

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292035

研究課題名(和文) 群集生態学的アプローチによる土壌中のリンをめぐる微生物応答の数理的記述の試み

研究課題名(英文) Mathematical biological understanding of microbial response to phosphorus in soil by a community ecological approach

研究代表者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10313074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)： 野外の黒ボク土について、16S rDNAおよびアルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子phoDの組成は、土壌pHに強く規定されていた。また、交互作用付き重回帰分析によると、可給態リン濃度と酵素活性比酸性ホスファターゼ(ACP) / ベータグルコシダーゼ(BG)のあいだの関係は、pHまたは16S rDNAの組成に依存した。

黒ボク土および褐色森林土のマイクロコズムについて、炭素源・窒素源の添加により微生物群集構造は大きく攪乱されるとともに、酵素活性比ALP/BG、ACP/BGが上昇した。しかし、添加後時間が経過すると、酵素活性比も元の水準近くへと低下した。

研究成果の概要(英文)： The community structure based on 16S rDNA and the composition of alkaline phosphatase (ALP) gene, phoD, of soil bacteria in field andisols had a strong correlation with soil pH. Multiple regression analysis considering the interaction effect showed that the relationship between available P concentration and the enzyme activity ratio of acid phosphatase (ACP) to beta-glucosidase (BG) depended on soil pH and the community structure.

In experimental microcosms of andisol and brown forest soil, the addition of C- and N- sources disturbed microbial community structure, and increased the enzyme activity ratios of ALP/BG and ACP/BG. However, the ratios later decreased nearly to the original level.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：土壌微生物 リン可給性 群集構造 遺伝子組成 土壌酵素 資源配分

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンサーの技術発展により、以前とは比較にならないほど詳細に、土壤の微生物群集構造や機能遺伝子組成が明らかになってきた。しかし、そのようなして求められた群集構造や機能遺伝子組成が土壤の何を意味するのかは、ほとんど議論されていない。その原因として、土壤の物理性や化学性と異なり、微生物性は集成的に表すことが困難であると認識されていることが考えられる。また、微生物群集構造や機能遺伝子組成は、一般的には漠然とした情報の集合であり、その解釈のためには統計的手法を用いデータを絞り込むことが有効だろう。しかし、そのような試みは非常に少ない。現状では、国内の研究においては微生物群集構造や機能遺伝子組成に関する研究の大半が記載的な報告にとどまっている。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、実験系土壤マイクロコズムを用い、土壤の養分条件と、可給態リンの量、ホスファターゼおよびグルコシダーゼの活性、およびそれらの遺伝子 DNA のプロファイルなどの間にどのような関係があるのかを明らかにする。また、統計学的手法を用い、フィールド土壤中のリン可給性と微生物群集の関係も明らかにする。このように、土壤の理化学性も考慮することによって、土壤のリン可給性と微生物性との関係性に環境要因が与える影響を統計的に記述する。

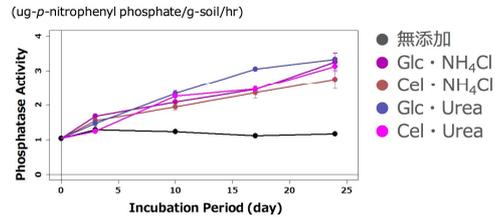
3. 研究の方法

土壤マイクロコズムを構築し、炭水化物および窒素源をいくつかの濃度で添加し、微生物のホスファターゼ・グルコシダーゼ活性測定、土壤 DNA に基づく機能遺伝子組成解析・群集構造解析等の解析を行う。また、フィールド土壤を採取し、可給態リンの定量を含む理化学性の分析を行った上で、上述の微生物プロファイルの解析を行う。これらの要因・変数の間にある相関性を明らかにするとともに、土壤のリン可給性と微生物性との関係性に環境要因が与える影響を数理的に記述することを試みる。

4. 研究成果

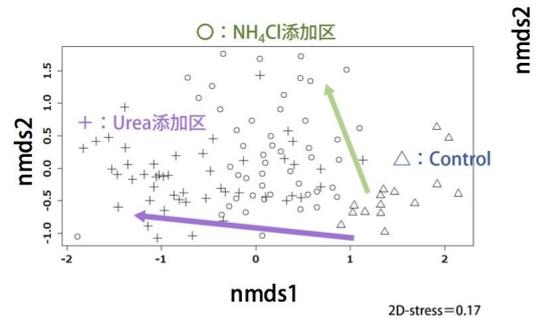
(1) マイクロコズムを用いた時系列解析
黒ボク土または褐色森林土に対して、炭素源（グルコースまたはセロピオース）・窒素源（塩化アンモニウムまたは尿素）を添加してリン制限条件を作出した土壤マイクロコズム系を作製・培養（1~24 日間）し、土壤微生物群集のリン制限に対する応答（16S rDNA 組成、phoD 組成、酵素活性、土壤の可給態リン濃度・DOC・無機態窒素）を時系列で調べた。いずれの系でも、炭素源・窒素源の添加により微生物群集構造は大きく攪乱されるとともに、リン制限にともなって酵素活

Phosphatase 活性の変遷

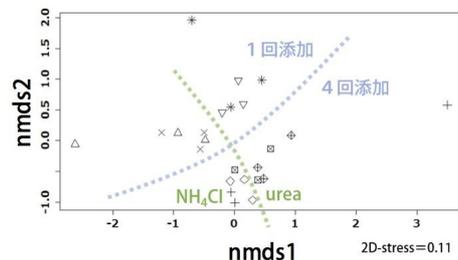


性比 ALP/BG、ACP/BG が上昇した（resource allocation model）。炭素源・窒素源の添加後時間が経過すると、上記酵素活性比も元の水準近くへと低下していった。16S rDNA 組成は、酵素活性比の低下と同期的に培養前

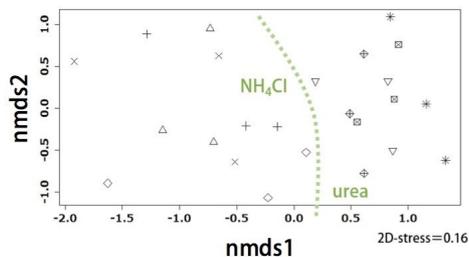
全サンプルの概観



培養3日目



培養24日目



の組成に接近する傾向、あるいは alternative stable state に収束する傾向が見られたが、phoD の組成の変遷は土壤の種類により異なり、いずれでも培養前の組成に回帰する傾向は見られなかった。また、phoD の多様性は 16S rDNA のそれに比べて安定的であった。

(2) 長期連用圃場に対する解析

長野県花き栽培試験場（長野県塩尻市）の長期連用圃場（70 年以上にわたり施肥状況が固定されている土壤）の畑土壤黒ボク土 12 サンプルについて、16S rDNA（バクテリア・アーキア群集）、18S rDNA（真菌群集）、陸域

で優占するとされる菌体外ホスファターゼ遺伝子 *phoD* の組成を、次世代シーケンサーを用いた amplicon sequencing で解析した。16S rDNA の群集組成、*phoD* の組成、18S rDNA の群集組成はいずれも、窒素施肥状況ならびに、その影響を受けていると考えられる土壌 pH に強く依存し、リン施肥の状況、可給態リン濃度、酵素活性との間に明確な関係は見られなかった。

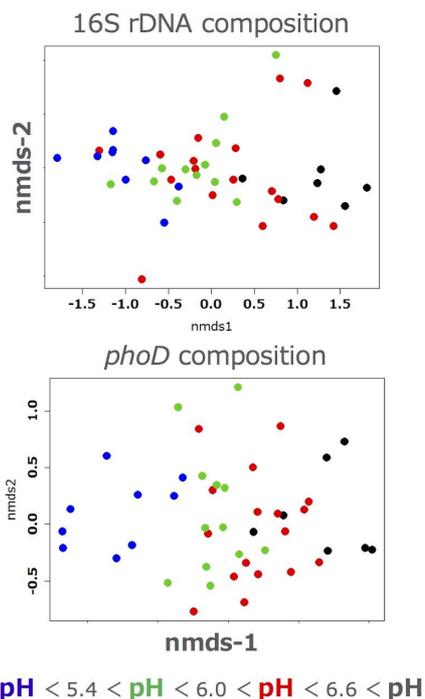
日本国内 8 地域 (北海道・東北・関東・中部・九州) から採取された、母材・気候条件・利用状況を異にする黒ボク土畑土壌 45 サン



プルに対して、土壌酵素活性・理化学性を測定するとともに、16S rDNA、18S rDNA、*phoD* の組成を、次世代シーケンサーを用いた amplicon sequencing で解析した。その結果、

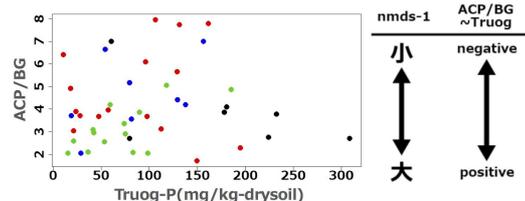
16S rDNA、*phoD* の組成は土壌 pH によって強く規定されていた。また、16S rDNA に比べて、*phoD* はサンプル間の OTU の入れ替わりが大きい傾向が見られたほか、16S rDNA の組成の類似度と、*phoD* の組成の類似度の間に

全細菌群集・*phoD* 保有微生物群集ともに pH に連動



は有意な相関は見られなかった。一方、アルカリホスファターゼ (ALP)・酸性ホスファターゼ (ACP) 活性の $\frac{ACP}{BG}$ と、可給態リン・水溶性リン濃度のあいだには相関は見られず、単純な resource allocation model は妥当しなかった。しかし、pH や 16S rDNA 組成を含めた交互作用付き重回帰分析

ACP/BG と Truog-P の関係は微生物群集構造によって異なる (資源配分モデルへの修正可能性)



(16S rDNA) $nMDS1 < -1 < nMDS1 < 0 < nMDS1 < 1 < nMDS1$

によると、可給態リン濃度と酵素活性比 ACP/BG のあいだの関係は、pH あるいは 16S rDNA の組成によって変化することが示され、既存の resource allocation model に対する修正の可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

美世一守, 丸山るな, 齋藤利仁, 磯部一夫, 國頭 恭, 妹尾啓史, 大塚重人「土壌細菌群集によるリン可給化能の維持機構」日本微生物生態学会第 31 回大会 (横須賀) (2016/10/22-10/25, 横須賀市文化会館, 神奈川県横須賀市)

藤田一輝, 國頭 恭, 諸人誌, 大塚重人, 吉田清志, 長岡一成「窒素利用性に対する土壌酵素活性の応答」日本土壌肥料学会 2016 年度佐賀大会 (2016/9/20-9/22, 佐賀大学, 佐賀県佐賀市)

諸人誌, 國頭 恭, 宮原裕一, 長岡一成, 大塚重人「森林土壌における化学抽出法および生物学的評価法による土壌養分利用性の評価」日本土壌微生物学会 2016 年度岐阜大会 (2016/6/11-6/12, 岐阜大学, 岐阜県岐阜市)

藤田一輝, 國頭 恭, 諸人誌, 大塚重人, 長岡一成「異なる土壌型における土壌酵素活性とリン利用性の関係」日本土壌微生物学会 2016 年度岐阜大会 (2016/6/11-6/12, 岐阜大学, 岐阜県岐阜市)

美世一守, 丸山るな, 諸人誌, 伊藤英臣, 磯部一夫, 國頭 恭, 大塚重人, 妹尾啓史「リン可給性をめぐる微生物群集の応答」日本土壌微生物学会 2016 年度岐阜大会 (2016/6/11-6/12, 岐阜大学, 岐阜県岐阜市)

美世一守, 丸山るな, 諸人誌, 伊藤英臣,

磯部一夫, 國頭 恭, 大塚重人, 妹尾啓史「畑
土壌のリン可給性と微生物群集の応答」日本
微生物生態学会第 30 回大会(土浦)
(2015/10/17~10/20, 土浦亀城プラザ, 茨
城県土浦市)

諸 人志, 國頭 恭, 矢口直輝, 斎藤龍司,
大塚重人, 長岡一成「肥培管理の異なる黒ボ
ク土での酵素活性と酵素遺伝子多様性との
関係」日本土壌微生物学会 2015 年度大会(つ
くば)(2015/5/22~5/23, つくば国際会議場
エポカルつくば, 茨城県つくば市)

丸山るな, 國頭 恭, 諸 人志, 出澤文武,
斎藤龍司, 矢口直輝, 長岡一成, 大塚重人「炭
素・窒素添加に対する土壌中ホスファターゼ
活性の応答」日本土壌微生物学会 2015 年度
大会(つくば)(2015/5/22~5/23, つくば国
際会議場エポカルつくば, 茨城県つくば市)

藤田一輝, 國頭 恭, 諸 人志, 矢口直輝,
斎藤龍司, 出澤文武, 吉田清志, 大塚重人,
長岡一成「土壌酵素活性を用いた畑地の窒
素・リン利用性の評価」日本土壌微生物学会
2015 年度大会(つくば)(2015/5/22~5/23,
つくば国際会議場エポカルつくば, 茨城県つ
くば市)

諸 人志, 國頭 恭, 斎藤龍司, 矢口直輝,
大塚重人, 長岡一成「肥培管理の異なる畑土
壌の酵素活性と酵素生産遺伝子を標的とし
た PCR-DGGE による微生物群集構造解析」
環境微生物系学会合同大会 2014(2014/10/21
~10/24, アクトシティ浜松, 静岡県浜松市)

(11) 諸 人志, 國頭 恭, 斎藤龍司, 矢口直輝,
大塚重人, 長岡一成「肥培管理の異なる畑土
壌におけるホスファターゼ活性とアルカリ
ホスファターゼ生産細菌の群集構造解析」日
本土壌肥料学会 2014 年度東京大会(2014/9/9
~9/11, 東京農工大学, 東京都小金井市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
現在データは非公開

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 重人 (OTSUKA, Shigeto)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准
教授
研究者番号：10313074

(2) 研究分担者

國頭 恭 (KUNITO, Takashi)
信州大学・理学部物質循環学科・准教授
研究者番号：90304659

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()