

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580290

研究課題名(和文)モノクローナル抗体とPCRによる有害赤潮藻ヘテロカプサ殺藻ウイルス定量法の開発

研究課題名(英文)Development of a quantification method of HcRNAV infectious bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* with a monoclonal antibody and PCR

研究代表者

中山 奈津子(Nakayama, Natsuko)

独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号：20612675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロカプサ殺藻性ウイルスHcRNAVを特異的に定量する迅速で簡便な定量系ELISA法とマルチプレックスリアルタイムPCR法の構築に成功した。ELISA法では、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体を作製し、HcRNAVを特異的に検出することが可能となった。マルチプレックスリアルタイム法では、プライマー・プローブに蛍光標識し、反応温度や時間の検討を繰り返した結果、最終目標である現場海中のHcRNAVの定量を可能にした。ウイルスの感染価を定量できる従来法(MPN法)と併せて、現場における赤潮藻類とウイルスの挙動および生態に新たな知見が得られるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) system and the multiplex real-time reverse transcription PCR (mRT-PCR) system for quantifying a single-stranded RNA virus (HcRNAV) that causes a lytic infection in bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and checked its availability to environmental samples. In mRT-PCR, two primer-probe sets targeting separate conserved regions in the HcRNAV genome allowed highly specific detection of HcRNAV. The accuracy of the system was tested using three typical HcRNAV strains by comparing the enumeration results of the mRT-PCR method and two conventional methods, transmission electron microscopy (TEM) and a most-probable-number (MPN) assay. As a result, estimates obtained via the mRT-PCR method were consistent with those of TEM, indicating that it is a useful method for quantifying HcRNAV. In the ELISA, a monoclonal and polyclonal antibody established became possible to specifically detect the HcRNAV in situ.

研究分野：藻類ウイルス学、赤潮科学

キーワード：mRT-PCR HcRNAV ELISA ヘテロカプサ

1. 研究開始当初の背景

有害藻類ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ（以下、ヘテロカプサ）の大増殖によって引き起こされる赤潮は、日本の漁業に甚大な被害を与えているだけでなく、全地球規模でブルーム発生海域が拡大しつつある。近年、ヘテロカプサに感染する一本鎖 RNA ウィルス HcRNAV が発見され、赤潮の消長に深く関わっていると考えられた。さらに、ヘテロカプサとウィルスは複数のサブタイプから構成され、それぞれがサブタイプ特異的な感受性・感染性を示すことも明らかになっている(文献 1, 2)。ウィルスは、高い複製能をもつことや感染が宿主特異的であり他の生物への影響がないなどの点から、微生物学的赤潮防除用のツールとしてその有用性は非常に期待されている。申請者は、2011 年 8 月に、凍結保存下に置いた「HcRNAV を含む天然海底泥」をヘテロカプサ赤潮発生時の海水に接種することにより、ヘテロカプサ個体数が減少することを実証した(文献 3)。今後、天然の底泥散布による赤潮制御を現場で適用するためには、泥の散布量、散布法などを検討する必要があり、泥に含まれるウィルス密度や散布後のウィルスの効果・環境中のウィルス量を把握するために、ウィルスの定量技術は絶対不可欠であると考えた。

これまでの HcRNAV の密度は、ヘテロカプサのサブタイプ代表株 4 株に感染させて、MPN 法（培養株に段階希釈した試料を接種し宿主の死滅より判定）により推定してきた。しかし、この方法では、測定に用いた宿主株に感染可能なウィルス密度しか測定できず、現場海水や底泥中に存在するさまざまなサブタイプのヘテロカプサに対する総ウィルス密度の定量には適さなかった。また測定に 1 週間という長い時間を要することも問題であった。

そこで、本課題では、室内実験および環境中のウィルス定量に向けて、ELISA 法とリアルタイム PCR 法の 2 つの定量系を立ち上げることを目的とした。微量なタンパク質を検出できる ELISA 法は、ウィルスの定量に普遍的に用いられることが期待できる。また、ELISA 法は、標的抗原への特異性が高いことや高感度であること、一度に多数の試料を処理できることなど、現場のウィルス定量に最も向いている技術の一つと考えられる。また、塩基配列を標的としたリアルタイム PCR 法も、一度に多数の検体を高精度に測定できることから、ELISA 法との併用により、より精度の高い定量法の確立が期待できると考えた。これら定量系の立ち上げにより、迅速で正確な HcRNAV 量の定量を可能にし、赤潮削減へのウィルス HcRNAV の利用に向けた検証実験データの質が飛躍的に高度化するものと期待できる。また、現場のウィルスモニタリングが容易になるため、ヘテロカプサの生態を巡る知見がさらに深化するなど、赤

潮防除や赤潮予測においても多大な情報を提供すると期待できる。

2. 研究の目的

本課題では、有害赤潮原因藻類ヘテロカプサ(*Heterocapsa circularisquama*)に感染する RNA ウィルス HcRNAV を、酵素抗体法(ELIASA; Enzyme-linked Immunosorbent Assay)とリアルタイム PCR 法の 2 つの方法によって定量するシステムを構築する。過去の研究より、ヘテロカプサ赤潮の終息にはウィルス感染が重要な影響を与えていることが示唆されている。事実、室内実験や閉鎖系の現場実験において、HcRNAV がヘテロカプサ数を減少させることが確認されている。今後、HcRNAV を用いた赤潮防除法を確立するためには、接種試験と並行して HcRNAV 定量し、精緻な検証データを蓄積することが必要不可欠である。しかしながら従来の定量法は感度が低い上、測定に 1 週間以上要するため、現場への適用は困難である。そこで本課題では、迅速かつ正確な定量法として上述の 2 法を確立し、現場環境での持続的な利用を目指すものとする。

3. 研究の方法

本課題では、ヘテロカプサに感染するウィルス HcRNAV の定量とその現場への応用を目的とし、ELISA 法とリアルタイム PCR 法を用いてウィルス定量法を確立する。具体的には、1)ポリクローナル抗体を用いて ELISA 法によるウィルス定量法を確立し、2)室内・現場海域での利用に向けて検出法を最適化する。また、持続可能な定量システム構築のために 3)モノクローナル抗体を作製し、ELISA 法によるウィルス定量系を確立した後、4)現場海域でのウィルス利用実用化に向けて系を最適化する。さらに、5)リアルタイム PCR 法による HcRNAV 定量系も構築し、ELISA 法との併用によって、現場における高感度・高精度のシステムの確立を図る。

4. 研究成果

(1) マルチプレックスリアルタイム法による HcRNAV の定量

① プライマー・プローブの作製

HcRNAV を検出するためのプライマー・プローブを作製した。室内実験はもとより現場試料中の HcRNAV を定量することを最終目標とし、特異性を上げるために 2 領域をターゲットにし、蛍光色素で標識するなど、特異性を上げることに成功した。

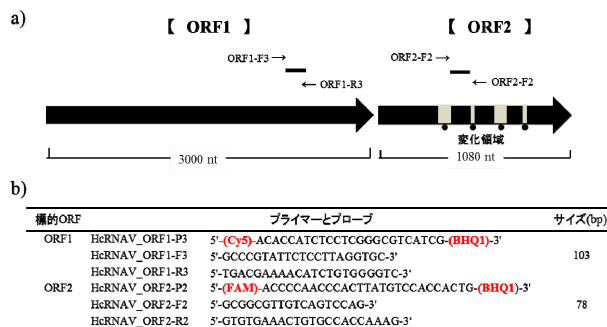


図 1. a) — ; HcRNAV ゲノム中のプライマー 2 領域
b) プライマーとプローブ。赤字は蛍光色素

②アニーリング温度の決定

特異性を左右するリアルタイム PCR のアニーリング温度について、59-70°Cの間の最適温度について検討した。図 2 が示すように、この温度間では顕著な差が認められなかったため、66°Cと決定した。温度を上げたことにより、反応時間を格段に短くすることができ、一回のランニング時間は、わずか 40 分となった。従来法である MPN 法で HcRNAV を検出する場合、結果が得られるまでに 7-10 日かかっていたことから、RNA 抽出や RT 反応を入れても 2-3 時間という劇的に迅速な定量系となった。

また、アニーリング温度を上げることで、特異性が高くなるため、野外試料から HcRNAV を定量する場合、夾雑物や類似のゲノムを読んでしまう交差性も回避できることが大いに期待できる結果となった。

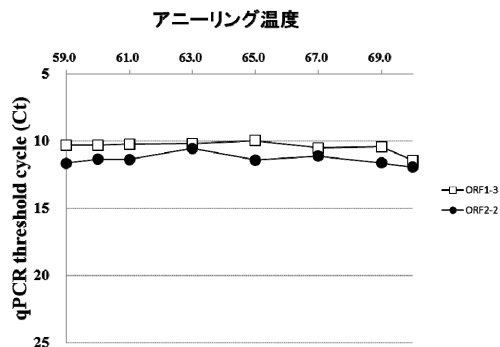


図 2. アニーリング温度の検討試験

③検量線の作製と検討

HcRNAV はヘテロカプサ赤潮海水に多量に存在する。その感染型の多様性は非常に高いが、過去の研究より 3つのグループに大別できることを見出している。そのため、3つのグループの代表株を用いて検量線をそれぞれ作製し、偏りの有無について比較した。

その結果、いずれの代表株を用いても相関係数の高い偏りのない検量性を引くことができた。以降、HcRNAV34 を検量線作製に用いることとした。

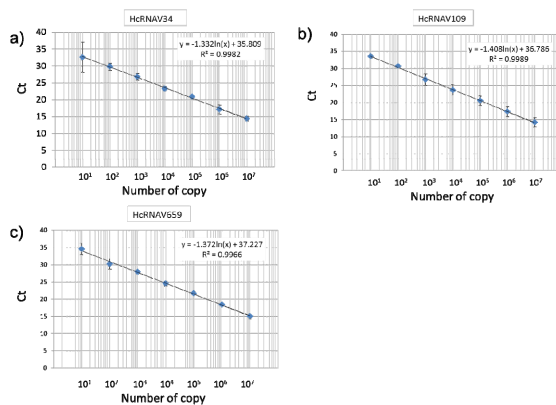


図 3. 検量線: a) HcRNAV34, b) -109, c) -659

④プライマー&プローブの特異性テスト

作製したプライマーとプローブが、他の藻類ウイルスを検出しないかどうか確かめた。用いた藻類ウイルスは、HcRNAV が検出される現場海水中に存在すると想定される藻類ウイルスである。ヘテロカプサに感染する大型ウイルス HcDNAV や珪藻やヘテロシグマに感染する 8 株のウイルスについてテストした (表 1)。

表 1.リアルタイム PCR の特異性テスト

Viruses	C _r value	
	Cy5	FAM
<i>Heterocapsa circurarisquama</i> RNA virus		
HcRNAV34	28.15	28.33
<i>Heterocapsa circurarisquama</i> DNA virus		
HcDNAV	n.d.	n.d.
<i>Cylindrotheca</i> virus		
KT12KUV	n.d.	n.d.
KT12RNAV	n.d.	n.d.
<i>Nitzschia</i> virus		
KT30RNAV	n.d.	n.d.
<i>Heterosigma</i> virus		
THaV2	n.d.	n.d.
THaV3	n.d.	n.d.
THaV4	n.d.	n.d.
THaV5	n.d.	n.d.

その結果、本リアルタイム PCR において、HcRNAV 以外のウイルスは検出されなかった。分離された藻類ウイルスは非常に少ないため、試験に用いる株数に限界がある。ウイルス以外にも、藻類や生海水からの核酸抽出物についても試験をする必要があると考えている。

⑤リアルタイム PCR 法と従来法による HcRNAV 定量値の比較

本課題で構築したマルチプレックスリアルタイム PCR 法と従来からウイルスの定量に用いられている TEM 法、MPN 法を用いて HcRNAV 定量値を比較した。TEM 法とは、精製したウイルス粒子を、スウィング型の超遠心機を用いて、グリットという試料台に一定量集め、ウランで染色した後、透過型電子顕微鏡下でカウントする方法である。MPN 法

は、精製したウイルス溶液を段階希釈したものを、宿主株に感染させて、死滅量からウイルス密度を換算する方法である。本課題で構築したリアルタイム PCR は、表 2 が示すように TEM 法との結果と非常に近い値となった。MPN 法は、宿主に感染するウイルス密度に限定されるため、定量値が低くなる傾向がある。一方、TEM では、ウイルス粒子を集めて観察する直接検鏡なので、比較的正確なウイルス数をカウントすることができる。リアルタイム PCR 法で得られた結果が、TEM 法と近似していたことは、本法が HcRNAV を正確に定量できたことを示している。ただし、本結果は、培養液における HcRNAV の密度である。

表 2. 3 つの定量法による HcRNAV 量の比較

	mRT-PCR copies/ml	TEM viral particles/ml	MPN infectious unit/ml
HcRNAV34	5.65 ± 2.76 × 10 ⁹	4.83 ± 3.29 × 10 ⁹	4.34 ± 4.79 × 10 ⁹
HcRNAV109	2.37 ± 0.4 × 10 ⁹	1.67 ± 1.5 × 10 ⁹	4.05 ± 5.08 × 10 ⁹
HcRNAV659	4.23 ± 1.97 × 10 ⁹	4.67 ± 0.60 × 10 ⁹	7.83 ± 3.45 × 10 ⁹

⑥海水・底泥からの HcRNAV 定量～抽出法の検討～

海水や底泥中のウイルス密度を定量するため、試料にあらかじめ HcRNAV34 を接種し、各試料から直接 RNA の抽出を試みた。海水には、4.91 × 10⁶ infectious units/ml の HcRNAV34 を接種し、段階希釈した試料をそれぞれ定量した。底泥には、1.38 × 10⁷ infectious units/g を接種したものを測定した。抽出には、表 3 に示すように、2-3 種類の市販の抽出キット、Trizol による抽出を行い、それらの効率を比較した。その結果、海水試料からの抽出では、2 つの抽出キット間で差はなく、MPN との値も顕著な差が認められなかった。このことから、リアルタイム PCR による海水からの HcRNAV 定量の可能性が示唆された。底泥からの抽出では、最も効率の高かった Power soil Kit においても、初期接種量の 1/10 量であり、抽出効率や RT 反応などを検討する必要があると考えられた。

表 3. 野外試料を用いた HcRNAV 回収効率の比較試験～RNA 抽出方法の検討～。a) 海水からの回収効率比較試験、b) 底泥からの回収効率比較試験

(a)

	mRT-PCR (copies/g)		MPN (infectious units/mL)
	RNeasy	Trizol	
	8.51 ± 1.3 × 10 ⁴	1.48 ± 0.4 × 10 ⁴	7.46 ± 3.3 × 10 ⁴
	2.94 ± 0.6 × 10 ³	3.57 ± 3.0 × 10 ³	6.84 ± 4.2 × 10 ³
	6.15 ± 2.1 × 10 ²	4.50 ± 5.0 × 10 ²	2.56 ± 0.0 × 10 ²

(b)

Host (Virus)	mRT-PCR (copies/g)			MPN (infectious units/mL)
	Power Soil	NORGEN	Trizol	
Hu (HcRNAV34)	5.96 ± 1.4 × 10 ⁵	4.38 ± 4.5 × 10 ³	N/A	3.85 × 10 ⁴

(2) HcRNAV 検出・定量のための ELISA 法構築

抗体を用いた ELISA 法については、ポリクローナル抗体の改変やモノクローナル抗体の作製を試みるとともに、ウイルス回収法やウイルスタンパク溶出バッファ等を検討し、系を構築した。その結果、ポリクローナル抗体を用いて培養株における検出を可能にしたが、現場海水や底泥中の HcRNAV の検出においては、夾雑物の問題や特異性を高める点で問題が残った。しかしながら、培養株においては、HcRNAV のヘテロカプサへの吸着開始時間や細胞内での挙動に関する知見を得るのに極めて有効な手段であるため、今後は、HcRNAV とヘテロカプサの生理生態を解明するための系として使用する予定である。

<参考文献>

- (1) Nagasaki, K., Y. Tomaru, K. Nakanishi, N. Hata, N. Katanozaka, and M. Yamaguchi. 2004. Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.* 34: 219-226.
- (2) Tomaru, Y., N. Hata, T. Masuda, M. Tsuji, K. Igata, Y. Masuda, T. Yamatogi, M. Sakaguchi, and K. Nagasaki. 2007. Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environ. Microbiol.* 9: 1376-1383.
- (3) Nakayama, N., S. Kondo, N. Hata, Y. Tomaru, K. Tarutani, K. Nasaki, and S. Itakura. 2013. Estimation of impacts of virus-containing bottom sediment on natural *Heterocapsa circularisquama* population. *Suisan Gakkai.* 79(6): 1017-1019 (in Japanese).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

(1) N. Nakayama, Shinichi Kondo, Naotsugu Hata, Yuji Tomaru, Masami Hamaguchi, Keizo Nagasaki and Shigeru Itakura : Prospect for the biological control of *Heterocapsa circularisquama* bloom by inoculating frozen bottom sediment with HcRNAV viruses. Korea PICES 2014 2014.10

(2) N. Nakayama, K. Nagasaki, N. Hata, K. Watanabe, M. Hamaguchi; Enumeration of a Dinoflagellate-infecting ssRNA virus by Multiplex real-time PCR. 7th Aquatic Virus Workshop 42~42, November 2013

(3) 中山 奈津子・長崎 慶三・浜口 昌巳 有

害渦鞭毛藻感染性ウイルス HcRNAV の定量法および赤潮防除法の開発と現場適用の展望 第 5 回ファージ研究会 2014.9 三重大学

(4) 中山奈津子・浜口昌巳・畑直亜・渡邊和博・長崎慶三. マルチプレックスリアルタイム RT-PCR を用いた海底泥からのウイルス HcRNAV 定量の検証 平成 26 年度日本水産学会春季大会. 講演要旨集 p.141 2014.3.28 北海道大学函館キャンパス.

(5) 中山奈津子, 長崎慶三, 浜口昌巳; 有害渦鞭毛藻感染性ウイルス HcRNAV に対するマルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法の開発, 第 29 回日本微生物生態学会 講演要旨集 81 2013.11.23 鹿児島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 奈津子 (Nakayama Natsuko)

独立行政法人 水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号：20612675

(2) 研究分担者

長崎 慶三 (Nagasaki Keizo)

独立行政法人 水産総合研究センター・本部・研究開発コーディネーター

研究者番号：00222175

浜口 昌巳 (Hamaguchi Masami)

独立行政法人 水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主幹研究員

研究者番号：60371960