

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などにはフジツボなどの汚損性付着生物が大量に付着し、取水流量の低下、復水器管の閉塞や腐食、清掃後の廃棄物処理といった問題を引き起こす。問題となる汚損性フジツボ種はアカフジツボなどに限られているが、付着前の幼生はその形態から種を判別することは困難である。汚損性フジツボ幼生の出現を検出できれば、付着時期の予測が可能となり、付着防除対策を効率的に実施することができるようになる。そこで、アカフジツボなどの特定のフジツボ幼生を検出する高精度で簡便な技術が求められている（図1）。

目的

日本沿岸に生息する主なフジツボの種判定を可能にするDNA領域を解析し、各種フジツボの塩基配列を比較するとともに、フジツボ幼生1個体からのDNA解析技術を確立する。さらに得られた配列データを利用して、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

日本沿岸に生息するフジツボ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上の特定の遺伝子領域（12S rRNA 遺伝子）を、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）により増幅して、それぞれの塩基配列を比較することで、種判定が可能かどうかを調べた。さらに制限酵素断片長多型解析（PCR-RFLP）によるアカフジツボの簡易検出を試みた。

1. 日本沿岸の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、12S rRNA 遺伝子の解析領域の塩基配列を決定した。この領域の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（図2）。

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法によるアカフジツボの簡易検出

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、特定の制限酵素（*Spe I*）が認識する配列が見いだされた。この酵素によるPCR-RFLPで、容易にアカフジツボの検出が可能となった（図2、3）。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

今回開発した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有効であることが確認できた（図4）。

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、野外で採集したプランクトンサンプルの中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。

主担当者 環境科学研究所 バイオテクノロジー領域 上級特別契約研究員 松村 清隆

関連報告書 「DNA解析によるアカフジツボ幼生の簡易検出法」電力中央研究所報告：V05007（2006年2月）

関連特許 特願2006-008478「フジツボ幼生の種判定方法」（2006年1月17日出願）

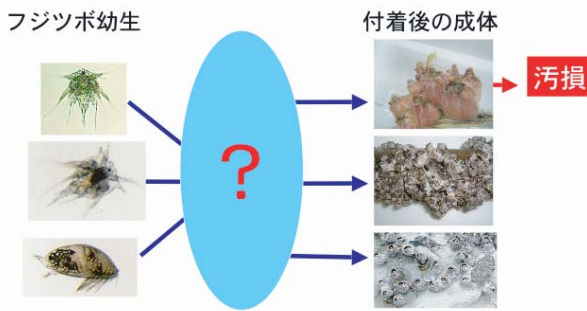


図1 フジツボ幼生の種判定技術開発の必要性
発電所取水設備などに大量に付着して被害をもたらす汚損性フジツボ種はアカフジツボなどに限られているが、付着前の幼生はその形態から種を判別することは困難である。汚損性フジツボの幼生の出現を検出できれば、対策を効果的に実施することができるようになる。

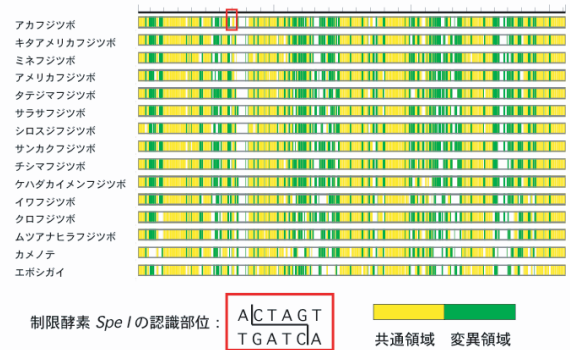


図2 12S rRNA遺伝子解析領域の種間変異とアカフジツボに特異的な制限酵素認識部位
日本沿岸に生息するフジツボ15種の12S rRNA遺伝子解析領域の塩基配列を決定した結果より、種間変異が存在する領域を緑で示す。また、アカフジツボにのみ1箇所存在した制限酵素*Spe I*の認識部位を赤枠で示す。

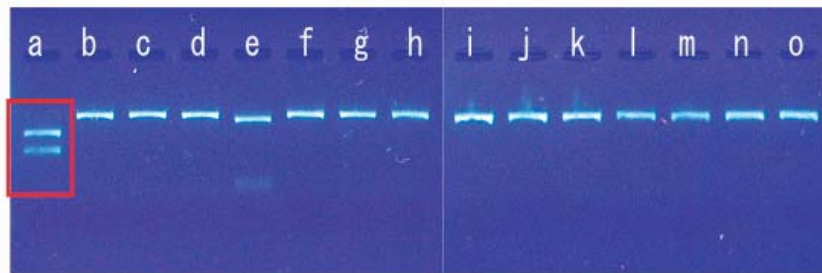


図3 各種フジツボ12S rRNA遺伝子領域の制限酵素*Spe I*によるPCR-RFLP
各フジツボのPCR産物を*Spe I*処理後、アガロース電気泳動によりDNA断片を可視化した結果、aのアカフジツボだけにはっきりと2本のバンド（赤枠）が観察され、他のフジツボと明確に区別することができた。
a：アカフジツボ、b：キタアメリカフジツボ、c：ミネフジツボ、d：アメリカフジツボ、e：タテジマフジツボ、f：サラサフジツボ、g：シロスジフジツボ、h：サンカクフジツボ、i：チシマフジツボ、j：ケハダカイメンフジツボ、k：イワフジツボ、l：クロフジツボ、m：ムツアナヒラフジツボ、n：カメノテ、o：エボシガイ

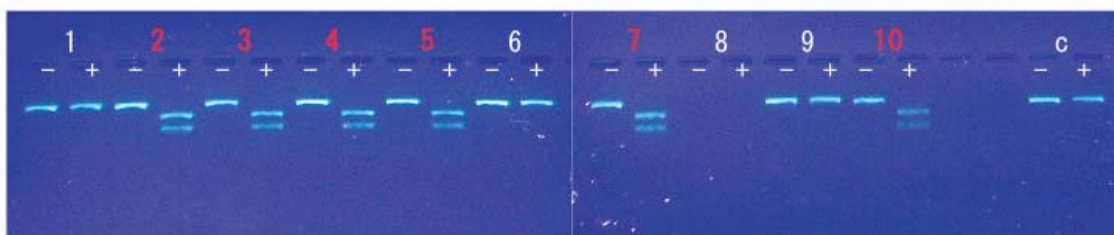


図4 野外採集幼生12S rRNA遺伝子領域の制限酵素*Spe I*によるPCR-RFLP
1～10は各幼生の個体番号で、-：未処理PCR産物、+：*Spe I*で処理したPCR産物を示す。cはミネフジツボ飼育幼生を用いた対照区。この結果から、バンドが2本観察されたNo.2、3、4、5、7、10の6個体がアカフジツボ幼生と判明した。