

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：64303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03324

研究課題名(和文) 花圏に優占するスフィンゴモナス属細菌の植物との共生関係と地理的変異

研究課題名(英文) Associations between plants and bacteria (*Sphingomonas* spp.) dominated on the anthosphere and their geographic variation

研究代表者

酒井 章子 (Sakai, Shoko)

総合地球環境学研究所・研究基盤国際センター・客員教授

研究者番号：30361306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では雌雄異株植物アカメガシワの雌個体の柱頭に優占する *Sphingomonas* 属細菌に注目し、これらと宿主植物の相互作用について検討を行った。同じ調査地で複数年にわたって調査を行うと、*Sphingomonas* 属の種類や優占度は、年によって異なっていた。サンプリング地点によっても細菌叢は異なっていたが、当初期待していたような明確な地理的なパターンは見られなかった。一方、*Sphingomonas* 属細菌を柱頭に接種することによって種子内部の微生物組成が変化した。これらの結果から、花の表面の微生物は宿主と密接な関係を築いているわけではないが、植物の適応度に大きな影響を及ぼしていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで植物と地下微生物の相互作用については、進化・生態学重要性和食物生産上の観点から盛んに調べられて来た。一方、植物繁殖器官上の微生物群集やそれらの繁殖成功への影響は、ほとんど顧みられて来なかった。花は一般に寿命が短く微生物叢は重要でないと考えられてきたこと、種子にはほとんど微生物がないと考えられてきたことが、その背景にあると考えられる。本研究では、野生植物の花・種子上の微生物と宿主植物の関係に焦点をあて、送粉者によって運ばれる細菌の潜在的インパクト、雄雌の差、年変動や地理的変異を明らかにした。繁殖器官上の微生物は、植物の繁殖成功に大きな影響を与える重要な要素であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research focused on *Sphingomonas* bacteria dominating on the stigmas of female *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae) and explored their interaction with the host plants. We found that the composition of *Sphingomonas* on the stigmas changed across flowering seasons at the same sampling site. While the bacterial composition also differed among the sampling sites, there was no clear geographical pattern as anticipated. *Sphingomonas* bacteria are also found as seed endophytes of the host plant. Our inoculation experiment suggested that *Sphingomonas* bacteria on the stigmas affect the endophyte compositions and diversity of the resultant seeds. In summary, this study showed that microbes on flower can impact the next generation through the transmission of seed endophytes, whereas their association with the host plant may be rather stochastic.

研究分野：生態学

キーワード：送粉 細菌 アンブリコンシーケンシング 微生物叢

## 1. 研究開始当初の背景

近年、急速な DNA 配列解析技術の進歩によって微生物叢（主に真菌・細菌）を網羅的に調べることが可能になり、植物表面には、地下（根圏、**Rhizosphere**）のみならず地上部であっても膨大な数の微生物が存在することがわかってきた。とくに葉については急速に研究が進み、葉表面（葉圏、**Phyllosphere**）には植物の種や遺伝子型に応じた共生微生物が棲息し、耐病性や成長に寄与していることが報告されている。たとえば、葉圏には多数のメタノール資化性の *Methylobacterium* 属細菌が棲息し植物から放出されるメタノールを利用する一方、植物の生長を促進し、植物と共生関係にある。この細菌は、種子を通じ次世代に伝えられる。葉圏微生物叢やその機能は、植物の種や遺伝子型により異なることから、植物の延長された表現型として選択を受け進化してきたと考えられている。

それに対し、繁殖器官である花表面（花圏、**Anthosphere**）の微生物叢の研究は非常に少ない。花圏微生物は、花香や花蜜の成分を変化させるなど花の形質に影響を与えうるものの、それらの植物の適応度への影響は、送粉者との相互作用を介しており状況依存的である [4]。また、花は葉より短命であることから、花圏微生物叢は日和見的な微生物の集合で、花圏微生物が花の進化に及ぼしてきた影響は限定的だと考えられてきた。

しかし研究代表者は、花でも微生物感染を防ぐ色々な仕組みが報告されるようになってきたことから、花圏微生物叢も花の進化に重要な役割を果たしてきたのではないかと考えた。花粉の授受を達成するためさまざまな仕組みを備えた花は、結果として訪花者や空気感染によってもたらされる多数の微生物にも暴露されている。しかも花には、花粉の発芽床となる柱頭、送粉者への報酬となる蜜など、微生物の増殖・成長に必要な水分や養分を含んだ組織がある。これらの組織が微生物によって大きな影響を受けるようなことがあれば、花粉散布や種子生産を通じて植物の適応度を大きく左右する。根圏微生物や葉圏微生物に見られるように、花圏微生物の中にも植物と強い相利共生関係を築き、花の延長された表現型として進化してきたものがあるのではないだろうか。

研究代表者らは、滋賀県の調査地で、雌雄異株のトウダイグサ科アカメガシワの雌花に、*Sphingomonas* 属細菌がときに全細菌の 9 割を占めるほど優占することを見出した。葉圏・花圏微生物叢で特定の細菌群がこれほどまでに優占する例は、ほとんど報告はない。そこで、この系が、花圏微生物と植物の強い共生関係を見出すための格好の材料だと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の 3 つの問に答えることを目的とする。

- ① *Sphingomonas* 属細菌はどの程度安定してアカメガシワ柱頭上で維持されるのか
- ② *Sphingomonas* 属細菌に地理的変異は見られるか
- ③ *Sphingomonas* 属細菌を含むアカメガシワ柱頭上に見られる細菌は、種子に伝播し、微生物叢に影響を与えるのか。

## 3. 研究の方法

### サンプリング

花のサンプリングは、6 月にフィールドで花序からアルコール滅菌したピンセットを用いて、一つずつサンプリングし、同じ花序由来の 5 花を 1 サンプルとした。

種子は、フィールドで果序をサンプリングし、それぞれの個体の別果序から 5 個の種子を分析対象とした。種子は次亜塩素酸を含んだ蒸留水につけて表面殺菌し、蒸留水で洗浄後、破碎したのち細菌 DNA を抽出した。

### 16S rRNA の V4 領域のアンプリコンシーケンス解析

各試料を 5ml のマイクロチューブに入れ、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS 緩衝液) 3ml を加えた。超音波分散を用い、50 %の出力で 30 秒間、サンプル表面から微生物を剥離した。その後、ホモジナイズし、Millipore Sterivex (GP 0.22  $\mu\text{m}$  pore size - MilliporeSigma) を用いてろ過した。DNA は Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用い、製造元の指示に従って抽出し、さらに処理するまで  $-21^{\circ}\text{C}$  で保存した。

1 段階目の PCR は、プライマーペア 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA - 3') および 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT - 3') (Caporaso et al. 2012) を用いて、16S rRNA の V4 領域の増幅および配列決定を行った。ミリ Q 水 3.6ul、KAPA Hifi Buffer (Kapa Biosystems) 6ul、フォワードプライマーとリバースプライマー各 0.7ul、最後に DNA 鋳型 1ul を含む 12ul の反応液で、各サンプルについて 3 連の 1 段階目の PCR を行った。電気泳動によって増幅できていることを確認した後、3 回分の反応を合わせ、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製した。

2段階目のPCRは、PCRは、7.2 ulのMilli-Q水、12 ulのKAPA Hifi Buffer、1.4 ulの各フォワードおよびリバースサンプル特異的プライマー、最後に2 ulの精製したPCR産物を含む24 ulの反応で行った。その後、サンプルを合わせ、E-Gel SizeSelect System II Agarose Gel 2% (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA)を用いて、16S rRNAのV4領域の平均サイズである350-450 bpの産物のみを抽出した。Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc)を用いて、精製PCR産物の濃度を見積もり、最終ライブラリー濃度を1 nMに調整した。500サイクルのV2試薬キットを用いてIllumina MiSeq® Platform (Illumina Inc.)により配列決定をした。

Ushio (2018)に従って配列データを処理した。得られたMiSeqデータは、イルミナが提供するbcl2fastqプログラム(bcl2fastq v2.18)を用いてFASTQファイルに変換した。FASTQファイルは、Claident (<http://www.claident.org>; Tanabe & Toju, 2013)に実装されているコマンドを使用してマルチプレックスを行った。分類学的同定は、dada2を用いて推定されたASV (Amplicon Sequence Variant; Operational Taxonomic Unitの代替)に対して、query-centric auto-k-nearest-neighbour (QCauto) method (Tanabe & Toju, 2013)に基づき、claident v0に実装されているsemiallデータベースとclidentseqおよびclassigntaxコマンドを用いて行った。BacteriaまたはArchaeaと同定されたリードを解析に使用した。

### 接種実験

実験にはアカメガシワの花で確認された細菌と同じ16S rRNA V4領域の配列を持ち、それぞれ網の異なる3系統(細菌P: Pantoea属、細菌S: Sphingomonas属、細菌R: Robbsia属)の細菌を使用した。これらの細菌を30°Cで48時間培養したのち、培地(φ90×15mm)の1/2のコロニーを掻き取り、蒸留水25mlに懸濁した。柱頭の裂開を確認した花序に対して、3系統の細菌の懸濁液と蒸留水のうちいずれかをスプレーで約500μl噴霧した。接種実験後、1倍~10<sup>5</sup>倍に希釈した接種溶液100μlをR2A培地に撒き、2日後にコロニー数をカウントし、接種実験に用いた溶液のCFUを推定した。

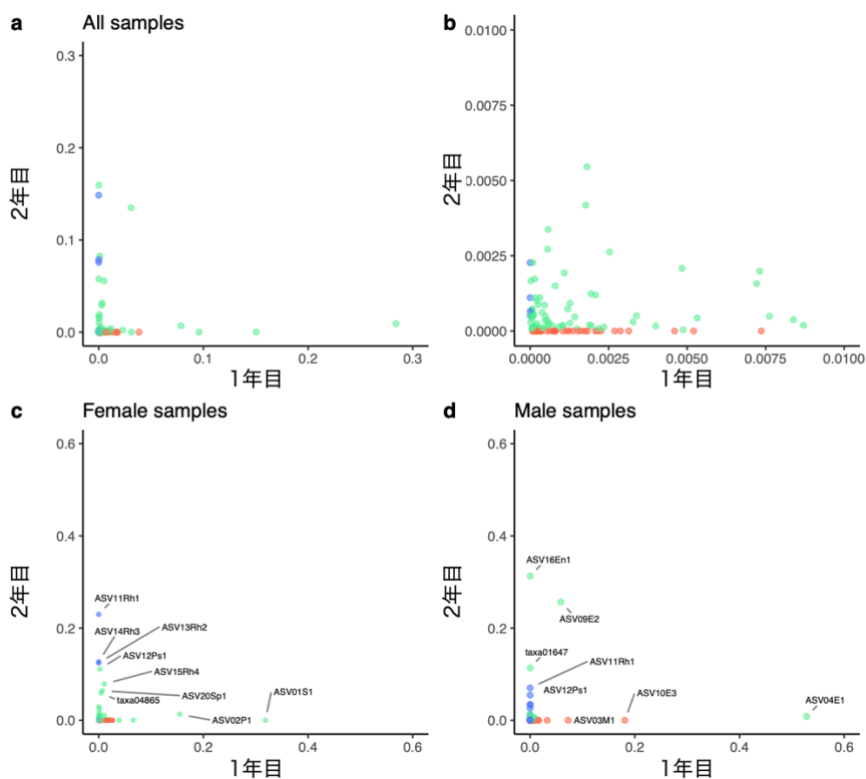


図1. 2年間にわたって採集されたASVの相対的存在量。x軸は2018年に採集されたサンプルの割合、y軸は2019年に採集されたサンプルの割合を表す。色は、年をまたいで当該ASVの出現があったかどうかを示す: 2018年固有のASV(青)、2019年固有のASV(赤)、2年共有のASV(緑)。(a)雄雌両方あわせた結果。(b)(a)のグラフの両軸を0から0.01まで拡大したもの。(c)雌花サンプルのみ、(d)雄花サンプルのみ。雄花サンプルと雌花サンプルのグラフでは、1年目または2年目のどちらかの割合が0.05を上回るASVのみが表示されている。

#### 4. 研究成果

- ① Sphingomonas 属細菌ほどの程度安定してアカメガシワ柱頭上で維持されるのか  
雌花、雄花それぞれでアンプリコンシーケンシングによって細菌叢を調べたところ、雄花と雌花の間で大きな違いが見られた(Maxime et al. 2022)。また、同様の調査を複数年繰り返すと、微生物群集には大きな変動が見られ、その変動は個体間で同調していた(図1)。Sphingomonas 属の配列や優占度も年によって異なっていた。送粉者の体表を調べると花上の細菌群集と共通するものが見つかったことから、少なくとも一部の微生物は送粉者によって運ばれていることが示唆された。これらの結果から、花上の微生物叢は植物由来のものと風や送粉者によって運ばれる外部に由来するものがあり、後者の割合のほうが大きいことが示唆された。年による大きな変動は、外部からもたらされる微生物によるものではないかと推察された。
- ② Sphingomonas 属細菌 Sphingomonas 属細菌に地理的変異は見られるか  
主調査地である滋賀県大津市の周辺三箇所、そのほか和歌山県、大阪府、京都府などを含むフィールドでサンプリングを行った。サンプリング地点によって細菌叢は異なっていたが、当初期待していたような明確な地理的なパターンは見られなかった。
- ③ Sphingomonas 属細菌を含むアカメガシワ柱頭上に見られる細菌は、種子に伝播し、微生物叢に影響を与えるのか。  
本研究では、花の細菌叢を変えると種子の微生物叢がどのように変化するのか、細菌を接種して検討した。その結果、種子細菌叢を処理ごとにはっきり区別できるほどの変化は見られなかった。この結果は、種子内微生物叢の大半が親植物から伝播してきているという先行研究(Chesneau et al., 2020)を支持する。  
しかしながら、2つの細菌(細菌P、細菌R)は花序に接種すると、種子で増加が見られた(図2)。これらの細菌は、非接種個体でも存在量の多い細菌であった。接種細菌の種子への侵入経路の可能性として柱頭が考えられる。花の子房壁を構成する心皮に由来する部分に接種するよりも、柱頭に接種した方が胚珠での細菌の割合が高くなるという報告がある(Dutta et al., 2015)ことから、柱頭が微生物の効率的な侵入経路である可能性がある。  
細菌の接種に伴って接種細菌以外の複数の分類群の相対存在量の増加・減少が見られた。細菌Sは種子で増加が見られなかったが、細菌Sを接種した花序で減少した細菌がみられた。花経路で獲得した微生物は種子内微生物叢を大きく変えるわけではないが、種子の中で割合が増加する直接的な効果の他に、微生物間相互作用を介して間接的にも微生物叢の変化をもたらすことが示唆された。  
送粉者が花粉と共に微生物を運び、次世代個体の生残・成長・繁殖に影響するのであれば、送粉者の誘引に関わる形質や雌花の形質などへの選択要因になりうる。

#### まとめ

本研究では雌雄異株植物アカメガシワ(トウダイグサ科)の雌個体の柱頭に優占するSphingomonas 属細菌に注目し、これらと寄主植物の相互作用について検討を行った。同じ調査地で複数年にわたって調査を行うと、Sphingomonas 属の種類や優占度は、年によって異なっていた。サンプリング地点によっても細菌叢は異なっていたが、当初期待していたような明確な地理的なパターンは見られなかった。一方、種子の微生物叢の解析を行うと、Sphingomonas 属細菌の割合とOUTの多様性の間には正の相関が見られた。Sphingomonas 属細菌を柱頭に接種することによって種子内部の微生物組成が変化したことから、Sphingomonas 属を含む柱頭の微生物叢の一部は種子に伝播することが予測される。

これまで植物と地下微生物の相互作用については、進化・生態学重要性と食物生産上の観点から盛んに調べられてきた。一方、植物繁殖器官上の微生物群集やそれらの繁殖成功への影響は、ほとんど顧みられて来なかった。花は一般に寿命が短く微生物叢は重要でないと考えられてきたこと、種子には微生物はほとんどいないと考えられてきたことが、その背景にあると考えられる。本研究では、野生植物上の植物と花・種子上の微生物の関係に焦点をあて、送粉者によって運ばれる細菌の潜在的インパクト、雄雌の差、年変動や地理的変異を明らかにした。繁殖器官上の微生物は、植物の繁殖成功に大きな影響を与える重要な要素であることが示唆された。

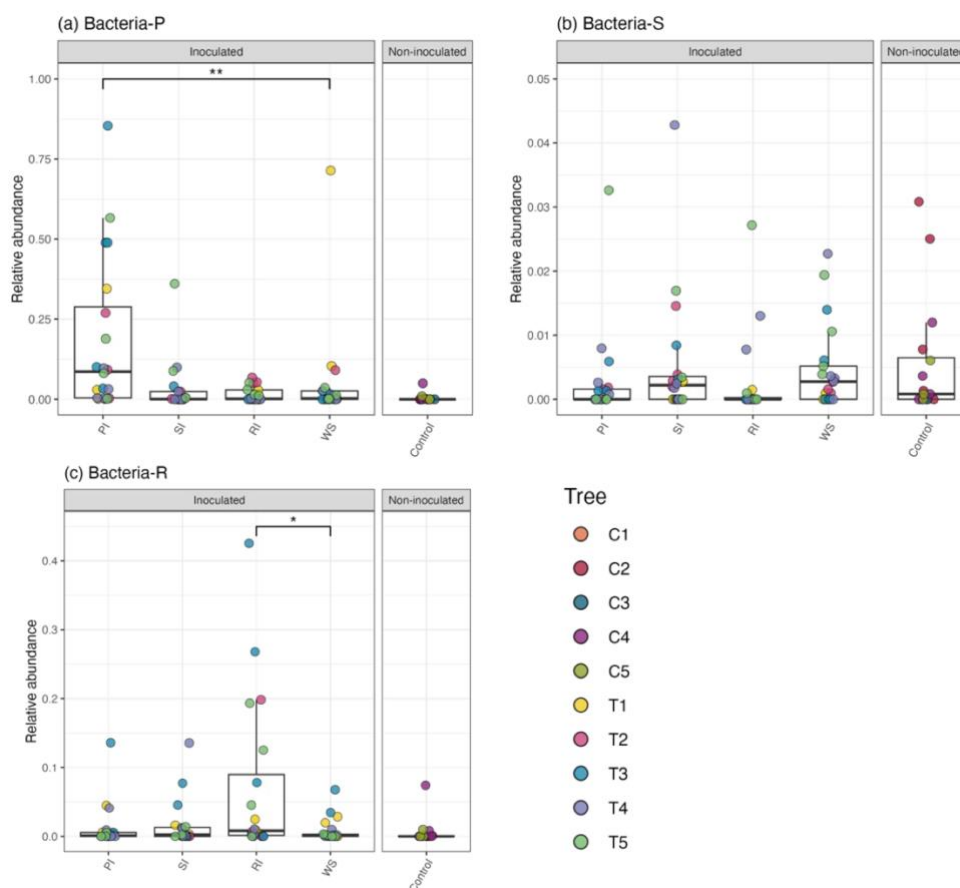


図 2. 接種細菌 OTU の相対存在量

接種実験の処理(PI, SI, RI)間で比較した。また、非接種個体の分布を異なるパネル(Non-inoculated)で示した。プロットの色は個体を表す。アスタリスクは NBZIMM(Non-Binomial and Zero-Inflated Mixed Model)により測定した比率の有意差(\*,  $p < 0.05$ )を示す。異なる色は個体を示している。接種した系統の詳細については本文を参照。

## 引用文献

Chesneau, G., Laroche, B., Prévieux, A., Marais, C., Briand, M., Marolleau, B., Simonin, M., Barret, M., 2022. Single Seed Microbiota: Assembly and Transmission from Parent Plant to Seedling. *mBio* e01648-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01648-22>

Dutta, B., Ha, Y., Lessl, J.T., Avci, U., Sparks, A.C., Johnson, K.L., Walcott, R.R., 2015. Pathways of bacterial invasion and watermelon seed infection by *Acidovorax citrulli*. *Plant Pathol.* 64, 537-544. <https://doi.org/10.1111/ppa.12307>

Marre, M., Ushio, M., & Sakai, S. 2022. Contrasting microbial communities on male and female flowers of a dioecious plant, *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae). *Environmental DNA*, 4(3), 565-579. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/edn3.271>

Tanabe AS, Toju H (2013) Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076910>

Ushio M (2019) Use of a filter cartridge combined with intra-cartridge bead-beating improves detection of microbial DNA from water samples. *Methods Ecol Evol* 10:1142-1156. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13204>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeda Kazuya, Sakai Shoko	4. 巻 37
2. 論文標題 Idea paper: Extended benefits of pollinator mediated microbial dispersal among flowers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 481 ~ 484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1703.12326	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jimenez Elvira Nuria, Ushio Masayuki, Sakai Shoko	4. 巻 6
2. 論文標題 Are microbes growing on flowers evil? Effects of old flower microbes on fruit set in a wild ginger with one-day flowers, <i>Alpinia japonica</i> (Zingiberaceae)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabarcoding and Metagenomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/mbmg.6.84331	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Marre M, Ushio M, Sakai S	4. 巻 -
2. 論文標題 Contrasting microbial communities on male and female flowers of a dioecious plant, <i>Mallotus japonicus</i> (Euphorbiaceae).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Marre M, Ushio M, Sakai S	4. 巻 -
2. 論文標題 The effects of the floral infection by a bacterial pathogen in a dioecious plant, <i>Mallotus japonicus</i> (Euphorbiaceae)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Population Ecology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1438-390X.12110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 和也・酒井 章子
2. 発表標題 ツルニンジン花上細菌叢に花弁表面ワックスが与える影響
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小茂尻 真凜・潮 雅之・武田 和也・酒井 章子
2. 発表標題 野生樹木アカメガシワにおける種子微生物叢の変動要因
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 章子
2. 発表標題 見過ごされてきた訪花者：花をめぐる細菌とその役割
3. 学会等名 The 2nd Symposium of Plant Microbiota Research Network (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井章子
2. 発表標題 花に見るオスの都合・メスの事情
3. 学会等名 植物分類学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoko Sakai
2. 発表標題 Why are flowers ephemeral? Effects of old flower microbes on fruit set in a wild ginger with one-day flowers, <i>Alpinia japonica</i> (Zingiberaceae)
3. 学会等名 Plant Microbiota Research Network (PMRN) (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小茂尻真凜, 酒井章子
2. 発表標題 アカメガシワの種子内生菌
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Marre Maxime, Masayuki Ushio, Shoko Sakai
2. 発表標題 Contrasting microbiomes of male and female flowers of <i>Mallotus japonicus</i>
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井章子・Marre Maxime・潮雅之
2. 発表標題 アカメガシワ斑点細菌病の花器感染
3. 学会等名 植物病理学会・関西支部会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Shoko SAKAI
2. 発表標題 Microbes on flowers and pollination
3. 学会等名 環境DNA学会・個体群生態学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	乾 陽子 (Inui Yoko)  (10343261)	大阪教育大学・教育学部・准教授  (14403)	
研究分担者	辻 かおる (Tsuji Kaoru)  (40645280)	京都大学・理学研究科・研究員  (14301)	削除：2021年2月4日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------