

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380044

研究課題名(和文) DNA 分子は黒ボク土の何に吸着されるのか？

研究課題名(英文) Which of andosol's components can adsorb DNA molecules

研究代表者

佐伯 和利 (SAEKI KAZUTOSHI)

九州大学・生物環境調節センター・准教授

研究者番号：30284780

研究成果の概要(和文)： 黒ボク土からの DNA 抽出効率の向上と遺伝子組換え作物の安全性の把握の必要性から、土壌、鉱物、腐植物質への DNA の吸着を調べた。黒ボク土が、灰色低地土と赤黄色土に比べて DNA を多く吸着した。土壌有機物や酸化物を減少させて DNA 吸着量の変化を観察し、土壌構成成分の中でも、アロフェンや酸化物が DNA 吸着の主要な媒体であることが示した。黒ボク土壌と、主要粘土鉱物であるアロフェンへの DNA 吸着を、反応溶液の DNA 濃度、イオン強度、pH、リン酸イオンとの競合等の観点から調べた結果から、細胞外 DNA 分子の土壌粒子への吸着機構・様式を 3 つ想定した。

研究成果の概要(英文)： This study investigated the adsorptions of DNA molecules by real soils and variable-charged soil constituents such as goethite, allophane, and humic acids for understanding risk assessment for release of the genetically modified organisms and for development of DNA extraction efficiency from soils in the analysis of soil microbial communities using culture-independent methods. The DNA adsorption on an andosol used in this study was much larger than those on a fluvisol and an acrisol. The changes in DNA adsorptions by the decrease in organic matter and oxide minerals implied that these oxide minerals among soil constituents are one of the main media to adsorb DNA molecules in soil environments. The adsorptions of DNA by andosols and allophane were investigated as function of solution pH, ionic strength in solution and some solutes. These results suggested that there are several DNA adsorption mechanisms in soil.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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：DNA, 吸着, 黒ボク土, アロフェン, 土壌化学

1. 研究開始当初の背景

土壌 1 g 当り最大で 100 億もの微生物が存在しており、その種類は数千にも及ぶとされている。しかし、培養可能な微生物はその僅か 0.1 から 1% であることが知られており、大部分の培養できない微生物は **VBNC** (viable but nonculturable) 微生物とよばれている。これら VBNC 微生物は従来の培養法では研究できないため、土壌から直接 DNA を抽出し解析するアプローチがとられている。土壌から直接抽出した DNA を用いた VBNC 微生物の研究は、土壌中における未知の微生物の多様性と機能を理解する上で重要であると同時に、これら VBNC 微生物から新規の生理活性物質をコードした遺伝子を探索する上でも役立つことが期待できる。土壌からの DNA 抽出法は大きく分けて 2 つある。1 つ目は土壌から微生物細胞を分離した後に溶菌させるもの、2 つ目は土壌中で溶菌させ、その後土壌から DNA を抽出・精製するものである。前者は DNA の回収率が低く、また分離できる微生物群集に偏りが生じることが知られている。そこで後者の土壌中で溶菌する方法が広く用いられている。この直接抽出法で抽出された DNA は、PCR-DGGE 法などの分子生物学的手法を用いて、有用遺伝子の探索、遺伝子組み換え体や病原菌など特異的な遺伝子の追跡、環境中の微生物群集の解析に利用されている。

過去数年にわたって、土壌中で死んだ微生物から放出された核酸物質は、ヌクレアーゼによって速やかに分解されると考えられていた。しかし、最近、様々な微生物、植物から出る核酸物質は、粘土、砂、土壌粒子に吸着されることによって、ヌクレアーゼへの反応性・感受性を変えて、生分解に抵抗を示すようになると言われている。さらに言い進めると、放出された DNA 分子は、粘土鉱物や他の物質に結合することによって、コンピテント細胞を形質転換する能力を持つように

なると考えられてきた。外来遺伝子は、微生物間だけで形質転換を起こすのではなく、組み換えや複製、形質導入、転換、置換が作物と微生物の間でも起こる。プロテアーゼ阻害剤、抗生物質耐性遺伝子のような遺伝的に修飾された作物の外来遺伝子は、植物の根や腐敗した植物組織から排泄され、結果として、微生物群集を変化させ、土壌の性質を変えてしまう。また、土壌 DNA は、細菌間の遺伝的情報交換と同様に、生物学的な活性、土壌中の多様性において重要な役割を担っている。そこで、土壌中での DNA の存在状態や水平転移の頻度を明らかにしなければならない。そのためには、第一義的に、土壌構成成分への DNA 分子の吸着を把握する必要がある。土壌中の細胞外 DNA の吸着についての知識は、生物多様性の調節、GEOs の放出における危険性の査定を理解するために重要である。

1951 年に発表された J. D. Bernal の「生命起源関連高分子化合物の規則的合成に粘土鉱物が重要な役割を果たしている」という説が発端になり、核酸を含む有機分子の粘土鉱物への吸着に関する実験・研究が盛んになった(例: Greaves and Wilson, 1969; Franchi et al., 1999)。これらの研究から、粘土表面が地球での生命の化学進化にかかわっている可能性があると考えられるようになってきた(Hazen, 2001)。この研究動機のため、土壌構成成分の中で、モンモリロナイトのような層状ケイ酸塩鉱物に対する核酸物質の吸着に関する研究例が多い。

2. 研究の目的

土壌への DNA 吸着メカニズムの解析は、生物多様性の調節、GEOs の放出における危険性の査定を理解するために、また、土壌からの DNA 抽出効率を改善する研究にとって必要である。それはまた、土壌微生物における遺伝的多様性の進化・維持機構の解明研究

の発展にも役立つ。黒ボク土のような変異荷電性物質が主体の土壌を研究対象にする場合、モンモリロナイトのような層状ケイ酸塩鉱物に対する DNA 吸着の結果だけではまったく不十分である。そこで、本研究では、アロフェン質黒ボク土壌への DNA の吸着メカニズムを明らかにするために、土壌構成成分(ゲータイト、アロフェン、腐植物質といった変異荷電性物質)と DNA 吸着量との関係について調べた。

3. 研究の方法

3.1 固体試料

本研究では、主に、4つの黒ボク土試料を使用した。知覧土壌は、鹿児島県川辺郡の畑地の表層 0-10 cm より採取した多腐植厚層黒ボク土である。都城土壌は、宮崎県都城市に位置する九州沖縄農業研究センター都城支所の畑地の 0-20 cm 層のアロフェン質黒ボク土である。都城+スラリー土壌は、上記の畑地の隣の圃場で家畜糞尿スラリーを 10 a あたり 60 t 施用した。その畑地の 0-20 cm 層のアロフェン質黒ボク土である。田無土壌は、西東京市に位置する東京大学多摩農場未耕地の 0-20 cm 層のアロフェン質黒ボク土である。

アロフェンは、黒ボク土の主要な粘土成分であり、中空球状の鉱物で、その直径は 3.5~5nm である。多くの場合、凝集体を形成している。化学式 $1\sim 2\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ で表され、 $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 比は 1~2 である。本研究で、合成アロフェンと天然アロフェンを使用した。合成アロフェンは Ohashi et al. (2002) の方法で作った。組成は SiO_2 56.08 %; Al_2O_3 43.92 %で、 N_2 -BET 比表面積は $552 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ と報告されている (Ohashi et al. (2002))。天然アロフェンは、栃木県真岡で産出したものを水ひし、精製した (Matsumoto et al., 2004)、(株)品川化成から供給されたものであった。組成は SiO_2 50.0 %、 Al_2O_3 43.2 %で、 N_2 -BET 比表面積は約 $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ と(株)品川化成から報告されている。

3.2 供試 DNA

吸着実験に使用する DNA は、濃度 1 mg mL^{-1} の分子量 2000bp 以下のサーモン精子 DNA (Invitrogen 社)であった。これを純水で希釈して使用した。

3.3 吸着実験

オートクレーブ処理した固体試料に DNA 溶液を添加し、2時間振とうした。遠心分離した後、上澄み液を回収した。この手順の中で、溶液条件 (DNA 濃度, pH, イオン強度, リン酸塩共存等) を変化させ、これらの要因の DNA 吸着への影響を調べた。上澄み液中の DNA 量を Pico Green 法を用いて蛍光光度法で定量した。最初に添加した DNA 量から、回収された DNA 量を差し引くことで、試料に吸着された DNA 量を算出した。

本研究では、DNA の吸着親和性をみるために、下記の Langmuir 式から推定される最大吸着量 (A_{max}) を用いた、

$$A = \frac{k \cdot A_{\text{max}} \cdot C}{1 + k \cdot C} \quad (1)$$

A は吸着量、 k は吸着平衡定数、 C は平衡濃度を示す。式(1)を変形して、

$$\frac{C}{A} = \frac{1}{k \cdot A_{\text{max}}} + \frac{1}{A_{\text{max}}} \cdot C \quad (2)$$

式(2)に実験データを代入し、近似的に最大吸着量を算出した。

4. 研究成果

4.1 土壌への過酸化水素処理とシュウ酸処理の DNA 吸着に対する影響

土壌構成成分の DNA 吸着への寄与を探ることを目的として、土壌有機物と酸化物鉱物に焦点を当て、土壌に過酸化水素水処理とシュウ酸処理を行い、これらの物質を減少させて DNA 吸着量の変化を観察し、その寄与を考察した。本研究で用いた黒ボク土壌が、灰色低地土と赤黄色土に比べて DNA を多く吸着することが確認された。土壌から有機物を削減しても DNA 吸着量はほとんど変化しなかった。土壌有機物は DNA 吸着に関与しないことが示唆された。有機物を減少させた土壌をさらに酸性シュウ酸塩を用いて、土壌から鉄、アルミ酸化物やアロフェンなどを減少させた場合、DNA 吸着量は本来の土壌の酸化物量に関係して、減少した。土壌構成成分の中でも、非晶質鉱物であるアロフェンや酸化

物が DNA 吸着へ影響があるようだ。よって、土壌中のこれらの酸化物が DNA 吸着の主要な媒体の1つであることが示唆された。

4.2 黒ボク土への DNA 吸着に対する有機物量の影響

土壌中有機物の DNA 吸着に対する影響を、土壌に過酸化水素処理を行うことによって検証した。また、有機資材の施用によって、土壌全有機物量が増加した黒ボク土壌を用いることで、DNA 吸着に対する有機物量増加の影響を調べた。ほぼ完全に黒ボク土から有機物を取り除いた試料に対する DNA の吸着を調べるために、400 °C で加熱処理した黒ボク土壌を用いて、未処理土壌と DNA 吸着量を比較した。スラリー施用土壌の方が、未施用土壌よりもはるかに DNA 吸着量が少なかった。スラリー施用による有機物増加が DNA 吸着に負の影響を与えていることが明らかになった。H₂O₂ 処理を行うと、未処理土壌よりも若干多くの DNA を吸着した。別の土壌の場合を見ると、H₂O₂ 処理土壌の比表面積は、未処理土壌にくらべ、約 2 分の 1 に減少したにもかかわらず、未処理土壌よりも DNA 吸着量が高かった。400 °C 加熱処理土壌の比表面積は、未処理土壌よりも 3 分の 1 以上少なくなった。それにもかかわらず、400 °C 加熱処理土壌の DNA 最大吸着量が未処理土壌よりもはるかに高かった。供試したすべての処理黒ボク土の T-C 量とリン酸吸収係数とともに、推定最大 DNA 吸着量とは統計的に有意な関係は見られなかった。これらの結果から言及できるのは、土壌有機物が DNA 吸着にプラスに関与していないことである。すなわち、土壌有機物に DNA 分子は吸着しないようだ。また、リン酸の吸着機構だけで、黒ボク土への DNA 吸着が説明できるわけではないようだ。

4.3 アロフェンへの DNA 分子の吸着

黒ボク土への DNA 吸着を理解するために、黒ボク土壌の主要構成粘土鉱物であるアロフェン（天然と合成アロフェン）への DNA 吸着を、反応溶液の DNA 濃度、イオン強度、pH、リン酸イオンとの競合等の観点から調べた。2つのアロフェンともに DNA 吸着量と平衡濃度との関係は、Langmuir 式の線形式に有意に当てはまった。pH3~9 の範囲で溶液組成を

変化させ、アロフェンに DNA を吸着させたところ、pH が高くなるほど吸着された DNA 量が減少した。DNA 吸着は溶液 pH によって大きく影響されることがわかった。バックグラウンド塩を NaCl であった本研究のイオン濃度範囲 (0.1-0.5 mol L⁻¹) では、pH(6.8-7.0) 一定の条件で、合成アロフェンと天然アロフェンの両方とも DNA 吸着割合はあまり変動せず、一定であり、これらのアロフェン上での DNA 吸着はイオン強度に影響されないと判断できた。アロフェンへの DNA 吸着は、モンモリロナイト、シリカより高く、カオリン、ゲータイト、ギブサイトの場合と同じくらい、またはより低いということがわかった。リン酸イオンをアロフェンに添加することにより、吸着 DNA 量が減少した。リン酸イオンと DNA との間で吸着反応における競合が生じることがわかった。アロフェンと DNA 吸着機構で、アロフェンへの DNA 吸着には DNA のリン酸基の関与する可能性を示唆した。本研究の結果から、黒ボク土の構成成分の中で、主要粘土鉱物であるアロフェンが DNA 吸着に対して大きな役割を示している媒体の1つであることが重ねて示唆された。

4.4 黒ボク土への DNA 分子の吸着

黒ボク土壌への DNA 吸着を、反応溶液の DNA 濃度、イオン強度、pH、リン酸イオンとの競合等の観点から調べた。黒ボク土への DNA 吸着に対する溶液 pH、イオン強度、共存溶質の影響を調べた。pH が高くなるほど吸着された DNA 量が減少し DNA 吸着は溶液によって大きく影響されることがわかった。土壌粒子への DNA 吸着機構は pH 依存的で、DNA の等電点(約 pH 5.0)より pH が低い場合は DNA は正に荷電し、負電荷の粘土等の土壌粒子に吸着しやすくなるが、pH 5 以上では負電荷の土壌粒子とは斥力が働く。バックグラウンド塩として NaCl を用いた場合、イオン濃度範囲 (0.01~0.5 mol L⁻¹) では、pH 一定(6.8~7.0)の条件で、黒ボク土への DNA 吸着割合は一定であった。この条件では、DNA 吸着はイオン強度に影響されないと判断できた。土壌の DNA 吸着能力は、粘土含量、酸化物含量に左右されることは予測の範囲内であるが、交換性陽イオンまたは土壌溶液中陽イオンのイオン種組成によっても影響を受けるかもしれない。黒ボク土へ

の、DNA 吸着量と平衡濃度との関係は Langmuir 式に有意に当てはまった。

5. 結論

黒ボク土とアロフェンともに、DNA 吸着量と平衡濃度との関係は Langmuir 式に有意に当てはまった。この吸着等温線は、L 型または H 型であった(Saeki et al., 2008; in submitting)。DNA 分子と供試粒子との間で強い吸着相互作用が働いて、DNA 分子が土壤粒子表面で単分子層になっていると考えられた。

現在、DNA 分子の土壤粒子に対する 2 つの吸着形態が想定されている。1 つ目は、土壤粒子への DNA 吸着反応で、DNA 分子末端のリン酸基が土壤粒子外表面の酸化物の OH 官能基に結合する機構である。同様に、モンモリロナイトなどの層状ケイ酸塩鉱物の結晶末端の Al 酸化物の OH 官能基へも DNA 分子は吸着するだろう。高 pH 域では吸着 DNA 量は減少する。pH が高くなると、変異電荷粘土の土壤は表面の AIOH が脱プロトン化され、負に帯電した AIO⁻が増加し、DNA のリン酸基と反発し近づけないため、DNA が吸着されにくいと考えられる。土壤の AIOH と DNA のリン酸基が配位子交換反応で吸着結合しているかどうかは、現在のところ、判明していない。

2 つ目は、陽イオンが架橋として使用される土壤粒子外表面上での吸着形態である。pH 8-9 で、土壤に対する DNA の吸着は 0% にならず、加えて、リン酸イオンによって、DNA の吸着がすべて阻害されるわけではなかった(Saeki et al., in press)。また吸着量は小さいが、DNA 分子は、中性からアルカリ性では全体として負に帯電しているシリカ表面にも吸着された(Saeki et al., in submitting)。これらの結果は、無機陰イオンの吸着反応で見られる粒子表面の正荷電量と OH 基量と、DNA 分子末端のリン酸基との反応だけでは説明できない。陽イオンを架橋として使用する層状ケイ酸塩鉱物などへの吸着形態が Khanna and Stotzky (1992) と Paget et al. (1992) によって提案されている。また Ca²⁺ はシリカなどの鉱物のシラノール基にも結合し、鉱物表面の負電荷を低下させ、DNA が吸着しやすくなる(Nguyen and Elimelech,

2007a)。この吸着機構は高 pH 域での DNA 吸着にも、配位子交換反応をとまなう吸着を補填する反応として当てはまるかもしれない。もしこの反応が大きく寄与しているのであれば、溶液中の陽イオン量(イオン強度)を上げることで DNA 吸着量は増加するはずである。土壤の DNA 吸着能力は、粘土含量、酸化物含量に左右されることは予測の範囲内であるが、交換性陽イオンまたは土壤溶液中陽イオンのイオン種組成によっても影響を受けるかもしれない。

「土壤、特に黒ボク土の構成成分の中で、何が DNA 分子を吸着するのか?」という問いに対して、当初、主要な吸着サイトは無機鉱物であり、腐植物質は DNA を吸着しないであろうと著者たちは思い込んでいた。DNA 吸着反応で、DNA 分子末端のリン酸基が鉱物表面の OH 官能基に結合する機構を想定していたためと、黒ボク土から有機物を削減処理すると、DNA 吸着量が増加したためである(Saeki and Sakai, 2009)。しかし、他の研究とこれまでの著者たちの研究とを総合すれば、鉱物が DNA 分子の主要な吸着サイトであることはもちろんであるが、腐植物質も DNA 吸着サイトとして十分に働いていると結論づけられる。酸性領域以外で、腐植物質は全体として負に強く帯電しているため、腐植物質への DNA 吸着のメカニズムは、陽イオンを架橋として使用する負電荷粒子表面上での吸着形態が重要であろう。

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)

〔雑誌総説〕(計 2 件)

- ①佐伯和利・境 雅夫・國頭 恭, 土壤生態系における細胞外 DNA 分子の挙動 第 1 部: 土壤および土壤構成物質への DNA 分子の吸着, 土と微生物 (印刷中)
- ②佐伯和利・國頭 恭・境 雅夫, 土壤生態系における細胞外 DNA 分子の挙動 第 2 部: 細胞外 DNA 分子の安定性と形質転換能, 土と微生物 (印刷中)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- ① Saeki K., T Kunito, M Sakai, Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols, *Biology and Fertility*

- of Soils (in press) 査読あり
- ② Saeki K., M Sakai., The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on andosols. *Microbes and Environments*. **24**: 175-179 (2009) 査読あり
- ③ Saeki K., M Morisaki, M Sakai, The effects of hydrogen peroxide and acid oxalate treatments on DNA adsorption on soils. *Microbes and Environments*. **23**: 353-355 (2008) 査読あり
- ④ T-K.Oh, K. Saeki Fluoride removal by a variety of minerals in aqueous phase. *Clay Sci.*, **14**: 111-116 (2009) 査読あり
- ⑤ Saeki K. Adsorption Sequence of Toxic Inorganic Anions on a Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **81**: 508-512 (2008) 査読あり
- ⑥ Saeki K. The comparison of arsenite and arsenate adsorption on an andosol. *Soil Science*, **173**: 248-256 (2008) 査読あり
- ⑦ Saeki, K. T. Kunito, Estimating sorption affinities of heavy metals on humic acid and silica using constant capacitance model. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **40**: 3252-3262 (2009) 査読あり
- ⑧佐伯和利, 無機ヒ素塩の土壌への吸着特性, 九大農学芸雑誌 **63**: 133-140(2008) 査読なし
- ⑨佐伯和利・森田崇嗣・境 雅夫, 黒ボク土への DNA 吸着に対する土壌有機物削減処理の影響, 九大農学芸雑誌 **64**: 31-37 (2009) 査読なし

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ①Sakai, M., S-I. Wada, K. Saeki DNA adsorptions on andosols and allophane minerals. 5th International Conference Interfaces against Pollution 2008, June, 1-4, 2008. Kyoto, Japan
- ②Sakai, M., K. Saeki Interactions of extracellular DNA with soil components in andosols 12th International symposium on microbial ecology, Aug.,17-22, 2008. Cairns, Australia
- ③森崎真由美・佐伯和利・廣田淳美・境 雅夫, 各種土壌成分による DNA の吸着, 日本土壌肥料学会 2007 年度東京大会
- ④佐伯和利・森崎真由美・森田崇嗣・廣田淳

- 美・境 雅夫, 土壌への DNA 吸着と土壌理化学性との関係, 日本土壌肥料学会 2008 年度愛知大会
- ⑤佐伯和利・境 雅夫, 天然・合成アロフェンへの DNA 分子の吸着, 第 53 回粘土科学討論会(岩手大学)2009 年 9 月
- ⑥佐伯和利・境 雅夫, アロフェンへの DNA 分子の吸・脱着, 日本土壌肥料学会 2009 年度京都大会
- ⑦井表靖貴・國頭 恭・久保浩義・境 雅夫・佐伯和利, 土壌と腐植酸への DNA の吸着, 日本土壌肥料学会 2009 年度京都大会

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 和利 (SAEKI Kazutoshi)
九州大学・生物環境調節センター・准教授
研究者番号: 30284780

(2) 研究分担者

和田信一郎 (WADA Shin-Ichiro)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 60108678

境 雅夫 (SAKAI Masao)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号: 20225775

國頭 恭 (KUNITO Takashi)
信州大学・理学部・准教授
研究者番号: 90304659