

SSP-PCR 法によるテナガエビ属 3 種の同定法の検討 - 種特異的なプライマーの設計 -

奥 俊輔

1. はじめに

テナガエビ属 (*Macrobrachium*) は、世界各地に生息し、200種以上が報告されている (Holthuis, 1980; Jayachandran, 2001)。国内では9~15種が報告されており、特にミナミテナガエビ (*M. formosense*)、ヒラテナガエビ (*M. japonicum*)、テナガエビ (*M. nipponense*) の3種は九州以北の日本各地に分布している (大野・Armada, 1999; 林, 2000a; 林, 2000b; 林, 2000c)。テナガエビ属の多くは河川で孵化した後、浮遊幼生期に汽水域や海域まで流下し、再び河川を遡上するというような両側回遊型の生活史を持っているが、湖沼などの淡水域で一生を過ごす陸封型の種類も確認されている (Shokita, 1973; 大野・Armada, 1999)。また、テナガエビ (*M. nipponense*) では同一種内でも生息環境の違いによって遺伝的に分化しており、淡水湖群、汽水湖群、河口域群に分けることができる (大野・Armada, 1999)。このことから、テナガエビ属は淡水域の環境指標生物としての利用価値があると考えられる。また、テナガエビ属は内水面漁業の対象種となっており、食用として各地で漁獲されるなど水産生物としての利用価値もある (中田ら, 2005)。

テナガエビ属では、第3歩脚や雄成体で発達する第2歩脚 (胸脚) の形態を中心に分類が行われている (林, 2000a; 林, 2000b; 林, 2000c; 鈴木・佐藤, 1994)。このため、第2歩脚 (胸脚) の発達していない稚エビや、雄成体であっても第2歩脚や第3歩脚が欠落した個体では同定が困難である。形態による種同定が困難あるいはできない場合は、DNAの塩基配列の違いによる判別が有効である。DNAによる判別方法には、1種のみ

に特異的に結合するプライマー (種特異的なプライマー) を使用して判別する方法 (Species Specific Primer-Polymerase Chain Reaction, SSP-PCR法) や、制限酵素を使ってDNAを切断しその切断片パターンから判断する方法 (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP法) などがある。PCR-RFLP法を用いたテナガエビ属の種同定手法については、青山ら (2013) により検討および開発が行われている。

本研究では、ミナミテナガエビ、ヒラテナガエビおよびテナガエビの3種を対象とし、ミトコンドリアDNA (以下、mtDNA) のcytochrome oxidase I領域 (以下、COI領域) の塩基配列を使用したSSP-PCR分析を行うために必要な、種特異的なプライマーの設計を目的とする。

2. 方法

2. 1 対象生物の採取

テナガエビ3種の採取には、タモ網、釣り、エビかご (中田ら, 2005) を用いた。ミナミテナガエビは2015年7月に神奈川県酒匂川河口周辺で、ヒラテナガエビは2014年9月および2015年10月に神奈川県狩川下流で、テナガエビは2013年5月に東京都多摩川ガス橋周辺で採取した。採取したテナガエビ3種の写真を図1に示す。

採取したテナガエビ3種は、水道水中においてエアレーションをした状態で生きたまま実験室へ持ち帰り、20% エタノールで固定した。その後速やかに、林 (2000a)、林 (2000b) および林 (2000c) に準じて種の同定を行い、-45°Cで凍結保存した。

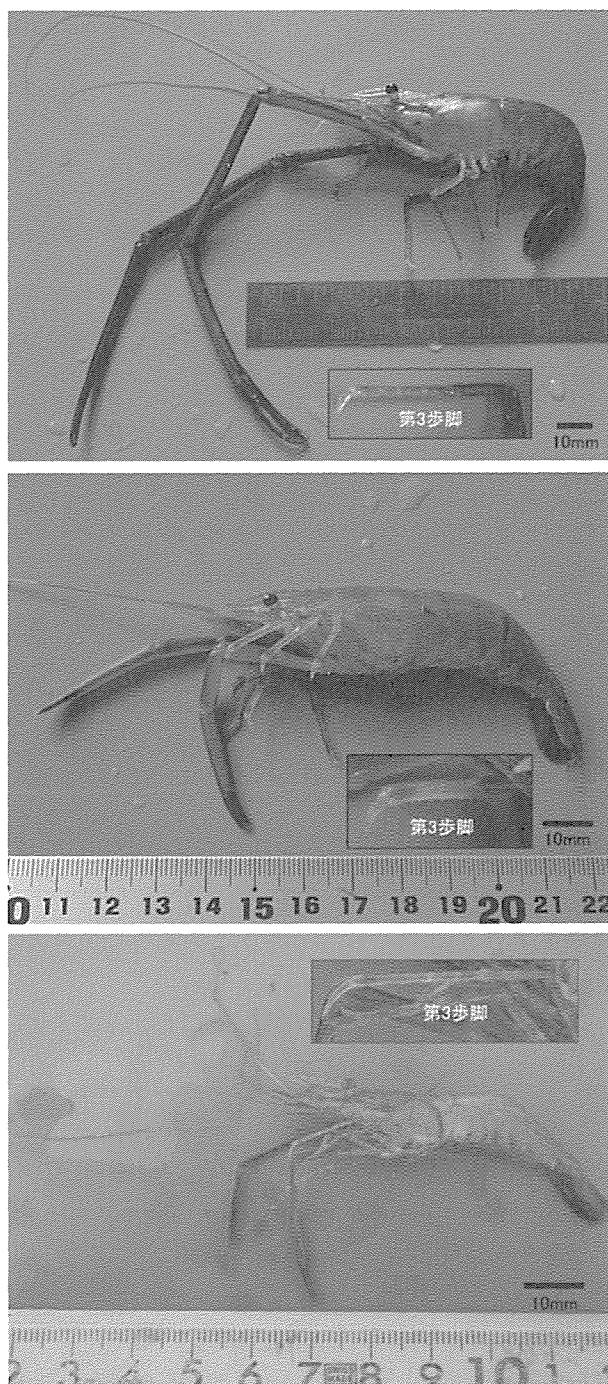


図1 テナガエビ属3種の写真

ミナミテナガエビ（上段）：第3歩脚の指節は短く頑丈である（林, 2000a）。第2歩脚はさみの指節に剛毛が少ない（林, 2000a）。

ヒラテナガエビ（中段）：第3歩脚の前節表面に鱗状の突起がない（林, 2000a）。第2歩脚の掌節は扁平で、すべての節のほぼ全面に小顆粒が密生するが、細毛に覆われることはない（林, 2000b）。

テナガエビ（下段）：第3歩脚の指節は細長い（林, 2000a）。第2歩脚はさみの指節が通常剛毛に覆われる（林, 2000a）。

2. 2 DNAの抽出および増幅

DNAの抽出および増幅にはミナミテナガエビ3個体、ヒラテナガエビ2個体、テナガエビ4個体の計9個体を用い、個体別に100～200 mgの筋肉組織を摘出し、DNA抽出キットのFastDNA SPIN Kit (MP社) を使用してDNAの抽出を行った。

抽出したDNAについて、COI領域の塩基配列をPCR法により増幅した。本研究におけるPCRでは、プライマーにはFolmer et al. (1994) により示されている無脊椎動物用の汎用プライマーLCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')とHCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')を、PCR用酵素にはEx Taq (TaKaRa社) を、サーマルサイクルにはModel TP600 (TaKaRa社) を使用した。PCR条件については青木ら (2013) の方法を参考に、本研究で最適と思われる条件を選定した。PCRが完了した試料については、柳本 (2007) の方法に基づいてサイズマーカーと共に2%アガロースゲル上で電気泳動を行った。サイズマーカーにはOneStep Ladder 50 (ニッポンジーン社)、アガロースゲルにはAgarose 21 (ニッポンジーン社)、染色剤にはGelgreen (Biotium社)、電気泳動装置にはMupid-exU (ADVANCE社) を使用した。電気泳動終了後、UV照射装置 (Mupid-Scope WD, ADVANCE社) を用いてDNA増幅の有無 (バンドの確認) と、サイズマーカーとの比色でDNA量の確認を行った。DNA量の確認によって塩基配列分析に足るPCR産物が認められた場合は、PCR産物精製キットillustra ExoProStar (GE Healthcare社) を使用して精製し、北海道システム・サイエンス株式会社に塩基配列分析を依頼した。

2. 3 種特異的なプライマーの設計

塩基配列分析の結果に対してClustalW (Thompson et al., 1994) によるアライメントを行った後、Web上のプライマー作成ソフト: Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いて種に特有な塩基配列を含むフォワードプライマーとリバースプライマーを設計した。

3. 結果および考察

3. 1 PCR条件の検討

PCR法によるDNA増幅の大まかな原理は次の通りである。まず、生物の筋肉片からDNAを抽出する。抽出したDNAを含む検液を95°C前後にすると、二本鎖DNAが一本鎖DNAとなる（熱変性）。続いて、DNAが再会合できる程度の温度（50～55°C）まで冷却し、一本鎖となったDNAにプライマーを結合させる（アニーリング）。結合させた後、72°Cまで温度を上げるとプライマー部分が伸長して、二本鎖DNAが2本形成される（伸長反応）。これを繰り返すことにより、1本、2本、4本、8本と指数関数的にDNAが増幅されるというものである。

DNAを効率的に増幅するためには、上記の変性温度、アニーリング温度、伸長温度を最適な条件とする必要がある。テナガエビ属3種については先行の知見があり、94°C、5分で初期熱変性を行った後、94°C、30秒（熱変性）、50°C、30秒（アニーリング）、72°C、1分（伸長反応）のサイクルを30回、最後に72°C、10分の伸長反応を行うという条件が設定されている（青山ら, 2013）。本研究でもこの条件でPCRを行い、テナガエビについては十分なDNAの増幅が認められたが、ミナミテナガエビとヒラテナガエビではほとんど増幅は起こらなかった。そこでPCR条件について見直しを行ったところ、Ex taq（PCR用酵素）の取扱説明書に初期熱変性の時間が長い場合は酵素失活の原因となり1分で十分であるという記述がなされていることから、初期熱変性条件を94°C、1分に変更してPCRを行った。この結果、DNAの増幅が確認された。しかし、効率的な増幅が起きておらず、DNA量が少なく塩基配列分析ができない検体や、図2に示した非特異的増幅およびスメア（シャープでない幅の広がったバンド）が確認される検体が多くみられた。非特異的増幅やスメアはアニーリング温度が低い場合に起こる。そこで50～55°Cの間で最適なアニーリング温度を探った結果、52°Cで最も効率的な増幅が確認された。また、DNAを抽出する際の筋肉片量によってDNAの増幅量に違いがあるかについて、同一個体にて100 mg、200 mg、300 mgの3条件で検討を行った。この結果、3条件に大きな違いがみられなかったため、100 mgあ

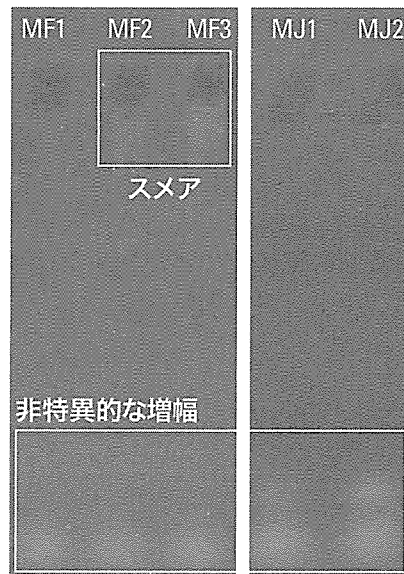


図2 PCR法でmtDNA COI領域が特異的に増幅されていない検体のDNA断片

ればDNA増幅が可能であることが確認された。以上の結果を踏まえPCR条件を以下の通り決定した。

94°C、1分で初期熱変性を行った後、94°C、30秒（熱変性）、52°C、30秒（アニーリング）、72°C、1分（伸長反応）のサイクルを30回行い、最後に72°C、10分の伸長反応を行う。

この条件でPCRを行った結果、図3のようにミナミテナガエビとヒラテナガエビでも効率的なDNAの増幅が確認された。

3. 2 COI領域の塩基配列

ミナミテナガエビ3個体、ヒラテナガエビ2個体、テナガエビ4個体の合計9個体による塩基配列分析で得られたCOI領域の塩基数は、ミナミテナガエビで685～691 bp、ヒラテナガエビで678～688 bp、テナガエビで683～698 bpであった。これらのうち、末端部の塩基は方法上、正確に読み取ることができないためアライメントを行い切り取った。アライメント後に得られたCOI領域の塩基配列を図4に示す。最終的に決定したCOI領域の塩基配列は、ミナミテナガエビとヒラテナガエビはともに628 bp、テナガエビは625 bpの鎖長を有し、青山ら（2013）により報告されている配列と比較すると、配列の重なる1～581 bpの区間ではミナミテナガエビとテナガエビで99.5～100%、ヒラテナガエビで99.5～99.8%の一致が認められた。これ

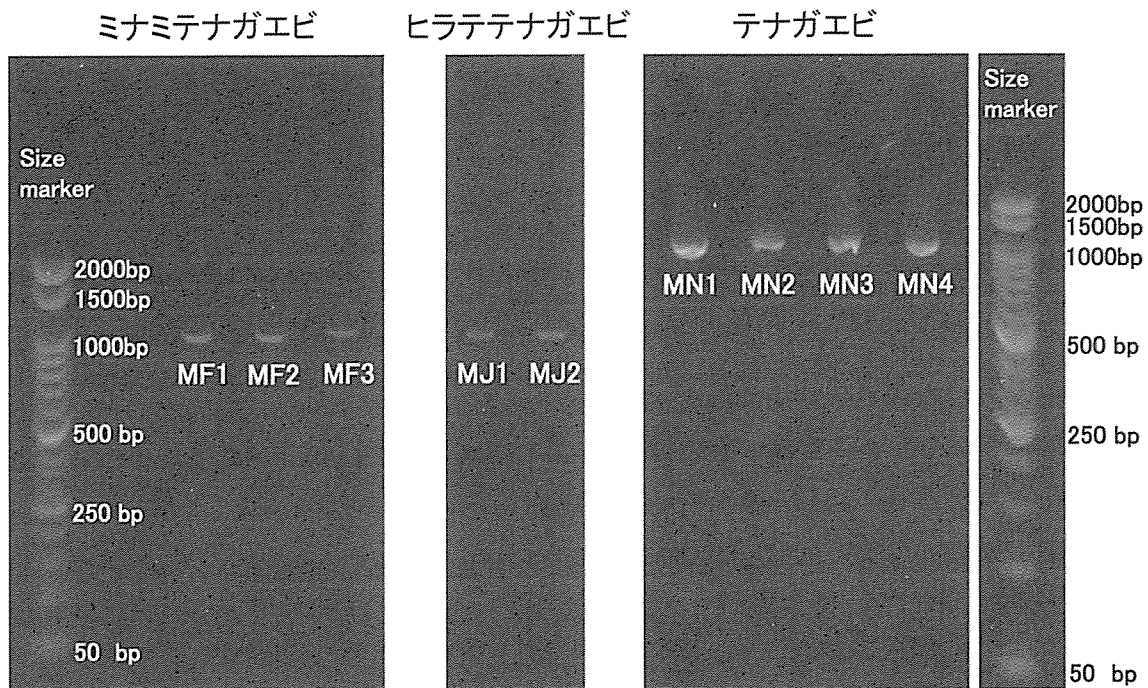


図3 PCR法で増幅したテナガエビ属3種のmtDNA COI領域
 ミナミテナガエビとヒラテテナガエビについては本研究検討条件で増幅したPCR産物、テナガエビは青山ら(2013)の条件で増幅したPCR産物である。

表1 種特異的なプライマーの配列とその特徴

種名	プライマー名	配列	塩基数 (mer)	PCR産物サイズ (bp)	GC含量 (%)	Tm値 (°C)
ミナミテナガエビ	MF-COI-F	5'-AATTGGGTCAACCAGGAA-3'	18	253	44.4	56.2
<i>Macrobrachium formosense</i>	MF-COI-R	5'-GTGCCCACTCCTCTTCTAC-3'	20		55.0	56.4
ヒラテテナガエビ	MJ-COI-F	5'-TATTAATTCGTGCCGAGCTT-3'	20	479	40.0	57.6
<i>Macrobrachium japonicum</i>	MJ-COI-R	5'-AAGAATTGCTGTCAGGAACA-3'	20		40.0	55.9
テナガエビ	MN-COI-F	5'-ATTCGAGCAGAATTAGGTCA-3'	20	428	40.0	55.0
<i>Macrobrachium nipponense</i>	MN-COI-R	5'-TCTATGGTCATTCCTGGTGA-3'	20		45.0	56.4

※1: PCR産物サイズとは、記載プライマーでDNAを増幅した際に得られるであろう塩基配列の長さを示す。

※2: Tm値は、プライマー設計ソフト (Primer3Plus) で計算した理論上の数値を示す。

※3: プライマー名のFはフォワードプライマー、Rはリバースプライマーを示す。

らのことから、目的の領域が増幅できたと考えられる。

最終的に決定したCOI領域の塩基配列を個体ごとに詳しくみていくと、3種9個体で六つの塩基配列が得られ、138の塩基に変異がみられた。このうち5塩基は種内変異、135塩基は種間変異であった (1塩基で種内変異と種間変異が同時にみられた)。まず、種内変異についてみると、ミナミテナガエビでは399番目の塩基に、ヒラテテナガエビでは394と395番目の塩基に、テナガエビでは237番目と447番目の塩基にトランジション型変異が確認された。次に種間変異についてみると、25番目と435番目の塩基において3種すべてで変異が

みられた。また、ミナミテナガエビで14塩基、ヒラテテナガエビで110塩基、テナガエビで8塩基において、他の2種とは異なる塩基が確認された。

3. 3 種特異的なプライマーの設計

種特異的なプライマーの設計条件は、プライマーの配列中に1種に特有な塩基 (または塩基配列) を有することとし、配列中に種内変異がないこととした。また、塩基数が17~25mer、GC含量が40~60%、Tm値が50~60°Cの範囲に入るようにした。設計したプライマーは表1および図4の通りである。

今回作成したプライマーについて、他の種でも増幅

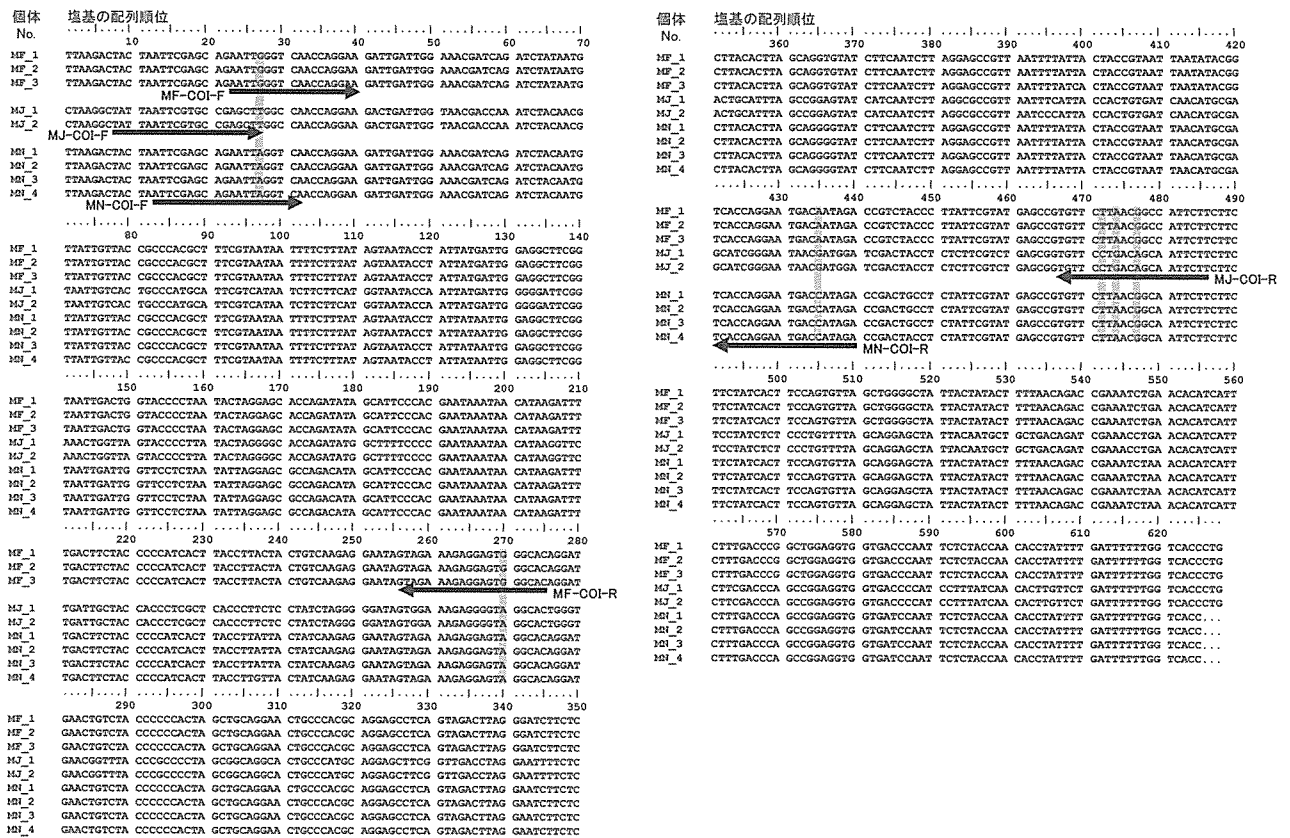


図4 テナガエビ属3種のmtDNA COI領域の塩基配列 (1-628bp)
 MFはミナミテナガエビ、MJはヒラテナガエビ、MNはテナガエビを示す。また、矢印は本研究で設計した特異的なプライマーの配列部分を示し、MF-COI-FとMF-COI-Rはミナミテナガエビ用のプライマー、MJ-COI-FとMJ-COI-Rはミナミテナガエビ用のプライマー、MN-COI-FとMN-COI-Rはミナミテナガエビ用のプライマーを示す (F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー)。グレーのハッチはプライマーの配列中で塩基に変異が見られる箇所を示す。

がみられる場合や、同一種内でも増幅に有無が起こる場合は、プライマーの再設計を行う必要がある。そのため、今後は本研究で作成したプライマーを用いて、確実に特定の種のみDNAを増幅できるかについての実証実験を行う必要があると考えられる。

参考文献

青山美鈴・浜崎健児・山田誠. 2013. 紀伊半島に生息するテナガエビ属 (*Macrobrachium*) 3種のPCR-RFLP法を用いた同定手法の開発. 陸水学雑誌, 74: 85-91.
 Folmer, O., Black, R., Hoeh, R., Lutz and Vrijehk, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
 林 健一. 2000a. 日本産エビ類の分類と生態 (112) テナガエビ科・テナガエビ亜科-テナガエビ属①. 海洋と生物, 128: 240-245.
 林 健一. 2000b. 日本産エビ類の分類と生態 (113) テナガエビ科・テナガエビ亜科-テナガエビ属②. 海洋と生物, 129: 360-363.
 林 健一. 2000c. 日本産エビ類の分類と生態 (114) テナガエビ科・テナガエビ亜科-テナガエビ属③. 海洋と生物, 130: 468-472.

Holthuis, L. B. 1980. FAO SPECIES CATALOGUE: Vol. 1 - SHRIMPS AND PRAWNS OF THE WORLD: An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. FAO fisheries synopsis, 125: 288 pp.
 Jayachandran, K., V. 2001. Palaemonid Prawns: Biodiversity, Taxonomy, Biology and Management. Science Publishers Inc., U. S. A., xii + 624 pp.
 中田和義・和田信大・荒木 晶・浜野龍夫. 2005. テナガエビ類の採集に用いるエビ籠の構造と使用人工飼料. 水産増殖, 53: 263-274.
 大野 淳・Armada. N. A. 1999. テナガエビ属の種と地域個体群の分化. 海洋と生物, 21: 319-329.
 Shokita, S. 1973. Abbreviated larval development of the freshwater prawn, *Macrobrachium shokitai* Fujino et Baba (Decapoda, Palaemonidae) from Iriomote Island of the Ryukyus. *Annotationes Zoologicae Japonenses: Societates Zoologicae Tokyonensis*, 46: 111-231.
 鈴木廣志・佐藤正典. 1994. 淡水産のエビとカニ. 鹿児島自然ガイド. 西日本新聞社, 大阪, 141 pp.
 Thompson, J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
 柳本 卓. 2007. SSP-PCR分析によるクリガニ科3種の種判別. 日本水産学会誌, 73: 872-879.