

ITS 配列を用いた *Anabaena* 属の遺伝子工学的分類に関する試み

東北学院大学工学部 学生員 ○青木勇人
東北学院大学大学院 村上将也, 太田康裕
東北学院大学 正会員 韓 連熙
フェロー 石橋良信

1. はじめに

本研究では, *Anabaena* 属の簡便で正確な分類を行い, 湖沼等で問題になっているかび臭発生予測と, 対処に寄与することを目的に研究を進めた.

遺伝子工学的手法により藍藻類を分類する際には, 16S rRNA 遺伝子が多用されてきた. しかし, *Anabaena* 属の 16S rRNA 遺伝子は, 種を越えて非常に相同性が高く 16S rRNA 遺伝子での分類は難しいことが知られている. また, 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子の間にある ITS 配列についての研究も進みつつある.

本研究では, ITS 配列による *Anabaena* 属分類への適用, およびパターン解析の可能性について検討した.

2. 解析および実験方法

本研究で対象にした菌株 *Anabaena* 属は, かび臭産生物質である geosmin を産生する菌株, *Anabaena spiroides*, *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermannii* である. また, 適用した菌株は国立環境研究所微生物系統保存施設より購入し, 実験に供した. 4 株は TA クローニング後に相同性解析を行い, ITS 配列を決定した. TA クローニング中の PCR の際に使用したプライマーは, 設計した 16S AF および 23S AR である.

パターン解析では制限酵素による切断とインシリコによる解析を行った.

3. 実験結果および考察

Anabaena 属はコピー数が 4 個あることが, 知られている. その違いにより多種の ITS 配列を保有していることが予想される. ITS 配列を増幅するよう設計した primer を適用し, PCR をかけた結果, 図-1 のような泳動写真結果が得られた. 得られたバンドをそれぞれ, シーケンサーによる波形データとして解析し, 確認できた.

解析の結果, それぞれの *Anabaena* 属はそれぞれ, ITS 配列を 3 種保有し, tRNA の有無により違いがみられた. 図-1, 図-2, 図-3 に ITS の構築図を示す. 4 株の ITS1, ITS2, ITS3 はそれぞれ長さ塩基配列はほぼ 100%であった. しかし, ITS1, ITS2, ITS3 は長さ, 塩基配列はそれぞれ異なっていた. したがって, *Anabaena* 属は 16S rRNA 遺伝子, 23S rRNA 遺伝子と同様 ITS 配列も高い相同性であることが判明し, ITS 配列を適用した遺伝子工学的手法によっても, *Anabaena* 属の分類は非常に困難であると考えられた.

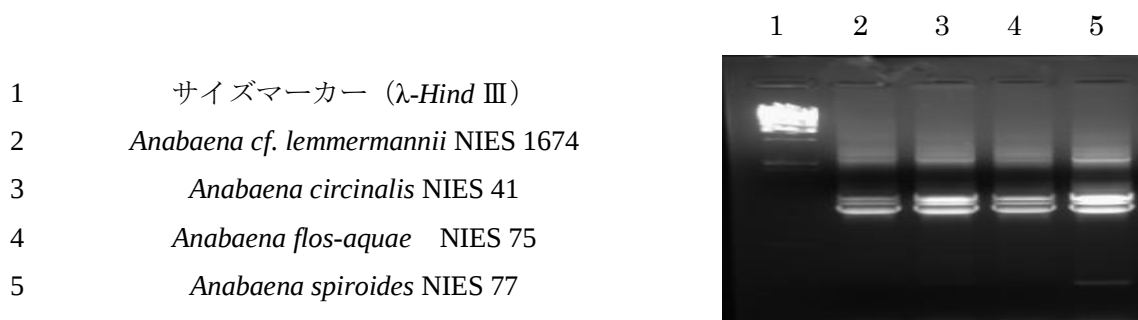


図-1 泳動写真

一方, *Anabaena* 属は 16S rRNA 遺伝子, 23S rRNA 遺伝子, さらに ITS 配列を一連とする塩基配列では, 塩基配列に多少の違いがみられる. これを利用して制限酵素消化に伴うバンドの大きさ, 数により判断することが可能なパターン解析 (RFLP 法) が適用できると考えられる. さらに, インシリコによる解析を行った. Gene Construction Kit Ver3 によるソフト解析によって得られた結果を図-5 に示す. ITS 配列でも判別できなかった *Anabaena* 属の分類は, 制限酵素の種類によるパターン解析により, 分類ができる可能性があると判断した.

キーワード : かび臭 *Anabaena* 属 分類 ITS 配列

住所 : 多賀城市中央一丁目 13-1 ・ 電話 022-368-7418, FAX : 022-368-7070

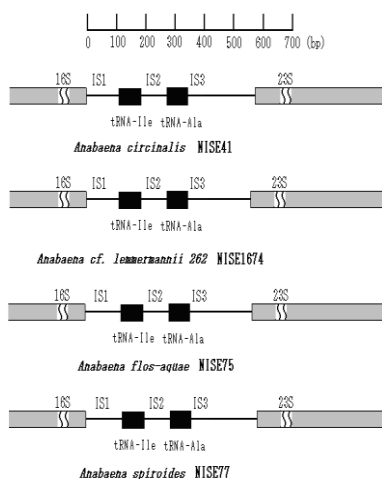


図-2 ITS-1 構築図

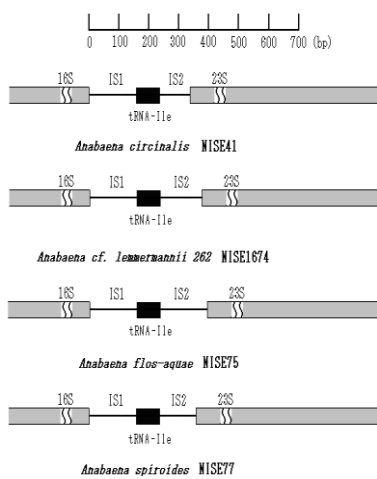


図-3 ITS-2 構築図

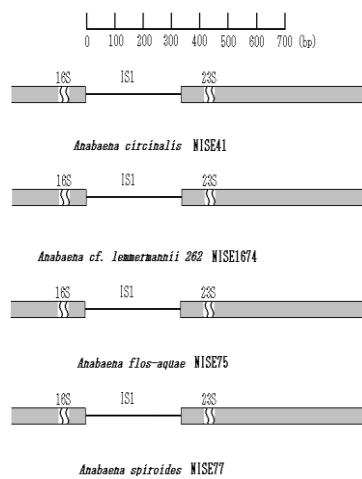


図-4 ITS-3 構築図

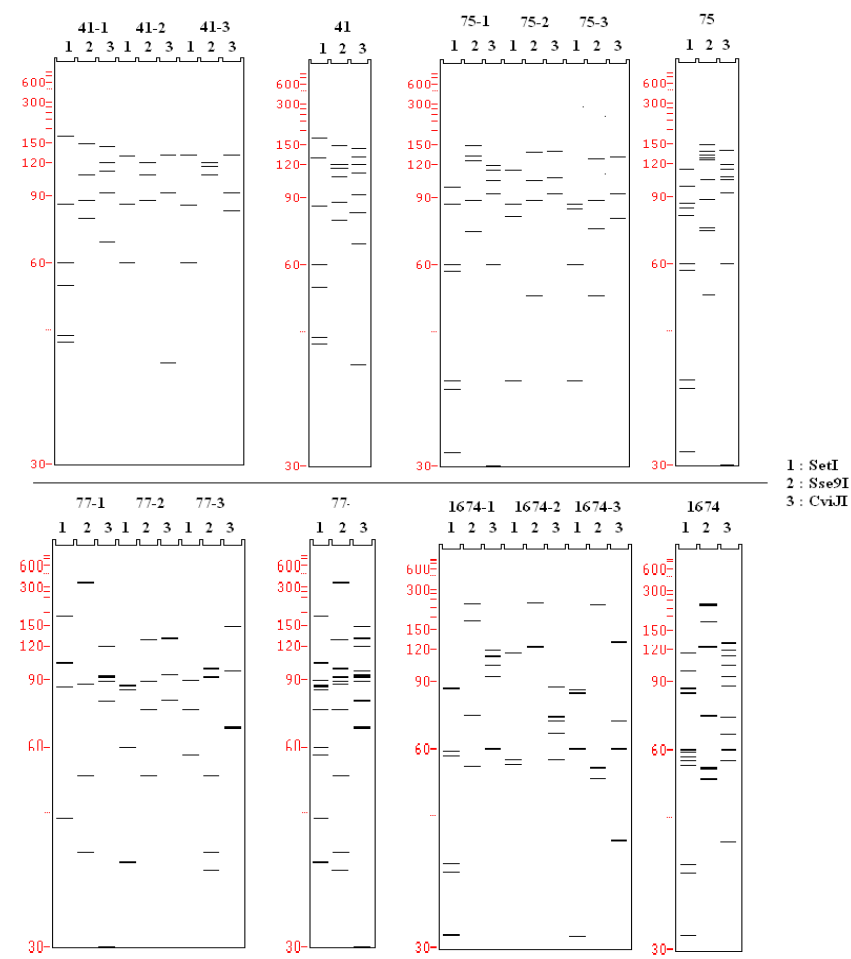


図-5 パターン解析結果

4.おわりに

ITS 配列では、*Anabaena* 属の分類は困難であった。しかし、パターン解析での塩基配列では 16S rRNA 遺伝子、ITS 配列よりも多少の違いが見受けら RFLP 法が *Anabaena* 属の分類に適用できる可能であると考えられる。