

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0039

研究課題名(和文) 農耕地生態系の潜在的物質循環ポテンシャルを可視化する

研究課題名(英文) Visualization of the metabolic and physiological potential of microbial community in farmland

研究代表者

高見 英人 (TAKAMI, Hideto)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・上席研究員

研究者番号：70359165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：微生物生態系のメタゲノム情報から農耕地・森林土壌の物質循環能を可視化するため、熊本、東京、山形の各都県6箇所で3回ずつ採取された18農耕地サンプル及び北海道から沖縄に至る人工林20、天然林20の土壌サンプル(計40)のメタゲノム解析をMAPLEシステムを用いて行った。約730種類のKEGGモジュールに対する充足率、アバンダンスに基づく代謝機能、リボソームタンパク質に基づく菌叢組成を用いて非計量多次元尺度構成法(NMDS)を用いて解析した結果、菌叢、機能アバンダンスとも水田と畑地が有意な検定結果をもって差別化され、人工林と天然林の代謝機能、菌叢組成は土壌pHと相関することがわかった。

研究成果の概要(英文)：To visualize nitrogen and carbon cycling potential in the soils of farmland and forest, we used 18 farmland samples collected at Yamagata, Tokyo, and Kumamoto and also 40 planted and natural forest soil samples collected at various locations from Hokkaido to Okinawa in this study. By analyzing the metagenomic sequences generated from each soil sample using MAPLE system, we calculated completion ratio of the 766 functional modules registered in the KEGG database, and the abundance of each module and composition of taxonomical composition of the microbial community based on the ribosomal proteins. In addition, we performed the statistical analyses with non-metric multidimensional scaling method based on the functional module abundance and taxonomical composition. As a result, paddy and field soils were clearly separated with a significant p-value and the patterns of functional abundance and taxonomic composition of planted and natural forest were found to correlate to the soil pH value.

研究分野：ゲノミクス、環境微生物学

キーワード：メタゲノム解析 MAPLEシステム 生理代謝機能 農耕地土壌 森林土壌 微生物物質循環

1. 研究開始当初の背景

陸域、特に水田、畑地、森林、河川などにおける物質循環は、食料生産を支える生態系の成長・維持の根幹をなし、そのメカニズムの解明は、食料生産、森林、水産資源を安定的に維持し、さらに向上させていく上で急務である。しかし、複合的プロセスからなる物質循環メカニズムの把握は未だ困難で、限られたプロセスを抽出した解析に留まっている。そのため、土質や肥料の種類など自然環境や人為的要因の異なる農耕地や植生の異なる森林が持つ物質循環ポテンシャルを網羅的に把握できず、その違いを単純に比較することができていない。

環境中の網羅的ゲノム DNA 情報を利用したメタゲノム解析は、物質循環の全体像の把握に有効な数少ないアプローチである。しかし、先と同様に一部の代謝機能に着目し、それに関与する少数の鍵遺伝子の探索と多様性解析に留まっているのが現状である。研究代表者らはこの問題解決のため、メタゲノム解析並びに生物情報学的解析手法の開発を進めてきた。メタゲノム配列情報に基づく網羅的生理・代謝機能の可視化法を考案し、平成 25 年 12 月には、本法による解析を自動化した MAPLE (<http://www.genome.jp/tools/maple/>)システムを公開するなどして、陸域の物質循環像の解明に向けた準備を進めてきた。MAPLE は、生態系に備わる物質循環ポテンシャルをメタゲノムに含まれる全ての遺伝情報を用い、網羅的に可視化できる唯一無二のシステムである。

一方、米国研究者が中心となり、世界中から集めた様々な環境サンプルの大規模メタゲノム解析プロジェクト、Earth microbiome が進行中であるが、この大規模プロジェクトにおいても生態系が持つ網羅的代謝機能解析まではなされていない。したがって、研究代表者らが独自に開発した MAPLE システムを用い、世界に先駆けて各陸域生態系の代謝マップを描くことで、物質循環プロセス全体の把握が可能となる。さらに、異なる生態系間を比較しこれまでの知見と合わせることで、物質循環の諸現象を制御する要因の推定が可能になると考えた。また、研究分担者の竹本博士と共に提案し、採択された挑戦的萌芽研究「メタゲノミクスと数理統計学の融合による新規な環境影響評価法の開発」の中の 1 課題である「代謝ポテンシャルの定量化法の開発」で得られた成果を取り込むことで、本研究がさらに推進されると考え本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、物質循環プロセスが微生物の多彩な代謝系によって駆動されていることに着目し、微生物群集のメタゲノム配列情報から見える生態系の物質循環ポテンシャルを、独自に開発した MAPLE を用いて網羅的に可視化(生態系代謝マップを作成)することを目的とした。そして、各物質循環に関与する代謝ポテンシャルをネットワーク化することで、これまで個別に行われてきた①分離菌株による分子生物学的解析、②環境中の物質濃度測定、③同位体解析、などだけ

では解釈できなかった物質代謝反応間のつながり解明を目指す。また、これらの情報を陸域生態系の環境情報と統合することで、生態系(水田、畑地、森林)間における各環境条件、人為的要因と物質循環ポテンシャルの関係性を明らかにする。これにより、陸域における新たな物質循環プロセスの発見と物質循環の諸現象を制御するメカニズムの理解に必要な論理的枠組み構築へと迫る。

3. 研究の方法

本研究では、国内の代表的な陸域環境(水田土壌、畑地土壌、森林土壌)から微生物群集の DNA を取得し、そのメタゲノム配列を MAPLE で解析することにより、生態系の物質循環に関与する生理・代謝ポテンシャルを網羅的に明らかにする。また、各物質循環に関与する代謝モジュールの構成に必要な遺伝子数(abundance)やそれを担う微生物組成と環境要因との関係性の解明を目的とし、以下の 4 課題を設定し進めた。

課題 1 土壌試料からのメタゲノム DNA の抽出と配列決定:まず、これまで採取され、凍結保存されている国内の水田(灰色低地土)、畑(灰色低地土[有機肥料、尿素]、火山灰土)、天然林(針葉樹林土壌、広葉樹土壌)、人工林(スギ林土壌)から採取された土壌サンプルから、環境メタゲノム抽出用キットを用いて DNA を抽出し、Illumina MiSeq DNA シーケンサーで各サンプルから 250 塩基長を持つ配列をペアエンドでそれぞれ 300 万配列産出した。

課題 2 微生物群集構造解析:課題 1 により、各サンプルから得られたペアエンドの 300 万配列をアセンブルし、400-450 塩基長のメタゲノム配列を約 300 万配取得した。次に、遺伝子予測プログラム MetageneAnnotator を用いて遺伝子予測を行った。予測された遺伝子をアミノ酸配列に変換後、MAPLE システムに投入し、ゲノムが解読された生物種のアミノ酸配列データベースに対して検索を行い、有意にヒットした遺伝子の ID 番号(KO)をアサインした。代謝反応単位、複合装置として KEGG に登録された機能モジュールは、この KO が付与された遺伝子によって構成されているので、メタゲノム配列中の遺伝子に付与された KO を各モジュールにマッピングすることで、代謝や複合体モジュールの充足率(MCR)を計算した。

複合体モジュールの中に原核生物(バクテリアとアーキア)と真核生物のリボソームモジュールがある。リボソームを構成するリボソームタンパク質遺伝子は種によらず同数で、一部の例外を除きゲノム中にそれぞれ 1 コピーしかない。そこで、このモジュールにマップされた遺伝子数と由来生物種を調べることで、メタゲノム中のバクテリアとアーキアの割合、バクテリアとアーキアの門(分類群)レベルでの組成を算出した。

課題 3 網羅的生理・代謝機能ポテンシャルの可視化:課題 2 で各土壌生態系のメタゲノムか

ら予測された遺伝子配列を MAPLE システムに投入することで、現在 KEGG に登録されている 279 の代謝モジュール、292 の複合体モジュール、環境応答などに関係する 155 の機能セットモジュールなどに対する MCR と各機能モジュールを構成する KO に割り振られた遺伝子の abundance を算出し、本課題において開発した MAPLE Graph Maker を用いて可視化した。また、MCR が 100% に満たない場合については、各モジュール機能の存在確率を評価する Q 値を算出し、その値に基づいてモジュール機能の有無を評価した (Q 値の算出方法は、挑戦的萌芽研究によって開発されたものを用いた)。MAPLE システムで KO がアサインされた配列には、その由来生物種情報が付随するので、各遺伝子を由来生物種ごとに分けることができる。そこで、本課題の主題である物質循環に直接的に関与すると思われる炭素固定、光合成、メタン生成やメタン酸化、硝化、脱窒、窒素固定や難分解性物質分解などの 2 次代謝、ポリマー合成や硝酸、亜硝酸、重炭酸、糖やアミノ酸などのトランスポーターなどの機能モジュールを担う生物種組成を解析した。

課題 4 比較代謝ネットワーク解析: 課題 3 で得られた各機能モジュールの充足率や abundance の結果を本課題中に開発した MAPLE Metabolic Map Viewer を用いて粗視化マップ上に描画し、機能の有無や機能アブundanceの違いをハイライトした。

4. 研究成果

(1) 農耕地土壌の機能的菌叢組成的特徴



図 1. 農耕地土壌採取地点

図 1 に示した 3 都府県の 2 地点の水田及び畑地土壌を 3 サンプルずつ採取し、課題 1 で述べた方法によって算出された 300 万配列を MAPLE に供試した。

KEGG に登録された 766 種の機能モジュールのうち、9 種全ての土壌サンプルでモジュールの充足率 (MCR) が 100% となったモジュールのアブundance値のパターンに基づき Bray-Curtis により多次元尺度法 (NMDS) を用いた統計解析を行った。その結果、図 2 に示したように各サンプルのモジュールアブundanceのパターンは、地

域性ではなく、土地利用性の違いと相関し、畑地と水田土壌が持つ微生物機能が有意に差別化されることがわかった。また、水田はアンモニアの濃度と、畑地は硝酸の濃度と相関していることもわかった。

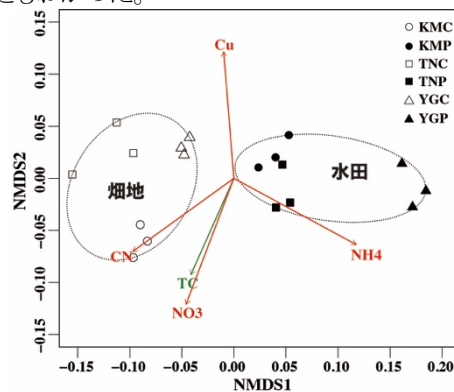


図 2. 機能モジュールのアブundanceによる NMDS 解析
緑矢印： $P < 0.05$, 赤矢印： $P < 0.01$

これに加え、各土壌サンプルの菌叢組成による各サンプル間の違いを同様に NMDS による統計解析によりハイライトした。16S rDNA を用いた方法では PCR バイアスやコピー数の問題などにより正確さに乏しいため、菌叢組成は、ゲノム中に同数存在するリボソームタンパク質遺伝子の生物種組成に基づいた解析を行った。その結果、モジュールアブundanceのパターンと同様に、地域性ではなく、土地利用性の違いと相関し、畑地と水田土壌の微生物生態系を構成する菌叢組成により有意に差別化された (図 3)。

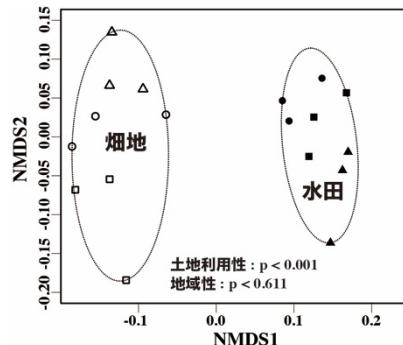


図 3. ribosomal protein に基づく菌叢組成の NMDS

次に、各モジュールのアブundanceを水田と畑地間で比較し、水田より畑地が優位 (畑地 > 水田) なもの、畑地より水田が優位 (水田 > 畑地) なものをピックアップした (図 4)。

その結果、畑地土壌では同化的な、水田土壌では異化的な窒素・硫黄代謝モジュールが高く、Pathway モジュール以外では、水田で金属イオン輸送系や嫌気代謝遺伝子モジュールが、畑地で多糖の取り込み、薬剤耐性遺伝子、酸素に対する窒素固定遺伝子発現の制御系がそれぞれ相対的に高いことがわかった。

さらに、図 4 でハイライトした窒素と硫黄代謝に関与するモジュール機能を担う生物種組成を調べたところ、図 5 に示したように、機能モジュールを担う Phylum/Class レベルでの微生物組成は水田・畑地土壌間で大差なかったが、同化的な代謝モジュールでは α -proteobacteria の割合が

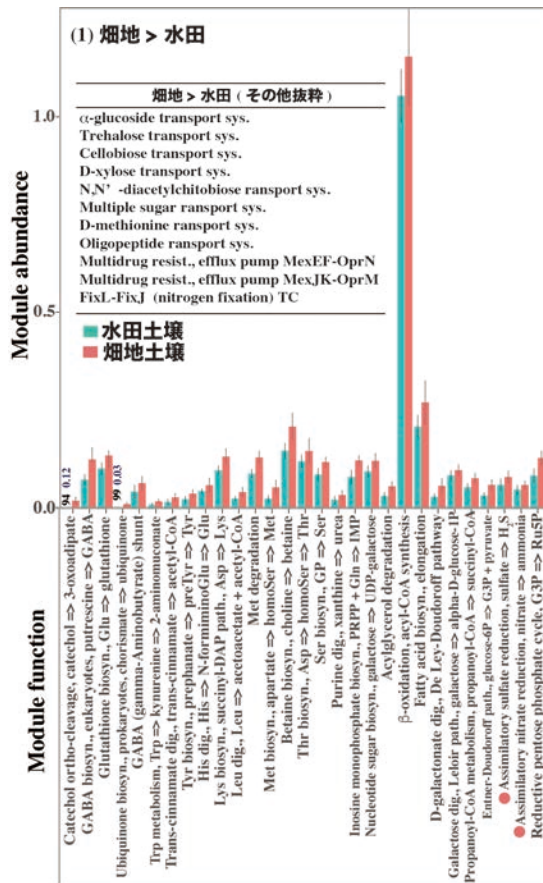


図4. 水田・畑地土壌間で有意差のある Pathway module アバダンス。(1) 畑地 > 水田。データは各土地利用性での平均アバダンス値。グラフ内の数値はモジュールが不完全な場合の MCR(%), Q 値。●はモジュール機能に貢献する生物種組成を示した。(図5)

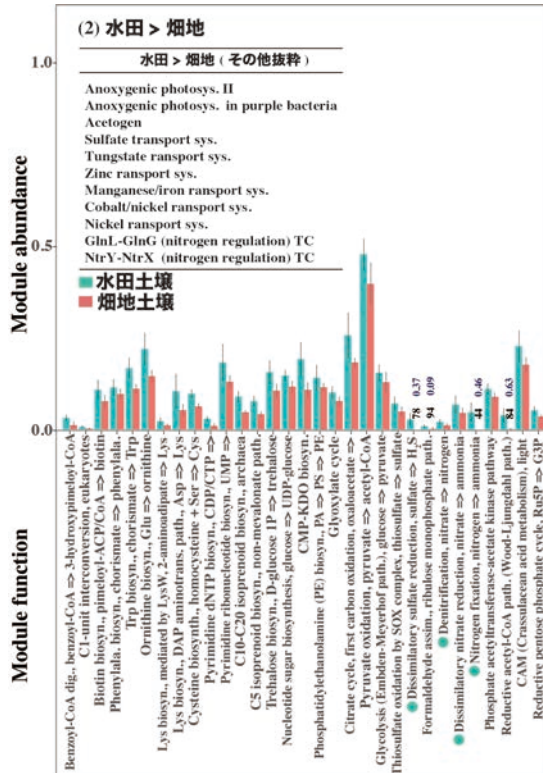


図4. 続き。(2) 水田 > 畑地。データは各土地利用性での平均アバダンス値。グラフ内の数値はモジュールが不完全な場合の MCR(%), Q 値。●はモジュール機能に貢献する生物種組成を示した。(図5)

高く、異化的な代謝モジュールでは β -proteobacteria の割合が高いことがわかった。このように、機能モジュールに基づく土壌微生物

代謝機能ポテンシャルの解析では、畑地では酸化的な、水田では還元的な代謝系が高い、という従来の知見を支持する結果とともに、同化的窒素・硫黄代謝系は畑地で、逆に異化的代謝系は水田で高いという新たな知見も得られた。

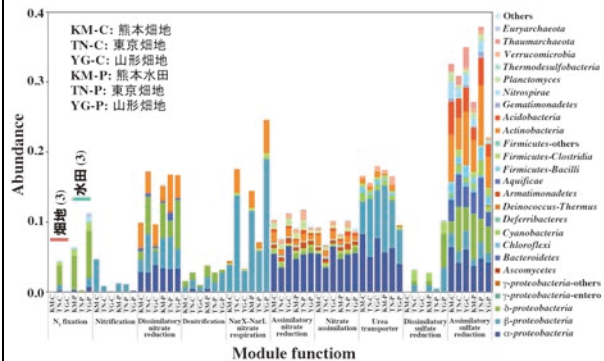


図5. 窒素と硫黄の異化・同化に関わるモジュール機能を担う生物種組成。図4の●に加え、Pathway以外のモジュールで有意差が見られた NarX-NarL(Nar gene regulation) 及び urea transporter についても示した。

(2) 森林土壌の機能的及び菌叢組成的特徴

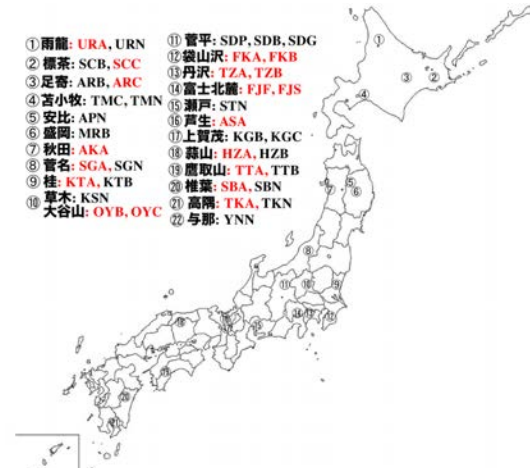


図6. 森林土壌の採取地点。赤:人工林, 黒:天然林

北海道から沖縄まで全国 22 ヶ所から天然林 20、人工林 20 の計 40 土壌サンプル(図6)を採取した。メタゲノム DNA を抽出し、農耕地土壌の場合と同様に加工された配列データを MAPLE に供試した。MAPLE の結果から各サンプルのリボソームタンパク質に基づく菌叢組成を調べたところ、全ての土壌サンプルにおいて微生物叢全体の 95%以上がバクテリアからなっており、一部のサンプルでアーキアが3~4%占めていたが、アーキアの割合は全体的に低いことがわかった。また、真核生物が占める割合は全てのサンプルで1%以下であった(図7)。

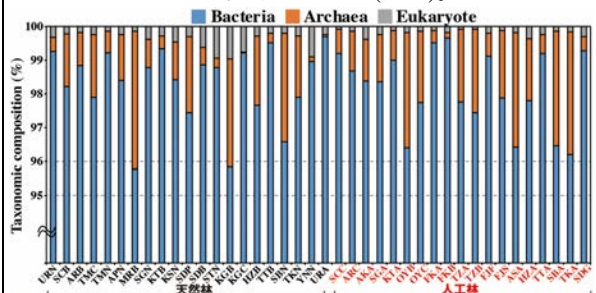


図7. リボソームタンパク質に基づくバクテリア、アーキア、真核生物の組成。バクテリアの菌叢は主に α -、 δ -proteobacteria、

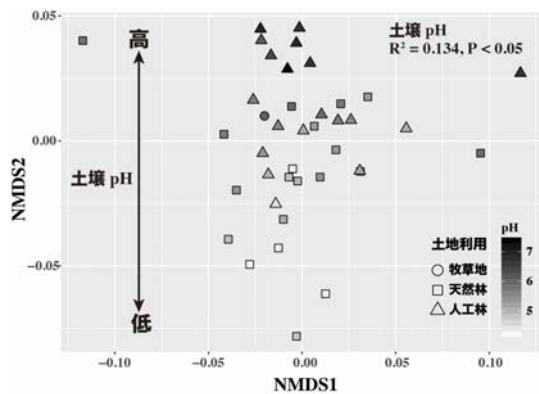


図 8. モジュールアバンダンスの NMDS による解析

Acidobacteria, *Actinobacteria*, *Firmicutes* 門の菌種によって構成されていた。一方、天然林は低 pH、人工林土壤は高 pH の傾向があり、各サンプルの菌叢組成も土壤 pH と相関し、NMDS による統計解析の結果からも支持された。各機能モジュールのアバンダンスによる NMDS 解析でも菌叢組成の場合と同様に、各モジュールアバンダンスのパターンは、土壤 pH との相関を支持し、低 pH は天然林土壤、高 pH は人工林土壤という傾向を示した(図 8)。

個別機能の一例としては、窒素循環を担う主な機能である硝化、脱窒、異化的硝酸還元などが pH と正の相関を示し(図 9)、ストレス耐性・環境応答に関わる二成分制御系の機能モジュールは、pH と有意な負の相関が見られることがわかった。また、脱窒を担う生物種組成には差が見られ、高 pH 土壤では α -*proteobacteria* の割合が低 pH 土壤と比べ 35%と高く、低 pH 土壤では見られない γ -*proteobacteria* が約 7%を占めてい

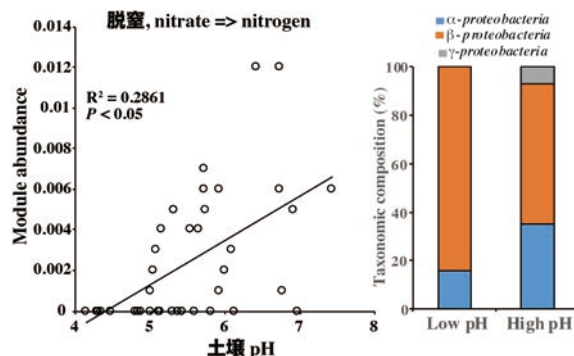


図 9. 土壤 pH と正の相関を示す脱窒とそれを担う生物種

(3) まとめ

微生物生態系のメタゲノム情報から農耕地・森林土壤の物質循環能の可視化を本研究課題の主目的として、熊本、東京、山形の各都県2ヶ所で3回ずつ採取された18サンプルの農耕地土壤、北海道から沖縄に至る人工林及び天然林の土壤サンプル各20、計40サンプルを研究代表者等が独自に開発した生理・代謝機能評価システムMAPLEを用いてメタゲノム解析を行った。

各サンプルからメタゲノム解析用DNAを抽出し生データの処理を行った後、得られた300万配列をMAPLEに供試した。これにより得られた766種

類のKEGGモジュールに対する充足率、アバンダンス、リボソームタンパク質に基づく菌叢組成等をもとにNMDSを用いて解析した。その結果、菌叢組成、アバンダンスとも水田と畑地が有意な検定値によって差別化された。また、水田はアンモニアと畑地は硝酸濃度と強い相関を示し、東京と熊本は水田、畑地を問わず菌叢、アバンスのパターンが極めて類似していることがわかった。

北海道から沖縄に至る人工林、天然林土壤の微生物生態系は、主に *Proteobacteria*、*Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Firmicutes* 門に属するバクテリアによって構成され、菌叢組成は土壤のpHと相関を示した。天然林は低pH、人工林土壤は高pHの傾向があり、NMDSによる統計解析の結果からも支持された。また、MAPLEで得られた各モジュールアバンダンスに基づくNMDS解析でも菌叢組成と同様に土壤pHとの相関が示され、低pHは天然林、高pHは人工林という傾向が支持された。個別機能の一例としては、窒素循環を担う主な機能の硝化、脱窒、異化的硝酸還元などがpHと正の相関を示し、ストレス耐性・環境応答に関わる二成分制御系の機能モジュールは、pHと有意な負の相関が見られることもわかった。これらの結果を踏まえ今後は、土地利用性と微生物生態系が有する機能的特徴との関係性を更に詳細に解析し、農耕地、森林土壤における物質循環能とその担い手について明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- Hideki Kobayashi, Takahiko Nagahama, Wataru Arai, Yohei Sasagawa, Mana Umeda, Tetsutaro Hayashi, Itoshi Nikaido, Hiromi Watanabe, Kazumasa Oguri, Hiroshi Kitazato, Kantaro Fujioka, Yukari Kido, and Hideto Takami (2018) Polysaccharide hydrolase of the hadal zone amphipods *Hirondellea gigas*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1-11. 査読あり. doi: 10.1080/09168451.2018.1459178
- Allyn H. Maeda, Shinro Nishi, Shun'ichi Ishii, Yasuhiro Shimane, Hideki Kobayashi, Junko Ichikawa, Kanako Kurosawa, Wataru Arai, Hideto Takami, and Yukari Ohta (2018) Complete Genome Sequence of *Altererythrobacter* sp. Strain B11, an Aromatic Monomer-Degrading Bacterium, Isolated from Deep-Sea Sediment under the Seabed off Kashima, Japan. *Genome Announ.* 6, e00200~18. 査読なし. doi: 10.1128/genomeA.00200-18
- 高見英人 (2017) 「メタ 16S 解析」から「機能メタゲノミクス」へ、生理・代謝機能ポテンシャル評価システム: MAPLE. 日本ゲノム微生物学会ニュースレター. 15, 3-8. 査読なし
- Ruben Zapata-Perez, Ana-Belen Martinez-Monino, Antonio-Gines, Garcia-Saura, Juana Cabanes, Hideto Takami, Alvaro Sanchez-Ferrer (2017) Biochemical characterization of a new nicotinamidase from an unclassified

- bacterium thriving in a geothermal water stream microbial mat community. *PLOS ONE* e0181561. 査読あり. doi:10.1371/journal.pone.0181561
- Masahito Hayatsu, Kanako Tago, Ikuo Uchiyama, Atsushi Toyoda, Yong Wang, Yumi Shimomura, Takashi Okubo, Futoshi Kurisu, Yuhei Hirono, Kunihiko Nonaka, Hiroko Akiyama, Takehiko Itoh, and Hideto Takami (2017) An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil. *ISME J.* 11, 1130-1141. 査読あり. doi:10.1038/ismej.2016.191
 - Hideto Takami, Atsushi Toyoda, Ikuo Uchiyama, Takehiko Itoh, Yoshihiro Takaki, Wataru Arai, Shinro Nishi, Mikihiro Kawai Kazuo Shinya and Haruo Ikeda (2017) Complete genome sequence and expression profile of the commercial lytic enzyme producer, *Lysobacter enzymogenes* M497-1. *DNA Res.* 24, 169-177 *DNA Res.* 23, 467-475. 査読あり. doi:10.1093/dnares/dsw055
 - Hideto Takami, Takeaki Taniguchi, Wataru Arai, Kazuhiro Takemoto, Yuki Moriya, and Susumu Goto (2016) An automated system for evaluation of the potential functionome: MAPLE version 2.1.0. *DNA Res.* 23, 467-475. 査読あり. doi:10.1093/dnares/dsw030

[学会発表] (計 9 件)

- 高見英人、田中彩、下野隆一、豊田敦、荒井涉、今大路治之、多田雄哉、桑原知己、機能メタゲノミクスで抗生剤投与が及ぼす乳児腸内細菌叢への影響を見る、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 17 日 (名城大学、愛知県・名古屋市)
- 今大路治之、田中彩、下野隆一、豊田敦、高見英人、桑原知己、抗菌薬投与前後における乳幼児腸内フローラの機能メタゲノム解析、第 12 回日本ゲノム微生物学会 年会、2018 年 3 月 6 日 (京都大学、京都府・京都市)
- 荒井涉、谷口 丈晃、五斗 進、守屋 勇樹、上原 英也、竹本 和広、緒方 博之、高見英人、利便性が向上した生理・代謝機能ポテンシャル評価システム -MAPLE2.3.0-、第 12 回日本ゲノム微生物学会 年会、2018 年 3 月 6 日 (京都大学、京都府・京都市)
- 高見英人、多田雄哉、荒井涉、鈴木翔太郎、浜崎恒二、メタゲノム解析で見る太平洋低緯度海域の表層微生物叢代謝、第 12 回日本ゲノム微生物学会 年会、2018 年 3 月 6 日 (京都大学、京都府・京都市)
- 藤村玲子、磯部一夫、豊田敦、竹本和広、荒井涉、妹尾啓史、高見英人、農耕地土壌における微生物代謝機能ポテンシャルの解析、環境微生物系学会合同学会 2017 年 8 月 28 日 (東北大学、宮城県・仙台市)
- Hideto Takami, Kazuhiro Takemoto, Wataru Arai, Yoshitoshi, Ogura, Tetsuya Hayashi, and Koji Hamasaki (2017) Functional metagenomics of low latitude areas of the Pacific Ocean. FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologist. 2017 年 7 月 11 日 (Spain・Valencia)
- 高見英人、機能からマイクロバイオームを見る、日本感染症学会、西日本、中日本合同学術集会(招待講演)、2017 年 10 月 28 日 (長崎ブリックホール、長崎県・長崎市)
- 高見英人、メタゲノミクスで環境の微生物機能を評価する、第 10 回大気バイオエアロゾルシンポジウム(招待講演)、2017 年 2 月 19 日 (金沢大学、石川県・金沢市)
- 荒井涉、谷口 丈晃、竹本和広、守屋 勇樹、五斗 進、高見英人、MAPLE 2.1 による生理・代謝機能ポテンシャルの比較ゲノム解析、第 10 回日本ゲノム微生物学会、2016 年 3 月 4 日 (東京工業大学、東京都・目黒区)

[図書] (計 1 件)

- 高見英人、荒井涉、羊土社、今すぐ始める！メタゲノム解析実験プロトコール 2017, 229 (215-225)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 英人(TAKAMI, Hideto)
国立研究開発法人・海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・上席研究員
研究者番号: 70359165

(2) 研究分担者

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

豊田 敦(TOYODA, Atsushi)
国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・特任教授
研究者番号: 10267495

竹本 和広(TAKEMOTO, Kazuhiro)
九州工業大学・情報工学研究院・准教授
研究者番号: 40512356

(3) 連携研究者

荒井 涉(ARAI, Wataru)
国立研究開発法人・海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・技術スタッフ
研究者番号: 50724910