アサクサ板ノリの品質管理・評価技術の開発—PCRによる 板ノリ中のアサクサノリ含量の簡易定量—

柿沼 誠,^{1*} 平 壮雄,¹ 岩出将英²

(2015年4月14日受付, 2015年6月10日受理)

¹三重大学大学院生物資源学研究科, ²三重県水産研究所鈴鹿水産研究室

Development of quality control and evaluation techniques for dried sheets of Asakusa-nori:
Simple estimation of *Pyropia tenera* thallus content in dried sheets using PCR analysis

MAKOTO KAKINUMA,^{1*} TAKEO TAIRA¹ AND SHOUJI IWANE²

¹Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, ²Suzuka Fisheries Research Division,
Mie Prefecture Fisheries Research Institute, Suzuka, Mie 510-0243, Japan

In order to develop quality control and evaluation techniques for dried sheets of Asakusa-nori, a simple, rapid method was created for using PCR analysis to estimate *Pyropia tenera* thallus content. Based on the mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide sequences of *P. tenera* and *P. yezoensis*, PCR primer sets were designed to amplify two mtDNA regions (*orf169-trnV* and *cox1* regions) with nucleotide polymorphisms between both species. After PCR amplification of *P. tenera* and *P. yezoensis* total DNAs with the mtDNA-specific primers, structural differences between both species such as gene loss and rearrangement in the *orf169-trnV* and *cox1* regions were easily detected, indicating that PCR analysis of these mtDNA regions is useful for discriminating *P. tenera* from *P. yezoensis*. *Pyropia tenera* content consisting of thallus pieces randomly collected from commercially-available sheets of dried Asakusa-nori was successfully estimated by PCR analysis of these mtDNA regions. In addition, the mtDNA fragments originating from *P. tenera* and *P. yezoensis* were amplified by competitive-PCR using total DNAs extracted from the punches of the dried-Asakusa nori sheets as the template. These results indicate that these techniques enable rapid, simple estimation of *P. tenera* thallus content in dried-Asakusa nori sheets.

キーワード: PCR, アサクサノリ, 板ノリ, 簡易定量, 種判別, スサビノリ, ミトコンドリア DNA

現在の日本におけるノリ養殖には様々な品種が利用されているが, その大部分はスサビノリ *Pyropia yezoensis* Ueda から選抜育種された栽培品種ナラワスサビノリ *P. yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura であるとされ, アサクサノリ *P. tenera* Kjellman やその栽培品種オオバアサクサノリ *P. tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura はほとんど養殖されていない。¹⁻⁴⁾ しかしながら, 昭和20年代頃まではアサクサノリを用いた養殖が主流であった。アサクサノリは第4次レッドリストで絶滅危惧種I類 (CR+EN) に分類されているが (第4次レッドリスト: http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html, 環境省生物多様性情報システム, 2015年4月1日), 国内には数カ所のアサクサノリ生育地が知られており, 少数ながらアサクサノリ養殖を行っている生産地も存在す

る。⁵⁻⁷⁾ アサクサノリはスサビノリに比べて栄養要求性が高いために生長が悪く, 病障害にかかりやすいなどの特性をもっているため養殖が難しいとされている。^{1,3,8)} 一方, アサクサノリ製品 (アサクサ板ノリ) はスサビノリのそれと比べて赤みを帯びるが, 風味や食感に優れているため,^{1,9,10)} 近年では貴重な逸品として高値で流通している。

数少ないアサクサノリの自生地の一つとして, 三重県伊勢市大湊が知られている。⁵⁻⁷⁾ 三重県水産研究所は平成23年3月に本自生地よりアサクサノリを採集し, その純系化フリー糸状体を保有している。また, このアサクサノリを陸上採苗してノリ網を作り, 平成25年度漁期から三重県内の一部漁場で試験養殖を行っている。平成25年度漁期のアサクサ板ノリ生産枚数は約9万枚

(県内ノリ生産量の約 0.03%) と少なかったものの、共販における平均入札価格はスサビ板ノリの約 5 倍であったため、今後アサクサノリ養殖に取り組む生産者は増加すると予想される。アサクサノリ養殖にはスサビノリの養殖設備を流用できるが、両種は育苗段階において葉状体の一部から単胞子（二次芽）を放出する生長特性をもつため、^{1,3)}アサクサノリとスサビノリを同じ漁場あるいは隣接した漁場で養殖した場合、両種の単胞子がそれぞれの養殖網に流入・付着すると考えられる。アサクサノリの養殖網にスサビノリの単胞子が流入した場合、スサビノリの方が生長性に優れているため、^{1,3,8)}アサクサノリが駆逐されて育成・摘採期にはスサビノリが優占種となり、¹¹⁾このようなノリ網から生産されたアサクサ板ノリのアサクサノリ含量は大きく低下している危険性がある。したがって、アサクサノリ漁場から生産される板ノリ製品の品質を管理・評価するための技術開発が急務となっている。

近年、食品業界における食品偽装が大きな社会問題となっているが、品質の維持・管理には一般に、特定の DNA 領域の塩基配列を基に原料の種類や品種を同定する食品 DNA 検査が利用されている。アマノリ属藻類の場合、ミトコンドリア DNA (mtDNA)、葉緑体 DNA、核 DNA の特定の遺伝子領域を対象とした塩基配列の比較解析や polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 分析による種判別技術が既に確立されており、^{4,5,8,12,13)}これら技術を用いることでアサクサ板ノリへのスサビノリ混入の有無を確認することは可能である。しかしながら、特定遺伝子領域の塩基配列解析には費用と時間がかかり、PCR-RFLP 分析については標的遺伝子領域の増幅 DNA 断片長が種に関わらずほぼ同一になるよう PCR プライマーが設計されており、制限酵素による増幅 DNA 断片の切断パターンを比較する必要がある。今後、市場に多く流通していくと考えられるアサクサ板ノリの品質を管理・評価していくためには、スサビノリ混入の有無やアサクサノリ含量をより迅速、簡便且つ正確に調べるための技術が必要である。

本研究では、アサクサノリとスサビノリの種判別や品種判別に有用とされ、既に両種的全塩基配列が明らかにされている mtDNA に着目し、^{6,7,12,14,15)}種間で遺伝子構造が大きく異なる 2 領域を種判別マーカーに選定した。各領域に特異的なプライマーを用いた PCR 分析により、制限酵素処理を行わずとも簡便に両種を判別できること、アサクサ板ノリ葉状体片の簡易種判別や板ノリ片の抽出 DNA を鋳型とした競合的 PCR により、板ノリ中のアサクサノリ含量を推定できることを見出したので報告する。

材料と方法

実験材料 mtDNA を対象とした PCR-RFLP や塩基配列の確認には、三重県伊勢市大湊の宮川河口域から三重県水産研究所が採集後に純系化し、管理・維持しているアサクサノリ (PtMIE) の葉状体、アマノリ養殖品種の特性評価に用いられているスサビノリ基準品種 U-51 (PyU51) の葉状体、^{16,17)}三重県内のノリ漁場で用いられているノリ網から回収した複数スサビノリ養殖品種 (PyMIX) の混合葉状体を用いた。また、アサクサ板ノリのアサクサノリ含量の推定には、平成 25 年度漁期中に三重県内の異なる漁場 (A および B) で生産された未焼成のアサクサ板ノリを用いた。葉状体試料および板ノリ試料は、実験に供するまで -20°C で保管した。

PCR-RFLP アサクサノリ (PtMIE) およびスサビノリ (PyU51, PyMIX) 葉状体からの全 DNA 抽出 (ニッポンジーン, ISOPLANT II を使用)、mtDNA 領域の PCR 増幅、制限酵素処理は既報の方法^{4,6,7,12)}に従った。なお、PCR-RFLP の対象とした mtDNA の ATP synthase F₀ subunit 6 遺伝子領域 (*ATP6* 遺伝子領域) と tRNA-Cys 遺伝子 (*trnC* 遺伝子) から小サブユニット・リボゾーム RNA 遺伝子 (*rns* 遺伝子) までの領域 (*trnC-rns* 遺伝子領域) の PCR 増幅には、mit12BF と mit12CR, mit17BF と mit17R のプライマーセットを用い (Table 1), *ATP6* 遺伝子領域の増幅 DNA 断片は制限酵素 *SspI* または *HypCH4III* (*TaaI* のアイソシゾマー) で、*trnC-rns* 遺伝子領域の増幅 DNA 断片は制限酵素 *TaqI* で処理した。^{7,12)}

mtDNA 特異的プライマーと塩基配列決定 アサクサノリおよびスサビノリの mtDNA の全塩基配列情報^{14,15)}を比較し、両種間で塩基配列や遺伝子構造に大きな差の認められた 2 領域、機能不明タンパク質遺伝子 (*orf169* 遺伝子) から tRNA-Val 遺伝子 (*trnV* 遺伝子) までの

Table 1 Nucleotide sequences of primers for PCR amplifications

Primer name	Sequence
For PCR-RFLP*	
mit12BF	5'-d <u>AGTATG</u> CCCGATGTCATAT-3'
mit12CR	5'-dGCTCAATGGTCAGAGCATACG-3'
mit17BF	5'-dGTCAGTTCGAATCTGGCCCTAGTT-3'
mit17R	5'-dATGTGTTAGGCCGACCACTA-3'
For PCR amplification of the <i>orf169-trnV</i> mtDNA region	
<i>orf169</i> -F	5'-dCTGACATTAAGAGAAGAGAAAGTAGGC-3'
<i>trnV</i> -R	5'-dCATTTCGGTGTAACAAAAACGCTCTAC-3'
For PCR amplification of the <i>cox1</i> mtDNA region	
<i>cox1</i> -F	5'-dGCTAGTATAATACCAGTAAGTCCTCCT-3'
<i>cox1</i> -R	5'-dTCACATGTATACTGTTGGCCTTGATGT-3'

* PCR primers are modified from Abe *et al.* (2013).¹²⁾ Nucleotides modified in this study are underlined.

領域 (*orf169-trnV* 遺伝子領域) および cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子領域 (*cox1* 遺伝子領域) を選定した。各領域を増幅するためのプライマーセットを作製し (Table 1), PtMIE, PyU51, PyMIX から抽出した全 DNA を鋳型として各領域の PCR 増幅を行った。なお, 反応液は全 DNA 溶液 (10 ng/ μ L) 0.5 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2 μ L, dNTP 混合液 (各 2.5 mM) 2 μ L, 各プライマー (10 μ M) 0.4 μ L, *ExTaq* (タカラバイオ) 0.2 μ L に滅菌水を加えて 20 μ L に調製した。反応条件は, 94 $^{\circ}$ C 2 分間の後, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 72 $^{\circ}$ C 5 分間を 7 サイクル, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 67 $^{\circ}$ C 5 分間を 33 サイクル, 次いで 67 $^{\circ}$ C 8 分間とした。

アガロースゲル電気泳動により目的 DNA 断片の増幅を確認後, 反応液の一部を illustra ExoStar (GE Healthcare Life Sciences) で処理し, 残存プライマーの分解と未反応 dNTPs の不活性化を行った。この DNA 溶液を鋳型として BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により蛍光標識し, DNA シーケンサー (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いて増幅 DNA 断片の塩基配列を決定した (国際塩基配列データベースのアクセッション番号: LC047782-LC047785)。

アサクサ板ノリ葉状体片からの全 DNA 抽出 Touhata *et al.* (2013)¹⁸⁾ の方法に従い, アサクサ板ノリの一部 (1.5 $\times$ 1.5 cm) を蒸留水中に浸漬し, 剥離した葉状体片 12 片 (検体 1-12) (Fig. 1a) を個別に 2.0 mL 容チューブに回収して, 全 DNA 抽出を行うまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。全 DNA 抽出は, 0.3 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 5 M 尿素, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 5% フェノールを含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (DNA 抽出液 1) を用いる陸上植物の全 DNA 抽

出法 (EM1)^{19,20)}, または 0.2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% TritonX-100, 0.5 M グアニジン塩酸を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) (DNA 抽出液 2) を用いる菌類の全 DNA 抽出法 (EM2) (User-Developed Protocol QG08 (2001): <http://www.qiagen.com/jp/resources/resourcedetail?id=cb2ac658-8d66-43f0-968e-7bb0ea2c402a&lang=en>, QIAGEN GmbH, Hilden, 2014 年 11 月 4 日) により行った。また, 抽出 DNA に混在する多糖類などの夾雑物を除去するために, 各抽出法に DNA 吸着レジンをを用いた精製を組み合わせた。

1. 抽出法 EM1 による全 DNA 抽出 葉状体片 (検体 1-6) の入った 2.0 mL 容チューブにステンレス製ビーズ (ϕ 3 mm) を 5 個と DNA 抽出液 1 を 0.3 mL 加え, ビーズ破砕機 (μ T-01, タイテック) で 4600 rpm, 3 分間処理して葉状体片を破砕した。遠心分離 (12000 $\times$ g, 室温, 5 分間) 後に得られた上清を回収し, その一部 (100 μ L) についてはフェノール・クロロホルム (フェノール:クロロホルム:イソamilアルコール=25:24:1) 処理 (PCI 処理), エタノール沈殿 (EtOH 沈殿) を行い, 得られた沈殿を 0.1 mL の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0, TE 緩衝液) に溶解した (抽出法 EM1-1)。別途, 遠心分離後の上清の一部 (100 μ L) を QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製し, レジンに吸着した全 DNA を 0.1 mL の TE 緩衝液で回収した (抽出法 EM1-2)。

2. 抽出法 EM2 による全 DNA 抽出 葉状体片 (検体 7-12) の入った 2.0 mL 容チューブにステンレス製ビーズを 5 個と DNA 抽出液 2 を 0.3 mL 加え, ビーズ破砕機で葉状体片を破砕した。遠心分離後に得られた上清を回収し, RNaseA 処理 (終濃度 20 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 30 分間), 次いで proteinase K 処理 (終濃度 10 μ g/mL, 50 $^{\circ}$ C, 60 分間) を行った。この溶液の一部 (100 μ L) については PCI 処理, EtOH 沈殿を行い, 得られた沈殿を 0.1 mL の TE 緩衝液に溶解した (抽出法 EM2-1)。別途, 溶液の一部 (100 μ L) を QIAEX II Gel Extraction Kit により精製し, レジンに吸着した全 DNA を 0.1 mL の TE 緩衝液で回収した (抽出法 EM2-2)。

アサクサ板ノリ片からの全 DNA 抽出 アサクサ板ノリからコルクボーラー (穴開け径 4 mm) を用いて板ノリ片 3 片 (検体 PS1-PS3) を切り出し (Fig. 1b), 個別に 2.0 mL 容チューブに回収して全 DNA 抽出を行うまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。板ノリ片からの全 DNA 抽出は, 抽出法 EM1-1 により行った。なお, 板ノリ片には葉状体片が約 20-30 片含まれていたため (Fig. 1b), 得られた沈殿は 2.0 mL の TE 緩衝液に溶解した。

板ノリ葉状体片の種判別によるアサクサノリ含量の推定 葉状体片から調製した全 DNA 溶液を鋳型とし, *orf169-trnV* 遺伝子領域および *cox1* 遺伝子領域に特異

Fig. 1 Samples used for total DNA extraction from dried nori sheets. (a) Dried nori sheets (1.5 $\times$ 1.5 cm square) were soaked in distilled water. The reconstituted sheets released small pieces of chopped thalli, and 12 of these pieces were randomly collected for total DNA extraction. (b) Dried nori sheets were punched with a cork borer (ϕ 4 mm). Three punched sections of a dried nori sheet were used for total DNA extraction. Each section included approximately 30 pieces of chopped thalli. Bar, 1 cm.

的なプライマーセット (Table 1) を用いて PCR を行った。なお, 反応液は全 DNA 溶液 1 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 1 μ L, dNTP 混合液 (各 2.5 mM) 1 μ L, 各プライマー (10 μ M) 0.2 μ L, *ExTaq* 0.05 μ L に滅菌水を加えて 10 μ L に調製した。反応条件は, 94 $^{\circ}$ C 2 分間の後, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 72 $^{\circ}$ C 5 分間を 5 サイクル, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 67 $^{\circ}$ C 5 分間を 25 サイクル, 次いで 67 $^{\circ}$ C 8 分間とした。反応液 1 μ L をアガロースゲル電気泳動に供し, 増幅 DNA 断片長の違いで葉状体片の種判別を行い, 全検体数に対するアサクサノリと判別された検体数から板ノリ中のアサクサノリ含量を推定した。

板ノリ片 DNA の競合的 PCR によるアサクサノリ含量の推定 PtMIE および PyU51 から抽出した全 DNA 溶液を TE 緩衝液で希釈後 (終濃度 10 ng/ μ L), 各希釈 DNA 溶液を体積比 2 : 8, 4 : 6, 6 : 4, 8 : 2 (PtMIE : PyU51) となるように混合して標準 DNA 溶液 (20, 40, 60, 80% PtMIE) を調製した。各標準 DNA 溶液ならびに板ノリ片から調製した全 DNA 溶液を鋳型とし, *orf169-trnV* 遺伝子領域に特異的なプライマーセット (Table 1) を用いて PCR を行った。なお, 反応液は全 DNA 溶液 2.5 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, dNTP 混合液 (各 2.5 mM) 5 μ L, 各プライマー (10 μ M) 1 μ L, *ExTaq* 0.5 μ L に滅菌水を加えて 50 μ L に調製した。反応条件は, 94 $^{\circ}$ C 2 分間の後, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 72 $^{\circ}$ C 5 分間を 5 サイクル, 94 $^{\circ}$ C 25 秒間, 67 $^{\circ}$ C 5 分間を 25 サイクル, 次いで 67 $^{\circ}$ C 8 分間とした。16 サイクル以降 2 サイクル毎に反応液 5 μ L を回収し, そのうち 2 μ L をアガロースゲル電気泳動に供した。臭化エチジウム染色したゲルの蛍光画像を Gel Doc EZ システム (BIO-RAD) で撮影後, 付属の Image Lab ソフトウェアを用いてアサクサノリおよびスサビノリ由来の増幅 DNA 断片の蛍光強度を解析した。標準 DNA 溶液を鋳型とした時の増幅

DNA 断片の蛍光強度比 (スサビノリに対するアサクサノリの比) と板ノリ片全 DNA 溶液を鋳型とした時の増幅 DNA 断片の蛍光強度比から, 全 DNA 溶液中のアサクサノリおよびスサビノリ全 DNA の組成比を求め, 板ノリ中のアサクサノリ含量を推定した。

結 果

葉状体試料の PCR-RFLP PtMIE, PyU51, PyMIX の PCR-RFLP の結果を Fig. 2 に示す。*ATP6* 遺伝子領域および *trnC-rns* 遺伝子領域の PCR により, 予想サイズの DNA 断片の増幅が認められた。アサクサノリおよびスサビノリの *ATP6* 遺伝子領域の増幅 DNA 断片 (670 bp) は制限酵素 *SspI* により, それぞれ 364/306 bp および 306/196/168 bp に切断され, *trnC-rns* 遺伝子領域の増幅 DNA 断片 (1341 bp) は制限酵素 *TaqI* により, それぞれ 834/500/7 bp および 1334/7 bp に切断される。¹²⁾ PtMIE はアサクサノリ, PyU51 と PyMIX はスサビノリの PCR-RFLP パターンを示した (Fig. 2a)。なお, PyMIX は複数品種の混成試料であったが, 全てスサビノリ栽培品種と判断された。

アサクサノリ *ATP6* 遺伝子領域の増幅 DNA 断片を制限酵素 *HypCH4III* で処理した場合, 野生型アサクサノリでは 2 断片 (431/229 bp) に, 栽培品種オオバアサクサノリでは 3 断片 (431/147/82 bp) になる。⁷⁾ PCR-RFLP 分析の結果, PtMIE は野生型アサクサノリと判別された (Fig. 2b)。

mtDNA 特異的プライマーと増幅 DNA 断片の塩基配列 アサクサノリおよびスサビノリに共通の *orf169-trnV* 遺伝子領域特異的プライマーセット (*orf169-F* と *trnV-R*) および *coxI* 遺伝子領域特異的プライマーセット (*cox1-F* と *cox1-R*) を作製した (Table 1, Fig. 3a, b)。PtMIE, PyU51, PyMIX の全 DNA を鋳型とし, 各

Fig. 2 PCR-RFLP profiles of the *P. tenera* strain (PtMIE), *P. yezoensis* standard strain (PyU51), and mixture of locally-cultivated strains (PyMIX). In panel (a), PCR products (U) of the partial mtDNA regions related to *ATP6* (*ATP6*) and *trnC-rns* (*trnC*) genes were digested (D) with *SspI* and *TaqI*, respectively. In panel (b), PCR product (U) was digested (D) with *HypCH4III*. Lanes M1 and M2 contain 0.5 kbp and 0.1 kbp ladder markers, respectively.

Fig. 3 Schematic representation of partial mtDNA regions related to the *orf169-trnV* (a) and *cox1* (b) genes, and agarose-gel electrophoretic patterns of *orf169-trnV* and *cox1* mtDNA fragments amplified by PCR (c). In panels (a) and (b), horizontal bars and boxes represent flanking mtDNA or introns and gene coding exons, respectively. The structures of mtDNA of *P. tenera* (Pt) and *P. yezoensis* (Py) are based on the nucleotide sequence data from NCBI reference sequence numbers NC_021475¹⁴⁾ and NC_017837¹⁵⁾ respectively. The ORF of the *cox1* genes is interrupted by three introns in the Pt and Py mtDNAs. Arrows indicate gene-specific primers for PCR amplification of *orf169-trnV* and *cox1* mtDNA fragments (Table 1). Abbreviations tA, tR, and tV (a), and e1-e4 (b) indicate *trnA-ugc*, *trnR-acg*, and *trnV-uac*, and *cox1* coding exons, respectively. In panel (c), PCR amplification of mtDNA fragments was performed using total DNAs extracted from PtMIE (lane 1), PyU51 (lane 2), and PyMIX (lane 3) as the templates. Arrowheads and arrows indicate the mtDNA fragments corresponding to *P. tenera* and *P. yezoensis*, respectively. Lanes M1 and M2 contain 0.5 kbp and 0.1 kbp ladder markers, respectively.

プライマーセットを用いてPCRを行ったところ、PtMIEでは約2.2 kbp (*orf169-trnV* 遺伝子領域) および約0.2 kbp (*cox1* 遺伝子領域) のDNA断片の増幅が、PyU51とPyMIXでは約3.7 kbp (*orf169-trnV* 遺伝子領域) および約2.5 kbp (*cox1* 遺伝子領域) のDNA断片の増幅が認められ (Fig. 3c), いずれも予想サイズと合致していた。

増幅DNA断片の塩基配列解析の結果、PyU51およびPyMIXの*orf169-trnV* 遺伝子領域と*cox1* 遺伝子領域の塩基配列は一致していた。PtMIE, PyU51, PyMIXの*orf169-trnV* 遺伝子領域 (PtMIE, 2156 bp; PyU51/MIX, 3698 bp) と*cox1* 遺伝子領域 (PtMIE, 207 bp; PyU51/MIX, 2523 bp) の塩基配列を既報のもの (アサクサノリ *P. tenera*, NC_021475; スサビノリ *P. yezoensis*, NC_017837)^{14,15)} と比較したところ、*cox1* 遺伝子領域

域についてはそれぞれの種で報告されている塩基配列と一致した。一方、*orf169-trnV* 遺伝子領域の塩基配列には違いが認められ、既報のアサクサノリ mtDNA の相当領域の塩基配列と比較して PtMIE では 11 bp の挿入、12 bp の欠失、9 bp の置換が、既報のスサビノリ mtDNA の相当領域の塩基配列と比較して PyU51/MIX では 1 bp の挿入が認められた。

板ノリ葉状体片を用いたアサクサノリ含量の推定 浸漬したアサクサ板ノリから葉状体12片 (検体 1-12) を個別に回収し、DNA抽出液 1 (検体 1-6) または DNA抽出液 2 (検体 7-12) を用いて全DNAを抽出後、2通りの方法で精製・濃縮した。全DNA溶液を鋳型とし、*orf169-trnV* 遺伝子領域または*cox1* 遺伝子領域特異的プライマーセット (Table 1) を用いてPCRを行い、増幅DNA断片長の違いにより各葉状体片の種判別を行

った。その結果, A 漁場産アサクサ板ノリでは 12 検体中 10 検体, B 漁場産アサクサ板ノリでは 12 検体中 5 検体がアサクサノリと判別され (Fig. 4), それぞれのアサクサノリ含量は約 80% および約 40% と推定された。なお, 抽出方法の違いは標的遺伝子領域の PCR 増幅による種判別結果に影響しなかった。

板ノリ片を用いたアサクサノリ含量の推定 標準 DNA 溶液 (20, 40, 60, 80% PtMIE) および最も簡易な抽出法 EM1-1 によりアサクサ板ノリ片 (検体 PS1-PS3) から調製した全 DNA を鋳型とし, *orf169-trnV* 遺伝子領域特異的プライマーセット (Table 1) を用いて PCR を行った。アサクサノリおよびスサビノリ由来の増幅 DNA 断片の蛍光強度を解析したところ, 標準 DNA 溶液については 24 サイクル以降, A 漁場産板ノリ片 DNA 溶液については 24-26 サイクル以降, B 漁場産板ノリ片 DNA 溶液については 28 サイクル以降で一方の DNA 断片の増幅がプラトーに達していた (Fig. 5a, b)。指数増加期における増幅 DNA 断片の蛍光強度比は, 20, 40, 60, 80% PtMIE で 0.24 ± 0.06 , 0.40 ± 0.10 , 0.64 ± 0.15 , 0.99 ± 0.08 (18-22 サイクル), A 漁場産板ノリ片 PS1-PS3 で 0.79 ± 0.16 , 0.83 ± 0.16 , 0.89 ± 0.08 (18-22 または 20-24 サイクル), B 漁場産板ノリ片 PS1-PS3 で 0.34 ± 0.07 , 0.36 ± 0.04 , 0.32 ± 0.08 (22-26 サイクル) であり, アサクサノリおよびスサビノリ由来 DNA 断片の増幅効率に著しい差はみられなかった。そこで, 標準 DNA 溶液を鋳型とした時の増幅 DNA 断片の蛍光強度比と, 標準 DNA 溶液中のアサクサノリ全 DNA 含量から検量線を作製し (Fig. 5c), これを基に板ノリ片から調製した全 DNA 溶液のアサクサノリとスサビノリの全 DNA 組成比を調べた。その結果, A 漁場産板ノリ片のアサクサノリ含量は $73 \pm 4.0\%$ (PS1-PS3 でそれぞれ 69, 73, 77%), B 漁場産板ノリ片のアサクサノリ含量は $30 \pm 0.6\%$ (PS1-PS3 でそれぞれ 30, 31, 30%) と推定された。

考 察

アマノリ属藻類の種判別には一般に, mtDNA の *ATP6* 遺伝子領域や *trnC-rns* 遺伝子領域,^{12,13)} 葉緑体 DNA の ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) スペーサー領域,^{5,8)} 核 DNA の ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 領域^{4,5,8)} や actin-related protein 4 遺伝子 (*ARP4* 遺伝子) 領域など^{21,22)} を対象とした PCR-RFLP が用いられている。また, mtDNA の *ATP6* 遺伝子領域,^{6,7)} 葉緑体 DNA の Rubisco スペーサー領域や Rubisco 大サブユニット遺伝子 (*rbcl* 遺伝子),²³⁾ 核 DNA の小サブユニット rDNA 遺伝子 (SSU rDNA 遺伝子) とその近傍の ITS 領域^{18,23-26)} の塩基配列データ, それらと PCR-RFLP の結

Fig. 4 Agarose-gel electrophoretic patterns of *orf169-trnV* and *cox1* mtDNA fragments amplified by PCR. Twelve thallus pieces (lanes 1-12) were randomly collected from dried Asakusa nori sheets A (a) and B (b) from different *Pyropia* cultivation farms, and the total DNA extracted from each thallus piece was used as the template. Arrowheads and arrows indicate the mtDNA fragments due to *P. tenera* and *P. yezoensis*, respectively. EM1-1, EM1-2, EM2-1, and EM2-2 show total DNA extraction methods as described in the Materials and Methods. Lane M contains an 0.5 kbp ladder marker.

果との組み合わせ, random amplified polymorphic DNA-PCR¹³⁾により, アサクサノリとスサビノリの野生種と栽培品種の判別や同一種内の品種判別, 品種の系統化や起源の推定が可能であることが示されている。しかしながら, 特定遺伝子領域の塩基配列解析を行う場合, その費用と作業時間は膨大になり, SSU rDNA 遺伝子とその近傍の ITS 領域といった複数コピー存在する標的遺伝子では PCR により複数バンドが増幅される場合もある。²⁷⁾ 比較的簡便で明瞭な結果が得られる PCR-

Fig. 5 Agarose-gel electrophoretic patterns of *orf169-trnV* mtDNA fragments amplified by competitive PCR (a, b) and fluorescence intensity analysis of relative changes in total DNA content by competitive PCR (c). In panel (a), PCR amplification of *orf169-trnV* mtDNA fragments was performed using standard DNAs as the templates. The standard DNAs were prepared by mixing the total DNAs extracted from *P. tenera* strain (PtMIE) and *P. yezoensis* standard strain (PyU51) in the ratios (PtMIE : PyU51) of 2 : 8 (20% PtMIE), 4 : 6 (40% PtMIE), 6 : 4 (60% PtMIE), and 8 : 2 (80% PtMIE). In panel (b), three punches (PS1–PS3) were randomly collected from dried Asakusa nori sheets A and B from different *Pyropia* cultivation farms, and the total DNA extracted from each punch was used as the template. Arrowheads and arrows indicate the mtDNA fragments corresponding to *P. tenera* and *P. yezoensis*, respectively. Numbers (16–30) indicate the number of PCR amplification cycles. Lane M contains a 0.5 kbp ladder marker. In panel (c), the relative fluorescence intensities of the PtMIE *orf169-trnV* mtDNA fragments to the PyU51 *orf169-trnV* mtDNA fragments were derived from the exponential phase of amplification (18–22 cycles) in panel (a), and the data were plotted as a function of the relative fluorescence intensity versus total DNA content of PtMIE.

RFLP については、基本的には純系化された株が対象（検体）で、アマノリ属藻類の多岐にわたる種の判別方法である。¹²⁾ アサクサノリ漁場で栽培・摘採された藻体

を加工して板ノリを生産した場合、板ノリ中にはアサクサノリと近隣漁場から流入したスサビノリが含まれるため、基本的にはこれら2種を判別することで板ノリ中

のアサクサノリ含量を推定できると考えられる。他藻種における種判別や集団遺伝構造・系統解析には、片親由来で基本的に組換えがないとされる mtDNA マーカーが利用されており、²⁸⁻³⁰⁾ アサクサノリとスサビノリの種判別や両種内の品種判別においても有用とされている。^{6,7,12)} さらに近年、アサクサノリとスサビノリの mtDNA の全塩基配列が明らかにされ、両種間で遺伝子構造の大きく異なる領域のあることが示されている。^{14,15)} 本研究ではこれら領域に着目し、アサクサノリとスサビノリの判別を簡易化するための標的遺伝子領域として *orf169-trnV* 遺伝子領域および *cox1* 遺伝子領域を選定した (Fig. 3)。本研究で用いた各領域特異的プライマーの塩基配列は、アサクサノリとスサビノリの両種で同一であったが (Table 1)、増幅 DNA 断片長が両種間で異なるように設計したため (Fig. 3)、PCR 後に制限酵素処理を行うことなく両種を判別することが可能となった。

orf169-trnV 遺伝子領域および *cox1* 遺伝子領域の塩基配列解析の結果、複数のスサビノリ栽培品種が殻胞子付けされ、県内ノリ漁場で用いられている種網から採藻した混合試料 PyMIX の両遺伝子領域の塩基配列は、スサビノリ基準品種 PyU51 のものと一致した。アマノリ属藻類の種判別に汎用されている核 DNA の SSU rDNA 領域や ITS 領域では、同種内においても塩基の欠損や置換、遺伝子構造の差異が認められるが、^{8,21,24-26,31)} 本研究で利用した各 mtDNA 領域はスサビノリ品種間で安定していると考えられる。さらに、スサビノリ栽培品種 (PyU51 と PyMIX) と PtMIE の各 mtDNA 領域の遺伝子構造は予想通り大きく異なっていたため、^{14,15)} これら mtDNA 領域は三重県内で養殖が始まっているアサクサノリ (PtMIE) とスサビノリ栽培品種の種判別マーカーとして有用であると考えられる。今後は、各 mtDNA 領域の国内に自生するアサクサノリ全般に対する有効性を検証するために、他自生地から分離されたアサクサノリにつき、各 mtDNA 領域の塩基配列解析や PCR により増幅される DNA 断片のサイズ確認を行う必要がある。

板ノリ中のアサクサノリ含量を簡便かつ迅速に推定するためには、板ノリ葉状体片あるいは板ノリそのものの全 DNA 調製操作を簡略化する必要がある。アマノリ属藻類糸状体や葉状体からの全 DNA 抽出・精製には市販の DNA 抽出キットが汎用されているが、キットによっては操作が多く、試料の前処理 (液体窒素による凍結粉碎) が必要とされる場合もある。^{6,7,18,21,32,33)} 本研究では、全 DNA 抽出・精製操作を簡略化するために、容易に調製できる 2 種類の DNA 抽出液を用いた破碎抽出、酵素 (RNaseA, proteinase K) 処理、レジンを用いた全 DNA 精製を組合せたが、最も簡易な抽出法 EM1-1

でも明瞭な PCR 分析結果が得られ (Figs. 4, 5)、本 DNA 調製法は各種 PCR 分析に耐え得ることが示唆された。

アサクサ板ノリ葉状体片の簡易抽出 DNA を鋳型とした PCR による種判別と、アサクサ板ノリ片の簡易抽出 DNA を鋳型とした競合的 PCR によりアサクサノリ含量を調べたところ (Figs. 4, 5)、推定値に約 10% の差があった。板ノリ葉状体片の種判別による含量推定法については、より多くの板ノリ葉状体片を分析することで板ノリ中のアサクサノリ含量をより正確に把握できると考えられる。板ノリ片 DNA を用いた競合的 PCR による含量推定法については、標的とした *orf169-trnV* 遺伝子領域が約 2.2 kbp (アサクサノリ) や 3.7 kbp (スサビノリ) と長鎖であったため (Fig. 3)、板ノリ DNA の加工工程や長期保管による部分的な損傷・断片化といった品質劣化が DNA 断片の増幅効率に影響した可能性がある。また、植物 mtDNA のコピー数は組織や生長段階で大きく変化するため、³⁴⁾ 生長特性の異なるアサクサノリとスサビノリでは^{1,3,8)} 葉状体に含まれる mtDNA 量に差のあることも考えられる。事実、標準 DNA 溶液 (20-80% PtMIE) を鋳型とした時の増幅 DNA 断片の蛍光強度比は予想された値よりも低く、アサクサノリ全 DNA 含量が高いほどその傾向は顕著であった (Fig. 5c)。今後、これら課題を解決していく必要があるものの、本研究で用いた PCR 分析によりアサクサ板ノリ中のスサビノリ混入の有無や程度をおおよそ推定できることが示唆された。

アサクサ板ノリ中のアサクサノリ含量をより迅速、簡便かつ正確に定量するためには、リアルタイム PCR を用いた絶対定量アッセイの導入が必要と考えられる。*orf169-trnV* 遺伝子領域および *cox1* 遺伝子領域の構造はアサクサノリとスサビノリで大きく異なっているため、種特異的プライマー・プローブセットを設計する際の大きな利点となり得る。また、リアルタイム PCR アッセイに必要な標的遺伝子領域は 50-150 bp 程度と短いため (Real-time PCR handbook (2014): <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>, Life Technologies, Carlsbad, 2015 年 4 月 6 日)、板ノリ DNA の品質劣化による影響を大きく抑制できると考えられる。現在、リアルタイム PCR を利用した板ノリ中のアサクサノリ含量の簡易定量法の開発に取り組んでいる。

謝 辞

本研究は、一般財団法人海苔増殖振興会の平成 26 年度海苔養殖の長期的・基礎的な研究に関する研究助成により行われた。

文 献

- 1) 三浦昭雄. オオバアサクサノリとナラワスサビノリの品種特性. 海苔増殖振興会会報Ⅱ, 海苔増殖振興会, 東京. 1972; 53-66.
- 2) Miura A. A new variety and a new form of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Japan: *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura, var. nov. and *P. yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura, form. Nov. *J. Tokyo Univ. Fish.* 1984; **71**: 1-37.
- 3) 能登谷正浩. アマノリ類. 「有用海藻誌—海藻の資源開発と利用に向けて—」(大野正夫 編著) 内田老鶴圃, 東京. 2004; 160-200.
- 4) Niwa K, Aruga Y. Identification of currently cultivated *Porphyra* species by PCR-RFLP analysis. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 143-148.
- 5) Niwa K, Kobiyama A, Aruga Y. Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA. *Phycol. Res.* 2005; **53**: 296-302.
- 6) 阿部真比古, 小林正裕, 玉城泉也, 藤吉栄次, 菊地則雄. ATP6 遺伝子に関連したミトコンドリア DNA 部分塩基配列を用いた変種オオバアサクサノリ *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis* の判別について (予報). 水産増殖 2008; **56**: 497-503.
- 7) Abe M, Kobayashi M, Tamaki M, Fujiyoshi E, Kikuchi N. Rapid discrimination of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura by PCR-RFLP. *J. Appl. Phycol.* 2010; **22**: 405-408.
- 8) Niwa K, Kikuchi N, Aruga Y. Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 2005; **41**: 294-394.
- 9) 殖田三郎. 「新編海苔養殖読本」全国海苔貝類漁業協同組合連合会, 東京. 1973; 50-51.
- 10) 三浦昭雄. 海苔の養殖品種. 「海苔健苗育成の基本」全国海苔貝類漁業協同組合連合会, 東京. 1987; 1-28.
- 11) 藤井直幹. 有明海におけるアサクサノリの養殖試験. 福岡県水産海洋技術センター研究報告 2008; **18**: 155-158.
- 12) Abe M, Kobayashi M, Fujiyoshi E, Tamaki M, Kikuchi N, Murase N. Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 2013; **25**: 225-232.
- 13) 小林正裕, 洲上 哲, 土居内靖子, 服部克也, 石元伸一, 玉城泉也, 阿部真比古, 藤吉栄次. 種・品種の判別. 「アマノリ養殖品種の特性」(藤吉栄次, 小林正裕, 玉城泉也, 有瀧真人 編) 水産総合研究センター西海区水産研究所, 長崎. 2014; 5-14.
- 14) Hwang MS, Kim S-O, Ha DS, Lee JE, Lee S-R. Complete sequence and genetic features of the mitochondrial genome of *Pyropia tenera* (Rhodophyta). *Plant Biotechnol. Rep.* 2013; **7**: 435-443.
- 15) Kong F, Sun P, Cao M, Wang L, Mao Y. Complete mitochondrial genome of *Pyropia yezoensis*: reasserting the revision of genus *Porphyra*. *Mitochondrial DNA* 2014; **25**: 335-336.
- 16) 有賀祐勝, 田中 洋, 田尻純仁. スサビノリフリー糸状体の生長と光合成. 海苔増殖振興会会報Ⅳ, 海苔増殖振興会, 東京. 1983; 9-13.
- 17) 藤吉栄次, 小林正裕, 玉城泉也. 使用品種について. 「アマノリ養殖品種の特性」(藤吉栄次, 小林正裕, 玉城泉也, 有瀧真人 編) 水産総合研究センター西海区水産研究所, 長崎. 2014; 2-4.
- 18) Touda K, Namikoshi A, Suzuki T, Iguchi J, Mizusawa N, Hara T, Imamura S, Yabu T, Yamashita Y, Yamashita M. Origin identification of dried seaweed product “nori” by PCR-RFLP analysis of *Pyropia yezoensis* in the internal transcribed spacer ITS-1 region. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 865-875.
- 19) Shure M, Wessler S, Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell* 1983; **35**: 225-233.
- 20) Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 1995; **8**: 457-463.
- 21) Park E-J, Fukuda S, Endo H, Kitade Y, Saga N. Genetic polymorphism within *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) and related species from Japan and Korea detected by cleaved amplified polymorphic sequence analysis. *Eur. J. Phycol.* 2007; **42**: 29-40.
- 22) Park E-J, Endo H, Kitade Y, Saga N. Simple differentiation of two closely related species *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on length polymorphism of actin-related protein 4 gene (*ARP4*). *Fish. Sci.* 2008; **74**: 613-620.
- 23) Niwa K, Iida S, Kato A, Kawai H, Kikuchi N, Kobiyama A, Aruga Y. Genetic diversity and introgression in two cultivated species (*Porphyra yezoensis* and *Porphyra tenera*) and closely related wild species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 2009; **45**: 493-502.
- 24) Kunimoto M, Kito H, Yamamoto Y, Cheney DP, Kaminishi Y, Mizukami Y. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene structure. *J. Appl. Phycol.* 1999; **11**: 203-209.
- 25) Kunimoto M, Kito H, Kaminishi Y, Mizukami Y, Murase N. Molecular divergence of the ssu rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 1999; **11**: 211-216.
- 26) Kunimoto M, Kito H, Mizukami Y, Murase N, Levine I. Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage. *J. Appl. Phycol.* 2003; **15**: 337-343.
- 27) 岡内正典. DNA 情報から見た野生種および養殖種の系統. 「海苔の生物学」(能登谷正浩 編著) 成山堂書店, 東京. 2000; 35-49.
- 28) Zuccarello GC, Burger G, West JA, King RJ. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Mol. Ecol.* 1999; **8**: 1443-1447.
- 29) Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am. J. Bot.* 2006; **93**: 1101-1108.
- 30) 上井進也. ミトコンドリアマーカーによる日本産褐藻アカモク集団における遺伝的・系統地理的構造の解析. 藻類 2007; **55**: 177-180.
- 31) Niwa K, Kato A, Kobiyama A, Kawai H, Aruga Y. Comparative study of wild and cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data. *J. Appl. Phycol.* 2008; **20**: 261-270.
- 32) Niwa K, Aruga Y. Rapid DNA extraction from chonchoceles and ITS-1 rDNA sequences of seven strains of cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 2003; **15**: 29-35.
- 33) Hu Z, Zeng X, Wang A, Shi C, Duan D. An efficient method for DNA isolation from red algae. *J. Appl. Phycol.* 2004; **16**: 161-166.
- 34) Cupp JD, Nielsen BL. Minireview: DNA replication in plant mitochondria. *Mitochondrion* 2014; **19**: 213-237.