



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ecological consequences of genetic variation in a foundation species on above- and below-ground communities in the field [an abstract of entire text]
Author(s)	鍵谷, 進乃介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13894号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78587
Type	doctoral thesis
File Information	Shinnosuke_KAGIYA_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士（環境科学）

氏 名 鍵谷 進乃介

学 位 論 文 題 名

Ecological consequences of genetic variation in a foundation species on above- and below-ground communities in the field

（地上部-地下部群集への生態系基盤種の遺伝的変異の影響に関する生態学的研究）

近年、生物種内にみられる遺伝的変異が生物間相互作用の強度や正負、帰結に及ぼす影響への関心が高まっている。多くの研究によって、植物種内の遺伝的変異から、表現形質の変異を介した、多様な生物の群集構造への波及効果が示されてきた。しかし、ほとんどの研究が圃場実験を用いた均質な環境下での結果に基づいている。そのため、生物群集形成における植物の遺伝的変異の重要性に関して、複雑な野外環境下での理解は不十分である。また、これまでの研究では、植物と植食者のような捕食－被食相互作用に基づく群集形成に着目しているが、生物群集でみられる生物間相互作用は捕食－被食関係だけではない。特に、ほとんどの陸上植物が普遍的に根圏微生物と共生しているが、共生関係にみられる遺伝的変異が群集構造に与える効果は明らかにされていない。共生微生物には、寄主植物の成長や生存に多大な影響を及ぼし得るほどの多様な遺伝的変異が存在する。しかし、共生関係における遺伝的変異の効果に関する知見のほとんどが操作実験に基づいており、植物と共生する共生微生物の群集構造の野外実態はまだわかっていない。そのため、野外における植物－根圏微生物の共生関係によって生み出される植物種内の表現型変異とその生態学的波及効果も見過ごされている。野外環境下における植物の種内変異から生物群集への波及効果の理解には、捕食－被食に基づく地上部群集と、共生微生物の地下部群集を統合する必要がある。

本論文では、森林生態系を構成する基盤的樹種における遺伝的変異が樹上性節足動物と地下部共生細菌のそれぞれの群集形成に与える影響の違いを解明し、地上部と地下部の生物群集の植物を介した相互作用を明らかにすることで、野外生物群集の形成における生態系基盤種の遺伝的変異の役割を包括的に理解することを目的としている。この目的を達成するため、河畔林の構成樹種であるケヤマハンノキ (*Alnus incana* ssp. *hirsuta*; 以下、ハンノキ) と、ハンノキ属植物と根粒共生する窒素固定細菌フランキア (*Frankia* sp.) の野外共生系モデルを確立し、次世代シーケンサー (NGS) を活用したゲノム解析手法によって、以下の研究を行った。

第2章では、樹木の遺伝的変異とその樹上に形成される節足動物群集の関係の野外実態を明らかにすることを目的としている。この目的の達成のため、北大雨龍研究林に流れる4つの河川に設定された調査地点12か所に生育するハンノキ計216個体を対象として、RAD-seqによるゲノムワイド多型解析を行った。また、遺伝解析を行ったハンノキ個体のうち、85個体について、節足動物群集と環境要因の代替指標として各ハンノキ個体の周囲5m円内の樹種構成の調査を行った。樹上の節足動物

群集は、最大長5 mの捕虫網により、各ハンノキ個体に対して1分間のスウィーピングを2回行うことで採集した。調査は2014年と2015年の夏季に行われた。その結果、地理的距離には依存しないハンノキの遺伝的空間構造が検出された。また、マンテル検定を用いた相関検定の結果、ハンノキのNeiの遺伝距離とMorisita-Horn指標に基づく節足動物の群集非類似度の間に有意な正の相関関係が検出された。これにより、樹上に形成される節足動物の群集は、遺伝的に離れたハンノキ集団ほど異なる関係が明らかにされた。この相関関係について、一般化非類似度モデリング (GDM) を用いて、本調査で計測した4つの要因（ハンノキ間の遺伝的距離、地理的距離、調査日のずれ、周囲樹種構成の違い）がもつ節足動物群集の非類似度に対する説明力の比較を行った。その結果、本研究で計測した説明要因の中でも、ハンノキの遺伝的距離は節足動物群集の違いを予測する上で最も重要な要因であることが明らかとなり、野外における遺伝的類似則が支持された。続いて、樹木の遺伝的変異に応答しやすい機能群を調べるため、得られた節足動物群集を食性に基づいた5つの機能群（咀嚼性植食者、吸汁性植食者、クモ類、捕食性昆虫、その他）に分類し、ハンノキの遺伝距離との相関関係についてマンテル検定を用いて相関検定を行った。その結果、2014年では、咀嚼性植食者とクモ類、捕食性昆虫がハンノキの遺伝距離と有意な正の相関関係にあることが示された。捕食性昆虫については、ハンノキの遺伝距離との相関関係が2015年にもみられており、特に応答しやすい機能群であることが示された。さらに、構造方程式モデリング (SEM) により、ハンノキの遺伝的変異による樹上性節足動物の群集構造に対する効果は、トップダウン効果とボトムアップ効果の両方の経路を通っていることが示され、生物間相互作用網の構造にも植物の遺伝的変異が影響していることがわかった。以上より、変動的な野外環境下においても、植物の遺伝的変異が関連する生物群集に対する強い説明要因であることが明らかになった。

第3章では、森林内における共生可能なフランキアの遺伝的多様性とその遺伝的空間構造を明らかにすることを目的としている。野外環境下における根粒共生に関わる共生細菌の遺伝的多様性を明らかにすることはその寄主植物と関連する生物群集の形成や窒素循環を理解するうえで重要となる。しかし、比較的小さい空間スケール内での共生細菌の遺伝的多様性についての知見はまだ不十分である。そこで、同研究林内に生育するハンノキ稚樹213個体に形成された根粒を約100m間隔で連続的に採取し、フランキア特異的な*nifD*-Kスペーサー領域についてサンガーシーケンシングによる遺伝解析を行った。その結果、得られた 201配列について、類似度97.0%の閾値によって操作的分類単位 (OTU) による分類を行った結果、18タイプのフランキアOTUが見つかった。最尤法に基づく系統樹により、これらのフランキアOTUは、先行研究によって異なるハンノキ属植物種 (*A. incana* ssp. *rubra*, *A. incana* ssp. *tenuifolia*, *A. viridis*) の根粒から見つかったそれぞれのフランキアと近縁なクレードに含まれていた。これらのことから、局所的な空間スケール内でも、フランキアの遺伝的多様性は先行研究と同程度であることが示された。加えて、AMOVAやPERMANOVAによる統計解析によって、森林内のフランキア遺伝的空間構造は、河川による分断に加え、100m間隔でも異なるという構造がみられた。このことから、局所スケールにおけるフランキアの遺伝的空間構造は弱い地理構造を伴ってモザイク状に分布していることが明らかにされた。以上より、野外環境下において、寄主樹木が晒されている共生細菌の遺伝子型は個体間でも異なる可能性が示唆された。

第4章では、遺伝的に多様に存在する共生細菌から形成される植物と共生する細菌群集の実態を調べた。捕食-被食相互作用を通じた、従来の植物の遺伝的変異から生物群集への波及効果に関する

コンセプトの根底には、植物－植食者相互作用にみられる逃避－放散共進化の視点があると考えられる。逃避－放散共進化のコンセプトでは、植食者に対する防衛形質を獲得していく植物側の進化とそれに対する抵抗性を獲得していく植食者との軍拡競争による共進化の結果、系統的に近縁な植物では類似した防衛形質をもつことから、それを利用する植食者も系統的に近縁となることが予測されている。これまでの捕食－被食相互作用を通じた研究では、地上部、地下部に関わらず、逃避－放散共進化と同じように互いが多様化へ向かうシナリオが暗に考えられていた。それに対し、共生相互作用では、共生細菌の遺伝的多様性が高い環境下で相利共生を維持するために、利益を搾取する共生細菌との関係を避けるメカニズムが働いている。理論研究により、このようなメカニズムが働くことで共生細菌の多様性は抑制されることが予測されている。そのため、植物－細菌共生系では捕食－被食相互作用とは異なるプロセスにより群集が形成されることが予想される。そこで、ハンノキと共生関係にあるフランキア群集の形成プロセスを明らかにするために、ハンノキ個体内に共生するフランキアと周囲の土壤中に存在するフランキアについて、NGSによる網羅的な探索を行い、その遺伝的組成の比較を行った。第2章で扱ったとしたハンノキ個体のうち、78個体を対象として、各個体から7つの根粒と、その根圏土壌3か所を採取した。また、ホスト樹冠外の土壌（以下、河畔林土壌）についても、12か所の調査地点から、10m間隔で4か所採取した。これらのサンプルに対して、*nitD-K* スペースャー領域についてMiSeqによるシーケンシングを行った。DADA2パイプラインによって得られた配列のフィルタリングを行い、計352配列のアンプリコンシーケンスバリエーション（ASV）を得た。その結果、根圏土壌及び河畔林土壌から検出されたフランキアASVはそれぞれ計228配列と計103配列だったのに対し、根粒中から検出されたフランキアASVは計38配列と少数だった。これらの配列について、類似度97.0%の閾値によってOTU分類を行った結果、19タイプのOTUに分類された。その結果、根圏土壌中には多様なフランキアOTUが検出されたにも関わらず、ほとんどのハンノキ個体が特定の3タイプのフランキアOTUによって構成される共通の共生細菌組成をもっていることがわかった。また、根粒中のフランキア群集組成について、マンテル検定による相関検定の結果、ハンノキの遺伝距離との相関関係はみられず、捕食－被食相互作用における群集形成プロセスで予測されていた関係性とは異なる結果がみられた。さらに、根圏土壌中から検出されたフランキア群集のデータを基に各OTUの出現頻度を考慮して7回のランダムサンプリングを行うことで、偶然によって根粒中に形成されるフランキア群集のnullモデルを作成した。このnullモデルと実際の根粒群集の平均OTU数と群集組成について、ポワソン分布を考慮した一般化線形モデル（GLM）とPERMANOVAを用いて、それぞれの解析を行った。その結果、根粒に形成されているフランキア群集は、偶然によって形成されたnullモデルよりも有意に少数のOTUで構成されており、その組成も異なっていることがわかった。以上より、共生相手の選別が機能的に行われていることが示唆された。加えて、共生相手の選別度合と樹木の遺伝的変異との関連性を解析するため、群集解析手法を応用することで共生相手の選別度合の定量化を行った。根粒中の共生細菌は周囲の土壤中に存在する共生細菌群集から選別されていると考えられる。そこで、根粒群集と根圏土壌中のフランキア群集の非類似度が、共生相手の選別度合の指標として扱うことができると考えた。この考えの下、各樹木個体の根粒群集と各河川レベルでの根圏土壌中のフランキアOTUプール間の群集非類似度をJaccard指標に基づいて算出し、選別度指標として扱った。ハンノキのNeiの遺伝距離と選別度指標の相関関係について、マンテル検定によって解析した結果、有意な正の相関関係がみられ、選別

度指標は近縁なハンノキ集団では類似していることが明らかになった。また、GDMを用いて、各要因（ハンノキの遺伝距離、地理的距離、土壌pH、土壌中無機態窒素量、根圏土壌中のフランキア群集組成）による選別度指標に対する説明力の比較を行った。その結果、今回計測した要因の中で、ハンノキの遺伝距離が最も説明力が高いことがわかった。以上の結果より、共生相手の群集形成において、選別が重要であることを明らかにしたとともに、その度合いには樹木の遺伝的変異が影響している可能性が示唆された。

第5章では、ハンノキ個体内のフランキア遺伝的組成が、植物の表現形質を介して植食者の成長や生存、嗜好性に与える影響を検証するために、野外ハンノキ個体を用いた実験を行った。根粒共生系では、根粒菌との共生関係の有無によって、ホスト植物に対する食害ダメージや、その上の植食者群集の種数や個体数といった群集構造が異なることが知られている。そのメカニズムの一つとして、根粒菌との共生コストが影響している。根粒菌などの窒素固定細菌は、窒素固定に必要な炭素源として、ホスト植物の光合成産物の一部を消費することにより、炭素ベースの防衛物質の生成が制限されることで、食害ダメージが増加につながることが報告されている。このように、根粒共生は、ホスト植物を介して、地上部相互作用にまで影響している。しかし、従来の根圏共生細菌から地上部植食者に対する寄主植物を介した間接効果に関する研究のほとんどが、共生細菌の遺伝子型や有無を実験的に操作しており、寄主植物が野外環境下で実際に共生関係を結んでいる共生細菌の組成による影響はまだ明らかにされていない。そこで、地上部－地下部相互作用の野外実態を明らかにするため、野外個体を用いた実験を行った。このアプローチによって、森林構成樹種の成木が自然環境下で結んでいる共生関係を扱うことができるため、従来の実験系がもつ限界を乗り越えることが可能となる。植食者として、ハンノキ属植物を主な餌種とするハンノキハムシ (*Agelastica coerulea*; 以下、ハムシ) を用いた。第4章の結果に基づいて5タイプの異なるフランキア組成をもつハンノキ計15個体を同研究林内の1河川の調査地点3か所から選択して葉を採取し、総フェノール量と縮合タンニン量の計測と、採餌実験と選好性実験を行った。対象となるハムシは、同研究林外に生育するケヤマハンノキから計22個体の成虫を採取し、選好性実験に用いた。また、そのうちのメス4個体から得た幼虫計180個体を採餌実験に用いた。採餌実験には、直径9.0 cmのシャーレを使用した。シャーレ内に孵化直後のハムシ幼虫1個体とハンノキの葉1枚を入れ、インキュベーター内で蛹化まで飼育した。孵化20日後にハムシ幼虫の重量を計測し、成長量を評価した。また、ほぼすべての幼虫が蛹化を完了させる孵化30日後までの生存率を計測した。選好性実験では、直径12.0 cmのシャーレを使用した。シャーレの中心にハムシ成虫1個体を、シャーレの両端に異なる2組のハンノキの葉から切り出したリーフディスク (ø 11.5 mm) をそれぞれ設置し、ハムシ成虫がどちらかの葉を齧るまで観察を行うことで選好性を評価した。これらの実験結果について一般線形混合モデル (GLMM) を用いて解析を行った結果、フランキア組成の違いによる葉中の総フェノール量や縮合タンニン量に違いはみられなかったものの、ハムシ幼虫の生存率が有意に異なっていることがわかった。さらに、フランキア組成を構成する個々のフランキアOTUの効果を評価するため、各OTUの在・不在によるハムシへの影響についてGLMMを用いて解析した結果、ハムシ幼虫の生存率に対して正と負の相反する効果を与えるフランキアOTUが存在していることがわかった。以上の結果より、共生コストによる影響はみられなかったものの、植物の防衛形質に対して共生細菌の遺伝的変異の効果が働いていることが示唆された。加えて、ハムシの嗜好性に対するハンノキ集団の効果がみられ、樹木と

共生細菌の遺伝的変異は異なる経路を通して植食者に影響している可能性も示唆された。

本研究より、野外環境下において、樹木の遺伝的変異が樹上性節足動物の群集構造の重要な決定要因であることが示された。一方で、共生細菌の群集構造は樹木の遺伝的変異による違いはみられなかったものの、選別度合が樹木の遺伝的変異によって異なることが示唆された。以上から、植物の遺伝的変異から生物群集への波及効果は相互作用の経路によって異なることが明らかになった。また、樹木共生細菌の群集組成は植食性昆虫の生存に影響を与えており、その影響は樹木の遺伝的変異とは異なる経路を通っている可能性が示唆された。以上より、植物－微生物共生関係の統合により、遺伝的類似則の発展に繋がると考えられる。遺伝情報と同様、植物と共生する微生物群集の変動は少ないことが4章の結果から予測される。しかし、植食者の生存率に影響するほどの組成の変異が植物個体間でみられたことから、樹木の遺伝的変異よりもより狭い空間スケールにおける群集予測に役立つ可能性がある。加えて、その共生細菌の群集形成プロセスには植物の遺伝的変異が影響する可能性が示唆された。以上から、植物の被食－捕食相互作用に関わる防衛形質の遺伝的基盤に加え、共生相互作用に関わる遺伝子にも注目することで、自然生態系における生物群集の成り立ちのより深い理解が期待される。