

リアルタイムPCRの新たな可能性

増殖技術室 主任研究員 成田 公義

はじめに

リアルタイムPCR装置の概要については、当誌第5,6号でも紹介していますが、従来のPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）手法と比較すると目的DNAの検出がより迅速に、より定量的に検出できることが特徴です。魚病検査では、病原体のDNAが「あるか、ないか」だけでなく、「どの程度あるか」が従来法より短時間でわかります。

ヒラメでは、筋肉に寄生するクダア的一种（寄生虫）を原因とする食中毒がまれに発生しており、生食した場合に一過性の下痢や嘔吐が見られる場合があります。寄生虫が微量であれば食中毒にはならないため、ヒラメ筋肉1グラム当たり一定数以上の場合にクダア陽性と判断することとされています¹⁾。こうした検査では、目的生物由来のDNAを定量する必要があるため、リアルタイムPCRによる分析が行われます。

ここでは、リアルタイムPCRの特性を利用した、当所で現在行われているその他の試験について紹介します。

環境DNA分析

土壌や水中に含まれているDNAを検出し、それがどのような生き物由来なのかを調べることを環境DNA分析といいます。これはまだ新しい技術で、特定の生物のDNAを海や川の水から検出した初めての報告は2008年のイギリスの雑誌とされており、この数年で報告も増加し、様々な知見が蓄積され始めました。

いくつか例をあげますと、特別天然記念物であるオオサンショウウオの生息場所の特定、外来魚であるブルーギルがいる池の把握、河川に生息するコイの資源量推定などについて研究されています。その



写真 リアルタイムPCR装置

ほか、マアジでは海域での潜水による観測尾数の多さと、検出されるDNA量の多さが関連することが確認されており、漁業対象種や絶滅危惧種の資源量把握、保護などへの応用に期待が高まっています。また、面白いところでは、水族館の飼育水についてDNA分析を行ったところ、飼育している180種の魚種のうち93%もの魚種の検出に成功したそうです。この分析は次世代シーケンサーと呼ばれる別の装置を組み合わせで行っていますが、こうした環境DNA分析には高感度にDNA量を検出できるリアルタイムPCR装置が不可欠です。

当所では、リアルタイムPCRを使い、資源が減少しているマコガレイの資源量を環境DNAから推定する技術開発を行っています。現在のところ、2リットルの海水をろ過することで、魚の収容密度に応じたDNA量が検出されることや、100t水槽にたった1尾の魚がいるだけでも飼育水からDNAを検出できることがわかってきました。今後、実際に海域でマコガレイDNAの検出を試み、資源回復に向けた産卵場の特定や資源量推定への可能性について検討していくことにしています。

SNP (スニップ) 解析

DNA にはその生物の様々な遺伝情報が含まれていますが、非常に長い DNA 配列の中で、標準的な配列と比べると一つだけ塩基が異なる変異のことを **SNP (Single Nucleotide Polymorphism : 一塩基多型)** と呼びます。これにより個体差などの多様性が生じることがあり、特定の SNP が太りやすさやお酒の強さなどに関係していることがわかってきます。最近では、病気へのかかりやすさや薬の効きやすさなどを SNP で調べることが始められています。私たちは、この SNP 解析を用いて外来生物の迅速検出に取り組んでいます。

日本の里山に生息するドジョウは、皆さんが子供の頃から親しみのある魚のひとつだと思います。しかし、現在では食用や釣り餌用として輸入された中国由来のドジョウが、知らない間に自然水域に逃げ出して定着していることが、本県を含む全国各地で知られています(詳細は、当誌第 2 号)。このような外来生物の侵入は、現在様々なレベルで進行しており、その迅速かつ簡便な識別は地域固有集団の保全にとって非常に重要です。しかし、日本と中国産のドジョウは、外観から識別できず DNA 解析が必要ですが、長い DNA 配列を 1 個体ずつ調べるのは非常にコストと時間がかかるため、多数のサンプルを分析することはこれまで困難でした。

そこで、ドジョウの中国系統を迅速で比較的安価に識別するために、リアルタイム PCR を使った SNP 解析手法の開発に取り組みました。中国産のドジョウと日本のドジョウ DNA 配列を比較し、系統によって異なる SNP 部分を見つけ出し、それをリアルタイム PCR で検出しようと試みたのです。この結果、日本産と中国産は図のように分かれて表示されることで、サンプルがどちらであるかが判別できました。しかも、リアルタイム PCR を用いることで、数十個体のドジョウの鱗(ひれ)の一部から DNA を抽出しこのような結果を得るまで、1 時間以

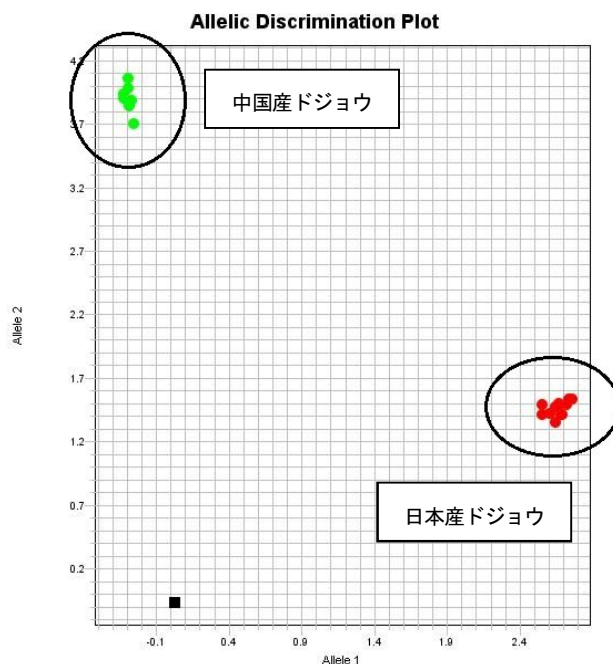


図 リアルタイム PCR によるドジョウの SNP 解析

(●: 日本産ドジョウ、●: 中国産ドジョウ、■: 対照、1 つの点が 1 個体を示す。)

内で実施可能となり、従来の方法と比べて、簡便、迅速、安価な分析法が開発できました。

おわりに

今回はリアルタイム PCR について紹介しましたが、最近では「デジタル PCR」と呼ばれるさらに高精度に遺伝子検出が可能な装置が出てきました。これにより、環境 DNA 分析などでは、さらに大きな進展が期待されます。遺伝子に関する研究は現在でも急速に進歩をしており、新しい技術が生み出され続けています。そういった中から、水産業への応用が可能なものを見だし、新たな技術として取り入れていきたいと考えています。

引用文献

1) *Kudoa septempunctata* の検査法について(暫定版)(平成 23 年 7 月 11 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知)。