

総合理学研究所 2000 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 3

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 (Suzuki and Takahashi, 1995; Kudoh et al., 1997)、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 (Suzuki et al., 1997)。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切な (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。1999

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、RubisCO をコードする遺伝子の塩基配列を珪藻 11 種について決定し、第2段階で決定した指標 DNA 塩基配列の個体群識別の指標としての有用性を再検討した。個体群の多様性を検出するために必要であると考えられる微量試料からの DNA 抽出と PCR による増幅を検討し、この方法を用いて多数の個体を対象とし、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

### 指標 DNA 領域の DNA 塩基配列に基づく個体群識別の検討

珪藻 11 種 (*Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve、*Thalassiosira antarctica* Comber、*Thalassiosira pacifica* Gran、*Detonula confervacea* (Cleve) Gran、*Coscinodiscus* sp.、*Cheateoceros* sp.、*Odontella* sp.、*Nitzschia frigida* (Grun.) Cleve、*Navicula* sp.、*Fragilariopsis* sp.と *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve) の培養株を実験に用いた。それぞれの珪藻培養株からキレート剤 (Chelex-100) を用いる方法 (Walsh et al. 1991) により全 DNA を抽出した。*T. nordenskiöldii* の *rbcL* と *rbcS* の既知塩基配列 (Tomizawa, 1999a) を他の珪藻種 (*Detonula confervacea* (Tomizawa, 1999b)、*Cylindrotheca* sp. (Hwang and Tabita, 1991)) の *rbcL* と *rbcS* の既知塩基配列と比較し、保存性の高い領域を選び PCR プライマー (LF1 と SR1) を設計した。これらのプライマーと Taq DNA polymerase (TaKaRa Premix Ex Taq) を用い、抽出した DNA を鋳型として、ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) を行い珪藻 11 種の *rbcL*、*rbcILS* と *rbcS* の全領域を一度に増幅した。PCR 産物を鋳型 DNA として、dye terminator 法 (Sanger et al., 1977) により *rbcL*、*rbcILS* と *rbcS* の塩基配列を決定した。決定した珪藻各種の塩基配列を比較し、また様々な領域について遺伝距離 (Kimura, 1980) を計算し近隣結合法 (Saito and Nei, 1987) により分岐図を制作することで、指標 DNA 領域を検討した。

### 微量試料からの全 DNA 抽出と PCR による増幅

簡便な DNA 抽出法として知られるキレート剤 (Chelex-100) を用いる方法 (Walsh et al., 1991) を適用し *Thalassiosira nordenskiöldii* 珪藻培養株を用いて微量試料からの高収率の DNA 抽出と、これを用いた DNA 断片の増幅を検討した。培地中の細胞密度が一定になるように希釈し、十分に攪拌した各培地の 1 ml を用いることで一定数の細胞を集めた。少数の細胞を用いる場合には、実体顕微鏡下で細胞数を確認した単コロニーを直接ピペティングで取り出し、正確に一定数の細胞を集めた。一定数の細胞から DNA をキレート剤を用いる方法により抽出した。これを鋳型として PCR を行い、反応産物を 1 % アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイ

ドで染色し増幅を確認した。

#### 指標 DNA 領域を用いた個体群識別

東京湾木更津沖（96 年 12 月）、真鶴町岩漁港（99 年 3 月、12 月）、小田原市小田原港（99 年 12 月）で採取した海水試料を各現場でプランクトンネット（ $\phi=10\ \mu\text{m}$ ）を用いて約 500 倍に濃縮した。これを保温して実験室に持ち帰り 1 日以内に実体顕微鏡下で *Skeletonema costatum* の各個体をピペッティングにより単離し実験に用いた。これらの各個体から、キレート剤を用いる方法により全 DNA を抽出し、PCR 法により指標 DNA 領域を含む DNA 断片を増幅し、反応産物を鋳型として dye terminator 法により指標領域の塩基配列を決定した後、個体群内および個体群間で指標領域の塩基配列を比較した。

#### 結果と考察

##### 指標領域の DNA 塩基配列に基づく個体群識別の可能性の検討

*T. nordenskioeldii* の既知塩基配列との比較により、珪藻 11 種において *rbcL* の一部（*rbcL'* とする）、*rbcILS* と *rbcS* の一部（*rbcS'* とする）の塩基配列を決定した。プライマーの外側である *rbcL* の開始から 102 塩基と *rbcS* 終止コドンとその上流 33 塩基は決定できなかった。*T. nordenskioeldii* に対する全領域での塩基配列の相同性の平均は  $90.1\pm3.1\%$  であった。*rbcL'* と *rbcS'* の塩基数は全種で同じであり、それぞれ 1371 塩基と 384 塩基であったが、*rbcILS* の塩基数は種によって異なり 37~40 塩基であった。珪藻種の *rbcILS* は、紅藻亜綱の 77~113 塩基（Valentin and Zetsche, 1990）や褐藻綱の 112~280（Assali et al., 1990）に比べ短い、変異が大きく種によって塩基数が異なることは共通していた。*T. nordenskioeldii* の塩基配列に対する各領域（*rbcL'*、*rbcILS*、*rbcS'*）の相同性の平均はそれぞれ  $91.2\pm2.8\%$ 、 $89\pm3.9\%$ 、 $87.0\pm6.3\%$ （平均 $\pm$ 標準偏差）となり、相同性は *rbcS'* で低く、*rbcL'* と *rbcILS* ではそれよりも高い相同性が認められた。これは酵素 RubisCO の補助的役割を担っている小サブユニットをコードする *rbcS* の方が、反応中心を持つ大サブユニットをコードする *rbcL* に比べ変異が大きいことが多くの生物で知られていることと一致する。また、*rbcILS* は非コード領域でありながらアミノ酸をコードしている *rbcS'* よりも相同性が高くなっていた。これは *rbcILS* の塩基配列中のリボゾーム結合部位である Shine-Dalgarno 配列（Shine and Dalgarno, 1974）とそれに続く配列で相同性が高くなっていたためである。これを除いた領域（*rbcILS'* とする）の塩基配列の相同性はどの領域よりも低くなっていた。また、変異の分布は *rbcL'*、*rbcILS*、*rbcS'* のいずれの領域においても一様ではなく、特定の領域（S1~S13 領域）に集中しており、特定の領域（G1~G8 領域）は保存性が高くなっていた。この特徴的な各領域の個体群識別の指標としての有用性を、塩基配列から計算した遺伝距離に基づいて分岐

図を制作することで検討した。識別の明瞭性を遺伝距離の和で、正確性を中心目・羽状目の識別と *Thalassiosira* 属 3 種の識別の 2 点で検討した。その結果、系統関係を正しく解析するためには、十分な数の塩基からなる領域が必要であり、各種を明瞭に区別するためには、変異の大きな領域が必要であることが示唆された。極めて近縁な同種個体群の違いを検出するためには、高い明瞭性が必要であると考えられる。これらの結果は、少数の塩基でも変異の大きい領域を用いれば、高い明瞭性だけなら得られることを強く示している。そのため、遺伝距離の和が大きかった領域 *rbcILS'* や S4 領域の塩基配列を用いれば、近縁な同種個体群の解析を行えると考えられる。

#### 微量試料からの DNA 抽出と PCR による増幅

少量の抽出緩衝液を用いて少数の細胞から DNA を抽出することで、800~80 細胞から抽出した DNA を鋳型として用いた PCR 法により目的の DNA 断片を増幅することに成功した。さらに細胞数を減らすために実体顕微鏡下で細胞数を確認し、一定数の細胞をピペッティングで取り出す方法を用いたところ、最少 10 細胞からの抽出と PCR による目的の DNA 断片の増幅に成功した。この PCR 産物を直接シーケンス反応に用いることで、珪藻種の各個体から抽出した DNA を鋳型として PCR により増幅し、指標領域の塩基配列を決定することが可能になった。

#### 指標 DNA 領域を用いた個体群識別

指標 DNA 領域として、遺伝距離の和が大きかった *rbcILS* と S4 領域のうち種内での大きな変異が予想されるアミノ酸をコードしていない *rbcILS* 領域に着目し、天然同種個体群の DNA 塩基配列の解析を行った。同じ海域で採取した個体群内では *rbcILS* 塩基配列に変異は認められなかった。特に、72 個体を用いて解析した小田原港の個体群での結果は、同一個体群中の各個体では *rbcILS* 塩基配列に変異が生じていないことを示している。また、最も大きな変異が予想される *rbcILS* 塩基配列に変異が認められないことから、*rbcL* と *rbcS* 塩基配列にも変異が生じていないことが予想される。異なる海域から採取した個体群間で *rbcILS* 塩基配列を比較したところ、岩漁港と小田原港での個体群間では変異は認められなかったが、これらと東京湾の個体群との比較では *rbcILS* 塩基配列に変異が認められた (図 1-A)。これは岩漁港と小田原港の個体群が同一の個体群に由来し、東京湾の個体群はそれとは異なる別の個体群に由来することを示している。また、同じ海域に出現した *S. costatum* 個体群が個体群の増殖時期によって異なるかを調べた。岩漁港において、1999 年 3 月と 12 月に出現した *S. costatum* 個体群を用いて *rbcILS* 塩基配列を比較したが、3 月と 12 月の個体群間の *rbcILS* 塩基配列に変異は認められなかった (図 1-B)。珪藻種は、好適な条件下では数時間から数日の間隔で分裂を繰り返し個体密度を増加させるが、不適な環境のもとでは捕食や沈降などにより海中の個体密度を急速に減少させる。



3月の個体密度の増加から12月の個体密度の増加の間には、*S. costatum* 個体群は個体密度を大きく減少していたと考えられる。実際に、この期間には *S. costatum* は採取できなかった。このことから、異なる増殖時期の同所での個体群は個体密度が極端に減少する時期をはさんで増殖を繰り返した同一個体群であると考えられる。このように、*rbcILS* 塩基配列は、形態による識別が困難な微細藻類の同種個体群を識別することができる指標 DNA 領域として用いることができると考えられる。

今回、地球規模の気温異常に起因すると思われる海水温の異常のために、各海域での再三の採集にも関わらず 2000 年の *S. costatum* 個体群は残念ながら採取できなかった。しかしながら、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。

#### A 海域間の比較

単離場所	単離年月	塩基配列
東京湾	1999. 12	1 TAAATTACTTTCATAAACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
岩漁港	1999. 3	1 .....A...C..... 38
小田原港	1999. 12	1 .....A...C..... 38
***** ** *****		

#### B 増殖時期による比較

岩漁港	1999. 3	1 TAAATTACTTTAATACACATTTAAGGAGTATTTGAATA 38
岩漁港	1999. 12	1 ..... 38
*****		

図 1. *rbcILS* 塩基配列の比較

A は全海域間の個体群の *rbcILS* 塩基配列の比較。B は岩漁港の 1999 年 3 月と 12 月の個体群の *rbcILS* 塩基配列の比較。“.” は上段の塩基と相同であることを示し、“\*” は全個体群で塩基が相同であることを示している。

#### 参考文献

- Assali N. E., Mache R. and Loiseaux-de G. S. 1990. Evidence for a composite phylogenetic origin of the plastid genome of the brown alga *Pylaiella littoralis* (L.) Kjellm. *Plant Molecular Biology*. 15:307-315.
- Hwang S. R. and Tabita F. R. 1991. Cotranscription, deduced primary structure, and expression of the chloroplast-encoded *rbcL* and *rbcS* genes of the marine diatom *Cylindrotheca* sp. strain N1. *The Journal of Biological Chemistry*. 266:6271-

6279.

- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*. 16:111-120.
- 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. *Journal of Marine Systems*. 11:93-109.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 4:406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:5463-5467.
- Shine J. and Dalgarno L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71:1342-1346.
- 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. *Journal of Marine Systems*:111-121.
- Suzuki Y. and Takahashi M. 1995. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *Journal of Phycology*. 31:880-888.
- Tomizawa K. 1999a. Structure and function study of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of the marine diatom, *Thalassiosira nordenskiöldii*. *Published Only in DataBase (DNA Data Bank of Japan)* . ACCESSION AB018007.
- Tomizawa K. 1999b. Structure and function study of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of the marine diatom, *Detonula confervacea*. *Published Only in DataBase (DNA Data Bank of Japan)* . ACCESSION AB018006.
- Valentin K. and Zetsche K. 1990. Structure of the Rubisco operon from the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*: evidence for a polyphyletic origin of the plastids. *Molecular and General Genetics*. 222:425-430.
- Walsh P. S., Metzger D. A. and Higuchi R. 1991. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 10:506-513.