

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580069
 研究課題名(和文) SIP法を用いた植物根圏における微生物-線虫群集間の相互関係解明と土壌環境指標化
 研究課題名(英文) Elucidation of bacteria and nematode community in rhizosphere interactions using stable isotope probing
 研究代表者
 境 雅夫(SAKAI MASAO)
 鹿児島大学・農学部・教授
 研究者番号：20225775

研究成果の概要(和文)：

センチュウ群の18S rDNA-ITS領域をPCR-DGGE法で解析することにより、センチュウ群集構造を種レベルで解析する方法を確立し、本手法を用いて土壌に添加した農薬がセンチュウ群集に及ぼす影響を明らかにした。さらに、MALDI-TOF MSにより測定される菌体タンパク質の質量分析パターンに基づく細菌種の同定・識別法と菌体を安定同位体¹³Cで標識して解析する新たなタンパク質SIP法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：

Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplicons of the nematode 18S rDNA-ITS region was developed and employed to investigate the effect of three different pesticides on soil nematode communities. In addition, it was found that the combination of identification of bacteria by MALDI-TOF MS and a protein-based stable isotope probing might be useful for analysis of community structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、植物栄養学・土壌学

キーワード：土壌センチュウ・土壌微生物・DGGE・rDNA

1. 研究開始当初の背景

植物根圏に生息する微生物群集は、植物根に対する直接・間接の作用により植物の生育や健全性に大きな影響を及ぼしている。したがって、この根圏微生物群を植物の生育や健全性にとって好適な状態に調節する、あるいは好適環境の指標として利用するという観点から、その多様性や群集構造（微生物群の

種の構成)に関する研究への関心は高い。しかし、どのような群集構造が植物にとって望ましい状態なのか十分には明らかでない。根圏微生物群を調節する、または環境指標として利用するためには、根圏微生物の群集構造に影響を及ぼす要因とその作用を明らかにしなければならない。

根圏微生物群に影響を及ぼす要因として

は、根圏における植物・土壌・微生物の間に存在する複雑な相互作用が考えられる。しかし、根圏微生物群に対する捕食者の影響については、これまで十分には考慮されていなかった。捕食者としては土壌中の原生動物やセンチュウが考えられる。ただし、原生動物は乾燥に耐性がないため、畑土壌では主要な捕食者ではない。畑土壌では、センチュウによる捕食の影響が主体となる。微生物を捕食するセンチュウは、動植物に寄生するセンチュウと区別するため自活性センチュウと呼ばれ、土壌中に多数生息している。また、その種類数も数百種におよぶことが知られている。さらに、根圏に生息するセンチュウの密度は、非根圏土壌よりも高いことが知られている（センチュウの根圏効果）。そこで、本研究では、植物根圏のセンチュウ群集構造に注目した。

2. 研究の目的

植物根圏に生息する微生物群集は、植物根に対する直接・間接的作用により植物の生育や健全性に大きな影響を及ぼしている。したがって、この根圏微生物群を植物の生育や健全性にとって好適な状態に調節する、あるいは好適環境の指標として利用するという観点から、その多様性や群集構造（微生物群の種の構成）に関する研究への関心は高い。そこで本研究では、根圏における微生物-センチュウ群集構造解析法の確立、新たな Stable Isotope Probing (SIP) による微生物捕食センチュウの群集構造解析法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) センチュウ群集構造の PCR-DGGE 法による解析

これまで分子生物学的手法を用いてセンチュウの群集構造解析を行う場合に用いられる PCR プライマーはセンチュウの 18S rDNA 領域を増幅させるものであり、属レベルでの解析しかできない。実際、ネコブセンチュウ主要 4 種のサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*)、キタネコブセンチュウ (*M. hapla*)、アレナリアネコブセンチュウ (*M. arenaria*)、ジャワネコブセンチュウ (*M. javanica*) の DNA 配列をアライメントしたところ、18S rDNA 領域には塩基配列の違いはほとんど見られず、その後の ITS 領域にわずかに変異がみられることがわかる。ITS 領域はリボソーム遺伝子の機能領域の間に介在する非機能領域であり、この ITS 領域に起こった変異は個体の生存には関与しないために変異が蓄積されやすく、種レベルでの系統関係推定に適していると考えられる。

そこで、ITS 領域を解析することによりセンチュウ群の種レベルでの解析を可能にする

ため、各種センチュウの 18S rDNA - ITS 領域のアライメント結果から増幅 DNA に ITS1 領域を含むプライマーを設計した。

センチュウ DNA の抽出および PCR 操作は以下のように行った。センチュウ懸濁液 100 μ l に溶解液 (20mM Tris、5mMEDTA、0.3% SDS、0.4M NaCl) 40 μ l と滅菌超純水 40 μ l、Proteinase K (20mg/ml) 20 μ l を添加し、56°C で 3 時間以上インキュベートし、これを 14000rpm で 5 分間遠心した。上澄み液を移し、95°C で 5 分間加熱処理後、再度 14000rpm で 5 分間遠心し、上澄み液の一部を PCR に用いた。

PCR は Ampdirect Plus PCR (Shimazu) を使用した。2x Amp direct Plus 25 μ l、Nova Taq Hot Start DNA Polymerase (5U/ μ l) 0.25 μ l、フォワードプライマー 2 μ l、リバースプライマー 2 μ l、サンプル DNA 1 μ l、滅菌超純水 19.75 μ l を反応液とし、95°C で 10 分、{52°C で 1 分、72°C で 1 分、94°C で 1 分} 30 cycle を行った後、1.4% アガロースゲル電気泳動にて目的 DNA の増幅を確認した。

この増幅 DNA を用いて DGGE 解析によるセンチュウ群集構造解析法の最適化を検討した。

(2) 土壌添加農薬のセンチュウ群集構造に及ぼす影響

土壌の添加された農薬がセンチュウ群に及ぼす影響について、今回開発した ITS 領域の PCR-DGGE 法により解析した。土壌添加農薬としてモスピラン、オルトラン、ネマトリンを使用した。

モスピラン粒剤の有効成分であるアセタミプリドは、ネオニコチノイド系殺虫剤であり、昆虫神経のシナプス後膜のニコチン性アセチルコリン受容体に結合し、神経の興奮とシナプス伝達の遮断を引き起こすことで殺虫活性を示す。オルトラン、ネマトリンは、有機リン剤の農薬に分類され、アセチルコリンエステラーゼの働きを阻害することにより、神経を攪乱する神経毒として作用する。また、モスピラン粒剤、オルトラン粒剤は本来、土壌に混和することにより有効成分が植物の各器官に蓄積されることで、アブラムシなど植物地上部における害虫防除に用いられる。ネマトリン粒剤は、殺センチュウ剤として植物寄生性センチュウの防除に用いられる農薬である。

最大容水量の 50% になるように水分調整した土壌サンプルに各農薬を加え混合し、25°C で培養を行った。この時、農薬は標準の最大使用量、および最小使用量を添加した。これを 7 日おきにサンプリングし、バルマン法によりセンチュウ群を回収・計数後、DNA を抽出し、PCR 増幅したものを DGGE にてセンチュウ群集構造を解析した。

PCR はプライマーセット NS7gc/Nem58Sr を

使用し、DGGE 解析は最適化した変性剤濃度勾配により行った。

(3) MALDI-TOFMS を用いた同定・識別法および安定同位体 ^{13}C 標識 (SIP)

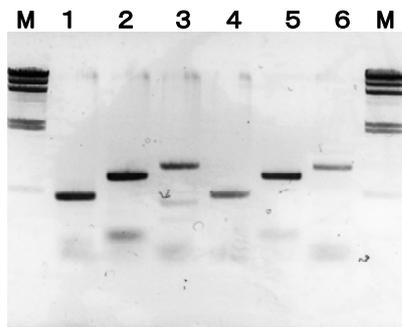
MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry) により測定される菌体タンパク質の質量分析パターンに基づく細菌の同定法が開発され、様々な細菌種に適用されている。土壌微生物の迅速な同定法としてこの解析法を利用することも期待されている。まず、土壌微生物としてダイズ根粒菌を対象に MALDI-TOF MS 法により菌株レベルでの識別・同定の可能性を調査した。ダイズ根粒菌として USDA 株 (10 菌株の *Bradyrhizobium japonicum*、3 菌株の *B. elkanii*) を用いた。ダイズ根粒菌は HM 培地で5日間培養したコロニーから菌体細胞を回収し、エタノール-ギ酸抽出法によりタンパク質を抽出した。このサンプルを MALDI-TOF MS 分析計 (autoflex speed, Bruker Daltonics) で測定した。得られた各菌株の質量スペクトルパターンからクラスター解析を行った。

次に、安定同位体 ^{13}C による標識と微生物-センチウ群集構造解析法を組み合わせた方法を確立するため、 ^{13}C グルコースを炭素源として増殖した土壌細菌の MALDI-TOF MS 法による菌体タンパク質の質量分析パターンを調査した。

4. 研究成果

(1) センチュウ群集構造の PCR-DGGE 法による解析

各種センチウの 18S rDNA - ITS 領域のアライメント結果から増幅 DNA に ITS1 領域を含むプライマーとして END18Sf/Nem58Sr、NS7/Nem58Sr、END18Sf/NemITSr の3セットを設計した。これらのプライマーセットを用いてセンチウ DNA の PCR を行った結果、END18Sf/Nem58Sr、NS7/Nem58Sr、END18Sf/NemITSr での PCR 増幅は可能であった (図1)。



1、4: END18Sf/Nem58Sr
2、5: NS7/Nem58Sr
3、6: END18Sf/NemITSr

図1. ITS領域を含むプライマーセットでのPCR

そこで、増幅率が最も良好であった NS7gc/Nem58Sr の組み合わせを用いて PCR-DGGE 解析の実験を行った。DGGE 解析条件を最適化した結果、NS7gc/Nem58Sr での PCR 増幅産物の DGGE 解析は、アクリルアミド濃度 6%、変性剤濃度勾配 25-45% が適していることを明らかにした (図2)。

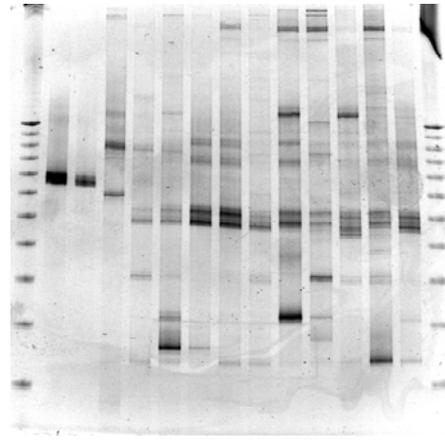


図2. センチュウ rDNA ITS 領域の PCR-DGGE 解析

(2) 土壌添加農薬のセンチウ群集構造に及ぼす影響

3 種類の農薬 (モスピラン、オルトラン、ネマトリン) をそれぞれ混和した土壌を培養し、経時的にセンチウ数を計数したところ、すべての農薬処理区においてコントロール区と比較して、培養7日目の段階でセンチウ数が減少した。その後若干増加するものもあったが、培養後期にはセンチウは減少した。

一方、これらのサンプルから抽出したセンチウ群の DNA を NS7gc/Nem58Sr で PCR 増幅し、DGGE 解析した結果、特定のバンドにおける大きな変化は認められなかった。すなわち、害虫防除に用いられる農薬が土壌センチウの数に対しては影響を及ぼすこと、これらの農薬のセンチウの種構成に対する特異性は認められないことを明らかにした。

(3) MALDI-TOFMS を用いた同定・識別法および安定同位体 ^{13}C 標識 (SIP)

ダイズ根粒菌における解析条件を最適化することにより安定して MALDI-TOF MS スペクトルを得ることができた (図3)。得られたスペクトルパターンをクラスター解析した結果、菌株レベルで識別できることが推察された (図4)。また MALDI-TOF MS による結果と ITS 領域のシーケンスによる系統解析結果を比較すると、MALDI-TOF MS 法の解像度は

同等もしくは菌株によっては優れた識別力を示すことから、ダイズ根粒菌の菌株レベルでの迅速な識別法として利用可能であることが示唆された。

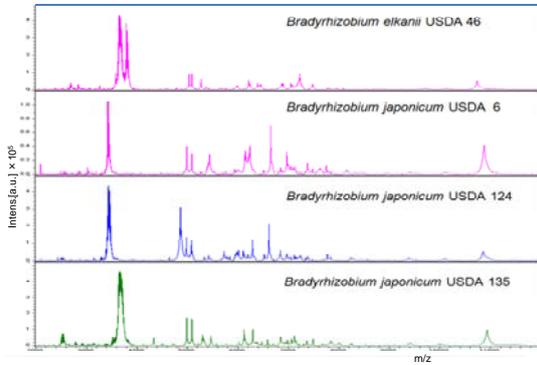


図3. MALDI-TOF MSで得られたタンパク質質量分析パターン

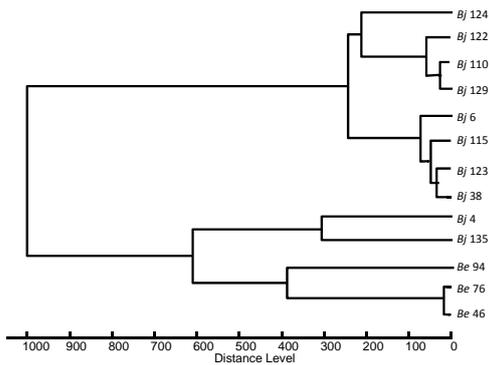


図4. MALDI-TOF MSスペクトルのクラスター解析

さらに、安定同位体 ^{13}C グルコースを炭素源として増殖した土壌細菌の菌体タンパク質の質量分析パターンをこのMALDI-TOF MS法により解析した結果、予想される菌体タンパク質の質量増加パターンが得られた(図5 a, b)。したがって、安定同位体 ^{13}C で微生物菌体を標識することが可能であり、この標識菌体を捕食したセンチウタンパク質をMALDI-TOF MS法にて解析することで、微生物捕食性センチウによる摂食を通じた炭素の流れを解明できる可能性を示すことができた。この結果は、これまでDNAやRNAを安定同位体で標識して解析するSIP法が開発されているが、これに加えて菌体タンパク質を安定同位体で標識して解析する新たなSIP法の

可能性を示した。

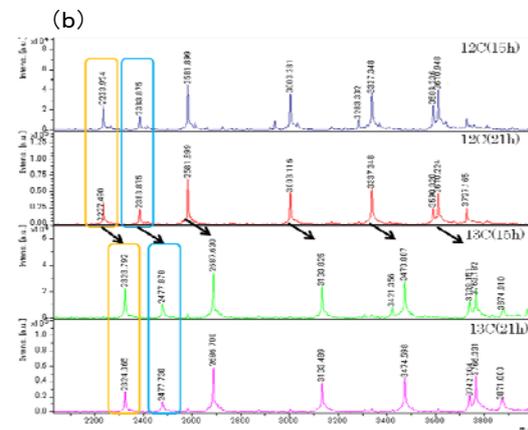
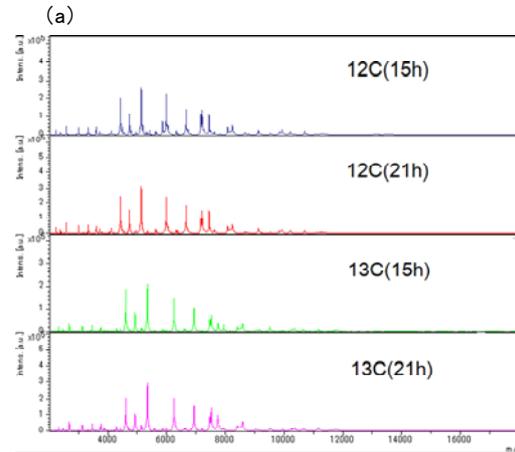


図5. ^{12}C と ^{13}C グルコースで培養した菌体のスペクトルパターン比較

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

坂上さゆみ、池永 誠、佐伯雄一、境 雅夫、MALDI-TOF MSによるダイズ根粒菌の迅速同定に関する研究、日本土壌肥料学会、2012年9月5日、鳥取大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

境 雅夫 (SAKAI MASAO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：20225775