

ITS プライマーを用いた PCR 法による土壌からの織毛虫検出

嶋谷智佳子

(2013年6月26日 受理)

要 旨

嶋谷智佳子 (2014) ITS プライマーを用いた PCR 法による土壌からの織毛虫検出。九州沖縄農研報告 61 : 17 - 22.

土壌中の織毛虫を簡便に検出するために、Internal Transcribed Spacer (ITS) プライマーを用いた検出手順を確立した。まず、2009年に開発した土壌織毛虫1個体からのDNA抽出法を用いて、18S rDNAによる同定とITS領域塩基配列の解析を行い、ITS領域塩基配列の種特異的な部分からプライマーを設計した。次に、土壌から環境DNAを抽出し、これを鋳型として設計したITSプライマーを用いたPCRを行ったところ、目的のサイズのDNA断片が増幅された。このDNA断片の塩基配列を解読したところ、目的の織毛虫の配列であることが確認でき、一連の検出手順を確立することができた。これまで主に行われていた顕微鏡下での織毛虫の検出は、時間もかかり、作業も熟練を要していた。しかし、ITSプライマーを用いたPCRによる方法は、迅速な検出結果を得ることができ、特別な熟練も必要としない。この検出法は、将来的に土壌診断への利用も期待できる。

キーワード：土壌、織毛虫、ITS、PCR、プライマー、検出、環境DNA。

I. 緒 言

土壌織毛虫は、細菌等の摂食者として土壌生態系内の物質循環に関与していることから (Griffiths, 1994)、土壌での物質循環に関わる生物指標としての利用が期待できる。生物指標として土壌織毛虫を利用するには、土壌からの織毛虫の簡便な検出法が必要である。土壌織毛虫の検出は、主に顕微鏡下で形態によって行われてきた (Foissner, 1999)。顕微鏡による形態での織毛虫の検出は、原生物情報サーバの「原生物図鑑 (<http://protist.i.hosei.ac.jp/taxonomy/menu.html>)」や An Illustrated Guide to the Protozoa (Society of Protozoologists, 2000) などのデータベースを参考にすることができる。しかし、織毛虫の形態は、重要とされている表層構造が、別種でありながら近縁種と極めて似ている場合が多く、属の区別さえ難しいことがある (高橋, 1993)。

一方、18S リボソーム DNA (18S rDNA) の塩基配列による織毛虫種の検索は、インターネット上の DNA データベースで可能であり、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) の検索機能が広く活用されているが、2013年4

月現在で織毛虫の登録数は3,039件である。これは、細菌の16S rDNA データベースの3,860,269件に比べると0.08%と極めて少ない。原因としては、織毛虫のDNA抽出法から塩基配列解析による同定までの手法が十分に確立されていなかったことが考えられる。

近年、織毛虫を大量培養した後にDNAを抽出し、塩基配列を解析することにより種を同定する方法が行われているが (Dopheide *et al.*, 2008; 熊谷ら, 2007)、土壌織毛虫は温度や水分などの環境の変化ですぐに死滅してしまい、培養は困難である (熊谷ら, 2007)。そこで、著者は、培養を行うことなく織毛虫1個体から効率良くDNAを抽出し、解析する方法を確立した (嶋谷・橋本, 2009)。

rDNAは、土壌中の原生動物の群集構造解析に使用されてきた (Lawley *et al.*, 2004; Fell *et al.*, 2006; Shimano *et al.*, 2012)。真核生物のrDNAには、先述の18S (small subunit) に加え、5.8S、および26S (large subunit) があり、また、18Sと5.8S、および5.8Sと26Sの間に2つのITS領域が存在している。真菌類における研究では、サブユニットの長さは種にかかわらずほぼ同じであるが、ITS領域は種によって長さは著しく異なっており、この領域の塩基配列の違いを利用

した分類・同定に適している (杉田・西川, 2004)。近年, 種特異的な ITS プライマーが作成され, 温泉中のアメーバの検出でも用いられていることから (Sheehan *et al.*, 2003), 土壤繊毛虫でも ITS プライマーを利用できる可能性がある。

本研究では, 土壤繊毛虫1個体からの DNA 抽出法 (嶋谷・橋本, 2009) を用いて, 18S rDNA による同定と ITS 領域塩基配列の解析を行い, ITS 領域塩基配列の種特異的な部分からプライマーを設計した。そして, その ITS プライマーを用いて, 土壤からの繊毛虫の簡便な検出手順を確立したので報告する。

II. 材料および方法

1. 供試土壤

土壤は, 九州沖縄農業研究センター都城拠点 (宮崎県都城市) のソルガム栽培後の2畑地圃場 (土壤 A, B) の表層土 (0-10 cm) を 2008 年 5 月に採取して供試した。土壤 A の理化学性は, 乾土あたり全窒素 1.4 mg/100 g, リン酸 17.3 mg/100 g, pH (H₂O) 6.1, EC (1:5) 0.06 ms/cm, 交換性カルシウム 211.2 mg/100 g, 交換性マグネシウム 30.1 mg/100 g, 交換性カリウム 30.5 mg/100 g, CEC 19.6 me/100 g (新美, 2008) であった。土壤 B の理化学性は, 乾土あたり全窒素 0.9 mg/100 g, リン酸 43.6 mg/100 g, pH (H₂O) 6.7, EC (1:5) 0.06 ms/cm, 交換性カルシウム 297.9 mg/100 g, 交換性マグネシウム 50.3 mg/100 g, 交換性カリウム 39.8 mg/100 g, CEC 20.1 me/100g (新美, 2008) であった。Most probable number 法 (三好ら, 2004) による土壤繊毛虫の乾土あたりの個体数は, 土壤 A は $(1.49 \pm 1.00) \times 10^5$ cells/g, 土壤 B は $(1.14 \pm 0.43) \times 10^5$ cells/g であった。

2. 土壤繊毛虫の単離と鋳型 DNA の調製

土壤繊毛虫の単離に利用した培養液は, 滅菌したレタス浸出液 (高橋, 1993) 200 mL に細菌 (*Enterobacter aerogenes*) を1白金耳分接種し, 25°C に1~2日静置して増殖させたものを用いた。供試土壤 0.03 ~ 0.1 g を直径 9cm の滅菌シャーレに入れて培養液 10 mL を添加し, 20°C に静置して遊泳してきた土壤繊毛虫1個体を実体顕微鏡下でガラスピペットを用いて吸い上げた。土壤の混入を避けるため, まずデプレッションスライドに移し (月井, 2003), 次に約 5

μ L の水とともにガラスピペットを用いてスライドグラス上に乗せ, 生細胞の動画を撮影して保存した。土壤繊毛虫の形態による種の同定は, 「原生生物図鑑」および An Illustrated Guide to the Protozoa (Society of Protozoologists, 2000) を用いて行った。

その後, 実体顕微鏡下で観察しながら水分が蒸発して土壤繊毛虫のみが残るまで待ち, 約 1.5 mm 角に切った滅菌ろ紙 (No.131; ADVANTEC 社製) をピンセットでつまんで土壤繊毛虫の上に載せ, ピンセットの先で強く押しつぶした。このろ紙を, 滅菌水 5 μ L が入った PCR 用チューブに移し, 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0) 4 μ L とプロテイナー K を 1 μ L (0.1 μ g) 加えて, 60°C で 1 時間処理した。最後に, 95°C で 10 分加熱し, -70°C で 30 分, または -20°C で 1 時間以上凍結させ, PCR のための鋳型とした (嶋谷・橋本, 2009)。

3. 18S rDNA による土壤繊毛虫の同定

まず, 18S rDNA の一部, ITS 領域, 5.8S rDNA, 26S rDNA の一部を増幅するためにファースト PCR を行い, 続いて 18S rDNA の一部を増幅するためにセカンド PCR を行った。ファースト PCR は, SR1: 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' および LSUR2: 5'-ATTTCGGCAGGTGAGTTGTTAC-3' のユニバーサルプライマーセット (Takano and Horiguchi, 2005) を用いた。PCR 反応液の組成は, 前述の鋳型 DNA 全量 (10 μ L) に各プライマー (100 pmol) をそれぞれ 0.1 μ L, *Taq* DNA ポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq; タカラバイオ (株) 社製) を 0.1 μ L (0.5 unit), dNTP (各 2.5 mM) 1.6 μ L, 10 \times PCR バッファー 2 μ L, 滅菌蒸留水 6.1 μ L を加え, 全量を 20 μ L とした。PCR 反応条件は, 93°C 1 分でプレインキュベーション後, 93°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 1 分を 35 サイクル行い, その後 72°C 5 分を行った。セカンド PCR は, 18S rDNA の繊毛虫特異的配列をターゲットとしたプライマーセット (CS322F: 5'-GATGGTAGTGTATTGGAC-3', EU929R: 5'-TTGGCAAATGCTTTCGC-3') (Puitika *et al.*, 2007) を用いて行った。PCR 反応液 20 μ L の組成は, 鋳型 DNA となるファースト PCR 産物を 0.5 μ L, 滅菌蒸留水 15.6 μ L とし, それ以外はファースト PCR と同様にした。PCR 反応条件は, Puitika *et al.* (2007) の条件を一部変更し, 94°C 5 分でプレインキュベーション後, 80°C 1 分, 65°C 1 分, 72°C 1 分

を1サイクル、続いて94℃ 1分、64℃ 1分(2サイクルごとに1℃ずつ温度を下げる)、72℃ 1分を1サイクルとして19サイクルを行い、その後94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして9サイクル、最後に94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 5分を行った。得られたPCR産物は、Invisorb Spin PCRapid Kit (Invitek, Berlin, Germany) で精製し、ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, CA, USA) によりシーケンスを行った。得られた土壌織毛虫のDNA塩基配列(500 bp程度)による種の同定は、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) および GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で検索したDNA塩基配列と比較して行った。

4. ITSプライマーの設計と確認

ITS領域は、前述のファーストPCR産物を用いてセカンドPCRにより増幅した。ITS領域のPCRは、ファーストPCR産物を0.5 μ Lと、ITS領域を増幅させるユニバーサルプライマーセット(SR12cF:5'-TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAA-3', 25F1R:5'-ATATGCTTAAATTCAGCGG-3') (Takano and Horiguchi, 2005) を用いて、ファーストPCRと同じ条件で行った。得られたPCR産物は、先述の手順と同様にして精製後、シーケンスを行った。データベースに登録されている様々な織毛虫のITS領域塩基配列との比較を行い、その種に特異的な部分からITSプライマーを設計した。

設計したITSプライマーの増幅確認は、それぞれの土壌織毛虫のファーストPCR産物0.5 μ Lを鋳型DNAとして、ファーストPCRと同じ条件でPCRを行い、

1.2%アガロースゲル電気泳動し、増幅の有無と増幅断片の大きさを確認した。

5. ITSプライマーを用いた土壌からの織毛虫の検出

環境DNAは、供試土壌の0.5gを用い、ISOIL for Beads Beating Kit (Nippon gene, Tokyo, Japan) で抽出した。SR1とLSUR2プライマー(Takano and Horiguchi, 2005)を用いてファーストPCRを行い、そのPCR産物0.5 μ Lを鋳型DNAとし、設計したITSプライマーを用いて18S rDNA増幅と同条件でセカンドPCRを行った。得られたセカンドPCR産物は、1.2%アガロースゲル電気泳動により増幅の有無と増幅断片の大きさを確認し、さらにシーケンスにより増幅DNA断片の塩基配列を解析し、種の確認を行った。

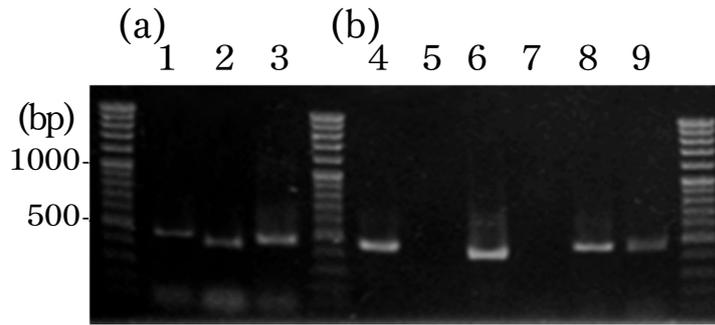
Ⅲ. 結果および考察

1. ITSプライマーの設計と確認

土壌から単離した織毛虫を形態および18S rDNAの塩基配列により同定した。同定した織毛虫の中から、土壌A由来の *Diaxonella trimarginata* (Accession number AB684386) と *Holosticha manca* (Accession number AB684389)、土壌B由来の *Oxytricha lanceolata* (Accession number AB684395) を無作為に選抜し、ITSプライマーを設計した。設計したITSプライマーの塩基配列は第1表に示した。これらのプライマーを用いてPCRを行ったところ、*D. trimarginata* では467 bp、*H. manca* では448 bp、*O. lanceolata* では452 bpのITS領域が増幅した(第1図(a-1, 2, 3))。

第1表 設計したITSプライマー

標的織毛虫	プライマーの名称	プライマーの配列(5'→3')	期待される産物長(bp)
<i>Diaxonella trimarginata</i>	D. trima-ITS-F (Forward)	TAACACTAATCCAATCATTAAACC	467
	D. trima-ITS-R (Reverse)	GCACTTGTGCAGATGAACTGCG	
<i>Holosticha manca</i>	H.manca-ITS-F (Forward)	AGCCTTAAGTTGCAGCAAAGAT	448
	H.manca-ITS-R (Reverse)	GGTCTAAGCACTTGTGCAGATG	
<i>Oxytricha lanceolata</i>	O.lance-ITS-F (Forward)	ATCAACCTAAACCTAGCCTTCAG	452
	O.lance-ITS-R (Reverse)	AGTTTTAGTGCTAAGCACTTGC	



第1図 設計した ITS プライマーによる PCR 増幅

(a) それぞれの土壌織毛虫からの増幅

レーン1: *Daxionella trimarginata*, レーン2: *Holosticha manca*, レーン3: *Oxytricha lanceolata*。

(b) 環境 DNA からの増幅

鋳型 DNA は, レーン4, 6, 8: 土壌 A の環境 DNA, レーン5, 7, 9: 土壌 B の環境 DNA。

使用した ITS プライマーセットは, レーン4, 5: *D. trimarginata* の ITS プライマーセット, レーン6, 7: *H. manca* の ITS プライマーセット, レーン8, 9: *O. lanceolata* の ITS プライマーセット。マーカー: OneSTEP ladder 100 (0.1-2 kbp)。

2. ITS プライマーを用いた土壌からの織毛虫の検出

設計した ITS プライマーを用いて土壌の環境 DNA から ITS 領域の PCR 増幅を試みたところ, 土壌 A から単離された *D. trimarginata* と *H. manca* は, 土壌 A の環境 DNA では増幅し, 土壌 B の環境 DNA では増幅しなかった (第1図 (b-4, 5, 6, 7))。第1図 (b-4, 6) の増幅 DNA 断片をシーケンスしたところ, 目的とするそれぞれの織毛虫の ITS 領域であることが確認された。土壌 B から無作為に 100 個体の織毛虫を顕微鏡下で単離したが, *D. trimarginata* と *H. manca* は検出されなかった。したがって, 土壌 B には, *D. trimarginata* と *H. manca* は存在しないと推測された。

一方, 土壌 B から単離された *O. lanceolata* は, 土壌 A と B どちらの環境 DNA を鋳型とした PCR でも増幅した (第1図 (b-8, 9))。これらの増幅 DNA 断片をシーケンスしたところ, *O. lanceolata* の ITS 領域であることが確認された。*O. lanceolata* は, 土壌 A から無作為に 100 個体の織毛虫を顕微鏡下で単離したときには見つからなかったが, 土壌 A にも存在していることが明らかになった。したがって, 顕微鏡下での単離法では見つけれなかった種も, この方法であれば検出できることが明らかになった。

18S rDNA は, 多くの種でマルチコピー遺伝子であり, 鋳型となりうる分子数が相対的に多くなり検出し

やすいため, 広く利用されてきた。ITS 領域は, 18S rDNA と比較して, 近縁種同士であっても種間の多型性が高く, 検出に際して特異性を高めることができる (Mora *et al.*, 2003)。そのため, ITS 領域は, 近縁種を識別可能な同定マーカー遺伝子として有用な領域と考えられている (Daffonchio, 2003)。近年, ITS プライマーは, さまざまな分野で注目されてきており, 病原菌 *Pythium* 属の検出のために ITS 領域から設計された種特異的なプライマーが報告された (Lévesque and de Cock, 2004)。また, アメーバの検出のためにも ITS プライマーが利用されている (Pélandakis *et al.*, 2000)。顕微鏡下での織毛虫の検出は, 時間を要し, 作業も熟練を必要とする。しかし, ITS プライマーを用いた PCR による検出法は, 迅速に結果を得ることができ, 特別な熟練も必要としない。さらに, 織毛虫の検出感度にも優れている。

以上のことから, 特定の織毛虫の検出には, 種特異的な ITS プライマーを用いた PCR 法による検出法が極めて有用である。今後, 織毛虫を生物指標として利用していくためには, 多種多様な土壌を用いてデータを蓄積し, ある環境で特異的に存在する織毛虫を特定してゆく必要がある。この簡便な織毛虫の検出法は, 土壌環境の指標となる織毛虫が特定された場合に, 土壌診断を行う上での利用も期待できる。

引用文献

- 1) Daffonchio, D. (2003) Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 5128 - 5137.
- 2) Dopheide, A., Lear, G., Stott, R. and Lewis, G. (2008) Molecular characterization of ciliate diversity in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** : 1740 - 1747.
- 3) Fell, J.W., Gloria, S., Laurie, C. and Scott, C. (2006) Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic dry valley soils with <5% soil moisture. *Soil Biol. Biochem.* **38** : 3107 - 3119.
- 4) Foissner, W. (1999) Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agric. Ecosyst. Environ.* **74** : 95 - 112.
- 5) Griffiths, B.S. (1994) Soil nutrient flow. In Darbyshire JF, Eds. *Soil protozoa*, p.65 - 91, CAB International, Oxon UK.
- 6) 熊谷朋子・三部光夫・明石典之・島野智之 (2007) 北海道大黒島の土壤繊毛虫の同定. 原生動物学雑誌 **40** : 82.
- 7) Lawley, B., Ripley, S., Bridge, P. and Convey, P. (2004) Molecular analysis of geographic patterns of eukaryotic diversity in antarctic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 5963 - 5972.
- 8) Lévesque, C.A. and de Cock, A.W.A.M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* **108** : 1363 - 1383.
- 9) 三好孝和・橋本知義・高橋忠夫 (2004) 家畜スラリーの投入が土壤原生動物および微生物群に及ぼす影響. 九州農業研究 **66** : 80.
- 10) Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D., and Fortina, M.G. (2003) 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology* **149** : 807 - 813.
- 11) 新美洋 (2008) 省耕耘による堆肥および緑肥の連続活用技術の開発. 有機農業の生産技術体系の構築と持続性評価法の開発平成 20 年度評価会議資料 58 - 61.
- 12) Pélandakis, M., Serre, S. and Pernin, P. (2000) Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47** : 116 - 121.
- 13) Puitika, T., Kasahara, Y., Miyoshi, N., Sato, Y. and Shimano, S. (2007) A taxon-specific oligonucleotide primer set for PCR-based detection of soil ciliate. *Microbes Environ.* **22** : 78 - 81.
- 14) Sheehan, K.B., Fagg, J.A., Ferris, M.J. and Henson, J.M. (2003) PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 5914 - 5918.
- 15) Shimano, S., Sambe, M. and Kasahara, Y. (2012) Application of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) for the analysis of ciliate communities in soils. *Microbes Environ.* **27** : 136 - 141.
- 16) 嶋谷智佳子・橋本知義 (2009) 土壤繊毛虫 1 個体からの DNA 抽出法とそれを用いた系統分類. 日本土壤肥料学会誌 **80** : 157 - 160.
- 17) Society of Protozoologists (2000) An illustrated guide to the protozoa, Lawrence, Kansas.
- 18) 杉田隆・西川朱實 (2004) DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. 日本医真菌学会雑誌 **45** : 55 - 58.
- 19) 高橋忠夫 (1993) 土壤繊毛虫の検出法と分類. 土と微生物 **24** : 31 - 41.
- 20) Takano, Y. and Horiguchi, T. (2005) Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell. *J. Phycol.* **42** : 251 - 256.
- 21) 月井雄二 (2003) 原生生物の採集と観察. <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/DataBook/m&m/2003/index.html>

Detection of Soil Ciliates by ITS Primers

Chikako Shimaya

Summary

A new protocol for detecting soil ciliates using internally transcribed spacer (ITS) primers was proposed. ITS primers were designed for rapidly detecting soil ciliates. Some soil ciliates were detected by using these ITS primer sets. Identifying soil ciliates under the microscope is very time-consuming; however, this method using ITS primers can detect specific soil ciliates quickly. This method could even detect them using environmental DNA from soil in which soil ciliates had not been detected by microscopy.

Key words : Soil, ciliate, ITS, PCR, primer, detection, environmental DNA.