

(9) 地域資源に特異な DNA 塩基配列の探索・利用技術の開発研究

(令和2年度～令和4年度)

1. 研究のねらい

塩基配列を指標にした DNA 分析技術により、種、個体、地域集団の識別が可能である。食産業分野では、外観で識別できない原料の種・産地の証明や産生機能の優れた新品種の作出等に DNA 分析技術が利用されている。函館地域では、健康機能成分を多く含む海藻や発酵食品スターターに利用可能な新規な微生物など、ブランド価値を有する新たな地域資源が発掘されており、地域企業が求める加工食品の高付加価値化が図れる資源として期待されている。地域資源に特異な塩基配列を探索・利用できる DNA 分析技術の開発は、地域資源であることの証明や新品種の作出に繋がるものと考えられる。

現在の課題は、函館地域で機能性成分が多く含まれるダルスやアカモク等の海藻やチーズの風味改良に有用な乳酸菌が見出されているが、特異的な塩基配列に関する情報は、ほとんど得られていない。そこで本研究では、地域資源から DNA を抽出し、塩基配列の解読、他地域産との比較解析により、地域資源に特異な塩基配列を探索し、産地識別等が可能な DNA 分析技術の開発を検討する。また加工食品に適応可能な DNA 分析技術の開発を検討し、地域海藻であるダルスをモデルに適応性を図る。

2. 研究の方法

昨年度、地域紅藻類であるダルスについて、コンブで構築した DNA 抽出法及び地域に特徴的な塩基配列の探索法の適応性について検討した。その結果、コンブ DNA 抽出法を応用した DNA 抽出法を構築し、また函館産と海外産の塩基配列の差異を COX1 遺伝子内に確認した。そこで今年度は、函館産と海外産の塩基配列の差異を利用した識別技術の開発を検討した。

(1) 制限酵素切断部位の解析

解析プログラム NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) を用い、昨年度に解読した函館産、アイスランド産、カナダ産のダルス由来 COX1 遺伝子の部分配列中 (609 塩基) に存在する制限酵素切断部位の解析を行った。

(2) PCR-CAPS 法を利用した函館産ダルスの識別技術の構築

試料には、函館市の沿岸で採取したダルス 3 個体の他、アイスランド製及びカナダ製の乾燥ダルス製品 (各 1 種類) のそれぞれから藻体 1 枚を採取して使用し、各試料から DNA を抽出した。PCR-CAPS 法による識別技術を構築するため、PCR-CAPS 用 (制限酵素切断部位を含む約 200 塩基の PCR 産物を増幅する) プライマーの設計及び PCR 条件を検討した。さらに制限酵素処理条件を確立するため、PCR 産物の添加量が異なる 20 μ l 容の制限酵素反応系を調製し、37°C、30 分間で処理した後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物のサイズを確認した。

3. 研究成果の概要

(1) 制限酵素切断部位の解析

制限酵素切断部位を解析した結果、函館産、アイスランド産、カナダ産の COX1 遺伝子部分配列には、それぞれ 37 カ所、41 カ所、41 カ所の部位の存在を確認した。これらの切断部位を比較した結果、アイスランド産及びカナダ産だけを切断する制限酵素は 16 種類あることが分かった。本研究では、16 種類の中から Ase I を選択して PCR-CAPS 法の構築に関する検討を行った。

(2) PCR-CAPS 法を利用した函館産ダルスの識別技術の構築

189 塩基のサイズで、87~89 番目の塩基に Ase I 切断部位を含む DNA 領域を増幅するようにプライマーを設計し、PCR 条件を検討した。その結果、全ての試料で 200 塩基程度の PCR 産物が確認され、また Ase I で各 PCR 産物を処理した結果、函館産以外は 100 塩基程度に切断されたことから、標的とする DNA 領域を増幅するための PCR 条件は構築できたと考える。さらに 20 μ l 容の制限酵素反応系における PCR 産物の使用量を検討し、5 μ l ではほぼ全ての PCR 産物が切断され、10 μ l では未切断の PCR 産物が検出されたことから、5 μ l 程度が使用量として適切であると判断した。以上の結果から、PCR-CAPS 法による函館産ダルスの識別技術を構築できたと考える。

本研究で構築した識別技術を利用し、次年度は、加工品への応用を検討する予定である。

担当者 清水健志、大坪雅史、鳥海滋