

## (研究科様式 博7添付)

氏名	坂田 歩美
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成26年 9月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
学位論文題目	日本産リトマスゴケ科地衣類の分類学的研究—樹皮着生及び岩上生種—
論文審査委員	主査 山本 好和 副査 藤 晋一 小峰 正史 特別 原 光二郎

## 論文内容要旨

※ページ数は3頁以上(図表を含む)とする。

地衣類は、二次代謝産物から様々な薬理活性が報告されるなど、既に経済的な価値が認められつつあり、将来は更に多くの有用な研究が期待できる。しかし、分類が明らかになっていないため、このような研究の対象となっていない科・属が多い。リトマスゴケ科は正にそのような科のひとつである。関東平野以西の低地(暖温帯)に高頻度で出現するにもかかわらず、日本産本科の情報は断片的に過ぎない。そこで、本研究では日本産リトマスゴケ科(Roccellaceae)について、形態・化学成分を詳細に検討し、分類を解明し、これを分子系統解析で評価する。しかし、地衣類の重要な分類形質とみなされる子器の内部形態に関して、本科も含め研究者により組織の定義や用語の使い方が異なるため大きな混乱を招いていた。そこで、リトマスゴケ科以外とも比較しつつ、各組織を定義し、用語の統一を図る。更に、子器はほとんどの科内では概ね構造が同一であるのに対して、本科では子器の主要3型が見られるなど、極めて多様であること(Fig. 1)が特筆に値する。そこで、日本産本科における子器を詳細に観察、比較し、形態に基づく類型化を試みる。さらに、分子系統と子器の形態形質との関係を検討する。

1988年から2014年にかけて採集され、千葉県立中央博物館に所蔵されている標本約400点を用いた。外部形態は、乾燥標本を実体顕微鏡下で観察した。内部形態は、実体顕微鏡下で乾燥標本からカミソリを用いてフリーハンドにて子器の縦断切片等を切り出し、プレパラート(GAW標本とLPCB標本、KI標本)を作製し、生物顕微鏡下で観察した。化学成分分析はアセトン抽出物をTLCとHPLC-PDAで分析した。分子系統解析は日本産種7属13種と外国産種のmtSSU領域の約1400塩基対を用いて実施した。

## 1. 子器の形態と多様性

裸子器の代表型であるレカノラ型、レキデア型、ピアトラ型について、リトマスゴケ科以外の*Lecanora megalocheila*、*Parmelia laevior*、*Bacidia hakonensis*、*Coenogonium pineti*の子器をLetrouit-Galinou (1968)とKirk *et al.* (2001)の概念に準拠し、各組織を再定義した。その結果、レカノラ型の亜型としてLecanora-typeとParmelia-typeを新たに認めた(Fig. 3)。また、レキデア型とピアトラ型を認めた。裸子器のもう一つの代表型とされるゼオリン型は今後使うべきでないと結論づけた。

本科の裸子器については日本産該当種全種の各組織を同様に定義した。これまで、定義がまちまちであった子囊下層とヒポテシウムについて統一した。*Roccellina niponica*と*Schismatomma ocellulatum*の果托については*Lecanora megalocheila*の子器と比較した結果、これと同様に子器由来のアンフィテシウムであることが明らかになった(Fig. 2)。さらに、日本産本科のレカノラ型裸子器を、レカノラ型の亜型のSchismatomma-type、Mazosia-typeとして新たに区別した(Fig. 3)。Cresponea属の裸子器は*Bacidia hakonensis*と同じレキデア型であることを初めて認めた。リレラは、裸子器の結果を受け、更に初期発生の観察に基づき、各組織を定義した。従来果殻とされていた組織は、菌糸の走行がレキデア型の果殻とは異なることから後者とは区別し、さらに、菌糸の走行と発生の違いに基づき、Opegrapha-type果殻、Graphidastra-type果殻、Enterographa divergens-type果殻を定義した(Fig. 3)。さらに、*Graphidastra japonica*の果托が地衣体由来であることを明らかにした。リレラには型あるいは亜型は報告されていないため、本科内のみで比較検討を行い、Opegrapha-typeをはじめ7亜型を新たに認めた(Fig. 3)。被子器は1種のみしか認められなかったため、通常使われている用語を用いて、詳細に観察・記載した。ストロマはリレラ

の子器を生じる *Chiodecton congestulum* と被子器の *Dichosporidium boschianum* に認められた。以上により、リトマスゴケ科における子器を以下のとおり類型化できた。

裸子器ーレカノラ型： Schismatomma-type、Mazosia-type、(Graphidastra-type)\*\*、レキデア型、リレラ： Opegrapha-type、Enterographa anguinella-type、Enterographa divergens-type、Enterographa leucolyta-type、Graphidastra-type、Sclerophyton-type、Chiodecton-type、被子器： Dichosporidium-type、ストロマ： (Chiodecton-type)\*\*、(Dichosporidium-type)\*\*

\*\*Graphidastra-type は基本的にはリレラだが、若い子器は円形で果托があり、レカノラ型 Chiodecton-type の子器はリレラ、Dichosporidium-type の子器は被子器だが、複数の子器が集合してストロマに埋もれる。

## 2. 日本産リトマスゴケ科の分類

本研究で日本産本科の樹皮着生種と岩上生種を検討した結果、10 属 23 種を認めた。このうち 2 種 (*Cresponea japonica*、*Graphidastra japonica*) は新種、3 種 [*Cresponea macrocarpoides*、*Opegrapha bonplandii*、*Sclerophyton elegans*] は日本新産である。従来論文では種の特徴を知るための記載・図が必ずしも十分ではなかったため、扱った全種について詳細な記載と図(解剖図を含む)をまとめた。*Cresponea* 属においては、粉霜の分布と若い子器の形が種を分ける分類形質として重要であることが初めて明らかになった (Fig. 4)。これによって、本属の種を外部形態によって区別できることを初めて明らかにした。

## 3. 日本産リトマスゴケ科の化学成分

本研究で日本産本科の化学成分を TLC と HPLC により分析した結果、12 成分が同定された。さらに、TLC により未同定成分 7 種類と未同定黄色色素、HPLC により未同定成分 19 種類が検出された。検出された化学成分を以下に示す。confluentic acid、glyphoric acid、lecanoric acid、lichesterinic acid、roccellic acid、protocetraric acid、protolichesterinic acid、psoromic acid、salazinic acid、schizopeltic acid、stictic acid、2'-*O*-demethylpsoromic acid、未同定成分 (1-7、G1-3、C1-C7、E3-E11、R1)、未同定黄色色素。一部の化学成分は属・種を分ける分類形質として有効であることを確認した。*Graphidastra japonica* は schizopeltic acid を含むことから、これを分類形質の一つとして評価し、新種記載した。日本産 *Cresponea* 属 3 種 (*C. japonica*、*C. macrocarpoides*、*C. proximata*) の未同定成分が種間及び他属とは異なることを示し、本属において化学成分が分類形質として有効であることを初めて明らかにした。

## 4. リトマスゴケ科の分子系統解析と形態形質 (Table 1)

リトマスゴケ科内にブートストラップ確率で有意に支持された 6 つのクレードが認められた。分子系統解析により、*Enterographa* と *Opegrapha* s. lat. の各属は多系統であることが示唆された。両属においてタイプ種とは別のクレード位置づけられた 12 種は別の属に移すことが妥当と考えられた。クレード F に位置づけられる *Cresponea* は分子進化学的に古い時代に他から分岐したことが示唆された。認められた 6 クレードのうち、5 つのクレードにリレラ (子器の一主要型) が認められたことから、これは共通の祖先が持っていた形質であると考えられた。2 つのクレード (D と E) は、複数の子器のタイプが認められるため、子器のタイプは本科内を大きく分けるには有効な形質ではないことが明らかになった。リレラの *Opegrapha*-type 以外の子器のタイプは、単一のクレードにのみ出現するため、属を定義するには有効であることが示唆された。リトマスゴケ科はそれぞれのクレード内で分化が平行的に進んだ結果、多様な子器を生じるようになったと考えられた。分子系統と形態形質の関係を検討した結果、子器のタイプとヒポテシウム、側糸状体、子嚢胞子の外膜が多く属を分ける形態形質として有効だと考えられ、日本産本科においては複数の形態形質を組み合わせることで形態からも属や亜群を定義することが可能であることが初めて示された。Ertz & Tehler (2011) は、形態的特徴と化学成分は科や属を定義する際にわずかにしか役立たないとしたが、それは形態形質を正確に観察し、比較検討していないためであると推測された。国外産種についても詳細な形態観察を行い、分類を再検討することが必要と考えられた。

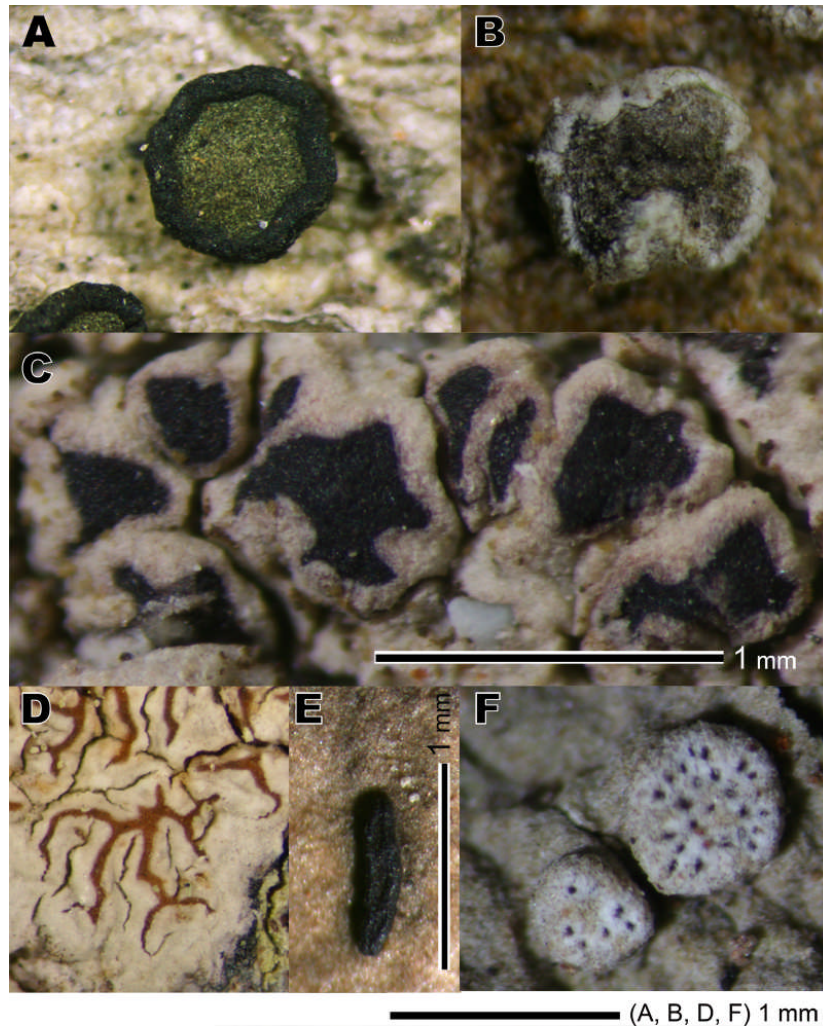


Fig. 1. 日本産リトマスゴケ科の多様な子器。 A, レキデア型裸子器。 B, レカノラ型裸子器。 C-E, リレラ。 F, 被子器 (ストロマ)。 A, *Cresponea macrocarpoides*; B, *Roccellina niponica*; C, *Graphidastrea japonica*; D, *Enterographa anguinella*; E, *Opegrapha varia*; F, *Dichosporidium boschianum*. (乾燥標本)。

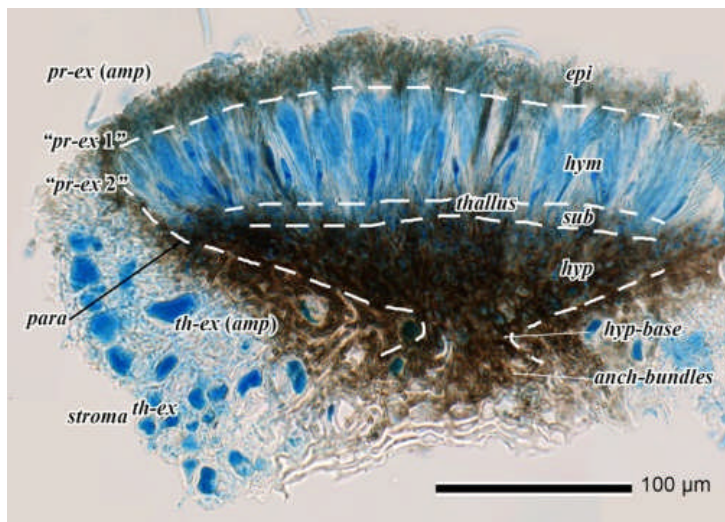
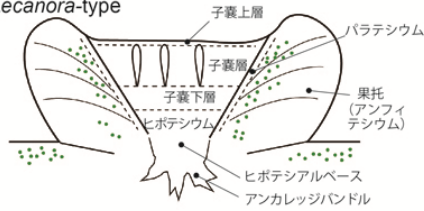


Fig. 2. *Schismatomma ocellulatum* の子器縦断面。(LPCB 標品)。 (epi)、子囊上層; (hym)、子囊層; (sub)、子囊下層; (hyp)、ヒポテシウム; (hyp-base)、ヒポテシアルベース; (anch-bundles)、アンカレッジバンドル; (para)、パラテシウム; (amp)、アンフィテシウム; (th-ex), 果托。

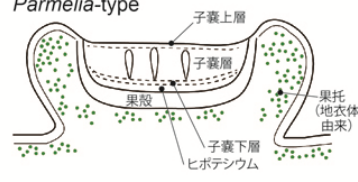
# 裸子器

## レカノラ型

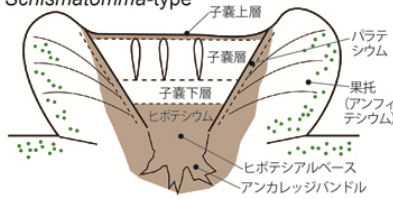
### Lecanora-type



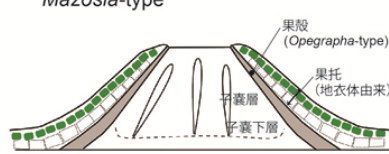
### Parmelia-type



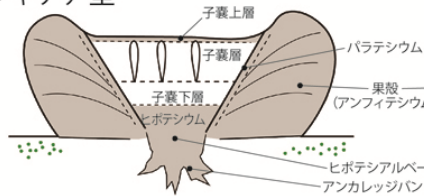
### Schismatomma-type



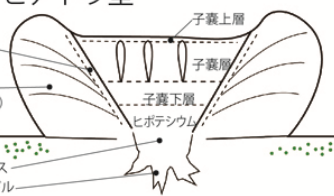
### Mazosia-type



## レキデア型

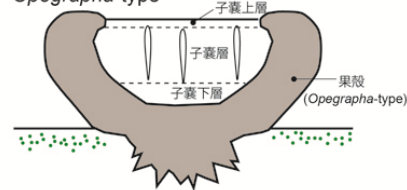


## ビアトラ型

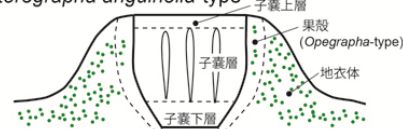


# リレラ

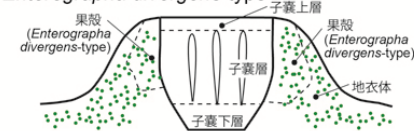
### Opegrapha-type



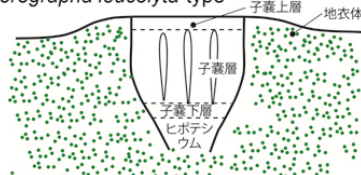
### Enterographa anguinella-type



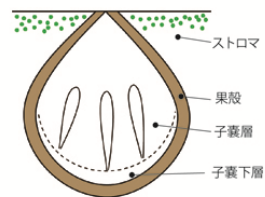
### Enterographa divergens-type



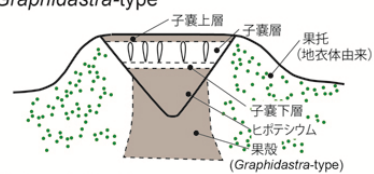
### Enterographa leucolyta-type



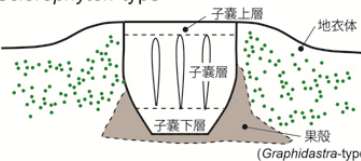
# 被子器



### Graphidastra-type



### Sclerophyton-type



### Chiodecton-type

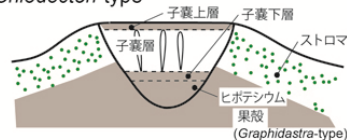


Fig. 3. 日本産リトマスゴケ科における裸子器（レカノラ型、レキデア型、ビアトラ型）（縦断面）とリレラ（横断面）の内部形態、被子器（縦断面）（模式図）。

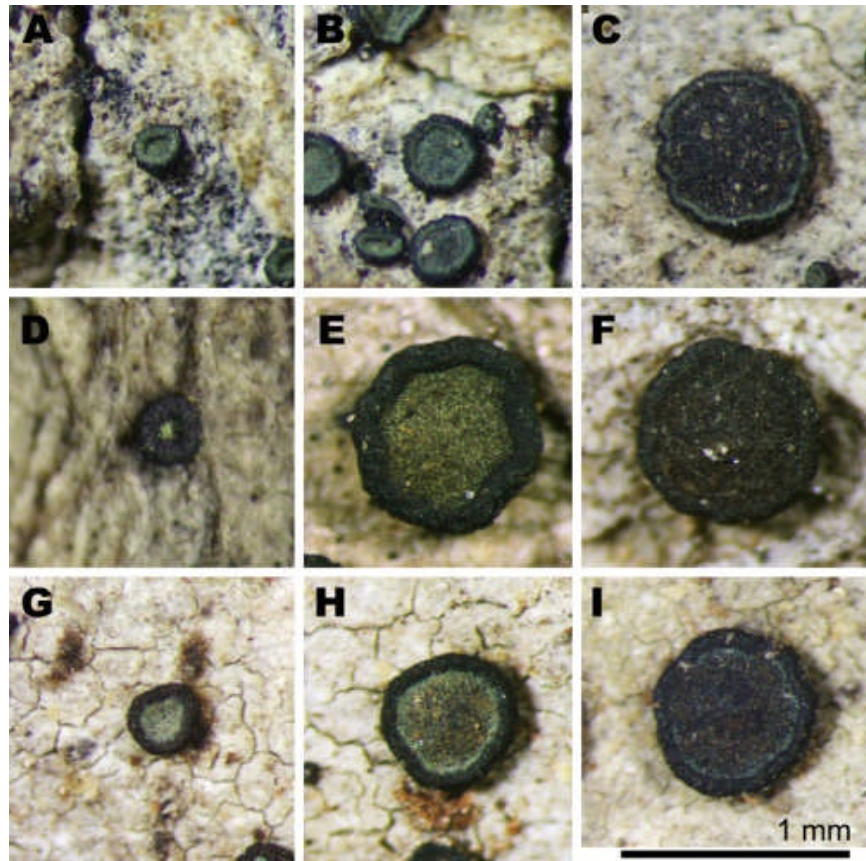


Fig. 4. *Cresponea* 属 3 種における様々な発生段階の子器。若い子器の縁部の形態と、黄褐色から青色を帯びた黄緑色の粉霜の分布と消失が種間で異なる。A-B, *Cresponea japonica*. D-F, *Cresponea macrocarpoides*. G-I, *Cresponea proximata*. (乾燥標本)。

Table 1. 形態形質と分子系統

クレード	種	子器			ストロマ	ヒポテシウム	側系状体		子嚢胞子の外膜
		主要型	型	type			分枝	先端の細胞壁の着色	
A	<i>Enterographa anguinella</i>	リレラ		<i>Enterographa anguinella</i> -type	-	-/+	よく分枝	-	+
B	<i>Opegrapha bonplandii</i>	リレラ		<i>Opegrapha</i> -type	-	-	よく分枝	-	+
B	<i>Opegrapha varia</i>	リレラ		<i>Opegrapha</i> -type	-	-	よく分枝	-	+
D	<i>Chiodecton congestulum</i>	リレラ		<i>Chiodecton</i> -type	+	+	概ね単一	+	-
D	<i>Schismatomma ocellulatum</i>	裸子器	レカノラ型	<i>Schismatomma</i> -type	-	+	概ね単一	+	-
D	<i>Graphidastra japonica</i>	リレラ (裸子器)	(レカノラ型)	<i>Graphidastra</i> -type	-	+	概ね単一	+	-
E	<i>Dichosporidium boschianum</i>	被子器		<i>Dichosporidium</i> -type	+	-	よく分枝	-	-
E	<i>Enterographa divergens</i>	リレラ		<i>Enterographa divergens</i> -type	-	-/+	よく分枝	-	-
F	<i>Cresponea japonica</i>	裸子器	レキデア型		-	+	概ね単一	+	-
F	<i>Cresponea macrocarpoides</i>	裸子器	レキデア型		-	+	概ね単一	+	-
F	<i>Cresponea proximata</i>	裸子器	レキデア型		-	+	概ね単一	+	-
(G)	<i>Opegrapha</i> sp.	リレラ		<i>Opegrapha</i> -type	-	-	よく分枝	-	+

## 論文審査結果要旨

※単独ページとする。

地衣類は二次代謝産物から様々な薬理活性が報告されるなど、将来は更に多くの有用性が期待できる材料である。しかし、分類が明らかになっていないため、研究対象となっていない科や属が大変多い。リトマスゴケ科は正にそのような科のひとつである。関東平野以西の低地（暖温帯）に高頻度で出現するにもかかわらず、日本産本科の情報は断片的に過ぎない。また、地衣類の重要な分類形質とみなされる子器の内部形態に関して、本科も含め研究者により組織の定義や用語の使い方が異なるため大きな混乱を招いていた。

本研究は、①リトマスゴケ科以外とも子器の内部形態を比較しつつ、各組織を定義し、用語の統一を図り、②その結果を基に日本産本科における子器を詳細に観察、比較し、形態に基づく類型化を行い、③形態・化学成分を詳細に検討し、分類を解明し、これを分子系統解析で評価したものである。

①地衣類の子器、裸子器の代表型であるレカノラ型、レキデア型、ビアトラ型について、その代表的な地衣材料を用いてその子器の内部形態を観察した結果、Letrouit-Galinou (1968) と Kirk *et al.* (2001) の概念に準拠することが適切と判断し、その上で各組織の定義を明確にした。さらに、レカノラ型の亜型として Lecanora-type と Parmelia-type を新たに認めた。また、レキデア型とビアトラ型を認める一方、ゼオリン型は今後使うべきでないと結論づけた。

②子器はほとんどの科内では概ね構造が同一であるのに対して、本科では子器の主要3型が見られるなど、極めて多様である。そこで、本科の子器構造を詳細に観察し、各組織を再定義した。本科のレカノラ型子器を有する種について詳細に比較した結果、レカノラ型の亜型の Schismatomma-type、Mazosia-type を新たに区別した。本科のリレラ型子器構造を比較した結果、Opegrapha-type をはじめ7亜型を新たに認めた。以上により、リトマスゴケ科における子器を、裸子器－レカノラ型2亜型、レキデア型、リレラ型7亜型、被子器－1亜型、ストロマー2亜型に初めて類型化できた。

③日本産本科の樹皮着生種と岩上生種を検討した結果、10属23種を認めた。このうち新種は2種、日本新産は3種である。Cresponea においては、粉霜の分布と若い子器の形が種を分ける分類形質として重要であることを初めて明らかにした。一部の化学成分は属・種を分ける分類形質として有効であることを明らかにした。分子系統と形態形質の関係を検討した結果、子器のタイプとヒポテシウム、側糸状体、子嚢胞子の外膜が多くの属を分ける形態形質として有効だと考えられ、日本産本科においては複数の形態形質を組み合わせることで形態からも属や亜群を定義することが可能であることを初めて示した。

地衣類、特に痲状地衣類は分類形質が少なく、そのため分類することが難しい材料である。中でも日本産のリトマスゴケ科について分類学的な研究はほとんどなく、本研究が実質的に初めての分類関係の論文となる。また、混乱していた子器の内部形態に関する概念についても、詳細に検討が行われ、統一化が図られたことは地衣分類学にとって大きな貢献となる。統一された概念を日本産本科に応用したことと合わせ、本研究によって日本産本科のほぼ全貌が明らかとなったことは、国内地衣研究者にとっては大きな朗報である。2014年8月27日に開催された公開審査会ならびにその後行われた非公開審査会において、発表内容とともに発表能力や質疑応答能力についても検証を加え、十分な発表内容と能力を有していると確認できた。以上の審査結果から審査委員一同は博士の学位を授与するに値すると判断した。