

ミニ特集：新たな土壌診断技術

総論 — eDNA プロジェクトの成果と PCR-DGGE 法による土壌診断—

農業環境技術研究所 對馬誠也

はじめに

2006 年から 5 年間続いた農林水産省委託プロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発」（以下、eDNA プロジェクトと称す）が本年 3 月に終了した。本プロジェクトは、安定した地力の確保や連作障害等を克服するため、これまで行われてきた土壌の理化学的評価に加え、新たに生物性を評価する手法を開発することと、そうした新しい評価手法を活用した土壌診断事例の一つでも多く示して利用者を増やすことを目的とした。そのため、プロジェクトでは、中課題 1) 新しい土壌微生物評価技術の開発、中課題 2) 中課題 1 で開発した技術による圃場での作物生産・病害発生と土壌微生物相との関係の解析、中課題 3) 中課題 2 で蓄積した圃場情報（栽培、肥培管理、病害発生、微生物相等）のデータベース化とその利用法の開発、を担当する三つのグループに分かれて研究を進めてきた。すでに、このプロジェクトの概要や一部の成果については、本誌などで報告しているが（對馬, 2010 a ; 2010 b), 最終年度になって多くの成果が出てきたことから、改めて成果の紹介と今後開発した技術の普及に向けた取り組み等について述べたい。本ミニ特集では、まず對馬のほうから、プロジェクト全体の成果と、特に本プロジェクトの基幹技術とした PCR-DGGE 法を用いた土壌診断について報告する。続いて、PCR-DGGE 法を活用した事例として、村上氏と関口氏からそれぞれアブラナ科野菜根こぶ病、トマト褐色根腐病での取り組みについて紹介する。

I プロジェクトの成果

2011 年 3 月に、本プロジェクトの成果として、表-1 に示す「革新的な土壌生物相解析マニュアル」の「ダイジェスト版」と「詳細解説版」を作成し、全国の関係者に配布した（農業環境技術研究所, 2011）。その理由は、「土壌 DNA を用いた土壌診断技術」が生産現場の関係

者にも身近なものになりつつあることを少しでも実感してもらい、それぞれの立場で興味を持って利用していただけたらとの思いからである。また、もう一つの理由は、一口に土壌 DNA 診断技術といっても様々な技術があるため、利用する際には、各種の技術毎の長所と短所を十分に理解したうえで、どのような場面で活用できるか、どのような施設や体制が必要か等、状況に応じた技術の活用が必要なことから、様々な DNA 解析技術について理解してもらいたいと考えたからである。そこで、A4 版 1 枚でわかりやすく成果を紹介したマニュアル（ダイジェスト版）を作成し、実用化を目指す二つの技術に関してだけは（詳細解説版）を作成した。前者は、さらに「1. 技術マニュアル Ver1.0」, 「2. ケーススタディ Ver1.0」, 「3. 研究者用マニュアル Ver1.0」にわかれ、特に「2. ケーススタディ」では PCR-DGGE 技術を用いた解析事例を紹介している。以下に、これらのマニュアルを基に、本プロジェクトの成果を紹介する。

1 「革新的な土壌生物相解析マニュアル」

(1) 技術マニュアル Ver1.0 (ダイジェスト版と詳細解説版)

本プロジェクトの目玉である二つの技術をマニュアル化したものである。一つ目は、たくさんある DNA 解析技術の中では比較的成本がかからない「PCR-DGGE を用いた土壌微生物相解析・活用マニュアル」について、二つ目は、多くの研究者が収集・解析したデータを誰もが利用できるようにするために開発した「農耕地 eDNA データベース (eDDASs) の利用マニュアル」である。

1) PCR-DGGE を用いた土壌微生物相解析・活用マニュアル

本技術は、「土壌細菌・糸状菌相解析法」と「土壌線虫相解析法」からできている。PCR-DGGE の弱点は、ゲル間の DNA バンドパターンの比較ができない点にある。本成果の最大の特徴は、微生物ごとに標準 DNA マーカーを開発し、それを基準にすることで、ゲル間の比較ができるようにしたことである。これにより、多数の土壌サンプルを対象に、3 種（細菌、糸状菌、線虫）の土壌微生物を解析できるようになった。

本マニュアルには、標準マーカーの使用法以外にも、

Introduction of 'eDNA Project of MAFF' and Soil Biodiversity Analysis by PCR-DGGE. By Seya TSUSHIMA

(キーワード: eDNA (environmental DNA), 土壌生物性, 土壌病害, 農耕地 eDNA データベース)

表-1 革新的な土壌生物相解析マニュアル

-
1. ダイジェスト版
 - (1) 技術マニュアル Ver1.0
 - 1) PCR-DGGE を用いた土壌微生物相解析・活用マニュアルの開発
 - 2) 農耕地 eDNA データベース (eDDASs) の開発
 - (2) ケーススタディ Ver1.0
 - 1) ジャーガルにおける緑肥鋤込み畑の後作播種可能時期の評価
 - 2) eDNA 解析により明らかとなった発病未発生病土壌における微生物群集の特徴
 - 3) eDNA 情報等に基づく土壌病害衰退機構の解析とそれを用いた土壌病害抑制法の開発
 - 4) 土壌消毒処理後土壌における病害発生危険度の評価の試み
 - 5) 施用した農薬の影響や残効性を土壌微生物群集から評価する
 - 6) 栽培管理が土壌生物相に及ぼす影響の eDNA による評価
 - (3) 研究者用マニュアル Ver1.0
 - 1) 土壌からの RNA 抽出技術
 - 2) 水田の土壌線虫相の分析技術
 - 3) 畑のアンモニア酸化細菌の群集構造と機能発現を解析
 - 4) 水田の脱窒活性微生物の多様性を解析
 - 5) 根圏の微生物 DNA を大量に解析
 - 6) DNA マイクロアレイによる eDNA 情報収集
 - 7) トマト萎凋病菌のレース検出技術
 2. 詳細解説版
 - (1) 技術マニュアル Ver1.0
 - 1) PCR-DGGE を用いた土壌微生物相解析・活用マニュアル
 - 2) eDNA データベース (2010 年度版) ユーザーマニュアル
-

土壌からの DNA 抽出法や、PCR のプライマー等に関する最新の情報を取り入れている (森本・星野, 2008; 大場・岡田, 2008)。「土壌からの DNA 抽出法」はどのような土壌からも純度の高い DNA が回収できる方法であり、それだけでも研究上の価値は高いと考えている。マニュアルでは、「土壌試料の取り扱い」、「DNA 抽出法」、「PCR (一般細菌相, 糸状菌相)」、「DGGE」、「実例」、「トラブルシューティング」、「参考文献」の順に解説がある。さらに線虫に関しては、これに加えて、「土壌からの線虫分離及びサンプルの前処理」が記載されている。なお、DGGE では、ゲル内でのゲル上の中央と両端で DNA バンドの異動度が異なる、いわゆる DNA パターンのゆがみが生じることが多く、解析の障壁になることがあるが、これに関してはその後の研究で、ゆがみが室内温度、ゲルを流すガラスプレートの温度との温度差に影響を受けることがわかり、ゆがみを最小限にする方法が報告されている (松下ら, 2010)。

なお、中課題 2 グループの研究の結果から、このマニュアルを用いることにより、どの土壌群でも PCR-DGGE 解析が可能であることが明らかになっている。特筆すべき点としては、DNA 抽出が極めて難しかった火山灰土壌である黒ボク土 (畑の約 45% を占める) でも解析が可能になったことがあげられる。この技術によ

って、「全国の農耕地を対象に eDNA 解析ができるようになった」という意義は極めて大きい。最先端の DNA 技術を用いて土壌微生物を解析している例は国内、諸外国でも多くあるが、この成果のように、一つの DNA 解析技術により、全国の農耕地を対象として土壌微生物相を統一的に評価しようとするシステムは世界でも日本だけである。なお、このマニュアルは、「eDNA プロジェクト」の HP (http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna_jp/) からダウンロードできる。

2) eDNA データベースの開発

国内初の「農耕地 eDNA データベース (eDDASs : eDNA Database for Agricultural Soils)」を開発し本年 3 月 31 日に公開した (<http://eddass.niaes3.affrc.go.jp/hp/index.html>)。eDDASs の特徴は、ア) 農耕地の土壌理化学性、作物栽培様式、eDNA 解析情報 (細菌, 糸状菌, 線虫) 等約 60 項目の情報を収納している、イ) ユーザーは、登録されているすべての DGGE 解析データ (生物性の多様性など) を利用することができる、ウ) 誰でも情報を登録することができる (自己増殖データベース)、エ) 簡単な解析ツールを搭載しており、DGGE データのクラスタリングや主成分分析ができる、等があげられる (図-1, 2, 3)。

(2) ケーススタディ Ver1.0

ここでは、中課題2のグループが、前述の技術マニュアル「PCR-DGGE 解析法」を活用した6件の研究事例（土壤病害関連4件、肥培管理関連2件：ケーススタディ1～6）を紹介している。ただし、肥培管理関連のケーススタディ6は、他のケーススタディ事例と異なり、

肥培管理などと土壤生物性の関係をわかりやすく紹介するために、六つの地域で得られた様々な成果を集約したものである。なお、これらの成果については、後半の「PCR-DGGE 法による土壤診断」の中で紹介したい。

(3) 研究者用技術マニュアル Ver1.0

分子生物学的手法は予測できないほどの早さで進展し

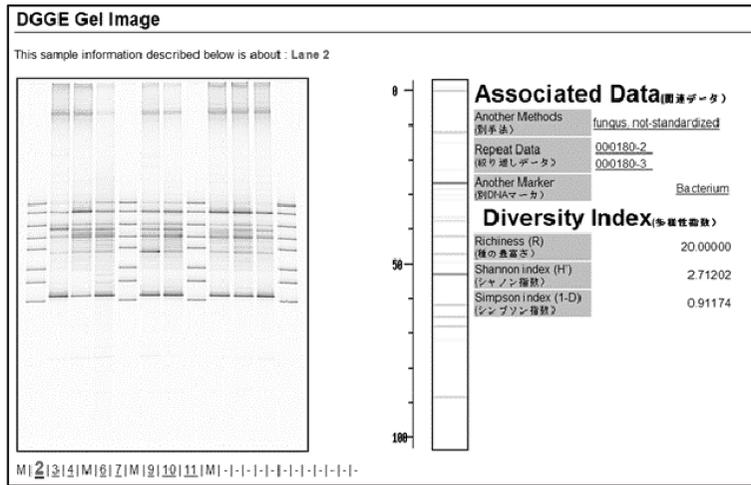


図-1 eDDASsで検索された DGGE 画像

左図：レーン2が検索により表示された土壤サンプルの画像データ（生データ）であることを示す。

右図：左の生データをデジタル化した画像で、右端に多様性指数が表示されている。

R	20	21	10	15	17	20	16	17
H'	2.60880	2.79413	1.86066	2.47554	2.50748	2.75939	2.49577	2.54041
1-D	0.90063	0.92705	0.76457	0.89890	0.89480	0.92689	0.89553	0.90372

R:Richness H':Shannon Index 1-D: Simpson Index S.D:Standard Deviation

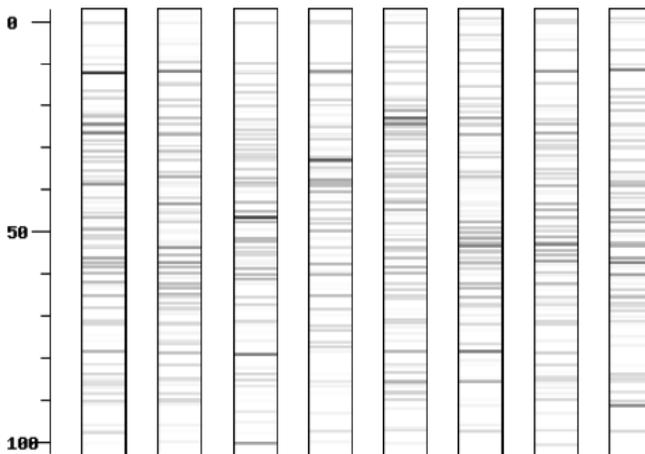


図-2 eDDASsの検索により表示された八つの土壤サンプルの DGGE デジタル画像
デジタル画像にしたことで、多数の土壤サンプルを画面上に並べることができるようになった。

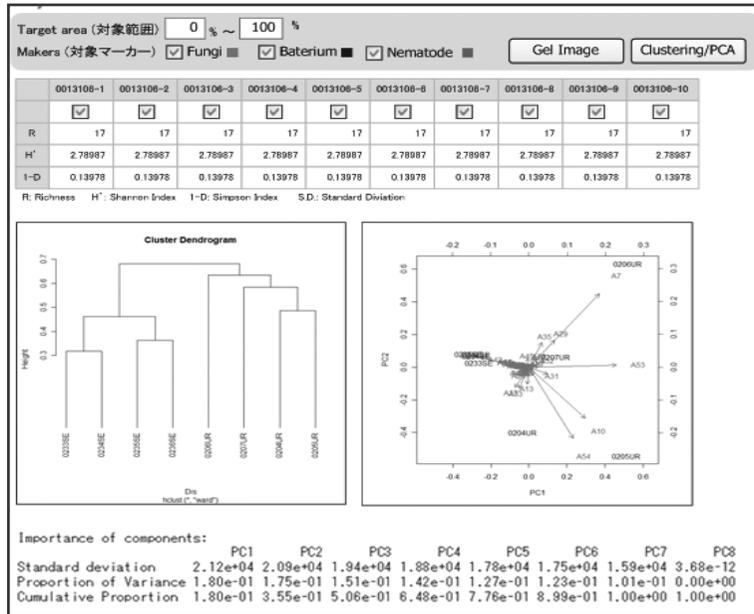


図-3 eDDASs 上での DGGE データの解析

図-2 の表示画面上でクリックを 1 回することによりクラスタリング (左) や主成分分析 (右) の結果が表示される。

ている。昨年までコスト的に無理と考えていた技術が、今年は低コスト化により活用できそうだということが起こっても不思議のない時代になっている。こうした背景から、DNA (RNA) 解析技術に関しては、常に新しい技術の活用方法を開発しておく必要がある。このことから、本プロジェクトでは、土壌からの RNA 抽出、特定遺伝子の検出、網羅的な DNA 解析 (メタゲノム解析) 等の技術開発にも取り組んできた。これらは、農業現場で直ちに利用できるものではないが、研究者にとってはすでに利用できる段階にある。したがって、今後さらに多くの研究者が活用することによって、実用化への道も加速されることが期待される。

マニュアル 1 は、土壌からの RNA 抽出法に関するものである。DGGE 技術も含め DNA を解析する技術は微生物の有無を調べることはできるが、目的とする遺伝子が土壌中で活性化しているかどうかは不明である。したがって、特定遺伝子が土壌中で機能しているかどうかを調べたいときには、何よりも土壌から高純度の RNA を抽出する必要がある。本技術は少なくとも特定の土壌群では利用可能になったと判断したのでマニュアル化した。今後は黒ボク土からの回収が課題となっている。

マニュアル 2 では、水田の線虫相の解析技術を紹介している。すでに畑については開発されているが、水田でも線虫相の解析が可能になった。マニュアル 3, 4 では

畑のアンモニア酸化細菌、水田の脱窒活性を評価する方法を開発したことを、マニュアル 5 では本プロジェクトで開発した DNA 抽出法で回収した DNA を用いてメタゲノム解析 (DNA の網羅的解析) が可能であることを紹介している。さらに、マニュアル 6 は、土壌微生物を一度に解析できるマイクロアレイ技術の紹介である。土壌微生物の配列解析データ (9,920 本) を用いて、eDNA 解析用のプローブ配列を設計し、1,081 種類の土壌微生物解析用プローブの設計に成功した。これにより、3,836 種類の微生物の解析が可能となった。マイクロアレイには、DGGE ではすぐに評価できない「細菌の種類」を評価できる利点がある (久原, 2009)。なお、eDDASs には、マイクロアレイ解析データも登録することができ、かつ膨大なマイクロアレイデータを比較できるプログラムを搭載している。マニュアル 7 では、マニュアルを用いて回収した土壌 DNA の利用法の一つとして、トマト萎凋病菌の、分化型レベル、レースレベルを検出する PCR 技術を開発している (対馬, 2010 a)。

II PCR-DGGE 法による土壌診断

まず、PCR-DGGE の利点、弱点を知ったうえで、土壌診断にどのように役立つかを考える必要がある。PCR-DGGE は、図-1 に示すように、DNA バンドの多型が見られるというものである。長所としては、ア)

DNA バンドのパターン（多様性）を評価することができる、イ）培地法を経ないので「培養できない微生物」も評価できる、ウ）必要なら DNA バンドを切り出して塩基配列を決定することができる（その分さらにコストがかかる）、エ）試薬代だけであれば 2,000 円弱であり比較的安価である（森本，2010），ことがあげられる。

逆に、弱点は、ア）塩基配列情報は得られない、イ）DNA バンドの泳動位置がゲル間で異なるため、ゲル間で DNA パターンを比較することはできない、等である。

これまでのプロジェクトの成果を見ると、PCR-DGGE 法の利用場面としては、ア）ある処理（土壤消毒、有機物、緑肥、連作等）の土壤生物性に及ぼす影響を大まかに知りたい時、イ）ある現象（発病未発生圃場、発病衰退圃場等）に特定の微生物が関与しているかどうかを大まかに知りたい時、に有効であると考えられる。確かに、ある処理がどのような土壤微生物に影響を及ぼしているか見当もつかない時に、いきなり数万円以上をかけて微生物 100 個体のシーケンス情報を集めるのは現実的ではないし、いきなり特定のプライマーを用いて PCR を行っても非効率的な場合はあるであろう。

以上のことから、研究事例はまだ少ないが、少なくとも土壤診断の第 1 段階として、PCR-DGGE 解析を位置付けることは可能と考える。ここでは、プロジェクトでの成果を紹介して、今後の展開について考えたい。

（1）PCR-DGGE による土壤診断

1) PCR-DGGE で見える土壤微生物の世界

本プロジェクトでの研究から、有機物処理、化学農薬が土壤微生物相に何らかの影響を及ぼしていることが明らかになった。想像はできるが、細菌相、糸状菌相、線虫相それぞれへの影響を見ている例は希有と思われる。代表例として、ケーススタディ 6 には様々な圃場試験の結果がまとめられている（竹中，2011）。それによると、ア）ハウレンソウの連作により糸状菌の多様性が減少する傾向がある、イ）トウモロコシ畑では、細菌相は土壤の種類に、糸状菌相は有機物の種類に影響を受ける、ウ）水田では、細菌相・糸状菌相ともにどの地域でも類似していたが、転換畑では大きく変化した、等である。こうした現象にどの程度普遍性があり、それらをどのように土壤診断に役立てるのかについては、さらなる検討が必要であるものの、培養できない微生物を含めて、細菌相や糸状菌相の変動を迅速、簡単に評価できるようになったことで研究が飛躍的に進むことは間違いないであろう。

2) PCR-DGGE による土壤診断、特に土壤病害について

本プロジェクトでも土壤病害対策として、前述のアプ

ラナ科野菜根こぶ病、トマト褐色根腐病の他にも興味深い成果がでている。長野県では、セルリー萎黄病の土壤消毒処理後の病害発生危険度を微生物の多様性指数で推定しようと取り組んでいる（藤永，2011）。また、岐阜大学では土壤病害の衰退機能の解析（百町，2011）に PCR-DGGE 法を活用しているため、以下に紹介する。

長野県では、土壤消毒したセルリー圃場で、しばしばフザリウム病が多発する現象が見られた。藤永らは、この現象に土壤中の微生物相の変化が関与しているのではないかと考え、様々な圃場で PCR-DGGE 解析をした。その結果、土壤消毒後の土壤の「発病しやすさ」を土壤微生物相の変化で捉えることができた。このことから、この診断法は、土壤消毒処理した圃場での作付前の病害対策作りに役立つと考えている。

また、岐阜大学では、発病抑制土壤における病害衰退機構を診断した結果、ある種の糸状菌（*Trichoderma* 属菌）のバンドが発病抑制性の指標になる可能性を見つけた。この結果から、百町らは、特徴的な DNA バンドを指標とすることで、土壤の発病抑制ポテンシャルを評価できるようになれば土壤消毒剤投入を減らすことに役立つのではないかと考えている。

以上の例をみると、藤永らは PCR-DGGE を土壤微生物の「多様性指数」を指標として用い、百町らは「特定の DNA バンド」を指標として活用している。このように、PCR-DGGE には限られた機能しかないものの、病害の防除対策に役立つ土壤診断技術になる可能性はあると考えている。

（2）今後の展開

「eDNA プロジェクト」で得られた成果を紹介してきたが、土壤 eDNA で農耕地の土壤生物相を評価するという国内最初の取り組みとしては、一定の成果は出てきていると感じている。しかし、その一方で、今後の普及に向けて今まで以上に様々な取り組みが必要であるとも考えている。以下に感じた点を紹介する。

1) 多くの情報（データ）を利用する研究スタイルへの転換

eDDASs は、今までなら一人の研究者が利用した後は捨っていた情報を、「蓄積して誰でもが利用できるようにする」ために開発された。土壤環境という複雑な系を相手にしたときに多くの情報が必要になるのは当然であり、かつコストと労力をそれなりにかけて得られた貴重な情報を活用しない手はないと考えて作られたものである。しかし、多くの研究者はいまだに他人の情報を用いて研究に役立てるということには抵抗があるように思う。したがって、eDDASs が生産現場などで利用される

かどうかは単に技術的な問題だけでなく、このような新しいシステム（他人の情報を使う）に慣れてもらうことが重要だと考えている。そのため情報発信側としては、データベースの利用事例も蓄積して公開したり、普及活動が必要だと考える。データベースの情報だけで論文を書いて投稿してもらうことも考えている。このことは、情報が信頼できるものであることを世間にアピールすることになるからである。

2) 膨大な情報を活用するためのシステムの必要性

どんなに多くのデータがあってもその情報が利用されなければ意味がない。したがって、情報発信者側にとっては、ユーザーが利用したくなる情報をいかにして提供することができるか検討する必要がある。さらに、システムの構築にあたっては、今や、高額なシステムを作っただけでデータを集める時代ではないようである。最近、よく耳にしている「クラウド」化などがそれに相当するが、いずれにしても、「利用しやすさ」と「コスト」に合ったシステムを研究機関の規模や社会状況に応じて臨機に構築することが求められている。eDDASも「情報は多く」、しかし「検索画面はシンプルに」、「多様なユーザーのニーズに対応した表示画面を」等を目指しかけて今後も必要に応じて改変する予定である。

一方、ユーザー側にとっては、どんなに情報が多くても、データを解析する手法や解析した結果を理解できないと情報をうまく活用したとは言えないであろう。そのため、ユーザー側も、様々な統計学的手法や、メタ解析等聞き慣れない新しい解析手法についても今後はある程度理解できるようになることが必要になっていると感じている。本プロジェクトでも、「正準対応分析」（鈴木・竹中, 2009）、「回帰木解析」（包・對馬, 2009）の紹介をしており、さらに多くの統計学的分析について慣れる必要があるであろう。

PCR-DGGEという技術に対しては、しばしば「塩基配列情報を蓄積できる技術のほうがよい、なぜなら情報がより多いから」、などの様々なご意見をいただいている。本プロジェクトでも基幹技術としてどの技術を活用するか議論しており、その結果、コスト、利用しやすさから総合的に判断してPCR-DGGEを用いることにした。eDDAS自体は、どのようなDNA情報でも将来蓄積できるように計画しているが、技術の活用・普及に関しては、やはり、単に機能面を強調するだけでなく、コスト、機能、利用しやすさ、普及しやすさ、生産現場のニーズ等を総合的に判断する必要がある。むしろ安価で情報が少ないもののほうがユーザーにとっては活用しや

すい場合もあるであろう。このように考えると、各技術にあった利用場面を発信者、ユーザーが一緒になって探し出すシステムの構築も必要ではないかと考える。

おわりに

最近、イノベーション（技術革新）という言葉をよく聞く。その理由としては、いろいろな分野で、技術の行き詰まりを感じているから出てきているようであるが、土壤病害診断にもイノベーションを目指す取り組みがあってもよいのではないかと考える。

ここで紹介した「全国の農耕地を評価できる標準化した土壤DNA診断技術の開発とデータベース化」はまさに技術あるいはシステムのイノベーションといえるかもしれない。しかし、土壤微生物解析技術が開発されたからといっても、ただちに土壤診断ができるわけではない。事例で紹介したように、土壤病害に関して言えば、病害の発生に関与する微生物情報（指標）が見つかって初めて役立つことができるわけである。しかし、それでもまだ足りないであろう。一口に土壤病害診断と言っても目的によって用いる技術は異なるし、そもそもどのような土壤診断方法が目的とする病害対策に役立つか前例は必ずしもないからである。したがって、技術開発にあたっては、「土壤診断の考え方や戦略」を明確にする必要があると考える。「土壤病害の発生は予測できない」「土壤生物性といっても畑のごく一部を調べているだけである」「誰が、いつ、どこで診断するのか」等々様々な意見が予想されるが、それらをどのように克服して土壤病害診断技術にすることができるかを考えていくことが必要である。ここにも個別技術ではなく、「戦略」のイノベーションが必要と考える。

引用文献

- 1) 包 智華, 對馬誠也 (2009): 土と微生物 63: 39 ~ 43.
- 2) 藤永真史 (2011): 革新的な土壤微生物相解析マニュアル, ケーススタディ 4, 農環研, つくば.
- 3) 百町満朗 (2011): 同上, ケーススタディ 3, 農環研, つくば.
- 4) 久原 哲 (2009): 土と微生物 63: 74 ~ 77.
- 5) 松下裕子ら (2010): 同上 64: 107 ~ 112.
- 6) 森本 晶・星野 (高田) 裕子 (2008): 土と微生物 62: 63 ~ 68.
- 7) 森本 晶 (2010): 「eDNAプロジェクト」技術説明会講演要旨, p. 11 ~ 21.
- 8) 農業環境技術研究所 (2011): 革新的な土壤微生物相解析マニュアル 1. 技術マニュアル Ver1.0 (詳細解説版).
- 9) ——— (2011): 同上. 技術マニュアル Ver1.0, 2. ケーススタディ Ver1.0, 3. 研究者用マニュアル Ver1.0 (ダイジェスト版).
- 10) 大場広輔・岡田浩明 (2008): 土と微生物 62: 69 ~ 74.
- 11) 鈴木千夏・竹中 眞 (2009): 同上 63: 32 ~ 38.
- 12) 竹中 眞 (2011): 革新的な土壤微生物相解析マニュアル, ケーススタディ 6, 農環研, つくば.
- 13) 對馬誠也 (2010 a): 植物防疫 64: 149 ~ 155.
- 14) ——— (2010 b): 土と微生物 64: 64 ~ 69.