

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550085

研究課題名(和文) 20種の有害有毒藻類を15分以内に検出可能な簡易分子モニタリング手法の開発

研究課題名(英文) Development of a new molecular diagnostic technique to detect 20 HAB species within 15 min

研究代表者

長井 敏 (Nagai, Satoshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・グループ長

研究者番号：80371962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸クロマトグラフィーとMultiplex-PCR法を併用することで、約20種の有害赤潮・貝毒原因藻をわずか3本のPCRチューブで15分以内に検出できる画期的な分子モニタリング手法の開発を目指した。まずは、麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻として広く知られるAlexandrium属5種(有毒種3種を含む)を同時検出できる核酸クロマトチップの開発に成功した。DNA量で0.1-10pg、rRNA遺伝子が5-500コピーあれば、検出可能であった。本法は、PCR反応物を用いて、肉眼で判定する技術であり、従来法に比べ操作が簡単、短時間・複数種同時検出が可能であり、モニタリング現場で活用されつつある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the Kaneka DNA chromatography chip (KDCC) for Alexandrium species was successfully developed that enables the simultaneous detection of five Alexandrium species. This method is utilized a DNA-DNA hybridization technology. This technique is simple, because it is possible to detect the target species by naked eye soon after (< 5 min) applying two μ L of PCR amplicon and 65 μ L of development buffer to the sample pad of the chip. Further, this technique is relatively inexpensive (does not require expensive laboratory equipment such as real-time Q-PCR machines or DNA microarray detectors, but a thermal cycler). Regarding the detection limit of KDCC for the five Alexandrium species, it varied among species and they were <0.1-10 pg and equivalent to 5-500 copies of rRNA genes, indicating that the technique is sensitive enough for practical use to detect several cells of the target species from 1 L of seawater.

研究分野：分子同定

キーワード：核酸クロマト multiplex-PCR 有毒渦鞭毛藻 有害赤潮 分子同定

1. 研究開始当初の背景

1972年、播磨灘において発生した *Chattonella* 赤潮による 72 億円にも及ぶ漁業被害を契機に、各自治体の海洋研究機関において、精力的な有害赤潮および貝毒原因プランクトンのモニタリングが実施されている。依然として *Chattonella*、*Karenia*、*Cochlodinium* 等による大規模赤潮は発生しており、膨大な金額の漁業被害が生じている。貝毒についても同様、*Alexandrium* 属による麻痺性貝毒、*Dinophysis* 属による下痢性貝毒による出荷規制等の漁業被害も後を絶たない。このため、各モニタリング機関が、高額な分析機器を購入するのは困難な状況にある。加えて人事異動が 2、3 年ごとに行われ、形態分類の専門家の育成と確保や経験・専門的知識の蓄積ができない状況にある。赤潮・貝毒モニタリングは、漁業被害の軽減および貝毒による健康被害を防止する非常に重要な役割を担っており、モニタリング現場からは種同定作業の負担を軽減できるような技術的サポートを行うことが求められている。モニタリング担当者が光学顕微鏡を用いた形態観察で原因種を正確に検出同定するのは、十分な知識・経験が必要であり、特に形態類似種の正確な同定は、専門家でも不可能である。天然海域では、有毒種、無毒種が同時に混在して出現が見られることがしばしばであり、細胞の形態や大きさが酷似していること、また、有毒種の間でも毒性の強さに強弱があるため、遺伝子による正確な種同定が必須となる。このため、これらの研究機関の担当者から、有害有毒プランクトンを迅速、簡単、正確、安価にできる分子同定技術の開発に対する大きな期待が寄せられてきた。これまで、種々の分子同定法、例えば、リアルタイム qPCR¹⁻²⁾、FISH 法³⁾、DNA microarray 法⁴⁾、LAMP 法⁵⁻⁸⁾、核酸クロマト⁹⁾、Multiplex PCR¹⁰⁾法が開発されてきたが、モニタリング担当者が実践的に使用している手法がほぼないのが現状である。

表 1. 沿岸生物モニタリングの現状と本研究への期待



2. 研究の目的

ごく近年開発された核酸クロマト型チップ¹⁰⁾と Multiplex-PCR 法⁹⁾技術の併用、加えて PCR の高速化を図ることで、PCR 反応を 10 分に短縮し、かつ約 20 種の有害有毒種を

わずか 3 本の PCR チューブで 3 分以内に目視観察で種同定できる技術開発を行う。さらに新たに開発したクロマト型チップを、市都道府県のモニタリング現場の担当者に実際に使用してもらい、性能・操作性等について評価を受けることで、分子生物学実験の経験のないモニタリング現場の担当者でも実践的に使用できる分子同定技術を確立する。

3. 研究の方法

1) 増幅用プライマーのスクリーニング (培養株入手、標的遺伝子配列の取得および収集)

まず、分子モニタリングする必要のある候補種として 20 種を挙げると、*Alexandrium* 属 5 種、*Chattonella* 属 3 種、*Cochlodinium polykrikoides* 3 リボタイプ、*Cochlodinium type Kasasa*、*Karenia* 属 4 種、*Heterocapsa circularisquama*、*Pseudonitzschia multiselis* 等を予定しており、類似種を含めて 60 - 70 種の培養株を確保する。上記の対象種について、標的遺伝子 (核 28S-rDNA あるいは 5.8S-rDNA + ITS を含む領域) の配列を取得し、かつ核酸遺伝子データベースから近縁種の標的遺伝子配列を収集する。

2) 種特異的に検出するための増幅用プライマーの設計およびスクリーニング

上記の対象種について、種内における配列のバリエーションを考慮しながら、核 28S-rDNA あるいは 5.8S-rDNA + ITS 領域において種特異的に検出できるプライマーの設計を 1 種につき複数個ずつ行い、上記で準備する 70 種の DNA を用いてスクリーニングを実施する。2) で選んだプライマー配列をもとに、1 個のクロマト型チップに 4 - 5 種の DNA プローブを固相化し、固相化したプローブの感度について、単独検出の場合、複数同時検出する場合等をテストし、プローブ候補をスクリーニングすることで、チップに搭載するプローブを決定する。また、プライマーの特異性については Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) で確認する。

3) 開発したチップの検出感度評価および天然サンプルを用いた実用性の検証

段階的に調整した各種の DNA を用いて PCR 増幅し、開発したチップの検出感度を調べる。天然のサンプル (環境 DNA) を用いて、標的種の検出を試み、メタゲノム解析手法、Multiplex-PCR 法¹⁰⁾での検出結果と比較し、検出感度およびその信頼性について評価を行う。

4) PCR 反応高速化

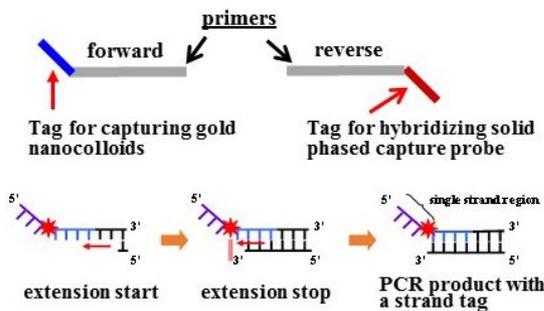
バイオコズム株式会社が現在、市販の遺伝子増幅装置を用いた高速 PCR チップを開発している。あるいは、Genesystem 株式会社が開発した GENECHECKER UF-100 と専用のポ

リマー製三次元チップを用いて、PCR 反応時間の短縮を試みる。

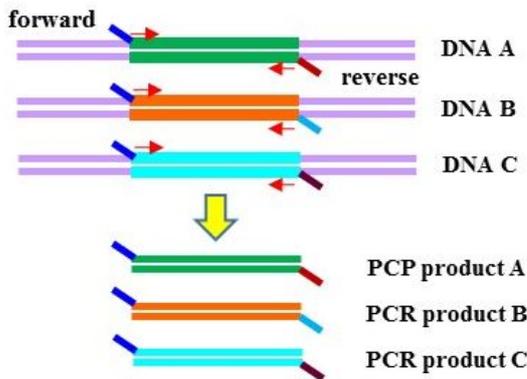
4. 研究成果

核酸クロマトチップは、カネカ（株）により開発された技術（表 1、図 1）で、その原理は、タグ化した白金コロイドと種特異的に検出できるプローブをクロマト紙に固相化し、白金コロイドを補足するプローブと固相化した種特異的なプローブと結合する相補的なタグを付加した特殊なプライマーを用いて種特異的に遺伝子増幅し、その後、クロマト紙に、ごく少量の遺伝子産物と展開バッファを添加するだけで、数分後には標的種の有無を判定できるという技術である（図 2）。

A. タグ付きプライマーのデザインと伸長過程



B. PCR増幅



C. ハイブリダイゼーション過程

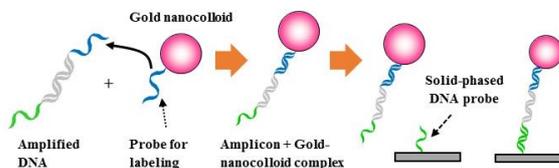


図 1. 核酸クロマトチップ（特殊プライマーの構造）

本研究では、まずは、麻痺性貝毒の原因渦鞭毛藻である *Alexandrium* 属 5 種の種同定が正確に出来るようにと、*Alexandrium affine*（無毒種）、*A. catenella*（有毒種）、*A. fraterculus*（無毒種）、*A. tamarense*（有毒種）、*A.*

tamiyavani（有毒種）を特異的に増幅できるプライマー - をリボソ - マル RNA 遺伝子の領域から選定した。それらを核酸クロマトチップに固相化し、チップの評価を行った（図 3）、各種、特異的に検出することに成功し、任意の 2 種類、あるいは 5 種の DNA 混合産物からも問題なく検出することができた。カネカによる核酸クロマトチップの開発当初、発色が充分でない場合も散見されたが、現在は、より強く発色するよう技術改善がなされている。1 細胞から抽出した DNA からも、十分な発色が見られ、検出可能であった（図 4）。

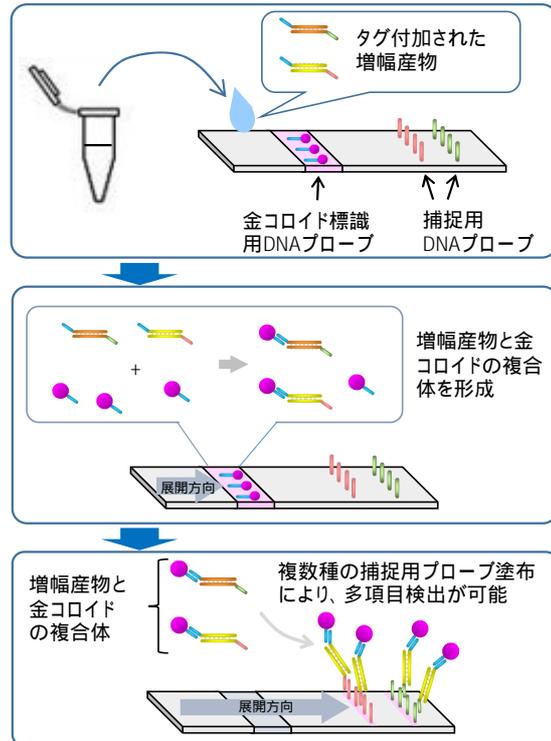


図 2. 核酸クロマトチップ（検出過程）

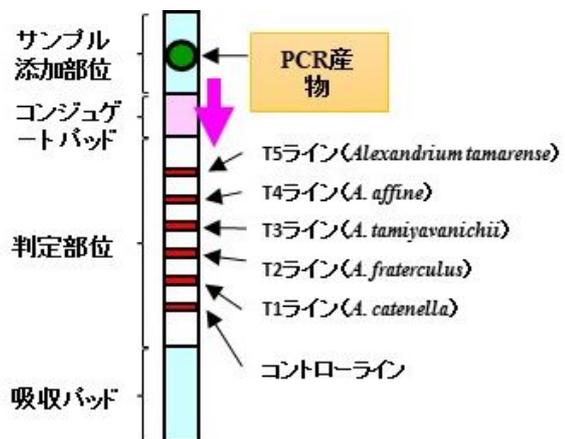


図 3. 核酸クロマトチップのイメージ

環境 DNA サンプルからの検出感度を調べるため、八代海定点（2013 年 6 月 5 日～9 月 25 日）、鹿児島定点（2013 年 6 月 5 日～9 月 25 日）、各 16、10 個の海水サンプル（海水 500 mL

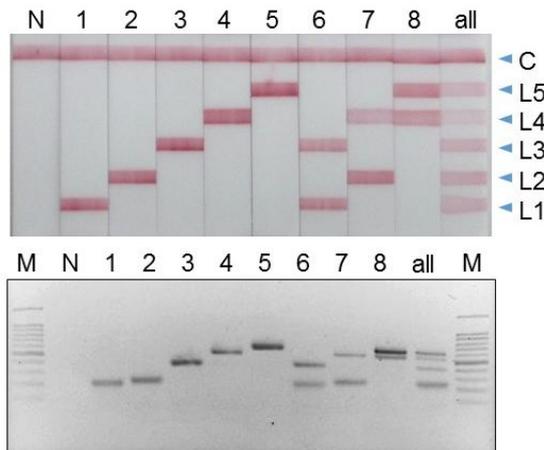


図 4 . 核酸クロマトチップによる *Alexandrium* 属 5 種の検出 N, ネガコン; L1, *A. catenella*; L2, *A. fraterculus*; L3, *A. tamiyavanichii*; L4, *A. affine*; L5, *A. tamarensis*; L6, *A. catenella* + *A. tamiyavanichii*; L7, *A. fraterculus* + *A. affine*; L8, *A. affine* + *A. tamarensis*; All, all species; C, control

表 2 . 環境 DNA から *Alexandrium* 属の検出 八代海定点 (16 サンプル)

sampling date	method	target species				
		Aaff	Acat	Afra	Atama	Atami
5-Jun	KDCC	○	○			
	Multiplex	○	○			
	MPS	○	○			
11-Jun	KDCC	○	○			
	Multiplex	○	○			
	MPS	○	○			
19-Jun	KDCC	○		○		
	Multiplex	○		○		
	MPS	○		○		
25-Jun	KDCC	○		○		
	Multiplex	○		○		○
	MPS	○		○		○
3-Jul	KDCC	○		○		○
	Multiplex	○		○		○
	MPS	○		○		○
9-Jul	KDCC	○		○		○
	Multiplex	○		○		○
	MPS	○		○		○
17-Jul	KDCC			○	○	
	Multiplex			○	○	
	MPS			○	○	
23-Jul	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
31-Jul	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
7-Aug	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
14-Aug	KDCC			○		
	Multiplex	○		○		
	MPS	○		○		
20-Aug	KDCC	○		○		
	Multiplex	○		○		
	MPS	○		○		
28-Aug	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
3-Sep	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
11-Sep	KDCC			○		○
	Multiplex			○		○
	MPS			○		○
25-Sep	KDCC			○		○
	Multiplex			○		○
	MPS			○		○

鹿児島湾定点 (10 サンプル)

sampling date	method	target species				
		Aaff	Acat	Afra	Atama	Atami
5-Jun	KDCC			○		
	Multiplex		○			
	MPS	○				
19-Jun	KDCC	○				
	Multiplex	○				
	MPS	○				
26-Jun	KDCC	○		○		
	Multiplex	○		○		
	MPS	○		○		
3-Jul	KDCC			○		○
	Multiplex			○		○
	MPS	○		○		○
17-Jul	KDCC			○		
	Multiplex			○		
	MPS			○		
31-Jul	KDCC					
	Multiplex					
	MPS					
14-Aug	KDCC			○		○
	Multiplex			○		○
	MPS					○
28-Aug	KDCC					○
	Multiplex					○
	MPS					○
11-Sep	KDCC			○		○
	Multiplex			○		○
	MPS			○		○
25-Sep	KDCC					
	Multiplex					
	MPS					

method	target species				
	Aaff	Acat	Afra	Atama	Atami
All 26 samples	9	2	19	1	6
KDCC	9	2	19	1	6
Multiplex	8	3	17	1	8
MPS	12	1	18	0	6

をヌクレポアフィルタ - でおろす) を用いて、5 種の *Alexandrium* 属について、3 種の分子同定法、KDCC (カネカ核酸クロマトチップ)、Multiplex (Multiplex-PCR 法)、MPS (次世代シーケンスによるメタゲノム解析) で検出感度の比較を行った。その結果、*A. affine* で 8 - 12、*A. catenella* で 1 - 3、*A. fraterculus* で 17 - 19、*A. tamarensis* で 0 - 1、*A. tamiyavanichii* で 6 - 8 個の検体で検出されたが、検出感度に有意差は見られなかった。核酸クロマトチップの場合、種によって異なるが、0.1 - 10 pg、5 - 500 コピ - の範囲で検出可能、*Alexandrium* 属の標的遺伝子 (リボソーム RNA gene) の細胞あたりのコピ - 数は 10,000 - 20,000 個であり、1 - 5 細胞/L なら、十分検出は可能であると判断された (表 2)。以上から、核酸クロマトチップによる高精度の種判別マ - カ - の開発に成功した。

第 2 個目の核酸クロマトチップとして、有害赤潮藻 6 種 (*Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama*, *Karenia mikimotoi*) を標的としたチップの開発も行った (図 5, 6)。*Chattonella* 属 3 種は、遺伝的にかなり近縁であり、同じ配列を有しており、現時点で区別はつかないが、形態では識別可能である。検出可能は最小鋳型量は、*Karenia mikimotoi* で 100 fg、*Cochlodinium polykrikoides* と *Heterocapsa circularisquama* で 1 pg、

Chattonella spp. で 10 pg であった。*Chattonella* 以外の種では、十分な検出感度を示した。このため、単独種毎の検出では問題なく、十分な発色が確認されたが、複数種の DNA を混合した状態では、*Chattonella* のバンドが検出されないサンプルが複数見られた(図 6)。この検出感度の悪さを改良するため、タグ配列の改良、プライマーの選別、nested PCR の導入等の工夫を試みたが、現時点で、十分な感度が得られていない状況にある。

以上、*Alexandrium* 属用チップに関しては、既にカネカ(株)より試験販売が行われており、複数の都道府県の水産試験場のモニタリング担当者により使用されている。

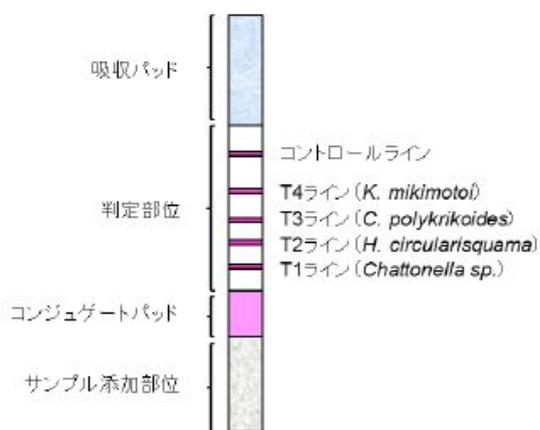


図 5 . 核酸クロマトチップ(有害赤潮検出用)

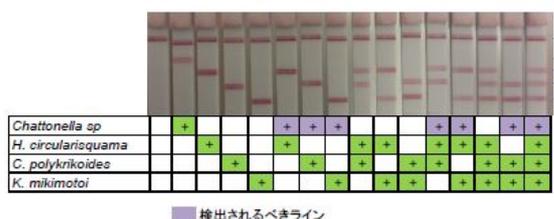


図 6 . 核酸クロマトチップによる有害赤潮種 6 種の検出

一方、PCR の高速化による検出時間の短縮についても検討した。GENECHECKER UF-100 (Genesystem) と専用のポリマー製三次元チップを用いて PCR 増幅すると、30 分程度で増幅が完了し、結果を確認することが出来た。また、高速増幅用 DNA Polymerase (カネカ(株)) や AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用すると、1 時間以内に PCR 増幅を終了することが可能であった。しかし、*Alexandrium* 属の核酸クロマトチップの場合、PCR 増幅の時間を短縮すると、4 種類以上の DNA が混在している場合に反応が不安定になり、上手く検出できないサンプルも見られ、今後、さらなる条件検討が必要である。

引用文献

- 1) Kamikawa R, Hosoi-Tanabe S, Nagai S, Itakura S, Sako Y. Fisheries Science, 71: 985-989 (2005),
- 2) Kamikawa R, Nagai S, Hosoi-Tanabe S, Itakura S, Yamaguchi M, Uchida Y, Baba T, Sako Y. Harmful Algae, 6: 413-420 (2007),
- 3) Hosoi-Tanabe S, Sako Y. Fisheries Science, 72: 77-82 (2006),
- 4) 平成 22 年度水産庁委託 平成 22 年度地球温暖化対策推進委託事業報告書・水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所・三菱レイヨン株式会社 ,p23 (2011),
- 5) Nagai S, Yamamoto K, Hata N, Itakura S. Marine Genomics, 7: 51-56 (2012),
- 6) Nagai S, Itakura S. Marine Genomics, 7: 43-49 (2012),
- 7) Nagai S. DNA Testing 5: 33-46 (2013),
- 8) 長井 敏ほか . DNA 多型, Vol. 18: 122-126 (2010),
- 9) 株式会社カネカ . 増幅核酸検出方法および検出デバイス .PCT/JP2011/077050 (2012),
- 10) Nagai S. Journal of Phycology, 47: 703-708 (2011).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- Nagai S, Miyamoto S, Ino K, Tajimi S, Nishi H, Tomono J. Easy detection of multiple *Alexandrium* species using DNA chromatography chip. Harmful Algae 51: 97-106 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 長井 敏・宮本信彦 . 核酸クロマトチップによる有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属 5 種の同時検出 . 第 9 回日本 DNA 鑑定学会, 平成 28 年 11 月 10 日, 発明会館 (東京都千代田区)
- 2) Nagai S, Urushizaki S, Chen H, Fujiwara A, Yasuie M, Katakura S. Metagenomic approach for HAB monitoring in Japanese coastal waters. The 17th International conference on Harmful Algae, as an invited speaker in Brazil. October 31, 2016. Florianopolis, Santa Catarina, Brazil.
- 3) Nagai S, Miyamoto S, Takahashi H, Tomono J. Easy detection of multiple *Alexandrium* species using DNA chromatography chip. The 16th International Conference on Harmful Algae. October 29, 2014. Wellington, New Zealand.

〔図書〕(計 1 件)

- 長井 敏・宮本慎吾 . 養殖技術講座 - 貝毒検査 - 有毒渦鞭毛藻 5 種を簡単・正確・安価に検出する遺伝子解析技術の開発 . 月刊「養殖ビジネス」2015 年 3 月号 .

〔その他〕

ホームページ <http://nrifs.fra.affrc.go.jp/>

ワークショップ等での招待講演 (計 6 件)

- 1) Nagai S, Urushizaki S, Katakura S. Application of metagenome analysis to time series monitoring of plankton in the Okhotsk Sea.

- Scientific and Technological Development and Monitoring of Marine Biological Resources in Russia, as an invited speaker (2017). May 22, 2017. Vladivostok, Russia.
- 2) Nagai S. Factors influencing the distribution and the genetic structures of *Alexandrium* and *Cochlodinium* species Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology Conference as an invited speaker (2017). May 16, 2017. Daejeon, Korea.
 - 3) Nagai S. Recent development in molecular diagnostic techniques for HAB detection. A Molecular workshop in National University of Singapore as an invited speaker. November 24, 2016, Singapore.
 - 4) Nagai S., Urushizaki S, Hungyen C, Fujiwara A, Yasuike M, Katakura S. Weekly monitoring of eukaryote biodiversity using massively parallel sequencing (MPS)-based technology in Okhotsk Sea, Japan. The Front Line in Fisheries Science: Biosciences and Environmental Science in Fisheries as an invited speaker. November 11, 2016. Shinagawa, Tokyo, Japan
 - 5) Nagai S., Urushizaki S, Hungyen C, Fujiwara A, Yasuike M, Katakura S. Weekly monitoring of eukaryote biodiversity using massively parallel sequencing (MPS)-based technology in Okhotsk Sea, Japan. Kitasato-KAUST Joint International Workshop, Marine metagenomics: Comparative study among different marine resources as an invited speaker in Japan (2016). August 25, 2016. Ofunato, Iwate Pref, Japan.
 - 6) Nagai S. Application of metagenome technology to evaluate biodiversity among different marine ecosystems and materials. CBRC seminar in King Abdullah University of Science and Technology as an invited speaker. September 3, 2015. Jeddah, Saudi Arabia.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長井 敏 (NAGAI, Satoshi)
国立研究開発法人 水産研究・教育機構
中央水産研究所 水産生命情報研究センタ
- 環境ゲノムグループ・グループ長
研究者番号：80371962

(2)研究協力者

宮本信彦 (MIYAMOTO, Nobuhiko)
株式会社カネカ 研究部探索グループ
研究主任