

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19870

研究課題名（和文）マイクロバイオームに基づく森林環境の評価手法の開発

研究課題名（英文）Development of assessment methods for forest environments based on microbiomes

研究代表者

山田 利博（Yamada, Toshihiro）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：30332571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロバイオーム分析に基づく森林環境の評価手法については、心材腐朽病害木のマイクロバイオームを特徴づけるバイオマーカーが得られ、さらに共起ネットワーク解析により腐朽病害木周辺土壌において健全木周辺土壌とは異なる群集構造を示すことが明らかになり、土壌中の腐朽菌の共出現の程度が環境の健全性の指標になり得ることが示された。

また、リアルタイムシーケンスを用いた樹木病害の現地診断手法を検討し制限要因を抽出した結果、実用化には対象サンプルに応じて条件分岐したプロトコルの作成が必要になることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロバイオーム分析に基づいて森林の樹木腐朽被害を評価することが可能であり、リアルタイムシーケンス解析を用いることで迅速な評価を行うことができることが示された。このことは、樹木腐朽のように外部表徴から判別できない環境変化に対しても、リアルタイムなマイクロバイオーム分析が環境評価の実用的なアプローチになり得ることを示唆している。

こうした手法で樹病や森林攪乱と関連する微生物叢の特徴を解明することで、樹木保護の実務を進展させ、マイクロバイオームに基づいた全く新しい環境評価手法の開発に資するだけでなく、基礎科学として、環境微生物学への有意なフィードバックが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Regarding forest environment evaluation methods based on microbiome analysis, biomarkers that characterize the microbiome of heartwood rot diseased trees were obtained, and co-occurrence network analysis revealed that the community structure in the soil around diseased trees was different from that in the soil around healthy trees. These results are indicating that the degree of co-emergence of decay fungi in soil can be an indicator of environmental health.

In addition, as a result of examining a field diagnosis method for tree diseases using real-time sequences and extracting limiting factors, it was shown that it is necessary to create a protocol with conditional branching according to the target sample for practical use.

研究分野：樹木医学

キーワード：樹木 健全性 森林環境 ナノポアシーケンサー マイクロバイオーム

1. 研究開始当初の背景

近年、森林や緑地の有する防災や水源涵養の機能をグリーンインフラとして活用し、社会資本の一環として整備することが、国土強靱化の国家戦略として提言されている。特に樹木の健全性を評価し、枯死衰弱木を適切に管理することは、グリーンインフラ整備において最も重要なプロセスであり、その技術開発に対しては大きな社会的な要請がある。

樹木は生木であっても樹幹内に菌類が侵入し、徐々に腐朽が進行して衰退や倒木に至る。そのため、森林や緑地の健全性を維持するには、腐朽を伴う樹木病害を初期段階で診断し、早期に原因菌類の同定や感染経路の特定を行うことが重要である。しかし、原因菌類や感染経路の特定には分離した菌類の同定が必要であり、従来の手法では難しいことが多かった。

そこで、これまでとは全く異なるアプローチで森林や緑地の健全性を評価し、樹木病害の原因菌類や感染経路の特定に貢献する技術の開発が求められている。近年、医学分野では、人体に成立する微生物集団がマイクロバイーム(微生物叢)としてのまとまりをなして、ヒトの細胞と相互作用をしながら、身体の生理機能をコントロールしていると考えられる「ヒトマイクロバイーム」の概念が提唱された。このアプローチでは、人体のあらゆる部位の微生物叢を網羅的に解析し、病徴との関連を調べることで、微生物叢から身体の健全性を評価する。現在このアプローチを森林環境の評価に応用することの可能性が提案されており、環境評価手法として有望であると考えられる。

樹木に腐朽病害が発生する際には、環境中の微生物叢にも変化が起きていると考えられる。腐朽を引き起こす病原菌は土壌・枯死木・リターで増殖しており、大気を介した胞子の付着や土壌を介した菌糸の貫入などによって生木に感染する(図1)。腐朽が進展した生木はやがて枯死し、枯死木が新たな病原菌のソースになる。そこで、対象木だけでなく、周囲の土壌・枯死木・リター・大気などのハビタットで「森林マイクロバイーム」の網羅解析を行うことで、腐朽病害の発生と関連した微生物叢の変化を捉えることができると期待される。

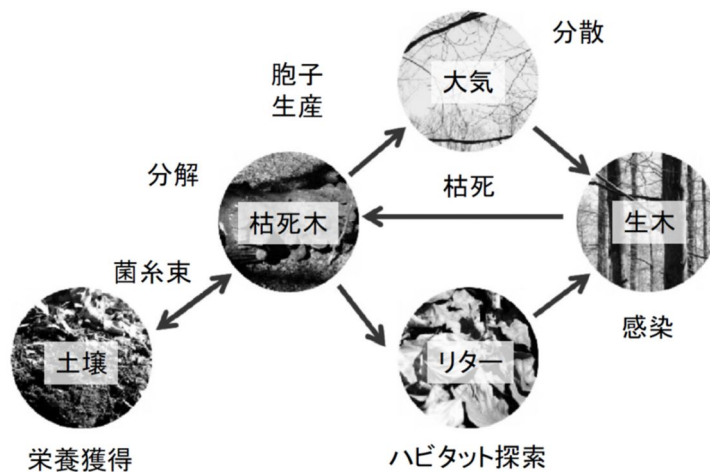


図1. 樹木病原菌を介した森林ハビタット間の微生物叢のつながり

また、近年のDNAシーケンス解析には著しい進展があり、樹木の腐朽病害の検出においても有効である。しかし、実験設備とコストのため、樹木保護の現場には普及しなかった。それに対して、タンパク質細孔(ナノポア)をDNA鎖が通過する際の電位差を計測して配列を決定するという従来と異なる原理のシーケンス解析が2016年に実用化された。このナノポアシーケンサーは極めて小型で、コストも100分の1以下になっており、野外でリアルタイムシーケンス解析を行うことが可能になりつつある。

2. 研究の目的

本研究では、健全な森林と病害の発生した森林でマイクロバイームの比較解析を行い、病害と関連した微生物叢の特徴を明らかにして、マイクロバイーム分析に基づく森林環境の評価手法を開発する。また、リアルタイムシーケンス解析によるマイクロバイーム分析を確立することで、環境評価手法の転換を図る。

3. 研究の方法

(1) マイクロバイーム分析に基づく森林環境の評価手法の開発

まず、森林において物理的手法による腐朽診断を行った。林業木のサワラを対象として、東京大学秩父演習林で野外調査を行い、外部の病徴や打撃音樹内腐朽簡易診断装置(ワールド測量設計社)を用いて、腐朽度の診断を実施した。そして、物理的手法による腐朽診断と対応させ、アンプリコンシーケンス解析による樹木圏の微生物叢解析を行った。健全木と腐朽病害木を比較

対照し、対象木の材と周囲の樹皮・落枝・落葉・根・土壌からサンプルを採取した。サンプルから抽出したゲノム DNA を鋳型として、MiSeq (Illumina 社) により、真菌 rDNA 遺伝子 ITS2 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析を行い、UNITE データベースの相同性 97% の基準で真菌の分類群を決定した。そして、菌類組成から腐朽病害と関連のあるマイクロバイオームの特徴を統計学的に抽出した。

(2) リアルタイムシーケンス解析によるマイクロバイオーム分析手法の開発

まず、リアルタイムシーケンスによる樹木圏の微生物叢解析を行った。同じ方法でサンプリングを実施し、サンプルから簡易抽出したゲノム DNA にトランスポザーゼとアダプター配列の混合溶液を添加し、断片化した部位にアダプター配列を付加した。そして、ナノポアシーケンサー MinION (ONT 社) を用いたシーケンス解析を行い、MEGAN によるホモロジーサーチを用いて真菌類の分類群を決定した。そして、菌類組成から、MiSeq によるマイクロバイオーム分析の再現性を評価した。最後に、一連のリアルタイムシーケンス解析のプロセスに基づいて、微生物叢に基づく森林の健全性評価のプロトコル作成を行った。現地でのサンプル採取・シーケンスライブラリー調整・マイクロバイオーム分析に関するバイオインフォマティクス解析の手順をまとめ、出現した腐朽菌の分類群や優占度に基づいて、微生物叢から樹木腐朽の診断を行う統計学的アプローチを検討した。

4. 研究成果

(1) マイクロバイオーム分析に基づく森林環境の評価手法の開発

腐朽病害と関連するマイクロバイオームの解析結果に基づいて、腐朽診断の基準となる量的な指標の検討に取り組んだ。サワラ人工林において実施した打撃音簡易診断装置による心材の腐朽診断に基づいて、健全木 3 本と腐朽病害木 3 本を比較対照し、アンプリコンシーケンス解析によって対象木の周囲の土壌・細根・樹皮・落葉・落枝の真菌群集を解析した。得られたマイクロバイオームについて、機械学習により群集組成を特徴づける分類群を抽出した結果、健全木と腐朽病害木間のマイクロバイオームを特徴づけるバイオマーカーとして、ナミダタケ *Serpula* 属が抽出された。さらに、マイクロバイオームの共起ネットワーク解析を行った結果、腐朽病害木の周辺土壌において、ナミダタケ属といくつかの腐生菌が共出現し、健全木の周辺土壌とは異なる群集構造を示すことが明らかになった。一連の解析から、土壌中の腐朽菌の共出現の程度が環境の健全性の指標になり得ることが示された。

(2) リアルタイムシーケンス解析によるマイクロバイオーム分析手法の開発

MinION によるリアルタイムシーケンスを用いた、微生物叢から樹木腐朽の診断を行うアプローチの実用化の検討に取り組んだ。MinION によるリアルタイムシーケンスと解析パイプラインの構築を行い、従来のアンプリコンシーケンス解析と比較した。その結果、MinION によっても従来手法と整合性のある菌類群集組成が得られることを確認した。そして、MinION によるリアルタイムシーケンスを用い、森林マイクロバイオームから樹木腐朽の診断を行うアプローチの実用化に向けたワークフローを検討した。サンプル採取、ゲノム DNA 抽出、シーケンスライブラリー調整、バイオインフォマティクス解析の 4 つのステップを現地で実施するプロトコルを作成し、リアルタイムシーケンス解析を行った結果、抽出したゲノム DNA の精製度が、ワークフローの簡略化と現地での適用可能性の制限要因になることが明らかになった。土壌のように粗抽出 DNA の精製度が低いサンプルは、再精製を行う必要があった。これらの結果から、リアルタイムシーケンスを用いた樹木病害の現地診断の実用化には、対象サンプルに応じた条件分岐したプロトコルの作成が必要になることが示された。

以上の結果から、マイクロバイオーム分析に基づいて森林の樹木腐朽被害を評価することが可能であり、リアルタイムシーケンス解析を用いることで迅速な評価を行うことができる場合もあることが示された。このことは、樹木腐朽のように外部表徴から判別できない環境変化に対しても、リアルタイムなマイクロバイオーム分析が環境評価の実用的なアプローチになり得ることを示唆している。

樹木の腐朽病害は、森林動態に影響を及ぼすだけでなく、経済的にも大きな損失を引き起こす。特に心材腐朽の進展は外部表徴から判別できないため、腐朽被害を非侵襲的に評価することは難しい。しかし、樹木に根株心材腐朽病害が発生する際には、腐朽菌が周囲の土壌やリターで増殖し、菌糸が根から貫入することが多いため、環境微生物叢に変化が生じると考えられる。樹木の病害や腐朽は森林や公園など野外で起きているため、現地で微生物叢の分析を行うことができれば、樹病診断における実用上の意義は大きい。しかし、これまでは実験上の制約により、シーケンス解析を現地で実施することは不可能だった。本研究で使用したナノポアシーケンサーは、配列決定の原理が従来とは全く異なるため、PCR や精製などの前処理を行う必要がなく、現地でリアルタイム分析が可能であることが示された。今後、樹病診断や樹木保護の実務を担う実務者団体にこの分析技術のプロトコルを提供し、速やかな技術普及を進めることができれば、樹木保護の実務を大きく進展させ、国土保全に貢献できると考えられる。

また、本研究の成果は、樹病や森林攪乱と関連する微生物叢の特徴を解明することで、マイクロバイオームに基づいた全く新しい環境評価手法の開発に資するだけでなく、基礎科学として、

環境微生物学への有意なフィードバックがあると考えられる。環境中の微生物の分布はいまだに未解明な点も多く、本研究で提案した樹木圏のあらゆる部位の微生物叢を網羅解析する「森林マイクロバイオーム」のデータが蓄積していくことで、環境中の微生物の分布と機能について、新たな知見が得られることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山田利博	4. 巻 27
2. 論文標題 街路樹の機器診断の精度を高めるための課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 TREE DOCTOR	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Haraguchi Ryusei, Hirao Toshihide, Yamada Toshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Detection and Quantification of <i>Serpula himantoides</i> in the Wood of <i>Chamaecyparis pisifera</i> Butt Rot Trees by Real-Time PCR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Forests	6. 最初と最後の頁 1429 ~ 1429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/f13091429	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平尾聡秀・原口竜成・山田利博
2. 発表標題 サワラ人工林における腐朽病害木と健全木の環境マイクロバイオームの違い
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada T, Haraguchi R & Hirao T
2. 発表標題 Rapid characterization of wood-decaying fungal communities using the nanopore sequencing system
3. 学会等名 Asian Mycological Congress 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田利博・原口竜成・平尾聡秀
2. 発表標題 森林マイクロバイオームによる樹木腐朽病害の検出可能性の検討
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戴 健平・原口竜成・平尾聡秀・山田利博
2. 発表標題 クマ剥ぎによるヒノキ被害部の主要腐朽菌と拮抗菌の選別
3. 学会等名 日本森林学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	平尾 聡秀 (Hirao Toshihide) (90598210)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・講師 (12601)	

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
---------	---------