

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12256

研究課題名(和文)植物の花蜜が介在する生物間ネットワークの形成プロセス

研究課題名(英文) Ecological networks of plant-pollinator-microorganism mutualisms mediated by floral nectar

研究代表者

平尾 章 (HIRAO, Akira)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20447048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：花蜜内の微生物が送粉共生系に介入しているという知見が報告されており、植物-訪花者-微生物の三者間に拡張された生物間相互作用が注目されている。複合送粉共生系ネットワークの解明を目的として、草本種の花蜜に含まれる真菌群集組成をDNAメタバーコーディングおよび単離培養によって同定し、ホスト植物種および送粉者との共生関係を検討した。その結果、花蜜内に生息する真菌としてMetschnikowia属酵母が優占し、花蜜内の真菌群集のネットワーク構造がホスト植物種の訪花昆虫タイプと対応していることが明らかになった。また未記載種のMetschnikowia属酵母を単離し、その生活環を解明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The natural history of plant-pollinator-microorganism interaction has led to increased interest among ecologists because nectar-dwelling microorganisms, notably yeasts, can modify plant-pollinator mutualisms through their metabolic impact on the chemical properties of nectar. Based on DNA metabarcoding analyses and isolated cultures, we determined composition of microfungal communities in floral nectar from several herb species in a semi-natural grassland and evaluated plant-pollinator-fungus associations with using network analyses. We found that the common nectar-borne fungi diversity comprised few specialist yeasts belong especially to the genus of Metschnikowia and that the fungal communities were structured with respect to pollinator types for the plant species, indicating the network structure of plant-pollinator-microorganism mediated by nectar. In addition, we isolated a novel Metschnikowia species from nectar-associated substrates and revealed its life-cycle.

研究分野：分子生態学

キーワード：花蜜酵母 Metschnikowia 送粉共生系 ハナバチ DNAメタバーコーディング

1. 研究開始当初の背景

送粉共生系は、代表的な生物間相互作用ネットワークの1つであるが、花蜜内に生息する微生物が植物-送粉者の二者間の相互作用系に介入している事例が報告されており、植物-送粉者-微生物の三者間を巡る送粉共生系の構造および機能が議論されている。花蜜内の微生物は、単純な盗蜜者ではなく、植物および送粉者へ協力的に働きかけている可能性が指摘されており、複合送粉共生系の存在が示唆されている。花蜜内微生物に関しては、特定の酵母菌類のようにその分類や生態がよく研究されている分類群がある一方で、肉眼では見えないこと、顕微鏡下であっても形態観察での同定が困難なこと、難培養性微生物の潜在的な存在などによって、微生物群集の全体像については断片的な情報しか得られていなかった。しかしながら、次世代シーケンシング技術の革新によって、これまで見過されてきた微生物を含む生物多様性の全体像を、大規模な DNA データから低労力かつ客観的に描くことが可能な時代を迎えている。花の中の花蜜環境は、微量な高糖濃度の閉鎖系のように見えるものの、送粉共生系ネットワークの結節点となっているため、微生物・昆虫・植物といった多様な分類群の生物間相互作用に関する情報を網羅的に取得することで、ミクロからマクロまでの生物学分野を横断する研究シーズが期待される。

花蜜に含まれる微生物は主に酵母（真菌）と細菌に大別されるが、前者は蜜成分を改変するような発酵能力を備え、花蜜環境を決定づける重要な微生物である。モデル生物として知られる狭義の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、真核生物の細胞周期や生体機構などのミクロ系生物学の発展に大きく貢献したが、広義の酵母は、単細胞世代を有する菌類の総称であり、自然界では、植物や昆虫とともに生き、土壌や淡水など地球上にあまねく存在する。しかし自然界における生活史はその一部分しか明らかになっていない。たとえモデル生物の *S. cerevisiae* であっても、その生物学の特徴は進化生態学背景から切り離されて理解されている。野生酵母の多様な実態とその生態機能を理解するには、自然界における本来のニッチや他の生物との相互作用の解明が必要不可欠である。花蜜酵母から発酵食品などに有用な菌株の単離が試みられているが、これらの野生酵母の生態学的な理解を深めることで、有用な菌株の探索戦略を最適化するような成果も期待できるだろう。

2. 研究の目的

被子植物の花蜜を介して結びつく生物群集（被子植物、昆虫、花蜜に含まれる微生物）を対象に、多様な分類群の生物相とそれらの相互作用を評価することで、微生物-送粉者-

植物によって構成される複合送粉共生系ネットワークの全体像の解明を試みる。具体的には、ある一つの地域の草原植物群集について、DNA メタバーコーディング法および送粉生態学的手法を活用して、花蜜内微生物・送粉者タイプ・植物種の共生関係リストを作成し、送粉共生系ネットワークの構造を評価する。あわせて異なるタイプの花蜜関連基質から主要な酵母の菌株を単離し、花蜜内微生物の分散プロセスを検討する。

3. 研究の方法

本州中部の典型的な山地草原として、筑波大学菅平高原実験センター（現：筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所）内にある 6ha の半自然草原を調査地とした設定した。2015 年および 2016 年の春から秋にかけて、主要な蜜源となる草本植物 14 種から計 112 個の花蜜サンプルを採取し、花蜜内の真菌群集の組成を ITS 領域の DNA メタバーコーディングによって同定した。同じく草本 14 種の花を対象にインターバル撮影を行い、訪花昆虫相を記録した。花蜜内の真菌群集組成と宿主植物種、訪花者タイプとの共生関係について、ネットワーク解析を用いて検討した。花蜜関連基質より主要な酵母菌類を単離し、子嚢胞子などの形態観察、生活環の解明、分子系統などの情報に基づいて分類群の同定を行った。また分離同定した菌株の ITS 領域の塩基配列を決定し、DNA メタバーコーディングのリファレンスに供与した。

4. 研究成果

対象地域において主要な蜜源となる草本 14 種の花蜜から、計 39 種類の真菌（子嚢菌門 6 属 34 種類、担子菌門 4 属 5 種類）が DNA メタバーコーディング法によって検出された。

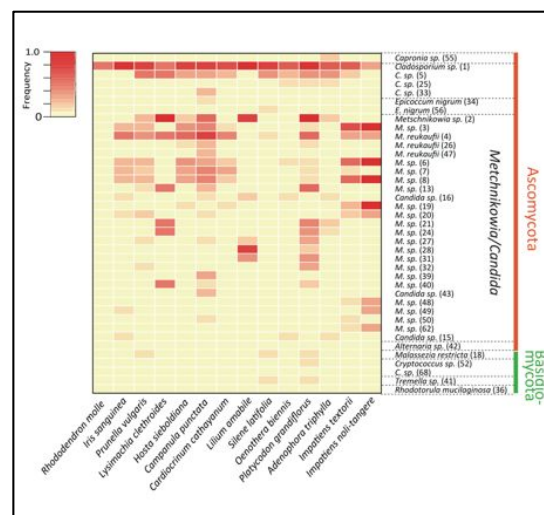


図 1 花蜜内の真菌群集組成のヒートマップ（縦軸：39 種類の真菌、横軸：14 種の宿主植物種）

39 種類の真菌の中から *Chradosporium* spp. を空中雑菌とみなして除外すると、目レベルでは *Saccharomycetales* が、属レベルでは *Metschnikowia* が花蜜内で優占的に出現していた。その中でも最も出現頻度が高く、ほとんどの宿主植物種から検出された *M. reukaufii* は典型的な花蜜酵母として、ヨーロッパや北米からも頻繁に報告されている種である。一方で、検出された真菌の中には *Metschnikowia* 属に分類されるものの GenBank に登録されている塩基配列との一致率が 97%以下となる未記載の複数種の酵母が検出された。

これらの酵母を含む真菌類と宿主植物種との間には特異的な共生関係は認められなかったが、微生物-植物-訪花昆虫の三者間の共生関係に拡張して、更に検討を進めた。訪花昆虫タイプは、各種あたり 3,000 枚以上のインターバル撮影の記録に基づいて、ハナバチ媒花、ガ媒花、チョウ媒花の 3 タイプのいずれかのカテゴリーに判別した。三者間の共生関係リストをネットワーク解析によって評価した結果、花蜜内の真菌類と宿主植物種のネットワーク構造が訪花昆虫タイプと対応し、ハナバチ媒花植物がネットワークのコアを形成していることが明らかになった（図 2）。この結果は、微生物-訪花昆虫-植物の三者間を巡る複合送粉共生系ネットワークの存在を示す。

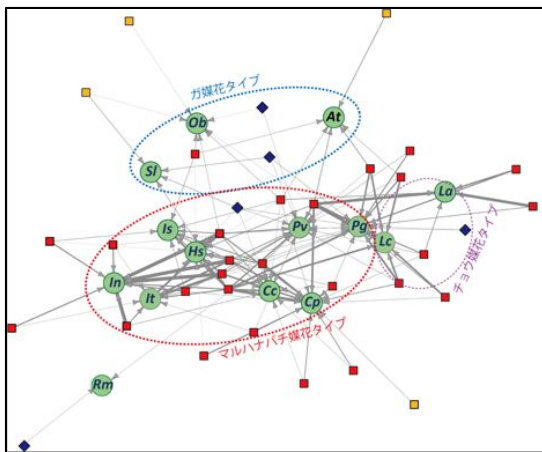


図 2 花蜜内の真菌類と宿主植物種のネットワーク構造（○：宿主植物種、□および◇：真菌類）。共生関係の強さをリンクの太さで示す。

次に社会性ハナバチ類の蜜胃内容物に含まれる真菌群集を DNA メタバーコーディングで同定したところ、花蜜内の真菌群集と組成が非常に類似しており、*Metschnikowia* 属酵母が優占することが明らかになった（図 3）。社会性ハナバチは、効率的な訪花行動に加えて、巣内に蓄えた花蜜や花粉荷（=花粉団子）を餌資源としてコロニー内で共有するため、花蜜酵母の分散において重要なハブの役割を担っていると考えられる。

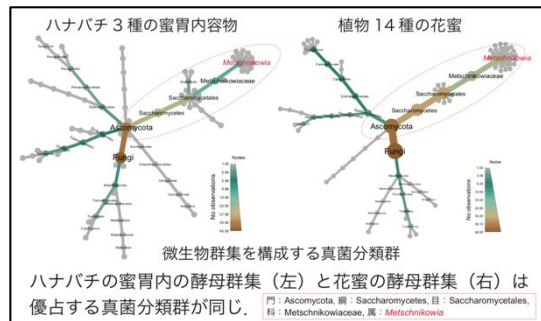


図 3 ハナバチの蜜胃内容物および花蜜に含まれる真菌群集の比較。

さらにハナバチの蜜胃内容物および花蜜を分離源として、未記載と考えられる *Metschnikowia* 属の酵母種を単離し、その生活環の全容を解明することに成功した（図 4）。当該酵母種では、子嚢胞子の発芽後、偽菌糸が長く伸長して先端に球形の分生子を形成する。これらの形態形成は *M. lachancei* においても知られていたが、当該種とは資化活性が異なり、分子系統上の違いも確認されている。

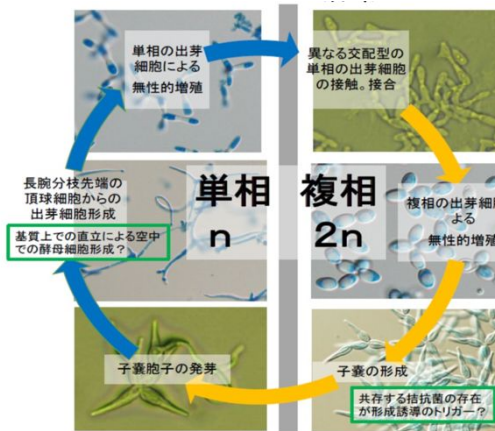


図 4 *Metschnikowia* 属未記載種的生活環

社会性ハナバチは、体表に付着した花粉を団子状に固めて花粉荷を作るが、その際に蜜胃に蓄えられた花蜜を吐き出して、つなぎとして用いる。花粉荷を分離源として真菌類の単離を試みたところ、*Metschnikowia* 属の酵母が多産することが明らかになった。一方で、花粉荷からはケカビ門の糸状菌も出現したが、特に *Mucor* 属の *M. falcatus* が複数試料より高頻度に検出された。本種は報告例の稀な種であり、現存する 2 株中の 1 株はミツバチ類の巣より分離されていた。本種は社会性ハナバチと深く関わりを持つ可能性があるが、同所の花蜜、ハナバチの蜜胃内容物からは検出されず、自然界でのハビタットを今後詳細に調査する必要がある。

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 1 件)

Hirao AS, Onda Y, Shimizu-Inatsugi R, Sese J, Shimizu KK, Kenta T (2017) Cost-effective discovery of nucleotide polymorphisms in populations of an allopolyploid species using Pool-Seq. *American Journal of Molecular Biology* 7(4): 1031-1046. 査読有.

[学会発表](計 10 件)

平尾章・出川洋介 山地草原におけるハナバチ類と花蜜酵母を含む真菌類の関わり. 2017 年度山岳学位プログラム第 3 回学術集会, 2017 年.

出川洋介・平尾章 マルハナバチ類の花粉団子より分離されたケカビ目菌. 2017 年度山岳学位プログラム第 3 回学術集会, 2017 年.

出川洋介・平尾章・佐藤幸恵・山田宗樹・恩田義彦・遠藤力也 菅平高原より分離された *Metschnikowia* 属酵母. 環境微生物系学会合同大会 2017 (日本菌学会 61 回大会), 2017 年.

平尾章・出川洋介 NGS を用いた新種酵母の探索: 全国公開実習のプログラム開発の取り組みとして. NGS 現場の会・第五回研究会, 2017 年.

平尾章・出川洋介 花蜜内に生息する酵母群集の分散プロセス. 第 64 回日本生態学会, 2017 年.

平尾章・出川洋介 山地草原に生息する花蜜酵母の分散プロセス. 2016 年度山岳学位プログラム第 2 回学術集会, 2016 年.

出川洋介・平尾章・佐藤幸恵 菅平高原産 *Metschnikowia* 属酵母. 2016 年度山岳学位プログラム第 2 回学術集会, 2016 年.

平尾章・山田宗樹・出川洋介 花蜜に生息する真菌群集の多様性とネットワーク構造. 第 63 回日本生態学会, 2016 年.

平尾章・山田宗樹・出川洋介 菅平高原の草本群落に生息する花蜜酵母の多様性. 2015 年度山岳学位プログラム第 1 回学術集会, 2015 年.

平尾章 花蜜を介して結びつく生物群集のメタバーコーディング. NGS 現場の会・第四回研究会, 2015 年.

[その他]

ホームページ等

菅平生き物通信第 50 号: 花を訪れる昆虫
http://www.sugadaira.tsukuba.ac.jp/ikimono/ikimono50_1609.pdf

菅平生き物通信第 52 号: 小さな隣人たち
V - 花を訪れる酵母たち
http://www.sugadaira.tsukuba.ac.jp/ikimono/ikimono52_1612.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 章 (HIRAO, Akira)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 20447048

(2) 連携研究者

出川 洋介 (DEGAWA, Yosuke)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号: 00311431