

# 北海道産コンブ属7種のミトコンドリアDNA解析

清水健志, 大坪雅史, 青木 央, 宮崎俊一

## Mitochondrial DNA Analysis of Seven Laminarian Species from Hokkaido

Takeshi Shimizu, Masashi Ootsubo,  
Hiroshi Aoki and Syun-ichi Miyazaki

### 要 旨

北海道沿岸で採集されたコンブ属7種（マコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブ, ガッガラコンブ, オニコンブ, ホソメコンブ, リシリコンブ）のミトコンドリアDNAの塩基配列について解析を行ったところ, 16S rRNA遺伝子上流の非コード領域内に欠失・挿入による変異が見られ, 4種（マコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブ, ガッガラコンブ）をそれぞれ単独に, 3種（オニコンブ, ホソメコンブ, リシリコンブ）を1グループとして区別することができた。

コンブ属は, 北海道の重要な水産資源のひとつである。コンブ属には様々な種があり, それぞれの種が地域特産ブランドとして確立している。しかしながら, 細断, 粉碎, 乾燥等の加工処理が施された製品では, 外観のみで種類を区別することが困難になるため, 生産者や消費者から客観的な種判別法の開発についての要望が高まっている。

近年では, 外見上の判別が困難な農水産物に対して, DNA解析技術による種判別法が利用され始めている。しかしながら, コンブ属においては, これまでに報告されている塩基配列情報が少ないため, DNA解析技術による種判別は困難であった。そのため, コンブ属の遺伝子情報を蓄積していくことが重要な課題となっている。

本研究では, 北海道産コンブ属であるマコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブ, ガッガラコンブ, オニコンブ, ホソメコンブ, リシリコンブの7種について, ミトコンドリアDNA (mtDNA) の解析を行った。

試料として, マコンブは2003年7月に南茅部町, ミツイシコンブは2003年9月に様似町, ナガコンブとガッガラコンブは2003年7月に根室市, オニコンブは2003年6月に羅臼町, ホソメコンブは200

3年6月に松前町, リシリコンブは2003年6月に稚内市のそれぞれ沿岸で採集されたものを用いた。試料からのtotal DNAの抽出は, 市販キットのDNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) を用いて行った。さらに, 市販キットのGENECLEAN SPIN KIT (Qbiogene) を用いて精製を行った。

次に, total DNA を鋳型としたPCRにより, mtDNAの16S rRNA遺伝子上流の非コード領域を含んだ部分配列を増幅した。プライマーには, *Laminaria digitata*の塩基配列データを参考に設計したユニバーサルプライマー, LamF1及びLamR1を用いた。PCRによる増幅が確認されない場合は, ユニバーサルプライマー, LamF2及びLamR2を用いたNested PCRにより増幅を行った。DNA polymeraseには, KOD Dash (東洋紡) を用い, サーマルサイクラーには, GeneAmp PCR System 9600 (PE Biosystems) を用いた。PCRの条件は, 95°C3分のプレヒート後, 95°C30秒, 55°C2秒, 72°C30秒を30サイクル行い, 最後に72°C7分の伸長反応で行った。

得られたPCR産物の塩基配列の解析は, ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により行った。プライマー

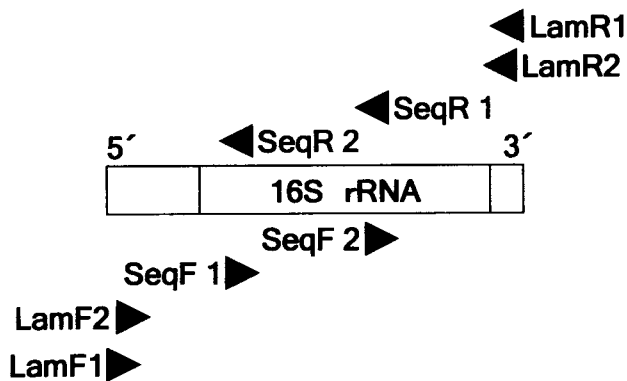


図 1 プライマーの位置

表 1 プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
LamF1	5'- GTGGTCGAGTGGTTTATGGC-3'
LamR1	5'- GCTTGAATAAGTTTATGCCTC-3'
LamF2	5'- GGGTTCAAATCCCACCTTATCC-3'
LamR2	5'- GGATTTGAACCTACGACC-3'
SeqF1	5'- CAATGATGCTTAGTTGGTCTGA-3'
SeqF2	5'- AAATCAACGGAATTGGCGG-3'
SeqR1	5'- CTACCTTCTCCCGCTTAGC-3'
SeqR2	5'- ACAACCTAAGCCTTCAATCCC-3'

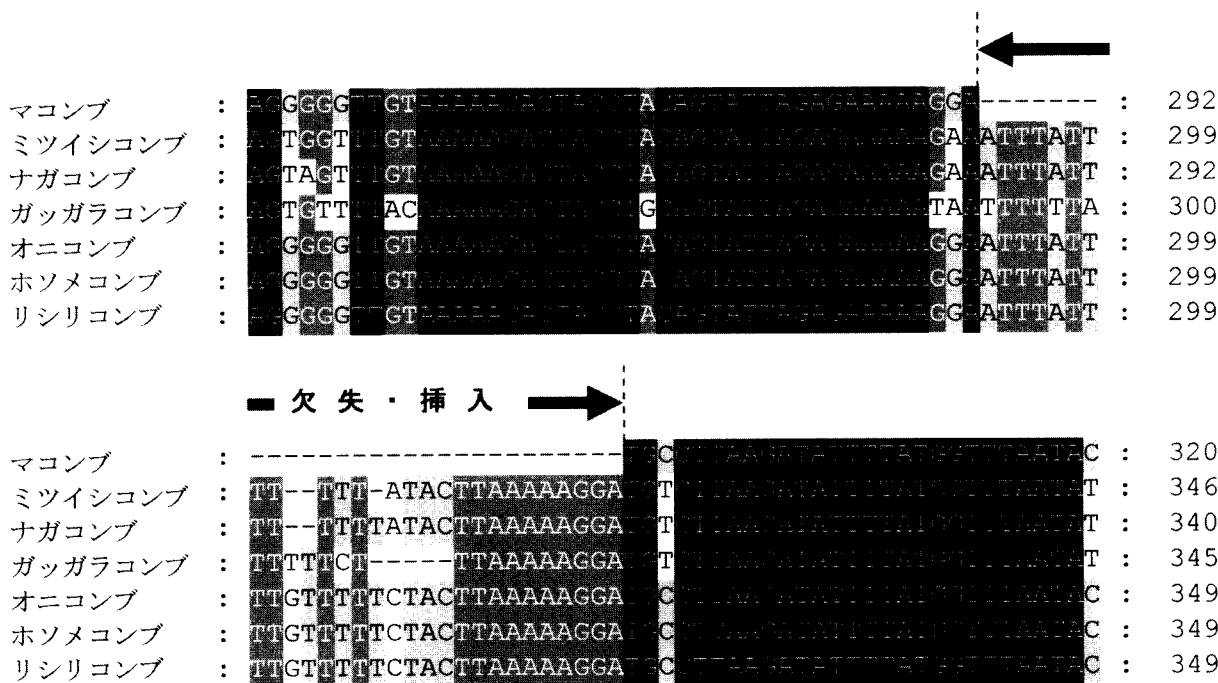


図 2 コンブ属 7 種の mtDNA 塩基配列の比較

には、新たに設計したユニバーサルプライマー SeqF1, SeqF2, SeqR1, SeqR2を用いた。PCR及びシーケンシングで使用したそれぞれのプライマーの位置及び塩基配列を、図 1及び表 1にそれぞれ示した。

PCRにより、7種全てから約2.1kbpのPCR産物が得られ、それぞれの塩基配列について決定し、比較解析を行った。その結果、16S rRNA遺伝子上流の非コード領域内において、7種間で塩基の欠失・挿入を伴った変異が確認された(図2)。

特に、マコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブの4種で見られたそれぞれの変異

は、種特異的であることが分かった。また、オニコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブの3種については、3種間の塩基配列に明瞭な差を見出すことはできなかった。コンブ属の種については、マコンブ、オニコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブを同種とする見解もあり、本研究においてオニコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブの3種とマコンブとの間に違いが見られたことは非常に興味深い。今後、コンブ属の塩基配列の解析について、個体間あるいは地理的な変異の検討も必要であり、このような塩基配列情報の蓄積は、DNA解析による種判別法の開発に貢献するものと考え

る。

### 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、試料の採集にご協力していただいた、渡島西部地区、根室地区、日高地区、稚内地区水産技術普及指導所並びに南茅部町役場に心から感謝いたします。