

2. 道南産マコンブのブランド強化のための DNA 分析技術の開発

食産業技術支援グループ

○清水健志

1. はじめに

道南地域に生息するマコンブは、旨味の強いコンブとして高値で取引されており、安定供給が可能な養殖生産技術が確立されている。中国や韓国でもマコンブが生産されているが、これらに比べて道南産のブランド価値は高く、地域コンブ製品の付加価値向上に貢献している。また、これまでマコンブと別種とされてきたホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブは、近年の DNA 分析等の知見から、特徴が異なるマコンブ（マコンブ変種）と分類されている。道南産マコンブを差別化できる技術の開発は、これまでに築いてきた道南産マコンブのブランド力の向上に繋がると考えており、今後、道南地域のコンブ関連産業の持続的な成長に重要である。

当センターでは、道南産マコンブのブランド力の強化を目的に、産地の判別や有用個体の探索に利用できる DNA 分析技術を開発してきた。本研究では、これらの技術普及を目的に、高価な分析機器を使用しない迅速な識別技術の開発に取り組んだ。

2. 研究開発の背景と目的

2.1 マコンブの産地判別法の開発に関する取り組み

我々が開発したマコンブの産地判別法は、ミトコンドリア DNA にある NAD5 遺伝子の 4 ヶ所の塩基を指標に、日本産マコンブ（マコンブ変種を含む）を 100%、中国産を 96.5%、韓国産を 94.7% の判別率で判定できる方法である（表 1）。現在、(株)ファスマックでの受託検査サ

表1：マコンブの産地判別の指標に用いる塩基

マコンブ	NAD5遺伝子の塩基				判別率 (%)
	1182番目	1294番目	1355番目	1544番目	
日本産	C	G	C	C	100
中国産	T	G	C	C	96.5
	C	G	T	C	
韓国産	C	T	C	C	94.7
	C	G	C	T	

ービスに利用されている他、(独)農林水産消費安全技術センターでの食品表示の監視業務への導入が検討されている。一方、本判別法の普及における課題は、塩基配列の解読に高価な分析装置（DNA シーケンサー）を必要とすることである。そこで本研究では、DNA シーケンサーを使わない技術として、増幅の有無で 1 塩基を識別できる PCR 法の開発に取り組んだ。

2.2 養殖に有用な個体の探索技術に関する取り組み

上述の塩基配列は、マコンブとマコンブ変種を識別できないため、道南産の証明は困難である。しかし道南産マコンブに限定される塩基配列を持つ個体を探索し、養殖に利用することで、道南産を証明できるマ

★マコンブ : CTACAGTATTAGAG-----AAAAAGGATGC
マコンブ : CTACAGTATTAGAGAAAAAGGAATTTATTTTCTACTTAAAAAGGATGC
ホソメコンブ : CTACAGTATTAGAGAAAAAGGAATTTATTTTCTACTTAAAAAGGATGC
リシリコンブ : CTACAGTATTAGAGAAAAAGGAATTTATTTTCTACTTAAAAAGGATGC
オニココンブ : CTACAGTATTAGAGAAAAAGGAATTTATTTTCTACTTAAAAAGGATGC

図1：道南産マコンブの一部に確認される特異型の塩基配列

★で示した特異型のマコンブは、赤枠内の塩基が欠失している。

コンブの生産は可能と考える。これまでに解析した道南産マコンブのミトコンドリア DNA を個体レベルで比較すると、いくつかの個体で塩基配列に違いが見出されており、ミトコンドリア DNA 分析技術は有用個体の探索に有効と考えている。現在、道南産マコンブの一部に見られる塩基配列（特異型）が、マコンブ変種では見られないことを確認している（図 1）。そこで本研究では、特異型の塩基配列に着目し、中国産と韓国産のマコンブに特異型の塩基配列を持つ個体が存在するかを調査した。さらに、近年、PCR 検査等の簡易迅速化に利用され始めている核酸クロマトグラフ法（以下、核酸クロマト法）に着目し、高額な装置を使わずに短時間に特異型を持つ個体を選抜できる技術開発に取り組んだ。

3. 実験方法

3.1 簡易迅速なマコンブの産地判別技術の開発

試料には、道南産と中国産のそれぞれのマコンブから抽出した DNA を使用した。あらかじめ NAD5 遺伝子の 1182 番目の塩基を解読し、道南産は C、中国産は T であることを確認した。次に、日本産を増

幅せず、且つ中国産だけを増幅する PCR 条件の構築を検討した。プライマーには、中国産の NAD5 遺伝子の塩基配列を参考に、二本鎖の一方と同じ塩基配列のプライマーA及び1183番目の塩基をAからGに置換したプライマーBを設計した(図2)。道南産と中国産のDNAのそれぞれについて、プライマーA、またはプライマーBを用い、反応温度の異なるPCR条件について、それぞれのDNAの増幅の有無をアガロースゲル電気泳動で確認した。また中国産だけが増幅されたPCR条件について、3回の繰り返し試験を行い、安定性を評価した。



図2：設計したプライマーの塩基配列
産地判別の指標である塩基を青、導入した塩基を赤で示す。

3.2 道南地域に特異的な個体の簡易迅速な選抜技術の開発

中国と韓国の各10個体のマコンブについて、それぞれのミトコンドリアDNAを解読して特異型の存在を調べた。また、標準型と特異型のタイプ識別が可能な核酸クロマト法を開発するため、まず標準型の塩基配列から核酸クロマト用プライマーを設計した。次いで、標準型と特異型のマコンブのDNAを用い、PCRの反応温度と各タイプの増幅性をアガロースゲル電気泳動で確認しながら、標準型のDNAだけを増幅できる条件の構築を検討した。構築したPCR条件については、核酸クロマト試験キット(株TBA、C-PAS)を用いて正確に識別できるかを確認した。

4. 結果及び考察

4.1 簡易迅速なマコンブの産地判別技術の開発

プライマーAとプライマーBで中国産だけが増幅されたPCR条件について、繰り返し試験を行った結果、プライマーBでは、安定して中国産だけを増幅できたが、プライマーAでは、日本産の一つに増幅が見られることを確認した(図3)。中国産を増幅し、且つ日本産を増幅しない温度の差は、プライマーAでは僅かであるが、識別対象の塩基配列と異なる塩基を導入することで(プライマーB)、温度の差を大きくできたものと推測している。

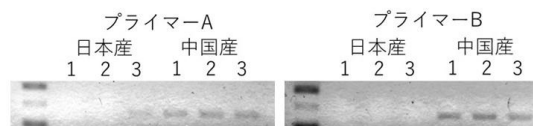


図3：プライマーによるDNA増幅の安定性の違い

4.2 道南地域に特異的な個体の簡易迅速な選抜技術の開発

各産地10個体のマコンブのミトコンドリアDNAを分析した結果、特異型は、中国産と韓国産では確認されなかったことから、道南地域に特異的な個体である可能性が高いと考えられる。また核酸クロマト用に設計したプライマーは、PCRの反応温度を調整することにより、標準型だけを増幅できる条件を構築できた。さらに、核酸クロマト法により、約10分で標準型だけを正確に検出できることを確認した(図4)。



図4：核酸クロマト法による標準型と特異型の識別
1：特異型(道南産)、2：標準型(道南産)、3-4：標準型(中国産)、5-6：標準型(韓国産)、N：陰性コントロール(DNA無)、N：陰性コントロール(DNA無)、矢印：青いラインは検出されたDNAを示す。

5. まとめ

本研究により、道南産マコンブのブランド強化のためのDNA分析技術の開発について、以下の成果を得ることができた。

(1) 既存の産地判別法で指標となる4ヶ所の塩基の1つに関し、増幅の有無で識別できるPCR法を開発できた。残る3カ所の塩基の識別にも応用できれば、DNAシーケンサーを必要せず、所要時間は7時間から4時間程度に短縮されるため、産地判別法の利用を拡大できると考える。

(2) 特異型の塩基配列を持つ個体は、道南地域に特異的である可能性が高く、道南産の証明が可能な養殖品種としての利用が期待できる。さらに核酸クロマト法を利用し、標準型と特異型を簡易かつ迅速に識別できる技術を開発できた。種苗センターなどの現場に導入できる可能性は十分あり、養殖コンブの新たな生産体制の創出に貢献できる技術になることを期待している。