

農林水産基礎研究

「病害微生物モニタリングのための基礎研究」

—LAMP 法による *Alexandrium pacificum* の検出—

堅田昌英

目 的

渦鞭毛藻類である *Alexandrium catenella* 及び *A. tamarense* は、麻痺性貝毒を産生し、二枚貝の他、二枚貝を捕食するカニ類を毒化させる¹⁾。

A. catenella 及び *A. tamarense* グループの分類については、従来から形態形質に基づく種と分子系統解析に基づく種との間に不一致があり、我が国でも調査現場での対応に混乱・苦慮してきた経緯がある²⁾。最近の研究で、*A. catenella* 及び *A. tamarense* グループの種について、遺伝子情報が再整理された結果、*A. australiense* (新種記載)、*A. fundyense* (再定義)、*A. mediterraneum* (新種記載)、*A. pacificum* (新種記載) 及び *A. tamarense* (再定義) の5つの分岐群にまとめられた³⁾。John *et al.* (2014b) は、*A. catenella* の種名を廃棄して *A. fundyense* とすることを提案したが、*A. catenella* の名前に先取権があることから、Wilson (2017) によりこの提案は退けられ、*A. fundyense* は *A. catenella* とされた。以上の経緯により、*A. catenella* 及び *A. tamarense* グループの種は、*A. catenella* (Group I)、*A. mediterraneum* (Group II)、*A. tamarense* (Group III)、*A. pacificum* (Group IV) 及び *A. australiense* (Group V) の5つの分岐群にまとめられることになった^{4,5)}。

しかし、顕微鏡下で上記のアレキサンドリウム属プランクトンを形態に基づいて識別することは困難であるとされており⁶⁾、現場ではその対応に苦慮することが予想される²⁾。

これまでも形態学的に極めて類似する *A. catenella* と *A. tamarense* のシストの識別には、分子系統解析的手法が用いられてきたことから^{7,8,9)}、今後のアレキサンドリウム属プランクトンの同定には遺伝子情報が必須になる²⁾。

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は、PCR 法と同じく、特異的な DNA 領域を増幅する高感度な手法であるが、PCR 法よりも増幅効率が高く、短時間で増幅可能であることから¹⁰⁾、貝毒原因プランクトンのモニタリングに応用可能である。これまでも、LAMP 法による従来の *A. catenella* や *A. tamarense* の特異的な検出系が開発されてきた¹¹⁾。

そこで、本研究では、Prud'homme van Reine (2017) 及び Wilson (2017) によって5つの分岐群にまとめられたアレキサンドリウム属プランクトンについて、迅速で簡便かつ高感度な検出系を確立することを目的に、LAMP 法による検出系の反応条件等について検討を行った。

方 法

1. 供試サンプル

和歌山県内の沿岸海域から採水された海水サンプル 1 liter を 100 倍濃縮し、1 ml ずつ 1.5 ml マイクロテストチューブ (エッペンドルフ株式会社製) へ分注した。15,000rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、各マイクロテストチューブの海水サンプルが 50 μ l 程度になるまで上清を除去した。それらを 1 本のマイクロテストチューブへ集約し、更に 15,000rpm で 5 分間の遠心分離を行い、海水サンプルが 50 μ l 程度になるまで上清を除去した。DNA 抽出を容易にするために、一度、凍結・解凍の処理をした後、Nagai *et al.* (2012) の方法に従って DNA 抽出を行い、LAMP 法に供した。なお、陰性コントロールとしては、砂濾過海水を孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (メルク株式会社製) で濾過したサンプルを用いた。陰性コントロールのサンプルについても、上記と同様に凍結・

解凍の処理を施した後、同じく Nagai *et al.* (2012)の方法に従って DNA 抽出を行い、LAMP 法に供した。

2. LAMP 法プライマーの設計

LAMP 法のプライマーは、リボゾーマル DNA (rDNA)の internal transcribed spacer 1 (ITS1)-5.8S-ITS2 領域 (*A. australiense*: GenBank アクセションナンバーKF908817, *A. catenella*: GenBank アクセションナンバーKF908818, *A. mediterraneum*: GenBank アクセションナンバーKF908816, *A. pacificum*: GenBank アクセションナンバーKF908812, *A. tamarense*: GenBank アクセションナンバーKF908813) を標的配列として設計した。なお、同領域の塩基配列について、ClustalW Version 2.1™ (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>) を用いてアライメント解析を行い、各プランクトンについて特異的な変異箇所を特定した。LAMP 法による増幅反応を円滑に行うために、LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer V5™ (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) を用いて、アライメント解析によって特定した変異箇所を指定した上で、特異的プライマー設計モードにより、各プランクトンにつき 4 種類ずつのプライマーを設計した (表 1)。

表 1 アレキサンドリウム属プランクトン検出のための LAMP 法プライマー塩基配列

プランクトン	プライマー名	塩基配列
<i>A. australiense</i>	AA-F3	GCAAAATGCATTATGCATTGT
	AA-B3	AGTTTGCCCAAATAAACCAT
	AA-FIP	ATATGCATTGAATCAAGCACACCTTCCGTGAGCTAACAGATGT
	AA-BIP	ATGCTGATTAGCATTGCTGTGAAGAAAGTGTATGACACCCAG
<i>A. catenella</i>	AC-F3	AATTGCAGAATTCCGTGAG
	AC-B3	ACCAGCACATGACGAAAC
	AC-FIP	CAGCAGTATTGCATATGGAAGGTAACCTTGTGCCTTTGGGATA
	AC-BIP	ACAAAGAGAGTCAATGTGTATTGCACCAATCAACCATGTTTAGGT
<i>A. mediterraneum</i>	AM-F3	CTTGTTTTACAAGCATGTGTG
	AM-B3	TTCAAGAATATCCCAAAGGTAC
	AM-FIP	TGAGCTAAGACATTCTTTCGAAAACCTGGTTGGTAAACTGTGTGA
	AM-BIP	TGAAGAATGCAGCAAAATGCATTAACATCTGTTGGCTCACG
<i>A. pacificum</i>	AP-F3	CAAGCATGTGTGCTGTAG
	AP-B3	TCAAGAATGTCCCAAAGGT
	AP-FIP	CCTTGCAAAACATAAGTGTTCATGTGATGTGTTGTGTAACCTG
	AP-BIP	TGATGAAGAATGCAGCCACATCATCTGTTAGCTCACGGAAT
<i>A. tamarense</i>	AT-F3	AATTGCAGAATTCCGTGAG
	AT-B3	TCAACCAGCAAATGACGAA
	AT-FIP	CAGCATTATTGCATATGGAAGACAGTGTGTTGAATGTTACTTGTACCTT
	AT-BIP	GTAGGGGTCAATGTGTGTGCCCAAGAAAACATGTTTAGGT

3. LAMP 法の実施

Loopamp® DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社製) に添付されている説明書に従って、2×Reaction Mix (RM), 今回設計したプライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素 (*Bst* DNA ポリメラーゼ), Loopamp® 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社製) 及びキット添付の蒸留水を混合し、マスターミックスを作製した。0.2 ml の Loopamp® 反応チューブ (栄研化学株式会社製) を用いて、23 μ l のマスターミックスと抽出 DNA 溶液 2 μ l を入れ、1 サンプルあたりの最終液量を 25 μ l とした。LAMP 反応は、ブロックインキュベーター BI-516H (株式会社アステック製) で行い、所定時間経過後、ウォーターバス BM400 (ヤマト科学株式会社製) で 95°C・2 分間のインキュベーションをすることで酵素を失活させ、反応を停止させた。反応終了後、ハンディー紫外線ランプ LUV-6 (アズワン

株式会社製)を用いて、反応チューブ底面より紫外線(波長 365 nm)を照射し、反応チューブ側面より目視で観察して、蛍光の有無を確認した。緑色の蛍光を発すれば陽性、陰性コントロールと同様に蛍光を発しなければ陰性と判定した。

4. 反応条件等の検討

LAMP 法の最適な反応条件を把握するため、反応温度は 56°C から 68°C まで 2°C ずつ変えて検証した。また、反応時間は 10 分間から 60 分間まで 10 分間ずつ変えて検討した。

LAMP 法の最適な反応温度及び反応時間を把握した後、同一の抽出 DNA 溶液を 10^{-4} まで 10 倍段階希釈して LAMP 法に供し、検出感度の検証を行った。

結果及び考察

1. LAMP 法の反応温度及び反応時間

LAMP 法の反応温度の検討結果を表 2 に示す。供試サンプルには、採水時の水温が 14.4°C、15.0°C 及び 21.5°C のサンプルを用いた。最適な反応温度を検討するために、反応時間を 60 分間に固定して検証した結果、採水時の水温が 14.4°C 及び 15.0°C のサンプルでは、*A. pacificum* を検出対象とする反応系でのみ 56~64°C の反応温度において陽性反応が認められた。また、採水時の水温が 21.5°C のサンプルでは、同じく *A. pacificum* を検出対象とする反応系でのみ 60~64°C の反応温度において陽性反応が見られた。供試した 3 種類の採水時水温のサンプルのいずれにおいても、60~64°C の反応温度で陽性であったことから、中間域に相当する 62°C が反応温度として最適であると考えられた。

LAMP 法の反応時間の検討結果を表 3 に示す。上述のとおり、供試した採水サンプルでは *A. pacificum* を検出対象とする反応系でしか陽性反応が認められなかったことから、反応時間の検討は *A. pacificum* 検出系で行った。最適な反応時間を検討するために、上述の結果を受けて反応温度を 62°C に固定して実験したところ、50~60 分間の反応で陽性を示した。50 分間の反応でも陽性であったが、反応時間が短くなると陰性になり、50 分間は陽性の下限時間であることから、より正確を期すために、60 分間の反応時間が最適であると考えられた。

以上の結果から、*A. pacificum* は 62°C で 60 分間の反応を行えば LAMP 法で確実に検出できることが示された。

表 2 LAMP 法の反応温度の検討（反応時間：60 分間）

・ 供試サンプル採水時水温：14.4℃

プライマー検出対象 プランクトン	反応温度						
	56℃	58℃	60℃	62℃	64℃	66℃	68℃
<i>A. australiense</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. catenella</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. mediterraneum</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. pacificum</i>	+	+	+	+	+	—	—
<i>A. tamarense</i>	—	—	—	—	—	—	—

・ 供試サンプル採水時水温：15.0℃

プライマー検出対象 プランクトン	反応温度						
	56℃	58℃	60℃	62℃	64℃	66℃	68℃
<i>A. australiense</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. catenella</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. mediterraneum</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. pacificum</i>	+	+	+	+	+	—	—
<i>A. tamarense</i>	—	—	—	—	—	—	—

・ 供試サンプル採水時水温：21.5℃

プライマー検出対象 プランクトン	反応温度						
	56℃	58℃	60℃	62℃	64℃	66℃	68℃
<i>A. australiense</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. catenella</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. mediterraneum</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. pacificum</i>	—	—	+	+	+	—	—
<i>A. tamarense</i>	—	—	—	—	—	—	—

表 3 LAMP 法の反応時間の検討（反応温度：62℃）

反応時間	<i>A. pacificum</i> 検出系
10 分	—
20 分	—
30 分	—
40 分	—
50 分	+
60 分	+

2. LAMP 法の検出感度検証

LAMP 法の検出感度の検証結果を表 4 に示す。上述した結果を受けて、LAMP 法の反応条件は、*A. pacificum* 検出系で 62℃・60 分間とした。LAMP 法に供試したサンプルの細胞数は 827cells/liter であり、 10^{-3} の希釈倍率まで陽性反応が見られたことから、*A. pacificum* 検出系の LAMP 法は、理論上 0.827cells/liter まで検出することができると考えられた。

表4 LAMP法(62℃・60分間)の検出感度

希釈倍率	<i>A. pacificum</i> 検出系 (供試サンプル細胞数* : 827cells/liter)
10 ⁰	+
10 ⁻¹	+
10 ⁻²	+
10 ⁻³	+
10 ⁻⁴	-

*100倍濃縮した海水サンプル1mlを検鏡し、1liter当たりの細胞数に換算した。

3. LAMP法によるアレキサンドリウム属プランクトンの分類

本研究では、採水時の水温が14.4℃、15.0℃及び21.5℃のサンプルを用いた。その結果、*A. pacificum*の検出系のみで、前2者のサンプルでは反応温度が56~64℃において、後1者のサンプルでは反応温度が60~64℃において、それぞれ陽性反応を示した。前2者と後1者のサンプルにおいて、陽性反応が見られた温度帯に違いが認められたのは、DNA抽出効率の差、あるいは遺伝子増幅効率の差に由来している可能性がある。日本沿岸域において、従来の*A. tamarensis*は2~20℃の低水温期^{2,9)}、従来の*A. catenella*は15℃を上回る高水温期^{2,13)}に出現が認められるとされてきた。これらの水温帯による区分では、本研究で供試したサンプルは、3者ともに従来の*A. tamarensis*か従来の*A. catenella*のいずれに相当するのかを決めかねる。しかし、rDNAのITS1-5.8S-ITS2領域の塩基配列に着目した本研究によって、Prud'homme van Reine (2017) 及びWilson (2017) が示した5つの分岐群の中では、本研究で供試したサンプルは3者ともに*A. pacificum*(従来の*A. catenella*に相当)に分類されることが示された。

4. LAMP法による定量化

有害プランクトンのモニタリングには定量解析が必要不可欠である。魚病分野では、伝染性皮下造血器壊死症ウイルス(IHHNV)のLAMP法による検出系において、リアルタイム濁度測定装置を用いてLAMP反応をモニタリングすることによって、定量解析が可能であることが報告されている¹⁴⁾。本研究で確立したLAMP法は定性的なものであるが、今後は定量的に有害プランクトンを検出できるLAMP法の検出系を確立していくことが課題である。

謝 辞

サンプリングにご協力いただきました貝類養殖業者及び和歌山県沿海各振興局の水産業普及指導員の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 三重県水産研究所(2012) 三重県沿岸海域 プランクトン図鑑, 36-37.
- 2) 今井一郎・山口峰生・松岡数充(2016) 有害有毒プランクトンの科学, 恒星社厚生閣, 東京, 2-16, 48-57.
- 3) John, U., W. Litaker, M. Montresor, S. Murray, M. L. Brosnahan and D. M. Anderson (2014a) Formal revision of the *Alexandrium tamarensis* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist.* **165**:779-804.
- 4) Prud'homme van Reine, W.F. (2017) Report of the Nomenclature Committee for Algae:15. *TAXON* **66**:191-192.
- 5) Wilson, K.L. (Secretary) (2017) Report of the General Committee:18. *TAXON* **66**:742-744.
- 6) John, U., W. Litaker, M. Montresor, S. Murray, M. L. Brosnahan and D. M. Anderson (2014b) Proposal

to reject the name *Gonyaulax catenella* (*Alexandrium catenella*) (Dinophyceae). *Taxon*. **63**:932-933.

- 7) Nagai, S., C. L. Lian, M. Hamaguchi, Y. Matsuyama, S. Itakura and T. Hogetsu (2004) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes*. **4**:83-85.
- 8) Nagai, S., M. Sekino, M. Matsuyama and S. Itakura (2006) Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Mol. Ecol. Notes*. **6**:120-122.
- 9) Nagai, S., C. L. Lian, S. Yamaguchi, M. Hamaguchi, Y. Matsuyama, S. Itakura, H. Shimada, S. Kaga, H. Yamauchi, Y. Sonda, T. Nishikawa, C. H. Kim and T. Hogetsu (2007) Microsatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Japanese coastal waters. *J. Phycol.* **43**:43-54.
- 10) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63.
- 11) Nagai and Itakura (2012) Sensitive and specific detection of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* from single vegetative cells by a loop-mediated isothermal amplification method. *Mar. Genomics*. **7**:43-49.
- 12) Nagai, S., K. Yamamoto, N. Hata and S. Itakura (2012) Study of DNA extraction methods for use in loop-mediated isothermal amplification detection of single resting cysts in the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*. *Mar. Genomics*. **7**:51-56.
- 13) Yoshimatsu, Y. and C. Ono (1986) The seasonal appearance of red tide organisms and flagellates in the southern Harima-Nada, Inland Sea of Seto. *Bull. Akashiwo Res. Inst. Kagawa Pref.* **2**:1-42.
- 14) Sudhakaran, R., T. Mekata, T. Kono, K. Supamattaya, N. T. H. Linh, M. Sakai and T. Itami (2008) Rapid detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Fish Pathol.*, **43**, 170-173.