

サロベツ湿原泥炭採集地環境再生のための微生物叢メタゲノム解析 Microbiome metagenome analysis for peatlands' vegetation recovery of Sarobetsu raised bog

三田 稜一朗[†] 小川 仁[†] 齊藤 玉緒[†] 矢入 郁子[†]
Ryoichiro Mita Jin Ogawa Tamao Saito Ikuko Yairi

1. はじめに

ラムサール条約に代表されるように、世界的に湿地帯の環境保全・再生の重要性が認識されるなか、日本でも環境省主導によって各種取り組みが行われている。その一つの手段として、近年の微生物叢メタゲノム解析手法の発達を背景に、水や土壌を生物学的に分析して環境保全・再生に活用する試みへの期待が高まっている。本研究で対象とするサロベツ湿原は、低地における日本最大の高層湿原である。この湿原が環境保全・再生の観点から注目を浴びている理由は、1970年から2002年まで国内最大規模の泥炭の採掘によって自然が大きく破壊されたことによるものである[1]。現在は泥炭の採掘だけでなく農耕も含む一切の開発が禁止されているが、湿原本来の元の姿に戻ることは非常に困難である。それは、過去の開発によって外来植物が侵入し、絶滅危惧種の生育が危険にさらされていることが指摘され、様々な湿原再生の対策が講じられていることから浮き彫りとなっている[2~4]。本稿では、採掘後に地表面が形成されたものの植物の定着がまばらで土壌が露出している1972年と1982年の採掘地に着目した。この2地点は湿地本来の固有種を脅かすはずの外来種でさえも定着しづらいため、別の根本的原因があると考えられている。特に1972年採掘地は1982年よりも前に採掘され、より以前に形成され再生が進んでいるはずの地表面を持っているが、より植生の定着がまばらで再生困難な地点と位置づけられている。本稿はこの2地点の土壌中の微生物叢のサンプル収集・メタゲノム解析を通して、湿原再生に向けた提言を行うことを目的とする。2章以降、2地点の土壌3箇所を、2018年から2019年の間に6回採取した約50サンプルについて、サンプル間のβ多様性を分析して報告する。

2. 微生物叢メタゲノム解析

2.1 サンプル収集とDNAシーケンスデータの作成

1972・1982採掘地の土壌中微生物調査は2018年6月、8月、11月と2019年5月、8月、10月に上智大学斎藤玉緒研究室によって実施された。それぞれの採掘地で裸地(BG)、ミカズキグサ(RA)、ヌマガヤ(MJ)の植生地からそれぞれ3箇所ずつ、毎回同じ場所の土壌が採取された。16S rDNAのV3-V4領域は、各調査地点から精製されたDNAをテンプレートDNAとして使用され増幅された。16S rDNA PCRに使用されたプライマーは、341F(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3)、806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')である。16S rDNA増幅に使用されたPCRプログラムは、95°Cで3分間の初期変性、続いて95°Cで30秒間の変性、55°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで30秒間の伸長の25サイクルであり、また72°Cで5分間の最終伸長が施された16S rDNA V3-V4領域のPCR産物は、説明書の指示(Becman Coulter)に従ってAMPure XPビーズで精製された。PCR産物の5分の1は、固有のバーコード

を持ち、プライマーペアを使用した後続のバーコードPCRのテンプレートとして使用された。バーコード付きPCRアンプリコンは、AMPure XPビーズで精製された後、等モル様式でプールされた。(株)FASMACによってイルミナMiSeqシーケンシング機器が使用され、300bpペアエンドシーケンシングが行われた。標準のQIIMEパイプライン(version 1.9.0)によって、アダプター配列、低品質の配列が除去された。結合されたシーケンシングデータの母集団分析には、Greengeneデータベースが用いられ、同一性97%を基準にして分析された。このようにして得られたOTUデータから"Archaea"と"Unassigned"を除くことで、Kingdom levelで"Bacteria"のみのOTUデータが取得された。

2.2 解析方法

本稿のデータの解析は全てPhylum levelにて名寄せ処理されたOTUデータで行われた。Read数はKingdom levelのOTUデータによってカウントされた。基礎分析は全てPython(version 3.7.10)上で行われた。各調査地点のBacteriaの存在比のbar chartは、存在比によるOTUデータを使用し、plotly(version 4.4.1)ライブラリによって作成された。サンプル間で出現する微生物の違いを比較するためのベン図の作成には各サンプルのRead数を使用した。ベン図分析はPython(version 3.7.10)のvenn3(version 0.11.6)によって行われた。β多様性分析は異なるサンプルのBacteriaの構成の違いを見るため、各サンプルのRead数が使用された。Bray curtis距離に基づくサンプル間の非類似度を視覚化するために、ノンパラメトリックな手法であるNMDS分析を行なった。NMDS分析はR(version 4.1.0)上で行われ、vegan(version 2.5.7)パッケージにあるmetaMDSが用いられた。

3. 結果

3.1 基礎分析

得られたOTUデータの総read数は11202638reads、地点毎のread数平均は104707readsであった。表1に各地点でのリード数を示す。2019/06のP72(1972年採掘地)のMJ2(ヌマガヤの2つめ)のread数が小さいため、以降の分析から除去することとした。図2に各調査地点のBacteriaの存在比のbar chartを示す。各地点共通の主要なBacteriaは"Proteobacteria"(青)と"Acidobacteria"(黄緑)であり、2019/05 P72のBG1(裸地の地点1)以外で合わせて50%以上の占有率を占めた。次いで裸地以外は"Nitrospirae"(紫)、裸地は"Actinobacteria"(濃緑)が多く出現していた。全ての調査地点、調査月でベン図を作成し、裸地、ミカズキグサ、ヌマガヤ地点間での細菌叢の違いを調べた。裸地には存在せず、ミカズキグサとヌマガヤに存在する細菌は"BHI80-139"が一番多く、全33回の比較中27回出現した。次いで"WPS-2"が全33回の比較中18回出現し、"Fusobacteria"が全33回の比較中11

[†] 上智大学 Sophia University

回出現した。また、1972年採掘地は”TPD-58”が16回の比較中5回出現したが、1982年は17回の比較中13回出現した。

表1. read数(裸地 (BG), ミカヅキグサ (RA), ヌマガヤ (MJ))

調査月	調査地点								
	P72			P72			P72		
	BG1	BG2	BG3	RA1	RA2	RA3	MJ1	MJ2	MJ3
2018/06	55234	66379	61061	60739	69277	60964	75068	80114	66458
2018/08	134457	65445	89072	103654	55159	83535	82764	64318	66653
2018/11	68954	66553	81433	59559	75359	90953	74540	65660	60545
2019/06	129795	71739	111368	86256	120609	125804	113584	805	132606
2019/08	80255	56859	213147	171397	96106	40007	82491	40956	49884
2019/10	207286	159016	328897	207248	333691	179655	158139	214144	223091
調査月	調査地点								
	P82			P82			P82		
	BG1	BG2	BG3	RA1	RA2	RA3	MJ1	MJ2	MJ3
2018/06	26843	59502	75808	41474	46108	38326	62711	66189	39753
2018/08	88042	28147	141475	77405	129846	74466	59656	95581	99335
2018/11	72344	83821	69890	90873	53794	71435	91269	67027	74815
2019/06	132606	89422	114467	107791	123171	114467	113237	115244	119352
2019/08	106237	64082	112089	90143	97731	88902	97476	156432	156148
2019/10	396510	137003	205674	97154	72914	141741	194763	160978	148717

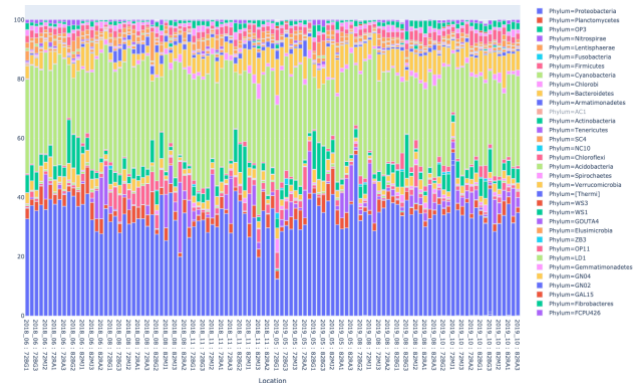


図1 Phylum levelでのBacteriaの存在比(%)

3.2 NMDS

図2にBray curtis距離を用いたNMDSによる土壤微生物叢の多様性の可視化結果を示す。図1(a)は2019年の1972・1982年採掘地の全土壤データの結果、ストレス値は0.1748、(b)は2019年の1972年採掘地の全土壤データのみの結果、ストレス値は0.1609、(c)は2019年の1982年採掘地の全土壤データのみの結果で、ストレス値は0.1140

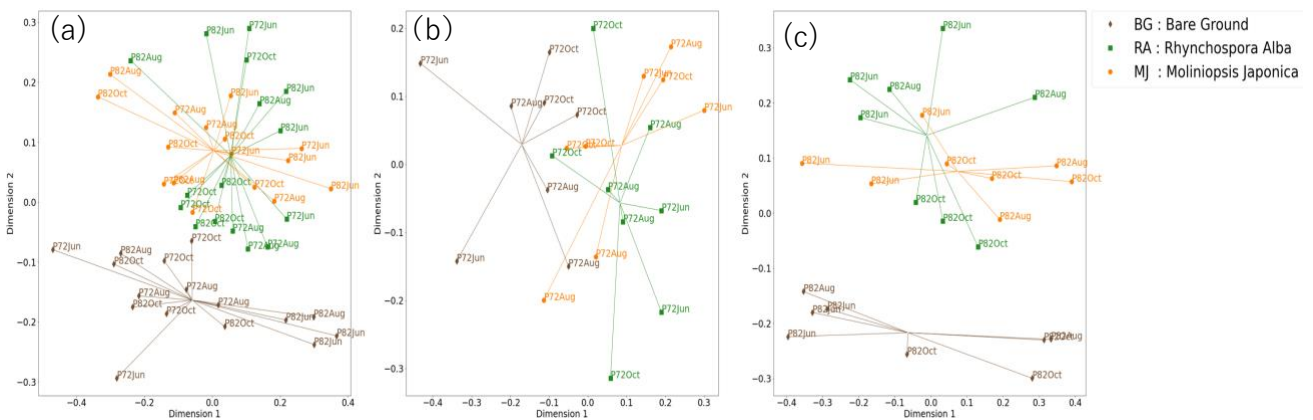


図2 サロベツ湿原泥炭採掘地植生土壌の微生物層のBray curtis距離に基づくNMDS分析結果

茶色が裸地 (BG), 緑色がミカヅキグサ (RA), 黄色がヌマガヤ (MJ) (a)は2019年の1972・1982年採掘地の全土壤データの結果、ストレス値は0.1748、(b)は2019年の1972年採掘地の全土壤データのみの結果、ストレス値は0.1609、(c)は2019年の1982年採掘地の全土壤データのみの結果で、ストレス値は0.1140

1982年採掘地の全土壤データの結果で、ストレス値は0.1748であった。図1(b)は2019年の1972年採掘地の全土壤データのみの結果で、ストレス値は0.1609であった、図1(c)は2019年の1982年採掘地の全土壤データのみの結果で、ストレス値は0.1140であった。この結果、BG(裸地)とRA(ミカヅキグサ)、MJ(ヌマガヤ)の植生土壌における微生物叢の多様性が季節を通して変動するとともに、土壌毎に大きく異なること、1972年採掘地よりも1982年採掘地の方が土壌間の差異が大きいことがわかった。

4. おわりに

本稿は、サロベツ湿原の植生再生困難な2地点の土壌のBacteriaの微生物叢の分析を行った。その結果、NMDSでの裸地とミカヅキグサ、ヌマガヤの植生土壌データ間の距離の遠さから、2018年より2019年、1972年採掘地より1982年採掘地の方が植生の遷移が進んでいる可能性が示された。また、ベン図の結果からは、1982年採掘地の植生の遷移が進んでいる理由に”BHI80-139”、”WPS-2”、”Fusobacteria”と”TPD-58”が関係している可能性が示された。今回は植生土壌のデータを用いたが、今後はより詳細な微生物叢解析のために根圏データを用いて、共生細菌と根圏細菌を含めた微生物叢の解析を行いたい。そして、1972年採掘地より1982年採掘地の方が植生の遷移が進んでいる理由を明らかにし、微生物叢メタゲノム解析を通して、湿原再生に向けた提言を行うことを目指す予定である。

参考文献

- [1] 江川知花, 西村愛子, 小山明日香, 露崎史郎, “北海道サロベツ湿原泥炭採掘地における外来植物の侵入”, 保全生態学研究, 2017, 22, p.187-197
- [2] 露崎史郎, 北海道大学院地球環境科学院, “環境の保全と復元 -サロベツ湿原を事例として-”, <https://hosho.ees.hokudai.ac.jp/tsuyu/top/lecture/old/kokai10.html>, (参照2021-6-17).
- [3] 橋ヒサ子, 富士田裕子, 佐藤雅俊, 松原光利, 周進, “サロベツ湿原の1970年代以降約30年間の植生変化”, 北大植物園研究紀要, 2013, 13(3), p.1-2.
- [4] 斎藤慶四郎, “北海道・下サロベツ原野における自然再生に向けた泥炭採掘跡地状況調査”, NPO法人サロベツ・エコ・ネットワーク, 2009, p.17-19.