

総合理学研究所1998年度産学協同プロジェクト報告

C. 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

研究代表者 鈴木祥弘 神奈川大学理学部応用生物科学科 助手
 共同研究者 村上悟 神奈川大学理学部応用生物科学科 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

目的

湖沼や海洋に生活する植物プランクトンは、好適な条件下では数時間から数日の世代時間で分裂を繰り返し個体密度を増加させるが(1,2(番号は参考文献と対応))、不適な条件下では捕食や沈降などにより個体密度を急速に減少させる。このため、(種ごとの性質の違いによりその時期は異なるが、)自然環境中の植物プランクトン各種の個体密度には著しい増加と減少が認められる(3)。個体密度の増減の中で植物プランクトン種の多様性は変化すると考えられる。密度が減少する際に多様性は低下するが、そればかりでなく、密度が増加する際にも特定の環境に適した個体を選択されることにより、多様性は低下している可能性が高い。このため、植物プランクトン種は個体密度の激しい増減の中で、種内の多様性を保持することが困難であると考えられる。それにも関わらず、自然環境中の植物プランクトン種は絶滅することなく、好適条件になると個体密度を増加させている。植物プランクトン種が低い多様性のままで存続しているのか、何らかの機構により多様性を保持しているのかを明らかにすることは、植物プランクトン種の存続を考える上で極めて重要であると考えられる。しかし、形態による同種内の個体識別の難しい植物プランクトン種では多様性を検出する方法が無く、このため、植物プランクトン種の存続を多様性に着目して解析することは難しかった。

一方、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。これらの技術は植物プランクトンにも応用され、同じ形態を持ち同種に分類される植物プランクトン種でも、異なるDNAを持つ様々な個体にわけられることが明らかになってきた。しかしながら、植物プランクトン種内の遺伝的多様性の解析には、多数の個体の解析が必要であり、旧来の時間と手間のかかる方法での解析は、実際上、不可能であった。解析を省力化し、多数の個体の解析を行うためには、極めて少量の試料から簡便に目的のDNAを増幅し、分析に必要な量のDNAを提供するpolymerase chain reaction(PCR)によるDNA増幅技術の適用が有効である。PCRによるDNA増幅技術を利用し、植物プランクトンの各個体の遺伝子を増幅、これを分析することでDNA塩基配列を指標に植物プランクトンの各個体を識別することができれば、自然環境中の植物プランクトン種の遺伝的多様性の解析が可能になる。本研究では、PCRを利用した遺伝的多様性モニタリング技術を開発し、この技術を自然環境中の植物プランクトン種に適用することを目指す。このために、1.植物プランクトン各個体の持つ少量のDNAより分子生物学的解析に足りるような大量のDNAを増幅する技術を開発し、2.個体識別に適当な「個体間に違いの認められるDNA」(指標DNA)を選択する。さらに、3.自然環境中での植物プランクトン種の個体密度の時間変化と種内

の遺伝的多様性の変化を解析することを目指す。このうち、「1.植物プランクトン各個体の持つ少量のDNAより分子生物学的解析に足りるような大量のDNAを増幅する技術の開発」は1998年度、総合理学研究所産学協同プロジェクトの助成を受け完了している。本年度は、「2.個体識別に適切な「個体間に違いの認められるDNA」（指標DNA）の選択」を行った。

材料と方法

材料

珪藻種数種について指標遺伝子の解析を行い、比較検討するため珪藻種単離株を用いた。「3.自然環境中での植物プランクトン種の個体密度の時間変化と種内の遺伝的多様性の変化の解析」の実施を予定している、海域にしばしば出現する、珪藻類5種5株 (*Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve (東京湾試水より単離)、*Thalassiosira nordenskioldii* Cleve、*Detonula confervacea* (Cleve) Gran (サロマ湖試水より単離) (1)、*Chaetoceros* sp. (カナダ北方準州レゾリュート海峡海水より単離)、*Coscinodiscus* sp. (大西洋グリーンランド沖ノースウォーターポリニア試水より単離)) を実験に使用した。Guillard and Ryther (1962) (4) の組成で栄養塩を強化した濾過海水 (F/2培地) 中で $50\sim 150\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の光強度の連続照明下で 25°C (*S. costatum*) と 5°C (残りの4種) で培養を行った。対数増殖期にある細胞を静置して沈降させ、上澄みを吸引し濃縮した後、滅菌済み遠心管中で、 4°C 、3000rpmで10分間遠心し回収した。細胞は遠心管中ごと液体窒素で凍結し、 -84°C で保存した。

プライマーの設計

珪藻類の葉緑体ゲノム上にコードされているリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ (RuBisCO) の大サブユニット遺伝子 (*rbcL*) と小サブユニット (*rbcS*) 及び *rbcL* と *rbcS* の間に介在する非コード領域 (本報告書中では *rbcLS* と呼ぶことにする) を指標遺伝子の候補とした。高等植物の *rbcL*、*rbcS* の解析結果から、反応中心領域を含み保存性が良く種間であまり違いの認められない *rbcL* に対して、*rbcS* は変異が大きいことが明らかになっている*。また、珪藻類では *rbcL* と *rbcS* が葉緑体ゲノム上に連続して配置されており、この間に酵素タンパク質をコードしない100残基ほどの領域が存在することが、最近の知見から明らかになっている*。酵素を直接コードしない *rbcLS* には、*rbcS* よりもさらに大きな変異が予測される。このように変異の程度の異なる *rbcL*、*rbcS*、*rbcLS* を解析することで、いずれかの遺伝子が個体識別に適切な「個体間に違いの認められるDNA」として利用可能である可能性が高い。*rbcL*、*rbcS*、*rbcLS* を増幅するために、珪藻類、紅藻類、褐藻類の既知の *rbcL*、*rbcS* の塩基配列 (図1) を参考に、保存性の高い領域を推定し、以下のような四ヶ所 (*rbcL*-F・*rbcL*-R・*rbcS*-F・*rbcS*-R) の領域について六種 (LF・LR・LF・SR・SF・SR) のPCR反応のプライマーを設計した (図2)。

S.costatum 1:-----C-----G-----TT-----AC-----G-----A-----A-TCT---G-G-----T 15
Cylindrotheca sp. 1:-----AT 2
Unidentified 1:TATAATTAACAATAAGGTTGTAATTAATTTACTAAAATCAACCAGCAGAACTAATTTAGATGAAAATAGTTAAATATCTATTATATATGCGCTTTTATTCTTAAGGAGAAATCAAT 120

S.costatum 16:G--T-AA-----T-T-----C-C-----A-----T---A-C---G-----CG--AAATGGTTACTGGGATGCTTCATACACAGTAAAGA-TACTGATGT- 78
Cylindrotheca sp. 3:GTCTCAATCTGTATCAGAACGGACTCGAATCAAAGTGACCGTTACGAATCTGGTGTAATCCCTTACGCTAAAATGGGTACTGGGATGCTTATATGCAAGTAAA-ACTACTGATGT- 120
Unidentified 121:GTCTCAATCTGTATCAGAACGGACTCGAATCAAAGTGACCGTTACGAATCTGGTGTAATCCCTTACGCTAAAATGGGTACTGGGATGCTTCATACAGTAAA-ACTACTGATGT 239

S.costatum 79:TTAGCATTATTCCGATTACACCACAACCAGGTGTAGATCCAGTAGAAGCTGCTGCTGTAGCAGGTGAATCTTCAACTGCAACTTGGACTGTTGTATGGACAGATTTAATACAGCT 198
Cylindrotheca sp. 121:TTAGCTTTATTCCGATTACACCACAACCAGGTGTAGATCCAGTAGAAGCTGCTGCTGCGCAGTAGCGGGTGAATCTTCTACAGCAACTTGGACAGTGTATGGACTGATTTAATACAGCT 240
Unidentified 240:TT-GCTTTATTCCGATTACTCTCAACCAGGTGTAGATCCAGTAGAAGCTGCTGCTGCGCAGTAGCGGGTGAATCTTCTACAGCAACTTGGACAGTGTATGGACTGATTTAATACAGCT 358

S.costatum 199:TGTGAGCGCTACCGTGTCAAAGCTTCCGTTAGATCCAGTACCTAA-TTCA---G--CAGATGATTTCTTGA-TTTCATGCATATGAATGTGATTTATTTGAAGAAGCTCTTTAGC 311
Cylindrotheca sp. 241:TGTGACCGTACCGTGTCAAAGCTTCCGTTAGATCCAGTACCTAA-TTCA---G--CAGATGATTTCTTGA-TTTCATGCATATGAATGTGATTTATTTGAAGAAGCTCTTTAGC 353
Unidentified 359:TGTGACCGTACCGTGTCAAAGCTTCCGTTAGATCCAGTACCTAA-TTCA---G--CAGATGATTTCTTGA-TTTCATGCATATGAATGTGATTTATTTGAAGAAGCTCTTTAGC 471

S.costatum 312:TAACCTAACAGCATCTATTATTGGTAAAGTTTTGGATTT-AAAGCAGT-T-TCTGCTTACGTTTAGAAGATATGCTNN 426
Cylindrotheca sp. 471:TAACCTAACAGCATCTATTATTGGTAAAGTTTTGGATTT-AAAGCAGT-T-TCTGCTTACGTTTAGAAGATATGCTNN 470
Unidentified 472:TAACCTAACAGCGTCTATCATTGGTAAAGTTTTGGATTT-AAAGCAGT-T-TCTGCTTACGTTTAGAAGATATGCTNN 588

S.costatum 427:NN 538
Cylindrotheca sp. 589:AGGTATCAT-T-GTAGAACGTGAACGTTAAACAATAACGATTTCTTTATTAGTGCGACAGTAAAAACCAAAATAGG---T---T-TATCAGGTAAAACTACGGCTGTAGTAT 698

S.costatum 539:ATGAAGTTTAAAAGGTGGTTAGACTTCTAAAAGTAGTAAAAATTAACCTCAACCATTATCGCTGGAGAGAACGTTTCTTAACTGTATGGAAGGTATTAACCGTGCAT-CA 657
Cylindrotheca sp. 581:ACGAAGTTTAAAAGGTGGTTAGACTTCTAAAAGTAGTAAAAATTAACCTCAACCATTATCGCTGGAGAGAACGTTTCTTAACTGTATGGAAGGTATTAACCGTGC-TCAT 699
Unidentified 699:ACGAAGTTTAAAAGGTGGTTAGACTTCTAAAAGTAGTAAAAATTAACCTCAACCATTATCGCTGGAGAGAACGTTTCTTAACTGTATGGAAGGTATTAACCGTGC-TGCA 817

S.costatum 658:GCTGCAACTGGTGAAGTTAAAGGTTCTTACTTAAACATTACGCTGCTACAATGAAGAAGTATACAAACGCTGCTGAGTA-TGCTAAAGCTGTTGGTTCTATCGTTGTTATGATCGATTT 776
Cylindrotheca sp. 700:GCTGCTACAGGTGAAGTTAAAGGTTCTTATTAAACGTTACGCTGCTACTATGGAAGAAGTATACAAACGCTTCTGAGTA-TGCTAAAGAGTAGGTTCTATCATTATCATGATCGATTT 818
Unidentified 818:GCTGCAACAGGTGAAGTTAAAGGTTCTTACTTAAACATTACGCTGCTACAATGAAGAAGTATACAAACGCTGCTGAGTACAG-TAAAGAAGTAGGTTCTGTAATGTTATGATCGATTT 936

S.costatum 777:AGTAATGGTTACACTGCAATTCAATCA--ATTGC-ATACTGGGCTGCGAA-AACGATATG-TTATTACACTTACACCCTGCTGTAACCTTACATACGCTGCTCAAAAAGATCATGGT 891
Cylindrotheca sp. 819:AGTTATGGTTACACAGCAATCAA--AGTATGGCTTA-TGGGCTGCGAA-AATGATATGCTT-TTACATTTACACCCTGCAAGTAACTTCTATGCTGCTCAAAAAGATCATGGG 933
Unidentified 937:AGTTATGGTTACACAGCAATCAA--AGTATGC-TTACTGGGCTG-TAACAGATATG-TTATTACACTTACACCCTGCAAGTAACTTACCTGCTGCTCAAAAAGATCATGGT 1051

S.costatum 892:ATTAACCTCCGTTATCTGTAATGGATGCGTATGCTGGTGTAGATACATCCAGCTGGTACAGTTGTTGGTAAGTTAGAAGGTGATCCTTAAATGATTAAGGTTTCTA-CGATA- 1009
Cylindrotheca sp. 934:ATTAACCTCCGTTAATTTGTAATGGATGCGTATGCTGGTGTAGATACATCCAGCTGGTACAGTTGTAAGTAAATAGAAGGGATCCTTAAATGATTAAGGTTTCTA-CATAC- 1052
Unidentified 1052:ATTAACCTCCGTTAATCTGTAATGGATGCGTATGCTGGTGTAGATACATCCAGCTGGTACAGTTGTAAGTAAATAGAAGGTGATCCTTAAATGATTAAGGTTTCTA-CGATAT 1170

S.costatum 1010:TCTTACGTTTAACTGA--ATTAGAAGTAAACTACCTTCGGTA-TCTTCTCGAAATG-GATTGGCTAGTTTACGCTGTTGATGCCAGTAGCTTCTGGTGTATCCACTGTGGTCAA 1125
Cylindrotheca sp. 1053:T-TTACGGTTAAC--AACATTAGATGTTAACTACCTTATGGT-TTGTCTCGAAATGCA-TGGGCTAGTTTACGCTGTTGATGCTGTTGTTGCTGGTGTATCCACTGTGGTCAA 1167
Unidentified 1171:T-TTACGTTTAACT--ATCATTAGATGTTAACTACCTTACGGTAT-TTCTTCTCGAAATGCA-TGGGCTAGTTTACGCTGTTGATGCTGAGTGGTCTGAGTGGTATCCACTGTGGTCAA 1285

S.costatum 1126:ATGCACCAATTAATCTACTATTAGGTGATGATGTTGATTACAATTTGGTGGTGTACAATTTGGTCAACCTGATGGTATCCAAGCTGGTGA-C-TGCAGAACGTTGCTTTAGAA- 1242
Cylindrotheca sp. 1168:ATGCACCAATTAATCTACTATTAGGTGATGATGTTGATTACAATTTGGTGGTGTACAATTTGGTCAACCTGATGGTATCCAAGCTGGTGA-C-GCTAACCGTTGCTTTAG-AG 1284
Unidentified 1286:ATGCACCAATTAGTACACTACTTAGGTGATGATGATGATTACAATTTGGTGGTGTACAATTTGGTCAACCTGATGGTATCCAAGCTGGTGA-C-AACCGTGTGCTTTAGAA 1403

S.costatum 1243:TCAATGGTATTAGCTCGTAACGAAGGTGTTGACTACTGATCAACAGTAGGCTCTCAATCTTACGCTGATCGGGTAAAAACATGGTCTTTTACAACAGCTTTAGATTTATGGAAA 1362
Cylindrotheca sp. 1285:TCAATGGTATTAGCTCGTAACGAAGGTGTTGACTACTGATCAACAGTAGGCTCTCAATCTTACGCTGATCGGGTAAAAACATGGTCTTTTACAACAGCTTTAGATTTATGGAAA 1404
Unidentified 1404:-CAATGGTATTAGCTCGTAACGAAGGTGCGACTACTTCAACAGTAGGCTCTCAATCTTACGCTGATCGGGTAAAAACATGGTCTTTTACAACAGCTTTAGATTTATGGAAA 1522

S.costatum 1363:GATATTCTTTGACATATACTTCTACAGATACAGAGATTTGCTGAACACCACTGCAAAAC--A-GA- 1428
Cylindrotheca sp. 1405:GATATTAGTTTAACTATACATCTACAGATACAGCTGATTTGCTGCAACATCAACAGCAAACTATAA- 1473
Unidentified 1523:CATATTAGTTTAACTACACTTCTACAGATACAGCTGATTTGCTGGAACACCAACGCAAACTATAA 1592

rbcLの塩基配列

Cylindrotheca sp. 1:GTGAGACTTACACAAGGTTGTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATGAACAAATGAAAAGCAAGTTAATACGCAATC-TCTAAAGTTGGGCAATGAACGTTGAATGGACAGATGA 119
Unidentified 1:GTGAGACTTACACAAGGTTGTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATGAACAAATGAAAAGCAAGTTAATACGCAATC-TCTAAAGTTGGGCAATGAACGTTGAATGGACAGATGA 119

Cylindrotheca sp. 120:TCCCCATCCACGTAATAACTATTGGGAATTATGGGTTTACCTTATTGACATTAAGATCCTGCATCTGTAATGTTGAATACAAGAAGCTGTAAGGCTGTGCAGCTGGTTATAT 239
Unidentified 120:TCCACACCCACGTAACAACACTACTGGGAATTATGGGTTTACCTTATTGATATTAAGATCAGCATCTGTAATGTTGAAATACGTTGAAGCTGTAATCATGTGCAGCTGGCTACAT 239

Cylindrotheca sp. 240:TCTGATGAATGCTTTTATGCAAGTTACGGTACAGAAGTTGTTATGTC-TTTTCCTGTAACCGTCC-AGCTAACGAGCTGGTTTCTACCTAGAAGCT-GCTGAAGGTAAGGTCG 356
Unidentified 240:CGTTTAAATGCAATTTGATGCAAGTTACGGTACAGAAGTTGTTATGTCATTT-ATCGTTAACCGTCC-CTAGTGAACCTGGTTTCTACTTAGAGCGTAG-TGAAGCTCAAAGGCCG 356

Cylindrotheca sp. 357:TCA-GATTAATTACACAATTAATCATATAGTGTACAAGCTAATCCAGAAGGTGGCCGTTACTAA 420
Unidentified 357:T-ATGATTCGTTACACTATTAACTTACAGTGTACAAGCTAATCCAGAAGGTGGCTGTTACTAA 420

rbcSの塩基配列

図1.珪藻類数種のrbcL、rbcS塩基配列

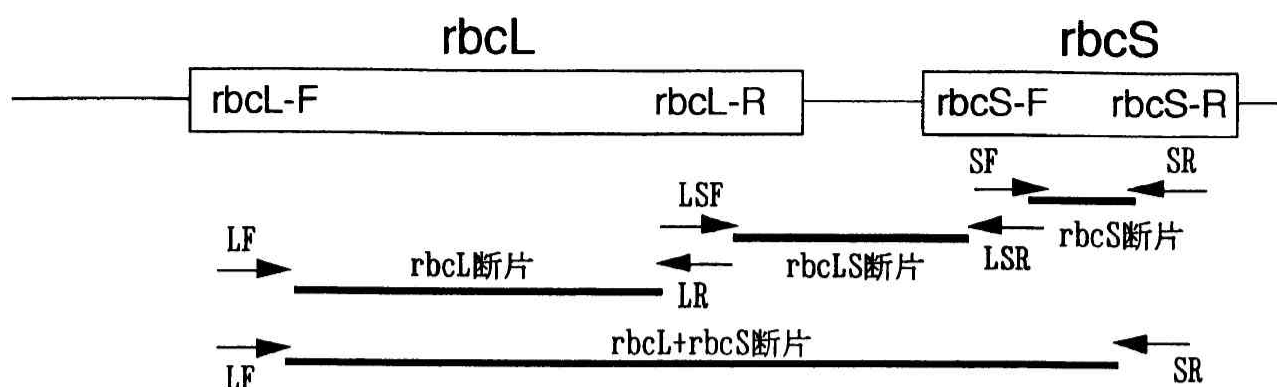


図2. PCR用 プライマーを設計した領域と増幅された断片

鋳型DNAの精製

設計したプライマーにより、5株で*rbcL*、*rbcS*、*rbcLS*の増幅条件を検討するため、5株の全遺伝子を精製した。まず、160℃で4時間乾熱滅菌を行い他種のDNAの混入を排除した乳鉢を準備し、液体窒素で冷却する。この乳鉢中で液体窒素を加えながら各株の凍結試料を粉末にした。この粉末を50℃に保温した試料の5倍量の抽出緩衝液（50mM Tris-HCl 10mM NaCl 2mM MgCl₂最終濃度）に加え、さらにSDS溶液を最終濃度1%になるように加えた。これにProteinase Kを0.05mg/ml（最終濃度）となるように添加し、50℃で1時間静置した。さらに、Proteinase Kを添加し（0.1mg/ml（最終濃度））50℃で1時間静置した後、再度Proteinase Kを添加して（最終濃度0.2mg/ml）50℃で12時間静置した。その後、3000rpmで室温で10分間遠心し、上清をフェノール・クロロフォルム抽出法（Sambrook 他1987）で処理し、遊離したDNAを精製した。凍結試料1gあたり1mg以上のDNAが精製された。DNA試料は、蒸留水で適当な濃度に希釈され、PCRの鋳型として用いた。

PCR反応条件の決定 精製DNAを95℃で20分処理後、急冷し1本鎖DNAとした。このDNA5~10ngを鋳型とし、合成ペプチド（サワデーテクノロジー、カラム精製グレード）20~30μM（最終濃度）とDNAポリメラーゼ（Premix Taq DNA Polymerase（TAKARA））を様々な温度条件で反応させた。反応温度条件はPCRサーマルサイクラ（Cycler PERSONAL（TAKARA））により制御した。反応後、反応生成物を含む反応液10μlを1.0%のアガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色して、DNA断片の増幅の確認を行った。PCR反応により目的のDNAが増幅したときに生成されると予想される分子量のDNA断片のみが認められた反応条件を、良好な反応条件とした。PCR反応産物の確認 さらに、このDNA断片のうち以下の方法でクローニングが容易な*rbcL*断片・*rbcS*断片について塩基配列の確認を行った。まず、グラスミルク法（GENECLEANII Kit（TAKARA））でアガロースゲル中よりDNA断片を回収し、TA Cloning法によりpCR2.1ベクター（Invitrogen）に組み込み、これを大腸菌OneShotCell株（Invitrogen）に導入した（TA Cloning Kit Jr.（Invitrogen））。DNA断片を導入した大腸菌を培養後、アルカリSDS法でプラスミドを精製、さらに、DNA吸着カラム（スピンカラム（TAKARA））

を用いて不純物を取り除いた。これを鋳型とし、先のPCR反応に用いたプライマーを用いて、シーケンス反応を行い（dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー））、電気泳動を行った（ABI PRISM 310 Genetic Analyzer）。1DNA断片に対し、独立に遺伝子を導入した3株の大腸菌を用意し、そこから得られたプラスミドについて塩基配列を決定した。決定された塩基配列を解析ソフト（GENETIX MAC9.0（ソフトウェア開発株式会社））を用いて解析し、さらに、解析ソフト（clustalx）を用いて分岐図を作製、*rbcL*断片・*rbcS*断片の種間の変異を比較した。

結果と考察

PCR反応条件の決定

六種（LF・LR・SF・SR・LSF・LSR）のプライマー（図2）を以下のように設計した（表1）。滅菌水22 μ lに鋳型DNA1 μ l（5~20 μ g/ μ l）、二種類のプライマー（図2の四種の組み合わせ；*rbcL*領域・*rbcS*領域・*rbcL*と*rbcS*を両方を含む領域、*rbcL*・*rbcS*間の非コード領域を増幅するためのプライマーの組み合わせ、（以後*rbcL*プライマーセット・*rbcS*プライマーセット・*rbcL+rbcS*プライマーセット・*rbcLS*プライマーセットと呼ぶ））を各1 μ l（20~30 μ l）を反応系に加え、さらに、DNA Polymelrase（Premmix Taq DNA Polymerase（TAKARA））25 μ lを反応チューブに入れて反応を開始した。95 $^{\circ}$ C5分・アニリング2分・72 $^{\circ}$ C2分の温度制御を1周期行った後、94 $^{\circ}$ C1分・アニリング1分・72 $^{\circ}$ C2分の温度制御を29周期行い、最後に72 $^{\circ}$ C10分の温度制御を行い酵素を反応させた。アニリングの温度は60 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ Cで行い、予想された分子量のDNA断片のみが増幅された温度条件のうち、最も高い温度を以後の実験でアニリング反応に用いることとした。その結果、全ての種の鋳型DNAについて全てのプライマーセットで55 $^{\circ}$ Cおよび50 $^{\circ}$ Cのアニリング温度で、予想された分子量のDNA断片の増幅が確認された。

*T. nordenskiöldii*以外の4種では、*rbcL*・*rbcS*・*rbcL+rbcS*プライマーセットについて、55 $^{\circ}$ Cアニリングでそれぞれ約1500・500・2000塩基対のDNA断片（*rbcL*断片・*rbcS*断片・*rbcL+rbcS*断片と呼ぶ）の増幅が認められた。この4種の*rbcLS*については55 $^{\circ}$ Cでは増幅が認められず、50 $^{\circ}$ Cで約100塩基対（*rbcLS*断片と呼ぶ）の増幅が認められた。これは、*rbcLS*プライマーセットが他のプライマーセットに比べて、鋳型DNAとの相同性が低かったためと考えられる。一方、*T. nordenskiöldii*では55 $^{\circ}$ Cのアニリング温度ではDNA断片の増幅が認められず、50 $^{\circ}$ Cで初めてそれぞれ約1500塩基対、約500塩基対、約2000塩基対のDNA断片の増幅が認められた。*T. nordenskiöldii*の鋳型DNAは他種に比べてプライマーセットとの相同性が低かったためと考えられる。他種でも増幅の難しかった*rbcLS*断片のプライマーセットを用いたPCRについて、本種では50 $^{\circ}$ Cでも増幅が認められなかった。このため、反応に先立ち反応系の温度を95 $^{\circ}$ Cに上昇させDNA Polymeraseを添加するHotStar法を試みたところ、初めて約100残基のDNA断片の増幅が認められた。これは、プライマーと鋳型DNAの低い相同性により生じていた反応開始時の非特異的アニリングが、HotStar法により解消されたためと考えられる。

表1. プライマーの名称と配列

名称	塩基配列
LF	AAT GGG TTA CTG GGA TGC TTC ATA
LR	AAA TCT GCT GTA TCT GTA GAA GTA TAG T
SF	TTA CAC AAG GTT GTT TCT CGT TCT TAC C
SR	CCA CCT TCT GGA TTA GCT TGT ACA CT
LSF	ACT ATA CTT CTA CAG ATA CAG CAG ATT T
LSR	GGT AAG AAC GAG AAA CAA CCT TGT GTA A

PCR産物の確認

全ての鋳型DNAについて全てのプライマーセットで予想された分子量のDNA断片の増幅が確認された。得られたDNA断片が*rbcL*・*rbcS*・*rbcLS*・*rbcL+rbcS*断片であることを確認するために、*rbcL*断片と*rbcS*断片をTAクローニング法によりプラスミドベクターに組み込み、大腸菌を用いてこのプラスミドDNAを大量に調整した。さらにこのプラスミドDNAを用いて断片の塩基配列を決定した。DNA Taq Polymeraseの読み間違いを考慮し、独立にプラスミドベクターを組み込んだ3株の大腸菌について解析し塩基配列を求めた。その結果、*rbcL*断片の一部（プライマーから約400塩基対）と*rbcS*断片の全長の塩基配列が決定された。*rbcL*断片の一部について決定された塩基配列は珪藻（*Cylindrotheca* sp.）の既知の*rbcL*の塩基配列と高い相同性（90%以上）を示した。これにより、*rbcL*断片が鋳型DNAの*rbcL*の一部を増幅した物であることが明らかになった。この領域は*rbcL*の中でも比較的変異の大きい領域であることが高等植物や藻類の*rbcS*から予想されていた。それにも関わらず高い相同性を示したことは、*rbcL*を指標遺伝子に用いると、個体間のみならず種間の違いを解析することも難しいと予想される。一方、*rbcS*断片については、決定した全長約500塩基対の塩基配列のうち、珪藻（*Cylindrotheca* sp.）の既知の*rbcS*の塩基配列に相同性（83%以上）を示す部分が確認された。これにより、*rbcS*断片が鋳型DNAの*rbcS*の一部を増幅した物であることが明らかになった。これらの部分は*Cylindrotheca* sp.の*rbcS*一部を増幅した物であることが明らかになった。これらの部分は*Cylindrotheca* sp.の*rbcS*のうち、下流側のプライマー領域とその外側を除く部分（約380塩基）の塩基配列に相当していた（図3）。*Cylindrotheca* sp.の*rbcS*の相当部分との相同性は塩基配列およびアミノ酸配列で、*S. costatum*の*rbcS*断片で85%、88%、*T. nordenskioeidi*断片で83%、85%、*D. confervacea*で84%、87%、*Chaetoceros* sp.で83%、85%であった。今回求めた*rbcS*断片の塩基配列より求めたアミノ酸配列（図4）について、解析ソフト（clustalx）を用いて類猿関係を数値化し、分岐図を求めると図5のようになった。この結果は、形態から求められた現在の分類と良く一致しており、*rbcS*断片の塩基配列を用いることで、少な

くとも、種間の変異の大小を比較できることが明らかになった。*rbcL*断片、*rbcS*断片を増幅した同じプライマーにより、予測された分子量のDNA断片が得られたことを考えると、*rbcS+rbcL*断片も*rbcS*、*rbcL*の一部を増幅した物と考えられる。この断片についても、プラスミドベクターへの導入が終了しており、現在解析中である。

<i>S.costatum</i>	1	GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCTTTCTTACCTGATTTAACTGACGCACAAATTGAA	60
<i>T.nordenskioidii</i>	1	GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCTTTTACCTGATTTAACTGACACACAAATTGAA	60
<i>D.confervacea</i>	1	GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCTTTCTTACCTGATTTAACTGACGAACAAATTGAA	60
<i>Chaetoceros sp.</i>	1	GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCTTTCTTACCAGATTTAACAACGAACAAATTGAG	60
<i>Coscinodiscus sp.</i>	1	GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCTTTCTTACCAGATTTAACTGACCAACAAATTGAA	60

<i>S.costatum</i>	61	AAACAAGTTGCTTACGCAATG---AAC-AAAGG-TTGGGCTATGAACGTAGAGTGGACAG	115
<i>T.nordenskioidii</i>	61	AAACAAGTAGCTTACGCTATG---A-ATAAGG-TTGGGCTATGAACGTTGAGTGGACAG	115
<i>D.confervacea</i>	61	AAACGAGTAGCTTGCCTATG----TCTAGAGG-TTTAGCGATGAACGTAGAGTGGACAG	115
<i>Chaetoceros sp.</i>	61	AAACAAGTTGCTTACGCAATGAACA---A-AGG-TTGGGCAATGAACGTAGAGTGGACAG	115
<i>Coscinodiscus sp.</i>	61	AAACAAGTTGCATATGCAAT-TTCA---AGAGGCTT-GGCAATGAATGTTGAATGGACGG	115

<i>S.costatum</i>	116	ATGATCCACATCCACGTAACAACCTACTGGGAATTATGGGGTTTACCATTATTCGACATTA	175
<i>T.nordenskioidii</i>	116	ATGATCCACATCCTCGTAACAACCTACTGGGAATTATGGGGTTTACCATTATTCGACATTA	175
<i>D.confervacea</i>	116	ATGATCCACATCCTCGTAATAACTACTGGGAATTATGGGGTTTACCATTATTCGACATTA	175
<i>Chaetoceros sp.</i>	116	ATGATCCACATCCTCGTAACAGTTACTGGGAATTATGGGGTTTACCATTATTCGACATTA	175
<i>Coscinodiscus sp.</i>	116	ATGATCCACACCCACGTAACAGTTACTGGGAATTATGGGGTTTACCATTATTCGACATTA	175

<i>S.costatum</i>	176	AAGATCCTGCGA---CTGTAATGT-TCGAA-TTAAATGAAGCTCGTAAATCATGTGCGAG	229
<i>T.nordenskioidii</i>	176	AAGATCCTGCGA---CAGTAATGT-TTGAA-TTAAATGAAGCGCTAAACCATGTGCTT	229
<i>D.confervacea</i>	176	AAGATCCTGCAA---CAGTAATGT-TTGAA-TTAAATGAAGCTCGTAAATCATGTGCGAG	229
<i>Chaetoceros sp.</i>	176	AAGATCCTGC-A---TCTGTAATGT-TCGAA-TTAAATGAAGCTCGTAAATCATGTGCTG	229
<i>Coscinodiscus sp.</i>	176	AAGAT--T-C-AGGTTCTGTAATGTAT-GAACTT-AACGAAGCTCGTAAAGCATGT-C--	226

<i>S.costatum</i>	230	C---TGGCTATATTCGTATTAATGCATTTGATGC-A-TCATACGGTGTGAAAGTTG--T	282
<i>T.nordenskioidii</i>	230	C---TGGTTACATCCGTATTAATGCATTTGATGC-A-TCTTATGGTGTGAAAGTTG--T	282
<i>D.confervacea</i>	230	C---TGGCTATATTCGTATGAATGCATTTGATGC-A-TCCTACGGTACTGAAAGTTG--T	282
<i>Chaetoceros sp.</i>	230	C---TGGTTACATTCGTGTTAACGCGTTTGTGCTAGT--TACGGTACTGAAAGTTG--TT	283
<i>Coscinodiscus sp.</i>	227	CAAAATGGCTACATTCGTATGAATGCATTTGATGCTAGT--TACGGGACAGAAAGTTGCGT	284

<i>S.costatum</i>	283	GTTATGTCCTTTTCATTAC---AAACCGTCCA-GCTAAC-GAACCAGGTTTCTACTTAGATC	337
<i>T.nordenskioidii</i>	283	GTTATGTCCTTTTCATTAC---AAACCGTCCA-GCTA-CTGAGCCAGGTTTCTACTTAGATC	337
<i>D.confervacea</i>	283	GTTATGTCCTTTTCATTAC---AAACCGTCCA-GTTAGC-GAACCAGGTTTCTACTTAGATC	337
<i>Chaetoceros sp.</i>	284	CT-ATGTCCTTCAT--CGTTAA-CCGTCC-GGTTA-ATGAGCCAGGCTTCTACTTAGAAC	337
<i>Coscinodiscus sp.</i>	285	-T-ATGTCCTTCAT--CG-CAAGCCGTCGAAG-TA-ATGAGCCAGGTTTCTACTTAGATC	337

<i>S.costatum</i>	338	GTAC-AGATGGTC-CAGGTCGTC---AATCGTTTACAGCATTAGAGCTAC	384
<i>T.nordenskioidii</i>	338	GTAC-TGAAGG-CCAGGTCGTCAGGTTATC---TACAGTAGTA-AGAGCTAC	384
<i>D.confervacea</i>	338	GTAC-AGAAGG-CGTAGGTCGTC---AATCGTGTACAGTATTA-AGAGTTAC	384
<i>Chaetoceros sp.</i>	338	GT-CAAGAAGGTC-CAGGCCGTC-AA-A-----T-C-C-A-TACACAACCTAA	376
<i>Coscinodiscus sp.</i>	338	GTAC-AGAAGGAC-CAGGTCGTCGAATTAT--T-TACTCTATTA-AGAGTTAT	384

図3. *rbcS*断片について決定された塩基配列

<i>S.costatum</i>	1	VRLTQGCFSFLPDLTDAQIEKQVAYAMNKGWAMNVEWTDPPHPRNNYWELWGLPLFDIKD	60
<i>T.nordenskioeidii</i>	1	VRLTQGCFSFLPDLTDTQIEKQVAYAMNKGWAMNVEWTDPPHPRNNYWELWGLPLFDIKD	60
<i>D.confervacea</i>	1	VRLTQGCFSFLPDLTDEQIEKRVACAMSRGLAMNVEWTDPPHPRNNYWELWGLPLFDIKD	60
<i>Chaetoceros sp.</i>	1	VRLTQGCFSFLPDLTNEQIEKQVAYAMNKGWAMNVEWTDPPHPRNSYWELWGLPLFDIKD	60
<i>Coscinodiscus sp.</i>	1	VRLTQGCFSFLPDLTDQIEKQVAYAISRGLAMNVEWTDPPHPRNSYWELWGLPLFDIKD	60
		*****.****.*.*.*.*.*****.*****	
<i>S.costatum</i>	61	PATVMFELNEARKSCAAGYIRINAFDASYGVESCVMFITNRPANEPGFYLDRTDGPGRQ	120
<i>T.nordenskioeidii</i>	61	PATVMFELNEARKPCASGYIRINAFDASYGVESCVMFITNRPATEPGFYLDRTDGPGRQ	120
<i>D.confervacea</i>	61	PATVMFELNEARKSCAAGYIRMNAFDASYGTESCVMFITNRPVSEPGFYLDRTDGPGRQ	120
<i>Chaetoceros sp.</i>	61	PASVMFELNEARKSCAAGYIRVNAFDASYGTESCMSLIVNRPVNEPGFYLERQEGPGRQ	120
<i>Coscinodiscus sp.</i>	61	SGSVMYELNEARKACPNGYIRMNAFDASYGTESCVMFIASRPSNEPGFYLDRTDGPGRQ	120
		...*.*****.*.****.*****.***.*.*.*.*.*****.*.*****	
<i>S.costatum</i>	121	IVYSIKSY	128
<i>T.nordenskioeidii</i>	121	VIYSSKSY	128
<i>D.confervacea</i>	121	IVYSIKSY	128
<i>Chaetoceros sp.</i>	121	IHTQL---	125
<i>Coscinodiscus sp.</i>	121	IIYSIKSY	128
		

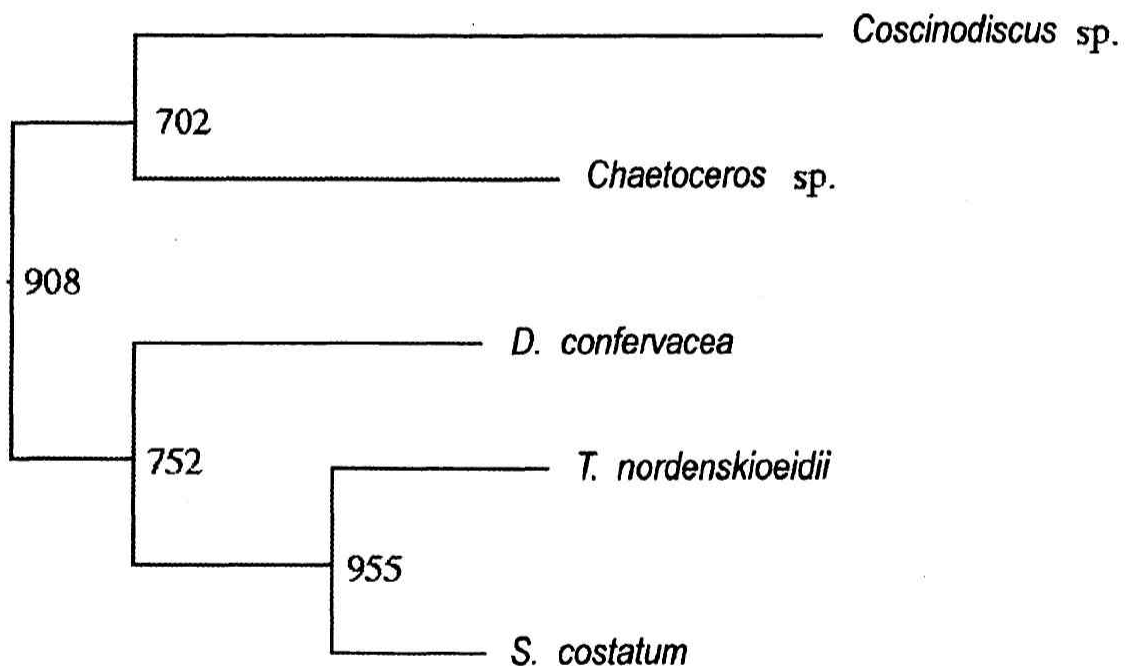


図4. *rbcS*断片について決定されたアミノ酸配列と求められた分岐図

今後の展望

本研究では、*rbcL*、*rbcS*、*rbcLS*、*rbcL+rbcS* の領域を増幅するPCR について、プライマーの設計に成功し、反応条件を決定した。さらに、本研究では珪藻類の*rbcL*と*rbcS*について、種間の比較により変異の大きさを検討した。その結果、*rbcL*の種間差は小さいが、*rbcS*は比較的大きく、種間の差を検討するのに十分な変異が認められることが明らかになった。個体識別に適切な「個体間に違いの認められるDNA」（指標DNA）として*rbcL*より*rbcS*の方が有望であると考えられる。

増幅された断片が短すぎるため、プラスミドベクターへの組込みが難しい*rbcLS*については、本研究では解析を行わなかった。しかしながら、*rbcL*や*rbcS*に比べてより大きな変異の予想される*rbcLS*は指標遺伝子として有望である。本研究で増幅に成功しながら未解析の*rbcLS*断片および*rbcL+rbcS*断片には、この*rbcLS*の全領域が含まれている（図2）。今後、これらの断片をダイレクトシーケンス等の方法を用いて解析することで、*rbcLS*領域が指標遺伝子として適切かどうかを明らかにできる。*rbcL*、*rbcS*、*rbcLS*のうち適切な領域が決定すれば、これまでの実験結果から自然環境中の個体群へ適用することが可能になっている。現在、サロマ湖試水より*D.confervacea*等の珪藻種を100株程度単離中であり、適切な領域が明らかになりしだい、これらの株を用いて「3.自然環境中での植物プランクトン種の個体密度の時間変化と種内の遺伝的多様性の変化の解析」を行う予定である。

参考文献

- 1.Suzuki, Y. and Takahashi, M. 1995. Growth responses to temperature of several diatom species isolated from various environments. *J. Phycol.* 31:880-888.
2. Kudoh, S., Robineau, B., Suzuki, Y., Fujiyoshi, Y. and Takahashi, M. 1997. Photosynthetic strategy and an estimation of primary production of ice algae under the environmental characteristics of Saromako. *J. Mar. Sys.* 11:93-109.
- 3.Suzuki, Y., Kudoh, S. and Takahashi, M. 1997. Photosynthesis and respiration characteristics of Arctic ice algal community inhabiting under poor light and low temperature environments. *J. Mar. Sys.* 11:111-121.
- 4.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