

定量 PCR 法による土壌細菌の絶対定量

農業生物資源研究所 ^{さわ}澤 ^だ田 ^{ひろ}宏 ^{ゆき}之
 農業環境技術研究所 ^{のぐち}野口 (辻本) ^{まさこ}雅子・^{よしだ}吉田 ^{たかのぶ}隆延
 北海道農業研究センター ^{そめ}染 ^や谷 ^{のぶ}信 ^{たか}孝
 九州大学大学院 ^{つち}土 ^や屋 ^{けん}健 ^{いち}一

はじめに

定量 PCR 法のための装置や試薬は長足の進歩を遂げており、信頼性の高い結果が簡便に得られるようになってきた。植物病原細菌の動態の追跡や診断・検出などにおいても積極的に取り入れられつつある。特に、植物体内の細菌を定量の対象とする場合や、存在するかどうかさえわかればよいという定性的な検査に関しては、本法の導入は比較的容易であり、今後は普及が急速に進むものと思われる。

一方、土壌中の細菌を相手にできるだけ精度の高い絶対定量を目指す場合は、その実施を阻むような土壌特有の問題がいろいろと存在している。このうち、土壌粒子による DNA の抽出阻害や土壌由来の腐植酸などによる PCR 反応の阻害などはよく知られた問題であるが、これらによる影響の度合も土壌の種類ごとに大きく異なっており、それが問題をより複雑化している (SAGOVA-MARECKOVA et al., 2008)。ここでは、土壌中の細菌へ定量 PCR 法を適用する際に、どのような点に気をつけながら実験系の構築を進めていく必要があるのかについて、組換え微生物を材料にした我々のモデル実験 (澤田ら, 2007; 2008) を例にしながらかその「条件検討のためのスキーム」を紹介したい。

I TaqMan アッセイのための事前準備

一口に定量 PCR 法といっても測定原理の異なる様々な手法が考案されており、それぞれに一長一短があるため、研究目的や実験環境に応じて使い分けがなされている (北條, 2008)。このうち、インターカラーターや蛍光標識プローブを用いたいわゆる「リアルタイム定量 PCR 法」が最近では主流になっており、特に前者に関し

ては SYBR Green アッセイ、後者では TaqMan アッセイの適用例が多いようである。

SYBR Green アッセイの場合は、融解曲線分析によって本来の増幅産物が得られたかどうかの確認がなされている。しかし、土壌中には標的配列に類似した未知の配列がどの程度存在しているのか予想がつかないため、融解曲線分析によって PCR の特異性が十分に担保できているとはいえない恐れがある。そこで、今回はより高い特異性が期待できる方法として TaqMan アッセイを採用することにした。TaqMan アッセイに基づいて定量 PCR を行うに当たって、必要となる試薬や機器については成書を参考にさせていただきたい (北條, 2008)。ここでは、ユーザー側が設計・調整し、有効性を確認しておかなければならないものについて、今回のモデル実験で用いたものを例にして説明を加えたい。

1 対象微生物

今回のモデル実験において対象微生物として用いたのは、ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110) から作製された組換え微生物「MA106」(東北大学・南澤究先生より分譲; YUHASHI et al., 2000) である。MA106 の染色体上には、約 5 kb のサイズの外来性領域 [ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sm/Sp) ならびに β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*gusA*)] が 1 コピー挿入してある (図-1)。なお、本菌に関してはあらかじめ菌濃度と吸光度との関係式を求めておき、以後の試験において、液体培養から調整した菌液の濃度は吸光度から算出できるようにした。

2 プライマー

MA106 に導入された外来性領域のうち、*gusA* 構造遺伝子は *gus* オペロン由来のものであり、その下流には大腸菌の *trp* オペロン由来の *trpA* ターミネーターが連結してある (図-1)。したがって、この連結部分のような構造は本菌に特異的であり、自然界には存在しないことが期待できることから、この領域を標的としてプライマーやプローブの設計を行うことにした。プライマーに関しては、*gusA* 構造遺伝子の 3' 末端から *trpA* タ

Challenges to Developing Real-Time PCR Method to Quantify Bacteria in Soils. By Hiroyuki SAWADA, Masako T. NOGUCHI, Takanobu YOSHIDA, Nobutaka SOMEYA and Kenichi TSUCHIYA

(キーワード: 定量 PCR, 土壌細菌, TaqMan MGB プローブ, 黒ボク土, 検量線, 標準試料, 絶対定量)

ーミネーターにかけての 101 bp を増幅できるように設計した「gus-F1/ter-R1」が、高い特異性と増幅効率を示すことを、相同性検索、定性的な PCR およびシーケンス解析によって確認することができた。

3 プローブ

gus-F1 の直下にプローブ「gus-ter-MGB1」を設計し (図-1), gus-F1/ter-R1 プライマーセットと組み合わせることによって予備的に定量 PCR を行ったところ、高い特異性と増幅効率を得ることができた。なお、以後の試験では、通常の TaqMan プローブよりもバックグラウンドをより低く抑えることができると考えられている TaqMan MGB プローブ (アプライドバイオシステムズ) を使用した。

II 土壌からのサンプル調製に伴う問題

1 DNA 抽出阻害の克服

土壌中の粘土鉱物や腐植酸は DNA を吸着する特性を有しているため、土壌から DNA を効率よく抽出することは難しいと考えられてきた。日本の畑地で多く見られる火山灰土壌 (黒ボク土) は特にその傾向が強くなり、畑地における土壌細菌の DNA 解析を阻んできた。しかし、そのような障害が近年になってようやく解消された (森本・星野, 2008; IKEDA et al., 2008)。スキムミルクや RNA を抽出バッファーに添加することによって土壌への DNA の吸着が抑えられ、高い抽出効率を得られることが示されたのである。

定量 PCR においても、検出感度を上げるためには土

壌からできるだけ効率よく DNA 抽出を行う必要がある。また、多数のサンプルを迅速に検査できるようにするためには、簡便な手法であることが望ましい。そこで、抽出方法としてはハイスルーブットが可能なビーズ式破碎装置による「ビーズ振とう法」を採用することにした。そして、抽出バッファーに「スキムミルク」を添加することによって、定量 PCR に利用できるような収量と品質が得られるかどうかについて評価を行った。その結果、DNA 抽出阻害が特に強いと考えられているアロフェン質黒ボク土においても、スキムミルクの添加によって抽出効率が大幅に改善されること (図-2), 抽出した DNA のサイズに関しても PCR 反応の鑄型として問題のないことが確認できた。

なお、土壌は極めて多様性に富んでいるうえ、土壌からの DNA 抽出に特化したキットも多数市販されているが、土壌の種類とスキムミルクの添加量や抽出キットの組合せによっては成績に差が認められる (MUMY and FINDLAY, 2004; SAGOVA-MARECKOVA et al., 2008; 森本・星野, 2008) (図-2 にもその一例を示した)。また、スキムミルクには DNA がコンタミしている場合があることも指摘されている (IKEDA et al., 2008)。したがって、検査対象の土壌ごとに予備試験を行って抽出条件 (キットの種類やスキムミルクの添加量) を至適化するとともに、使用するプライマーによってスキムミルクに混在している DNA から増幅が起こらないことを確認しておく必要がある。

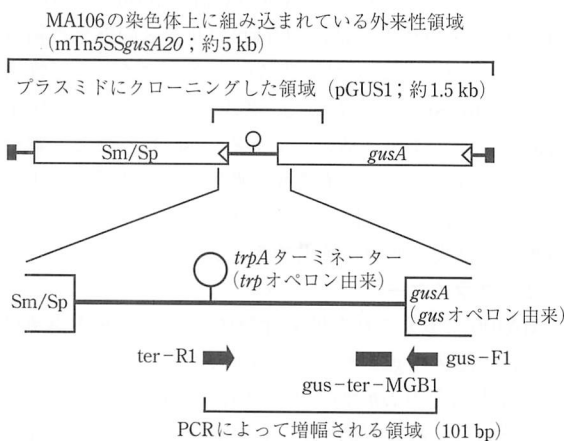


図-1 対象微生物である MA106 (YUHASHI et al., 2000) の染色体上に組み込まれている外来性領域の構造。gusA 構造遺伝子の 3' 末端から trpA ターミネーターにかけての 101 bp を増幅できるようにプライマー/プローブを設計した。

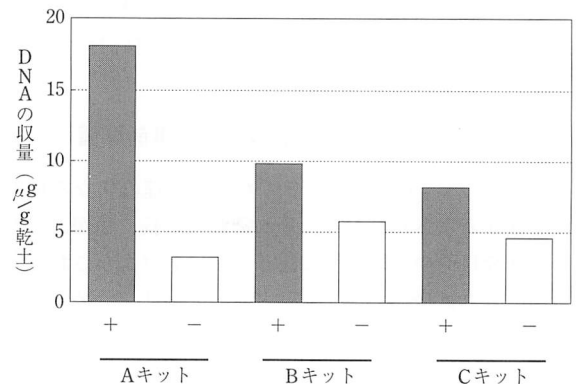


図-2 スキムミルクの添加による DNA 抽出阻害の克服。抽出バッファーにスキムミルクを添加することによって、アロフェン質黒ボク土からの DNA 抽出効率が改善されるかどうかを、DNA 抽出キットごとに検討した。+ はスキムミルク添加区 (土壌 0.5 g 当たり 20 mg を添加した), - は無添加区を示す。

2 PCR 反応阻害の克服

土壌に含まれている腐植酸は PCR 反応を阻害することが知られている。しかも、DNA の抽出過程において腐植酸は DNA と似た挙動を示すため、最終的に得られた DNA 抽出液中にも腐植酸が混入し、その後の PCR に悪影響を与えてしまうことが問題とされてきた。前項 II-1 で DNA 抽出の際にバッファーに添加したスキムミルクは、こうした腐植酸の混入を防ぐ効果もあると考えられている (GARCIA-PEDRAJAS et al., 1999)。また、市販の DNA 抽出キットにはそれぞれ腐植酸除去のための様々な工夫がなされている。しかし、それだけで定量 PCR における反応阻害の問題が解消できるかどうかについては十分に明らかになっていない。

腐植酸などによる反応阻害を克服するための方策として、1) 抽出後にさらに精製処理を追加することによる阻害物質の除去、2) 阻害作用を軽減する効果のある BSA などの PCR 反応系への添加、3) 阻害作用に対して耐性の強い定量 PCR キット (酵素/バッファー) の選抜、などが考えられる。ここでは、特別な実験操作の追加が不要であり、サンプルのロスやコンタミを招く恐れがないことから 3) を検討対象として選び、以下のようにしてキット間の比較を行ってその可能性を探った。

定量 PCR の鋳型としては、十分に精製した「対象微生物 (MA106) のゲノム DNA」を用意した。さらに、II-1 に示したビーズ振とう法を用いて「アロフェン質黒ボク土から抽出した土壌 DNA サンプル」も準備した。そして、土壌由来の阻害物質を含むと思われる後者を、精製済みの鋳型である前者に加えることによって、各定量 PCR キットの反応が阻害を受けるかどうか [Ct 値 (増幅曲線と Threshold Line の交点) が大きくなるかどうか] について調べてみた。その結果、キットによっては阻害物質の影響を強く受けてしまうことが認められた (図-3 における A キット)。そこで、できるだけ耐性の強いキットを選抜するために、阻害物質の添加量を順次増やしながら市販製品の比較試験をさらに続けたところ、耐性が強く、高感度が期待できるキットとその最適な実験条件 (図-4) を明らかにすることができた。

III 標準試料による検量線の作成に伴う問題

1 標準試料として何をを用いるべきか?

定量 PCR によって絶対定量を行うためには、対象微生物の標的配列と同一の配列を有しており、絶対量 (コピー数) がわかっているような「標準試料」を用意し、それを用いて検量線を作成する必要がある。このような検量線作成用の標準試料としては、標的配列を組み込ん

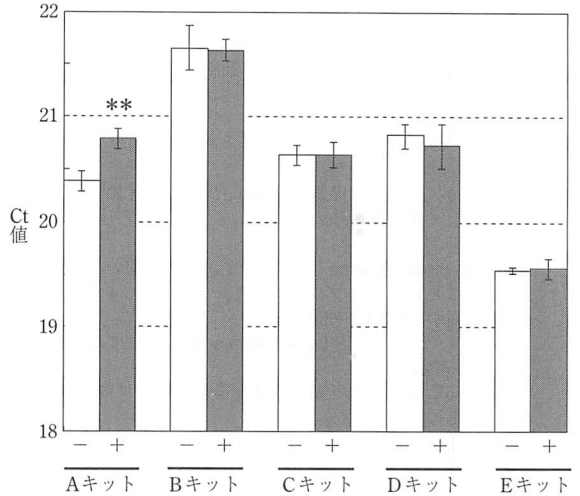


図-3 土壌由来の反応阻害物質に対する各定量 PCR キットの耐性の比較

「土壌由来の阻害物質」を「十分に精製した鋳型 DNA」に添加することによって、PCR 反応が阻害を受けるかどうかを定量 PCR キットごとに検討した。+ は阻害物質添加区、- は無添加区を示す。反応が阻害を受けるほど、縦軸の Ct 値 (増幅曲線と Threshold Line の交点) は大きくなる。エラーバーは標準偏差、** は阻害物質の添加によって Ct 値が有意に大きくなったことを示す ($p < 0.01$)。

だプラスミドが使われることが多いようである。しかし、今回のモデル実験において定量したいのは細菌そのものの数であり、標的となる配列はその染色体上に存在している (図-1)。プラスミドと染色体とではその形状 (高次構造など) が大きく異なっていることから、前者を鋳型として得られたデータは、後者を定量するための信頼できる基準になりえるのだろうか?

この点について確認するためには、標的配列がプラスミド上にある場合と染色体上にある場合とで、PCR における反応性が一致するかどうかの比較を行う必要がある。そのような確認を行うために、対象微生物 (MA106) の染色体から、増幅の標的部位およびその周辺領域を含む約 1.5 kb の領域をクローニングした (図-1 の pGUS1)。そして、このプラスミドの DNA と、対象微生物の染色体 DNA とをそれぞれ抽出し、十分に精製したうえで希釈系列を調製した。それぞれの系列を鋳型として定量 PCR を行い、得られたデータをプロットしたところ、いずれの場合でも極めて直線性の高いことが認められた (図-5)。ただし、両者の傾きは異なっており、それぞれの PCR 増幅効率を算出したところ、プラスミドからは 98%、染色体からは 88% という値が得

1. 対象微生物を振とう培養する
2. 菌体を2回洗浄後、リン酸緩衝液に懸濁して分光光度計で菌濃度を測定する
3. 「 $10^2 \sim 10^{10}$ cfu/ml」の希釈系列を作る = 「標準試料」
4. 土壌^{a)} 0.5 g に対して標準試料を 100 μ l 添加し、「 $10^1 \sim 10^9$ cfu/0.5 g 生土」の菌密度の系列を作る
5. ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) を用いたビーズ振とう法 (スキムミルクプロトコル) によって、4で調製した土壌の系列からDNAを抽出する^{b)}
 - ✓ スキムミルクを Lysis Solution BB に添加する (20 mg/950 μ l)
 - ✓ 65°C 加温処理 (最大収量を得るためのプロトコル) を行う
 - ✓ 最後のステップで DNA を TE 50 μ l に溶解する (実際の解析サンプルからも同じ条件で DNA 抽出する)
6. QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN) を用いて反応を行う^{b)}
 - ✓ 5で抽出した DNA サンプルを 5 μ l 用いて、最終容量が 50 μ l の反応液 (TaqMan アッセイ用プロトコル) を調製する
 - ✓ 2ステップのサイクルを 45 回繰り返す (実際の解析サンプルも同時にサーマルサイクラーにセットして反応・解析を行う)
7. データ解析を行い、菌密度 (標準試料の土壌への添加量) と Ct 値をもとに検量線を作成する (実際の解析サンプルから得られた Ct 値を検量線に当てはめ、その菌密度を算出する)

図-4 土壌細菌の菌密度を絶対定量するための検量線作成手順

- a) 供試土壌の水分量を測定しておき、菌密度を乾土当たりの数値に換算できるようにしておく。
- b) 補足に記した変更点以外は、キットに添付された標準プロトコルに従って操作した。なお、ビーズ式破碎装置は FastPrep FP100A (フナコシ)、サーマルサイクラーは ABI PRISM 7000 (アプライドバイオシステムズ) を用いた。

られた。このことは、全く同じ標的配列であっても、その鑄型としての形状が違えば PCR の反応性が異なってくる可能性のあることを示している。

以上のことから、今回のように増幅の標的が染色体上にある場合に、定量の精度をできるだけ上げたいのであれば、標準試料としてプラスミドを使用することは避けるべきであると判断した。そこで、以後の試験では「対象微生物の菌体そのもの」を標準試料として用いて、土壌に対する添加回収試験を行うことにした。すなわち、既知濃度の菌液を用いて希釈系列を調製し、それを土壌に添加した後、実際の解析サンプルと同一の条件で DNA 抽出・定量 PCR を行い、得られた Ct 値と土壌への添加量 (土壌中の菌密度) とをプロットして検量線を

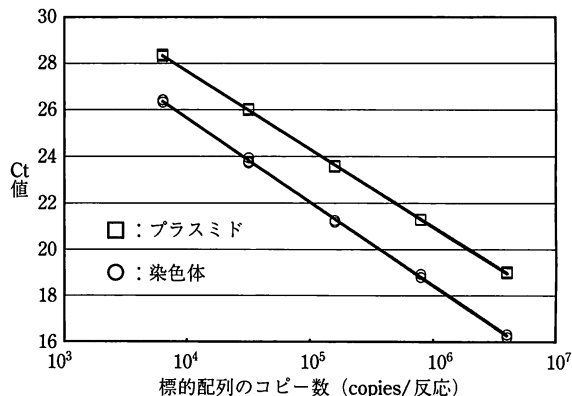


図-5 鑄型となる DNA の形状 (染色体あるいはプラスミド) が定量 PCR の結果に及ぼす影響

□ : 標的配列がプラスミド上に存在している場合 ($R^2 = 0.9998$, PCR 効率 = 98%)。

○ : 標的配列が染色体上に存在している場合 ($R^2 = 0.9996$, PCR 効率 = 88%)。

両者の傾きが異なるのは、PCR 効率が違うことを示している。

作成することとした (図-4)。

2 定量値の補正は必要か?

(1) 補正の必要がない場合

II で述べた DNA の抽出効率や PCR 阻害物質の混入率は、土壌の種類によってそれぞれ異なる値になるであろう。したがって、精度の高い定量を目指すのであれば、抽出過程における DNA のロスや PCR 阻害物質の混入によって定量値がどの程度影響を受けるのか (過小評価されるのか) について、検査対象となる土壌ごとに事前評価を行っておき、その値を用いて定量値を補正する作業が必要であると考えられてきた。

しかし、「対象微生物の菌液を標準試料として用いて、土壌に対する添加回収試験を行う」という手順 (図-4) を踏めば、たとえその土壌における抽出効率や混入率が不明であっても、それらの影響があらかじめ反映された形の「その土壌専用の検量線」を得ることができるはずである。したがって、その検量線から算出された値は、精度の高い「絶対定量値」としてそのまま用いることができるであろう。その結果、定量値の過小評価分を見積もるための事前評価や補正するための作業が省略できることになり、簡易に定量 PCR 実験を行うことが可能となる。

ただし、この手順 (図-4) をそのまま適用する前に、確認しておくべき点の一つだけがある。今回データを示したモデル実験では、組換え微生物における導入遺伝子を標的としてプライマー/プローブが設計してあるため

(図-1)、増幅の標的となるような配列は自然界の土壌中には存在していない、と想定することができた。しかし、対象となる微生物が一般的な植物病原細菌であり、その菌が本来もっている遺伝子を増幅の標的とするような場合は、検査対象の土壌中に標的配列が既に存在している可能性がある。したがって、標的配列のコピー数が検出限界以下であるような「同じタイプの土壌」を事前に探索し、検量線作成用に確保しておく必要がある。そのような土壌サンプルさえ確保できれば、それと標準試料とを組み合わせることによって、図-4 の手順に従って検量線を作成することが可能となる。

(2) 補正が必要となる場合

標的配列が検出限界以下であるような土壌が確保できない場合は、図-4 の手順をそのまま適用することはできない。定量値を「補正」するための工夫が必要となってくる。そのための候補として考えられるのが、今回のモデル実験で用いたような「自然界には存在しないような構造の導入遺伝子」を有する組換え微生物を用いて事前に添加回収試験を行う (MUMY and FINDLAY, 2004)、という方法である。すなわち、既知の菌量の組換え微生物を検査対象の土壌に添加し、そこから DNA を抽出して定量 PCR を行う。そして、算出された定量値と実際に添加した菌量とを比較することによって、抽出過程における DNA のロスや PCR 阻害物質の混入による影響を見積もり、過小評価分を補正するための係数を求めておく。その後、本来の対象微生物 (植物病原細菌など) を標的として検査対象の土壌における定量 PCR 実験を行い、得られた定量値を補正係数によって補正し、真値を求めることになる。なお、この 2 回の定量 PCR において用いる二つの検量線は、それぞれ組換え微生物と対象微生物の菌液の希釈系列を調製し、そこから抽出・精製した DNA サンプルの系列を用いて作成すればよい。

また、検出限界以上の標的配列が検査対象の土壌中に最初から存在している場合でも、過小評価が「回避」できるような実験系を構築することによって、補正の必要のない真値を求めようとする試みも報告されている (競合的定量 PCR 法の変法; MANOME et al., 2008)。この手法では、対象微生物ごとに実験系を構築するための手間がかなりかかりそうである。しかし、いったん信頼性の高い系さえ構築できれば、それ以後の実験操作は比較的簡単であるというのが利点であろう。

検査対象となる微生物が植物体内に存在している場合は、対象微生物に汚染されていない植物を温室や人工気象器などで育成し、それと標準試料とを組み合わせることで検量線を作成することによって、高精度な絶対定量を比較

的簡単に行うことができる。しかし、土壌中の細菌を相手に精度を上げたいのであれば、過小評価を「補正」あるいは「回避」するための努力が今後も常に求められるであろう。

IV 検量線の信頼性にかかわる問題

1 定量性と定量範囲の確認

II および III の検討結果をもとに構築・至適化した実験条件 (図-4) は、実際の土壌中に存在している対象微生物を相手にどの程度使えるものなのだろうか。すなわち、どれくらい正確に定量できるのか? 定量可能な範囲は? 検出下限は? といった問題について検討を行った。そのために、検量線作成用の標準試料の系列を用いて土壌への添加回収試験を以下のようにして行い、「直線性が成立する菌密度の範囲」について確認を試みた。

図-4 の手順に従って段階希釈した菌液をアロフェン質黒ボク土に添加し、 $3.1 \times 10^1 \sim 3.1 \times 10^9$ cfu/g 乾土 (以後、測定値はすべて乾土当たりの数値に換算してある) の密度で対象微生物を含む土壌サンプルの系列を準備した。そこから抽出した DNA を用いて PCR 反応を行い、得られたデータをプロットしたところ、「 $3.1 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^9$ cfu/g 乾土」において強い直線性 ($R^2 = 0.9941$) が認められた (図-6)。したがって、図-4 の実験条件下において、今回供試したアロフェン質黒ボク土に関しては、少なくともこの菌密度の範囲において高い定量性が期待できる。また、正確な定量はできないもの

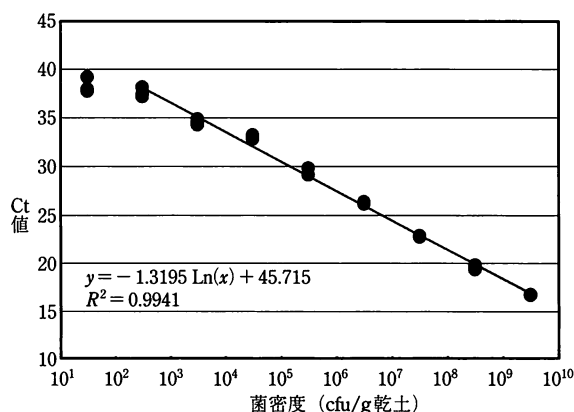


図-6 定量性と定量範囲の確認

菌液の希釈系列を土壌 (アロフェン質黒ボク土) に添加後、DNA を抽出して反応・解析を行った。 $3.1 \times 10^2 \sim 3.1 \times 10^9$ cfu/g 乾土の範囲において強い直線性が保たれている。

の、この範囲よりさらに1桁低い菌密度においてもシグナルが得られる場合があった。検出さえできればよいという定性的な検査の場合は、その検出下限は「約 3.1×10^1 cfu/g 乾土」近くまでさかのぼることができるかもしれない。

2 DNA サンプルの保存性と検量線の再現性

土壌からDNAサンプルを調製する作業にはどの程度の再現性が期待できるのだろうか？ 調製したDNAサンプルは保存ができるのだろうか？ これらの要因は検量線の再現性にどのような影響を及ぼすのだろうか？ 以上のような疑問に対して、次のようにして評価を試みた。

標準試料の系列を用いた添加回収試験(図-4)を、1か月の間において同一圃場を対象として2回行い、得られたDNAサンプルを凍結保存した。そして、これら二つの保存サンプルの系列を用いて、時間をおいてPCR反応を繰り返し行ったところ、得られる検量線がほぼ一致することが認められた(図-6, 7)。したがって、検査対象の土壌に標準試料を添加した後、そこからDNAサンプルを調製・保存するという作業を最初にまとめて行っておけば、以後の試験ではその保存サンプルを使って検量線が繰り返し作成可能であり、DNA抽出作業を省力化することができそうである。

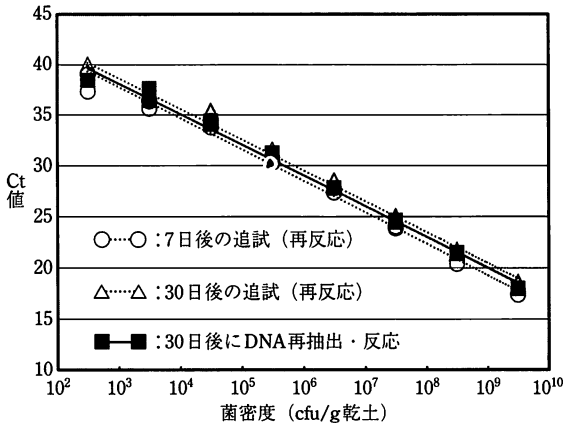


図-7 DNA サンプルの保存性・検量線の再現性についての検討

○：図-6で供試したDNAサンプルを7日間凍結保存した後、再び用いて反応・解析した結果 ($R^2 = 0.9929$)。

△：図-6で供試したDNAサンプルを30日間保存後、再び反応・解析した結果 ($R^2 = 0.9903$)。

■：図-6で検査した圃場から30日後に再び土壌を採取し、標準試料の添加・DNAの抽出を行った後、反応・解析した結果 ($R^2 = 0.9926$)。

本試験では検量線用のDNAサンプルの系列を、土壌から全DNAをまとめて抽出するという形で調製・保存している(図-4)。そのため、対象微生物のDNA量(コピー数)が少ない区においても、その他の土壌生物由来のDNAが大量に共存しているために、それらがキャリアDNAのような効果を発揮して対象微生物DNAの安定化に寄与しているのかもしれない。ただし、同一の圃場であっても、水分量をはじめとする土壌の条件が検査期間の途中で大きく変動するようなことがあった場合は、保存サンプルの流用は避け、改めて検量線用サンプルを再調製する必要がある。

3 異なる土壌間における比較

前項まではアロフェン質黒ボク土を検討対象としてきたが、それ以外のタイプの土壌においても図-4に示した実験条件のもとで定量性が確保できるであろうか？ このことを確認するために、3種類の土壌(黒ボク土、砂質土、砂壤土)と標準試料とを組み合わせて添加回収試験を行ってみた。

その結果、いずれの土壌においても高い定量性が認められることから(図-8)、この実験条件は汎用性が高く、様々な土壌に対して適用できそうである。しかも、三つの検量線がほぼ一致することから、この実験条件下で任意の土壌に標準試料を添加した後、そこから調製したDNAサンプルの系列は、異なる土壌の解析においても検量線作成のために流用できる可能性がある。ただし、水分量、DNAの抽出効率やPCR阻害物質の混入率などの条件が大きく異なるような土壌に対しては、当然のこ

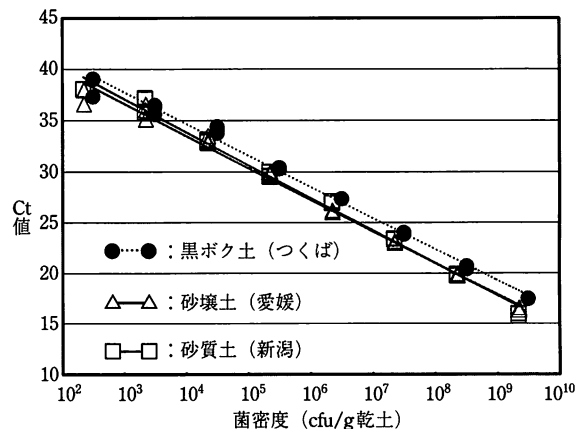


図-8 異なる土壌間における比較

●：茨城県つくば市で採取した黒ボク土 ($R^2 = 0.9929$)。

△：愛媛県で採取した砂壤土 ($R^2 = 0.9919$)。

□：新潟県で採取した砂質土 ($R^2 = 0.9921$)。

とながらサンプルの流用は不可能である。事前に検量線が一致するかどうかについて標準試料を用いて予備試験を行い、サンプルの流用が許容できることを確認しておく必要がある。

おわりに

本稿では、リアルタイム定量 PCR 法によって土壌細菌をできるだけ高精度に絶対定量したい場合に、どのような条件検討が必要になるのかについて、我々が実験系を構築する過程（澤田ら, 2007; 2008）をその一例として紹介しながら示してきた。本法は定量可能範囲が非常に広いうえに検出感度、特異性や再現性が高く、土壌細菌の動態を解析する様々な場面で威力を発揮するであろう。また、胞子の懸濁液を標準試料とするなどの工夫をすれば、本稿で示した実験条件（図-4）を糸状菌へ適用することも可能であろう。

検出のみを目的とするような定性的な検査においても、本法に対して大きな期待が寄せられている。電気泳動による産物の確認が不要なため、簡便・迅速に結果が得られる、コンタミのリスクが少ない、ハイスループットな処理ができるなどの利点があるからである。定性的な検査であれば本稿の III および IV で述べたような定量の精度を上げるための労力も必要なくなるので、手法を導入するうえでのハードルは極めて低くなり、病害診断の現場でも容易に実施することができるであろう。今後は、従来型の定性的な PCR によって行われている診断・検出のための検査が、定量 PCR 法に置き換わっていく場面が多くなっていくのではないだろうか。

本法によって定量を試みるに際して注意すべき点はいくつか挙げておきたい。土壌は極めて多様性に富んでおり、図-4 に示した実験条件がそのうちのどの範囲にまで通用するかについては全く予想がつかない。条件の異なる土壌を相手にする場合は、今回示したスキームに従って改めて条件検討するべきであろう。その結果、実験

の各段階において対象土壌に合わせた至適化が必要になる可能性がある。また、定量 PCR によって得られる定量値には、生菌だけでなく、死菌や遊離 DNA 由来のシグナルが含まれていることにも留意したうえで評価しなければならない。生菌（VBNC 状態の菌も含む）のみを分別定量するためには、RNA ベースの手法を利用するなどの工夫が必要となる。さらに、今回は取り上げなかったが、観測地点の選択、土壌のサンプリングの方法や回数の設定、土壌サンプルの保存や前処理のやり方などに関しても、条件検討・標準化すべきポイントが多数残されている。

定量 PCR に関連する試薬やキット、機器、解析方法などは、著しいスピードで技術改良が進められている。FAST PCR やマルチプレックス PCR のような手法も、定量 PCR と組み合わせるようになりつつある。このような新しい技術・解析方法を取り込んで実験系を改良していくことによって、土壌細菌の動態の解析や病害の診断にかかわる手法がさらに進歩していくことを期待したい。その際の実験系の構築・至適化において、本稿で示したスキームが参考になれば幸いである。

引用文献

- 1) GARCIA-PEDRAJAS, M. D. et al. (1999): *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 251 ~ 259.
- 2) 北條浩彦 (2008): 原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド, 羊土社, 東京, 193 pp.
- 3) IKEDA, S. et al. (2008): *Microb. Environ.* 23: 159 ~ 166.
- 4) MANOME, A. et al. (2008): *Plant Pathology* 57: 887 ~ 896.
- 5) 森本 晶・星野裕子 (2008): *土と微生物* 62: 63 ~ 68.
- 6) MUMY, K. L. and R. H. FINDLAY (2004): *J. Microbiol. Methods.* 57: 259 ~ 268.
- 7) SAGOVA-MARECKOVA, M. et al. (2008): *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2902 ~ 2907.
- 8) 澤田宏之ら (2007): 遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究 (研究成果 447), 農林水産技術会議事務局, 東京, p. 227 ~ 230.
- 9) ———ら (2008): 日本土壌微生物学会 2008 年度大会講演要旨集, 日本土壌微生物学会, 静岡, p. 35.
- 10) YUHASHI, K. et al. (2000): *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2658 ~ 2663.

(新しく登録された農薬 30 ページからの続き)

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ヘラオモダカ, ヒルムシロ

●ピラクロニル・ベンゾビシクロン水和剤

22253: サンシャインフロアブル (エス・ディー・エス バイオテック) 08/09/24

22254: 協友サンシャインフロアブル (協友アグリ) 08/09/24

ピラクロニル: 3.9%, ベンゾビシクロン: 3.9%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北) ヒルムシロ, クログワイ (東北, 近畿・中国・四国),

オモダカ (東北, 関東・東山・東海), コウキヤガラ (九州), シズイ (東北)

●フェントラザミド・ベンゾビシクロン・ベンゾフェナップ粒剤

22255: クミアイスマート 1 キロ粒剤 (クミアイ化学工業) 08/09/24

22256: スマート 1 キロ粒剤 (エス・ディー・エス バイオテック) 08/09/24

フェントラザミド: 2.0%, ベンゾビシクロン: 2.0%, ベンゾフェナップ: 8.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヘラオモダカ, ヒルムシロ