

18S rRNA遺伝子を標的とした広瀬川河川中の真核生物の挙動解析

東北学院大学大学院工学研究科 神 あや
東北学院大学工学部 正会員 中村 寛治

1. はじめに

河川は森から始まり、海へと繋がっている。家庭から排出される排水や雨水、地下水もまた河川へ流れ込む。特に家庭排水に含まれる有機物は川や海を汚す原因となるが、海へたどり着く前に河水中の微生物によって分解される。この有機物の分解による自浄作用は微生物が大きな役割を担っており、これらの微生物を捕食する原生生物もまた有機物の分解に深く係っている。それゆえ原生生物を含む河川中に存在するさまざまな真核生物全体の動態を把握することが重要と考えられる。分子生物学技術の進歩によって微生物の挙動把握が容易になり、ほぼ全ての微生物の挙動を網羅的に解析できるようになってきた。現在、16S rRNA 遺伝子を標的とした原核生物の群集構造解析、系統解析は頻繁に行われているが、真核生物が持つ 18S rRNA 遺伝子 (18S rDNA) を標的とした群集構造の解析はあまり行われていない。本研究では広瀬川河川中の真核生物の挙動解析を Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法および 18SrDNA クローン解析を用いて行った。

2. 実験材料および方法

2-1 サンプルングポイント (Sp)

広瀬川の上流から下流までのほぼ等間隔の 8ヶ所、源流、相生橋、熊ヶ根駅付近、苦地橋、開成橋、生瀬橋、大橋、宮沢橋 (Sp 1 ~ Sp 8) から採取した 2006 年 10 月 19 日の河川水を用いた。(図 1)

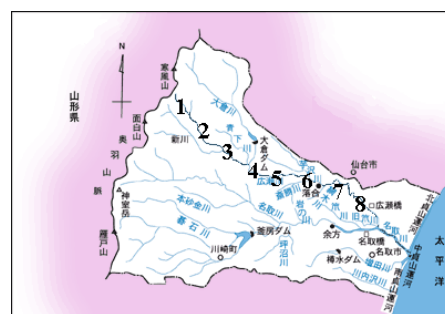


図 1 サンプルングポイント (広瀬川)
国土交通省ホームページより

2-2 DNA の抽出

DNAの抽出の手順は既報の論文¹⁾に従った。河川水を孔径 0.2 μm のフィルターでろ過し、微生物を収穫した。このフィルターを 2 mL のエッペンドルフチューブに入れ、凍結融解、SDS処理、BeadBeater処理を行った。抽出したDNAは最終的に 50 μLのTEに溶解させた。

2-3 T-RFLP による解析

サンプルから抽出したDNA中の 18S rDNAはプライマーとしてEuk-82²⁾の 5'末端を 6-FAMで標識したもの、およびMedlinB²⁾の 5'末端をNEDで標識したもの(アプライドバイオシステム社に合成依頼)を用いてPCR増幅した。反応条件はPre-heating - 94 , 1分に続き、第1段階 - 94 , 20秒、第2段階 - 56 , 30秒、第3段階 - 72 , 2分を 30 サイクル繰り返し、Post extension - 72 , 7分を行った。MicroSpin S-300 HR Columns (GEヘルスサイエンス社製)で精製したPCR反応液 2 μLを制限酵素(*Bst*UI)で切断後、T-RFLP解析を行った。本研究ではEuk-82 側、5'末端の 6-FAMによる解析結果のみ使用した。内部標準にはGeneScan 500 Rox (アプライドバイオシステムズ社製)を利用した。T-RFLP解析、塩基配列の決定ともにGenetic-Analyzer 3130 (アプライドバイオシステムズ社製)を利用した。

2-4 18SrDNA の塩基配列決定および系統解析

2-3で示したPCR条件反応にて18SrDNA増幅のPCR反応を行い、その後プラスミドにクローン化し18SrDNAクローンを取得した。ただしプライマーは蛍光標識されていないものを使用した。各々の18SrDNAクローンは上流約500basesの塩基配列を決定した。得られた塩基配列データはインターネット上のDDBJ(日本遺伝子データバンク)にて近縁種を決定し、かつClustal Wによる系統解析を行った。

3. 実験結果および考察

T-RFLP 解析の結果を図2に示す。Sp 1からSp 3までとSp 4からSp 8まではそれぞれ似通った群集構造であることがわかった。

図3にSp 1およびSp 5で得られた18S rDNA クローン解析結果を示す。図中のクローン名は任意のクローンNo (Sp 1はA+クローンNo、Sp 5はE+クローンNo) 続いて*Bst*UIで切断した際の5'側からの位置の順に表記してある。この結果からSp 1は真核生物の種類は少なくほとんどが菌類であることがわかった。図2のSp 1からSp 3まで優占種であったピークは子囊菌門のクロイボタケ綱に属する菌類であることがわかった。この菌類は腐生菌として知られている。広瀬川上流は周囲が森であり、森から菌類が流れ込んでいるためこのような結果になったと予想される。また昆虫に寄生する原生生物であるカウレリエラ目も確認でき、周囲の森の影響を深く受けていることがわかる。Sp 4以降には赤潮の原因となるラフィド藻類を含む藻類に近縁なクローンが確認できた。これは広瀬川に流れる込む家庭排水などの影響もあるだろうと思われる。

このように18S rDNAを対象としたT-RFLP解析やクローン解析によって広瀬川河川中の真核生物の挙動の全体像を把握ができる見通しが得られた。

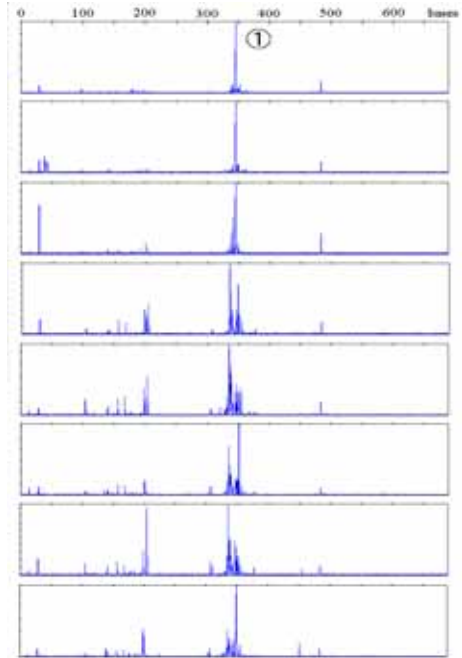


図2 T-RFLP プロファイル

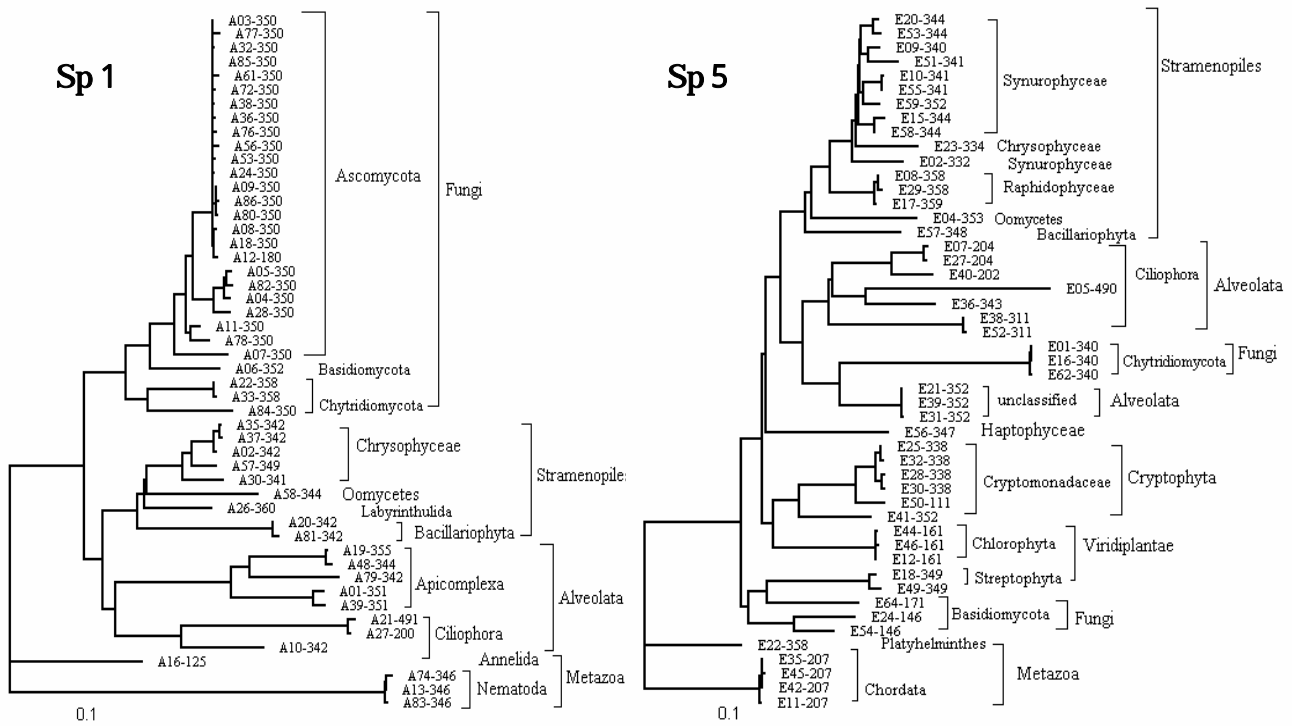


図3 Sp 1およびSp 5で得られた18S rDNA クローンの系統解析結果

参考文献

- 1) 中村寛治ほか; 環境工学研究論文集. Vol. 39, p335-336, 2002
- 2) Lucy C.Skillman.et.al. ; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, p201-206, 2006