

氏名	綿貫 攻 <small>わたぬき おさむ</small>
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成 29 年 9 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	広義スミイボゴケ属 <i>Buellia</i> s. lat. 地衣類の分類体系の確立
指導教員	藤 晋一
論文審査委員	主査 藤 晋一 副査 小峰 正史 原 光二郎

論文内容要旨

背景

地衣類の一属であるスミイボゴケ属 *Buellia* (ピンゴケ目 Caliciales, ピンゴケ科 Caliciaceae) は, 原則として痂状の地衣体とレキデア型の裸子器をもち, ヒポテシウムは有色, 子嚢胞子は褐色で 2 室 (時に 4 室または石垣状多室), という特徴をもつ. スミイボゴケ属は全世界に分布し, 400 種以上が知られている. 時に属が細分化されることもあるがその評価は定まっておらず, 分子系統学的評価も一部を除き行われていない. 細分化された属を含め, 広義スミイボゴケ属 (*Buellia* s. lat.) とされている. 日本国内における *Buellia* s. lat. については, 19 世紀末から 20 世紀前半にかけて複数のヨーロッパの研究者による断片的な報告があるのみで, 系統的な分類学的研究はなされておらず, 詳細は不明である. 本研究では, *Buellia* s. lat. の分子系統解析に必要な手法の確立とともに, 多遺伝子座系統解析を用いて本属内の系統関係を明らかにすることを目的とした. また菌類における DNA バーコーディングのマーカとなる核リボソーム RNA コード遺伝子 (nrDNA) の内部転写スペーサー (Internal Transcribed Spacers including 5.8S nrDNA, ITS) 領域について, 日本産 *Buellia* s. lat. データベースの充実を図った.

分子系統解析技法の開発

遺伝子の塩基配列の決定に際し, *Buellia* s. lat. では, リボソーム RNA コード遺伝子 (含む ITS) と比較してタンパク質コード遺伝子における解析手法が未確立で目的とする配列を得にくい. そこで分子系統解析技法の構築を試みた.

日本各地で採集した標本と千葉県立中央博物館および秋田県立大学に収蔵されている標本, 計 134 点を用い, DNA の抽出を行った. 抽出した DNA は各遺伝子座 [ITS, 核リボソーム大サブユニット rRNA (nrLSU), ミトコンドリア小サブユニット rRNA

(mtSSU), RNA polymerase II largest subunit (*RPB1*), RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*)] ごとにポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行なった。なお, *RPB1* と *RPB2* はそれぞれ2つの保存領域 (*RPB1* [A-D]と *RPB1* [D-F], *RPB2* [5-7]と *RPB2* [7-11]) を対象とした。得られた PCR 産物は精製後, 本学バイオテクノロジーセンターにシーケンスを依頼した。リボソーム RNA コード遺伝子である ITS, nrLSU, mtSSU においては供試したサンプルの 90%以上で目的とする配列を増幅することができたが, タンパク質コード遺伝子である *RPB1*, *RPB2* においては PCR による増幅が認められないサンプルが多く, 配列を得られたものはいずれも 25%以下であった。この原因としてタンパク質コード遺伝子におけるプライマー設計領域の保存性が低く, プライマーの特異性が低いことが考えられたため, *RPB1*, *RPB2* おける PCR 技法の検討を行った。

まず nested-PCR の応用を試み, プライマーを開発した。全ての領域で改善がみられ, 特に *RPB2* [7-11]では顕著で, 約 90%のサンプルで配列を得ることができた。初期の条件で増幅が見られないサンプルについてはアニーリング温度を下げることで改善するサンプルもみられた。また, PCR に用いる DNA ポリメラーゼを変えることにより増幅が見られたサンプルもあった。Nested-PCR でも増幅の見られなかったサンプルについては, 配列の得られた近縁種のデータをもとに種特異的プライマーの開発を行い, 特に *RPB1* [A-D]において多くの配列を得た。この結果, 4 領域全てで 75%以上のサンプルで配列を得ることができた (図 1)。

以上の改良の結果より, *RPB1*, *RPB2* の増幅における Nested-PCR と種特異的プライマーの有用性が示され, *Buellia s. lat.*の属する Caliciaceae における解析済みの当該遺伝子配列数が大幅に増加した。また, DNA バーコーディングのマーカである ITS 領域においては, 新たに 32 分類群の配列を得た (図 2)。

***Buellia s. lat.*の分子系統解析**

新たに得られた配列に既知の配列を加え, 分子系統解析を行った。

初めに ITS 領域の分子系統解析によるグルーピングを行った。既知の配列を含めた *Buellia s. lat.* 139 点について最尤法を用いた系統推定を行った結果, 東アジア (主に日本) 産の標本は 27 種に区分された。形態・化学成分から, このうち 11 種をそれぞれヒメスミイボゴケ *Amandinea punctata*, *A. melaxanthella**, *Buellia bahiana**, *B. dialyta*, コウヤスミイボゴケ *B. elizae*, *B. erubescens**, *B. lauricassiae*, *B. pleiophoroides*, *B. cf. pleiotera**, *B. subnexa*, ヤマトスミイボゴケ *Sculptolumina japonica* と同定した (*日本初記載)。また, 4 種 (*B. numerosa*, *B. subnumerosa*, イソスミイボゴケ *B. yoshimurae*, *Sculptolumina* sp.) は新種であった。加えて, 未同定の 12 種の中には, さらに新種が含まれる可能性が示された。

次いで多遺伝子座系統解析を行った。Caliciales に属する 38 種 45 サンプルについて, 5.8S nrDNA, nrLSU, mtSSU, *RPB2* [5-7], *RPB2* [7-11]の 5 領域 (5-locus) を基に最尤法で系統を推定し, ブートストラップ値により信頼性を検証した。また, 近隣接合法でも内部枝を評価した。加えて *RPB1* [A-D], *RPB1* [D-F]を加えた 3 種類のデータセ

ット (5-locus+*RPB1* [A-D], 5-locus+*RPB1* [D-F], 7-locus) についても同様に系統推定と信頼性の検証を行った。その結果, *Buellia* s. lat.の単系統性が再確認され, さらに内部が4つの Subclade (A1, A2, B1, B2) から構成されることが明らかとなった。これまでに細分化されていた属ではヒメスミイボゴケ属 *Amandinea* とヤマトスミイボゴケ属 *Sculptolumina* は Subclade A1 に属し, Subclade A2 には *Cratiria* が含まれた。Subclade B1 は *Chrismofulvea* と狭義スミイボゴケ属 (*Buellia* s. str.) で構成され, Subclade B2 には *Gassicurtia* と *Dimelaena* が含まれた (図3)。

多遺伝子座系統推定の結果に既知の系統樹および ITS 領域解析の結果から信頼性の高い種を加え分岐図を作成した。これに表現型として生態 (基物), 化学成分, 形態 (子嚢層, 子嚢胞子, 粉子) の形質を加えて比較し, 各クレードの分類形質を探った。その結果, Subclade A1 は主に線形の粉子をもち, 地衣成分に乏しいという共通した特徴をもつため, *Amandinea*-group と定義した。*Amandinea* と *Sculptolumina* は胞子の特徴により明確に区別され, 両者は姉妹群関係をもつ独立した属とすることが妥当であると考えられた。ただし, *Amandinea* の範囲については引き続き検討が必要であると考えられた。Subclade A2 には *Buellia* s. lat.において化学成分が特徴である *Tetramelas* が含まれることが示唆された。*Tetramelas* を除く Subclade A2 は多少とも区画化する地衣体をもち, 化学成分においてアトラノリンおよび大多数が β -オルチン系メタデプシドンのいずれか (フマールプロトセトラール酸, スチクチン酸, ノルスチクチン酸) を伴うことで特徴的であるが, これらの形質は他の系統でもみられ, Subclade A2 の分類形質とは言い難かった。*Cratiria* の再評価には至らなかった。Subclade B1 は *Buellia* s. str.を含み, *Buellia* s. str.-group と定義した。*Buellia* s. str. は分子系統的に強固で, 子嚢層に油滴を含み (inspersed), 胞子は *Callispora*-type であることで, 形態的にも特徴的である。*Chrismofulvea* の分類形質の1つであるフマールプロトセトラール酸は他の系統からも検出されたため, 属の定義の検討が必要である。Subclade B2 には *Buellia* s. lat.において形態的な特徴が際立つ2種が含まれた。これらの系統関係についても再検討が必要である。なお, *Gassicurtia* と *Dimelaena* の再評価はできなかった。

総括

菌類の DNA バーコーディングマーカーとして用いられる ITS 領域の配列を多数得ることができた。これは, 今後の同定作業や DNA による群集構造解析に有用である。また, Caliciaceae の *RPB1*, *RPB2* の増幅に用いる Nested-PCR 用プライマー, 種特異的プライマーを開発し, その有用性を実証した。この手法は他の分類群や遺伝子座への応用が可能で, DNA 配列解析の進展が期待される。前記の結果を用いた多遺伝子座系統解析により, *Buellia* s. lat.が4つの系統に分かれることを初めて示し, 地衣類において多遺伝子座系統解析が分類体系を構築する上で極めて有効であることを確認した。また, *Buellia* s. lat.から細分化された属のうち, *Amandinea* と *Sculptolumina* は分子系統および表現型から独立した属と認められ, 両者は姉妹群の関係にあることを明らかにした。また, *Buellia* s. str.の単系統性が分子系統からも裏付けられた。

以上の結果から、*Amandinea*, *Sculptolumina*, *Buellia* s. str.を認めると Subclade B1 に属する種の属名変更が必要となり、*Buellia* s. lat.の分類に混乱をきたすおそれが生じると考えられる。これを解決するために、基準種を変更し Subclade B1 を *Buellia* と再定義し、*Buellia* s. str.を *Hafellia* とすることを提案したい。*Buellia* の基準種変更の提案 (Moberg *et al.* 1999) は1度却下されている (Gams 2004) が、分子系統の情報が考慮されておらず、今回の結果を踏まえ、再考する意義があることを見出した。そのためには全世界的なサンプリングと系統解析が必要で、本研究による分子系統解析技法が生かせるものと考えられる。

引用文献

- Gams W. 2004. Report of the Committee for Fungi: 11. *Taxon* 53: 1067–1069.
- Moberg R., Nordin, A. & Scheidegger, C. 1999. (1384) Proposal to change the listed type of the name *Buellia*, nom. cons. (Physciaceae, lichenised Ascomycota). *Taxon* 48: 143.

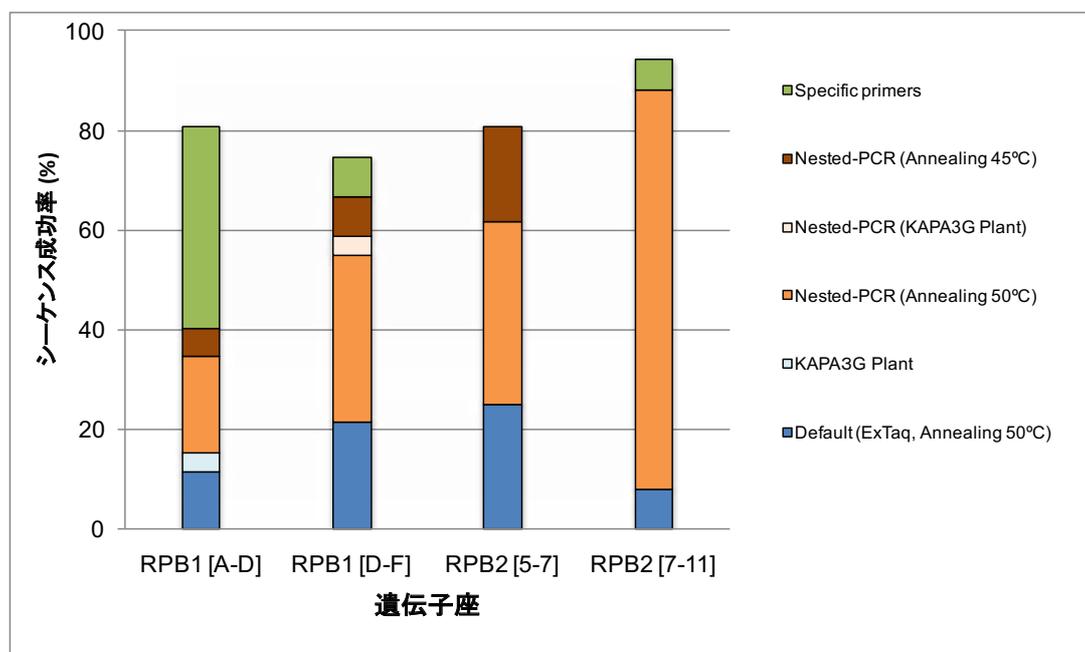


図1 *RPB1*, *RPB2* におけるシーケンス成功率 (シーケンス完了サンプル数/供試サンプル数) の改善.

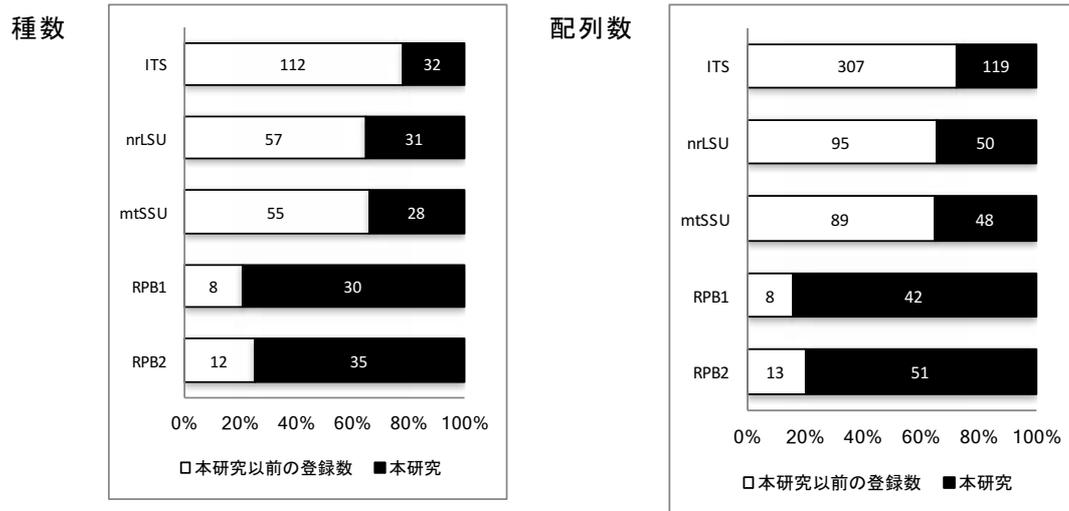


図2 Caliciaceae の遺伝子配列データベースにおける新規配列の割合.

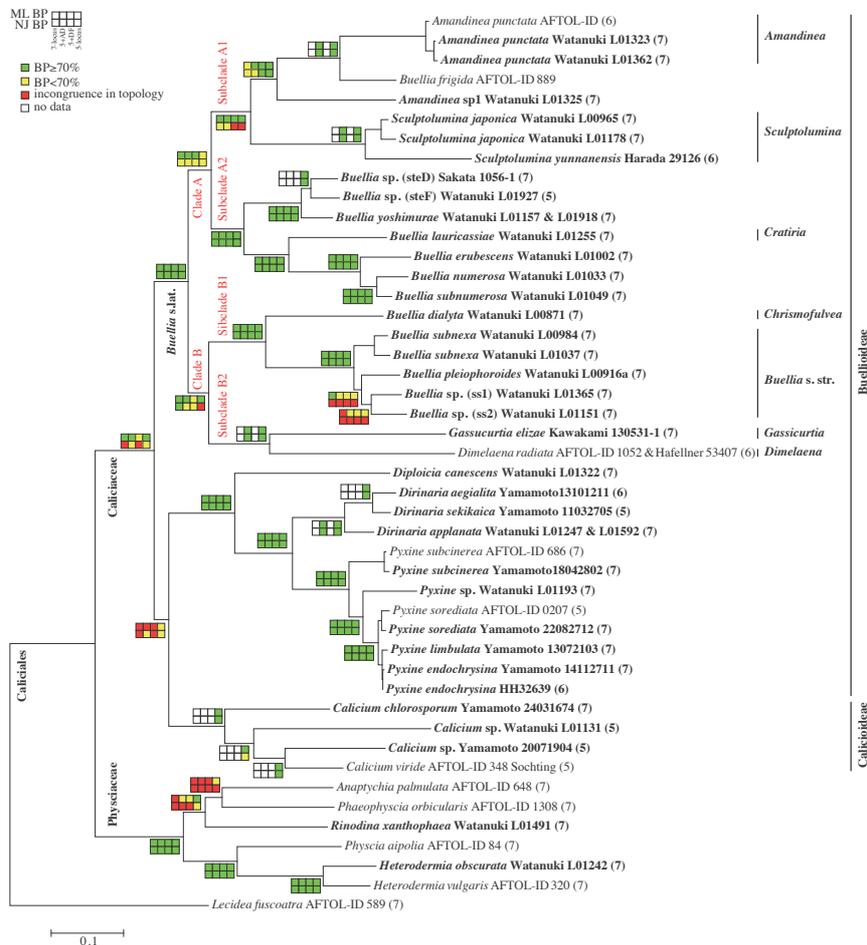


図3 多遺伝子座系統解析による Caliciales の分子系統. 5-locus データセットに基づき最尤法により推定しブートストラップ値により信頼性を検証した. 内部枝の信頼性は近隣接合法でも検証し, 5+AD, 5+DF, 7-locus, 各データセットにおいても同様に内部枝の信頼性を検証した.

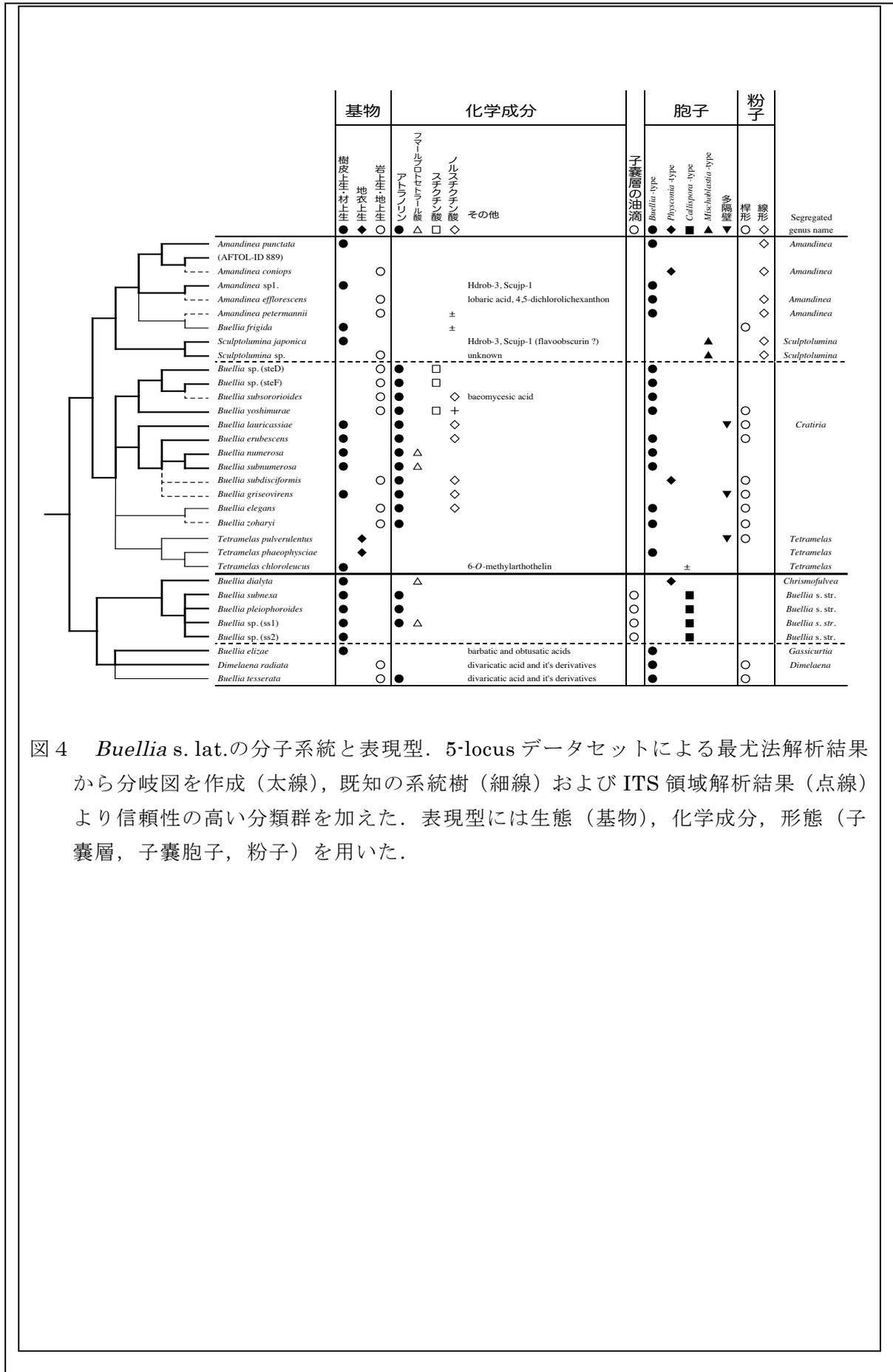


図4 *Buellia* s. lat.の分子系統と表現型. 5-locus データセットによる最尤法解析結果から分岐図を作成 (太線), 既知の系統樹 (細線) および ITS 領域解析結果 (点線) より信頼性の高い分類群を加えた. 表現型には生態 (基物), 化学成分, 形態 (子嚢層, 子嚢胞子, 粉子) を用いた.

論文審査結果要旨

本論文では分子分類体系が確立していない地衣類の広義スミイボゴケ属 *Buellia* s. lat. について、ITS 領域を用いた pairwise distribution 解析による分子分類手法を確立し、新種記載への道筋を構築した。上記分子分類と形態的特徴等に基づいて 3 種を新種として、1 種を本邦発記載として学術誌に記載することができた。

一方で、*Buellia* s. lat. は ITS 領域のみで系統解析を行った場合、系統樹の枝の信頼性が極めて低く、分子分類に汎用的に用いられる ITS 領域のみでは、*Buellia* s. lat. 内での系統関係を明らかにすることが困難であった。そこで、地衣類の分子系統解析に広く用いられている、ITS 領域を含む核リボソーム大サブユニット rRNA (nrLSU)、ミトコンドリア小サブユニット rRNA (mtSSU) と RNA polymerase II largest subunit (*RPB1*), RNA polymerase II second largest subunit (*RPB2*) に着目、既存の配列情報からのプライマーの再設計や Nested PCR 等を利用してこれら遺伝子領域の配列決定を進めるための技術を確立した。

決定した 5 遺伝子座の塩基配列に基づいて、Caliciales に属する 45 点の多遺伝子座系統解析を行ったところ、*Buellia* s. lat. の単系統性であることを再確認した。さらに内部が 4 つの Subclade (A1, A2, B1, B2) で構成されることが示された。これら Subclade 内それぞれについて形態学的特徴および化学成分との関連性、共通性を解析したところ、多遺伝子座分子系統解析が *Buellia* s. lat. の系統関係を明らかにする上で極めて有効であることを明らかにした。

これら解析結果と形態的特徴等の表現系に基づいて、*Buellia* s. lat. から細分化されている属のうち、*Amandinea* と *Sculptolumina* は分子系統および表現型から独立した属とすべきであり、両者は姉妹群の関係にあることを明らかにした。また、*Buellia* s. str. の単系統性を分子系統から裏付けた。この結果に基づくと、1. *Amandinea*, *Sculptolumina* に属する種については属名の変更が必要となること。2. Subclade B1 を *Buellia* と再定義し、*Buellia* の基準種が含まれる *Buellia* s. str. を *Hafellia* に改めることが妥当であるという新たな提案を行った。

博士学位論文発表は 8 月 22 日 (火) 16 時 00 分からおよそ 1 時間にわたって行われた。発表の導入部分では、地衣類の専門外の人にもわかりやすい発表に心がけ、特に研究対象とした *Buellia* s. lat. の分類体系が混乱状況にあることについて、これまでの経緯をわかりやすく説明、本論文の目的と研究の必要性とそれを解決するための研究手法についてきちんと説明された。具体的な研究成果の報告後、分子分類結果と形態的特徴等表現系に基づいて、新たな分類体系と属名の修正の必要性を提唱した。発表後の質疑応答についても、的確な返答がなされており、学位取得後は地衣類の分類を中心とした博士として、引き続き研究を行うとともに、共同研究者等との地衣類図鑑の作成といった将来の展望をしっかりと持っていた。

以上のことを踏まえ、博士の学位を授与するに妥当であると判定した。