

## クローン解析による土壌繊毛虫相の解析の試み

三部 光夫<sup>1</sup>, 島野 智之<sup>1</sup>, 笠原 康裕<sup>2</sup>, 橋本 知義<sup>3</sup>, 高橋 忠夫<sup>4</sup>  
 (<sup>1</sup>宮教大・EEC, <sup>2</sup>北大・低温研, <sup>3</sup>九州沖縄農研センター, <sup>4</sup>西九州大・生物)

## Soil ciliate diversity studied in upland soil using SSU rRNA gene cloning

Mitsuo SANBE<sup>1</sup>, Satoshi SHIMANO<sup>1</sup>, Yasuhiro KASAHARA<sup>2</sup>, Tomoyoshi HASHIMOTO<sup>3</sup> and Tadao TAKAHASHI<sup>4</sup> (<sup>1</sup>EEC, Miyagi Univ. of Education., <sup>2</sup>Inst. Low Temp. Sci. Hokkaido Univ., <sup>3</sup>NARC Kyushu-Okinawa Reg., <sup>4</sup>Biol. Lab. Nishikyushu Univ.)

## SUMMARY

We compared the results of phylogenetic sequence analyses based on SSU rDNA cloning of soil ciliates in environmental DNA of upland soil using a specific primer and the culturing and microscopy technique. Using large-scale sequence analysis, this study found more taxon groups and species than the culturing and microscopy technique. The results suggest that SSU rDNA cloning with a specific primer can be applied to elucidate soil ciliate diversity. However, the SSU rDNA cloning could not detect the Nassophorea taxon group, which was detected using the culturing and microscopy technique.

【目的】我々は土壌から直接抽出した DNA (環境 DNA) を用いて分子生態学的解析による, まずは原生生物相の解明を目指し, 遺伝学的に単系統群を形成する繊毛虫をターゲットに解析を試みている。環境 DNA には, 原核生物など, 他の生物群の DNA も当然ながら多く含まれているため, 原生生物由来の DNA の増幅が阻害されてしまう可能性がある。そこで, 真核生物ユニバサル・プライマーを用いて SSU rDNA の増幅を行った後, 我々が作成した繊毛虫特異的プライマー(Tunjang et al., 2007) による Nested PCR を用いて解析を試みた。昨年度の大会では, この特異的プライマーを用いた分子生態学的手法によって, どの程度の系統群の数を検出できるかを, パイロット試験的に各処理区, 24 クローンを解析して検討した。クローン解析の結果は, 培養法である MPN-SIPs 法 (高橋ほか 2003) によって得られた結果との比較検討では (三部ほか 2007), クローン解析は, MPN-SIPs 法と同程度の数の網の検出が可能であった。しかし, 環境 DNA を用いた分子生態学的手法によって, 土壌繊毛虫相の動態が十分に解析できるかどうかを確認するためには, より多くのクローン数を解析する必要があることも同時に示唆された。そのため, 今回はより大規模なクローン解析を行い, 得られた結果からクローン解析によって土壌繊毛虫相の多様性の解析が可能かどうかを検討した。

【材料と方法】供試土壌: 土壌試料は, 15 年以上, 同じ圃場管理が行われている宮崎県都市九州沖縄農業研究センターの実験圃場の 4 区画から 2005 年度, 2006 年度に表層土を採取し, 合計 8 処理区とした。1 年あたり 4 処理区の各々における家畜スラリー投与量は 0 t, 60 t, 150 t, 300 t (ha<sup>-1</sup>) であった。土壌は 5 mm のふるいを通してから, 実験に供試するまで 4°C

で保存した。

環境 DNA の抽出及びクローンライブラリーの作成: 土壌試料約 0.5 g をマイクロチューブに入れ, 液体窒素と 65°C のウォータバスを用いて凍結融解処理を 3 回繰り返した。その後, 超音波洗浄器 (100 W) に 5 分間投与し, 土壌 DNA 抽出キット ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) をもちいた。キットのプロトコールに従って, ビーズ粉碎と DNA 抽出を行った。抽出後, PEG 6000 を用いて得られた DNA を精製した。真核生物ユニバサル・プライマー (EU60F 及び EU929R) を用いた PCR 増幅の後, 繊毛虫門に特異的なプライマー (CS322F) 及び EU929R を用いて, Nested PCR を行い, クローンライブラリーを作成した。

シークエンスと塩基配列の解析: シークエンスによって得られた全ての塩基配列について BLAST 検索を行ない, 繊毛虫門以外の塩基配列をこれらより除いた。検出された繊毛虫門に所属すると思われる塩基配列の遺伝的な多様性を解析するために ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997), PHYLIP 3.6 パッケージ (Felsenstein, 1989) の DNADIST を用いて, アライメント, 遺伝的距離行列の計算を行った。OTU (operational taxonomic unit) のグループ化には, 一般的にいわれているように 97% 以上の類似性をもつ rDNA の塩基配列同士を, 同じ種として扱う条件を用いた。得られた繊毛虫の塩基配列間の遺伝的距離行列に関して, DOTUR 1.53 (Schloss and Handelsman, 2005) を用いて, 塩基配列を各 OTU にまとめた。

【結果と考察】クローンライブラリー解析により得られた約 910 の全塩基配列を BLAST 検索した結果, 繊毛虫以外の生物だと考えられる塩基配列は全体のわずか 4% であった。このことから本プライマーが, 環境 DNA を用いた分子生態学的手法による, 土壌繊毛

虫の選択的な解析に、有効であることが示唆された。検出された繊毛虫の塩基配列の約 870 を OTU にまとめた結果、全ての OTU 数は約 100 となり、昨年度報告した解析 (約 60 OTU) の 1.7 倍の OTU 数が検出された。検出された綱は昨年度の解析よりも 1 綱 (Prostomatea) 多く、これを含めて、Spirotrichea, Colpodea, Litostomatea, Oligohymenophorea, Heterotrichea, Phyllopharyngea, の合計 7 綱の繊毛虫 に属する塩基配列を得た (綱の定義は, Lynn (2003) に基づいた)。また, MPN-SIPs 法のみで検出された Nassophorea 綱は, 今回のクローン解析でも検出されなかった。クローン解析では, Spirotrichea, Colpodea 綱が優占的に検出された。その結果は MPN-SIPs 法と一致し, これらの繊毛虫が, 今回解析した土壌における主要な構成種であることがいずれの方法からも示唆された。

大規模なクローン解析の結果では, 全体の平均として, 約 0.5 g の土壌あたりに約 25 種の土壌繊毛虫を検出したことになる。一方, MPN-SIPs 法では, 全体の平均として 1 g の土壌あたりに約 17 種の土壌繊毛虫を検出したことになる。以上の結果より, 環境 DNA を用いた分子生態学的手法は, 土壌繊毛虫の多様性の有効な手段となりうることが示唆された。ク

ローンライブラリー解析は, コストや時間を要するが, 土壌試料を得た畑土壌の土壌繊毛虫類に関する情報を蓄積することができた。次の段階として, 今回得られた膨大な土壌繊毛虫の塩基配列情報に基づき, より迅速な群集解析法である PCR-DGGE 法 (三部ほか 2007) を用いることで, 土壌環境中の繊毛虫群集の動態を明らかにしていきたいと考えている。

#### [文献]

- 1) Tunjung, P. et al. (2007) *Microb. Environ.*, 22, 186-189.
- 2) 三部光夫 ほか (2007) *日本原生動物学雑誌*, 40, 41-42.
- 3) 高橋忠夫 ほか (2003) *日本原生動物学雑誌*, 36, 18-19.
- 4) Lynn, D. H. (2003) *Europ. J. Protistol.*, 39, 356-364.
- 5) Thompson, J. D. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.*, 24, 4876-4882.
- 6) Felsenstein, J. (1989) *Cladistics*, 5, 164-166.
- 7) Schloss, P. D. and Handelsman, J. (2005) *Appl. Environ. Microb.*, 71, 1501-1506.
- 8) 三部光夫 ほか (2007) 第 20 回日本微生物生態学会講演要旨集, p. 189.