

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380082

研究課題名 (和文) 北方森林土壌において温暖化が及ぼす微生物と原生生物の群集構造変化と連鎖関係

研究課題名 (英文) Changes of microbial and protozoa community structures influenced by heat disturbance in the boreal forest soil

研究代表者

笠原 康裕 (KASAHARA YASUHIRO)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20273849

研究成果の概要 (和文)：森林土壌において、5年間の5度の加温は、土壌の全炭素量や全窒素量を若干減少させた。しかし、加温攪乱は土壌微生物の群集構造にほとんど影響を与えていないと考えられる。微生物群集の組成は変わらず、機能する細菌の活性が変化したのか、今後の課題となった。これまで、解析が困難であった原生生物の分子手法を開発し、PCR-DGGE法による群集構造の変動解析を確立した。土壌微生物群集の構造解析だけではなく機能解析を可能にする環境メタプロテオミクスの基盤を構築することができた。

研究成果の概要 (英文)：In the forest soil, warming of 5 degrees for 5 years, the amount of total soil carbon and total nitrogen slightly were decreased. However, the warming disturbance was considered to be little effect on the structure of microbial community in soils. We developed a molecular technique, and established PCR-DGGE analysis to analyze a structure of protist community. For the function analysis of microbial communities in soil, we were able to be established the platform of environmental metaproteomics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：微生物生態学、ゲノム微生物学

科研費の分科・細目：農学・森林学・森林科学

キーワード：微生物、原生生物、群集構造、環境変動、北方森林、土壌温暖化

1. 研究開始当初の背景

森林は、陸上生態系の中で最も大きな生物体量を擁し、その生物生産活動を通して地球環境の恒常性に大きな役割を担っている。一方で、人類活動によって進行する環境攪乱、地球環境変動の影響を受けて、大量の生物種が喪失し、森林生態系の機能が崩壊しかねない危機が迫っている。近年シミュレーション予測により、地球温暖化の深刻さが叫ばれて

いる。このような危機的崩壊に対して予測し、回避するためにも科学的基盤の確立が急務と考えられた。

森林生態系の機構を理解するためには、地上部で展開される植物の生産・繁殖過程、地下部で展開される物質の分解・循環過程、およびその相互作用を明らかにすることが肝要である。

北海道で見られる北方森林は、亜寒帯気候

に適した固有の生態系を形成している。最暖月と最寒月の気温の年較差は大きく、そのため地温の変化も大きい。また、冬季に土壤凍結が起こる特徴もあり、この土壤凍結現象が北方森林系を支えている一因であると考えられる、土壤温暖化が土壤微生物生態系に及ぼす影響を知ることにより、北方森林の土壤生態系の理解に繋がる。

2. 研究の目的

土壤の温暖化処理区と無処理区のフィールドを対象に、微生物群集構造解析、原生生物の群集構造解析を行ない、群集変化を観察し、比較解析することを第1の目的とした。第2の目的として、微生物や原生生物の群集構造解析について新規解析法の基盤をつくることである。

3. 研究の方法

北海道大学苫小牧研究林内に、地中に電熱線を張り、年間を通じて周りより地温を5度上昇させた処理区が設置されている。この温暖化処理区と無処理区の土壤フィールドを対象とした。

(1) 微生物群集構造解析

2006年11月から2011年3月の期間、両処理区において、表層5cmの土壤を採取した。土壤試料よりDNAを抽出した。16S rDNAを標準マーカー遺伝子として、PCR-DGGE法によるパターン解析を行った。

ゲノム内1コピーである *rpoB* 遺伝子(RNAポリメラーゼβサブユニット)をマーカーとした解析法の開発を行った。

(2) 原生生物群集構造解析

原生生物の分子手法による構造解析手法の確立を行った。18S rDNAを標準マーカー遺伝子として、繊毛虫特異的プライマー、PCR-DGGE法、繊毛虫1細胞からのPCR法、PCR-クローン解析について検討した。

(3) 土壤分析

採取時の土壤温度、試料のpH、水分含量、CN比について測定した。

(4) 環境メタプロテオミクスの基盤構築

芳香族炭化水素化合物を分解する土壤細菌 *Pseudomonas putida* F1株を供試菌株として半定量的解析法を検討した。

F1株を接種した土壤を使用して、タンパク質の直接抽出法と間接抽出法を検討した。

また、F1株を土壤に接種し、グルコース、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼンを添加し、3週間培養を行ない、培養中でのタンパク質の発現変化を観察した。

タンパク質の可視化はSDS-PAGEおよび二

次元電気泳動法(2DE)を行った。

タンパク質の同定は、SDS-PAGEや2DEにより観察されたタンパク質のバンドやスポットから、ゲル内消化法を用いて試料を作製する。リニアイオントラップ型タンデム質量分析計LC/MS/MSにより行った。

4. 研究成果

(1) 微生物群集構造解析

両処理区の採取土壤について、PCR-DGGE解析を行った。温暖化処理開始から現在まで5年の期間、DGGEプロファイルに変化は観察されなかった。また、処理区と無処理区の比較からも、顕著な相違は観察されなかった(図1)。森林土壌において5度の加温攪乱は土壤微生物の群集構造にほとんど影響を与えていないと考えられる。今後温暖化の継続により変化が見られるかも知れない。現在、次世代シーケンサーを用いて環境16S rDNAのディープシーケンスによる詳細な微生物構造解析を準備中である。

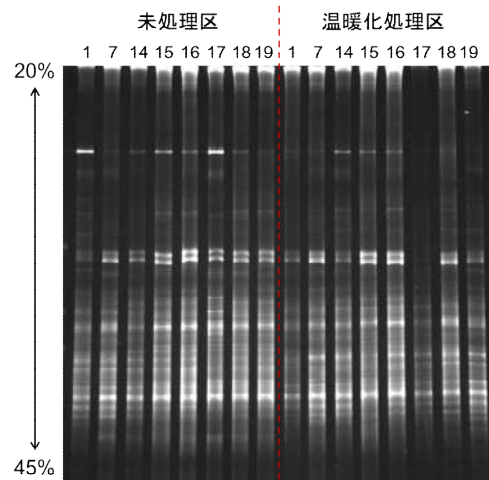


図1. 温暖処理区と未処理区のDGGE像

rpoB 遺伝子をマーカーとした解析法の開発を行った。全細菌種に適用できるプライマーが設計できた。また、このプライマーを用いたPCR-クローン解析により環境中の細菌群集構造解析が可能となった。

(2) 原生生物群集構造解析

18S rDNAを標準マーカー遺伝子となるよう、繊毛虫特異的プライマーを設計した。このプライマーを用いて、nested PCR-DGGE法を構築した(図2)。

また、顕微鏡下で観察した繊毛虫1細胞を単離し、その細胞よりPCR-シーケンス解析を行う、同定法を開発した。

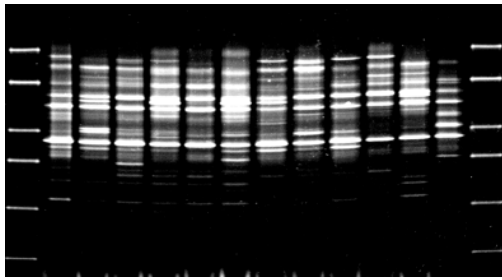


図 2. 様々な土壌の繊毛虫 DGGE 像

(3) 土壌分析

両処理区の土壌試料の分析を行った。試料の pH は両区において約 5~5.5 とほとんど変化しなかった。温暖区において全炭素量・全窒素量とも無処理区より若干減少した。

(4) 環境メタプロテオミクスの基盤構築

土壌細菌 *P. putida* F1 株を用いて半定量的解析法を検討した。SDS-PAGE と LC/MS/MS、emPAI (exponentially modified Protein Abundance Index) の組み合わせより、細胞内タンパク質のグローバルな発現変動解析が可能となった。

土壌からのタンパク抽出法において、2つの方法を確立した。直接抽出法：土壌 2 g から SDS とフェノールにより抽出した。間接抽出法：密度勾配遠心分離法より細菌細胞を分離した後、タンパク質を抽出した。

芳香族化合物を添加し、F1 株が接種された土壌培養より、経時的にタンパク質の発現解析を行った。芳香族化合物分解関連タンパク質の発現を網羅的に検出・確認することができた(図 3)。これらの結果より、環境土壌中の土壌微生物群集の機能解析の可能性を明らかとした。

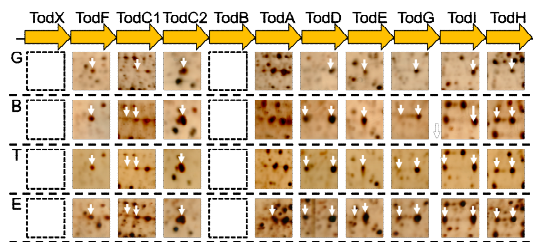


図 3. 土壌培養中の F1 株のタンパク質発現。芳香族化合物分解関連タンパク質群の検出。

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 3 件)

1. K. Yamamoto, S. D. Ohdachi and Y. Kasahara. 2010. Detection of Effects of

a High Trophic Level Predator, *Sorex unguiculatus* (Soricidae, Mammalia), on a Soil Microbial Community in a Cool Temperate Forest in Hokkaido, Using the ARISA Method. *Microbes and Environments* 25: 197-203. (査読有)

2. S. Shimano, M. Sanbe and Y. Kasahara. 2008. Linkage between light microscopic observations and molecular analysis by single-cell PCR for ciliates. *Microbes and Environments* 23: 356-359. (査読有)

3. T. Puitika, Y. Kasahara, N. Miyoshi, Y. Sato and S. Shimano. 2007. A taxon-specific oligonucleotide primer set for PCR-based detection of soil ciliate. *Microbes and Environments* 22: 78-81. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. 森本 一、桑野晶喜、笠原康裕. 液体培養系および土壌培養系における *Pseudomonas putida* F1 株の比較プロテオーム解析。第 5 回日本ゲノム微生物学会年会、2011 年 3 月 14-16 日、仙台市(東北学院大学)

2. Morimoto H., Kuwano M. and Kasahara Y. Proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* F1 to aromatic hydrocarbon in soil. 第 26 回日本微生物生態学会、2010 年 11 月 24-26 日、つくば市(筑波大学)

3. Shimano, S., Imaizumi Y. and Kasahara Y. Micro-eukaryote diversity in soil environments of a grass field. International Society for Evolutionary Protistology, 18th Meeting (ISEP XVIII), July 2-7, 2010, Ishikawa (金沢大学), Japan.

4. 桑野晶喜、森本 一、笠原康裕. ゲノム未解析株のプロテオーム解析の評価。第 4 回日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月 7-9 日、福岡市(九州大学)

5. 森本 一、桑野晶喜、笠原康裕. 間接タンパク質抽出法を用いた土壌メタプロテオミクスの基盤構築。第 4 回日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月 7-9 日、福岡市(九州大学)

6. 森本 一、桑野晶喜、笠原康裕. 半定量的発現プロテオミクスによる芳香族分解の代謝経路解析。第 4 回日本ゲノム微生物学会年会、2010 年 3 月 7-9 日、福岡市(九州大学)

7. Shimano, S., Imaizumi Y. and Kasahara Y. Biodiversity of micro-eukaryotes in soil environments of a grass field. Canadian Society for Ecology and Evolution (CSEE) 2009 meeting. 14-17 May, 2009, Halifax, Canada.

8. 笠原康裕. 環境変動と土壤微生物群集変動。第56回日本生態学会大会、2009年3月17-21日、盛岡市(岩手県立大学)
9. 鶴谷安弘、森浩禎、笠原康裕. 大腸菌のVBNC状態関与遺伝子のゲノムワイドスクリーニング。第3回ゲノム微生物学会年会、2009年3月6-7日、東京(中央大学)
10. 山本佳奈、大館智志、笠原康裕. 土壤微生物群集に対する高次捕食者トガリネズミの効果(予報)。第24回日本微生物生態学会、2008年11月26-28日、札幌市(北海道北海道大学)
11. Shimano, S., Sanbe, M., Puitika, T. and Kasahara Y. Ciliate community analysis of agricultural soil based on SSU rDNA with new taxon-specific primer. The International Society of Protistologists (ISOP), 59th Annual Meeting, and the International Society for Evolutionary Protistology, 17th Meeting (ISEP XVII). July 21-26, 2008. Halifax, Canada.
12. 高叡瑞、明石典之、熊谷朋子、三部光男、今泉友希、外菌香菜、笠原康裕、島野智之. シングルセルPCR法による繊毛虫類の塩基配列解析。日本土壤動物学会第31回記念大会、2008年5月24-25日、那覇市(琉球大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 康裕 (KASAHARA YASUHIRO)
北海道大学・低温科学研究所・准教授
研究者番号：20273849

(2) 研究分担者

福井 学 (FUKUI MANABU)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号：60305414

島野 智之 (SHIMANO SATOSHI)
宮城教育大学・環境教育実践研究センター・准教授
研究者番号：70355337

(3) 連携研究者

なし