

土壌からの DNA/RNA 直接抽出による土壌微生物群集の解析

星野(高田)裕子 (独立行政法人 農業環境技術研究所)

yuko422@affrc.go.jp

要約

これまで困難だった火山灰土からの DNA 及び RNA 抽出を可能にし、この抽出 DNA 及び RNA を用いることで、実際に農薬による土壌消毒が培養困難な微生物を含む土壌中の微生物群集へ与える影響を評価できることを示した。さらに細菌に比べ抽出 DNA/RNA による解析が遅れていた糸状菌については群集構造評価手法を最適化するなど、土壌微生物の評価を行うための基礎技術を確立した。これらの成果は土壌微生物相解析の標準法に採用され、農耕地土壌の解析に広く利用されている。

はじめに

土壌中には高い密度で多様な微生物が存在し、作物の生育に重要な役割を果たしている¹。しかし、農業現場における土壌診断では、土壌の物理性及び化学性が調べられることが多く、生物性に関する報告は限られていた。その原因には生物性を検討するための手法における問題があげられる。現在までによく用いられてきた土壌微生物の調査法には、希釈平板法を用いた培養・分離によるものがあるが、環境中に存在する微生物の 99%以上は現在の技術では培養が困難であり、平板法では微生物相のごく一部しか評価することができない。

近年になって、環境中から直接 DNA を抽出し、微生物群集を解析する分子生態的手法の登場により、環境中の培養困難な微生物の解析が可能になりつつあった。しかし、土壌への分子生態的手法の適用に際しては、依然として DNA 抽出法など実験技術上の問題点がいくつか残されていた²。そこで、本研究では、土壌診断における新しい視点として、培養困難な微生物を含む土壌微生物相の全体像を明らかにし、土壌微生物に対する様々な環境影響を評価するために、土壌から直接抽出した DNA による微生物群集構造解析法を確立することを目的とした。

火山灰土からの DNA 及び RNA 抽出法の確立

土壌からの DNA 抽出法について、標準的な手法は確立されていた³。しかし、日本の畑面積の半分を占め農業上重要な火山灰土（黒ボク土）は、従来の方法では DNA の抽出が困難な場合が多く、このことが日本における土壌への分子生態的手法導入の妨げとなっていた。そこで、簡便で高い収量の得られるビーズ破碎法を採用し、この方法の改良により黒ボク土からの DNA 抽出を目指した。まず、DNA 抽出が困難な原因を検討した。茨城県つくば市の農業環境技術研究所内圃場より採取した黒ボク土を用いて、顕微鏡による直接計数法及び培養法で一般的に知られている密度の土壌微生物が含まれていること、従来法において微生物細胞は十分破碎されていることを確認した。次に DNA 添加・回収実験を行った。添加 DNA 及びその分解産物は抽出液中に検出されず、DNA の土壌粒子への吸着が示唆された²。

そこで、吸着阻害剤としてスキムミルクあるいは RNA を抽出バッファーに添加したところ、土壌由来と考えられる DNA が抽出可能となった（図 1A）。スキムミルク 40 mg/g soil を添加する

ことによって、これまで DNA 抽出の困難であった日本各地の黒ボク土から高い収量の DNA 抽出に成功した。スキムミルクは、RNA に比べ安価で除去が簡単である。また、スキムミルクの添加により 16S リボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子を対象にした PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) による細菌群集構造全体のパターンには影響を与えず、本手法が微生物群集構造解析に適用可能であることを示した²。

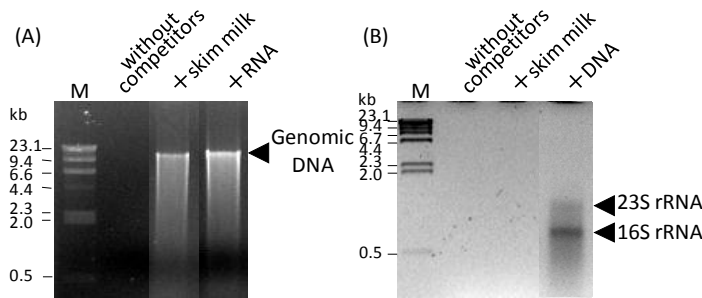


図1 吸着競合阻害剤を用いた火山灰土壌からの DNA 及び RNA 抽出^{2,4}
を除去することで、黒ボク土からの RNA 抽出を可能にした (図1B)^{4,5}。

次に、黒ボク土からの RNA 抽出は DNA 同様に困難であったことから、抽出条件を RNA 用に改変し、同様にビーズ法と競合阻害剤の添加による抽出を試みた。スキムミルクの添加では、RNA は回収できなかった。RNA 抽出時にサケ精子 DNA を添加し、抽出液から DNA

抽出 DNA 及び RNA の環境影響評価への適用—土壌くん蒸処理の微生物群集への影響解析—

土壌くん蒸剤として広く用いられてきた臭化メチル剤の使用禁止に伴い、その代替薬剤への移行が進められる中、これら代替薬剤の環境中における非標的生物への影響が懸念されていた。そこでその影響評価に土壌抽出 DNA 及び RNA による分子生態的解析の適用を検討した。

農業環境技術研究所内圃場ホウレンソウ畑において、クロルピクリン (CP) あるいは 1,3-ジクロロプロペン (1,3-D) により年 1 回土壌くん蒸処理した。この処理が土壌微生物群集に与える影響を前述した手法により調製した土壌抽出 DNA を用い、細菌 16S rRNA 遺伝子及び糸状菌 18S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析により、3 年間追跡した^{4,6}。土壌抽出 DNA を用いた影響解析において、CP 処理により DGGE パターンの変化、多様性指数の低下が見られた (図 2)。DGGE バンドの塩基配列の解析により、培養困難な微生物も影響を受け、処理後生育の早い微生物が優占することを明らかにした。この傾向は、処理後 1 年を経過しても完全には回復せず、微生物群集全体の回復には、培養法の結果から考えられるよりも、時間がかかることが示唆された。また、1,3-D 処理区では、2、3 年目の処理後にパターンに影響が見られたが、CP に比べ影響は小さく、処理 1 年後には無処理区のパターンと区別がつかなかった。

上記の解析において、CP 処理直後には培養法による菌数が低下するにもかかわらず、DGGE パターンに変動が見られなかった。これは微生物が死んでも DNA がしばらく残存していた可能性も考えられることから、代謝回転が速く、生きている微生物をより鋭敏に反映する RNA を対象にした解析を試みた⁴。土壌抽出 DNA 及び rRNA を用いて CP 処理後の細菌群集構造変化を 2 ヶ月間追跡し、両者を比較した。rRNA を用いた DGGE 解析で、DNA

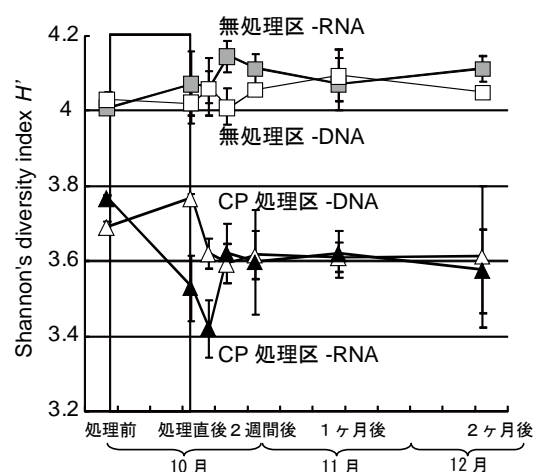


図2 土壌抽出 DNA あるいは RNA を用いた場合のクロルピクリンくん蒸処理後の細菌 16SrDNA を対象にした DGGE パターンにおける多様性指数の変化³

を用いた場合に見られなかった、CP 処理直後の多様性指数の低下が検出された (図 2)。微生物群集の変動をより早く、より高感度に検出することが可能になった。しかし、両者の違いが見られたのは数日間で、処理 1 週間後には DNA 及び rRNA の両方の解析で同様の CP 処理の影響が検出された。短期的な変化の解析においては、rRNA は DNA より鋭敏なバイオマーカーである一方、長期的な影響評価においては DNA と rRNA の間で大きな違いはなく、解析操作の簡便な DNA による解析が適していることが示唆された。

以上のことより、土壌抽出 DNA 及び RNA を用いた手法は、培養困難な微生物を含む土壌微生物群集への環境影響評価に有用であり、DNA と RNA による解析を使い分けることにより、目的に応じた微生物診断が可能であることを示した。

糸状菌群集構造の解析手法の確立

農耕地土壌で糸状菌は重要な役割を担っているにもかかわらず、糸状菌は細菌に比べ分子生態的手法の適用が遅れていた。その原因の一つに用いられる PCR プライマーが統一されておらず、得られたデータの比較が困難という問題があった。そこで糸状菌 18S rRNA 遺伝子を対象にした 4 種類のプライマーセットを、同じ土壌を用いた PCR や DGGE 解析⁷、クローン解析⁸に適用し、それぞれの特性を明らかにした。DGGE 解析による土壌糸状菌相の違いの検出や検出される糸状菌の系統群については、各プライマーセット間で大きな違いはなかったが、PCR 増幅効率や DGGE への適用性、糸状菌配列への特異性、キメラ生成率については違いが見られた。それぞれのプライマーセットに利点と欠点があり、適用する土壌サンプルあるいは用いる解析により最適なプライマーが異なることが示唆された。この結果から農耕地土壌の PCR-DGGE 解析に最適なプライマーセットを見出し、これを用いた手法を精緻化、標準手法として提案した⁹。また、これに加えこれまであまり着目されていなかった土壌古細菌群集についても PCR-DGGE 実験条件を確立し、農耕地土壌で古細菌群が施肥や窒素成分に反応していることを示した¹⁰。

おわりに

環境 DNA を用いた解析により、これまで知られていなかった微生物の存在が明らかになり、これらの微生物も様々な環境変動により影響を受けることが明らかになってきた。本研究で得られた成果から提案した標準手法は、多くの農耕地土壌に適用されている。これらのデータはデータベース化され、現在、作物生産性と土壌生物相との関連性の解析を目指し、データの蓄積と解析が進められている。現場レベルでの問題解決への利用も期待されている。

また、DNA はすべての生物が持つ共通言語の情報源である。土壌 DNA を網羅的に解析することで、土壌や根圏の生態系システムを全体的に解析することが可能になることが期待される。最近はより機能に着目した解析も進展しており、環境 DNA 解析はさらなる発展を見せている。次世代シーケンサーの登場により大規模な解析が可能になるとともに、様々な物質の動きなど機能とリンクしたメタ解析が試みられるようになってきた。これまでブラックボックスであった土壌生態系を明らかにし、機能発現のメカニズム解明を目指したい。

謝 辞

本研究の実施に当たっては多くの方々のご指導とご協力をいただきました。本研究をとりまとめるのに当たり、ご指導とご助言を賜りました北海道大学の松本直幸博士、内藤繁男名誉教授、

東北大学の齋藤雅典教授、農業環境技術研究所の長谷部亮博士、對馬誠也博士、早津雅仁博士、藤井毅博士、森本晶博士（現・東北農業研究センター）に深甚なる感謝を申し上げます。土壌試料を提供いただきました全国各地の農業試験場、大学の皆様には大変お世話になりました。その他、農業環境技術研究所 生物生態機能研究領域、旧・水質保全研究室、農業生物資源研究所 旧・微生物資源チームの歴代スタッフからは有形無形のご援助をいただきました。最後に本農学進歩賞にご推薦下さいました(独)農業環境技術研究所の宮下清貴理事長、ご支援いただきました他関係諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

1. 星野（高田）裕子 (2008) 植物の根に関する諸問題[174] -土壌微生物の分子生物学的解析と作物の生育-. 農業および園芸, 83, 300-305.
2. Hoshino, T. Y., and Matsumoto, N. 2004. An improved DNA extraction methods using skimmed milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ.*, 19, 13-19.
3. 星野（高田）裕子・長谷部亮 (2005) 土壌からの DNA 抽出法（総説）. 環境バイオテクノロジー学会誌, 5, 43-53
4. Hoshino, T. Y., and Matsumoto, N. 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biol. Biochem.*, 39, 434-444.
5. 星野（高田）裕子 (2007) 土壌 RNA を用いた微生物群集構造解析（総説）. 日本微生物生態学会誌, 22, 51-58
6. Hoshino, T. Y., and Matsumoto, N. 2007. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53, 40-55.
7. Hoshino, T. Y., and Morimoto, S. 2008. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 54, 701-710.
8. Hoshino, T. Y., and Morimoto, S. 2010. Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting fungal 18S rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE). *Microbes Environ.*, 25, 281-287
9. 森本晶・星野（高田）裕子 (2008) PCR-DGGE 法による土壌生物群集解析法（1）一般細菌・糸状菌相の解析. *土と微生物*, 62, 63-68
10. Hoshino, T. Y., Morimoto, S., Hayatsu, M., Nagaoka, K., Suzuki, C., Karasawa, T., Takenaka, M and Akiyama, H. 2011. Effect of soil type and fertilizer management on archaeal community in upland field soils. *Microbes Environ.*, in press

Analyses of soil microbial communities by molecular methods using directly extracted DNA or RNA

Yuko Takada Hoshino
(National Institute for Agro-Environmental Sciences)
yuko422@affrc.go.jp