

I. 遺伝子増幅技術 (PCR) を利用した 植物プランクトン個体群内の遺伝的多様性モニタリング技術の開発

メンバー構成

研究代表者	鈴木祥弘	神奈川県立産業技術総合研究所	助手
共同研究者	村上 悟	神奈川県立産業技術総合研究所	教授
	富沢健一	財団法人地球環境産業技術研究機構	主任研究員
	井村 智	国立極地研究所	助手

目的

分子生物学的技術 (バイオテクノロジー) の普及に伴い、旧来、高価で熟練を要していた技術が、近年、比較的安価で容易に利用できるようになってきた。中でも、サーマルサーキュラーを用いた polymerase chain 反応 (PCR) による DNA 増幅技術は、極めて少量の試料から簡便に目的の DNA を検出できる優れた技術であり、犯罪捜査や病原菌の検出に代表されるように、様々な分野で広く利用されている。

本研究では、この PCR による DNA 増幅技術を、DNA 塩基配列を指標として植物プランクトン各個体を同定するために利用し、さらに、この技術を用いて、「同じ種でありながら少しずつ違う遺伝子 DNA を持つ個体が、自然環境中でそれぞれどのように生きているか」を環境変動と対応づけて解析することを目指す。このために、1. 植物プランクトン各個体から増殖させた少量の細胞より DNA を抽出・増幅する技術の開発 2. 植物プランクトンの個体識別に適当な「個体間に違いの認められる DNA」(指標 DNA) の選択 3. 指標 DNA による自然環境中での個体群動態の測定 の三段階を経て研究を実施する。本年度は、このうち第一段階である少量の細胞より、DNA を抽出し、増幅する技術の開発を行った。

材料と方法

材料

東京湾試水より単離した珪藻類 *Skeletonema costatum* (Grev.) の単細胞由来の株 (S1株) (Suzuki & Takahashi 1995) を用いた。この株を 3.0% 人工海水 (SIGMA) に Guillard & Ryther (1962) の組成で栄養塩を強化した F/2 培地を用いて、2.0 l 三角フラスコ中、25℃、蛍光灯 (National F120S.N-EDL.NU) による照度 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 連続照明下でバッチ培養した。対数増殖期にある細胞を静置して沈降させ濃縮したあと、4℃ 12000rpm で 10 分間遠心し集めた。この細胞を液体窒素で凍結し -84℃ で保存しておいたものを以下の実験に用いた。

DNA の抽出

160℃ で 4 時間で乾熱滅菌を行った乳鉢を準備する。この乳鉢を液体窒素で冷却しておいたものに凍結試料を移し、液体窒素を加えながら粉末にした。さらに乳鉢中で液体

窒素を加えながら、試料の湿重量の5倍量の抽出緩衝液(50mM Tris-HCl 10mM NaCl 2mM MgCl₂ 最終濃度)を加えた後、再度粉末にし、その後氷上で解凍した。この破碎液を95℃で20分処理し鋳型DNAとして用いた。必要に応じて破碎液をChelex-100(BIO-RAD)5%(最終濃度)およびProteinase K溶液(16.2mg/ml)(Boehringer Mannheim)を加え処理後、鋳型DNAとして用いた。

DNAの増幅

プライマーとしてrbc-L(リブローソニリン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ-大サブユニット遺伝子)の保存領域を利用した23塩基のフォワード・リバース両プライマーを設計し合成(宝酒造)、解析に用いた。このプライマーを用いて総量50.0μlの系でPCR Thermal cycler(TaKaRa PCR Thermal cycler personal)およびTaq DNA polimeraze(TaKaRa Taq™)を用いてPCR緩衝液(10mM Tris-HCl 50mM KCl 1.5mM MgCl₂)中で異なる処理により得られたいくつかの鋳型DNAを濃度を変えて添加し反応を行った。

結果

抽出緩衝液(50mM Tris-HCl pH. 8.0, 20mM EDTA)中で破碎した細胞を1% SDS、Proteinase K(最終濃度0.2mg/ml)50℃で12時間処理後、フェノール・クロロフォルム法で精製した*S. costatum* S1株のゲノムDNA1ngを鋳型DNAとして前記のプライマー0.1μM(最終濃度)で反応を行った。95℃で2分処理後、94℃1分、55℃1分、72℃1分のサイクルを30サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。この反応液10μlについて1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、約400塩基の位置に1本のエチジウムブロマイドで染色されたバンドが認められた。さらに、このバンドからDNA断片の精製を試み(TaKaRa GeneCleanII)、得られたDNA断片をTA-cloningによりpCRvector(Invitrogen)に組み込み、大腸菌(One Shot cells(Invitrogen))に導入した。この大腸菌をLB培地2mLで培養し、その細胞からアルカリSDS法で精製したDNAを用いて塩基配列を決定したところ、既知の*S. costatum* rbc-Lと非常に高い相同性を示した。この結果は、前記の反応条件でゲノムDNAからrbc-Lの特定の領域が特異的に増幅されることを示している。このため、少量試料から様々な方法で抽出したDNAを鋳型として前記の条件で反応させる系を用いて、DNAを伸長させ、伸長の有無から抽出法の良・不良を検討した。

まず、凍結試料に5倍量の抽出緩衝液(50mM Tris-HCl 10mM NaCl 2mM MgCl₂ 最終濃度)加えて液体窒素存在下で粉末にした破碎液を95℃で20分処理した。これを氷水に浸けて急冷し、0℃で20分静置した後、4℃12000rpmで3分間遠心した。その上清を鋳型DNAとして用いた。3~10μlの鋳型DNAを上記の反応系に添加したが、いずれの反応液を電気泳動した1.2%アガロースゲルにもバンドは認められなかった。このため、熱処理に加えていくつかの処理を破碎液に行った。まず、Chelex-100を添加して、鋳型DNAの抽出を試みた。破碎液に10%Chelex-100溶液を等量添加し、-20℃で30分静置。その後95℃で25分処理した試料を直ぐに氷水に浸けて急冷し、そのまま20分0℃で静置した。4℃12000rpmで3分間遠心した後、上清を鋳型DNAとして用いた。3~10μlの鋳型DNAを添加したがいずれの反応液の電気泳動にもバンドは認められなかった。こ

のため、さらに、破碎液にProteinase K（最終濃度0.2mg/ml）を加え50℃で2時間処理を行った。その後上記の10%Chelex-100溶液を等量添加し、-20℃で30分静置、95℃で25分処理後急冷、0℃20分静置を行った。4℃12000rpmで3分間遠心した後、上清を鋳型DNAとして用いた。3~10 μ lの鋳型DNAを添加したがいずれの反応液の電気泳動にも、予想された400塩基の位置にエチジウムブロマイドで染色されたバンドが認められた。

考察

PCRの鋳型DNAとして、比較的純度の低いDNA標品を用いることが可能であることが経験上知られており、このため、鋳型DNAを調整するための簡便な方法が数多く開発されてきている（Rofls et al. 1992）。本研究ではこれらの方法の中でも特に簡便な方法の幾つかを珪藻類のDNAの抽出に適用し、抽出されたDNAが鋳型としてPCRに使用可能であるかを検討した。その結果、95℃保温による抽出法や、これにキレート剤であるChelex-100を加えた改良法では珪藻細胞からは鋳型DNAの抽出が困難であることが明らかになった。このため、抽出効率を上げることが予想されるProteinase K処理を試みた。藻類からのDNA精製ではProteinase Kによるタンパク質の消化が極めて有効であることが知られている（太田 personal communication）。本研究では、このProteinase K処理が珪藻細胞からの鋳型DNA抽出にも有効であることを明らかにした。今回開発された方法は、最も簡便な95℃処理による抽出法に比べて数時間の余剰の時間を必要とするが、湿重量0.5mg以下の生物試料から鋳型DNAを抽出可能であり、当初の目的である「植物プランクトン各1個体から増殖させた少量の細胞より、DNAを抽出・増幅する技術」として十分機能すると考えられる。

今後、この方法を用いて研究を継続する予定である。

参考文献

- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8:229-39.
- Rofls R., Schuller I., Finckh U. and Weber-Rofls I. 1992. PCR: Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Suzuki, Y. and Takahashi, M. 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature *J. phycol.* 31: 880-888