

土壌からの DNA 抽出法

DNA Extraction from Soil

星野(高田)裕子^{1*}, 長谷部 亮^{1,2}

YUKO TAKADA HOSHINO and AKIRA HASEBE

¹ 独立行政法人農業環境技術研究所 〒305-8604 つくば市観音台3-1-3

² 現, 農林水産省農林水産技術会議事務局 〒100-8950 東京都千代田区霞が関1-2-1

* TEL: 029-838-8267 FAX: 029-838-8267

* E-mail: yuko422@affrc.go.jp

¹ National Institute for Agro-environmental Sciences, 3-1-3, Kan-nondai, Tsukuba 305-8604, Japan

² Present Address: Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 1-2-1, Kasumigaseki, Chiyodaku, Tokyo 100-8950, Japan

キーワード: 土壌 DNA, 菌体回収法, 直接溶菌法, 火山灰土(黒ボク土)

Key words: Soil DNA, Cell Extraction Method, Direct (in situ) Lysis Method, Volcanish ash soil (Andisol)

(原稿受付 2004年10月4日/原稿受理 2005年2月22日)

1. はじめに

環境バイオテクノロジーにとって、土壌は様々な側面で重要である。土壌は環境バイオテクノロジーの適用対象の一つであり、そこに棲息する微生物の生態・機能に関する科学的知見はこの技術による土壌環境改善に不可欠である。一方、土壌は豊富な遺伝資源を持つ微生物の宝庫で²⁾、環境バイオテクノロジーを支える個別技術素材を提供している。

しかし、土壌微生物の重要性及び可能性は認識されながら、これまでその全体像を知ることは困難であった。土壌及び土壌生態系の複雑さ、そして、その複雑さを解析する手法がなかったことが原因に挙げられる。土壌微生物は、複雑な組成、構造を持つ土壌中で不均一に分布し³⁾、土壌粒子との結合状態等存在形態も様々である^{3,9)}。さらに、多くの環境で存在する微生物のうち、これまで長年微生物研究に用いられてきた培養技術で培養されるものは1%に満たない²⁾。

その中で、環境中に存在する微生物由来の DNA を直接解析する手法が注目されている。これらは環境 DNA (eDNA) と呼ばれる。統計用語で真の母集団と抽出された標本の期待値の差をバイアスというが、微生物群集を調べるため培養法を用いる場合、培地などの培養条件により特定のものしか回収できないためこのバイアスが大きくなる。このことは、微生物群集の多様性を大幅に過小評価する結果につながる。環境 DNA を用いた分子生物学的手法を導入することで、培養法では全貌をつかむことが難しかった環境中の微生物群集をより少ないバイアスで明らかにでき、培養することなく組換え体や病原菌などの特異的な遺伝子を追跡できる²⁾。また、現在まで知られていなかった遺伝資源にアクセスが可能にな

る³⁴⁾。地球上で最後のフロンティアと呼ばれる土壌において、DNA を直接抽出することは真理探究のための重要な鍵であるといえよう。

土壌からの DNA 抽出は他の環境に比べ困難ではあるが、これまでに分子生物学実験に用いるためのさまざまな DNA の抽出法が報告されている。土壌からの DNA 抽出法は大きく2種類に分けられる。土壌から微生物画分を回収した後、これらから DNA を抽出する間接抽出法—菌体回収法 (Cell Extraction Method) と、土壌中で溶菌し DNA を回収する直接抽出法—直接溶菌法 (Direct Lysis Method) である(図1)。抽出法は DNA 収量、DNA 長さや純度などの質、すべての微生物から偏りなく DNA を抽出できているかなどの点で評価される。それぞれの手法について改良が進められてきたが、すべての点で優れた手法というのは現在のところ存在しない。また、研究の目的によっても、DNA 抽出法の評価は変わってくる。

PCR と 16S rDNA の遺伝子解析による微生物群集解析は未知の微生物群の存在を示唆し、土壌微生物研究に大きな変化をもたらした。さらに、ここ1~2年でパラダイムシフトと言っているほどのもう一つの大きな変化が起きている。微生物のゲノム解析の進展とともに、個々の菌株からでなく環境中に存在する微生物のゲノムを丸ごと解析する研究が展開している。環境の微生物を種という単位からゲノム単位でとらえるという概念の転換である。このように環境 DNA をどうとらえるかという視点も変化してきている。本稿では、まず2種類の土壌 DNA の抽出法についてそれぞれの開発の歴史や特徴を概観する。環境 DNA に対する視点の変化は、抽出法に対する評価も変化させている。次に各法で用いられている具体的な手法を最新の知見を交え紹介する。また、

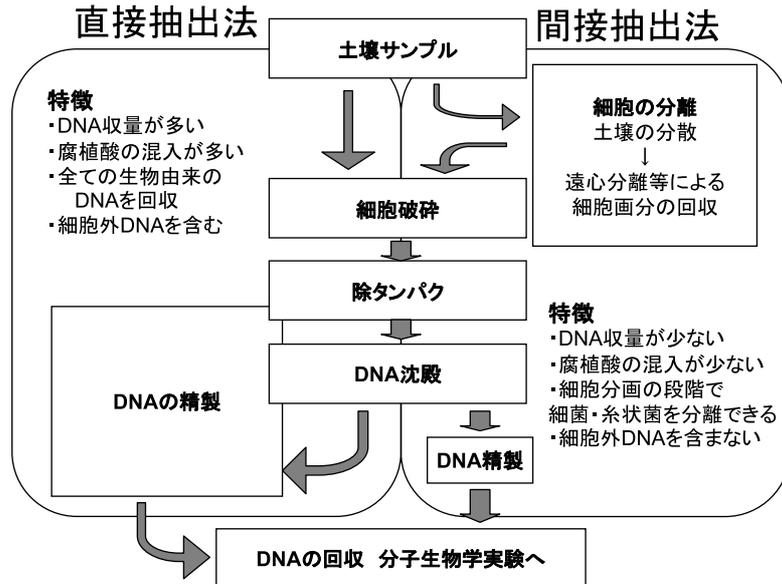


図1. 間接抽出法と直接抽出法のストラテジーと特徴。

DNA 抽出法は欧米の土壌を中心に開発されたが、日本に幅広く分布する火山灰土については最近まで抽出が困難であった。火山灰土壌からの DNA 抽出法についても紹介したい。

2. 間接抽出法と直接抽出法—開発の歴史と各手法の特徴—

生物体からの DNA 回収は、分子生物学の基本操作の一つである。純粋培養された微生物から DNA を回収することは早くから開発された技術であったが、多くの夾雑物を含む土壌から微生物 DNA を微生物の培養過程を経ずに回収することは誰もが困難であると考えていた。1980年ノルウェーの土壌微生物学者である Torsvik は、この既成概念をうち破り、土壌から遠心分離法により細菌細胞を分画した後、培養過程を経ずにそのまま溶菌させ DNA を回収すること（間接抽出法—菌体回収法 (Cell Extraction Method)）に成功した。土壌からの菌体回収法は初め Faegri らが土壌細菌由来バイオマスの定量のため開発したもので²³⁾、その後 Torsvik がこの得られた細胞画分から土壌細菌由来の DNA 回収に成功した⁹⁴⁾。この発表を皮切りに世界中の土壌微生物研究者が土壌からの微生物由来 DNA の回収法の改良に取り組んだ。Holben らはこの間接抽出法により得た土壌 DNA を用いて direct hybridization probing 法により遺伝子組換え微生物の検出に成功している³⁹⁾。

しかし、間接抽出法では全ての微生物が偏り無く回収できているか、という点について早くから疑問が呈されていた⁶⁶⁾。土壌中の微生物は、団粒の内部に含まれていたり土壌粒子に結合した状態であったりと、その存在形態は様々である。そのため、回収されないまま残る微生物が多く存在し、解析される微生物は土壌微生物全体を反映していないと考えられる⁴⁸⁾。その上、このオリジナルの手法は、60~90 g の土壌を用い、最低3日間を要する非常に煩雑で労力のかかる作業であった。そこで、よ

り土壌微生物全体を反映する DNA を得るための手法として、Ogram らにより直接抽出法 (Direct Lysis Method) が開発された⁶⁶⁾。Ogram らは、SDS を含むリン酸ナトリウムバッファー中で底泥サンプルを 70°C 加熱の後、底泥と等量のガラスビーズを加え振とう破碎処理することで、微生物画分を分離することなく、底泥マトリックス中で溶菌を行った。その後、ポリエチレングリコール (PEG) で DNA を回収、塩化セシウム密度勾配遠心とハイドロキシアパタイトカラムを用いて精製を行い、核酸ハイブリダイゼーション実験に用いるのに十分な純度の DNA 回収に成功している。直接抽出法はバイアスの大きな原因と考えられる微生物の土壌からの分離作業を経ないために、間接抽出法に比べより少ないバイアスで非常に高い収量の土壌微生物 DNA が、より簡便に得られる^{54,82,90)}。また、直接抽出法では高い収量が得られるため実験のスケールダウンが可能であり、多くのサンプルを同時に処理できるようになった。直接抽出法では、土壌に多く含まれる腐植物質が DNA と同時に多く抽出されるという問題点があり、初期の頃には、分子生物学実験に使用できる DNA を得るためには非常に煩雑な精製作業が必要であった。しかし、その後より簡便な短時間で行える精製法が幅広く検討されてきており、これらを利用すればこの問題はある程度解決することができる。90年代の後半になると試薬メーカーから土壌 DNA 回収キットが商品化され、誰でも簡単に土壌 DNA を得ることができるようになった³³⁾。特に90年代には、PCR を用いたクローニングや変性剤勾配ゲル電気泳動 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 法による微生物群集構造の解析、また PCR による特定遺伝子の検出などが幅広く行われ、このような解析に直接抽出法は大いに活用された。

DNA 抽出法としてはじめに検討された間接抽出法は、一時は直接抽出法に比べ欠点が多く、廃れるものと考えられていた。しかし、2000年にはいつてからの環境 DNA 解析の新たな展開のなかで、DNA 抽出法に対す

る評価もまた変わってきた。上述したような PCR を介した研究ではバイアスがかかる、新規なものを検出できないという問題点がある。これらの理由から、真の微生物群集構造を解析し、未開拓微生物遺伝子資源を活用するために、PCR を介さないで DNA 配列の解析を行うメタゲノム研究に大変興味を持たれている。このメタゲノム研究を行うための土壌からの DNA 抽出法として間接抽出法の有用性が指摘され、再び脚光を浴びている^{52,60}。メタゲノム解析を行うために、直接法はいくつかの問題を含んでいた。第一の欠点として、間接法に比べ強力な菌体破碎法を使用するため、DNA のせん断を免れないことがあげられる。現在までに報告されている直接抽出法での回収 DNA 断片のサイズはだいたい数 10 kb 程度であるが、生合成経路や遺伝子クラスターの解析には 200 kb 以上の DNA 断片が必要だといわれている。回収した菌体から DNA を抽出する間接抽出法ではよりマイルドな溶菌処理を利用することが出来、数 100 kb の高分子量の DNA 断片の回収も可能である⁷⁹。第二の欠点は、直接法による抽出 DNA には土壌中にその存在が指摘されている菌体外 DNA⁶⁰ が混入するとともに、理論上存在する全ての生物から DNA が抽出されるため細菌由来に加え、かなりの量の原生生物・糸状菌と言った真核生物由来の DNA が含まれることである^{26,90}。抽出した DNA をクローニングし解析する際に、目的以外の生物由来 DNA の混入は作業が煩雑になり望ましくない。直接抽出法では全ての DNA を回収してしまうが、間接抽出法では菌体を回収する際に目的とする生物の画分のみを回収することが可能である。そのため、メタゲノム研究においては直接抽出法よりも間接抽出法が適していると考えられている。このように間接抽出法と直接抽出法それぞれの手法に利点・欠点があり (図 1)、研究の目的・対象とする生物などによって手法を選択すべきである。

3. 間接抽出法—菌体回収法 (Cell Extraction Method)—

間接抽出法では、土壌粒子を分散させた後に遠心により細胞画分を土壌粒子から分離・回収するステップとこの細胞画分から DNA を抽出・精製するステップに分けることができる。それぞれのステップ毎に、オリジナルな手法を出発点として、方法の改善がなされてきた。

3.1. 土壌粒子の分散と細胞の分離

土壌サンプルの分散には、物理的・化学的手法が用いられている。物理的手法としては、Waring blender²³ や小スケールの実験のための rotating rubber pestle⁵⁷、超音波処理⁷⁷ や振とうによる分散¹⁰⁰ などがある。化学的処理には、土壌の分散に効果的な陽イオン交換レジン (Chelex100)⁴⁵、疎水性の物質を溶解するポリエチレングリコール (PEG) や SDS⁹⁰、腐植物質を取り除くポリビニルポリピロリドン (PVPP)⁹⁰、バクテリアのリポ多糖と相互作用する特定の界面活性剤 (コール酸ナトリウムとデオキシコール酸ナトリウム)⁹⁰ などが用いられ、物理的手法と併用して用いられることが多い。Waring blender 分散 (小スケール実験の場合 rotating rubber pestle) は超

音波処理や化学的処理単独よりも効果的に土壌を分散することが明らかにされており⁵⁷、幅広く用いられている。

Faegri らの沈降速度の違いによる土壌粒子からの細菌の分離では、はじめに分散させた土壌サンプルを 500~1000×g の低速遠心で (底泥や) 土壌残渣、菌類の菌糸、重い土壌粒子を取り除き、次に上清を高速遠心することで、細菌細胞を得る²³。Holben らは一回の分散・分離処理で土壌中に存在する全細菌の約 10% が放出され、これは十分に全細菌群集を代表するものであることを示した³⁹。さらに、この作業を繰り返すことによりトータルの細胞回収率が大幅に改善される。一方、低速度の遠心で得られた上清は依然として細胞以外の腐植物質のような土壌からの夾雑物を含んでいる。そこで、細菌の浮遊密度による分離をする手段として密度勾配遠心の原理による高速の遠心法が発達してきた³。Percall や metrizamide、Nycodenz などいくつかの多重勾配媒体が検討されてきたが、Nycodenz を利用したときに最もよい結果が得られている⁴。Nycodenz 勾配遠心は低速遠心法に比べ比較的きれいな細菌細胞を回収することができる。また、スクロース密度勾配遠心を用いた同様の方法が Pillai らによって報告されている⁷¹。

3.2. 核酸の分離と精製

回収した核酸の分離・精製には様々な手法が利用可能である。間接抽出法では、腐植物質の混入が少ないため直接抽出法に比べ精製は容易であると考えられる。間接抽出法は、最近ゲノムの解析を目的にした研究に用いられることが多く、より大きいサイズの断片を得るための方法が検討されている。

初期の頃の間接抽出法では、ハイドロキシアパタイトカラムや塩化セシウム密度遠心による DNA 精製が行われた。Torsvik はハイドロキシアパタイトカラムを通すことによって細菌溶解物を精製するプロトコルを開発した⁹⁴。ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー精製と塩化セシウム密度遠心は吸光度の比率 A_{260}/A_{280} および A_{260}/A_{230} で測定した DNA の純度を高めたが両方とも DNA のロスを引き起こすことが報告されている。塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度遠心は大きなサイズ (少なくとも 48 kb)^{14,39} の純粋な DNA を回収することができる⁴⁵。より大きなサイズの DNA 断片を回収する目的で、アガロースゲルに細胞画分を埋め込み、穏やかな溶菌を行った後パルスフィールド電気泳動を行う手法が土壌にも適用された。Berry らは、この手法と Nycodenz による分離との組み合わせで 1 Mb を超える DNA 断片の回収に成功している⁹。

4. 直接抽出法—直接溶菌法 (Direct Lysis Method)— 方法の検討と改良

土壌中でそのまま溶菌を行う直接抽出法は、一般的に比較的短時間で高い収量の DNA が得られ、ここ 10 年の間広く用いられてきた。多くのプロトコルが現在までに報告されているが、はじめに Ogram らにより発表された方法⁶⁶ が基礎となっている。この方法には大きく分けて (i) 土壌中での微生物の溶菌と (ii) 核酸の分離精製

という2つのステップがある。(i) は DNA 抽出の上で本質的なステップである。ここでは細胞壁の壊れやすさや土壌中の微生物の存在形態に関係なく、すべての微生物から核酸を抽出すること、そして分解酵素による分解や土壌への吸着による DNA の損失を防ぐことが重要である。(ii) のステップは、核酸と同時に土壌から抽出される腐植物質を取り除く作業である。これら腐植物質などの夾雑物は、制限酵素による DNA 切断^{45,73,96,99} や PCR の阻害^{91,105}、またハイブリダイゼーション反応の低下^{1,90,91} など分子生物学的実験を行う際に阻害要因となることがある。直接法では高収量の DNA が得られるのと同時に多くの腐植物質が抽出されるため、間接法に比べこのステップがよけいに必要となってくる。

4.1. 土壌中での直接溶菌

土壌中での直接溶菌には、(i) 酵素的処理、(ii) 化学的処理、(iii) 物理的処理の3種類の方法がある。土壌に適用されてきたそれぞれの主な手法を表1に示した。酵素は溶菌酵素であるリゾチーム^{49,58,91,96} が、化学的溶菌では界面活性剤である SDS^{8,51,66,86,90} が使われることが多い。物理的方法では、土壌懸濁液を液体窒素中などですばやく凍結させた後、60~100°C の恒温槽に保持し融解する凍結融解法^{21,22,63,70,96} と土壌懸濁液を小さなガラスビーズやジルコニアビーズとともに激しく振とうすることで菌体細胞を破碎する Bead-beating 法^{15,51,58,60,61,63,66,88,90,108} がよく用いられている。

これらの手法は様々な組み合わせで用いられて、膨大なプロトコールが報告されている。それぞれの研究で用いられる土壌について手法の改良がなされているが、酵素や化学物質、そしてそれらの濃度、物理的処理条件など、実験条件の違いと、使用する土壌の違いから、それらを一概に比較することは難しい。しかし、いくつかの比較研究によって個々の手法の有用性が明らかにされて

きた。

上記の手法は大まかに、酵素・化学的処理に熱処理を加えた穏やかな方法、凍結融解処理を加えた方法、そしてさらに強力な機械的処理を加えた方法に分けられる。溶菌効率という点で、界面活性剤と Bead-beating の組み合わせが最も強力な方法である。SDS-凍結融解法と SDS-Bead-beating 法の比較において、後者の方が *Bacillus* の孢子の破碎効率が高く、底泥サンプルからの DNA 収量は前者が 5.2 µg/g sediment (dry wt) に対し後者が 11.2 µg/g sediment (dry wt) であったと More ら⁶³ は報告している。さらに、彼らの実験では、Bead-beating に凍結融解処理を加えても DNA 収量は増大しなかった⁶³。凍結融解法に比べ Bead-beating 法で、細胞の破碎効率が高いため DNA の収量が高くなることは、土壌サンプルについても報告されている^{51,54,61}。さらに、More らは底泥サンプルを用いて、SDS 処理のみと Bead-beating 法のみでの細胞破碎効率を直接顕鏡計数法で見積もった。細胞破碎効率は SDS 処理の方が高かったが、まんべんなく様々な形態の菌を破碎するのは Bead-beating 法であり、両者の組み合わせは最も偏りなく多くの細菌を破碎した。機械的な処理は土壌構造を破壊するため土壌の微小団粒中の奥深くにいる細菌についても破碎が可能で、溶菌しにくい栄養型や微小細胞、孢子の破碎に効果を発揮する^{51,58,63}。DGGE 法による細菌群集構造の解析で、Bead-beating による抽出法が、他の手法に比べ幅広い菌を検出できることが報告されている^{16,48,58,106}。機械的な破碎法としては、液体窒素下での破碎処理も有用である¹¹⁰ が、Bead-beating 法は 2 ml 程度のチューブを使用した小さいスケールで、また数十秒から数分という短時間の処理で細胞破碎が可能のため、簡便で利用しやすい。Bio101 Fast DNA spin kit (Qbio gene, USA)^{7,56,69,101} や UltraClean Soil DNA kit (MoBio, USA)^{28,59} などの市販の土壌 DNA 抽出キットは、いずれも Bead-beating を基礎

表1. 直接法による DNA 抽出法。

		加熱
		凍結・融解
		ビーズ振とう
		液体窒素による凍結・摩砕
		リゾチーム
		プロティナーゼ K
		アクロモペプチダーゼ
		プロナーゼ
		界面活性剤 (SDS)
		フェノール・クロロホルム
		塩化ベンジル
		グアニジンチオシアネート (GTC)
		CTAB/PVPP
		フェノール・クロロホルム処理
		アルコール/PEG 沈殿
		カラム精製/アガロースゲル電気泳動
精製		

とした方法である。そのため、Bead-beating 法は微生物群集構造解析を中心に広く用いられている。これに対し、酵素・化学処理と熱処理との組み合わせでは土壌団粒内部にいる微生物や溶菌されにくい微生物からの DNA 抽出は難しいため、群集構造の解析という目的には不向きである。また、物理的処理に比べ腐植物質が多く抽出される欠点もある^{15,58)}。

しかし、強力な細胞破碎法を使用した場合、DNA がせん断され回収 DNA 断片のサイズは数 kb⁵⁴⁾ から最大で 20 数 kb¹⁵⁾ 程度と小さくなってしまふ^{61,63,88)}。Burgmann らは Bead-beating 法の振とう時間・速度・抽出バッファ量の条件を詳細に検討しており、30 s・5 m/s・1.5 ml の条件で DNA 収量は 30 µg/g soil (dry wt)、回収 DNA 断片の大きさは 13.3 kb に対し、45 s・6 m/s・1.25 ml の条件で DNA 収量は 136 µg/g soil (dry wt)、回収 DNA 断片の大きさは 6.7 kb となり、抽出 DNA 量は増えるが代わりに DNA が切断されてしまうことを明らかにした¹⁰⁾。そのため、Bead-beating 法は土壌遺伝子クローニングなど長い遺伝子断片が必要な実験には不向きと考えられる。また、極端な DNA のせん断 (<1000 bp) は PCR を行った際にキメラ生成の問題を引き起こすことも報告されており^{12,55)}、注意が必要である。一方、酵素や化学的処理と熱処理との組み合わせは、比較的穏やかな手法であるため DNA のせん断は押さえられる。Krsek らのリゾチーム-SDS 処理と熱処理との組み合わせでは大きな DNA 断片 (40-90 kb) の回収が報告されている⁴⁹⁾。Selenska や Klingmuller らのプロトコールでは、SDS-リン酸ナトリウムバッファ中、70°C で穏やかに振とうすることで抽出を行い、回収される核酸は平均で 25 kbp である⁸⁶⁾。Bead-beating 法が土壌遺伝子クローニングに用いられた例もあるが、より長い遺伝子断片が必要な場合にこの酵素や化学的処理を中心にした手法は有用になってくるだろう。DNA のせん断に関しては、Niemi らの報告で土壌が異なると同じ手法を使った場合でもせん断程度が異なることが示されている。彼らは土壌の構成成分によるせん断への影響や分解酵素の活性などが異なるためだろうと述べている⁵⁸⁾。

細胞溶菌時に溶菌効率の次に重要となってくるのが、土壌粒子への吸着や分解酵素による分解などによる DNA のロスを防ぐことである。DNA は土壌の粘土鉱物に吸着することが知られており、土壌への DNA の吸着は DNA の回収率に大きな影響を及ぼす。DNA を粘土鉱物から剥離するために物理的処理として超音波処理⁷⁰⁾や加熱処理が試みられたが、DNA 回収にはあまり効果がないことが示されている²⁵⁾。バッファの組成など化学的処理で様々な工夫がなされている。界面活性剤とともに EDTA や Chelex100⁶¹⁾ などのキレート剤、リン酸ナトリウムバッファ⁴⁹⁾、1 M 以上の高濃度の塩溶液¹¹⁰⁾ がよく用いられ、これらは土壌への DNA の吸着阻害に効果的であると報告されている。しかし、いくつかの研究によると、EDTA の濃度を上げると抽出・溶菌バッファの強度が増し収量が增大するが、同時に腐植物質も多量に抽出される⁴⁹⁾。さらに、Miller らによると、Chlex100 処理は腐植物質の抽出量を増大させる⁶¹⁾。また、イオン強度の増大でもキレート剤の濃度上昇と同じことが言え、より強力な条件で抽出を行うと DNA 収量

は増大するが同時に腐植物質も大量に抽出されてきてしまい、分離された核酸の純度が落ちてしまう。したがって、使用するバッファの強度は DNA の収量と純度の妥協点であり、実験目的に応じて選択する必要がある。加えて、土壌はそれぞれ粘土含量、有機物含量などの特性が異なるため、バッファの強度は使用する土壌によっても検討すべきである。このような化学的処理は、熱処理と組み合わせで用いられる^{8,51,66,86,90)} ことが多いが、腐植物質の抽出を防ぐために冷却して用いられた報告^{73,91)} もある。また、EDTA などのキレート剤は二価イオンを除去することによる DNase 阻害の目的でも使用されている⁴⁵⁾。

また、有機物含量の高い土壌などについては、抽出初期段階の溶菌時において、腐植物質除去のための処理が行われることがある。化学物質、変性したタンパク質や多糖、細胞残渣と不溶性複合体を形成する⁸³⁾ 臭化セトリメチルアンモニウム (CTAB) や PVPP の添加の添加が効果的であることが報告されている^{49,110)}。Zhou らによると、CTAB や PVPP は部分的に腐植物質をのぞくことができるが、一方で PVPP は DNA をロスさせる¹¹⁰⁾。また、PVPP は細胞溶解中には効果はないが、核酸精製の段階でスピニカラムとして用いる場合に効果があるとの報告もある⁴⁹⁾。また、酵素処理でリゾチーム以外にプロテアーゼも用いられ、これらは溶菌に加えて不純物であるタンパク質の分解や腐植物質の分解に効果があることも報告されている^{49,58)}。フェノールやクロロホルム⁶¹⁾、塩化ベンジル^{103,50)} などの有機溶媒は強力なタンパク変成作用を持ち、細胞の破壊に効果があるとともに、腐植物質除去に有用である。特に塩化ベンジルはフェノールやクロロホルムに比べても、溶菌と腐植物質除去に効果があるとの報告がある¹⁰³⁾。塩化ベンジルは細菌や糸状菌、植物の細胞壁構成成分であるポリサッカライドすなわちセルロース、ヘミセルロースの水酸基と反応し、溶菌する。その後の遠心分離で水相と有機相の二層に分離することで、同時に除タンパクできる¹¹¹⁾。しかし、有機溶媒と加熱処理や Bead-beating との組み合わせの抽出は強力な手法であるため、DNA のせん断が激しい⁸⁹⁾。塩化ベンジルの場合、ゲノム DNA は加熱処理との併用で 8000 bp 以下、Bead-beating で 2000 bp 以下にまで低分子化すると報告がある⁷⁶⁾。

4.2. 腐植物質等夾雑物からの DNA の精製

前述したように、直接法では土壌中で溶菌を行い様々な夾雑物を含んだままの土壌から DNA のみを回収してこなければならぬため、細胞のみを回収して抽出を行う間接法に比べ多くの精製の段階が必要となってくる。

まず、溶菌に引き続く DNA の精製の第一ステップでは、有機溶媒抽出などによる除タンパクとアルコール沈殿による DNA 溶液の濃縮が行われることが多い。除タンパクは、フェノールや、フェノール-クロロホルム、クロロホルム-イソアミルアルコールなどの有機溶媒抽出^{66,86,88,91,96)} の他に、飽和塩溶液を用いた塩析によっても行うことができる。塩溶液として、塩化ナトリウム^{39,86)} や塩化カリウム^{93,107)}、酢酸アンモニウム^{47,72,90)}、酢酸カリウム^{73,88)}、酢酸ナトリウム³⁹⁾ などが用いられる。毒性のある有機溶媒の使用に比べ塩析の方が実験上利用しやす

い。しかし、これらの処理では腐植物質を完全にのぞくことはできない⁶¹⁾。処理後、DNA は、エタノールやイソプロパノールによるアルコール沈殿あるいは PEG による沈殿で、濃縮・回収できる。Porteous らは、PEG による沈殿に比べアルコール沈殿では腐植物質を共沈させやすいことを報告している⁷⁴⁾。Cullen らによると、エタノール沈殿はイソプロパノールや PEG に比べ、DNA の回収率が悪く、腐植物質を共沈させやすい¹⁵⁾。また、PEG はフェノールの混入で DNA 回収率が大幅に下がるため、フェノール抽出を行ったサンプルの適用については注意が必要である。これらのことから、PEG⁷⁴⁾、あるいはアルコールではイソプロパノール¹⁵⁾ が推奨されている。

これまで述べた粗精製では、依然として抽出液に腐植物質が残っており、分子生物学実験に用いるのに未だ不十分であることが多い。このような腐植物質を含んだ粗抽出液を希釈したり^{15,80,91,98,104,108)}、また PCR 反応液に直接 BSA (bovine serum albumin) や T4 遺伝子32タンパク、市販の製品 (genereleasers) などの除去剤を加えること¹⁰⁸⁾で、この阻害の問題はある程度克服できる。しかし、1000倍希釈しても腐植物質の阻害を軽減することができないという報告例もある²²⁾。そこで、さらなる精製のステップが必要とされる。

精製の第2ステップとして、CsCl 密度勾配遠心は、初期によく用いられた^{8,39,45,66,73,86,90,91)}。この精製処理で、核酸の制限酵素切断が可能になると報告されている^{66,73)}。しかし、腐植物質の除去に必ずしも良好な結果を示さず^{66,90)}、DNA がこの処理で大量に失われてしまう⁹⁰⁾。加えて、非常に労力と時間がかかることからこれに代わる様々な方法が開発されてきている。

より簡便な方法としてアガロースゲル電気泳動^{26,31,63,81,110)}やゲル濾過カラムによる精製、その他市販の DNA 精製用製品が検討されている。アガロースゲル電気泳動では、腐植物質は茶色のバンドとして検出され、移動度の違いからゲノム DNA との分離が可能である。低融点アガロースがよく用いられ^{31,38,81)}、直接 PCR に利用された例もある⁵³⁾。さらに、ポリビニルピロリドン (PVP) は電気泳動で通常核酸とともに移動するフェノール性の化合物の移動を阻害するため¹⁰⁹⁾、PVP を混ぜ込んだアガロースゲルが用いられることもある^{38,52,53)}。アガロース電気泳動による分離は、手順が煩雑であり、また回収率が低いとの報告例⁶¹⁾もあるが、おおむね本手法により PCR や制限酵素切断が可能な純度の高い DNA を十分回収することに成功している^{52,89,110)}。

また、分子量の大きさを分画を行うゲル濾過カラムもよく利用される。セファデックス G50^{19,80,102)} や G75^{15,75)}、G150、G200^{22,49,97,98,107)}、セファロース 2B、4B^{52,58,89)}、6B、バイオゲル P100、P200⁶⁰⁾ などが試みられた。Jackson らは、セファデックスカラム特に G50 は、森林土壌や炭化水素汚染土壌からの抽出 DNA の精製にあまり効果がないと報告している⁴³⁾。さらに、セファデックス G200 より分画分子サイズのより大きいセファロース 4B による精製で、低分子の RNA 除去効率や PCR の反応効率がよく、DNA 精製に効果的であることを示した。Miller らは DNA と腐植物質の分離を検討しており、セファロースカラム、特に 2B で他に比べ分離が最もよいこと

を示した⁶⁰⁾。

その他クロマトグラフィー原理を利用した精製では、ハイドロキシアパタイトカラムの適用で、土壌や底泥サンプルの DNA 抽出^{66,90)} や DNA と rRNA の両方の抽出⁷⁵⁾ に成功している。イオン交換クロマトグラフィーの利用で、粗抽出液に含まれる腐植物質の97%を除けるとの報告がある⁹¹⁾。

さらに、様々な DNA 精製用製品が市販されており、利用することができる。これらは土壌 DNA の腐植物質除去にも効果的で、アガロース電気泳動やカラム精製に比べ作業が簡便であるため大変有用である。Wizard DNA clean-up system (Promega)³⁷⁾、CentriconTM50、MicroconTM100 濃縮器 (Amicon)¹¹⁰⁾、ElutipTM D column (Schleicher & Schuell)^{17,25)}、DNA 結合シリカに基づく SpinBind カラム (FMC BioProducts)⁶¹⁾、Tip-100、Tip-500 カラム (Qiagen)^{41,91)} などの使用例が報告されている。いくつかの比較研究^{25,52,58,61,89,110)}からは、一概にそれぞれの製品を評価することは難しい。

腐植物質は不均一であることから単独の精製法ですべてを取り除くことは難しく、いくつかの手法の組み合わせが用いられることが多い。ゲルの切り出しとカラム精製の組み合わせが良好な結果を示すことが報告されている¹¹⁰⁾。

また、土壌中の全ての DNA を抽出するのではなく、特定の遺伝子配列の回収を目的としている場合、従来法とは異なる精製法が報告されている。精製の過程で多少の DNA の損失はまぬがれないが、量の少ない DNA 配列ではこの損失が致命的な問題になる場合がある。これらを克服する手法として、Jacobsen は磁氣的結合ハイブリダイゼーション (MCH) を用いた方法で腐植物質の PCR 阻害効果を取り除くことに成功した⁴⁴⁾。ビオチンで標識した特定の一本鎖 DNA を土壌サンプルの精製されていない核酸にハイブリダイズさせることで、対象 DNA を他の DNA や腐植物質を含む共雑物質から分離する。また、Chandler らは¹³⁾ 特定のハイブリダイゼーションプローブとしてペプチド核酸 (PNA) クランプとオリゴマーを用いた親和性磁氣的結合を同様に検討している。

5. 様々な土壌サンプルへの適用—火山灰土壌のための DNA 抽出法の改良—

これまで開発されてきた手法は、ほとんど数点のサンプルへの適用にとどまっていて、同一の抽出手法を様々な特徴を持つ土壌に適用し、抽出効率を比較した実験はあまり見られない。その中で、Zhou ら¹¹⁰⁾ は、有機物含量が0.59~5.85%、粘土含量が5~31%の様々な性質を持つ土壌から化学的な溶菌によって DNA を抽出したが抽出効率は26~92%と大きく変動し、すべての土壌に最適な土壌 DNA 抽出・精製法というものには存在しないことを報告している。それに加えて、土壌は複雑な組成を持ち、土壌によりそれぞれ大きく異なる組成・性質を持つことから、それぞれの土壌の特性にあわせて手法の修正が必要となってくる。

火山生成物由来の土壌の場合、その土壌の化学分析は一般に困難な場合が多いが、DNA 抽出の場合もその例

外ではない。火山国であるわが国に広く分布する火山灰土壌の中には、欧米で開発されてきた DNA 抽出法の適用が困難な場合がある。火山灰土壌（黒ボク土）は、関東地方を中心に日本中に多く分布しており、リン酸を強く吸着する・有機物の蓄積量が多いという特徴をもつ。この性質からウイルス粒子⁶⁸⁾ や微生物細胞³⁵⁾ を強く吸着するため、間接抽出法の適用は難しい。しかし、有機物と同様に DNA も強く吸着するために、直接抽出法においてもこれまでに報告されている手法ではほとんど、あるいは全く DNA が検出されないという例が見られている。黒ボク土には非結晶成分であるアロフェンを含むアロフェン質黒ボク土と非アロフェン質黒ボク土がある⁶⁵⁾。前者のほうが DNA の抽出はより困難であることが知られている。現在までに、粘土への DNA の吸着が粘土含量の高い土壌で問題になることが報告されている^{25,104,27)}、特にアロフェン質黒ボク土においては抽出・回収の際に大きな障害になってくると考えられる。このことが火山灰土壌における、土壌微生物研究発展の大きな妨げとなっていた。近年、これらの DNA 抽出が困難な火山灰土壌からの DNA 抽出法が相次いで開発された^{40,76)}。

星野らは、黒ボク土での DNA 抽出が困難な原因は土壌への DNA の吸着であり、吸着を阻害するための Competitor としてスキムミルクや RNA を抽出バッファーであるリン酸緩衝液に添加することで、DNA の抽出が可能になることを明らかにした⁴⁰⁾。ここでは DNA 抽出キット Bio101 にスキムミルクを併用しており、20 mg/g soil スキムミルクを含む 200 mM リン酸ナトリウムバッファーを用いた bead-beating で溶菌し、塩析とスピカラムにより精製する。供試 7 サンプルの黒ボク土のうち無添加では 5 サンプルの抽出液中に DNA は全く検出されなかったが、添加により PCR に適した DNA が抽出された (図 2)。通常精製過程でスキムミルクは除去され、その結果スキムミルクの添加は PCR に影響を与えない。そのため除去が必要な RNA に比べ簡便で、また安価であることから利用しやすい。さらに、スキムミルクのみからは細菌 16S rDNA は PCR 増幅されず、添加で DGGE パターンは影響を受けないことから、今回用いたスキムミルクの場合はコンタミの心配がない

ことを示した⁴⁰⁾。景山らも、土壌中の病原糸状菌の PCR 検出にスキムミルクが有用なことを報告している⁴⁶⁾。さらに、池田らは市販のキットを使わないスキムミルク添加による DNA 抽出法を確立した⁴²⁾。8 mg/g soil スキムミルクを含む 100 mM EDTA-200 mM リン酸ナトリウム抽出バッファーを用いて bead-beating で溶菌と、塩析と DEAE セルロースによる精製法を採用している。Bio101 キットに比べ、収量が若干低いという欠点はあるが、経済的であることに加え、DNA のせん断程度が少なく、 A_{260}/A_{230} 測定での純度が良好だという長所がある。黒ボク土を含む日本各地から採取した 24 サンプルについて、スキムミルクの効果を確認している。スキムミルク無しで全く DNA が抽出できなかった土壌を含め、全ての土壌で添加により抽出が可能になった。黒ボク土以外でも粘土含量の高い土壌では粘土への DNA 吸着が原因で DNA 回収率が極端に悪くなる場合がある。その際の DNA 抽出にスキムミルクや RNA などの Competitor は大変有用である^{25,27,104)}。沖縄の赤土も効果のある土壌の一例である (宮丸直子 (沖縄県農業試験場) : 私信)。PCR 効率の上昇から、スキムミルクはまた腐植物質の除去にも有用であると報告されている¹⁰⁴⁾。しかし、全ての土壌でスキムミルク添加が良好な結果を示すわけではない。池田らは、スキムミルク無しで DNA が抽出できる土壌について、収量、純度に対する添加の効果は土壌によって異なることを報告している⁴²⁾。また、スキムミルク添加の必要性はリン酸吸収係数で判定できず⁴²⁾、添加の必要性を示すような土壌特性は明らかにされていない^{40,42)}。一方、頼らは数 100 mM 以上と非常に高濃度の EDTA とリン酸を組み合わせたバッファー中でのビーズ振とうによる破碎処理に、60°C での加熱処理を加えることで黒ボク土から DNA を抽出した⁷⁶⁾。Zhou や Cullen らの既往法では数 $\mu\text{g/g soil (dry wt)}$ あるいは検出限界以下でしか DNA 抽出できなかった様々なアロフェン質黒ボク土で数 $\mu\text{g}\sim 40 \mu\text{g/g soil (dry wt)}$ の DNA が抽出できるようになったと報告している⁷⁶⁾。CTAB による腐植物質と PEG による沈殿で DNA を回収することで、森林土壌など腐植物質の多い土壌以外は抽出液を希釈することなく (50 ng/反応液量 50 μl) PCR が可能である。回収できる DNA 長に関して、実験条件設定の中で、

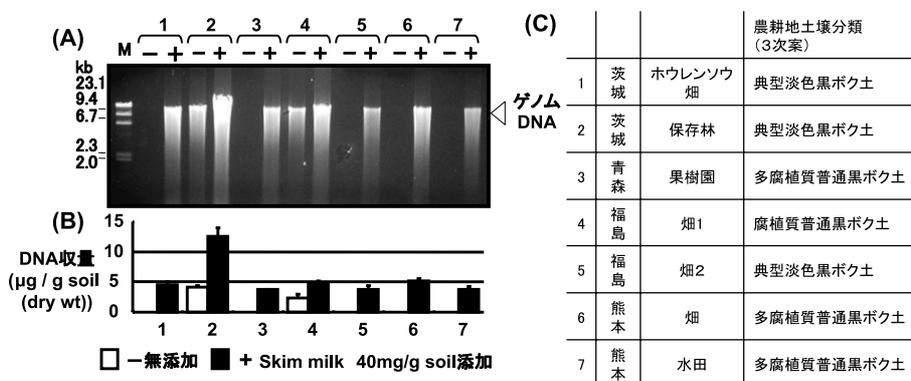


図 2. スキムミルクを用いた黒ボク土からの DNA 抽出。

日本各地の黒ボク土から Bio101 kit を用いて DNA を抽出した。ビーズ振とうを行うはじめの抽出バッファーにスキムミルク (40 mg/g soil) を添加した場合としない場合を比較した。最終 DNA 抽出液をアガロース電気泳動し (A)、バンドの濃さから回収 DNA 量を計算した (B)。(C) には使用した土壌を示した。

EDTA 600 mM 以上ないしはリン酸カリウム 500 mM 以上の条件で bead-beating すると高濃度の塩の影響で低濃度のときに比べ DNA が低分子化することを明らかにしている。なお、本法を用いたキット ISOIL がニッポンジーン社より発売されている。

火山灰土壌は極端に DNA の吸着が強く、それが DNA の抽出効率に大きく影響を与えている。そこで、吸着を阻害するための高濃度のキレート剤やリン酸、スキムミルク、RNA の添加が抽出のために必要となってくる。このような化学物質が抽出効率の上昇に効果的であることは現在までに報告されているが、従来法で全く DNA が検出されないような火山灰土壌から簡便な DNA の抽出法が開発されたことは一つの成果といえよう。DNA の土壌への吸着の競合阻害力の強さは、リン酸<スキムミルク<RNA の順であると考えられるが、RNA を用いても DNA の粘土鉱物への吸着は完全に阻害できないことが報告されている²⁵⁾。上記のような手法を用いても土壌中の DNA を完全に抽出することはできないと考えられる。外来遺伝子の添加回収実験で土壌における DNA の回収率を簡便に見積もる方法が報告されている⁶⁴⁾が、土壌中の遺伝子の定量を行う際には火山灰土では特にこのような手法での回収率の検討が必要になるだろう。粘土鉱物への DNA 吸着に関しては、これまでにモンモリロナイトなどで報告されている^{18,95)}が、アロフェンについては報告が無く、今後詳細な検討が必要である。

6. まとめ

ここまで、数多くの抽出法を紹介し、直接抽出法、間接抽出法のいずれにおいても、すべての土壌に適用可能なオールマイティなプロトコールは存在しないことを述べてきた。研究の目的や実験対象となる生物種、用いる土壌に応じて、それぞれの特長を生かした手法の選択が必要となる。では、実際、自分のサンプル土壌から DNA を抽出する場合、どうすればよいだろうか。まず、抽出の目的について考えてみよう。ゲノム解析のように長い配列が必要な場合、間接法、あるいは直接法の中でも機械的な処理を含まない化学処理と加熱処理の組み合わせのような比較的穏やかな手法がよいだろう。また、汚染物質の微生物群集への影響のモニタリングなど、多くのサンプルを扱う必要がある場合、より簡便な直接法が適しているだろう。

対象についてはどうだろうか。細菌や糸状菌など特定の生物種のみを対象とする場合、他の生物の遺伝子の混入が望ましくなければ、はじめに分離の可能な間接法がよいだろう。PCR を介する解析で、他の生物の遺伝子混入に問題がなければ、直接法も利用できる。糸状菌や放線菌など溶菌しにくいものを対象にするときはより強力な物理的手法、また、特定の微生物の検出にはその微生物を溶菌するための酵素の利用が有効かもしれない。全微生物群集をなるべく包括的に調べたい場合、間接法より直接法、そして直接法の中でもより強力な物理的手法を含むものがよいと考えられる。

最後に、用いる土壌に合わせた抽出法の選択についてはどうだろうか。これが最も難しい問題である。一つの方法の有用性が土壌によって大きく異なることがあり、

土壌の特性がこれに関わっていると考えられる。しかし、土壌の抽出に与える要因は、複合的で単純ではなく、また推定はされていても、完全に明らかにされていないものが多い。粘土含量や有機物量、粘土鉱物の種類などが重要なことは示唆されているが、一概に断定することはできない。一般的に考えると、森林土壌など有機物量の多い土壌では腐植物質の混入が問題になっている。直接法を適用する際には、抽出段階で腐植酸を取り除く工夫を取り入れるか精製法の検討が重要であろう。また、有機物が少なく粘土含量が高い土壌など粘土鉱物への微生物や DNA の吸着が問題となる土壌の場合、間接法では分散の方法の検討が必要だろう。直接法では、DNA 吸着を阻害するような阻害物質の使用や抽出液の組成の検討が必要である。それぞれの土壌について最適化するためには、それぞれの手法の中でさらに条件を検討し、いくつかのパラメーターを変更する必要がある。

いずれの手法を選択する場合でも、抽出法の特徴をよく理解し、実験結果を検討する際に、抽出の各段階でかかるバイアスについて留意する必要がある。ここまで抽出法について議論したが、抽出以前の段階にも重要なファクターが存在する。現場でのサンプリング法、サンプルの保存方法⁸⁵⁾や使用するサンプルサイズ⁷⁸⁾が、解析結果に影響を与えることが知られている。サンプルサイズについて、Ranjard らが興味深い報告をしている。0.125 g から 4 g の間の 8 段階のサンプル量を用いて、RISA により微生物群集解析を行ったところ、細菌についてはこれらの範囲で実験結果に変動はなかったが、糸状菌については 1 g 以下で変動があり、糸状菌の解析には 1 g 以上使用する必要がある旨示したものである⁷⁸⁾。土壌中における微生物分布の不均一性から、サンプルサイズにより解析結果に影響を受けることが示された例で、実験の際にはこのような抽出以前のファクターにも注意が必要である。

なお、今回は DNA の抽出にしばって研究例をまとめたが、土壌 DNA は土壌中の微生物群集のポテンシャルを示すに過ぎない。さらに興味をもたれる点は実際活動している微生物群集・遺伝子である。実際活動している微生物を解析するために安定同位体を用いて物質の動態と微生物の代謝をリンクさせた研究や、マイクロアレイなどによる土壌 RNA の解析が注目されている。活性を検出するという点で RNA の回収を目的に抽出を試みた研究、あるいは DNA と RNA の同時抽出を試みた研究が数多く報告されている^{6,11,20,24,29,30,41,62,67,87,99)}。RNA の抽出は DNA より困難であり、特に分解しやすい mRNA の土壌からの抽出は非常に難しい。最近、土壌からの RNA 抽出キットが販売された (Bio101 FastRNA® Pro Soil-Direct Kit 及び FastRNA® Pro Soil-Indirect Kit (Qbiogene, USA)) が、RNA 特に mRNA の土壌からの抽出法に関しては各土壌への最適化など、さらなる検討が必要であるだろう。また、土壌からの DNA/RNA の抽出に関しては様々な総説等が現在までにいくつか報告されており、参考にしていただきたい^{9,79,82,84,85)}。

文 献

- 1) Alm, E.W., D. Zheng, and L. Raskin. 2000. The presence of

- humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4547–4554.
- 2) Amann R.L., W. Ludnig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
 - 3) Bakken, L.R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1482–1487.
 - 4) Bakken, L.R., and V. Lindahl. 1995. Recovery of bacterial cells from soil. In: *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*, p. 9–27. In J.D. Van Elsas, and J.T. Trevors (ed.), *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*. Springer.
 - 5) Berry, A.E., C. Chiocchini, T. Selby, M. Sosio, and E.M.H. Wellington. 2003. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 15–20.
 - 6) Bogan, B., B. Schoenike, R. Lamar, and D. Cullen. 1996. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2381–2386.
 - 7) Borneman, J., P. Skroch, K. O'Sullivan, J. Palus, N. Rumjanek, J. Jansen, J. Nienhuis, and E. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1935–1943.
 - 8) Bruce, K.D., W.D. Hiorns, J.L. Hobman, A.M. Osborn, P. Strike, and D.A. Ritchie. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413–3416.
 - 9) Bruns, M.A., and D.H. Buckley. 2002. Isolation and purification of microbial community nucleic acids from environmental samples, p. 564–572. In C.J. Hurst, R.L. Crawford, G.R. Knudsen, M.J. McInerney and L.D. Stetzenbach (ed.), *Manual of Environmental Microbiology* second edition. American Society Microbiology.
 - 10) Burgmann, H., M. Pesaro, F. Widmer, and J. Zeyer. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods* 45: 7–20.
 - 11) Burgmann, H., F. Widmer, W.V. Sigler, and J. Zeyer. 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1928–1935.
 - 12) Chandler, D., J. Fredrickson, and F. Brockman. 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* 6: 475–482.
 - 13) Chandler, D.P., J.R. Stults, S. Cebula, B.L. Schuck, D.W. Weaver, K.K. Anderson, M. Egholm, and F.J. Brockman. 2000. Affinity purification of DNA and RNA from environmental samples with peptide nucleic acid clamps. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3438–3445.
 - 14) Courtois, S., C.M. Cappellano, M. Ball, F.-X. Francou, P. Normand, G. Helynick, A. Martinez, S.J. Kolvek, J. Hopke, M.S. Osburne, P.R. August, R. Nalin, M. Guerineau, P. Jeannin, P. Simonet, and J.-L. Pernodet. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 49–55.
 - 15) Cullen, D.W., and P.R. Hirsch. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30: 983–993.
 - 16) de Liphay, J.R., C. Enzinger, K. Johnsen, J. Aamand, and S.J. Sorensen. 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1607–1614.
 - 17) Degrange, V., and R. Bardin. 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2093–2098.
 - 18) Demaneche, S., L. Jocteur-Monrozier, H. Quiquampoix, and P. Simonet. 2001. Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 293–299.
 - 19) Dijkmans, R., A. Jagers, S. Kreps, J.M. Collard, and M. Mergeay. 1993. Rapid method for purification of soil DNA for hybridization and PCR analysis. *Microbial Releases: Viruses, Bacteria, Fungi* 2: 29–34.
 - 20) Duarte, G.F., A.S. Rosado, L. Seldin, A.C. Keijzer-Wolters, and J.D. van Elsas. 1998. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *J. Microbiol. Methods* 32: 21–29.
 - 21) Edgcomb, V.P., J.H. McDonald, R. Devereux, and D.W. Smith. 1999. Estimation of bacterial cell numbers in humic acid-rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1516–1523.
 - 22) Erb, R., and I. Wagner-Dobler. 1993. Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4065–4073.
 - 23) Faegri, A., V.L. Torsvik, and J. Goksøyr. 1977. Bacterial and fungal activities in soil: Separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biol. Biochem.* 9: 105–112.
 - 24) Felske, A., B. Engelen, U. Nubel, and H. Backhaus. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4162–4167.
 - 25) Frostegard, A., S. Courtois, V. Rasmise, S. Clerc, D. Bernillon, F. Le Gall, P. Jeannin, X. Nesme, and P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5409–5420.
 - 26) Gabor, E.M., E.J. de Vries, and D.B. Janssen. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 153–163.
 - 27) Garcia-Pedrajas, M.D., B.W. Bainbridge, J.B. Heale, E. Perez-Artes, and R.M. Jimenez-Diaz. 1999. A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 251–259.
 - 28) Gomes, N.C.M., O. Fagbola, R. Costa, N.G. Rumjanek, A. Buchner, L. Mendona-Hagler, and K. Smalla. 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3758–3766.
 - 29) Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, A.G. O'Donnell, and M.J. Bailey. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5488–5491.
 - 30) Hahn, D., R. Kester, M. Starrenburg, and A. Akkermans. 1990. Extraction of ribosomal RNA from soil for detection of *Frankia* with oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 154: 329–335.
 - 31) Harry, M., B. Gambier, Y. Bourezgui, and E. Garnier-Sillam. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples. *Analyst* 27: 439–442.
 - 32) 長谷部亮. 1992. DNA プローブ法による土壌環境試料からの微生物の検出. pp. 17–34. 日本微生物生態学会編. 微生物の生態18 学会出版センター.
 - 33) 長谷部亮. 2001. 土壌 DNA の利用で広がる新しい世界. *エンバイオ*, 1: 45–49.
 - 34) 長谷部亮. 2004. eDNA による培養困難微生物資源へのアクセス. pp. 203–213. 工藤俊章, 大熊盛也編. 難培養微生物研究の最新技術—未利用微生物資源へのアプローチ. シーエムシー出版.
 - 35) Hasebe, A., J. Koike, and H. Katou. 2003. Strong retardation in the transport of *Burkholderia cepacia* during infiltration into a volcanic ash soil. *Microbes Environ.* 18: 32–37.
 - 36) Hattori, T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microor-

- ganisms. *Biol. Fertility Soils* 6: 189–203.
- 37) Henne, A., R. Daniel, R.A. Schmitz, and G. Gottschalk. 1999. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3901–3907.
 - 38) Herrick, J.B., E.L. Madsen, C.A. Batt, and W.C. Ghiorse. 1993. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 687–694.
 - 39) Holben, W.E., J.K. Jansson, B. K. Chelm, and J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 703–711.
 - 40) Hoshino, Y.T., and N. Matsumoto. 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA 13–19. *Microbes Environ.* 19: 13–19.
 - 41) Hurt, R.A., X. Qiu, L. Wu, Y. Roh, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje, and J. Zhou. 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4495–4503.
 - 42) Ikeda, S., K.N. Watanabe, K. Minamisawa, and N. Ytow. 2004. Evaluation of soil DNA from arable land in Japan using a modified direct-extraction method. *Microbes Environ.* 19: 301–309.
 - 43) Jackson, C., J. Harper, D. Willoughby, E. Roden, and P. Churchill. 1997. A Simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4993–4995.
 - 44) Jacobsen, C. 1995. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3347–3352.
 - 45) Jacobsen, C., and O. Rasmussen. 1992. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2458–2462.
 - 46) Kageyama, K., T. Komatsu, and H. Suga. 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 153–160.
 - 47) Knaebel, D.B., and R.L. Crawford. 1995. Extraction and purification of microbial DNA from petroleum-contaminated soils and detection of low numbers of toluene, octane and pesticide degraders by multiplex polymerase chain reaction and Southern analysis. *Mol. Ecol.* 4: 579–591.
 - 48) Kozdroj, J., and J.D. Van Elsas. 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biol. Fertility Soils* 31: 372–378.
 - 49) Krsek, M., and E.M.H. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods* 39: 1–16.
 - 50) Kudo, Y., T. Nakajima, T. Miyaki, and H. Oyaizu. 1997. Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 39–48.
 - 51) Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill, and P.J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2463–2472.
 - 52) LaMontagne, M.G., J. Michel, F.C., P.A. Holden, and C.A. Reddy. 2002. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *J. Microbiol. Methods* 49: 255–264.
 - 53) Lee, S.-Y., J. Bollinger, D. Bezdicek, and A. Ogram. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3787–3793.
 - 54) Leff, L., J. Dana, J. McArthur, and L. Shimkets. 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1141–1143.
 - 55) Liesack, W., H. Weyland, and E. Stackebrandt. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* 21: 191–198.
 - 56) Liles, M.R., B.F. Manske, S.B. Bintrim, J. Handelsman, and R.M. Goodman. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2684–2691.
 - 57) Lindahl, V., and L.R. Bakken. 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 135–142.
 - 58) Maarit Niemi, R., I. Heiskanen, K. Wallenius, and K. Lindstrom. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* 45: 155–165.
 - 59) Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J.C. Germon, G. Soulas, and G. Catroux. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2354–2359.
 - 60) Miller, D.N. 2001. Evaluation of gel filtration resins for the removal of PCR-inhibitory substances from soils and sediments. *J. Microbiol. Methods* 44: 49–58.
 - 61) Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4715–4724.
 - 62) Moran, M., V. Torsvik, T. Torsvik, and R. Hodson. 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 915–918.
 - 63) More, M.I., J.B. Herrick, M.C. Silva, W.C. Ghiorse, and E.L. Madsen. 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1572–1580.
 - 64) Mummy, K.L., and R.H. Findlay. 2004. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. *J. Microbiol. Methods* 57: 259–268.
 - 65) Nanzyo, M., R. Dahlgren, and S. Shoji. 1993. Chemical characteristics of volcanic ash soils, p. 145–187. In S. Shoji, M. Nanzyo and R. Dahlgren (ed.), *Volcanic ash soil*. Elsevier.
 - 66) Ogram, A., G.S. Sayler, and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7: 57–66.
 - 67) Ogram, A., W. Sun, F. Brockman, and J. Fredrickson. 1995. Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 763–768.
 - 68) Okabe, I., and S. Toriyama. 1995. Scanning electron microscopic observations of tobacco mosaic virus adhering to soil particles. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 44–48.
 - 69) Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer, and K.M. Scow. 2004. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1008–1016.
 - 70) Picard, C., C. Ponsionnet, E. Paget, X. Nesme, and P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2717–2722.
 - 71) Pillai, S.D., K.L. Josephson, R.L. Bailey, C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 1991. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2283–2286.
 - 72) Pitcher, D.G., N.A. Saunders, and R.J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151–156.

- 73) Porteous, L.A., and J.L. Armstrong. 1991. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. *Curr. Microbiol.* 22: 345–348.
- 74) Porteous, L.A., R.J. Seidler, and L.S. Watrud. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol. Ecol.* 6: 787–791.
- 75) Purdy, K., T. Embley, S. Takii, and D. Nedwell. 1996. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3905–3907.
- 76) 頼 泰樹. 2004. 土壌微生物の群集構造解析法に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命科学専攻土壌圏科学研究室 博士論文.
- 77) Ramsay, A.J. 1984. Extraction of bacteria from soil: Efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biol. Biochem.* 16: 475–481.
- 78) Ranjard, L., F. Poly, J. Combrisson, A. Richaume, and S. Nazaret. 1998. A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *Eur. J. Soil Biol.* 34: 89–97.
- 79) Robe, P., R. Nalin, C. Capellano, T.M. Vogel, and P. Simonet. 2003. Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* 39: 183–190.
- 80) Rochelle, P.A., J.C. Fry, R. John Parkes, and A.J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 59–65.
- 81) Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541–2547.
- 82) Roose-Amsaleg, C.L., E. Garnier-Sillam, and M. Harry. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecol.* 18: 47–60.
- 83) Saano, A., E. Tas, S. Pippola, K. Lindstrom, and J.D. Van Elsas. 1995. Extraction and analysis of microbial DNA from soil, p. 49–67. In J. T. Trevors and J. D. Van Elsas (ed.), *Nucleic Acids in the Environment*. Springer.
- 84) Saylor, G.S., J.T. Fleming, and D.E. Nivens. 2001. Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene lux fusions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 455–460.
- 85) Schneegurt, M.A., S.Y. Dore, and J. Charles F. Kulpa. 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5: 1–8.
- 86) Selenska, S., and W. Klingmuller. 1991. Direct detection of nif-gene sequences of *Enterobacter agglomerans* in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 80: 243–246.
- 87) Sessitsch, A., S. Gyamfi, N. Stralis-Pavese, A. Weilharter, and U. Pfeifer. 2002. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *J. Microbiol. Methods* 51: 171–179.
- 88) Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonca-Hagler, A. Wolters, and J.D. Van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78–85.
- 89) Stach, J.E.M., S. Bathe, J.P. Clapp, and R.G. Burns. 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 139–151.
- 90) Steffan, R.J., J. Goksoyr, A.K. Bej, and R.M. Atlas. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2908–2915.
- 91) Tebbe, C.C., and W. Vahjen. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2657–2665.
- 92) Thomas P. Curtis, W.T.S., and Jack W. Scannell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10494–10499.
- 93) Torsvik, V., J. Goksoyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782–787.
- 94) Torsvik, V.L. 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12: 15–21.
- 95) Trevors, J.T. 1996. DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 1–10.
- 96) Tsai, Y.-L., and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070–1074.
- 97) Tsai, Y.-L., and B.H. Olson. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 754–757.
- 98) Tsai, Y.-L., and B.H. Olson. 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2292–2295.
- 99) Tsai, Y.-L., M.J. Park, and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of mRNA from seeded soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 765–768.
- 100) Turpin, P.E., K.A. Maycroft, C.L. Rowlands, and E.M. Wellington. 1993. An ion-exchange based extraction method for the detection of salmonellas in soil. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 181–190.
- 101) Valinsky, L., G. Della Vedova, T. Jiang, and J. Borneman. 2002. Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes for analysis of fungal community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5999–6004.
- 102) Van Elsas, J.D., L.S. Van Overbeek, and R. Fouchier. 1991. A specific marker, pat, for studying the fate of introduced bacteria and their DNA in soil using a combination of detection techniques. *Plant Soil* 138: 49–60.
- 103) Vazquez-Marrufo, G., M.S. Vazquez-Garciduenas, B.E. Gomez-Luna, and V. Olalde-Portugal. 2002. DNA isolation from forest soil suitable for PCR assays of fungal and plant rRNA genes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 379–390.
- 104) Volossiuk, T., E. Robb, and R. Nazar. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3972–3976.
- 105) Watson, R.J., and B. Blackwell. 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 46: 633–642.
- 106) Westergaard, K., A.K. Muller, S. Christensen, J. Bloem, and S.J. Sorensen. 2001. Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biol. Biochem.* 33: 2061–2071.
- 107) Xia, X., J. Bollinger, and A. Ogram. 1995. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol. Ecol.* 4: 17–28.
- 108) Yeates, C., M.R. Gillings, A.D. Davison, N. Altavilla, and D.A. Veal. 1997. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 303–307.
- 109) Young, C., R. Burghoff, L. Keim, V. Minak-Bernerio, J. Lute, and S. Hinton. 1993. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1972–1974.
- 110) Zhou, J., M.A. Bruns, and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316–322.
- 111) Zhu, H., F. Qu, and L.H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21: 5279–5280.