

あかぐされ病菌遊走子の定量検出技術の開発

瀧上 哲
(有明海研究所)

あかぐされ病はノリ生産に多大な被害を与える病害である。感染力の源である遊走子については、これまで、蛍光抗体法やPCR法で検出が試みられたが、実用化には至っていない。そこで、新しい手法である定量PCR法を用いて遊走子の定量検出を試みた。プライマー及びプローブは、あかぐされ菌の既知の塩基配列情報を用いて、18 SrDNAのITS領域を標的領域として開発した。試料は、実験室内で培養して得た遊走子を海水に加え、フィルターに捕集してDNAを抽出した。これらを用いて定量PCRを行ったところ、目視計数値と概ねオーダーレベルで一致する結果が得られ、遊走子数 $10^0 \sim 10^1$ 個の試料からも検出可能であった。また、所要時間は従来法に比べて大幅に短縮可能であると考えられた。

キーワード：ノリ，あかぐされ病，定量PCR

あかぐされ病は有明海のノリ養殖生産に大きな影響を与える要因であり、卵菌綱フハイカビ目の *Pythium porphyrae* (以下、あかぐされ菌) によって引き起こされる。本病の発生は毎年みられ、漁期を通して感染の拡大・縮小を繰り返しながら継続する。特に、高水温や低塩分条件下においては爆発的に感染を拡大し、大被害を与える。近年では2003年や2011年に大きな被害がみられた。

感染の拡大は菌糸上に形成された遊走子嚢から放出される遊走子によって引き起こされる。このため、病勢の予測や感染対策には遊走子の動態を把握することが重要であるが、現状ではノリ葉状体の目視及び顕微鏡による病斑の観察によって感染状況を把握しているのが実情である。したがって、感染成立前の遊走子の存在量、時系列変化、環境要因との関連など、基本的な知見は非常に乏しい。

あかぐされ菌遊走子については、これまで蛍光抗体法^{1,2)}やPCR法³⁻⁵⁾での検出が試みられているが、検出感度が低い、処理に時間を要する、定量が困難などの理由で実用化には至っていない。しかしながら、漁場の海水中における遊走子の動態を明らかにすることができれば、感染成立前にその兆候を把握でき、より早期の対処が可能となる。あるいは、一斉撤去などの集団管理の効果を定量的に評価することも可能となる。

そこで、本研究では新しい手法である定量PCR法を用いて、遊走子の定量検出技術を開発することを目的とした。

方 法

定量PCR法は、検量線により対象物の数量を決定する方法である。検量線は、既知濃度の試料を用いて作成した希釈系列が一般的に用いられる。試料としては、標的配列を組み込んだプラスミドが用いられることが多いが、増幅効率やコピー数の問題により不適當であることが知られている。⁶⁾また、DNA抽出時における抽出効率等の影響も考えられることから、検量線用の試料としては、目視計数した遊走子から試験サンプル同様の方法で抽出したDNA溶液を用いることとした。

試料の作成 供試菌として、2012年4月2日に柳川市地先の漁場で採取したノリ葉状体から分離したあかぐされ菌を用いた。菌糸をコーンミール平板培地に植え継いで、18°Cのインキュベーター内で保存培養しておき、必要に応じて切り出して試料とした。遊走子はAmano *et al.*¹⁾の方法に従って放出させ、一定量をホルマリン海水で固定してトーマ血球計算板を用いて目視計数したのち、濾過海水500mlに所定の数を加えて遊走子液とした。これを3 μ mメンブレンフィルター(ミリポATSTP04700)を用いて吸引濾過し、遊走子をフィルター上に捕集した。遊走子を捕集したフィルターは-20°Cで凍凍保存しておき、後日DNA抽出キット(Qiagen DNeasy Plant Mini Kit)を用いてDNAを抽出した。カラムからの最終溶出量は、標準プロトコルでは100 μ lとなっているが、濃度を上げて検出感度を高めるため50 μ lとした。

プライマー及びプローブの設計 DNAデータベース(DDBJ)からダウンロードしたあかぐされ菌18SrDNAのITS領域の塩基配列情報(アクセッション番号:AB043506)を用い、プライマー設計支援ソフトPrimer Express (Applied Biosystems社)でプライマー及びプローブを設計した。合成はライフテクノロジーズジャパン社に依頼した。反応系はTaqManプローブアッセイとし、PCR反応と検出は7500Fast Real-Time PCR System (ライフテクノロジーズジャパン)を用いて行った。1サンプルあたりの反応液組成は、滅菌水4.4 μ l, 2×TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (ライフテクノロジーズジャパン) 10 μ l, フォワード及びリバースプライマー (10 μ M) 各 1.8 μ l, プローブ (5 μ M) 1 μ l, テンプレートDNA溶液 1 μ l の計20 μ lとした。反応プログラムは、初期活性化ステップとして95 $^{\circ}$ C, 20秒を1サイクル行い、続いて95 $^{\circ}$ C, 3秒と60 $^{\circ}$ C, 30秒の2ステップを40サイクル行った。

試料として遊走子数 $10^0 \sim 10^7$ 個のDNA抽出溶液を用い、増幅の有無を確認した。増幅がみられたプライマーセットについては、さらに通常のPCRを行って、目的のサイズの断片が増幅されていることを確認した。

検量線の作成と清浄海水からの定量検出 遊走子数 $10^1 \sim 10^7$ 個の7段階の試料を用い、検量線用のスタンダードとした。各濃度系列は3反復とし、平均値を用いて検量線を作成した。

得られた検量線を用いて定量検出を試みた。試料は、PCR阻害物質の影響を排除するため、0.45 μ m及び0.22 μ mのフィルターで2段階濾過した清浄海水に遊走子を加えて作成した。

漁場海水からの遊走子の定量検出 より現場に近い状況で定量検出可能であるか明らかにするため、4月のノリ網撤去後にノリ漁場で採水して濁りやプランクトン等を含んだままの未濾過海水に計数した遊走子を加えて作成した試料を用い、定量PCRを行った。

結 果

プライマー及びプローブの設計 3セットのプライマー及びプローブを作成した(表1)。各セットを用いた増幅曲線を図1～3に示した。セットAは良好な増幅曲線が得られた。一方、セットB及びCについては、増幅はみられたものの良好な曲線が得られず、Ct値を決定できなかった。

良好な増幅がみられたセットAについては、通常のPCRとアガロースゲル電気泳動を行って、目的とするサイズの断片(62bp)が増幅されていることを確認した。以上のことからセットAは使用可能であると判断し、以降の分析に採用することとした。

検量線の作成と清浄海水からの定量検出 得られた検量線を図4に示す。概ね良好な直線性を示し、 R^2 は0.98であった。この検量線を用いて清浄海水中の遊走子を定量した結果は、目視計数結果に対して0.15～4.21倍の範囲であり、遊走子数1個でも検出可能であった(表2)。

漁場海水からの遊走子の定量検出 遊走子捕集後のフィルターは懸濁物質等でかなり汚れた。このためPCR阻害物質の影響が懸念されたが、全ての濃度区で遊走子が検出され、目視計数値に対する定量誤差は7.8～38.3倍であった(表3)。清浄海水を用いた場合に比べやや誤差が大きくなり、全ての濃度区で目視計数値よりも多く検出された。

考 察

作製したプライマー及びプローブのセットAは良好な増幅を示し、有効であると判断された。

検出感度については、清浄海水では1個、現場海水では10個と、いずれも最低濃度の試験区で検出できたことから検出感度は良好であるといえる。一方、定量誤差については、一例としてKamikawa *et al.*が有害赤潮プランクトンを対象として目視及び定量PCRで比較した結果によると2～3倍程度の誤差である。⁷⁾今回の試験においては、清浄海水では最大で4.21倍であり概ね良好であるといえる。現場海水では最大38.3倍と1オーダーレベルの誤差で、全体として過大評価になり精度はやや低下した。これは、海水中に含まれるPCR阻害物質により感度が低下するのではないかという、当初の予想に反する結果であった。むしろ過大に検出される方向であることから、現時点では実用上大きな支障はないと考えられるが、その原因は不明であり、今後さらに試験を重ねて検討する必要がある。

検量線に関しては、手法は今回と違うものの福岡県有明海地先のノリ漁場内における遊走子数は、小谷ら²⁾によると海水1l当たり数個～約2,300個、福永ら³⁾によると海水500ml当たり数個～ 10^4 個が確認されており、今回作成した検量線の範囲で十分にカバー可能である。

今回、DNA抽出における最終溶出は50 μ lのバッファー

で行ったため、得られたDNA溶液は約50 μ lである。PCR反応にはこのうち1 μ lのみを用いたが、清浄海中からは遊走子数1個、現場海中からは遊走子数10個と、いずれも最小濃度の試験区で検出可能であった。このことは、今回標的とした増幅領域が1細胞あたり複数コピー存在することを示していると考えられる。実際、真菌におけるrDNAのITS領域は数十～数百コピー存在するとされている。⁶⁾このことは、検出感度を高めるという点で有利であるといえる。

本法は、従来の手法に比べ極めて迅速に結果を得ることができると、定量が可能であることが特徴である。従来法の場合、蛍光抗体法では発芽に8時間のインキュベーションが必要であるため、1日以上を要する。^{1,2)}また、PCR法ではNested-PCR法のため2回のPCR反応が必要で、さらに判定にはアガロースゲル電気泳動を行うので半日以上を要すると考えられる。³⁻⁵⁾これに対し本法の場合は、遊走子のフィルター捕集とDNA抽出に約90分、PCR反応と検出は40分程度で終了する。反応プレートの調製時間を考慮しても、帰港後3時間程度で結果を得られるため、当日発行のノリ養殖情報に記載することも不可能ではない。

一方、養殖漁場においては赤潮の発生、降雨、時化等により海水の状態は大きく異なる。本技術を現場に応用するためには、多様な状態の海水からでも安定して検出できることを検証する必要がある。

また、検量線用の試料は、試験ロット毎の抽出効率の差や経時劣化の観点から試験毎に作製することが望ましいと考えられるが、あかぐされ菌の遊走子は活発に遊泳する上に、極めて生長が早く、遊走子嚢から放出された遊走子は数時間後には着定して発芽してしまう。この性質のため、検量線用の試料を作製するにあたっては、計数精度及び十分な細胞数の確保に大変苦労した。加えて、菌糸の前培養も含めて約10日と時間を要する。今後、本技術を現場に応用していくためには、簡便な検量線用試

料の作成手法の検討も必要である。

文 献

- 1) Amano H, Sakaguchi K, Maegawa M, Noda H. The Use of a Monoclonal Antibody for the Detection of Fungal Parasite, *Pythium* sp. the Causative Organism of Red Rot Disease, in Seawater from *Porphyra* Cultivation Farms. *Fisheries Science* 1996 ; **62** (4) : 556-560.
- 2) 小谷正幸, 岩渕光伸, 藤井直幹, 淵上 哲. 海中のあかぐされ菌の遊走子数とノリ葉体への感染の関係. 福岡県水産海洋技術センター研究報告 1999 ; **9** : 43-46.
- 3) 福永 剛. ノリ漁場におけるあかぐされ病菌遊走子の分布. 福岡県水産海洋技術センター研究報告 2006 ; **16** : 1-5.
- 4) 服部克也, 蒲原 聡, 原田靖子, 柿沼 誠. 2004年と2005年における愛知県内ノリ養殖漁場海中のあかぐされ病菌遊走子のPCR法による検出結果. 水産増殖 2007 ; **55** (3) : 483-487.
- 5) 清水泰子, 草加耕司, 杉野博之. 児島湾口部ノリ養殖漁場におけるあかぐされ病の発生. 岡山県水産試験場報告 2009 ; **24** : 54-59.
- 6) 三好孝典, 清水伸一, 篠崎毅, 澤田宏之. リアルタイム定量PCR法によるイチジク株枯病菌の絶対定量および検出. 日本植物病理学会報2011 ; **77** : 96-104.
- 7) Kamikawa R, Asai J, Miyahara T, Murata K, Oyama K, Yoshimatsu S, Yoshida T, Sako Y. Application of a Real-time PCR Assay to a Comprehensive Method of Monitoring Harmful Algae. *Microbes and Enviroments* 2006 ; **21** (3) : 163-173.

表 1 作成したプライマー及びプローブセット

セット A	プライマー(F)	5'-GATCGCTTTGCGCTTTTCG-3'
	プライマー(R)	5'-CGCCAATAGAGGTTGCTTCCT-3'
	TaqMan MGB probe	5'-CGACTTCGGTTAGGACAT-3' MGB
セット B	プライマー(F)	5'-GCTGCGAACTGCGATACGTA-3'
	プライマー(R)	5'-CGTTCAAGATTTTCGATGACTCACT-3'
	TaqMan MGB probe	5'-TGCGAATTGCAGAATT-3' MGB
セット C	プライマー(F)	5'-GGCTTCGGCCCCGACTT-3'
	プライマー(R)	5'-GTACACCTCAAGGAAAGAACAGAAAA-3'
	TaqMan MGB probe	5'-CAGCTGACGGAGTGTG-3' MGB

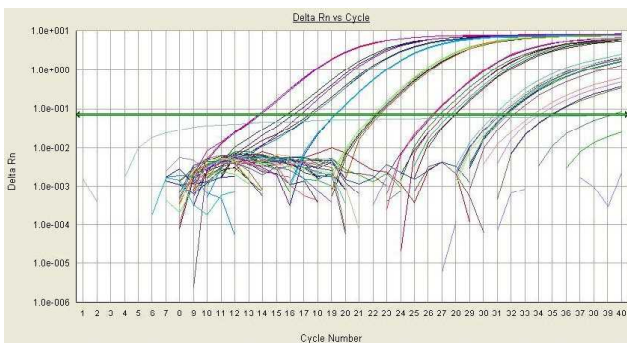


図 1 増幅曲線 (セット A)

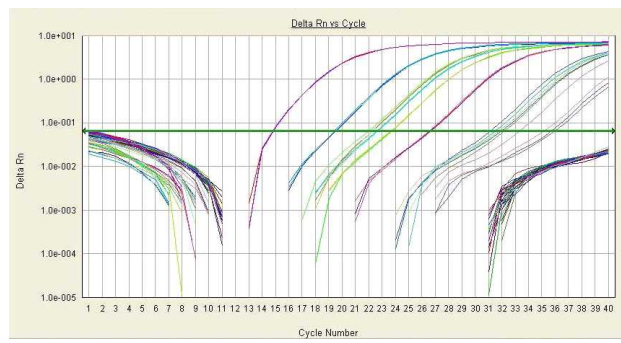


図 2 増幅曲線 (セット B)

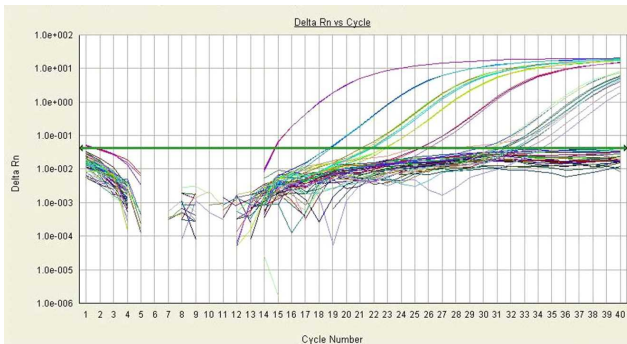


図 3 増幅曲線 (セット C)

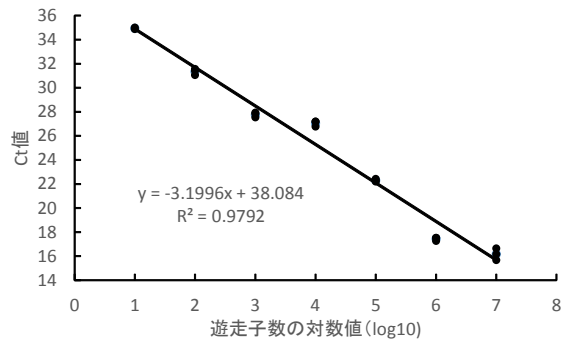


図 4 検量線

表 2 清浄海水からの遊走子の定量検出結果

遊走子濃度	目視計数値(A)	定量結果(B)	定量誤差(B/A)
10^0	1	0.35	0.35
10^1	10	38.24	3.82
10^2	100	122.97	1.23
10^3	1,000	152.27	0.15
10^4	10,000	4,943.27	0.49
10^5	100,000	99,503.99	1.00
10^6	1,000,000	803,180.21	0.80
10^7	10,000,000	42,100,000.00	4.21

表 3 現場海水からの遊走子の定量検出結果

遊走子濃度	目視計数値(A)	定量結果(B)	定量誤差(B/A)
10^1	10	382.81	38.28
10^2	100	779.72	7.80
10^3	1,000	16,194.38	16.19
10^4	10,000	94,591.69	9.46
10^5	100,000	1,790,000.00	17.90
10^6	1,000,000	16,400,000.00	16.40