

黒ボク土からRNAを抽出することに成功 土壌中の微生物研究を後押しする画期的な研究成果

生物生態機能研究領域長 藤井 毅

(文:サイエンスライター 齊藤 勝司)

日本の農耕地の土からRNAを抽出することは難しい!

近年、土壌微生物の研究に期待が高まっています。土壌には、農作物の病気の原因となる微生物や、肥料を分解する微生物はもちろんのこと、二酸化炭素よりも強い温室効果を持つメタンや一酸化二窒素(N₂O)を出す微生物、抗がん剤や抗生物質を作る未知の微生物もいることから、その研究が求められているのです(図1)。

しかし、これまでに研究することができた土壌微生物は、全体の数パーセントに過ぎないと言われています。というのも、従来、微生物を研究するには、培養して増やす必要がありました。ところが、栄養が乏しい土壌環境にすむ微生物は増殖が活発でなかったり、休眠状態だったりするものも多く、栄養豊かな培地で培養しても増やすことが難しいことから、培養して得られるのは活発に増殖できるところの一部の微生物ばかりになってしまいます。そのため、研究できている微生物はごく限られたものになると考えられているのです。



図1 土壌中における微生物の働き

土壌中にはさまざまな微生物があり、多様な働きをしています。なかには、作物病原菌や根粒菌など農作物の生育に影響を与えるものや地球温暖化に関わるもの、抗がん剤や抗生物質など人間に有用な物質を作るものもあります。けれども、その働きは今まで詳しく調べることができませんでした。

写真 RNAの抽出が難しい黒ボク土

日本の農耕地の主要な土である黒ボク土には、DNAやRNAを吸着する腐植物質が多く含まれているため、その抽出が難しく、特にRNAは市販の抽出キットをもってしてもほとんど抽出ができません。



そこで培養することなく土壌中の微生物を研究する方法が考案されました。微生物を含んだ土壌から直接、DNAやRNAを抽出し、その情報を読み解くことで、どんな微生物がいて、どんな遺伝子が働いているのかを明らかにする研究が世界中で進められています。(独)農業環境技術研究所 生物生態機能領域の藤井毅領域長も、この研究に取り組む研究者の一人ですが、日本の土壌に関して課題があるといいます。

「土壌からDNAやRNAを抽出するキットが販売されているのですが、日本の主要な農耕地土壌である黒ボク土(写真)からの抽出はとても難しいのです。砂質の土であれば抽出することはできても、黒ボク土には、

落ち葉などが分解されずに残った腐植物質が多く含まれていて、これに吸着されてしまいます。それでも、DNAであれば吸着を抑えて抽出することはできるのですが、RNAは吸着を防ぐ方法がこれまでなく、ほとんど抽出することができませんでした」

DNAを調べるだけでも、土壌中にどんな微生物がいるかを明らかにすることはできます。しかし、休眠中や死んだ微生物からも同じようにDNAは抽出できることから、土壌で働いている微生物だけを見ることはできません。その点、RNAはDNAの遺伝情報に従ってタンパク質が合成される際に作られるため、RNAが確認できれば、土壌に生きた微生物がいて、その遺伝子を働かせていることを直接示す証拠になります(図2)。

ぜひ土壌中のRNAを研究したいところですが、市販のキットでは日本の土壌からRNAを抽出することが難しく、これが日本で土壌微生物の研究を進める大きな障壁になっていたのです。

吸着物質をコーティングしてRNAを抽出しやすくする

こうした問題を解決するため藤井領域長らは、牛乳に含まれるタンパク質のカゼインを利用することにしました。土壌にカゼインを添加した後にRNAを抽出すると、確実に抽出できるのです。カゼインを使うことになった経緯について藤井領域長がこう説明しました。

「ヒントになったのは農環研で以前開発された方法

で、DNAを抽出するのにスキムミルクを使ったことでした。スキムミルクに含まれるタンパク質が腐植物質をコーティングして、DNAの吸着を防いでくれるのです。しかし、スキムミルクではRNAは抽出できませんでした。RNAのほうが腐植物質に強く吸着されるため、さまざまな成分を含むスキムミルクでは、腐植物質とRNAの吸着を抑えきれなかったのです。しかも、スキムミルクにはRNAを分解する酵素も多量に含まれています。そこで、この研究を担当した農環研特別研究員の王勇^{わんよん}さんが着目したのが牛乳成分から精製したタンパク質、カゼインでした。カゼインは腐植物質との結合能が高く、市販のカゼインにはRNAを分解する酵素の混入も少なかったからです」

図3は市販のカゼインを用いて土壌からのRNAの抽出を試みた結果です。この写真では、分子量の違いによりDNAは写真上部に、RNAは2本のバンドを中心に写真下部に現れます。土壌DNAを抽出するといずれの土壌からもDNAの分子量に当たるところにバンドが現れ、いずれの土壌にも確かに微生物が存在していることがわかります(上段)。しかし、同じ土壌から市販のキットを用いてRNAを抽出すると、黒ボク土(多腐植質黒ボク土、淡色黒ボク土)では全くRNAが検出されず、この方法では黒ボク土からはRNAが抽出できないことがわかります(中段)。

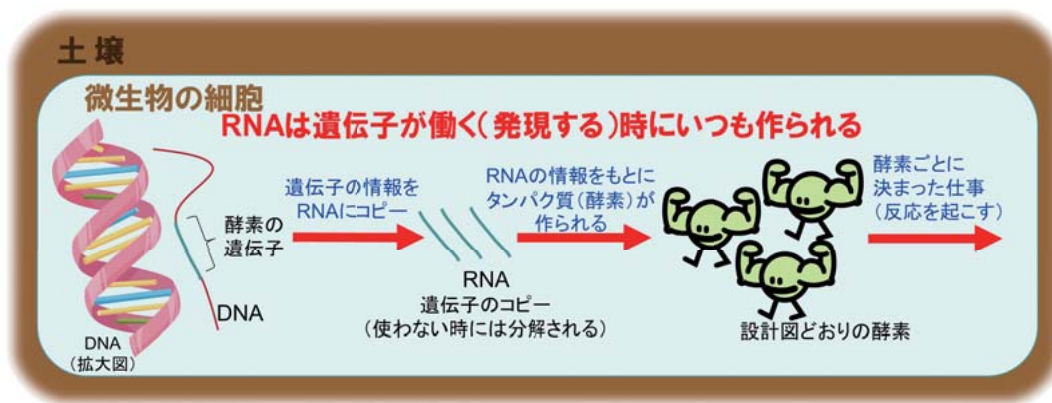


図2 RNAを調べるとわかること

RNAは遺伝子が発現する時に作られるため、RNAを調べることで、土の中の微生物の働きがわかります。

ところが、抽出の際に土壌にカゼインを加えてから抽出すると、黒ボク土からでもRNAが抽出できていることが見て取れるでしょう(下段)。このようにして最もRNAの抽出が難しい多腐植質黒ボク土からでもRNAを抽出できることが確かめられたのです。

誰でもすぐに使えるRNA抽出技術

さらに藤井領域長はこの技術を利用して、放線菌を用いた実験を行いました。放線菌は抗生物質を生産する微生物で、これまでに人類が手にした抗生物質の3分の2は放線菌から得られたものです。藤井領域長らは土壌から抽出したRNAを調べることで、放線菌が土壌中で栄養源(エサ)を見つけると抗生物質を作り出すことを発見しました。

実験では高温、高圧処理により滅菌した土壌に人為的に放線菌を移植し、増殖させました。その時、放線菌の栄養源となるキチン(節足動物や甲殻類の外皮に含まれる多糖類)を添加した場合と添加しない場合で、どのような遺伝子が発現しているかを土壌からRNAを抽出して比較しました。実験結果について藤井領域長がこう説明しました。

「放線菌が持つすべての遺伝子について比較検討したところ、土壌にキチンを添加した場合に複数種類の抗生物質の遺伝子が働きだすことがわかりました。抗生物質は他の微生物の増殖を抑える働きがあるため、放線菌はエサのキチンを独占しようとして抗生物質を分泌したのかもしれない」

このように土壌から直接抽出したRNAを調べることで、土壌中での微生物の暮らしぶりの解明が期待されます。これまで培養ができないことから、手つかずであった未知の微生物の働きを明らかにできる可能性があります。特に農業分野では、農産物の生育に関わる肥料の分解や、農作物の病気の発生、温室効果ガスの発生メカニズムなど、微生物が関わる現象の理解にも貢献できるはずです。

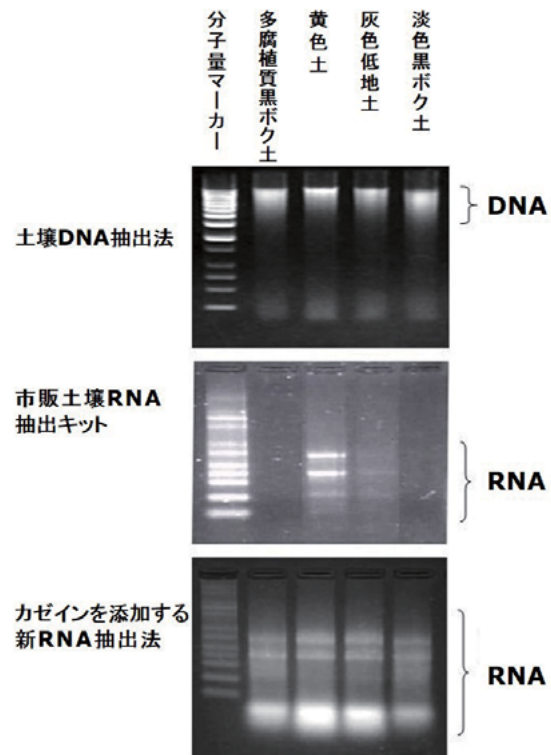


図3 カゼインを用いることでRNAを抽出できる

DNAは、黒ボク土(多腐植質黒ボク土や淡色黒ボク土)からでも抽出できますが(上段)、RNAは市販の抽出キットを用いても抽出できません(中段)。ところが、土壌にカゼインを加えるとRNAも抽出できるようになります(下段)。(いずれも白く見えるところにDNAまたはRNAが存在する)

今回開発されたRNAの抽出技術は、土壌にカゼインを加えるだけでよく、誰でもすぐに利用できるため、今後、土壌からのRNAの抽出に広く利用されると期待されます。土壌微生物の研究を後押しする技術になることでしょう。