

リアルタイムPCRを用いたコンブ遊走子定量法の改良 (技術報告)

高谷義幸*

北海道立総合研究機構中央水産試験場

An improved method of real-time PCR assay for zoospores of *Saccharina japonica* var. *religiosa*. (Technical report)

YOSHIYUKI TAKAYA

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

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、主要な大型海藻であるホソメコンブの群落が増減し、磯焼け状態となっている。このような海域では、遊走子の供給源である母藻の減少により、群落の回復が困難になっている。海水中の遊走子数を定量することは、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が、従来用いられてきた培養による手法（新原ら，1980；名畑，1989）では、多検体の分析が難しかった。

高谷ら（2016）はリアルタイムPCRを用いてホソメコンブ遊走子数を容易に定量する手法を開発したが、安定した測定値を得るためには試水を濾過したフィルターに2,000個以上の遊走子を捕捉することが必要だった。ここでは、より少ない遊走子濾過数でも定量できる方法として、前報（高谷ら，2016）に比べて、抽出後のDNA濃度が10倍となる抽出法での手順について検討した。また、PCRの測定精度を向上させるために、ホソメコンブ用プライマー（高谷ら，2016）で、まれに見られることがあった非特異増幅の影響を軽減するのに最適なプライマー濃度と蛍光強度測定温度を求め、PCRプロトコルを改訂した。

試料と方法

DNA抽出キットの変更 前報（高谷ら，2016）で用いたDNA抽出キット（DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN社））は、抽出時の最終液量が2,000 μ Lであった。これを最終液量が200 μ LであるDNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN

社）に変更することで、抽出液中のDNA濃度を従来の10倍とした。この際、キット所定のDNA抽出手順の過程に、遊走子を捕集するために使用した濾紙を除去するステップ（図1のステップ7~9）を追加した（図1）。

非特異増幅の軽減1 プライマー濃度の検討 非特異増幅に対するプライマー濃度の影響を検討するため、プライマー添加量を4段階に調整してPCRを行った。PCR反応液は、TB Green Premix EX Taq II（タカラバイオ社）12.5 μ Lにホソメコンブ用のForwardおよびReverseプライマー（高谷ら，2016）を終濃度が0.6 μ M，0.4 μ M，0.3 μ Mおよび0.2 μ Mになるように加え、超純水で液量を23 μ Lに調整した。これに、テンプレートとなるDNA抽出液を2 μ L加えて最終的に25 μ Lに調整してPCRに供した。非特異増幅は、ホソメコンブのDNA濃度が薄いときに生じやすいため、この実験で用いたテンプレートは、DNA抽出液200 μ L中にホソメコンブ遊走子30個相当のDNAを含む抽出液を使用した。

これらをThermal Cycler Dice Real Time System Lite（タカラバイオ社）を用いて、リアルタイムPCRに供した。PCRの反応条件は、95 $^{\circ}$ C30秒で初期変性を行った後、95 $^{\circ}$ Cで5秒，60 $^{\circ}$ Cで30秒の温度サイクルを45回行い、PCR終了後に融解曲線分析を行った。

非特異増幅の軽減2 蛍光強度測定温度の検討 このプライマー使用時に見られる非特異増幅のT_m値はホソメコンブのT_m値と明らかに異なっているため、非特異増幅による産物が乖離して蛍光を失い、かつ特異的産物が乖離せずに蛍光を維持する温度に蛍光強度測定ステップを設定

DNAの抽出手順 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)使用時

1. 400 μ Lの「AP1」を2mLのチューブに入れ65 $^{\circ}$ Cに加熱する*1。
 2. 4 μ Lの「RNase」を添加する。
 3. 遊走子を濾過した濾紙を「1」のチューブに入れる*2。
 4. 濾紙を入れたチューブを65 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートする。途中で2~3回、ボルテックスで攪拌する。
 5. 130 μ Lの「Buffer P3」を添加後、ボルテックスで混和する。この時、チューブの下端まで白濁するように激しく攪拌する。攪拌時に粘性を生じると混和しづらくなるので、手早くボルテックスする。その後、氷上で5分間インキュベートする。
 6. 室温, 20,000 \times Gで5分間遠心分離する。
 7. 新しい1.5mLチューブに広口チップで上澄と沈殿を移す。上面に浮いているものと濾紙は移さない。
 8. 室温, 20,000 \times Gで2分間遠心分離する。
 9. 「QIA shredder Mini Spin Column (2mLチューブにセット済み) (薄紫色)」に上澄全量を広口チップで移す。沈殿はなるべく吸わないようにする。
 10. 室温, 20,000 \times Gで2分間遠心分離する。
 11. 濾液を新しい2mLチューブにピペットを使って移す。この時、遠心したチューブ内にペレットができていない場合は、これをはがさないように注意する。
 12. 「11」で移したライセートの1.5倍量の「Buffer AW1*3」を添加し、ピペティングで混和する。通常は、450 μ L程度のライセートが得られるので、加える「AW1」は675 μ Lとなる。
 13. 「12」の混和液を「DNeasy Mini Spin Column (2mLチューブにセット済み) (白色)」に移すただし、全量は移せないで、2回に分けて移すことになる。
 14. 室温, 6,000 \times Gで1分間遠心分離する。濾液は捨てる。
 15. 「13」で残ったライセートを「DNeasy Mini Spin Column」に移す。
 16. 室温, 6,000 \times Gで1分間遠心分離する。濾液とチューブは捨て、「DNeasy Mini Spin Column」をキット添付の2mLコレクションチューブにセットする。
 17. 「Buffer AW2*3」500 μ Lをカラムに添加する。
 18. 室温, 6,000 \times Gで1分間遠心分離する。濾液は捨てる。
 19. 再度、500 μ Lの「Buffer AW2」をカラムに添加する。
 20. 室温, 20,000 \times Gで2分間遠心分離し、メンブレンを乾燥させる。
 21. 「DNeasy Mini Spin Column」を新しい1.5mLチューブに移す。
 22. 100 μ Lの「Buffer AE」を「DNeasy Mini Spin Columnメンブレン」にアプライする。
 23. 室温で5分間インキュベートする。
 24. 6,000 \times Gで2分間遠心分離する。
 24. 「22」～「24」を繰り返す。最終液量は200 μ Lとなる。
- *1 AP1は常温で結晶を生じるので、あらかじめ60 $^{\circ}$ C程度に加熱して結晶を溶解して2mLのチューブに400 μ Lずつ分注してストックしておくといよい。
- *2 濾紙全体がAP1に浸漬されるよう、ハサミで濾紙を1/2に切断する。濾紙を収容してあるポリ袋の上から切断し、ピンセットで濾紙を取り出してチューブに2枚とも入れる。。切断に用いたハサミとピンセットは、コンタミを避けるため、1サンプルごとにエタノールで洗浄して拭き取る。
- *3 AW1とAW2は濃縮なので、表示に従ってエタノールで希釈しておく。AW1に沈殿が見られる場合は、65 $^{\circ}$ Cに加熱して沈殿を溶解した後にエタノールで希釈する。

図1 DNA抽出の手順

することで、非特異増幅産物を除いてターゲットだけを特異的に測定することが可能となる（タカラバイオウェブカタログ「インターカレーター法によるリアルタイムPCRの条件検討 2(2)検出ステップ（ターゲット特異的検出）」, http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100004190, 2020年5月20日閲覧）。そこで、PCR終了後の融解曲線分析から、非特異増幅とホソメコンプのT_m値の差を調べ、伸長反応ステップに追加する蛍光強度測定ステップの温度を検討した。

DNeasy Plant Mini Kitを使用した場合のDNA抽出精度の確認 2019年10月30日に北海道後志総合振興局管内余市町にある道総研中央水産試験場前浜で子嚢斑が形成されているホソメコンプを採集し、表面を蒸留水で洗浄してから紙に包んだ半乾燥状態で冷蔵庫内に半日置き、これを人工海水に浸漬して遊走子を放出させた。得られた粗遊走子液は4枚重ねのさらしで夾雑物を除去し、冷暗所に2時間静置して試験用の遊走子原液とした。遊走子原液から9mLを分注し、これにホルマリン1mLを加えて遊走子を固定し、血球算定盤を用いて遊走子数を計数した。

遊走子原液を人工海水で10倍に希釈したものから50mLと10mL、また、原液を100倍希釈したものから20mL、10mLおよび5mLを前報（高谷ら, 2016）と同様の方法でそれぞれ2本ずつ濾過し、フィルターホルダーから濾紙を取り出した後、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てDNA抽出まで-30℃で冷凍保存した。後日、図1に示した方法でDNA抽出を行い、先の非特異増幅軽減実験で得られたPCRプロトコール（後述）でPCRを行って、想定した遊走子濾過数とリアルタイムPCRのCt値を比較した。

定量下限値の検討 本法における定量下限値を調べるため、図1の手順で抽出したホソメコンプ遊走子20,000個相当のDNAを含む抽出液を1/2ずつ12段階にEASY Dilution（タカラバイオ社）で希釈して、20,000~10個相当となるDNA希釈系列を作成した。これを、先の非特異増幅軽減実験で得られたPCRプロトコール（後述）でPCRを行い、測定精度（Ct値の安定性）について検討した。

結果と考察

プライマー濃度の決定 4段階のプライマー濃度でPCRを行った結果、すべての濃度で非特異増幅が見られたが、0.3μMで最も少なかった。また、0.6~0.3μMではホソメコンプ反応の蛍光強度に差は見られなかったが、0.2μMでは非特異増幅の蛍光強度が大きいと同時にホソメコンプ反応の蛍光強度が低下した（図2）。以上のことから、ホソメコンプの反応に影響を与えずに非特異増幅を軽減

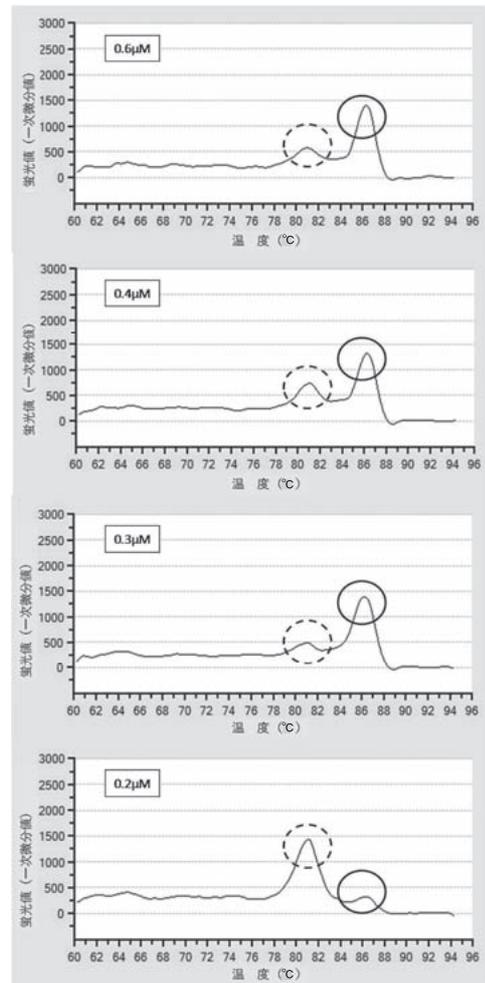


図2 4段階のプライマー濃度でPCRしたときの融解曲線の負の一次微分曲線
破線丸印が非特異増幅によるピーク、実線丸印がホソメコンプDNAによるピーク
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite（タカラバイオ社製）付属のデータ処理ソフトにより作図して一部改変および加筆

できる最適なプライマー濃度は、終濃度で0.3μMであると考えられた。

蛍光強度測定温度 図3に前述の実験における0.4 μMの融解曲線分析の結果を示した。非特異増幅のT_m値は81.0℃付近であった。これに対してホソメコンプのT_m値は86.5℃付近であり、両者の融解曲線の負の一次微分曲線のピークは84.0℃で明瞭に分離可能であった。このことから、PCR時の伸長ステップの次に84.0℃の蛍光強度測定ステップを追加設定することで、非特異増幅の影響を受けずにホソメコンプのDNA量が測定可能となった。新たに作成したPCRプロトコールは図4に示した。

DNeasy Plant Mini Kitを使用した場合のDNA抽出精度 濾過前の遊走子原液の遊走子数は、直接計数の結果45,000

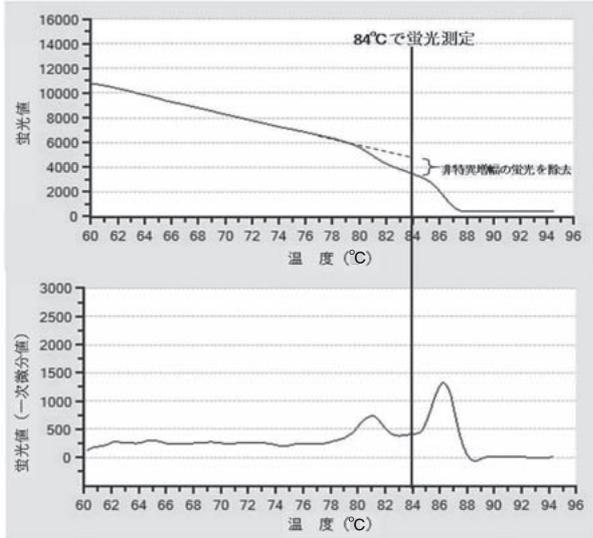


図3 非特異増幅とホソメコンプによる増幅の融解曲線(上)とその負の一次微分曲線(下)
Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (タカラバイオ社製) 付属のデータ処理ソフトにより作図して一部改変および加筆

①PCR反応液の調整	
TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ社)	12.5 μL
Forward Primer (10 μM)	0.75 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.75 μL
超純水	9.0 μL
DNAテンプレート	2.0 μL
合計	25.0 μL
②PCRプロトコール	
95°C 30秒 (初期変性)	
↓	
95°C 5秒	← 40cycle
↓	
60°C 30秒	
↓	
84°C 15秒 (蛍光測定)	
↓	
融解曲線分析	

図4 リアルタイムPCRプロトコール

個/mLであった。したがって、濾紙に捕捉された遊走子数は、225,000個、45,000個、9,000個、4,500個および2,250個と想定された。これらから図1の手順でDNAを抽出し、リアルタイムPCRで測定した結果を図5に示した。その結果、想定された遊走子数とCt値には強い相関関係 ($R^2=0.990$) があり、DNAは精度高く抽出されていた。

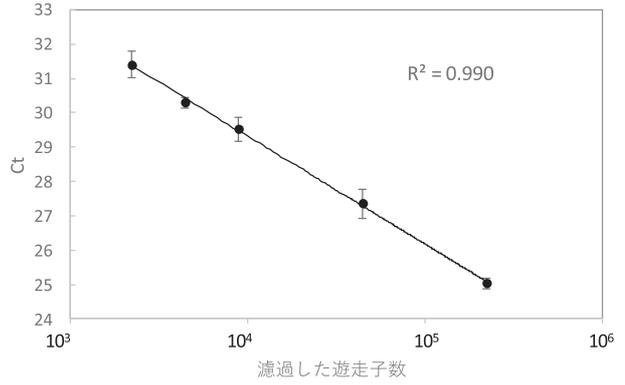


図5 濾過した遊走子数と抽出したDNAのCt値

定量下限値 遊走子20,000個~10個相当まで12段階のDNA希釈系列を図4のプロトコールを使ってリアルタイムPCRで測定した結果を図6に示した。遊走子数とCt値には20,000~312個相当までは高い相関関係 ($R^2=0.995$) があり、残差に偏りもなかったが、156個相当以下では相関関係はある程度維持されたもののCt値のばらつきが大きく一部の残差に偏りが見られた。また、10個相当では検出できない場合もあった。さらに、20,000~312個相当までのPCR効率率は92.4%であり、一般に適正とされる範囲(80~100%)内であった。

以上のことから、本法では、試水を濾過したフィルター上に300個以上の遊走子が含まれていれば正確な定量が可能であると判断され、前報に比べて検出下限値を1/7にすることができた。これは、現状で私たちが行っている現場海水の濾水量(50mL)を想定した場合、海水中に6個/mL以上の遊走子があれば正確に定量できることを示している。

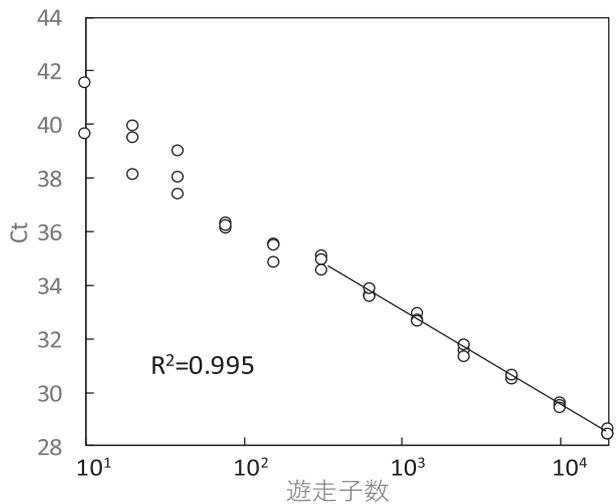


図6 遊走子由来DNAの希釈系列とCt値の関係 R^2 は20,000~312個までのデータから算出

引用文献

- 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, 北海道立水産試験場研究報告 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. 北海道立水産試験場報告 1980; 22: 7-16.
- 高谷義幸, 秋野秀樹, 四ツ倉典滋. 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). 北海道水産試験場研究報告 2016; 90: 13-16.