

eDNAを活用した効率かつ高精度な土壌診断技術

独立行政法人農業環境技術研究所 農業環境インベントリセンター長 對馬 誠也

はじめに

高品質な作物生産を行う上で、安定した地力の確保、連作障害等の病害の克服が重要であり、それを実現するためには、土壌の物理性、化学性および生物性を適切に把握する必要がある。しかし、実際には、土壌の物理性、化学性による土壌診断はあるものの、生物性を取り入れた土壌診断法は確立されていない。土壌微生物が土壌病害の発生や有機質肥料からの養分供給に重要な役割を果たしていることは明らかであり、的確な土壌診断を行うためには、物理性と化学性だけでなく、生物性も合わせた総合的な評価法の開発が望まれている。

土壌微生物の評価法の開発がなかなか進まない理由としては、①培養法を介した微生物の分離・解析技術では、土壌微生物全体を十分に評価できない、②解析自体に時間がかかるため、研究者一人で土壌微生物の影響評価等のために必要なサンプル数を確保することが難しい、などが考えられる。具体的には、①では、土壌細菌の場合、いわゆる「培養」法で土壌から分離できる細菌はたかだか全細菌の1/100程度に過ぎないと言われている。このことは、土壌中に圧倒的に多く存在する「培養不可能な細菌」を含めた土壌微生物全体を総合的に評価することは培養法では難しいことを意味している。②では、様々な栽培条件と土壌微生物の関係を統計的に解析する場合、解析が複雑なほど多くのサンプルが必要になるが、必要量のサンプルを限られた期間中に一人の研究者が収集するのは極めて難しい。したがって、土壌生物性の評価では、場合によっては、別の研究者が収集した情報も合わせて解析できるシステムの構築が必要であると考えられる。

こうした背景の下、eDNA（土壌から培養過程を経ず得たDNA）を直接解析することにより、新しい土壌微生物評価法を開発し、栽培管理に活用できる指標の策定などを目的として、平成18年に農林水産省委託プロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発」（eDNAプロジェクト）がスタートした（図1）。ここで、eDNAとはenvironmental DNA（環境DNA）の略である。

2. eDNAプロジェクトの概要

プロジェクトは、3つのグループ（大課題1, 2, 3）に分かれている（表1）。大課題(1)では土壌DNA、RNA解析技術の開発を行い、大課題(2)では(1)で開発した手法を用いて実際の圃場試験で作物生産や病害発生と土壌DNA解析結果の関係等を調べ、新しい「指標」作りを目指している。さらに、大課題(3)では、(2)の課題担当者が収集した土壌情報をデータベース化し、誰でもが使えるデータベースシステムの構築を目指している。

具体的には、大課題(1)では、最初の2年間でPCR-DGGE法（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）を用いた土壌微生物（細菌・糸状菌・線虫）評価手法の開発を行った。PCR-DGGE法を使うことにした理由は、プロジェクト終了時に、コスト、労力的に考えた場合、試験場レベルで利用可能な技術になると考えたからである。しかし、この手法には、1枚のゲル内のサンプル毎のDNA

土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発 (eDNAプロジェクト)

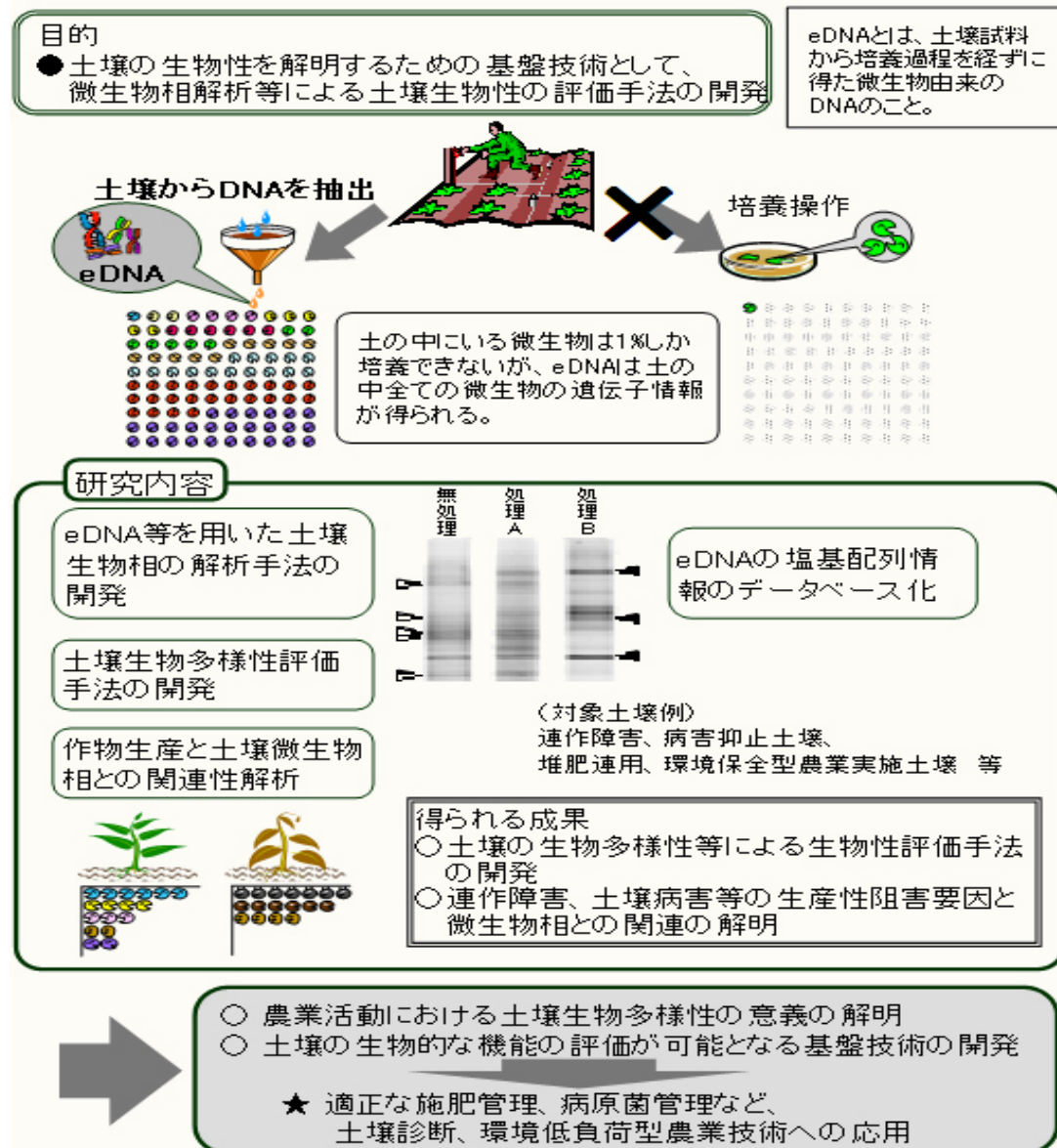


図1 eDNAプロジェクトの概要

表1 eDNAプロジェクトの課題と概要

大課題名と概要	
大課題(1)	eDNA等を用いた土壌微生物相の解析手法の開発 土壌eDNA等を用いて、土壌微生物及び土壌微生物相を解析するための標準手法を確立する。
大課題(2)	作物生産と土壌微生物相との関連性の解析及び土壌生物の多様性評価手法の開発 連作障害、病害多発、堆肥連用等農業生産と関わりの深い土壌における土壌微生物相を調査・解析し、作物生産性と土壌微生物相との関連を解明する。また、土壌微生物の多様性に基づく土壌の生物的評価手法の有効性・可能性を評価するとともに、土壌微生物相等を指標として土壌生物性を評価する手法を開発する。
大課題(3)	eDNA情報のデータベース化及び利用技術開発 土壌生物性の評価法開発及び作物生産向上技術開発に資するため、微生物種・機能・塩基配列等のeDNAの基礎的情報を土壌の種類、管理、作物生産性等と関連させてデータベース化する。また、eDNA情報を利用し病原菌等を簡易に検出するための新技術を開発する。

バンドパターンを比較するのには適しているが、異なるゲル間のDNAバンドパターンの比較が難しいという欠点があった。このため、すべてのゲルにマーカーとなるDNAを流し、全国土壌eDNA情報を相互に比較できるようにするため、解析時には全てのゲルにマーカー（DGGE標準マーカーと称す）を作製し流すことにした。さらに、土壌からのDNA抽出法やPCR-DGGEの条件も統一したマニュアルを開発することにした。また、その他の課題では、5年計画で、土壌中の遺伝子の発現を直接評価するため、土壌RNAの抽出法や脱窒関連遺伝子の発現解析技術の開発を目指した。

次に、大課題(2)では大課題(1)が開発したPCR-DGGE解析マニュアルに従って、施肥管理、病害管理等とPCR-DGGE解析結果との関係を調べ、圃場管理のための「指標」の探索などを目指すことにした。

大課題(3)では、大課題(2)で収集された土壌情報や土壌eDNA情報をデータベース化するとともに、eDNA情報の更なる活用技術の開発を行うことにした。

ここで作製するデータベースの最大の特徴は、(A)培養できない微生物（細菌、かび、線虫）も含めた全ての細菌、かび、線虫を対象としていること（前述）と、(B)全国の農耕地eDNA情報を誰もが利用できるようなシステムを目指していること、である。

近年、IT技術の発展により、世界規模で、生物多様性情報や生態情報などをデータベース化して共有しようとする動きがあるが、土壌情報に関してはまだ世界的にも始まったばかりである。国内での農耕地土壌の物理・化学・生物性に関する情報のデータベース化は国際的にも先駆けと言える。

3. eDNAプロジェクトの成果

まだ、プロジェクトの途中であるが、現在までに得られた成果を報告する。

1) 大課題(1)

2年間で、「細菌・糸状菌・線虫の標準マーカー」を開発することに成功した。さらに、土壌DNA抽出法、PCR-DGGE条件を統一した「細菌・糸状菌・線虫用土壌DNA解析マニュアル」を作製し、平成20年4月に学術雑誌に掲載した。また、平成21年1月にはeDNAプロジェクトのホームページ上にトラブルシューティングを含むより詳細なマニュアルを公開した（URL：http://www.niaes.affrc.go.jp/project/edna/edna_jp/index.html）。このマーカーとマニュアルの完成により、大課題(2)で圃場試験の試験区から得られるDGGEパターンをデータベース上で相互に比較することが可能になった。また、このマニュアルを全国に普及させることがデータベースへの登録の増加につながることから、主として公的機関の研究員を対象に本年度10月に「土壌DNAのPCR-DGGE解析技術講習会」を予定している。

2) 大課題(2)

肥培管理による土壌管理（中課題1）と病害管理（中課題2）にわかれている。課題毎に、作物生産、病害発生と土壌微生物（土壌物理・化学性含む）の関係や栽培管理が土壌微生物に及ぼす影響などを調べ、栽培管理に役立つ「生物等の指標」の作出を目指している。これまでの研究の結果、病害関係では、たとえば、北海道ではトマト褐色根腐病実発生土壌に特有のDGGEバンドが確認されたり、ジャガイモそうか病菌用のDGGE条件が明らかになっている。

3) 大課題(3)

ここでは、土壌情報をデータベース化するためのシステム（農耕地土壌eDNAデータベース：eDDASs）

の構築に取り組んでいる（図2. 現在データベースは非公開。プロジェクト終了時に公開）。このデータベースには、土壌採取位置（緯度、経度）、土壌物理・化学性、栽培条件および土壌 DNA 解析情報（細菌、糸状菌、線虫）など 68 項目が入力できるようになっており、現在国内 19 地点で約 1,500 件の土壌情報がデータベース化されている。ここでは、データベースに入っている情報の「質」を一定水準以上に確保するために、以下のようなシステムを構築中である。

ア) データベースの情報は多いほど良い。このため、ID 登録することによって誰もが土壌情報を入力したり、活用できるシステムにした。（自己増殖データベース）

イ) 土壌サンプル毎にアクセッション番号を付けて、土壌サンプル（冷凍保存）と土壌情報を一括管理することにした。

ウ) 情報の「質」を保つために、入力項目 68 件のうち 36 件は「必須項目」とした。そのため、「必須項目」が未入力の場合は登録できないようにした。



図2 eDNAプロジェクトホームページ
左上：eDNAプロジェクトのホームページ
右下：農耕地eDNAデータベース（eDDAS）のホームページ