

eDNA を活用した効率的かつ高精度な土壌診断技術  
～土壌 DNA の解析によって土壌の微生物相を評価する～

農業環境技術研究所  
農業環境インベントリーセンター長  
對馬誠也

はじめに

地力確保、連作障害等の病害を克服して安定生産を行うためには、土壌の物理性、化学性、生物性を適切に把握する必要があるが、土壌の物理性、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。

土壌微生物性の評価法が開発が遅れている理由としては、「培養法」では、土壌微生物全体を評価できないことや、土壌生物性の解析に時間がかかり研究者一人で解析できる量が少なく複雑な土壌生態系の解析が難しいことなどがある。前者については、「培養法」で土壌から分離できる微生物は極わずかであるといわれ、膨大な数の「培養不可能な細菌」を含めた土壌の全微生物を評価することは難しいため、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。また後者の場合、他の研究者が収集した土壌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、平成18年に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5年計画でスタートし、今年最終年になった（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)）。ここでは、本プロジェクトの紹介と取り組みの現状を紹介する。

## 1. 3つの大課題

本プロジェクトは大課題1, 2, 3からなり、大課題1では土壌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壌DNA解析結果の関係等を調べ、作物生育、病害発生（あるいは抑制）など、新しい「指標」作りを目指している。大課題3では、大課題2の課題担当者が収集した土壌情報を蓄積して活用できる農耕地eDNAデータベース（eDDASs）の構築を目指している。

### 1) 大課題1：「土壌DNA等を用いた土壌生物相の解析手法の開発」

#### (1) 基幹技術PCR-DGGEによる多様性解析マニュアルの作成

ここでは、低コスト、簡易な土壌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とすることにし、最初の2年間でその利用マニュアルを作成することに成功した。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。しかし、その一方で、この DGGE 法は、ゲル毎にバンドの移動度が異なるのでゲル間の比較が簡単にできない、などのいくつかの問題があった。そこで、本プロジェクトでは、全ての 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、かつ統一した手法の開発を行った。

## (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、土壤からの RNA の抽出法の開発も行っている。

### 2) 大課題 2 : 「作物生産と土壤生物相の関連性の解析及び土壤生物の多様性評価手法の開発」

ここでは、肥培管理サブチームと土壤病害サブチームの 2 つのチームがあり、肥培管理サブチームでは、野菜畑、普通畑、水田の土壤生物相について土壤の DNA 及び諸性質や作物収量等について調査している。

土壤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壤病害に焦点を当て、土壤中の細菌、糸状菌、線虫相と病害発生との関係を調べている。

### 3) 大課題 3 : 「土壤 DNA 情報のデータベース化及び利用技術開発」(図 1)

ここでは、PCR-DGGE 解析情報などの生物性も含めた各種の土壤情報を収集し、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壤情報を基に、「土壤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 種の土壤群から採取した約 2400 件のデータが蓄積されている。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。

## 3. おわりに

eDNA プロジェクトは、農耕地土壤の物理・化学性に生物性の評価を加えて、総合的な土壤診断技術を目指しているという点で革新的な試みであり、世界でも例がない。

また、多くの研究者が得た情報を共有しようとするシステムも DNA や化学物質などではあるが、土壤生物性情報に関しては極めて少ない。しかし、複雑な系の解析、研究費・人材等の有効活用を考えた場合、情報の共有は重要である。また、これまでは、多数の情報を解析する手法(統計手法など)やソフトが必ずしも充実していなかったが、最近では文献情報や生データをまとめて解析する「メタ解析」や各種のフリーソフトなども使われるようになっており、データの整理・解析が比較的容易になってきている。このため、今後はさらに情報を増やすとともに、必要に応じて「土壤図」や「気象データ」など他の分野で開発されたデータベースとの融合も進める必要があると考える。その第一歩として、本プロジェクトで取り組んでいる意義は高いと考える。

参考文献

- 1) 對馬誠也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）.植物防疫 64(3):11-17.2010(3).



図1. 農耕地 eDNA データベース (eDDASs) への登録、利用法 (流れ図)

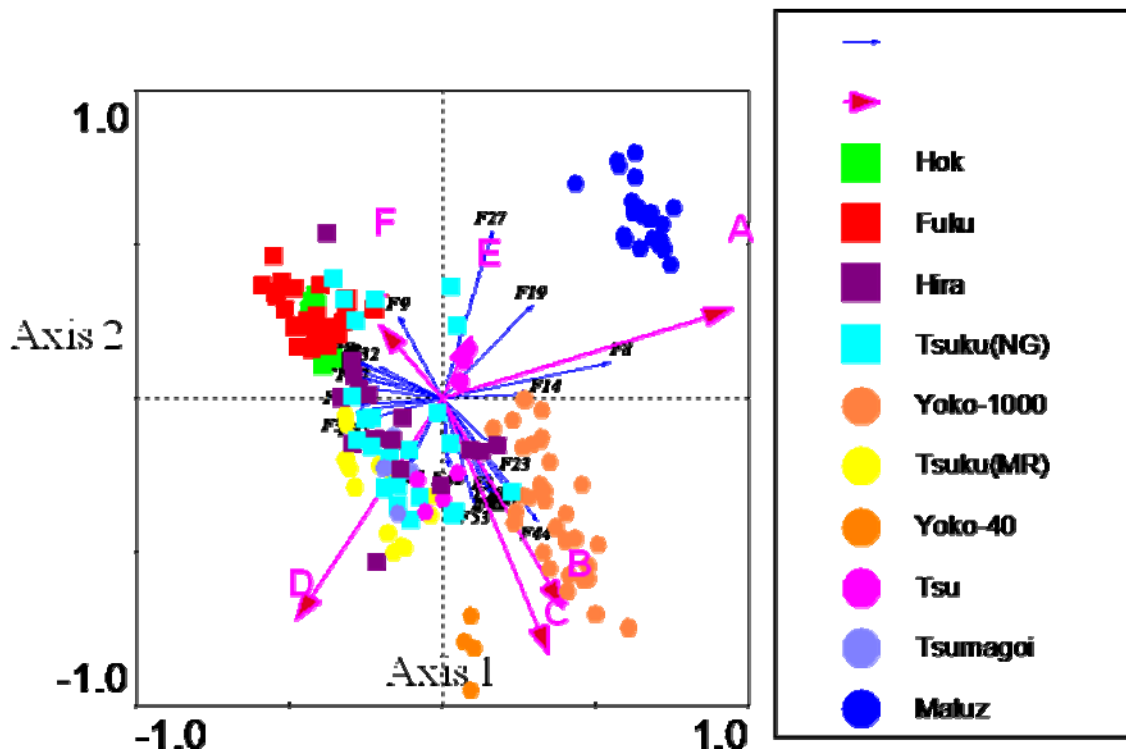


図8. 冗長分析 (Redundancy analysis : RDA) による微生物の多様性に及ぼす土壌物理・化学性の影響解析例

(解説) 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。

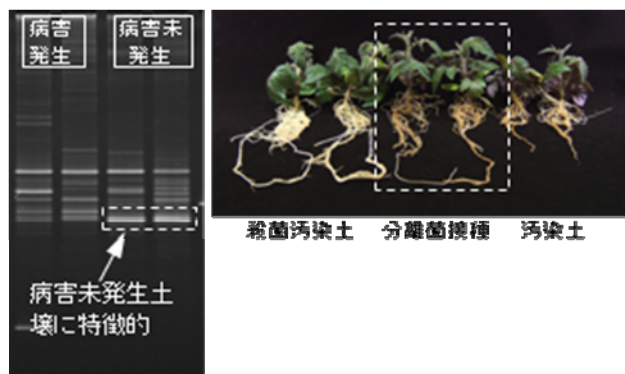


図9 トマト褐色根腐病発生圃場と未発生圃場の糸状菌相のPCR-DGGE解析(左写真)と未発生圃場特徴的バンドを示す微生物の発病抑制効果(上写真)

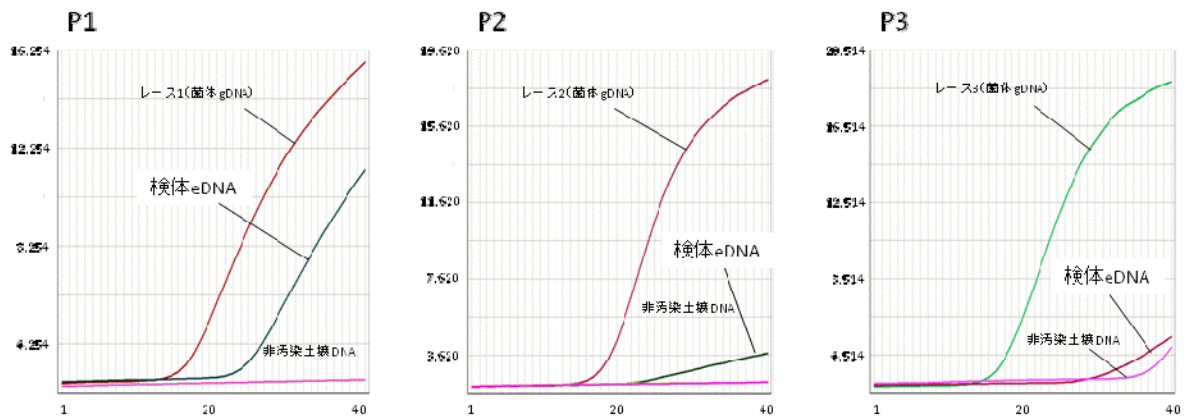


図10 トマト萎凋病発病圃場土壌から抽出したDNA(eDNA)を鋳型としたリアルタイムPCRによるレース識別事例

(解説) 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。