

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310145

研究課題名（和文） 共生系を基本単位とする微生物多様性の保全

研究課題名（英文） Conservation of microscopic biodiversity using symbiotic unit

研究代表者

岡部 貴美子（OKABE KIMIKO）

独立行政法人森林総合研究所・森林昆虫研究領域・チーム長

研究者番号：20353625

研究成果の概要（和文）：昆虫と共生する微小生物の生物多様性は、森林タイプなどの生態系の多様性と明確な相関関係を示さず、共生生物の種の多様性と相関していた。これは微小生物がパッチ状の生息地を利用するため便乗寄主を利用しており、マクロハビタットの差などの影響は顕在化しにくいためと考えられた。これらのことから便乗性の微小生物の多様性保全には、便乗寄主の生息場所の保全が重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Species diversity of microscopic symbionts living together with insects are not directly affected by ecosystem diversity but directly affected by host species diversity. Difference of conditions in each microhabitat where they live was masked because of their evolutionary adaptations such as phoresy. Thus, for the conservation of the microscopic symbionts, conservation of habitats of their phoretic hosts is crucial.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：微生物保全

1. 研究開始当初の背景

生物多様性研究は保全を目的として、現在までに（1）生物多様性の成立要因や生物学的意義の解明、（2）インベントリの作成やモニタリングによる生物多様性の理解と実感、（3）保全手法の開発が行われてきた。特に2と3は保全の実践にとって必要不可欠とみなされ、多くの研究者が取り組んでいる。しかし微生物のように、保全についてほとんど手つかずの状態にある生物群があるのも

実情である。微小な生物の多様性研究は、記載分類の遅れ、採集分離等の技術的困難さ、生態系へのインパクトが低いという誤解、病原菌に対する研究投資への偏りなどの理由から、中～大型生物に比べ非常に遅れている。一方で医薬品への利用、微生物分解者によるリサイクル機能、遺伝資源としての有用性など、微小な生物を維持し人間社会で利用してゆく必要性は認識されている（Howksworth and Colwell 1992 など）。また近年の研究技

術の進歩により、エンドファイトなどの微生物の生態系影響が定量的に評価され、これらの保全の重要性が明らかになってきた (Hudson et al 2006 など)。

2. 研究の目的

微生物多様性保全の手法として「共生系保全」を提唱することを目的とする。保全対象とする微小な生物を、生態系の生物間相互作用に無視できない役割を果たしていることが明らかになりつつある、ダニ、センチュウ、菌類とする。生物多様性保全がインベントリから始まる例は多いが、早急に着手する必要性から食物網を利用した共生系単位を保全単位とする研究に取り組み、保全の実行可能性を高めることに資する。そのためまずダニ、センチュウ、菌などの微小な生物の多様性が、同一生態系の他の生物の多様性よりも共生者との相互関係により強く相関することを明らかにする。さらに共生系としてこれらの生物の通常の生息場所のみならず、移動分散のための便乗寄主を含めて解析し、共生単位を提示することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では微小生物 (ダニ・センチュウ・菌) の生物多様性が、生態系の多様性と相関関係を示すという仮説を検証する (応募者らは明確な相関関係がないと予想する)。また便乗微小生物の多様性は便乗寄主の多様性と強く相関するという仮説を検証する (応募者らの仮説)。

(1) 対象分類群

微小生物多様性研究はダニ、センチュウ、糸状菌を対象とする。これらの生物群は主に、風分散や便乗による分散を行う。移動分散は微小な生物の個体群維持にきわめて重要であることから、本研究では分散前後のハビタット内での生物間相互作用だけでなく、便乗という移動分散における相互関係も共生系に含める。ダニ、センチュウ、糸状菌の便乗寄主としては昆虫が最も普通であり、共通種から採取できる。便乗寄主昆虫の調査地はハビタットの多様性が高い森林とする。

(2) 調査地

微小生物が同一生息地のほかの生物の多様性と、共生生物の多様性のいずれに強く相関するか (研究期間内に明らかにする仮説 1, 2) を明らかにするために、生物多様性が異なる (種数および種構成が異なる) 複数の森林で調査を行う。

(3) 方法

各森林の生物多様性は、コドラート法による植物の種数データ (既存のデータ) を基準にして評価する。昆虫の多様性は主に本研究で採集するサンプルで評価する。

①採集

仮説 1 のハビタットのスケール (= 生物多様性を調査するスケール) は森林の 1 林分 (通常 1ha 以下) とする。これは昆虫の移動分散距離から、適当なスケール (サイズ) といえる。調査は 1 地点につき、なるべく種を網羅できるように行う。森林では、リター層、生木・倒木、下層植生、動物の巣などが便乗寄主や便乗微小生物のハビタットとなるが、リター層や倒木などが共通のハビタットとして重要であるため、特にこれらを主なサンプリング対象とする。便乗寄主昆虫はライトトランセクトによる見つけ取りなどによって採集する。

採集した昆虫から、便乗および弱寄生性のダニ、センチュウ、糸状菌を採取する。また見つけ取りで捕獲した昆虫からはダニ、センチュウ、糸状菌を生きのまま採取して DNA の検出に利用するほか、それぞれの微小生物の便乗後の発育を促し、形態による同定を行う。それぞれの生物の飼育・培養法は既存の手法や、応募者らが独自に開発した手法を用いる (例: ダニは Okabe and OConnor 2001)。また昆虫が穿入した木は森林総合研究所に持ち帰り、半年~1 年間十分な湿度を保って網室内に保存し、羽化昆虫をトラップして昆虫種と便乗微小生物を確認する。

②同定

ダニは岡部、センチュウは神崎、糸状菌は升屋が分離採集~同定を担当する。昆虫は 3 名で採集と同定を行う。ダニ、センチュウ、糸状菌は、形態から種の同定を行う (形態種を含む) ほか、DNA バーコーディング法を利用する。DNA バーコーディングはバーコードオブライフなどで紹介されている標準的な手法を検討するか、それぞれの分類群の生物に適当な手法を開発する。菌類では応用分野で利用されているほか、ダニではハダニなどの農業害虫で試用されていることから、ミトコンドリア COI 遺伝子の数百領域を利用する予定である。センチュウは応募者 (神崎) によって DNA バーコーディングの利用が検討されており、概ね利用できる段階に達した (神崎 2009)。バーコーディングによる同定結果は、形態分類手法によって確認する。従って、本研究では副次的にこれら微小生物の多様性の定量的評価手法を検討することが可能である。従来用いられている形態による同定と DNA バーコーディングによる結果とを比較する。この結果を用いて (本研究の主旨ではないが副次的成果として) 微小生物多様性評価手法の提言を行う予定である。

③仮説 1, 2 の検証

トラップで採集した昆虫の種数、既存の植物や動物の種数データを元に、調査地の生物多様性を定量化する。また調査地の温度や立地などの非生物データを収集する。これらの結果と (2) で得られた便乗生物データ、誘引

木（従来の共生系と位置づけられる）から採集された微小生物データなどを用いて統計解析を行い、仮説の1, 2を検証する。

4. 研究成果

(1) マイクロハビタットを利用するダニの多様性

林齢約 95 年の老齢二次林のライントランセクト上でキノコ子実体に生息するダニを採集した。同時に昆虫幼虫を採集し、キノコおよび昆虫の種多様性との関係を調べた。その結果、キノコのサイズはダニの多様性に大きく寄与しておらず、キノコ子実体の寿命（サルノコシカケタイプのキノコでは昆虫もダニも多かった）が重要であることがわかった。また昆虫の有無はダニの種数と相関し、昆虫がいる時増加するのは昆虫を捕食する種ではなく、きのこ生息性で移動分散に昆虫を利用する種であることが示唆された。

また同地域の異なる林齢および森林タイプの林内で、土壌性のダニとキノコに生息するダニを調査した。その結果、土壌中では便乗しないササラダニが最も優先していたが、キノコからはササラダニとトゲダニが同程度採集された（図1）。また土壌性のダニの

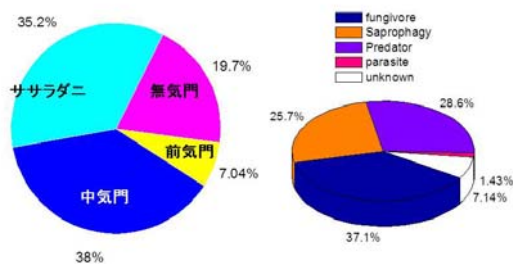


図1 キノコに生息するダニ

種多様性は森林の生物多様性と明確な関係がなかった一方で、キノコおよびキノコに生息するダニの種の多様性は森林構造が複雑化する（構造の多様性の増加）ことによって、種の多様性が増加した。またキノコの種数は二次林の林齢の増加に伴って増加した。これらキノコ生息性のダニの多くが便乗性であった（図2）。これらのことからサルノコシ

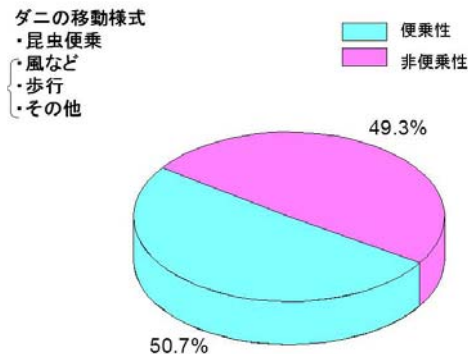


図2 キノコ生息性ダニの移動分散様式

カケタイプのキノコ、およびこれらのキノコを利用する昆虫の多様性を維持すること、すなわちこれらの生息地として適当な老齢林の保全が重要であることが示唆された。

(2) 昆虫体表面に共生する微小生物の多様性

国産のクワガタムシを採集し、便乗者や、それに寄生する微生物の多様性調査を行った。この結果、国内産の8種類のクワガタムシより複数の未記載種を含む8種の線虫が確認され、これらの多くは細菌食性自由生活線虫であることが明らかとなった。また便乗線虫には種特異性はほとんど見られなかったことから、比較的広い範囲のクワガタムシを媒介昆虫として利用していると考えられた。

またクワガタムシの体表面に特異的に生息するクワガタナカセの寄主特異性を明らかにした。クワガタナカセは南西諸島～本州までのクワガタムシにほぼ種特異的に共生していた。しかし、東北地方以北（仙台市以北および新潟県以北）ではコクワガタにもスジクワガタにもスジクワガタナカセが共生していた。また北海道ではクワガタナカセが生息していないことが示唆された。しかし2種のクワガタナカセの分布は、年間最低、最高気温とは無関係であり、過去のクワガタムシの分布との関連が示唆された。一方、関東以西では、高い寄主特異性が認められたことから、実験的にダニのホストを交換したところ、コクワガタナカセはコクワガタ表面上でのみ生息可能なこと、コクワガタナカセは他のクワガタナカセを排除することが明らかとなった（図3）。

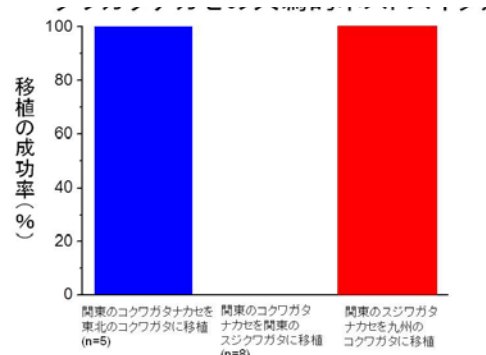


図3 クワガタナカセの寄主転換実験

関東以西ではコクワガタは低地で見つかるのに対して、スジクワガタは比較的山地に適応していると考えられている。このことから、関東以西ではクワガタムシ同士が会う機会が少なく、クワガタナカセの寄主転換の機会が少ないこととあわせて、コクワガタナカセが他のダニを排除しているために、寄主特異性が維持されていることが明らかとな

った。

これらのクワガタナカセ体表面から、未記載のこれまで全く未知であった共生菌類が発見された(図4)。これらの菌の機能は不明であるが、複数のクワガタムシの比較から、寄主特異性の高いものが多いと推測された。

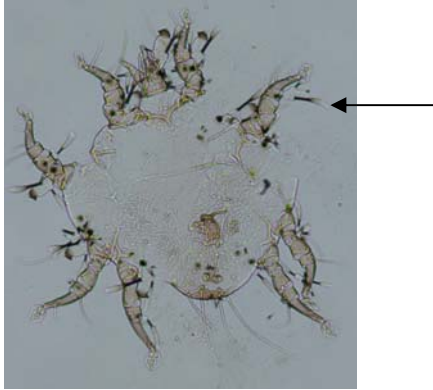


図4 クワガタナカセ共生菌(矢印)

これらのことから昆虫そのものも未記録の共生生物の生息地となっていることがわかった。これらの知見は、1種の生物の絶滅が引き起こす生物多様性の減少の推定に寄与すると考える。またクワガタムシの分布と共生ダニの分布は一致していなかったことから、クワガタムシの保全だけでは共生微生物の保全には充分でないことが示唆された。クワガタムシは人為的な移動が顕著であることから、共生微生物保全には新たなアプローチが必要である。

(3) 腐肉食昆虫に便乗する微小生物の多様性

森林における有機物廃棄物の分解に大きく寄与するシデムシはシデムシに便乗する微小生物同様にパッチ状のハビタットを利用していることから、便乗生物と寄主特異性について調べた。

シデムシ随伴酵母は *Yarrowia lipolytica* とその近縁群であり、さらには各種シデムシの随伴酵母の優占種はシデムシ種特異的な随伴関係が成立していると考えられた。さらに各種キクイムシからの随伴菌の検出を行ったところ、糸状菌だけでなく酵母でも多様な随伴関係が成立していると考えられた。また、各種シデムシから線虫の分離同定を行ったところ、亜社会性の種で、線虫保持率、保持種数とも非常に高く、自由生活者ではほとんど線虫の検出が見られないことが明らかになった。同様にシデムシ便乗ダニを調べたところ、亜社会性の種で種数個体数ともに多いことが分かった。これら共生生物は便乗寄主の影響が大きく、種の多様性について森林タイプによる明確な差がなかったことから、

安定的なハビタットを利用する種で共生生物の高い多様性が維持されていることが示唆された。

Sugiura et al. (2013)によってシデムシは森林の消失によく反応することから、シデムシ便乗微生物保全のためには、動物遺体が定期的に供給されるようなある程度大きな面積の、資源が豊富な森林の保全が必要であると考えられた。

これら複数の研究結果により、共生生物の多様性保全のためには、ホスト昆虫が十分に個体数を維持できる面積の生息地保全が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

- ① Okabe K (2013) Influence of spatio-temporal resource availability on mushroom mite diversity. *Exp Appl Acarol* DOI: 10.1007/s10493-013-9696-4
 - ② Okabe K, Masuya H, Kanzaki N, Taki H (2012) Regional collapse of symbiotic specificity between lucanid beetles and canestriniid mites. *Naturwissenschaften* 99: 959-965.
 - ③ Kanzaki N, Ragsdale EJ, Herrmann M, Mayer WE, Tanaka R, Sommer RJ (2012) *Parapristionchus giblindavisi* n. gen, n. sp. (Rhabditida: Diplogastridae) isolated from stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) in Japan. *Nematology* 14: 933-947.
 - ④ Kanzaki N, Taki H, Masuya H, Okabe K (2012) *Bursaphelenchus tadamiensis* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), isolated from a stag beetle, *Dorcus striatipennis* (Coleoptera: Lucanidae), from Japan. *Nematology* 14: 223-233.
 - ⑤ Kobune S, Kajimura H, Masuya H, Kubono T (2011) Symbiotic fungal flora in leaf galls induced by *Illiciomyia yulawai* (Diptera: Cecidomyiidae) and its mycangia. *Microbial Ecol* 10.1007/s00248-011-9962-0
 - ⑥ Sugiura S, Masuya H (2010) Leaf-mining beetles carry plant pathogenic fungi amongst hosts. *J Nat Hist* 44: 2179-2186.
- [学会発表] (計12件)
- ① 升屋 勇人、岡部 貴美子、神崎 菜摘 (2012) クワガタナカセに寄生するラブルベニア目菌類. 第55回菌学会大会 9月10-11日 北海道大学、札幌
 - ② Okabe K, Yamashita S, Hattori T,

Hasegawa M, Tanaka H, Makino S (2012)
Conservation of deadwood could conserve
microscopic organisms such as mushroom
mites. Second International Conference
on Biodiversity in Forest Ecosystems and
Landscapes. 28-31 August, University of
Cork, Ireland

③ Kanzaki N, Taki H, Masuya H, Okabe K,
Tanaka R (2012) Survey of stag
beetle-associated nematodes in Japan as
basic information for identification of
invasive nematodes. IUFRO Alien
invasive species and international
trade. 10-16 June, University of Tokyo,
Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 貴美子 (OKABE KIMIKO)
森林総合研究所・森林昆虫研究領域・チー
ム長
研究者番号 : 20353625

(2) 研究分担者

升屋 勇人 (MASUYA HAYATO)
森林総合研究所・森林微生物研究領域・主
任研究員
研究者番号 : 70391183
神崎 菜摘 (KANZAKI NATSUMI)
森林総合研究所・森林微生物研究領域・主
任研究員
研究者番号 : 70435585