

(9) 遺伝子情報を用いた道産コンブ類の種属判定技術の開発(平成17年度～平成19年度)

研究のねらい

北海道の重要な水産資源であるコンブ類は、種類(種や属など)の違いによって性質が異なるため価格に差があり、加工製品に使用される際も、コンブ類の種類を表示することにより製品の付加価値の向上に貢献している。しかしながら、細断、粉碎、乾燥等の加工処理が施されると、外観のみで種類を区別することが困難である。近年では、多くの食品原料(ウナギ、サバなど)について、客観的な農水産物の種属判定技術の一つとして遺伝子情報が利用され始めている。また、近年のコンブ類の遺伝子解析に関する研究により、核DNAのリボゾームRNA遺伝子や転写スパーサー領域、葉緑体DNAのリブローソム1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼスパーサー領域などが調べられているが、変異が非常に少なく、これらの遺伝子情報では種を判別することは困難であった。一方、ミトコンドリアDNA(mtDNA)は様々な生物種で変異頻度が高いことが確認されているが、コンブ類に関する報告はほとんどない。

そこで本研究では、コンブ類の種属判定技術の開発を目的に、mtDNAの遺伝子情報の蓄積およびDNAマーカーの探索を行うこととした。昨年度に行ったマコンブを用いた研究では、mtDNA上で特に変異頻度が高いと予想した6箇所の非コード領域に関する遺伝子情報を取得できたため、本年度は、これらの情報を基にマコンブ以外のコンブ類試料であるホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブ、エナガコンブについても塩基配列を調べ、5種を比較することにより変異の有無を調べた。

研究の方法

コンブ類のmtDNAにおいて、DNAマーカーとなりうる変異を探索するため、平成17年度の研究成果で得られたマコンブmtDNAの部分塩基配列(100bp以上の6つの非コード領域を含む)の情報を基に、それぞれをPCR増幅するための6組プライマーペアを設計した。また、マコンブ以外の北海道産コンブ類試料として、新たに収集した4種のコンブ(ホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブ、エナガコンブ)を用いた。それぞれのコンブ試料から市販キットによるtotal DNAの抽出・精製を行い、PCRによる非コード領域を含むDNA断片の増幅を行った。PCRで得られたそれぞれの増幅産物は、市販キットを使用して精製を行った後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、公共のDNAデータベースであるGenBank内のデータとのホモロジー検索から類似性の確認を行った。さらに、5種のコンブ(マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブ、エナガコンブ)について比較解析を行い、部分塩基配列内における変異の探索を行った。

研究成果の概要

ホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブ、エナガコンブから抽出・精製したそれぞれのtotal DNAを用い、PCR増幅したDNA断片の塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った結果、全てのDNA断片はmtDNA由来であり、非コード領域(非コード領域1:116bp、非コード領域3:361bp、非コード領域4:110bp、非コード領域5:175bp、非コード領域6:124bp)を含んでいることが確認された。また、ホモロジー検索の結果から、昨年度、非コード領域2として予想されていた領域には、内部に未知タンパクと思われるコード領域(ORF)を含んでいることが示唆され、100bp以上と予想していた非コード領域は存在していないと考えられた。マコンブを含む5種のコンブについてそれぞれの塩基配列の比較解析を行ったところ、非コード領域3～5の配列中に変異が4箇所、また、ORFにも変異が1箇所あることが確認され、その内4箇所についてはマコンブおよびエナガコンブに特異的と思われる変異であった。

今後、本研究で確認された変異については、検体数を増やしていくことで判別に適したDNAマーカーであるかを検討し、また、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニココンブに特異的な変異についても探索していく予定である。

担当者 清水健志、吉岡武也、大坪雅史、青木央