

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780178

研究課題名（和文）全ミトコンドリアゲノム配列に基づくシオミズツボワムシ複合種の迅速分類技法の開発

研究課題名（英文）Investigation of *Brachionus plicatilis* species complex classification based on full mitochondrial genome

研究代表者

菅 向志郎（SUGA KOUSHIROU）

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：60569185

研究成果の概要（和文）：シオミズツボワムシ複合種の生物学的特徴に一致する新規な分子系統解析による分類法の検討を行った。全 mtDNA を用いた分類法では生物学的特徴に一致する明確な分類は出来なかった。しかし、種の基盤となる生殖に関連する *Mate Recognition Pheromone* 遺伝子による解析で、生物学的特徴に近い分類が可能であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：RFLP analysis using mtDNA was performed to establish a new classification method matched with biological characters on *Brachionus plicatilis* species complex. RFLP fingerprint patterns of mtDNA were inconsistent with its biological characters. *Mate Recognition Pheromone* gene sequences similarity analysis on *B. plicatilis* was nearly matched with its biological character classification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：シオミズツボワムシ、ミトコンドリア DNA、分類法、PCR

## 1. 研究開始当初の背景

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*（以下ワムシ）は魚介類の種苗生産で欠かすことの出来ない餌料プランクトンとして世界中で広く使用されており、産地や生物学的

諸特性をもとに 100 を超える株が登録されている。これまで、ワムシは形態種として 3 タイプ（L、S、SS）に分けられてきたが、近年の遺伝子部分配列（COI や ITS 等の DNA 配列）の解析によって 9～16 種に分類されるよ

うになり、現在は *Brachionus plicatilis* 複合種として扱われている。この細分化はワムシの基礎研究のみならず、種苗生産の現場でも大きな混乱をもたらしている。例えば、研究機関において生物学的特性が詳らかにされたワムシ株は世界中で 100 を超えるが、これらは先の遺伝子情報による分類とは必ずしも一致しない。また、種苗生産の現場では幼生飼育に必要なワムシを安定供給することは必ずしも容易ではないため、各々の機関で経験的に培養の比較的安定している株を維持し、機関間で行き来する場合も多い。ところが、これらの株がどのような遺伝形質および生物学的特性を持つワムシ株であるのかは判然としていない。したがって、ワムシの分類が混乱している上に、これまで生物学的特性の知見が集積したワムシ株と種苗生産現場で使用しているワムシ株とは異なり、現場のワムシ株の生物学的特性の知見は圧倒的に少ない。

基礎研究分野では、ワムシの培養時における環境因子（水温、塩分、アンモニア態窒素、バクテリア相など）に対して、個々のワムシ株が有する耐性や応答等の生物学的特性の解析に主眼が置かれ研究が行われて来た。これらの知見を種苗生産現場のワムシ株と繋ぐためのワムシ株の識別法が確立されれば、知見の集積に時間を要する生物学的特性を迅速に推定することが可能となる。

## 2. 研究の目的

これまでのワムシの分子生物学的手法による研究は、複合種であるワムシを種レベルで細分化するのが主体であり、生物学的特性による分類とは乖離してきている。本研究の目的は、形態的な大まかな分類と遺伝子配列による細分化の中間に位置し、ワムシの生物学的特性と一致する mtDNA を用いた RFLP 分析によるワムシ株の新規分類法を開発す

ることである。これにより、時間を有するワムシ株ごとの生物学的特性の解析を行わず、ワムシ株の生物学的特性を推定出来る。また、海産魚種苗生産の実情にあったワムシ株の分類として非常に意義があるため、生物学的特性に基づくワムシ培養を可能とし、種苗生産業界に大きな波及効果をもたらすことが予測される。ワムシは世界中で種苗生産に用いられているが、由来を明らかにした株による培養は少ない上に機関間での往来も多く、病害事例などが発生した場合にも、どの株に由来するかなどの基本的な生物学的特性が不明なため、迅速な対処ができないのが現状である。本研究による成果は日本のみならず世界の種苗生産現場で活用可能である。

## 3. 研究の方法

(1) ワムシ株 mtDNA 増幅用のユニバーサルプライマーの設計

生物学的特性が異なるワムシ株の *cox1*、*cox2*、*rmS*、*rmL* 遺伝子配列を解析し、共通な配列を見出すことでユニバーサルプライマーを以下の手順で設計した。

- ①ワムシ株より *cox1*、*cox2*、*rmS*、*rmL* 遺伝子を増幅。
- ②増幅した遺伝子断片の塩基配列を解析。
- ③GenBank に登録されているワムシの *cox1*、*cox2*、*rmS*、*rmL* 遺伝子と、②で解析した遺伝子配列より共通な配列の検索。

(2) mtDNA 全塩基配列を増幅する為の PCR 条件の決定

上記 (1) で設計したプライマーを用いて安定的に 2 つの mtDNA 全塩基配列を増幅する為の PCR 条件（DNA 合成酵素、反応液組成、PCR プログラム）を決定した。

(3) RFLP 解析による解析

増幅した mtDNA 全塩基配列を制限酵素で

消化し、アガロース電気泳動により RFLP 解析を行った。

#### (4) *MRP* 遺伝子の解析

形態種として従来法で分類されている L 型 10 株、S 型 6 株、SS 型 7 株の各ワムシ株を個別に培養し、それぞれ約 60,000~80,000 個体を収穫した。これらより total RNA を単離し、sscDNA を合成した。*MRP* 遺伝子断片を PCR により増幅させるためのプライマーは、既知のロシア株 (L 型) *MRP* 遺伝子配列を基に設計した。増幅した *MRP* 遺伝子断片の塩基配列を解析し、相同性検索を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ワムシ株 mtDNA 増幅用のユニバーサルプライマーの設計

複数のプライマーにて全 mtDNA の増幅効率を確認した結果、以下のプライマーが最適であることを見出した。

フォワードプライマー配列：

TCAAGAATTGAGCTTATTTTACACGACACG

リバースプライマー配列：

GTTAGACAGCATAATACCAGTAAGACC

#### (2) mtDNA 全塩基配列を増幅する為の PCR 条件の決定

上記プライマーと全 DNA を用いて、mtDNA を増幅させる PCR の条件検討には、長鎖 DNA 増幅用、高増幅効率および、増幅時の正確性が高い DNA ポリメラーゼをそれぞれ、複数種類使用した。この結果、ワムシの全 mtDNA を効率よく PCR で増幅させるには、高正確性を有する酵素の使用が最適であった。また、全 mtDNA 増幅させる際の反応液中に含まれる dNTP およびプライマーは、通常使用される濃度よりそれぞれ 2 倍、1/2 倍とすることで、さらに増幅効率を高められ

ることを見出した。また、PCR のプログラムは、本酵素で通常用いられる 2 ステップ反応より 3 ステップ反応の方が、より安定的にワムシ全 mtDNA が増幅可能であることを見出した。

#### (3) RFLP 解析による解析

増幅した mtDNA 配列の RFLP 解析からは、形態種として従来法で分類されている L 型、S 型、SS 型の各ワムシ株ワムシを明確に分けることは出来なかった。

#### (4) *MRP* 遺伝子の解析

形態学的に L 型に分類されている 7 株より *MRP* 遺伝子の増幅断片 (図) が得られたが、S、SS 型の本遺伝子は全く増幅できなかった。増幅できた遺伝子配列を解析した結果、L 型株間で約 98% の相同性であった。mtDNA にコードされている *COX1* 遺伝子におけるこれら株間の相同性は約 78% であり、形態学的に同類に分類されている株間において *MRP* 遺伝子の相同性が高いことが明らかとなった。

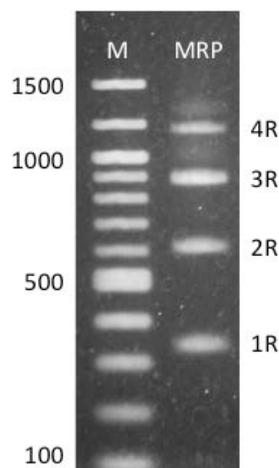


図 *MRP* 増幅断片のアガロース電気泳動写真  
M は DNA マーカー、MRP は増幅した *MRP* 遺伝子断片を表す。1R~4R の数字は *MRP* 遺伝子の繰り返し配列数を示している。

解析できたワムシ株間での *MRP* 遺伝子の相同性の高さにもかかわらず、**S** および **SS** 型の本遺伝子が増幅されなかったことから、**L** 型ワムシ株と **S** および **SS** 型ワムシ株の本遺伝子配列は大きく異なることが推定された。よって、表現形質に関与しない現在の遺伝子配列による分子系統解析と種の基盤となる生殖に関連する *MRP* 遺伝子による分子系統解析の結果は異なり、*MRP* 遺伝子の系統解析による分類は、従来の形態学的特徴に近似することが示唆された。

今後、この遺伝子を用いたワムシの形態種に近い迅速分類を、確実性の高い手法として確立するため、本研究では増幅が困難であった **S**、**SS** 型ワムシ株の *MRP* 遺伝子のクローニングと解析を継続し、種苗生産で使用されているワムシ株の生物学的特徴にもとづく分類を行う。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Suga, K., Tanaka, Y., Sakakura, Y., Hagiwara, A.: Axenic culture of *Brachionus plicatilis* using antibiotics. *Hydrobiologia* 662, 113-119. (2011) 査読有り

② Suga, K., Oshiyama, N., Tanaka, Y., Sakakura, Y., Hagiwara, A.: Isolation of mixis related genes from the rotifer *Brachionus plicatilis* using subtractive hybridization method. *Hydrobiologia* 662, 83-86. (2011) 査読有り

[図書] (計 1 件)

① Denekamp, N. Y., Suga, K., Hagiwara, A., Reinhardt, R., Lubzens, E.: Chapter 7, A role for molecular studies in unveiling the pathways for formation of rotifer resting eggs and their survival during dormancy. Lubzens, E., Cerdà J. and M. Clark (eds). *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. *Topics in Current Genetics* 21, 109-132. (2010)

[学会発表] (計 2 件)

① 金 禧珍、萩原 篤志、菅 向志郎：ワムシの生活史に与える光波長の影響。平成 23 年度日本水産学会春季大会、平成 23 年 3 月、東京海洋大学

② 中村 航、阪倉 良孝、菅 向志郎、丸山 功、萩原 篤志：セレン強化クロレラの給餌がシオミズボワムシの増殖に与える影響。平成 22 年度日本水産学会秋季大会、平成 22 年 10 月、京都大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅 向志郎 (SUGA KOUSHIROU)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：60569185