

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03826

研究課題名(和文)環境DNAを用いた森林葉食性昆虫の天敵微生物のモニタリング技術の開発

研究課題名(英文) Development of methodology using environmental DNA to monitor insect pathogens of forest defoliating insects

研究代表者

鎌田 直人 (Kamata, Naoto)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：90303255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：森林土壌中の菌類群集は空間変異が大きい。昆虫病原性糸状菌類は森林昆虫の重要な天敵を含むが、多くが土壌中に生息しており大発生時を除くと情報が少ない。環境DNAの手法を用いて、土壌中の昆虫病原菌のモニタリング手法を開発することを目的とした。3種の手法で、土壌量をキットのレシピに合わせた0.4gと、より網羅的に菌のDNAを捕捉するために土壌を増やした15gからDNAを抽出し、次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を行った。予想に反して、抽出に用いる土壌量が少ないほど菌類OTU数が多くなった。今回の結果からは、少ない土壌試料を多数サンプリングすることがベストの戦略であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目にみえない土壌中に生息する菌類のモニタリング手法として環境DNAを用いた次世代シーケンサーによるアンプリコン解析の手法開発を検討した。抽出に用いる土壌量を増やすことにより菌類DNAをより網羅的に捕捉することを目指したが、予想とは逆に、少ない土壌量の方がより網羅的な抽出が可能であった。これは土壌量を増やすと腐植酸などの影響により抽出が阻害されることが原因の一つと考えられた。実際にこれまでも、同様の視点から大量の土壌を使ったDNA抽出技術の開発が行われてきたが、本研究の結果は、これらの研究に一石を投じるものである。

研究成果の概要(英文)：Spatial variation in fungal communities in forest soils is high.

Entomopathogenic fungi include important natural enemies of forest insects, but their information is limited except during outbreaks, partly because many of them live in soil. The objective of this study was to develop a method for monitoring entomopathogenic fungi in soil using environmental DNA methods. Three different methods were used to extract DNA from 0.4 g (according to a kit recipe) and 15 g (intention to collect fungal DNA more widely) of soil volume. Amplicon analysis was performed using next-generation sequencers. Contrary to expectations, the smaller the amount of soil used for extraction, the greater number of fungal OTU were detected. The results of this study indicate that the best strategy is to sample a large number of small soil samples.

研究分野：森林昆虫生態学

キーワード：昆虫病原性糸状菌 土壌DNA 環境DNA アンプリコン解析 次世代シーケンサー 菌類

1. 研究開始当初の背景

森林では、しばしば葉食性昆虫が大発生して樹木の葉を食い尽くす。葉食性昆虫の大発生を終息させる上で、糸状菌・細菌・ウイルス・原生動物などの天敵微生物が重要な役割を果たしている場合が多いことが知られている。ブナ林ではブナアオシヤチホコ(鱗翅目:シヤチホコガ科)が、約10年の周期で密度変動を繰り返し、密度のピーク時にしばしば葉を食い尽くすほどの大発生が起こる。サナギタケを主とする昆虫寄生性糸状菌類が、時間遅れをもった密度依存的死亡要因として、周期的な密度変動そのものを引き起こす駆動力になることが明らかにされている。しかし、ブナアオシヤチホコの大発生時以外のサナギタケの動態は不明な部分が多い。実際に野外の土壌サンプルを使って定量PCRを行うと、サナギタケの子実体が発生している場所でも、サナギタケを検出はできなかったが検量線の適用下限以下の密度であった。

本科研ではDNAの抽出方法に問題があると考えた。森林土壌中の腐植酸にはPCR阻害作用があるため、腐植酸の影響を取り除いたうえでDNAを抽出する必要がある。腐植酸の影響を受けにくいキットは市販されてはいるものの、培養した菌体から直接DNAを抽出した場合に比べ、同量の菌体を土壌に混ぜてからDNAの抽出を行うと抽出効率が落ちる。さらに、森林土壌中の菌類DNAは空間的異質性が高いことに知られているが、このキットで1回の抽出に使用する土壌の量は、約0.5gと少ない。水系生態系では、多量(0.1~2ℓ)の水中に含まれる環境DNAをフィルターで濾過収集して、フィルターから抽出した環境DNAを使い、メタゲノミクスによる群集解析や、定量PCRによるターゲット種の存在の検定や相対的密度推定が行われている。従来の土壌DNAの抽出では使用するサンプル量が少ない(0.5g程度、1gのことが多い)ことに問題があるものと考えた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、大量の土壌からDNAを抽出することができれば、昆虫病原菌の時間変動を分子生物学的手法で精緻に解析することが可能になるのではないかと考えた。そこで、本科研では、大量の土壌から菌類のDNAを抽出する手法の開発を目指した。

3. 研究の方法

岩手県安比高原のブナ林から採集した土壌サンプルを実験に用いた。落葉層から腐植層を取り除いたあと直径10cm、長さ10cmのコアサンプラーを使って、採集した土壌(約400g)をサンプルの単位とした。お互いに20m以上離れた4プロットのそれぞれから、互いに50cm以上離れた6サンプルを採集した。採集したサンプルは-30℃で保管したのち解析に用いた。DNAの抽出は以下の3つの方法を用いた。

- ・市販キット(NucleoSpin® Soil, MACHERY-NAGEL社, ドイツ): マニュアルにしたがって、細胞溶解ステップによって得られた上澄み約400μℓを出発材料とした。使用した土壌量は約0.4g。

- ・PAB法(Foucher et al. (2020)を改変): 各サンプルについて、約15gと約0.4gの土壌を用いた。15gの土壌の場合は、15mlの飽和リン酸塩バッファー(Na₂HPO₄; 0.12 M, pH≈8)と15分間Vortexで混合した。この混合物2mlを遠心分離し(10,000 g, 10分間)、得られた上清み400μℓを出発材料とした。0.4mgの土壌の場合は、0.4mlの飽和リン酸塩バッファーと15分間Vortexで混合したのち、遠心分離して(10,000 g, 10分間)、得られた上清み約400μℓを出発材料とした。

- ・SB法(Woodhall et al. (2012)を改変): 各サンプルについて、約15gと約0.4gの土壌を用いた。15gの土壌の場合は、溶解バッファー(120mMリン酸ナトリウムバッファーpH8、2%セトリモニウムブロミド、1.5M塩化ナトリウム)15mlおよびアンチフォームB(1ml)と15分間Vortexで混合した。この混合物2mlを遠心分離し(10,000 g, 10分間)、得られた上清み400μℓを出発材料とした。0.4mgの土壌の場合は、0.4mlの溶解バッファーと15分間Vortexで混合したのち、遠心分離して(10,000 g, 10分間)、得られた上清み約400μℓを出発材料とした。

その後は、市販キットのマニュアルに従って抽出を行った。TE抽出DNAを100μℓのSEバッファーで溶かし、PCR(ポリメラーゼ鎖反応)テンプレートとして使用した。使用したプライマーは菌類のユニバーサルプライマーであるgITS7(F)とITS4ngs(R)である。1st PCRののち電気泳動により増幅を確認し、磁気ビーズ精製を行った。その後2nd PCRを経て、濃度調整した試料を、MiSEQ(Illumina社, USA)による次世代シーケンスにより、塩基情報を解読した。次世代シーケンスは業者に委託した。

得られたショートシーケンスデータはFastQC(Andrews 2010)によって品質チェックを行ったあと、PIPIITSパイプライン(Gweon et al. 2015)によりアンプリコン解析を行った。菌類の機能群解析にはFUNGuild(Nguyen 2016)を用いた。

市販キット(土壌量0.4g)、PAB法(同15g)、SB法(同15g)については、4つのプロット(A~D)の4サンプル(1~4)、合計16サンプル(A-1~D-4)について解析を行った。すべての解析には、R version 4.3.0(R Core Team 2023)のライブラリーvegan(Oksanen et al. 2022)を用いた。最初に、最もリード数の少なかった結果に合わせて、希薄化による

リサンプリングを行い、リード数を揃えたのち、OTU 数、Shanon の多様度指数を計算した。PERMANOVA を使って、抽出手法とプロット、サンプルが菌類群集構造に及ぼす影響を調べるとともに、NMDS によって群集を 2 次元座標にプロットした。群集間の距離には Bray-Curtis の非類似度指数を用いた。これら一連の解析を、全 OTU と総リード数の 2% 以上のリード数があった主要 OTU に対して行った。主要 OTU についてはリード数の比較も行った。多様度指数の加法分解を全 OTU に対してのみ行った。また、手法間の比較をするためには、すべての手法をまとめてリサンプリングするよりも、手法ごとにリサンプリングするのが適切とも考えられたことから、手法ごとにリサンプリングを行い、上記すべての解析に加えて、リード数の比較を行った。

次に、異なる量の土壌（同 0.4g、15g）を使って、同一の土壌サンプル（4 番目のプロットの 6 番目のサンプル、番号 D-6）から、PAB 法と SB 法で抽出した DNA サンプル間の比較を行った。まとめてリサンプリングした場合と、手法と使用土壌量で分けた 4 つのグループごとにリサンプリングした場合について、多様度指数の加法分解を除くすべての解析を行った。

4. 研究成果

4 プロットから 4 サンプルずつ、合計 16 サンプルから 3 つの手法で抽出したシーケンス結果をまとめてリサンプリングした結果、SB 法で抽出が劣る傾向が認められた（図-1）。すなわち、ほかの 2 つの方法に比較して、SB 法では全 OTU 数が少なく、シャノンの多様度指数も小さかった。しかし、主要 OTU に限ると、これらの違いは認められず、リード数は SB 法の方がほかの 2 つの方法よりも多くなり、主要 OTU 数とシャノンに関しては方法間で差が認められなかった。これらの結果から、ほかの 2 つの方法に比べ、SB 法ではマイナー種の抽出に難があるものと考えられた。

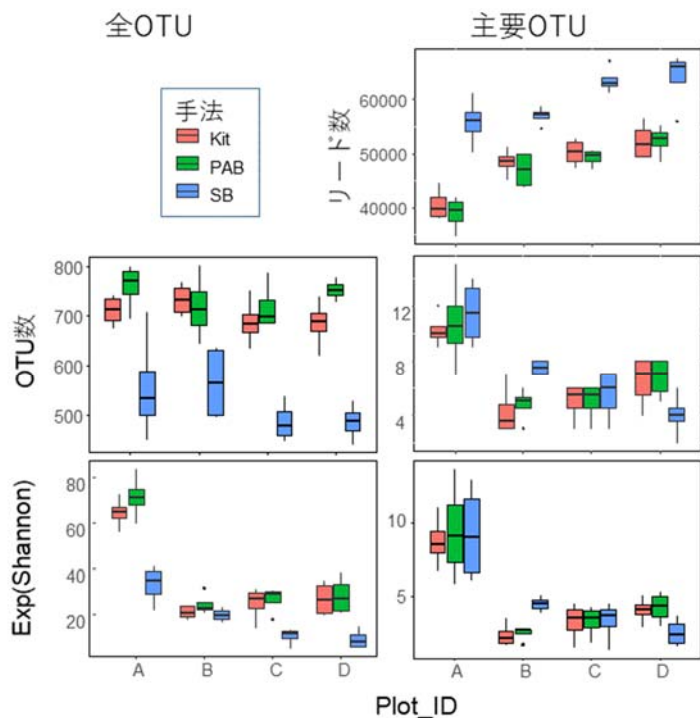


図-1 3つの手法によって抽出された全 OTU と主要 OTU の OTU 数とシャノンの多様度指数 (exp 値)。主要 OTU に関してはリード数も示した。

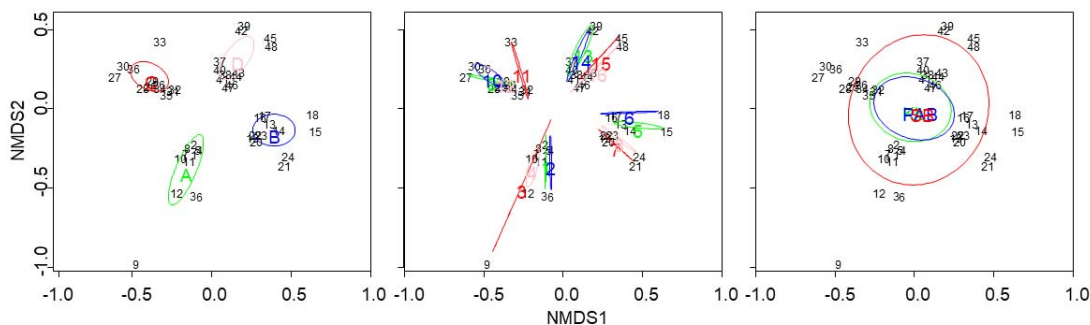


図-2 NMDS による OTU 群集の類似度

菌類の群集構造はプロット、サンプル、手法のすべての影響が認められた (PERMANOVA, $p < 0.05$)。NMDS の結果、サンプルごとの 95% 楕円の重なりが小さく、また各プロットのサンプルがまとまっ

てプロットされており、土壌菌類群集の空間変異の明確な階層構造が認められた (図-2)。また、キットと PAB 法の 95% の楕円がほぼ一致したのに対して、SB 法のみ大きく異なっていたことも、SB 法の抽出結果がほかの 2 つと異なっていたことに起因したものと考えられた。しかし、各方法で検出された OTU の分類群や機能群を精査すると、キットと PAB 法の間でもいずれかに偏っている OTU がみられ、分類群・機能群によっては方法間で有意差が認められたものも多数みられた (結果省略)。以上の結果は、手法ごとにリサンプリングを行った場合でも同じであった。

しかし、多様性指数は、まとめてリサンプリングした場合と、手法ごとにリサンプリングした場合で結果が大きく異なった (表-1)。SB 法では、ほかの 2 つの手法に比べておしなべて多様性が低かった。手法ごとにリサンプリングを行った場合では、キットと PAB 法の結果はほぼ同じであったのに対して、まとめてリサンプリングした場合、キットでは α 多様性 (サンプル間の多様性: $\alpha 1$) が PAB 法よりも大きく、プロット内の β 多様性の値が極めて小さかった。この結果はキットの結果は、プロット内のサンプル感の変異が小さかったことを示しているが、この原因として、実際にプロット内サンプル間の変異が小さい可能性と、キットがプロット間の変異を解析できていない可能性が考えられた。群集の類似度に関係した解析では、結果がリサンプリングの単位にあまり影響を受けなかったのに対して、多様性指数が強い影響を受けたことは、結果の頑健さ (robustness) とも関係して今後さらなる検討が必要と考えられた。

次に、サンプル D-6 を使って、PAB 法と SB 法で、それぞれ 0.4g と 15g の土壌を用いて抽出した結果を示す。最初の結果同様に、リサンプリングの単位によって結果は影響受けなかったため、まとめてリサンプリングして解析した結果のみを示す。一つの土壌サンプルからのサブサンプルであるため同じ菌類群集を解析しているという前提があり、実際に、同じ手法・同じ土壌量の 2 回の繰り返しの間では、群集構造はほぼ一致した。また、解析する土壌量を増やすことによって、マイナー種をより広く網羅できることを期待していたのにもかかわらず、予想と逆の結果が得られた。すなわち、OTU 数もシャノンの多様性指数も、土壌量 0.4g 抽出の方が、15g 抽出よりも大きい値を示した。加えて、土壌量 15g では SB 法では PAB 法よりも小さな値を示し、上記の結果と一致する結果が得られたが、土壌量 0.4g では、SB 法の方が PAB 法よりも多様性が高くなった。最初の実験でキットの α 多様性が高くなった原因も、土壌量がキットのみ 0.4g であったことが関係している可能性も考えられた。

表-1 リサンプリングの単位の違いが、多様性の階層構造に及ぼす影響

	γ	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\alpha 1$
(まとめてリサンプリング)					
KIT	4.552	0.778	3.774	0.058	3.716
PAB	4.581	0.737	3.844	0.793	3.051
SB	4.037	0.934	3.103	0.256	2.847
(手法ごとにリサンプリング)					
KIT	4.553	0.777	3.775	0.361	3.415
RAB	4.581	0.737	3.844	0.345	3.499
SB	4.038	0.934	3.104	0.401	2.703

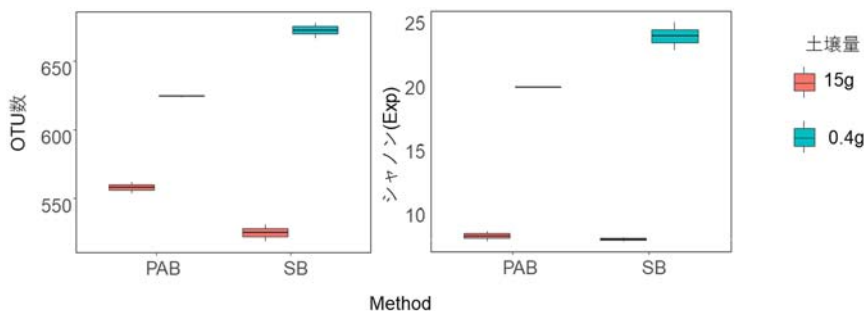


図-3 PAB 法と SB 法において土壌量が週出された DNA の多様性に及ぼす影響

本研究の結果から、現時点で開発済みの手法を使う限りは、少ない土壌の数多くのサンプルから DNA の抽出を行うのが好ましいことが示された。

引用文献

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Foucher, A., Evrard, O., Ficot, G.F. et al. (2020) Persistence of environmental DNA in cultivated soils: implication of this memory effect for reconstructing the dynamics of land use and cover changes. Sci Rep 10, 10502. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67452-1>

Gweon, H.S., Oliver, A., Taylor, J. et al. (2015), PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing

platform. *Methods Ecol Evol*, 6: 973–980. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12399>

Oksanen J., Simpson G., Blanchet F. et al. (2022) `_vegan: Community Ecology Package_`. R package version 2.6-4, <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

R Core Team (2023). `_R: A Language and Environment for Statistical Computing_`. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

Woodhall, J.W., Webb, K.M., Giltrap, P.M. et al. (2012) A new large scale soil DNA extraction procedure and real-time PCR assay for the detection of *Sclerotium cepivorum* in soil. *Eur J Plant Pathol* 134, 467-473. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0025-2>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 鎌田直人	4. 巻 140
2. 論文標題 東京大学北海道演習林における樹木のフェノロジーデータで元データが紛失した1938～1950年の期間平均値の推定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東京大学演習林報告	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 鎌田直人・木村徳志・井口和信・福岡 哲・小川 瞳・笠原久臣・芝野伸策・高橋康夫・犬飼雅子・佐々木忠兵衛・功力六郎・佐々木与八	4. 巻 61
2. 論文標題 東京大学北海道演習林における1930～2010年の長期樹木フェノロジーデータ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 演習林（東大）	6. 最初と最後の頁 45-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 鎌田直人	4. 巻 57(8)
2. 論文標題 昆虫の密度変動機構と 大発生分類	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 2-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鎌田直人	4. 巻 57(8)
2. 論文標題 ブナアオシャチホコの周期的大発生	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野中佳祐
2. 発表標題 産地試験を用いたブナとブナカイガラタマバエ とのフェノロジカルカスケード
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoto KAMATA
2. 発表標題 Long-term forest insect research using litter traps: treasures in litter
3. 学会等名 The 9th Symposium of Asian University Forest Consortium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小池孝良・塩尻かおり・中村誠宏・鎌田直人編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 253
3. 書名 木本植物の被食防衛	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平尾 聡秀 (Hirao Toshihide) (90598210)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------