

SSP-PCR 法によるテナガエビ属 3 種の同定法の検討 -同定法の確立-

奥 俊輔

1. はじめに

テナガエビ属 (*Macrobrachium*) は、国内では9～15種の生息が報告されているが、本州や四国ではその内のミナミテナガエビ (*M. formosense*)、ヒラテテナガエビ (*M. japonicum*) およびテナガエビ (*M. nipponense*) の3種が主に生息している (大野・Armada, 1999、林, 2000a、林, 2000b、林, 2000c)。これら3種は、主に第2歩脚や第3歩脚の形質により同定を行うが、歩脚が未発達あるいは欠落している個体では同定が困難である。この問題を解決するためには、DNAを用いた同定法が有効である。DNAを用いた方法には、対象種のDNAの特定領域のみを増幅するためのプライマー (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。本研究では、ミトコンドリアDNA (以下、mtDNA) の cytochrome oxidase I 領域 (以下、COI 領域) の塩基配列を利用した SSP-PCR法によるミナミテナガエビ、ヒラテテナガエビおよびテナガエビ (以下、テナガエビ属3種) の種同定法の確立を目的とした。

2. 本研究の流れ

本研究は、昨年度年報に掲載した研究 (奥, 2016) からの継続研究である。昨年度の研究 (奥, 2016) では、まず PCR による DNA の増幅において、試料量や PCR 時の温度条件などの検討を行った後、テナガエビ属3種の COI 領域の塩基配列を決定した。そして、得

られた塩基配列から、Web 上のプライマー設計ソフト: Primer3Plus を用いて3種それぞれの種特異的なプライマーを設計した。

今年度の研究では、まず、Primer3Plus で設計したプライマーを用いてテナガエビ属3種の種同定ができるかを確認し、このプライマーで種同定ができなかった場合には、プライマーの再設計と種同定の可否の確認を行うこととした。さらに、開発したプライマーについては、マルチプレックス PCR 法による効率的な使用方法についても検討することとした。

3. Primer3Plus で設計したプライマーによる種同定の可否

3.1 方法

(1) 供試生物

2015年7月に神奈川県酒匂川河口周辺でミナミテナガエビを3個体、2014年9月および2015年10月に神奈川県狩川下流でヒラテテナガエビを計11個体、2013年5月に東京都多摩川ガス橋周辺でテナガエビを30個体採取した。採取したテナガエビ属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) に準じて種の再確認を行い、-45°C で凍結保存した。

(2) DNA の抽出および増幅

DNA の抽出および増幅は、奥 (2016) の方法に従い、ミナミテナガエビ3個体、ヒラテテナガエビ3個体、テナガエビ6個体の計12個体について FastDNA SPIN Kit (MP社) で DNA を抽出した後、Primer3Plus で設

表1 Primer3Plusで設計した種特異的プライマーの配列とその特徴 (奥, 2016)

種名	プライマー名 ^{*1}	配列 ^{*2}	塩基数 (mer)	PCR産物サイズ ^{*3} (bp)	GC含量 (%)	Tm値 ^{*4} (°C)
ミナミテナガエビ	MF-COI-F	5'-A A T T G G G T C A A C C A G G A A -3'	18	253	44.4	56.2
<i>Macrobrachium formosense</i>	MF-COI-R	5'-G T G C C C A C T C C T C T T T C T A C -3'	20		55.0	56.4
ヒラテテナガエビ	MJ-COI-F	5'-T A T T A A T T C G T G C C G A G C T T -3'	20	479	40.0	57.6
<i>Macrobrachium japonicum</i>	MJ-COI-R	5'-A A G A A T T G C T G T C A G G A A C A -3'	20		40.0	55.9
テナガエビ	MN-COI-F	5'-A T T C G A G C A G A A T T A G G T C A -3'	20	428	40.0	55.0
<i>Macrobrachium nipponense</i>	MN-COI-R	5'-T C T A T G G T C A T T C C T G G T G A -3'	20		45.0	56.4

※1: 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。

※2: 黒色のハッチは、COI領域内の種特異的な塩基と結合する塩基を示す。

※3: PCR産物サイズとは、上記のプライマーで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。

※4: Tm値は、プライマー設計ソフト (Primer3Plus) で算出した値である。

計したプライマー (表1) を用いて94°C, 1分→ (94°C, 30秒→50°C, 30秒→72°C, 1分) を30サイクル→72°C, 10分のPCR条件でDNAの増幅を行った。なお、PCRを行うために、サーマルサイクラーにはModel TP600 (TaKaRa社) を、PCR用酵素にはPremixTaq (TaKaRa社) を使用した。

(3) 増幅確認および種同定

増幅後のPCR産物を試料として、サイズマーカー (ニッポンジーン社 OneStep Ladder 50) と共に2%アガロースゲルで電気泳動を行った後、UVを照射して増幅の有無 (バンドの有無) と、サイズマーカーとの泳動距離の比較からPCR産物のサイズを確認した。ここで種特異的なプライマーによって対象種のみDNAが増幅し、PCR産物のサイズが設計値と一致した場合に、種同定が可能であると判断した。

3.2 結果および考察

Primer3Plusで設計したプライマーを用いて、DNAの増幅を行ったところ、ミナミテナガエビ用プライマーでは3種すべての個体で、ヒラテテナガエビ用プライマーではヒラテテナガエビのみの全個体で、テナガエビ用プライマーではミナミテナガエビとテナガエビの全個体でDNAの増幅がみられた。このことから、Primer3Plusで設計したプライマーでは、少なくともミナミテナガエビとテナガエビについては種同定ができないことが明らかとなった。

ミナミテナガエビ用プライマーとテナガエビ用プライマーで他種のDNAが増幅された主因として、プライマーの3'末端付近に結合するCOI領域内の塩基配列が

種特異的でなかったことが考えられる (表1)。これは、DNAの伸張がプライマーの3'末端から開始されることから、プライマーの3'末端からの数塩基のみが部分的にCOI領域の塩基と結合した場合でも、誤ってDNAの増幅が起こってしまう可能性があるためである (座古, 2010)。

4. SSP-PCR法による種同定法の確立

4.1 方法

(1) プライマーの再設計

新たなプライマーの設計には、過年度の研究で用いたPrimer3Plusは使わず、Excel上で自作した計算ファイルを用いて以下の手順で行った。

まず、mtDNA COI領域の塩基配列 (図1) 中で1種のみに変異がみられる塩基を探し出し (種内変異のある箇所は除外)、その塩基に3'末端の塩基が結合するような配列のプライマーを複数選び出した。それらについて、Excel上でプライマーとしての条件を満たしているか確認を行い、最適なものを選択するという方法により設計した。プライマーが具備すべき条件は、塩基数が18~30mer、GC含量が40~60%、Tm値が50~60°Cの範囲に入ることとした (小田・三橋, 2010)。また、プライマー内やプライマー間での結合でDNAの増幅効率が低下しないようにするため、同一プライマー内の3'末端部分と5'末端部分、フォワードプライマーの3'末端部分とリバースプライマーの3'末端部分で、連続した3塩基以上が相補的にならないような配列とした。さらに、マルチプレックスPCRでPCR産物のサイズ差から種同定を行うことを想定して、mtDNA

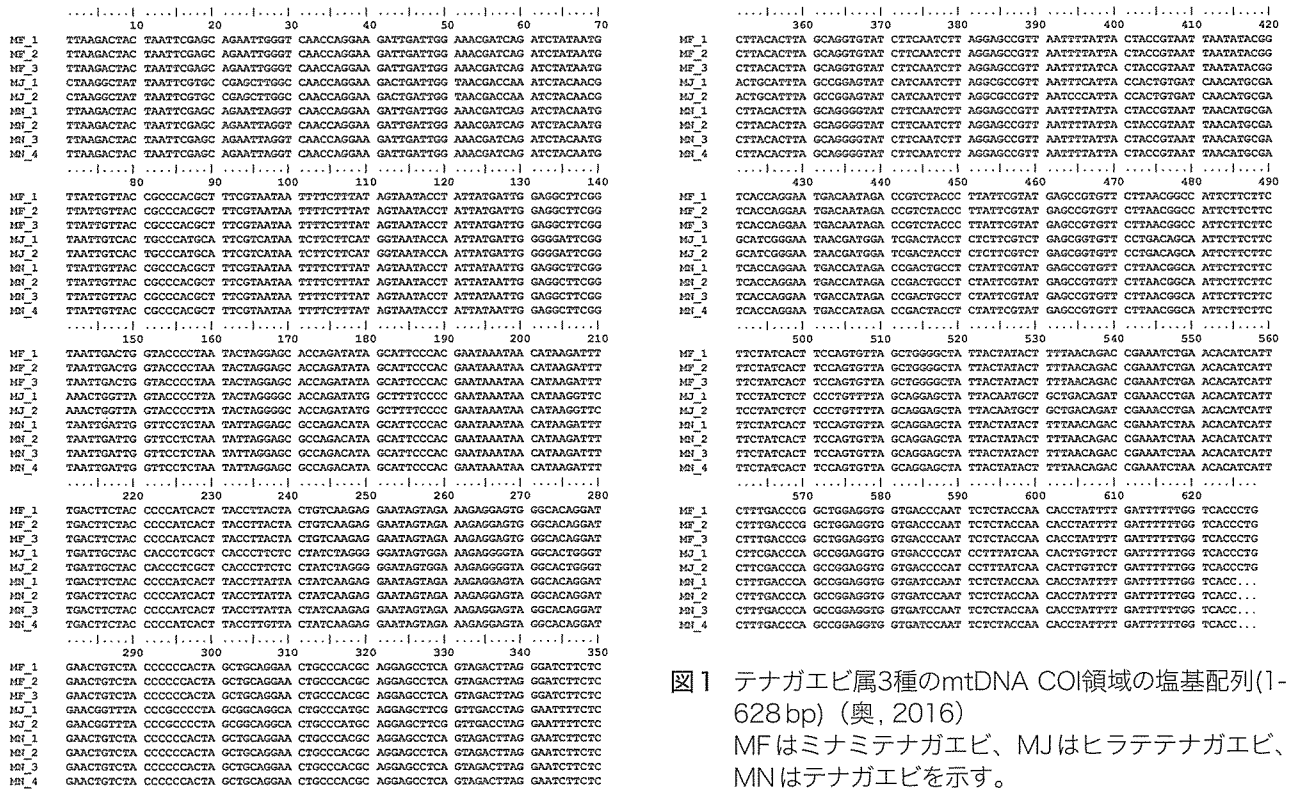


図1 テナガエビ属3種のmtDNA COI領域の塩基配列(1-628bp) (奥, 2016)
MFはミナミテナガエビ, MJはヒラテナガエビ, MNはテナガエビを示す。

COI領域におけるフォワードプライマーとリバースプライマーの間の塩基対数が、3種で可能な限り大きく異なるように配慮した。

(2) 供試生物

テナガエビ属3種については、3.1 (1) で示した個体の一部を供試した。加えて、再設計したプライマーを用いた種同定において、他種のエビ類で誤同定が起きないことを確認するため、テナガエビ属3種と分布域の重なる可能性があるスジエビ (*Palaemon paucidens*)、ヤマトヌマエビ (*Caridina multidentata*)、カワリヌマエビ属の1種 (*Neocaridina* sp.)、ヌマエビ (*Paratya compressa*) およびヌカエビ (*Paratya improvisa*) の5種 (以下、その他エビ類) を供試生物とした (神奈川県環境科学センター, 2005)。その他エビ類は、本州各地の観賞魚店で購入し、各種10個体ずつを20%エタノールで固定した後、-45°Cで凍結保存した。

(3) DNAの抽出および増幅

ヒラテナガエビ8個体、テナガエビ8個体、その他エビ類の各種4個体から3.1 (2) の方法でDNAを抽出した。これらに加えて、前項の試験で抽出したミナミテナガエビ3個体、ヒラテナガエビ3個体、テナガエ

ビ6個体のDNAをテンプレートとして、再設計したプライマーを用いて、3.1 (2) の条件でDNAの増幅を行った。

(4) 増幅確認および種同定

3.1 (3) の方法により電気泳動とUV照射を行い、DNA増幅の有無とPCR産物のサイズ確認を通じて種同定の可否を判断した。

(5) 開発したプライマーを用いたマルチプレックスPCR

再設計したプライマーが使用可能と判断された時点で、より効率的な種同定方法を確立するため、1反応液中で複数種のDNA断片を同時に増幅するマルチプレックスPCRの適応を検討した。

その他エビ類を除く各個体のDNA抽出液にテナガエビ属3種用のプライマーをすべて加えてDNAの増幅を行った後、DNA増幅の有無とPCR産物のサイズ確認を行って、増幅されたPCR産物のサイズから種同定が可能であるか判断した。なお、DNAの増幅は3.1 (2) の方法に準じて行い、DNAの増幅確認とPCR産物のサイズ確認は3.1 (3) の方法で行った。

表2 再設計した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 ^{#1}	配列 ^{#2}	塩基数 (mer)	PCR 産物 サイズ ^{#3} (bp)	GC 含量 (%)	Tm 値 ^{#4} (°C)
ミナミテナガエビ	MF-F_129-148	5'-TGGAGGCTTTCGGTAATTGAC C -3'	20	341	50.0	56.3
<i>Macrobrachium formosense</i>	MF-R_469-450	5'-ACACGGCTCATACGAATAA G -3'	20		45.0	54.3
ヒラテテナガエビ	MJ-F_354-372	5'-GCA T TTAGC C GG A GTATC A -3'	19	133	47.4	53.9
<i>Macrobrachium japonicum</i>	MJ-R_486-467 ^{#5}	5'-AAGAATTGCT T GT C AGGAACA-3'	20	40.0	55.9	
テナガエビ	MN-F_419-435	5'-GATCACCCAGGAATGAC C -3'	17	186	52.9	53.1
<i>Macrobrachium nipponense</i>	MN-R_604-585	5'-GGTGTGGTAGAGAATTGG A -3'	20		45.0	54.3

※1：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、数字は図1の塩基配列中の位置（塩基の通しNo.）を示す。
 ※2：黒色のハッチは、COI領域内の種特異的な塩基と結合する塩基を示す。
 ※3：PCR産物サイズとは、上記のプライマーで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。
 ※4：Tm値は、Current Protocols in Molecular BiologyのUnit14.8（Bagasra, 2008）に記載されている式を用いて算出した値である。
 ※5：奥（2016）で設計したヒラテテナガエビ用のリバースプライマー（MJ-COI-R）と同一のものである。

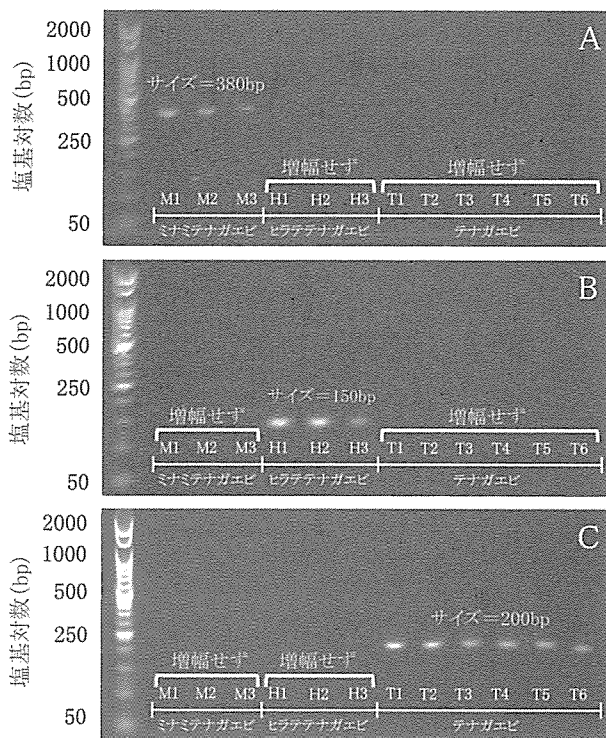


図2 テナガエビ属3種の種特異的なプライマーにより増幅されたmtDNA COI領域のDNA断片
 A：ミナミテナガエビの種特異的なプライマーにより増幅されたDNA断片
 B：ヒラテテナガエビの種特異的なプライマーにより増幅されたDNA断片
 C：テナガエビの種特異的なプライマーにより増幅されたDNA断片

4.2 結果および考察

(1) 再設計したプライマーによる種同定の可否

再設計したプライマーを表2に示す。これらのプライマーを用いてDNAの増幅を行った結果、ミナミテナガエビ用プライマー、ヒラテテナガエビ用プライマーおよ

びテナガエビ用プライマーのすべてにおいて対象種のみDNAを増幅することができた（図2）。また、増幅したPCR産物のサイズもミナミテナガエビで設計値341 bpに対して実測値380 bp、ヒラテテナガエビで設計値133 bpに対して実測値150 bp、テナガエビで設計値186 bpに対して実測値200 bpと、いずれの種でも設計値と実測値がほぼ一致していた。さらに、その他エビ類については、全個体でDNAの増幅は認められなかった。

SSP-PCR法による種同定を確立するためには、解決すべき問題点が二つある。一つは、対象種以外でDNAが増幅してしまうことによる誤同定が起きないかという点である。これについては、前述の通り、その他エビ類で誤同定が起きないことを確認した。また、テナガエビ属3種と他のエビ類は額角等、欠損の可能性が低い形態で区別することができる。これらのことから、他種で誤同定が起きる点については、簡易的な形態分析で検体を絞ることによって、解決が可能であると考えられる。

もう一つの問題は、異なる地域の個体間で塩基配列に変異があった場合、対象種であってもDNAが増幅されない、あるいは近縁種でDNAが増幅されてしまうことによる誤同定が起きないかという点である。今回、他の地域のテナガエビ属3種の個体を確保することができなかったため、過年度の研究（奥, 2016）で得られたテナガエビ属3種の塩基配列（図1）について、他の地域で行われた先行研究で報告されている塩基配列情報と比較した。日本のDNAデータベースであるDBJ

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) により情報収集を行ったところ、テナガエビ属3種のmtDNA COI領域の塩基配列情報は青山ら (2013) で和歌山県の河川において報告されたものだけであった。この塩基配列と過年度の研究 (奥, 2016) で得られた塩基配列 (図1) を比較した結果、同一領域間で変異がみられたのはミナミテナガエビで0~3箇所、テナガエビで0~3箇所、ヒラテテナガエビで1~3箇所であり、過年度の研究 (奥, 2016) での個体間変異と大きな差はみられなかった。さらに、最も重要な部分であるプライマーとの結合部位の塩基配列では変異がみられなかった。これらのことから、二地域間ではテナガエビ属3種用プライマーを用いた種同定で誤同定する可能性は低いと考えられる。また、和歌山と東京・神奈川では距離が離れているにも関わらず塩基配列に大きな変異はみられなかったことから、テナガエビ属3種においては地域が異なってもmtDNA COI領域内での変異がほとんどなく、本研究で再設計したプライマーを用いても種同定の障害にならないと考えられる。

以上のことから、再設計したプライマーを用いたPCRでテナガエビ属3種の種同定が可能であると考えられ、テナガエビ属3種を同定するためのプライマーが開発できたと判断される。

(2) 開発したプライマーを用いたマルチプレックスPCR

開発したプライマーを用いてマルチプレックスPCRを行ったところ、供試した全個体でDNAの増幅が認められ、それらのPCR産物のサイズはミナミテナガエビで設計値341 bpに対して実測値380 bp、ヒラテテナガエビで設計値133 bpに対して実測値150 bp、テナガエビでは設計値186 bpに対して実測値200 bpであり、いずれの種でも設計値と実測値はほぼ一致していた (図3)。以上のことから、開発したプライマーを用いたマルチプレックスPCRで、テナガエビ属3種の種同定が可能であると考えられる。これにより、種同定時のDNA抽出後の一連の操作において、試薬および作業量を1/3に削減することができる。

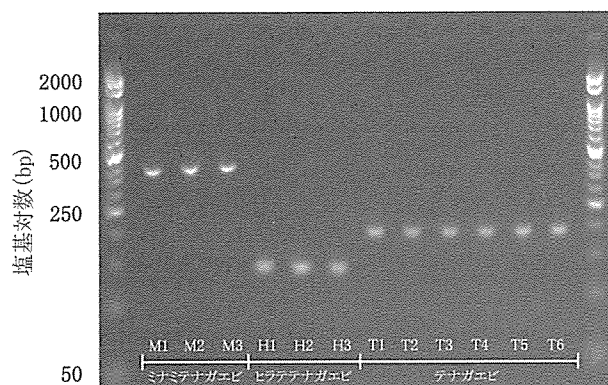


図3 開発したプライマーを用いたマルチプレックスPCRにより増幅されたmtDNA COI領域のDNA断片

5. まとめ

本研究では、まずPCRによるDNAの増幅によって、テナガエビ属3種 (ミナミテナガエビ、ヒラテテナガエビ、テナガエビ) のmtDNA COI領域の塩基配列を決定した。これらの塩基配列に基づいて、テナガエビ属3種を同定するための種特異的なプライマーの設計や同定可否の確認を行い、テナガエビ属3種用のプライマーを開発した。さらに、開発したプライマーを用いたマルチプレックスPCRでは、3種のPCR産物のサイズ差から種同定することが可能となり、効率的なテナガエビ属3種の同定法を確立することができた。

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.
- Bagasra, O. 2008. In Situ Polymerase Chain Reaction and Hybridization to Detect Low-Abundance Nucleic Acid Targets. *Current Protocols in Molecular Biology*, 82:14. 8. 1-14. 8. 28.
- 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.
- 神奈川県環境科学センター. 2005. 神奈川県内河川の底生動物. 神奈川県環境科学センター, 299 pp.
- 小田和彦・三橋将人. 2010. 第3章PCRプライマーの設計と合成. もっと知りたい! PCR実験, 東京, 34-45.
- 奥 俊輔. 2016. 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-. 株式会社日本海洋生物研究所2016年度年報, 40-44.
- 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.
- 座古 保. 2010. 第1章PCRの基本原理解. もっと知りたい! PCR実験, 東京, 1-19.