

リアルタイムPCRを用いたホソメコンブ遊走子の定量法 (技術報告)

高谷義幸^{*1}, 秋野秀樹¹, 四ツ倉典滋²

¹北海道立総合研究機構中央水産試験場, ²北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

Real-time PCR assay for zoospores of *Saccharina japonica* var. *religiosa*. (Technical report)

YOSHIYUKI TAKAYA, HIDEKI AKINO and NORISHIGE YOTSUKURA

¹ Central Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Yoichi, Hokkaido 046-8555*,

² Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, *Sapporo, Hokkaido 060-0809, Japan*

キーワード: 定量, ホソメコンブ, 遊走子, リアルタイムPCR

北海道南西部の日本海沿岸ではホソメコンブを主体とする大型褐藻類の群落が増加する「磯焼け」が1965年頃から顕著に見られるようになってきている(藤田 1987)。磯焼け海域においては、コンブ類の繁茂は低潮線付近や礁上の波浪の影響を受ける場所に限られる(吾妻 1995)が、近年では、このような場所でもコンブ群落は極めて少なくなっている(秋野 未発表)。このため、再生産に関与する母藻が不足し、磯焼けの回復をさらに困難にしているのではないかと危惧がある。ホソメコンブの遊走子は、10月から12月にかけて海中に放出される(長谷川ら 1961)。これらを捕捉して遊走子数を定量することは、母藻群落が十分に存在するかなどコンブ群落の形成機構を知るための重要な手がかりとなる。海中の遊走子数を測定する方法として、付着板を設置する方法(新原ら 1980)や海水を濾過してこれを培養する方法(名畑 1989)が知られている。しかし、いずれの方法も遊走子を捕捉した後に、胞子体が形成されるまで培養が必要であり、この間の減耗が正確な遊走子数を得ることを難しくしている。一方、遊走子は単細胞であり、組織内には一定量のDNAを保有している。このため、リアルタイムPCRを用いてDNA量を測定することで、遊走子数を定量できると考え、そのための手法を開発したので報告する。

試料と方法

実験用遊走子液の作成 子嚢斑が形成されているホソメコンブの表面を洗浄して冷蔵庫内で1日放置し、これを

滅菌海水に浸漬することで遊走子を放出させた。得られた粗遊走子液をガーゼで濾過し、8℃の冷暗所に3時間静置して試験用の遊走子原液とした。これを滅菌海水で希釈して4段階の実験用希釈系列を作成した。この希釈系列に含まれる遊走子数を確認するため、希釈系列からそれぞれ9mlを分取して1mlのホルマリンを加えて固定した。各希釈系列から一定量(高濃度から3段階の希釈系列は3.2μl, 最も低濃度の希釈系列は10μl, 各2回)をとり、血球計算盤を用いて倒立顕微鏡下で遊走子を計数した。**遊走子の捕集** 各希釈系列をルアーロック付きのディスプレイプラスチックシリンジ(容量30ml)に収容した。先端にはセルロース混合エステルメンブレンフィルター(直径13mm, 孔径0.8μm, ADVANTEC社製)をセットしたフィルターホルダー(SWINNEX13mm, メルクミリポア社製)を装着し、5mlを濾過した。濾過後はフィルターをホルダーから取り出して、濾過面を内側に折りたたみチャック付きポリ袋に収容して、DNA抽出まで冷凍保存した。

DNAの抽出 DNAの抽出には、DNeasy Plant Maxi Kit(QIAGEN社製)を用いた。冷凍保存していた遊走子捕集済みのフィルターを抽出用チューブに入れ、図1の手順でDNAを抽出した。この手順は抽出キット添付のプロトコルを原則とし、抽出操作の途中や最終液量を一定として定量的に抽出できるよう一部を改変したものである。

リアルタイムPCRによるDNAの定量 得られたDNA抽出液をテンプレートとしてリアルタイムPCR(Thermal Cycler Dice Real Time System Lite, タカラバイオ社製)

DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN社製)によるDNA抽出手順を一部改変

- ①15mlのチューブに5mlのBuffer AP1*1を65°Cに加温し, 10 μ lのRNase Aストック溶液と冷凍保存していた直径13mmフィルターの場合は裁断せず, 47mmフィルターの場合は必要に応じて2~3片に裁断して入れ, 激しくボルテックスで混和する。フィルター裁断の際は, コンタミネーションに注意する。
- ②65°Cで10分間インキュベートし, 細胞を溶解する。インキュベート中にチューブを2~3回転倒混合する。
- ③1.8mlのBuffer P3を添加後, ボルテックスでよく混和し, 10分間氷上でインキュベートし, 界面活性剤, タンパク質, 多糖類を沈殿させる。
- ④室温, 3000~5000 \times Gで5分間遠心分離する。
- ⑤50mlのチューブ中にセットしたAlAshredder Maxi Spin Column(紫色)に上清を注ぎ入れる。スイングローターで室温, 3000~5000 \times Gで5分間遠心分離する。
- ⑥濾液を新しい50mlチューブに注ぎ入れる。このとき, 遠心したチューブ内にペレットができている場合は, これをはがさないように注意する。
- ⑦10mlのBuffer AW1*2を添加し, すぐにボルテックスで混和して沈殿物を含む全量をDNeasy Maxi Spin Columnに注いで移す。スイングローターにセットして, 室温, 3000~5000 \times Gで5分間遠心分離し, 濾液を捨てる。
- ⑧12mlのBuffer AW2*2をDNeasy Maxi Spin Column(無色)に添加し, 3000~5000 \times Gで10分間遠心分離してメンブレンを乾燥させる。濾液とコレクションチューブを捨てる。
- ⑨DNeasy Maxi Spin Columnをキット添付の新しい50mlコレクションチューブに移す。1ml(または0.75ml)のBuffer AEをカラムのメンブレンにピペットで添加する。
- ⑩室温で5分間インキュベートし, 3000~5000 \times Gで5分間遠心分離し, DNAを溶出する。
- ⑪再度, 1ml(または0.75ml)のBuffer AEをカラムのメンブレンにピペットで添加する。⑩の操作を繰り返し, 1回目と2回目の溶出液を一緒にする。
- ⑫DNeasy Maxi Spin Columnを捨てて抽出完了(DNA抽出原液)。抽出に用いたBuffer AEの量は記録しておく。

*1 Buffer AP1は常温で沈殿を形成するので, 前もって65°Cに加温して沈殿を溶解しておく。

*2 Buffer AW1とAW2は濃縮液なので, あらかじめ容器記載の通りにエタノールで希釈しておく。AW1に沈殿が見られる場合には65°Cに加温して沈殿を溶解してから希釈する。

図1 ホソメコンブ遊走子のDNA抽出方法

を行った。プライマーは, Internal transcribed spacer-1 (ITS-1) 領域の一部を増幅するように設計した(図2)。PCR酵素は, SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ社製)を使用した。リアルタイムPCRのプロトコールは図3に示した。増幅終了後に融解曲線分析を行った。定量下限値 本法における定量下限値を調べるため, 500,000個のホソメコンブ遊走子から得られたDNA抽出液(最終容量2ml)を8段階にEASY Dilution(タカラバ

Forward Primer(K-ITS1-54203qF) : 5'-CTTCGTGCGCCTCTTACC-3'
Reverse Primer(K-ITS1-54203qR) : 5'-AGCGCCCTTTGAGTTCAG-3'

図2 増幅に用いるプライマー

イオ社製)で希釈して, 500,000個, 125,000個, 31,250個, 7,812個, 1,953個, 488個, 122個および30個相当の遊走子由来DNAを含む希釈系列を作成し, 前述の方法でリアルタイムPCRによる分析を行った。

PCR条件	
①反応液の調整	
SYBR Primix Ex Taq II (タカラバイオ社製)	12.5μℓ
PCR Forward Primer	1.0μℓ
PCR Reverse Primer	1.0μℓ
滅菌蒸留水	8.5μℓ
テンプレート	2.0μℓ
合計	25.0μℓ
②PCRプログラム	
95°C 30秒	1サイクル
↓	
95°C 5秒	50サイクル
60°C 30秒	
↓	
融解曲線分析	

図3 リアルタイムPCRプロトコール

結果と考察

遊走子数の定量性 直接計数で得られた希釈系列の遊走子濃度は7,640個/ml, 3,300個/ml, 1,272個/mlおよび472個/mlであった。これに対して、リアルタイムPCRに供した際の検出感度 (Ct値) は、それぞれ30.02 (平均値, n=4, 以下同じ), 31.26, 32.72および33.84であり、両者には強い相関関係 ($r=0.9977$) があった (図4)。また、PCR増幅産物の塩基配列をシーケンスし、目的とするホソメコンブ遺伝子が正確に増幅されていることを確認した。

以上の結果から、本法によってホソメコンブ遊走子はリアルタイムPCR分析によって定量可能であると判断された。なお、この方法で増幅したDNAのTm値は86.2~87.0°Cであった。

定量下限値 500,000個, 125,000個, 31,250個, 7,812個, 1,953個, 488個, 122個および30個相当の遊走子由来のDNAを含む希釈系列を前述の方法でリアルタイムPCRに供した結果、遊走子数とCt値の関係は500,000個~1,953個までは直線性を示したが488個以下ではこの直線から外れ、30個では検出できなかった (図5)。このことから、本法では、DNA抽出液中に遊走子2,000個分以上のDNAが含まれていれば正確な定量が可能であると判断された。

フィールドにおける採水と濾過 フィールドにおける基本的な採水および濾過方法を図6に示した。フィールド中に出現する遊走子の密度は数個/ml~数百個/mlであり (名畑 1989), 近年の磯焼け地帯にわずかに残るコンブ群落中では数十個/ml程度が出現する (高谷 未発表)

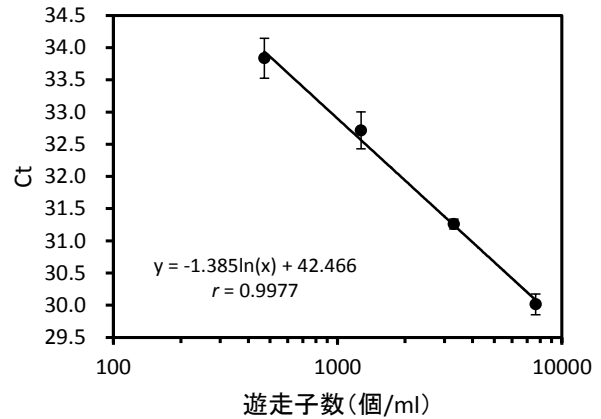


図4 ホソメコンブ遊走子数 (対数) とリアルタイムPCRにおける検出感度 (Ct値) の関係
各点4回の平均値, 縦棒は標準偏差

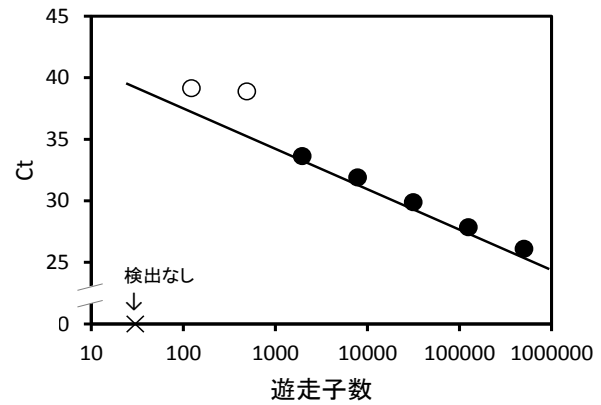


図5 リアルタイムPCR分析におけるホソメコンブ遊走子の定量限界

に過ぎない。前述の定量下限値である2000個の遊走子を得るためには、50個/mlの遊走子がフィールド中に存在する場合には40mlの海水を濾過する必要がある。図6では容量60mlのシリンジを用いて50mlの海水を濾過する方法を記載しているが、遊走子の出現状況に応じてシリンジの容量や濾過水量は適宜加減するとよい。また、さらに少ない数の遊走子しか存在しないと予想される時は濾過水量を増やす必要があるが、直径13mmのフィルターでは目詰まり等の問題もあり、濾過できる水量には限界がある。その場合には、クロロフィル測定などで使用する直径47mmのフィルター (ポリカーボネイトフィルター, 孔径0.8μm) を用いて真空ポンプで吸引する方法が効率的である。ただし、この手法は、通常、試水の濾過作業を実験室に持ち帰って行うことになるため、採水時や輸送中に採水器や採水ボトルの内壁などに遊走子が付着する。このロスによる変動を最小にするためには、名畑

フィールドにおけるコンブ遊走子採集方法

- ①60mlのルーアロック付きシリンジ(A)に, 現場の海水を採水する。
- ②シリンジの先端に, セルロース混合エステルメンブレンフィルター(直径13mm, 孔径0.8 μ m)(B)をセットしたフィルターホルダー(C)を装着する。
- ③シリンジの目盛りを目安に50mlを濾過する。
- ④濾過後, ホルダーからフィルターを取り出し, 濾過面を内側に折りたたんでチャック付きポリ袋に収容し, DNA抽出まで冷凍保存する。

注:使用するシリンジの容量や濾水量は, 現場の遊走子出現密度に応じて適宜変更する。

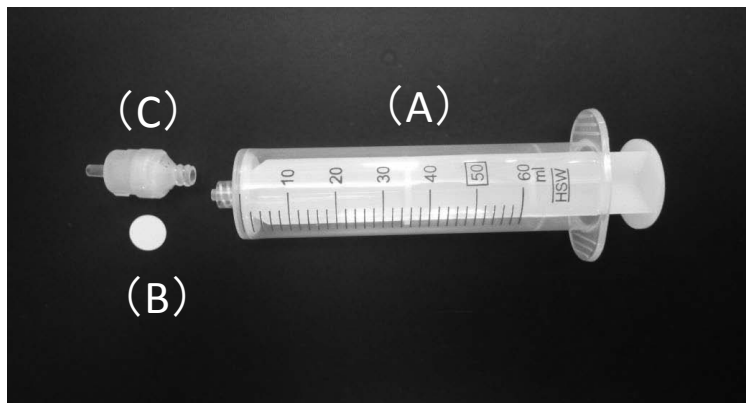


図6 フィールドにおける遊走子採集方法

(1989)が指摘しているように, 採水から濾過までの経過時間や保管方法が常に一定になるよう留意する必要がある。

引用文献

吾妻行雄. 北海道日本海南西部沿岸の磯焼け. 北水試だより, 31, 3-9, 1995.
藤田大介. 北海道大成町の磯焼けに関する聞き取り調査.

水産増殖 1987, 35 (3), 135-138.
長谷川由雄, 阪井与志雄, 船野 隆. ホソメコンブの生態. 北水試月報 1961, 20 (9), 303-311.
名畑進一. コンブ遊走子の生態に関する研究 第1報 コンブ遊走子の定量法, 北水誌報 1989, 32, 11-17.
新原義昭, 名畑進一, 松谷 実, 武井文雄. リシリコンブの成熟と胞子体発芽数の周年変動及び日周変動. 北水試報 1980, 22, 7-16.