

植物根圏における細菌キチナーゼ遺伝子多様性解析

○池田成志¹、伊藤 希^{1,2}、江面 浩^{1,2}、藤村達人^{1,2}¹筑波大学・遺伝子、²筑波大院・生命環境科学研究科

Molecular diversity of bacterial chitinase genes in rhizospheric soils

Seishi Ikeda¹, Nozomi Ytow^{1,2}, Hiroshi Ezura^{1,2}, and Tatsuhito Fujimura^{1,2}¹Gene Research Center, University of Tsukuba,²Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,

Key words: bacterial chitinase, rhizosphere, biodiversity

【目的】根圏から分離された細菌類が生産するキチナーゼは主要な植物病原糸状菌類に対して細胞壁溶解活性を持つことから、これまでにキチナーゼ生産性細菌や細菌キチナーゼ遺伝子を利用した植物病害防除が検討されている。しかしながら、これらの研究は人工培地上でのキチナーゼ活性や抗糸状菌活性を指標とした根圏からの培養が可能な細菌類についてのものである。一方、天然環境中には多くの難培養性微生物が存在することが近年明らかとなる中で、多様な環境における新規のキチナーゼ生産性細菌類の存在も分子生態学的手法で明らかにされつつある。そこで本研究では根圏土壌 DNA を分析することにより難培養性細菌類も含めた細菌キチナーゼ遺伝子群の根圏における遺伝子多様性を検討した。

【方法】2003年7月に筑波大学附属実験圃場にキク [*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] (品種「秋芳の力」)の幼苗を移植し、2004年6月に根系を採取した。根系を分離後、軽く振とうすることにより得られた土壌 (0.5g) を非根圏土壌とした。根圏土壌は根系を滅菌水で水洗後、約5cmの根端5本 (約0.25g) をマイクロチューブに詰めて回収した。土壌DNAの抽出は市販キット (FastDNA SPIN Kit for soil, Qbiogene) を使用することにより行った。Williamsonら (1) により報告されているプライマーセットを用いて根圏及び非根圏の土壌DNAを鋳型としてPCRを行い細菌キチナーゼ遺伝子の増幅を試みた。予想サイズのPCR産物 (約400bp) が得られるようにPCR条件を改変した後、蛍光プライマーを使用して得られたPCR産物を制限酵素処理することにより細菌キチナーゼ遺伝子のT-RFLP解析を試みた。

【結果および考察】細菌キチナーゼ遺伝子の T-RFLP 解析の結果、非根圏土壌サンプルとの比較から根圏土壌サンプルにおいて優先化していると考えられる DNA 多型が検出された。さらに全国各地の耕作土から得られた土壌 DNA を用いて同様の検討を行った結果、広範囲の土壌サンプルにおいて安定して存在する細菌キチナーゼ遺伝子群の存在が示唆された。

1) Williamson, N. *et al.*, 2001. *Antonie Leeuwenhoek* 78:315-321.

池田成志 Seishi Ikeda: sikeda@gene.tsukuba.ac.jp