

原著論文 (技術論文)

真菌叢解析条件の最適化に関する検討

Exploring the Optimization of the Conditions for Fungal Community Analysis

内田真理子, 水野 憲, 野村 暢彦, 中島 敏明, 内山 裕夫 \*  
MARIKO UCHIDA, KEN MIZUNO, NOBUHIKO NOMURA, TOSHIAKI NAKAJIMA and HIROO UCHIYAMA

筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

\* TEL: 029-853-6626 FAX: 029-853-6626

\* E-mail: uchiyama.hiroo.fw@u.tsukuba.ac.jp

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,  
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: 真菌叢解析, PCR, 土壌団粒

Key words: fungal community analysis, PCR, soil aggregation

(原稿受付 2012年5月28日 / 原稿受理 2012年6月18日)

1. 緒 言

バイオレメディエーションの実施に際し、土着微生物叢の変動を解析し把握することは当浄化技術のヒトへの安全性および生態系への影響を評価する上で重要である。我々は既に細菌の群集構造解析に係るバイアスについて検討し、解析時における問題点を報告した<sup>9,10)</sup>。土壌中には、細菌のみならず真菌、藻類等の様々な微生物や原生動物が存在し、このうち真菌は炭素循環や植生の変動要因、また土壌の物理的環境を制御する因子として、重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>19)</sup>。さらに、動物の遺体や植物の落葉等は細菌と共に真菌の働きによって分解され、真菌には木質化合物分解菌も存在するためバイオレメディエーションにおいてもその分解機能が注目されている<sup>14)</sup>。

本研究では、近年バイオレメディエーションにおいて重要視され始めた真菌に着目し、土壌中の真菌の群集構造を DGGE で解析する際の問題点の抽出およびその対策について検討した。まず PCR 増幅領域の検討を行い、28S rRNA 遺伝子領域が適切と判断した。次いで、平面上に同一土壌を広げて複数個所から土壌を採取した場合、採取ポイントによって得られる真菌叢に差異が生じる事が認められたため、採取ポイントに影響されない解析手法について検討を行った。

2. 材料および方法

2.1. 供試土壌

地理的に異なる採取現場 2 カ所から採土器あるいは移植ゴテを用いて土壌 2 検体を採取し、使用するまではポリエチレン容器にて -30°C で保管した。それぞれ土壌の諸性質を表 1 に示した。なお、土壌の使用に際しては

混入している植物根・礫等を極力除去して用いた。

2.2. 真菌叢解析に適した PCR 増幅領域の検討

真菌叢解析に適切な遺伝子増幅領域の検討は、表 1 に示した黒ボク土 (採取地: 東京都) を用いて行った。供試土壌 30 g をチャック付きポリ袋 (Ziploc, 幅 18 cm × 縦 20.5 cm × 厚さ 0.07 mm) に入れ、袋の上から指で土壌の粒子を十分に潰して均一化した。次いで、土壌を滅菌したステンレス製バット (16 × 20 × 2 cm) 一面に均等となるように広げ、中央部および 4 隅からの計 5 か所からそれぞれ 0.5 g ずつミクロスパーテルにて採取し、DNA 抽出キットに含まれている beads 入りチューブ (Lysing Matrix E) に入れた。DNA 抽出キットには Fast

表 1. 供試土壌の諸性質

項目	黒ボク土壌 東京都	黒ボク土壌 栃木県
土性 <sup>a)</sup>	LiC	CL
粗砂 (%)	7	12.3
細砂 (%)	23.6	33.1
シルト (%)	38.1	34.2
粘土 (%)	31.3	20.4
pH (H <sub>2</sub> O)	6	7.3
電気伝導度 (ds/m)	0.2	0.05
腐食 (g/kg)	79.3	73.7
全炭素 (g/kg)	51.7	43.4
有機物含有量 (W/W%)	15.4	12.2
全窒素 (g/kg)	3.3	2.8
リン酸吸収係数 (g/kg)	15.2	166
塩基交換容量 (cmol(+)/kg)	42.9	20.4

<sup>a)</sup> 各土壌の土性は三角座標 (国際法) に基づいた。  
Lic; 軽埴土 (Light Clay), CL; 埴埴土 (Clay Loam)

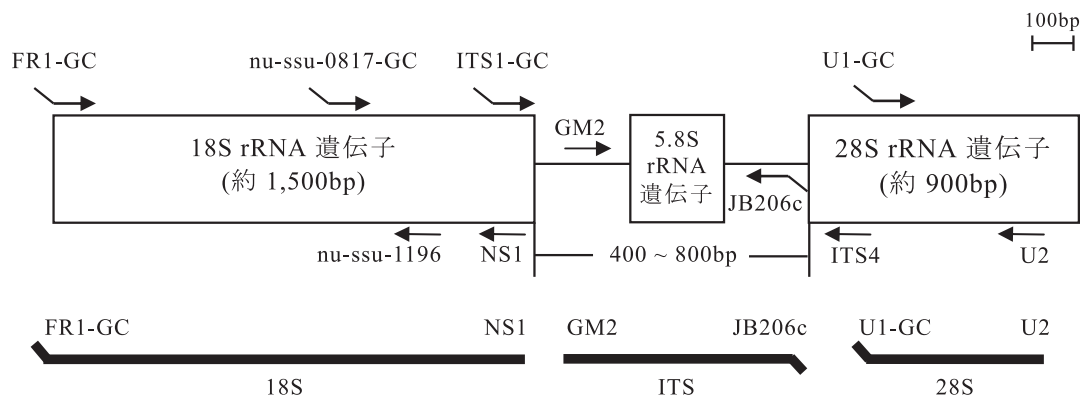


図1. PCR 増幅領域と PCR 産物

プライマー名にある GC は GC クランプを示す。太線は予想される PCR 産物を示す。

表2. 使用プライマーセットの一覧

## DGGE 用プライマーセット

primer	sequence	region	増幅断片長 (bp)	文献
FR1-GC	5'-GC clamp-TTGGTCATTTAGAGGAAGT-3'	18S rRNAgene	約 1650 bp	17
NS1	5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3'			
GM2	5'-CTGCGTTCTTCATCGAT-3'	ITS	約 200 bp	2
JB206c	5'-GC clamp-AAAGTAAAAGCTGTAACAAGG-3'			
U1-GC	5'-GC clamp-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3'	28S rRNA gene	約 260 bp	13
U2	5'-GACTCCTTGGTCCGTGTT-3'			
nu-ssu-0817-GC	5'-GC clamp-TTAGCATGGAATAATRRATAGGA-3'	18S rRNAgene	約 420 bp	1
nu-ssu-1196	5'-GTATTACCGCGGCTGG-3'			
ITS1-GC	5'-GC clamp-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	ITS	約 400~800 bp	2
ITS4	5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3'			

GC clamp=CCCCGCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGCCG

## シーケンス配列決定用プライマー

primer	sequence	region	文献
U1	5'-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3'	28S rRNA gene	13

DNA Spin kit for soil (Q-BIO gene, Irvine, California, USA) を用い、キット添付のプロトコールに従って DNA 抽出を行った。得られた DNA を PCR のテンプレートとし、図1に示した各遺伝子領域を以下(1)~(3)に記した方法で増幅した後、後述する DGGE 法によって真菌叢解析を行った。得られた泳動パターンを比較することによって適切な増幅領域を決定し、以降の真菌叢解析に用いた。

## (1) 18S rRNA 遺伝子を対象とした PCR

0.2 ml 容 PCR 用チューブに、滅菌超純水 12.3  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer (TaKaRa) 2  $\mu$ l, dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6  $\mu$ l, 表2に示した FR1-GC/NS1 プライマーセット<sup>17)</sup> (5  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ l, Ex Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l) (TaKaRa) 0.1  $\mu$ l を加え、混合した。これにテンプレートとして 2  $\mu$ l の全 DNA を添加し、全量を 20  $\mu$ l として PCR に供した。PCR には i-Cycler (BIO-RAD Laboratories Inc.) を使用し、Vainio らの方法<sup>17)</sup>に従って以下の様に行った。初めに変性処理を 94 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。その後の 35 サイクルでは変性処理を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、アニーリング反応を 47 $^{\circ}$ C で 45 秒間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 2 分間行い、これを繰り返した。プログラム最後には伸長反応を 72 $^{\circ}$ C にて 7 分間行い、次いで 4 $^{\circ}$ C にて保存した。

反応終了後、1  $\mu$ l の反応液と等容の 10 $\times$  Loading Buffer (TaKaRa) を混合して 1.5% アガロース (nacalai tesque) ゲル電気泳動に供し、100 V で 30 分間泳動を行った。泳動終了後、0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド (NIPPON GENE) を含む 0.5 $\times$  TAE Buffer で 30 分間染色し、短波長 UV (256 nm) により DNA を可視化して増幅の有無、および単一 PCR 産物が得られる最適テンプレート濃度の確認を行った。

## (2) Internal Transcribed Spacer (以下、ITS 領域) を対象とした PCR

0.2 ml 容 PCR 用チューブ中に、滅菌超純水 12.3  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer (TaKaRa) 2  $\mu$ l, dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6  $\mu$ l, 表2に示した GM2/JB206c プライマーセット<sup>2)</sup> (5  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ l, Ex Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l) (TaKaRa) 0.1  $\mu$ l を加え、混合した。これにテンプレートとして 2  $\mu$ l の全 DNA を添加し、全量を 20  $\mu$ l として PCR に供した。PCR には i-Cycler を使用し、Cosgrove らの方法<sup>2)</sup>に従って以下の様に行った。初めに変性処理を 94 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。その後の 20 サイクルでは変性処理を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、アニーリング反応を 59 $^{\circ}$ C で 30 秒間 (但し、1 サイクル毎に 0.5 $^{\circ}$ C ずつ低下)、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 45 秒間行った。次いで行った 30 サイクル

ルでは、変性処理を 94°C で 30 秒間、アニーリング反応を 49°C で 30 秒間、伸長反応を 72°C で 45 秒間行い、最終サイクルの伸長反応は 72°C で 2 分間行った。プログラム終了後は 4°C に保った。反応終了後、上記と同様にアガロースゲル電気泳動により増幅産物の確認を行った。

### (3) 28S rRNA 遺伝子を対象とした PCR

0.2 ml 容 PCR チューブ中に、滅菌超純水 12.3  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR Buffer (TaKaRa) 2  $\mu$ l, dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6  $\mu$ l, 表 2 に示した U1-GC/U2 プライマーセット<sup>13)</sup> (5  $\mu$ M) 各 2  $\mu$ l, Ex Taq DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ l) (TaKaRa) 0.1  $\mu$ l を加え、混合した。これにテンプレートとして 2  $\mu$ l の全 DNA を添加して全量を 20  $\mu$ l とし、PCR 反応に供した。PCR には i-Cycler を使用し、Meroth ら<sup>13)</sup> の方法に従って以下の様に行った。初めに変性処理を 94°C で 4 分間行った。その後の 35 サイクルでは変性処理を 94°C で 30 秒間、アニーリング反応を 59°C で 30 秒間、伸長反応を 72°C で 45 秒間行った。プログラム最後に伸長反応を 72°C で 5 分間行った。プログラム終了後は 4°C に保った。反応終了後、上記と同様にアガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。

## 2.3. 採取ポイントの違いおよび均一化処理が真菌叢解析結果に及ぼす影響

表 1 に示した黒ボク土 2 種類を用いて、異なる採取ポイントから得た土壌の真菌叢を比較・解析した。2.2 と同様に土壌をステンレス製バット上に広げ、3 か所から 0.5 g ずつ採取した。但し、3 か所が正三角形の頂点に位置するようにした。それぞれの土壌を DNA 抽出キットに含まれている beads 入りチューブに入れ、バット上に残った土壌全量は滅菌した乳鉢に移した。クリーンベンチ内で 5 分間乳棒を用いて搗り潰し、再び同様にバットに移して薄く広げ、3 か所から土壌を 0.5 g ずつ採取した。以下同様にして、搗り潰す時間の合計が 5 分、10 分、20 分、30 分、40 分になるように操作して土壌試料を調製した。なお、搗り潰し過程で水分が蒸発するため、適宜滅菌水を添加した。DNA 抽出に際しては、抽出効率を向上させるため各 beads tube にスキムミルクを 20 mg 添加し、キットに添付されたプロトコールに従って行った。得られた全 DNA をテンプレートとし、2.2 (3) に示した方法で PCR を行った。

## 2.4. PCR 産物の精製

PCR 産物 100  $\mu$ l を Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit (MO BIO) に供し、未反応プライマーおよび酵素の除去を行った。得られた反応液に 5 倍容量の Spin Bind (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) を加え、ピペティングで混合した後、Spin Filter (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) に入れた。これを 13,000 $\times$ g で 1 分間遠心分離 (TOMY, MX-160 型) し、ろ液を捨てた後、フィルターに 300  $\mu$ l の Spin Clean (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) を加えて 13,000 $\times$ g で 1 分間遠心分離した。ろ液を捨ててさらに 14,000 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、フィルターのみを新しい Collection Tube (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) に移し、50  $\mu$ l の Elution

Buffer (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) を加えて 14,000 $\times$ g で 1 分間遠心分離し、チューブ内に精製物を得た。

精製終了後、2  $\mu$ l の精製物と 0.5  $\mu$ l の 10 $\times$ Loading Buffer (TaKaRa) を混合して 2% アガロース (nagalaitesque) ゲル電気泳動に供し、100 V で 30 分間泳動した。泳動終了後、0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド (NIPPON GENE) を含む 0.5 $\times$ TAE Buffer で 30 分間染色し、短波長 UV (256 nm) により精製の確認を行った。また、吸光度計 (BECKMAN COULTER: DU 640) を用いて短波長 UV (260 nm) により DNA 濃度を求めた。さらに短波長 UV との比 (260 nm/280 nm) により DNA が精製された事を確認した。

## 2.5. DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法

DGGE には、D-Code Universal Mutation Detection System (BIO-RAD Laboratories Inc.) を用い、同社のプロトコールに従ってゲルを作成した。8% アクリルアミドゲル中の変性剤濃度勾配を、(1) 18S rRNA 遺伝子領域の増幅サンプルでは 18%~43%、(2) ITS 領域の増幅サンプルでは 25%~45%、(3) 28S rRNA 遺伝子の増幅サンプルでは 35%~65% (変性剤 100% とは 7 M 尿素、40% ホルムアミドを示す) に設定した。上記で精製した PCR 産物に等容の 2 $\times$ Dye Solution (NIPPON GENE) を加え、DGGE に供した。なお、各レーンに供する DNA は同一量とした。泳動は D-Code を用いて、0.5 $\times$ TAE buffer 7 l, 60°C, 50 V で 18 時間行った。

泳動終了後、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) を 0.5 $\times$ TAE Buffer で 10,000 倍に希釈した溶液で 30 分間染色し、Printgraph (ATTO) を用いて短波長 UV (300 nm) により DNA を可視化し、泳動パターンを撮影した。

## 2.6. 特異的な DGGE バンドの塩基配列解読

DGGE ゲルから特異的な DNA バンドをメスによって切り出し、1.5 ml 容チューブに適量の TE と共に一晩 4°C にて静置した。ゲルから溶出した DNA をテンプレートとし、プライマーには U1-GC/U2 プライマーセット (表 2) を用い、2.2. (3) に示した方法で PCR を行った。その後、2.4. と同様の方法で PCR 産物を精製し、これをテンプレートとしてシークエンス反応に供した。シークエンス反応には ABI PRISM<sup>TM</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) を用い、以下の方法で行った。0.2 ml 容チューブに、滅菌超純水 3.86  $\mu$ l, Terminator Ready Reaction Mix (上記キット) 1  $\mu$ l, Big Dye Dilution Buffer (上記キット, 400 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) 1.5  $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l の U1-GC プライマー溶液 0.64  $\mu$ l (終濃度 0.32 pmol/ $\mu$ l), そしてテンプレート DNA (5~20 ng) 2  $\mu$ l を加え、全液を 10  $\mu$ l として i-Cycler を用いて PCR を以下の様に行った。初めの変性を 96°C で 1 分間行った後、その後は変性を 96°C で 10 秒間、アニーリングを 50°C で 5 秒間、伸長反応を 60°C で 45 秒間とするサイクルを 25 回繰り返す。プログラム終了後は 10°C に保った。次いで、1.5 ml 容チューブに、反応後のサンプル 10  $\mu$ l を移し、1  $\mu$ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 1  $\mu$ l の 125 mM EDTA



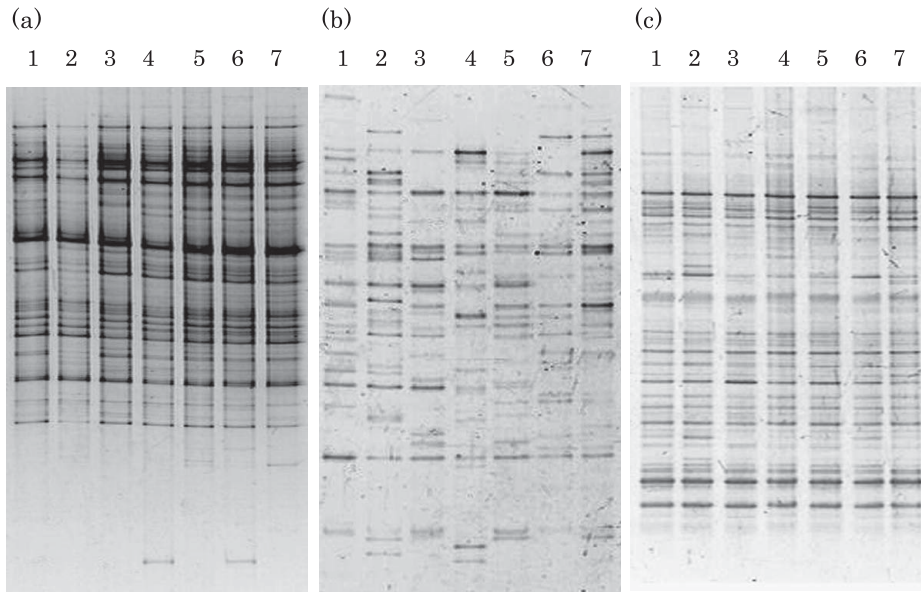


図2. 各増幅領域を対象とした真菌叢解析

(a) 18S rRNA 遺伝子, (b) ITS 領域, (c) 28S rRNA 遺伝子

1~5: 採取ポイントを示す。6: 1~5 の各ポイントから等量ずつ採取し、混合した。7: 土壌の団粒を潰さずに 1 ポイントから採取した。

を加えて攪拌した。そこへ 36  $\mu$ l の 99.5% エタノールを加えて軽く攪拌した後、15 分間室温で静置した。その後、20°C、13,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を取り除いて沈殿を回収した。次に、250  $\mu$ l の 70% エタノールを加え、軽く転倒攪拌をした後、20°C、13,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を取り除いた。最後に、20°C、13,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い、エタノールを出来るだけ取り除いて沈殿を回収し、室温で 30 分間乾燥させた。これをシークエンス用サンプルとした。解析に供す前にサンプルに 20  $\mu$ l のホルムアミド (nacalaitesque) を加えて溶解させ、i-Cycler を用いて 95°C で 2 分間の熱処理を施し、DNA シークエンサー ABI3130 (Applied Biosystems) に供した。

得られたデータをシークエンス解析ソフト DNASIS pro (HITACHI Software Engineering) を用いて解析し、相同性検索は the National Center for Biotechnology Information の BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) を用いて行った。

## 2.7. 主成分分析

DGGE のバンドパターンを基にして、統計学的手法を用いて真菌群集構造の類似度について解析した。まず、DGGE の泳動画像を画像解析システム Image Master (Amersham Pharmacia Biotech.) を用いて解析し、各バンドの移動度と輝度を求めた。これは、移動度の異なる各バンドの輝度を変数とし、そのレーンの全バンドの輝度総量に対する割合を値としたものである。次に、サンプル間の相関関係をより明確に可視化するため、上記のパターン解析した結果を主成分分析 PCA (Principal Component Analysis) に供した。解析ソフトには Pirouette 2.6 (Informetrix Inc.) を用いた。主成分分析では、プロット間の距離が短いほどサンプル同士の菌叢が類似していることを示す。解析図では、最も多くの情報が反映

するように作られた軸を第一主成分 (PC1)、2 番目に反映するように作られた軸を第二主成分 (PC2) とし、各成分の全情報に対する反映度を表す指数を寄与率として表した。

## 3. 結果

### 3.1. PCR 増幅領域の検討

黒ボク土 (採取地: 東京都) から抽出した全 DNA をテンプレートとして図 1 に示した 3 カ所の遺伝子領域を PCR で増幅し、DGGE 法にて菌叢解析を行った結果を図 2 (a)~(c) に示した。増幅対象領域として 18S rRNA 遺伝子のほか、真菌の菌叢解析に広く用いられている ITS 領域および 28S rRNA 遺伝子を選択したが、いずれの領域を増幅しても、同一土壌由来の DNA サンプルであるにも拘らず採取ポイントの違いによって異なる菌叢解析結果が示された。特に ITS 領域を対象とした場合、菌叢に顕著な差異が認められた。サンプル間の差異が少なく、且つ、増幅断片長も約 260 bp と DGGE 法に適している 28S rRNA 遺伝子領域 (U1-GC/U2 プライマーセット) を PCR 増幅対象として真菌叢解析を行うこととした。

本研究を行うにあたり、上記 3 種のプライマーセットのほか 18S rRNA 遺伝子を対象とする nu-ssu-0817-GC/nu-ssu-1196 プライマーセット<sup>1)</sup>、ITS 領域を対象とする ITS1-GC/ITS4 プライマーセット<sup>2)</sup> も用いて検討したが、いずれにおいても明瞭な DGGE バンドパターンを得ることができなかったため、以降の検討では対象外とした。

### 3.2. 異なる採取ポイント間の真菌叢の比較および均一化処理の影響

2 種の黒ボク土をそれぞれ手で搗り潰して均一化し、

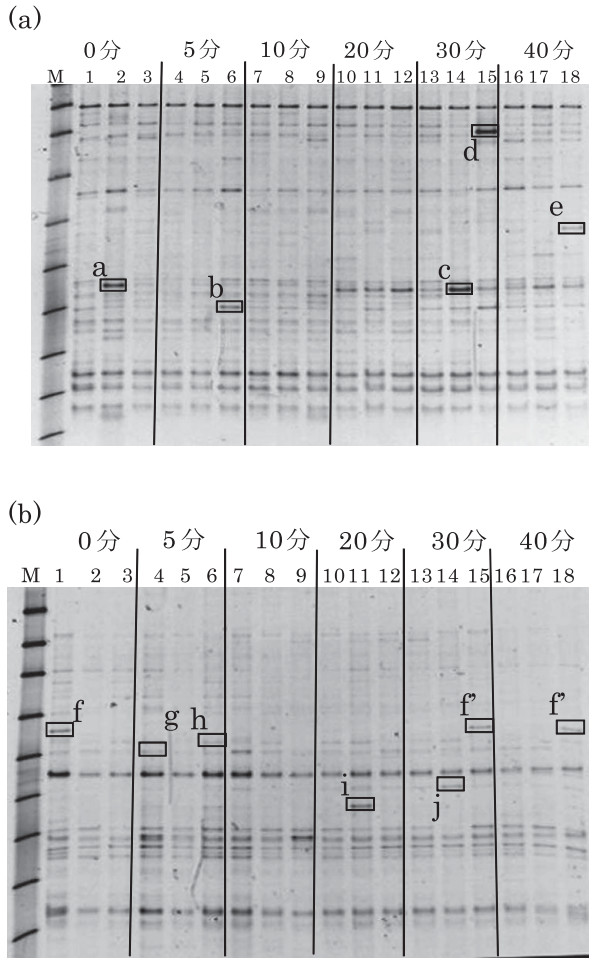


図3. 異なる均一化処理時間における真菌叢の DGGE 解析  
 (a) 黒ボク土 (東京都) (b) 黒ボク土 (栃木県)  
 1~3: 処理時間 0分 4~6: 処理時間 5分 7~9: 処理時間 10分 10~12: 処理時間 20分 13~15: 処理時間 30分 16~18: 処理時間 40分 M: マーカー  
 図中のアルファベットで示したバンドを切り出し、シーケンスを解読した。

バットに広げたのちに異なる 3 カ所からサンプリングして解析した DGGE プロファイルを図 3 (a) (b) に示した。併せて、均一化処理時間を 40 分まで行った際のプロファイルも示した。処理時間 0 分すなわち手で均一化し乳鉢による均一化を施さなかったサンプルにおいては、採取ポイントによってプロファイルが異なり、図 2 で認められた差異が再現された。

一方、乳鉢による処理時間を延長しても、この差異は解消されず、処理時間ごとに得られる菌叢に変化が生じた。特に、黒ボク土 (採取地: 東京都, 図 3 (a)) ではゲルの中間位置に、黒ボク土 (採取地: 栃木県, 図 3 (b)) では比較的上部の位置に差異が多く認められた。

### 3.3. 採取ポイント間で異なるバンドのシーケンス解析

DGGE プロファイルにおいて採取ポイント間で異なったバンドについては切り出し、塩基配列の解読を行って相同性を調査した。その結果、黒ボク土 (東京都) のバンド a は *Chaetomella raphigera* (98%), b は *Myrothe-*

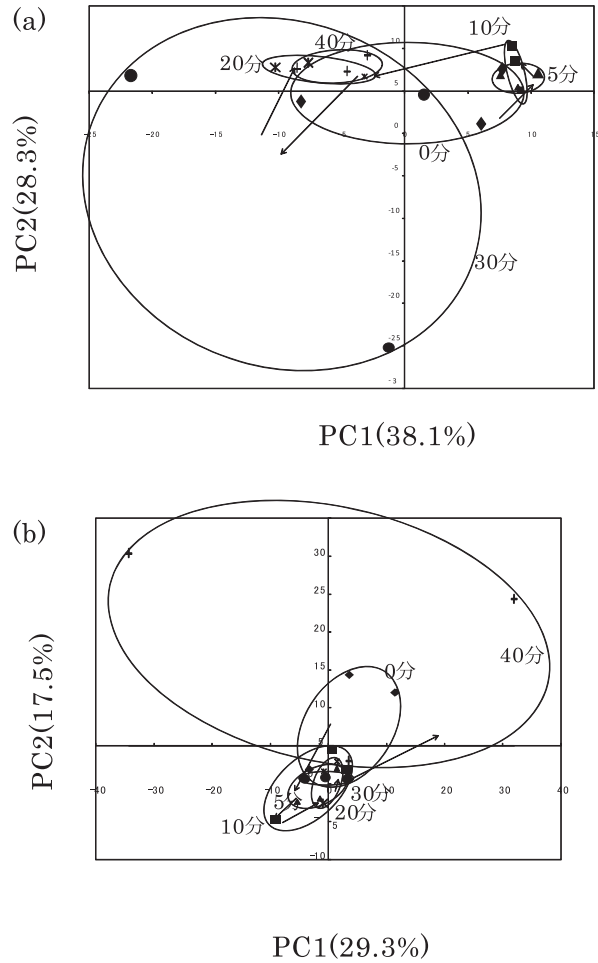


図4. 異なる均一化処理時間における真菌叢の PCA 解析  
 (a) 黒ボク土 (東京都), (b) 黒ボク土 (栃木県)  
 0分: ◆, 5分: ▲, 10分: ■, 20分: \*, 30分: ●, 40分: +

*cium verrucaria* (99%), c は *Sphaerobolus stellatus* (95%), d は *Nolanea sericea* (97%), e は *Bionectria pityrodes* (86%) に近縁であった。バンド a, b, e は子嚢菌であり、バンド c, d は担子菌である。また、黒ボク土 (栃木県) のバンド f は *Ascobolus denudatus* (97%) (なお f' は f と同一であった), g は *Ascobolus denudatus* (97%), h は *Ascobolus denudatus* (97%), i は *Spooneromyces laeticolor* (94%), j は *Sporormiella dakotensis* (100%) に近縁であり、これらは全て子嚢菌であった。従って、ある特定の真菌の存在によって採取間ポイントに差異が生じているのではないことが示唆された。

### 3.4. 主成分分析 (PCA) による DGGE プロファイルの比較

図 3 で得られた DGGE プロファイルを PCA に供し、その結果を図 4 (a) (b) に示した。(a) では、処理時間を 5 分、10 分および 20 分と行うことによって採取ポイント 3 点間の菌叢の差異が減少し類似化されたが、30 分処理では差異が拡大し、40 分で再び類似化された。一方 (b) では、処理時間が 30 分までは類似化の効果が

見られたが、40分では再び差異が拡大した。以上より、いずれの土壌においても均一化処理によって菌叢の類似化効果は得られたが、より長時間行うことによって差異は拡大することが明らかとなった。

#### 4. 考 察

##### 4.1. PCR プライマーの性質と真菌叢解析における有効性

真菌叢解析の対象として 18S rRNA 遺伝子、ITS 領域、28S rRNA 遺伝子があるが、各領域にはそれぞれの特徴がある。18S rRNA 遺伝子を増幅する FR1 プライマー<sup>18)</sup> と NS1 プライマー<sup>16)</sup> は、木材に棲息する真菌を DGGE で解析する際に利用されている<sup>17)</sup>。また、土壌真菌の多様性解析にも用いられており、他のプライマーセットと比較して多様性が多く検出できる<sup>7,8)</sup> ことから DGGE 法にも適していると考えられ、本研究の検討対象とした。また、ITS1 領域を増幅する GM2/JB206c プライマーセットは、DGGE を用いた汚染物質分解菌の特定<sup>2)</sup> や、土壌真菌のコミュニティを調査する際に使用されている<sup>19)</sup>。ITS 領域に関するデータベースは豊富であり、環境中の菌種の特定に有効である<sup>15)</sup>。一方、28S rRNA 遺伝子の 260 bp の部分を増幅する U1/U2 プライマーセットは Sandhu ら<sup>16)</sup> により開発され、病原菌の特定に関する研究の他、環境や食品中等の真菌の DGGE 解析にも利用されている<sup>5,13)</sup>。

本研究では 5 種のプライマーセットを比較したが、NS1、FR1 プライマーセットを用いた 18S rRNA 遺伝子領域の増幅では断片長が 1650 bp と長いため DGGE 法における分離が優れているとは言えず<sup>7)</sup>、また PCR 段階で長い配列の増幅に起因するキメラが多く生成されてしまう<sup>7)</sup> ことも指摘されている。Hoshino ら<sup>7,8)</sup> は 18S rRNA 遺伝子領域内を増幅する 4 種のプライマーセット (約 350 bp を増幅する① NS1/GCFung と② FF390/FR1-GC、約 1650 bp を増幅する③ NS1/FR1-GC と④ NS1/EF3 と NS1/FR1-GC の組み合わせ) についてそれぞれの PCR 効率や特異性、DGGE における多様性検出等について比較し、より短い領域を増幅する NS1/GCFung が真菌叢解析に最も適していると報告している。本研究では、長い増幅断片におけるキメラの発生頻度や DGGE 泳動におけるバンドの分離性については検討していないが、同様の問題点が危惧されるため長い領域の増幅は望ましくないと考える。

ITS 領域を対象とした真菌叢解析では、採取ポイント間により差異が大きくデータの評価が困難である事が示された (図 2)。一方、28S rRNA 遺伝子を増幅する U1-GC/U2 プライマーセットを用いた DGGE では、採取ポイント間による菌叢差異が小さいことや、バンドの分離が良好である事が確認された。また、Sandhu ら<sup>16)</sup> により病原菌の特定が 28S rRNA を対象として行われ、病原菌を特定するデータが豊富であるため、バイオレメディエーションの安全性を確保するという観点からも汚染サイトにおける病原菌の調査には本領域を対象とした解析は有効であろうと考えられる。さらに、U1-GC/U2 プライマーセットで増幅される断片長は約 260 bp であり、DGGE 法に適した断片長である。従って、本研究では

U1-GC/U2 プライマーが真菌叢の解析に適切であると判断した。

##### 4.2. 土壌均一化処理が真菌叢解析に及ぼす影響

土壌中における微生物の分布に関し、土壌試料の洗浄によって容易に回収される微生物は土壌団粒の外部 (表面、または比較的大きな孔隙) に存在し、音波処理によって回収されるものは団粒内部 (または比較的小きな孔隙中) に存在するとされている。真菌は細菌よりも菌体サイズが大きいため団粒内部に入り込むことが困難であり、団粒間やその表面に孢子または菌糸体の状態で存在している<sup>3,6)</sup>。また、菌糸の分布密度は不均一であり、細菌と比較して分布がより不均一になり易いと考えられる。筆者らの研究によれば、細菌を対象とした菌叢解析では採取ポイント毎で得られる菌叢に差異が生じることは認められなかったが (未発表データ)、真菌を対象とした場合、図 2 に示した様に採取ポイント毎に差異が生じる事が確認された。これは、細菌と真菌の土壌における棲息状況の違いに起因しているものと考えられる。本研究では、土壌を乳鉢ですり潰すことによって均一化し、採取ポイント毎の差異を減少させることを試みた。その結果、すり潰し時間を長くすることによって採取ポイント間の菌叢を類似化することができたが、更に延長すると菌叢の差異を増大させることが示された。また、DGGE プロファイルから、均一化処理時間の違いによってバンドの濃淡が比較的変動する現象は、存在比が比較的低い真菌由来のバンド (輝度の低いバンド) に見られた。DGGE の結果を定量的に論じることは適切ではないが、これらの原因として真菌の不均一分布の他に、PCR バイアスや均一化操作中における DNA のスクレアーゼ分解等も考えられる。土壌を一定時間処理して抽出した DNA をアガロースゲル電気泳動で確認した結果、すり潰し時間が長くなるに従って DNA の断片化が確認されたが、室温でのすり潰し操作のため土壌中のスクレアーゼが作用し、断片化が進行した可能性も考えられた。4°C にて同様の操作を行ったところ断片化をある程度防げたことから (未発表データ)、より厳密な真菌叢解析には低温環境下での操作が推奨される。本研究では操作の簡便性に配慮し室温にて操作を行ったが、10分~20分間の乳鉢による均一化処理が適切であることが示された。土壌環境・構造は複雑であるため、黒ボク土以外の土壌を対象とする際には、別途、条件検討を行う必要があるであろう。

##### 4.3. 採取ポイント間で異なる DGGE バンドの解析

採取ポイント間で異なるバンドを切り出し、塩基配列を解析した結果、子囊菌類および担子菌類が同定された。菌界はツボカビ類、接合菌類、子囊菌類、担子菌類などから構成されているが、このうち、子囊菌、担子菌が検出された原因は不明である。検出された菌種のポピュレーションが低いためにすり潰し処理を行ってもその分布が均一化されにくいためのものか、あるいは子囊菌、担子菌に固有の特性が関与しているのか、さらには供試土壌にはそれらが優占しているためなのか、さまざまな推測ができるがいずれも憶測の域を越えず今後の検討を要す。



#### 4.4. 真菌叢解析手法の展望

土壌は固相、液相、気相からなるが、固相を形成するシルト・砂等の土壌粒子は有機物や粘土によって吸着し、粒団を形成している。粒団は植物根や根から放出される有機物によって結びつけられて団粒を形成し、団粒によって作られる構造が団粒構造と称されている<sup>11)</sup>。団粒には0.25 mm以下のマイクロ団粒と、マイクロ団粒や粘土、シルトの塊が複合凝集したマクロ団粒が存在する<sup>9)</sup>。また、土壌には孔隙が多く存在し、水分が保持されにくい非毛管孔隙と毛管力によって水分が保持されている毛管孔隙がある<sup>9)</sup>。このような複雑な土壌中において、真菌はその菌糸の幅からマイクロ団粒の内部よりも団粒間や表面や非毛管孔隙に存在していると考えられている<sup>4,6)</sup>。本研究では土壌の挿り潰しによって均一化を図ったが、これによってマクロ団粒が破壊され、表面および団粒間に存在する真菌のDNAを抽出することができたものと思われるが、マイクロ団粒中の真菌DNAが抽出されたか否かについては不明であり、超音波処理等のより強力な破壊・抽出法を検討する必要があるであろう。

また、真菌叢解析に際しては土壌の均一化とともにPCR増幅領域の適正化をさらに検討する必要がある。Hoshinoら<sup>7)</sup>は、18S rRNA遺伝子を対象としPCR-DGGEに適切な増幅領域の検討を行い、NS1/GCFungプライマーセットの使用が適切であることを報告しているが、併せて水田土壌に適用した場合には原生動物も検出されることを指摘している。本研究で用いた28S rRNA遺伝子を対象とするプライマーセットは真菌に高い特異性を示すことが報告<sup>10)</sup>されてはいるが、今後、18S rRNA遺伝子、ITS領域、28S rRNA遺伝子を対象としてさらに特異性の高いPCR増幅領域を検討することが望まれる。

#### 謝 辞

本研究は、経済産業省平成17～21年度環境対策技術開発等（バイオインダストリー安全対策調査）事業の一部として実施したものである。

#### 文 献

- Borneman, J. and R.T. Hartin. 2000. Primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4356–4360.
- Cosgrove, L., P.L. McGeechan, G.D. Robson, and P.S. Handley. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(18): 5817–5824.
- 土壌微生物研究会編. 1981. 土の微生物. 博友社. pp. 35–37.
- Foster, R.C. 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biol. Fertil. Soils.* 6: 189–203.
- Garofalo, C., G. Silvestri, L. Aquilanti, and F. Clementi. 2008. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of *Panettone*. *J. Appl. Microbiol.* 105(1): 243–254.
- 服部 勉, 宮下清貴, 齋藤明広. 2008. 土の微生物学. 養賢堂. pp. 34–44.
- Hoshino, Y.T. and S. Morimoto. 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.
- Hoshino, Y.T. and S. Morimoto. 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(4): 281–287.
- 加藤芳章, 内田真理子, 青木智子, 野村暢彦, 中島敏明, 内山裕夫. 2010. 各種市販キットを用いた土壌DNAの抽出および細菌叢解析結果の比較. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 10(2): 109–114.
- 竹内絵美, 内田真理子, 小野里奈, 野村暢彦, 中島敏明, 内山裕夫. 2010. DNA抽出が困難な土壌の細菌叢解析およびその問題点. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 10(2): 115–119.
- 松中照夫. 2003. 土壌学の基礎: 生成・機能・肥沃度・環境. 農山漁村文化協会. pp. 83–84.
- May, L.A., B. Smiley, and M.G. Schmidt. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can. J. Microbiol.* 47: 829–841.
- Meroth, C.B., W.P. Hammes, and C. Hertel. 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 7453–7461.
- Novotny, C., K. Svobodova, P. Erbanova, T. Cajthaml, A. Kasinath, E. Lang, and V. Sasek. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1545–1551.
- O'Brien, H.E., J.L. Parrent, J.A. Jackson, J-M. Moncalvo, and R. Vilgalys. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9): 5544–5550.
- Sandhu, G.S., B.C. Kline, L. Stockman, and G.D. Roberts. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33(11): 2913–2919.
- Vainio, E.J. and J. Hantula. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 104(8): 927–936.
- White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, NY.
- Wu, T., D.O. Chellemi, J.H. Graham, and E.N. Rosskopf. 2008. Assessment of fungal communities in soil and tomato roots subjected to diverse land and crop management systems. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1967–1970.