

## 定量PCR を用いた有害ラフィド藻*Chattonella marina* および*Heterosigma akashiwo* 定量法の検討

向井, 幸樹  
九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室

太田, 耕平  
九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室 | 九州大学大学院農学研究院海洋生物学研究室 : 准教授

島崎, 洋平  
九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室 : 准教授

鵜木 (加藤), 陽子  
九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室

他

<https://doi.org/10.15017/1854040>

---

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 72 (2), pp.39-46, 2017-09-08. 九州大学大学院農学研究院

バージョン :

権利関係 :

## 定量 PCR を用いた有害ラフィド藻 *Chattonella marina* および *Heterosigma akashiwo* 定量法の検討

向井幸樹・太田耕平<sup>1</sup>・島崎洋平\*

鶴木(加藤)陽子・大嶋雄治

九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室

(2017年4月28日受付, 2017年5月10日受理)

Development of a Quantification Method of Harmful Raphidophytes  
*Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo* by the quantitative PCR assay

Koki MUKAI, Kohei OHTA<sup>1</sup>, Yohei SHIMASAKI\*, Yoko KATO-UNOKI and Yuji OSHIMA

Laboratory of Marine Environmental Science, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

### はじめに

*Chattonella marina* の 3 亜種 (*Chattonella marina* (Subrahmanyam) Y. Hara & Chihara var. *marina*, *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Y. Hara & Chihara var. *antiqua* (Hada) Demura & Kawachi, *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Y. Hara & Chihara var. *ovata* (Y. Hara & Chihara) Demura & Kawachi) (以下, *C. marina*) および *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada ex Y. Hara & Chihara (以下, *H. akashiwo*) は、いずれもラフィド藻綱に属する有害赤潮生物種である。過去には1972年の瀬戸内海播磨灘において、*Chattonella* spp. 赤潮による養殖ハマチの大量へい死が発生し、約71億円の被害を引き起こした (Okaichi and Yanagi, 1997)。また八代海、有明海および橘湾においても同赤潮が発生し、2009年に約29億円、2010年に約53億円と2年続けて甚大な漁業被害をもたらしている (鬼塚ら, 2011)。*H. akashiwo* も、鹿児島湾において1995年に約10億円の漁業被害をもたらし、2001年にも約1億円の漁業被害を引き起こした (村田ら, 2011)。

これら有害赤潮による漁業被害軽減のためには、現場赤潮藻の発生初期段階における広範なモニタリングが極めて重要であるが、低密度かつ多検体の海水サン

プルを顕微鏡観察により分析するには多大な労力を要する。近年、分子生物学的技術の飛躍的な向上により、定量PCRを中心とする遺伝子解析法を用いて、環境中に存在する特定の藻類種の遺伝子を高感度かつ高精度に検出することが可能となり、有害赤潮藻モニタリングへの応用が報告されている。Coyne *et al.*, (2005) は、有害ラフィド藻 *Chattonella subsalsa* および *H. akashiwo* の2種で、Kamikawa *et al.*, (2006) は、*Chattonella* spp. および *H. akashiwo* を含めた有害赤潮藻類の5種で、さらに Hosoi-Tanabe and Sako (2005) および Penna *et al.*, (2015) は、有毒藻類 *Alexandrium* 属において定量PCRによる遺伝子検出法を構築し、実環境中における遺伝子の定量を行っている。これらの手法は、従来の顕微鏡観察による計数法に比べて短時間で多検体を分析でき、藻類由来の遺伝子を高感度かつ高精度に検出できることから水産現場への普及が期待されている。

そこで本研究では、TaqMan probe法に基づいた定量PCRによる現場赤潮藻モニタリングを目指し、*C. marina* および *H. akashiwo* をターゲット種としたプライマーおよびプローブを新規に設計し、定量PCRにおけるそれらの増幅効率、種特異性および定量性を調べて両種の遺伝子検出系の構築を行った。

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院海洋生物学研究室

<sup>1</sup>Laboratory of Marine Biology, Faculty of Agriculture, Kyushu University

\*Corresponding author (E-mail: simasaki@agr.kyushu-u.ac.jp)

## 材料と方法

### 1. 供試株の培養とDNA抽出

国立研究開発法人国立環境研究所より *C. marina* (NIES-1) および *H. akashiwo* (NIES-10) の培養株を入手し、それらを改変 SWM3 培地 (Yamasaki *et al.*, 2007) を用いて定常期まで培養 (水温 25°C, 光強度 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 明暗周期 14 h : 10 h) した。その後、培養液約 20 ml を 50 ml 容のコニカルチューブに移して遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 室温) し、上清を約 49 ml 程度取り除いた後、ピペットを用いて沈殿物と残りの上清を 2 ml プラスチックチューブに回収した。最後に、遠心分離 (14,000 rpm, 3 分, 4°C) を行い、余分な培地を取り除いた後、細胞ペレットを DNA 抽出まで -30°C で保存した。DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN K.K, Tokyo) を用いて、プロトコールに従い細胞ペレットから DNA を抽出した。

### 2. プライマーおよびプローブの設計と種特異性の確認

*C. marina* および *H. akashiwo* のプライマーおよびプローブは、National Center for Biotechnology Information (NCBI, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より遺伝子情報を入手し設計した。プライマーおよびプローブの情報を Table 1 に示す。*C. marina* は、*C. marina* var. *antiqua*, *C. marina* var. *marina* および *C. marina* var. *ovata* の 3 亜種に共通する遺伝子配列を 6 株の遺伝子情報 (accession: AB334452, AB334462, JF907047, AB334476, AB334482 および JF907043) をもとにミトコンドリア DNA (mtDNA) の cytochrome c (*cyt c*) 領域から設計した。*H. akashiwo* は、

3 株に共通する遺伝子配列 (accession: KM588064, JX067555 および KF998565) をもとに internal transcribed spacer (ITS) 領域 (gene name: 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) から設計した。各種プライマーおよびプローブの種特異性は、ラフィド藻類 2 種 17 株、渦鞭毛藻類 9 種 9 株および珪藻類 3 種 3 株から前述の方法で抽出した DNA を定量 PCR に供することで確認した。DNA 量は、反応液当たり 1 ng に調整し、後述の条件で定量 PCR に供した。

### 3. 定量PCR条件

定量 PCR には、Mx3000P Multiplex q-PCR System (Agilent, Tokyo, Japan) を使用し、MxPro Software version 4.10 (Agilent, Tokyo, Japan) により Ct 値を算出した。PCR 反応液は、10  $\mu\text{l}$  の THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan), 6 pmol に調整した各 1  $\mu\text{l}$  の Forward および Reverse プライマー、4 pmol に調整した 1  $\mu\text{l}$  のプローブ、0.04  $\mu\text{l}$  の 50 $\times$  ROX, 5.96  $\mu\text{l}$  の滅菌水および 1  $\mu\text{l}$  のテンプレート DNA を混合し、1 サンプル当たり 20  $\mu\text{l}$  に調整した。PCR 反応条件は、95°C で 1 分間の熱変性後、95°C で 15 秒、60°C で 30 秒のサイクルを 40 回行った。

### 4. 検量線用サンプルの調製

*C. marina* および *H. akashiwo* 株から前述の方法で抽出した 1  $\mu\text{l}$  の DNA 溶液をそれぞれ 12.5  $\mu\text{l}$  の 2 $\times$  PCR buffer (TOYOBO, Osaka, Japan), 5  $\mu\text{l}$  の 2 mM dNTP (TOYOBO, Osaka, Japan), 各 0.75  $\mu\text{l}$  の Forward および Reverse プライマー (各 10 pmol), 4.5  $\mu\text{l}$  の滅菌水および 0.5  $\mu\text{l}$  の KOD FX (TOYOBO, Osaka, Japan) と混合し、1 サンプルあたり 25  $\mu\text{l}$  の PCR 反応液とした。次に、サーマルサイクラー (T-Gradient,

Table 1. Primers and probes used in this study.

Target species	Name	Sequence (5'-3')	Target site
<i>Chattonella marina</i>	<i>C. m</i> - Forward	TTGGGCTGTATTTATTACTG	Mitochondrial DNA cytochrome c region
	<i>C. m</i> - Reverse	GTTGGTAAAGAACTGGATC	
	<i>C. m</i> - Probe	56-FAM/CCTCCTCCT/ ZEN/ GCTGGGTCATAA/3IABkFQ	
<i>Heterosigma akashiwo</i>	<i>H. a</i> - Forward	GACCTTTGCTCCTTTGAC	Ribosomal RNA ITS region
	<i>H. a</i> - Reverse	AGCCATTTCTTCAACATCA	
	<i>H. a</i> - Probe	56-FAM/TAACACGCA/ZEN/ CAGTCGCAAGC/3IABkFQ	

BIOMETRA, Goettingen, Germany) を用いてPCR反応を行った。反応条件は、98℃で30秒の熱変性後、98℃で15秒、60℃で30秒、68℃で30秒の温度サイクルを40回行い、さらに68℃で5分間伸長した。その後、反応液をアガロース電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色後、UV照射により可視化した。そして単一のバンドをメスで切り出して1.5 mlチューブに移した後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) を用いて切り出したゲルからDNAを精製した。精製したDNAの濃度は、BioSpec-nano (SHIMADZU, Kyoto, Japan) を用いて測定した。さらに再度アガロース電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色後、UVを照射し、単一バンドを確認した。PCR産物中のコピー数は、計算ソフト (URL: [http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01\\_07.html](http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_07.html)) を用いて算出した。PCR産物のコピー数をもとに希釈系列 ( $10^3$  から  $10^9$  コピー) を作成し、検量線用のサンプルとした。

### 5. 1細胞当たりのコピー数の算出

*C. marina* および *H. akashiwo* 株を1.5 mlチューブに1,000および10,000細胞ずつ採取し、前述の方法でDNAを抽出後、定量PCRに供した。検量線用サンプルも同時に定量PCRに供して検量線を作成し、各サンプルのコピー数を算出した。最終的には、抽出した全DNA中のコピー数を算出し、添加した細胞数で除し、全サンプルの平均値を1細胞当たりのコピー数とした。

### 6. 増殖段階が異なる培養細胞を用いた定量性の検討

*C. marina* および *H. akashiwo* 株の初期細胞密度を100 cells/mlに調整し、60 mlの改変SWM3培地を用いて対数増殖期から衰退期まで培養した (水温25℃、光強度230  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期14 h : 10 h)。培養開始1日目と各増殖段階 (対数増殖期-一定期-衰退期) において2回ずつ培養液を採取し、光学顕微鏡観察による計数と定量PCRによる定量を行った。さらに、両手法により算出された細胞密度の関係をピアソンの相関係数の検定 (Statcel 3, OMS, Saitama, Japan) により分析した。

## 結 果

### 1. プライマーおよびプローブの種特異性

プライマーおよびプローブの種特異性を調べた結果をTable 2に示す。単細胞藻類29株 (ラフィド藻類2種17株、渦鞭毛藻類9種9株および珪藻類3種3株)

から抽出したDNAを用いた定量PCRにおいて、*C. marina*用プライマーおよびプローブは*C. marina*のみを、*H. akashiwo*用プライマーおよびプローブは*H. akashiwo*のみを検出した。両種のプライマーおよびプローブの組み合わせにおいて、本実験に使用した標的種以外の藻類に対する非特異的な遺伝子増幅は確認されなかった。

### 2. 検量線用サンプルの調製

検量線は、 $10^3$  から  $10^9$  コピーに調整したPCR産物を用いて作成した。その結果、両種ともに良好な標的遺伝子の増幅が認められた (Fig. 1)。 *C. marina* の検量線における相関係数 ( $R^2$  値) は0.991、PCR増幅効率率は80.0%であった (Fig. 2A)。 *H. akashiwo* の検量線の  $R^2$  値は0.998、PCR増幅効率率は82.6%であった (Fig. 2B)。なお、本実験において  $10^2$  以下のコピー数に関しては、PCR反応のサイクル数を増加させても遺伝子の増幅および蛍光の検出が確認されなかった。

### 3. 増殖段階が異なる培養細胞を用いた定量性の検討

顕微鏡観察による計数から得られた細胞密度と、定量PCRにより算出された細胞密度の結果をFig. 3に示す。定量PCRにより算出された *C. marina* の細胞密度は、顕微鏡観察により得られた細胞密度の概ね0.7から1.5倍の範囲であったが、23日目の *C. marina* の定量PCRによる定量値のみ、顕微鏡を用いた計数値の約4分の1であった (Fig. 3A)。定量PCRにより算出された *H. akashiwo* の細胞密度は、顕微鏡観察により得られた細胞密度の概ね0.6から1.05倍の範囲であった (Fig. 3B)。顕微鏡を用いた計数値と定量PCRにより算出された細胞数の間には、両種ともに有意な正の相関が認められ、両対数値の相関係数  $R^2$  値は0.84 (*C. marina*) および0.96 (*H. akashiwo*) であった (Fig. 4)。

## 考 察

本実験の結果、設計したプライマーおよびプローブにおいて、他種藻類由来の遺伝子に対して非特異的な増幅を起こさず、標的種である *C. marina* または *H. akashiwo* のみを検出できた。一般に、様々な生物が混在する現場サンプルを用いた定量PCRでは、種特異的な検出が極めて重要な課題となる。本法で採用した蛍光標識法の一種のTaqManプローブ法は、プライマーのみの選択性に依存するインターカラー法に比べて非特異的な遺伝子増幅に伴う蛍光値の増加が抑制される。また、本実験で使用したプライマーおよびプ

Table 2. Algal strains used in the species specificity check of primers and probes. “+” means PCR reaction positive. “-” means PCR reaction negative. In the list, 1 to 4 are raphidophytes, 5 to 13 are dinoflagellates, 14 to 16 are diatoms.

	Species	Isolation region (strain)	Primers and probe set	
			for <i>C. marina</i>	for <i>H. akashiwo</i>
1.	<i>Chattonella marina</i> (var. <i>antiqua</i> )	Harima-nada, Japan (NIES-1)	+	-
		Osaka Bay, Japan (NIES-2)	+	-
		Shodo-island, Japan (NIES-85)	+	-
		Hiroshima Bay, Japan (NIES-161)	+	-
		Ariake-sea, Japan (NIES-2509)	+	-
		Yatsushiro-sea, Japan (NIES-2511)	+	-
2.	<i>Chattonella marina</i> (var. <i>marina</i> )	Osaka Bay, Japan (NIES-3)	+	-
		Harima-nada, Japan (NIES-116)	+	-
		Kagoshima Bay, Japan (NIES-121)	+	-
		Hiroshima Bay, Japan (NIES-557)	+	-
		Kagoshima Bay, Japan (NIES-2513)	+	-
3.	<i>Chattonella marina</i> (var. <i>ovata</i> )	Tokyo Bay, Japan (NIES-2517)	+	-
		Harima-nada, Japan (NIES-603)	+	-
		Harima-nada, Japan (NIES-671)	+	-
4.	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Kagoshima Bay, Japan (NIES-1872)	+	-
		Harima-nada, Japan (NIES-10)	-	+
		Hakata Bay, Japan	-	+
5.	<i>Alexandrium catenella</i>	Harima-nada, Japan (NIES-675)	-	-
6.	<i>A. tamarense</i>	Okhotsk-sea, Japan	-	-
7.	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	Inokushi Bay, Japan	-	-
8.	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Uwa-sea, Japan	-	-
9.	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Asoura Bay, Japan	-	-
10.	<i>Karenia mikimotoi</i>	Imari Bay, Japan	-	-
11.	<i>Prorocentrum dentatum</i>	Sasebo Bay, Japan	-	-
12.	<i>P. minimum</i>	Hakata Bay, Japan	-	-
13.	<i>P. triestinum</i>	Hakata Bay, Japan	-	-
14.	<i>Chaetoceros muelleri</i>	The north pacific, USA (CCMP 1316)	-	-
15.	<i>Skeletonema marinoi-dohrnii</i> complex	Osaka Bay, Japan (NIES-324)	-	-
16.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Long Island, USA (CCMP 1335)	-	-

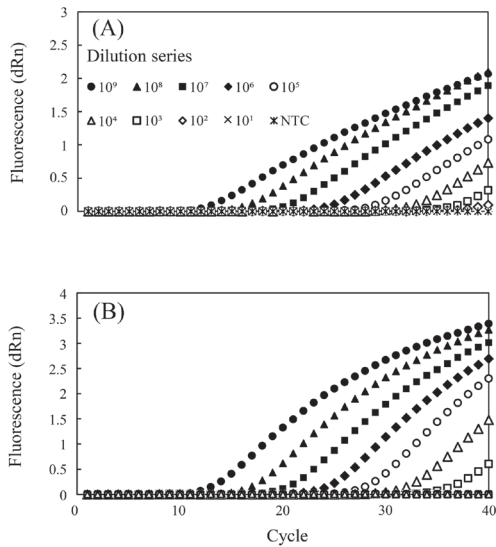


Fig. 1. Amplification curve of quantitative-PCR (QPCR) assay using 9-fold dilutions PCR products of *C. marina* (A) and *H. akashiwo* gene (B). NTC means no template control.

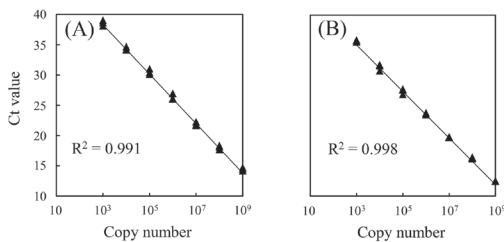


Fig. 2. Correlation of Ct value and copy number of target genes in *C. marina* (A) and *H. akashiwo* (B).

ローブは、NCBIに登録されている他種藻類や様々な生物群由来の遺伝子配列と一致せず、*C. marina*または*H. akashiwo*に種特異的な配列を探索し設計したため、高い種特異性が予測された。今回の結果から、渦鞭毛藻類や珪藻類だけでなく、同じラフィド藻綱に属し、近縁種である*C. marina*および*H. akashiwo*間においても、種特異的な遺伝子配列を標的とすることで両種の判別が可能となった。以上のことから、多種の藻類が混在する現場海水においても、本実験で使用したプライマーおよびプローブを用いることで標的の藻類由来

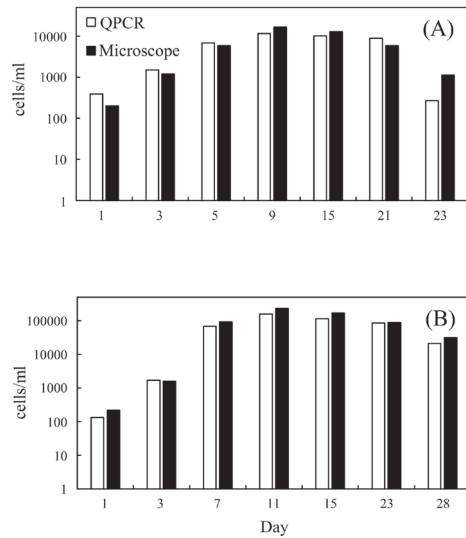


Fig. 3. Temporal change of cell densities calculated by microscopic observation and quantitative-PCR (QPCR) in *C. marina* (A) and *H. akashiwo* (B).

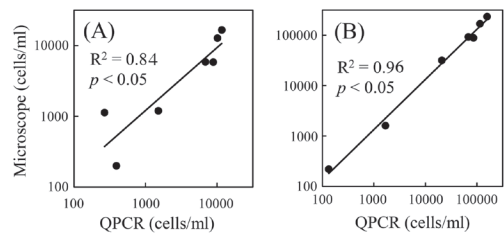


Fig. 4. Relation analysis between cell densities calculated by microscope and quantitative PCR (QPCR) in *C. marina* (A) and *H. akashiwo* (B) by Pearson's correlation coefficient test.

遺伝子を検出することが可能であると考えられた。

プライマー・プローブの選択において、定量PCRにおける高い増幅効率と定量性も極めて重要である。目的遺伝子断片の希釈系列を検量線サンプルとして用いた定量PCRの結果、両種ともCt値と遺伝子コピー数との間に高い直線性 ( $R^2$ 値  $> 0.99$ ) が確認され、PCR増幅効率も80%以上と良好な増幅が認められた。以上の結果から、今回用いた定量PCRの諸条件により両種の目的遺伝子の定量が可能であると考えられた。

室内培養系における増殖段階別の細胞を用いた実験

において、検鏡による細胞密度と定量PCRにより算出した細胞密度の間に有意な正の相関が観察されたため、抽出法を含めた本法による両種の定量の有用性が強く示唆された。一般的に植物細胞に含まれる多糖類やポリフェノールといった分子は、PCR反応を阻害すると言われている(Koonjul *et al.*, 1999)。吉川ら(2014)は、植物のDNA抽出に用いられる4つのDNA抽出キット【ISOPLANT, ISOPLANT II (NipponGene) およびDNeasy Plant Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)】を用いて4種の植物の花、茎、根および種子からDNAを抽出し、PCR増幅効率を比較した。その結果、DNeasy Plant Mini Kitにおいて最も優れたPCR増幅が認められている。我々の予備実験において10細胞という低い細胞密度においても本キットにより抽出したDNAを鋳型とした遺伝子検出が可能であった。以上の結果から、本キットから抽出したDNAを用いた現場モニタリングが可能であると考えられた。

既往の知見から、増殖段階や他の要因により遺伝子コピー数が変動する可能性が報告されている。高等植物のmtDNAにおいては、DNAの分子構成の変化(Kanazawa *et al.*, 1994)や細胞の成長に伴ってDNA量が減少すること(Fujie *et al.*, 1993, 1994)が報告されている。また、真核生物のrRNA遺伝子においても、染色体の高次構造の変化によりコピー数が変化すること(小林および赤松, 2013)、有毒渦鞭毛藻類*Alexandrium*属のrRNA遺伝子を標的とするFISH法を用いた実験系において、増殖後期から死滅期にかけて蛍光の検出感度が低下することが報告された(Anderson *et al.*, 1999)。一方でKamikawa *et al.*, (2006)の研究では、rRNAを標的とした定量PCRにおいて、培養段階における有害藻類5種(*C. marina*, *H. akashiwo*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Karenia mikimotoi* および*Heterocapsa circularisquama*)の顕微鏡による計数と定量PCRによる定量値に顕著な誤差は確認されなかったと報告している。本実験において、*C. marina*はmtDNAの*cyt c*遺伝子を、*H. akashiwo*はrRNA遺伝子のITS領域を標的としているが、前述のように検鏡および定量PCRにより算出した細胞密度の間に有意な正の相関が観察されたため、本定量法による両種のモニタリングが可能であると考えられた。一方で、特に*C. marina*の死滅期(23日目)においては、検鏡値(1,133 cells/ml)と定量PCR値(268 cells/ml)に約4倍と、死滅期におけるmtDNA量の減少に起因すると考えられる比較的大きな測定値の違いが観察された。室内培養環境下において、死滅期付近の細胞の遊泳能力は低

下しており、現場海域では既に底層付近に沈降している可能性が高く、今回観察された差異による現場モニタリングへの影響は少ないと予想されるが、赤潮の終息期における定量PCRによるモニタリングには一定の注意が必要であると考えられた。

本実験において、*C. marina*および*H. akashiwo*を標的種として新規にデザインしたプライマー・プローブのセットによる定量PCRの結果、両種に対する高い種特異性が確認された。したがって、本手法を用いて海水中に存在する両種細胞の定量が可能であると考えられた。今後は、本定量法を用いて現場海域での*C. marina*および*H. akashiwo*のモニタリングを行い、両種の発生动態の解析を行う予定である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、国立研究開発法人水産研究・教育機構の坂本節子博士(瀬戸内海区水産研究所)より*Gymnodinium catenatum*を、長井敏博士(中央水産研究所)および伊藤真奈博士(瀬戸内海区水産研究所)より*Alexandrium tamarense*の培養株をご提供いただいた。この場をお借りし、皆様へ厚く御礼申し上げます。

## 要 約

定量PCRを用いて、海水中に存在する有害ラフィド藻*Chattonella marina*および*Heterosigma akashiwo*遺伝子の検出法の検討を行った。プライマーおよびプローブ(TaqManプローブ)は、*C. marina*についてはmtDNAの*cyt c*領域に、*H. akashiwo*についてはrRNA遺伝子のITS領域に設定した。標的遺伝子の希釈系列を鋳型に用いた定量PCRの結果、高い増幅効率(*C. marina*: 80.0%; *H. akashiwo*: 82.6%)が確認され、さらにCt値と遺伝子コピー数との間に高い正の相関(*C. marina*:  $R^2=0.991$ ; *H. akashiwo*:  $R^2=0.998$ )が認められた。また、他種藻類(渦鞭毛藻、珪藻等)からDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて抽出したDNAに対して非特異的増幅を示さなかった。さらに両種を対数増殖期から衰退期まで培養し、検鏡および定量PCRによる細胞密度の定量を行った結果、両定量値間には有意( $p<0.05$ )な正の相関(*C. marina*:  $R^2=0.84$ ; *H. akashiwo*:  $R^2=0.96$ )が観察された。以上の結果から、DNA抽出から定量PCRに至る本法の有用性が強く示唆された。

## キーワード

ITS領域, *cyt c*領域, *Chattonella marina*, 定量PCR, *Heterosigma akashiwo*

## 文 献

- Anderson, D. M., D. M. Kulis and B. A. Keafer 1999 Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labeling intensity with physiological condition. *Journal of Phycology*, **35** : 870-883
- Coyne, K. J., S. M. Handy., E. Demir., E. B. Whereat., D. A. Hutchins., K. J. Portune., M. A. Doblin and S. C. Cary 2005 Improved quantitative real-time PCR assays for enumeration of harmful algal species in field samples using an exogenous DNA reference standard. *Limnology and Oceanography*, **3** : 381-391
- Fujie, M., H. Kuroiwa., S. Kawano and T. Kuroiwa 1993 Studies on the behavior of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (L.) Col. *Planta*, **189** : 443-452
- Fujie, M., H. Kuroiwa., S. Kawano., S. Mutoh and T. Kuroiwa 1994 Behavior of organelles and their nucleoids in the shoot apical meristem during leaf development in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, **194** : 395-405
- Hosoi-Tanabe, S and Y. Sako 2005 Species-Specific Detection and Quantification of Toxic Marine Dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* by Real-Time PCR Assay. *Marine Biotechnology*, **7** : 506-514
- Kamikawa, R., J. Asai., T. Miyahara., K. Murata., K. Oyama., S. Yoshimatsu., T. Yoshida and Y. Sako 2006 Application of a real-time PCR assay to a comprehensive method of monitoring harmful algae. *Microbes and Environments*, **21** : 163-173
- Kanazawa, A., N. Tsutsumi and A. Hirai 1994 Reversible changes in the composition of population of mtDNAs during dedifferentiation and regeneration in tobacco. *Genetics Society of America*, **138** : 865-870
- 小林武彦・赤松由布子 2013 核小体・rDNA 構造とリボソーム RNA 転写I—1リボソーム RNA 遺伝子の不安定性と生理作用—出芽酵母を中心にして一. 生化学, **85** : 839-844
- Koonjul, P. K., Brandt, W.F., Lindsey, G. G., Farrant, J. M 1999 Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Research*, **27** : 915-916
- 村田圭助・猪狩忠光・和田 実・上野 剛 2011 鹿児島県海域で発生する *Heterosigma akashiwo* の増殖に及ぼす水温・塩分・照度・シストの影響. 鹿児島水技研報第1号, **1** : 1-5
- Okaichi, T. and T. Yanagi 1997 *Sustainable Development in the Seto Inland Sea, Japan*. Terra Scientific Publishing Company (Tokyo). 251-304.
- 鬼塚 剛・青木一弘・清水 学・松山幸彦・木元克則・松尾 斉・耒代勇樹・西 広海・田原義雄・櫻田 清 2011 2010年夏季に八代海で発生した *Chattonella antiqua* 赤潮の短期動態—南部海域における出現特性—一. 水産海洋研究, **75** : 143-153
- Penna, A., F. Perini., C. Dell'Aversano., S. Capellacci., L. Tartaglione., M. G. Giacobbe., S. Casabianca., S. Fraga., P. Ciminiello and M. Scardi 2015 The *sxt* Gene and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins as Markers for the Monitoring of Toxic *Alexandrium* Species Blooms. *Environmental Science and Technology*, **49** : 14230-14238
- Yamasaki, Y., S. Nagasoe., T. Matsubara., T. Shikata., Y. Shimasaki., Y. Oshima and T. Honjo 2007 Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Marine Ecology Progress Series*, **339** : 83-92
- 吉川ひとみ・杉田律子・瀬戸康雄 2014 法科学的検査のための植物DNA抽出キットの比較. *The Japan Society for Analytical Chemistry*, **63** : 269-273



## Summary

We developed a quantification method of harmful raphidophytes *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo* using quantitative PCR from seawater sample. Primers and probes were designed from *cyt c* region of mtDNA in *C. marina* and ITS region of rRNA in *H. akashiwo* as target genes for quantitative PCR. High PCR amplification efficiency (80.0% in *C. marina* and 82.6% in *H. akashiwo*) and  $R^2$  value (0.991 in *C. marina* and 0.998 in *H. akashiwo*) between Ct value and gene copy number were observed in quantitative PCR using dilution series of the target gene fragments from  $10^3$  to  $10^9$  copies. Then, we confirmed the species selectivity of the designed primers and probes by quantitative PCR using DNA samples extracted from other algal species. In addition, we checked the accuracy of quantitative value of present method including extraction using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) using cultured algal cells. As a result, non-specific gene amplification was not detected in DNA samples extracted from other algal species tested. Also, there were significant relation between quantitative values of cell densities by microscopic observation and quantitative PCR in *C. marina* ( $R^2=0.84$ ;  $p<0.05$ ) and *H. akashiwo* ( $R^2=0.96$ ;  $p<0.05$ ) through the growth phase. These results strongly suggested the application of the present method to field monitoring of *C. marina* and *H. akashiwo*.

**Key words:** *Chattonella marina*, *cyt c* region, *Heterosigma akashiwo*, ITS region, quantitative PCR