

# 気候変動に適応する強靱な新養殖事業－ I

## 藻類養殖

岡 謙佑・八巻勇翔<sup>1)</sup>・五十嵐洋治<sup>1)</sup>・柿沼 誠<sup>1)</sup>

1) 三重大学大学院生物資源学研究科

### 目的

養殖ヒトエグサの種苗の多くは現在、天然採苗によって確保されている。しかし、天然採苗は気象や海況に大きく影響される。また種場の遊走子の量を確認する方法も、現在は種場に張り込まれた種網の顕微鏡観察に頼っている。顕微鏡観察では、種網を2週間培養することで結果を確定させているため、結果が出るまでに時間がかかることが問題となっている。また、必ずしも安定的に採苗が行えないことから藻体の生産量が安定せず、養殖業者の収入も変動が大きい。このため、現在、安定的に採苗を行う技術の開発が望まれている。そこで本事業では、ヒトエグサの安定的な採苗技術の開発を目的として、これまで遺伝学的知見の少ないヒトエグサの全ゲノム DNA 塩基配列を解読し、技術開発のための基礎的知見を得るとともに、環境水中のヒトエグサ遊走子を DNA レベルで検出する手法を検討してきた。本年度は、定量 PCR に用いるヒトエグサ特異的プライマーの開発を試みるとともに、環境水から DNA を抽出し、PCR によるヒトエグサ DNA の検出を試みた。さらに、定量 PCR による DNA 定量限界濃度の検討を行った。

### 方法

#### 1 ヒトエグサ種特異的プライマーの開発

昨年度までに本事業で取得したヒトエグサ DNA 塩基配列から local Blast 検索を用いて Internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域の塩基配列を抽出した。次に、NCBI 塩基配列データベースに登録されている緑藻 60 種の ITS 領域とマルチプルアライメントを行い、種特異性の高い領域を選定しプライマーおよびプローブの設計を行った。なお、プライマーおよびプローブの合成はタカラバイオ株式会社に委託した。

プライマーの特異性を確認するための鋳型 DNA には、昨年度 DNA 抽出を行った松阪産ヒトエグサ由来のものほか、スジアオノリおよびウスバアオノリの乾燥葉状体試料より DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen) を用いて抽出されたものを用いた。また、DNA 合成酵素は KAPA2GRobust PCR Kit (Kapa Biosystems) を用いた。PCR 増幅反応は、ABI 2720 Thermal Cycler (Applied

Biosystems) を用いて行い、反応液を 95°C で 3 分保温した後、95°C で 15 秒、62°C で 15 秒、72°C で 15 秒の反応を 35 サイクル行い、72°C で 1 分保温して反応を終了した。最後に、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、増幅断片の有無を確認した。

#### 2 PCR による環境水由来 DNA からのヒトエグサ検出

ミトコンドリア DNA の *cox1* のイントロン領域に設計したプライマーおよび核 DNA の ITS1 領域に設計したプライマーを使用した。鋳型 DNA には 2024 年 9 月に紀北町矢口浦で採取した環境水から抽出した DNA を使用した。PCR 増幅反応は前述と同様の条件で行った。

#### 3 定量 PCR による DNA 検出限界濃度の決定

定量 PCR には 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。検出法は TaqMan プローブ法を用いて、蛍光物質は FAM, クエンチャーは BHQ を使用した。酵素は Probe qPCR Mix (TaKaRa) を使用し、反応は反応液を 95°C で 30 秒保温した後、95°C で 5 秒、60°C で 31 秒を 40 サイクル行った。鋳型 DNA にはスタンダードとしてヒトエグサ DNA, ネガティブコントロールとして水, ポジティブコントロールとしてヒトエグサ葉状体由来 DNA, 試料としてヒトエグサ葉状体から人工的に配偶子放出を誘導して回収した溶液 (配偶子溶液), 環境水由来 DNA, スジアオノリ葉状体由来 DNA, およびウスバアオノリ葉状体由来 DNA を使用して定量 PCR の反応性および検出限界濃度を検討した。

### 結果及び考察

#### 1 ヒトエグサ種特異的プライマーの開発

核 DNA の ITS1 領域に設計したプライマーの特異性を確認したところ、ヒトエグサにおいて増幅産物が確認された。しかしながら、ウスバアオノリでもわずかに増幅が確認された (図 1)。

#### 2 PCR による環境水由来 DNA からのヒトエグサ検出

PCR および電気泳動の結果、ミトコンドリア DNA の *cox1* のイントロン領域に設計した 77 番プライマーで増幅が確認された。また、核 DNA の ITS1 領域に設計し

たプライマーでも増幅産物が確認された（図 2, 3）。

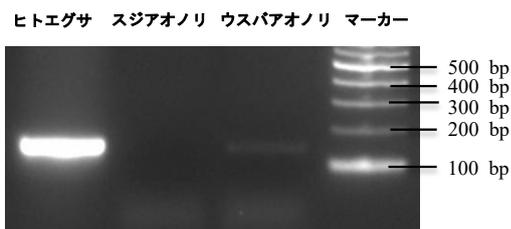


図 1. 核 DNA の ITS1 領域を対象とした PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果

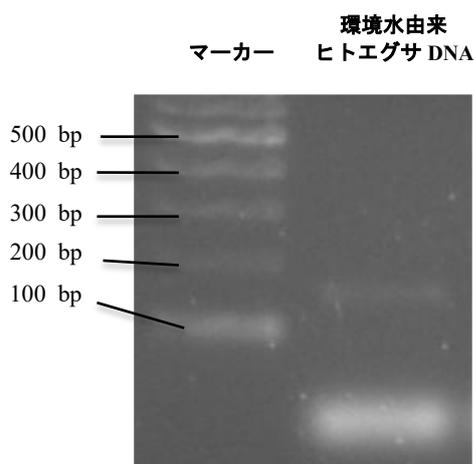


図 2. ミトコンドリア DNA の *cox1* のイントロン領域に設計した 77 番プライマーを使用した PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果

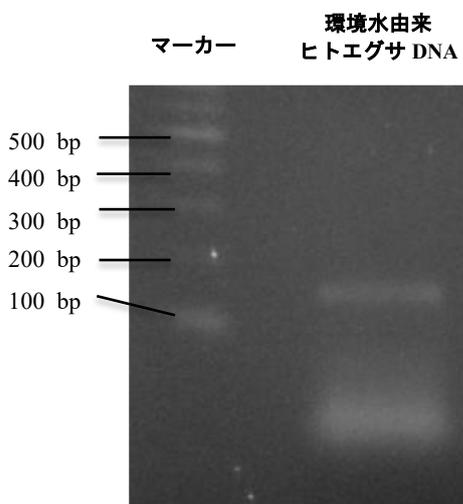


図 3. 核 DNA の ITS1 領域に設計したプライマーを使用した PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動結果

### 3 定量 PCR による DNA 検出限界濃度の決定

定量 PCR の結果、ヒトエグサ葉状体および配偶子溶液では増幅が確認され、ヒトエグサ葉状体の平均 Ct 値

は 19.1, 平均コピー数は  $2.46 \times 10^6$  と算出された。また、配偶子溶液では平均 Ct 値は 27.6, 平均コピー数は  $4.09 \times 10^4$  と算出された。一方で、環境水由来の DNA, スジアオノリおよびウスバアオノリでは増幅が確認できなかった（表 1）。次に、段階希釈 DNA 溶液は  $10^{-4}$  希釈まで検出可能であり、平均 Ct 値は 34.1, 平均コピー数は  $1.86 \times 10^3$  であった（表 2）。

表 1. 定量 PCR による検出試験の結果

DNA抽出試料	DNA濃度 (ng/μL)	平均Ct値	平均コピー数
ヒトエグサ葉状体	1.32	19.1	$2.46 \times 10^6$
配偶子溶液	0.10	27.6	$4.09 \times 10^4$
環境水	23.20	35.4	検量線閾値外
スジアオノリ葉状体	38.50	35.6	検量線閾値外
ウスバアオノリ葉状体	45.50	35.6	検量線閾値外

表 2. 定量 PCR による検出限界濃度を検討した結果

DNA濃度 (ng/μL)	平均Ct値	平均コピー数
1.32	19.1	$2.46 \times 10^6$
$1.32 \times 10^{-1}$	23.0	$3.80 \times 10^5$
$1.32 \times 10^{-2}$	26.4	$7.12 \times 10^4$
$1.32 \times 10^{-3}$	30.6	$9.82 \times 10^3$
$1.32 \times 10^{-4}$	34.1	$1.86 \times 10^3$
$1.32 \times 10^{-5}$	35.8	検量線閾値外
$1.32 \times 10^{-6}$	36.1	検量線閾値外
$1.32 \times 10^{-7}$	36.0	検量線閾値外
$1.32 \times 10^{-8}$	35.5	検量線閾値外
$1.32 \times 10^{-9}$	36.1	検量線閾値外
$1.32 \times 10^{-10}$	36.1	検量線閾値外

本年度、ヒトエグサ漁場の環境水から抽出した DNA に関して、PCR ではヒトエグサの増幅産物が確認されたものの、定量 PCR では増幅産物の確認ができなかった。これは、今回行った定量 PCR に用いたプライマーの増幅効率が 61.4%と低く、検出に PCR より高濃度の DNA が必要だった可能性が考えられる。また、PCR では KAPA2GRobust PCR Kit, 定量 PCR では Probe qPCR Mix と異なる DNA 合成酵素を用いているため、PCR 阻害物質の影響の大小により検出の有無に影響した可能性が挙げられる。今後、より効率的なヒトエグサの検出を目指して環境水の濃縮などを含めた抽出法の検討やプライマー・プローブの再設計、定量 PCR での増幅反応プログラムの改善などを行う必要があると考えられる。

本年度は、新規に開発した手法における定量 PCR による検出限界濃度が確認され、約 1 万コピーを含む ITS1

領域の DNA 濃度があればヒトエグサの検出が可能であることが示された。また、実験室で作成した配偶子溶液からも DNA の検出が可能であったことから、自然界でも遊走子放出のピーク時であれば検出は可能と考えら

れる。さらに、今後 1 遊走子や 1 配偶子での ITS1 コピー数を算出することができれば、遊走子換算での検出限界を調べることも可能となると考えられた。