

令和元年6月9日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18665

研究課題名(和文) 土壌の移植メタゲノム：土壌ノトバイオロジー

研究課題名(英文) Soil gnotobiology: Microbial transplantation between soils

研究代表者

加藤 広海 (Kato, Hiromi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90727265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では土質の異なる2種類の土壌(褐色森林土と黒ボク土)において微生物移植実験を行なうことで、菌叢形成プロセスへの物理化学的/生物学的因子を定量的に評価することを目的とした。移植した微生物集団に関わらず、定着した細菌叢は黒ボク土含有率が高いほど、(1)生菌数が高くなる、(2)放線菌群の占める割合が高くなる、などの傾向が観察され、細菌叢形成における物理化学的因子の強い影響が示された。また菌叢形成における初期優占細菌には、他細菌への生育促進効果を有する細菌株が存在することから、これら初期優占細菌が後の菌叢形成過程にとって重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌微生物叢が示す安定性は、土壌改良やバイオオーギュメンテーション等、人間が望んだ菌叢へと変化させる技術に対しては大きな障壁となっている。人間社会において土壌機能を有効かつ持続的に活用するためには、土壌微生物叢が土壌の物理化学的性質とどのような因果関係にあるか、微生物叢の構造を任意に変化させるために必要な要素は何なのか、を解明する必要がある。本研究で得られた成果は、これら問題に対して基盤となる情報を提供するとともに、将来的に土壌菌叢誘導技術への応用にも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed microbial transplantation between the two different types of soil (brown forest soil and andisol) to evaluate effect of physicochemical and microbial factors on microbial community formation in the soils. We showed that higher mixing ratio of andisol resulted in high levels of viable cells and actinomycetes regardless of the parental communities, implying the dominating effect of physicochemical factors on microbial colonization in the soils. Furthermore, we found that dominant bacteria in the initial step of the colonization exhibited the promoting ability of other bacterial growth, implying sequential growth networks among bacteria during the microbial colonization in the soils.

研究分野：環境微生物学

キーワード：土壌 細菌叢形成 微生物移植 褐色森林土 黒ボク土 移動性細菌 難培養性細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌微生物生態系は、動植物遺体を二酸化炭素まで分解し大気へ放出することで地球規模の物質循環を駆動するとともに、農業生産や環境浄化などの土壌機能の根幹を成している。また土壌に棲息する莫大な種類の微生物間において形成される複雑な代謝ネットワークによって、様々な環境変動に対しても安定して機能を発揮することができるかと理解されている。また一方で土壌微生物叢が示す安定性は、土壌改良やバイオオーギュメンテーション等、人間が望んだ菌叢へと変化させる技術に対しては大きな障壁となっている。人間社会において土壌機能を有効的かつ持続的に活用するためには、土壌微生物叢が土壌の物理化学的性質とどのような因果関係にあるか、微生物叢の構造を任意に変化させるために必要な要素は何なのか、を解明する必要がある。土壌微生物叢の安定性の問題をシステムティックに追求するためには、自然界そのものの土壌サンプル自体では扱いづらいため、ノトバイオロジー技術(無菌生物に特定の腸内菌叢を移植して、その生物の健康をモニタリングする研究手法)を用いたアプローチが期待されている。申請者らはこれまでにノトバイオロジー技術の畑土壌への応用を検討してきた結果、(1)物理的・化学成分的に変性の少ない完全滅菌土壌の作製、(2)数千種に及ぶ細菌種によって構成される土壌細菌叢を実験室培養条件下で再構築、(3)反復サンプルにおける高い再現性、を成功させた。これにより、土壌においてもノトバイオロジー技術が十分に可能であることを示した。

2. 研究の目的

本研究では、土壌ノトバイオロジー技術のさらなる応用を目指して以下の研究を実施する。本技術を他土壌に適用することで、畑土壌で見られた極めて決定論的である菌叢形成プロセスが土質の異なる他土壌でも観察されるのかを明らかにする。また土質の異なる2種類の土壌の物理化学的/生物学的因子を段階的に混合した系において移植実験を行なうことで、菌叢形成プロセスへの両因子を定量的に評価する。得られた環境因子と菌叢変動の関係性を用いて、特定の因子を変えて土壌の菌叢変動を特定の方向へ誘導できるかを検証する。

3. 研究の方法

土質の異なる二つの土壌間における微生物移植実験

本研究では、これまで用いてきた褐色森林土(愛媛県)に加えて、土質の異なる黒ボク土(東京都)を用いて実験を行なった。ともに国内では代表的な畑土壌であるが、黒ボク土は腐植質を含めた全炭素量やリン酸吸収係数、保水力(最大容水量)が高く、シルト質の多い粒径分布を示す点で、褐色森林土とは物理化学的性質が大きく異なっている。それぞれの土壌懸濁液から微生物細胞集団を回収した。またそれぞれの土壌から滅菌土壌を調製し、10%ずつ段階的な割合で混ぜた混合土壌環境を調製した。50gの各土壌もしくは各混合土壌が入ったガラス容器に、褐色森林土または黒ボク土から回収された微生物細胞集団を接種し、含水率が最大容水量の60%になるように調整したのち、コントロールされた一定培養条件下(25℃、暗所、日照無し)で半年間培養した。経時的に各ガラス容器から土壌サンプルを回収し、一部は生菌数等の培養依存的解析に用いて、一部はビーズ破砕によるメタゲノムDNA抽出を行い、16S rRNA amplicon解析等の培養非依存的解析に供した。得られたデータより、各土壌サンプルにおける菌叢構造の時間変動パターンを調べた。

菌叢形成に影響を及ぼす細菌株の分離

上記研究において、菌叢形成に大きな影響を及ぼす細菌群が推定された。そこで、それら細菌群の分離・培養を試みた。分離した株に関しては、16S rRNA 遺伝子解析による系統解析を行い、各種の細菌学的性状試験ならびに炭素資化性試験を実施した。また上記の滅菌土壌における単独培養、ならびに他の細菌株との共培養を行うことで、土壌生残性に与える影響を評価した。

4. 研究成果

土質の異なる二つの土壌間における微生物移植実験

褐色森林土と黒ボク土を10%ずつ段階的に混合することで、両土壌を連続的に繋ぐ人工土壌を創出した。それぞれの滅菌混合土壌に褐色森林土または黒ボク土から回収した微生物集団を移植した。移植後の生菌数を測定した結果、移植後1週間で千倍程度増殖した後、少なくとも半年間は特別な有機物添加無しでも10の8乗(CFU/g)を超える高い菌密度を維持できることがわかった。このような移植細菌叢の良好な定着性は、褐色森林土や黒ボク土、および全ての混合土壌で観察された。しかし一方で、黒ボク土の含有率が高い混合土壌ほど、(1)生菌数が高くなる、(2)放線菌群の占める割合が高くなる、などの傾向が観察された。これらの傾向は、両土壌の微生物集団のどちらを移植した際にも同様に観察された。このことは、細菌叢形成における菌密度や構造に対して生物的因子よりも物理化学的因子の方がより強い影響を与えることを示している。また黒ボク土の割合が高い土壌では、移植された微生物集団は長期間経過しても元の細菌叢構造を再構成できないことが明らかとなり、黒ボク土特有の細菌叢の復元には何らかの要素が必要であることが示された。一方で、元の細菌叢を属レベルで再構成できる褐色森林土では、swarmingやglidingといった移動性の高い分類群が移植後に優占したことから、これら菌群の増殖が後の細菌叢形成に重要である可能性が示された。

菌叢形成に影響を及ぼす細菌株の分離

上記の結果より、移動性細菌がその後の細菌叢形成、特に土壤環境特有の難培養性細菌の増加を促している可能性が疑われた。そこで swarming 活性のある細菌株の分離を試みた結果、*Bacilli* 綱の細菌株において、周囲の非移動性細菌を自身の swarming に同調させて移動できる co-swarming 活性が認められた。さらに様々な細菌株と滅菌土壌において共培養を行なった結果、これら swarming 細菌は相手株の土壌における生育を促進する効果があることが認められた。土壤環境は液体環境に比べて拡散性が低いことから、このような固体表面における移動性が高い細菌群との共生関係が菌叢形成に重要であると考えられた。

また褐色森林土における菌叢形成時の初期優占属である *Burkholderia* の細胞由来成分を用いて、難培養性細菌の分離・培養を試みた。その結果、土壤の難培養性細菌として知られる *Verrucomicrobia* 門細菌株の分離に成功した。本株の 16S rRNA 配列解析により、既知の培養株に高い相同性を示さないことから、これまでに培養されたことのない新属グループであることが明らかとなった。興味深いことに、本株は移植後中期に土壌で最も優占したグループと近縁であるにも関わらず、滅菌土壌では単独培養できないことがわかった。本株は *Burkholderia* 属細菌株との共培養によって土壌でも増殖できることから、何らかの共存メカニズムが存在すると思われる。今後の本共在メカニズムが明らかにできれば、土壤細菌叢のネットワークの一端を明らかにできると期待できる。

本研究の総括として、(1) 土壤細菌叢形成においては生物的因子よりも物理化学的因子の方がより強い影響を与えた、(2) 物理化学的因子の影響は一部線型性が認められた、(3) 土壤の種類によっては移植された菌叢が元の土壤菌叢構造を再現できなかった、(4) swarming 細菌をはじめとする初期優占細菌が、その後の難培養性細菌を含めた細菌叢形成に重要な役割を持つ可能性がある、などが明らかになった。これらの結果は、細菌群間の逐次的増殖関係性 (Sequential growth network: SGN) が細菌叢形成において重要であることを示唆しており、将来的に SGN を利用した特定細菌叢への誘導技術が期待できる。上記の示した通り、今回の科学研究費の受領によって本研究を大きく発展させることができた。ここに記して心からの感謝の意を表したい。また本研究に携わった関係者にも謝辞を表したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件 査読あり 6 件)

査読有り

1. Ogawa N, Kato H, Kishida K, Ichihashi E, Ishige T, Yoshikawa H, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M. Suppression of substrate inhibition in phenanthrene-degrading *Mycobacterium* by co-cultivation with a non-degrading *Burkholderia* strain. *Microbiology* 165:625–637 (2019)
2. Kishida K, Ogawa N, Ichihashi E, Kato H, Nagata Y, Ohtsubo Y, Tsuda M. Establishment of plasmid vector and allelic exchange mutagenesis systems in a mycobacterial strain that is able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbon. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 82:1169-1171 (2018)
3. Ogawa T, Hattori S, Kamezaki K, Kato H, Yoshida N, Katayama Y. Isotopic Fractionation of Sulfur in Carbonyl Sulfide by Carbonyl Sulfide Hydrolase of *Thiobacillus thioparus* THI115. *Microbes and Environments* 32:367-375 (2017)
4. Tabata M, Ohhata S, Nikawadori Y, Kishida K, Sato T, Kawasumi T, Kato H, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y. Comparison of the complete genome sequences of four γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Research* 23:581-599 (2016)
5. Ogawa T, Kato H, Higashide M, Nishimiya M, Katayama Y. Degradation of carbonyl sulfide by Actinomycetes and detection of clade D of beta-class carbonic anhydrase. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS* 363:fnw223 (2016)
6. Ohtsubo Y, Nonoyama S, Ogawa N, Kato H, Nagata Y, Tsuda M. Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp. EPa45. *Journal of Biotechnology* 228:67-68 (2016)

査読無し

7. 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝, 永田裕二. 汚染物質分解コンソーシアムにおけるキープレイヤーとオーディエンス. *環境バイオテクノロジー学会誌* 1:15-20 (2018)
8. 加藤広海. 土壤細菌叢のノトバイオロジー. *アグリバイオ* 2:107-109 (2018)
9. 加藤広海, 津田雅孝. 土壤細菌叢の化学的攪乱に対するロバスト性. *化学と生物 今日の話* 55:446-447 (2017)
10. 加藤広海, 津田雅孝. 土壤細菌叢メタゲノムの時間的変動. *生体の科学* 68:160-164 (2017)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 加藤広海, 津田雅孝, 永田裕二. 異なる土壤間における微生物集団の移植実験. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年 3 月 24-27 日 (東京都世田谷区).
2. 高橋紳八, 加藤広海, 永田裕二, 大塚重人, 大坪嘉行, 津田雅孝. 難培養性細菌の培養における細胞外多糖の重要性. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年 3 月 24-27 日 (東京都

- 世田谷区)。
3. 蘇立俊、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 人工汚染化土壌からの有機塩素殺虫剤分解酵素遺伝子取得の試み. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年 3 月 24-27 日 (東京都世田谷区)。
 4. 羽賀千晃、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 細菌間の接近と拡散が有機塩素系殺虫剤の分解コミュニティに与える影響. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年 3 月 24-27 日 (東京都世田谷区)。
 5. 酒井洋範、稲葉慎之介、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. アルコールデヒドロゲナーゼ AdhX 遺伝子依存的貧栄養環境適応機構の普遍性. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年 3 月 24-27 日 (東京都世田谷区)。
 6. 市橋永吉、小川なつみ、加藤広海、岸田康平、野々山翔太、永田裕二、大坪嘉行、津田雅孝. *Mycobacterium* sp. EPa45 株におけるフェナントレン分解関連遺伝子群の転写解析. 第 13 回日本ゲノム微生物学会年会. 2019 年 3 月 6-8 日 (東京都八王子市)。
 7. 堀川慧太、池内倫子、小川なつみ、加藤広海、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝. フェナントレン分解細菌 *Mycobacterium* sp. EPa45 株の生育阻害因子の解析. 第 13 回日本ゲノム微生物学会年会. 2019 年 3 月 6-8 日 (東京都八王子市)。
 8. 羽賀千晃、加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 有機塩素系農薬の分解細菌コミュニティを構成する細菌間の関係性. 第 36 回農薬環境科学研究会. 2018 年 11 月 8-9 日 (山梨県甲府市)。
 9. 加藤広海、森宙史、黒川顕、津田雅孝、永田裕二. 土壌細菌叢の形成プロセスにおける再現性. 日本微生物生態学会第 32 回大会. 2018 年 7 月 12-13 日 (沖縄県那覇市)。
 10. Su L, Kato H, Ohtsubo Y, Tsuda M, Nagata Y. Construction of Efficient Organochlorine Pesticide Degraders by Using an Artificial Gene Cluster. 微生物生態学会第 32 回大会. 2018 年 7 月 12-13 日 (沖縄県那覇市)。
 11. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 環境汚染物質の分解細菌コミュニティにおける非分解菌コロニーの分解菌コロニーへの接近現象. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年 3 月 15-18 日 (愛知県名古屋市)。
 12. 高橋紳八、加藤広海、永田裕二、大塚重人、大坪嘉行、津田雅孝. 土壌由来難培養性細菌の単離及び易培養性細菌との共存関係. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年 3 月 15-18 日 (愛知県名古屋市)。
 13. 加藤広海. 土壌細菌叢メタゲノムの時間的変動と細菌間相互作用 (招待講演). 第 61 回日本放線菌学会学術講演会. 2017 年 11 月 16 日 (東京都品川区)。
 14. 加藤広海、小川なつみ、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝. 利用する：汚染物質分解コンソーシアムにおける非分解菌の役割 (招待講演). 環境微生物系学会合同大会. 2017 年 8 月 31 日 (宮城県仙台市)。
 15. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 難分解性有機塩素系殺虫剤の分解細菌コミュニティにおける非分解菌の役割. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 3 月 17-20 日 (京都府京都市)。
 16. 加藤広海、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二. 有機塩素系殺虫剤 γ -hexachlorocyclohexane 分解コミュニティのメタゲノム解析. 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会. 2017 年 3 月 2-4 日 (神奈川県藤沢市)。
 17. Kato H, Tsuda M. Robustness of soil microbiome against chemical disturbance (招待講演). The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology. 2016 年 9 月 30 日-10 月 2 日 (Taiwan)。
 18. 加藤広海、渡来直生、森宙史、大坪嘉行、永田裕二、黒川顕、津田雅孝. 再構築された土壌微生物群集の超長期培養 (招待講演). 日本微生物生態学会 第 31 回大会. 2016 年 10 月 22-25 日 (神奈川県横須賀市)

〔図書〕(計 2 件)

1. Nagata Y, Kato H, Ohtsubo Y, Tsuda M. Chapter 9: Mobile Genetic Elements Involved Evolution of Bacteria that Degrade Recalcitrant Xenobiotic Compounds, p 215-244. in Nishida H, Oshima T (ed), DNA Traffic in the Environment. Springer (2019)
2. 加藤広海、津田雅孝、他. NGS アプリケーション メタゲノム解析実験プロトコール(担当: 共著, 範囲: 第 2 章 14 (土壌細菌叢のメタ 16S・ショットガンメタゲノム解析) 107 頁-114 頁), 羊土社 (2016)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名：加藤 広海

ローマ字氏名：Hiromi Kato

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院生命科学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：90727265

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。