

# 分子生物学的手法によるモニタリング

○左子芳彦・神川龍馬

(京大院・農)

キーワード: real-time PCR, 28S rRNA D1/D2 領域, CTAB 法

## 【目的】

代表的赤潮藻である *Chattonella* spp.、*Heterosigma akashiwo*、*Karenia mikimotoi* に加えて近年、二枚貝斃死原因藻 *Heterocapsa circularisquama* や魚介類斃死原因藻 *Cochlodinium polykrikoides* といった新型赤潮が頻発し、より簡便かつ正確なモニタリング法が求められている。そこで本研究では、検出感度の高い分子生物学的手法の一つである real-time PCR 法を用いて、主な赤潮原因藻 *C. antiqua*、*H. akashiwo*、*H. circularisquama*、*K. mikimotoi*、*C. polykrikoides* 天然細胞の定量的検出法の確立を試みた。

## 【方法および結果】

### DNA 抽出法の確立

28S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域の塩基配列から、赤潮藻各種に特異的なプライマーと Taq man probe を作成した。次に6種類の手法で抽出した DNA 1 $\mu$ L を種特異的プライマーおよびプローブとともに real-time PCR に供して得られた Ct 値を比較した。対象種により、有効と思われる DNA 抽出法は異なっており、*C. polykrikoides* では TE buffer による抽出法が効果的であると考えられた。しかし本研究では様々な種において効果的な手法を探索したので、すべての種において効果的であると考えられた CTAB 法を *C. polykrikoides* を含む赤潮藻の包括的検出に用いた。

### 検量線の作成

細胞希釈系列から抽出した DNA を鋳型とした real-time PCR における検出感度 (Ct 値) と細胞数の間には高い相関関係が得られ、 $r^2$  値は 0.96 以上であった。このようにして検量線が作成できたので、赤潮藻 5 種についての real-time PCR 法による定量的検出が可能となった。本手法では、5 種において培養細胞では 1 細胞あれば検出可能であるため、非常に高感度であった。

### 細胞増殖期と非標的種の影響

細胞を前培養後新しい培地に移し、3 日ごとに「直接計数」と「real-time PCR 法」の両法で細胞数を計数した。上記 2 手法で計数した結果はよく一致しており、細胞増殖期から死滅期に至るまで、幅広い増殖段階における細胞を正確に定量可能であることが示唆された (図 1)。また、100 細胞の標的細胞に様々な非標的種を混在させたサンプルから抽出した DNA を用いて real-time PCR 法により標的種を定量した結果、ほぼ 100 細胞として定量す

ることができた。

この結果、本手法は細胞の増殖段階や非標的種の存在に影響を受けないことが培養細胞を用いた実験で明らかとなった。

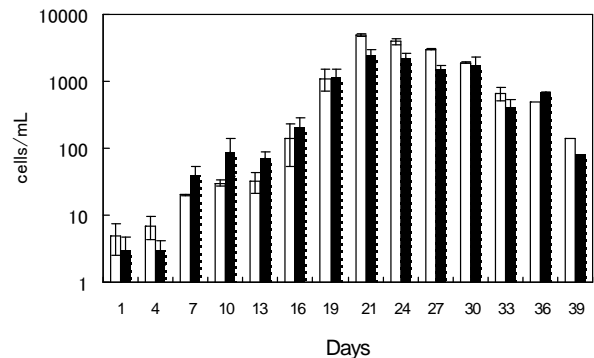


図 1. *C. polykrikoides* 培養細胞の増殖段階における直接検鏡 (白抜き) と real-time PCR 法 (黒塗り) による細胞定量結果

### 環境サンプルへの応用

環境海水 500ml から 1L を 3 $\mu$ m Nucleopore filter で 50ml まで濃縮後、遠心することで海水中の細胞を回収した。本サンプルから CTAB 法にて抽出した DNA を real-time PCR 法に供したところ、直接検鏡とほぼ一致する同定・定量結果が得られた。また直接検鏡では観察されなかった 1L 中に数細胞という低密度でも検出・同定が可能であり、直接検鏡よりも感度が高いことが示された。

### 【今後の応用と展開】

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* および *A. catenella* では、real-time PCR 法を用いて、その休眠細胞を底泥中から種特異的かつ定量的に検出可能である。このように、栄養細胞が観察されない時期に、*C. polykrikoides* がどの海域のどのような環境に、どのくらい存在しているのか、を明らかにするためにも本手法は非常に有効であろうと考えられる。

また、現在さらに高感度かつ動向を予測可能な分子マーカーを探索するため、*C. polykrikoides* を含む様々な有害藻のミトコンドリアゲノムやその遺伝子の解析を進めている。