

DNA解析によるアカフジツボ幼生の簡易検出法

背 景

火力・原子力発電所の冷却水路系に付着する汚損生物の代表であるフジツボは遊泳型の幼生の時期を経て基盤に付着する。その付着時期を予測できれば、効率よく対策を講じることが可能である。フジツボ幼生の遊泳期間は種によっておおよそ決まっているため、幼生の出現時期を調べることで付着時期が推定できる。そこで、フジツボ幼生を事前に検出する技術が求められているが、特に問題となるフジツボは特定の種（アカフジツボおよびオオアカフジツボ）であり、幼生の形態から種を判別することは困難である。

目 的

フジツボ幼生 1 個体の種判別に有効な遺伝子解析技術を開発し、日本沿岸に棲息する主なフジツボ幼生の種判定を可能にする。さらに、日本の発電所における代表的汚損種であるアカフジツボ幼生の簡易検出技術を開発する。

主な成果

日本沿岸に棲息するフジツボ 15 種の成体および数種の幼生におけるミトコンドリア DNA 上にコードされた 12S rRNA 遺伝子領域を、特異的なプライマーセットを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅して、それぞれの塩基配列を比較することで、種判定が可能かを調べた。

1. 主なフジツボ種の塩基配列比較による種判定

15 種のフジツボ成体から総 DNA 抽出、PCR を行い、塩基配列を決定した。12S rRNA 遺伝子の解析領域（297～305 塩基対）における塩基配列の種間変異は、種内変異に比べて十分に大きく、この塩基配列を比較することにより、100%の精度で種判定ができることが判明した。

2. 幼生 1 個体からの DNA 解析技術の開発

DNA 抽出の手順を省き幼生 1 個体をそのまま直接 PCR に供することで、遺伝子増幅を可能にする簡便技術を開発した。エタノールに浸漬した 1 個体の幼生を PCR チューブ中で乾燥させ、そのまま PCR を行うことでほぼ 100%の幼生サンプルで遺

伝子増幅がみられ、種判定可能な塩基配列データが得られた。

3. PCR-RFLP 法による汚損性フジツボの検出

15 種のフジツボ成体サンプルから得られた塩基配列データにおいて、アカフジツボに特有の制限酵素認識配列を検索した結果、*Spe I* という酵素が認識する配列が 12S rRNA 遺伝子解析領域に見いだされた。この酵素による PCR-RFLP (制限酵素断片長多型解析) で、容易にアカフジツボの検出が可能となった (図)。さらに、別の汚損種であるオオアカフジツボも同様に検出可能であることが判明した。この PCR-RFLP 法を用いれば、サンプリングから 1 日以内にアカフジツボおよびオオアカフジツボを高い精度で検出することができる。

4. 野外採集幼生サンプルの種判定

今回開発された DNA 解析による種判定技術を野外で採集したサンプルに適用してみたところ、アカフジツボ幼生の検出に本簡易検出法が十分有効であることが判明した。

今後の展開

本研究により開発されたフジツボ幼生種判定技術をさらに実用的なものにするために、野外で採集した混合プランクトンサンプルから汚損種フジツボ幼生を定量的に分析する方法を開発する。

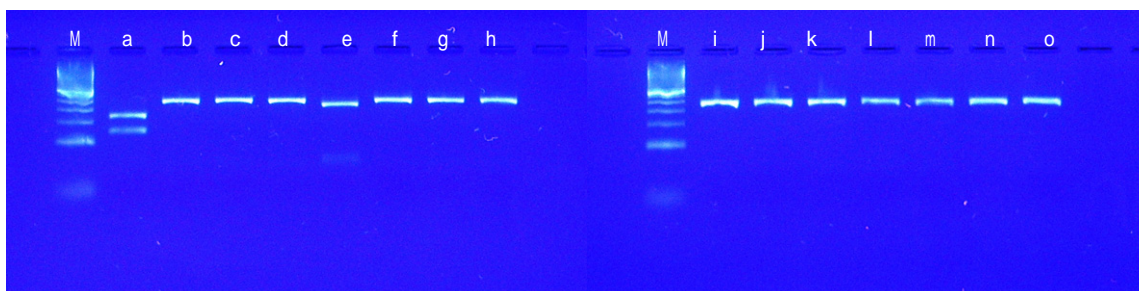


図. 各種フジツボ 12S rRNA 遺伝子領域の *Spe I* による PCR-RFLP

各フジツボの PCR 産物を *Spe I* 処理後、アガロース電気泳動により DNA 断片を可視化した結果、a のアカフジツボだけはっきりと 2 本のバンドが観察され、他のフジツボと明確に区別することができた。
a: アカフジツボ、b: キタアメリカフジツボ、c: ミネフジツボ、d: アメリカフジツボ、e: タテジマフジツボ、f: サラサフジツボ、g: シロスジフジツボ、h: サンカクフジツボ、i: チシマフジツボ、j: ケハダカイメンフジツボ、k: イワフジツボ、l: クロフジツボ、m: ムツアナヒラフジツボ、n: カメノテ、o: エボシガイ、M: 100 bp DNA ラダー (分子量マーカー)

研究報告 V05007	キーワード: DNA 解析, ポリメラーゼ連鎖反応, フジツボ, 幼生, 種判定
担当者	松村 清隆 (環境科学研究所 バイオテクノロジー領域)
連絡先	(財)電力中央研究所 環境科学研究所 Tel. 04-7182-1181(代) E-mail: esrl-rr-ml@criepi.denken.or.jp