

特集：有害センチュウ類の遺伝子診断技術

## 群集類似度推定における DGGE 法と形態同定法との比較

農業環境技術研究所 おか 岡 だ 田 ひろ 浩 あき 明

## はじめに

土壤線虫は食性や生活史が異なる様々な種を含むため、土壤中の有機物分解様式や食物網の発達程度などを推定する目的で、特定の線虫種だけでなく線虫群集全体の構造を分析することが、土壤生態学の研究でよく行われている（岡田，2007）。近年、植物寄生性線虫と自由生活性線虫との拮抗関係を分析する目的でもこうした分析が行われるようになった（SANCHEZ-MORENO and FERRIS, 2007）。このような分析では、サンプル中の線虫種ごとに出現頻度やバイオマスを求めることが理想であるが、顕微鏡下での形態観察による線虫種の同定には専門知識と経験を要し、素人には実施困難である。

一方微生物学では、土壤や水などの環境サンプルから抽出した DNA をもとに、その中の微生物群集の構造を分析する手法が 90 年代より普及している（稲垣，2002）。線虫でも今世紀に入り、DGGE 法（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, FOUCHER et al., 2004；佐藤・豊田，2006）や T-RFLP 法（Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, OBA et al., 2006；DONN et al., 2008）の適用が試みられている。

ここで問題になるのは、これらの手法で得られた結果の妥当性である。同一サンプルを分析したときに、形態同定法（1 匹ずつ顕微鏡観察で種を同定して群集構造を調査。以下、従来法という）による結果と同じ結果が得られるであろうか？ DGGE 法の電気泳動ゲル上に出現したバンド 1 本 1 本が各線虫種に対応すると仮定し、その数と従来法により検出された種数とを比較したり、両者の相関関係を検討した報告はある（Cook et al., 2005；FOUCHER et al., 2004）。しかし、バンドパターンの情報すべて（数、位置、輝度）を利用し、かつサンプル間の類似度（実際には非類似度の距離行列）を比較して妥当性を検討した例はない。そこで我々は、地点や栽培管理を異にする 12 の土壤から分離した線虫をサンプルとし、DGGE と従来法とで群集構造を分析した場合のサンプル間類似度について検討した（OKADA and OBA,

2008）。

ただし、1 サンプル当たりせいぜい 100 ～ 200 の限られた個体数の線虫の同定による従来法の分析で得られた結果が、その土壤中の「真の」線虫群集構造を示しているとは限らず、従来法との比較が「妥当性の検討」になるか否かには議論の余地がある。また、後述のように、扱うサンプルセットにより「妥当性」の結果が変わる可能性がある。それでも、従来法で得られた結果との整合性の検討は分子生物学的手法の導入には不可欠であると考え、このような研究を実施した。

## I DGGE 法とは？

まず、複数の生物種が混在したサンプルから DNA を抽出し、GC 含量が多い配列（GC クランプ）をつけたプライマーで PCR 増幅する。DNA 変性剤（尿素とホルムアルデヒドの混合物で、2 本鎖 DNA を 1 本鎖にする）の濃度勾配をつけたゲル上でその産物（2 本鎖 DNA 断片）を電気泳動すると、変性剤濃度が高いゲルの下方で部分的に 1 本鎖に解離するが、その程度は切れやすい A-T 結合の数、つまり塩基配列の違いによって異なる。さらに、解離した DNA 断片はゲル内での移動速度が低下する。したがって、生物種ごとに DNA 断片が異なる地点にバンドを形成する。このようにしてサンプル中の生物群集の構造を、バンドパターン（バンドの位置、数、輝度）として視覚化できる。さらに、いくつかのサンプルを 1 枚のゲル上で同時に泳動することで、群集構造を容易に比較することができる。DGGE 法の詳しい原理や特徴については微生物学の文献に詳しく解説されている（例えば石井ら，2000）。

## II プライマー選択とクローン解析

DGGE 法の実施にはまず、生物種や分析の目的に応じたプライマーセットの選択が重要である。これまでに線虫用 DGGE 法に用いられた 2 組のプライマーセット（FOUCHER and WILSON, 2002；WAITE et al., 2003）を我々が検討したところ、一つは電気泳動時にバンド像がぼやけ、もう一つはそれ自体が数種類の塩基配列をもち、1 クローンからでも主要なバンドが 2 本以上検出されうる縮重プライマーであったため、採用しなかった。代わり

に、線虫バーコードプロジェクト (BLAXTER et al., 1998) で開発され、18S rRNA 遺伝子をターゲットにしたプライマーセット「SSU18A-SSU9R」に GC クランプをつけたものを採用した。

DGGE 法実施の前にプライマー選択の妥当性を検討するため、このプライマーによる PCR 産物をクローン解析し、従来法による分析と結果を比較した。実際には、後述のように DGGE 法で用いた 4 地点 12 サンプルのうち、地点ごとに一つずつ選んだサンプルにつき、各々のサブサンプルをクローン解析法と従来法とで分析し、科レベルで出現頻度を算出し、2 法間で有意な相関があるか検討した。

その結果、クローン解析では糸状菌や原生動物の塩基配列も検出されたが、いずれのサンプルでも 7 割以上のクローンが線虫であった。また、2 法のうちいずれかの手法でしか検出されない線虫種もあったが、供試 4 サンプルのうち三つで、出現頻度に有意な相関が認められた

(図-1,  $P < 0.05$ )。これにより、我々はプライマーセット SSU18A-SSU9R の選択を妥当と判断した。

### III 分析方法

以下に分析手法の概略を示すが、詳細は大場・岡田 (2008) を参照して欲しい。線虫サンプルを得るため、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター (以下、北海道)、東北農業研究センター (東北)、中央農業総合研究センター (中央) および野菜茶業研究所 (野茶) が管理する試験圃場 (各々 4, 3, 3, 2 点) の土壌からベールマントレイ法 (OKADA et al., 2004) で線虫を分離した。なお、各地点において圃場間の施肥管理は異なる。48 時間トレイで分離した線虫をカウントし、ヒメミミズなど線虫以外の動物をできるだけ除去した。得られた 12 点のサンプル各々を小分けし、従来法では、常法によりグリセリン包埋のプレパラートを作製し、顕微鏡下でサンプル当たり 150 匹をラ

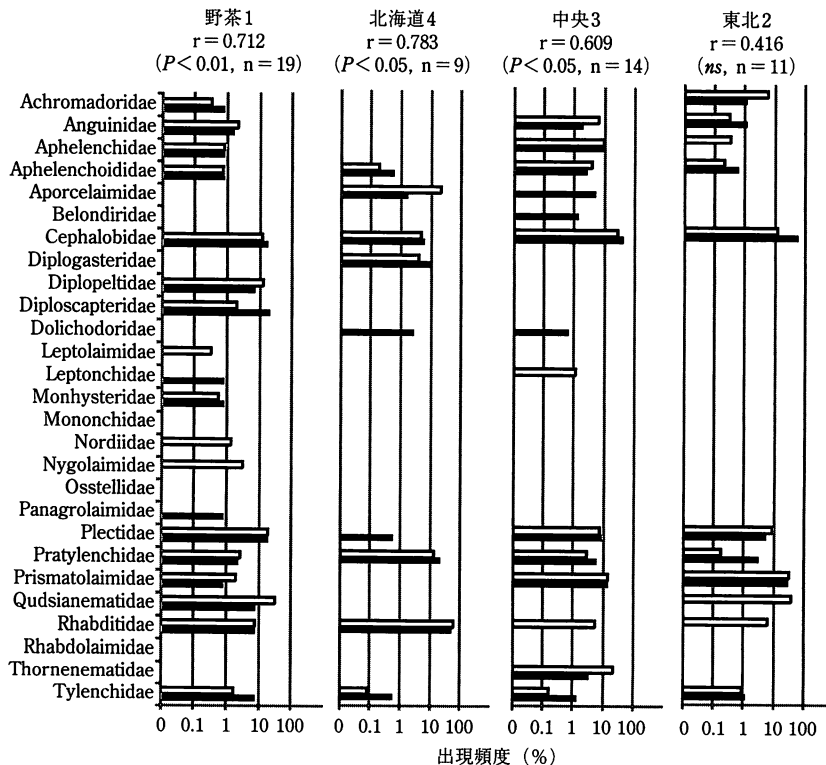


図-1 クローン解析法 (黒色) と従来法 (白色) とによって調べた線虫分類群 (科) の出現頻度

前者ではサンプル当たり 192 個のクローンをランダムに選択した。そのうち、175 ~ 186 個の配列決定に成功し、その中の 126 ~ 170 個が線虫種であった。従来法ではサンプル当たりランダムに 150 匹を選択し同定し、科ごとの平均体重で補正した出現頻度を示した。各グラフ上部には、クローン解析法と従来法との対数変換後の出現頻度の相関係数を示した。

ンダムに選んで属または科まで同定した。そして分類群ごとに出現頻度を算出し、文献から求めた体サイズによる重み付けをした。これは、線虫の個体数よりもバイオマスのほうが、DNA ベースの分析法と比較する対象としてより妥当と考えられるからである。

一方、DGGE 法ではサンプル当たり 500 匹に調整し、ビーズによる破碎で DNA を抽出、精製した。それを鋳型として前出のプライマーセットで PCR 増幅を行い、一定量の産物を変性剤濃度勾配ゲルに注入した。このとき、異なるゲル間でもサンプルの比較ができるように、既知の DNA 断片をもとにして我々が作製したマーカー（ニッポンジーン社より市販）も注入した。そして 60℃、75 V で 16 時間泳動した。ゲル上のバンドごとにレーン内での相対輝度を求めた。こうして得られたデータの対数値を以後の分析に用いた。ただし、サンプル中の線虫種ごとのバンドの位置を見るために事前に個体別に DNA を抽出し同条件で泳動したところ、それらのバンドはゲルの矢印の範囲（図-2）にほぼ限られて出現し

たため、範囲外のバンド（原生動物など線虫以外の生物と考えられる）はデータ解析から除外した。範囲内のバンドのいくつかを切り出して配列を読み、BLAST 検索にかけたところ、線虫種が検出できた（表-1）。

#### IV DGGE 法と従来法とで結果は同じか？

従来法、DGGE 法各々について距離行列を作成し、対応する要素間（12C2 で計 66 組）の相関の有意性を検討した（PAZOS and VALENCIA, 2001；図-3）。群集間の非類似度（距離）を評価する方法はいくつもあるが、ここではユークリッド、相対ユークリッドおよび相対 Sørensen の 3 法を用いた。その結果、この順に 0.40、0.56、0.60 と、あまり高くないものの、いずれの距離法でも従来法と DGGE 法とで有意な相関があり（ $P < 0.01$ ）、2 法の分析結果がある程度一致することが示唆された。サンプル間の実際の類似関係を検討するためには樹形図を描かなければならないが、それにも様々な方法があり、同一の距離行列に基づいても図の形態が異なる可能性があるため、樹形図に基づいて結果を検討するのは妥当ではない。それでも、分析結果を視覚的に把握するためには便利なので、ここではユークリッド法による距離行列に基づき、UPGMA 法によって描いた樹形図を掲げる（図-4）。従来法では地域ごとにクラスターがまとまったが、DGGE 法では北海道農研、中央農研のサンプル群が各々二つに分かれてしまった。しかし、北海道農研 1 と 2、野茶研 1 と 2、中央農研 2 と 3 は各々一つのクラスターとして検出されるなど、2 法で共通する部分も認められ、結果がある程度一致する、という距離行列での結果を支持するものであった。

では、どうして DGGE 法と従来法とで分析結果が完全には一致しないのであろうか？ まず、群集構造の単位がそもそも 2 法間で異なり、DGGE 法では種または個体群に由来する DNA 断片であるのに対して、従来法では形態分類群である。したがって、従来法では 1 分類群とされた線虫から複数の DNA バンドが出現することは普通である。また、今回 PCR 増幅の対象にした 18S rRNA 遺伝子は同一個体内でもわずかに異なる配列が含まれることがあり、その結果、1 個体から複数のバンドが出現することがある。一方で、異なる配列の DNA 断片が偶然同じ位置にバンドを形成することもある。以上の原因に加え、DGGE 法以前の問題として、PCR 増幅効率が線虫種間で異なるであろうこと（実際、従来法とクローン解析の結果も完全には一致していない。図-1）、労力上の制約から従来法での供試個体数がサンプル当たり 150 匹にとどまったことなども原因として考えられる。

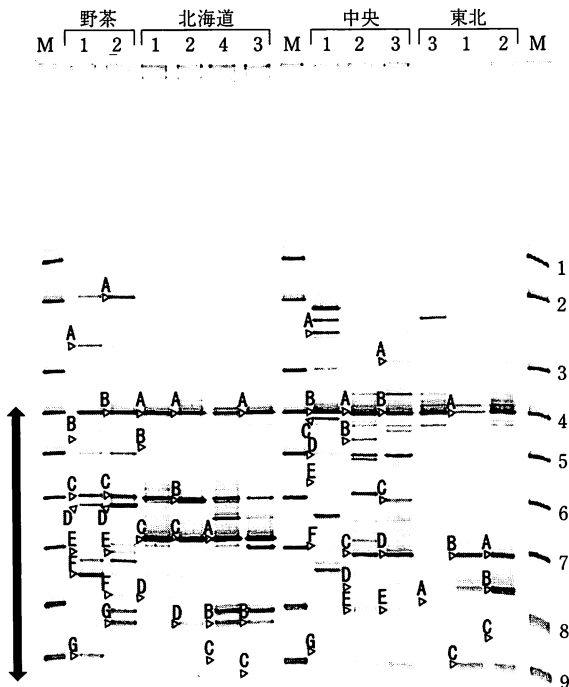


図-2 12 サンプルの DGGE バンドパターン  
各レーン左の英文字は、切り出して配列および種を決定したバンドを示す（OKADA and Oba, 2008 を参照）。M はマーカー、数字はマーカー内のバンドの識別番号（前出文献参照）。矢印は線虫由来のバンドが出現した範囲を示す。

表-1 図-2のゲルより切り出して塩基配列を決定し、BLAST検索で線虫種を推定したバンドの一部

	図-2における 英字	線虫の科	線虫の種	Accession No.	塩基配列 類似度 (%)	配列長 (bp)
野茶 2	B	Cephalobidae	<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707	99.8	511
	C	Rhabditidae	<i>Oscheius tipulae</i>	AF036591	99.8	488
	D	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430641	95.6	363
	E	Diplopeltidae	<i>Cylindrolaimus communis</i>	AY593939	98.6	491
	F	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430626	99.8	414
	G	Cephalobidae	<i>Cephaloboides nidrosiensis</i>	EU196020	95.3	469
北海道 1	A	Cephalobidae	<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707	99.8	512
	B	Pratylenchidae	<i>Hirschmanniella santarosae</i>	EF029855	94.5	271
	C	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430626	100.0	469
	D	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430626	99.0	394
北海道 2	A	Cephalobidae	<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707	99.8	464
	B	Cephalobidae	<i>Eucephalobus oxyuroides</i>	AY284665	98.9	378
	C	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430626	99.3	441
	D	Cephalobidae	<i>Cephaloboides nidrosiensis</i>	EU196020	95.3	469
北海道 4	A	Rhabditidae	<i>Pellioiditis</i> sp.	AF430626	100.0	468
	B	Cephalobidae	<i>Cephaloboides nidrosiensis</i>	EU196020	95.3	469
	C	Plectidae	<i>Plectus aquatilis</i>	AF036602	99.6	486
中央 1	B	Cephalobidae	<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707	99.6	508
	C	Cephalobidae	<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707	98.4	513
	D	Aphelenchidae	<i>Aphelenchus</i> sp.	AY284641	100.0	513
	E	Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides</i> sp.	DQ901550	94.3	472
	F	Prismatolaimidae	<i>Prismatolaimus intermedius</i>	AY284729	97.6	462
	G	Aporcelaimidae	<i>Aporcelaimellus obtusicaudatus</i>	AY284811	98.8	515

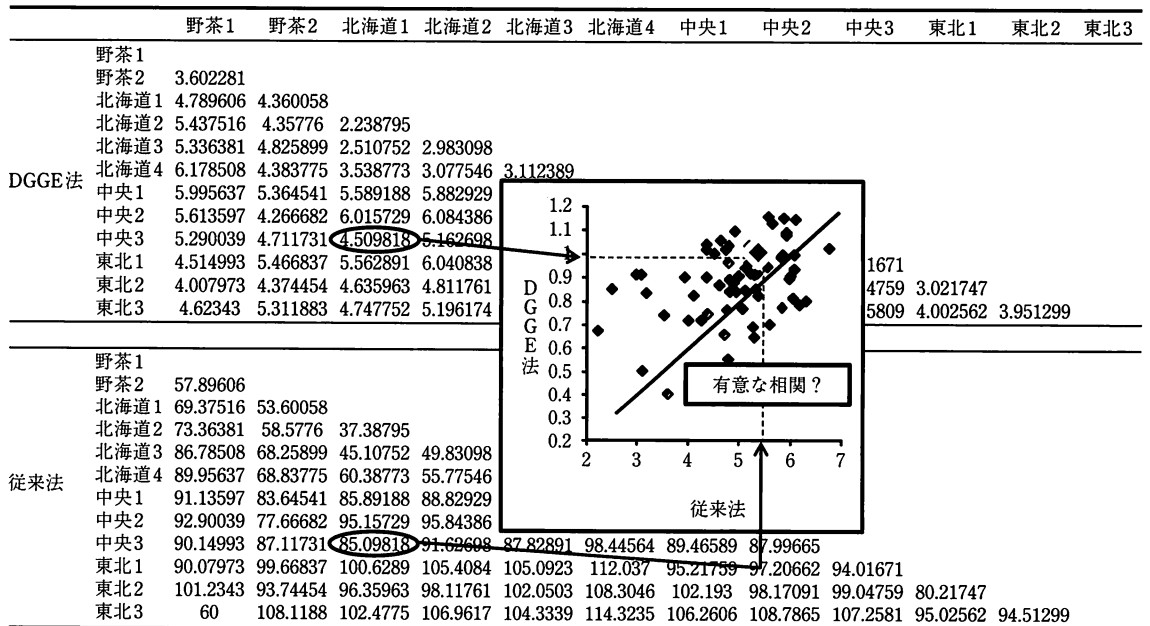


図-3 DGGE法と従来法の距離行列間の相関関係の検討のイメージ

表中の数値はユークリッド法などによる2サンプル間の距離(非類似度)。

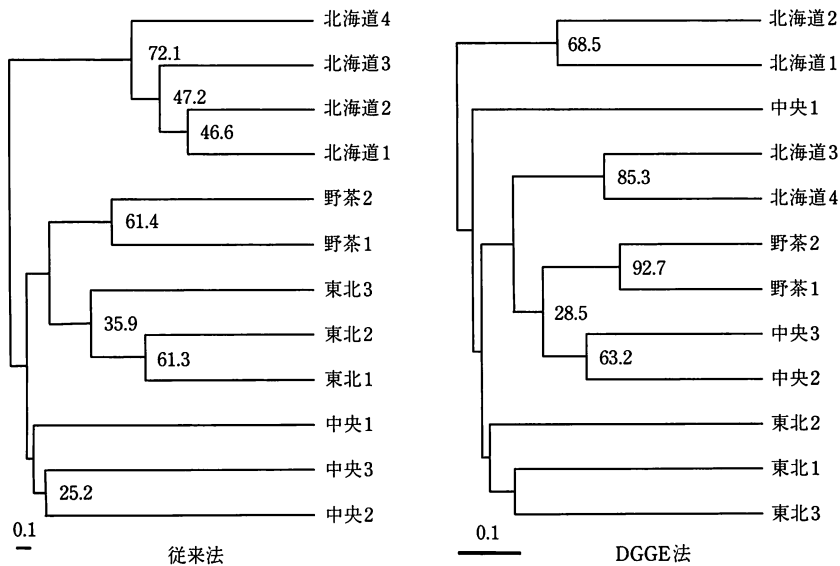


図-4 従来法と DGGE 法の距離行列 (ユークリッド距離) に基づいて描いた樹形図 (UPGMA 法)

25%以上のブーツストラップ値を表示, 横棒は距離単位。

## おわりに

検出されたバンド各々が異なる線虫種に対応するならば, DGGE 法は優れた群集分析手法といえるが, 実際にはそうではないことは前述のとおりである。また, PCR 増幅を経るため, バンドの輝度が各々の線虫種の個体数やバイオマスに比例する (定量性がある) とも言い切れない。さらに, バンドを切り出して塩基配列を読もうとしても, 配列および種が常に決定できるとは限らない。したがって, この手法のみで群集構造を詳細に把握するのは困難である。また, 今回の検討では, DGGE 法が従来法と「ある程度」一致する結果をもたらすことが示されたが, 他のサンプルセットについて検討した場合はどうであろうか? 予想としては, 1 年生畑, 水田, 森林のサンプルといった, 従来法で調べて明らかに群集構造が異なるセットの場合は, DGGE 法のバンドパターンも明らかに違い, 2 法でよく一致した結果が得られるであろう。一方, 栽培管理条件がわずかしかなかった畑のサンプルセットでは, 従来法で得られた微妙な群集構造の違いが, バンドパターンの違いに反映されるとは限らず, 2 法の結果はあまり一致しないように思われる。

DGGE 法には, 以上のような欠点や分析結果の妥当性の評価の難しさはあるものの, 線虫分類の知識がなく

でも実施できること, 多数のサンプルを効率的に分析できるといったメリットを備えている。また, プライマーセットの選択など実験条件の検討により, アブラムシやアザミウマなど他の小動物群集にも適用できると思われる。こうした生物群集のサンプルが多数あり, その構造を概観し, 他と比べて特異なサンプルを発見するといった, スクリーニング的な作業には DGGE 法は最適であろう。ただし, 分子生物学的手法の発達は非常に早く, DGGE 法もいずれは他の手法にとって代わられるかもしれない。

## 参考文献

- 1) BLAXTER, M. et al. (1998) : *Nature* **392** : 71 ~ 75.
- 2) COOK, A. et al. (2005) : *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **291** : 103 ~ 113.
- 3) DONN, S. et al. (2008) : *Appl. Soil Ecol.* **38** : 20 ~ 26.
- 4) FOUCHER, A. et al. (2004) : *Soil Biol. Biochem.* **36** : 2027 ~ 2032.
- 5) FOUCHER, A. and M. WILSON (2002) : *Mol. Ecol. Notes* **2** : 45 ~ 48.
- 6) 稲垣史生 (2002) : 微生物利用の大展開 (今中忠行監修), エヌ・ティー・エス, 東京, p. 522 ~ 531.
- 7) 石井浩介ら (2000) : *Microbes Environ.* **15** : 59 ~ 73.
- 8) OBA, H. et al. (2006) : *Programme Abstr. 28th Int. Symp. Eur. Soc. Nematol.*, p. 137.
- 9) 大場広輔・岡田浩明 (2008) : *土と微生物* **62** : 69 ~ 73.
- 10) OKADA, H. et al. (2004) : *Jpn. J. Nematol.* **34** : 89 ~ 98.
- 11) 岡田浩明 (2007) : *化学と生物* **45** : 43 ~ 50.
- 12) OKADA, H. and H. OBA (2008) : *Nematology* **10** : 689 ~ 700.
- 13) PAZOS, F. and A. VALENCIA (2001) : *Protein Eng.* **14** : 609 ~ 614.
- 14) SANCHEZ-MORENO, S. and H. FERRIS (2007) : *Agric. Ecosyst. Environ.* **119** : 75 ~ 87.
- 15) 佐藤恵利華・豊田剛己 (2006) : *日土肥誌* **77** : 157 ~ 163.
- 16) WAITE, I. et al. (2003) : *Soil Biol. Biochem.* **35** : 1165 ~ 1173.