

黒ボク土へのDNA吸着に対する土壤有機物削減処理の影響

佐伯, 和利
九州大学生物環境調節センター

森田, 崇嗣
九州大学生物環境調節センター

境, 雅夫
鹿児島大学農学部

<https://doi.org/10.15017/13904>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 64 (1), pp.31-36, 2009-02-27. 九州大学大学院農学研
究院

バージョン：

権利関係：

黒ボク土への DNA 吸着に対する土壤有機物削減処理の影響

佐伯和利^{1*}・森田崇嗣¹・境雅夫²

九州大学生物環境調節センター

(2008年11月14日受付, 2008年12月5日受理)

The Influence of Organic Matter Removal Treatments on Adsorptions of DNA on an Andosol

Kazutoshi SAEKI^{1*}, Takatsugu MORITA¹ and Masao SAKAI²

Biotron Institute, Kyushu University

はじめに

土壤環境中では、ほとんどの土壤細菌は培養が困難であることが知られており、培養困難な細菌については、土壤から直接 DNA を抽出して解析する非培養法によるアプローチがとられている。日本に広く分布する黒ボク土壌は、他の土壤に比べて、DNA の抽出が特に困難であると報告されてきた (Takada-Hoshino and Matsumoto, 2004; Ikeda *et al.*, 2008)。これは、非培養法による細菌群集解析の障害となっている。したがって、土壤への DNA 吸着メカニズムの解析は、土壤からの DNA 抽出効率を改善する研究にとって必要である。モンモリロナイトのような 2 : 1 型粘土鉱物への DNA 吸着の研究例は比較的多い (Greaves and Wilson, 1969; 1970; Khanna and Stotzky, 1992; Khanna *et al.*, 1998; Pietramellara *et al.*, 2001)。黒ボク土のような変異荷電性物質が主体の土壤を研究対象にする場合、層状ケイ酸塩鉱物に対する DNA 吸着の結果だけでは不十分である。また、土壤そのものへの DNA 吸着の研究例は多くない (Ogram *et al.*, 1988; 1994)。

前報 (Saeki *et al.* 2008) で、九州に分布する灰色低地土、赤色土と黒ボク土の DNA 吸着特性を比較

した。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。さらに、土壤中有機物の DNA 吸着に対する影響を、土壤に過酸化水素処理を行うことによって検証した。土壤から有機物を削減しても土壤への DNA 吸着量はほとんど変化しなかった。

土壤の有機物を除去する処理法として H₂O₂ 処理を用いたが、黒ボク土壌の有機物が 3 分の 1 ほど残っており、有機物の除去が不十分であることも考えられた。そこで、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 の吸着を調べる必要がでてきた。673 K で加熱処理した黒ボク土壌 (Saeki and Matsumoto, 1994) を用いて、未処理土壤と DNA 吸着量を比較し、DNA 吸着に対する土壤有機物の影響を調べた。

試料と方法

1. 土壤試料

供試土壤は、西東京市に位置する東京大学多摩農場未耕地の 0 - 20cm 層のアロフェン質黒ボク土である。これらの土壤は Typic Meranudands と分類された (Saeki, 2008)。土性区分は、埴壤土であった。土壤の理化学性は表 1 に示した。

¹九州大学生物環境調節センター

²鹿児島大学農学部

¹Biotron Institute, Kyushu University

²Faculty of Agriculture, Kagoshima University

* Corresponding author (E-mail: ksaeki@agr.kyushu-u.ac.jp)

表1 供試土壌の理化学性

採取場所	西東京市, 未耕地	
土壌分類	Typic Meranudands	
粒径組成		
	粘土画分	23.9%
	シルト画分	27.1%
	細砂画分	49.0%
pH (H ₂ O)	5.3	
pH (KCl)	4.5	
電気伝導度	0.098mS cm ⁻¹	
酸性シウ酸塩抽出		
	Al	4.9%
	Fe	3.3%
	Si	1.3%

2. 土壌試料の前処理

土壌から腐植などの有機物を減少させるために過酸化水素水処理を施した。さらに有機物を減少させるため673K加熱処理を施した。・未処理土：2mmのふるいにかけた生土に希水酸化ナトリウムを加え、pH6にした。その後、超純水で数回洗浄し、凍結乾燥した。

・過酸化水素水処理土（以下、H₂O₂処理土）：乾土10gあたりに100mLの7%過酸化水素水を加え、95℃で2時間以上加熱した。16000xgで10分間、遠心分離して上澄みを除去した。残渣を希水酸化ナトリウムを加え、pH6にした。その後、超純水で数回洗浄し、凍結乾燥した。・673K加熱処理土（Saeki and Matsumoto, 1994）：マッフル炉に乾土を適量入れ、約673Kで4時間加熱した。最後に超純水で数回洗浄し、遠心して凍結乾燥した。

3. 供試 DNA

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

4. 吸着実験

オートクレーブ処理した土壌試料0.1gにDNA溶液1mLを濃度200μg mL⁻¹で添加し、25℃で2時間振とうした。16000xgで10分間、遠心分離した後、上澄み液を回収した。上澄み液中のDNA量をPico Green法を用いて蛍光光度計（BioRad）で定量した。すべての吸着実験は3連で行われた。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、土壌試料に吸着されたDNA量を算出した。固液界面

におけるDNAの吸着には、溶液中pHと共存イオン濃度などの要因が関わっている（Lorenz and Waqckernagel, 1987; Cai *et al.*, 2006a）。本研究で、各処理土壌をpH6に調整して、最終的に水で数回洗浄したので、各処理土壌間で、懸濁液中のpH、電気伝導度に大きく偏差はなかった。よって、この2つの項目については、吸着実験で考慮しなかった。また、反応前後のDNAの電気泳動分布に差はなかったので、吸着実験中のDNA分子の顕著な改変はないと判断した。

結果と考察

1. 有機物削減処理のDNA吸着に対する影響

図1に、3つの処理土壌におけるDNA吸着を示した。H₂O₂処理を行うと、全炭素量は8.3から2.2%に減少した（表2）。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になった。土壌有機物の表面積への寄与は大きい。表面積が減少したにもかかわらず、H₂O₂処理土壌のDNA吸着量（平均0.80mg g⁻¹）が未処理土壌（平均0.32mg g⁻¹）よりも見かけ上、高かった。熊本の黒ボク土壌でも、未処理とH₂O₂処理土壌のDNA吸着量に差はほとんどなかった（Saeki *et al.*, 2008）。Alfisolの粘土画分で、H₂O₂処理すると、DNA吸着は未処理粘土画分より有意に

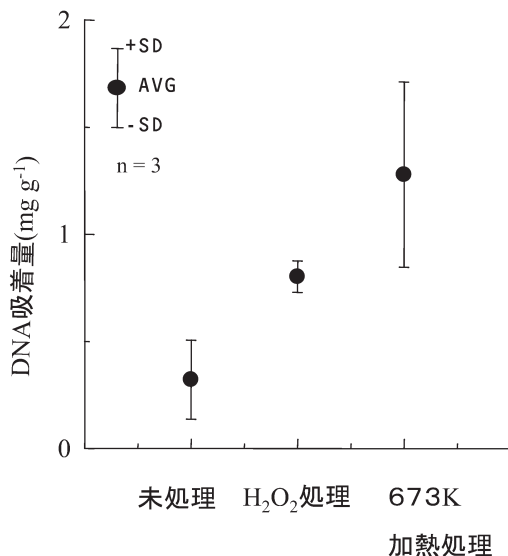


図1 有機物削減処理のDNA吸着への影響
土壌試料：100mg，初期DNA濃度：200mg mL⁻¹
溶液量：1mL

増加した (Cai *et al.*, 2006a).

さらに、673K 加熱処理し、ほとんどすべての有機物を取り除いた土壌試料を用いて、DNA 吸着量の変化を調べた (図 1)。673K 加熱処理で、土壌中の全炭素含量は 0.03% にまで減少した (表 2)。673K 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、 H_2O_2 処理土壌よりも比表面積が小さくなった。それにもかかわらず、673K 加熱処理土壌の DNA 吸着量 (平均 1.28 mg g^{-1}) が未処理土壌よりも統計的に有意に高かった (*t*-test, $p < 0.25$) (図 1)。また、673K 加熱処理土壌の方が、 H_2O_2 処理土壌よりも DNA 吸着量が多かった。表面積あたりの吸着量は、673K 加熱処理土壌 ($21.2 \cdot \text{g m}^{-2}$) で未処理土壌に比べ、約 14 倍になった (表 2)。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。

2. DNA 吸着に対する土壌有機物の役割

H_2O_2 処理、673K 加熱処理で土壌有機物量が減少したことによって土壌に対する DNA 吸着量は増加した。Ogram *et al.* (1988; 1994) も、8 つの土壌を用いて DNA 吸着を調べ、DNA 吸着量と土壌の全炭素量、粘土画分量、pH、CEC との相関は見られなかったと報告した。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。逆に、土壌粒子に対する DNA 吸着に、土壌有機物が競合・妨害等の負の大きな影響を持っていないとも言える。Ogram *et al.* (1988) によれば、供試した土壌の pH 域では、DNA 吸着に対する有機炭素量の寄与は非常に小さい。同様に、永久荷電性の土壌では、土壌有機物が DNA 吸着に寄与しないようだ (Cai *et al.*, 2006b)。さらに、比表面積が減少したに

もかわらず、 H_2O_2 処理、673K 加熱処理によって土壌に対する DNA 吸着量は増加したことは、これらの処理によって、有機物に含まれていた、あるいは覆われていたアルミ・鉄酸化物が表面露出して、新たな吸着サイトが生じたことが原因であろう。

ところで、土壌有機物はさまざまな化合物から成り立っている、そのなかで、DNA の吸着に対して固体表面を提供し、単離・研究できる物質は腐植酸である。しかし、腐植酸に対する DNA 吸着に関する研究は少ない。弱酸性領域で、土壌有機物である腐植酸単体への DNA 吸着は報告されている (Crecchio and Stotzky, 1998; Stotzky, 2000)。試葉の腐植酸への本研究で用いたものと同じサーモン精子 DNA 分子の吸着が顕著に見られた (Saeki, unpublished data)。腐植酸に吸着した DNA の 7~8 割は蒸留水と 0.1M NaCl 溶液で抽出されなかった (Crecchio and Stotzky, 1998)。これらの結果から、DNA 分子は土壌から抽出された腐植酸表面に強く結合していると解釈できる。DNA 吸着に関して、土壌に実在している固体有機物の表面特性と抽出された有機物の一部である腐植酸のそれとはかなり異なるのかもしれない。

3. 土壌粒子への DNA 吸着位置と吸着機構の推定

これまで、土壌粒子に対する DNA 分子の吸着様式が 3 つほど想定されている。まず、図 2-1-a で示した、DNA 分子末端のリン酸基が土壌のアルミ・鉄酸化物などの OH 官能基に結合するという様式が提案されている。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アルミ酸化物の OH 官能基への DNA 分子の吸着機構も同様に考えられている (Lorenz and Wackernagel, 1987; Khanna and Stotzky, 1992; Page *et al.*, 1992)。前研究 (Saeki *et al.*, 2008) で、有機物を減少させた土壌をさらに酸性シユ

表 2 有機物除去処理土壌に対する DNA 吸着量

	未処理土壌	H_2O_2 処理土壌	673K 加熱処理土壌
全炭素含量 (%)	8.25	2.17	0.03
比表面積 (N_2 -BET 法) ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) *	215	109	60.7
土壌 1 g あたり DNA 吸着量 (mg g^{-1}) **	0.32	0.80	1.28
表面積あたり DNA 吸着量 ($\mu\text{g m}^{-2}$)	1.49	7.34	21.1

* : Saeki and Matsumoto (1993) より引用

** : 図 1 のデータを引用

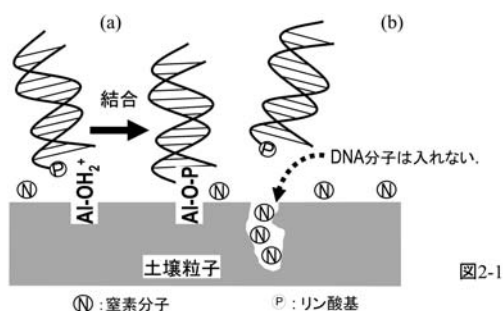


図2-1

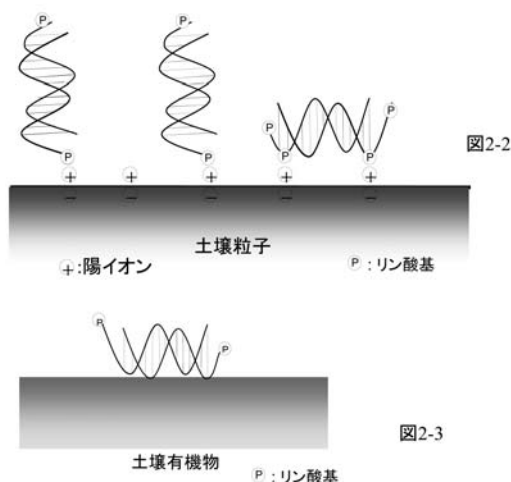


図2-2

図2-3

図2 土壌粒子に対するDNA分子の吸着の模式図

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、減少したことを示した。この吸着様式は、クロボク土のような酸化物を多量に含む土壌におけるDNA吸着の主要なものであると思われる。図2-2に示した、陽イオンを架橋として使用される層状ケイ酸塩鉱物などに対するDNA吸着形態の一つはKhanna and Stotzky (1992)とPaget *et al.* (1992)が提案している。この吸着機構は有機物の表面上でのDNA吸着にも当てはまるかもしれない。図2-3に示したような、有機物同士の接着のような吸着形態が想像できる。しかし、土壌有機物量が減少したことによって土壌に対するDNA吸着量は増加したことから、土壌有機物表面にDNA分子が直接的に結合するという可能性は小さいようだ。

H₂O₂処理と高熱処理によって、腐植物質がほとんど消失し、窒素分子が拡散できる小さい孔隙が消失して、見かけ上の表面積が小さくなった。しかし、これ

らの処理により土壌粒子へのDNA吸着量は増加した。窒素分子が拡散できる孔げきの中で、分子サイズが大きいDNA分子が入れない孔げきがあるようだ。前者の概念を図2-1-bに例示した。比表面積がかならずしもDNA吸着サイト量を反映するわけではないということ、有機物が除去されて表面に出てきた無機鉱物へDNA分子が新たに吸着したことが、この結果の原因であると想像される。Ogram *et al.* (1994)は、砂にくらべて、土では、長い断片より短いDNA断片の方が割合的にたくさん吸着したと報告し、土では、長いDNA断片は孔隙に拡散しにくいことが原因であろうと考察している。よって、土壌へのDNA吸着は、単純に粒子の表面積に量的に関係するのではなく、土壌粒子表面の質的な条件に大きく左右されるようだ。後者の原因については、前研究で示した(Saeki *et al.*, 2008)。本研究で、DNA吸着に対する土壌有機物の寄与は小さいことがわかった。対照的に、土壌構成成分の中で、非晶質鉱物であるアロフェンや酸化物がDNA吸着へ影響があり、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。これに関する研究はあまり多くない(Cai *et al.*, 2006a; Melzak *et al.*, 1996)。今後、アロフェンなどの酸化物に対するDNAの吸着を調べる必要がある。

謝 辞

本研究は、科学技術研究助成(課題番号19380044)を受けた。

ま と め

土壌中有機物の黒ボク土へのDNA吸着に対する影響を、土壌に過酸化水素(H₂O₂)処理、673K加熱処理を行うことによって検証した。H₂O₂処理を行うと、土壌中の全炭素含量は8.3から2.17%に減少した。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。673K加熱処理で、土壌中の全炭素含量は0.03%にまで減少した。673K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、ほぼ完全に黒ボク土から有機物を取り除いた673K加熱処理土壌のDNA吸着量が未処理土壌よりもはるかに高かった。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。

文 献

- Cai P, Q. Huang and X. Zhang 2006a Microcalorimetric studies of the effectes of $MgCl_2$ concentrations and pH on the adsorption of DNA on montmorillonite, kaolinite and goethite. *Appl. Clay Sci.* **32**: 147-152
- Cai P, Q. Huang, X. Zhang and H. Chen 2006b Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an alfisol. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 471-476
- Crecchio C. and G. Stotzky 1998 Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1061-1067
- Greaves M. P. and M. J. Wilson 1969 The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biol. Biochem.* **1**: 317-323
- Greaves M. P. and M. J. Wilson 1970 The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic-acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2**: 257-268
- Ikeda S, H. Tsurumaru, S. Wakai, C. Noritake and K. Fujishiro 2008 Evaluation of the effects of different additives in improving the DNA extraction yield and quality from andosol. *Microbes and Environments* **23**: 159-166
- Khanna M, M. Yoder, L. Calamai and G. Stotzky 1998 X-ray diffractometry and electron microscopy of DNA from *Bacillus subtilis* bound on clay minerals. *Sciences of soil.* **3**: 1-12
- Khanna M. and G. Stotzky 1992 Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 930-939
- Lorenz M. G. and W. Wackernagel 1987 Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 2948-2952
- Melzak K. A., G. S. Sherwood, R. F. B. Turner and C. A. Haynes 1996 Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, **181**: 635-644
- Ogram A. V., M. L. Mathot, B. J. Harsh, J. Boyle and C. A. Jr. Pettigrew 1994 Effects of DNA polymer length on adsorption to soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 393-396
- Ogram A. V., G. S. Saylor, D. Gustin and J. R. Lewis 1998 DNA adsorption to soils and sediments. *Environ. Sci. Technol* **60**: 393-396
- Paget E., L. J. Monrozier and P. Simonet 1992 Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Let* **97**: 31-40
- Pietramellara G, M. Franchi, E. Gallori and P. Nannipieri 2001 Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite. *Biol. Fertil. Soils.* **33**: 402-409
- Saeki K. 2008 The comparison of arsenic adsorptions on an andosol between arsenite and arsenate. *Soil Sci* **173**: 248-256
- Saeki K. and S. Matsumoto 1994 Influence of organic matter on selenite sorption by Andosols. *Commun Soil Sci Plant Anal.* **25**: 3379-3391
- Saeki K., M. Morisaki, and M. Sakai 2008 The effects of hydrogen peroxide and acid oxalate treatments on DNA adsorption on soils. *Microbes and Environments.* **23**: 353-355
- Stotzky G 2000 Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.* **29**: 691-705
- Takada-Hoshino Y. and N. Matsumoto 2004 An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly absorb DNA. *Microbes Environ.* **19**: 13-19

Summary

The influence of soil organic matter on DNA adsorptions on soils was investigated by using an andosol sample including hydrogen peroxide (H_2O_2) treated and 673 K heated soils. The organic matter content of the andosol was decreased from 8.2 to 2.2% by the H_2O_2 treatment. The treatment raised DNA adsorption per unit weight on soil particles, although the surface area of the treated soil was 50% of that in the original soil. The 673K heated treatment removed the organic matter from the sample to 0.03% and decreased the surface area to 30% of the original soil. Nevertheless, the DNA adsorption of the heated soil was significantly higher than that of the original soil. These results suggested little contribution of soil organic matter to DNA adsorption on the andosol.