環境 DNA 分析におけるプライマー設計

（一財）九州環境管理協会　環境部環境技術課　**大井　和之**

1．はじめに

DNA は生物の細胞内に普遍的に存在する物質であり，個々の生物が固有の塩基配列を持っているため，適確な分析を行うことで多くの情報を得ることができる。しかし細胞内に存在する遺伝情報の総体である「ゲノム」を構成する DNA の塩基配列の長さは 107～1011 塩基対のオーダーであり，全長を解読することは技術的には可能であるが非常なコストと時間がかかる。まずは 102～104 塩基対程度の長さの領域に対象を絞って分析するのが普通である。

ゲノムの塩基配列の大部分は個体間あるいは近縁な生物種間では違いがない。ゲノムの 109 塩基対の百万分の 1 しかない分析対象の 103 塩基対を選ぶ時に，もし調べたい生物と比較対象との間で相違が全く無い領域を選んでしまったら情報量は 0 になってしまう。逆に配列の相違が大きくなりすぎるとそもそも「相同」な領域を比較しているのかどうかわからなくなる。適確な分析のためには相同性が保証されていて変異が十分にある領域を探す必要がある。

環境調査において DNA 分析で調べたいことは大きくわけて 4 つある（**図 1**）。調査対象によって分析方法はいくらか異なるが，いずれの場合でも，試料から DNA を抽出し PCR を行うという最初のステップは共通している。この PCR で用いられる「プライマー」とよぶ 20mer 程度の合成 DNA（2 種類で 1 対）が分析対象となる領域を規定するキーとなる。

プライマーの塩基配列の選択が分析の成否を左右するにもかかわらず，プライマー設計に決定版のマニュアルがない。普遍的なプライマーが使える場合や調査対象についてすでに論文等でプライマー配列が報告されている場合は，まずその配列を試してみることになるが，本調査の前に予備調査としてプライマーの検証が必要であり，プライマー設計の考え方を知らないといけない。本報告では，プライマー設計の基礎的知識を整理し，これまでに筆者が実施したプライマー設計の実例を紹介する。理論的，技術的な詳細は末尾の参考文献を参照していただきたい。

知りたいこと：種名（種の同定）
試料：個体（標本），単離培養株
使用：普遍的なプライマー
方法：塩基配列解析（シーケンス）

知りたいこと：集団の由来・構造
試料：個体（標本）［複数サンプリング］
使用：種内多型を検出する特異的プライマー
方法：塩基配列多型解析（SSR, SNP など）

知りたいこと：分布（生息の有無）
試料：痕跡（糞，毛），環境水，土
使用：対象種特異的なプライマー
方法：PCR 増幅の有無，定量 PCR

知りたいこと：生物相
試料：水，土，プランクトン等の混合試料
使用：普遍的なプライマー
方法：DGGE，次世代シーケンサー

図 1　DNA 分析の調査対象と方法

２．分子進化遺伝学の基礎

２．１　塩基置換と挿入欠失

親から子へと世代が引き継がれていく中で, DNA に突然変異が起こり塩基配列が変化することがある。配列中の 1 つの塩基が別の塩基に換わることを塩基置換という。また，配列の一部分が欠落したり余計な塩基が付加したりすることを挿入欠失という。

DNA のうちタンパク質をコードしている遺伝子部分では, DNA の 3 塩基がタンパク質を構成するアミノ酸の種類 1 つを定めている（コドン)。タンパク質を構成するアミノ酸は 20 種類であり，3 塩基の組み合わせは 43=64 種類あるため，塩基置換がおきた時にアミノ酸が変化する場合と変化しない場合がある。アミノ酸が変化する塩基置換を非同義置換，変化しない置換を同義置換(synonymous substitution)とよぶ。非同義置換では，アミノ酸が変化してタンパク質の機能が十分で無くなった場合，変化していない個体に比べて生存に不利になって子孫を残しづらくなり，変異が集団から排除される可能性が高い（機能的制約)。同義置換では作られるタンパク質の構造は変わらないので，機能的制約を受けない進化的に中立な変異になる。中立な突然変異は，集団中のどの個体で発生した突然変異も 1/(集団サイズ)の確率で集団中に定着するため, 集団サイズ（個体数）にかかわらず, 突然変異率と同じ速度で変異が集団に定着する。すなわち，同義置換の分子進化速度は DNA の突然変異率できまり，2 つの生物の塩基配列を比較した場合，共通祖先が古いほど配列の違いが多くなる。これを分子時計という。同義置換の平均的な分子進化速度は**表１**のように生物の種類と核ゲノムか細胞内小器官のゲノムかによって異なる。ただし，塩基置換の突然変異発生率は A,C,G,T のどれからどれに変化するかによっても異なり，配列上の塩基の位置によってかなりばらつきがある。

遺伝子がコードされていない部分では，挿入欠失がよく見られる。遺伝子部分では挿入欠失が起こるとタンパク質のアミノ酸配列が大きく変化してしまうため有害な突然変異となって変異が定着しないが，非コード部分では挿入欠失に機能的制約を受けない場合が多く変異が定着しやすい。また，1～数塩基の並びが複数回繰り返している配列（short tandem repeat）があると，その繰り返し回数に変化が起きやすい（突然変異率が高い）ことも知られている。

表１　同義置換の平均的分子進化速度

	ゲノムの種別	およその進化速度
動物	核	～ 5×10^{-9}(置換/座位/年)
	ミトコンドリア	～50×10^{-9}(置換/座位/年)
植物	核	～10×10^{-9}(置換/座位/年)
	葉緑体	～ 2×10^{-9}(置換/座位/年)
	ミトコンドリア	～0.5×10^{-9}(置換/座位/年)

２．２　配列の相同性とアライメント

2 つの生物の共通祖先が持っていた 1 つの塩基配列が，世代を繰り返して変異を蓄積しそれぞれ異なった塩基配列になった時，これを相同な配列という。実際には，過去の生物の塩基配列を直接調べることはできないし，変異の蓄積過程を見ることもできなくて，現在の生物の塩基配列を分析して相同であるかどうか判断する。ゲノム上の遺伝子の並びは，大きな位置の変更（転座）がおこるので相同性の確認には使えない。現生の 2 つの生物の塩基配列を比較して，一部だけが異なっていて多くの部分が同一であればその領域は相同であると考えられる。特に遺伝子をコードしている領域では非同義置換が起こりにくいので，同一遺伝子を相同として取り扱う。

2 つの塩基配列の長さが異なる場合は、配列のどこかにギャップを入れて挿入欠失の位置を推定する必要がある。これを塩基配列の整列（アラインメント）という。整列は 2 つの塩基配列の違いの大きさ（距離）を塩基置換数とギャップの数，ギャップの重み付け係数を用いて表し，距離が最小になるギャップの位置を探索する。実際に解析する際には，複数の塩基配列を同時に整列するマルチプルアラインメントも含めて，塩基配列を整列するためのコンピュータプログラムが利用できる。

２．３　保存領域と易変領域

複数の生物から得た塩基配列を整列してみると，**図２**のように塩基置換がたくさん起こっている領域とあまり

起こっていない領域があることがわかる。タンパク質のアミノ酸配列にかかる機能的制約の大小によって非同義置換の起こりやすさが変わる。リボゾーム RNA 遺伝子でも，RNA の立体構造に対応して変化しやすい領域とほとんど変化しない領域がある。また，図 2 のように非コード領域でも DNA 複製等の制約により配列に変化が起こりにくい部分がある。生物間で配列がほとんど違わない領域を保存的（conservative）といい，変化しやすい領域を variable という。

図 1 で示した「普遍的 universal なプライマー」は保存領域に設計されたプライマーである。保存領域の塩基配列は多くの生物に共通であるため，たとえ対象生物の塩基配列がわかっていなくても使用可能と考えられる。一方，「特異的 specific なプライマー」は対象生物ごとに特有の配列を見つけ出して設計する必要がある。

3． DNA 分析の方法

3．1　通常の PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応は，試料 DNA に耐熱性 DNA 合成酵素 (Taq polymerase)と 1 対の 20 塩基程度の合成 DNA（プライマー）を添加し，サーマルサイクラーによって温度を変化させて，DNA2 本鎖の解離，プライマーとの対合，相補 DNA 鎖の合成を連続的に行うものである。30～40 回温度変化を繰り返すことで 2 つのプライマーと対合する部分に挟まれた DNA 断片だけを試料 DNA の 100 万倍程度に増幅する。

加熱されて 1 本鎖に解離した DNA は，配列固有の温度（Tm）付近まで温度が下がるとプライマーと相補する DNA が対合する（アニーリング）。プライマーと試料 DNA の間に 1～数塩基のミスマッチがあっても，アニーリング温度を下げると対合が起こる。このため，普遍的なプライマーを使用する際はアニーリング温度を Tm よりも 10℃程度低い 45～50℃付近にすることが多い。一方，特異的なプライマーを使用する際はアニーリング温度は Tm と同じ 60℃付近に設定する。

3．2　定量 PCR

定量 PCR は，PCR で DNA 合成が行われる際に蛍光色素を取り込ませ，1 サイクルの反応ごとに蛍光を測定して反応で生成した DNA の量を測定するものである。反応チューブの上から紫外線を照射し蛍光を測定することができる専用のサーマルサイクラーを使用する。開始時に反応液中に含まれる対象領域の DNA 量が多いと早いサイクルから蛍光が観測され，少ないと 20～30 サイクルの後にようやく蛍光が観測される。一定強度の蛍光が観測されるサイクル数と DNA 濃度の対数が比例関係になることが知られている。

定量 PCR に用いるプライマーは検出対象とする生物に特異的なもので，生成する DNA 断片が 200 塩基対程度の長さになるように設計する。定量 PCR は病原微生物の検査にも使われ，プライマーを含む試薬が全てセットされたキットが市販されている。

3．3　シーケンス

種の同定を行う際は，普遍的なプライマーで増幅した DNA 断片の塩基配列を解析（シーケンス）する。種名が明らかな参照標本がある場合は，参照標本からも同様にシーケンスして比較し，配列が一致したものに同定する。参照標本がなくても，DNA データバンクに登録されている配列を検索して同定することが可能である。塩基配列

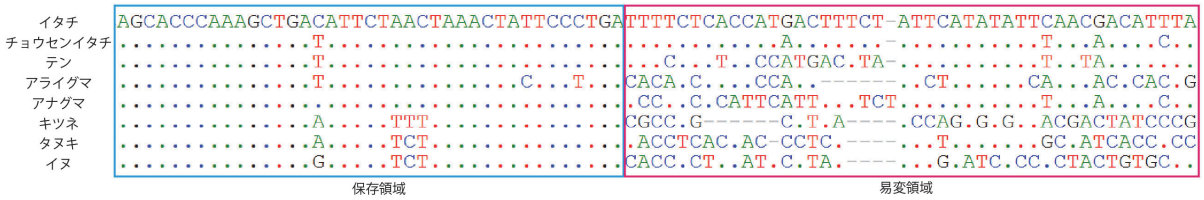


図 2　保存領域と易変領域

中型哺乳類のミトコンドリア DNA の D-Loop 領域（非コード部分）の一部を表示（大井(2013)を改変）

情報を用いて種の同定を行うことを DNA バーコーディングといい，参照用の塩基配列データベースが整備されつつある。

効率的な DNA バーコーディングを行うためには，普遍的なプライマーで挟まれた易変領域の塩基配列情報が蓄積される必要がある。例えば真核生物のリボソーム DNA は 18S-5.8S-28S という 3 つの保存性が高い機能部分の間に ITS という易変領域が含まれている（**図３**）。このため，保存的な 18S リボソーム DNA 領域と 28S リボソーム DNA 領域に設計された普遍的プライマーを使用して，多くの生物の易変領域の配列を調べることができる。また，動物のミトコンドリアゲノムでは**表１**に示したとおり塩基置換速度が速いため，近縁な種間でも塩基置換が起こりやすい。このミトコンドリアゲノムにコードされているチトクローム C 酸化酵素遺伝子（COI）は呼吸に必要な酵素で機能的制約が強いため，非同義置換がほとんど起こらない保存的な領域に設計された普遍的なプライマー（LCO1490 と HCO2198）で脊椎動物も無脊椎動物も DNA を増幅でき，約 650 塩基のシーケンスが得られる。植物では，葉緑体ゲノムの遺伝子（matK と rbcL）が DNA バーコーディングに用いられるが，動物に比べて塩基置換速度が遅く，近縁種の区別が難しい場合もある。（Ooi ら(1995)，日本バーコードオブライフ・イニシアティブ http://www.jboli.org/）

４．プライマー設計の手順

４．１　DNA データバンク

調査で DNA 分析を行う際には，まず先行研究や参照データの有無を確認する必要がある。研究で解析された DNA 配列はたいていの場合，論文公表時に DNA データバンクに登録することが義務づけられているため，DNA データバンクを検索すれば確認できる。DNA データバンクは，日米欧のデータが共通化されており，日本の DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録したものも米国の Genbank に登録したものも同じように検索できる。ここでは，米国 NCBI のサイト（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）を使用して検索し，特異性の異なるプライマー2 組を設計した実例を紹介する。

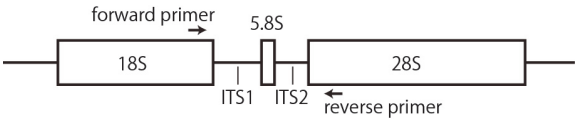


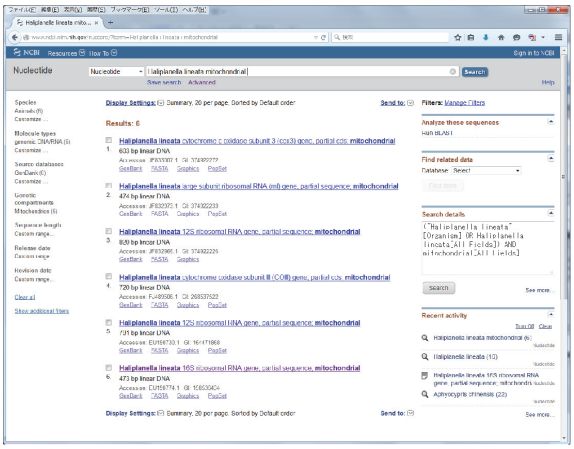
図３　真核生物リボソーム DNA の構造

検索する際は，まずは学名を検索窓に入れて検索してみると，対象種に関して登録されている配列の一覧が得られる。例えばタテジマイソギンチャクの学名 *Haliplanella lineata* を検索すると 16 個の配列が登録されている。このうち，ミトコンドリアゲノムの塩基配列は 6 個であった（**図４（ａ）**）。続いて，近縁な種から少し遠縁のものまで，対照種があれば種名で，なければ属名や科名，目名で検索して，登録数の多い遺伝子領域を確認する。イソギンチャク類ではミトコンドリアゲノムの 16S リボソーム DNA 遺伝子領域が様々な種から登録されていた。**図４（ｂ）**はタテジマイソギンチャクの 16SrDNA の登録配列を表示したところである。必要な塩基配列データは，それぞれファイルをダウンロードしておく。

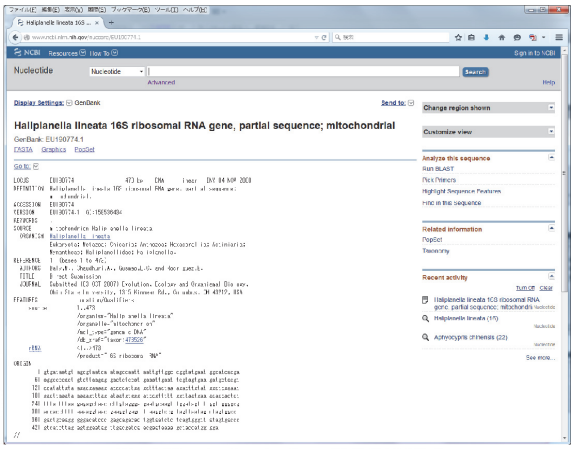
４．２　Primer 設計ツール

DNA データバンクからダウンロードした塩基配列から，定量 PCR で使用するための対象種特異的なプライマーを設計する。プライマー設計には Primer3Plus（http://primer3plus.com/）という Web アプリケーションを使用する（**図４（ｃ）**）。

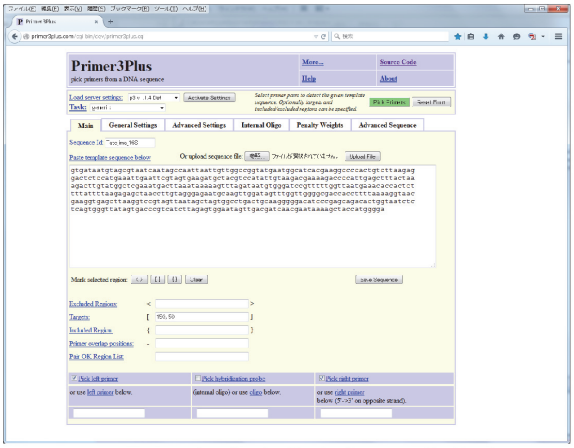
タテジマイソギンチャクの 16SrDNA の配列を Primer3Plus に入力し，定量 PCR による遺伝子の検出に適した設定でプライマー候補を探索する。この際，Primer3Plus の探索条件はタカラバイオの「リアルタイム PCR 実践編－プライマー設計ガイドライン－」（http://www.takara-bio.co.jp/prt/pdfs/prt3-1.pdf）などを参考に設定する。



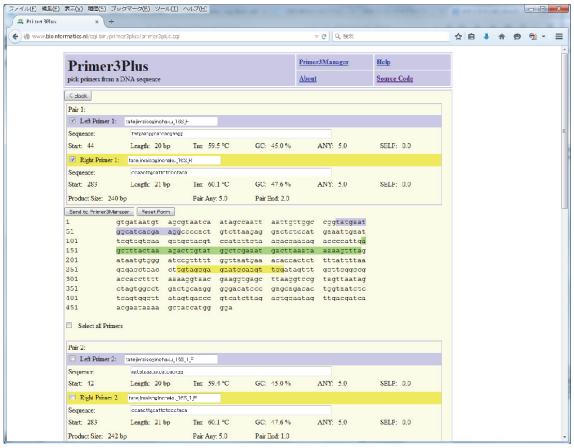
(a) Genbank でタテジマイソギンチャクのミトコンドリア DNA 配列を検索



(b) タテジマイソギンチャクの 16SrDNA 配列を表示



(c) Primer3Plus にタテジマイソギンチャク 16SrDNA 配列を入力



(d) Primer 候補配列の表示

図４　Genbank と Primer3Plus の使用例

探索の結果 5 組の候補が表示される（**図４（d）**）。候補配列の多くは重複しているので，Tm や GC 含量，末端の塩基配列などを考慮して候補を絞り込む。また，Target 領域を変更して別の領域でもプライマー候補を探索する。

４．３　配列エディタとアラインメント

DNA データバンクからダウンロードした対象種および近縁種の塩基配列は，配列エディタ BioEdit（http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html）と配列エディタから呼び出して使用するアラインメントアプリケーション（CLUSTAL W）で整列を行う。イソギンチャク類について 16SrDNA を整列した結果を**図５**に示す。整列した塩基配列にプライマー候補の位置をあてて，対象種以外の種にも塩基置換が少ない保存的な領域であった場合は，そのプライマーは universal なプライマーになることが予想される。一方で，対象種以外の種とは配列が異なれば，対象種に specific なプライマーとして使用できる。**図５**では 2 組のプライマー候補を表示しているが，このうち赤色で表示した tatejima_F と tatejima_R の組はタテジマイソギンチャク特異的なプライマーである。一方，青色で表示した isogin_F と isogin_R の組はタテジマイソギンチャクだけでなく，ウメボシイソギンチャク科の 7 種も配列が完全に一致しており，イソギンチャク目の中で足盤族というグループの多くの種がこのプライマーで増幅できる可能性が高い。

４．４　PCR による確認

プライマーの特異性の検証には，DNA データバンクに登録されている配列の中から候補配列と一致する配列を検索する BLAST 検索を行う方法もあるが，野生生物の検出や同定に用いる場合はまだまだデータバンクの登録

①タテジマイソギンチャク（タテジマイソギンチャク科），②クロガネイソギンチャク，③モエギイソギンチャク，④ヨロイイソギンチャク，⑤ヒメイソギンチャク，⑥Bunodosoma 属，⑦Epiactis 属，⑧ウメボシイソギンチャク（②～⑧ウメボシイソギンチャク科），⑨オヨギイソギンチャク（別の族），⑩ヒメハナギンチャク（別の目）

図５　整列した塩基配列とプライマー候補の位置

数は少ない。最終的には候補となるプライマーいくつかを，標本から抽出した DNA や環境試料から抽出した DNA でテストして，良い結果をあげたものを採用する。

表２の 2 組のプライマーで，海洋の動物プランクトン試料（70%エタノールで固定）から抽出した DNA を鋳型に PCR 反応を行った結果を**図６**に示す。タテジマイソギンチャク特異的なプライマー（tatejima_F/R）では 7 月と 8 月の試料からのみ検出されているのに対し，イソギンチャク類一般のプライマー（isogin_F/R）では 6～11 月と 1～3 月と長い期間 DNA の増幅がみられている。プライマーisogin_F/R で増幅される DNA 断片は約 200 塩基対と短いが，図 5 で示したように易変領域を含んでいるので，塩基配列を調べればウメボシイソギンチャク科であるかどうか程度は判定できる。

表２　イソギンチャク類検出用のプライマー配列

Name	Sequence
tatejima_F	TATGAATGGCATCACGAAGG
tatejima_R	CCAACTTGCATTCTCCCTACA
isogin_F	AAGACGAAAAGACCCCATTG
isogin_R	CCCCAACCAAACTATCCAAC

５．おわりに

海生生物で，成体はあまり移動しないが幼生の時期にプランクトンとなって広く移動するものが多数ある。これら浮遊幼生は形態的特徴が乏しいため，近縁な種類を顕微鏡下の観察で区別することは難しい。プランクトンネットを曳いて採集した試料から DNA を抽出し，種特異的プライマーを用いた PCR により検出を行えば，形態では区別できない特定の種の幼生が出現しているかどうかを判定することが可能になる。現在，ここで報告したイソギンチャク類だけでなく，貝類や甲殻類等の定量 PCR による分析方法の開発と検証に取り組んでいる。

DNA 分析は，プライマーの設計や分析方法の工夫で様々なことができる。課題に応じたプライマーの設計や分析手法の選択ができる高い技術力を磨いて，自然環境調査に対する社会的要請に応えていきたい。

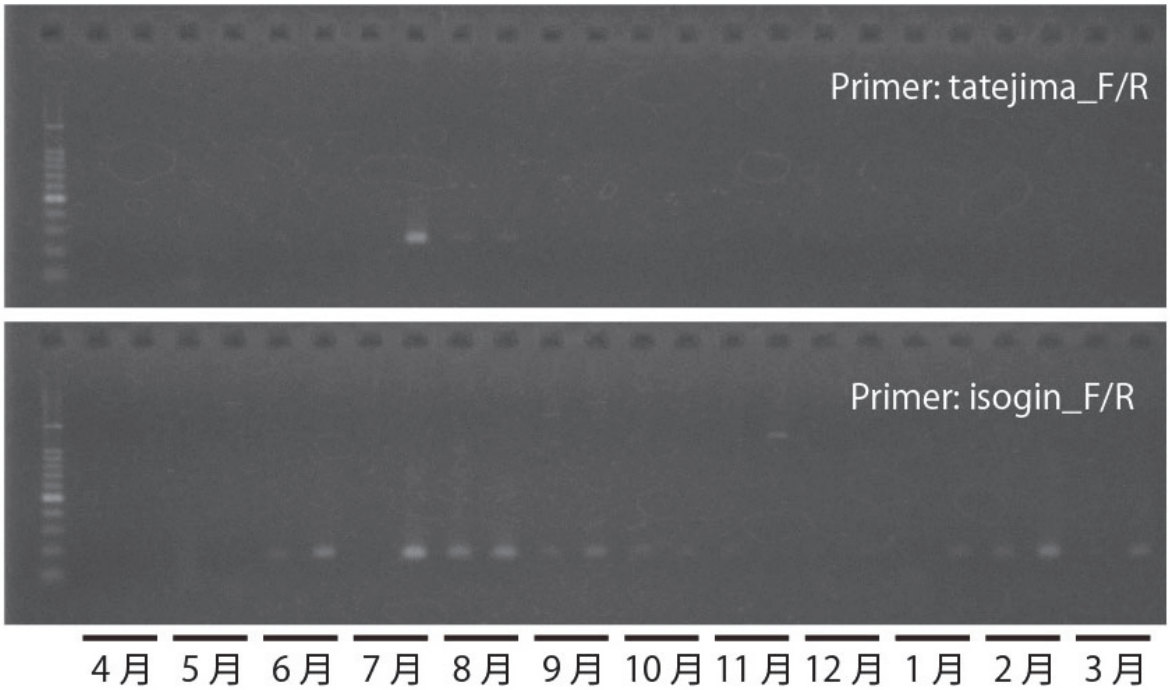


図６　イソギンチャク特異的 DNA の検出状況

参考文献

1）大井和之(2013) “中型哺乳類の糞の DNA 分析” 環境管理 42, 36-42.

2）Ooi, K. et al. (1995) “Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene matK from angiosperm plants” J. Jpn. Bot., 70, 328-331.

3）根井正利（五条堀・斉藤訳）(1990) 「分子進化遺伝学」培風館

4）津村義彦・陶山佳久（編）(2012)「森の分子生態学２」文一総合出版

5）井鷺裕司・陶山佳久(2013)「生態学者が書いた DNA の本」文一総合出版