

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、特定の個体が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φ10 μm 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 100 μl 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、氷中で急冷し、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 断片のみが増幅してた。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わけではなく、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。