

令和元年5月22日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00573

研究課題名(和文) 環境DNA法による土壌微生物動態評価から温暖化に伴う土壌有機炭素の変動要因を探る

研究課題名(英文) Response and feedback of soil microbiota to global warming revealed by metagenome analysis

研究代表者

近藤 俊明 (Kondo, Toshiaki)

広島大学・国際協力研究科・特任准教授

研究者番号：40391106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：温暖化操作実験のもと、微生物呼吸が長期に渡って測定されている西日本の森林において、遺伝解析を用いて土壌微生物動態を把握することで、温暖化に対して土壌微生物相がどのような応答を示し、結果として微生物呼吸がどう変動するのかといった、一連の微生物呼吸プロセスの解明を行った。その結果、温暖化環境下においても微生物呼吸量の減少をもたらすと考えられる土壌微生物種の消失や土壌微生物量の減少が生じないことなどが明らかとなり、森林生態系における土壌微生物相の高い温度耐性が、温暖化効果の長期維持(微生物呼吸量の増加)の要因になっていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林生態系が将来に渡ってCO₂吸収源として機能するのか、あるいは温暖化に伴って土壌有機物分解が促進し、更なる温暖化と微生物呼吸の増加が生じることで放出源へと転換するのかといった疑問に対する回答は、未だ憶測の域を出ていない。本研究では、温暖化操作実験下において土壌呼吸の連続測定が行われている西日本の森林において、最新の遺伝解析手法である「次世代シーケンサーを活用した環境DNA解析法」により、温暖化に伴う土壌微生物動態の変化を解明した。得られた知見はこれまでブラックボックスとされてきた「温暖化環境下における土壌微生物動態」の解明に寄与するもので、気候変動影響の将来予測に貢献するものと言える。

研究成果の概要(英文)：The carbon stored belowground is transferred to the atmosphere by microbial decomposition of soil organic carbon. This phenomenon is called as soil respiration, and the global soil respiration is estimated at 98GtC, which is about nine times as large as that released by annual fossil-fuel CO₂ emission. Because the amount of soil respiration increases with a rise in temperature due to accelerated microbial decomposition of soil organic carbon, global warming-induced increases in soil respiration represent an important positive feedback loop to climate change. However, the magnitude and timing of this feedback still remain unclear, because of the difficulty in measuring the response of diverse and huge soil microbiota to global warming. In this research, we measured the amount and species composition of soil microbiota in the soil warming experiment site in Hiroshima Prefecture by using the Next Generation Sequencing, and discussed the response of soil microbiota to global warming.

研究分野：分子生態学

キーワード：土壌呼吸 微生物呼吸 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

陸上生態系の土壌中には、大気中で二酸化炭素(CO₂)として存在している炭素の約2倍に相当する15,500億トンの炭素が、表層から僅か1メートルまでの範囲に有機物として蓄積している。植物の落葉・落枝・枯死根などに由来する、この膨大な量の土壌有機物は、土壌微生物による分解過程を経てCO₂として大気中に放出され(微生物呼吸)、植物根の呼吸(根呼吸)に伴う土壌からのCO₂の放出と併せて「土壌呼吸」と呼ばれている。

最近のNature誌における報告では、全陸域からの年間あたりの土壌呼吸量は約980億tCy-1にのぼり、そのうちの約70%にあたる696億tCy-1が微生物呼吸に由来すると推定されている(Bond-Lamberty & Thomson 2010)。これは化石燃料の使用など、人間活動に伴って放出されるCO₂量(78億tCy-1)の約9倍に相当するものである。そのため、気候変動に伴って土壌有機物の分解速度が僅かでも変動すれば、地球上の炭素収支は多大な影響を受け、更なる気候変動が生じる可能性があると考えられている。

実際、こうした微生物呼吸量と土壌温度との関係については、これまで多くの生態系で報告されており、気温の低い冬場に比べ、気温の高い夏場において微生物呼吸量が増え、土壌温度の上昇に伴って微生物呼吸速度が指数関数的に増加することが広く知られている(図1右)。こうした知見に基づくシミュレーション解析では、温暖化に伴う土壌からのCO₂放出量の増加によって、更なる温暖化と微生物呼吸量の増加が生じ(正のフィードバック効果)、結果として森林生態系の一部が21世紀の後半までにCO₂の吸収源から放出源に転換することが予想されている。

一方、野外環境下において、赤外線ヒーター等を使用して温暖化環境を人工的に創出し(図1左)、微生物呼吸量を測定した研究例では、非温暖化区に比べ、温暖化区において総微生物呼吸量の増加が見られるものの、温暖化区における微生物呼吸の温度反応曲線は非温暖化区に比べ緩やかとなることや(図1右)、その度合いが生態系ごとに異なることなどが明らかになりつつある(e.g. Karhu *et al.* 2014)。つまり、温暖化に伴う土壌からのCO₂放出量の増加は従来の予測よりも小さく、森林生態系が将来的に吸収源として機能するのか、あるいは放出源へと転換するのかは依然憶測の域を出ていない。

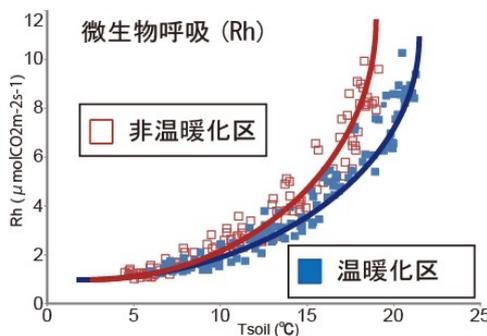


図1: 温暖化操作実験の様子(左)と結果(右)

左: 広島大学に設置された土壌呼吸測定サイト。H19年より温暖化操作を実施。

右: 温暖化が微生物呼吸量に及ぼす影響。

このように、微生物呼吸や地球規模の炭素収支に対する温暖化の影響予測が定まらない理由として、気候変動に対する土壌微生物動態の評価が困難なことが挙げられる。実際、温暖化操作実験下における微生物呼吸の緩速化は、温度の上昇に対する土壌微生物群集の応答、つまり温度馴化に起因することが多くの研究で指摘されているものの(Karhu *et al.* 2014)、1グラムあたり数億の微生物が存在すると考えられている土壌中において、従来の培養法を用いた微生物調査では、温度馴化の指標となる土壌微生物群集における種組成や量の変化を正確に評価することは困難である。

こうしたなか、近年の遺伝解析技術の進歩により、培養の過程を経ることなく、土壌サンプルから直接DNAを抽出し、その塩基配列情報をもとに未知の生物種の発見やその系統的位置づけが行われ始めており(メタゲノム解析)、資源生物探査等の分野において新たな知見が得られつつある。この方法は、単離に成功した生物種を直接観察することができる培養法に比べると、生物種個々の情報は少ないものの、これまで培養できなかった大多数の生物種の存在や量を評価できるだけでなく、DNA塩基配列情報を用いた系統解析に基づいて未知の生物種の生態的特性や動態を推定できるといった優れた利点を持つ。さらに近年開発が目覚ましい次世代シーケンサーを活用することで、土壌サンプルあたり数万~数十万の土壌微生物の同定・定量が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、西日本の代表的な植生であるアラカシが優占する混交広葉樹林において、気候変動に伴う温暖化の影響予測に係る以下の2つの研究を行った。

- 1) 10基の大型マルチ自動開閉チャンバー式土壌呼吸測定システムを用いて微生物呼吸を連続測定するとともに、5基を対象に赤外線ヒーターを使用して温暖化環境を人工的に創出することで、温暖化が微生物呼吸に及ぼす影響を把握する（図1参照）。
- 2) 次世代シーケンサーを活用した環境DNA解析法を用いて、温暖化区を含む10基のチャンバー内の土壌を対象に、①土壌微生物の種組成、②土壌微生物量、および③それらの季節変化、の3つを評価することで、土壌微生物動態に対する温暖化の影響を明らかにする。

得られた情報をもとに、土壌微生物動態と微生物呼吸量の関係を明らかにすることで、温暖化に対して土壌微生物相がどのような応答を示し、結果として微生物呼吸がどう変動するのかといった一連の微生物呼吸プロセスの解明を行った。

3. 研究の方法

本研究では、(国研) 国立環境研究所により、温暖化操作実験のもと、微生物呼吸が約10年に渡って測定されている西日本の代表的な植生であるアラカシが優占する混交広葉樹林（広島大学東広島キャンパス内）において、メタゲノム解析や定量PCRなど、最新の遺伝解析手法を用いて、①土壌微生物量、および②土壌微生物の種組成の変化など、土壌微生物動態を把握することで、温暖化に対して土壌微生物相がどのような応答を示し、結果として微生物呼吸がどう変動するのかといった、一連の微生物呼吸プロセスの解明を行った。

(1) 土壌サンプルの採集および土壌からの環境DNAの抽出

気温が最も上昇する2017年7月に、温暖化処理を施した5基のチャンバー及び非処理のチャンバー5基の、計10基のチャンバーから、土壌サンプラーを用いて遺伝解析に使用する土壌サンプル（直径1.5cm、深さ10cm程度）を採取した。土壌サンプルの採集は、チャンバー内の環境不均一性を考慮し、それぞれチャンバー内の4ヶ所から行い、採取した土壌サンプルは深さの異なる2つの層（上層0-3cm、下層3-7cm）に分割した。また、土壌微生物動態の季節変化を明らかにするため、同様のサンプリングを春期（2018年4月）、秋期（2017年10月）、冬期（2018年1月）にも行った。

採取した計320の土壌サンプル（5サイト×10チャンバー×4か所×2土壌層）を対象に、土壌微生物由来のDNAを抽出した。DNA抽出はQIAGEN社のDNeasy PowerLyzer PowerSoil Kitを用いて行い、サンプルあたり乾燥重量換算で0.25gの土壌を対象とした。なお、土壌微生物量および種組成を評価するための遺伝解析には、各チャンバーについて土壌層ごとに混合したDNAサンプル計80サンプルを使用した。

(2) リアルタイム定量PCR法を用いた土壌微生物量の測定

リアルタイム定量PCR法を用いて土壌微生物量（細菌）の測定を行った。リアルタイム定量PCR法は、2-4日の培養を必要とした従来の定量法に比べ、PCR増幅の過程を蛍光物質によりリアルタイムでモニタリングすることで、迅速かつ高精度に土壌微生物量を測定できる方法である。本サブテーマでは、菌種間での保存性が高く、染色体上に低コピー（1または2コピー）で存在するたんぱく質伸長因子 *Tu* (*Tuf*) 遺伝子を検出対象とした。なお、土壌微生物量（細菌）の測定には、気温が最も上昇する2017年7月の夏期に採取した20サンプルを使用し、正確性を期すため3度の反復実験を行った。

(3) 次世代シーケンシング法を用いた土壌微生物相評価

次世代シーケンシング法を用いて、春、夏、秋、冬の4期間に採取した全80サンプルについて土壌微生物相の評価を行った。16S rRNA(V3-V4領域)についてPCR増幅を行った後、AMPureXP (Beckman Coulter社製)を用いてPCR産物の精製を行った。精製したPCR産物に各サンプルに固有のindex配列を付与し、シーケンスライブラリーを作成した後、イルミナ社製のシーケンサー (MiSeq)を用いて塩基配列情報を取得した。得られた塩基配列情報をもとに、Blast検索により個々の微生物種の同定を行った。この際、塩基配列が97%以上一致するものについては同一種 (Operational Taxonomic Unit) とみなした。

4. 研究成果

土壌中の有機炭素は土壌微生物による分解過程を経て CO₂ として大気中に放出される。この現象は微生物呼吸と呼ばれ、人間活動に由来する CO₂ 放出量の約 7–10 倍に相当する。温暖化に伴う微生物呼吸量の増加は地球規模の炭素収支に多大な影響を及ぼすため、その評価は気候変動の将来予測において重要であるものの、僅かな土壌中に数億個体が存在する土壌微生物の動態（量、種組成および活性等）を、従来の培養法を用いて把握することは極めて困難であった。

本研究では、温暖化操作実験のもと、微生物呼吸が長期に渡って測定されている西日本の代表的な植生であるアラカシが優占する混交広葉樹林において、メタゲノム解析や定量 PCR 法などの最新の遺伝解析手法を用いて、①土壌微生物量、②土壌微生物の種組成、およびその季節変化など、土壌微生物動態を把握することで、温暖化に対して土壌微生物相がどのような応答を示し、結果として微生物呼吸がどう変動するのかといった、一連の微生物呼吸プロセスの解明を行った。

その結果、従来の報告とは異なり、①日本の森林生態系では、温暖化環境下においても微生物呼吸量の減少をもたらすと考えられる土壌微生物種の消失や土壌微生物量の減少が生じないこと、②一方で、土壌微生物種数や土壌微生物量に変化はないものの、温暖化に応じて多様な有機物の分解に関わる放線菌類の出現頻度が増加すること、また、③こうした傾向は季節に関係なく、年間を通して観測できること、などが明らかとなった。

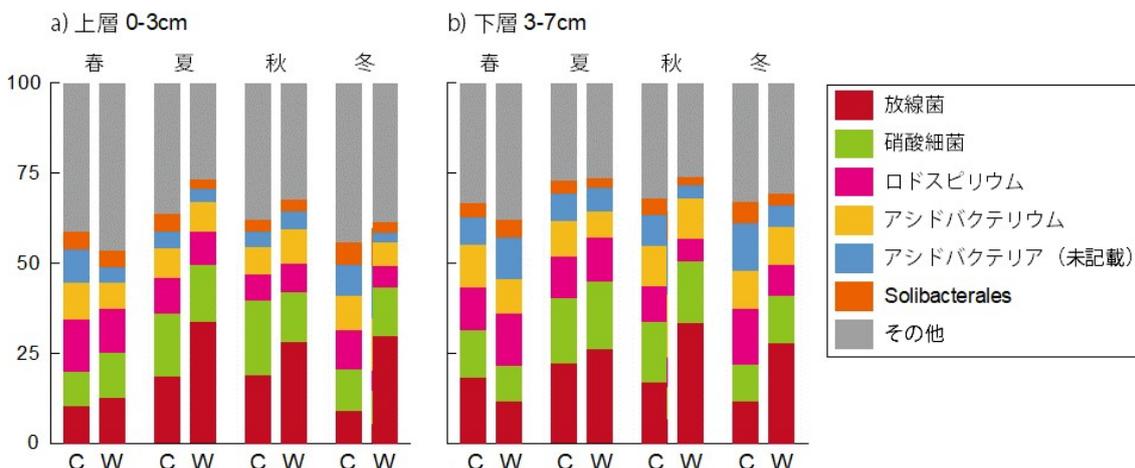


図 2：土壌微生物グループの出現頻度における温暖化区(W)・非温暖化区(C)の比較とその季節変化。a) 上層、b) 下層

つまり、こうした日本の森林生態系における土壌微生物相の高い温度耐性と、温暖化に応じた特定の土壌微生物グループの出現頻度の増加が、温暖化効果の長期維持（土壌呼吸量の増加）の要因になっていることなどが示唆された。森林生態系が将来に渡って CO₂ 吸収源として機能するのか、あるいは温暖化に伴って土壌有機物分解が促進し、更なる温暖化と微生物呼吸の増加が生じることで放出源へと転換するのか（正のフィードバック効果）といった疑問に対する回答は、未だ憶測の域を出ていないものの、本研究で得られたこれらの新たな知見は、これまでブラックボックスとされてきた「温暖化環境下における土壌微生物動態」の解明に寄与するもので、気候変動影響の将来予測に貢献するものと言える。

<引用文献>

- ① Bond-Lamberty & Thomson. 2010. Temperature-associated increases in the global soil respiration record. *Nature* 464: 579–582.
- ② Karhu et al. 2014. Temperature sensitivity of soil respiration rates enhanced by microbial community response. *Nature* 513: 81–84.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 18 件）

- ① 近藤俊明・寺本宗正・高木健太郎・小嵐 淳・安藤麻里子・高木正博・石田祐宣・梁 乃申. 2019. 遺伝解析による土壌微生物評価から温暖化に伴う土壌呼吸量の変動要因を探る. 第 130 回日本森林学会大会 企画シンポジウム.
- ② 安藤 麻里子・小嵐 淳・高木健太郎・近藤俊明・寺本宗正・永野博彦・國分陽子・高木正博・石田祐宣・梁 乃申. 2019. 炭素・窒素同位体比で探る森林土壌有機物の蓄積状況. 第 130 回日本森林学会大会 企画シンポジウム.
- ③ 小嵐 淳・安藤麻里子・高木健太郎・近藤俊明・寺本宗正・永野博彦・國分陽子・高木正博・石田祐宣・平館俊太郎・梁 乃申. 2019. 温暖化は土壌に貯留する有機炭素にどのような変化をもたらすか? 第 130 回日本森林学会大会 企画シンポジウム.
- ④ 高木健太郎・梁 乃申・Aguilos MS・Kira RM・寺本宗正・小林 真・孫 力飛・近藤俊明・小嵐 淳・安藤麻里子. 2019. 10 年間の地温上昇処理が道北の植林泥炭地の微生物呼吸量に与える影響. 第 130 回日本森林学会大会 企画シンポジウム.
- ⑤ 永野博彦・安藤麻里子・福島慶太郎・中山理智・堅田元喜・山口高志・渡辺 誠・近藤俊明・館野隆之輔・小嵐 淳. 2019. 落葉広葉樹林における窒素沈着量と土壌微生物特性の関係. 第 130 回日本森林学会大会.
- ⑥ Kondo T, Teramoto M, Nakane K, Takagi K, Koarashi J, Andoh M, Takagi M, Ishida S & Liang N. 2018. Response of soil microbial community to climate change. ILTER Annual Coordinating Committee Meeting 2018.
- ⑦ Teramoto M, Kondo T, Liang N, Zeng J, Nakane K, Koarashi J & Andoh M. 2018. Long-term warming effect on heterotrophic respiration in a warm-temperate evergreen broad-leaved forest in western Japan. ILTER Annual Coordinating Committee Meeting 2018.
- ⑧ Liang N, Chiang PN, Wang Y, Teramoto M, Takagi K, Kondo T, Koarashi J, Zhang Y, Li S, Fang J, Piao S, Lai DYF, Takagi M, Ishida S, Hirano T, Zeng J, Takahashi Y, Andoh M & Harun I. 2018. Long-term Monitoring Soil Carbon Dynamics of Asian Terrestrial Ecosystem by An Automated Chamber Network. ILTER Annual Coordinating Committee Meeting 2018.
- ⑨ Takagi K, Liang N, Aguilos MM, Kira RM, Teramoto M, Kobayashi M, Son R, Kondo T, Koarashi J & Andoh M. 2018. Warming-induced enhancement of soil heterotrophic respiration is linearly increased by the current year's litterfall supply in a cool-temperate forested peatland. ILTER Annual Coordinating Committee Meeting 2018.
- ⑩ Andoh M, Koarashi J, Liang N, Teramoto M, Kondo T & Takagi K. 2018. Estimating the carbon source in soil respiration and the effects of warming using radiocarbon signatures. ILTER Annual Coordinating Committee Meeting 2018.
- ⑪ Kondo T, Teramoto M, Nakane K, Takagi K, Takagi M, Ishida S & Liang N. 2018. Response and feedback of soil microbiota to global warming. The 8th EAFES International Congress.
- ⑫ Kondo T, Takagi K & Koarashi J. 2018. Soil Respiration in Asian Forests under Climate Change. The 8th EAFES International Congress.
- ⑬ Liang N, Teramoto M, Takagi K, Kondo T, Zhang Y, He J, Wang Y, Li S, Fang J, Piao S, Lai Y, Takagi M, Ishida S, Chiang P, Zeng J & Harun I. 2018. An Automated Chamber Network for Estimation of CO₂/CH₄ Sink/Source of Asian Terrestrial Ecosystems. The 8th EAFES International Congress.
- ⑭ Teramoto M, Liang N, Takagi K, Kondo T, Takagi M, Ishida S, Zhang Y, Lai DYF, Zeng J & Nakane K. 2018. Sustained stimulatory warming effect on soil organic carbon decomposition in Asian monsoon forests: long-term empirical validation using chamber network. The 8th EAFES International Congress.
- ⑮ Teramoto M, Kondo T, Liang N, Zeng J, Nakane K, Koarashi J & Andoh M. 2018. Feedback of soil organic carbon decomposition to artificial soil warming. OzFlux-AsiaFlux joint conference.
- ⑯ Teramoto M, Liang N, Kondo T, Zeng J & Nakane K. 2018. The influence of long-term soil warming on heterotrophic respiration in an evergreen broad-leaved forest in Hiroshima. JpGU2018.

- ⑰ 梁 乃申・寺本宗正・高木健太郎・平野高司・石田祐宣・高木正博・近藤俊明. 2018. チャンバーネットワークを用いた地球規模の温暖化影響の解明. Japanflux10 周年記念集会.
- ⑱ 寺本宗正・梁 乃申・近藤俊明・曾 継業・中根周歩. 2018. 東広島アラカシ林における微生物呼吸に対する長期的な温暖化の影響. 第 129 回日本森林学会大会.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：梁 乃申

ローマ字氏名：LIANG Naisen

所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所

部局名：地球環境研究センター

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：50391173

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：寺本 宗正

ローマ字氏名：TERAMOTO Munemasa

所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所

部局名：地球環境研究センター

職名：特別研究員

研究者番号 (8 桁)：10761041

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。