

ホタテガイ幼生分布調査現場への普及に向けた免疫染色技術の簡易化 (技術報告)

清水洋平^{*1}, 川崎琢真¹, 高畠信一¹, 岩井俊治^{2,3}, 山下正兼²

¹北海道立総合研究機構栽培水産試験場, ²北海道大学大学院理学研究院, ³愛媛大学南予水産研究センター

Simplification of the immunostaining procedures in Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* larvae toward the spread of immunostaining method for investigating the larval distribution in the field (Technical report)

YOHEI SHIMIZU^{*1}, TAKUMA KAWASAKI¹, SHIN-ICHI TAKABATAKE¹, TOSHIHARU IWA^{2,3} and MASAKANE YAMASHITA²

¹ Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan.

² Laboratory of Reproductive and Developmental Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan.

³ South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University, Ainan, Ehime 798-4292, Japan.

キーワード：アルカリフォスファターゼ標識抗体, 抗ホタテガイ幼生ポリクローナル抗体, 分布調査, 免疫染色法のキット化

ほたてがい漁業はホタテガイ (*Mizuhopecten yessoensis*) と対象とする北海道の基幹産業である。ほたてがい漁業は天然採苗に依存しているため、関係機関はホタテガイ幼生の分布状況を調査している。しかしながら、外部形態を基にホタテガイ幼生を他の二枚貝幼生と区別することは難しく、本作業には熟練を要する。そこで清水ら (2014) はホタテガイ幼生に対するポリクローナル抗体を作製し、判別基準を外部形態から色へと変えることで判別の簡易化を図った。しかし、本法を幼生分布調査の現場で実施可能な簡便な技術とするためには、作業工程の簡略化と操作の簡易化が求められた。免疫染色法を利用した二枚貝幼生の判別技術は他種でも開発され (浜口 1999, 浜口 2009), 分布調査に利用されている (福澄ら 2013, 鳥羽ら 2013)。しかし、その利用には専門的な知識や技術が必要なことから、これらの手法は研究機関を中心に普及しているのみで、現場で恒常的に使われた事例は少ない。そこで、ホタテガイ幼生の分布調査現場に免疫染色技術を普及させることをめざし、血清から精製した抗体をアルカリフォスファターゼで直接標識し、免疫染色の作業工程を簡略化した。また、使用する溶液類をキット化し、溶液類の扱いを容易にすることで、現場での作業を簡易化した。

試料および方法

抗体のアルカリフォスファターゼ標識 ホタテガイ幼生に対するモルモット抗血清 (清水ら, 2014) 1 ml より HiTrap Protein A カラム (GE Healthcare) を用いて抗体 (免疫グロブリン) を 10.28 mg 精製し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 1 mg/ml の濃度となるように希釈した。Lightning-Link Alkaline Phosphatase Conjugation Kit (Innova Biosciences) を用い、製品に添付されたプロトコールに従って、精製抗体にアルカリフォスファターゼを結合させた。

アルカリフォスファターゼ標識抗体の特異性検証 人工授精で得られたホタテガイ幼生とキタノムラサキイガイ幼生を 1% グルタルアルデヒド海水 (25% グルタルアルデヒド水溶液を海水で 1% に希釈) を用いて固定し、これらを混合した標本を免疫染色に用いた。抗体溶液として、アルカリフォスファターゼ標識抗体をブロッキング緩衝液 (Super Block Blocking Buffer in PBS, Thermo Scientific) で、200 倍、500 倍、1,000 倍、2,000 倍、5,000 倍および 10,000 倍に希釈したものを作製した。標本を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、PBS による 1 分間の洗浄を 3 回行った。PBS をパストールピペットで取り除いた後、抗

体溶液を40 μ l 加え, ローテーターにより室温で30分間攪拌した。抗体反応後, 抗体溶液を除去し, トリス緩衝液 (pH 9.5) で1分間3回洗浄した。トリス緩衝液を取り除いた標本に200 μ l の発色基質溶液 (BCIP/NBT solution, premixed, Sigma-Aldrich) を加え, ローテーターを用いて室温で30分間攪拌しながら発色させた。発色後, 発色基質溶液を水道水で置換し, 実体顕微鏡下で観察した。ポジティブコントロールとして, 抗体精製前の抗血清を一次抗体として用いた免疫染色を行った。一次抗体はブロッキング緩衝液で1,000倍希釈, 二次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗体 (Invitrogen) を1,000倍希釈し, いずれも30分間反応させた。ホタテガイ幼生とキタノムラサキガイ幼生は外部形態を基に判別した。

ホタテガイ幼生免疫染色のキット化 免疫染色に用いる溶液は, PBS, 抗体溶液, トリス緩衝液 (pH 9.5) および発色基質溶液である。これらをドロップパーボトルあるいは点眼ボトルに分注し, キット化した。使用量の多いPBSおよびトリス緩衝液にはドロップパーボトルを用い, 使用量の少ない抗体溶液および発色基質溶液には点眼ボトルを用いた。抗体溶液は, アルカリフォスファターゼ標識抗体をブロッキング緩衝液で200倍に希釈した後に点眼ボトルに入れ, 免疫染色1反応あたり1滴 (約40 μ l) を試料に添加した。発色基質溶液は市販品を原液のまま点眼ボトルに入れ, 免疫染色1反応あたり5滴 (約200 μ l) を試料に添加した。また, 本キットを用いた免疫染色プロトコルを新たに作成し, これに従って, 1%グルタルアルデヒド海水で固定した噴火湾産二枚貝混合標本を試験染色し, 染色性と簡便性を確認した。

結果と考察

アルカリフォスファターゼ標識抗体の特異性検証 まず, ポジティブコントロールとして, ホタテガイ幼生に対するモルモット抗血清とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を用いて, ホタテガイ幼生とキタノムラサキガイ幼生を混合した標本を免疫染色した。その結果, 形態学的にホタテガイと同定された幼生のみが染色された (図1A)。次に, 抗血清から精製した抗体 (免疫

グロブリン) にアルカリフォスファターゼを結合させたものを200倍から2,000倍希釈して免疫染色した。この場合も, 抗血清と同様にホタテガイ幼生のみが明瞭に染色された (図1B-E)。5,000倍から10,000倍希釈の精製抗体を用いた場合でもホタテガイ幼生のための染色が見られたが, 染色強度は低下した (図1F, G)。これらのことから, 抗ホタテガイ幼生抗体に直接アルカリフォスファターゼを結合させても抗体の特異性は保持されることと, 標識抗体の希釈率が2,000倍程度でも十分染色できることがわかった。

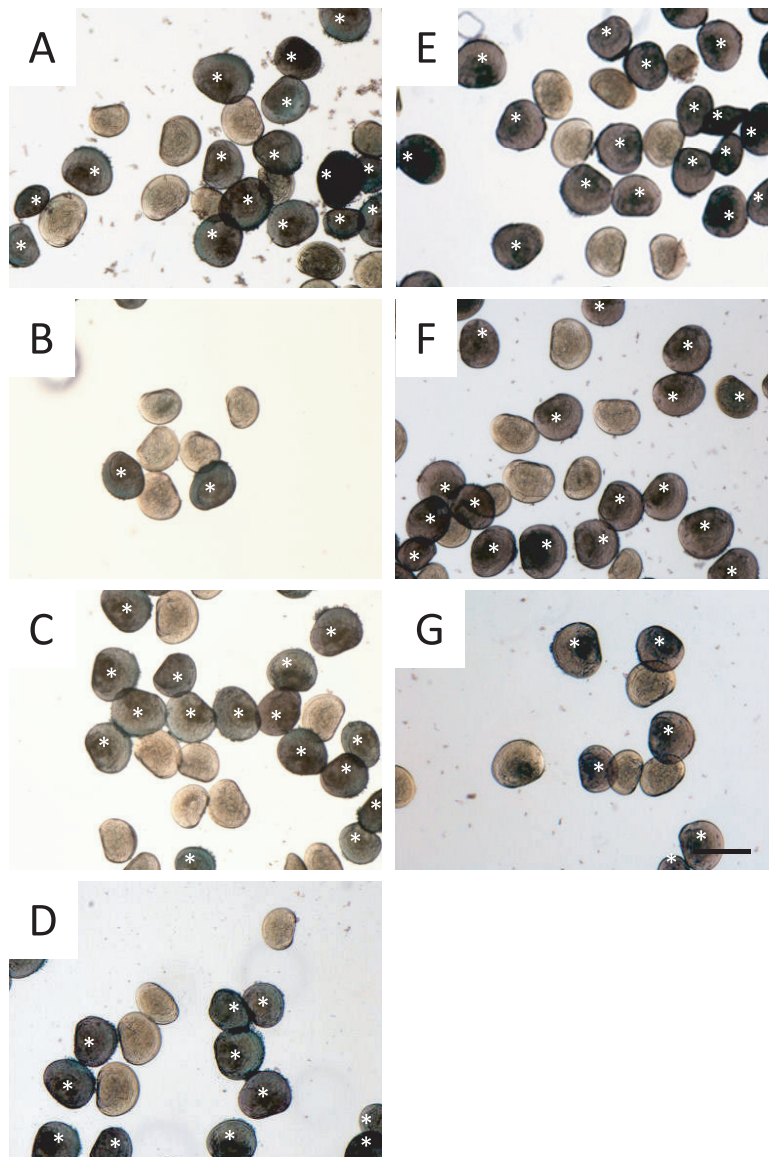


図1 アルカリフォスファターゼ標識抗体の特異性

A: ホタテガイ幼生に対する抗血清 (一次抗体, 1,000倍希釈) とアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を用いた免疫染色。B-G: ホタテガイ幼生に対するアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた免疫染色 (希釈率: B, 200倍; C, 500倍; D, 1,000倍; E, 2,000倍; F, 5,000倍; G, 10,000倍)。星印: 染色されたホタテガイ幼生。Bar = 200 μ m。

ホタテガイ幼生免疫染色のキット化 ホタテガイ幼生の免疫染色には1.5 mlマイクロチューブを用いる。従来の方法では、各溶液のストック容器から、それぞれの必要量をピペットで吸い、マイクロチューブに注入していたが、本研究では作業を容易にするため、免疫染色の溶液類をキット化した。すなわち、使用する溶液類を適切な濃度に調製した後、ドロPPERボトルや点眼ボトルに入れ、これらの容器から直接マイクロチューブに添加する方法を開発した。PBSおよびトリス緩衝液は大型のドロPPERボトルに入れることで試料への添加を容易にした。一方、抗体溶液や発色基質溶液は点眼ボトルに入れることで、ピペットを用いず少量の溶液を正確にマイクロチューブへ直接滴下できるようにした。

点眼ボトルに入れる抗体溶液の濃度は次のように検討した。抗体反応前のPBSによる洗浄時に、マイクロチューブからパストールピペットを用いて溶液を除去する場合、チューブ内に残る液量は100 μ lから200 μ lと想定される。点眼ボトルから滴下される溶液1滴は約40 μ lであるため、1滴をチューブ内に滴下した場合、抗体溶液は残存溶液と混合されて3.5から6倍に希釈される。そのため、あらかじめ抗体をブロッキング緩衝液で200倍に希釈して点眼ボトルに入れておけば、700から1,200倍希釈で抗体を使用することになり、確実にホタテガイ幼生を染色できる。また、余剰抗体が存在すると基質が溶液中で反応して浮遊物として析出し、観察が困難になるため、抗体反応後の余剰抗体を除去する必要がある。1 mlのトリス緩衝液を用いた3回未満の洗浄では、溶液中に反応基質の浮遊物が見られた。そのため、洗浄は1 mlのトリス緩衝液を用いて3回以上行うこととした。同様に、抗体反応前に行うPBSへの溶液置換も1 ml、3回とした。発色基質溶液は、現場で調整する必要がないよう、市販品を用いることとした。マイクロチューブを用いた場合、200 μ l程度（5滴）の基質溶液で十分に染色されるため、コストを考慮し、この量を基準とした。以上により、PBS、抗体溶液、トリス緩衝液および発色基質溶液の1回の免疫染色に必要な容量は、それぞれ、3 ml、40 μ l、3 mlおよび200 μ lとした。

本キットを用いた免疫染色法を普及させるため、新規にプロトコルを作成した（図2）。抗体に直接アルカリフォスファターゼを結合させたことにより、一次抗体反応後の洗浄と二次抗体反応が不要となり、免疫染色操作が簡略化された。最終的にホタテガイ幼生の発色が完了するまでに要する時間は、オリジナルのプロトコルに比べて、3.5時間から1.5時間へとおよそ2時間短縮された。新規プロトコルに従って免疫染色を行った結果、ホタテガイ幼生のみを濃く染め分けることができた（図3）。

本研究では、抗血清から精製した抗体に直接アルカリフォスファターゼを結合させることで免疫染色の工程を簡略化した。また、ドロPPERボトルや点眼ボトルを用いて免疫染色に必要な溶液をキット化することで、免疫染色操作を簡易化した。さらに、水産技術普及指導所では、市販のモーターと適当な箱を用いることで、格安のローターを作製し、現場での免疫染色が効率的に実施できるように工夫している（澤田、未発表）。これらの技術改良により、ホタテガイ幼生の免疫染色作業が格段に容易になった。よって、ホタテガイ幼生分布調査現場への本手法の導入が大いに促進されると期待される。

謝 辞

本手法開発にあたり、多くのご意見をいただきました北海道水産技術普及指導所の皆様に感謝いたします。本研究は北海道ホタテガイ振興協会からの受託事業「日本海ホタテガイ採苗不振対策事業」により行った。

引用文献

- 清水洋平，岩井俊治，高嶋信一，川崎琢真，山下正兼：ホタテガイ幼生簡易同定に用いる高特異的ポリクローナル抗体の作製。水産技術 2014, 7: 31-36
- 浜口昌巳．貝類浮遊幼生の免疫学的特性の解明。「魚介類の初期生態解明のための種判別技術の開発」 農林水産技術会議事務局，東京．1999; 21-31.
- 浜口昌巳．アサリ等海産ベントスの初期生態研究推進のための技術開発。日水誌 2009; 75: 771-774.
- 福澄賢二，浜口昌巳，小池美紀，吉岡武志．モノクローナル抗体法及びリアルタイムPCR法によるアコヤガイ浮遊幼生の同定。福岡水海技セ研報 2013; 23: 27-32.
- 鳥羽光晴，山川紘，庄司紀彦，小林豊．東京湾盤州沿岸での1潮汐間におけるアサリ幼生の鉛直分布の特徴。日水誌 2013; 79: 355-371.

ホタテガイ幼生の免疫染色プロトコール

1. マイクロチューブから余分な液を除く。
2. リン酸緩衝食塩水 (PBS) をマイクロチューブに加える。
3. 幼生がマイクロチューブの底に沈んだのを確認し, PBSを除く。
4. 「2」および「3」を2回繰り返す。
5. 抗体溶液をマイクロチューブに 1 滴加える。かるく攪拌する程度にチューブの底を指ではじく。
6. ローテーターや攪拌機を用いて, マイクロチューブ内を攪拌しながら30分間抗体を反応させる。
7. マイクロチューブから抗体溶液を除く。
8. トリス緩衝液 (pH 9.5) をマイクロチューブに加える。
9. 幼生がマイクロチューブの底に沈んだのを確認し, トリス緩衝液を除く。
10. 「8」および「9」を2回繰り返す。
11. 発色基質溶液をマイクロチューブに5滴加える。
12. ローテーターや攪拌機を用いて, 30分間程度発色させる。発色の程度を確認し, 発色が不十分であれば, さらに時間をおいて反応させる。
13. すぐに観察しない場合は, 発色基質溶液を除き, 水道水で3回洗浄する。
14. 実体顕微鏡もしくは万能投影機で観察する。

図2 ホタテガイ幼生免疫染色キット用プロトコール

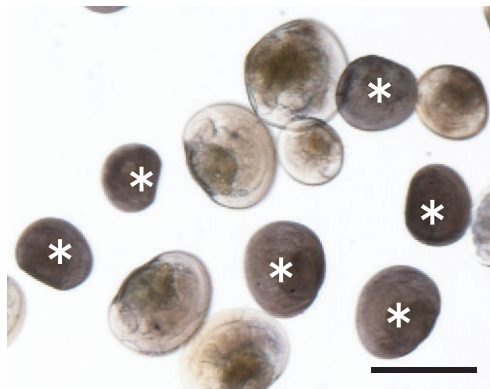


図3 キットを用いたホタテガイ幼生の免疫染色. 星印: 染色されたホタテガイ幼生. Bar = 200 μm 。