

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12203

研究課題名(和文)火熱攪乱による森林土壌細菌生態系の回復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of recovery of forest soil bacterial ecosystems by thermal disturbance

研究代表者

笠原 康裕 (Kasahara, Yasuhiro)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：20273849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：山火事は生態系にとって重大な攪乱であり、土壌微生物にも多大な影響を与える。火災後の土壌生態系の回復に微生物が重要な役割を果たしているが、微生物群集の回復メカニズムは未解明である。

伝統農法の山焼きを山林火災とみなし、山焼き前後の土壌の細菌叢解析から、細菌群集組成は火入れ1日後に劇的な変化が見られ、10ヵ月程度でほぼ火入れ前の組成に回復した。この群集変化の過程における機能微生物群の変化を知るために、転写産物のメタ解析(RNA-seq解析)から、分解代謝系を担う細菌群の定性(同定)と定量(発現量)を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

山林火災後の土壌微生物群集の回復メカニズムは群集の構造・多様性・遷移に関する経時的な解析データの不足に加え、生態系機能レベルの群集集合の研究不足も回復メカニズムの理解を阻んでいる。本研究から火災後、土壌細菌群集が1年以内で回復する結果を得ている。この火熱の攪乱を受けた山林土壌の回復過程における細菌群集の構造と機能の変動様式を、より経時的に定性・定量解析を行うことで、構造と機能の関連性を探り、細菌群集の回復を駆動する要因とメカニズムを明らかにできる。これより細菌群集がどのような条件下でどのように変化するのが理解することにより、生態系がどのように再生していくかを予想するのに役立つ。

研究成果の概要(英文)：Wildfires are a significant disturbance to ecosystems and have a significant impact on soil microorganisms. Microbes play an important role in the recovery of soil ecosystems after fire, but the mechanisms of recovery of microbial communities are not yet understood.

Considering a traditional agricultural wildfire as a forest fire, bacterial community analysis of pre- and post-fire soil showed that bacterial community composition changed dramatically after 1 day of the fire and recovered to almost the pre-fire composition in about 10 months. To understand the changes in the functional microbial population during this community change process, qualitative (identification) and quantitative (expression levels) of the bacterial groups responsible for the degradative metabolic system are being conducted based on transcriptional meta-analysis (RNA-seq analysis).

研究分野：微生物生態学、ゲノム微生物学

キーワード：細菌群集 生態系機能 攪乱 回復 山焼き

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

山火事や野火の火災は毎年大規模に発生し、生態系にとっても地球環境にとっても最も重大な攪乱であり、脅威の1つである。植物種や動物種に甚大な被害をもたらすだけでなく、土壤細菌にも直接的および間接的な影響を与える。そのため長年、火災後の細菌群集についてバイオマスの増減、群集組成変化、回復期間(数年から数十年)が研究されている。しかしこれらの研究結果は一致していない。基本的に突発的で予測不能な山火事を対象フィールドにするため、火災前の細菌群集の情報不足や土壤採取が短期間(数ヶ月から1年程度)で数回(2, 3回程度)であることが考えられる。火災後の土壤生態系の回復に細菌が重要な役割を果たしているにもかかわらず、土壤細菌群集の火災前後の経時的な変動に関する情報はほとんどない。そのため、回復メカニズムも未解明である。

申請者は、火災攪乱がおよぼす土壤細菌生態系の安定性の機構とその意味を明らかにするために山焼き土壌での細菌群への影響を調査した。山形大学農学部演習林で伝統農法として、2014年と2015年に異なった山斜面で行われた山焼き地を山林火災の実験フィールドとした。火入れ前と火入れ1日後から3年間経時的に、細菌群集構造について16SリボゾームDNA(rDNA)遺伝子メタ解析を中心に変動解析を行った。以下4点を明らかとした。

- ・火入1日後に細菌多様度は90~95%減少した。
- ・細菌群集は1年以内で元の群集に近い組成に回復した。
- ・群集変化は、pH、全窒素量、アンモニア態、硝酸態窒素量、マンガン量が起因した。
- ・群集は、3つのクラスター(1:火入れ1日、2:1~2ヶ月、3:他すべて)に分類され、各クラスターで火災応答細菌群が検出された。

以上から、「細菌群集構造の火熱への回復には再現性があるが、回復過程の応答細菌群には共通群がなく再現性がない」、新たな知見と新たな課題が得られた。

### 2. 研究の目的

本研究は、火入れ後の回復過程における細菌群集と細菌機能群の構造変化を経時的に解析し、一連の解析結果から、構造と機能の関連性を見だし、細菌群集の回復の変化とメカニズムを明らかにすることで先述の新課題を解くことを目的とする。山焼き土壌試料について計画している研究項目は以下の5項目である。

- ① 細菌群集構造解析：細菌種を対象に、16S rDNA 遺伝子のメタ解析を行い、組成変化、多様性、遷移状態を解析する。
- ② 細菌群集代謝プロファイル解析：市販の基質分解多様性解析用プレートに土壌懸濁液を接種・培養し、発色状態から機能多様性を測定する。
- ③ 機能細菌群集解析：発色した基質溶液からDNAとRNAを同時に抽出し、DNAについて16S rDNA 遺伝子のメタ解析から、同定と組成解析を行う。
- ④ 機能関連遺伝子の定性・定量解析：同時に得られたRNAについて、RNA-seq解析を行い、基質の代謝経路上の分解遺伝子の同定、帰属種の特定と検出量による定量を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、火熱の攪乱を受けた山林土壌の細菌群集の構造と機能の変動様式、および両者の関連性から、細菌群集の回復を駆動する要因とメカニズムを明らかにすることを目的とした。

実験フィールド：山形大学農学部鶴岡演習林内において、伝統農法の焼畑地を造るために、新たな山斜面で、樹木の伐採・撤去、火入れ、山焼きを行っている。この実験区を借用した。2022年8月8日に山焼きを行った。

供試土壌：土壌試料は、火入れ前(2022年8月7日)、火入れ後1, 14, 35, 74, 291, 432日後に採取した。採取地点は、斜面中部の横方向3地点、表層1~5cmから採取した。

#### 1. 細菌群集構造解析

土壌約0.5gからDNA抽出キットISOIL (NIPPON GENE)を用いて、環境DNAを抽出した。16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をPCRにて増幅し、次世代シーケンサーMiSeqを用いて塩基配列を決定した。次世代シーケンス(NGS)解読はリード数と読取り品質を揃えるために、1年後試料が揃った時点で行った。得られたDNA配列データは、R(v4.3.1)ソフトウェアを用いたdada2によりamplicon sequence variant(ASV)を得て、系統分類学的解析を行った。

#### 2. 機能細菌群集解析

土壌試料は、火入れ前と火入れ後14, 74, 432日の3サイト(計12試料)を使用した。炭素基質31種類(多糖類、糖、アミノ酸、カルボン酸など)が入った96穴プレートEcoPlate (BIOLOG社)を用いた。1プレートに31基質が3セットが配置されている。そのうち8種の基質(Glycogen (Polymers)、D-Cellulose (Carbohydrates)、D-Xylose (Carbohydrates)、4-Hydroxybenzoic acid (Carboxylic and ketonic acids)、Gamma-Hydroxybutyric acid (Carboxylic and ketonic acids)L-Threonine (Amino acids)、Phenylethylamine (Amines/amides)、Putrescine (Amines/amides))を使用した。各土壌試料1.0gを100ml滅菌水に懸濁し、ヴォルテックス30秒、音波処理30秒行ったのち、土壌懸濁液140μlの各ウェルに接種した。22°Cで100時間培養を行った。1土壌試料-1プレートとして使用

した。

各土壌試料について1基質1種あたり3ウェル/プレートから青入りに発色した培養液を1つに集めた。3つのサイトからの培養液を1つにまとめた。この後のDNAとRNAの解析に十分な量を確保するためである。集積した培養液からZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research)を用いて、DNAとRNAを同時に抽出した。

DNAについて16S rDNA遺伝子を増幅後、Miseqにより解読を行った。

### 3. 機能関連遺伝子の定性・定量解析

抽出RNAについて、RNA-seq解析を行った。抽出RNA試料は、外部に委託した。

## 4. 研究成果

### 1. 細菌群集構造解析

土壌試料について、得られた細菌の系統分類学的解析結果より、Rソフトウェアを用いて、群集構造解析、シンプソン多様性解析、主座標分析(PCoA)を行った。

火入れ後1日の土壌試料(サイトC)は、環境DNAは抽出できたが、16S rDNA遺伝子の増幅は、できなかった。キットの変更や土壌量の変更など改良点を検討する必要がある。

細菌群集構造解析の結果を図1に示した。火入れ1日後土壌で、群集構造が大きく変化していることが分かった。特にFirmicutes門のBacillus属の割合が約70%を占めた。その後急激に減少し10%以下までになった。

各土壌の細菌群集の多様性は、逆シンプソン多様度により示した(図2)。山焼き直後は多様度が一旦低くなるが、その後、火入れ前より急速に多様度が高くなった。

細菌群集間の類似度は、主座標分析より行った(図3)。細菌群集は大きく3つのクラスターに分けることができた。クラスターI(火入れ前と291、432日後)、クラスターII(1日後)、クラスターIII(14、35、74日後)である。火入れ直後の群集は他と大きく異なり、一つのクラスターを形成した。これは、群集構造解析からも明らかとなった。火入れ291日後、約10ヵ月には火入れ前の群集組成に近い組成になった。それ以降432日後の約1年後の組成はさらに類似したものとなった。

私たちは2014年と2015年に山焼きを行い、その土壌についてこれまで細菌群集解析を行ってきた。その結果は、以下である。

・火入れ1日後に細菌多様度は90~95%減少した。

・細菌群集は1年以内で元の群集に近い組成に回復した。

・群集は、3つのクラスター(1:火入れ1日、2:1~2ヶ月、3:他すべて)に分類された。

これらと本研究の結果を比較すると、火入れ1日後の多様度は劇的に減少しなかった。群集はこれまでと同じように3つのクラスターに分類された。さらに1年程度で火入れ前と類似した群集に回復した。

### 2. 機能細菌群集解析

今回、Ecoplateの31種の基質のうち8種を選んで解析に用いた。供した4採取日・3サイトの土壌ですべての基質において青色に発色した。これらよりDNAとRNAの抽出を行った。

抽出DNAについて、すべての基質試料で16S rDNA遺伝子を増幅することができた。現在、NGSを行っている。

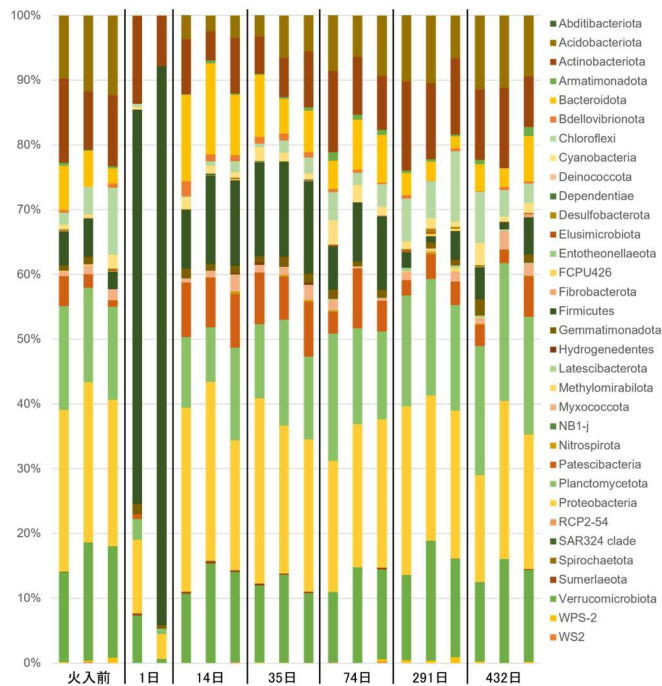


図1. 細菌群集構造の推移(門レベル)

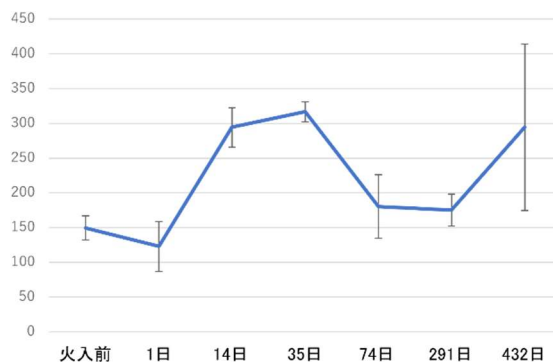


図2. 逆シンプソン多様度

抽出 RNA について、トータル RNA を得ることができた。RNA 試料は、外部解析会社に。RNA-seq 解析を依頼した。試料によっては、RNA-seq 解析に必要な量を得ることができず、限られた予算もあることから、

8 基質のうち、Glycogen、Gamma-Hydroxybutyric acid、Phenylethylamine、Putrescine の 4 種のみ解析を行った。

### 3. 機能関連遺伝子の定性・定量解析

基質の代謝経路上の分解遺伝子の同定、帰属種の特定と検出量による定量については、現在、作業を進めている。

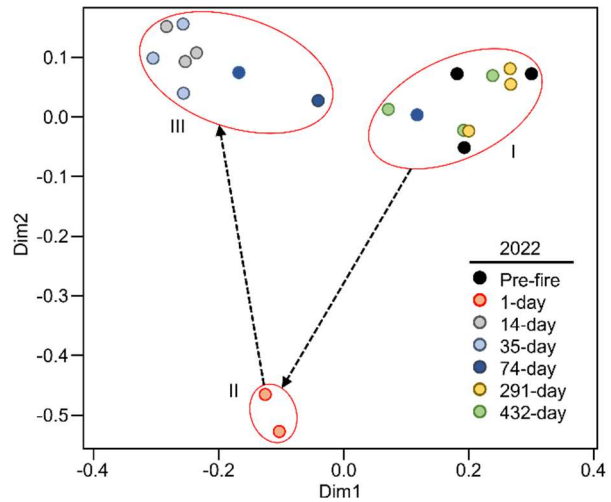


図 3. 細菌群種間の類似度解析(PCoA)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小椋 義俊  (Ogura Yoshitoshi)  (40363585)	久留米大学・医学部・教授    (37104)	

	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
研究協力者	佐藤 雅志  (Sato Tadashi)	東北大学・農学研究科    (11301)	

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