

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19370010

研究課題名（和文）種多様な森林生態系における土壌ポリフェノールと局在化土壌微生物群集の形成

研究課題名（英文）The formation of localized soil microbial communities in relation to dissolved soil polyphenols in a species-diverse forest ecosystem

研究代表者

北山 兼弘 (KITAYAMA KANEHIRO)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：20324684

研究成果の概要（和文）：1つの森林に共存する、異なる生葉ポリフェノール濃度を持つ針葉樹2種、広葉樹3種それぞれ5反復の樹冠下から土壌を採集し、生化学的・生態学的な解析を行った。その結果、固有の土壌微生物群集や窒素無機化特性の空間様式が樹冠に対応する形で樹種特異的に形成されていた。土壌水の溶存態ポリフェノールの分布様式との比較、及び樹木から抽出した縮合タンニンの土壌接種試験の結果から、以上の空間様式は生葉のポリフェノールによって形成されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：I conducted biochemical and ecological analyses on the topsoils collected underneath 5 replicates of each of 2 coniferous and 3 broad-leaved tree species. These species co-exist in a single forest and have different concentrations of foliar polyphenol. Soil microbial communities and the pattern of soil nitrogen mineralization differed among tree species. These spatial patterns corresponded with the patterns of dissolved polyphenols in soil water. I concluded that the foliar polyphenol was a proximate factor to form species-specific soil microbial communities and nitrogen mineralization rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	10,000,000	3,000,000	1,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態環境

キーワード：(1) フィードバック (2) 窒素無機化 (3) 土壌微生物群集 (4) 共存メカニズム (5) 土壌酵素 (6) 縮合タンニン (7) 総フェノール (8) ニッチ分割

## 1. 研究開始当初の背景

樹木の葉には二次代謝産物である種々の

ポリフェノール化合物が含まれており、1つの森林にあってもそれらの濃度には大きな

種間差が知られている。代表的なポリフェノール化合物としては、液胞に存在する可溶性のタンニンと、主に細胞壁に存在する不溶性のリグニンがある。これらのどちらも、葉が脱落する際に生分解されず、リターとして土壤に還元される。この際に、ポリフェノールに多く含まれる官能基が葉のタンパク質と水素結合し、難分解性のタンパク質-ポリフェノール複合体が土壤中で形成される (Kuiters 1990)。このため、タンパク質分解が遅くなり、窒素循環が滞ってしまう。私は、この考えをさらに発展させ、生葉中のポリフェノールは食植者に対して防衛機能があるので、植物が有機物を防衛に投資すると難分解性のリターが形成されて土壤に加入し、分解系に負荷がかかると考えた。さらに、タンパク質分解が滞り、その結果として土壤中の無機態窒素濃度が低下すると、この資源低下（土壤窒素濃度低下）を補償するように防衛への投資が増加するので、正のフィードバックにより窒素無機化はさらに低下すると考えた。私の独創的なこれらの仮説は、植物の被食防衛と腐食連鎖を結ぶポリフェノール化合物の生態系生態学的研究によって検証されつつある (Majuakim & Kitayama 投稿中)。

これまでの研究から、相対的に土壤栄養状態が悪く生産性の低い森林では、土壤水の溶存有機態窒素と溶存フェノール物質の濃度がより高いことが検証された。さらに、土壤窒素可給性の低い森林から採水した土壤水の溶存有機態窒素のうち、10%程度が難分解性のタンパク質として存在していることがわかった。難分解性のタンパク質濃度と溶存フェノール物質の濃度には高い正の相関関係が認められた。これらの結果は、土壤におけるタンパク質-ポリフェノール複合体の存在を示唆するもので、土壤窒素可給性の低

い森林ほどこの複合体が形成されやすいことを示唆した。また、実験室で作り出した人工的なタンパク質-ポリフェノール複合体に土壤微生物を接種、培養した結果、この複合体は著しく分解性の低い物質であることが確認された。

私は、これまでの成果に基づき以下のように考えを発展させた。すなわち、樹木の場合は水域生態系のように生産した有機物が拡散していくことがなく、リターは自らの足元に落ち堆積するので、このフィードバックの過程は森林全域に拡散的に生じるのではない。むしろ、樹木生葉のポリフェノール濃度には種間差が存在するので、生葉の濃度に依存した濃度のタンパク質-ポリフェノール複合体が土壤にモザイク状に形成される。異なる濃度のタンパク質-ポリフェノール複合体は、土壤微生物に対して異なる選択圧として働く。異なる樹種直下から採集した土壤微生物の基質利用様式を生化学的に調べた結果、樹種特異的な土壤微生物群集の存在と酵素活性の種間差が示され、これは上の考えに反しない結果であった。

## 2. 研究の目的

以上の経緯から、この研究では以下の3つの仮説を検証した：1) 1つの森林生態系において、ポリフェノール物質化学種や濃度の異なる腐植モザイクが樹種依存的に土壤表層に形成され、これがタンパク質-ポリフェノール複合体の局在化につながる。2) さらに、タンパク質-ポリフェノール複合体は難分解性物質として土壤微生物への選択圧となるので、樹種特異的な組成を持つ土壤微生物群集が局在的に土壤表層に形成され、分解にかかわる土壤微生物の分解酵素活性にも局在化が生じる。3) 以上の2つの作用により、可給性土壤栄養塩の濃度は森林内で空間的に局在化する。化学分析方法の開発を進め

ながら、以上の3つの仮説を検証することを目的とした。ここで、土壤微生物群集とは、グラム陽性・陰性細菌、放線菌、真菌など、上位の分類群（機能群）の組成を指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究サイトと対象樹種の選定

人為影響の低い常緑広葉樹林に1haの調査区を設定した。林冠に到達している樹木種のうち優占度の高い10種について、各種5個体から生葉を採集し、タンニン濃度を定法によって決定した。この中から、タンニン濃度の最も高い樹種、最も低い樹種、及び中間的樹種を5つ選び、各種から最も幹直径の大きな5個体を反復対象木として選定した。

#### (2) 土壤水溶存フェノール物質の樹種依存的な分布

選定した5種、5本の反復個体のそれぞれの幹を交点とし、4方向に長さ5mのトランセクトを設定し、トランセクトに沿って、一定距離毎に深度別の土壤サンプルを採集した。サンプルは冷蔵して実験室に持ち帰り、純水を加えて振とうし、遠心分離後に0.2 $\mu$ mのメンブレン・フィルターで濾過し土壤水を採集した。これを検体として、比色法で溶存総フェノール物質の濃度及び縮合タンニン濃度を測定した。土壤サンプルについては、pH、含水率、全窒素濃度、無機態窒素濃度、有機態炭素濃度を決定した。さらに、新鮮なリターと土壤表層から分解途上のリターを採集し、同様に可溶性フェノール濃度、縮合タンニン、窒素濃度、炭素濃度を決定した。

#### (3) 土壤微生物群集と酵素活性の解析

リン脂質脂肪酸は細胞膜の構成要素で、その化学組成は微生物の上位の分類群（機能群）に特異性を示す。リン脂質脂肪酸を生化学マーカーとして用いることにより、土壤微

生物群集を上位分類群レベルで直接的に特徴付けることが可能となる。採集した土壤は直ぐに実験室に持ち帰り、それぞれの試料の一部を凍結乾燥した。有機態炭素の濃度に応じて、1サンプル当たり0.3~0.4gの乾燥土壤を測り採り、10:5:4のメタノール、クロロフォルム、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に入れ、振とう後に抽出した。精製後にリン脂質脂肪酸をケイ酸カラムを用いて分離し、ガスクロマトグラフを用いてリン脂質脂肪酸化学種の同定と定量を行った。リン脂質脂肪酸の組成と濃度に基づき多変量解析を行うことによって、土壤微生物群集の特徴付けを行った。また、環境要因との相関関係から、微生物群集分布の樹種依存性と樹幹からの距離依存性を解析した。

残りの土壤については、冷蔵保存し、土壤有機物分解に関わる土壤酵素活性の分析に供試した。それぞれの土壤について、酸性リン酸分解酵素、 $\beta$ -D-Glucosidase、Phenol Oxidase、Peroxidaseの活性を調べた。異なる反応基質に一定量の土壤を反応させ、分解生成物の生成速度を比色法で定量することによって、それぞれの酵素の活性を測定した。

#### (4) 土壤栄養の局在性

土壤中の栄養塩濃度を測定しても、植物による吸収と無機化による供給のバランスをみていることになり、供給速度自体の定量は難しい。そこで、土壤中に陽イオン・陰イオン交換樹脂を微細メッシュに詰め込み、土壤中に一定時間埋設して加入してくる陽イオン・陰イオンをトラップする方法を用い、栄養塩供給速度を測定した。円形のメッシュバックを用意し、これに十分に洗浄した陽イオン・陰イオン交換樹脂の混合物を一定量測りとった。これまでに定義された土壤微生物群集の広がりに応じて、高密度にイオン交換ト

ラップを埋設した。2週間後に全てのトラップを回収し、超純水で洗浄後に室温で1週間乾燥させた。乾燥後にイオン交換樹脂を抽出液(0.1N HClに2M KClを溶解した溶液)に加え、振とうしてトラップされた土壤栄養塩(陽イオンおよび陰イオン)を遊離させた。抽出液に遊離した各種栄養塩を、無機態窒素とリン酸については比色法により、それ以外のイオンについては多元素測定装置 ICPにより定量した。

#### (5) 精製ポリフェノールの接種実験

土壤微生物群集の組成、活性に対する針葉樹由来のポリフェノールの効果を接種実験によって検証した。まず、調査区の森林で優占している針葉樹1種の生葉から、有機溶媒とカラムを用いて縮合タンニン(ポリフェノールの1群)を抽出、粗精製し、接種用の縮合タンニンを得た。その後、調査区内で優占する針葉樹1種と広葉樹1種について、それぞれ5反復の個体を選定した。選定した樹木個体の樹冠下の土壤において、縮合タンニン接種区には蒸留水に溶かした縮合タンニンを接種し、隣接した対照区には蒸留水のみを接種した。これと同時に、それぞれの反復個体から採取した土壤を実験室に持ち帰り、同様に接種実験を行った。土壤への縮合タンニン接種から1週間、経時的に土壤呼吸量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 土壤水溶存フェノール物質の樹種依存的な分布

リターとして地表に加わる縮合タンニン量の平均値は、針葉樹下で広葉樹下より高かった。土壤中の総フェノール濃度の深度変化を検討したところ、濃度自体は深度の増加とともに減少した。しかし、有機態炭素に対する総フェノール濃度の相対値は、深度の増加

とともに増加し、このパターンはフェノール性物質の難分解性を示唆した。酵素活性に対する樹種と距離の効果を検証したところ、 $\beta$ -D-Glucosidase と Phenol Oxidase において有意な樹種と距離の効果が認められた。また、Peroxidase 活性は土壤有機態炭素当たりの総フェノール量と正の相関があった。以上から、ポリフェノール含有量の異なるリターを生産する樹種の周りに、親木特異的なリターが落下し、樹種依存的なポリフェノール含有量の土壤が形成され、これが酵素活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

#### (2) 土壤微生物群集と酵素活性の解析

8つの微生物グループ(グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、菌類、放線菌、原生動物、内生菌根菌、外生菌根菌)のそれぞれに特徴的なリン脂質脂肪酸を指標種として選び、樹木個体毎のリン脂質脂肪酸の相対モル比をもとに主成分分析を行い、樹木25個体を展開した。その結果、展開した樹木個体は樹種毎にクラスターを形成し、このことから土壤微生物群集の組成は樹種特異的であることが示唆された。特に、針葉樹2種と広葉樹3種の間で、土壤微生物群集の組成は大きく異なることが示され、これは生葉から抽出される総フェノール濃度の差を反映しているものと解釈できた。しかし、それぞれの微生物グループを指標するリン脂質脂肪酸のモル比と土壤から水によって抽出される総フェノール濃度の間には、全ての微生物群において有意な相関関係がみられなかった。このことから、生葉のポリフェノールは土壤表層の微生物群に影響を与え、樹種特異的な土壤微生物群集が形成されるが、土壤腐植自体は分解産物であるからその中の溶存総フェノール濃度の微生物相への影響は低下するものと解釈された。

### (3) 土壌栄養の局在性

高濃度の土壌ポリフェノールが存在する針葉樹下土壌では広葉樹下よりも、土壌窒素の純無機化速度が有意に低く、リン酸フラックスが高い傾向にあった。高いリン酸フラックスは、高濃度の土壌ポリフェノールで優占する真菌類とその分解機能に関係していると解釈された。

### (4) 精製ポリフェノールの接種実験

縮合タンニン接種区で土壌呼吸速度が低下した。また、縮合タンニン接種前後で窒素、リン、ポリフェノールの無機化に関わる土壌酵素活性を調べたところ、縮合タンニン接種区でほとんどの酵素活性が低下した。一方で、縮合タンニン接種の効果は針葉樹樹冠下でも広葉樹樹冠下でも同様であった。土壌微生物群集の組成変化をリン脂質脂肪酸をマーカーとして調べたところ、縮合タンニン接種区では真菌類由来の脂質濃度が上昇していた。実験室内での土壌培養実験では、縮合タンニン接種区での土壌微生物の無機化活性の低下、真菌類由来の脂質濃度の上昇は、野外接種実験に比べていっそう顕著であった。

## 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6件)

- ① Wagai R., Kitayama K., Satomura T., Fujinuma R., Balser T. (in press) Interactive influences of climate and parent material on soil microbial community structure in Bornean tropical forest ecosystems. *Ecological Research*. 査読有.
- ② Ushio M., Kitayama K., Balser T.C. (2010) Tree species-mediated spatial

patchiness of the composition of microbial community and physicochemical properties in the topsoils of a tropical montane forest. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 11588-1595. 査読有.

- ③ Ushio M., Kitayama K., Balser T.C. (2010) Tree species effects on soil enzyme activities through effects on soil physicochemical and microbial properties in a tropical montane forest on Mt. Kinabalu, Borneo. *Pedobiologia* 53: 227-233. 査読有.
- ④ Ushio M., Miki T., Kitayama K. (2009) Phenolic control of plant nitrogen acquisition through the inhibition of soil microbial decomposition processes: a plant-microbe competition model. *Microbes and Environments* 24: 180-187. 査読有.
- ⑤ Moritz L., Liang C., Wagai R., Kitayama K. & Balser T. (2009) Vertical distribution and accumulation of microbial residues in two tropical forest soils formed from contrasting parent material. *Biogeochemistry* 92: 83-94. 査読有.
- ⑥ 和穎朗太・北山兼弘 (2008) 科学の動向: 土壌有機物と地球温暖化、科学 (岩波書店) 78 (2): 137-139. 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ushio M., Kitayama K., Balsler T.C.  
(2010) Tree species-mediated spatial patchiness of soil physicochemical and microbial properties in the top soils of a tropical montane forest. The 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, USA. Aug. 22-27, 2010.
- ② 潮雅之・北山兼弘(2009) 針葉樹の縮合タンニンが土壤栄養塩可給性の変化を介して樹木実生の成長率に与える影響: 熱帯山地林での植物-土壤フィードバック. 日本生態学会第 56 回岩手県立大学 2009/3/19.
- ③ 潮雅之, 北山兼弘(2008) 熱帯林生態系におけるポドリフェノール動態への樹木種の影響. 日本生態学会第 55 回大会福岡国際会議場 2008/3/16.

[図書] (計 1 件)

- ① Kitayama, K., et al. (in press) The ecology of podocarps in tropical montane forests of Borneo: distribution, population dynamics, and soil nutrient acquisition. Podocarpaceae in Tropical Forests.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北山 兼弘 (KITAYAMA KANEHIRO)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 20324684

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: