九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

日本産大型ミミズ腸内細菌群集構造のPCR-DGGE法による特徴付け

中村, 和徳
九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻土壌微生物学研究室

酒井, 謙二
九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室

https://doi.org/10.15017/13162

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 63 (2), pp.125-132, 2008-10-29. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第63巻　第2号　125-132　(2008)

日本産大型ミミズ腸内細菌群集構造のPCR-DGGE法による特徴付け

中　村　和　徳[1]・酒　井　謙　二*[2]
九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室
(2008年6月27日受付，2008年7月16日受理)

Characterization of Dominant Bacteria in Japanese Earthworm Gut Microbiota by PCR-DGGE

Kazunori NAKAMURA[1] and Kenji SAKAI*[2]
Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production,
Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒　　言

土壌動物の中で大型ミミズはDarwin（1881）が長期に亘る観察を発表して以来最も研究がなされている動物群である．大型ミミズは土壌の物理性・化学性・生物性に大きな影響を及ぼす重要な土壌生物の一つであり，それら影響の多くは土壌の摂食と排糞の際の微生物作用を介して行なわれ，大型ミミズと土壌微生物との関係については数多くの研究がなされてきた(Brown, 1995；Lavelle, 1995)．大型ミミズの腸内では周辺土壌よりも多くの菌数が検出されることが複数の研究者により報告されており（Pedersen and Hendriksen, 1993；Schönholzer *et al.*, 1999；Schönholzer *et al.*, 2002；Wolter and Scheu, 1999)，ミミズ腸内は微生物にとって好ましい生育環境のようである．土壌では全細菌群集の10％以下しか分析できていないと言われており（Torsvik *et al.*, 1990)，培養を経ない分子生物学的手法が多々開発され，利用されている（Nocker *et al.*, 2007)．大型ミミズ腸内微生物群集構造の解析でもCloningを用いた方法（Singleton *et al.*, 2003)，terminal restriction fragment length polymorphism（T-RFLP）を用いた方法（Egert *et al.*, 2004）などがなされており新たな知見が加えられている．しかしながら，これまでの研究は*Lumbricus rubellus*（Singleton *et al.*, 2003）や*L. terrestris*（Egert *et al.*, 2004）などの西欧に主に生息する特定のLumbricidaeについてのみの研究がなされてきた．日本においては西欧であまり見られないMegascolecidaeが優占していることが知られており（青木，1973；山口，1967)，日本における自然生態系中の大型ミミズ－微生物の相互関係を明らかにするためにはMegascolecidaeの優占種においても知見を増やす必要がある．

そこで本研究では，放牧用草地に棲息するMegascolecidaeに属する*Pheretima hilgendorfi*（MICHAELSEN, 1892）とLumbricidaeに属し，日本固有種の*Allolobophora japonica*（MICHAELSEN, 1892）の腸内細菌群集構造を周辺土壌と比較しながら遺伝子増幅反応物の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動による分析法（PCR-DGGE）を用いて解析しその特徴について調査した．このように同じ棲息場所におけるMegascolecidaeとLumbricidaeを比較しながら大型ミミズ腸内細菌群集構造を詳細に解析した報告は始めてである．

[1]九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻土壌微生物学研究室
[2]九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座土壌微生物学研究室
[1]Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Department of Plant Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University
[2]Laboratory of Soil Biology & Biochemistry, Division of Soil Science & Plant Production, Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University
*Corresponding author（E-mail: kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

材 料 と 方 法

1．試料の採取

実験に供した大型ミミズは愛媛県松山市において2006年３月29日及び６月１日に採取された．大型ミミズの同定は形態観察によって行なった（大淵・山口，1965；中村，1999）．ハンドソーティング法によって採取された大型ミミズは速やかに実験室に運ばれ腸内容物を採取された：滅菌脱塩水で体表面を洗浄後，腸内容物を搾り出した（Márialigeti, 1979）．周辺土壌0.5g を２ml 容ネジロマイクロチューブに採取し，－20℃で保存した．また，新鮮糞は洗浄した大型ミミズを滅菌したガラスシャーレに入れて一晩置き，排糞することによって採取された（Furlong *et al.*, 2002）．全て滅菌した２ml 容ネジロマイクロチューブに採取し，直ぐに－20℃で保存した．表１に本実験で用いた大型ミミズの種名，採取時期，及び採取地点などについて示した．

2．DNA の抽出

試料中の DNA 抽出は以下のように行なった（Matsuka *et al.*, 2003；Sakai *et al.*, 2004）．0.5g 以下の試料を入れた２ml 容ネジロマイクロチューブに１ml の120mM sodium phosphate buffer（pH

表１　供試試料

試料形態	種類名	個体数	発育段階	採取日	採取地点
腸内容物	*Allolobophora japonica*	5	成体＋幼体		March-1(M-1)
腸内容物	*A. japonica*	5	幼体		March-2(M-2)
腸内容物	*A. japonica*	6	成体＋幼体		March-3(M-3)
腸内容物	*A. japonica*	7	成体＋幼体		March-4(M-4)
腸内容物	*A. japonica*	3	成体＋幼体		March-5(M-5)
腸内容物	*Pheretima hilgendorfi*	9	幼体	2006/3/29	March-5(M-5)
周辺土壌	－	－	－		March-1(M-1)
周辺土壌	－	－	－		March-2(M-2)
周辺土壌	－	－	－		March-3(M-3)
周辺土壌	－	－	－		March-4(M-4)
周辺土壌	－	－	－		March-5(M-5)
腸内容物	*A. japonica*	1	成体		June-1(J-1)
腸内容物	*A. japonica*	1	成体		June-2(J-2)
腸内容物	*A. japonica*	1	成体		June-3(J-3)
腸内容物	*A. japonica*	1	成体		June-6(J-6)
腸内容物	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-1(J-1)
腸内容物	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-2(J-2)
腸内容物	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-4(J-4)
腸内容物	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-5(J-5)
腸内容物	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-6(J-6)
新鮮糞	*A. japonica*	1	成体		June-1(J-1)
新鮮糞	*A. japonica*	1	成体		June-2(J-2)
新鮮糞	*A. japonica*	1	成体		June-3(J-3)
新鮮糞	*A. japonica*	1	成体	2006/6/1	June-5(J-5)
新鮮糞	*A. japonica*	1	成体		June-6(J-6)
新鮮糞	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-1(J-1)
新鮮糞	*P. hilgendorfi*	1	成体		June-2(J-2)
新鮮糞	*P. hilgendorfi*	1	成体		June-4(J-4)
新鮮糞	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-5(J-5)
新鮮糞	*P. hilgendorfi*	1	幼体		June-6(J-6)
周辺土壌	－	－	－		June-1(J-1)
周辺土壌	－	－	－		June-2(J-2)
周辺土壌	－	－	－		June-3(J-3)
周辺土壌	－	－	－		June-4(J-4)
周辺土壌	－	－	－		June-5(J-5)
周辺土壌	－	－	－		June-6(J-6)

8.0）を加え撹拌した後，8000×g で10分間遠心し，上澄みを捨てることで洗浄した．再度，1 ml の120 mM sodium phosphate buffer を加えて，同様に洗浄を行なった．試料を入れた 2 ml 容ネジロマイクロチューブに glass beads（φ：2.5mm，0.06g；φ：1.0mm，0.3g；BioSpec Products, Bartesville, OK, USA），zirconia/silica beads (φ：0.5mm, 0.4g；φ：0.1mm，0.4g；BioSpec Procucts, Bartesville, OK, USA），SDS lysis mixture（100mM NaCl, 500mM Tris-HCl（pH 8.0），10％SDS）400 μl，120mM sodium phosphate buffer（pH 8.0）300 μl，及び phenol-chloroform- isoamylalcohol（25：24：1，pH 8.0）400 μl を添加した．MINI-BEADBEATER（BioSpec Products, Bartesville, OK, USA）を用いて，5,000rpm，30秒間の振盪処理により細胞を破壊した．その後，8000×g，3 分間室温で遠心分離し，水層中の DNA をエタノール沈殿法にて精製濃縮した後，GENECLEAN® Turbo Kit（Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA）を用いて精製した．

3．PCR 増幅

抽出された DNA（約10ng）を forward primer 357f-GC（5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'）と reverse primer 518r（5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'）で PCR 増幅した（Muyzer *et al.*, 1993）．PCR 反応液は，終量25 μl 或いは50 μl となるように20pmol の各 primer と Premix Taq［Ex Taq Version］（TaKaRa, Otsu, Japan）を混合して調製した．各サンプルは thermocycler を用いて，以下に示す反応条件で増幅した：94℃ 3 分（1 cycle）；52℃ 1 分，72℃ 1 分，94℃ 1 分（30 cycle）；52℃ 1 分，72℃10分（1 cycle）．PCR 産物は1.5％アガロースゲルを用いて電気泳動後，EtBr 溶液にて染色し，脱染色後234bp のバンドの増幅を確認した．

4．DGGE

DGGE は DCodeTM ユニバーサルミューテーション検出システム（Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用いて行った．PCR 反応液（5 μl）は30～50％の DNA 変性剤濃度勾配（7 M 尿素及び40％ホルムアミドの濃度を100％変性剤濃度とした）をつけた 8 ％アクリルアミドゲルで泳動された．電気泳動は 1 ×TAE 中で60℃，200V で 5 時間行なわれた．泳動終了後，ゲルを SYBR Green I（Molecular Probes, Eugene, OR, USA）で30分間染色し，UV 照射下で写真撮影をした．

5．DGGE バンドの切り出しとシークエンス解析

DGGE ゲルからのバンドの切り出しは，滅菌したパスツールピペットを用いて行なわれた．切り出されたゲルは50 μl の TE が入ったマイクロチューブに移され，一晩 4 ℃で静置された．先に述べた方法で再 PCR 増幅反応を行ない，DGGE を用いて目的のフラグメントの確認が行なわれた．

切り出された目的の PCR 産物はシーケンスのために forward primer 357f-GC と reverse primer T7518r（5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCG GCT GCT GG-3'）を用いて再増幅された．PCR 条件は先に述べたとおりである．PCR 産物は QIAquick® PCR Purification Kit（QIAGEN GMBH, Hiden, Germany）で精製後，dye terminator 法にてシーケンス反応された．一部の切り出されたバンドは TA cloning 後にシーケンス解析された（Sakai, 2000）．

解析された配列は BLAST algorism を用いて DDBJ/EMBL/GeneBank DNA データベース（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）で相同性検索された．

結　　果

1．放牧用草地から採取された試料

2006年 3 月の採取では体長が小さい幼体の *P. hilgendorfi* しか得られなかった．また *A. japonica* も体長の小さい幼体数が多かった．そこで DNA 抽出には複数個体の腸内容物をまとめて一つとして行なった．一方で2006年 6 月の採取では *P. hilgendorfi* と *A. japonica* の 2 種とも得られた個体は大きく，また成体数も多く得ることができた．そのために，この時期の試料は一個体それぞれから DNA を抽出して分析した（表 1）．

2．大型ミミズ腸内細菌16S rDNA の DGGE プロファイル

日本産大型ミミズの代表的な 2 科に属する *P. hilgendorfi* と *A. japonica* の腸内細菌群集構造を PCR-DGGE 法を用いて解析した．今回試料からの DNA 抽出には土壌や根からの DNA 抽出に用いられてきた方法を参考にしたが，何れの試料でも234bp の

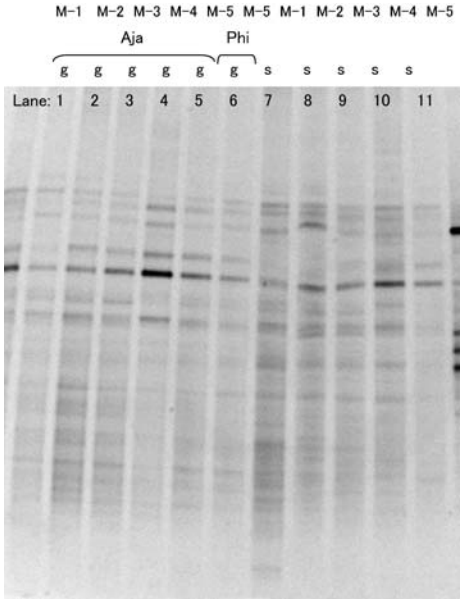
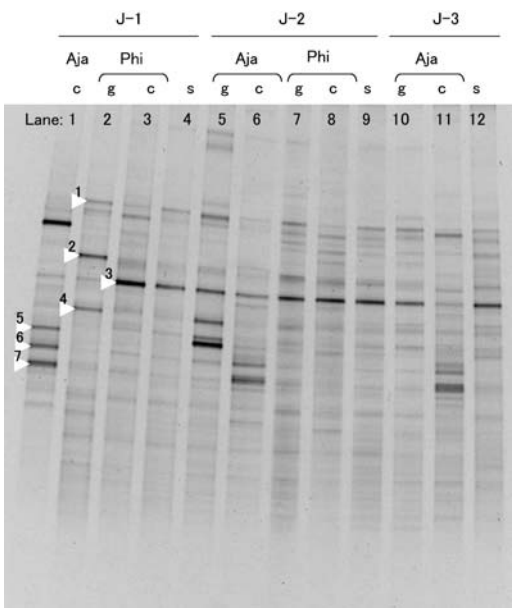


図 1　3 月に採取された試料の DGGE プロファイル
Aja, *Allolobophora japonica*； Phi, *Pheretima hilgendorfi*
g，腸内容物；s，周辺土壌
M-1－M-5，採取地点



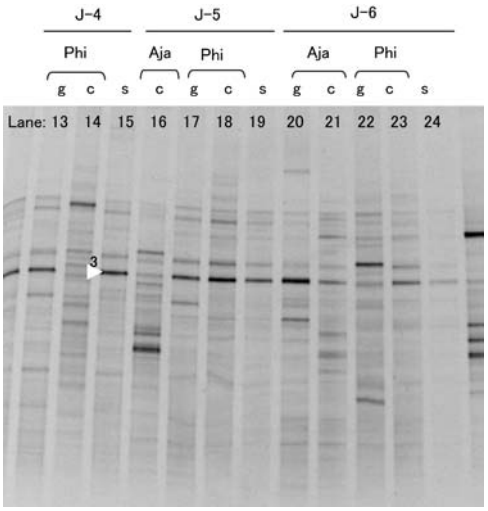


図 2　6 月に採取された試料の DGGE プロファイル
Aja，*Allolobophora japonica*；Phi，*Pheretima hilgendorfi*
g，腸内容物；c，新鮮糞；s，周辺土壌
J-1－J-6，採取地点
白矢印，シークエンス解析に供されたバンド

断片が確認され，細菌群集構造の特徴付けがなされた．

図1と図2に示したように，採取された腸内容物と新鮮糞は何れも周辺土壌とは異なったバンドパターンを示し，それぞれ特有の細菌群集構造を持つことが示唆された．2006年3月に採取された試料は明確な細菌群集構造の特徴が見られなかった．しかしながら，この時期に多く採取された幼体のみの試料で *P. hilgendorfi* と *A. japonica* の腸内細菌群集を比較すると，DGGEプロファイルに違いが見られた（図1のLane 2と6）．2006年6月に採取された試料ではDGGEプロファイルに周辺土壌とは明確な違いが見られた．すなわち *P. hilgendorfi* の腸内容物（図2のLane 2，Lane 7，Lane 13，Lane 17，及びLane 22）では，新鮮糞，*A. japonica* の試料及び周辺土壌と比べて優占するバンド（図中の矢印2及び4）が見られた．また，*A. japonica* の新鮮糞（図2のLane 1，Lane 6，Lane 11，Lane 16，及びLane 21）には，腸内容物や *P. hilgendorfi* の試料，及び周辺土壌と比べて優占するバンド（図中の矢印5－7）が見られた．

また *P. hilgendorfi* と *A. japonica* の腸内容物，新鮮糞，及び周辺土壌の全試料において共通する優占バンド（図中の矢印3）が存在し，シークエンス解析の結果 *Bacillus* が属する *Bacillaceae* の細菌であることが分かった（表2）．

3．*Pheretima hilgendorfi*（Megascolecidae）の腸内細菌群集構造

6月に採取された試料のDGGEプロファイルを比較すると，*P. hilgendorfi* の腸内には新鮮糞，*A. japonica* の試料及び周辺土壌ででは優占しない特徴的な優占菌の存在が示唆された（図2）．これらの優占するバンドを切り出した後シークエンスした結果，その一つ（図中の矢印2）は *Caryophanon latum* に最も高い相同性（98%）を示した（表2）．また，別の特徴的なバンド（図中の矢印4）は *Bacillus silvestris*，*B. bhargavae*，及び *Caryophanon tenue* に最も高い相同性（98%）を示した（表2）．

4．*Allolobophora japonica*（Lumbricidae）の新鮮糞における群集構造の特徴

6月に採取された *A. japonica* のDGGEプロファイルではその新鮮糞に腸内容物や *P. hilgendorfi* の試料，及び周辺土壌には見られない特徴的な優占菌の存在が示唆された（図2）．これらのバンドを切り出した後シークエンス解析を試みたが，特定にはいたらなかった（図中の矢印5－7）．

考　　察

近年，環境中の微生物群集構造を調査するために培養を経ない分子生物学的手法が盛んに用いられてきている．これらの方法にはPCR-DGGE，T-RFLP等があるが（Nocker *et al.*, 2007），PCR-DGGEは微生物生態系を構成する群集の構造を全体的に把握すると共にその配列解析から優占種を推定することができるという有利な点を有している（Muyzer, 1999）．本実験に用いたリン酸緩衝液で洗浄した試料のビーズを用いて菌体破砕後，DNAを溶媒抽出する方法は腐植物質等が多い周辺土壌はもとより，大型ミミズ腸内容物からも細菌由来DNAを抽出し，PCR増幅及びDGGE解析が可能であった（図1と図2）．従って本実験方法によりPCR-DGGEを用いた更に多様な地勢にわたる日本産大型ミミズ腸内の細菌群集構造が高価なDNA抽出キットを用いず，またClone Libraryの構築やT-RFLPの解析よりも比較的安価に，容易に解析可能であることが示された．ここで確立した方

表2　図2の矢印2－4で指し示された優占バンドのシークエンス解析

バンド番号	DDBJデーターベースでの最近縁種（アッセンション番号）	相同性（%）	系統学的な帰属
2	*Caryophanon latum*（X70319）	98	*Firmicutes*
3	*Bacillus nealsonii*（EU221341）	100	*Firmicutes*
	Bacillus circulans（EU124560）	100	*Firmicutes*
	Bacillus benzoevorans（Y14693）	100	*Firmicutes*
	Bacillus longiquaesitum（AM747042）	100	*Firmicutes*
	Oceanobacillus chironomi（DQ298074）	100	*Firmicutes*
4	*Bacillus bhargavae*（AM773821）	98	*Firmicutes*
	Bacillus silvestris（AJ006086）	98	*Firmicutes*
	Caryophanon tenue（AJ491303）	98	*Firmicutes*

法は他の土壌動物及び土壌細菌群集構造の関係を広く解析していく方法としても有用であろう．

しかしながら，本実験方法にも例えば腸内容物の採取法などの改善の余地が幾つか見られる．直接顕鏡法を用いた実験でミミズ消化管の大部分を占める腸管はその部位ごとに微生物相が異なることが明らかにされており（Fischer *et al.*, 1995；Schönholzer *et al.*, 2002），本実験で得た腸内容物の位置は一定ではなかったことは留意すべきであり，このことはDGGEプロファイルの同種内のばらつきに影響を及ぼしたかもしれない．より緻密な試料調製と共に，例えば優占バンドの配列を基にして各腸部位のFluorescence *in situ* hybridization（FISH）を行なえば（Muyzer, 1999），腸内における細菌の分布や細菌数に関する知見が得られると考えられる．

今回の実験には我が国の大型ミミズの繁殖期に当たる6月，また活動の鈍いと言われる3月（中村，1972）に採取した試料を用いた．3月に得られた試料は全て幼体であり，この3月に採取された試料を6月に採取された試料と比較すると，概して3月に採取された試料では周辺土壌と比べて全体（DGGEプロファイル）の腸内細菌群集構造のパターンは比較的類似していた．このことは大型ミミズの活動の活発さが腸内細菌群集構造に影響していることを示唆しているのかもしれない．しかしながら，幼体であっても種間，種内で一部の特徴的なバンドの違いがあり，未成熟においても既に腸内細菌群集構造は種に特徴的であるといえる．

Bouché（1977）は欧州の大型ミミズを，Epigeic, Anecic，及びEndogeicの3つの生態型に大別した：Epigeicは地表面の分解途中のリターを餌とし*Lumbricus rubellus*が知られ，Anecicは地表面のリターとある程度の土壌を食べて垂直な坑道を形成し，*Lumbricus terrestris*が知られ，また，Endogeicは有機物に富む鉱質土壌を食べて水平の坑道を形成し，*Aporrectodea caliginosa*が知られている（Bouché, 1977；Brown, 1995）．日本に生息する大型ミミズをNakamura（2000）はこのBouchéの分類を基にして4つの生態型に分けており，それによると*A. japonica*はAnecicに，*P. hilgendorfi*はEndogeicに相当すると思われる．今回調査された*A. japonica*では腸内に優占して存在する周辺土壌と共通のバンドが*Bacillus*の属する*Bacillaceae*の細菌由来であることが分かった．Anecicに分類される*Lumbricus terrestris*についてのFISHによる観察では*Proteobacteria*が調査されて腸内における存在比が高いことが明らかにされたが，*Bacillus*と思われる有胞子細菌の多いことも示唆されている（Fischer *et al.*, 1995）．これらのことはAnecicに分類されるLumbricidaeが，土壌細菌群集の中で特に*Bacillus*と強い関係を持っていることを示すのかもしれない．一方で，Megascolecidaeに属し，Endogeicに分類される*P. hilgendorfi*の腸内細菌群集構造は同じ採取地から得られたLumbricidaeとは異なっていることが示唆された．MegascolecidaeはLumbricidaeにない腸盲嚢を有しており（畑井，1931；山口，1967），その存在により腸内微生物相とその排出場である土壌微生物相にLumbricidaeとは異なる影響を及ぼしている可能性がある．今回の結果がこの腸盲嚢の有無といった，分類学上の所属する系統的位置の違いによるものなのか，それとも生態型の違いによるものなのかは今後の更なる研究が明らかにするであろう．

謝　　辞

本実験に用いた試料を採取するに当たり，愛媛大学農学部附属農場の皆様には大変にお世話になりました．大型ミミズの同定と取り扱いは愛媛大学農学部名誉教授　中村好男博士にご指導を賜りました．また本研究を行なうにあたり，鹿児島大学農学部　境雅夫博士並びに九州大学熱帯農学研究センター　松元賢博士には実験に対する貴重なご意見・ご指導を賜りました．この場を借りて御礼申し上げます．

要　　約

放牧用草地から採取した大型ミミズ，*Pheretima hilgendorfi*（Megascolecidae）と日本固有種の*Allolobophora japonica*（Lumbricidae）との腸内細菌群集構造を，試料抽出物を鋳型とした遺伝子増幅反応物の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動による分析法（PCR-DGGE）を用いて周辺土壌と比較しながら解析した．その結果，両種の腸内容物のDGGEプロファイルは，それぞれの大型ミミズ腸内に周辺土壌とは異なる細菌群集構造が存在することを示唆していた．主要なDGGEバンドを切り出した後，シークエンス解析することによって，両種の腸内に共通して優占する細菌の中には*Bacillus*の属する*Bacillaceae*の細菌が存在することが示唆された．この様な同じ生息場所のMegascolecidaeとLumbricidaeの両科に着目した大型ミミズ種の非培養法を用いた腸内細菌群集構造の解析は始めての報告である．

文　　献

青木淳一　1973　土壌動物学．北隆館，東京

Bouché, M.B.　1977　Strategies Lombriciennes. *Ecolo. Bull.*(*Stockholm*), **25**: 122-132

Brown, G. G.　1995　How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil*, **170**: 209-231

Darwin, C. R.　1881　*The formation of vegetable mould through the action of worms, with observations on their habits.* John Murray, London

Egert, M., S. Marhan, B. Wagner, S. Scheu and M.W. Fridrich　2004　Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol. Ecol.*, **48**: 187-197

Fischer, K., D. Hahn, R.I. Amann, O. Daniel and J. Zeyer　1995　In situ analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. by whole-cell hybridization. *Can. J. Microbiol.*, **41**: 666-673

Furlong, M. A., D. R. Singleton, D. C. Coleman and W. B. Whitman　2002　Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 1265-1279

畑井新喜司　1931　みみず．改造社，東京

Lavelle, P., C. Lattaud, D. Trigo and I. Barois　1995　Mutualism and biodiversity in soils. *Plant Soil*, **170**: 23-33

Márialigeti, K.　1979　On the community-structure of the gut-microbiota of *Eisenia lucens* (Annelida, Oligochaeta). *Pedobiologia*, **19**: 213-220

松家　輝・境　雅夫・井上聖華・金澤晋二郎　2003　T-RFLP 法によるトウモロコシ根圏および非根土壌の細菌群集構造の比較．土と微生物，**57**(2)：125-130

Muyzer, G.　1999　DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 317-322

Muyzer, G., E. C. D. Waal and A. G. Uitterlinden　1993　Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 695-700

中村好男　1972　草地土壌動物相の研究１．採草地の大型土壌動物の個体数および現存量の季節変動．日草誌，**17**(4)：217-222

中村好男　1999　環形動物門．青木淳一編：日本産土壌動物－分類のための図解検索．東海大学出版会，東京，101-110頁

Nakamura, Y.　2000　Earthworms and potworms as keystone functional animals in pedospheres. *Farm. Jap.*, **34**: 10-15

Nocker, A., M. Burr and A. K. Camper　2007　Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microb. Ecol.*, **54**: 276-289

大淵真龍・山口英二　1965　貧毛鋼．岡田ら編：新日本動物圖鑑．北隆館，東京，533-563頁

Pedersen, J. C. and N. B. Hendriksen　1993　Effect of passage through the intestinal-tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, **16**: 227-232

Sakai, K., E. Kudoh, M. Wakayama and M. Moriguchi　2000　Analysis of the Microbial Community in an Activated Sludge Enriched with an Inorganic Nitrite Medium. *Microbes Environ.*, **15**: 103-112

Sakai, M., A. Matsuka, T. Komura and S. Kanazawa　2004　Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *J. Microbiol. Methods*, **59**: 81-89

Schönholzer, F., D. Hahn and J. Zeyer　1999　Origins and fate of fungi and bacteria in the gut of *Lumbricus terrestris* L. studied by image analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **28**: 235-248

Schönholzer, F., D. Hahn, B. Zarda and J. Zeyer　2002　Automated image analysis and in situ hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *J. Microbiol. Methods*, **48**: 53-68

Singleton, D. R., P. F. Hendrix, D. C. Coleman and W. B. Whitman　2003　Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.*, **35**: 1547-1555

Torsvik, V., J. Goksøyr and F. L. Daae　1990　High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 782-787

Wolter, C. and S. Scheu　1999　Changes in bacterial numbers and hyphal lengths during the gut passage through *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae, Oligochaeta). *Pedobiologia*, **43**: 891-900

山口英二　1967　貧毛綱．内田亨編：動物系統分類学．中山書店，東京，130-193頁

Summary

The gut microbiota of two earthworms (*Pheretima hilgendorfi* [Megascolecidae] and *Allolobophora japonica* [Lumbricidae]) collected from the pasture in Japan were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments (PCR-DGGE). The DGGE profiles indicated that there were different bacterial communities in each earthworm guts from surrounding soils. All samples including surrounding soils contained a common major band, which showed high homology to *Bacillaceae* including *Bacillus* spp. in its sequence. We believe that we are the first to report the detailed analysis of gut microbiota, of which existed in two earthworm families, Megascolecidae and Lumbricidae at the same sampling site.