

3

線虫類の長期保管に向けた 固定・保存液の検討

石黒 健太郎

1. はじめに

メイオセントスは海底表面や堆積物の間隙、海藻の表面などに生息する小型底生生物である。同分類群はバクテリアやデトリタスの消費者として、またマクロベントスや魚類等の食糧源として底生生態系内で重要な役割を担っていると考えられている（寒川ら, 2008）。特に線虫類はメイオセントスの中で最も優占する生物群であり（Platt & Warwick, 1980）、未記載種を含めると約 2 万種を越えるとされる（Giere, 1993）。多様性が極めて高い線虫類は陸域から深海まで広く生息しており（辻野ら, 2014）、様々な環境において影響評価の指標生物として、その有効性が報告されている（Warwick, 1988; Tita *et al.*, 2002）。

線虫類は体長や口針長、生殖孔の位置などの形態的特徴により同定・分類される（岩堀・二井, 1995）。これらの特徴を顕微鏡下で観察し、その違いを明確にするには知識と経験が必要であり、専門家でない限り困難である。近年、遺伝子を用いた解析、いわゆる分子生物学的手法が著しく発達し、ある程度の生物の専門的な知識を備えていれば、本手法を種の査定に活用することが可能である。線虫類についても DNA 技術を利用した研究が報告されており、形態観察および DNA 分析の両手法を用いた検討が種の査定に重要であると考えられている（岩堀・二井, 1995）。

当社は海産自由生活性の線虫類を対象に形態観察および DNA 分析を実施しており、自社研究の成果を学会等で報告している（奥, 2018）。その中で、長期保存した線虫類の DNA 分析に関しては、保存方法に課題があることが判明した。当社では線虫類の固定・保存をホルマリン（形態観察のみの場合に使用。DNA 分析試料には使用しない）、エタノール、DESS（DMSO/EDTA/Saturated Sodium chloride）のいずれかの保存液で行う。各固定・保存液に長所と短所が存在するが、長期保存の際には DNA が抽出できず PCR による増幅が認められないケースがしばしばあり、問題なく DNA が保存されているのか

明確でない。この課題をふまえ、現在、各固定・保存液において線虫類の形態および DNA がどのくらい長期保管が可能なのか、またどのような固定・保存液が適しているのか検討している。本稿では保管 1 か月後の結果が得られたので、途中経過として報告する。

2. 材料と方法

2.1 試料採集

試料は、2020 年 9 月 3 日に片瀬西浜海水浴場（図 1: 緯度 35°18'38. 72"、経度 139°28'38. 52"）で採集した。採集には方形枠（20cm×20cm）を用い、枠内の深さ 5cm ほどの底泥をスコップで採集してビニール袋に入れ冷蔵保存で持ち帰った。持ち帰った底泥はふるい目 32 μ m と 500 μ m でふるい分け、500 μ m を通過し 32 μ m のふるい上に残った試料を 50mL コーニングに移し分析試料とした。



図1 調査地点（国土地理院標準地図から作成）

2.2 形態観察および DNA 増幅

線虫類は、ふるいにかけて分析試料から実体顕微鏡下で針を用いて無作為に分取した。分取した線虫類は、形態に異常がないことを確認した後、70% エタノール、5% 中性ホルマリン、5%DESS 保存液 (Melissa *et al.*, 2006) の 3 種に 8 個体ずつ液浸し、各々常温 (20°C) で 1 日間保管したものと、常温 (20°C) と冷蔵 (4°C) で 1 か月間保管したものを作成し試料とした。

保管後の試料は蒸留水で十分に洗浄し、10 倍希釈した 10×Ex Taq Buffer (TaKaRa Bio) を 10μL ずつ分注した 1PCR チューブに 1 個体ずつ浸漬した。PCR チューブに移す前に、固定・保存液による形態への影響を実態顕微鏡下で確認した。その後、Proteinase K (TaKaRa Bio) を加えてタンパク質を溶解し、Gene Releaser (Bio Ventures) を用いて DNA を抽出した。

抽出した DNA を用いて、PCR により核 DNA の 18S rRNA 領域 (真核生物では全て共通領域) の一部を増幅した。サーマルサイクルの条件は、94°C で 2 分の初期熱変性をし、94°C 30 秒の熱変性→57°C 30 秒のアニーリング→72°C 60 秒の伸長反応を 37 サイクル、最後に 72°C で 10 分間の伸長反応とした。プライマーは MN18F (5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3') および Nem_18S_R (5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3') を用い (Bhadury *et al.*, 2006)、反応酵素には Premix Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Bio) を用いた。PCR 産物は、2% アガロースゲルを用いた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) を確認した。

3. 結果

3.1 形態の保存性について

70% エタノールに浸漬した試料は、保存期間および環境条件に限らず形態が縮小し、観察が困難であった。5% ホルマリン、5%DESS 保存液の試料は、保存期間および環境条件に限らず、形態の変化はみられなかった (表 1)。

3.2 DNA の保存性について

常温で 1 日間保管した試料は全ての保存液の全試料において DNA の増幅が認められた (表 1, 図 2)。常温で 1 か月間保管した試料は全ての保存液において増幅が認められたが、70% エタノールおよび 5%DESS 保存液では常温で 1 日間保管した試料と増幅数に明確な差は生じなかった。一方、5% 中性ホルマリンでは 8 検体中 4 検体と DNA の増幅数が他の固定・保存液よりも少なく、常温で 1 日間保管した試料よりも増幅数の減少が明らかであった (表 1, 図 3)。冷蔵で 1 か月間保管した試料でも全ての保存液で増幅が認



図 2 1 日間常温保管

表 1 DNA 増幅結果

	1日間常温保管後増幅数	1か月間常温保管後増幅数	1か月間冷蔵保管後増幅数	備考
70%エタノール	8/8	7/8	8/8	形態が収縮し観察が困難
5%中性ホルマリン	8/8	4/8	7/8	形態変化はみられなかった
5%DESS	8/8	7/8	6/8	形態変化はみられなかった

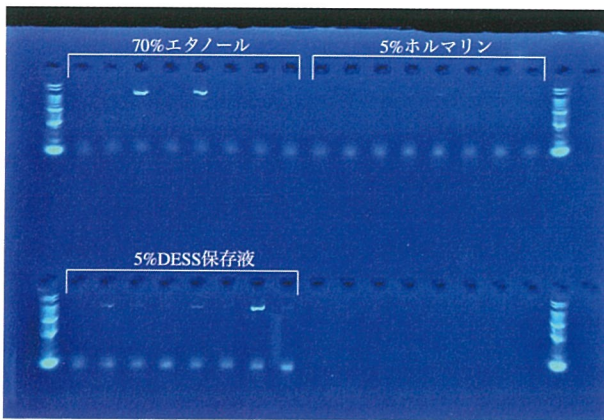


図3 1か月間常温保管

70%エタノールの2、4、6、7、8列目、5%ホルマリンの5、6、7、8列目について、画像ではバンドが薄いですが、肉眼で視認可能だったためDNAが増幅したと判断した。

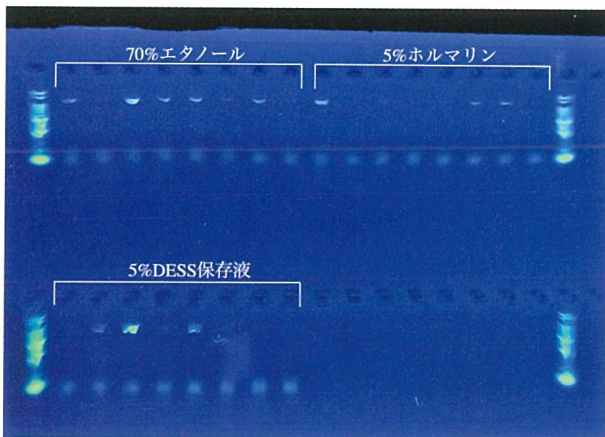


図4 1か月間冷蔵保管

70%エタノールの2列目、5%ホルマリンの2、3、4、5列目について、5%DESS保存液の6、7列目について画像ではバンドが薄いですが、肉眼で視認可能だったためDNAが増幅したと判断した。

められ、70% エタノール、5% ホルマリン、5%DESS 保存液の順で DNA 増幅数が多かった (図4)。5%DESS 保存液で増幅が認められた試料は 8 検体中 6 検体と、常温で1日間保管した試料よりも増幅数が少ないと判断された。

4. 考察

本実験の結果から、線虫類の DNA 保存液としては 70% エタノールが適しており、環境は冷蔵が推奨される。しかし、エタノールは DNA の保存には適しているものの、

保存 1 日間後には線虫が収縮し、形態の保持には適していなかった。線虫の収縮は、エタノールへ試料の水分が移行した結果であり、エタノール濃度が高いほど収縮も強いと考えられる。このため、形態および DNA 両方の保存にむけ、エタノール濃度の検討が必要である。

ホルマリンは形態の保持には優れているが、DNA を断片化させるため DNA の保存液には適さないと考えられている (水久保・二井, 2014)。本実験結果においても、常温では DNA の保存液には適さなかった。これは水分の蒸発による濃度の変化や内在性の DNA 分解酵素による分解などにより、DNA の断片化が促進されたと考えられる。しかし、冷蔵であれば 1 か月間は断片化が抑えられており、ホルマリン固定・保存による試料でも DNA 技術に適應可能であると考えられる。

DESS 保存液は形態および DNA を併せて保存することが可能であり、1 か月以内の常温保管では線虫の同定・分類には適した保存液であると考えられる。冷蔵による DNA の保存はエタノールよりも悪かったが、海外などでのエタノールやホルマリンの使用制限がある調査では DESS 保存液が有効であると考えられる。欠点としては、塩化ナトリウムを含むため、1 か月間保管をすると部分的に結晶化が進み、観察の前には十分な洗浄を必要とすることが考えられる。

本稿は保管後 1 か月後の結果であるが、各固定・保存液の一長一短が明確化された。今後も実験を継続し、保管期間の限界等を明らかにしていく予定である。

参考文献

- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D. T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D. and Smerdon, G. R. 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*, 320: 1-9.
- Giere, O. 1993. *Meiobenthology-The Microscopic Fauna in Aquatic Sediments*. Springer-Verlag, 328 pp.
- 岩堀英晶・二井一禎. 1995. 線虫の分類における DNA 分析技術の利用. *日本線虫学会誌*, 25: 1-10.
- Melissa, Y., Irma, T. D. L., Ian, W. K., Manuel, M. O., Jenna, M., Mark, B., Larisa, P and Paul, D. L. 2006. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, 8: 367-376.
- 水久保隆之・二井一禎. 2014. *線虫学実験*. 京都大学学術出版会. 324pp.
- 奥俊輔. 2018. 分子生物学的手法を用いた天津小湊海域における線虫類の群集構造解析. 株式会社日本海洋生物研究所 2018 年報, 19-26.
- Platt, H. M. and Warwick, R. M. 1980. The significance of the free-living nematodes to the littoral ecosystem. In : Price, J. H., Irvine, D. E. G. and Farnham, W. F. (eds.), *The shore environment. Vol.2. Ecosystems*, Academic Press, 729-759.
- 寒川浩・下出信次・橋本隆司・菊池知彦. 2008. 相模湾真鶴港内におけるメイオベントスおよび自由生活性線虫類を用いた底質環境の評価法の有効性. *日本ベントス学会誌*, 63: 11-22.
- Tita, G., Desrosiers, G., Vincx, M., and Clement, M. 2002. Intertidal meiofauna of the St. Lawrence estuary (Quebec, Canada): diversity, biomass and feeding structure of nematode assemblages. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82: 779-791.
- 辻野睦・三好達夫・内田基晴. 2014. 18S rRNA 遺伝子による広島湾潮間帯における海産自由生活性線虫類の遺伝的解析. *日本水産学会誌*, 80: 16-20.
- Warwick, R. M. 1988. The level of taxonomic discrimination required to detect pollution effects on marine benthic communities. *Marine Pollution Bulletin*, 19: 259-268.

