

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

Soil DNA Isolation by Commercial Kits and Comparison of Bacterial Community Structures

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*
YOSHIKI KATOH, MARIKO UCHIDA, TOMOKO AOKI, NOBUHIKO NOMURA, TOSHIKI 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@sakura.cc.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: DNA 抽出キット, 細菌群集構造, DGGE

Key words: DNA isolation kit, bacterial community structure, DGGE

(原稿受付 2010年11月15日/原稿受理 2010年12月8日)

1. 緒 言

土壌汚染は深刻な社会問題であり, その浄化技術として浄化微生物(群)を利用するバイオレメディエーションが注目されている。この技術の実施に際して, 土着微生物群集の変動を把握することはヒトへの安全性や生態系への影響を評価する上で極めて重要であるため, 本研究では土壌環境中の微生物群集を正確に把握するための解析手法に着目した。微生物群集構造の調査に際しては, まず土壌からの DNA 抽出を行う。従って, 本研究では, DNA 抽出操作の違いが PCR 産物量及び細菌群集構造の解析結果に及ぼす影響について検討を加えた。

2. 材料および方法

2.1. 供試土壌

日本に広く分布する代表的な7種の土壌のほか, 油による実汚染土壌(東北地方にて採取。TPH 2,000 ppm)を対象とし, 用いた各土壌の諸性質を表1に示した。

2.2. DNA の抽出

土壌サンプルからの DNA 抽出には, 抽出原理の異なる5種類の市販キット(表2)を用い, それぞれのキットに添付されたプロトコールに従って行った。また, 黒ボク土についてはスキムミルクを添加することにより DNA の抽出が促進されることが知られているため^{4,6)}, スキムミルクを添加する手法も併用して抽出効率を比較した。スキムミルクの添加量は土壌 1 g あたり 40 mg とした。

2.3. 抽出 DNA の定量

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (invit-

rogen) を用いて, 蛍光吸光光度計 (BIO-RAD, Versa-Fluor フルオロメーター, excitation ~ 480 nm, emission ~ 520 nm) により土壌から抽出した DNA 量を求めた。

乾土あたりの DNA 量を導き出す際には各供試土壌の水分含有率を求めたが, 105°C に保った恒温乾燥機 (AS ONE: DO-300C) で 24 時間土壌を乾燥させ, 次式を用いて算出した。

$$\text{水分含有率 (\%)} = \frac{\text{湿土重量 (g)} - \text{乾土重量 (g)}}{\text{湿土重量 (g)}} \times 100$$

2.4. PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅

PCR は 0.2 ml 容 PCR 用チューブを用いて行った。PCR チューブに滅菌超純水 10.3 µl, 10×PCR Buffer (TaKaRa) 2 µl, dNTP Mixture (TaKaRa) 1.6 µl, 表3に示すプライマー (5 µM) 各 2 µl, Ex Taq DNA polymerase (5 unit/µl) (TaKaRa) 0.1 µl を加え, 混合した。次いで, テンプレートとして 2 µl の全 DNA を添加し, 全量を 20 µl として PCR に供した。PCR には i-Cycler (BIO-RAD Laboratories Inc.) を用い, Zwat らの Touch down 反応を改変して 28 サイクル (表4) で行った。反応終了後, 2 µl の反応液と 0.5 µl の 10×Loading Buffer (TaKaRa) を混合して 2% Agarose (nacalai tesque) 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 µl/ml のエチジウムブロマイド (NIPPON GENE) を含む 0.5×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を確認した。

PCR 産物量が少ない場合には, 上記と同様にして数本の PCR チューブを用いて PCR を行い, 反応終了後に全ての反応液を 1 本にまとめて次の精製ステップに供した。

表 1. 使用土壌一覧

土壌名	黒ボク土	黒ボク土	黒ボク土	赤・黄色土	灰色低地土	褐色森林土	未熟土	未熟土 (油による汚染土) ^{a)}
採取地	神奈川県	東京都	栃木県	山口県	東京都	新潟県	栃木県	—
土性 ^{b)}	CL	LiC	CL	SCL	LiC	SL	S	LS
粗砂 (%)	10.4	7	12.3	32.2	5.7	44.1	84.3	41
細砂 (%)	28.2	23.6	33.1	28.5	19.4	25.8	11.7	44.3
シルト (%)	39.8	38.1	34.2	17.6	40.4	16.3	0.7	5.9
粘土 (%)	21.6	31.3	20.4	21.7	34.5	13.8	3.3	8.8
pH (H ₂ O)	6.8	6	7.3	4.8	6	4.3	7.6	7.8
電気伝導度 (ds/m)	0.3	0.2	0.05	0.04	0.05	0.07	0.02	0.34
腐食 (g/kg)	111	79.3	73.7	15.1	92.7	132	<0.1	29.3
全炭素 (g/kg)	66	51.7	43.4	10.3	55.4	77.7	0.3	19.2
有機物含有量 (W/W%)	25.6	15.4	12.2	7.1	17.7	16.7	0.9	5
全窒素 (g/kg)	3.9	3.3	2.8	0.7	4.5	4.1	<0.1	0.6
リン酸吸収係数 (g/kg)	27	15.2	166	4.9	20.2	7.6	1.7	7.6
塩基交換容量 (cmol (+) /kg)	44.9	42.9	20.4	9.1	25	26.2	2.9	19.7

^{a)} TPH=2,000 ppm, 東北地方にて採取

^{b)} 各土壌の土性は三角座標 (国際法) に基づいた。CL; 埴壤土, LiC; 軽埴土, SCL; 砂質埴壤土, SL; 砂質壤土, S; 砂土, LS; 壤質砂土

表 2. 使用キット一覧

使用キット	ビーズ破碎ステップ	界面活性剤添加	熱処理	DNA 回収法
キット A	有	有	無	マトリックスに吸着
キット B	有	有	有 (65°C, 1 hr)	クロロホルム/イソプロパノール処理後, エタノール沈殿
キット C	無	有	有 (65°C, 10 min)	ゲルろ過後, エタノール沈殿
キット D	無	有	有 (65°C, 3 hr)	クロロホルム/イソプロパノール処理後, エタノール沈殿
キット E	有	有	無	シリカ膜に吸着

表 3. 使用プライマーの塩基配列

Primer	塩基配列
357F-GC	5'-GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
518R	5'-GTATTACCGCGGCTGG-3'
GC clamp=CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG	

2.5. PCR 産物の精製

PCR 産物 100 μ 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 Purifica-

tion Kit) を加え, ピペッ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 14,000 \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 μ l の Spin Clean (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) を加えて 14,000 \times g で 1 分間遠心分離した。ろ

表 4. PCR プログラム

pre-heating	94°C	5 min.	
熱変性	94°C	30 sec.	20 cycle
annealing	*65°C	30 sec.	
伸長反応	72°C	12 sec.	
熱変性	94°C	30 sec.	8 cycle
annealing	55°C	30 sec.	
伸長反応	72°C	12 sec.	
伸長反応	72°C	5 min.	
	4°C	∞	

* 1 サイクル毎に 0.5°C ずつ下げる。

液を捨ててさらに 14,000×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 µl の Elution Buffer (Ultra Clean PCR Clean-up DNA Purification Kit) を加えて 14,000×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 µl の精製物と 0.5 µl の 10×Loading Buffer (TaKaRa) を混合して 2% Agarose (nacalai tesque) 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 µl/ml のエチジウムブロマイド (NIPPON GENE) を含む 0.5×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 の比 (260 nm/280 nm) により DNA が精製されたことを確認した。

2.6. DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法

DGGE には、D-code system (BIO-RAD) を用い、同社のプロトコールに従って作成した。8% アクリルアミドゲル中の変性剤濃度勾配を 30% ~ 60% (ここで変性剤 100% とは、7 M 尿素、40% ホルムアミドに相当する) に設定し、60°C、36 V、18 時間の条件で泳動した。上記で精製した PCR 産物 (DNA 量 120 ng 相当) に等容の 2×Dye Solution (0.5% Bromophenol Blue, 0.5% Xylene cyanol, 70% Glycerol) を加え、DGGE に供した。

泳動終了後、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes) を 0.5×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、撮影した。

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微生物群集構造の類似性について解析した。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、その輝度の全体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わかりやすく可視化するために、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. 各種土壌からの DNA 抽出

各抽出キットに添付されたプロトコールに従って操作を行ったところ、未熟土 (栃木県) を除いた全ての土壌から DNA を得ることができたが、その量は土壌の種類および抽出原理 (キット) によって大きく異なった (図 1)。

DNA 抽出の際、スキムミルク添加によって抽出効率が向上し、特に黒ボク土に対して有効であることが知られている^{4,6)}。そこで本研究では、抽出 DNA 量が少なかった 4 種の土壌 (黒ボク土 (神奈川県)、赤・黄色土 (山口県)、灰色低地土 (東京都))、および DNA を得ることが出来なかった未熟土 (栃木県) にスキムミルクを添加し、DNA の抽出促進効果を見た (図 1)。その結果、黒ボク土 (神奈川県) と灰色低地土では、キット A、B および E を用いた場合に顕著な DNA 量の増加が見られたが、キット C と D では抽出促進効果は見られず、逆に減少することも認められた。未熟土 (栃木県) の場合、キット A で DNA 抽出量の若干の増加が見られたが、その他のキットでは認められなかった。

3.2. PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析

土壌から抽出した DNA を鋳型として PCR を行ったところ、ほとんどのサンプルから目的とするサイズ (約 220 bp) の PCR 産物が得られた。一方、いずれのキットを用いても抽出 DNA 量が極めて少量であった未熟土 (栃木県) では、スキムミルク添加のキット A の場合でのみ増幅産物が観察され、その他のキットでは認められなかった。いずれの土壌においても、キット C による抽出 DNA 量は少なく、PCR で増幅しても DGGE に供するに十分量の PCR 産物を得ることは出来なかった。

DNA 抽出の際、スキムミルクを添加することによって、スキムミルク由来の DNA も抽出されることが懸念された。このため、まずスキムミルクのみから DNA 抽出を行って PCR で増幅したが、産物は認められなかった。次いで、スキムミルク添加の有無による DGGE バンドパターンを比較したところ、ほぼ同一であることが確認されたため、スキムミルクを添加しても群集構造解析には影響を及ぼさないことが判明した。

各種キットを用いて様々な土壌から DNA 抽出を行い、微生物群集構造の類似性を DGGE にて解析した (図 2A, 3A)。次いで、DGGE バンドプロファイルを主成分分析によって解析した結果、いずれのキットを用いても同一土壌ごとにクラスターを形成し、すなわち、用いたキットが異なっても解析結果には顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。 (図 2B, 3B)。

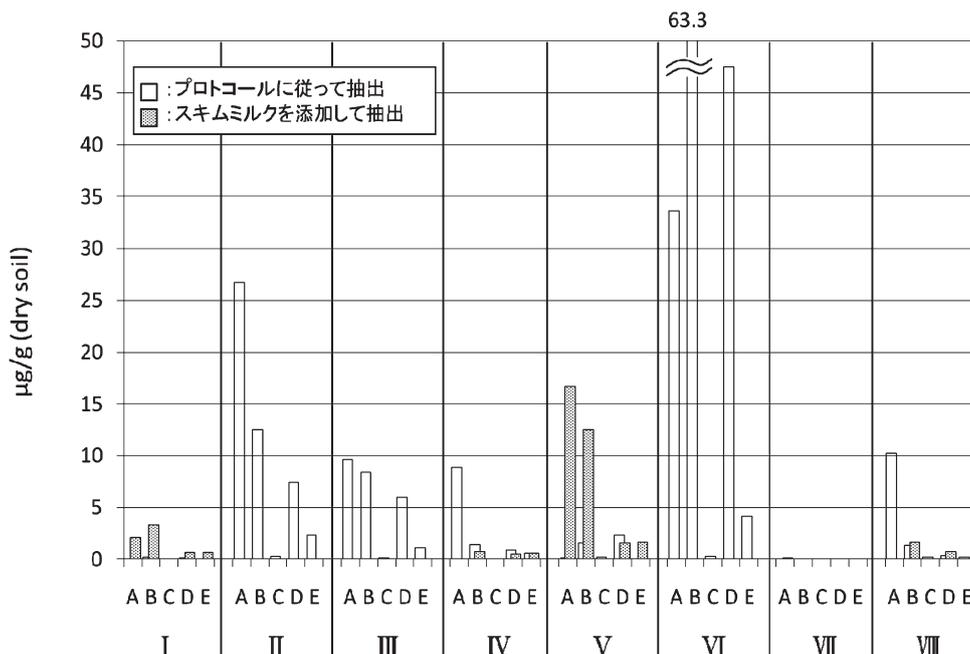


図1. 各抽出方法による抽出 DNA 濃度

I: 黒ボク土 (神奈川県), II: 黒ボク土 (東京都), III: 黒ボク土 (栃木県), IV: 赤・黄色土 (山口県), V: 灰色低地土 (山口県), VI: 褐色森林土 (新潟県), VII: 未熟土 (栃木県), VIII: 未熟土 (油汚染)

□: プロトコールに従って抽出。■: スキムミルクを添加して抽出。

4. 考 察

本研究では、性質の異なる計 8 種類の土壌に対し、広汎に使用されている 5 種類の市販 DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、土壌の性質の違いが抽出 DNA 量に及ぼす影響について検討した。次いで、PCR により真正細菌の 16S rRNA V3 領域を増幅して群集構造を解析し、DNA 抽出手法の違い (使用キットの相違) が微生物群集構造解析結果に与える影響について評価した。

4.1. DNA 抽出及び PCR 増幅

同一土壌であっても抽出キットによって DNA 量に変化し、土壌の性質や抽出原理の相違などに起因すると考えられる抽出効率の差異が認められた。特にキット C を用いた場合、いずれの土壌においても抽出 DNA 量が平均的に少なく、PCR でも十分量の増幅産物が得られない場合が認められた。しかし一方では、キット A により未熟土 (栃木県) から、また、キット E で未熟土 (油汚染) から DNA 抽出を行った場合、同様に抽出 DNA 量は少量であったが、PCR では十分量に増幅され DGGE に供することが可能であった。以上の理由として、キット C で得られた DNA 溶液には何らかの PCR 阻害物質等が残存していた可能性も考えられるが、詳細については今後の検討が必要である。

本研究では、未熟土を除いたいずれの土壌からも後の操作に支障を来さない十分量の DNA が抽出された。これまでの報告によれば、黒ボク土からの DNA 抽出は困難であり、その原因として、黒ボク土が火山灰由来の土壌であるためにリン酸吸収係数を高めるアロフェンやイモゴライト、腐食-アルミニウム複合体等の成分²⁾を多く含み、一旦抽出された DNA がそれらに吸着してしま

うためと考えられている^{4,6,8)}。また、土壌の化学的性質に深く関わるシルト・粘土が多く含まれる土壌でも、それらの鉱物に DNA が強力に吸着されることが報告されている^{1,7)}。しかし、DNA 抽出量 (回収量) が少なかった原因として、上記の様に抽出された DNA が鉱物等に吸着されて回収が困難になるほか、本質的に DNA 存在量が少なかった可能性も考えられる。本報で用いた未熟土は、全炭素量、有機物含有量が他と比べて極端に低いことから、後者の可能性も考えられる。

鉱物等への吸着により DNA 回収量が低下した場合、例えば、黒ボク土 (神奈川県) や灰色低地土 (東京都) ではスキムミルク添加によって回収効率が顕著に改善され、スキムミルクのマスキング効果が認められたが、これら土壌は「高リン酸吸収係数」および「高シルト・粘土含有率」という特徴を有していた (表 1)。一方、上記の条件を満たしている 2 種類の黒ボク土 (東京都、栃木県) では、特別な処理を加えることなく十分量の DNA 抽出が可能であった。このことから、Ikeda らの報告³⁾と同様に、リン酸吸収係数等のスコアが高くても必ずしも DNA 抽出が困難な土壌であるとは断定できず、上記以外の原因の存在が推察された。今後、土壌の性質と抽出 (回収) DNA 量の関係に関するデータが蓄積され、DNA 抽出 (回収) の難易度を事前に予測できる土壌の性質に関する特定指標が見いだされることが期待される。

4.2. DGGE 法による微生物群集構造解析

Martin-Laurent らは、市販のキット 2 種および彼らが考案した方法で DNA を抽出し、Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) と Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) によって細菌群集構造解析を行った結果、それぞれの抽出手法で得られたバンドパ

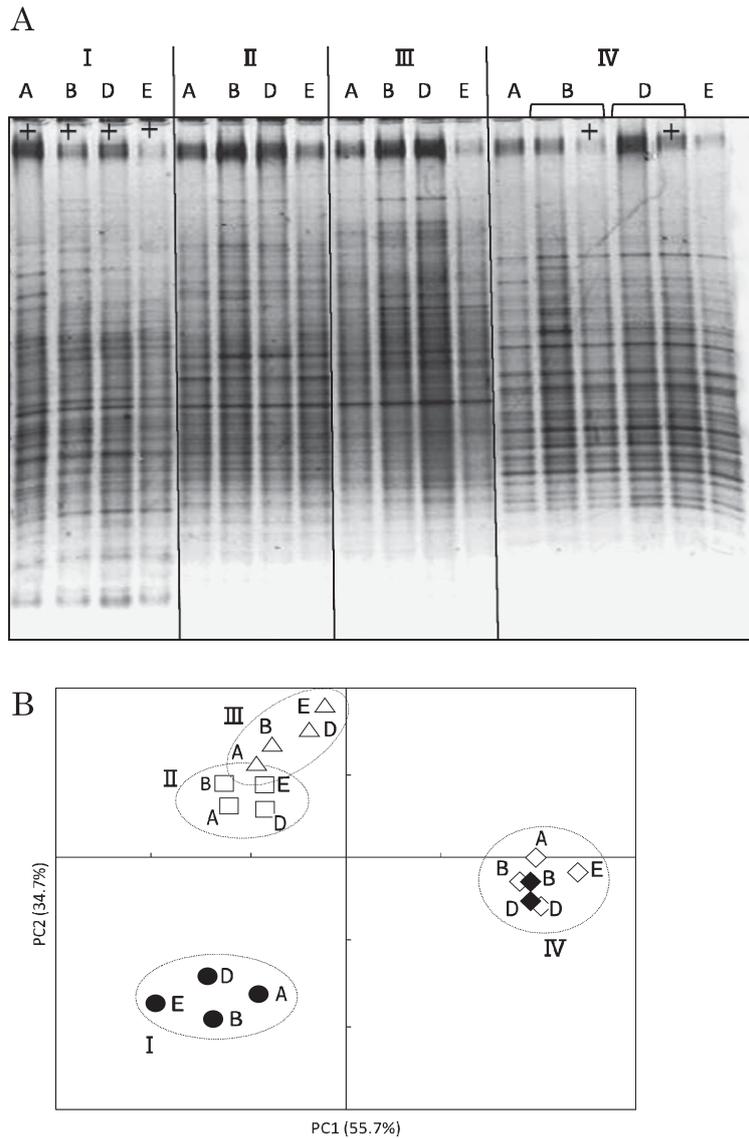


図 2. DGGE (A) 及び PCA (B)

I : 黒ボク土 (神奈川県), II : 黒ボク土 (東京都), III : 黒ボク土 (栃木県), IV : 赤・黄色土 (山口県)
 DGGE ゲルのレーン上部にある「+」はスキムミルク添加を示す。
 ○, ● : 黒ボク土 (神奈川県), □ : 黒ボク土 (東京都), △ : 黒ボク土 (栃木県), ◇, ◆ : 赤・黄色土 (山口県)
 白色シンボル : プロトコールに従って抽出。黒色シンボル : スキムミルクを添加して抽出。

ターンには顕著な差異が認められなかったと報告している⁹⁾。本研究においても同様の結果 (図 2, 3) が得られ、このことから、用いたキットによって土壌より得られた DNA 量が異なっても、同一土壌であればそれぞれの細菌細胞からの抽出効率はほぼ一定であると推察された。従って、PCR-DGGE を行うに十分な DNA 量が得られれば、抽出手法が異なっても、細菌群集構造解析結果には顕著な差異が生じないと結論される。

4.3. 実汚染土壌を用いた真正細菌叢解析

本報では、バイオレメディエーションにおける適切な安全性評価のための手法を提示するため、日本の代表的な 7 種の土壌に加え、油による実汚染土壌の細菌叢解析も行った。その結果、抽出キットの違いやスキムミルク添加有無の違いがあってもほぼ同様の細菌叢解析結果が

得られ、実汚染土壌でも特筆すべき問題点は生じなかったが、今後更に多くの汚染土壌を用いて検証を重ねる必要があるであろう。

謝 辞

本研究は、経済産業省平成 17 ~ 21 年度環境対応技術開発等 (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

- 1) 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.

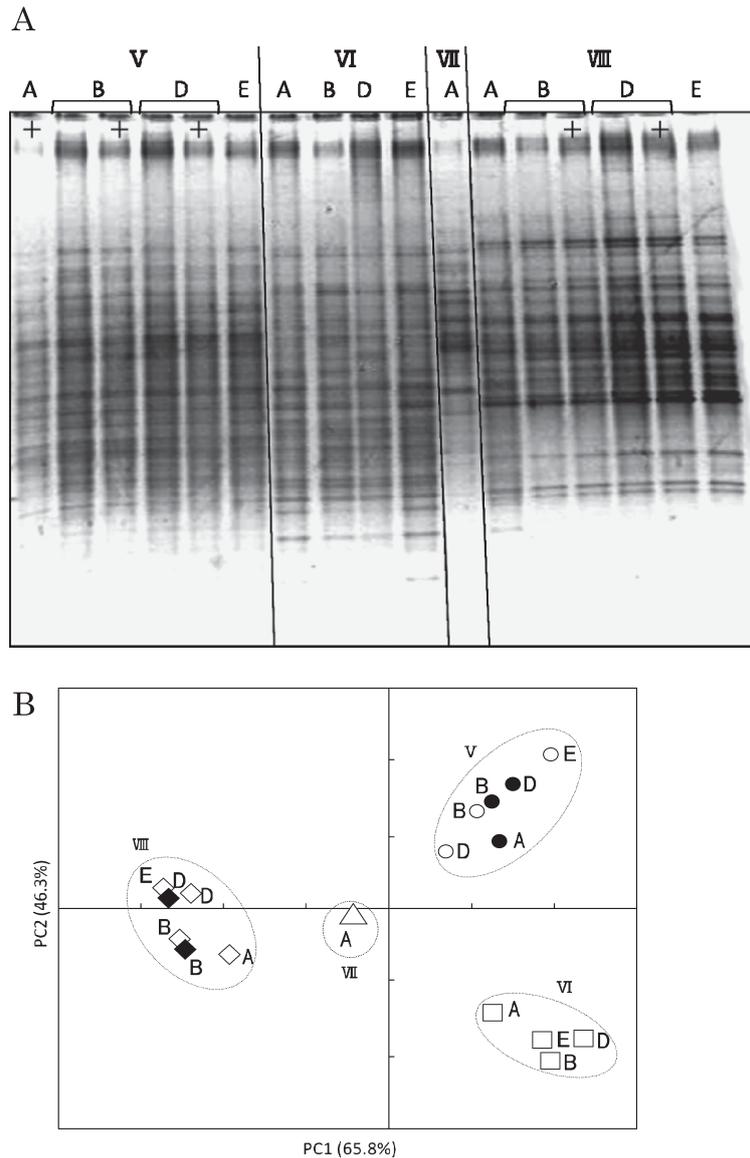


図3. DGGE (A) 及び PCA (B)

V : 灰色低地土 (山口県), VI : 褐色森林土 (新潟県), VII : 未熟土 (栃木県), VIII : 未熟土 (油汚染)

DGGE ゲルのレーン上部にある「+」はスキムミルク添加を示す。

○, ● : 灰色低地土 (山口県), □ : 褐色森林土 (新潟県), △ : 未熟土 (栃木県), ◇, ◆ : 未熟土 (油汚染)

白色シンボル : プロトコールに従って抽出。黒色シンボル : スキムミルクを添加して抽出。

- Appl. Environ. Microbiol. 67: 293–299.
- 2) Frostegard, A., S. Courtois, V. Ramisse, 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.
 - 3) Ikeda, S., H. Tsurumaru, S. Wakai, C. Noritake, K. Fujishiro, M. Akasaka, and K. Ando. 2008. Evaluation of the effects of different additives in improving the DNA extraction yield and quality from Andosol. Microbes Environ. 23(2): 159–166.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) Takada-Hoshino, Y. and N. Matsumoto. 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. Microbes Environ. 19: 13–19.
 - 7) Trevors, J.T. 1996. DNA in soil: adsorption, genetic transformation molecular evolution, and genetic microchip. Antonie van Leeuwenhoek. 70: 1–10.
 - 8) Volossiuk, T., E. Robb, and R. Nazar. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3972–3976.