

## 「花の雌雄差が昆虫や微生物群集に与える影響の環境依存性を解き明かす」

神戸大学 理学研究科 辻 かおる

### 1 研究の背景と目的

「生物多様性」は古くから研究者を魅了し続けてきただけでなく、人類の存続にも関わる重要課題である。しかし、種内の多様性を象徴する種内多型の一つ「雌雄差」は進化学で、「種多様性」や「多様な種からなる生物群集」は生態学でと、独立の研究分野で研究が進められてきた。

報告者は過去に野外観察から、雌雄異株の樹木ヒサカキの雄花を食べている蛾の幼虫が雌花では見つからない事に気づき、この幼虫が雌花を食べると死亡することを突き止めた。この植物の「雌雄差」が植食性昆虫の生死を決めるという世界で初めての発見から、これまでの想像以上に雌雄差は他種の生物に多大な影響を与えている可能性があることに気がついた。そこで研究を掘り下げ、花の雌雄差が昆虫群集や微生物群集に影響を与えており、また逆に、昆虫や微生物群集が植物の雌雄差の進化に関わっている可能性があることを解明した。

これらの研究から、申請者は「雌雄差」と「生物群集・種多様性」には、種分化や絶滅、多種共存機構や、侵入時の定着、進化などの様々な機構を介し、強い結びつきがあることを示した。これらの成果をきっかけに、近年、実証と理論の両側面から、その結びつきが具体的に示され始めている。その中で、雌雄差と生物群集の関係は周辺植生や人為的環境変動の影響を受けており、環境依存的事であることが示唆されている。このような申請者の研究をもとに、本研究では、花-動物-微生物の相互作用に着目し、雌雄差と生物群集の環境依存的な繋りを解明することを目指した。

兵庫県は、市街地を含め標高差があり、海岸や高山が市街地と近接しているという特徴がある。この特徴から、兵庫県は、近接地域で標高に伴う気温等の環境の変化や、人の暮らしに伴う環境変化の影響を検証するのに適した地域と考えられる。そこで、この兵庫県の特徴を活かし、県内複数箇所で、花-昆虫-微生物の調査を行いたいと考えた。

まとめると、本研究では、兵庫県の地理的特徴を活かし、周辺環境が雌雄差と生物群集の結びつきに与える影響を検証することを目的とした。

### 2 研究方法・研究内容

報告者はこれまで、雌雄異株の樹木ハマヒサカキの花蜜内微生物についての調査を和歌山県にて行ってきた。そのなかで、雄花の蜜からは雌花にくらべ、より多

くの酵母や細菌などの花蜜内微生物が見つかることを明らかにしている。これら花蜜内微生物は訪花昆虫などにより、花に持ち込まれ、持ち込まれた先の花蜜内で増殖する。その増殖の際に、花蜜成分の雌雄差が微生物に影響を与える可能性などが考えられる。また、その影響は微生物種ごとに異なる可能性がある。他にも、場所により訪花昆虫や、昆虫に付着している微生物種が異なる可能性もある。

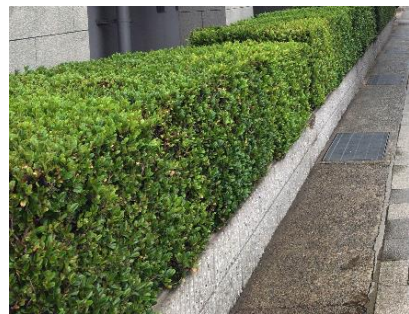
このように、場所が違えば、生物群集を含む様々な環境が異なり、同じ植物種の花蜜内に棲む微生物であっても、種構成が異なることが予想される。実際に、予備的な結果ではあるが和歌山の直線距離にして 30km 位離れた海岸沿いの 2 つの調査地では、花蜜内微生物群集が異なっていた(Ecology 2018)。

兵庫県下でのハマヒサカキの調査はこれまで行われていないが、花—昆虫—微生物の新たな繋がりが発見されることが期待されるため、本研究では、兵庫県という、標高差が大きく環境要因を検証するのに適した地域の複数地点で調査を行った。

まず初めに、神戸市内でのハマヒサカキの探索を行い、標高の異なる 3 箇所を調査地として選定した。この 3 地点全ては、ハマヒサカキの植栽が行われていた地点である。これら 3 箇所を以下 A-C 地点とする。

A: 標高 180m の街路樹 (右上写真)、B: 標高 17m の住宅地 (右中央写真)、C: 標高 6m の公園緑地 (右下写真)。

いずれの箇所も人為的に移植栽培しているもので、うち地点 A は住宅地が並ぶ地域の街路樹として、地点 B は都市部の住宅地内の植木としてハマヒサカキが植栽されていた。地点 A では針葉樹とともに植栽されており、地点 B ではハマヒサカキ 1 種のみが植栽されていた。残り 1 箇所の C 地点は公園内の緑地形成のための植え込みとして、クロマツ、ハマビワ、コバノミツバツツジ、ロウバイ、サンシュユ、カラタネオガタマ、ハンノキ、アラカシ、コナラ、エノキ、ムクノキ、クリ、ユズなどともに植栽されていた。



上述の3地点で、キャピラリーを用いて花蜜を採集した。採集した花蜜は、採集直後に寒天培地（細菌培養用 R2A 培地と菌類培養用 YM 培地）に播き、25°Cで4日ほど培養し、形成されたコロニーを観察した。また、コロニーが形成された微生物種については、単離・同定を行った。同定にはサンガーシーケンスを用い、PCR に用いるプライマーとして、菌類は NL1 と NL4 を、細菌類は 27F と 1492R を使用している。またシーケンスは外注により進めた。

### 3 研究成果

神戸市内3つの調査地のうち、調査地 B（標高 17m の住宅地）において、和歌山同様、ハナアブ（右写真）やキンバエなどの複数種の双翅目昆虫が花に訪れ蜜を飲んでいるのが観察された。ただし、調査地 B では、和歌山でのこれまでの調査地と比べ、開花時の気温が低く、訪花昆虫数も少ない傾向がみられた（私信）。しかし、調査した3地点ともに果実が見られたため、ある程度の昆虫が訪れ、受粉が行われていると考えられる。訪花昆虫の詳細な種同定や、訪花頻度などについては今後の課題であるが、兵庫県でも和歌山県と同様に、花には複数種の昆虫が訪れており、それら昆虫が花蜜内微生物の移動に関わっていることが明らかとなった。



花蜜内微生物については、和歌山に比べ兵庫県の3地点では、検出される酵母や細菌の数が少ない傾向にあった（私信）。また、採集した花蜜を用い、培地で培養できないと思われる微生物種についても調べるため、蜜中 DNA の網羅的解析も少数のサンプルを用いて行ったが、DNA 濃度が低すぎ、ほとんどのサンプルで解析を進めることができなかった。今後、今回の結果を踏まえ、DNA の抽出過程を改良することで、網羅的解析を進める予定である。

検出された微生物種についてはサンガーシーケンスを行った結果、細菌では *Pantoea* 属や *Pseudomonas* 属など、また、菌類では、糸状菌の *Aspergillus* 属や *Aureobasidium* 属などが見つかった。これらの微生物は、和歌山で最も多く見られた酵母 *Metschnikowia* 属や *Candida* 属、細菌 *Acinetobacter* 属や *Erwinia* 属などとは異なる分類群のものであった。酵母 *Metschnikowia* 属や *Candida* 属、細菌 *Acinetobacter* 属や *Erwinia* 属は世界各国の花蜜で増殖しているとの報告がある一方、今回の調査で神戸の調査地で得られた多くの微生物は特に花蜜と強い関係性があると考えられている分類群ではなかった。*Pantoea* 属や *Pseudomonas* 属は他の植物の蜜などから見つかることもあるが、今回の調査では、培地上で検出された *Pantoea* 属や *Pseudomonas* 属のコロニー数は数個程度と少なかったことから、今回の調査で検出されたものは、とくに蜜の中で増殖するタイプの微生物種ではない可能性もある。今後さらなる遺伝解析を進め、微生物の種組成が地域間でどの程

度異なるのかも明らかにしたい。

今回調査を行った3地点での、上述の種を含む、微生物の検出傾向として、いくつかの傾向が観察された。まず、調査地B（標高17mの住宅地）では、採集した雄花の5割ほどから培地上で微生物が検出されたが、雌花では採集した花の1割ほどからしか微生物は検出されなかった。この雄花では雌花より微生物が高頻度で検出される傾向は和歌山での傾向と一致するものの、和歌山とは異なり、検出されたコロニーの数はいずれも数個と極めて少なかった。

微生物が少ないもののある程度検出された雄花を対象に、兵庫県3地点で比較した結果についても報告する。最も微生物の検出頻度が低かったのは、一番標高が高く街路樹として植栽されていた地点Aで、ついで標高が中程度の住宅地の地点Bであった。最も多く微生物が検出されたのは、標高が最も低く、緑地公園内に植栽されている地点Cであった。地点Cでは雄花の8割から微生物が検出され、とくに細菌類の検出率が他2地点より高かった。また、地点Cで一つの花から検出された細菌のコロニー数は、和歌山同様に花ごとに大きく異なり、まったく検出されない花から、数千のコロニーが検出されるものまで見られた。

今回みられた地点間の違いは、一般的に、標高が高いほど気温が低く、微生物の増殖速度が抑えられること、緑地が多いほど昆虫の個体数が多く、花に微生物が持ち込まれる確率が高くなる傾向にあることなど、先行研究から予想できる傾向と一致している。今回、明らかになった傾向は、今回の調査で用いた3地点が、「周辺環境が雌雄差と生物群集の結びつきに与える影響を検証する」のに適した調査場所であることを示唆している。そこで、今後、今回明らかになった傾向をもとに、今回の3地点での研究を継続、発展させることにより、地点間の微生物叢の違いや、その違いが花の雌雄差と昆虫や微生物との繋がりにどのような効果をもたらすのかを解き明かしていきたいと考えている。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

植木、自生植物として身近なハマヒサカキという植物を材料に、生物間相互作用について調査を行った本研究結果は、植栽する樹木の選定や都市環境の景観が生物多様性と繋がっていることを示唆している。また、和歌山、神戸と地域に関わらず、花の性別により花蜜内微生物の検出割合などが異なることから、花の雌雄差は広い地域で微生物群集に影響を与えていることが伺える。今度、今回明らかになった、場所による微生物群中の違いなどの研究を進展させることにより、私たちの暮らしに伴って急速に変化している環境と、生物多様性の維持機構の関連の解明を進め、持続的な暮らし方の提案につなげたい。