

学 位 論 文 題 名

土壌くん蒸処理が微生物群集構造に与える影響の 分子生物学的解析

学位論文内容の要旨

土壌くん蒸剤として広く用いられてきた臭化メチルは、オゾン層破壊物質として 2005 年以降使用が禁止され、その代替薬剤の使用量増加が見込まれる。これらの薬剤は幅広い殺生物活性を持つことから、環境中の非標的生物への影響が懸念されている。

微生物は環境において物質循環など生態系の基礎となる重要な役割を果たしているが、土壌に生息する微生物は、培養法ではその大部分が培養できず、環境影響を測る上で手法上の問題があった。そこで、この問題を解決する手法として、培養を経ないで土壌から直接抽出した DNA や RNA を使用し、土壌中の微生物を調べる方法に着目した。

本論文では臭化メチル代替薬剤が土壌微生物群集に与える影響を取り上げ、土壌診断における新しい視点として、土壌から直接抽出した DNA あるいは RNA を用いた微生物群集の解析法を確立し、本法による影響解析を行った。

1. 黒ボク土からの DNA 抽出法の開発

日本の畑地面積の大部分を占める黒ボク土は、DNA 抽出が困難なことで知られている。DNA 添加実験により、その原因は DNA の土壌への吸着であることが示唆された。また、RNA やスキムミルクを添加し DNA の吸着を阻害することで、DNA の抽出効率が向上することを明らかにした。具体的には、スキムミルク ($40 \text{ mg g}^{-1} \text{ soil}$) と市販の DNA 抽出キットの組み合わせにより、日本各地の黒ボク土から PCR に適した DNA を抽出した。供試 7 土壌のうち、スキムミルク無添加で抽出されなかった 5 種類の土壌から抽出が可能になり、無添加で抽出可能な 2 土壌に関しても、添加により DNA 抽出量が増加した。付加したスキムミルクの除去作業が不要なこと、スキムミルクは安価であることから、黒ボク土からの DNA 抽出法として有用である。RNA の添加は後処理などの点でスキムミルク法より劣った。

以上より、黒ボク土からのスキムミルクを用いた DNA 抽出法が確立された。

2. 臭化メチル代替薬剤が土壌微生物の量と活性に与える影響の解析

農業環境技術研究所圃場ハウレンソウ畑（黒ボク土）において、臭化メチル代替薬剤として用いられるクロロピクリン（CP）あるいは 1,3-ジクロロプロペン（1,3-D）が土壌微生物群集に与える影響を 3 年間にわたり追跡した。くん蒸処理は毎年 9 月に行い、その後ハウレンソウを 2 作栽培した。

土壌からの DNA 抽出量、希釈平板法による細菌・糸状菌数、土壌被覆培養法による土壌微生物の静菌活性はいずれも、CP 処理区で 1,3-D 処理区より大きな影響が見られ、CP が土壌微生物群集に与える影響の大きさが示唆された。CP 処理区において、細菌数、静菌活性は処理から 1 月後に、糸状菌数は 1 年の間に、無処理区と同程度まで回復し、これらを指標とした評価によれば、土壌微生物への影響は回復しているこ

とが示唆された。しかし、培養困難な微生物も含めた指標である土壌からの DNA 抽出量は、処理から 1 年を経過しても無処理区の半分程度までしか回復しなかった。

3. 臭化メチル代替薬剤が細菌群集に与える影響の解析

上記圃場において、培養困難な微生物も含めた微生物群集を解析するため、土壌抽出 DNA を用い細菌 16S rDNA を対象とした PCR-DGGE 解析により、細菌群集の変化を追跡した。

CP 処理区で、実験 1 年目の処理 1 ヶ月後から DGGE パターンの変化、多様性指数の低下が見られ、これらは処理から 1 年を経過しても完全には回復しなかった。2、3 年目に行った CP の処理後には 1 年目とは異なるパターン変化を示した。処理前、あるいは無処理区で見られたバンドの多くは既知の塩基配列と同一性が低いのにに対し、CP 処理後、回復過程で出現及び増大したバンドの塩基配列は *Arthrobacter* sp. や *Burkholderia* sp. など、培養可能な菌のものと高い同一性 (98.7~100%) を示した。また、1,3-D 処理区では、1 年目に影響は見られなかったが、2、3 年目にコントロール区では見られない DGGE バンドが増加した。

4. 臭化メチル代替薬剤が糸状菌群集に与える影響の解析

同様に、糸状菌 18S rDNA を対象とした PCR-DGGE 解析により、糸状菌群集の変化を追跡した。糸状菌 DGGE 解析においては、プライマーの選択性に問題があったため、プライマーセットの新たな組み合わせによる nested PCR 法を確立した。この方法では、土壌抽出 DNA から全ての糸状菌分類群由来のバンドの増幅が確認されたが、植物及び卵菌類の遺伝子は増幅されなかった。

処理後のバンドパターン変化は、おおよそ細菌群集と同様の傾向を示したが、反応は遅かった。CP 処理区では、子のう菌に高い同一性を示す配列を持つバンドが検出されなくなり、ツボカビに高い同一性を示す配列を持つバンドが優占した。

5. 土壌抽出 DNA と RNA を用いた微生物群集構造解析の比較

これまでの土壌抽出 DNA を用いた解析で、CP 処理直後の培養菌数低下にもかかわらず、PCR-DGGE パターンの変動が見られず、影響の検出にタイムラグがあった。そこで、土壌中におけるターンオーバーのより短い RNA を対象にした解析を試みた。

第一に、黒ボク土からの抽出は DNA 同様 RNA においても困難であったことから、競合阻害剤としてサケ精子 DNA を用い、黒ボク土からの RNA 抽出を可能にした。次に、土壌抽出 DNA 及び RNA を用いて CP 処理後の細菌群集構造変化を PCR-DGGE 解析で 2 ヶ月間追跡し、両者を比較した。

RNA を用いた解析で CP 処理による微生物群集の変動をより早く、より高感度に検出することが可能になった。しかし、この差は数日間で、処理 1 週間後には DNA 及び RNA の両方の解析で同様の CP 処理の影響が検出された。一方で、RNA を用いた解析は、DNA に比べ実験操作が煩雑かつ困難であり、結果を安定的に取得するためには、相応のコストが必要である。

以上のことより、短期的な解析においては、rRNA は rDNA より鋭敏なバイオマーカーであることが示され、rDNA を対象とした解析では CP 処理後死滅した菌の DNA を検出することが示唆された。

結論として、土壌抽出 DNA あるいは RNA を用いた手法は、培養困難な微生物を含む微生物群集の解析が可能で、土壌微生物群集への環境影響評価、特にさまざまな影響の比較や影響を受けた後の群集構造の変化の追跡に有用であることが示された。すなわち、CP 処理により、微生物相は大きく変化し、生育の早い菌が優占し、その傾向は処理後 1 年を経過しても回復しないことが判明した。微生物群全体の回復には、培養法の結果から考えられるよりも、時間がかかることが示唆された。さらに、これまでに培養されたことが無く遺伝子の配列のみが知られている細菌や、培養が困難な

糸状菌についても、影響を受けていることが明らかになった。また、1,3-D 処理は、CP 処理に比べ影響は小さいが、繰り返し処理することにより影響がでることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 繁 男

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

副 査 教 授 松 本 直 幸 (筑波大学連携大学院)

学 位 論 文 題 名

土壌くん蒸処理が微生物群集構造に与える影響の 分子生物学的解析

本論文は図30、表9、総頁数139の論文であり、別に参考論文4編が添えられている。

使用量増加が見込まれる臭化メチル代替薬剤の環境中における非標的生物への影響が懸念されており、その影響評価が求められている。環境中で、微生物は物質循環など生態系で基礎となる重要な役割を果たしているが、土壌に生息する微生物は、大部分が従来の培養法では培養できず、環境影響を測る上で手法上の問題があった。本研究は、土壌診断における新しい視点として、培養を経ないで土壌から直接抽出した DNA あるいは RNA を用いた微生物群集の解析法を確立し、本法による臭化メチル代替薬剤の影響解析を行っている。

1. 黒ボク土からの DNA 抽出法の開発

日本の畑地面積の大部分を占める黒ボク土からの DNA 抽出は困難であった。DNA 添加実験により、その原因は DNA の土壌への吸着であることが示唆され、スキムミルクなど吸着競合阻害剤を添加し DNA 吸着を阻害することで、DNA の抽出効率が向上することを明らかにした。スキムミルク(40 mg g⁻¹ soil)と市販の DNA 抽出キットの組み合わせにより、日本各地の黒ボク土から PCR に適した DNA 抽出が可能となった。

2. 臭化メチル代替薬剤が土壌微生物の量と活性に与える影響の解析

農業環境技術研究所圃場ハウレンソウ畑（黒ボク土）において、臭化メチル代替薬剤として用いられるクロルピクリン（CP）あるいは 1,3-ジクロロプロペン（1,3-D）が土壌微生物群集に与える影響を3年間にわたり追跡した。くん蒸処理は毎年9月に行い、その後ハウレンソウを2作栽培した。

土壌からの DNA 抽出量、希釈平板法による細菌・糸状菌数、土壌被覆培養法による土壌微生物の静菌活性はいずれも、CP 処理区の方が 1,3-D 処理区よりも大きく影響を受

けていることが分かった。培養によって検出される菌数は全て 1 年の間に無処理区と同程度まで回復したが、DNA 抽出量は、処理 1 年後においても無処理区の半分程度に留まることが判明した。

3. 臭化メチル代替薬剤が微生物群集に与える影響の解析

上記圃場において、培養困難な微生物を含めた微生物群集を解析するため、土壌抽出 DNA を用い細菌 16S rDNA 及び糸状菌 18S rDNA を対象とした変性剤ゲル勾配電気泳動 (PCR-DGGE) により、細菌及び糸状菌群集の変化を追跡した。糸状菌 DGGE 解析では、既報のプライマーセットでは、その特異性に問題があったため、植物遺伝子を増幅しない nested PCR 法を確立した。

CP 処理区では、実験初年目処理 1 ヶ月後から DGGE パターンは変化し、単純化した。これらは処理後 1 年を経過しても完全には回復しなかった。2、3 年目に行った CP の処理後には 1 年目とは異なるパターン変化を示した。細菌では、既知の塩基配列と相溶性が低いバンドが検出されなくなり、培養可能な細菌のものと相溶性の高いバンドが優占した。糸状菌では、子のう菌の配列と高い相溶性を示すバンドが検出されなくなり、ツボカビに高い相溶性を示す配列を持つバンドが優占した。すなわち、処理により、生育の早い菌が優占し、また培養が困難な微生物についても、影響を受けていることが明らかになった。処理後の変化は、細菌と糸状菌で同様の傾向を示したが、後者の方が反応は遅かった。

また 1,3-D 処理区では、CP 処理に比べ影響は小さいものの、2、3 年目の処理後に特異的なバンドが出現することから、繰り返し処理が微生物群集に影響を与えることを示唆した。

4. 土壌抽出 DNA と RNA を用いた微生物群集構造解析の比較

CP 処理直後に培養菌数が低下したにもかかわらず、土壌抽出 DNA を用いた DGGE 解析では影響の検出に遅れが見られた。DNA より分解の早い RNA を用いた解析で CP 処理による微生物群集の変動がより早く、より高感度に検出された。しかし、この差は数日間で、処理 1 週間後には DNA 及び RNA の両方の解析で同様の CP 処理の影響が検出された。ここでは同時に、DNA 同様困難であった黒ボク土からの RNA 抽出を、競合阻害剤としてサケ精子 DNA を用いることで可能にした。

結論として、土壌抽出 DNA あるいは RNA を用いた手法の利用により、培養困難な微生物を含む微生物群集の解析が可能となり、土壌微生物群集への環境影響評価、特にさまざまな影響の比較や影響を受けた後の群集構造の変化の追跡に有用であることが示された。以上の成果は学術的・応用的に高く評価できる。

よって審査員一同は、星野（高田）裕子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。