

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24年5月31日現在

機関番号：82105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880040

研究課題名（和文） DNA定量法を用いた新たな細根バイオマス量の測定手法の開発

研究課題名（英文） Development of a new method for estimating fine root biomass from the quantity of DNA of target plant

研究代表者

鵜川 信 (UGAWA SHIN)

独立行政法人森林総合研究所・立地環境研究領域・研究員

研究者番号：30582738

研究成果の概要（和文）：土壌試料に含まれる細根のDNA量から、あらかじめ作成しておいた回帰式を用いて対象樹種の細根バイオマス量を推定する手法の実用性を評価・確保した。DNAを吸着する鹿沼土とトウモロコシの細根の混合試料から、DNAを100%に近い効率で抽出する方法を確立した。そして、改良した手法を用いて抽出したDNA量（CT値）と細根重量（対数値）との間で回帰直線が作成できることを明らかにした。また、細根量の推定誤差が、細根断片サイズに影響を受けないことを確認した。

研究成果の概要（英文）：The practical use of a new method for estimating fine root biomass of target plant from the quantity of DNA extracted from fine root mixed with soil particles was examined. A DNA extraction method was improved to obtain the optimal level of DNA extraction efficiency for *Zea mays* fine root mixed with Kanuma soil, which adsorbs DNA strongly. Using the improved DNA extraction method, a regression line between the amount of extracted DNA and fine root biomass could be obtained. Moreover, the estimation error in the method did not differ among the fraction sizes of fine roots.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,120,000	336,000	1,456,000
2011年度	590,000	177,000	767,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,710,000	513,000	2,223,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：細根バイオマス量、リアルタイム PCR、DNA 抽出効率、スキムミルク、アロフエン、単回帰分析、推定誤差

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の緩和を考える上で、森林生態系における炭素吸収機能は注目すべき項目である。炭素吸収機能を評価するためには、生態系内における炭素循環を明らかにする必要がある。

樹木の細根は、樹木の全バイオマス量の約3割を占めている。そのため、細根は、森林生態系の炭素循環に多大な影響を与える。炭素循環における細根の影響は、細根における炭素蓄積量の経時変化から導かれる。炭素蓄積量の経時変化を明らかにするためには、まず、

細根バイオマス量の経時変化（細根動態）を把握する必要がある。

細根動態を把握するためには、対象とする森林において、各時点での細根バイオマス量を測定しなければならない。ここで、研究結果の一般性を向上させるためには、高い測定精度を確保すると同時に、樹種ごとに細根バイオマス量を測定する必要がある。

現在用いられている細根バイオマス量の主な測定手法は、土壌コアサンプリング法と呼ばれるものである。この手法は、細根を含む土壌コアを採取し、そこから対象とする樹種の細根を拾い上げ、その乾燥重量（細根バイオマス量）を測定するものである。しかし、細根の形態が類似している樹種間では、視覚的に樹種判別を行うことが難しく、この問題を払拭する方法として、試料中に含まれる細根のDNA量から細根バイオマス量を推定することが提案できる。

提案する方法では、野外で採取した土壌コアからDNAを抽出し、その中に含まれる対象樹種のDNAを定量する。そして、あらかじめ作成しておいたDNA量と細根バイオマス量の回帰式から、当該樹種の細根バイオマス量を推定する。しかしながら、当該手法は、土壌中の菌類バイオマス量の測定で試みられているものの、植物の細根については未だその実用性が研究されていない。

2. 研究の目的

木本の細根には、DNAを含まない死んだ細胞（古い二次木部）が存在し、提案する手法をそのまま適用することは難しい。そこで、本研究では、提案する手法の実用化の第一歩として、草本植物における手法の実用性を評価・確保することを目標とする。細かくは、以下の3つの目的を設定する。

(1) DNA抽出効率の改善手法の確立

土壌に含まれる粘土鉱物は、DNAを吸着する。そのため、土壌中の細根では、DNAの抽出効率が十分に確保されないことが予想される。そこで、粘土鉱物によるDNA吸着の阻害剤（スキムミルク）をDNA抽出過程で添加し、100%に近い効率でDNAを抽出する手法を確立する。

(2) 細根重量とDNA量の関係解析

提案する細根バイオマス量の推定手法の実用性を評価する上で、細根重量とDNA量との回帰式の作成は必須である。そこで、細根のみの試料について、十分な精度で回帰式が作成できるか否かを確認する。また、土壌と細根の混合試料についても、改善したDNA抽出方法を用いて回帰式を作成し、細根のみの試料の回帰式との比較を行う。

(3) 推定誤差における細根断片サイズの影響評価

細根の組織ごとに、バイオマス量あたりのDNA量（DNA密度）が異なることが報告されている。一方で、試料中に様々な細根組織が含まれ、また、一度に取り扱う細根量が多ければ、DNA密度の不均一性が平均化される。そこで、DNA量における細根断片サイズの影響を、異なる細根量の試料について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細根試料および土壌試料

細根試料には、採取が容易であり、かつ、DNAの塩基配列情報が豊富なトウモロコシの細根を用いた。土壌試料には、鹿沼土を用いた。鹿沼土は、粘土鉱物であるアロフェンを50%以上含み、DNAを吸着することが報告されている。細根試料は凍結乾燥したものを、土壌試料は105°Cで乾燥後に粉末化したものを用いた。

(2) DNA抽出

DNAの抽出は、CTAB法を用いた。また、DNA抽出効率の改善を行う場合は、CTAB法の初めにスキムミルク溶液を添加した。スキムミルク溶液は、粉末状のスキムミルクに蒸留水を加え、オートクレーブ処理したものを用いた。以下にDNA抽出の詳細を示す。

対象とするサンプルが入ったマイクロチューブに、2% CTAB溶液 650 μ L とスキムミルク溶液 20 μ L を加え、攪拌したのち、65°C で1時間インキュベートした。その後、CIA溶液 740 μ L をマイクロチューブに加え、20分間攪拌したのち、20000 \times g で15分間遠心分離を行った。600 μ L の上澄み液を別のマイクロチューブに移し、そこに、CIA溶液 700 μ L を加え、20分間攪拌したのち、20000 \times g で15分間遠心分離を行った。さらに、500 μ L の上澄み溶液を別のマイクロチューブに移し、-20°C のイソプロパノール 400 μ L を加え、1分間攪拌したのち、20000 \times g で10分間遠心分離を行った。上澄み液を捨てたのち、残渣に70%エタノール 400 μ L を加え、攪拌し、さらに、20000 \times g で10分間遠心分離を行った。再度上澄み液を捨て、乾燥させた残渣を55°Cの蒸留水 100 μ L に溶解させ、DNA溶液とした。

(3) DNA定量

DNA溶液中のDNA定量には、リアルタイムPCR (LightCycler 350S; F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) を用いた。リアルタイムPCRでは、特定領域のDNA量を測定するが、本研究では、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているトウモロコシの塩基配列 (GAPHD の GapC サブユニットの

シーケンスデータ) から、トウモロコシに特異的なプライマー (5'-CTGCATTAAGGCAGTTCTATTTTAGTATA-3' および 5'-CGCGAAGTCCAGTTAAGGC-3') を設計し、これらの塩基配列に挟まれた領域について、DNA 量を定量した。DNA 量の指標値としては、CT 値 (DNA が一定量まで増幅されるまでの PCR サイクルの推定回数) を用いた。なお、当該指標値は、DNA 量が多いほど、小さい値を示す。

(4) 実験設定

研究の目的に基づき、以下の 3 つの実験を行った。

① DNA 抽出効率の改善手法の確立

粉末化した細根 0.15mg に土壤粉末 29.85mg を加えたサンプルを、39 サンプル作成した。これらを 3 サンプルずつに分け、13 段階の濃度 (0~20%) のスキムミルク溶液を加えた DNA 抽出を行い、続けて DNA の定量を行った。これらのデータから、鹿沼土による DNA 抽出効率の低下を確認するとともに、スキムミルク添加量ともなう DNA 抽出効率の改善を調べた。また、粉末化した細根 0.15mg に土壤粉末 29.85mg を加えたサンプルを、28 サンプル作成した。これらを 7 サンプルずつに分け、それぞれ 5、10、15、20% のスキムミルク溶液を加えた DNA 抽出を行い、DNA を定量した。そして、これらのスキムミルク濃度で抽出されたサンプルの CT 値と、細根のみのサンプルから抽出された CT 値との差異を Dunnett 検定で評価した。以上の結果から、DNA 抽出が 100% に近い効率で行えるスキムミルク濃度を検索した。

加えて、鹿沼土以外に、他の粘土鉱物、つまり、イライト、カオリナイト、モンモリロナイトをそれぞれ含む土壤について、スキムミルク添加による DNA 抽出効率の改善を調べた。

② 細根重量と DNA 量の関係解析

粉末化した細根について、異なる重量の 9 サンプル (0.15~2.40mg) を作成した。これらのサンプルについて、DNA の抽出および定量を行い、細根重量 (対数値) と CT 値について単回帰分析を行った。同様に、粉末化した細根について、異なる重量の 9 サンプル (0.15~2.40mg) を作成し、さらに、土壤粉末を加え、それぞれのサンプル重量を 30mg に調整した。これらのサンプルについて、スキムミルクを用いた DNA の抽出および定量を行い、細根重量 (対数値) と CT 値について単回帰分析を行うとともに、細根粉末のみのサンプルで作成された回帰直線との差異を共分散分析によって評価した。

③ 推定誤差における細根断片サイズの影響評価

凍結乾燥後の細根について、3 つの断片サイズ (粉末、1cm 断片、5cm 断片) の細根試料を作成した。そして、それぞれの断片サイズの細根について、3 つの細根重量 (0.15mg、0.60mg、2.40mg) のサンプルを 9 反復ずつ用意した。これらのサンプルについて、DNA の抽出および定量を行い、各処理区間での CT 値のばらつき (分散) の差異を、ボンフェローニ補正を用いた F 検定によって評価した。

4. 研究成果

(1) DNA 抽出効率の改善手法の確立

スキムミルクを添加しなかった場合、細根粉末 0.15mg と土壤粉末 29.85mg の混合試料では、DNA が定量できなかった。一方、スキムミルクを添加した場合は、DNA が検出され、その CT 値は、スキムミルク溶液の濃度にもなって減少し、細根粉末のみの試料における CT 値と同程度となった (図 1)。また、5、10、15、20% のいずれのスキムミルク溶液の濃度でも、得られた CT 値は、細根粉末のみの試料から得られた CT 値と有意な差がなかった ($p > 0.081$)。これらのことから、スキムミルクの添加量が多いほど、鹿沼土への DNA 吸着量が減少し、5% 以上のスキムミルク溶液を用いることで、DNA の抽出効率が 100% 近くまで改善されるを示した。加えて、イライト、カオリナイト、モンモリロナイトのそれぞれを含む土壤についても、スキムミルク添加による DNA 抽出効率の改善がみられた。

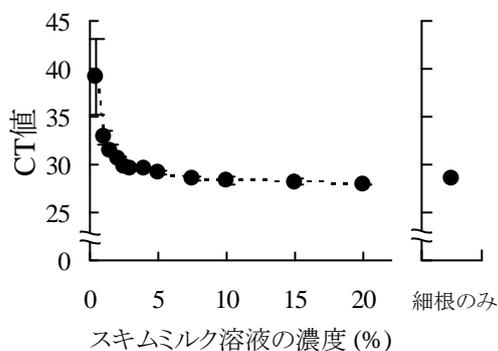


図 1 スキムミルク溶液の濃度と CT 値の関係。細根粉末 0.15mg と土壤粉末 29.85mg の混合試料を対象とした (対照は細根粉末 0.15mg のみの試料)。エラーバーは、標本標準偏差を示す。

(2) 細根重量と DNA 量の関係解析

細根粉末のみの試料において、細根重量 (対数値) と CT 値の間に有意な回帰直線を作成することができた (図 2: $p < 0.001$)。また、細根粉末と土壤粉末の混合試料について、20% スキムミルク溶液を用いた DNA 抽出を行

ったところ、細根重量（対数値）と CT 値の間に有意な回帰直線を作成することができた（図 3： $p < 0.001$ ）。さらに、細根粉末と土壌粉末の混合試料から得られた回帰直線は、細根粉末のみの試料から得られたものと有意な差がみられなかった（切片： $p = 0.204$ 、傾き： $p = 0.811$ ）。これらの結果から、DNA 量から細根重量を推定することが可能であり、土壌中の細根についても、改良した DNA 抽出手法を用いることで、細根重量と DNA 量の適正な回帰式が得られることを明らかにした。

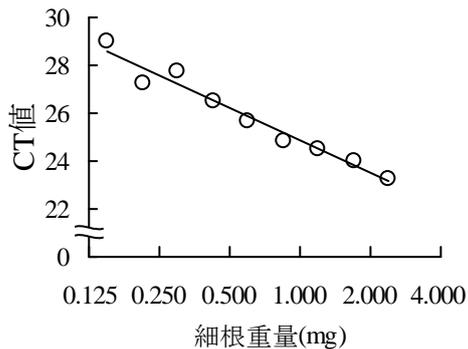


図 2 細根粉末のみの試料における細根重量と CT 値の関係。

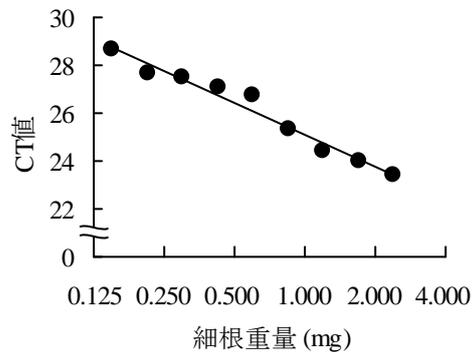


図 3 細根粉末と土壌粉末の混合試料における細根重量と CT 値の関係。

(3) 推定誤差における細根断片サイズの影響評価

各細根断片サイズ（粉末、1cm 断片、5cm 断片）の試料から得られた CT 値は図 4 のようになった。いずれの断片サイズにおいても、細根重量が低いほど、標本標準偏差が大きくなる傾向があった。しかし、9 つの処理区のいずれの組み合わせにおいても、分散における有意な差はみられなかった（ボンフェローニ補正： $p > 0.003$ ）。

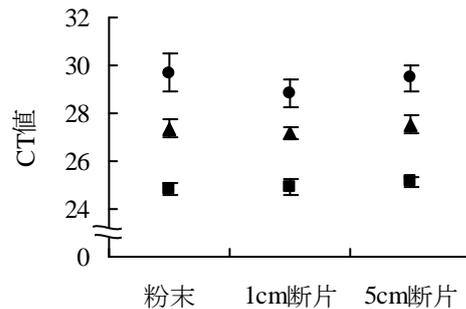


図 4 各細根断片サイズの細根試料から得られた CT 値. 黒い円形(●)は細根重量 0.15mg、黒い三角(▲)は細根重量 0.60mg、黒い四角(■)は細根重量 2.40mg の試料を示す. エラーバーは標本標準偏差を示す.

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

① 鵜川信、山口宗義、三浦覚、金子真司、DNA 定量法を用いた細根バイオマス量の測定手法の開発、日本森林学会、2012年3月27日、宇都宮大学（栃木県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜川 信 (UGAWA SHIN)

独立行政法人森林総合研究所・立地環境研究領域・研究員

研究者番号：30582738