

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 13 年度博士課程進学  
氏名 頼 泰樹  
指導教官名 妹尾 啓史

### 論文題目

## 土壌微生物の群集構造解析法に関する研究

### 1. はじめに

土壌は多種多様な鉱物、土壌有機物で構成され、地域の気候や地形、母材、植生などから影響を受けて生成したものである。その結果、いろいろな場所において一つとして同じ土壌はなく、土壌の多様性は無限であるといえるだろう。ひとにぎりの土壌においてもその中には極めて多様な微視的環境が存在しており、土壌は性質が異なる様々な生物にそれぞれの生活の場を与えている。土壌圏の生物は、生命活動の基盤となる土壌により大きな影響を受けていると考えられ、限りなく多様な土壌の種類、微視的環境を考えれば、微生物という生物群の多様性には土壌という複雑な環境が大きく寄与していると思われる。

土壌には極めて多くの種類の微生物が生息し、植物遺体の分解、植物との相互作用、土壌病害の低減、難分解性有機物の分解などを行っており、土壌微生物群集は土壌生態系における安定な作物生産や物質循環、環境保全などの極めて重要な役割を果たしている。そのため土壌微生物の群集構造を明らかにする試みが古くから行われてきている。しかし、現在のところ土壌微生物の 99%以上が培養できないとされており、培養法に依存した土壌微生物の群集構造解析は実際の微生物群集構造を正確に反映しているかどうか疑わしい。この問題を克服するため、微生物の培養を経ない群集構造解析法が開発されてきた。すなわち各微生物を特徴付けるバイオマーカーを土壌から直接抽出して解析する、あ

るいは土壌の基質代謝能を解析することによりその土壌に存在する微生物の群集構造を明らかにしようとするものである。代表的なものとして

- ・ 土壌から微生物 DNA を直接抽出し PCR で標的配列を増幅し、DGGE などで解析する方法
- ・ 土壌から抽出したリン脂質の脂肪酸組成を解析する方法
- ・ 土壌から抽出したキノンの組成を解析する方法
- ・ Biolog などを用いて基質代謝能を解析する方法

などがあげられる。

筆者はこれまでに土壌中での難分解性腐植の生成機構、とりわけ火山灰土壌においてなぜ難分解性の腐植が集積するのかを明らかにするために、各種土壌における有機物分解過程の解析を試み、有機物分解に関与する微生物の群集構造解析を試みてきた。しかしその過程で、従来の群集構造解析法では日本の代表的な土壌の一つである火山灰土壌を対象とした場合、バイオマーカーの抽出量が極めて少ないことなど、現状ではその解析結果の信頼性に大きな問題があることが判明した。

そこで本博士論文では、土壌微生物の群集構造解析法として土壌抽出 DNA を用いた PCR-DGGE 解析、リン脂質脂肪酸組成解析、キノン組成解析という主要な 3 種類の方法を取り上げ、それらの改良と相互比較を行った。

## 2. 土壌からの DNA 抽出

土壌や汚泥などの環境サンプルから DNA を直接抽出し、その DNA より PCR 反応を用いて解析対象の塩基配列を増幅し、クローニングや PCR-DGGE などを経た解析が現在盛んに行われている。土壌から直接抽出した DNA の塩基配列を解読することにより、培養できない微生物についても系統学的な群集構造や新規の遺伝子に関する情報の入手が可能になるからである。土壌からの DNA 抽出法としては、Zhou ら(1996)や Cullen と Hirsch(1998)、Tsai と Olson(1991)らの方法が代表的である。しかし、これらの方法では日本の主要な土壌の一つである火山灰土壌からは DNA 抽出効率が極めて悪く、また腐植の混入が問題となり、精製操作に時間を要した。

そこで火山灰土壌からも抽出可能でかつ簡便な土壌 DNA 抽出法の開発を試みた。従来法でも非火山灰土壌からは DNA 抽出が可能であったので、火山灰土壌から DNA が抽出できない原因は土壌自体の性質にあると推定した。火山灰土壌はアロフェンなどの非晶質成分により有機物を集積する能力が極めて高いことが知られている。このことから火山灰土壌から DNA が抽出できない原因は土壌による DNA の吸着であるという作業仮説を設け、実験を進めた。抽出条件を詳細に検討した結果、EDTA とリン酸緩衝液の高濃度混合溶液を用いると火山灰土壌からも十分な量の DNA 抽出が可能になった。EDTA やリン酸緩衝液の高濃度での使用は腐植物質の抽出量を増加させるため、従来これらを低濃度で使用する

方法が主であった。しかし、火山灰土壌からの DNA 抽出においては、火山灰土壌の DNA 吸着部位すなわちアロフェンに含まれる活性 Al をキレートあるいはマスキングすることが不可欠であるため、EDTA およびリン酸緩衝液を極めて高濃度で使う必要があったと考えられる。

また DNA とともに土壌から抽出される腐植物質は極微量でも PCR 反応を阻害するため、DNA 抽出後に腐植の除去を目的とした精製操作が必要である。従来法ではこの精製操作は極めて煩雑で時間もコストもかかることが問題であった。極めて高濃度の EDTA やリン酸を使用する新方法では、DNA とともにアロフェンに吸着している腐植物質も多量に抽出される。そこで比較的腐植物質の混入を低減する抽出条件を明らかにするとともに、CTAB 処理と PEG 沈殿という原理の異なる簡便な精製を組み合わせることにより、PCR 可能な高純度 DNA を得ることができる精製方法を開発した。今回開発した抽出、精製方法は非常に簡便であり、しかも PCR 可能な DNA を極めて多量にかつ再現性よく土壌から得られる方法である。

### 3. PCR-DGGE 解析

土壌抽出 DNA を鋳型とした PCR は multitemplate PCR であり、反応前の鋳型比を正確に反映しない PCR バイアス、heteroduplex (相補鎖同士が正しくない組み合わせの二本鎖 DNA) やキメラ鎖の生成など微生物群集の DGGE 解析結果に誤りをもたらす可能性がある。

DGGE 解析の際、特に問題となると思われたのが heteroduplex の生成である。塩基配列が既知の細菌株について 16S rRNA 遺伝子の V3 領域を増幅し DGGE 解析したところ、複数のリボタイプを持つ菌株の中には heteroduplex に由来する泳動パターンを示すものが存在し、この heteroduplex のバンドが群集構造解析の際にも出現する可能性があった。そこで heteroduplex が生成する条件ならびにその解消方法について、既知の細菌株を用いて検討した。その結果 PCR の反応サイクル数が多い場合に heteroduplex 生成率が高くなること、PCR 産物の最大収量 (plateau phase) の約 1/3 量が得られた時点で反応のサイクルを止めることで、DGGE 解析のバンドパターンに影響を与えない程度に heteroduplex の生成をとどめることが可能であることを明らかにした。これまで plateau に達した PCR の問題点は指摘されてきたが、今回の結果から、DGGE などを用いた多様性解析を行う場合は必要最小限のサイクル数で増幅を行う必要があることが示された。なお現在までのところ土壌 DNA の DGGE 解析についてはバンドパターンに変化を与えるような heteroduplex の生成は認められなかった。

### 4. 土壌リン脂質およびキノンの分析

土壌からリン脂質およびキノンを抽出する際、従来、リン脂質は Bligh & Dyer 法、キノンは Folch 法と異なる 2 つの方法で抽出していた。しかしリン脂質もキノンも脂質分子であるので、Bligh & Dyer

法で両者を全脂質として抽出し、それぞれの画分に分画する方法を検討した。

また、リン脂質は脂質分子であるが親水基であるリン酸基を持つことから、DNAと同様にアロフェンに吸着され抽出量が少なくなっている可能性を考えた。そこで抽出の際、高濃度 EDTA-リン酸緩衝液を用いる抽出方法も検討した。

その結果、リン脂質およびキノンを同時に抽出し、その後分画する新方法を確立した。さらにこの新方法では従来法と比較してキノンの抽出量はほとんど変化しないものの、火山灰土壌からのリン脂質の抽出においては最大約 2 倍の収量が得られた。

## 5. バイオマーカーとバイオマスとの相関

土壌バイオマス量は土壌微生物量にほぼ相当し、土壌の生物性や化学性における重要な指標の一つである。リン脂質やキノンなどのバイオマーカー量も微生物量に比例しているはずであり、これまでもこれらのバイオマーカー量と土壌微生物バイオマス量に相関が得られたという報告がある。新方法により土壌 DNA やリン脂質の抽出効率が改善されたことから、得られた土壌 DNA やリン脂質、キノン量が土壌バイオマス量と相関が得られるか、またこれらのバイオマーカー量により土壌のバイオマス量を推定することが可能であるかを検討した。

## 6. おわりに

火山灰土壌は日本の主要な土壌である。火山灰土壌は他の土壌と比較してきわめて特異な理化学的性質を有している。その特異な性質が DNA やリン脂質といった微生物生体成分の抽出に及ぼす影響についてこれまでは十分な検討がなされてこなかった。

本博士論文では火山灰土壌を土壌化学的な側面から再検討した結果、従来は非常に困難とされていた火山灰土壌からの DNA 抽出を、短時間、低コストで行う方法の開発に成功した。この新しい方法により様々な土壌から大量の DNA を抽出することが可能となり、加えて PCR に伴う問題を解決することにより、土壌微生物の群集構造解析の信頼性向上を実現した。さらに主要なバイオマーカーの抽出効率の改善により、土壌微生物の群集構造解析はより定量的なものへと前進した。現在、土壌微生物の研究は、従来の培養法に基づいた研究から DNA などの生体構成成分を利用した培養を経ない研究に大きく転換しようとしている。本博士論文で新たに確立ならびに改良された手法を用いることにより、今後日本の火山灰土壌に関する信頼性の高い土壌微生物学的知見が得られるものと期待される。