

ミトコンドリアDNA分析による 褐藻ガゴメ判別技術の開発

清水健志, 加藤省伍, 井上品*, 八十川大輔**

Development of Identification Technology of *Kjellmaniella crassifolia* by Mitochondrial DNA Analysis

Takeshi Shimizu, Syogo Kato, Akira Inoue* and Daisuke Yasokawa**

要 旨

ミトコンドリアDNA (mtDNA) 分析によるガゴメの判別技術を開発するため、産地の異なるガゴメ2個体のmtDNA全塩基配列 (37,569bp及び37,625bp) を決定した。得られた塩基配列情報を基に、CAPS法で利用可能なマーカーを探索した結果、23S rRNA遺伝子領域、NAD2遺伝子領域、NAD5遺伝子領域の3遺伝子領域内に候補となる5箇所の配列が見出された。コンブ類11種 (ガゴメ, マコンブ, ホソメコンブ, リシリコンブ, オニコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブ, ガッガラコンブ, チヂミコンブ, トロロコンブ, スジメ) を用いてCAPS法を検討した結果、3遺伝子領域の全てでガゴメを識別することが可能であった。また、NAD2遺伝子領域には、チヂミコンブを識別できるマーカーも含まれていることが確認できた。複数箇所を判別に利用することで、高精度なガゴメ判別技術が開発できると考えており、今後、各種個体数を増やし、判別精度の評価を行う予定である。

1. はじめに

ガゴメ (*Kjellmaniella crassifolia*) は、函館地域沿岸で水揚げされるコンブ類のひとつであり、その特徴として雲紋状の凹凸を表面に持ち、粘性多糖のフコイタンを多く含んでいる。近年、フコイタンの様々な機能性について明らかにされており^{1), 2)}、健康機能を有する海藻として注目されている。現在、函館地域では安定供給に向けた種苗生産や海中栽培などが行われ、素干し製品の他、細切りや粉末化された製品も多く生産されている。

しかしながら、多くのガゴメ製品では、乾燥・細断・粉碎処理により形態的特徴が失われており、また、加工・貯蔵時の温度・湿度条件により粘性の減少も見られることから、他のコンブ類と区別することが困難な場合が多い。そのため、ガゴメ

を識別する技術が求められている。

近年、様々な食品原料についてDNA分析による種判別技術が開発されている^{3), 4)}。特にmtDNAは、核や葉緑体のDNAに比べて変異速度が速く種間で異なる塩基配列を見出しやすいことから種判別の多くに利用されている^{5), 6)}。

当センターでは、これまでにコンブ類のmtDNAとしてコンブ属7種 (マコンブ, ホソメコンブ, リシリコンブ, オニコンブ, ミツイシコンブ, ナガコンブ, ガッガラコンブ) に関する塩基配列情報を取得してきたが、その他のコンブ類については外部機関を含め情報が乏しいのが現状である。

そこで本研究では、ガゴメの判別技術の開発を目的に、ガゴメのmtDNAを分析し、塩基配列情報からCleaved Amplified Polymorphic Sequence

*北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門

**北海道立食品加工研究センター食品バイオ部

(CAPS) マーカーの探索とCAPS法を利用した簡易識別法^{7, 8)}について検討した。

2. 実験方法

2.1 実験試料

ガゴメは、函館市の根崎町及び新港町のそれぞれで採集された1個体を用いた。また、その他のコンブ類試料として、コンブ属8種（マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブ、チヂミコンブ）、トロロコンブ属1種（トロロコンブ）及びスジメ属1種（スジメ）の各1個体を用いた（表1）。各試料を約5mm角に細切り、0.125M EDTA溶液（pH8.0）で2回洗浄した後、液体窒素及びシェイクマスターイーゼー-BMS-12EA（株式会社バイオメディカルサイエンス）を用いた凍結粉碎を行った。粉碎後の試料は、DNAの抽出に使用するまでの間、-80℃で保存した。

表1 試料に用いたコンブ類

コンブ類試料	採集年	採集地	状態
ガゴメ	2007年	函館市	乾燥
マコンブ	2007年	函館市	乾燥
ホソメコンブ	2007年	松前町	乾燥
リシリコンブ	2007年	利尻町	乾燥
オニコンブ	2007年	羅臼町	乾燥
ナガコンブ	2004年	根室市	乾燥
ミツイシコンブ	2007年	浦川町	乾燥
ガッガラコンブ	2003年	根室市	生
チヂミコンブ	2006年	利尻町	生
トロロコンブ	2006年	根室市	乾燥
スジメ	2006年	函館市	生

2.2 DNAの抽出および精製

約0.1gの凍結粉碎試料を用いて、DNA抽出キットであるNucleon PhytoPure Plant and fungal DNA extraction kit (Amersham Biosciences) によりtotal DNAの抽出を行った。さらにDNA精製キットであるGENECLEAN SPIN KIT (Qbiogene) を用いて精製したものをtotal DNA溶液とした。

2.3 ガゴメmtDNAの塩基配列分析

2.3.1 PCR法によるmtDNAの増幅

ガゴメから抽出・精製したtotal DNA溶液を用い、PCR法によりmtDNAを増幅した。使用したプライマーは、公共データベースGeneBankに登録されている*Laminaria digitata*⁹⁾のmtDNA塩基配

列 (Accession No. NC004024) を参考に、ガゴメmtDNA全長を約0.5-2.0kbpの大きさに分割して増幅できるよう設計した。DNA polymeraseはKOD Dash (東洋紡績株式会社)、サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9600 (PE Biosystems) を用いた。PCR条件は、94℃で3分のプレヒート後、94℃で30秒、各プライマーに適したアニーリング温度 (50-65℃) で2秒、72℃で30秒を35サイクル行い、最後に72℃で7分の伸長反応で行った。増幅断片の確認は、1.5%のアガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色して行った。

2.3.2 mtDNAの塩基配列分析

PCR法により得られた各増幅断片について、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いたシーケンス反応を行った後、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列に解読を行った。プライマーはPCR増幅と同様、*L. digitata*のmtDNA塩基配列を参考に設計した。解読後の各塩基配列をシーケンスアッセンブリソフトウェアATGC ver. 4.0.10 (株式会社ジェネティクス) を用いて連結し、mtDNAの全塩基配列を決定した。また、ガゴメ2個体と*L. digitata*のmtDNAの比較には、多重整列ソフトウェアであるCLUSTAL Wを用いた。

2.4 CAPS法

CAPS法は、PCR法により増幅したDNA断片を制限酵素処理し、切断パターンから配列の違いを検出する方法である。DNAシーケンサー等の高価な装置を用いなくても精度の高い結果を得られる利点があることから、簡易識別法としての検討を行った。

ガゴメを識別可能なCAPSマーカーを探索するため、コンブ属7種（マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブ）とガゴメのmtDNAの塩基配列情報を基に、NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BioLabs) を用いてガゴメmtDNAのみが切断される制限酵素認識配列の検索を行った。また、実際にCAPS法を行うため、23S rRNA遺伝子、NAD2遺伝子、NAD5遺伝子の3遺伝子領域を

ジメ) についても標的配列の増幅が認められたことから、8種以外のコンブ属についても利用できる可能性が高いと考えられた。

コンブ類11種の増幅断片を制限酵素処理した結果、NAD2遺伝子-ScaIを除く全ての組み合わせでガゴメのみ切断されることが確認された(図5A-D)。NAD2遺伝子-ScaIの組み合わせではチヂミコンブでも切断が確認されたが、ガゴメと異なる箇所でも切断されており、電気泳動パターンから2種を同時に識別できることが分かった(図5B)。

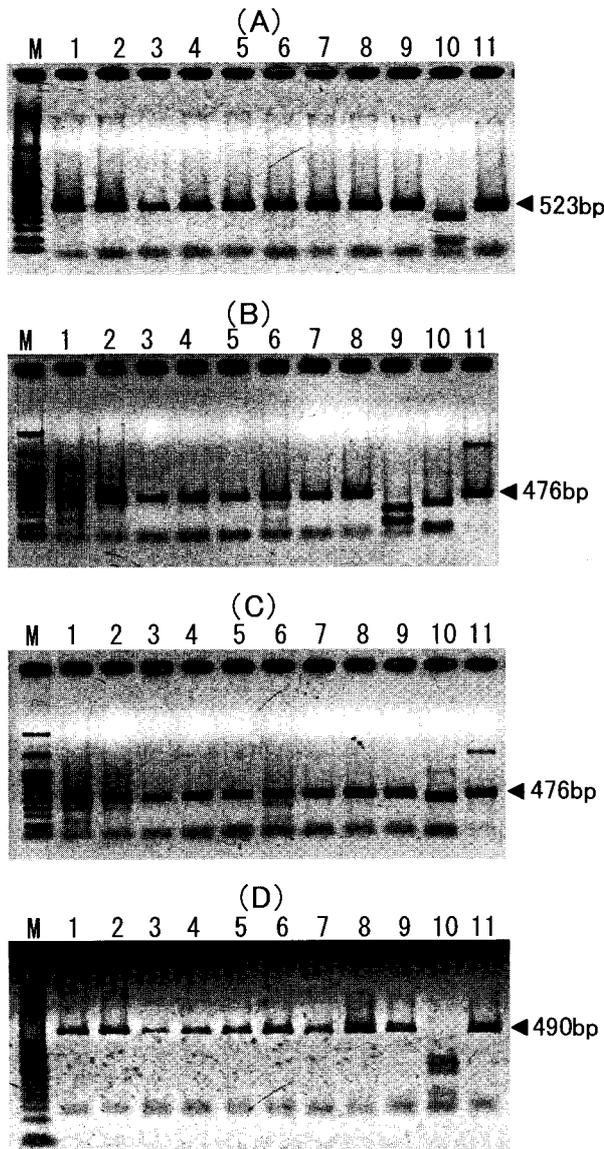


図5 CAPS法によるガゴメの簡易判別結果

A: 23S rRNA遺伝子領域をPstIで切断、B: NAD2遺伝子領域をScaIで切断、C: NAD2遺伝子領域をDraIで切断、D: NAD5遺伝子領域をEcoT14I とPstIで切断、M: 分子量マーカー、1: マコンブ、2: ホソメコンブ、3: リシリコンブ、4: オニコンブ、5: ミツイシコンブ、6: ナガコンブ、7: ガッガラコンブ、8: トロロコンブ、9: チヂミコンブ、10: ガゴメ、11: スジメ

本研究において、ガゴメを識別可能な5箇所のカPSマーカーを見出すことができたが、試料に用いたコンブ類11種は各1個体であるため、今後、それぞれの種について個体数を増やし、判別精度の評価を行う予定である。全ての箇所でもガゴメを個体差なく識別できた場合、1箇所のみでガゴメの識別は可能となる。しかしながら、分析できる個体数には限界があり、個体差がないことを確認することは困難であるため、複数のCAPSマーカーを利用することにより、精度の高いガゴメ判別技術が開発できると考えている。

本研究の一部は文部科学省都市エリア事業発展型で実施致しました。

参考文献

- 1) 酒井武, 加藤郁之進. 食品と化学, 6, 89-93 (1998)
- 2) 柴田英之, 長岡正人, 竹内由美, 高木逸子, 橋元秀介, 上山貞夫, 横倉輝男. 薬理と治療, 26 (8), 1211-1215 (1998)
- 3) 太田英明, 湯川剛一郎, 丹敬二, 土肥由長. 食品鑑定技術ハンドブック (株式会社サイエンスフォーラム), (2005)
- 4) 福田裕, 渡部終五, 中村弘二. 水産学シリーズ149 水産物の原料・産地判別 (恒星社厚生閣), (2006)
- 5) 柳本卓, 北村徹. 日水誌. 68 (6), 893-899 (2002)
- 6) 槇智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明. 日水誌 51 (9), 471-476 (2004)
- 7) 谷口武利: 無敵のバイオテクニカルシリーズ—改訂PCR実験ノートみるみる増やすコツとPCR産物の多彩な活用法 (株式会社羊土社), (2005)
- 8) 佐々木博己: 注目のバイオ実験シリーズ—ここまでできるPCR最新活用マニュアル (株式会社羊土社), (2005)
- 9) M. -P. Oudot-Le Sscq, B. Kloareg and S. L. -D. Goer: Eur. J. Phycol. Vol. 37, 195-198 (2002)