

PB-013

SIP (Stable Isotope Probing) 法を用いた三宅島火山灰堆積物における微生物群集構造の解析

○佐藤 桃子¹、藤村 玲子²、佐藤 嘉則¹、上條 隆志¹、太田 寛行¹
¹茨城大・院農、²東京大・大気海洋研究所、³東京文化財研究所、⁴筑波大・院生命環境、⁵茨城大・農

初成土壌生成の初期段階においては、独立栄養微生物による窒素と炭素の固定が重要であると考えられている。我々の先行研究では、¹⁵N-SIP (Stable Isotope Probing)法を用いて、三宅島2000年噴火火山灰の初成土壌微生物生態系を解析し、独立栄養性の鉄酸化細菌が窒素の固定に寄与していることを示された。本研究では、さらに三宅島火山灰堆積物における炭素固定微生物を明らかにすることを目的とし、¹³C₂O₂を使用した¹³C-SIP法による解析を行った。2011年9月に、三宅島雄山山頂付近に位置するOY地点より採取した火山灰堆積物試料の一定量をバイアル瓶にとって密栓し、バイアル瓶の気相をN₂:O₂:¹³C₂O₂ (80:20:1)に置換して、0、5、7日間、30℃で培養した。培養後、試料からDNAを抽出し、CsClの密度勾配遠心処理を行って、¹³C-DNA画分を回収した。¹³C-DNA画分はT-RFLP法により解析し、先行研究で行ったクローンライブラリー解析の結果からT-RFsを同定した。その結果、独立栄養性の鉄酸化細菌である *Acidithiobacillus ferrooxidans* と *Leptospirillum ferrooxidans* に由来すると同定されるT-RFsが検出された。そして、培養に伴いそのT-RFsの存在割合が高くなることも確認された。これらの結果から、鉄酸化細菌、*A. ferrooxidans* と *L. ferrooxidans* がモデル実験系での炭素固定細菌であることが示唆され、三宅島の初成土壌生態系で炭素蓄積に寄与していることが推察された。

Key words: Volcanic ash deposit, Iron-oxidizer, SIP
 E-mail: 12am206g@acs.ibaraki.ac.jp

PB-015

農耕地eDNAデータベース (eDDASs) におけるDGGEのバンドマッチングパラメータの決定

○松下 裕子¹、包 智華¹、久原 哲¹、森本 晶¹、長瀬 陽香¹、吉田 重信¹、對馬 誠也¹
¹農環研、²東北大院生命科学、³九大院農、⁴北農研

演者らは、全国各地の農耕地土壌の理化学性、生物性（細菌・糸状菌・線虫DGGEデータ）および栽培管理情報を蓄積した農耕地eDNAデータベース「eDDASs」を開発している。この「eDDASs」において、より客観的な比較解析のためには、バンドマッチングでのバンド位置の異同を判断するための最適なパラメータを決定する必要がある。そこで、DGGEのバンドパターン解析に最適なバンドマッチングパラメータの決定を試みた。まず、一つの土壌DNA由来の同じPCR産物を全ウェルにロードして、細菌・糸状菌・線虫相それぞれのDGGEを10回ずつ行った。得られたDGGE画像のバンド位置を標準化し、バンド位置の変動程度（標準偏差:SD）を算出した。これらの算出データを基に正規性を検定した結果、バンド位置の変動が正規分布に従うことが確認され、バンド位置の平均値±2SDの範囲に95%の確率で変動が収まることが明らかとなった。この結果を踏まえ、これまで蓄積してある細菌2,522点、糸状菌2,542点、線虫861点の土壌サンプルの解析データから、出現バンドの割り当て基準となる相対移動度 (R_{rel}) とその誤差範囲（±2SDに相当するR_{rel}値）を決定した。このバンドマッチングパラメータを用いることで、多サンプル間のDGGEバンドパターンの比較解析をデータベース上で行うことが可能となった。

Key words: DGGE, band position, bandmatching, eDDASs
 E-mail: yuhko@affrc.go.jp

PB-014

氷河堆積物環境における微生物群集の活性および群集形成に寄与する地球化学的要因

○山本 京祐¹、Hackley Keith C.^{2,5}、Kelly Walton R.³、Panno Samuel V.²、関口 勇地⁴、Sanford Robert A.⁵、Liu Wen-Tso⁶、鎌形 洋一¹、
 玉木 秀幸^{1,6}
¹産総研・生物プロセス、²イリノイ州立地質調査所、³イリノイ州立水質調査所、⁴産総研・バイオメディカル、⁵イリノイ大・地質、⁶イリノイ大・工

【目的】氷河堆積物は高緯度地域に広く分布する地下環境の一つであり、泥炭などに由来する有機物が多く含まれる。このことから氷河堆積物中における生物活動（メタン生成など）が物質循環に大きく寄与する可能性が指摘されているものの、微生物生態学的知見は非常に少ない。そこで本研究では、米国イリノイ州の氷河堆積物を対象に、微生物群集構造解析によって特徴的な系統群や群集組成を調べるとともに、各種地球化学的パラメータとの多変量解析によって群集形成に寄与する化学的要因についても知見を得ることを目的とした。【方法・結果】イリノイ州東部の氷河堆積物中に形成されているMahomet帯水層から地下水を採取し（帯水層西部、中央部および北東部の13地点）、化学成分分析とDNA/RNA抽出後にIllumina MiSeqによる16S amplicon sequenceを実施した。ほとんどのサンプルでDNAおよびRNAベースの群集構造解析結果がよく一致し、検出された系統群は一定の生物活性を有すると考えられた。主要な系統群として、嫌気性のDeltaproteobacteriaに属する硫酸還元菌やメタン生成アーキア、および（微）好気性の鉄酸化細菌やメタン酸化菌、メチル酸化菌が広く検出された。各種統計解析によって各群集間の構造比較や群集組成と化学パラメータとの相関を評価したところ、各群集は地域ごとに類似した構造となっており、メタン発生が顕著な西部では有機物が多く、硫酸還元菌が多く検出された北東部では硫酸濃度が高いなどの特徴がみられた。このように生物活性・機能と化学的要因がよく一致した群集組成がみられたことから、氷河堆積物における微生物群集形成にはこれらの地球化学的要因が強く寄与していると考えられた。

Key words: glacial deposits, terrestrial subsurface, geochemistry, Illumina
 E-mail: k.yamamoto@aist.go.jp

PB-016

イネ由来の新鮮有機物を利用する水田土壌の真核微生物群集の解析

○村瀬 潤¹、南 寿子²、李 勇³、渡邊 健史¹、浅川 晋¹、木村 真人⁴
¹名古屋大・院生命農、²名古屋大・農、³Coll Environ Nat Resour Sci, Zhejiang Univ、⁴農林水産消費安全技術センター

【はじめに】水田土壌に供給される植物由来有機物には、植物遺体の他、土壌に鋤き込まれる雑草やイネ根からの脱落細胞などの「新鮮な」有機物があり、土壌に供給される植物由来有機物の20~60%を占めている。本研究では、新鮮有機物のモデルとして¹³Cで標識したイネカルスを土壌に添加し、嫌気および好気条件の水田土壌におけるカルスの分解・利用に関与する真核微生物群集をDNA-SIP法により解析した。【方法】愛知県安城農業技術センターより採取した水田土壌に¹³C標識したカルス（ユキヒカリ）を添加（20 g/kg乾土）し、好気条件あるいは嫌気条件で培養した。経時的に採取した土壌からDNAを抽出後CsCl密度勾配遠心により分離し、18S rRNA遺伝子を対象としたPCR-DGGE法により、真核微生物群集の解析を行った。【結果と考察】分画前のDNAを用いた解析では、好気条件でカルス添加による真核微生物群集全体の变化が観察されたのに対し、嫌気条件ではカルス添加が真核微生物群集に及ぼす影響は見かけ上観察されなかった。一方、いずれの条件においても¹³C標識されたDNA画分からPCR増幅が認められた。好気条件では主にMucoromycotina、Zoopagomycotinaに属する糸状菌および卵菌がカルス炭素を利用しており、培養後半にはアメーバによるカルス炭素の利用が確認された。嫌気条件ではBasidiomycotaに属する糸状菌およびCercosozoa鞭毛虫によるカルス炭素の利用が認められた。以上のことから、酸素条件によって異なる真核微生物が、分解者、細菌捕食者としてカルス由来の分解・利用に関与することが示唆された。

Key words: Callus, DNA-SIP, Protists, Paddy soil
 E-mail: murase@agr.nagoya-u.ac.jp