

分子マーカーによる微細藻の同定

田辺（細井）祥子・左子芳彦

はじめに

分子生物学的手法の発展とともに、多くの生物において盛んに分子系統解析が行なわれ、生物を進化・系統関係から分類するようになってきた。微細藻においても多くの遺伝情報が蓄積され、分子系統解析から得られる情報をもとにした種特異的分子(遺伝子)マーカーを分類形質とする分子同定法の確立がなされ始めている。形態分類の困難な微細藻における分類・同定の現状を考えると、分子同定法を確立し利用していくことは急務である。本報では、分子同定法がなぜ微細藻において重要であるかを述べ、分子同定に用いられる手法について概説する。

分子同定の重要性

近年微細藻において、分子系統解析の発展とともに分子(遺伝子)マーカーを用いた分子同定法に関する研究・開発が進められている。これらの研究の背景としては、形態的特徴を分類基準とした一般的な同定がこれまでしばしば混乱を引き起こしてきたことが挙げられる。その原因として、(1) 形態的特徴に基づく分類基準が十分に統一されていない、(2) 微細藻の形態的特徴の差異が微小であり、必ずしも種の違いを反映しない、(3) 形態形質が環境要因などにより変化しやすい、(4) ‘重き’を置く形態形質が同定者によって異なり同定が主観的になりやすい等があげられる。とりわけ有害・有毒微細藻のモニタリングなど同定の誤りが許されない現場においては、これらの原因は深刻な問題となっている。つまり、形態的特徴を分類基準とする同定ではその正確さに限界があり、客観的基準が求められているのである。

これらの問題点を克服した正確な同定法として期待されるのが、遺伝情報を分類形質とする分子同定法である。分子同定法は形質に関する多くの情報が簡単に得られ、さらには形質の差

異が4種の塩基による配列の差異で表されるため、客観的で統一された判断基準を設定することが可能であるという利点がある。さらに、塩基配列が光や温度などの環境要因によって容易に変化することがないため、一定条件下での同定が可能である。つまり分子同定法は、形態的特徴を分類形質とする現行の同定法の問題点をほぼ解決できる可能性を有している。実際、形態形質に基づく同定が不可能である細菌では、古くから形態形質以外に生理学的・生化学的分類の重要性が認識され、DNAによる分子同定法の開発も盛んになされてきた。現在、細菌や古細菌といった原核生物の分類では、16S rRNA遺伝子による系統解析とDNA-DNAハイブリダイゼーションが必須となっており、これらの分類をもとに同定がなされている。微細藻の多くが細菌と異なり形態形質を顕微鏡下で観察可能であるため、分子同定法に関する研究は遅れている。しかし、現行の同定法を用いる限り誤りが生じ続けることを十分に認識し、分子同定法などの客観的な同定法を開発していくことは微細藻において極めて重要である。

分子マーカーの探索

分子同定法は、ある遺伝子の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列を比較し、その違いをマーカーとして同定を行なう手法である。そのため、塩基配列の比較から目的の微細藻を同定する適切な分子マーカーを探索することは、大変重要なステップである。塩基配列を決定することなく同定するRAPD法(Bolch *et al.* 1999)やRFLP法(Adachi *et al.* 1994)などの手法もあるが、本報ではより簡便な分子マーカーをもとに設計するプローブを用いた手法について紹介する。図1にプローブを用いた分子同定法のスキームをまとめた。まず、同定したい微細藻からDNAを抽出し、分子マーカーとして適切であると考

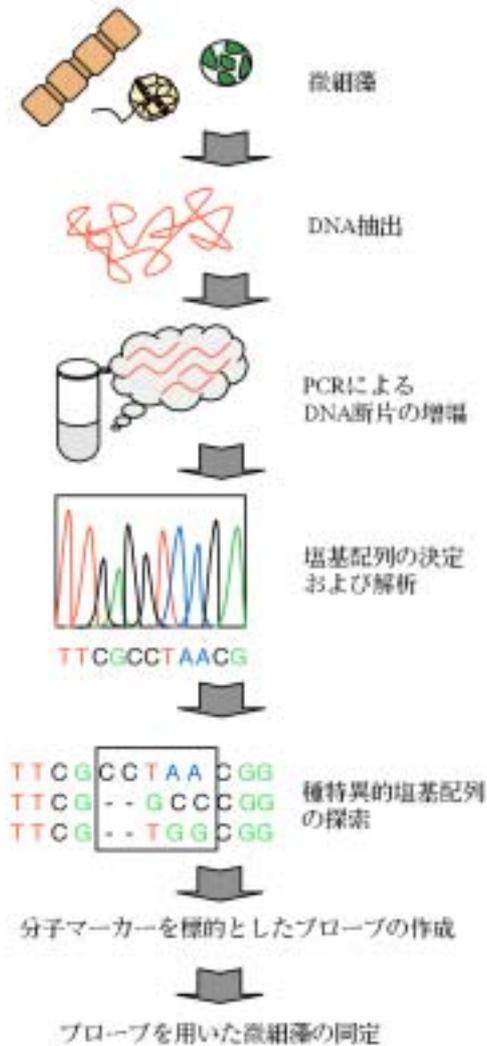


図1 プローブを用いた分子同定法のスキーム。

えられる遺伝子をPCR法により増幅する。現在「属」「種」および「個体群」を識別する分子マーカーとして最もよく使用されている遺伝子が、ribosomal RNA(rRNA)遺伝子である。rRNA 遺伝子が用いられる理由は、生物の進化や系統関係を正しく反映しており、分子マーカーとして適切であると考えられているためである。また、すべての生物が保持しており、解析も進み最も情報量が多いため、遺伝情報の比較的少ない微細藻に応用できることも要因である。次に、PCRに

よって増幅された断片の塩基配列を決定し、配列の比較および分子系統解析を行なう。そして解析結果から目的の微細藻特異的な塩基配列を見出し、その塩基配列をマーカーとする。このような分子マーカーの探索は同定の精度に直接影響するため、慎重を期さねばならない。分子マーカーの候補が得られたら、次にマーカーの塩基配列を標的とした標識プローブを設計し作成する。最後に、作成したプローブが目的とする微細藻を特異的に同定可能であるか、特異性について十分な検討を行なう。特異性についての検討は、とりわけ系統的に近縁であるとされた種に対しては必須である。以上のようにして、目的とする微細藻特異的な分子マーカーを探索し、マーカーを標的としたプローブを用いた手法を確立するのが分子同定の一般的なスキームである。

分子同定法の実際

これまでに、いくつかの分子マーカーを用いた分子同定法が、細菌を中心に開発されてきた。表1は、微細藻において確立されている主な手法をまとめたものである。現在最適の方法はなく、また特別な機器を要する手法もあるため、長所・短所を踏まえた上で目的に応じて手法を選択する必要がある。

これら分子生物学的手法のうち、簡便さや迅速さの点から微細藻の同定に有用であると考えられている手法の1つがFluorescence *in situ* hybridization(FISH)法である。図2にrRNAを標的としたFISH法の概略を示した。一般的に種を同定するためのFISH法においては、リボゾームのlarge subunitを構成する28S rRNAをコードする遺伝子内の、D1/D2領域と呼ばれる変異領域を標的としてプローブを設計する。用いるプローブはオリゴヌクレオチドプローブと呼ばれる15～50塩基を合成したもので、末端がfluorescein 5-isothionate (FITC)などで蛍光標識されている。蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、形態を維持した「そのままの細胞」内で標的となるrRNAと直接ハイブリダイゼーションされる。細胞が標的とする種であった場合、細胞内において蛍光オリゴヌクレオチドプローブは相補的

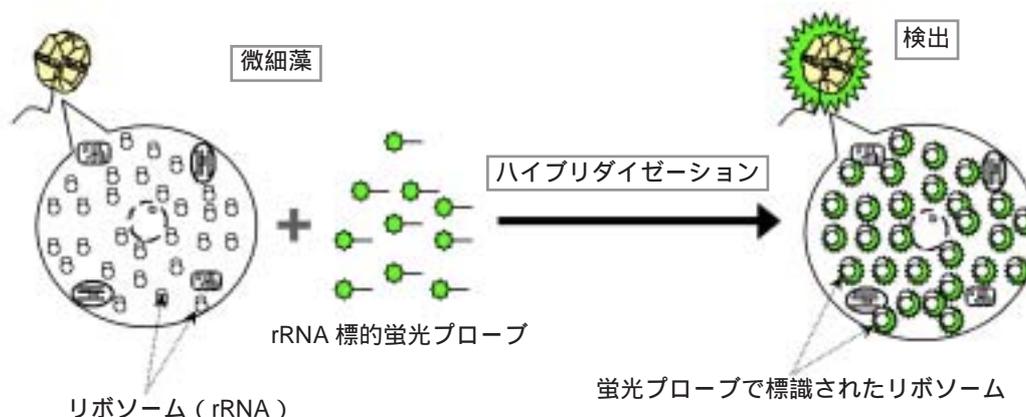


図2 rRNAを標的としたFISH法の概略。rRNA 標的蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、細胞内に散在するリボソーム中の標的となるrRNAに結合するため、細胞全体が蛍光発色する。

なrRNAと複合体を形成する。このようなrRNAを標的とするFISH法の場合、rRNAが細胞内に多数散在するリボソームの構成要素であるため、プローブとrRNAの複合体は核とオルガネラを除く細胞質全体に存在し細胞全体が蛍光を発する。そのため、目的の種を感度よく検出することが可能である。この検出感度は、蛍光が核内だけに限られる核DNAを標的としたFISH法より極めて高いものであり、rRNAを標的としたFISH法が微細藻の同定にしばしば用いられるの

はこのためである。

このようなFISH法が他の手法と比較して優れている点は、特別な機器や技術を要せず操作が非常に簡便であるため、誰でもすぐに利用できる点である。また、細胞をホモジェネートすることなくそのままの状態と同定するため、形態的特徴から同定の特異性が判別でき、誤った同定が生じにくい点も優れている。さらには、DNAの抽出やPCRによるDNAの増幅が必要ないため、同定に要する時間が最も少なくて済む。

表 1. 微細藻の分子同定法の比較

手法	核酸抽出	必要な機器	特徴	参考文献
FISH法	不要	蛍光顕微鏡	細胞内で直接プローブをハイブリダイゼーションさせ同定する手法。細胞の形態が保持されているため同定しやすいが、破碎されやすい細胞には不向き。特別な機器や試薬を要せず安価。	Adachi et al. 1996 Tanabe et al. 2002
PCR法	必要	PCR機 検出・測定器	PCRにより増幅させた特異的断片の有無で細胞を同定する手法。RIを使用した手法が一般的であったため扱いにくかったが、近年のReal Time PCR機の開発に伴い、蛍光発色による同定・定量が手軽に行なえるようになった。ただし、Real Time PCR機および使用するプローブが大変高価。	Penna & Magnani 2000 Bowers et al. 1999
sandwich hybridization法	必要	検出・測定器	カード上に貼り付けたcapture probeと、検出のための蛍光signal probeとのハイブリダイゼーションにより同定する手法。2本のプローブを使用するため特異性が高い。専用の検出機とカードが必要。	Scholin et al. 1996

しかしながら、FISH法に不適切な微細藻も存在する。例えば渦鞭毛藻である *Alexandrium* 属のように外殻が強固な藻類への利用は大変有用ではあるが、ラフィド藻である *Chattonella* 属のように細胞が脆弱な藻類は同定に至るまでの工程で細胞がつぶれやすく、FISH法の利用には不向きである。このような場合、PCRなど細胞をホモジェネートする手法を用いた方が有効となる。最近開発された Real Time PCR法は、従来のPCRによる同定法に比べ定量の正確さや迅速さの点で極めて優れた手法であり、脆弱な微細藻に対しても有用な分子同定法として期待されている。Real Time PCRでは、サーマルサイクラーと蛍光分光光度計を一体化したPCR機を用いて増幅産物を連続して検出・解析する。そのため、電気泳動の必要がなく時間短縮が可能であり、また指数関数的に増幅されている時の産物を比較できるためより確実に定量することができる。現在は開発段階にある手法であるが、将来的に微細藻に広く用いられる手法となるであろう。

いずれの手法をとるにせよ、微細藻の形態的特徴に基づく同定法に比べ、客観的で正確な同定が可能であることは確かである。また手法によっては、格段に迅速かつ簡便に同定することが可能であり、とりわけ有毒・有害微細藻のモニタリング現場での同定においては大変有用な方法となり得るであろう。

課題と展望

微細藻において、細菌と同様に分子同定が主たる同定法として用いられるためには、より多くの多様なDNAデータベースを構築すること、そして種や個体群を検出可能な分子マーカーを確立し、普遍性の高い正確かつ簡便な分子同定法の開発をすることが必要である。近年rRNA遺伝子を用いた分子系統解析の結果から、これま

で分類形質とされてきた形態的特徴が不適切である例は、数多く認められている。従って、種の系統を正しく反映する形態形質を早急に見出し、分子分類と整合性をとることは極めて重要であろう。そして、このような分類体系の再構築により、分子同定がより迅速で正確な必須の同定法として利用されることを期待したい。

文献

- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. 1994. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.* 30: 857-863.
- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. 1996. Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.* 32: 1049-1052.
- Bolch, C. J., Blackburn, S. I., Hallegraeff, G. M. and Vallancourt, R. E. 1999. Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 35: 356-357.
- Bowers, H. A., Tengs, T., Glasgow, J. R., H. B., Burkholder, J. M., Rublee, P. A. and Oldach, D. W. 2000. Development of Real-Time PCR assay for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4641-4648.
- Penna, A. and Magnani, M. 2000. A PCR immunoassay method for the detection of *Alexandrium* (dinophyceae) species. *J. Phycol.* 36: 1183-1186.
- Scholin, C. A., Buck, K. R., Britschgi, T., Cangelosi, G. and Chavez, F. P. 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia* 35: 190-197.
- Tanabe, S., Sako, Y. and Uchida, A. 2002. Simple and rapid detection of the toxic marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using rRNA-targeted probes. *Fish. Sci.* (in press)

(京都大学大学院農学研究科)