

研究種目：若手研究スタートアップ

研究期間：2008 年度～2009 年度

課題番号：20880007

研究課題名（和文）

土壌 RNA の直接抽出法開発および解析による微生物の土壌有機物分解過程の解明

研究課題名（英文） The development of direct extraction method of RNA from soils and analysis of decomposition of soil organic matter by microorganisms.

研究代表者 頼 泰樹 (RAI HIROKI)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30503099

研究成果の概要(和文): 火山灰土壌を含む様々なタイプの土壌から RNA を直接抽出できる方法を開発した。また RT-PCR などの解析に適応した高純度な RNA の精製法も確立した。この土壌 RNA の抽出法を用いて有機物添加後の土壌から rRNA を抽出、解析することにより土壌中での有機物分解微生物群集を解析することが可能となった。

研究成果の概要(英文): We developed a new method of direct extraction of RNA from various types of soils including of volcanic ash soils. And a purification method of extracted RNA from soils was also developed. We tried to analyze rRNA for determination of the community structure of soil microorganisms which were concerned with decomposition of added organic matter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,180,000	354,000	1,534,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：土壌微生物学、植物栄養学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌 RNA、土壌微生物、群集構造解析、火山灰土壌

1. 研究開始当初の背景

土壌有機物は作物への養分供給源としてだけでなく、土壌の理化学性の維持にも大きな役割を果たしている「地力の源」であり、作物生産上極めて重要なものである。また地球環境から見ても、土壌有機物は地球の生態系における有機物循環の中で最大のプールでもある。陸域の炭素循環において土壌有機物が持つ炭素は 2400Gt に達しており、植物バイオマスの 550Gt に対し約 4 倍の膨大な炭素が土壌有機物として存在している。

土壌有機物は大きく分けると、分解され作物に養分を供給する易分解性のものと、腐植をはじめとする比較的安定な難分解性のもの

の 2 つに分けられる。後者の腐植は土壌の保水性、団粒構造などの物理性や、養分の保持能などの土壌の化学性に特に大きな役割を果たしており、農耕地の作物生産において極めて重要である。腐植についての研究は、主に欧米を中心に腐植を多量に含む黒土の人工造成を目指してドイツやロシアで盛んに研究されたが、未だ土壌学における未解明の大きな課題の一つである。関東ローム層にみられる火山灰土壌は世界でも有数の有機物集積土壌であることから、日本では火山灰土壌の研究を中心として腐植の生成機構について研究されてきたが、未だその実態は明らかにされていない。一般に腐植生成には土

壤微生物による分解過程が大きく関与していることが知られているが、土壤微生物は極めて多様であり、また実にその90%以上が培養できないもしくは極めて難培養性でそのほとんどが未知であることがこれまで研究の大きな妨げとなってきた。土壤中にどのような微生物がいるか(群集構造解析)については、DNAなどのバイオマーカーを解析する研究により知見が得られ始めているが、土壤中での微生物の活性、機能、有機物の分解酵素、代謝経路などの、腐植生成につながる土壤微生物の分解経路についてはほとんど明らかにされておらず、さらに踏み込んだ手法の開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究の最終的なゴールとしては土壤の粘土や非晶質アルミニウムなどの無機成分が土壤微生物の有機物分解に与える影響を明らかにし、火山灰土壤の腐植集積のメカニズムの解明することを目指している。本研究ではまずは未だ開発されていない土壤(火山灰土壤を含む)からの土壤RNA抽出法の開発とそれを用いた有機物分解を担っている微生物の群集解析と機能解析を試みた。

3. 研究の方法

土壤からのRNA抽出法の確立

化学的に不安定なRNAはDNAよりはるかに分解されやすく、微生物が死滅すると速やかに土壤から消失するため、RNAの解析結果はDNAの解析結果よりも生きている微生物を正確に反映すると考えられており、rRNAの解析で活動している微生物の群集構造解析が可能となる。また土壤中で発現している遺伝子の追跡をmRNAの解析で行えば、生物の存在、多様性の評価だけではなく、微生物群集が発揮している機能を評価することも可能になる。火山国であるわが国にはリン酸およびリン化合物を特異的に強力に吸着する火山灰土壤が北海道、東北、関東地方を中心として広範囲にわたって分布している。先にも述べたとおり、火山灰土壤はリン化合物である核酸を強力に吸着するため、土壤からの核酸抽出は従来の方法では非常に困難である。土壤DNAについては高濃度のEDTAとリン酸を抽出液に添加することで抽出可能となったが、DNAとRNAを比較するとRNAのほうがより強力に火山灰土壤に吸着されており、DNA抽出液ではRNAは抽出できていない。またRNAは高い塩濃度の溶液中では沈殿してしまう性質があるため、抽出はより困難であり、RNAを高収量で直接抽出可能な方法は未だ開発されていない。そのため本研究ではEDTA、リン酸よりも強力なアロフェンのマス킹剤としてフッ化化合物、ケイ酸化合物を検討する。特にRNAを吸着する非晶質アルミニウムを完全に破壊除去するため、フッ化ケイ酸化合物を用いた抽出実験を行った。

抽出されたRNAの精製法の確立

土壤RNAを抽出するためには界面活性剤、リン酸やキレート剤を含む抽出液中に微生物菌体を破壊し、抽出液中に放出されたRNAを回収するが、この抽出液には腐植酸をはじめとする腐植物質も同時に抽出されてしまう。現在この精製操作は非常に煩雑で時間もコストもかかり、さらにRNAはDNAよりもはるかに分解されやすいため、より短時間で慎重な精製法を開発する必要がある。RNAは沈殿回収がLi塩などで行われており、高塩濃度でDNAより沈殿しやすい。逆にDNAより塩基部分の一つ多く水酸基を持つため低pH条件下では沈殿しにくい性質を持つ。この性質を利用し、具体的には腐植の除去剤としてCTABを抽出液に添加し、pH4.0~6.0のCH₃COONaを添加し、腐植の除去率、RNAの回収率が高くなるpH、塩濃度条件を検討する。RNAの回収には通常LiClやアルコールが用いられるが、本研究では高濃度のLiClとPEGを検討した。

土壤RNAの抽出解析による有機物分解の追跡

土壤からのRNA抽出法を用い、植物遺体から腐植へいたる有機物の分解及び腐植化過程における土壤微生物の機能に焦点を絞り、研究を進めた。腐植集積量の異なる代表的な土壤(黒ボク土壤、沖積土壤)をサンプリング、解析した結果すでに、ピロリン酸で抽出されるAl、Feと土壤に蓄積されていた土壤有機物、特に腐植との間に高い相関が認められ、これらが大きく異なる代表的な土壤12点に粗大有機物として大豆の収穫残渣の粉碎物、Yeast Extractsなどを添加しその後の分解過程の微生物相の追跡を行った。

4. 研究成果

土壤RNAの抽出法の確立

RNAの抽出については強力なアロフェンのマス킹剤としてフッ化化合物、ケイ酸化合物を検討したが、塩の形態により、抽出液pHが大きな影響を受けてしまい、RNAがアルカリ性もしくは酸性条件になると分解してしまうため、抽出はできても一部分解が見られた。そこで円の形態についても結構と重ねた結果、ケイフッ化ナトリウムの添加により分解しないRNA抽出が可能となった。

土壤RNAの精製法の確立

CTABによる腐植物質の除去を除タンパク操作時に用いることで腐植物質を減らすことができた。また、従来RNAはPEGでは沈殿せず、DNAの溶液からRNAを除くためにPEG沈殿が用いられてきた。このPEG溶液に高濃度の塩を共存させることでRNAをも沈殿回収することができ、またPEG溶液は水溶液であるためpHをコントロールすることで溶液にコンタミしてくる腐植物質を大幅に減らすことが可能となった。両者を組み合わせることで

精製法を確立した。

土壤中での有機物分解過程の追跡

土壤に有機物として、Yeast extractおよび大豆の収穫残渣を乾燥、粉碎したものを土壤に投与し、恒温、適湿条件下でインキュベートした。その土壤から経時的にRNAを抽出してDnase処理によりDNAを除去し、RNAの定量を行った結果、土壤DNAが3日目のサンプリングまでは量的には緩やかに増加するのに対し土壤RNAは24時間後には各土壤において数倍にその量が増加し、微生物の活性をより明確に解析することが可能であると考えられた。また16S rRNAによりバクテリア相解析を行った。RT-PCR後、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)により微生物の群集構造解析を行った結果、DNAを用いた解析と比較し、RNAによる解析結果では増加した微生物のバンドがより明瞭に示され、その比較により、土壤DNAの解析結果は休眠状態や非活性な微生物のバンドを多く含むのに対し、RNAを用いた解析では活性の高い微生物を的確に検出することが可能であると考えられた。mRNAについてcDNAライブラリーを作成し、各サンプルについてシーケンス解析により土質の異なる土壤における有機物分解酵素の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Hiroki Rai, Satomi Kanno, Yoshitake Hayashi, Tomoyuki Ohya, Naoto Nihei, Tomoko.M.Nakanishi

Development of real-time autoradiography system to analyze the movement of the compounds labeled by β -ray emitting nuclide in a living plant. Radioisotopes、査読有 57(5), 2008, p13-20

Hiroki Rai, Satomi Kanno, Yoshitake Hayashi, Naoto Nihei, Tomoko.M.Nakanishi

Development of a Fluorescent Microscope Combined with a Real-time Autoradiography System. Radioisotopes、査読有 57(6), 2008, p355-360

Naoto Nihei, Sayaka Masuda, Hiroki Rai, Tomoko.M.Nakanishi

Radioisotopes、査読有 57(6), 2008, p361-366

Hiroki Rai, Saki Yokoyama, Shinmei Hashimoto, Shin-ichi Nakamura and Hiroyuki Hattori

A restriction factor of direct DNA extraction from volcanic ash soils.

The proceeding 19th world congress of soil science. 査読有、2010、Accepted

S. Nakamura, N. Suzui, N. Ishioka, N. Kawachi, S. Ito, H. Rai, H. Hattori, M. Chino and S. Fujimaki

Non-invasive Imaging Of Cadmium Distribution in Intact Oilseed Rape Plants. The Proceeding of the International Plant Nutrition Colloquium 査読無、vol.16 2009、p 1181

[学会発表](計 15件)

頼 泰樹、中村進一、服部浩之

土壤からの簡易なRNA抽出・精製法 (口頭発表) 日本土壤肥料学会

2009年度京都大会(京都大学 2009.9.15)

橋本真明、本田 朋、頼 泰樹、中村進一、服部浩之

種々の堆肥施用が土壤および作物の遊離アミノ酸組成、含量に与える影響について

(口頭発表)日本土壤肥料学会

2009年度京都大会(京都大学 2009.9.16)

本田 朋、橋本真明、頼 泰樹、中村進一、服部浩之

牛糞堆肥の腐熟化における大腸菌検出と微生物相解析

(口頭発表)日本土壤肥料学会

2009年度京都大会(京都大学 2009.9.15)

浅利 南、頼 泰樹、中村進一、服部浩之
小松菜のミネラル含量の変動要因について

(口頭発表)日本土壤肥料学会

2009年度京都大会(2009.9.17)

頼 泰樹、中村進一、服部浩之

土壤からの簡易的なRNA抽出方法の開発 (口頭発表)

日本微生物生態学会 第25回広島大会

(広島大学 2009.11.21)

橋本真明、頼 泰樹、中村進一、服部浩之
種々の堆肥施用が作物の遊離アミノ酸含量に与える影響について(ポスター発表)

根の研究会 第31回根研究集会

(秋田県立大学 2009.11.21)

二瓶直登、増田さやか、頼 泰樹、中西友子
異なる根系発達を及ぼすアミノ酸の窒素利用と代謝 (ポスター発表)

根の研究会 第31回根研究集会

(秋田県立大学 2009.11.21)

中村 進一、工藤 順一、鈴木 伸郎、河地 有木、伊藤 小百合、石岡 典子、伊藤 正志、川本 朋彦、松本 真一、小玉 郁子、猪谷 富雄、

頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、藤巻 秀

ポジトロンイメージングを用いた植物の分子イメージング研究(2): イネにおけるカドミウム移行の動画像解析 - 品種間差の比較

(ポスター発表)日本分子イメージング学会 第4回総会・学術集会

(学術総合センター2009.5.14-15)

中村 進一、工藤 順一、鈴木 伸郎、河地 有

木、伊藤 小百合、石岡 典子、伊藤 正志、川本 朋彦、松本 眞一、小玉 郁子、猪谷 富雄、頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、藤巻 秀
カドミウム高蓄積イネ「長香穀」を用いたカドミウムの地上部への輸送機構の解明
(口頭発表) 日本土壤肥料学会東北支部講演会
(秋田県カレッジプラザ 2009.7.1-2)
S. Nakamura, N. Suzui, N. Ishioka, N. Kawachi, S. Ito, H. Rai, H. Hattori, M. Chino and S. Fujimaki
Non-invasive Imaging Of Cadmium Distribution In Intact Oilseed Rape Plants.
(ポスター発表) XVI International Plant Nutrition Colloquium (サクラメントコンベンションセンター USA 2009.8.26-30)
中村 進一、鈴井 伸郎、伊藤 小百合、河地 有木、石岡 典子、頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、藤巻 秀
アブラナ根におけるカドミウムの挙動に対するグルタチオンの影響(口頭発表)
日本土壤肥料学会 2009 年度京都大会
(京都大学 2009.9.17)
S. Nakamura, N. Suzui, T. Nagasaka, S. Ito, N. Kawachi, N.S. Ishioka, H. Rai, H. Hattori, M. Chino and S. Fujimaki
Glutathione, Administered to the Roots, Reduce Cd accumulation in the Shoots of Oilseed Rape Plants. (ポスター発表)
MARCO Symposium 2009 (つくば国際会議場 2009.10.5-7)
中村 進一、工藤 順一、頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、鈴井 伸郎、伊藤 小百合、河地 有木、石岡 典子、藤巻 秀、伊藤 正志、川本 朋彦、松本 眞一、小玉 郁子、猪谷 富雄
ポジトロンイメージング技術を用いたイネのカドミウムの移行・蓄積における品種間差の解析(ポスター発表) 第 4 回高崎量子応用研究シンポジウム(高崎シティギャラリー 2009.10.8-9)
中村 進一、鈴井 伸郎、長坂 俊紀、伊藤 小百合、河地 有木、石岡 典子、頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、藤巻 秀
ポジトロンイメージング技術を用いた植物体地上部へのカドミウム移行抑制の解析(ポスター発表)第 13 回放射線プロセスシンポジウム(日本未来館 2009.11.12-13)
中村 進一、鈴井 伸郎、長坂 俊紀、伊藤 小百合、河地 有木、石岡 典子、頼 泰樹、服部 浩之、茅野 充男、藤巻 秀
アブラナの根に与えたグルタチオンは植物体地上部へのカドミウムの移行と蓄積を選択的に阻害する(ポスター発表)
第 51 回日本植物生理学会年会(熊本大学 2010.3.18-21)

[図書](計 0 件)
[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

頼 泰樹 (RAI HIROKI)
秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号: 30503099

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし