

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05618

研究課題名(和文) 北東シベリア永久凍土地帯のガス代謝と微生物群集の環境変動に対する応答

研究課題名(英文) Response of gas metabolism and microbial community in soil in the permafrost zone of northeastern Siberia to the environmental change

研究代表者

村瀬 潤 (Murase, Jun)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30285241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：北東シベリア永久凍土湿地帯の温室効果ガスメタンの代謝とそれに関与する微生物群集の実態と環境変動に対する応答を調査した。メタン放出の鍵となるメタン酸化ポテンシャルは他の環北極域の湿地土壌よりも高いことが明らかとなる一方で、メタン放出に対しての抑止力としての機能は弱いことが示された。また、土壌微生物群集の構成についても他の環北極域の土壌との違いが明らかとなり、本地域の独自性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、地球環境変動の影響が最も懸念される環北極域のなかでも調査が進んでいない北東シベリアを対象に、ガス代謝と微生物叢の解析を同時に行い、永久凍土湿地土壌の物質循環とそれに関わる微生物群集を明らかにした。メタン酸化に対する温度条件の影響やメタン酸化に関わる微生物叢の知見は、温暖化に対する永久凍土帯のガス代謝の応答と将来予測に資する生物学的パラメータを提供するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the actual conditions of the metabolism of the greenhouse gas methane in the northeastern Siberian permafrost wetland and the microbial communities involved in it and the response to environmental changes. While the methane oxidation potential, which is the key to methane emission, is found to be higher than that of the other arctic wetland soils, it has been shown that its function as a deterrent to methane emission is weak. Also, regarding the composition of the soil microbial community, the difference from the other arctic soils was clarified, and the uniqueness of this area was clarified.

研究分野：土壌微生物学、生物地球化学

キーワード：北東シベリア メタン 地球温暖化 湿地 微生物群集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

永久凍土帯を含む寒冷地の湿地やツンドラには地球の全土壌炭素の 30% に相当する 20Gt の土壌有機物炭素が蓄積しており、陸上の炭素循環にとって極めて重要な生態系である。湿地はメタンの主要な自然発生源であり、寒冷湿地からの年間放出量は 35Tg yr<sup>-1</sup>、大気メタンの総発生量の約 7% に相当すると見積もられている。また、北半球の高緯度地域は地球温暖化の影響を最も強く受ける生態系であると考えられており、将来的に炭素循環やガス代謝が大きく変化する可能性が指摘されている (村瀬 2012)。

ガス代謝に関与する微生物の環境変動に対する応答はその群集構造と深く関わっている。近年、極域陸域生態系の微生物群集の解析が世界的に進められており、アラスカ、カナダ、スウェーデン、南極の永久凍土の微生物群集の多様性は高いこと、気候、植生が類似していても群集構造は地域によって明確に異なることが明らかになりつつある。また、永久凍土とその上部の活動層では微生物群集が異なっていることが示されている (Jansson and Tas 2014) が、その理由は明らかでない。一方で、広大なシベリア永久凍土帯の微生物群集の知見は現在のところ地理的に非常に限定されている (Gittel et al. 2014)。

### 2. 研究の目的

本研究では、北東シベリアにおける永久凍土湿地帯のメタンを中心とするガス代謝とそれに関与する微生物群集の実態と環境変動に対する応答を明らかにする。現地におけるガスフラックス観測を行うとともに、次世代シーケンサーを用いて湿地土壌の微生物群集を網羅的に解析する。また、室内培養実験で湿地土壌のガス代謝活性を測定するとともに安定同位体プロービング法によってガス代謝に関わる微生物群集を明らかにする。さらに現地観測および室内培養における短期～中長期の操作実験によって、地温上昇、活動層の拡大に対するガス代謝および微生物の応答を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ガス代謝の最も活発な夏季において、調査地の主たる植生を形成するミズゴケ、スゲ、およびコケ、ハイマツを中心とする異なる場所から表層から凍土層表層 (深さ 40-46cm) の土壌を層位ごとに採取し、ピン培養法により速やかにメタン酸化活性を測定した。湿地土壌の間隙水の温度および酸素濃度を測定した。

(2) ミズゴケおよびスゲが優占する湿地からのメタンフラックスをクローズドチャンバー法により測定した。また、メタン酸化の特異的阻害剤(CH<sub>2</sub>F<sub>2</sub>)を添加後のメタンフラックスを測定し、メタン酸化反応の寄与を推定した。

(3) ガスフラックス観測地点を含む植生および地形学的特徴の異なる場所から土壌試料を採取する。核酸抽出後、rRNA 遺伝子およびその転写物を対象としたメタゲノム解析により、微生物群集構成の詳細を明らかにした。

(4) <sup>13</sup>C 標識したメタンをミズゴケおよびスゲが優占する湿地土壌に添加し、5 および 15 で培養した。培養後の土壌から DNA を抽出、密度勾配遠心分離により分画後、<sup>13</sup>C で標識された DNA を分離し、rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスにより、メタンを利用する微生物群集を解析した。

### 4. 研究成果

(1) ロシア連邦サハ共和国インディギルカ川流域において夏季のミズゴケおよびスゲ植生湿地帯から採取した土壌は、培養後速やかにメタン酸化を酸化した。また、水飽和した無酸素層や凍土層から採取した土壌や低温 (0 ) で培養した土壌もメタン酸化活性を示した。その速度は、他の環北極域湿地帯で同様な方法で測定されたメタン酸化速度に比べて高かった。土壌表層の間隙水から採取した溶存メタンは、酸化を示す「重い」炭素および水素安定同位体比を示したが、20cm 以深ではメタンの酸化は示唆されなかった。以上のように、実際に現場でメタン酸化が起こっているのは土壌表層など酸素が存在する場所に限られているものの、微生物の潜在的

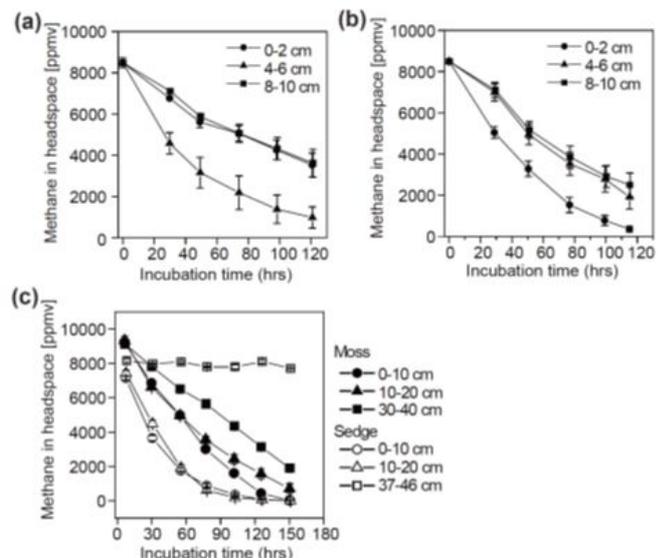


図 1 湿地土壌の培養に伴う気相のメタン濃度の経時変化 (a)コケ湿地表層、(b)スゲ湿地表層、(c)融解層全層

な活性は嫌気層、凍結層においても長期にわたって保存されており、環境条件が好適になれば速やかにメタンが酸化されると予想された。今後温暖化に伴う永久凍土の溶解、ガス代謝の変化を推定するうえでメタン酸化のプロセスを十分考慮する必要があると考えられた。

(2)クローズドチャンバー法により測定した湿地植生からのメタンフラックスは  $8 \sim 1800 \mu\text{mol h}^{-1} \text{m}^{-2}$  の範囲であった。阻害剤を添加して 10 分～19 時間の後に再度メタンフラックスを測定したところ、ほとんど変化が認められなかった。このことから、植生を經由した酸素供給とリンクしたメタン酸化は非常に小さいことが示唆された。(1)の結果と合わせ、本湿地土壌は高いメタン酸化ポテンシャルを維持しつつも、現場における実際の酸化量は限定的であると想定された。

(3) 16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスの結果から、同土壌に生息するメタン酸化細菌群集の構成を推定した。この土壌に生息するメタン酸化細菌群集の中で、未分類の Methylocystaceae 以外、典型的な Type I, II メタン酸化菌が占める割合は非常に低かった。一方、それ以外のメタン酸化菌として知られる *Crenothrix* や *Verrucomicrobia* (Methylacidiphilales) に近縁な配列が優占していることが示され、特に 20cm 以深では *Crenothrix* に近縁を示す配列が卓越した。本研究で得られたメタン酸化菌の群集構成は、他の環北極域とは異なっており、地域によって異なる微生物群がメタンの代謝に関わる可能性が示唆された。北東シベリア タイガ ツンドラ境界域の湿地土壌の原核生物(細菌、古細菌)群集を 16S rRNA を対象としたアンプリコンシーケンスにより解析した。16S rRNA を発現する活性の高い原核生物群集は、前年度実施した DNA 解析に基づく群集とは大きく異なった。また、植生(コケ、スゲ)や土壌層位間でも群集構造は異なった。RNA に基づく群集では *Actinobacteria* とユーリーアーキオータの優占度が高くなった。特にメタン生成古細菌は、DNA に基づく群集での優占度は 0.3-2.4% 程度であったが、RNA に基づく群集の中では最大で 14% を占めており、メタン生成古細菌の高い活性が示唆された。*Methanosarcina*, *Methanosaeta* が RNA を発現する優占グループで、DNA で優占した *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* は RNA 解析に基づく群集の中では優占度が低かった。メタン酸化細菌は、群集全体の中の優占度は DNA, RNA とともに 2% 以下で、典型的な Type I, II メタン酸化菌の比率は低かった。DNA で優占した *Methylacidiphilales* は RNA ではそれほど優占度は高くない一方、*Crenothrix* は RNA レベルの解析でも優占度が高かった。

(4) メタン酸化に関わる微生物群集の安定同位体プロービング法により解明を試みた。現地で

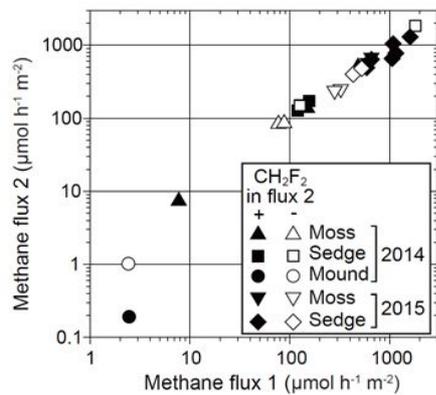


図2 メタン酸化の阻害剤の添加前(横軸)、添加後(縦軸)の湿地のメタンフラックス

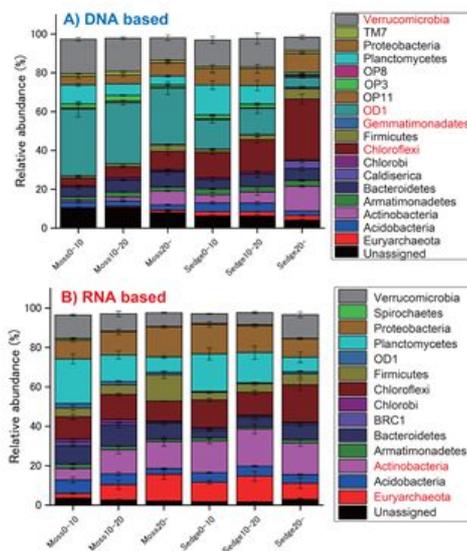


図3 湿地土壌の原核生物群集の構成

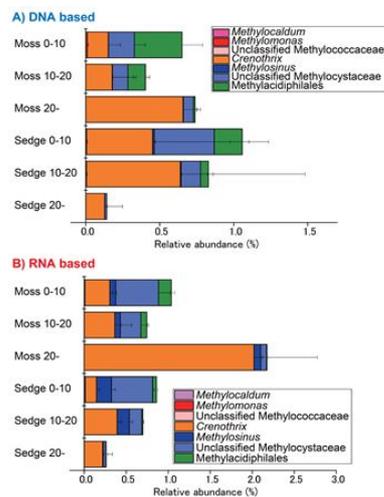


図4 メタン酸化菌群集の構成

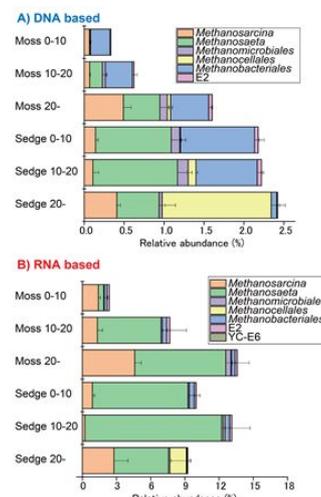


図5 メタン生成古細菌群集の構成

*Methanomicrobiales*, *Methanocellales* は RNA 解析に基づく群集の中では優占度が低かった。メタン酸化細菌は、群集全体の中の優占度は DNA, RNA とともに 2% 以下で、典型的な Type I, II メタン酸化菌の比率は低かった。DNA で優占した *Methylacidiphilales* は RNA ではそれほど優占度は高くない一方、*Crenothrix* は RNA レベルの解析でも優占度が高かった。

採取した泥炭試料を  $^{13}\text{C}$  標識したメタンを添加して培養を行ない、培養後の土壌を国内に持ち帰り、DNA の抽出、分画、16SrRNA 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 解析を行った。その結果、メタン由来の  $^{13}\text{C}$  を取り込んだ形跡は確認されず、現地での培養が十分な解析感度を有するに至らなかったと判断された。そこで、国内に持ち帰った同土壌について  $^{13}\text{C}$  標識メタンを添加した培養実験を現地よりも長期間行ったところ、 $^{13}\text{C}$  を取り込んだ群集を検出することに成功した。最も優占したのは *Crenothrix* であり、本グループがメタンを積極的に利用していることが裏付けられた。スゲ植生の土壌では *Methylomonas* が *Crenothrix* に次いで優占することが示された。培養温度を 5 から 15 に上昇すると *Crenothrix* の優占度は著しく低下し、*Methylomonas*, *Methylotinus* のほか、メタン酸化細菌以外の微生物群によるメタン由来炭素の取り込みが顕著となった。*Crenothrix* はメタン酸化細菌の中では新しく報告されたグループであり、実際の生態系での意義に関する知見は限られていた。本研究の結果から、*Crenothrix* が低温湿地で重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

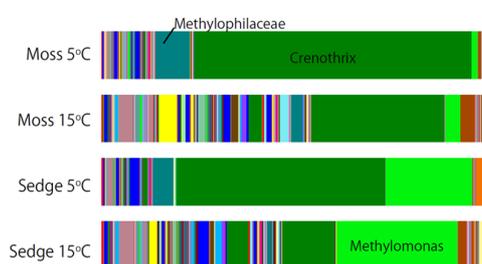


図 6 メタン由来の  $^{13}\text{C}$  を取り込んだ湿地の細菌群集

#### < 引用文献 >

Gittel A, Barta J, Kohoutova I, et al. (2014) Distinct microbial communities associated with buried soils in the Siberian tundra. ISME J 8: 841-853.

Jansson JK & Tas N (2014) The microbial ecology of permafrost. Nat Rev Micro 12: 414-425.

村瀬 潤 (2012) 北方湿地生態系からのメタン放出に及ぼす積雪の影響, 低温科学, 70, 131-136.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件 いずれも査読有)

Morozumi, T., Shingubara, R., Murase, J., Nagai, S., Kobayashi, H., Takano, S., Tei, S., Fan, R., Maximov, T. C., and Sugimoto, A.: Usability of water surface reflectance for the determination of riverine dissolved methane during extreme flooding in northeastern Siberia, Polar Science, <https://doi.org/10.1016/j.polar.2019.01.005>, 2019.

Shingubara, R., Sugimoto, A., Murase, J., Iwahana, G., Tei, S., Liang, M., Takano, S., Morozumi, T., and Maximov, T. C.: Multi-year effect of wetting on CH<sub>4</sub> flux at taiga-tundra boundary in northeastern Siberia deduced from stable isotope ratios of CH<sub>4</sub>, Biogeosciences, 16, 755-768, <https://doi.org/10.5194/bg-16-755-2019>, 2019.

〔学会発表〕(計 7 件)

Murase, J., Sugimoto, A., Shingubara, R., and Maximov, T. C.: Microflora in Arctic Wetland Soils of a Taiga-Tundra Ecotone in Northeastern Siberia, The 10th Asian Symposium in Microbial Ecology, 沖縄, 2018,

Shingubara, R., Morozumi, T., Tei, S., Murase, J., Takano, S., Fan, R., Maximov, T. C., and Sugimoto, A.: Intra-seasonal variations in CH<sub>4</sub> emissions observed by automatic and manual chambers, and in dissolved CH<sub>4</sub> concentration at taiga-tundra boundary in northeastern Siberia, 日本地球惑星科学連合 2018 年大会, 千葉, 2018,

村瀬潤, 杉本敦子, 新宮原諒, トロフィーム C マキシモフ: 北東シベリア湿地土壌のメタン酸化のポテンシャルと微生物叢の特性, 日本土壌肥料学会中部支部会, 富山, 2017,

Shingubara, R., Sugimoto, A., Murase, J., Tei, S., Takano, S., Morozumi, T., Liang, M., Iwahana, G., and Maximov, T. C.: Multi-year effect of wetting on CH<sub>4</sub> flux at taiga-tundra boundary in northeastern Siberia clarified by stable isotopes of CH<sub>4</sub>, 第 5 回国際北極研究シンポジウム (ISAR 5), 東京, 2018,

Shingubara, R., Sugimoto, A., Murase, J., Tei, S., Takano, S., Morozumi, T., Liang, M., Iwahana, G., and Maximov, T. C.: Multi-year response of CH<sub>4</sub> efflux to wetting at Indigirka Lowland in Northeastern Siberia, 日本地球惑星科学連合 連合大会 2016 年大会, 千葉, 2016,

村瀬潤, 杉本敦子, 新宮原諒, トロフィーム C マキシモフ: 北東シベリア湿地土壌のメタン酸化ポテンシャル, 日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会, 佐賀市, 2016,

村瀬潤, 杉本敦子, 新宮原諒, トロフィーム・C・マキシモフ: Methane Oxidation Potential of Arctic Wetland Soil of a Taiga-Tundra Ecotone in Northeastern Siberia, 日本地球惑星科学連合 2016 年大会, 幕張、千葉, 2016,

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 杉本敦子

ローマ字氏名: SUGIMOTO Atsuko

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 北極研究センター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 50235892

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: Torofim C. MAXIMOV

ローマ字氏名: Torofim C. MAXIMOV

研究協力者氏名: 新宮原 諒

ローマ字氏名: SHINGUBARA Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。