

糸状体から抽出したDNAを用いたアマノリ類の品種識別*

瀧上 哲¹・玉城 泉也²・阿部 真比古^{2a}・藤吉 栄次²・小林 正裕²・筑紫 康博¹
(¹研究部・²(独)水産総合研究センター西海区水産研究所)

遺伝子解析手法により、糸状体から抽出したDNAを用いてアマノリ低塩分耐性株「福岡有明1号」と他品種との識別を試みた。RAPDスクリーニングにより多型領域を検索し、得られたマーカーをクローニングしてSTS化プライマーを設計した。これらを用いて増幅試験を行った結果、福岡有明1号の識別が可能であった。

キーワード：ノリ，福岡有明1号，品種識別，DNA

福岡有明1号は有明海研究所において低塩分耐性で選抜育成されたスサビノリの新品種である。しかしながら、他品種との識別方法が確立されていないため、国外や海区内に持ち出されても見分けることができず、育成者権の実質的な保護が困難である。既報¹⁾では、葉状体を試料として、イネやタマネギなど陸上植物で多くの事例があるRAPD-STS化法を用いた識別を試み、^{2,3)}福岡有明1号を識別可能なSTS化プライマーを開発した。一方でノリの場合、一般的に品種の保存は培養が容易な糸状体の形で行われており、生産者段階で活発に流通しているのが現状である。育成者権のより実効的な保護のためには、葉状体のみでなく糸状体を検体とした識別技術も不可欠である。そこで、本研究では糸状体から抽出したDNAをサンプルとし、既報と同様の手法を用いて福岡有明1号の識別を試みた。

方 法

1. RAPDマーカーの探索

福岡有明1号及び全国の養殖産地で用いられている品種の糸状体から抽出・精製したDNAを水産総合研究センターから提供を受け、サンプルとして用いた。DNAは、糸状体を液体窒素で凍結・粉碎後、ISOPLANT II (ニッポンジーン社製)で抽出・精製したものである。DNA溶液は濃度を10ng/ μ lに調製し、PCR反応の鋳型とした。

プライマーはRAPD 10mer Kit(オペロン社製)を滅菌水で10 μ Mに調製したものをを用いた。PCR反応の反

応液組成は基本的に既報と同様としたが、反応系容量については反応の安定性を確保するため25 μ lとした。滅菌水18.125 μ l, 10 \times PCR Buffer (タカラバイオ社製) 2.5 μ l (タカラバイオ社製), TaKaRaEXTaq Hot Start Version (タカラバイオ社製) 0.125 μ l, ランダムプライマー1.25 μ l, dNTP Mixture (タカラバイオ社製) 2 μ l及び鋳型DNA溶液1 μ lで計25 μ lとした。PCRはGeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製)を用い、図1に示す反応プログラムで行った。増幅産物は1%アガロースゲル(ナカライテスク, アガロースME), 1 \times TAE Buffer, 100V, 約40分の電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV照射下でバンドパターンを観察・記録した。福岡有明1号に特異的に出現するバンドや、各品種間で大きく違うパターンを示したバンドをRAPDマーカーとして以降の解析に用いた。

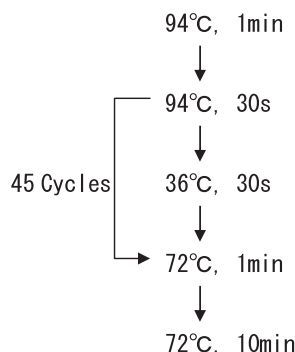


図1 RAPDスクリーニングのPCR条件

*アマノリ類の品種識別に関する研究-II

a 現所属：水産大学校生物生産学科

2. STS化プライマーの設計

RAPD マーカーとして選定したバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製した。精製断片は TOPO TA クローニングキット (インビトロジェン社製) を用いてプラスミドベクターに組み込み、大腸菌に導入した。得られた形質転換体はコロニーダイレクト PCR により挿入断片の確認を行った後、LB 培地で拡大培養した。これらから QuickLyse Miniprep Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドを精製し、タカラバイオ (株) に送付して挿入断片の塩基配列を決定した。塩基配列情報は AST 検索を行い、細菌由来の可能性が高いと判断された断片については以後の解析から除外した。

STS 化プライマーの設計は、スタンフォード大学のプライマー設計サービスである Web Primer を用いて行った。RAPD スクリーニングで検出された多型バンドは、ランダムプライマーのアニーリング部位に変異がある可能性が高いことから、多型バンド両端の RAPD プライマー配列を含むバンド全体を増幅するように STS 化プライマーを設計した。プライマー合成はタカラバイオ (株) に委託した。

3. STS 化プライマーを用いた識別

STS 化プライマーの増幅試験は、当初の RAPD スクリーニングに用いた48品種に加え、さらにスサビノリ系統9品種、アサクサノリ系統4品種の計13品種を追加し、合わせて61品種を用いた。反応液組成は RAPD スクリーニングと同じ試薬を使用し、滅菌水7.9375 μ l, 10 \times PCR Buffer 1.25 μ l, EXTaqHS 0.0625 μ l, STS 化プライマー (10 μ M) フォワード, リバース各0.625 μ l, dNTP Mixture 1 μ l 及び鋳型 DNA 溶液 1 μ l で計12.5 μ l とした。PCR プログラムは図2に示した。アニーリング温度は各プライマーの T_m 値とし、フォワードとリバースで異なる場合は低い方に設定した。増幅産物は上記と同様の条件で電気泳動し、増幅の有無を確認した。

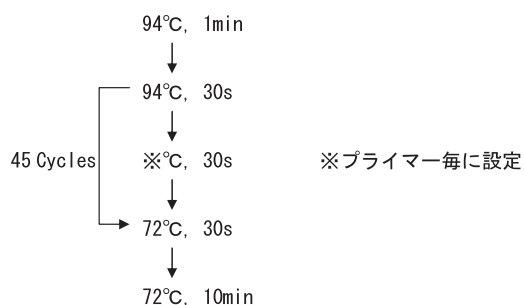


図2 STS化プライマー使用のPCR条件

結果

1. RAPDマーカーの探索

ランダムプライマーキット OPBA ~ BF のうち約70種類を用いてスクリーニングを行った。しかし、福岡有明1号に特異的な RAPD マーカーがほとんど得られなかったため、単独の STS 化プライマーでの識別に加えて複数の STS 化プライマーの組合せにより判別する方法も検討することにした。そこで、品種間で多型を多く示した RAPD プライマーの増幅産物から、1~数品種のみに出現する濃いバンドで、かつ他のバンドと近接せず切り出しが容易なものを探し、計72個の RAPD マーカーを選定した。品種間で多くの多型を示した RAPD スクリーニングの泳動像を図3に示した。

2. STS 化プライマーの設計

72個の RAPD マーカーの塩基配列を決定し、塩基配列情報を BLAST 検索した結果、うち19個については細菌由来の可能性が高いと判断された。これらを除いた53個の RAPD マーカーから53ペアの STS 化プライマーを設計した。

3. STS 化プライマーを用いた識別

増幅試験を行った結果、53ペアの STS 化プライマーのうち T8-BE07-2200 と Y19-BE02-394 の組合せにより福岡有明1号が識別可能であった (表1)。識別用プライマーは表2に、泳動像は図4に示した。ただし、Y19-BE02-394 については本来の目的サイズである394 bpとは違うサイズのバンドが出現する品種が多く、また福岡有明1号の増幅がやや弱かった。

考察

既報では5品種中からの識別であったが、本研究では61品種中からの識別であり、より実用性が高まったといえる。これまで特定のノリ品種を葉状体・糸状体共に識別可能な技術を開発した事例はなく、今後ノリの育種を推進していく上で本研究は一つの足がかりとなることが期待される。

一方、残された課題もある。より実用的・汎用的な技術とするためにはプライマーをマルチプレックス化するか、あるいは2ペアのプライマーの組合せではなく単独で識別可能なプライマーを開発することが望ましい。Y19-BE02-394 については増幅サイズやバンドの濃さが品種により異なっており、判定がしにくいいため改良の余

地があると考えられた。

また、選定した RAPD マーカー72個のうち細菌由来と判定されたものが19個と約1/4に達し、スクリーニングの効率が悪かった。これは、抽出した DNA そのものに細菌の DNA が混入しているため増幅断片数が増え、その結果、品種特異的な増幅断片と誤認してしまうためと考えられる。ノリの生物学的特性上、細菌の混入を防ぐことは容易ではないが、効率的に研究を進めるためには細菌フリーの DNA 抽出方法の検討も必要であろう。

現在、ノリの品種登録が急速に進んでおり、既に登録されている5品種に加え、2009年12月現在新たに5品種が出願公表されている。⁹⁾ 今後さらに出願は増えると考えられ、育成者権を担保するため品種識別技術の重要性はますます高まってくると考えられる。品種識別技術はその利用目的からみて、葉状体や糸状体だけでなく、最終的には板海苔や焼き海苔、味付け海苔などの加工製品を対象としたものを開発する必要がある。加工製品の場合は、DNA の断片化や調味料の混入等による DNA の質低下、あるいは複数品種の混在が考えられ、これらの

課題についても引きつづき検討していきたい。

なお、本研究の一部は(独)水産総合研究センターの漁場環境・水産資源持続的利用型技術開発事業の委託研究費により実施した。

文 献

- 1) 瀧上 哲・岩渕光伸：室内培養葉体から抽出した DNA を用いたアマノリ類の品種識別. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 第19号, 115-119(2009).
- 2) 新村和則・金川 寛・三上隆司・福森 武：イネ品種判別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発. 育種学研究, 第7号, 87-94(2005).
- 3) 臼井裕一・足立静香・紙谷元一・中島寿亀・山元義久・鈴木忠直・安井明美, タマネギの品種識別用 DNA マーカーの開発. 日本食品科学工学会誌, 第53巻, 48-54(2006).
- 4) 農林水産省品種登録ホームページ (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>).

表1 STS 化プライマーによる福岡有明1号の識別結果

	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12	Y13	Y14	Y15	Y16	Y17	Y18	Y19	Y20	Y21	Y22	Y23	Y24	Y25	Y26	Y27	Y28	Y29	
T8-BE07-2200						+												+	+		+	+			+				+	
Y19-BE02-394							+			+											+	+								

	Y32	Y33	Y34	Y35	Y36	Y37	Y38	Y39	Y40	Y41	Y42	Y43	Y44	Y45	Y46	Y47	Y48	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
T8-BE07-2200	+							+				+	+	+												+			
Y19-BE02-394		+					+	+									+				+	+		+					+

Y1～Y48:スサビノリ系統品種(Y21が福岡有明1号)

T1～T13:アサクサノリ系統品種

表2 福岡有明1号識別用 STS 化プライマー

プライマー名称	産物サイズ(bp)		塩基数	Tm 値	塩基配列(5'→3')
T8-BE07-2200	約 2200	フォワード	22	55.8	CCGTCCTATGTAGAAGGTGAAA
		リバース	22	53.9	CCGTCCTATGGATCAAAAAGAAT
Y19-BE02-394	394 (品種により異なる)	フォワード	22	57.7	ACGCCTGTAGCAGGAAAAGCAA
		リバース	24	57.9	ACGCCTGTAGGTTTATCCAAAACG

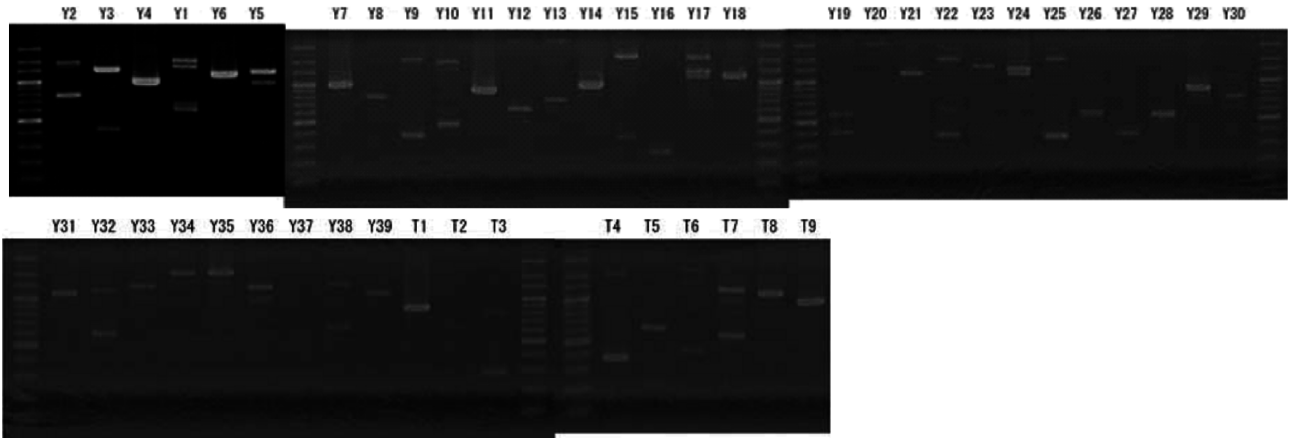


図3 多数の品種特異的増幅領域が検出されたRAPDスクリーニングの結果(BE-07)
 Y1~Y39:スサビノリ系統品種1~39(Y21が福岡有明1号)
 T1~T13:アサクサノリ系統品種1~13

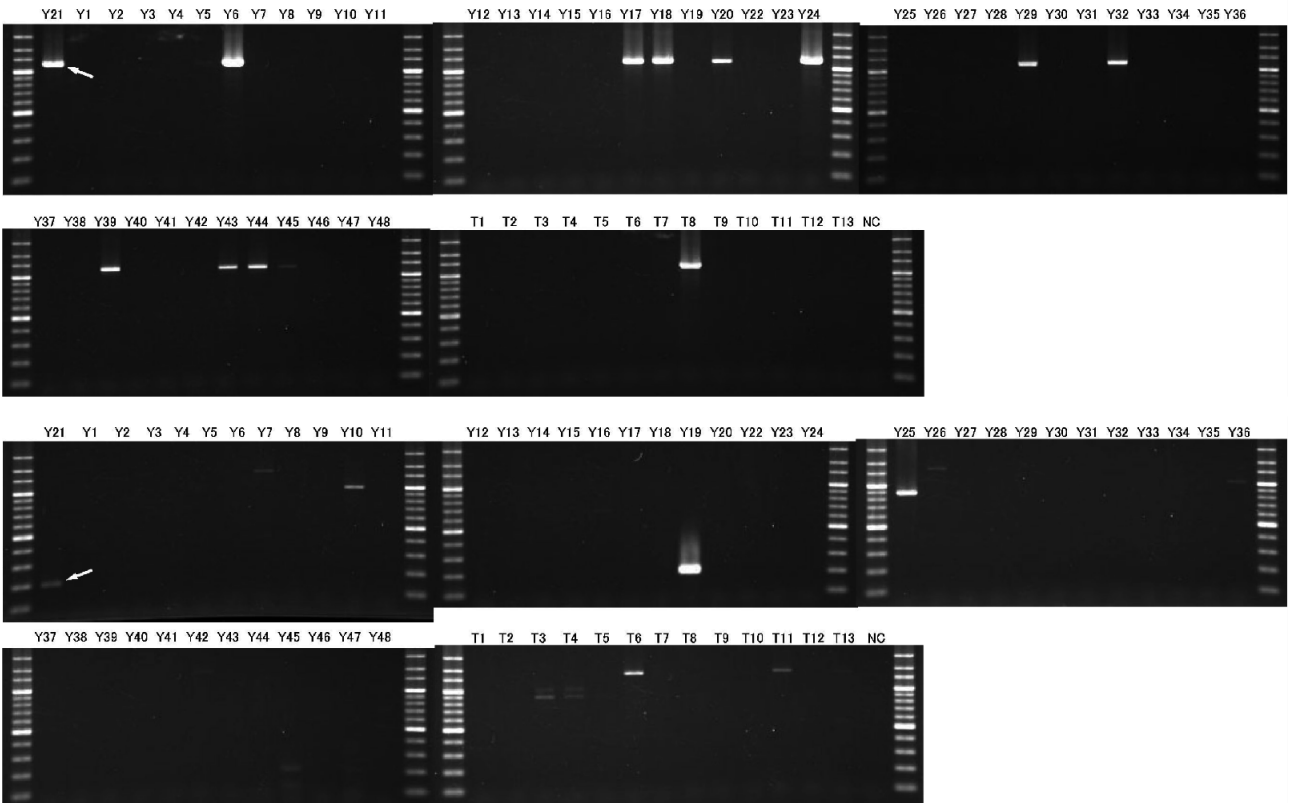


図4 STS化プライマーを用いたPCR結果(上段:T8-BE07-2200、下段Y19-BE02-394)
 Y1~Y39:スサビノリ系統品種1~39(Y21が福岡有明1号、矢印が識別バンドを示す)
 NC:Negative control