

## 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\*

測上 哲<sup>1</sup>・岩渕 光伸<sup>2a</sup>  
(<sup>1</sup>研究部・<sup>2</sup>有明海研究所)

遺伝子解析手法を用いてアマノリ低塩分株の新品種「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、シークエンスして 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号を識別することができた。

キーワード：ノリ，福岡有明1号，品種識別，DNA

現在ノリ養殖の現場には多くのノリ品種があふれ、その数は数百ともいわれている。これらの多くは生産者が独自に選抜・保存したものであり、陸上植物のような種苗法に基づく登録品種ではなく、厳密には「株」と呼ぶべきものである。そのような中、有明海研究所では河口域を中心とした低塩分漁場に適応した品種として、低塩分耐性で選抜した新品種「福岡有明1号」を作出し、2007年に種苗法に基づく品種登録を行った。イネやイチゴなどでは既に多くの品種が登録されているが、ノリについて都道府県で選抜育種し、品種登録したのは福岡有明1号が初めてである。しかしながら、上述のように現場にあふれる他品種と福岡有明1号との識別方法が確立されていないため、国外や海区外に持ち出されて養殖されても見分けることができない。しかも、ノリはフリー糸状体という形で簡単に保存や持ち運びができるため、コピー品の流通防止など種苗の実効的な保護は難しいのが現状である。さらに、ノリは環境条件による形態変異が大きく、外見的特徴による識別は極めて困難である。

一方、農業分野ではイネやイチゴなどの多くの栽培品種で遺伝子解析による品種識別技術が確立され、実用化されている。そこで、福岡有明1号についても遺伝子解析手法を用いて識別を試みることにした。アマノリの養殖株は遺伝的に多様性が少ないことが分かっているため、<sup>1)</sup>本研究では効率的に多型が検出でき、多くの陸上植物で実績のある RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) -STS (Sequence Tagged Site) 化法を用いて解析を行った。今回は生の室内培養葉体から抽出・精製した DNA をサンプルとして用いた。

## 方 法

### 1. サンプル

試験には福岡有明1号のほか、対照品種として福岡有明1号の選抜元株である FA89、ナラワスサビノリの原種である U-51、アサクサノリとスサビノリの種間交雑種で、品種登録された数少ないノリの一つであるあさぐも、及びアサクサノリ系統株であるサシキアサクサの計5株を用いた。DNA の抽出には、基本的に室内培養葉体をそれぞれ1個体ずつ用いた。多糖類を中心とした夾雑物の混入を極力減らすため、各検体を1%パパイン処理と0.1%アルカリヘミセルラーゼ処理によりプロトプラスト化した後、ISOPLANT II (ニッポンジーン社製)を用いて DNA を抽出した。基本プロトコルに従って抽出した DNA 溶液は、RNase 処理の後、RNase 及び残留した色素タンパクを除去するため、PCI 処理を2回、CIA 処理を1回行って精製した。

得られた DNA 溶液は、分光光度計 Ultrospec3000 (ファルマシア社製)で260nm の吸光度値を測定して原液濃度を算出し、TE Buffer で50ng/μL に濃度調整してストックソリューションとした。これをさらに滅菌水で希釈してワーキングソリューションを作成し、PCR 反応の鋳型として用いた。

### 2. RAPD マーカーの検索

反応条件は Mizukami *et al.*<sup>2)</sup> の方法を基に検討して決定した。Mizukami *et al.*<sup>2)</sup> は鋳型 DNA を25ng 用い

\* アマノリ類の品種識別に関する研究 - I  
a 現所属：漁業管理課

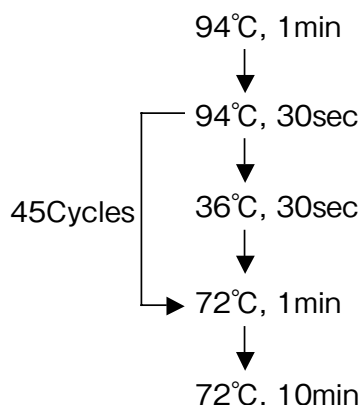


図1 RAPD スクリーニングの PCR 条件

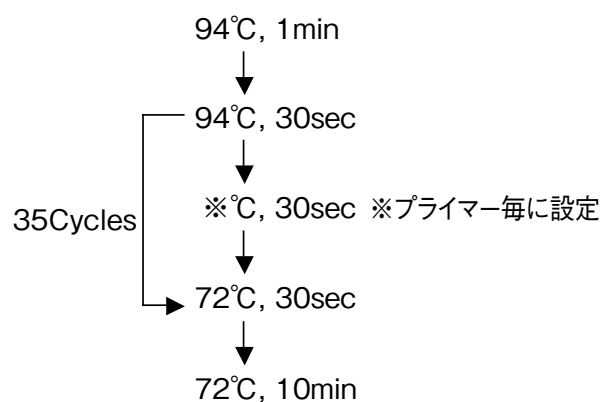


図2 STS 化プライマー使用の PCR 条件

て RAPD 解析を行っているが、1 枚の葉体から抽出できる DNA 量が限られることに加え、予備試験においてテンプレート量が多いと増幅しない場合があった。そこで数段階に希釈して検討した結果、5 ng でも十分に増幅することを確認できたため、ワーキングソリューションは 5 ng/μL に濃度調整した。プライマーは RAPD 10mer Kit (オペロン社製) を滅菌水で 10 μM に希釈したものを用いた。反応液組成は滅菌水 6.65 μL, 10× PCR Buffer (タカラバイオ社製) 1 μL, TaKaRa EX Taq (タカラバイオ社製) 0.05 μL, ランダムプライマー 0.5 μL, dNTP Mixture (タカラバイオ社製, 2.5 mM) 0.8 μL 及び鋳型 DNA 溶液 1 μL で計 10 μL 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, 1× TAE Buffer, 100V, 約 55 分で電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色して UV 照射下でバンドパターンを観察・記録した。福岡有明 1 号のみに特異的に出現するバンドが見つかった場合は再試験を行い、再現性があることが確認された RAPD マーカーを以降のサンプルとして用いた。

### 3. クローニング

RAPD スクリーニングで得られた特異的バンドはゲルから切り出し、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、ポジクローンと判定されたものを各断片それぞれ 1 個ずつ選び、LB 培地で拡大培養した。プラスミド精製は QuickLyse Miniprep Kit (キア

ゲン社製) を用いて行った。

### 4. シーケンス

プラスミドに挿入した断片は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてシーケンス反応後、BigDye X Terminator 精製キット (アプライドバイオシステムズ社製) で未反応の蛍光色素を除去し、310 ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) により塩基配列の解読を行った。得られた塩基配列情報は、BLAST 検索によりバクテリア由来等でないことを確認した。

### 5. STS 化プライマーの設計

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、基本的な考え方として、Forward 側プライマーは多型バンド末端にある RAPD プライマー配列を延長し、Reverse 側プライマーはバンド内部に設計することとした。設計ソフトは Primer 3 を用い、塩基数を 20 ~ 22 塩基程度、増幅断片長を 200 bp 前後として、T<sub>m</sub> 値、3' 側の相補性等を考慮しながら設計した。プライマー合成はタカラバイオ (株) に委託した。

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サンプルを使用し、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 6.15 μL, 10× PCR Buffer 1 μL, TaKaRa EX Taq 0.05 μL, フォワードプライマー 0.5 μL, リバースプライマー 0.5 μL, dNTP Mixture 0.8 μL 及び鋳型 DNA 溶液 1 μL で計 10 μL とした。PCR プログラムは図 2 に示したとおりである。アニーリング温度は各プライマーの T<sub>m</sub> 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

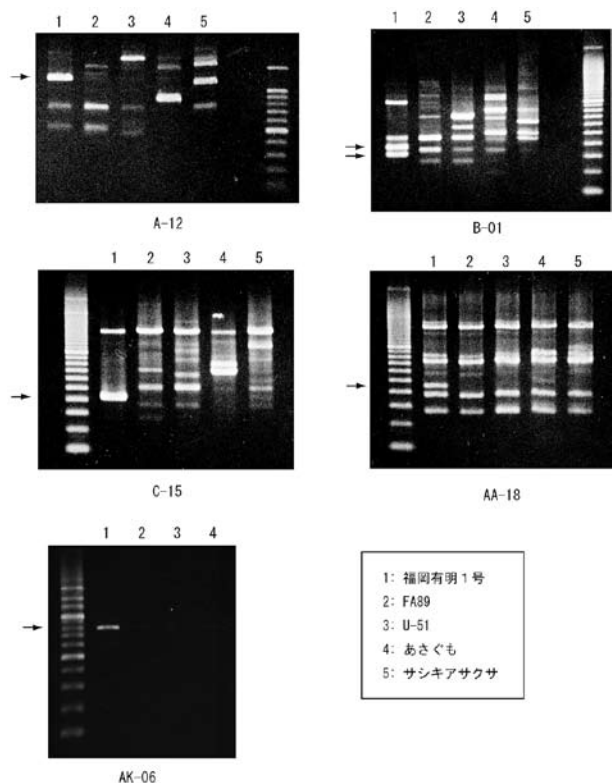


図3 RAPD スクリーニングで得られた福岡有明1号に特有な RAPD マーカー

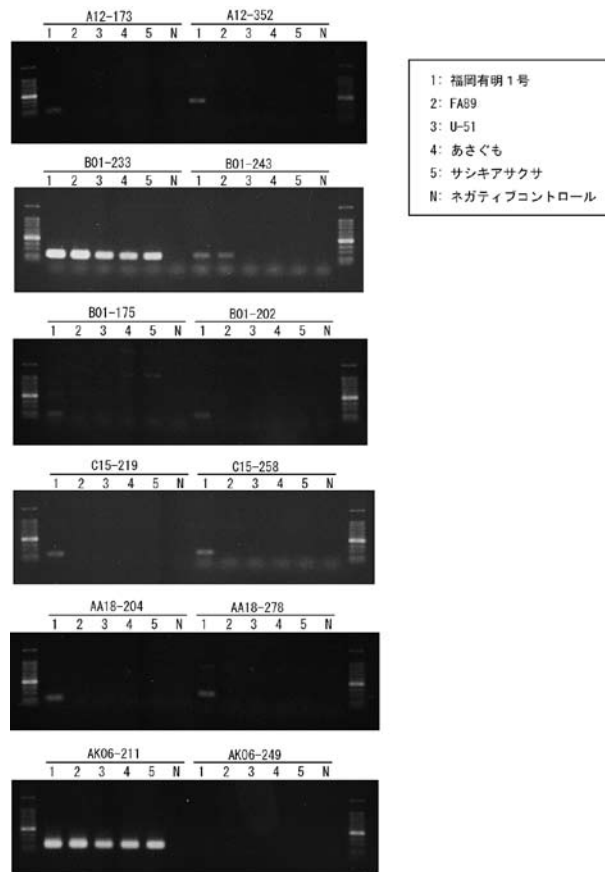


図4 STS 化プライマーによる増幅結果

た。増幅産物の電気泳動は、2%アガロースゲル使用、その他は RAPD スクリーニングと同様の条件とし、福岡有明1号のみに識別バンドが出現するかどうか確認した。

## 結 果

### 1. RAPD マーカーの検索

ランダムプライマーキット OPA ~ C, AA ~ AN 及び AT ~ AU のうち360種類を用いてスクリーニングを行った結果、5株の RAPD パターンは大きく分けてサビノリ系統株とアサクサノリ系統株とで異なる傾向がみられ、あさぐもはサシキアサクサと同様のパターンを示す場合が多かった。福岡有明1号と FA89は常に極めて相似したパターンを示し、相違したパターンを示すプライマーは非常に少なかったものの、A-12, B-01, C-15, AA-18, 及び AK-06の5種類のプライマーでは福岡有明1号に特有な RAPD マーカーが6本確認された(図3)。

### 2. STS 化プライマーによる識別

RAPD スクリーニングで得られた6本の RAPD マーカーをクローニング、シーケンスの後、1本のバンドにつき両端で1対ずつ、合計12組のプライマーペアを設計した(表1)。これらを用いて増幅試験を行った結果を図4に示した。これによると、A12-173, A12-352, B01-202, C15-219, C15-258, AA18-278, 及び AA18-204で福岡有明1号のみに識別バンドが出現した。また、B01-233及び AK06-211については全サンプルで、B01-243については福岡有明1号と FA89でそれぞれ識別バンドが出現した。AK06-249はいずれのサンプルでも識別バンドが出現しなかった。

## 考 察

今回作成した STS 化プライマー 12ペア中7ペアで福岡有明1号のみに識別バンドが出現したことから、これらは福岡有明1号の識別マーカーとして有効であると考えられた。また、イネやイチゴなどの高等植物で用いられている品種識別マーカーの開発手法がノリにも応用で

表1 設計した 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(°C)	塩基配列 (5' → 3')
A12-173	173	フォワード	19	55.2	TCGG CG ATAG TGA AAG TCG
		リバース	20	53.4	TTGCCCTTCTTG ATTGGTTC
A12-352	352	フォワード	19	53.0	TCGG CG ATAG TCCAACA AT
		リバース	20	55.4	GCCGG AGC ATTGATGATAGT
B01-233	233	フォワード	21	57.6	GTTTCGCTCCAGAGTGGAGTT
		リバース	20	59.5	GCCTCAACAGG AGGTAGCAC
B01-243	243	フォワード	21	55.6	GTTTCGCTCCACAATCATGTC
		リバース	20	55.4	ACAACACCCTGTGGG TGAAT
B01-175	175	フォワード	20	53.4	ACTTCGACCGTTGGAAATTG
		リバース	20	57.5	CTGTGAGTCAGCAACGTGGT
B01-202	202	フォワード	20	55.4	CTCCAAGTGCAACGTGCTTA
		リバース	20	53.4	CGAGCTCATAATTGGGG AAA
C15-219	219	フォワード	20	55.4	GACGG ATCAGGAAATACAGC
		リバース	20	57.5	GTAATCTCCCGCAGCAAGTC
C15-258	258	フォワード	20	55.4	ACGG ATCAGCTGTCCATGTT
		リバース	22	52.1	TCCGTAATAAACTTTGCGG TTT
AA18-278	278	フォワード	20	53.4	TCCAGCCATTGGAGG ATTTT
		リバース	20	55.4	CCATAGCGAAGAACGACCAT
AA18-204	204	フォワード	20	55.4	GTCCAGCCCTACAATTCGAT
		リバース	20	53.4	GGCCAGTATCATTTGCGTTTT
AK06-211	211	フォワード	22	55.8	TCACGTCCCTTTGTCAGTATGT
		リバース	20	53.4	CGATCGATTTGCGTCTTCTT
AK06-249	249	フォワード	23	56.0	TCACGTCCCTCTAAAGTAAGGAA
		リバース	20	53.4	AAGCATTCGAAGACCGGATT

きることが明らかとなった。

アマノリ類の品種識別については従来より研究が進められてきたが、特定の品種について識別技術が確立された事例はない。これまでは RAPD 法<sup>2)</sup> や RFLP 法<sup>3)</sup>, AFLP 法<sup>4)</sup> などの手法が用いられてきたが、再現性・信頼性が低い、DNA を大量に必要とする、あるいは特殊な機器や技術を必要とするなどの問題があり、簡便に高精度で識別を行うことは困難であった。しかし今回、STS 化プライマーを用いた PCR により、5 株と少ないサンプル中からではあるが特定の品種を識別することができた。この方法であれば、プライマーさえ用意すれば

一般的な PCR 機器・試薬を用いて目的の品種を検出することが可能であり、汎用的な技術として普及することができる。

結果の信頼性を高めるためにはさらに多くの養殖株を用いて検出試験を行う必要があるが、福岡有明 1 号と最も遺伝的に近いと思われる FA89 には識別バンドが出現していないことから、識別精度は高いと考えられた。また、全サンプルで識別バンドが出現した B01-233 と AK06-211 については、PCR 反応のポジティブコントロールとして利用できると考えられた。

ただ、今回用いたサンプルは生の葉体から高純度に抽

出・精製した DNA であり、現場に応用するためには現実的ではない。実際に利用する場面としては板海苔や焼き海苔、味付け海苔などの加工製品の抜き取り検査が最も現実的であると考えられる。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 の質低下も考えられる。また、特別な機器・試薬を必要とせず DNA を簡便に抽出できる技術の開発も重要であろう。これらの課題については、今後検討していきたい。

## 文 献

- 1) K. Niwa and Y. Aruga : Identification of currently cultivated *Porphyra* species by PCR-RFLP analysis. *Fish. Sci.*, **72**, 143-148 (2006).
- 2) Y. Mizukami, M. Okauchi, H. Kito and M. Kobayashi : Discrimination of Laver Cultivars with RAPD Markers. *Fish. Sci.*, **62**, 547-551 (1996).
- 3) Y. Mizukami, M. Okauchi, H. Kito and M. Kobayashi : DNA Fingerprinting of Cultivated Laver *Porphyra yezoensis* and *P. tenera* with Oligonucleotide Probes, and Its Application to Cultivar Discrimination. *Fish. Sci.*, **62**(2), 173-177 (1996).
- 4) 岩渕光伸 : AFLP 法によるノリ養殖品種の識別. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 第13号, 21-25 (2003).