

04-063

E

月山弥陀ヶ原湿原池塘における細菌の菌叢解析

○松田 潤、森田 孝平、服部 聰

山形大農

【目的】月山は山形県のほぼ中央に位置し、非常に積雪が多く、年間を通じ低温かつ高水分条件を維持した環境である。標高 1400~1500m には弥陀ヶ原湿原が広がり、湿原内には池塘が点在している。池塘は高層湿原ができる際に泥炭の堆積に雪解け水や雨水が蓄積して形成されたものであり、底部の泥炭は嫌気的かつ酸性環境にあることから、特有の微生物相が形成されていることが予想される。しかし、弥陀ヶ原湿原池塘においては、これまでに微生物学的な研究は全く行われていない。そこで、本研究では月山弥陀ヶ原湿原池塘の泥炭部に存在する真正細菌の菌叢解析を行うことを目的とした。

【方法】弥陀ヶ原湿原に点在する池塘のうち、任意の 1 箇所から泥炭をサンプルとして採取し、DNA の抽出を行った。これを錠型として真正細菌 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用い、PCR 増幅を行った。増幅断片をプラスミドベクターと大腸菌を用いてクローニングし、DNA シーケンサーで塩基配列約 500 bp を決定後、分子系統解析を行った。

【結果】真正細菌 16S rRNA 遺伝子 32 クローンの塩基配列解析を行った結果、系内に最も多く見いだされたクローンは、*Proteobacteria* 門の *Deltaproteobacteria* 級に近縁であることが明らかになった。また、主に *Actinobacteria* 門、*Planctomycetes* 門、*Acidobacteria* 門、*Verrucomicrobia* 門に近縁な配列を有したクローンが見いだされた。以上の結果から、弥陀ヶ原湿原池塘泥炭中には多様な真正細菌が存在している可能性が示唆された。

hats@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

04-064

E

生細菌群集構造解析のための環境試料由来 RNA 抽出方法の検討 2

○富田 順子、下村 謙悟、中村 葵、久田 貴義、西島 美由紀

(株)テクノスルガ・ラボ

【背景・目的】近年、RNA を用いた群集構造解析が注目されているが、各種環境試料に適応可能な RNA 抽出手法は未だ確立されておらず、解析手法が異なる試料間の比較評価が難しいのが現状である。我々は先の報告で市販 RNA 抽出キットによる各種土壤からの RNA 抽出方法を検討しているが、全種類に適応するキットはなかった。本研究では、各種環境試料について適応可能で且つ簡便な RNA 抽出方法の開発を目的とし、主に RNA 精製法の検討を行った。

【方法】土壤、糞便等から、フェノール或いはクロロホルム法により核酸を抽出し、市販 RNA 精製用カラムおよび超遠心により RNA を精製し、RNA の収量および精製度を調べ、得られた RNA を錠型として 16S rRNA (V3 領域)の RT-PCR-DGGE を行った。同時に、同一試料の DNA による PCR-DGGE を行い両者を比較した。

【結果および考察】カラム精製法による RNA の収量は、各試料において比較的高かった。土壤や糞便など夾雑物の多い試料では精製度は低いものの、二度精製を行うことにより殆どの試料について RT-PCR 増幅産物が得られた。一方、超遠心精製法による RNA の精製度は比較的高く、糞便ではカラム法と同等の RNA の収量であったものの、土壤では RNA の収量が低く、RT-PCR 増幅産物が得られない場合もあり、RNA の収量を増やすための検討が必要と考えられた。カラムおよび超遠心精製法による RT-PCR-DGGE は同一パターンを示し、手法としても簡便であるため、これらの精製法が環境試料の生細菌群集構造解析の評価において適応可能であることが示唆された。

junko.tomita@tecsrg.co.jp