

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712015

研究課題名(和文) 森林の窒素循環と微生物群集をつなぐ

研究課題名(英文) Linking microbial community with nitrogen cycling in forests

研究代表者

磯部 一夫 (Isobe, Kazuo)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30621833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くの森林生態系において窒素の供給は植物の成長・生産の制限因子として機能している。本研究では、窒素循環のプロセスの多くが微生物の窒素代謝反応であることに着目し、『環境条件 - 微生物群集の動態 - 窒素循環速度』の関係性を明らかにすることを目的とした。その結果、植物が吸収・利用するアンモニウムと硝酸の生成速度は基質の供給とともにそれを生成する微生物の存在量によって規定され、微生物の存在量は土壌の理化学性によって規定されるという階層的構造を見いだすことができた。本研究の成果は森林の窒素循環のメカニズム理解を進めるとともに、その環境応答を予測するための基盤的知見となる。

研究成果の概要(英文)：The nitrogen supply is one of the largest factors for the plant growth and production in many forests. In this project, we attempted to understand the relationship between environmental properties, microbial community dynamics, and nitrogen cycling rate, with the focus on the fact that nitrogen cycling is largely mediated by soil microbes. Then, we found the hierarchical structure between them in which the production rate of ammonium and nitrate, available nitrogen species to plants, are largely regulated by the ammonium and nitrate producing microbial abundances as well as the substrate supply, and the abundances were largely affected by the environmental properties. The findings here can not only enhance our understanding of nitrogen cycling in forests but provide the scientific basis to predict the response of the nitrogen cycling to the environmental change.

研究分野：土壌微生物

キーワード：森林土壌 窒素循環 土壌微生物 アンモニア生成 硝化 脱窒

1. 研究開始当初の背景

多くの森林生態系において窒素の供給が植物の成長を制限している。そのため、どのように窒素が循環しているのか、またどのように窒素循環が制御されているのかを明らかにすることは生態学・森林科学の主要なテーマであり続けている。また近年の大気からの窒素流入量の増大は、窒素循環のプロセスや速度を大きく変え、河流水の酸性化や下流域の富栄養化を引き起こすため、窒素循環のメカニズム理解は喫緊の課題である。

日本は森林が国土の約70%(天然林が30%、人工林が40%)を占め、気候に応じて北から南まで植生は大きく異なる。森林の窒素循環は一般に植生や林齢、更新履歴、また土壤の物理化学性などに左右されて大きく異なる。このような差異を理解するために、多くの研究において、植生や気象、土壤の物理化学性といった環境条件を用いた窒素循環の理解が試みられてきた。しかし、これらのパラメーターだけでは森林間の窒素循環のプロセスや速度の差異を十分に説明できないケースが多く見られている。そこで、窒素循環のプロセスの多くは微生物の窒素代謝反応であることから、窒素循環のメカニズム理解に向けた『環境条件 - 微生物群集の動態 - 窒素循環速度』の統一的理解の必要性が指摘されている。窒素循環に関わる環境微生物を対象とした分子生態的手法はまだ新しく、森林では研究が限られているのが現状であるが、近年の農耕地や草地を対象とした研究においても、窒素循環のプロセスの速度とそれを担う微生物群集の存在量との間に正の強い相関が見出されている。このように、微生物群集を考慮することなく窒素循環のメカニズム理解は困難であり、また微生物群集をパラメーターとして取り入れることで、窒素循環のメカニズム理解は飛躍的に進むと期待される。

2. 研究の目的

日本の森林における窒素循環のメカニズム理解に向けて、『環境条件-微生物群集の動態-窒素循環速度』の関係を明らかにする事を目的とする。土壤の物理化学性がほぼ連続的に変化するブナ天然林(京都)およびスギ人工林(千葉)と、天然林と人工林を含む多様な環境条件(植生、気象、土壤の物理化学性)からなる日本各地(北海道~九州、沖縄)の森林を対象として、以下の(1)~(4)に示す、環境条件・微生物群集構造・窒素循環速度に関する解析を行う。ここでは対象とする窒素循環プロセスとして、植物が吸収・利用するアンモニウムと硝酸に着目し、硝化とアンモニウム生成を対象とする。

(1) 森林土壤における窒素循環のプロセス速度(総硝化、脱窒、アンモニウム生成速度)を明らかにする。

(2) それぞれの森林における硝化、アンモニウム生成を担う微生物群集の組成と存在量

を明らかにする。

(3) 上記の微生物群集の組成と存在量を大きく決めている環境条件を特定する。続いて、微生物群集の組成・存在量と窒素循環のプロセス速度の関係を明らかにする。

(4) 以上を統合し、各プロセスを制御するメカニズムに対する理論的な枠組みを提唱する

3. 研究の方法

一つの森林内の斜面という狭いスケール(森林斜面スケール)と日本全国という広いスケール(広域スケール)での窒素循環速度と微生物群集の空間変動を解析する。まず京都大学芦生研究林内のブナ天然林および東京大学千葉演習林内のスギ人工林にある斜面において上部から下部にかけて段階的に土壤を採取した。北海道から鹿児島、沖縄までの全国40サイトの森林(天然林と人工林を含む)から採取済みの土壤と合わせて、以下の解析に用いた。

(1) 土壤の主な物理化学性のほか、硝化およびアンモニウム生成(無機化)の総速度を窒素安定同位体希釈法によって定量した。

(2) 全ての土壤からDNAを抽出し、全バクテリアの16S rRNA遺伝子量、アンモニア酸化バクテリアおよびアンモニア酸化アーキアのアンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA*)量を測定した。広域スケールにおいては菌類の16S rRNA遺伝子量や脱窒に関与する亜硝酸還元酵素遺伝子(*nirK*, *nirS*)もまた測定した。それらの測定値を各微生物群の存在量とした。ここで、ほぼ全てのバクテリアがアンモニア生成(低分子有機物を取り込むアンモニアを排出する)に関与しうることから全バクテリアをアンモニア生成微生物とした。またアンモニア酸化は硝化の律速段階であると考えられるので、アンモニア酸化バクテリアおよびアンモニア酸化アーキアを硝化微生物とした。続いて、16S rRNA遺伝子の塩基配列解読を行い、バクテリア群集組成を解析した。広域スケールにおいては菌類のITS領域遺伝子の塩基配列解読を行い、菌類群集組成を解析した。

(3) 得られた環境条件、アンモニウム生成・硝化微生物群集の組成・存在量、アンモニウム生成・硝化速度の関係を、各種多変量統計解析を行って解析した。

4. 研究成果

(1) 森林斜面スケールにおいて、京都大学芦生研究林内のブナ天然林および東京大学千葉演習林内のスギ人工林にある斜面ともに、上部から下部にかけて窒素動態が異なった。上部ではアンモニウムが、下部では硝酸が蓄積する傾向が見られ、特に下部では生成したアンモニウムが硝酸にまで酸化されることが確認された。アンモニウムを硝酸に酸化する硝化微生物群集の存在量も下部に行くにつれて大きくなることが確認された。またア

ンモニア生成速度とアンモニア生成微生物とした全バクテリアの存在量との間に、硝酸生成速度と硝化微生物、特にアンモニア酸化アーキアの存在量との間に正の相関が見られた。またアンモニア酸化アーキアの存在量は土壌の含水量または酸性度との間に正の相関が見られた。スギ人工林の斜面から採取した土壌を用いて、含水率を変化させて培養すると含水率の上昇に応じてアンモニア酸化アーキアの存在量と硝酸濃度が上昇したことから、特に土壌の含水量の影響を強く受けると考えられた。これらのデータを用いて、共分散構造解析を行った結果、図1に示すように、土壌の窒素循環速度は基質の供給とそれを担う微生物の存在量によって制限されており、土壌の微生物の存在量は土壌の理化学的条件によって制限される、その結果として斜面上部ではアンモニウムが、下部では硝酸が蓄積するというように、『環境条件-微生物群集の動態-窒素循環速度』の階層的構造を可視的に表現することができた(図1)。同時に、微生物の動態を把握することが窒素循環速度の環境応答を予測するために必要であることを示すことができた。

(2) 森林斜面スケールにおいて認められた階層的構造が広域スケールにおいても認められるかを検証した。広域スケールにおいても微生物群集と窒素循環速度の関連が認められた。一方で、窒素循環速度と微生物群集ともに基質の供給がより強い律速条件になっていると考えられた。

(3) 広域スケールにおいて微生物の群集組成を解析した結果、各サイトによって微生物の群集組成は異なり、バクテリアの群集組成は土壌の酸性度の影響を強く受けていることが認められた。菌類の群集組成は土壌の酸性度の影響は比較的小さく、森林の優占樹種の影響をより強く受けていることが認められた。特に、マツ林、ブナ林、ミズナラ林では外生菌根菌が多く検出された一方で、スギ林やヒノキ林では存在量は小さいがアーバスキュラー菌根菌が他の樹種が優占する森林に比べて多く検出された。マツ、ブナ、ミズナラは外生菌根菌を、スギ、ヒノキはアーバスキュラー菌根菌を保有するため、それが土壌の菌類構成に反映されていると考えられる。(2)で述べたように、微生物の存在量は基質の供給の影響を強く受けるため、微生物の存在量と組成は異なる要因によって規定され、またバクテリアと菌類の組成もまた異なる要因によって規定されていることが示された。現在までに微生物の組成の動態までを組み込んだ窒素循環モデルは構築されていないが、組成と存在量がどのように規定されているのかまで明らかにすることができたため、(2)で述べた微生物存在量を組み込んだ定性的なモデルに組成の情報を組み込むことで、微生物群集の量的、組成的な変動とその表現型としての窒素循環速度の環境応答を予測するためのモデルを構築でき

る可能性があり、そのための基盤が整ったといえる。

(4) 技術的な進展として、脱窒についても将来的にモデルに組み込むことを考え、土壌中の脱窒関連遺伝子(亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK*, *nirS*)を広く検出するためのPCRプライマーの開発ならびに分析条件の最適化を行った。その結果、これらの遺伝子は従来の手法で示されていたよりはるかに多様であり、豊富に存在していることを示した。また他の生態系の土壌も含めて、森林土壌中のこれらの遺伝子組成を解析した結果、森林土壌においては脱窒をするバクテリア群集の中で、その生態がほとんど研究されていないバクテリアが優占していることが示され、さらなる研究の必要性があると考えられた。

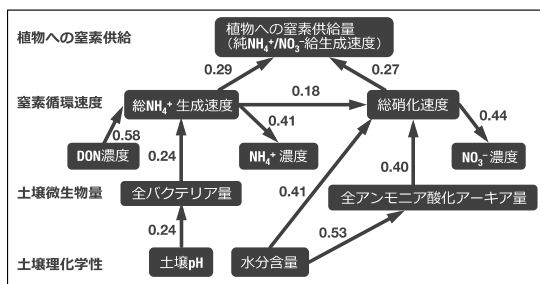


図1. 森林土壌における窒素循環速度(総NH₄⁺生成・硝化速度と純NH₄⁺生成・硝化速度)に直接的・間接的に影響を与える因子(東京大学千葉演習林の例)。数字は影響の強さを示す。

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5件)

Wei Wei, Kazuo Isobe, Tomoyasu Nishizawa, Lin Zhu, Yutaka Shiratori, Nobuhito Ohte, Keisuke Koba, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo, Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously, *The ISME Journal*, 査読有, 9 巻, 2015, 1954-1965, doi : 10.1038/ismel.2015.9

Kazuo Isobe, Nobuhito Ohte, Tomoki Oda, Sho Murabayashi, Wei Wei, Keishi Senoo, Naoko Tokuchi, Ryunosuke Tateno. Microbial regulation of nitrogen dynamics along the hillslope of a natural forest. *Frontiers in Environmental Science*, 査読有, 2 巻, 2014, 1-8, doi : 10.3389/fenvs.2014.00063

Wei Wei, Kazuo Isobe, Yutaka Shiratori, Tomoyasu Nishizawa, Nobuhito Ohte, Yuta Ise, Shigeto Otsuka, Keishi Senoo. Development of PCR primers targeting fungal *nirK* to study fungal denitrification in the environment, *Soil Biology*

Biochemistry, 査読有, 81 巻, 2015, 282-286, doi : 10.1016/j.soilbio.2014.11.02
磯部一夫、大手信人、森林の窒素循環研究に対する微生物生態学的アプローチ、森林立地、査読有、56 巻、2014、89-95, doi : 10.1016/j.soilbio.2014.11.026
Kazuo Isobe, Nobuhito Ohte. Ecological Perspectives on Microbes Involved in N-Cycling. Microbes and Environments, 査読有, 29 巻, 2014 年, 4-16, doi.org/10.1264/j sme2.ME13159

〔学会発表〕(計 14 件)

Kazuo Isobe, Spatio-temporal dynamics of N-cycling microbial communities in forest soils. BIOGEMON 2017 9th International symposium, 2017 年 8 月 20-24 日, Litomysl conference center (Litomysl, Czech Republic)

岡裕章、磯部一夫、渡辺恒大、舘野隆之輔、妹尾啓史、柴田英昭、北方林における積雪パターンの変化に対する微生物群集の応答、日本微生物生態学会第 31 回大会、2016 年 10 月 23 日、横須賀市文化会館(神奈川県横須賀市)

Kazuo Isobe, Ecological studies of nitrifying microbial communities in forest soil, BNI International Symposium, 2016 年 9 月 4 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

磯部一夫、岡裕章、渡辺恒大、浦川梨恵子、舘野隆之輔、妹尾啓史、柴田英昭、森林土壌における微生物の増殖・死滅と窒素動態、第 127 回日本森林学会大会、2016 年 3 月 28 日、日本大(神奈川県藤沢市)

磯部一夫、森林生態系における微生物群集と窒素循環過程の時空間的変動、日本生態学会大会第 63 回仙台大会、2016 年 3 月 24 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Kazuo Isobe, Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously, Frontiers in Soil Microbiology 2015, 2015 年 10 月 26 日, Xi-Jiao Hotel (Beijing, China)
伊勢裕太、磯部一夫、浦川梨恵子、妹尾啓史、大塚重人、大手信人、日本各地の森林における土壌微生物群集組成と窒素循環プロセスに対する寄与、日本微生物生態学会第 30 回大会、10 月 17-20 日、亀城プラザ(茨城県土浦市)

岡裕章、磯部一夫、渡辺恒大、舘野隆之輔、妹尾啓史、柴田英昭、森林の微生物群集の 1 年、日本微生物生態学会第 30 回大会、10 月 17-20 日、亀城プラザ(茨

城県土浦市)

磯部一夫、窒素循環研究に対する微生物生態学的アプローチ、日本土壌肥料学会 2015 年度京都大会、2015 年 9 月 9 日、京都大(京都府京都市)

磯部一夫、魏巍、妹尾啓史、環境中には未知なる脱窒微生物が豊富に存在している、日本地球惑星連合 連合大会 2015 年大会、2015 年 5 月 26 日、幕張メッセ(千葉県幕張市)

磯部一夫、魏巍、西澤智康、白鳥豊、大塚重人、妹尾啓史、土壌には未知の脱窒微生物が豊富に存在している、日本土壌微生物学会 2014 年大会、2015 年 5 月 23 日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
Kazuo Isobe, Nobuhito Ohte, Tomoki Oda, Hiroyu Kato, Sho Murabayashi, Wei Wei, Keishi Senoo. Topographical heterogeneity of nitrogen dynamics and microbial communities in forest soil. 15th International Symposium on Microbial Ecology, 2014 年 8 月 26 日, COEX (Souel, Korea)

Kazuo Isobe, Introduction of our project; from metagenome to ecosystem functions. 6th Korea-Japan-Taiwan International Symposium on Microbial Ecology, 2014 年 8 月 24 日, COEX (Souel, Korea)

磯部一夫、大手信人、微生物生態情報の把握は森林の窒素循環メカニズムの理解を深めるのか、日本地球惑星科学連合 2014 年大会、2014 年 4 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2015/20150312-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 一夫 (ISOBE KAZUO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30621833