

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292180

研究課題名(和文) 熱攪乱による森林土壌微生物生態系の維持機構の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of maintenance mechanism of forest soil microbial ecosystem by thermal disturbance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：抵抗性、復元力、機能重複性を安定性指標として、短期高温攪乱と長期低温攪乱の森林土壌の微生物生態系の維持機構を明らかにすることを目的とした。  
<短期・高温攪乱> 火入れフィールドにおいて、火入れ前と火入れ後1日から経時的に3年後の土壌微生物群集構造解析を行った。火入れ直後に単一種が優先する多様性の消失が観察され、3年目には火入れ前組成に近づきつつある。短期の復元力であることを示した。  
<長期・低温攪乱> 地温5℃の加温温暖化フィールドにおいて、10年間の土壌温暖化にもかかわらず、無処理区と比較して、微生物群集組成に著しい変化は観察されなかった。土壌微生物群集の頑強性を示した。

研究成果の概要(英文)： We aimed to clarify the maintenance mechanism of microbial ecosystem of forest soil with short-term high-temperature and long-term low-temperature disturbances with resistance, resilience and function redundancy as stability index.  
<Short-term/high-temperature disturbance> In the pyrotechnic field, soil microbial community structure analysis was performed before the burning and one day to three years after the burning. Disappearance of diversity that single species prefers immediately after burning is observed, and in the third year it is getting close to composition before burning. The resilience was shown to be short-term. <Long-term/low temperature disturbance> In the warming field with the ground temperature of +5 °C, no significant change in microbial community composition was observed compared with the untreated field despite soil warming for 10 years. It showed the robustness of the soil microbial community.

研究分野：微生物生態

キーワード：微生物生態 メタゲノム 森林土壌 微生物群集構造 攪乱

## 1. 研究開始当初の背景

東日本大震災時の津波による農地の塩害、噴火による火山灰や泥流物の堆積や森林火災など、さまざまな環境要因によって土壌微生物群集はストレスや攪乱を受けている。しかしそのほとんどが不毛の地にはならず、遅かれ早かれ本来の土壌に戻っている。そのため土壌微生物生態系は、『攪乱に対して強靱で安定性が高い』と言われている。近年、攪乱によって引き起こされる微生物生態系の安定性を、(i) 抵抗性(攪乱により生ずる変化の規模) (ii) 復元力(攪乱前レベルに戻る速さ) (iii) 機能重複性(異集団による同機能)の3つの指標から評価する研究が始まっている。

これまで熱攪乱が及ぼす土壌微生物生態系の安定性の機構とその意味を明らかにするために、森林土壌を対象に2つの実験フィールド、(1)農地開拓のため山林伐採後、火入れ、山焼きを行った土壌(短期・高温攪乱; 疑似森林火災)と(2)地中に電熱線を張り、年間を通じて周囲より地温を5度加温させた温暖化土壌(長期・低温攪乱; 疑似地球温暖化)において、攪乱後の微生物群集の変動様式に着目した。つまり、『火入れにより群集はどのように遷移し、どこに向かうのか?』『復元時間は?』『強い抵抗性を持つ群集は本当に変化していないのか?』『低温攪乱でいつまで群集は現状維持するのか?』『生態系として原状復帰する必要があるのか?』これら疑問に答えることで、攪乱による抵抗性、復元力、機能重複性の強弱の意味や生態系の維持機構や重要性を理解することができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、2つの実験フィールド(1)山形大学鶴岡研究林で行われている山焼き(短期・高温攪乱)と(2)北海道大学苫小牧研究林に設置されている、土壌5度加温した温暖化処理区と無処理区(長期・低温攪乱)の土

壌を対象とする。3つの指標を計るために、攪乱の前後での経時的な土壌微生物群集の組成や多様性の構造の変動解析と物質循環系や代謝経路の活用頻度を知る機能の変動解析を行う。解析法は土壌から抽出したゲノムDNAの塩基配列を網羅的に大量決定するメタゲノム解析と土壌抽出総タンパク質を同定するメタプロテオーム解析を適用する。メタゲノム解析から、土壌環境中に存在している微生物群集の遺伝子情報プロファイルと種々の代謝経路を明らかにする。メタプロテオーム解析から、実際に土壌中で発現している遺伝子や代謝経路を特定し、定量的発現解析を行う。両メタ解析データに加え、環境パラメータのメタデータの経時的な情報を組み合わせることで、微生物生態系の変動様式を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

### (1) 短期高温攪乱実験区

#### 【実験フィールドと土壌試料】

山形大学農学部鶴岡演習林内で行われた山焼きの実験区の土壌について、2014年火入では、火入れ前日、火入1日後、21日後、76日後、369日後、747日後と1117日後の3年間、2015年火入では、火入れ前日、火入1日後、39日後、417日後と787日後の2年間、継続的に採取した。土壌試料は斜面中腹の3地点から採取した。

#### 【土壌環境のメタデータ解析】

メタデータ解析は、2014年火入土壌21試料についてのみ行った。風乾土壌を0.2mmの篩に通した試料を(株)片倉コープアグリつくば分析センターに依頼した。

#### 【微生物群集構造解析】

土壌試料約10gからキットを用いて、土壌DNAを抽出した。解析対象微生物種は細菌、糸状菌、真核微生物と繊毛虫である。各生物種について、リボソームRNA遺伝子内の生物種特異的配列領域をPCRによって増幅し、次

世代シークエンサーHiseqを用いて大量に塩基配列を決定した。

配列解読は、メタゲノム用解析ソフト(QIIME)を用いてDNAの相同性検索および系統分類学的解析を行った。

#### (2) 長期低温攪乱実験区

##### 【実験フィールドと土壌試料】

北海道大苫小牧研究林内のミズナラ林冠木を中心に、5m x 5m の方形区に電熱線を深さ5cmで20cm間隔で埋めた温暖化処理区が2006年より設置している。地温は、電熱線を埋設しない無処理区より常時5度高く設定している。土壌試料は、温暖化処理区と無処理区から2006年から2012年まで毎年春と秋の2回と2016年10月に採取した。

##### 【微生物群集構造解析】

土壌試料約0.5gからキットを用いて、土壌DNAを抽出した。解析対象微生物種は細菌、糸状菌である。各生物種について、リボソームRNA遺伝子内の生物種特異的配列領域をPCRによって増幅し、次世代シークエンサーHiseqを用いて大量に塩基配列を決定後、QIIMEを用いてDNAの相同性検索および系統分類学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 短期高温攪乱実験区

2014年土壌試料の化学成分を解析した結果、火入れによって、pH、電気伝導度、アンモニア態窒素、無機態窒素、交換性マンガン量が増加し、1年後に火入れ前の値に戻った。

乾燥土壌1グラム当たりの抽出DNA量を土壌のバイオマス量とし、解析した結果、火入れ直後は火入れ前の10分の1まで減少したが、1年後3分の1まで回復し、3年後も

そのまま保持されている。2014年と2015年の両土壌で同じ傾向を示した。

細菌、糸状菌、真核微生物と繊毛虫の群集組成および多様性解析を行った(図1、2)。

<細菌>火入れ直後は種数が半減し、1年以上で火入れ前にもどり2年を超えるとさらに増加した。また、火入れ直後の群集組成は、80~90%がバチラス属細菌が優占した。2年目まで組成は変化しながら遷移し、主成分解析より3年目には火入れ前の組成に近似した。両年とも同様な傾向を示した。

<糸状菌>火入れ直後は種数が60%減少し、3年目で火入れ前まで回復した。主成分解析より細菌と同様に火入れ直後は変化が大きく、3年目で火入れ前に近づいている。また、火入れ直後から1年ほど、チャワントケ目ピロネマ属やホンシメジ科の焼跡菌が増加した。両年とも同様な傾向を示した。

<真核微生物>火入れ直後は種数が20%程度減少し、1年目ですでに火入れ前まで回復した。主成分解析から、細菌と糸状菌同様に火入れ直後に大きく変化し3年目に火入れ前に近づいている。両年とも同様な傾向を示した。

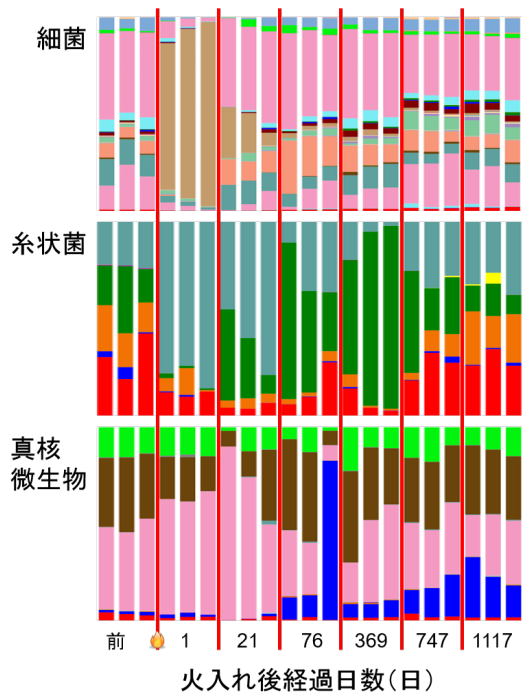


図 1

< 繊毛虫 > 予想以上に同定種が少なく、火入れの影響を受けていないくらい群集の変化は見られなかった。

火入れの高温短期の攪乱による微生物群集構造の変化は大きいですが、3年で火入れ前の構造に回復することがわかった。この変動と土壌化学性分の関連性については引き続き解析を行う。

## (2) 長期低温攪乱実験区

細菌と糸状菌の群集組成解析を行った。両生物種とも温暖処理区と無処理区において顕著な違いは見られなかった。また、温暖区の比較でも経時の変化は見られなかった。

10年間におよび長期低温攪乱による微生物群集構造はほとんど変化しなかった。5の加温程度では土壌微生物生態系は強靱であることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Kong, B., L. Chen, Y. Kasahara, A. Sumida, K. Ono, J. Wild, A. Nagatake, R. Hatano, T.

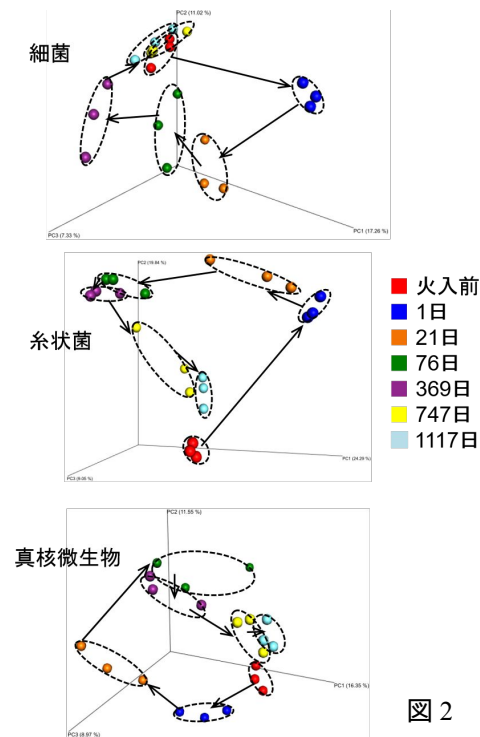


図 2

Hara: Understory Dwarf Bamboo Affects Microbial Community Structures and Soil Properties in a *Betula ermanii* Forest in Northern Japan. *Microbes and Environments* 32 (2): 103–111. (2017) 、 doi: 10.1264/jsme2.ME16154 (査読有)

Mondal, S.I., M.R. Islam, A. Sawaguchi, M. Asadulghani, T. Ooka, Y. Gotoh, Y. Kasahara, Y. Ogura, T. Hayashi: Genes essential for the morphogenesis of the Shiga toxin 2-transducing phage from *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports* 6: 39036 (2016), doi:10.1038/srep39036 (査読有)

Morimoto, H., R. Kadoya, K. Takahashi and Y. Kasahara: Proteome analysis of *Pseudomonas putida* F1 genes induced in soil environments. *Environmental Microbiology Reports* 8(5): 825–832 (2016) 、 doi:10.1111/1758-2229.12445 (査読有)

笠原康裕: 土壌プロテオミクスから考える微生物生態系機能。土と微生物、70巻2号 p41-44 (2016)、

doi.org/10.18946/jssm.70.2\_41 (査読有)

Bao, Z., T. Okubo, K. Kubota, Y. Kasahara, H. Tsurumaru, M. Anda, S. Ikeda, K. Minamisawa: Metaproteomic Identification of Diazotrophic Methanotrophs, and their Tissue Localization in Field-grown Rice Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 5043-5052 (2014)、doi: 10.1128/AEM.00969-14 (査読有)

Takada, H., Fukushima-Tanaka, S., Morita, M., Kasahara, Y., Watanabe, S., Chibazakura, T., Hara, H., Matsumoto, K., and Yoshikawa, Y.: An essential enzyme for phospholipid synthesis has a crucial role in *Bacillus subtilis* cell division. *Molecular Microbiology* 91: 242–255. (2014)、doi.org/10.1111/mmi.12457 (査読有)

[学会発表](計 14 件)

原新太郎、森川峻志、新井沙和、笠原康裕、小柴太一、山崎清志、藤原徹、徳永毅、南澤究:環境オミックス解析によるソルガム根の窒素固定 *Bradyrhizobium* 属細菌の同定、第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、2018、京都大学

森川峻志、原新太郎、笠原康裕、小柴太一、山崎清志、藤原徹、徳永毅、南澤究:メソソルガム根の窒素固定活性とその原因窒素固定細菌の探索、環境微生物系学会合同大会 2017、2017、東北大学

天知誠吾、土屋達哉、笠原康裕、濱村奈津子:ゲノム科学から見えてくる微生物によるヒ素循環、JpGU-AGU Joint Meeting 2017、2017、幕張メッセ

B. Kong, L. Chen, Y. Kasahara, A. Sumida, K. Ono, J. Wild, A. Nagatake, R. Hatano, T. Hara: Understory dwarf bamboo affects microbial structure and soil properties in a *Betula ermanii* forest in northern Japan 日本生態学会第 64 回大会、2017、早稲田大学  
B. Kong, L. Chen, Y. Kasahara, A. Sumida, K.

Ono, A. Nagatake, R. Hatano, J. Wild, T. Hara: Microbial community structure and soil properties in the rhizosphere of understory dwarf bamboo in *Betula ermanii* forest, northern Japan. 第 31 回日本微生物生態学会、2016、横須賀

土屋達哉、笠原康裕、濱村奈津子、天知誠吾:異化的ヒ酸還元細菌によるヒ素ストレス応答機構の発現解析、第 31 回日本微生物生態学会 2016、横須賀

笠原康裕: 土壌プロテオミクスから考える微生物生態系機能、日本土壌微生物学会 2016 年度大会、招待講演。2016、岐阜大学

土屋達哉、笠原康裕、天知誠吾:異化的ヒ酸還元細菌によるヒ素ストレス応答の網羅的解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016、札幌

森本 一、門屋亨介、高橋一弘、笠原康裕: プロテオーム解析を用いた *Pseudomonas putida* F1 株の土壌特異的発現遺伝子の同定と特性解析、第 10 回日本ゲノム微生物学会年会、2016、東京工業大学

Yasuhiro Kasahara: Proteome analysis of bacterial genes specifically expressed in soil. ILTS International Symposium, Hokkaido Univ. Sapporo, Dec. 2015

H. Morimoto, R. Kadoya, K. Takahashi, Y. Kasahara: Identification and characterization of the soil-specific expression genes in *Pseudomonas putida*. 第 30 回日本微生物生態学会、2015、茨城大学

K. Minasamiwa, Z. Bao, S. Ikeda, T. Okubo, H. Imaizumi-Anraku, K. Kubota, Y. Kasahara, D. Liu, S. Asakawa : N<sub>2</sub>-fixing methanotroph as non-leguminous rhizobia in paddy rice roots. 14th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. (October 30 - November 2, Chengdu, China), 2014

K. Minamisawa, S. Ikeda, Z. Bao, T. Okubo, A. Watanabe, K. Sasaki, H. Imaizumi-Anraku, T. Tokida, K. Kubota, Y. Kasahara, D. Liu, T. Watanabe, J. Murase, S. Asakawa, M. Anda, H. Tsurumaru, R. Shinoda, T. Sato: No nitrogen fertilization changes rice root microbiome abundant in diazotrophic methanotrophs through a plant symbiosis gene. 15th International Symposium on Microbial Ecology (August 24-29, Seoul, Korea), 2014

包智華、大久保卓、久保田健吾、笠原康裕、鶴丸博人、按田瑞恵、池田成志、南澤究: 水稲根における窒素固定メタン酸化細菌のメタプロテオーム同定と組織局在性、日本土壌肥料学会 2014 年度大会、2014、東京農工大学

〔図書〕(計1件)

笠原 康裕、丸善出版、低温科学便覧(北海道大学低温科学研究所編)、環境変動による土壌微生物生態系の影響、pp306-310、2015

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

小椋 義俊 (OGURA, Yoshihito)

九州大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40363585

(3)研究協力者

佐藤 雅志 (SATO, Tadashi)