

# 土壌抽出 DNA の植物病理学分野における利用

農業環境技術研究所 生物環境安全部 星野(高田)裕子

## はじめに

微生物の同定は、従来は形態観察や生理・生化学的性質に基づきなされていたが、遺伝子解析研究が進展し、現在では、リボゾーム RNA 遺伝子や ITS 領域などの配列の解析に基づき識別が簡易に行える。この技術は植物病理分野において、汚染種子の検定や病害診断で大きな役割を果たしている。さらに最近では、土壌など様々な環境中からの DNA 抽出法にも進歩が見られ、分子生物学手法に適用可能な DNA が少量のサンプルから簡便に得られるようになってきた。このように、環境中から直接抽出した DNA は環境 DNA (environmental DNA (eDNA) ともいう) と呼ばれる。DNA を直接抽出する技術と遺伝子による微生物の分類技術を組み合わせることにより、培養を経ないで特定の微生物の検出や、微生物群集を明らかにすることが可能である。

特に、土壌においては多種多様な微生物が存在し、その大部分が培養できないことから、土壌から直接抽出された DNA の解析は大きなポテンシャルを秘めている。植物病理分野においても、土壌病害研究への利用が期待されており、土壌抽出 DNA が植物病原菌の解析に適用された例も報告され始めている。しかし、その数はあまり多くないのが現状である。本稿では、土壌において実験する際の問題点、注意点とともに、環境 DNA の解析手法と植物病理分野における解析例をいくつか紹介したい。

## I 特異的な病原菌遺伝子の検出

環境 DNA を用いる方法の利点には、その簡便さと迅速性、絶対寄生菌など培養困難な微生物の検出が容易であることがあげられる。加えて、大量のサンプルを同時に解析することが可能である。その特性を活かした病原菌の検出、発病リスク評価への利用が期待される。病原菌の検出には、病原菌特異的な遺伝子をターゲットにした PCR がよく用いられる。

### 1 土壌における問題点と対応

汚染種子の検定などに比べ、植物病原菌検出に土壌抽

出 DNA が適用された例はあまり多くない。その原因には主に二つの問題点がある。

一つめは、土壌からの DNA 抽出が他の環境に比べ困難であることがあげられる。土壌病原菌の発病閾値は非常に低く、特に高感度かつ定量的な検出技術が求められる。それに対し、土壌は様々な粘土鉱物や腐植物質を含む複雑な組成をもち、特性も多様であるため、上記の目的を達するのは簡単ではない。特に土壌粒子への DNA 吸着により DNA の抽出効率が大きく下がること、DNA と同時に PCR などの酵素反応を阻害する腐植酸が多量に抽出されてくることが問題となる。そこで、DNA 抽出効率、PCR 反応効率の上昇のために様々な工夫がなされてきている。

日本の畑地土壌の多くを占める火山灰土壌(黒ボク土)は、DNA の抽出効率が極端に低いため抽出が困難である。HOSHINO and MATSUMOTO (2004 a) は、黒ボク土からの DNA 抽出効率の改善には、スキムミルクや RNA などの抽出バッファーへの添加が効果的であることを報告している。一方、腐植酸の除去方法についても多くの検討がなされてきたが、土壌抽出 DNA 溶液から完全に除くことは難しい。PCR 反応溶液に、腐植酸のスキャンジャーとなるような物質 BSA (bovine serum albumin) や T4 遺伝子 32 タンパク、市販の製品などを添加することで PCR の反応効率が上昇し、検出感度も増大する。KAGEYAMA et al. (2003) も BSA の有用性を指摘している。土壌は非常に多様な特性をもつため、最適な DNA 抽出方法は土壌によって異なり、手法の修正が必要になる場合がある (ZHOU et al., 1996)。

二つめの問題点は、多種多様な微生物が存在する土壌において多様な遺伝子が存在し、その中から病原菌特異的な遺伝子を見つけることが難しいことである。例えば、*Fusarium oxysporum* では、同一圃場内に病原性のものと非病原性のものが共存している。これらの区別は、リボゾーム RNA 遺伝子や ITS 領域の配列では難しい。また、病原菌によっては、レースが存在する。病害の発生予測には、どのレースが圃場に存在するかを明らかにすることが重要である。HORITA et al. (2004) は、青枯病菌の *Ralstonia solanacearum* について、レース 4 に特異的なプライマーを用いて、土壌から本レースを特異的に検出できることを報告した。病原菌に加え、環境中に腐

Application of soil DNA to Plant Pathology. By Yuko T. HOSHINO

(キーワード: 環境 DNA, 土壌, スキムミルク, PCR, DGGE 解析)

性的に存在する微生物の研究がさらに進展し、分離培養されている微生物のデータが蓄積することで、特異的な遺伝子の選択も可能になってくると考えられる。

## 2 スキムミルクを用いた植物病原菌遺伝子の PCR による検出

植物病原菌の PCR による検出例はいくつかあるが、ここではスキムミルクを利用した例を紹介する。VOLOSSIUK et al. (1995) は、*Verticillium dahliae* の菌体あるいは DNA を接種した人工汚染土から *V. dahliae* DNA の PCR 検出を行った。GARCIA-PEDRAJAS et al. (1999) は、ヒヨコ豆立枯病菌の *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* の検出にスキムミルクを利用した。スキムミルクは、DNA の土壌への吸着や土壌中での分解によるロスを防ぐことに加え、PCR を阻害する腐植物質が同時に抽出されてくるのを防ぐ効果があり、有機物が多く、粘土含量の高い土壌における検出で有用であることを報告している。KAGEYAMA et al. (2003) は、*Pythium ultimum*, *V. dahliae* および *Plasmiodiophora brassicae* について土性、黒ボク土を含む土壌群の異なる複数の土壌からの PCR による検出にスキムミルクを用いて成功した。本方法によれば、土壌 0.1 g から、*P. ultimum* で 14 ~ 623 cfu/g dry soil, *V. dahliae* で 1.0 ~ 26.2 cfu/g dry soil の菌密度、*P. brassicae* で発病度が 44 ~ 86 の汚染土壌から本菌の検出が可能であった。また、*P. ultimum* に特異的なプライマーを使用することで、他の *Pythium* の存在にかかわらず *P. ultimum* のみが特異的に検出された。

## 3 植物病原菌遺伝子の PCR による定量

病害の防除という観点から見た場合、病原菌の定性的な検出に加えて定量が重要となってくる。そこで、PCR を用いた定量法の開発が進められている。定量的 PCR 法には、competitive PCR (競合的 PCR), real-time PCR 法がある。competitive PCR では、PCR 反応液中に定量したい DNA に加えて、競合 DNA (competitor) を鋳型として添加する。competitor は、目的とする遺伝子と同じプライマーで、同じ効率で増幅しながら違うサイズの産物を産生する。そのため、PCR 産物の電気泳動では定量したい DNA 由来のバンドと competitor 由来のバンドの 2 本のバンドが見られる。2 本のバンドが同じ濃さなら、両者の濃度は同程度であると判断できる。添加する competitor の量を変えることで、目的の遺伝子の定量が可能である。MAUCLINE et al. (2002) は、土壌および植物根圏における線虫食性の *V. chlamyosporium* を定量した。この手法は PCR だけで定量が行えるが、条件に合う competitor の設計が難しいという欠点がある。

real-time PCR は、PCR 産物の増加をリアルタイムで

検出し、指数増幅期の PCR 産物量から目的の遺伝子の定量を行う方法である。PCR 反応では、反応初期にはサイクル数に応じ産物は指数関数的に増加するが、反応の進行に伴い産物量はプラトーに達する。したがって、PCR サイクルを重ねた後の産物量は必ずしも鋳型遺伝子量を反映しない。そのため指数増幅期の PCR 産物量を測定する必要がある。定量では、段階希釈した既知量の DNA をスタンダードとして PCR を行い、これをもとに、増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数 (threshold cycle : Ct 値) を横軸に、鋳型 DNA 量を縦軸にプロットして検量線を作成する。次いで、調査しようとするサンプルについても同じ条件下で反応を行い、Ct 値を求めてこの値と検量線からサンプル中の目的の DNA 量を測定する。PCR 産物の検出は通常蛍光試薬を用いるため、この方法ではサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した real-time PCR 専用の装置が必要となる。real-time PCR 法による植物病原菌の検出例としては、*Rhizoctonia solani* AG-3 (LEES et al., 2002), *Rosellinia necatrix* (SCHENA et al., 2002), *Phytophthora nicotianae* と *P. citrophthora* (SCHENA et al., 2004) などがある。SCHENA et al. (2004) によると、nested-PCR を用いることで *P. nicotianae* の人工汚染土壌における検出感度は 1.7 propagules/g soil で、*P. nicotianae* と *P. citrophthora* ともに選択培地と同程度の検出感度が得られ、病原菌の propagule 数と Ct 値に高い相関があった。

定量的 PCR を行うサンプルについても、黒ボク土など、DNA の吸着により回収効率が非常に低くなる土壌では、スキムミルクの添加などにより回収効率を上げる必要があると考えられる。さらに、定量においては、抽出過程における DNA の回収効率が重要になることから、DNA の土壌への添加、回収実験により回収率を見積もる必要があるだろう。また、腐植物質の PCR 鋳型への混入は解析に影響を与えるため、DNA 精製にも定性的な PCR 試験以上に気を配る必要がある。

## II 微生物群集の解析

これまで、特異的な微生物の検出について述べたが、環境 DNA を用いた解析において最も大きな利点は、培養できない微生物を含んだ微生物群集全体を同時に解析できる点である (野田, 2003; 境, 1998)。病原菌と他の微生物との相互作用が注目され、病原菌以外の微生物群集全体にも興味もたれている。PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 法など、環境 DNA を用いた微生物群集構造の解析手法が開発され、

発展してきている (HOSHINO and MATSUMOTO, 2004 b ; 星野・松本, 2004 c)。病原菌の発病に影響を与えるような土壌中の微生物群集解析への適用も始まっている。また、最近では、トマトなどいくつかの作物の病原菌遺伝子を並べた DNA アレイが、原因病原菌の特定に応用されている。

### 1 微生物群集の解析法

微生物群集の解析では、リボゾーム RNA 遺伝子がよく用いられる。ユニバーサルなプライマーを用いた PCR を行うことで、細菌や糸状菌全体、また特定のグループの遺伝子を増幅する。これらが大腸菌にクローニングし、個々に配列を解読、存在する微生物の系統的位置を解析できる。また、DGGE 法や T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 法によっても群集構造を明らかにすることができる。PCR-DGGE 法では、DNA 変性剤の濃度勾配をもつポリアクリルアミドゲルで PCR 産物を泳動する。配列により変性しやすさが異なるため、多数の配列を含む PCR 産物の分離が可能である。また、PCRT-RFLP 法では、PCR を行う際に一方のプライマーに蛍光標識したものを用い、産物を制限酵素で切断後シーケンサーを用い電気泳動する。配列により様々な長さの蛍光標識末端が生成し、プロファイルが得られる。さらに最近では、多数のプロープとハイブリダイゼーションを行う DNA アレイ法も、開発されている。

### 2 原因病原菌の検出

LEVESQUE et al. (1998) は植物病原菌群集を特徴づけたリ、*Pythium* や *Phytophthora* 属菌を同定するために、DNA アレイによる方法をいち早く利用した。彼らは引き続き、一連のリンゴ病原菌 (O'GORMAN et al., 2003)、ジャガイモの細菌病菌 (FESSEHAIE et al., 2002)、トマトの維管束萎凋病 (LIEVENS et al., 2003) を診断できる DNA アレイをそれぞれ開発した。*Pythium* や *Phytophthora* 属菌の DNA アレイは改良され、農耕地土壌中や植物の根における *Pythium spp.* の群集を解析するのに用いられている (MARTIN et al., 2000)。多年性作物に関連して報告される種の多様性は最近まである程度限られていたが、果樹園土壌において DNA アレイにより検出される *Pythium spp.* の多様性は、直接培養法に比べて高く、いくつかの新種の *Pythium* 属菌も検出された。また、DNA アレイ法は植物寄生性線虫の同定にも適用されている (UEHARA et al., 1999)。

### 3 病原菌に関連する微生物群集の解析

病理分野においては、土壌の発病抑止機構の解明やバイオコントロールエージェントの探索にこれらの手法が

興味をもたれている。バイオコントロールのための基礎的な知見を得るために、健全な作物と罹病作物の根圏微生物相の比較が、*Phytophthora* 属菌によるアボカドの根腐病 (YANG et al., 2001)、*Gaeumannomyces graminis* によるコムギの立枯病 (McSPADDEN et al., 2001)、病原菌の特定されていないクロトウヒ苗木の根腐病 (FILLON et al., 2004) で検討されている。いずれも、環境 DNA を用いた手法で健全作物と罹病作物の根圏微生物相には明確な違いが観察されている。

また、土壌の静菌作用にはその理化学性に加え微生物群集が関わっていることが示唆されている (de BOER et al., 2003) が、栽培慣行と微生物群集、発病抑止性の関係の解析にも分子生物学的手法は適用されている。ELSAS et al. (2002) は永年草地と輪作の農地で、後者に比べ前者のほうが *R. solani* AG3 に対する抑止性が高く、DGGE 法による微生物多様性が高いことを報告している。KOWALCHUK et al. は堆肥の投入によるアヤマの *Pythium* 根腐病抑止性について検討している (KOWALCHUK et al., 2003)。滅菌土へコンポストを施用することで、病害抑止性の回復し、滅菌後堆肥を施用した土壌は無処理土壌に比べユニークな微生物群集の組成をもつことが DGGE 解析で観察された。さらに、シスト線虫 *Heterodera schachtii* に対する土壌の抑止性の研究に、土壌 DNA から得られたリボゾーム RNA 遺伝子のクローンライブラリー DNA アレイが適用されている (YIN et al., 2003 a ; 2003 b)。

いずれの研究においても、*Pseudomonas* 属など既知のバイオコントロールエージェントを含む菌群は検出されているが、土壌微生物相は非常に多様であるため、明確に発病抑止性の要因となる菌を特定するには至っていない。そこで、解析の対象を限定することは有効である。*R. solani* AG3 に対する抑止性の研究では、*Pseudomonas* 属のみの DGGE 解析と分離菌の抑止能との比較解析が行われ、拮抗能のある特定の菌群が草地で農耕地に比べ活発化していることが報告された (GARBEVA et al., 2004)。

### 4 抗生物質生産菌群集構造の解析

群集構造の解析に、リボゾーム RNA 遺伝子ではなく機能性遺伝子を用い、特定の機能をもつ微生物群集の解析にも興味をもたれている。最近、抗生物質 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) 生産菌である *Pseudomonas* 属の多様性解析に PCR-DGGE 法を適用した例が報告された (BERGSMAN-VLAMI et al., 2005)。ここでは、DAPG 生成過程に関与する遺伝子 *phlD* の多型解析を対象としている。従来の RFLP 法よりも解像度が高

く、また分離培養の必要がないため、培養によるバイアスが無く根圏に存在するすべての遺伝子型の検出が可能である。DGGE 遺伝子型の違いにより、テンサイ苗根圏への定着能が異なり、この手法は生物学的に意義があると報告している。DAPG は生物防除や土壌の発病抑制性に関与しており、このような特定の機能に対象を絞った解析は大変興味深い。

おわりに

環境 DNA を用いることで、簡便で短時間で大量サンプルの解析が可能になり、これまでに比べ大幅に時間の節約が可能である。しかし、この手法だけでは解決できるわけではない。例えば、単に特異的な遺伝子を検出・定量できるだけでは、この技術を防除に役立てることはできない。土壌病害の発病閾値は病原菌によって異なっており、病害の特徴を把握しておくことは重要である。これまで述べた土壌における検出、病原菌特異的な検出という技術的な問題を克服するとともに、病原菌の生態に関する知見を深める必要がある。また、これまでの培養による手法の重要性は依然として変わらない。環境 DNA を用いた手法は、土壌中にある微生物の存在は示唆するものの、その生死や活性程度は明らかにできない。病害抑制能力のある菌が環境 DNA を用いた手法によって検出された場合、これを分離培養し、土壌の抑止性における機能的な性質について実験的に評価する必要がある。環境 DNA を有効なツールとして用いるためには、方法上の限界や問題点を理解し、他の方法と組み合わせることが重要である。

参考文献

- 1) BERGSMAN-VIAMI, M. et al. (2005) : Appl. Environ. Microbiol. 71 : 993 ~ 1003.
- 2) de BOER, W. et al. (2003) : *ibid.* 69 : 835 ~ 844.
- 3) ELSAS, J. D. V. et al. (2002) : Biodegradation 13 : 29 ~ 40.
- 4) FESSEHAIE, A. et al. (2002) : Phytopathology 92 : S25 (Abstr.).
- 5) FILION, M. et al. (2004) : Appl. Environ. Microbiol. 70 : 3541 ~ 3551.
- 6) GARBEVA, P. et al. (2004) : FEMS Microbiology Ecology 47 : 51 ~ 64.
- 7) GARCIA-PEDRAJAS, M. D. et al. (1999) : Eur. J. Plant Pathol. 105 : 251 ~ 259.
- 8) HORITA, M. et al. (2004) : J. Gen. Plant Pathol. 70 : 278 ~ 283.
- 9) HOSHINO, Y. T. and N. MATSUMOTO, (2004 a) : Microbes Environ. 19 : 13 ~ 19.
- 10) ——— (2004 b) : 10th International symposium on microbial ecology BOOK OF ABSTRACTS : p. 154.
- 11) 星野(高田)裕子・松本直幸 (2004 c) : 土と微生物 58 : 131.
- 12) KAGEYAMA, K. et al. (2003) : J. Gen. Plant Pathol. 69 : 153 ~ 160.
- 13) KOWALCHUK, G. A. et al. (2003) : Biol. Fertil. Soils 37 : 55 ~ 63.
- 14) LEES, A. K. et al. (2002) : Plant Pathol. 51 : 293 ~ 302.
- 15) LEVESQUE, C. A. et al. (1998) : Phytopathology 88 : 213 ~ 222.
- 16) LIEVENS, B. et al. (2003) : FEMS Microbiol. Lett. 223 : 113 ~ 122.
- 17) MARTIN, R. R. et al. (2000) : Annu. Rev. Phytopathol. 38 : 207 ~ 239.
- 18) MAUCLINE, T. H. et al. (2002) : Appl. Environ. Microbiol. 68 : 1846 ~ 1853.
- 19) MCSPADDEN GARDENER, B. B. and D. M. WELLER (2001) : *ibid.* 67 : 4414 ~ 4425.
- 20) 野田尚宏・金川貴博 (2003) : 日本微生物生態学会誌 18 : 38 ~ 43.
- 21) O'GORMAN, D. et al. (2003) : Phytopathology 93 : S66 (Abstr.).
- 22) 境 雅夫 (1998) : 新・土の微生物(3), 日本土壤微生物学会編, 博友社, 東京, p. 29 ~ 56.
- 23) SCHENA, L. et al. (2002) : Eur. J. Plant Pathol. 108 : 355 ~ 366.
- 24) ——— et al. (2004) : *ibid.* 110 : 893 ~ 908.
- 25) UEHARA, T. et al. (1999) : Nematology 1 : 549 ~ 555.
- 26) VOLOSSIUK, T. et al. (1995) : Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3972 ~ 3976.
- 27) YANG, C.-H. et al. (2001) : FEMS Microbiol. Ecol. 35 : 129 ~ 136.
- 28) YIN, B. et al. (2003 a) : Appl. Environ. Microbiol. 69 : 1573 ~ 1580.
- 29) ——— et al. (2003 b) : Phytopathology 93 : 1006 ~ 1013.
- 30) ZHOU, J. et al. (1996) : *ibid.* 62 : 316 ~ 322.

新しく登録された農薬 (17.5.1 ~ 5.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名（製造業者又は輸入業者）登録年月日、有効成分：含有量、対象作物：対象病虫害：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、適用作物、適用雑草等を記載。（登録番号：21505 ~ 21507）  
下線付きは新規成分。

「殺虫剤」

- アゾキシストロピン・ジフェノコナゾール水和剤  
21505 : アミスタートップフロアブル (シンジェンタ ジャパン) 2005/05/18  
アゾキシストロピン：18.2%, ジフェノコナゾール：11.3%  
てんさい：褐斑病、葉腐病：収穫 21 日前まで
- アゾキシストロピン・ジフェノコナゾール水和剤  
21506 : タイプフロアブル (シンジェンタ ジャパン) 2005/05/18

- アゾキシストロピン：18.2%, ジフェノコナゾール：11.3%
- 芝 (ペントグラス) : フェアリーリング, 葉腐病 (ブラウンパッチ), ビシウム病：発病初期
- アゾキシストロピン・シプロコナゾール水和剤  
21507 : シパンバフロアブル (シンジェンタ ジャパン) 2005/05/18  
アゾキシストロピン：18.2%, シプロコナゾール：7.3%
- 日本芝：葉腐病 (ラージパッチ) : 発病初期