

6. DNA から見た地域海藻資源の特徴と 判別法の開発に関する研究

食産業技術支援グループ

○清水健志

1. はじめに

道南地域には、食資源として利用できる多種多様な海藻類が生息している。褐藻類のマコンブは、地域を代表する海藻類であり、旨味が強く、高級コンブとして高値で取引されている。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マコンブ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も貢献している。一方、今後の利用が期待される地域海藻資源には、コンブの養殖ロープに繁茂する海藻として知られている紅藻類のダルスが挙げられる(図1)。近年の研究により、たんぱく質と脂質が多い他、抗酸化物質や EPA 等の機能性成分を含むことが明らかとなっている。北米やヨーロッパ北部にも生息しており、栄養価の高い食資源として古くから利用されている。



図1 コンブの養殖ロープに繁茂したダルス

マコンブやダルス等の海外でも生産される海藻については、ブランド価値を有する「日本産」を証明できる判別法を開発することにより、海藻資源のブランド力を強化できるものと考えている。

2. 地域海藻資源の DNA 配列の特徴と原産国判別法の開発

これまでに当センターでは、地域海藻資源のブランド力の強化を目的に、マコンブの原産国判別法の開発について取り組んできた。その結果、ミトコンドリア DNA に存在する NAD5 遺伝子配列の 4ヶ所の塩基を指標に、日本産マコンブを 100%、中国産を 96.5%、韓国産を 94.7% の精度で判別できる方法を開発し、特許を取得した(表1)。本判別法は、令和2年北海道発表明表彰「函館市長賞」を受賞し、現在、(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。本判別法の現時点の課題は、塩基配列を解読する必要があり、時間と手間を要することである。さらにコンブ以外の海藻については、判別法の開発が進められていないことも課題として挙げられる。

そこで本研究では、マコンブ原産国判別法の迅速化に関する検討の他、ダルスの原産国判別技術の開発を目的に、ミトコンドリア DNA 上にコードされている COX1 遺伝子配列の特徴を調査した。

表1 マコンブ産地判別の指標となる4ヶ所の塩基

マコンブ	NAD5遺伝子配列の塩基				判別精度 (%)
	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	

3. 実験方法

3.1 マコンブの原産国判別技術の迅速化に関する検討

試料には、あらかじめ NAD5 遺伝子の 1182 番目の塩基を解読し、日本産はシトシン (C)、中国産はチミン (T) であるマコンブを選択し、それぞれから抽出した DNA を用いた。次に、中国産は増幅されるが、日本産は増幅されないことにより両者を識別する PCR の構築を検討した。増幅するためのプライマーは、NAD5 遺伝子の相補鎖(二本鎖の片側)の塩基配列を参考に、中国産と同じ塩基配列

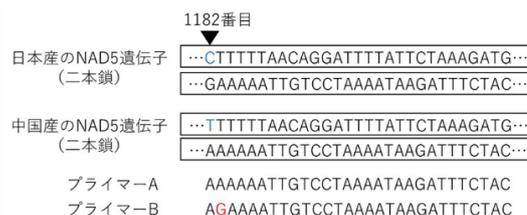


図2 設計したプライマーの塩基配列
産地判別の指標である塩基を青、導入した塩基を赤で示す。

を持つプライマーAの他、増幅性を低くするために1183番目の塩基を日本産及び中国産のDNA配列と異なる塩基(AからG)に置換したプライマーBの2種類を設計して用いた(図2)。日本産と中国産の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、アニーリング温度の異なるPCR条件で増幅反応を行った後、各プライマーにおける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条件については、同じ試験を3回繰り返して行い、増幅における安定性を評価した。

3.2 ダルスのCOX1遺伝子配列の解析

試料には、函館市沿岸で採取したダルス3個体の他、2種類の乾燥ダルス製品(アイスランド製、カナダ製)のそれぞれから採取した葉片を用い、コンブ用に開発したDNA抽出法を応用し、各試料からDNAを抽出した。次いで、それぞれの抽出DNAから、ミトコンドリアDNAにコードされているCOX1遺伝子配列の一部(約650塩基)をPCRにより増幅した後、DNAシーケンサーにより塩基配列を解読後、ClustalWにより比較解析を行い、函館産ダルスに特徴的な塩基配列を探索した。

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(アニーリング温度:59°C)について、繰り返し試験を行った結果、プライマーAでは、日本産が増幅される場合が見られたが、プライマーBでは、中国産だけが安定して増幅されることを確認した(図3)。

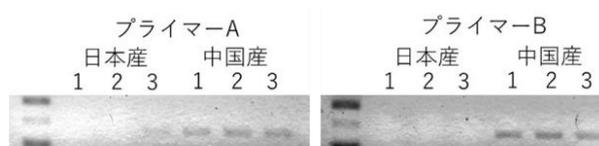


図3 プライマーによるDNA増幅の安定性の違い

増幅における安定性に違いが見られた理由として、プライマーAと日本産DNAは、59°Cのアニーリング温度では不安定に結合する場合があります、一方、プライマーBは、異なる塩基を導入した結果、日本産DNAとの結合は、より不安定となり増幅が起こらなくなったためと推測する。

4.2 各産地のダルスにおけるCOX1遺伝子の差異

各試料から増幅したCOX1遺伝子の609塩基について比較解析を行った結果、函館産の個体間では0.2 - 0.3%、カナダ・アイスランド間は0.5%の差異があることが分かった。一方、函館・アイスランド間、函館・カナダ間では、それぞれの差異が、9.5 - 9.9%、9.7 - 10.0%であることを確認した。これらの結果から、函館産のCOX1遺伝子には、海外産のCOX1遺伝子と異なる塩基配列が多く含まれており、塩基配列の解読により函館産と海外産を判別することが可能と考えられた(表2)。

表2 COX1遺伝子部分配列のサンプル間の差異 (%)

	函館1	函館2	函館3	アイスランド	カナダ
函館1	*	*	*	*	*
函館2	0.3	*	*	*	*
函館3	0.2	0.2	*	*	*
アイスランド	9.9	9.5	9.7	*	*
カナダ	10	9.7	9.9	0.5	*

5. まとめ

本件研究により、既存のマコンブ原産国判別法の迅速化及びダルスのCOX1遺伝子配列の特徴について、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、7時間の所要時間が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) 函館産及び海外産のダルスについて、COX1遺伝子の塩基配列を比較した結果、塩基配列の解読による両者の判別は可能と考えられた。函館産は、個体差(0.2 - 0.3%)に比べ、海外産との差異が10.0%程度と大きかったことから、今後、異なる塩基をプライマー配列に利用することで、PCRの増幅の有無による迅速な判別法の開発も期待できる。