

DNA 抽出が困難な土壌の細菌叢解析およびその問題点

Analysis of Bacterial Community Structure in Soil Possessing Difficulty in DNA Extraction, and Its Problems

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*
EMI TAKEUCHI, MARIKO UCHIDA, RINA ONO, 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, 土壌 DNA, 細菌群集構造, DGGE

Key words: DNA extraction, soil DNA, 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

前報¹⁾において, 8種類の土壌を対象として, 5種類のDNA抽出キットを用いたDNA抽出および細菌叢解析を行った。その結果, 未熟土を除いた土壌からは比較的十分量のDNAが抽出され, DGGE解析結果においても用いたキットの違いによる差異は認められなかった。本報では, 前報¹⁾で得られた結果の普遍性を検証するため引き続き他の土壌を用いて同様の解析を行い, 得られた細菌叢解析結果の比較, 検討を行った。

2. 材料および方法

2.1 供試土壌

本報では, 前報¹⁾と異なった土壌を使用し, ポーリングコアサンプルも用いた。それら供試土壌の性質を表1に示した。なお, 土壌名が前報¹⁾と同一であっても採取地が異なっている。また, ポーリングコアサンプルは地表面より1.5 m以上で採取したことから土壌名をつける範疇外にあたるため, 土層名にて示した。

2.2 DNAの抽出

キットA~Dは前報¹⁾と同一であるが, 新たにキットEに替えてキットF(表2)を加えた計5種類の市販キットを用い, それぞれのキットに添付されたプロトコールに従ってDNA抽出を行った。得られた抽出DNA量が少ない場合には, 前報¹⁾ではスキムミルクの添加によって増量を試みたが, 本報ではさらにそれ以外の以下に示す各種操作も追加して抽出量の改善を試みた。このうち最も効果のあったデーターを以降の図にて示した。

(1) キットBの代替 solution

キットBでのDNA抽出量が少ない場合, 通常用いられる solution (キット付属品) に替えてオプション solution (キット別売品) をプロトコールに従って使用した。

(2) EDTAの添加

EDTAを各キットで用いる buffer 量に対して0.2 Mとなるように添加し, DNA抽出を行った。

(3) 抽出DNAの濃縮

キット1本で得られるDNA量が少ない場合, キット複数本を用いてDNA抽出を行い, それらDNA抽出液を1本にまとめてエタノール沈殿を行った後, 50 µlのTEに溶解して用いた。

(4) スキムミルクの添加 (前報¹⁾と同一の操作)

スキムミルクを土壌1 gにつき40 mg添加し, DNA抽出を行った。

2.3 DNAの定量

前報¹⁾と同様にしてDNA濃度を求めた。

2.4 PCRによる16S rRNA遺伝子の増幅

PCRの反応条件は基本的に前報¹⁾と同じであるが, PCR産物量が少ない場合には基本の28サイクルを38サイクルに増加させて行った。すなわち, 前報¹⁾表4の8サイクル部分を18サイクルに変更し, 計38サイクルとして行った。

2.5 PCR産物の精製およびDGGE (変性剤ゲル濃度勾配電気泳動) 法

前報¹⁾と同様にして行った。

表 1. 使用土壌一覧

| 土層名/土壌名 ^{a)} | ローム (2 m) | 火山灰質粘土 (4.5 m) | 細砂 (8 m) | シルト (11 m) | 火山放出物 未熟土 | 黒ボク土 (関東ローム由来) | 黒ボク土 (シラス由来) |
|--------------------------|--------------|-------------------|-------------|---------------|--------------|-------------------|-----------------|
| 採取地 | 千葉県 | 千葉県 | 千葉県 | 千葉県 | 鹿児島県 | 千葉県 | 鹿児島県 |
| 土性 ^{b)} | LiC | LiC | LS | LiC | SL | CL | CL |
| 粗砂 (%) | 2.5 | 3.1 | 51.4 | 0.5 | 43.9 | 5.4 | 8.2 |
| 細砂 (%) | 28.9 | 26 | 34 | 22 | 40.8 | 33.2 | 30.9 |
| シルト (%) | 39.3 | 36.6 | 7.1 | 40 | 8 | 41.4 | 37.7 |
| 粘土 (%) | 29.3 | 34.3 | 7.5 | 37.5 | 7.3 | 20 | 23.2 |
| pH (H ₂ O) | 7.2 | 6.6 | 7.1 | 7 | 7.1 | 5.7 | 5.7 |
| 電気伝導度 (ds/m) | 0.06 | 0.05 | 0.02 | 0.11 | 0.01 | 0.07 | 0.18 |
| 腐食 (g/kg) | 20.6 | 0.5 | <0.1 | 11.7 | <0.1 | 255 | 70.9 |
| 全炭素 (g/kg) | 13.2 | 0.8 | 0.1 | 7.4 | <0.1 | 144 | 44.8 |
| 有機物含有量 (W/W%) | 11.9 | 8 | 3.8 | 4.9 | 1.9 | 32.4 | 14.1 |
| 全窒素 (g/kg) | 1.2 | 0.2 | <0.1 | 0.5 | <0.1 | 5 | 3.8 |
| リン酸吸収係数 (g/kg) | 28.9 | 14.7 | 5.2 | 9.9 | 1.4 | 30.8 | 17.4 |
| 塩基交換容量 (cmol (+) /kg) | 23.2 | 31.2 | 9.9 | 22.7 | 3.8 | 49 | 29.6 |

^{a)} カラム左側 4 つの土壌はボーリングコアサンプルであり土壌名の適用範囲外の試料であるため、土層名で示した。

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

表 2. キット F の概要

| 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 F | 有 | 有 | 有 (70°C, 10 min) | フェノール処理後，エタノール沈殿 |

3. 結 果

3.1 各種土壌からの DNA 抽出

各抽出キットに付属のプロトコールに従って行い、得られた DNA 量を図 1 に示した。黒ボク土（関東ローム由来）と黒ボク土（シラス由来）では前報¹⁾とほぼ同様な DNA 量が得られたが、他の土壌からの抽出量は極めて微量であり、本報で用いた土壌は前報¹⁾とは著しく異なり難抽出性であることが判明した。

3.2 DNA 抽出効率の向上化および増量化

土壌から抽出された DNA が電気泳動ゲル上で確認されないほど微量であっても、PCR によって十分に増幅され、その後の DGGE 解析が支障無く行われる場合もある。従って、黒ボク土以外で DNA が電気泳動で観察されなかったサンプルも含め、PCR によって真正細菌 16S rRNA 遺伝子断片を増幅・精製し、電気泳動で増幅産物の確認を行った（表 3）。その結果、黒ボク土（関東ローム由来）については、キット F を除いたサンプルにおいて予測されたサイズの PCR 産物が確認され、黒ボク土（シラス由来）については、キット A、キット F を除いたサンプルにおいて PCR 産物が確認された。しかし、その他の土壌に関しては、シルト（11 m）か

らキット A および キット C を用いて得られた DNA、火山灰質粘土（4.5 m）からキット B および キット C を用いて得られた DNA から僅かながら PCR 産物が確認されたものの、他の土壌では PCR 産物を確認することができなかった。従って、改めて、本報で使用したほとんどの土壌は、前報¹⁾で使用した土壌とは異なり DNA 抽出および PCR 増幅が困難な土壌であることが再確認された。

上記のとおり、各手法により DNA 抽出を行った結果、抽出 DNA 量は極めて少なく、その後の PCR においても 16S rRNA 遺伝子の増幅が確認できない土壌が多かった。従って、DGGE 解析に必要な DNA 量を得るために上記 2.2 (1)～(4) に示した追加手法を用いて DNA 抽出効率の改善を行う必要があった。また、DGGE に供するための十分な PCR 産物量を得るためにサイクル数を増加させて PCR を行うことにより、DGGE に供することが可能となった。

3.3 PCR-DGGE 法による細菌群集構造解析

十分量の DNA が比較的容易に得られた黒ボク土（関東ローム由来）と黒ボク土（シラス由来）では、いずれの抽出手法を用いてもほぼ類似した DGGE バンドパターンが観察された（図 2）。一方、DNA 抽出が困難で

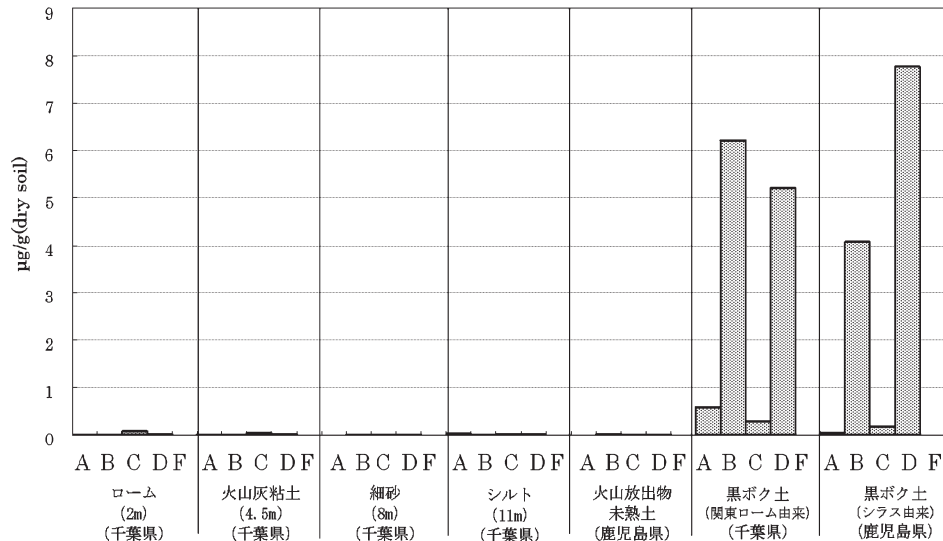


図 1. 各抽出キットによる DNA 抽出濃度
A, B, C, D, F はキットを示す

表 3. PCR 増幅産物量の比較

| | ローム (2 m) | 火山灰質粘土 (4.5 m) | 細砂 (8 m) | シルト (11 m) | 火山放出物未熟土 | 黒ボク土 (関東ローム由来) | 黒ボク土 (シラス由来) |
|-------|-----------|----------------|----------|------------|----------|----------------|--------------|
| キット A | - | - | - | + | - | ++ | - |
| キット B | - | + | - | - | - | ++++ | ++++ |
| キット C | - | + | - | + | - | +++ | ++ |
| キット D | - | - | - | - | - | ++ | + |
| キット F | - | - | - | - | - | - | - |

アガロースゲル上のバンドの濃淡を以下の 5 つに区分した。

++++: 濃い ++: バンド有 ++: 薄い +: かなり薄い -: バンド無

あったローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), 細砂 (8 m), シルト (11 m), および火山放出物未熟土 (通称, シラス土壌) では, 同一土壌であるにも関わらず抽出手法によって DGGE バンドパターンが著しく変化した (図 3, 4)。また, 火山灰質粘土 (4.5 m) では, 明確に確認できる DNA バンドは少なかった。

4. 考 察

4.1. DNA 抽出及び PCR 増幅

市販のプロトコールに従って DNA 抽出を行った結果, 本報で用いた供試土壌のうち特段の追加操作を加えずに DNA の抽出が確認できたものは 2 種の黒ボク土 (関東ローム由来, シラス由来) のみであった。本報で用いたローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), シルト (11 m), は, 前報⁷⁾で述べたように DNA を回収しにくい原因と考えられている高リン酸吸収係数, あるいは粘土を多く含んでいたため (表 1), DNA 量が極めて低かったものと考えられる。一方, 同じく DNA 回収が困難であった細砂 (8 m), 火山放出物未熟土はリン酸吸収係数が低く, また, 粘土の含有率も低いことから (表 1), 必ずしも DNA 吸着が低抽出量の原因であるとは考えにくい。一方, 全炭素や全窒素, 有機物含有量の値が低いと, こ

れら 2 土壌は本質的に微生物量が少なかったためではないかと推察された。本報では菌数測定を行わなかったが, 今後, 予め菌数が明らかになっている培養液を土壌サンプルにスパイクし DNA を回収する実験を行うことにより, その原因が明らかにされるであろう。

以上より, 本報で用いた土壌のほとんどが DNA 抽出の困難な性質を有す, もしくは, 微生物量自体の少ない土壌である可能性が示唆された。

各 DNA 抽出液を電気泳動に供した際, DNA の存在がバンドとして確認されなかったサンプルでは, 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅においても増幅産物量が微量であるか, もしくは検出されなかった。PCR の反応液中に腐植物質が含まれると, DNA ポリメラーゼ反応が著しく阻害されることが知られている⁴⁾。本報において PCR 産物が確認されなかった供試土壌のうち, ローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), シルト (11 m), では, 腐植や有機物含有率が高いことから (表 1), DNA 抽出液中に PCR 反応を阻害する腐植物質が混入し, PCR 時に支障をきたした可能性が考えられた。一方, 同じく PCR 産物を確認できなかった細砂 (8 m), 火山放出物未熟土では, 腐植, 全炭素や有機物含有量が少ないため (表 1), 同じ要因による阻害とは考えにくく, むしろ PCR に適切な DNA 量が抽出されなかったために増幅

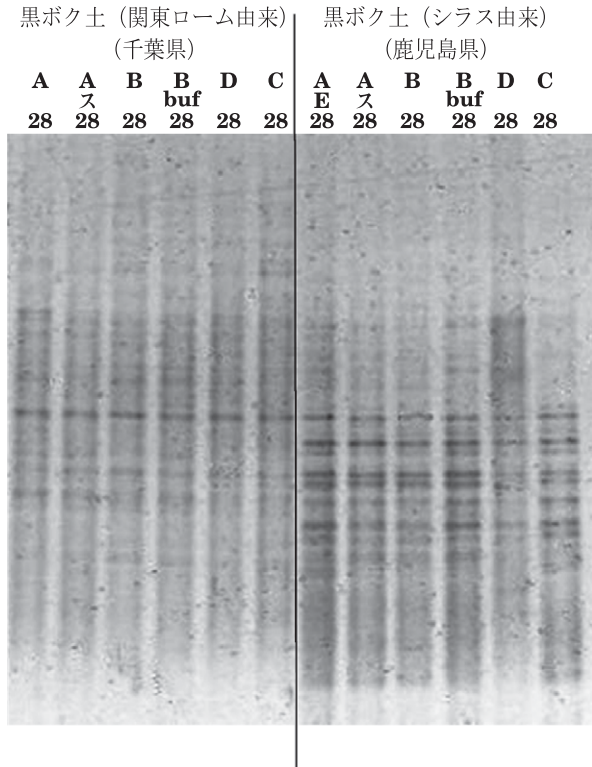


図2. 黒ボク土 (関東ローム由来, 千葉県), 黒ボク土 (シラス由来, 鹿児島県) の DGGE
 ス: スキムミルク添加, buf: キット B 別売品バッファー使用, E: EDTA 添加, 28: PCR サイクル数を示す

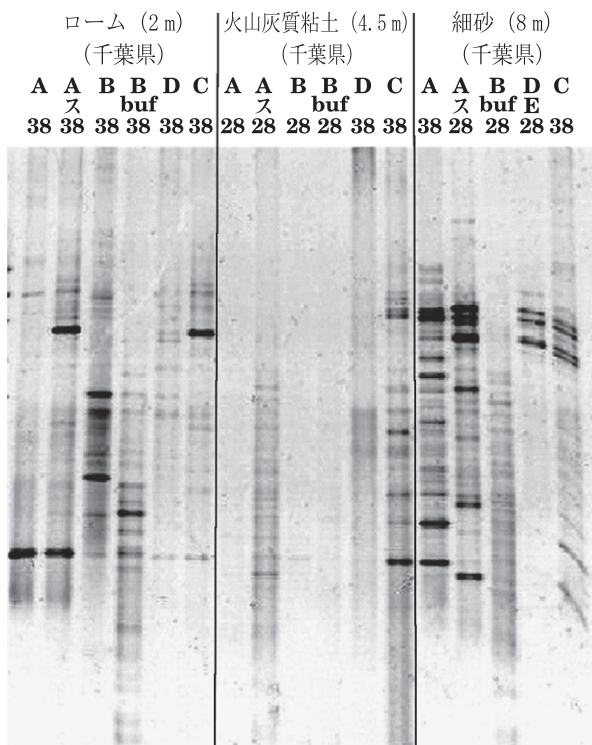


図3. ローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), 細砂 (8 m) の DGGE
 ス: スキムミルク添加, buf: キット B 別売品バッファー使用, E: EDTA 添加, 28, 38: それぞれ PCR サイクル数を示す

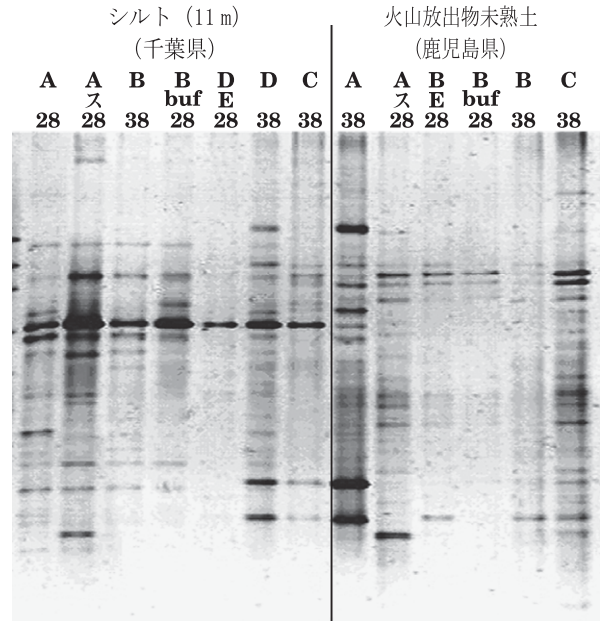


図4. シルト (11 m), 火山放出物未熟土 (鹿児島県) の DGGE
 ス: スキムミルク添加, buf: キット B 別売品バッファー使用, E: EDTA 添加, 28, 38: それぞれ PCR サイクル数を示す

が困難であったものと推察された。以上より、ボーリングにて採取したローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), 細砂 (8 m), シルト (11 m), および火山放出物未熟土について細菌叢解析を行う場合, DNA 抽出, PCR 増幅といった操作が困難になる可能性が示された。

4.2. DGGE 法による細菌群集構造解析

DNA 抽出が困難な土壌については、「2.2 DNA の抽出」に記載した (1)~(4) の操作を追加して DNA 抽出効率の向上を図った。また, 十分量の PCR 産物を得られなかったサンプルについては, PCR のサイクル数を増加して行った。以上の操作によって DNA 抽出及び PCR 増幅が改善された試料を DGGE に供し, 各抽出キットによる細菌叢解析結果を土壌ごとに比較したところ, 2 種の黒ボク土 (関東ローム由来, シラス由来) 以外の土壌ではそれぞれの抽出手法によって DGGE バンドパターンが著しく異なり, 特にローム (2 m), 火山灰質粘土 (4.5 m), 細砂 (8 m) では顕著であった (図 3)。また, PCR でサイクル数を 38 に増加させると泳動パターンが顕著に変化し, 改めて, サイクル数の増加に際しては細心の注意を払う必要があることが喚起された。

前報¹⁾では, 用いた 8 種類の供試土壌においていずれの抽出法を用いても細菌叢解析結果はほぼ類似していたが, 本報では, 用いた土壌のうち 5 種類においては各手法によって得られた DNA 量が前報¹⁾と比較して極端に少量であり, DNA 抽出の困難な土壌であった。このため, DNA 抽出効率を改善させるために各種操作を追加して DGGE 法で解析した結果, DNA 抽出手法によって DGGE バンドパターンが大きく異なった。本報で用いたような DNA 難抽出土壌では, 得られる DNA 液中の DNA 濃度が低いために, PCR のテンプレート液として用いる際, 高度に希釈する必要がない。従って, 土壌由

来の抽出成分が PCR 反応液中にほぼそのままの濃度で混入する可能性が高く、腐植物質や抽出バッファー成分由来のトリトン X 等の PCR 阻害物質²⁾が含まれていた可能性も考えられる。また、DNA 抽出効率を向上させる目的で使用した EDTA がバッファー中に高濃度で存在した場合、土壌中の腐植物質を溶出させる可能性も報告されている³⁾。従って、得られた DNA 抽出液中の DNA 濃度が低かった土壌では、抽出液中に持ち込まれた成分が PCR を阻害する、あるいは特定の増幅されやすい DNA が優先化される等により、細菌叢解析に大きな影響を与えた可能性が考えられた。また、PCR サイクル数を増加することにより、DNA 抽出時に生じる短い DNA 断片に由来した非特異的な増幅産物が形成される可能性も、DGGE バンドパターンが抽出手法によって大きく変化した原因の一つとして考えられた。

以上の様に、前報¹⁾とは異なって、DNA 難抽出土壌の細菌叢解析を行う際はそれぞれの抽出手法に固有の原理、操作、あるいは土壌の性質などが大きく影響し、同じ土壌を用いた細菌群集構造解析であっても結果に大きな差異が生じることが示された。従って、DNA 難抽出土壌の細菌叢解析を行う場合には、以下のことに留意する必要があるであろう。

1. スキムミルクや EDTA 等の添加資材を用いて DNA 抽出効率を改善させた場合、PCR に供する前に得られた DNA 溶液を精製し、不純物の除去を行うことが望ましい。
2. PCR 産物量が少ない場合、PCR のサイクル数を増加させるよりも複数本の PCR チューブを用いて行い、混合して DNA 量を増加させる方が、より正確な解析結果につながるものと思われる。

3. 長期間に渡って細菌群集構造を経時的に解析する場合、使用する DNA 抽出キットは 1 種類に固定して行い、複数のキットを用いて得られたそれぞれの結果で時系列変動を解析することは避けた方が良いであろう。

以上は、限られた土壌試料および使用キットを用いての結果であるため、今後さらに検体数などを増やして検証を進めることが重要であると考えられる。

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) 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: 109-114.
- 2) 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.
- 3) Takada-Hoshino, Y. and N. Matsumoto. 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly absorb DNA. *Microbes Environ.* 19(1): 13-19.
- 4) 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.