

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380196

研究課題名(和文) 土壌微生物の均等度評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation method of soil microorganisms evenness

研究代表者

信濃 卓郎 (Shinano, Takuro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター農業放射線研究センター・センター長

研究者番号：20235542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)：寒冷地の凍結融解時の一酸化二窒素の畑圃場からの生成に着目し、生成過程での土壌微生物多様性をDNAレベルとmRNA発現レベルから解析を行うためにメタゲノム手法とメタトランスクリプトーム手法を土壌試料に応用し、その結果に基づき種数の多様性の変化ではなく、均等度の変化(一部の種の個体数の顕著な増加)がバイオジェオケミカルプロセスの主導的な役割を担っていることを明らかにした。さらにFunctional Single Cell分離法を用いて低温環境下で優勢的に機能を担っていると想定される種に属する微生物株の取得に成功し、実際に低温下での一酸化二窒素発生能を確認した。

研究成果の概要(英文)：We focus on nitrous oxide emission during freeze and thaw process in the field, and to investigate the diversity and evenness of the soil microorganism, metagenomic and metatranscriptomic approaches were applied on DNA and mRNA levels. The results indicate that during the bio-geochemical process, it is rather evenness play an important role than diversity of species number, indicating that few number of species seems to be increased with the process. We have applied the Functional Single Cell separation technique and obtain several isolates which seem to grow and lead the process dominantly under the cold condition.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・生物環境

キーワード：土壌微生物 一酸化二窒素 メタゲノム メタトランスクリプトーム 凍結融解

1. 研究開始当初の背景

農業において有機物資源は過去においてはほぼ全てが耕地に還元されていたが、化学肥料の開発以降、圃場管理の容易さも相まって土壌への還元量は減少している。その結果として耕地土壌中の炭素量は化学肥料に依存することによって次第に減少することが観測されている。そのため、有機物資源の土壌への積極投入が推奨されているもののこれらの有機物資源の投入が土壌の微生物機能に対してどのような影響を及ぼしているのかについての有効な知見は無い。特に温暖化ガスであるメタンや一酸化二窒素の発生、環境汚染源となる硝酸、リンなどの動態に対する影響を正確に評価することが求められている。土壌微生物のこのようなバイオジェオケミカルプロセス（生物地球化学的過程）における役割はかねてより極めて大きいと考えられている。しかしながら、土壌微生物の99%は培養が出来ずに存在していることが知られており、その機能の全体像の解析手法はいまだに開発途上である。たとえば難培養性の微生物を研究対象とするためにPCR-DGGE法などの多様性解析手法の導入が進められているが、PCRに用いるユニバーサルプライマーが既知の微生物の配列に依存しているため、また一定のプライマーを鋳型として増幅するため配列によって増幅効率の違いが生じてしまう。これに対してサブクローニングによって多数の解析を行うことによって多様性を評価しようとする手法も取られているが、特定の微生物種をターゲットとするなど限定的な解析に現実的にはとどまっている。これに対して、近年急速に技術開発が進んでいる次世代型の超並列型シーケンサーを活用すれば、一度の解析で数千から数万のオーダーの配列解析が可能となり、予備実験からも根圏土壌細菌であれば約1万配列の解析で種の多様性が頭打ちになってくることが明らかであり、均等度の評価が可能となった。本研究ではこのような手法

を積極的に導入し、土壌微生物の機能性を明らかにする技術と、それを利用した土壌微生物機能の制御技術の方向性についての研究を目的とする。

2. 研究の目的

土壌微生物の機能を評価する手法の開発を進めるために、微生物遺伝子の中でも機能性に関わる遺伝子を中心にその量的変動から明らかにすることを旨とする。これまでに開発した根圏土壌微生物のメタゲノム解析からは、実際の土壌の物質動態と土壌微生物の持つ機能性遺伝子の間に対応関係が認められることが明らかにされている。そこで、本手法をさらに拡張して施肥方法、投入資材の種類、植物種の違いによる根圏環境が土壌微生物機能にどのような影響を与えるのかを解析する。特にバイオジェオケミカルプロセスで重要となる窒素、リン、炭素に関連した物質動態に関連した機能性遺伝子構造の全体的な変動パターンと耕種的手法との関連性を明らかにする。多様性指標を用いて土壌微生物の役割を評価しようとの研究が多くなされてきたが、残念ながら系の複雑さを示すのみであり、十分な成果が出ていない。その理由としてとくに考えなければいけないのは、これまで土壌微生物の多様性解析に取り入れられてきたPCR-DGGE法やサブクローニング法では土壌微生物の種数に十分対応した解析が不可能であった事があげられる。一方、近年急速に技術開発が進んでいる次世代型シーケンサーを用いた超並列型シーケンシング技術は短時間にきわめて大量のリードを解読することを可能とする技術であり、これを活用する事によって土壌微生物のより深度の深い多様性解析が可能であり、全体像を明らかにする事も視野に入ってきた。この手法を活用し、均等度を新たな評価軸として土壌微生物の種の多様性、機能の多様性を明らかにすることをめざす。なお均等度とはある群集内に存在しているそれぞれ

の種や系統などの数のバラツキを評価する手法であり、多様性評価手法の一つであるが、これまでの土壤微生物の多様性研究では種の豊富さであるSpecies richness での評価がほとんどである。

3. 研究の方法

(1) 凍結融解時に一酸化二窒素を放出する現象が報告されている、農研機構北海道農業研究センター芽室拠点内圃場および北海道大学静内牧場内トウモロコシ圃場を対象とした。本研究を遂行するためには土壤から精製度の高い微生物 DNA と mRNA を取得する必要があったが、芽室拠点内圃場からは mRNA を十分量取得できなかつたため、凍結融解時の現地圃場での DNA に基づく解析にとどめた。一方静内圃場からは十分な mRNA を取得することに成功したため、凍結融解のモデル試験、微生物取得の対象土壤とした。

(2) 圃場管理：芽室拠点内圃場は作付けを行わず、一酸化二窒素の測定は連続的に土壤空気を採取してガスクロマトグラフィーにて定量をした。気象データは同じ場所で測定されている数値を用いた。静内圃場では飼料用トウモロコシが栽培された。施肥、管理は当該圃場の慣行法に準じた。一酸化二窒素の測定、気象データの取得は圃場を管理する北海道大学土壤学研究室に依頼した。モデル試験では静内圃場の土壤を利用した。ウォーターバスを用いて人工的に凍結融解を行い(図1)、一酸化二窒素の発生の現象を再現させた。



図1 凍結融解モデル試験

(3) 土壤微生物 DNA および RNA 取得：現地試験では低温下での変動が予想されるため、

現地で土壤サンプルを取得後、直ちに液体窒素で凍結をし、実験室に運んで抽出を行った。なお、芽室試験区の土壤からは RNA の抽出が困難であったので DNA の抽出のみを行った。DNA の抽出は iSoil for DNA で行い、CB-L4 カラムを用いて精製をした。RNA の抽出は iSoil for RNA を利用し、RNeasy Plus kit を用いて精製をした。それらの純度の確認は Bioanalyzer を用いた。シーケンシング：パイロシーケンシングは GS Junior/FLX を用いて行った。精製した DNA, RNA の一部を利用して、16S の V4/V6 領域を用いたアンプリコンを作成してその配列を解析した。また RNA サンプルからは rRNA を Ribo-zero 試薬によって除去した後に mRNA を対照としたメタトランスクリプトーム解析を行った。得られた配列データはアンプリコンに対しては SILVA rRNA データベースを中心に行い、mRNA の解析には SEED データベースを利用した。試験は8連で行い、アンプリコンの解析では全てのデータをまとめる事によりカバレッジを高めた。

(4) Functional Single Cell 分離：凍結融解時に中心的な役割を担っている微生物を単離するために導入した。選択培地(一酸化二窒素生成の基質となる硝酸カリウムとコハク酸2ナトリウム)を用いて凍結融解条件において増殖する微生物を、蛍光色素で染色してマイクロマニピュレーターで顕微鏡下で直接採取する。この際、増殖活性の高い細胞のみを選択するために細胞分裂阻害剤を添加することにより伸張細胞のみを取得する。

4. 研究成果

(1) 凍結融解時の一酸化二窒素生成

芽室圃場において同一地点を対象とした大気と地中10cmの一酸化二窒素濃度は夏期にはそれぞれ0.31, 0.33ppmであったのに対して8cmにおいては0.33, 6.8ppmとなり、当該ほ場では凍結融雪期に著しく一酸化二窒素濃度が土壌中で高まることが観測された。②静内圃場土壌を用いたモデル試験では採取土壌を予め-20度で凍結し、その後-2, -0.4, 8度で培養し、土壌中の一酸化二窒素濃度の変遷を解析した結果、図2のようになり、凍結融解に伴い著しい一酸化二窒素の発生が認められた。試験では+8度において培養開始後7日目の土壌を利用してその後の解析を行ったが、凍結状態が持続している-2度、-0.4度でのゆっくりとした一酸化二窒素発生をはじめて見いだした。

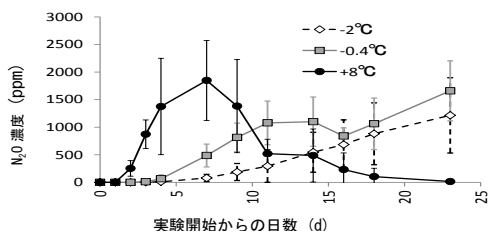


図2 北大静内研究牧場の土壌を利用して行った、凍結融解を再現したマイクロゾム試験。土壌は予め-20度で凍結し、その後各温度に移した。この際の一酸化二窒素の放出パターンを示している。0度付近の低温下において+8度のパターンとは異なる放出が認められる。

(2) DNAレベルの群集構造解析と単離

芽室圃場の土壌サンプルを用いて表土10cmの土壌中の微生物群集構造をメタゲノム解析を行った結果を図3に示した。種数の分布という観点においては融雪期と夏期での大きな違いは無いものの、Proteobacteria属を構成する微生物数が融雪期で多くなって

RDP Classifier	融雪期					夏期				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Acidobacteria	534	257	300	574	52	299	204	407	554	137
Actinobacteria	32	50	12	64	5	13	11	25	168	27
Armatimonadetes	61	17	6	27	6	5	24	7	4	
Bacteroidetes			19	65						55
Chloroflexi	15	7	3	5	5	2		6	6	
Cyanobacteria/Chloroplast	5	5	5	4	81	9	31	9	11	39
Deinococcus-Thermus	2			3	3	2				
Firmicutes	6	7	8	35		6		50	28	33
Gemmatimonadetes	105	200	391	504	66	86	91	60	455	37
Nitrospira					5	2	8			3
OD1			3	2		2				
OP11						6	2			
Planctomycetes	43	11	71	111	79	106	62	49	131	143
Proteobacteria	949	658	585	928	592	418	272	562	700	429
Verrucomicrobia	13	12	22	157	40	16	8	42	44	12
WS3	58	5	20	82	7	55	3	27	60	4

図3 芽室圃場の融雪期と夏期の土壌微生物のメタゲノム解析結果

いる傾向が認められた。このことは特定のバイオジェオケミカルプロセスにおいて土壌中の微生物群集構造に一定の方向性を持ったシフトが発生していることを示唆している。そこで、凍結融解時の一酸化二窒素生成により直接的に関与している微生物を実際に取得するために、採取土壌を用いたマイクロゾム試験を行い、その土壌を供試して微生物単離を試みた(図4)。その結果4株を単離した(表1)。

この中でもB-2と4株は低温(8度)においても高い一酸化二窒素性能を示しており、実際の土壌中での貢献が想定された。なお、単離された4株はいずれもPseudomonas属であり、図2で得られたメタゲノム解析の結果を支持する内容であった。

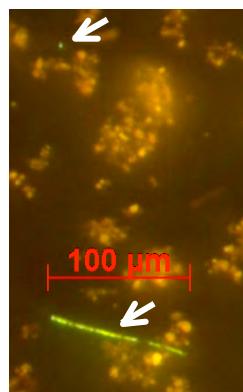


図4 Functional Single Cell法により細胞伸張が見られた細菌(下の矢印)

表1 Functional Single Cell 法で取得した細菌株の特性

単離菌株	class	最近縁の type strain	similarity score
A-2	Betaproteobacteria	<i>Cumulibacter narvicus</i> (T):LMG 3413:AF085226	0.997
A-3	Betaproteobacteria	<i>Ralstonia nirkethii</i> (T):ATCC 27511:AY741342	0.998
B-2	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas arsenicovorans</i> (T):VC-1:FN645213	0.999
B-4	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas chlororubris</i> (T):JF3835:FJ168539	0.995

(3) mRNA レベルの変動解析

芽室圃場から土壌 RNA の取得には成功しなかったため、静内圃場の土壌を用いた。図2で示したように凍結融解後に一時的に高い放出能が認められた事からこのタイミング（7日目）を対象として土壌微生物 RNA を取得した。得られた RNA の 16S rRNA 配列のアンプリコンを解析した結果が図5であり、凍結融解前後を通して細菌が主体を占めていることが示された。そこで、さらに属レベルで解析をしたところ、凍結融解に伴い Bacteroidetes や Firmicutes 属が増加し、Proteobacteria 属が減少する傾向が認められた（図6）。芽室圃場の試験とは土壌が異なるのみならず、実験系やサンプリング比較時期も異なるため単純な比較は出来ないが、例えば Firmicutes は芽室ではわずかな割合であったのに対して、静内では比較的大きなグループである。このことはそれぞれの土壌において母材となる微生物群集が異なっている状況で、一定のバイオジェオケミカルプ

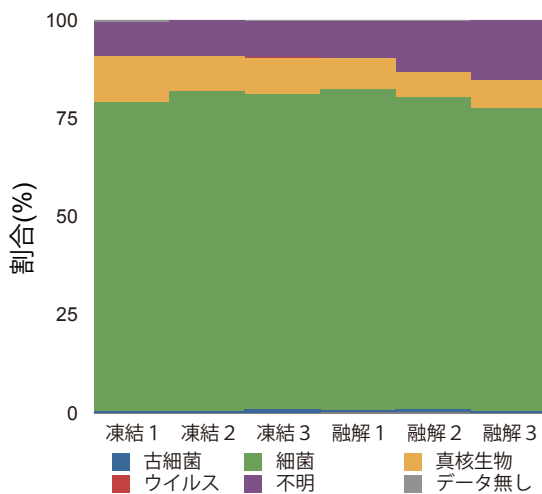


図5 静内圃場由来の土壌から抽出した RNA を用いたマイクロコスモ試験での凍結融解に伴う土壌微生物構造変化

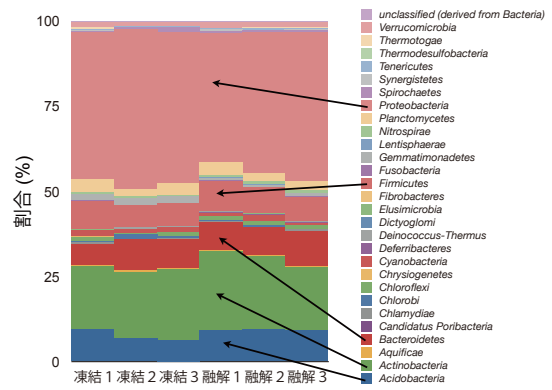


図6 凍結融解時の tRNA レベルでの細菌の構造変化

ロセスを担う微生物（群）が優先してくることを示唆している。単離までには至らなかったが、さらに科レベルで比較すると凍結融解時に大きく割合が増える科として Listeriaceae, Peptococcaceae, Aeromonadaceae, Cytophagaceae が見いだされ、このうち後者3科は過去の知見から一酸化二窒素性能を有する種が属していることが明らかである。さらに mRNA を対象として解析を行った。試料中に含まれる mRNA の制限があり、融解時の試料でのみ解析を行ったが、中心となっているのは RNA 合成や炭水化物代謝であり、この時期の急速な増殖に対応していることが見いだされた（図7）。窒素代謝関連のいくつかの重要な遺伝子の変動が確認され、それらをターゲットとした発

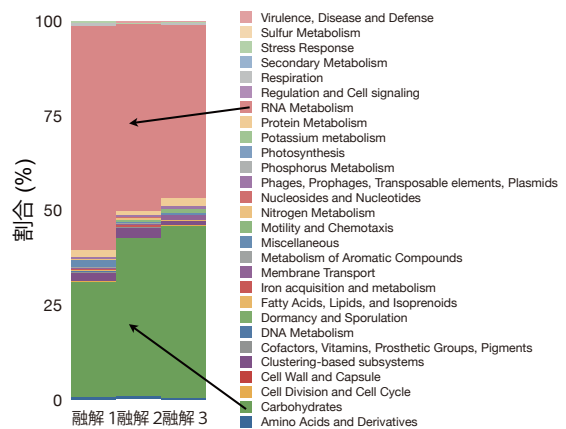


図7 凍結融解後の土壌微生物 mRNA の機能に基づく解析結果

現解析も可能であることが明らかにされた。

以上の知見から、土壌微生物の構造変化を伴う凍結融解という特徴的なバイオジェオケミカル現象においてそれぞれの土壌に対応した特徴的な微生物（群）の変動が優先的に起こっており、この状態は均等度の変化としてより適切に表現されることが示された。

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7件)

① Unno, Y., Shinano, T. (2013) Metagenomic analysis of the rhizosphere soil microbiome with respect to phytic acid utilization. *Microbes and Environments*, 28:120-127

DOI:10.1264/jsme2.ME12181 (査読あり)

② Iwata, Y., Yazaki, T., Suzuki, S., Hirota, T. (2013) Water and nitrate movements in an agricultural field with different soil frost depths: field experiments and numerical simulation. *Annals of Glaciology*, 54:157-165

DOI:10.3189/2013AoG62A204 (査読あり)

[学会発表] (計17件)

① Iwata, Y., Hirota, T., Hayashi, M., Yazaki, T., Nemoto, M., Ohkubo, S., Yanai, Y., Suzuki, S. (2012) Decreasing soil frost depth and its influence on the soil water and nitrate movements in Tokachi, Hokkaido, Japan. Plant and Microbe Adaptations to Cold 2012, June 12-14 口頭発表 (招待講演), 札幌, 日本

② Shinano, T. (2011) Metagenomic analysis on the rhizosphere soil microbiome. 3rd International Workshop "Advances in Science and Technology of Natural Resources", November 2-4. 口頭発表 (招待講演), プコン, チリ

[図書] (計5件)

① Unno, Y. and Shinano, T. Metagenomic analysis on the rhizosphere soil microbial community. In: Frans J. de Brjin (ed.) *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* Vol. 2, Wiley-Blackwell Publishers, Chapter 104, pp. 1099-1103 (2013) Pp. 1269.

② Iwata, Y., Hirota, T., Hayashi, M., Arima, J., Suzuki, S., Nemoto, M. (2013) Plant and microbe adaptations to cold in a changing world, p41-52, Possible change of water and nitrate cycles associated with the frost-depth decrease under climate change, Springer, Pp. 352

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信濃 卓郎 (SHINANO, TAKURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター・農業放射線研究センター・センター長

研究者番号: 20235542

(2) 研究分担者

岡崎 圭毅 (OKAZAKI, KEIKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター・生産環境研究領域・主任研究員

研究者番号: 40414750

関口 博之 (SEKIGUCHI, HIROYUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター・水田作研究領域・主任研究員

研究者番号: 50466009

岩田 幸良 (IWATA, YUKIYOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構農村工学研究所・農地基盤工学研究領域・主任研究員

研究者番号: 70370591