

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660155

研究課題名(和文) 赤潮個体群の短期挙動予測のための「赤潮診断キット」の開発

研究課題名(英文) Development of easy red-tide diagnostic kit using NASBA and nucleic-acid chromatography.

研究代表者

外丸 裕司 (Tomaru, Yuji)

国立研究開発法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：10416042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻赤潮構成種の一つである *Chaetoceros tenuissimus* がリン酸塩制限下で特異的に発現誘導する遺伝子(アルカリフォスファターゼ)を標的として、NASBA法用のプライマーならびに核酸クロマトグラフによる目視判定用プローブの作製を行った。実験の結果、リン酸塩欠乏時特異的に目視可能な強いシグナルが検出された。また、ノリの窒素・リン代謝系ならびに、ハウスキーピング遺伝子候補を同定した。さらに有害鞭毛藻の遺伝子の情報収集を行った。今後、NASBA法と核酸クロマトグラフを併用した遺伝子発現の目視判定技術の高度化により、赤潮・ノリ色落ち簡易診断手法開発に繋がるものと推察される。

研究成果の概要(英文)：We designed NASBA primers and nucleic acid-chromatography probes for detecting alkaline phosphatase (AP) gene and actin gene as house-keeping of the bloom-forming diatom *Chaetoceros tenuissimus*. The results showed that the intense signal of the AP gene expressions were successfully detected by the nucleic acid-chromatography, when the diatoms were under phosphate limited conditions. This device would be useful to detect gene expression of phytoplanktons. We also identified nitrogen, phosphorus metabolism related and house-keeping genes of the seaweed *Nori*. Furthermore, data for RNA sequences of the fish killing dinoflagellate *Karenia mikimotoi* were accumulated. These knowledge may contribute to develop an easy diagnostic method for gene expressions of marine algae.

研究分野：海洋微細藻類生態学

キーワード：珪藻 ノリ 赤潮 NASBA法 核酸クロマトグラフ 発現解析

1. 研究開始当初の背景

沿岸海洋で育まれる天然・養殖魚介類は、本邦の食糧タンパク源として重要な位置を占めている。しかしながら毎年のように大規模な「赤潮」が発生し、水産業に甚大な被害を与え続けている。こうした有害赤潮による漁業被害を最小限に抑えるための対策として、赤潮の発生予察、ならびに赤潮原因生物のモニタリングによる早期警戒情報の発信などが行われている。その一方で、大規模化した赤潮の短期動態を予測する手法は乏しいのが現状である。現在、そのプレイクスルーとして、「赤潮の生理状態を直接的に検出する手法」の構築が求められている。

報告者はこれまでに、赤潮診断技術開発のための基礎的研究を実施してきた。その結果、珪藻をモデルとして、リン・窒素欠乏、死滅期、ウイルス感染時等においてそれぞれ特異的に発現する遺伝子に関する情報を蓄積することに成功した。さらに有害赤潮種を対象として、同様な遺伝情報の蓄積を実施してきた。このように赤潮の生理状態を理解するための遺伝情報は、報告者の下で着実に明らかになりつつある。さらに次のステップでは、このような基盤情報を赤潮の生理診断に結びつけるための、「簡便」で「迅速」な検出手法の構築が求められる。それを実現するための手法として、報告者は、標的発現遺伝子(mRNA)を特異的に増幅させる NASBA 法と、その増幅産物を視覚的に検出する核酸クロマトグラフィー法(以降、核酸クロマト法)に注目し、本研究の着想に到った。

2. 研究の目的

どれほど有能な海洋研究者であっても、眼前に広がる赤潮がどれだけの期間継続するかを予測することは難しい。今から赤潮プランクトンが殖えるのか、それとも減るのか - こうした短期動態予測の実現には「赤潮の生理状態」をリアルタイムで評価する技術が必要である。報告者らはこれまでに、赤潮原因藻類の生理状態の指標となる遺伝子(栄養塩欠乏等のストレスに応答して発現する遺伝子群)に関する情報を蓄積してきた。本課題では、NASBA 法ならびに核酸クロマト法を応用し、遺伝子発現状態に基づき赤潮原因プランクトンの生理状態を迅速かつ簡便に把握するための「赤潮診断キット」の開発を目指す。これにより、特殊な実験装置を用いることなく短時間で赤潮の生理状態診断を行うことが可能となり、診断結果に基づき赤潮個体群の高精度な挙動予測を行うことができるようになるものと期待される。さらに、本研究では珪藻赤潮により被害を受ける側である、水産学的に重要なノリの生理状態を含めた NASBA 法ならびに核酸クロマトグラフを用いた簡易検出系の構築基盤の形成を試みた。また、有害赤潮原因種である *Karenia mikimotoi* の遺伝子情報基盤形成を目的としたトランスクリプトーム解析を実施した。

3. 研究の方法

NASBA 法は、2 種類のプライマー、3 種類の酵素を用いることで、標的とする配列を 15 分以内に 1 億~1000 億倍に増幅させる等温核酸増幅技術(一本鎖 RNA の増幅手法)であり、RNA の検出に有効とされている。一方、核酸クロマト法では、標的 RNA 配列特異的オリゴ DNA を固定した展開メンブレンを用いる。NASBA 法で増幅された一本鎖 RNA 産物は、まずラテックス標識された標的配列特異的なオリゴ DNA の修飾を受ける。さらに展開が進むと、ラテックス標識済みの標的 RNA 配列はメンブレン上に固定されたオリゴ DNA に補足され、標的配列特異的サンドイッチハイブリダイゼーションが成立する。これにより、サンプル中の標的 RNA 配列存在の有無を測定者は目視で確認できる(図 1)。

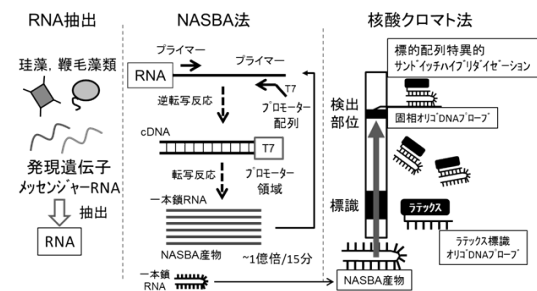


図 1. 核酸クロマトグラフによる遺伝子発現検出の概要

本課題ではモデル藻類として、珪藻赤潮構成種の一つである *Chaetoceros tenuissimus* を用いた。リン欠乏ならびにハウスキーピング遺伝子(アクチン等)に対し、他藻類のデータベースと比較しながら、種特異性が確認される塩基配列領域に NASBA 法用プライマーならびに核酸クロマト用プローブの設計を行った。選定した標的遺伝子ならびにハウスキーピング遺伝子を NASBA 法で増幅し、さらに電気泳動的にバンドの濃淡を確認して、応用の可否を検討した。珪藻細胞からの RNA 抽出は、キアゲン社製のキットを使用した。さらに、NASBA 反応条件の最適化、ターゲット領域の増幅確認目視判定のための核酸クロマトグラフの最適化を実施した。

また、ノリの生理状態把握のための基盤情報の構築を目指し、栄養塩代謝過程で重要となる、窒素とリンの取り込みから初期代謝過程についての遺伝子を探索した。

4. 研究成果

珪藻のリン欠乏時発現遺伝子の核酸クロマトグラフによる目視検出

珪藻がリン酸塩制限下で特異的に発現誘導する遺伝子(アルカリフォスファターゼ: AP)を標的として、NASBA 法用のプライマーならびに核酸クロマトグラフによる検出用プローブの作製を行った。そして AP 遺伝子検出のための最適条件の検討を行った。

実験の結果、アクチン遺伝子をハウスキー

ピング遺伝子とした場合、対数増殖～リン酸欠乏による定常期の珪藻いずれからも核酸クロマトグラフによりその存在が確認された。一方、AP 遺伝子に関しては、対数増殖期にはそのシグナルは検出されなかったものの、定常期には核酸クロマトグラフによる強いシグナルが検出された。定量 PCR 法においてもリン酸欠乏による定常期に AP 遺伝子が強く発現するという結果が得られた（図 2）。この事からは、NASBA 法と核酸クロマトグラフを併用した植物プランクトンの簡易生理診断が可能である事を示唆している。今後のさらなる改良により、本検出手法の高度化が期待される。

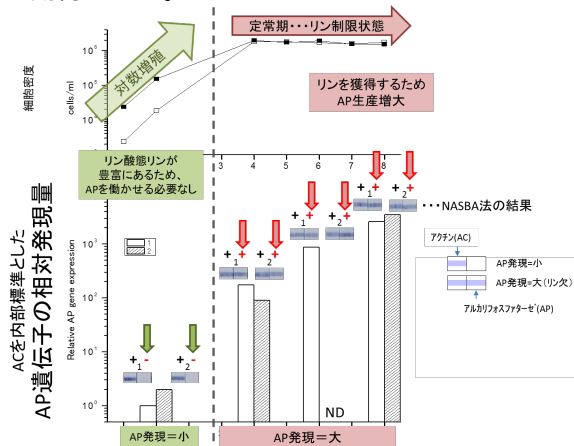


図 2 . 珪藻リン欠乏時の核酸クロマトグラフ（矢印）と、併行したリアルタイム PCR の結果 . グラフ（上）は珪藻細胞数の経日変化 . （下）は AP 遺伝子の相対発現量 .

ノリ生理状態把握のための基盤情報構築
ノリが赤潮の影響を受けている場合、ノリの栄養塩代謝過程の遺伝子発現パターンに変化が生じると考えられる。そこで本研究では、栄養塩代謝過程で重要となる、窒素とリンの取り込みから初期代謝過程についての遺伝子を探索した。ノリについては既にゲノム情報が公開されている為、この情報を利用し、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) の遺伝子代謝マップから、これらの遺伝子を推定した。結果的に、窒素代謝系の遺伝子 5 つ、リン代謝系の遺伝子 6 つ、ハウスキーピング遺伝子候補 6 つを同定することに成功した（図 3）。

これらの候補遺伝子から、まず 7 つの遺伝子に絞って、定量 PCR 用のプライマーを作成した。研究期間中には、これらのプライマーを用いた定量 PCR の予備実験を実施した。作成したプライマーでノリの当該遺伝子を検出できるまでには至っていないが、ノリからの核酸抽出法の検討や、PCR 条件の検討をする事で、当該遺伝子の発現量を比較できる状況に整備する基盤は構築できた。今後、ノリでの栄養塩代謝関連遺伝子の発現量解析が可能となれば、これらの遺伝子を用いた NASBA 法の開発に応用し、赤潮診断とともにノリの色落ち診断手法開発につなげたいと

考えている。

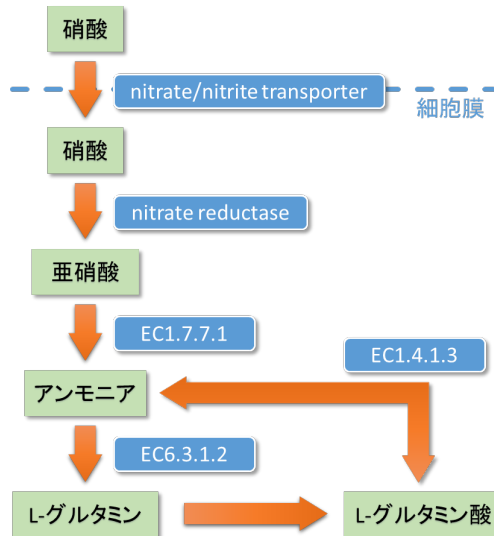


図 3 . 予想されるノリの窒素代謝経路と関連する遺伝子。

K. mikimotoi の塩基配列解析

K. mikimotoi の塩基配列解析により、多数の遺伝子が推定された。特に栄養代謝関連のみならず、毒関連の遺伝子も推定されたことから、今後の簡易生理診断技術の構築に有用な情報になると期待された。

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）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kimura K, Okuda S, Nakayama K, Shikata T, Takahashi F, Yamaguchi H, Skamoto S, Yamaguchi M, Tomaru Y, RNA sequencing revealed numerous polyketide synthase genes in the harmful dinoflagellate *Karenia mikimotoi*, PlosOne, 査読有, 10, 2015, e0142731, 10.1371/journal.pone.0142731

〔学会発表〕(計 1 件)

外丸裕司・山口晴生・木村圭・滝野ちあき・宇治家武史、NASBA 法と核酸クロマトグラフを用いた赤潮原因珪藻の簡易生理状態判定キットの開発～リン酸塩欠乏状態の場合～、日本水産学会、2016 年 03 月 29 日、東京海洋大学（品川キャンパス）

〔図書〕(計 1 件)

外丸裕司・白石智考、恒星社厚生閣、有害有毒プランクトンの科学、2016、352

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

珪藻ウイルスの生態学的研究

http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Viruses/members_tomaru.html

6．研究組織

(1)研究代表者

外丸 裕司 (TOMARU, Yuji)

国立研究開発法人水産研究・教育機構

瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：10416042

(2)研究分担者

木村 圭 (KIMURA, Kei)

佐賀大学・低平地沿岸海域研究センター・

講師

研究者番号：30612676