

総合理学研究所 1999 年度産学協同プロジェクト報告

B. DNA 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
IV. 指標 DNA による植物プランクトンの個体群動態の解析 2

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。自然環境中の植物プランクトン各種の個体の集まり(個体群)は、個体密度を著しく変化させながら存続している(3)。この個体群の中には少しずつ異なる遺伝子を持つ様々な個体が含まれており、その多少を一定の基準で定量化したものを、一般に「遺伝的多様性」と呼んでいる。密度が減少する際には、一部の個体が死滅するために遺伝的多様性は低下する。また、密度が増加する際にも、特定の個体を選択されることにより偏りが生じ、多様性は低下すると考えられる。個体密度の著しい増減の中では個体群内の遺伝的多様性は低下することが予想される。遺伝的多様性の低下した個体群は、様々な環境変動に対して脆弱であることが知られている。それにも関わらず、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る植物プランクトン個体群には、多様性を保持する機構や、多様性が低下しても存続する機構を持つ可能性が高い。植物プランクトン個体群の存続機構を考える上で、個体群内の遺伝的多様性を解析することは重要である。

本研究では、サーマルサイクラーを用いた polymerase chain reaction (PCR) による DNA 増幅技術を利用し、植物プランクトン個体群の各個体の DNA 塩基配列の一部を増幅し、これを指標として個体群内の異なる遺伝子を持つ個体を識別することで、「個体群内の多様性の変動を解析すること」を目指す。本研究では、温帯海域に普遍的に出現する *Skeletonema costatum* を材料に、1. 植物プランクトン各個体(単細胞)由来の DNA を増幅する技術の開発 2. 植物プランクトン各個体の識別に適当な(個体間に違いの認められる)指標 DNA 塩基配列の選択 3. 指標 DNA 塩基配列を用いた個体群内の多様性の測定 の三段階を経て実施する。このうち、第1・2段階は、総合理学研究所産学協同プロジェクトの助成を受け終了している。昨年度より同研究助成を受け、第3段階である「指標 DNA 塩基配列を用いた個体群内の多様性の測定」に着手している。本年度は、さらに長期間、広範囲にわたる個体群多様性の解析を行った。

材料と方法

材料

相模湾（小田原港、岩漁港）と東京湾より単コロニー由来の珪藻種 *Skeletonema costatum* 株を申請者らが単離した。

株の単離

表層水をφ10μmのプランクトンネットで穏やかに濾過し、1000倍に濃縮した。実体顕微鏡下で、パスツールピペットを用いて試水中の *Skeletonema costatum* を1コロニーずつに単離し、各コロニーを1mlのF/5培地(4)に移した。これを、現場海水温(15℃)、14h/10hの明暗周期で培養し増殖させた。

鋳型 DNA の抽出

増殖した各株を1.5mlチューブに移し、13000rpmで5分間遠心し細胞を集めた。これに、5% Chelex 溶液を100μl加え、よく混ぜた後、-20℃に30分間静置後、95℃に30分間置いた。この間何回か溶液を攪拌し、DNAの溶出を促した。その後、水中で急冷し、ゲノムDNAを変性した。13000rpmで5分間遠心した後の上澄みを変性済み total DNA 溶液とし、新しい1.5mlチューブに移した。

PCR・電気泳動・PCR産物の精製

精製した total DNA を鋳型として PCR を行った。昨年度使用したリブローズニ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 (*rbcL*) 用プライマー 3 (LF3; TCT GGT AAA AAC TAT GGT CGT GTA GT) と小サブユニット (*rbcS*) 用プライマー 1 (SR1; CCA CCT TCT GGA TTA GCT TGT ACA CT) を用い、指標遺伝子である *rbcL-rbcS* 間配列 (以下 *IRLS* と呼ぶ) を含む配列を増幅した。PCR はサーマルサイクラ (PCR Thermal Cycler PERSONAL、TaKaRa) を用い、total DNA 溶液に Taq 酵素 (Premix Ex Taq、TaKaRa) 規定量加えた後、95℃120秒と 53℃×30秒、72℃×1秒の反応を1サイクル、そして 94℃×30秒、53℃×30秒、72℃×60秒の反応を29サイクル、72℃×10秒を1サイクルの条件で行った (Premix Ex Taq (TaKaRa)、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL)。

シーケンス

ガラスミルク吸着法 (GENECLEAN II Kit、フナコシ) により精製した PCR 産物を鋳型としてダイターミネータ法 (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit、パーキンエルマー社) によりシーケンス反応を行った。予想される PCR 産物の両端より内側に存在する配列に対応した LSF0 (GGT CCT TTA CAA ACA GCT TTA GAT TTA TGG) と LSR0 (TTA CGT GGA TGT GGA TCA TCT GTC CA) をプライマーとして反応を行った。反応条件は、96℃×1分処理した後、96℃×10秒、53℃×5秒、60℃×4分を30サイクル行った。反応後、エタノール沈殿を行い、泳動緩衝液 (TSR、パーキンエルマー社) に溶かし、95℃で2分間熱変性した。塩基配列を決定は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI 社) で行い、ソフトウェア (GENETYX-MAC 9.0) により解析を行った。

結果と考察

PCR 反応後、全ての試料について DNA 断片の増幅が確認された。1%アガロースゲル電気泳動により分子量を確認したところ、IRLS 部の増幅時に予想される約 1kbp の分子量の DNA 断片のみが増幅した。さらに、シーケンスにより塩基配列を決定した結果、両側に *rbcL* と *rbcS* の既知の塩基配列を含む 38 塩基対の IRLS の増幅が確認された (図 1)。

これまでの申請者らの研究で、*S. costatum* の種内では、*rbcL* 及び *rbcS* に違いは認められなかった。しかしながら、IRLS を東京湾由来の *S. costatum* 株と相模湾 (小田原港、真鶴・岩漁港) 由来の株で比較すると全塩基対の 5%、2 塩基で違いが認められることが明らかになった (図 3)。この結果は IRLS が同種内の個体群に識別有効であることを示唆している。

さらに、IRLS を同じ海域より単離された個体群内で比較した。小田原港より単離した 72 株を比較したところ、IRLS に違いは認められなかった。また、同じ相模湾の真鶴・岩漁港由来の株にも全く同じ配列が認められた (図 1)。この結果は、隣接した海域では IRLS を指標とした単一の同じ個体群が出現することを示唆している。さらに、検出限界を超えるレベルまでの個体密度が減少した時期を挟む異なる時期 (1999 年 3 月及び 12 月) に真鶴・岩漁港で単離された株を比較したところ、双方の個体群に同じ配列しか認められなかった (図 2)。*S. costatum* 個体群は一次的な密度の低下にも関わらず絶滅することなく、好適条件になると再び同じ個体群が密度を増加させていた。これらの結果は、植物プランクトン種が個体密度の激しい増減の中で種内の多様性を保持する仕組みを持つ分けではなく、種内の多様性が低下しても生存してゆける何らかの仕組みを持っている可能性を示唆している。

一方、東京湾由来の株と相模湾由来の株に違いが認められたことから、異なる海域では異なる遺伝的組成を持つ個体群が存在すると考えられる。*S. Costatum* など多くの藻類が、汎世界的な分布を持つことを考えると、海域ごとに異なる遺伝的組成は、種全体としての高い多様性を強く示唆していた。多様性が低下しても存続してゆけるプランクトン種ではあるが、万一、多くの個体群が絶滅するような大きな変動があっても、種全体としての多様性により、絶滅を免れるのかも知れない。

一連の研究により開発された指標 DNA 塩基配列により同種内の個体を識別する新規技術は様々な生物に応用可能であり、形態による識別の難しかった様々な生物の個体群動態や遺伝的多様性の解析を可能にすると考えられる。開発された技術による環境中での生物の遺伝的多様性のモニタリングは、生物資源の保全を考えるうえでも極めて有効な手段となるであろう。

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. Potosynthesis 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.L. and Ryther,J.H 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I.Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea (Cleve) Gran.*Can.J. Micobiol.* 8:229-39.

図1 それぞれの自然環境中でのIRLSの塩基配列の比較

A 東京湾 1999

| STRAIN NAME | NUCLEOTIDE SEQUENCE | |
|-------------|--|----|
| tokyo-1-LS | 1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| tokyo-2-LS | 1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| tokyo-3-LS | 1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| tokyo-4-LS | 1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| tokyo-5-LS | 1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| | ***** | |

B 岩漁港 (相模湾) 1999.3

| STRAIN NAME | NUCLEOTIDE SEQUENCE | |
|-------------|--|----|
| 03-1-LS | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 03-2-LS | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 03-3-LS | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 03-4-LS | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 03-5-LS | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| | ***** | |

C 岩漁港 (相模湾) 1999.12

| STRAIN NAME | NUCLEOTIDE SEQUENCE | |
|-------------|--|----|
| 007 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 028 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 029 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 034 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 035 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| | ***** | |

D 小田原港 (相模湾) 1999.12

| STRAIN NAME | NUCLEOTIDE SEQUENCE |
|-------------|---|
| 001 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 002 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 003 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 004 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 005 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 006 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 007 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 008 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 009 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 010 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 011 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 012 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 013 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 014 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 015 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 017 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 018 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 020 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 021 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 022 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 023 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 025 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 026 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 027 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 030 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 031 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 032 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 033 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 034 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 035 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 036 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 037 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 038 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 040 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 042 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 043 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 045 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 046 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |
| 047 | 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38 |

052 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
053 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
054 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
055 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
056 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
057 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
058 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
059 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
060 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
061 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
062 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
063 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
064 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
065 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
066 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
067 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
079 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
082 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
083 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
084 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
086 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
087 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
088 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
089 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
090 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
091 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
092 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
093 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
094 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
096 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
108 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
109 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
124 1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38

図2 同一地域での季節による比較

| | | | | |
|-------|---------|---|--|----|
| 岩漁港 | 1999.3 | 1 | TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 岩漁港 | 1999.12 | 1 | TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| ***** | | | | |

図3 東京湾と相模湾の比較

| | | | | |
|-----------------|---------|---|--|----|
| 東京湾 | 1999 | 1 | TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 岩漁港 (相模湾) | 1999.3 | 1 | TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 岩漁港 (相模湾) | 1999.12 | 1 | TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| 小田原港 (相模湾) | 1999.12 | 1 | TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA | 38 |
| *****.***.***** | | | | |

注) 図1、2、3の*印は塩基配列が相同であることを意味しており、.印は異なっていることを意味している。