

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02233

研究課題名(和文)日本の森林の微生物相に関する情報基盤の構築

研究課題名(英文)Development of Information Base on Microbiota of Japanese Forests

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(農学部)・助教

研究者番号：30621833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日本各地の22地域・40地点の森林サイトを対象に土壌微生物相を調査した。土壌微生物相の種組成や遺伝的生理特性の地理分布、成り立ち、窒素循環に対する制御を明らかにすることを目的とし、日本の森林土壌の微生物相に関する基本情報を整備・体系化することを目指した。その結果、土壌微生物相の種組成の地理分布や成り立ちは各微生物種の遺伝的生理特性によって大部分が説明できること、土壌微生物相の種組成が森林の窒素循環速度に直接的に反映されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林土壌において微生物は物質循環の形成や植物への養分供給などの機能を担い、生態系を支えている。森林において微生物が果たす機能的役割の大きさ、あるいは腸内細菌や病原菌など微生物に対する社会的認知が広がっていることを鑑みても、日本の森林土壌の微生物相に関する基本情報を整備・体系化し、生態学的研究を支える情報基盤を構築する必要がある。本研究の成果は、日本の森林が有する特徴を新たな視点から捉え直す機会を提供すると同時に、微生物相の生態的・社会的影響の評価を可能とするための情報基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the soil microbial community at 40 forest sites in 22 regions across Japan. We aimed to clarify the geographic distribution of species composition and physiological traits of soil microbial communities, and their regulation on nitrogen cycling. We also aimed to develop the information base on soil microbial communities of Japanese forests. The results showed that the geographic distribution of species composition of soil microbial communities can be largely explained by the physiological traits of microbial species, and that the species composition is directly reflected in the rate of nitrogen cycling in forests.

研究分野：土壌微生物

キーワード：土壌微生物 森林土壌 窒素循環 生物地理

1. 研究開始当初の背景

森林土壌において微生物は有機物の分解、物質循環の形成、植物への養分供給、炭素や窒素の貯蔵などの機能を担い、生態系を支えている。近年では、数十万から数百万もの微生物の遺伝子塩基配列情報を土壌から直接取得・解読・解析することで、多様かつ豊富に存在している微生物を「群集」として把握することができるようになっている。それにより、動植物と比べてはるかに系統的に多様な微生物が検出され、動植物にはない新たな代謝が次々と発見されるなど、微生物の生態に関する知見は飛躍的に拡張している。

このような技術的・学問的発展とは裏腹に、日本の森林土壌の微生物相に関する知見は基本的なものであれ極めて限定的である。日本の森林土壌にはどれほどの微生物種が存在し、その多様さはどのような要因によって支えられているのだろうか。日本の森林土壌の微生物相に関する知見の整理や体系化は進んでおらず、このような基本的な問いに対しても十分な答えを持ち合わせていない。

森林において微生物が果たす機能的役割の大きさ、あるいは腸内細菌や病原菌など微生物に対する社会的認知が広がっていることを鑑みても、日本の森林土壌の微生物相に関する基本情報を整備・体系化し、微生物の生態学的研究を支える情報基盤を構築する必要がある。それは日本の森林が有する特徴を新たな視点から捉え直す機会となると同時に、微生物の生態的・社会的影響の評価を可能とする。多くの研究は個別的・先鋭的なトピックに傾倒するが、そこで得られた結果を相対的に評価するための情報基盤を構築することにもなる。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、日本の森林における土壌微生物相の基本情報を整備・体系化する。具体的には以下の3点を明らかにすることを目的とする。

1. 日本の森林における土壌微生物相の種組成を明らかにするとともに、環境と種組成の関係を明らかにする。
2. 日本の森林における土壌微生物相の遺伝的生理特性を明らかにするとともに、環境と遺伝的生理特性の関係を明らかにする。
3. 日本の森林における植生、土壌、土壌微生物相の関係を明らかにするとともに、窒素循環に対する制御を明らかにする。

3. 研究の方法

研究サイト

日本各地の22地域・40地点の森林サイトを対象に研究を行った。これらのサイトは北海道から九州・沖縄までの多種多様な森林が含まれており、その環境傾度も広範囲にわたることから日本の森林土壌における微生物相を広く検証するのに適している。各森林の中で5地点から土壌を採取し、計200サンプルの土壌から微生物DNAを抽出し実験に供した。各森林の地理・天候・環境情報はUrakawa et al. (2015 J Ecol Res)により論文化され、日本長期生態学研究ネットワークのデータベースにおいて共有されている。採取された土壌（森林サイト40地点 × 5反復 = 200サンプル）から土壌微生物のDNAを抽出し、以降の実験に用いた。

土壌微生物相の種組成

バクテリア、アーキア、真菌類群集の遺伝子（16S rRNA 遺伝子、ITS 領域遺伝子）のシーケンス解析を行い、土壌微生物の種組成の地理分布を決定した。続いて、generalized dissimilarity modelling（GDM）により環境と土壌微生物の種組成の関係について検証した。また、環境傾度に応じて優占する微生物種は進化系統的に決定されるという仮説のもと、環境傾度と優占種の進化系統の関係を検証した。

土壌微生物相の遺伝的生理特性

塩基配列をランダムに 251 bp paired-end を解読し、100 残基以上のアミノ酸 300 万配列をランダムに抽出した。得られたアミノ酸配列から MAPLE を用いて、KEGG モジュールに基づく生理機能を推定した。Mantel 検定により環境と遺伝的生理特性の関係を検証した。

土壤微生物相の窒素循環制御

気候、植生、土壌、土壤微生物相、窒素循環の間の関係性を整理する。これまでの研究 (Isobe et al. 2018 Soil Biol Biochem; 2020 ISME J) から土壌の理化学性の時空間的な変化が土壤微生物相の時間間的な変化をもたらす、窒素循環速度の時空間的な変化に反映されることを示している。その図式を拡張し、Partial Least Squares Structural Equation Modeling (PLS-SEM)により日本の森林の土壤微生物相の成立要因と窒素循環への制御を検証した。

4. 研究成果

土壤微生物の種組成

細菌群集について 49 門が検出された。Proteobacteria 門 (20.1~50.4%)、Acidobacteria 門 (12.6~44.6%)、Verrucomicrobia 門 (2.3~26.8%)、Actinobacteria 門 (2.3~17.6%) が多く、これらの門で全細菌群集の約 70~80%を占めていた。アーキア群集について 3 門が検出され、Crenarchaeota 門 (32~94%)、Euryarchaeota 門 (0~52%) の 2 種類の門が全アーキア群集の約 80~100%を占めていた。全真菌について 7 門が検出された。Ascomycota 門 (15.8~94.8%)、Basidiomycota 門 (11.1~80.2%) が多く、これら 2 種類の門で全真菌群集の約 70~90%を占めていた。外生菌根菌は 0.1~72.5%を占め、広葉樹天然林のサイトで多く検出された。アーバスキュラー菌根菌は 0~2.1%を占め、スギ・ヒノキ林のサイトで多く検出された。

バクテリア組成は 58.9%が環境要因で説明され、特に土壌 pH と土壌 C/N 比が大きな要因と考えられた。アーキア組成は 31.1%が環境要因で説明され、土壌 pH と土壌 C/N 比のみが有意な要因と考えられた。真菌の群集組成は 44.4%が環境要因で説明され、土壌 pH、土壌 C/N 比、地理的距離、年平均気温に加え、樹種組成が大きな要因と考えられた。このように土壤微生物の種組成は環境要因によって 5 割程度が説明でき、特に土壌 pH と土壌 C/N 比の影響の大きさが明らかになった (図 1A)。

続いて、4 地点以上の森林で優占する土壤微生物種を選抜、進化系統樹を作成し、それぞれの種の存在量と土壌 pH や土壌 C/N 比の間の相関をマッピングした。その結果、相関が進化系統的に保存されている、すなわち土壌 pH と土壌 C/N 比の傾度に対し、特定の進化系統のクレードに属する微生物群が揃って優占化する (希少化する) ことが明らかになった (図 1B)。

以上から、土壤微生物の種組成は土壌 pH と土壌 C/N 比によって大部分が説明でき、それは特定の進化系統のクレードに属する優占微生物群がそれらの環境傾度に対し顕著な応答を示すためであると考えられた。

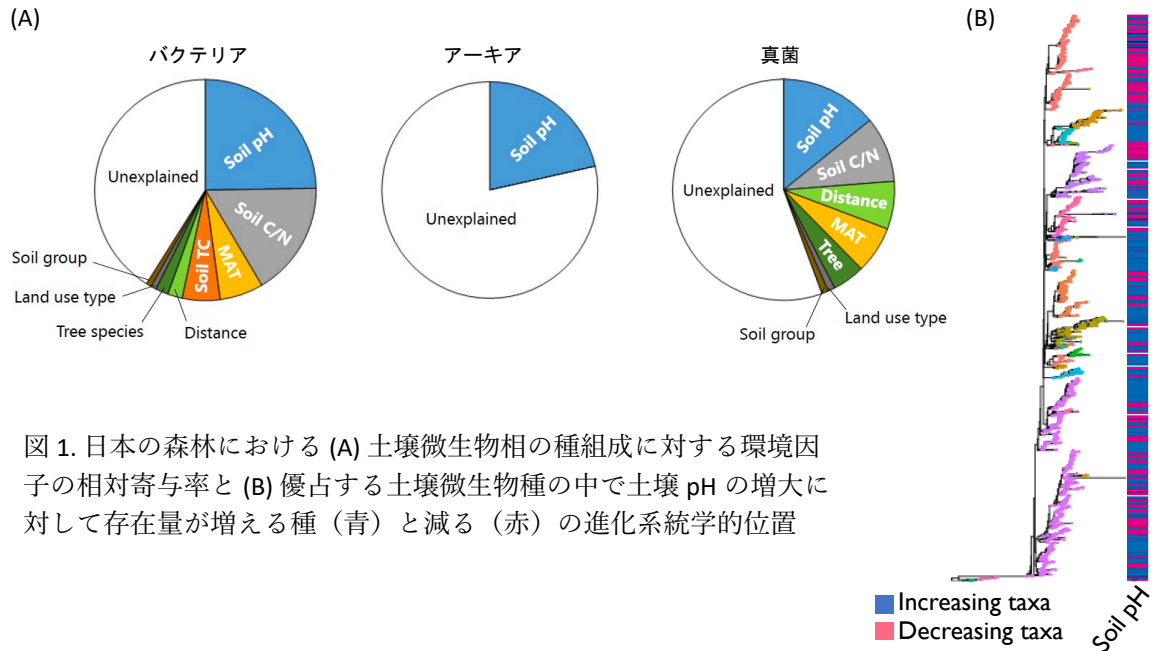


図 1. 日本の森林における (A) 土壌微生物相の種組成に対する環境因子の相対寄与率と (B) 優占する土壌微生物種の中で土壌 pH の増大に対して存在量が増える種（青）と減る（赤）の進化系統学的位置

土壌微生物相の遺伝的生理特性

土壌微生物群集が有する KEGG モジュールに基づく生理機能の組成は土壌 pH ($\rho = 0.33, P < 0.001$) や土壌 C/N 比 ($\rho = 0.32, P < 0.001$) と強い正の相関を示した。

続いて、機能モジュールのアバンダンスと土壌 pH との関係性を Spearman の順位相関分析によって検証し、92 と 52 のモジュールは正あるいは負の相関を示し、220 のモジュールは有意な相関を示さなかった。特に窒素代謝のうちエネルギー生成に関わるモジュール、無機・有機イオンや糖、脂質、リン酸、アミノ酸、金属カチオン等の輸送に関わるモジュールは正の相関を示した。ATP 合成に関わるモジュールや、酸性環境や浸透圧といった外部環境や envelope stress といったストレスに対する応答に関わるモジュールは負の相関を示した。また、同化的代謝や炭水化物・脂質代謝、ヌクレオチド・アミノ酸代謝、二次代謝、遺伝情報処理等に関わるモジュールは有意な相関を示さなかった。

以上から、土壌が酸性になるにつれて微生物群集はストレス応答に関わる生理機能を特に有する微生物が優占する一方で、中性になるにつれてストレスが緩和されエネルギー生成に関わる生理機能を特に有する微生物が優占することが示唆された。このことが土壌 pH に対する土壌微生物の種組成ならびに系統組成の変化をもたらしていると考えられた。

土壌微生物相の窒素循環制御

森林では土壌微生物によってリターが分解され、アンモニウムや硝酸が生成する。そのため土壌微生物相（組成、存在量、生理機能特性）は土壌環境の影響を受ける一方で、リターの分解や無機態窒素の生成速度を制御していると考えられる。そこで気候・植生・土壌タイプ・土壌理化学性が土壌微生物群集の組成・量・遺伝的生理特性を規定し、それが窒素循環の速度に反映されるというアイデアを検証した。

その結果、次の (1) - (6) の関係性が示唆された； (1) 植生の違いによって土壌 pH が規定される (2) 土壌 pH 傾度によって優占する微生物種が規定される（土壌が酸性になるにしたがって、エネルギー生成に関わる生理機能を特に有する細菌の優占が抑制され、結果的に真菌が優占しやすくなる） (3) 優占する微生物種によって土壌 C/N 比が規定される (4) 土壌タイプの違いによって土壌炭素窒素量が規定される (5) 土壌炭素窒素量傾度によって土壌微生物量が規定される (6) 土壌 C/N 比と土壌微生物量によって無機態窒素の生成速度が規定される（図 2）。

以上から、植生・土壌タイプが土壌理化学性の変化を介して土壌微生物群集の組成・量・遺伝的生理特性を規定し、それが窒素循環の速度に反映されることが示唆された。

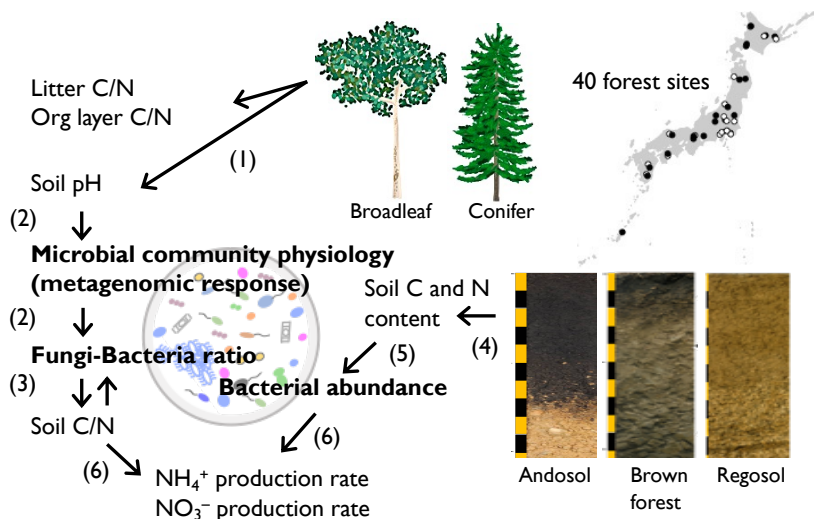


図2. 日本の森林における「植生・土壌タイプ - 土壌理化学性 - 土壌微生物群集の組成・量・遺伝的生理特性 - 窒素循環の速度」の関係。全ての矢印は有意($p < 0.05$)である

研究成果の公表と今後の展望

本研究において検討したコアとなる3つのアイデアの妥当性について、これまでの研究成果をまとめる形で論文化した。微生物の群集組成は地理的要因より土壌環境要因によって強く規定されるというアイデア (Fujimura et al. 2020 Microbes Environ)、微生物の環境応答は進化系統的に保存されるというアイデア (Isobe et al. 2019 Nat Commu; 2020 Philos Trans Royal Soc B)、土壌理化学性が土壌微生物群集の組成・量・遺伝的生理特性を規定し、それが窒素循環の速度に反映されるというアイデア (Isobe et al. 2018 Soil Biol Biochem; 2018 Soil Biol Biochem; 2020 ISME J) である。これらの論文の中でアイデアの妥当性が確かめられたため、日本の森林の土壌微生物相を対象として検討することの意義を確認することができた。これらのアイデアや本研究の結果については国際学会や国内学会において発表した。本研究の結果については近く投稿予定である。加えて、真菌類の 18S-ITS1-5.8S-ITS2 領域遺伝子の塩基配列解読を行っており、病原微生物を含む真菌類の地理分布とその規定要因の解析を行う。得られたデータを誰でもアクセス・利用できるようにデータベースやウェブサイトを通じて公表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujimura Reiko, Azegami Yoichi, Wei Wei, Kakuta Hiroko, Shiratori Yutaka, Ohte Nobuhito, Senoo Keishi, Otsuka Shigeto, Isobe Kazuo	4. 巻 35
2. 論文標題 Distinct Community Composition of Previously Uncharacterized Denitrifying Bacteria and Fungi across Different Land-Use Types	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Isobe Kazuo, Bouskill Nicholas J., Brodie Eoin L., Sudderth Erika A., Martiny Jennifer B. H.	4. 巻 375
2. 論文標題 Phylogenetic conservation of soil bacterial responses to simulated global changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2019.0242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Isobe Kazuo, Allison Steven D., Khalili Banafshe, Martiny Adam C., Martiny Jennifer B. H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Phylogenetic conservation of bacterial responses to soil nitrogen addition across continents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10390-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Isobe Kazuo, Ise Yuta, Kato Hiroyu, Oda Tomoki, Vincenot Christian E., Koba Keisuke, Tateno Ryunosuke, Senoo Keishi, Ohte Nobuhito	4. 巻 14
2. 論文標題 Consequences of microbial diversity in forest nitrogen cycling: diverse ammonifiers and specialized ammonia oxidizers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 12 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-019-0500-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isobe Kazuo, Oka Hiroaki, Watanabe Tsunehiro, Tateno Ryunosuke, Urakawa Rieko, Liang Chao, Senoo Keishi, Shibata Hideaki	4. 巻 124
2. 論文標題 High soil microbial activity in the winter season enhances nitrogen cycling in a cool-temperate deciduous forest	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Biology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 90 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.soilbio.2018.05.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Isobe Kazuo, Ikutani Junko, Fang Yunting, Yoh Muneoki, Mo Jiangming, Suwa Yuichi, Yoshida Makoto, Senoo Keishi, Otsuka Shigeto, Koba Keisuke	4. 巻 122
2. 論文標題 Highly abundant acidophilic ammonia-oxidizing archaea causes high rates of nitrification and nitrate leaching in nitrogen-saturated forest soils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Biology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 220 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.soilbio.2018.04.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 伊澤航太郎、伊勢裕太、高見英人、大手信人、妹尾啓史、磯部一夫
2. 発表標題 日本の森林における土壌微生物群集の物質代謝機能 -メタゲノムと生物地理-
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯部一夫
2. 発表標題 土壌のバクテリア群集の窒素応答は進化系統的に保存されている
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯部一夫
2. 発表標題 土壌微生物群集の環境応答を 予測することは可能なのか -窒素応答を例に-
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Isobe, Steven D Allison, Banafshe Khalili, Adam C Martiny, Jennifer BH Martiny
2. 発表標題 Phylogenetic conservation of bacterial responses to soil nitrogen addition across continents
3. 学会等名 17 th International Symposium of Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuo Isobe
2. 発表標題 Forest response to climate change: microbial ecological perspective.
3. 学会等名 2018 NTU-UTokyo Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 (一社)日本森林学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 694
3. 書名 森林学の百科事典	

1. 著者名 磯部 一夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 50
3. 書名 森林と土壌 (柴田 英昭 編)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大手 信人 (Ohte Nobuhito) (10233199)	京都大学・情報学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	カリフォルニア大学アーバイン校		