

環境由来 DNA 配列に基づいた土壌繊毛虫群集の解析

ツンジュン・プイティカ¹, 笠原 康裕¹, 三部 光夫¹, 島野 智之^{2,3}(¹茨城大学・農学部, ²独) 東北農業研究センター・福島研究拠点, ³宮城教育大学・EEC)

Community analysis of ciliates in soil based on 18S rDNA

¹Tunjung PUITIKA, ¹Yasuhiro KASAHARA, ¹Mitsuo SANBE and ^{2,3}Satoshi SHIMANO(¹Ibaraki Univ., School of Agriculture, ²NARCT Fukushima Campus, ³EEC, Miyagi Univ. Educ.)

SUMMARY

The interaction between protozoa and bacteria in the soil is very important in agricultural systems. The beneficial effects of protozoa on plant growth have been attributed to nutrients released from the consumed bacterial biomass. However, there are few reports analyzing protozoan diversity in soils. Although culturing techniques and microscopy are commonly used, procedures for isolation of protozoa from soil have not been fully exploited. Molecular techniques offer a powerful tool, which is rapid and high throughput, for analysing the diversity of the microbial community. We designed a ciliate-specific PCR primer, and performed PCR amplification of 18S rDNA of five ciliates, three flagellates, two amoebae, four nematodes, three fungi and one yeast species. Eukaryote 18S rDNAs of all organisms were amplified using the universal primer set EU347F & EU929R (ca 582 bp in length). The PCR bands for ciliates were observed using the ciliate-specific primer set CS322F & EU929R. Unexpectedly, 18S rDNA of one of the tested ciliates (*Dileptus anser*) was not amplified, while that of *Aphelenchus avenae* (a nematode) was amplified. The DNA sequence of *A. avenae* is identical to that of the CS322F primer except for one position. The designed ciliate-specific PCR primer is therefore not completely specific for ciliates, but may nevertheless be useful to study the diversity of ciliates. To analyze the communities and diversity of ciliates, and their interaction with bacteria in the soil, we used the ciliate-specific primer and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis based on 18S rDNA.

【目的】土壌中の原生動物と細菌の相互作用は土壌生態系内で、大変重要な役割を担っていると言われていいる。根圏において、土壌性原生動物と根圏細菌との間にはmicrobial loopという物質循環系が成立しているのではないかとする仮説はClarholm (1989) によって提唱された。また、近年、さらに植物の成長に対しての原生動物の促進効果として、原生動物の摂食による細菌群集の変化により、細菌由来の植物ホルモン様物質の環境中への放出の増加による植物根の活性化があるのという仮説がBonkowski (2004) によって提唱された。しかし、このような機能の解析は十分なされていないとはいえず、また、土壌中の原生動物の多様性の解析についても十分に報告が蓄積されているとはいえない。なぜならば、土壌からの原生動物の単離方法は培養法や顕微鏡観察が、現在のところ一般的な方法であるために、土壌粒子か

らの分離が処理の簡便性を妨げることによって、十分に研究されてはいないというのが現状である。

近年、分子生物学的手法としての PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法は、生態学的観点から微生物の群集構造解析に関して、培養を経ず簡便で網羅的であるという利点を生かして、細菌等では多くの研究で利用されている実績がある（例えば Hammen, Mooij, Gons and Laanbroek, 1999 など）。本報告では、本法を土壌中の繊毛虫の群集や多様性、細菌間との相互作用を解明するために用いることを試みた。

【方法】繊毛虫特異的プライマーの配列を決定するために、EMBL/GenBank/NCBIからの繊毛虫、べん毛虫、カビ、酵母、植物の18S rDNAをアライメントした。その結果、繊毛虫特異的プライマーを設計し

た。このプライマーを“CS322F”と名づけた。設計したCS322Fの有効性の確認のために、5種の繊毛虫、3種のべん毛虫、2種のアメーバ、4種のネマトーダ、3種のカビ、1種の酵母を対象に、リバースプライマーを真核生物ユニバーサルプライマー(EU929R)としてPCR増幅を行った。

家畜堆肥を投与した土壌から粗DNAの単離・精製を行った。単離には“ISOIL for beads beating”(ニッポンジーン社)のキットを用い、定法によりGCクランプを付けたプライマーを用いてPCR増幅を経て、DGGE解析を行った。

【結果と考察】 真核生物ユニバーサルプライマーのみ(EU347F & EU929R)を用いた場合、すべての種において目的とする長さのPCR産物が得られた。しかし、繊毛虫特異的プライマーをフォワードプライマーとして用いた場合は、ほとんどの場合は繊毛虫で目的のPCR産物が得られた。ただ例外として、繊毛虫の1種類は配列が完全一致にもかかわらず増幅しなかった(*Dileptus anser*)。さらに線虫の1種

(*Aphelencus avenae*)においてPCR産物が確認された。

土壌中の細菌と繊毛虫(真核生物)の群集解析のためおこなったDGGE解析では、種々のバンドが確認された。また、繊毛虫(真核生物)においては、変性剤の濃度を変えることによりDGGE解析が可能であることが分かった。塩基配列によって今回設計した繊毛虫特異的プライマー“CS322F”は繊毛虫の構造解析や多様性解析において使用する異は可能であると思われる。今後は、非特異的PCRの除去や、土壌からの繊毛虫DNAの抽出効率の改善など課題は残されているものの、繊毛虫の群集構造や細菌との相互作用の解明を進めてゆきたい。

【文献】

- 1) Bonkowski (2004) New Phytol., 162, 617-638.
- 2) Clarholm (1989) Biol. Fertul. Soils, 8, 373-378.
- 3) Hammen, Mooij, Gons, and Laanbroek (1999) Appl. Environ. Microbiol., 63, 2478-2484.