

機関番号：84201

研究種目：若手研究 A

研究期間：2007～2010

課題番号：19688011

研究課題名（和文）湖沼のプランクトン分子分類に基づく識別とモニタリングへの適用

研究課題名（英文）Developing phytoplankton detection and monitoring methods in lakes

研究代表者

石川 可奈子（ISHIKAWA KANAKO）

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・総合解析部門・主任研究員

研究者番号：80393180

研究成果の概要（和文）：

琵琶湖の植物プランクトン 133 株を単離培養し、真核生物は 18S、原核生物は 16S rRNA 遺伝子を増幅するためのユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、クローニングの後、塩基配列の全長解析を行った。琵琶湖で主に出現しやすいプランクトン塩基配列のアライメントにより、ターゲットとする 18 種を特異的に検出するためのプライマーの設計、また、それらを用いた定量的 PCR（リアルタイム PCR）を用いた検出を試みたところ、顕微鏡観察で確認された種の検出ができた。また、藍藻類全体をターゲットとした PCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）を用いて野外湖水の群集構造解析行ったところ、これまで報告のないピコプランクトン種のバンドが多数検出され、今後、分子分類を用いることにより長期のモニタリングだけでなく、プランクトン群集の多様性がより客観性の高い分析手法で明らかになると示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A plankton DNA database and monitoring method were developed in this project. Plankton cultures were isolated from Lake Biwa, and 18S or 16S rRNA genes were amplified with each universal primer set. The precise sequence of nucleotides in a sample of SSU-rRNA gene was analyzed after TA cloning treatment.

Primers for real-time PCR to detect 18 target species from Lake Biwa were designed by Primer 3 software based on the alignment of the Lake Biwa Plankton DNA Database using DNASIS Pro V2.10. These primer sets were tested using a real time PCR system, and the results of 15 species' detection were synchronized using a microscope. PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) analysis successfully showed pico-plankton species that have not been previously detected in Lake Biwa. We believe that these molecular methods will be useful for future diversity studies as well as for long-term plankton monitoring.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|------------|-----------|------------|
| 平成 19 年度 | 5,900,000 | 1,770,000 | 7,670,000 |
| 平成 20 年度 | 8,800,000 | 2,640,000 | 11,440,000 |
| 平成 21 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 平成 22 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 総計 | 16,100,000 | 4,830,000 | 20,930,000 |

研究分野：水産

科研費の分科・細目：水産一般

キーワード：環境微生物、分子識別法、プランクトン、環境監視、琵琶湖

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

水産資源および水生生物を支える餌生物として、また、水環境の状態をあらゆる重要な指標として、顕微鏡観察による長期的なプランクトンのモニタリングがなされてきた。日本最大の湖「琵琶湖」をかかえる滋賀県においても滋賀県水産試験場が1962年より、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター環境監視部門(旧滋賀県立衛生環境センター環境部門)が1978年より定期モニタリングがなされている。しかしプランクトン種のなかには、生活史におけるステージ、生理条件、雌雄の違いによって形態が大きく変化する種や、或いは、まったく別の生物群に属する酷似種が同水塊中に生息するため、これまでのモニタリングで一般的に用いられてきた光学顕微鏡観察では、十分な経験を有する技術者でも同一種かどうかの識別すら困難である場合や、種レベルでの同定が不可能な場合が多く、分析精度が一定しないという問題は未だ解決されていない。このような分析誤差は長期トレンドの解析を困難にし、ややもすると間違った解釈を導きかねない。

近年、DNAのデータベース化によって細菌から高等動植物まで遺伝子情報に基づく分類識別が飛躍的に発展しており、分子分類に基づく分析精度の安定したモニタリングが実現する日も近いと考えられている。

2. 研究の目的

湖沼のプランクトンの遺伝子情報に基づく迅速かつ正確で客観的な分類ならびに定量化手法を開発することを目的としており、本研究では、最もモニタリングデータが充実した湖沼の1つである琵琶湖をケーススタディとして手法開発を行った。

3. 研究の方法

プランクトン分子モニタリング手法開発のプロセスを図1に示した。

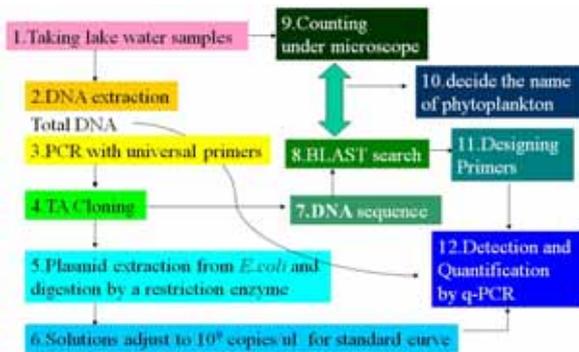


図1 プランクトン分子モニタリング手法開発のプロセス

サンプリング: 1) 野外のサンプリングによって湖水を採取する。2) 湖水 1L を 5000g で 10 分間、さらにマイクロチューブで 20000 g で 1 分間、遠心分離によりペレットを集め市販のDNA抽出キット(DNeasy Plant Mini Kit Qiagen社製 Cat No 69104)を用いて Total DNA を取得する。

遺伝子データベースの拡充: 3) 真核生物および原核生物の18S或いは16S rRNA遺伝子を増幅させるユニバーサルプライマーを用いてPCRを行う。真核生物用のプライマーとして、UEP-1 5'-TACCTGGTGGATCCTGCCAG-3'、UEP-2 5'-TGATCCTTCTGCA GGTTACCTAC-3' 或いはPCRA 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'、PCRB 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'、原核生物の場合B27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' U1525r:5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3' を用いた。PCRはTaKaRa Ex

Taq (product # RR001A)を用いて、プロトコールにしたがって遺伝子増幅を行った。4) 得られたPCR産物をアガロースゲル1.5%(w t/vol)で電気泳動およびバンド確認、切り出し精製をWizard SV gel and PCR Clean-UP system (Promega cat# A9281)を用いて行った後、TAクローニング(TOPO TA Cloning® for Sequencing with TOP10E.coli Invitrogen社製) Cat No. K4575-01)を行った後、プラスミド抽出(GENE ALLTM Plasmid SV mini Cat# GB101150)およびシーケンスにより遺伝子配列を解読した。

ターゲット種検出用プライマーの設計: 琵琶湖で頻繁に観察されるプランクトン種を表1のリストを用いて、プライマー設計用ソフト(Primer 3)を用いて設計した。プライマーの設計に用いた条件は図2に示したとおりである。

表1 琵琶湖に出現する主なプランクトンと、それぞれの種を検出するプライマリーストならびに Tm 値

| 番号 | 分類 | 学名 | 720-8 | 810-91 | Tm |
|----|----|-------------------------|--------|-------------------------|------|
| 1 | 藻類 | Microcystis spp. | MeF1F | GGGCAAGTGTGAACTGATTTT | 88.2 |
| 2 | | | MeF1B | GGGAATTCGCCACTGCT | 88.0 |
| 3 | 藻類 | Chlorella vulgaris | ChV1F | TGCTGATTCGAGGGGAAA | 88.8 |
| 4 | | | ChV1B | ATGAGGAGGAGTACGGGGA | 88.7 |
| 5 | 藻類 | Aphanizomenon spp. | AvF1F | GTAGAGTTTGTTGGGGGAGA | 87.4 |
| 6 | | | AvF1B | GGCAAGGGGAGACTTAACTG | 87.3 |
| 7 | 藻類 | Chlorella spp. | ChV1F | AGGATGGATCTAGGTTGT | 88.8 |
| 8 | | | ChV1B | TGGTAAAGTCTTGGGTTG | 88.8 |
| 9 | 藻類 | Chlorella kuetzingii | ChV1F | TGGATTTTCTTGTGAGCCG | 88.7 |
| 10 | | | ChV1B | GCAGTGGCTGCTTGAGCACT | 87.8 |
| 11 | 藻類 | Chlorella americana | ChV1F | GGTAACTTAAAGTACCTG | 88.6 |
| 12 | | | ChV1B | AACTTGTGAGGATCCG | 88.1 |
| 13 | 藻類 | Dinobryon spp. | DinF1F | CTGATCTGATTCAGGGTATGTG | 84.4 |
| 14 | | | DinF1B | CAAGCGAAGAACTGAGCAAG | 88.1 |
| 15 | 藻類 | Mastogonia spp. | MaF1F | GATTAAGTTGTGGGTAAG | 88.2 |
| 16 | | | MaF1B | GCTAGCTAAATATTTAAAGGGTA | 88.0 |
| 17 | 藻類 | Phragmites communis | PhF1F | ATGCTGACTTGGTTGGCTG | 88.0 |
| 18 | | | PhF1B | GGTAAAGCTGCTTTGAGACT | 84.3 |
| 19 | 藻類 | Cyanothece menziesiana | CyF1F | TCTGTGGGAACTTGGATG | 88.4 |
| 20 | | | CyF1B | TAGAAAGGCGGCGCTTGG | 88.1 |
| 21 | 藻類 | Stigeoclonium triale | StF1F | GCTGAACTTGGTTCTCTGG | 87.1 |
| 22 | | | StF1B | GAGTGTGAGAGGAAATAGGA | 86.0 |
| 23 | 藻類 | Nitzschia ovalis | NiF1F | GGATTTGCTTGTGATGCTGA | 87.0 |
| 24 | | | NiF1B | CATTAGCTTGTGGGAAAG | 88.2 |
| 25 | 藻類 | Actinocyclus luteoalbus | AcF1F | GATTCAGCGAACTTCAAGG | 88.6 |
| 26 | | | AcF1B | GGCAGCGGAAATCCAACTAC | 88.2 |
| 27 | 藻類 | Springera spp. | SpF1F | TGGGCTGTGGCTAGCTTAA | 87.3 |
| 28 | | | SpF1B | TGGGAAAGTGTGGTTGCA | 84.8 |
| 29 | 藻類 | Staurastrum spp. | StF1F | GATTCAGCTTGGTTCTGATG | 84.4 |
| 30 | | | StF1B | GCTCCGAAAGCAAGCAAA | 87.2 |
| 31 | 藻類 | Chlorella vulgaris | ChV1F | TGTAAGGCTGGGCTTCTTA | 84.5 |
| 32 | | | ChV1B | AGCTGATGCTGGGCTTAA | 84.0 |
| 33 | 藻類 | Chlorella spp. | ChV1F | GGCAGTGTGTTCTAAATAGAGAG | 88.3 |
| 34 | | | ChV1B | GGGCACTCAAAAGAAAGCA | 88.3 |
| 35 | 細菌 | Escherichia coli | EcF1F | AGTGGTGGAAAGCTTAA | 88.6 |
| 36 | | | EcF1B | GAAATTCGAGGCAAGCTTC | 88.2 |

C. Kuo, H-D. Park, N. Yamamura, M. Kumagai. (2010) Phytoplankton community reorganization driven by eutrophication and warming in Lake Biwa Aquatic Science, 72:467-483. 査読あり

〔学会発表〕（計8件）

大久保智司・細川由貴・石川可奈子・宮下英明 琵琶湖北湖で検出された*Synechococcus* sp.の遺伝的多様性とその動態 日本藻類学会第35回大会 富山大学 2011年3月

細川由貴・大久保智司・石川可奈子・宮下英明 PCR-DGGE法を用いた琵琶湖北湖の植物プランクトンの多様性と周年変動解析日本藻類学会第35回大会 富山大学2011年3月

大久保智司・細川由貴・石川可奈子・宮下英明 琵琶湖におけるピコシアノバクテリア遺伝的多様性とその動態 日本陸水学会第75回大会 弘前大学 2010年9月

細川由貴・大久保智司・石川可奈子・宮下英明 琵琶湖湖心における植物プランクトン群集構造の垂直分布と周年変動 日本陸水学会第75回大会 弘前大学 2010年9月

細川由貴・大久保智司・石川可奈子・宮下英明 琵琶湖湖心における植物プランクトン群集構造の分子生物学的解析 日本陸水学会第75回大会 弘前大学 2010年9月

Ishikawa, K., T. Nakajima, O. Mitamura, S. Tsujimura, M. Fukui, M. Nishino PROGRESSIVE OXYGEN DEPLETION AT THE BOTTOM OF LAKE BIWA AND CHANGES IN DISTRIBUTION OF SULFATE-OXIDIZING BACTERIA THIOPILOCA 国際微生物生態学会 ISME-13 2010年8月

石川可奈子・一瀬 諭 分子分類に基づく植物プランクトンの識別とモニタリング手法の開発の試み 日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会 北海道大学水産学部 2009年10月.

Ishikawa, K., T. Nakajima Changes in bacterial community structure accompanying oxygen depletion of the deepwater zone of Lake Biwa, Japan アメリカ陸水海洋学会 ASLO 2009 フランス・ニース市 アクロポリス国際会議場 2009年1月

〔図書〕（計1件）

Ishikawa, K., S. Fujita, T. Nakajima 「Topic10: Microbes as an indicator species in low oxygen environments」 in Nakamura et al. (Eds) Lake Biwa : Relationship between human and nature. Springer Academic, 550p, 2011年

〔その他〕

岡本高弘・石川可奈子 (2009) 水質調査船上から見た琵琶湖 琵琶湖環境科学研究センター ニュース びわ湖みらい10:2-3. 査読なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 可奈子 (ISHIKAWA KANAKO)
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・総合解析部門・主任研究員
研究者番号：80393180

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し