

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 大島 崇彰

論 文 題 目

温度環境が農耕地土壌の絨毛虫群集の生態に及ぼす影響

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 村瀬 潤

委 員 名古屋大学教授 浅川 晋

委 員 名古屋大学教授 渡邊 彰

委 員 名古屋大学准教授 土井 一行

委 員 名古屋大学助教 西内 俊策

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1 - 2

繊毛虫は、海、河川、土壌などの様々な環境に生息する原生生物の一群である。土壌に生息する繊毛虫の多くは細菌、糸状菌および他の原生生物を餌として利用する捕食者であり、捕食を介して餌微生物の生態に影響を及ぼすとともに、土壌物質循環の促進にも寄与する。また、繊毛虫は土壌環境の状態を反映する指標生物として有用とされており、土壌環境の変化に鋭敏に応答を示す微生物群であると考えられる。温度は生物の生育や生残に影響を与える最も基本的な環境要因の一つである。温度の重要性は繊毛虫にとっても例外でなく、生育可能な温度範囲内では環境温度の上昇に伴って繊毛虫の増殖速度や捕食速度が増加することが明らかになっている。一方、先行研究では特定の分離株の低温域 (<30°C) における生育が主に解析されてきたが、農耕地土壌はそれよりも高温になる。また、温度は繊毛虫の種間相互作用にも影響を与えることが知られている。したがって、農耕地土壌に生息する繊毛虫に対する温度の影響を理解するためには、さらに広範な温度域における繊毛虫の生育・生残を、群集レベルで解析する必要がある。本研究では、培養に依らない分子学的手法と分離微生物を対象とした培養法により、温度環境が農耕地土壌の繊毛虫群集の生態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

温度環境に対する繊毛虫群集の感受性と回復力を明らかにすることを目的として、異なる温度条件 (10–60°C) で土壌を培養した後、繊毛虫を計数するとともに、土壌から DNA を抽出し、PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) により繊毛虫群集を解析した。繊毛虫の栄養細胞は、培養 14 日目では 10°C、20°C で検出されたが、30°C 以上の条件ではほとんど検出されず、培養 28 日目にはいずれの土壌でも栄養細胞はほとんど観察されなかった。DGGE バンドの数から推定した繊毛虫群集の多様性は、50°C 以上で大きく減少し、30°C と 40°C でも 10–20°C に比べて少なくなった。その結果、10–20°C、40°C、50°C、60°C の各温度条件で異なる群集を形成した。30°C 以上での培養は、大半の DGGE バンドの輝度低下をもたらしたことから、繊毛虫に抑制的にはたらいと考えられたが、40°C で優占度が高くなる DGGE バンドも観察され、この温度で生残あるいは活動する繊毛虫の存在が示唆された。また土壌繊毛虫の優占グループである Colpoda 綱は比較的高温に対する耐性が比較的高いと推察された。40°C および 60°C で処理した土壌を 20°C に移して繊毛虫群集の回復の過程を検証した。40°C 処理した土壌では 20°C での培養 90 日後には DGGE バンドの数の増加が認められ、20°C で培養を続けた対照土壌の群集に類似した。一方、60°C で培養した土壌では回復は認められず、繊毛虫群集が致命的なダメージを受けたと推察された。繊毛虫の温度に対する応答は糸状菌群集のものと同様であった一方、繊毛虫の主要な餌微生物である細菌群集はより高い耐熱性と回復力を示した。

DNA 安定同位体プロービング (DNA-SIP) 法により、異なる温度条件で捕食に関与する繊毛虫を特定するとともに、その群集構成に及ぼす温度の影響を解析した。<sup>13</sup>C 標識大腸菌を接種した土壌を 20、30、40°C で培養後、土壌より抽出した DNA を CsCl 密度勾配遠心により分画し、PCR-DGGE およびアンプリコンシーケンスにより大腸菌由来の炭素を取り込んだ繊毛虫群集を解析した。大腸菌の接種による群集構成の変化は認められなかったが、20°C と 30°C で培養した土壌と 40°C で培養した土壌とで異なる群集が形成されており、繊毛虫の群集構成は温度環境に

## 論文審査の結果の要旨

## 別紙 1-2

応答して変化することが確認された。いずれの温度条件でも繊毛虫が大腸菌由来  $^{13}\text{C}$  の取りこみが確認され、繊毛虫群集が大腸菌を捕食したと考えられた。 $^{13}\text{C}$  で標識された群集と分画前の群集の主要なメンバーは概ね一致しており、各温度条件下で優占する繊毛虫が大腸菌の捕食に関与したと推察された。 $^{13}\text{C}$  で標識された群集を温度条件間で比較した結果、 $20^{\circ}\text{C}$  と  $30^{\circ}\text{C}$  では Colpodea 綱や Spirotrichea 綱の繊毛虫をはじめとした多様な繊毛虫に近縁な配列が得られた一方で、 $40^{\circ}\text{C}$  では Colpodea 綱のうち Cyrtolophosididae 科に近縁を示す 1 配列が優占しており、限られた繊毛虫が  $40^{\circ}\text{C}$  に適応していると推察された。以上より、温度環境は捕食に関わる繊毛虫群集の構成に影響を与えること、 $40^{\circ}\text{C}$  のような比較的高温条件下でも捕食を行う繊毛虫が存在することが示された。

土壌から繊毛虫を分離し、異なる温度条件に対する応答を明らかにした。 $20^{\circ}\text{C}$  および  $40^{\circ}\text{C}$  で培養した土壌から、大腸菌を餌細菌に用いて同じ温度条件で繊毛虫を分離培養した。得られた繊毛虫株を異なる温度 ( $10-45^{\circ}\text{C}$ ) で培養し、顕微鏡観察により生育状況を経時的に追跡するとともに、培養終了時に細胞数を計測した。 $40^{\circ}\text{C}$  で培養した土壌からの分離株は、いずれも  $40^{\circ}\text{C}$  付近の温度で活発に増殖しシスト化の進行も早いことから、 $40^{\circ}\text{C}$  付近の温度に適応していると推察された。一方で、 $20^{\circ}\text{C}$  で培養した土壌からの分離株は、 $30^{\circ}\text{C}$  付近の温度で増殖およびシスト化の進行が早く、至適温度は  $30^{\circ}\text{C}$  付近と推察された。培養終了時の細胞密度を比較すると、 $40^{\circ}\text{C}$  で分離した繊毛虫は  $15^{\circ}\text{C}$  以下では増加しなかったのに対し、 $20^{\circ}\text{C}$  で分離した繊毛虫は  $15^{\circ}\text{C}$  まで増殖を示した。高温側については、 $40^{\circ}\text{C}$  で培養した土壌からの分離株は  $40^{\circ}\text{C}$  以上でも増殖したのに対し、 $20^{\circ}\text{C}$  で培養した土壌からの分離株は  $40^{\circ}\text{C}$  以上では増殖しなかった。また、同じ温度で分離した繊毛虫の間で増殖可能な温度範囲に差が見られた。異なる温度条件下で分離した繊毛虫の混合培養を行い、培養後の群集構成を PCR-DGGE 法により比較したところ、 $45^{\circ}\text{C}$  で輝度の高かった繊毛虫は  $35^{\circ}\text{C}$  以下では検出されなかった。 $45^{\circ}\text{C}$  で増殖可能だった繊毛虫は、単独では  $35^{\circ}\text{C}$  以下でも十分に増殖可能だったため、混合培養系では他の分離株の影響により増殖が抑制されたと考えられた。これらの結果から、農耕地土壌の繊毛虫群集は異なる生育温度範囲を持つメンバーから構成されており、個体生理の点では異なる繊毛虫が増殖可能な温度でも群集として存在する場合にはその一部が捕食者としての機能を発揮すると推察された。

以上のように、大島崇彰は、農地土壌に特有の温度環境が繊毛虫群集の多様性や捕食機能に果たす影響を分子生物学的手法、培養法の双方から初めて解析した。農地土壌には幅広い温度に対して異なる生育応答を示す繊毛虫が混合して生息していることを明らかにし、温度が土壌繊毛虫群集の多様性に影響を与える重要な環境要因であることを示した。また、土壌繊毛虫群集と細菌群集との温度応答の違いから、土壌の微生物食物連鎖の構造や機能に及ぼす温度の影響を指摘した。本研究の成果は、原生生物学分野において新規性、独自性に優れるとともに、繊毛虫の多様性とその生態学的意義を指摘したという点で土壌微生物生態学分野の学術研究に大きく貢献するものと考えられる。よって、本審査委員会は本論文の内容が博士（農学）の学位を授与するに十分であると判断した。