

# 土壤微生物相の解明による土壤生物性の解析技術の開発 (総論)

農業環境技術研究所 對馬 誠也

## はじめに

高品質な作物生産を行ううえで、安定した地力の確保、連作障害等の病害の克服が重要であり、それを実現するためには、土壤の物理性、化学性、生物性を適切に把握する必要がある。しかし、土壤の物理性、化学性の診断技術はあるものの、生物性を診断する技術の開発は著しく遅れている。土壤病害においては、土壤中での病原菌と微生物間の競合（百町・對馬，2009）、菌寄生（百町，2009）、抗生（土屋・染谷，2009）や、線虫などによる捕食（百町，2009）等多くの研究がなされている。また、有機物資材などの病害防除効果として土着微生物の関与が報告されている（雨宮，2009）。したがって、土壤病害においても、簡易で、実用的な土壤微生物性を評価する技術の開発が必要と考える。

土壤微生物性の評価法の開発が遅れている理由としては、①「培養法」では、土壤微生物全体を評価できない、②土壤生物性の解析に時間がかかり研究者一人で解析できるサンプル数が限られる結果、複雑な土壤生態系の解析が難しい、等が考えられる。特に、①については、土壤細菌の場合、古くから「培養法」で土壤から分離できる細菌はたかだか全細菌の1%程度に過ぎないと言われ、膨大な数の「培養不可能な細菌」を含めた土壤の全微生物を評価することは難しいことが明らかになっている。このため、微生物全体を評価したいなら、培養法によらない新技術が必要である。また、②の問題を解決するためには、他の研究者が収集した土壤情報も共有できるシステムの構築などの工夫が必要になる。

こうした背景の下、eDNA（土壤から培養過程を経ず得たDNA）を直接解析することにより、新しい土壤微生物評価法を開発し、栽培管理に活用できる指標の策定などを目的として、2006年に農林水産省委託プロジェクト「土壤微生物相の解明による土壤生物性の解析技術の開発」（以下、eDNAプロジェクトと称す）が5年計画でスタートし、現在4年目を迎えている

(URL: [http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna\\_jp/plan.html](http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna_jp/plan.html))。なお、eDNAとはenvironmental DNA（環境DNA）の略である。

ここでは、本プロジェクトの紹介と主として病害防除に関連して、取り組みの現状を紹介する。

## I eDNAプロジェクトの概要

本プロジェクトは、三つのグループ（大課題1, 2, 3）に分かれている。大課題1では土壤DNA, RNA解析技術の開発を行い、大課題2では大課題1で開発した手法を用いて実際の圃場試験で作物生産や病害発生と土壤DNA解析結果に基づく生物性の関係等を調べ、作物生育、病害発生（あるいは抑制）等を評価するための、新しい「指標」作りを目指している。さらに、大課題3では、大課題2の課題担当者が収集した土壤情報をデータベース化し、誰でもが使えるデータベースシステムの構築を目指している。以下に各課題の取り組みを紹介する。

(1) 大課題1: 「土壤DNAなどを用いた土壤生物相の解析手法の開発」

ここでは、大課題2のグループが活用するための実用的な解析法マニュアルの作成と、それ以外の新規なDNA, RNA解析手法の開発を行っている。

1) 基幹技術PCR-DGGEによる多様性解析マニュアルの作成

本プロジェクトでは、低コスト、簡易な土壤DNA技術として、変成濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法と呼ばれる手法を基幹技術にして、最初の2年間でその利用マニュアルを作成することにした。DGGE法は、同じ長さのDNA断片でも塩基配列の違いによって泳動距離が異なることを利用した微生物相の解析手法である。そのため、微生物の系統解析に利用される、16SリボゾームDNA(細菌用)や18SリボゾームDNA(糸状菌と線虫用)の領域をPCRで増幅してDGGEで電気泳動することによって、土壤に含まれる微生物相をバーコードのように表すことができる(図-1)。

しかし、その一方で、このDGGE法は、①ゲルごとにバンドの移動度が異なるので、ゲル間の比較が簡単に行えない、②バンドから微生物種を知ることはできない(バンドを切り出し塩基配列を決定することはできる)

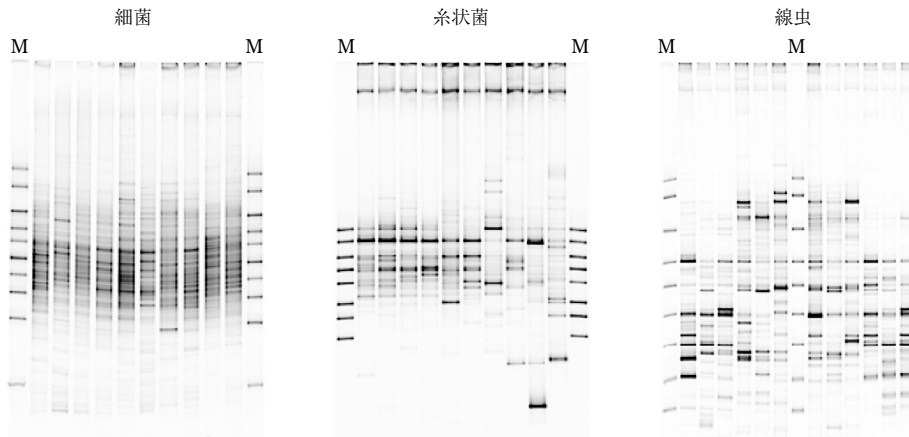


図-1 PCR-DGGE 標準法の開発

農耕地土壌の生物相（細菌・糸状菌・線虫）を、DNA 分析（PCR-DGGE）によって解析するための手順を、対象生物群ごとに最適化し、マニュアルを作成した。各レーンには異なる土壌に由来する DNA を泳動しており、それぞれの生物相がバンドパターン（バーコード）として検出される。

というデメリットもある。特に、①は、多数のサンプルの比較を目的とする本プロジェクトにとって大問題であった。そこで、本プロジェクトでは、すべての DGGE データを比較できるように、細菌、糸状菌、線虫の DNA マーカーを作成して、それらをすべてのゲルに一定間隔で流すことにした。

さらに、共通の DNA マーカー作成と同時に、土壌からの DNA 抽出法、PCR 反応条件、プライマーの選択、DGGE の条件等を検討して、細菌・糸状菌相解析マニュアル（森本・星野，2008）と線虫相解析マニュアルを作成（大場・岡田，2008）した。また、さらに詳細な情報を加えたマニュアルを「eDNA プロジェクト」の Web 上（前述）で公開した。

## 2) 各種 DNA, RNA 解析技術の開発

他の課題担当者は、土の中で微生物がどのような働きをしているかを調べるため、土壌からの RNA の抽出法の開発も行っている。土壌からの RNA の抽出は、DNA の抽出よりも難しいが、これまでの研究により、土壌から効率よく抽出できる方法が開発されつつある。さらに、農耕地土壌で肥料の分解や温室効果ガスの発生に関与するアンモニア酸化細菌や脱窒細菌等の生態や機能を土壌 DNA や RNA を用いて解析する研究も行っている。また、近年目覚ましい勢いで開発が進んでいる次世代 DNA シークエンサーと呼ばれる超高速自動遺伝子配列解析装置を使って、土壌の微生物の遺伝子の配列を丸ごと決定して、その土壌の微生物相を網羅的に解析する取

り組みも行っている。これらの技術も近い将来には、土壌中で活性化している遺伝子発現を直接評価することにより、温室効果ガスの発生圃場の推定などに役立つことが期待される。

## (2) 大課題 2: 「作物生産と土壌生物相の関連性の解析および土壌生物の多様性評価手法の開発」

### 1) 二つのサブチーム：肥培管理サブチームと土壌病害サブチーム

肥培管理サブチームでは、六つの研究課題を設定し、野菜畑、普通畑、水田の土壌生物相について、大課題 1 のグループが開発した PCR-DGGE の標準手法で解析し、土壌の諸性質や作物収量等について調査している。各地の栽培条件下で、PCR-DGGE のバンドパターンや特徴的なバンド、多様性等を明らかにし、統計解析などにより作物の生産性などとの関係について検討を加え、連作危険度や収量性の「指標」の探索を行っている。

次に、土壌病害サブチームでは、複数の植物病原糸状菌および線虫による土壌病害に焦点を当て、土壌中の細菌、糸状菌、線虫相と病害発生との関係を解明するとともに、土壌生物性の評価を行っている。病害が発生する土壌微生物相の特徴は何か、特徴的なバンドは存在するのか、特定の有機物を施用すると病害が軽減するのはなぜか、土壌消毒と病害発生の関係はどうなっているのか、発病抑止土壌に見られる土壌病害衰退現象はどのようなメカニズムで起きているか等、それぞれ課題ごとに現在解析を行っている（図-2）。

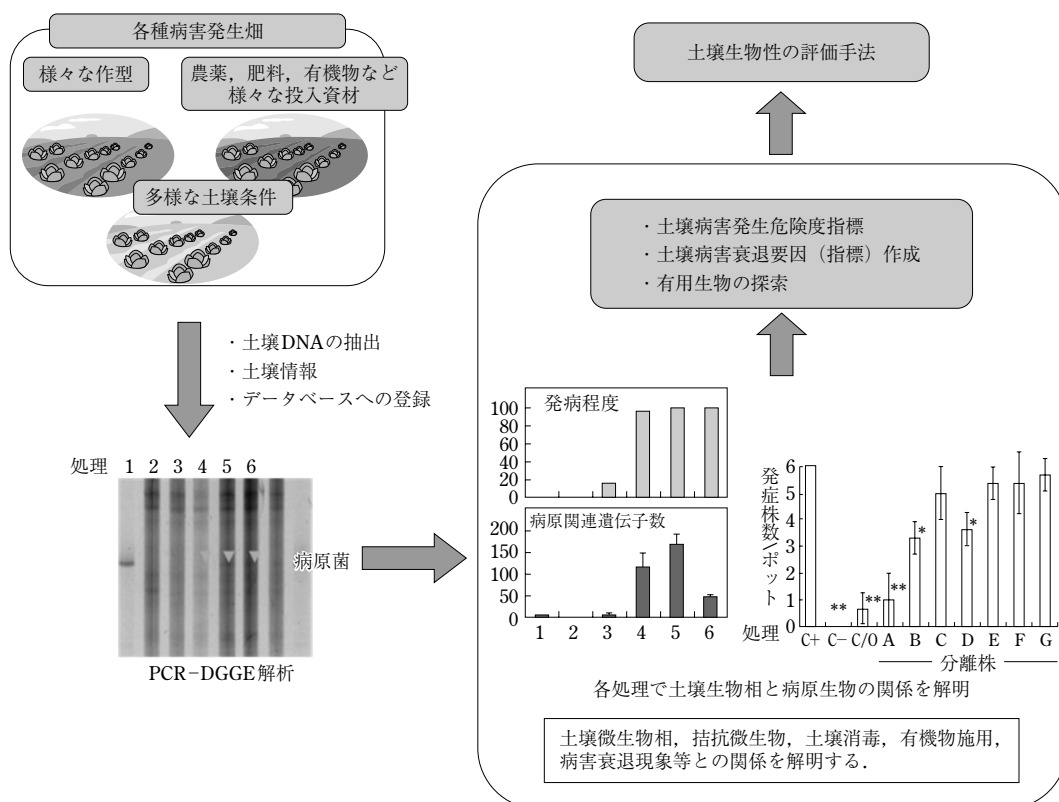


図-2 土壌病害と土壌微生物相の関係解析に基づく土壌生物性評価の研究の流れ

2) 大課題3のデータベースへの各種土壌情報の登録  
二つのサブチームで解析に用いた各種の土壌情報は、大課題3に送られ、そこで作成しているデータベース（後述）に登録されている。

(3) 大課題3:「土壌DNA情報のデータベース化および利用技術開発」

ここでは、PCR-DGGE解析情報などの生物性も含めた各種の土壌情報を収集し、将来にわたり利用可能な『農耕地 eDNA データベース』（eDDASs: eDNA Database for Agricultural Soils）を作成するとともに、データベース登録された全国の土壌情報を基に、「土壌特性と生物多様性の関係」を様々な統計手法を用いて解析している。昨年までに、全国15地点の6種の土壌群から採取した約1,500件（2009年3月現在、図-3）のデータが蓄積されている。

1) 農耕地 eDNA データベース（eDDASs）の構築（Tsushima et al., 2009 a）

eDDASsには「利用者登録」、「データ登録」、「データ検索・解析」機能があり、さらに、誰もがデータ登録で

きる自己増殖型データベースである。登録シートは、データの「質」を確保するために、「38個の必須項目」の入力を義務付けることにし、任意の入力項目を入れて全部で68項目の入力が可能になっている。採取者名、採取地（緯度、経度）、試験目的、土壌群名、土壌炭素・窒素・可給体リン量等が必須項目になっている。「search」画面でキーワード（「黒ボク土」など）検索すると該当する全情報が表示される（図-4）。以上の全体のシステムの流れを図-5に示した。

なお、大課題3では、DGGE解析データのほかに、eDDASsには、特定の微生物を対象に、土壌中の存在を明らかにすることができるマイクロアレイ解析データもeDDASsに搭載する予定でシステムを構築中である。

2) 全国の土壌サンプルを用いた多様性に及ぼす土壌要因の解析

大課題3では、さらに、集められた情報を基に、全国規模で各種の解析手法の検討も行っている。現時点では、収量などの情報の蓄積が不十分のため、「土壌要因（物理・化学・生物性）が微生物の多様性に及ぼす影響」



図-3 eDNA プロジェクトで平成20年度までに調査している全国の調査地点  
 プロジェクトではさらに、沖縄など土壤の異なる地域の情報も収集予定である。

**Sample Detail [000428-1 (Nematode, Standardized)]** [Returns to Search Result](#)

**DGGE Gel Image** [<Previous](#) | [Next >](#)

This sample information described below is about: Lane 4

検索したサンプルがレーン4番にあることを示す

Associated Data	
Another Method	Not-Standardized
Another Method	000428-2
Another Method	000428-3

③関連土壤サンプル（反復など）のDGGE画像

①標準化用DGGE画像（H20年度作成）

②デジタルDGGE画像

---

Accession Number	Organic Fertilizer
Accession Number: 000428-1	Kind of Organic Material
Sample Registration	Rate of Application
	Year of Continuous Application
	Time of Fertilizer
	Collector: Kazunari NAGAOKA
Affiliation: NARFC	

図-4 農耕地 eDNA データベース (eDDASs) の検索結果表示  
 ①マーカーと同時に流した標準化用 DGGE 画像（検索したサンプル（レーン番号 4）と他のサンプルも一緒に泳動）、②目的サンプル（レーン 4 番）の DGGE 画像のデジタル画像。これにより他のデータとの比較が容易になる。③関連情報（反復など）表示。下段にはサンプルの詳細な土壤情報が表示される。



図-5 農耕地 eDNA データベース (eDDASs) への登録, 利用法 (流れ図)

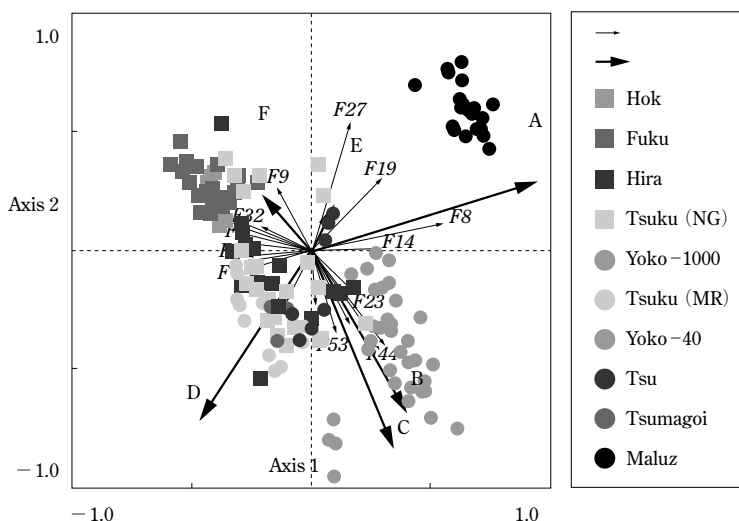


図-6 冗長分析 (Redundancy analysis : RDA) による微生物の多様性に及ぼす土壤物理・化学性の影響解析例  
 図中の矢印 (A, B, C) が多様性に強く影響を及ぼしていることが推定できる。

について解析しているが、極めて複雑な系を対象として何らかの「指標」を探すためには、様々な統計手法を用いて解析する必要がある。このため、ここでは、冗長分析 (RDA) (図-6)、二変量分析、回帰木解析等様々な解析法による検討を行っており、全国の黒ボク土壌におい

て、可給態リンと糸状菌相に高い相関があることが示唆されている (包ら, 2009)。

## II eDNA プロジェクトでの病害分野における取り組みの現状

本プロジェクトでは、大課題1で開発した基幹技術の利用可能性の検討を行いながら多数のデータ収集と解析を行うため、成果が出るまでに時間がかかっているが、ここでは、これまで比較的解析などが進んでいる課題について紹介する。

大課題2においては、関口ら(2009)は、トマト褐色根腐病長期未発生土壌における糸状菌群集構造の解析を行い、未発生土壌の微生物相の特徴を調べている。その結果、PCR-DGGEの比較結果(図-7, 左写真)を参考に病害未発生土壌に特徴的なバンドに相当する微生物を分離することに成功した。現在、その微生物の病害抑制効果を接種試験により確認している(図-7, 上写真)。

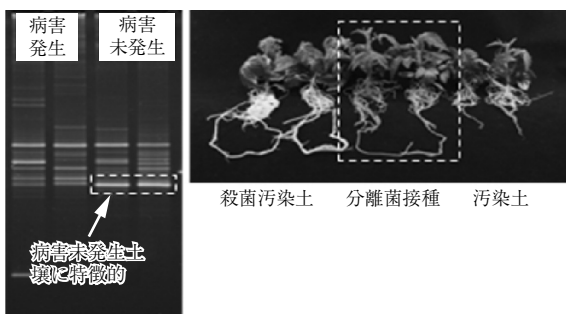


図-7 トマト褐色根腐病発生圃場と未発生圃場の糸状菌相のPCR-DGGE解析(左写真)と未発生圃場特徴的バンドを示す微生物の発病抑制効果(上写真)

また、大課題3においては、有江らは、本プロジェクトマニュアルに基づいて抽出したeDNAの新しい利用法を開発するために、*Fusarium*属菌を対象として種レベル『大分類群』、分化型レベル『中分類群』、レースレベル『小分類群』で検出可能な手法の開発に取り組んでおり、各レベルでの特異的な塩基配列を選抜した(図-8, INAMI et al., 2009)。現在、この特異塩基配列を同じ大課題3で開発中のマイクロアレイ(久原, 2009)に搭載して、その利用可能性を検討している。なお、有江らの研究の詳細は、植物防疫5月号掲載予定である。

## おわりに

eDNAプロジェクトは、農耕地土壌の物理・化学性に生物性の評価を加えて、総合的な土壌診断技術を目指しているという点で革新的な試みと言える。加えて、全国の農耕地土壌を視野に入れて各種の土壌情報を蓄積し、誰もが共有できるシステムの構築を目指している点も世界的にも珍しい(Tsushima et al., 2009 b)。土作りや病害防除における土壌微生物の管理の重要性は多くの研究から明白であるが、これまでは「複雑な土壌生態系」の解析は難しいと多くの研究者が考えて取り組みを躊躇していた研究者も多数いたのではないと思われる。しかし、近年のDNA解析も低コスト化が進み身近な技術となり、かつ膨大な情報を解析できるIT技術の進展も目覚ましいことから、土壌病害の対策を考えた土壌および土壌微生物の管理技術の開発が可能になってきていると考える。本プロジェクトの成果や農耕地eDNAデータベースがそれらの課題の解決に少しでも役立つようできたらと考えている。

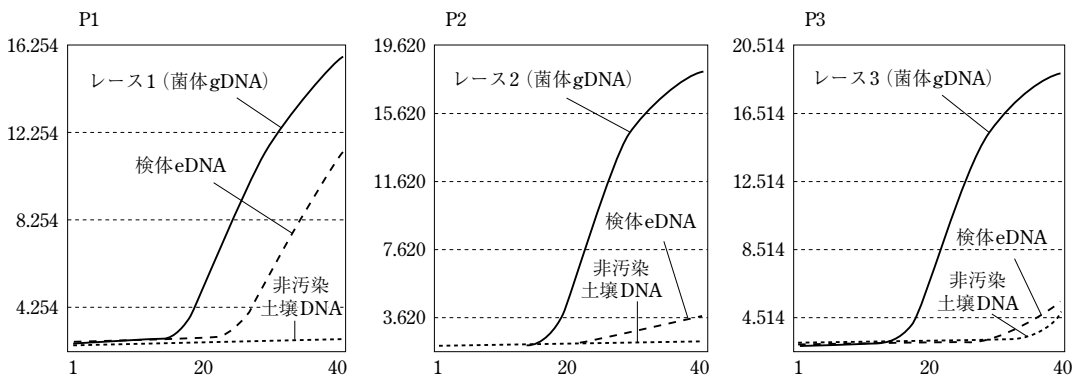


図-8 トマト萎凋病発病圃場土壌から抽出したDNA(eDNA)を鋳型としたリアルタイムPCRによるレース識別事例  
検体のeDNAは、P1で陽性、P2で陰性、P3で陰性であることから、当該圃場の土壌はトマト萎凋病菌レース1に汚染されていると診断された。

参考文献

- 1) 雨宮良幹 (2009): 微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—, ソフトサイエンス, 東京, p.80 ~ 83.
- 2) 包 智華ら (2009): 日本土壤微生物学会 2009 年度大会講演要旨集, p.60.
- 3) 百町満朗 (2009): 微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—, ソフトサイエンス, 東京, p.10 ~ 20.
- 4) ——— (2009): 同上, p.44 ~ 49.
- 5) ———・對馬誠也 (2009): 同上, p.10 ~ 17.
- 6) INAMI, K. et al. (2009): J. Gen. Plant Pathol. (印刷中).
- 7) 久原 哲 (2009): 土と微生物 63: 74 ~ 77.
- 8) 森本 晶・星野(高田)裕子 (2008): 同上 62: 63 ~ 68.
- 9) 大場広輔・岡田浩明 (2008): 同上 62: 69 ~ 74.
- 10) 関口博之ら (2009): 同上 63: 119.
- 11) 土屋健一・染谷信孝 (2009): 微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—, ソフトサイエンス, 東京, p.36 ~ 43.
- 12) TSUSHIMA, S. et al. (2009 a): MARCO Workshop 5 Abstract, p. 65.
- 13) ——— et al. (2009 b): BAGECO 10 Abstract, p. 84.

(新しく登録された農薬 10 ページからの続き)

「殺菌剤」

● **TPN 水和剤**  
 22563: **ホワイトブロック** (エスディーエスバイオテック) 10/01/20  
 TPN: 32.0%  
 きゅうり: うどんこ病: 収穫前日まで  
 ● **バリダマイシン・フェリムゾン水和剤**  
 22568: **トルファン** (住友化学) 10/01/20  
 バリダマイシン A: 5.0%, フェリムゾン: 30.0%  
 芝 (日本芝): ヘルミントスポリウム葉枯病, カーブラリア葉枯病, 葉腐病 (ラージパッチ): 発病初期  
 芝 (ペントグラス): ヘルミントスポリウム葉枯病, カーブラリア葉枯病, 葉腐病 (ブラウンパッチ), 炭疽病, ダラスポット病, 赤焼病: 発病初期  
 ● **銅水和剤**  
 22572: **MIC コサイドボルドー** (三井化学アグロ) 10/01/20  
 水酸化第二銅: 76.8%  
 かんきつ: かいよう病: 発芽前  
 かんきつ: かいよう病, 黄斑病, 黒点病: —  
 りんご: 斑点落葉病: —  
 ぶどう: べと病, さび病—  
 おうとう: せん孔病: 収穫後 (6 ~ 8 月)  
 びわ: がんしゅ病: —  
 キウイフルーツ: かいよう病: 収穫後 ~ 発芽前  
 キウイフルーツ: 花腐細菌病: 休眠期 ~ 養生期 (新梢長約 10 cm)  
 パパイア: 軟腐病: —  
 いちじく: 疫病: —  
 ばれいしょ: そうか病: 植付前 (20 分間種いも浸漬)  
 ばれいしょ: 疫病, 軟腐病: —  
 いんげんまめ: かさ枯病: —  
 きゅうり: べと病: —  
 トマト: 疫病: —  
 にんじん: 黒葉枯病: —  
 ほうれんそう: べと病: —  
 レタス: 腐敗病: —  
 にんにく: 春腐病: —  
 ホップ: べと病: —  
 くわい: ひぶくれ病: —  
 茶: もち病, 褐色円星病, 赤焼病, 炭疽病, 網もち病, 新梢枯死症 (輪斑病菌による): 摘採 14 日前まで  
**野菜類**: 斑点細菌病, 軟腐病, 褐斑細菌病, 黒腐病: —  
**ほおずき**: 斑点細菌病: —

「除草剤」

● **グリホサートカリウム塩・MDBA カリウム塩液剤**  
 22552: **ダブルクラッチ液剤** (シンジェンタジャパン) 10/01/12  
 グリホサートカリウム塩: 25.0%, MDBA カリウム塩:

25.0%  
**樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等)**: 一年生雑草, 多年生雑草  
 ● **グリホサートカリウム塩・MDBA カリウム塩液剤**  
 22553: **除草王シャワー S** (シンジェンタジャパン) 10/01/12  
 グリホサートカリウム塩: 1.0%, MDBA カリウム塩: 1.0%  
**樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等)**: 一年生雑草, 多年生雑草  
 ● **フルセトスルフロン・ベンタゾン水和剤**  
 22556: **アンカーマン DF** (石原産業) 10/01/20  
 22557: **BASF アンカーマン DF** (BASF ジャパン) 10/01/20  
 フルセトスルフロン: 0.30%, ベンタゾン: 20.0%  
**移植水稻**: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ (東北), ミズガヤツリ (九州を除く), ウリカワ (九州を除く), オモダカ (九州を除く), ヒルムシロ, セリ, コウキヤガラ (東北, 関東・東山・東海, 九州)  
 ● **カフェンストール・ダイムロン・ピラゾキシフェン・ベンゾビシクロン粒剤**  
 22569: **トビキリ 1 キロ粒剤** (石原産業) 10/01/20  
 カフェンストール: 2.1%, ダイムロン: 4.2%, ピラゾキシフェン: 10.0%, ベンゾビシクロン: 2.0%  
**移植水稻**: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ (北海道, 東北), ミズガヤツリ (北海道を除く), ウリカワ (関東・東山・東海を除く), ヒルムシロ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (関東・東山・東海), 水田一年生雑草  
 ● **ピラゾキシフェン・ベンゾビシクロン粒剤**  
 22570: **プレキープ 1 キロ粒剤** (石原産業) 10/01/20  
 ピラゾキシフェン: 10.0%, ベンゾビシクロン: 2.0%  
**移植水稻**: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ, ウリカワ, ヒルムシロ  
 ● **ターバシル水和剤**  
 22573: **シンバー** (丸和バイオケミカル) 10/01/20  
 ターバシル: 80.0%  
 かんきつ: 一年生雑草  
 りんご (成木): 一年生雑草  
 ● **イソウロン・DCBN・DCMU 粒剤**  
 22574: **K ワイドウェイ粒剤** (白元) 10/01/20  
 イソウロン: 1.0%, DCBN: 3.0%, DCMU: 6.0%  
**樹木等 (公園, 庭園, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, 鉄道等)**: 一年生雑草, 多年生広葉雑草, スギナ  
 ● **インダノファン・ピラゾスルフロンエチル・ベンゾビシクロン液剤**  
 22575: **ゲキハ 1 キロ粒剤** (大塚化学) 10/01/20  
 インダノファン: 1.2%, ピラゾスルフロンエチル: 0.30%, ベンゾビシクロン: 2.0%  
**移植水稻**: 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), ヒルムシロ, セリ, クログワイ (北海道を除く), オモダカ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (北陸を除く)