

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25304013

研究課題名(和文)ブナ属植物を中心とした共生生態系の進化・系統地理学的研究

研究課題名(英文)Evolutionary and phylogeographic studies of Fagus ecosystems

研究代表者

伊藤 元己 (ITO, Motomi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00193524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、北半球温帯地域に隔離分布するブナ属植物共生生態系を対象に、各生物群の進化における生物間相互作用の影響を解析する事によって多様な共生生態系の進化史解明を目指した。

アジア、ヨーロッパ、北米にて、ブナ属植物と共存しているチョウ目、コウチュウ目、カメムシ目の、3地域間のCOI遺伝子塩基配列の比較を行ったが、3目ともに近縁な関係を表す種群は検出されなかった。この事はブナ属植物に付随した昆虫の分化は見られないことを示唆している。

真菌類のメタゲノム解析からは、アジア、ヨーロッパで真菌相に差異が大きいこと、また比較的近縁の同属異種の植物間でも根に存在する菌相には明確な違いがあった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the evolutionary history of various symbiotic ecosystems by analyzing the influence of biological interactions in the evolution of each biological group, using beech associated ecosystems, which show isolated distribution in the Northern Hemisphere temperate region.

In Asia, Europe and North America, we compared the nucleotide sequences of the COI genes among the three regions, for Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera coexisting with beech trees. However, no species group was detected in all of three insect orders. This suggests that there is no differentiation of insects associated with beech trees.

From the metagenomic analysis of fungi, there were clear differences in the fungal flora in Asia and Europe, and also in the fungi present in the root between different species distributed in same region.

研究分野：多様性生物学

キーワード：ブナ属 生物地理 共生系 昆虫 共生菌類

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある生物種間において互いに影響を及ぼしあうことを生物間相互作用といい、生物多様性の創出と維持に非常に重要な役割を果たしている。近年、他者を介した間接作用とそのネットワークの重要性が明らかになり、ある生物群の進化を理解するためには、対象種間の相互作用だけでなく、その背景にある総体としての生物間相互作用ネットワークを考慮する必要があると認識されるようになった。生物間相互作用ネットワークは、生物の適応度に直接関与するため、生物種の進化動態に大きな影響を与えると考えられる(ここでは、ある種を中心として捉えた生物間相互作用ネットワークを共生生態系と呼ぶ)。特定の共生生態系における生物間相互作用を解析した生態学的研究はこれまでに知られているが、生物の種分化を伴う数万年から数千万年におよぶ長い進化過程の中で、共生生態系が実際にどのように各構成要素および共生生態系自体の進化に影響を与えてきたかはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、今日見られる共生生態系の成り立ちを進化的スケールで捉えるため、陸上生態系の中でも特に重要な植物をめぐる共生生態系を対象として、(1)各生物種および共生生態系自体が植物の進化に伴いどのように進化したのか、(2)共生生態系のある構成要素と他の構成要素とが各々の進化にどのような影響を与えてきたのか、という問いに答えることを目的とする。

植物地理学において、北半球温帯域に隔離分布する植物群は、周北極地域に分布していた植物群が気候変化とともに隔離分布し、それぞれ独自の進化を遂げたと考えられている。このようなシナリオはDNAなどの分子マーカーが使用できるようになって以来、さまざまな植物群で検証されてきた。しかし、一方で申請者らにより研究が行われたヒヨドリバナ属などではこのシナリオには合わず、ベーリング海峡成立後の北米からアジアへの移動が推定され(Ito et al., 2000a, b)、単純な気候変動による地理的隔離のみで成立したのではなく、隔離成立後に大陸間の生物種の移動もあったことがわかってきた。植物について研究が進んできた一方で、植食性昆虫相はそれぞれの地域では比較的解明度が高いにもかかわらず、地域間を比較した例はほとんどない。また、菌類については、詳細な研究が各地域でまだ十分に行われていないのが現状である。

我々がこれまでに行った文献調査や現地での予備調査により、北半球の温帯性植物は、多様な生物と共生生態系を形成していることが示唆されている。中でも重要と思われるのが、植食性昆虫や菌類など、植物を寄主として利用する生物群である。1種の植物を、互いに近縁な複数の生物種が利用している場合もあり、全体として複雑な共生生態系を形成していると推測される。したがって、東アジア、北米、ヨーロッパに隔離分布しているブナ属植物に関

連を持つ生物相は、共生生態系の進化史を解析する上で非常に興味深い対象と言える。

2. 研究の目的

本研究では、北半球温帯地域に隔離分布する共生生態系を対象に、(1)各地域で共生生態系を構成する主要な生物群の系統・進化の過程を明らかにした上で、(2)各生物群の進化における生物間相互作用の影響を解析する事によって、(3)多様な共生生態系の進化史解明を目指す。

3. 研究の方法

材料のサンプリング

平成25年7月に太平山のタイワンプナ林にて、タイワンプナの根、葉、樹皮の試料採取を行った。同時に、タイワンプナを餌とするチョウ目、コウチュウ目、カメムシ目の昆虫の採集、および、タイワンプナ周辺とタイワンプナの阿、枝、幹に寄生する菌類の採集を行った。

平成26年度には、ヨーロッパブナを対象とし、6月にスイスのチューリッヒ郊外で行った。具体的には、3箇所のヨーロッパブナ林において、ヨーロッパブナ成木の葉、枝、根について、植物の解析と菌類のメタゲノム解析用のサンプルを採集した。加えて、実生時の共生菌類相を比較するため、実生のサンプリングも行った。さらに、ヨーロッパブナの様々な器官、および枯木に付いている菌類(主に子実体)のサンプリングも行った。同時にヨーロッパブナを餌とするチョウ目、コウチュウ目、カメムシ目の昆虫の採集、ヨーロッパブナの葉、枝、幹に寄生する菌類の採集を行った。

26年度は北米のアメリカブナを対象に、8月に米国アパラチア山地で調査を行った。アメリカブナの根・葉・樹皮の試料採取を行った。同時にアメリカブナを餌とするチョウ目、コウチュウ目、カメムシ目の昆虫の採集、アメリカブナの葉、枝、幹に寄生する菌類の採集を行った。

昆虫類の系統解析

これらのサンプルは仮同定後にDNAの抽出を行い、標準バーコード領域であるCOIの塩基配列決定を行った。

真菌類のメタゲノム解析

日本のブナ *Fagus crenata*、イヌブナ *F. japonica* およびスイスのヨーロッパブナ *F. sylvatica* から根末端サンプルを採取した。6月から10月にかけて日野(栃木県)、7月、8月、9月にあずみ野(長野)、京都(京都)、野沢(長野)、戸隠(長野)で採集した。6月から10月まで日光(栃木県)で採取した。*F. sylvatica* は、8月にスイスで収集した(表1)。

表1. 真菌類のメタゲノム解析用サンプル

	Nikko					Other locations			
	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Kyoto	Azumino	Tozokush 1	Nozawa
<i>F. crenata</i>	2	5	6	6	3	4	2	4	4
<i>F. japonica</i>	3	4	3	6	3				
<i>F. sylvatica</i>						CH1	CH2		
						3	6		

全 DNA を根サンプルから抽出し、宿主植物種は *rbcL* 遺伝子により決定した。ブナ属であることが確認された 64 の根サンプルを、Ion Torrent PGM シーケンサーを用いて真菌 ITS 領域の次世代配列決定に供した。シーケンシングの結果は、Claident (<http://www.fifthdimension.jp/products/claident/>) を使用して同定を行った。

4. 研究成果

昆虫類の大陸間比較

アジア（日本、台湾）、ヨーロッパ（スイス）、北米（米国）にて、ブナ属植物と共存しているチョウ目（蛾類）約 20 種、コウチュウ目（ゾウムシ類、カミキリムシ類）40 種、カメムシ目 30 種の、標準バーコード領域である COI 遺伝子の塩基配列を決定した。

各目で 3 地域間の塩基配列の比較を行ったが、3 目ともに近縁な関係を表す種群は検出されなかった。この事は被子植物と異なり、ブナ属植物に付随した昆虫の分化は見られないことを示唆している。もっとも、今回の調査では、時間的な制約から網羅的な昆虫相のサンプリングができていないため、結論付けるのは時期尚早である。今後、1 年間に渡る網羅的なサンプルにて再検討する必要がある。

真菌類のメタゲノム解析

次世代シーケンサーによるリード回数は、1 サンプルあたり 3000~110,000 の範囲であった（図 1）。1 試料あたりの OTU は 7~58 の範囲であった（図 2）。3 種全ての宿主種からの試料は、同等の多様性指数を有していた（図 3）

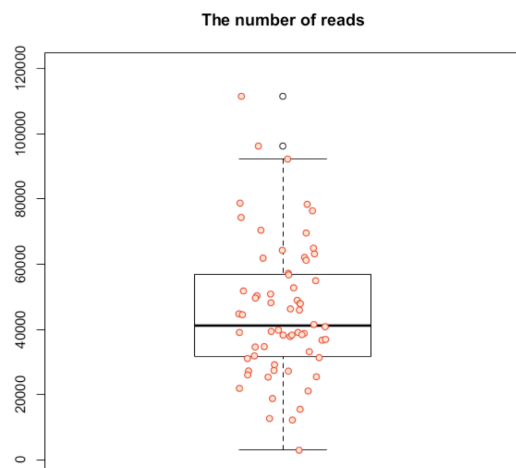


図 1. 次世代シーケンサーによるリード数

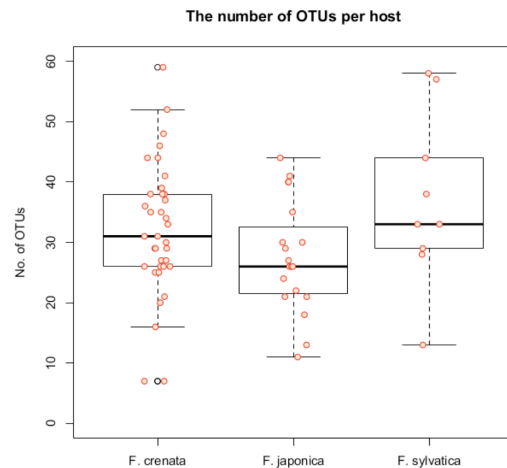


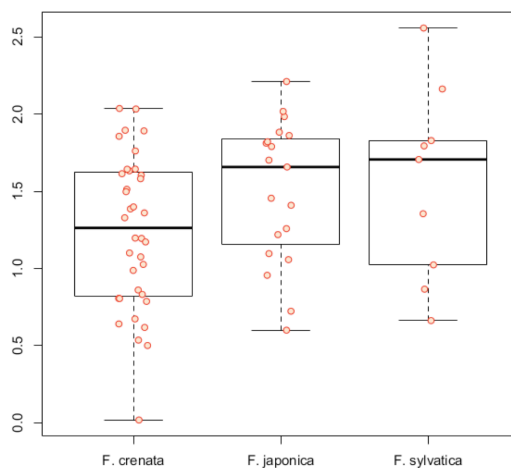
図 2. 各宿主種あたりの OTU 数

種多様性の指標は、EstimateS

(<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS/>) を使用して計算し、表 2 に要約を示した。

メタゲノム解析による真菌相の解析の結果、ほぼ同所的に生育しているブナ及びイヌブナでは、宿主植物の違いが根における菌相の構成に統計的に有意な違いを生み出すことが分かった。しかしその違いは日本国内のブナ属とヨーロッパブナほどではなく、ブナとイヌブナは、ヨーロッパブナと比較してより多くの OTU を共有していた。さらに、ブナとイヌブナにおける年間を通じての季節変化を観察した結果、同じ宿主植物においても、地理的変化及び季節変化が菌類の構成に有意な違いを及ぼすことが分かった。特に秋季から冬季にかけて菌相の変化が大きいことが明らかになった。以上の結果から、比較的近縁の同属異種の植物間でも根に存在する菌相には明確な違いがあること、また地理的及び季節的な差異が菌類の構成に有意な違いを与えることが分かった。

Shannon index



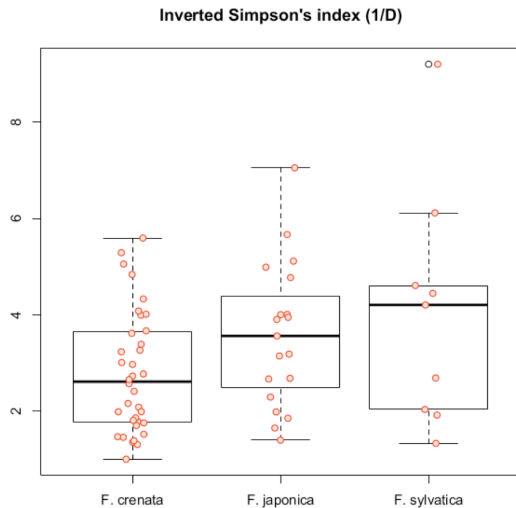


図3. 各宿主種における真菌相の種多様性

表2. EstimateS による種多様性の指標

Host	No. of samples	Total no. of OTUs	Chao1	ACE	Chao2	ICE	Estimated sample coverage
<i>F. crenata</i>	36	188.0 ± 10.61	188.0	188.0	468.0 ± 77.65	470.67	40%
<i>F. crenata</i> (Nikko)	22	126.0 ± 8.9	126.0	126.0	338.76 ± 75.75	300.78	37%
<i>F. japonica</i>	19	83.0 ± 5.12	83.0	83.0	121.37 ± 17.14	125.37	68%
<i>F. sylvatica</i>	9	108.0 ± 7.66	108.0	108.0	236.36 ± 42.65	319.65	46%

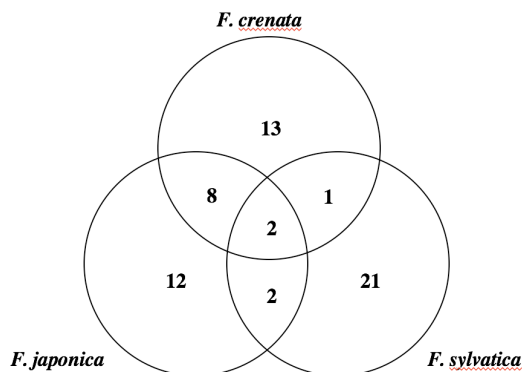


図4. ホスト種特異的およびホスト種間で共有される OTU 数

引用文献

Ito, M., Watanabe, K., Kita, Y., Kawahara, T., Crawford, D.J. and Yahara, T. 2000a. Phylogeny and Phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): Insights from Sequence Data of the nrDNA ITS Regions and cpDNA RFLP. *J. Plant Res.* 133: 79-89.

Ito, M., Yahara, T., King, M.R., Watanabe, K., Oshita, S., Yokoyama J. and Crawford, D.J. 2000b. Molecular phylogeny of the Eupatorieae (Asteraceae) estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. *J. Plant Res.* 133: 91-96.

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 4 件)

- ① Kobayashi, H., Masumoto, K., Sakai, K., Yoshitake, H., Ito, M. 2015. Records of Scarabaeoid Beetles from Ludao Is., Taiwan (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Japanese Journal of Systematic Entomology* 21(2): 367-372.
- ② 横原 寛、吉武 啓、山迫 淳介、伊藤 元己 2015. 緑島のカミキリムシ, *Sayabane N.S.* 17: 40-45. Huang, J.,
- ③ Yoshitake H., Zhang, R., Ito, M. 2014. Taxonomic revision of the East Asian genus, *Scleropteroides* Colonnelli 1979 (Coleoptera, Curculionidae, Ceutorhynchinae). *ZooKeys* 437: 45-86. doi: 10.3897/zookeys.437.6563
- ④ Kishimoto-Yamada, K., Kamiya, K., Meleng, P., Diway, B., Kaliang, H., Chong, L., Itioka, T., Sakai, S. and Ito M. 2013. Wide Host Ranges of Herbivorous Beetles? Insights from DNA Bar Coding. *PLoS ONE* 8(9): e74426. doi:10.1371/journal.pone.0074426

[学会発表] (計 1 件)

- ① 正路 淳也、大久保 美咲、伊藤 元己. アジア、ヨーロッパ産ブナ属植物 3 種の根における真菌群のメタゲノム比較解析. 日本生態学会第 63 回大会, 2016 年 3 月 21~25 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市青葉区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 元己 (ITO, Motomi)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 0 0 1 9 3 5 2 4

(2) 研究分担者

森長 真一 (MORINAGA, Shin-ichi)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：80568262

吉武 啓 (YOSITAKE, Hiraku)
農業環境技術研究所・農業環境インベン
トリーセンター・主任研究員
研究者番号：50517662

細矢 剛 (HOSOYA, Tsuyoshi)
国立科学博物館・植物研究部・グループ
長
研究者番号：60392536

神保 宇嗣 (JINBO, Utsugi)
国立科学博物館・動物研究部・研究員
研究者番号：10568281