

AFLP法によるノリ養殖品種の識別

岩渕 光伸
(研究部)

Discrimination of laver cultivars by AFLP Analysis

Mitsunobu IWABUCHI
(Research Department)

全国のノリ生産額は毎年1,000億円に達し、水産業全体の中でも大きなウェイトを占めている。また福岡県有明海区においては、海区全体の漁業生産額の90%を占める重要な産業である。ノリ養殖業の発展を支えた技術の一つに品種改良を上げることが出来る。ノリの品種改良は、昭和40年代におけるオオバアサクサノリやナラワサビノリの選抜¹⁾以来、主に多収性を追求してきたが、最近では病害耐性、高品質性、そして低栄養耐性を持った品種の開発を望む声が強い。

ノリ養殖品種は現在1,000種程度存在するといわれているが、その品種特性が把握されているもの、品種の履歴がはっきりしているものは非常に少ない。ノリの新品種は養殖業者が主体となって開発されてきたこと、葉体の形態が単純で環境変異も大きい外部形態による品種の識別、分類が困難であることをその理由としてあげられる。もし品種の識別が可能となり、系統別に分類整理がなされた上で、特性の関連性が明らかになれば、上記の特性を持った新品種開発の効率化が期待される。また漁場環境に適した品種の養殖指導にも活かされ、生産の安定化に寄与することも期待される。

本研究では、陸上植物の品種識別に利用されているAFLP法²⁾をノリ養殖品種の識別に利用するため、AFLP法に適したノリ葉体からのDNA抽出精製法を検討した。また、現在養殖されている品種の葉体DNAを同法で解析することにより、品種の識別が可能なることを明らかにしたので報告する。

方 法

1. AFLP法に適した葉体DNAの抽出精製法

(1) 葉体サンプル

葉体DNAの抽出には純系化された養殖品種FA89の野外養殖、あるいは室内培養によって育成した葉体を用いた。本株は福岡県有明海地先でノリ網から採集後、プロトプラスト再生葉体の中から生長が良好な1個体を選び、自家受精によって分離したものである。

野外養殖の葉体は前原市加布里地先の漁場で2000年10月から11月にかけて養殖され、DNA抽出時まで冷凍保存した。本漁場ではノリ養殖経営体は1漁家しかなく、使用品種はFA89のみであるため、他品種の混入は無い。室内培養葉体は、フリー糸状体を温度23℃、照度300lx、明暗周期12L:12Dの条件で1ヶ月間培養した後、温度18℃、照度4000lx、明暗周期10L:14Dに移して放出した殻胞子を同条件下で育成したものを用いた。培養液にはESS補強海水³⁾を用いた。

(2) DNAの抽出精製

AFLP法に適したDNAの抽出精製法として以下の処理法を比較した。なおa~d法は野外養殖葉体、e法は室内培養葉体を用いた。

a 約1gの葉体を乳鉢に入れ、液体窒素を注いで凍結し、乳棒で粉状になるまで粉砕した。葉体粉末をあらかじめ60℃に保温しておいた3%CTAB緩衝液(3%CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 0.1M TrisHCl, pH 7.5) 20mlに入れた。15分間60℃のウォーターバス中で保温した後、室温で2時間緩やかに振とうした。等量のCIA(クロロフォルム:イソアミルアルコール=24:1)を添加して15分間振とうさせ3,200rpm.で15分間遠心した。CIA処理は2回行った。新しいチューブに上清を取り等量の-20

℃イソプロパノールを加え、3,400rpm.で15分間遠心してDNAを沈殿させた。上澄みを捨て70%エタノール20mlを加えて再度3,400rpm.で15分間遠心した。エタノールを捨て、吸引乾燥を10分間行った。DNAを5mlのTE(10mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH 8.0)で溶解し、塩化セシウム5gとエチジウムブロマイドを加えて20℃60,000rpm.12時間の超遠心法による精製を行った。UV照射下でDNAのバンドを取り、ブタノール処理によってエチジウムブロマイドを除いた。エタノール沈殿を行って精製DNAを得た。

b 約0.1gの葉体を **a** 法と同様液体窒素による凍結粉碎処理後、ニッポンジーン社のISOPLANT IIを用いてDNAを抽出した。ISOPLANT IIの処理は添付プロトコールに従ったが、抽出層に水溶性色素の着色が見られたことからフェノール処理、PCI(フェノール:クロロフォルム:イソアミルアルコール=25:24:1)処理を付け加えた。エタノール沈殿後、TEに溶解したDNAに対しRNase処理(濃度0.2 μ g/ μ l)を37℃で1時間行った後、キアゲンチップ100による精製を行った。キアゲンチップによる精製は村上ら⁹⁾の方法に従った。

c Nakajima et al.⁹⁾の方法に従った。すなわち、約0.1gの葉体を液体窒素による凍結粉碎の後、5 μ lメルカプトエタノールと4Mチオシアン酸グアニジウムを含む緩衝液500 μ lに入れ60℃で3分間保温した後15,000rpm.で5分間遠心した。PCI処理を2回行った後、エタノール沈殿を行ってDNAを得た。**b**と同様にキアゲンチップ100による精製を行った。

d **b**と同様にDNAを抽出してTEに溶解した後、ノリ用のプロトプラスト単離用酵素であるアルカリヘミセルラーゼ(以降AHCと略記)を濃度0.1%となるように加えた。室温で4時間振とうした後、PCI処理でAHCを除き、キアゲンチップ100で精製した。

e 4個体の葉体から1.0%パパイソ溶液25℃1時間振とう処理と0.1%AHC溶液25℃3~5時間振とう処理によってそれぞれプロトプラストを単離した。プロトプラスト懸濁液をマイクロチューブに入れ、1,500rpm.で3分間の遠心によってプロトプラストを集めた後、ISOPLANT IIでDNAを抽出した。抽出したDNAはキアゲンチップ20で精製した。

(3) AFLP解析

AFLP処理はアプライドバイオシステムズ社のAFLP Microbial Fingerprinting Kitを用いた。処理は添付プロトコールに従い、以下のように行った。

1) 各抽出精製法で得られたDNA0.01~0.02 μ gを制限酵

素EcoRIとMseI(New England Biolabs社製)で切断し、同時にT4 DNA Ligase(New England Biolabs社製)でアダプターのライゲーションを行った。本処理は、25℃の温度条件で15時間行った。

2) Kitに含まれるプライマーを用いPreSelective PCRとSelective PCRを行った。Selective PCRに使用したプライマーペアはEcoRI-MseIの組み合わせに0-A·0-G·0-C·0-T·A·0-G·0-C·0-T·0の8通りを使用した。

3) 増幅断片はアプライドバイオシステムズ社のGenetic Analyzer 310によって検出した。増幅断片のサイズは分子量マーカーからGene Scanソフトウェアによって解析した。

どの抽出精製法がAFLP法に適しているのかを決定するため、同一抽出精製法によるDNAサンプルのAFLPパターンが一致していること、増幅断片のピークが高く明瞭であること、データかノイズかの判別に迷うピークの低い断片が少ないことを判断基準とした。

2. AFLP法によるノリ養殖品種識別

(1) 葉体サンプル

福岡県水産海洋技術センターでフリー糸状体として保存しているノリ養殖品種のうち、スサビノリ系品種として福岡1号、ナラワB、ナラワC、アオクビおよびFA89の5品種、アサクサノリ系品種としてサシキの1品種、さらに宮城県雄勝町地先で採集した野生スサビノリをサンプルとした。なお、福岡1号、アオクビ、FA89および野生スサビノリは福岡県水産海洋技術センターにおいて糸状体を分離し、ナラワB、ナラワCおよびサシキは譲渡されたものである。またFA89と野生スサビノリについては、プロトプラスト再生体1個体の自家受精によって分離したもので、純系化された株である。

各品種のフリー糸状体はESS補強海水中で温度23℃、照度300lx.、明暗周期12L:12Dの条件で1ヶ月以上培養し殻胞子を作らせた。次いで温度18℃、照度4,000lx.、明暗周期10L:14Dの条件に移し殻胞子を放出させてクレモナ糸に採苗した。培養液は7日毎に交換した。葉長が5cm程度に達した葉体を材料に使用した。基本的に1個体をDNA抽出用サンプルとしたが、野生スサビノリとサシキは1個体で十分なDNAが抽出できるほどの生長が見られなかったため、複数の葉体を使用した。

(2) DNAの抽出精製

葉体を1.0%パパイソ溶液で25℃1~2時間の振とう処理した後、0.1%AHC溶液による振とう処理を行った。処理時間はプロトプラストの単離状況を確認しながら調

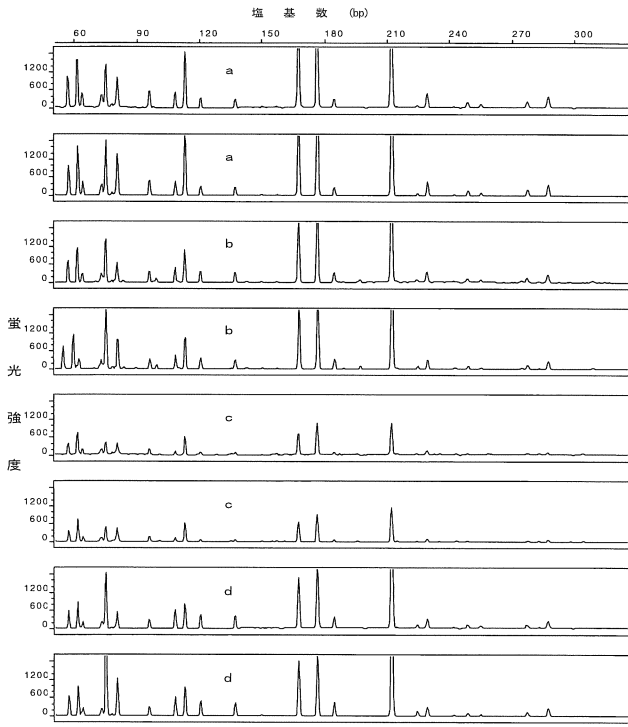


図1 抽出精製法別の葉体DNAのAFLP解析パターン
 a: CTAB法+塩化セシウム密度勾配法
 b: ISOP LANT II+キアゲンチップ100
 c: チオシアン酸グアジニウム+キアゲンチップ
 d: ISOP LANT II+アルカリヘミセルラーゼ+キアゲンチップ

整した。20 μmのミューラーガーゼでろ過して未消化の葉片を取り除き、マイクロチューブに入れて1,500rpm. 3分間の遠心によってプロトプラストを集めた。その後ISOP LANT II を使用してDNAを抽出し、37°C 1時間のRNase処理の後、キアゲンチップ20による精製を行った。

(3) AFLP解析

AFLP解析は前記と同様に行った。プライマーペアには0-A・0-C・0-T・C-0・T-0の5通りの組み合わせを用いた。

結 果

1. AFLP法に適した葉体DNAの抽出精製法

a, b, c, dの各抽出精製法で得られたDNAを用いて2回のAFLP処理を試みた。プライマーペアT-0におけるAFLPパターンを図1に示した。いずれの抽出精製法を用いてもAFLPパターンに大きな違いは認められなかった。しかし最も増幅断片が明瞭でノイズが少なかったのは塩化セシウム密度勾配法で精製したa法であった。次いでノイズが少なかったのは、DNA抽出後にAHC処理を行ったd法であった。逆に最も断片のピークが低く、ノイズも多く検出されたのはチオシアン酸グアジニウムで抽出したc法であった。他のプライマーペアの解析結果も図1に示したT-0と同様であった。

次に、e法によって抽出精製した4個体のDNAのプライマーペア0-AによるAFLP解析パターンを図2に示した。

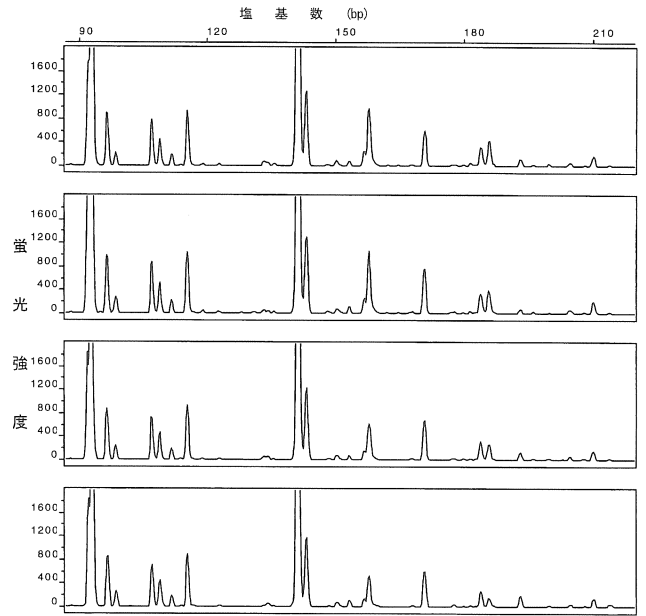


図2 FA89葉体4個体から抽出したDNAのAFLP解析パターン
 プライマーペアは0-A

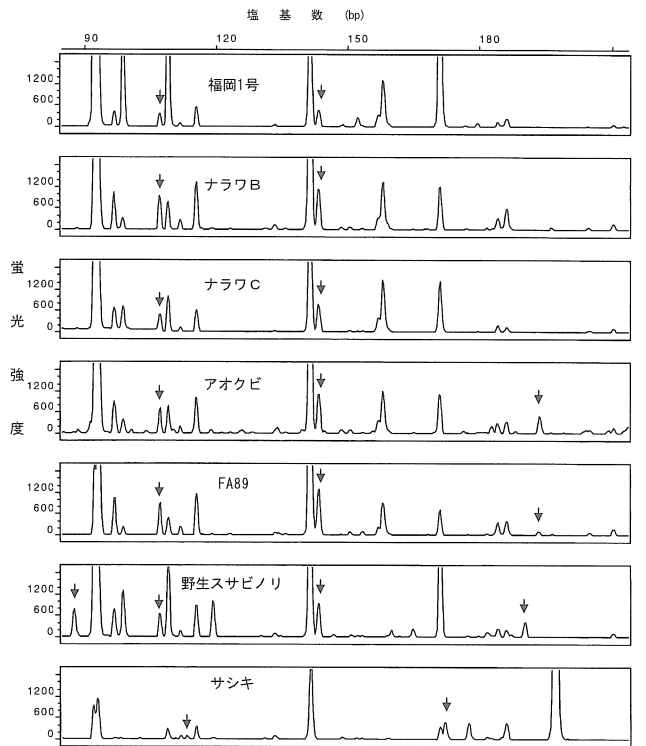


図3 ノリ葉体DNAの品種別AFLP解析パターン
 プライマーペアは0-A
 矢印は多型断片の例

4個体のAFLPパターンはすべて一致した。また他の7通りの組み合わせのプライマーペアにおいてもAFLPパターンは一致し、再現性の高いAFLP結果が得られることが判明した。

2. AFLP法によるノリ養殖品種識別

7品種のプライマーペア0-AにおけるAFLP解析パターンを図3に示した。それぞれの養殖品種間でパターンは

表1 5通りのプライマーペアで得られたノリ養殖品種間の多型断片数

	福岡1号	ナラワB	ナラワC	アオクビ	FA89	スサビ野生
ナラワB	4					
ナラワC	3	3				
アオクビ	3	7	4			
FA89	4	4	1	5		
スサビ野生	10	6	9	9	10	
サシキ	90	90	89	89	87	91

完全に一致せず、多型を示す断片が認められた。解析した5通りのプライマーペアで検出された増幅断片数は合計199断片であった。そのうち約52%の103断片が多型が認められた。しかし、各養殖品種間において認められた多型断片の約80%弱に当たる79断片はアサクサ系品種のサシキに認められた。表1に示したように福岡1号、ナラワB、ナラワC、アオクビおよびFA89のスサビノリ系5養殖品種間では野生スサビノリやサシキとの間に比べて多型を示した断片は少なかった。したがって1プライマーペアですべての品種を識別することは出来なかった。しかし複数のプライマーペアを使用することにより、5養殖品種を識別することは可能であった。

考 察

再現性が高く鮮明なAFLP解析結果が得られたノリ葉体DNAは、塩化セシウム密度勾配法で精製したDNAであった。しかし本法によるDNAの精製は手間と時間を要する上、大量のDNAを必要とする。大量のDNAを得るためには多くの葉体を必要とするが、殻胞子の発芽時に減数分裂するノリの場合、純系化されていない品種では、1枚の葉体であってもいわゆるキメラとなり先端部の細胞と根元部の細胞とではDNAが異なる。したがって、純系であることが保証されていない既存品種のDNA多型解析を行うには、葉体の一部から抽出したDNAか、二次芽葉体から抽出したDNAを用いなければならない。したがって材料を多く必要とする塩化セシウム密度勾配法は品種識別をするという目的に適していない。一方DNA抽出の前後に関わらずAHCによる多糖類の分解を行い、キアゲンチップで精製することによって塩化セシウム密度勾配法による精製DNAと同等の解析結果が得られた。しかし、AFLP法は非常に感度が高く、ノリ以外の生物のDNAが混入した場合に、増幅断片として検出されることが懸念される。ノリ葉体表面には多くのバクテリアが付着しており、それらと一緒に葉体を液体窒素で凍結粉碎してDNAを抽出することによってバクテリアのDNAも同時に抽出される可能性が高い。これを防ぐには、葉体をプロトプラスト化するのが適当と考えられる。プロトプラストを材料に

使えことにより、葉体表面に付着するバクテリアDNAの混入を抑えることが可能であろう。プロトプラスト単離処理は手間を要し、また経費がかかるものの、確実に信頼性の高い解析結果を得るためには必要な手順である。

ノリの品種を識別するためRFLP法⁶⁾、RAPD法⁷⁾、PCR-SSCP法⁸⁾、変異性が高い領域の塩基配列の解読⁹⁻¹¹⁾等が検討されてきた。しかしRFLP法は大量のDNAが必要で検出される多型バンドが少なく、近縁の品種間では識別できない可能性が高い。RAPD法は多くの多型バンドが認められるものの再現性が低く、PCR-SSCP法や塩基配列の解読は、種の違いや野生個体の判別は可能だが、品種間の違いは未だ認められていない。したがって、再現性が高くDNAの僅かな差異でも多型として検出される手法が求められていた。AFLP法は陸上農作物の品種識別が可能で、枝変わりのように突然変異で選ばれた品種の識別も可能なことが示されている。¹²⁾ノリの養殖品種も多くが突然変異を利用した選抜育種により開発されたもので、DNA変異の検出には、AFLP法が適していると考えられる。ノリDNAのAFLP解析については飯塚ら¹³⁾が色素変異体間での多型性を調べ、多型断片が多く検出されている。これは、肉眼でも形質の違いが明らかに認識できる品種間の多型を調べたものである。本報告で材料に使用したスサビノリ系養殖品種は、形態等には顕著な違いが認められないものである。そのような品種間でもAFLP法を用いることによって多型が認められ、品種識別も可能なことが明らかとなった。また、検出された多型断片数は、スサビノリ系養殖品種間では少なく、野生のスサビノリ、アサクサノリ系品種と遺伝的に遠縁と考えられるものほど多い傾向が認められた。AFLP解析データは品種の識別のみならず品種の系統解析にも有効と考えられる。さらに多くの品種においてAFLP法によるDNA解析を行い、品種改良の効率化等につなげて行きたい。

要 約

- 1) 再現性の高いAFLP解析結果が得られるノリ葉体DNAの抽出精製法を検討した。
- 2) 最も良好なDNAの抽出法は塩化セシウム密度勾配法であった。しかし葉体から単離したプロトプラストよりDNAを抽出し、キアゲンチップで精製したDNAも再現性が高く良好なAFLP結果を示した。
- 3) ノリ養殖品種7系統をAFLP法で解析したところ、5プライマーペアの組み合わせで119断片を検出した。多型は103断片で認められたが、多くはアサクサ

ノリ系のサシキに認められた。スサビノリ系の養殖品種にも多型断片が検出され、品種識別が可能なことを確認できた。

- 4) 養殖に使用されているスサビノリ系の養殖品種間の多型断片数は少なかった。しかし野生スサビノリ、アサクサ系品種と系統の遺伝的な距離が遠縁なほど AFLP多型断片数が多い傾向が認められた。

文 献

- 1) 三浦昭雄：ノリの養殖2品種の分類学的研究－I オオバアサクサノリについて，II ナラワスサビノリについて．昭和47年度日本水産学会春季大会講演要旨N 0. 239. 240
- 2) P. Vos, R. Horger, M. Bleeker et al.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414 (1995)
- 3) 嵯峨直恆：ラボマニュアルマリンバイオテクノロジー，裳華房29-43 (1991)
- 4) 村上哲明・瀬戸口浩彰・河原孝行・津村義彦：新版植物のPCR実験プロトコール，秀潤社189-196 (1997)
- 5) M. Nakajima, Y. Kitade, O. Iitsuka, S. Fukuda and N. Saga : Rapid extraction of high-quality genomic DNA from *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 48, 15-17 (2000)
- 6) 水上譲・岡内正典・小林正裕：アマノリDNAの多型性の検出: オリゴヌクレオチドプローブを用いたフィンガープリントの検討，平成6年度日本水産学会秋季大会講演要旨，p126
- 7) Y. Kaminishi, M. Kunimoto, Y. Yamamoto, Y. Mizukami and H. Kito : Rapid Discrimination of *Porphyra yezoensis* and *P. tenera* by PCR-SSCP Using Restriction Fragments and Silver Stain Detection. *Suisan Zoshoku* 47, 1, 1-7 (1999)
- 8) Y. Mizukami, M. Okauchi, H. Kito and M. Kobayashi: Discrimination of Laver Cultivars with RAPD Markers. *Fisheries Science* 62, 4, 547-551 (1996)
- 9) Y. Mizukami, Y. Kaminishi, M. Kunimoto, M. Kobayashi, M. Kobayashi, N. Murase and H. Kito: Comparison of Partial Nucleotide Sequences in the Exonic Region of a Small Subunit Ribosomal RNA Gene for Discrimination of Laver (*Porphyra*) Species and Cultivars. *Fisheries Science* 64, 6, 886-891 (1998)
- 10) Y. Mizukami, H. Kito, Y. Kaminishi, N. Murase and M. Kunimoto : Nucleotide Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacer Region of Cultivated (Cultivars) and Field-Collected Thalli of *Porphyra yezoensis* . *Fisheries Science* 65, 5, 788-789 (1999)
- 11) M. Kunimoto, H. Kito, D. P. Chen, Y. Kaminishi and Y. Mizukami : Discrimination of *Porphyra* species based on Small subunit ribosomal RNA gene. *Journal of Applied Phycology*, 11, 211-216 (1999)
- 12) 木村鉄也・島田武彦・山本俊哉・小曾納雅則・佐久間宣昭・山口正巳・林建樹・伴善之：AFLPマーカーによるモモ枝変り品種の識別，園芸学会雑誌，67，別2，p209 (1998)
- 13) O. Iitsuka, K. Nakamura, A. Ozaki, N. Okamoto and N. Saga : Genetic information of three pure lines of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) obtained by AFLP analysis. *Fisheries Science*, 68, 5, 1113-1117 (2002)