

新技術 解説

次世代シーケンシング技術を使った 土壌線虫の網羅的検出法の開発

国立大学法人 東京農工大学 ^{かわのべ}河野辺 ^{まさ}雅 ^{のり}徳*

はじめに

土壌生態系において、細菌、カビ等とともに線虫（体長 0.1~1 mm 程度）は重要な役割を果たしている。なかでも細菌やカビを捕食する自活性線虫は物質循環や病原体の抑制等多様な役割を担っており、線虫の群集構造（どの種がどのくらい存在するか）は土壌の生態系の状態を測る効果的な指標といわれている（YEATES and BONGERS, 1999）。一方、線虫の中でも植物寄生性線虫は農作物に対する病害をもたらし、収量減および作物の品質に甚大な影響を与えることが知られている。土壌線虫の群集構造は、土壌から線虫を分離（図-1）し、顕微鏡を使って形態的な特徴から種の特定をすることが一般的に行われているが、線虫は記載されているだけで 27,000 種以上、全体では 50 万種ともそれ以上ともいわれているため、形態的特徴からの線虫の同定は大変労力がかかる作業となっている。また、土壌病害要因としての植物寄生性線虫の診断は、顕微鏡下で形態的特徴や個体の塩基配列解析（シーケンシング）による同定、特定の線虫種を定量するリアルタイム PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を使うことになり、過去に線虫分析がされていない新規の土壌検体や複数の植物寄生性線虫が併存する場合等は診断のハードルがより高くなる。

近年は分子生物学の発展で、線虫個体や線虫群集から抽出した DNA を PCR で増幅し、群集構造の分析ができるようになった。具体的には濃度に勾配を付けたゲルで PCR 産物を電気泳動して微生物群集をバンドパターンとして可視化する PCR-DGGE 法や、PCR 産物を制限酵素処理してフラグメント解析する T-RFLP 法等をはじめとして様々な方法が開発されてきた。さらに次世代シーケンシング技術（NGS）を使ったメタバーコーディング解析（サンプルに含まれる DNA を網羅的に解析して生息

Development of a DNA Metabarcoding Method for Comprehensive Analysis of Soil Nematode Communities. By Masanori KAWANOBE

（キーワード：メタバーコーディング解析，土壌ゲノム DNA，18S rDNA，自活性線虫，植物寄生性線虫）

*アグリランド兼務

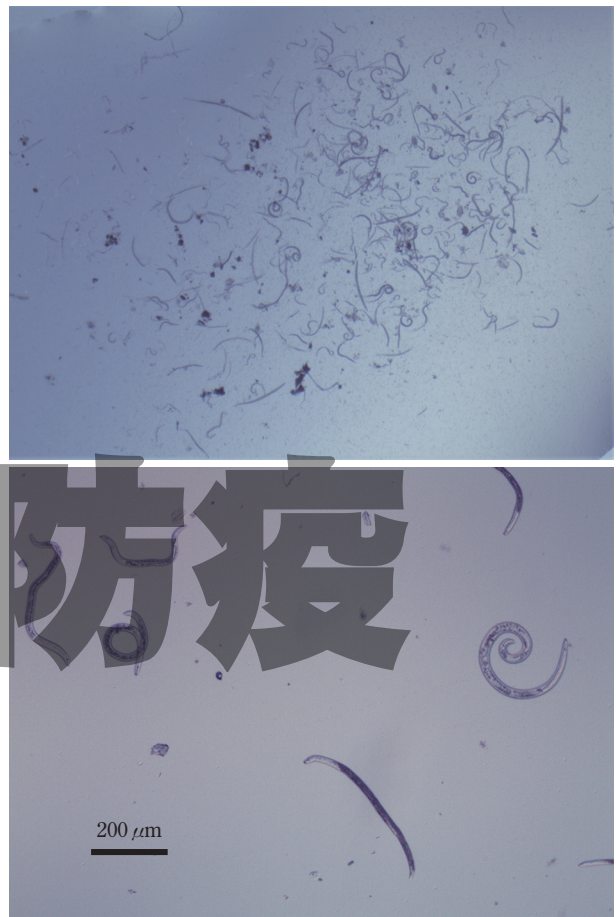


図-1 土壌から分離した線虫群集

する多様な生物種を明らかにする手法）は、遺伝子配列データベースの拡充やコンピューター能力の飛躍的向上もあり、PCR-DGGE 法や T-RFLP 法が苦手としていた生物種レベルの同定も含めた土壌生物相の解析に広く使われるようになってきている。

NGS を使ったメタバーコーディング解析を用いた線虫群集の分析では、線虫以外の真核生物（カビなど）も同時に検出するユニバーサルプライマーを使うことが多い。一般的に土壌中ではカビなどと比べて線虫の DNA 量が相対的に少ないことから、線虫群集分析には土壌からいったん線虫を分離（他の生物種を極力排除）して DNA 抽出をすることが基本となっていた。本稿で報告