

栽培土壌の T-RFLP 解析法の確立とメタゲノム解析

生命工学科 教授
澤 嘉弘

研究成果の概要

本研究は、複雑な微生物群集構造を持つ栽培土壌の簡便な真菌群集構造の解析を目的に、クローン化ライブラリーで真核生物種を同定し、18S-T-RFLP の最適化を試みたものである。必要な 18S-rDNA 解析用データベース、アナライザーソフトウェアについても同時に開発を行った。なお、細菌群集構造については次世代シーケンサーによるメタゲノム解析で決定を行った。

データベースの Hit 率を参考に、18S-rDNA の V4-5 (RI) 領域と V7-8 (RII) 領域を標的とする T-RFLP プライマーを設計した。ISOIL for Beads Beating を用いて DNA 抽出を行った。

ダイコン栽培土壌サンプル由来の 318 クローンのシーケンス解析により 141 種（真菌 55 種、アメーバ 3 種、高等植物 16 種、ミミズ・線虫・昆虫 17 種、その他 39 種）の真核生物を同定した。

最適条件下で 12 種の 4 塩基認識制限酵素処理の T-RFLP 解析を行ったところ、RI では、*TspI*、*MseI* が、RII では *AluI*、*HhaI* が最適という結果となった。アナライザーを用いて、これら4種の制限酵素で Hit した菌種の積集合による絞込みを行ったところ、クローン化ライブラリーで同定した 141 種中 83 種 (Animal:14, Fungi:46, Plant:14, Others:9)を確認することができた (Hit 率 60%)。特に真菌では 55 種中 40 種(72%)と高い検出率を示したことから、T-RFLP 法は土壌中の真菌群集構造解析に有用であると思われたが、現状ではまだノイズも多く、今後、より精密な絞込み条件の検討が必要とされる。

トマト（果菜類・双子葉・ナス科）、ダイコン（根菜類・双子葉・サトイモ科）栽培土壌のメタゲノム解析で、それぞれ 1131 種、1295 種、1273 種の細菌を同定した。3 種栽培土壌の Top6 属の存在比やデンドログラム解析で示されるように、ダイコンとサトイモは比較的良好似た細菌群集構造を持っていた。メタゲノム解析はその情報量と決定精度で他を圧倒しているが、解析は容易ではなく、分析コストも問題である。

社会への貢献・その他

土壌微生物群集構造動態の詳細を明らかにすることで、土壌微生物を指標とした管理指針（作物生産性向上、効率施用によるコスト削減、病害防除、温室効果ガス発生抑制等）の作成などに活用されることが期待される。

