

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450477

研究課題名(和文) 森林管理による樹種多様性の違いが窒素貯留機能に与える影響の微生物学的解明

研究課題名(英文) Investigation of microbial communities for nitrogen cycle in the 3 types forest managements of artificial Japanese cedar forest

研究代表者

多田 千佳 (Chika, Tada)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30413892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：スギ人工林の森林管理による窒素循環に関わる微生物群集構造について調査した。管理は無間伐区、弱度間伐区、強度間伐区で比較した。それぞれの土壌を採取し、N₂O還元酵素のnosZ遺伝子について解析した。その結果、強度間伐区では、他区に比較してnosZ遺伝子量が高かった。さらに、種構成も、強度間伐区でのみ検出された種があり、ダイズ根粒菌で知られるBradyrhizobium japonicum USDA110株に近縁であった。強度間伐区の下草植生には、他区になかったマメ科植物があった。よって、強度間伐区では、下草植生の影響で脱窒能が高い細菌が存在し、その結果、窒素浄化が高い可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The microbial community structure related to nitrogen circulation by forest management of Japanese cedar plantation forest was investigated. The management was compared in the unthinning area, the weak thinning area, and the intensity thinned area. Each soil was collected and analyzed for the nosZ gene of N₂O reductase. As a result, the amount of nosZ gene was higher in the intensity thinned plot than in the other plots. In addition, the species composition was also detected only in the thinning plot, closely related to Bradyrhizobium japonicum USDA 110 strain known as soybean root nodule bacteria. Undergrowth vegetation in the intensity thinned section had legume plants not found in other plots. Therefore, bacteria with high denitrification ability existed due to the influence of undergrowth vegetation in the intensity thinned plot, and as a result, the possibility that nitrogen removal was high was considered.

研究分野：環境微生物

キーワード：森林管理 土壌微生物 窒素循環 間伐強度

1. 研究開始当初の背景

人類の活動によって大気に排出される窒素酸化物の量は、2005年で自然生態系が固定する窒素量とほぼ同等の185tまで増加し、世界的に窒素飽和が起きている (Galloway et al. 2008)。それに伴い、雨水に含まれる窒素濃度も増加傾向にある。畜産由来の窒素揮散も大気汚染に大きな影響を与えており、日本では、家畜排泄物中の窒素量の約30%が大気に揮散すると言われる。関東周辺の針葉樹林では、林内降水による窒素量は13~136 kgN/ha yrと報告され、北海道や本州の山岳地帯の5kgN/ha yrに比較して2倍以上の高濃度である (Hayashi et al, 2002, Ito et al. 2003)。通常、森林は窒素制限状態にあるため、系外への窒素溶脱は少なく、降雨流出時を除き、渓流水中の窒素濃度は極めて低くなる。しかし、これら大気降水経由での慢性的な高窒素負荷が、森林生態系における窒素代謝に影響を及ぼすことで窒素溶脱が促進され、結果、平水時の渓流水中の窒素濃度は上昇する。欧米では、渓流水中のNO₃⁻濃度が年間を通して1 mg N L⁻¹を超え、森林の窒素飽和状態にあり、日本でも、関東地域等の大都市近郊森林では、既に渓流水中のNO₃⁻濃度が高いことが示されている (Ohruai et al. 1997)。さらに、上記の渓流水の窒素濃度増加の要因として、大気からの慢性的な高窒素負荷だけでなく、間伐手遅れ等の森林管理の不備から生じるスギやヒノキ等の人工林の荒廃によって、森林生態系における窒素貯留能の低下が指摘されている。間伐は、人工林の重要な管理手法であり、日本では、総面積の33%を抜き切りする間伐方法が取られてきた。一方、近年、生物多様性の維持を目的に針葉樹林に広葉樹林を混ぜる混交林化が提案され (Seiwa, 2009)、総面積の66%を間伐する強度間伐が当試験林で実施されている。これらの森林管理の違いによって、我々が行った調査 (図) では、下草植生の違いや広葉樹の移入が生じ、間伐強度の違う試験区で窒素貯留能やアンモニア酸化細菌 (AOB) の構成が異なっていた (Tadaら. 2009, Ito, Tadaら 2012)。その変化は春の強度間伐土壌において顕著であり、アンモニア酸化古細菌 (AOA) / AOB 構成比で AOB 比が高まることが明らかとなった。さらに、強度間伐区では、他の区に比較して下層植生および樹の根のバイオマスが A 層 0-5cm の範囲で高いことも明らかになった。しかし、なぜ、強度間伐でのみ微生物群集構造が異なり、高い窒素貯留能を持つのか、植生の多様性と微生物、そして窒素貯留能との関係については不明である。今後、窒素飽和対策の観点も含めて持続可能な森林管理手法として混交林化を推進する上でも、混交過程での種の多様化メカニズムの解明に加え、様々な生態系機能の向上の有

無、その定量評価とメカニズム解明は不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、間伐強度による森林の窒素貯留機能に及ぼす影響について、微生物学的視点から解明することを目的とする。

3. 研究の方法



調査地点は、東北大学川渡フィールド東北大学農学研究科附属複合生態フィールド教育研究センター内尚武沢試験林 (38°45'N 140°45'E 標高 330-540 m) で行った。本試験林は1983年にかつて牧草地だった場所にスギの苗木が植林された。本試験林

はほぼ同じサイズの区画に分けられ (0.45 ha-0.62ha)、間伐強度が異なるスギ林が三反復設置されている (無間伐: 0%、弱度間伐 33%、強度間伐 67%)。間伐は植林が行われてから20年後の2003年10月に行われた。特に本研究は、強度間伐2、無間伐3、弱度間伐3を対象に行った。

深度5cm, 20cm, 50cmの森林土壌をコアサンプリングした。その森林土壌の微生物群集構造について、特に、窒素循環に関与するアンモニア酸化細菌 (AOB)、アンモニア酸化古細菌 (AOA)、脱窒細菌に注目し、それぞれの酵素遺伝子 (*amoA* 遺伝子, *nosZ* 遺伝子) をマーカーに量の把握、種構成について明らかにした。

サンプリングは、2012年~2014年、2016年の冬期を除く季節で行った。微生物解析に用いたサンプルは、2012年、2014年、2016年に採取したサンプルを用いた。特に、脱窒細菌については、2012年と2016年のサンプルについて解析を行った。

AOA, AOB の解析

(1) DNA 抽出

土壌サンプル約5gをPowerMax® DNA Soil Isolation Kit (Mo Bio Lab, Inc.) を使用し、抽出した。抽出DNAはNanoDrop1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Ottawa ON) で濃度測定後、使用するまで-20℃で保存した。

(2) リアルタイム PCR 法による AOA・AOB 由来 *amoA* 遺伝子の定量解析

AOA 検出には古細菌 *amoA* 遺伝子を標的とした CrenamoA23f / CrenamoA616 プライマーを用いた。AOB 検出には真正細菌 *amoA* 遺伝子を

標的とした *amoA1f/amoA2r* プライマーを用いた。PCR 反応には DNA Engine (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、蛍光検出には Chromo4 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いた。定量 PCR 反応は MightyAmp® for Real Time (SYBR® Plus) (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いた。反応液の組成は MightyAmp® for Real Time 12.5 μ l、各プライマー 0.5 μ l、テンプレート DNA 1 μ l、滅菌 MilliQ 水で全量を 25 μ l とした。

反応条件は以下の通りである。プライマーセット AOA23f/AOA616r を用いた反応では、98 2 分の熱変性後、95 10 秒 (変性)、58 30 秒 (アニーリング)、68 60 秒 (伸長) を 45 サイクル行った。プライマーセット *amoA1f/amoA2r* を用いた反応では、98 2 分の熱変性後、95 30 秒 (変性)、55 1 分 (アニーリング)、68 45 秒 (伸長) を 45 サイクル行った。PCR 増幅反応後全ての反応で温度を 55 から 95 に段階的に上げ、DNA の融解曲線を求めて特異的増幅を確認した。

(3) PCR-DGGE による AOA および AOB の群集構造解析

AOA と AOB の群集構造解析は、2013 年 10 月、2014 年 5 月、2014 年 7 月の土壌サンプルを対象に行った。得られた DNA から、古細菌の *amoA* 遺伝子を増幅するプライマーセット CrenamoA23f/ CrenamoA 616r と真正細菌の *amoA* 遺伝子を増幅するプライマーセット *amoA1f/amoA2r* を用いて DNA 断片を増幅した。DGGE 解析に用いるため、プライマー *amoA1f* の 5' 末端に GC クランプを付加した。PCR 反応には iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いた。

プライマーセット AOA23f/AOA616r を用いた反応のための PCR 反応液の組成は 1 \times ExTaq™ Buffer、dNTP Mixture (各 0.2mM)、各プライマー 0.25 μ M、TaKaRa ExTaq™ 1.25U (タカラバイオ株式会社、滋賀)、テンプレート DNA を 1 μ l とし、オートクレーブ滅菌した超純水で全量を 50 μ l とした。超純水 (MilliQ 水) は Millipore Corporate, MA, USA) で作成した。プライマーセット AOA23f/AOA616r を用いた反応条件は、95 30 秒の熱変性後、95 10 秒 (変性)、58 30 秒 (アニーリング)、72 60 秒 (伸長) を 35 サイクル行い、最後の伸長反応は 72 5 分を行った。

プライマーセット *amoA1f-GC/amoA2r* を用いた反応では、二回 PCR を行った。一回目は、*amoA1f/amoA2r* の GC クランプがついていないプライマーで PCR 行い、二回目は一回目の PCR の産物を 1 μ l とりテンプレートとしプライマーセット *amoA1f-GC/amoA2r* を用いて PCR を行った。PCR 反応液の組成は 10 \times PCR Buffer for KOD -Plus-, 2mM dNTPs (各 0.2mM)、各プライマー 0.25 μ M、25mM MgSO₄、KOD -Plus-1U (東洋紡、大阪)、テンプレート DNA を 1 μ l とし、オートクレーブ滅菌した超純水で全量

を 50 μ l とした。超純水 (MilliQ 水) は Millipore Corporate, MA, USA) で作成した。一回目の PCR の反応条件は 94 60 秒の熱変性後、94 20 秒 (変性)、55 10 秒 (アニーリング)、72 20 秒 (伸長) を 35 サイクル行い、最後の伸長反応では 72 で 5 分を行った。二回目の PCR 条件は 94 60 秒の熱変性後、94 20 秒 (変性)、55 10 秒 (アニーリング)、72 20 秒 (伸長) を 20 サイクル行い、最後の伸長反応では 72 で 5 分を行った。PCR 産物は 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、バンドサイズを確認した。増幅された約 600bp の DNA 断片を DGGE 解析に用いた。

DGGE は D-code Multiple system (Bio-Rad Laboratories, Inc) を用いて行った。AOA では変性剤濃度勾配 20~60% をもった 6% アクリルアミドゲルを使用した。AOB では変性剤濃度勾配 30~70% をもった 8% アクリルアミドゲルを使用した。6% または 8% アクリルアミドゲルに、loading dye を混合した PCR 産物 30 μ l をアプライし、1 \times TAE buffer 中で 60、120V で 10 時間電気泳動した。電気泳動後、GelStar[®] Nucleic Acid Stain (Lonza Rockland, Inc., ME, USA) で約 15 分間染色した。染色後 Printgraph (アトー株式会社、東京) で泳動像を確認後、CCD video camera module (アトー株式会社、東京) で撮影した。

ゲル中で明確なバンドについては滅菌カッターナイフで切りだし、80 μ l の滅菌 TE buffer に一昼夜浸して DNA 溶液を得た。この DNA 溶液 1 μ l をテンプレートとして PCR を行った。PCR 産物は ExoSAP-IT[®] (USB Corporation, OH, USA) を用いて精製し、シーケンステプレートとした。

(4) 塩基配列の決定

DGGE バンドから得られた PCR 産物精製 DNA 溶液 1 μ l をテンプレートとし、AOA にはプライマーセット CrenamoA23f/ CrenamoA 616r、AOB には *amoA1f/amoA2r* を用い、BigDye Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystem Inc.) を使ってシーケンシング反応を行った。反応液の組成は BigDye Sequencing Buffer、プライマー 0.16 μ M、Ready Reaction Premix 1.5 μ l、テンプレート PCR 産物 1 μ l とし、滅菌 MilliQ で全量 10 μ l とした。シーケンシング反応は 96 1 分の後、96 10 秒、50 5 秒、60 4 分の行程を 30 サイクル行った。反応液はエタノール沈殿を行い、精製した後 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystem Inc.) 10 μ l に溶解し、ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc.) を用いて塩基配列を決定した。

(5) 近縁種の検索

決定した塩基配列は全て、日本 DNA データバンク (DDBJ) 上の相同性検索プログラム、BLAST

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blas>

t-j.html) により相同性検索を行った。

(6)脱窒細菌の検出方法

脱窒細菌として、N₂O を N₂ に還元する酵素の *nosZ* 遺伝子を標的とするプライマー *nozZ1F/nosZ1R* (Henry et al., 2006) を用いた。上記プライマーセットによる PCR 増幅を確認し、その後、同プライマーセットで *real time*PCR で量を確認した。一部は、クローニングを行い、塩基配列を決定後、BLAST 検索による種同定を行った。

さらに、2012 年と 2014 年のサンプルについては、次世代シーケンサーによって、真正細菌群集構造についても明らかにした。

4. 研究成果

AOA と AOB

2012 年、2013 年に引き続き、2014 年の AOA, AOB の *amoA* 遺伝子量を比較した結果(図 1)、乾燥重量 1g あたりの DNA 量として、AOA は、強度間伐区では、他の区に比較して、AOA の量が低い傾向が見られた。しかし、AOB については、季節を問わず、大きな差は認められなかった。

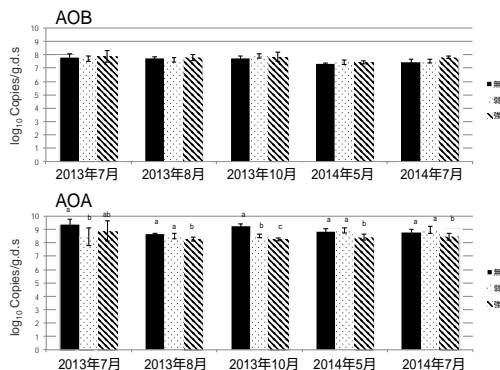


図 1 2013-14 年の AOB と AOA の *real time*PCR による定量結果

つまり、AOA が強度間伐区では、その他の区に比較して少ない傾向があると言え、構成比として比較した場合には、強度間伐区ではその他の弱度間伐区や無間伐区に比較して AOB の構成比が高いことを示した。

しかし、2016 年の結果では、AOB の量は、弱度間伐で最も高い傾向が見られた。

2012 年の調査開始当初と比較し、2016 年では、間伐強度の違いによって、スギ人工林に混入した広葉樹林の成長が異なる。2012 年当初は、強度間伐では、3 分の 2 の抜き切り間伐のため、森の中に多くの光が土壌にまで届き、下草の量が多かった。しかし、2016 年には、混入した広葉樹林(主に、ミズキ)が大きく成長し、同地点の土壌には、光が春先からはあたらなくなった。よって、このような下草環境の変化が、2012 年ごろの AOB の変化と 2016 年の AOB の変化に違いとなっている可能性が考えられた。

DGGE 解析による AOB 種構成について

図 2 には、PCR-DGGE 法における AOB のバンドパターンを示す。

これらの結果から、強度間伐については、他の区では観察されないバンドが、上部の方にあることが分かる。

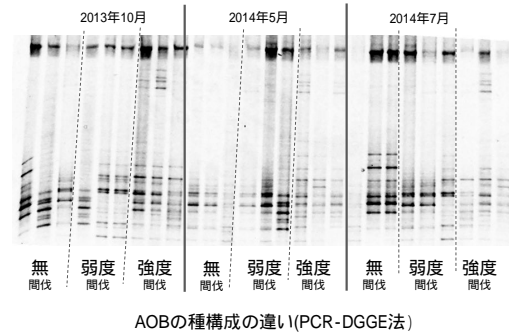


図 2 PCR-DGGE 法による AOB の種構成解析

また、季節を問わず、AOB の種構成は、それぞれの森林土壌で安定しているように見える。これまでの間隙水中の硝酸態窒素の変化などから、強度間伐では、無間伐に比較して窒素循環が速い速度で行われていると考えられた。この原因に、この AOB の種構成の違いが影響している可能性が考えられた。特に、強度間伐では、無間伐ではみられない、泳動上部に、強いバンドが観られたことから、このバンドに現れる種が、窒素循環に大きな影響を与えている可能性が考えられたため、その種同定を行った。

AOB の種同定と系統解析

PCR-DGGE 法のバンドパターンの結果から、強度間伐に特量的に見られた種を切り出し、塩基配列を決定し、BLAST により同定と系統樹作成を行った。図 3 にその結果を示す。

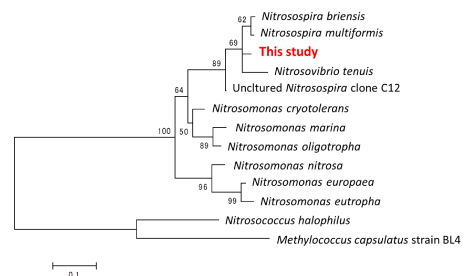


図 3 強度間伐区にのみ検出された種の系統解析結果

これらの結果から、このバンドの種は、*Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospora tenuis* に近縁であることがわかった。

Tourna ら (2010) の研究によると、*Nitrosospira briensis* や *Nitrosospora*

*tenuis*は16SrRNAを対象とした系統解析の結果、*Nitrosospora* クラスター3bに分類される。*Nitrosospora* クラスター3bに分類される種は、特に高濃度のアンモニア下において、急激に増加し、高いアンモニア酸化に寄与することが知られている。

よって、強度間伐からのみ検出された種が*Nitrosospora* クラスター3bに属する可能性があることから、この種が強度間伐において、高いアンモニア酸化能を示す可能性が示唆された。

脱窒細菌について

2012年と2016年のサンプルについて、N20を還元する酵素遺伝子 *nosZ* 遺伝子をターゲットとしたプライマーで検出した。その結果を図4に示す。

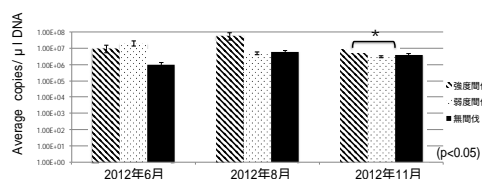


図4 2012年森林土壌深度5cmの*nosZ*遺伝子量の違い

この結果より、どの季節でも無間伐区に比較して、強度間伐区では*nosZ*遺伝子量が多い傾向にあり、11月の結果では有意に高かった。

しかし、2016年6月の結果では、*nosZ*遺伝子量は、弱度間伐区で最も高く、次いで、無間伐区、強度間伐区となり、2012年の結果とは異なった。

一つ、2012年には、間隙水中の硝酸態窒素濃度の結果、強度間伐区では、著しく減少が観られたため、その原因の一つは、脱窒細菌のN20還元酵素が多く、脱窒細菌による脱窒作用が高いことが原因とも考えられたが、2016年の結果では、この考察は当てはまらない。

2016年は、AOBの動きも異なっており、脱窒細菌の様子からも、樹木の成長に伴い、森林土壌環境が大きく変化したことが伺える。

脱窒細菌の種構成

2016年のサンプルについて、一部、クローニングを行い、*nosZ*遺伝子について、塩基配列を決定し、Blast検索で種の同定をおこなった。その結果、すべての区で、ほぼ同じ種に近縁種として検出されたが、強度間伐区において1つのクローンだけ、他の区にみられなかった種が検出された。その種は、*Bradyrhizobium japonicum* USDA110株に近縁であった。この種は、ダイズの根粒菌として知られ、特に、USDA110株は、大気中の低濃度のN20を取り込み、N2に変換できることが報告されている(Sameshima-Saito, Ret al.,

2006)。この時期の下草について調査した結果、強度間伐区にだけ、マメ科の下草が存在した。これらの結果より、強度間伐区では、他の区とはことなる下草植生のため、その種構成のちがいによって、土壌微生物群集構造も異なることが示唆された。さらに、脱窒能においても、影響を与えている可能性が考えられた。

また、この*Bradyrhizobium japonicum* USDA110株は、ダイズの根粒菌として認識されているが、今回、強度間伐区には、ダイズは生えておらず、その他のマメ科の植物であったため、根粒菌の共生可能な植物種が、マメ科の中で、幅広い可能性も考えられ、今後、自然界でのこれら脱窒能を持つ根粒菌の生態についての謎も明らかになり、面白い発見であった。

これに加え、真正細菌の16SrRNAについて、次世代シーケンサーにて、網羅的に解析した結果でも、強度間伐で、この種に近縁種が得られた。

以上の結果より、人工林の管理の違いによって、土壌微生物群集構造が異なること、特に、窒素循環に関わる微生物群集構造は、強度間伐区では、その他の区に比較して、特徴のある群集構造をしており、窒素循環の速度が早く、窒素を循環させていることから、間隙水中の硝酸態窒素濃度が低い可能性が考えられた。

その微生物群集構造の違いには、下草の植生も大きく影響していることが考えられた。また、このため、強度間伐区でも、広葉樹林が入り込み、成長した場合には、土壌にあたる光環境が変化し、光が当たりにくい場合になったときには、弱度間伐に比べて、無間伐区に近い状態の群集になる可能性も示された。今回、2016年には落葉後の11月ごろの調査はできなかったため、冬に光が土壌にあたるようになってからの微生物群集構造の変化は終えなかった。

しかし、人工林管理の上で、樹種の多様性も重要であると同時に、土壌環境においては、下草の種構成が大きく関与していることが示唆された。

引用文献

Reiko Sameshima-Saito[†], Kaori Chiba, Junta Hirayama, Manabu Itakura, Hisayuki Mitsui, Shima Eda and Kiwamu Minamisawa^{*}, Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* Reduces N₂O Surrounding the Soybean Root System via Nitrous Oxide Reductase, Appl. Environ. Microbiol. April 2006 vol. 72 no. 4 2526-2532

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

Chika Tada, Yutaro Ito, Characteristics of ammonia-oxidizing microbes under different management regimes in Japanese cedar forests, WET2015, Water and Environment Technology Conference 5-6th, August, 2015, Nihon University Surugadai campus, Japan

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 千佳 (TADA, Chika)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30413892

(2) 研究分担者

清和 研二 (SEIWA, Kenji)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40261474