

遺伝マーカーを利用した球磨川産アオノリ種同定の試み

吉永 圭介^{1,*} 中島 晃¹ 上久保 祐志²

An attempt to identify green laver species grown in Kumagawa River

Keisuke Yoshinaga^{1,*}, Akira Nakajima¹, Yuji Kamikubo²

At the mouth of Kumagawa river in Yatsushiro, green laver has been commercially cultivated as flavouring food. Although Shimantogawa's green laver was most famous in Japan and identified as *Ulva prolifera*, Kumagawa's green laver was not elucidated whether *U. prolifera* or other species. In this work, we attempt to identify green laver species grown in Kumagawa river using genetic marker (chloroplastic rbcL gene).

A novel method for readily extract chloroplastic DNA from small pieces of leaf sample has been developed. From both live and dry samples, extraction of chloroplastic DNA were possible. The rbcL gene fragments were amplified by PCR using universal primer set, and directly sequenced. 1,119bp length of rbcL sequence was searched with BLAST, it was fully identical to rbcL sequences of *U. linza*, *U. procera*, and *U. prolifera* (LPP clade). However, Kumagawa's sample was considered as *U. prolifera* by its morphologically aspects, further analyses using other genetic markers (e.g. nuclear-encoded ITS and associated 5.8S rDNA regions) were needed.

キーワード：アオノリ、球磨川、アオサ属、rbcL

Keywords：green laver, Kumagawa river, *Ulva*, rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit)

1. 背景と目的

日本三大急流の1つである球磨川産の青のりは、風味豊かであり、八代の特産品の1つとして30年程前から球磨川河口域で浮き流し方式で養殖されている⁽¹⁾。青のりは国内では四万十川産が有名であり、これらはスジアオノリ (*Ulva prolifera*) であることがわかっているが⁽²⁾、球磨川産の青のりがスジアオノリなのかどうかは正式に同定されていないのが現状である。よって本研究では、遺伝マーカーを利用して球磨川産青のりの原料藻であるアオノリの種の同定を試みたので報告する。

分子生物学的手法の発展により、近年多くの生物において遺伝マーカーをもとにした分子系統解析がおこなわれ、生物種を形態などの表現型ではなく進化・系統関係から分類するようになってきた⁽³⁾。藻類は個体差や生育

環境によっても形態が変化し、形態による分類は困難であり熟練を要する。また、形態による分類は進化や系統の関係を反映していない場合もある。例えば分類学上、形態の違いから2層膜状のアオサ属(*Ulva*)と1層管状のアオノリ属(*Enteromorpha*)はもともと別の属として扱われていたが、近年になって分子系統学研究が盛んにおこなわれ^(2,4,5)、旧アオノリ属は遺伝的な近縁性からアオサ属に組み入れられた。これらをふまえ、今回は形態による分類ではなく、正確な遺伝マーカーを利用した種同定法を試みることにした。

植物では分類用の遺伝マーカーとして rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 遺伝子がDNA バーコーディングなどで利用されている。rbcL 遺伝子は光合成に関与する酵素をコードする遺伝子であり、緑色植物において葉緑体ゲノム DNA 上に存在している。本研究では、rbcL 遺伝子の塩基配列をもとに球磨川産アオノリの種の同定を試みた。

2. 方法

2.1 アオノリ検体の採集

アオノリは、球磨川河口域で採集した検体(生検体)および実際に店頭販売されている乾燥青のり(乾燥検体)を準備した。

¹ 生物化学システム工学科
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Dept. of Biological and Chemical Systems Engineering,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

² 建築社会デザイン工学科
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Dept. of Architecture and Civil Engineering,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

* Corresponding author:
E-mail address: yoshinaga@kumamoto-nct.ac.jp (K. Yoshinaga).

表 1 rbcL 遺伝子の増幅と解読に使用したプライマー

プライマー名	塩基配列	ターゲット	向き	備考
rbcL-RH1	5'-atgtcaccacaaacagaaactaaagc-3'	rbcL	F	植物ユニバーサルプライマー、文献(6,7)
rbcL-1385r	5'-aattcaaatttaatttcttcc-3'	rbcL	R	植物ユニバーサルプライマー、文献(6,7)

2.2 葉緑体 DNA の簡易抽出

検体より筋状の葉を約 5 mm の長さで 1 本切り取り、TE buffer 200 µl 中でディスパーザブルホモジナイザー (BioMasher II: Nippi) を用いて破碎した。破碎液をサーマルサイクラーで 98 °C 10 min 加熱することで葉緑体 DNA を簡易抽出した。PCR 反応を阻害する物質を希釈するため、加熱後の破碎液は超純水で 5-100 倍に希釈した。希釈後の抽出液 5 µl を鋳型とし、rbcL 遺伝子に特異的なプライマーセット^(6,7) (表 1) と fidelity の高い KOD DNA Polymerase (KOD -Plus- Neo: TOYOBO) を用いた PCR により 35 サイクル増幅した。増幅されたバンド(約 1,400 bp) を電気泳動により確認後、PCR 産物をスピナラム (InnuPREP PCR pure Kit: Analytik jena) で精製した。

2.3 塩基配列の解読と解析

PCR 産物は、増幅に使用したプライマーのうち片方と Big Dye Terminator ver. 3.1(Applied Biosystems)を用いてダイレクトシークエンシングをおこなった。シークエンシング反応物はエタノール沈殿後 Hi-Di formamide 20 µl に溶解し、DNA シークエンサー (ABI 3500 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) で配列を解読した。上流および下流から解読した塩基配列は配列が一致する領域で重ね 1 つの配列とした。得られた配列は The Barcode of Life Data Systems (BOLD) <http://www.boldsystems.org/> で検索するとともに、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> による検索をおこない、一致する生物種を解析した。

3. 結果と考察

3.1 葉緑体 DNA の抽出と rbcL 遺伝子断片の増幅

通常、植物試料から葉緑体 DNA を単離する場合、ゲノム DNA 抽出キットを使用することが多い。処理に時間を要すること、検体数が多いと手間とコストがかかること、とくに植物では細胞壁の破壊と除去に手間がかかることから、より簡便な方法を独自に開発することにした。ゲノム DNA に比べ葉緑体 DNA は十分小さく、細胞あたりのコピー数が多いこと、大腸菌からのプラスミド DNA の簡易抽出法に着想を得て、試料を緩衝液中で茹で、滲み出た葉緑体 DNA を利用する方法を開発した。生検体および乾燥検体ともに、今回開発した簡易抽出法と PCR 法により約 1,400 bp のバンドが検出され rbcL 遺伝子断片の増幅が

可能であった。乾燥検体での増幅が可能であったことから、本法は乾物などの市販品の分析にも適応可能である。PCR で増幅がおこらない場合が一部の検体であったが、青のり由来の成分が PCR を阻害していると考え、鋳型を超純水で数パターン希釈し、条件を振ることで増幅に適した条件を探ることができた。

3.2 rbcL 遺伝子配列による種同定

生検体および乾燥検体ともに rbcL 遺伝子断片の解読が可能であった。生検体では上流、下流のプライマーでそれぞれ解読し、オーバーラップした配列をつなぐことで 1,119 bp を解読できた。実験の特性上、プライマー近傍は解読できておらず 1,403 bp の全長の解読はできなかった。乾燥検体では上流、下流のプライマーでオーバーラップするまで解読はできなかったが、解読できた配列は生検体の配列と完全に一致した。乾燥検体でも PCR により 1,400 bp の断片は得られているため、解読できなかった領域が生じた理由は乾燥による DNA の損傷ではなく、シークエンシング操作上の問題であり、今後の改善が十分に可能であると考えた。

生検体から得られた 1,119 bp の配列を使い BLAST による解析 (blastn) をおこなったところ、*U. linza* (ウスバアオノリ)、*U. prolifera* (スジアオノリ)、*U. Procera* (和名無し) の rbcL 配列と完全に一致した (図 1)。よって球磨川産のアオノリはこれら 3 種のうちのいずれかであることが判明した。

これら 3 種は、分類上 *U. linza-procera-prolifera* (LPP) clade を形成し、rbcL 配列が全く同一である。よって、rbcL の配列のみでは 3 種のうちのいずれであるかは判断できない。形態的特徴から球磨川産アオノリは四万十川産と同じくスジアオノリ (*U. prolifera*) であると考えられるが、正確に同定するためには核 5.8S DNA の ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域など、他の遺伝マーカー^(8,9)についても解析する必要がある。

4. まとめ

本研究は、八代の特産品のひとつである球磨川産青のりについて、遺伝マーカーを利用して構成藻の種の同定を試みたものである。以下に得られた結果をまとめる。

- (1) アオノリ葉緑体 DNA の簡易抽出法を確立した。
- (2) 生検体および乾燥検体どちらにおいても rbcL 遺伝

```

sample -----GATATTTAGCAGCGTTCCGATGACTCCTCAACCAGGAGTACCGGCAGAAGAAGCAGGTGCAGCTGTTGCTGCT
U.linza CAAGTAAAAGATACTGATATTTTAGCAGCGTTCCGATGACTCCTCAACCAGGAGTACCGGCAGAAGAAGCAGGTGCAGCTGTTGCTGCT
U.prolifera CAAGTAAAAGATACTGATATTTTAGCAGCGTTCCGATGACTCCTCAACCAGGAGTACCGGCAGAAGAAGCAGGTGCAGCTGTTGCTGCT
U.procera CAAGTAAAAGATACTGATATTTTAGCAGCGTTCCGATGACTCCTCAACCAGGAGTACCGGCAGAAGAAGCAGGTGCAGCTGTTGCTGCT
*****

sample GAATCATCAACAGGTAAGTGGACAACCTGTATGGACTGATGGTTAAACATCTTTAGATCGTTATAAAGGTCGTTGTACGACATTGAACCA
U.linza GAATCATCAACAGGTAAGTGGACAACCTGTATGGACTGATGGTTAAACATCTTTAGATCGTTATAAAGGTCGTTGTACGACATTGAACCA
U.prolifera GAATCATCAACAGGTAAGTGGACAACCTGTATGGACTGATGGTTAAACATCTTTAGATCGTTATAAAGGTCGTTGTACGACATTGAACCA
U.procera GAATCATCAACAGGTAAGTGGACAACCTGTATGGACTGATGGTTAAACATCTTTAGATCGTTATAAAGGTCGTTGTACGACATTGAACCA
*****

sample TTAGGAGAAGACGACCAATATATGCTTATATGCTTATCCTTTAGACTTATTTGAAGAAGGATCAGTTACAACTTATTTACTTCAATT
U.linza TTAGGAGAAGACGACCAATATATGCTTATATGCTTATCCTTTAGACTTATTTGAAGAAGGATCAGTTACAACTTATTTACTTCAATT
U.prolifera TTAGGAGAAGACGACCAATATATGCTTATATGCTTATCCTTTAGACTTATTTGAAGAAGGATCAGTTACAACTTATTTACTTCAATT
U.procera TTAGGAGAAGACGACCAATATATGCTTATATGCTTATCCTTTAGACTTATTTGAAGAAGGATCAGTTACAACTTATTTACTTCAATT
*****

sample GTAGGTAACGTTTTGGTTTTAAAGCTTTACGTGCTTTACGTTTGAAGATTTACGTTATCCACCAGCTTATGTTAAAAACATTTCAAGGT
U.linza GTAGGTAACGTTTTGGTTTTAAAGCTTTACGTGCTTTACGTTTGAAGATTTACGTTATCCACCAGCTTATGTTAAAAACATTTCAAGGT
U.prolifera GTAGGTAACGTTTTGGTTTTAAAGCTTTACGTGCTTTACGTTTGAAGATTTACGTTATCCACCAGCTTATGTTAAAAACATTTCAAGGT
U.procera GTAGGTAACGTTTTGGTTTTAAAGCTTTACGTGCTTTACGTTTGAAGATTTACGTTATCCACCAGCTTATGTTAAAAACATTTCAAGGT
*****

sample CCACCGCATGGTATTACAGGTGAACGTGATAAATTAACAAATATGGTCGTTGGTTTATTAGGTTGTACGATTAACCAAAATTAGGTCCTT
U.linza CCACCGCATGGTATTACAGGTGAACGTGATAAATTAACAAATATGGTCGTTGGTTTATTAGGTTGTACGATTAACCAAAATTAGGTCCTT
U.prolifera CCACCGCATGGTATTACAGGTGAACGTGATAAATTAACAAATATGGTCGTTGGTTTATTAGGTTGTACGATTAACCAAAATTAGGTCCTT
U.procera CCACCGCATGGTATTACAGGTGAACGTGATAAATTAACAAATATGGTCGTTGGTTTATTAGGTTGTACGATTAACCAAAATTAGGTCCTT
*****

sample TCAGCTAAAAACTATGGACGTGCTGTTTATGAATGTTTACGAGGTGGTCTTGATTTTACAAAAGACGATGAAAACGTTAACTCACAACCT
U.linza TCAGCTAAAAACTATGGACGTGCTGTTTATGAATGTTTACGAGGTGGTCTTGATTTTACAAAAGACGATGAAAACGTTAACTCACAACCT
U.prolifera TCAGCTAAAAACTATGGACGTGCTGTTTATGAATGTTTACGAGGTGGTCTTGATTTTACAAAAGACGATGAAAACGTTAACTCACAACCT
U.procera TCAGCTAAAAACTATGGACGTGCTGTTTATGAATGTTTACGAGGTGGTCTTGATTTTACAAAAGACGATGAAAACGTTAACTCACAACCT
*****

sample TTCATGCGTTGGCGTGACCGTTTCTTATTACTGCTGAAGCAATTTACAATCTCAATCTGAACTGGTGAGGTTAAAGGACATTACTTA
U.linza TTCATGCGTTGGCGTGACCGTTTCTTATTACTGCTGAAGCAATTTACAATCTCAATCTGAACTGGTGAGGTTAAAGGACATTACTTA
U.prolifera TTCATGCGTTGGCGTGACCGTTTCTTATTACTGCTGAAGCAATTTACAATCTCAATCTGAACTGGTGAGGTTAAAGGACATTACTTA
U.procera TTCATGCGTTGGCGTGACCGTTTCTTATTACTGCTGAAGCAATTTACAATCTCAATCTGAACTGGTGAGGTTAAAGGACATTACTTA
*****

sample AATGCAACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATGGAACGTGGTCAATTTGCTAAAGATTTAGGTGTTCCAATTTATATGCATGACTACATT
U.linza AATGCAACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATGGAACGTGGTCAATTTGCTAAAGATTTAGGTGTTCCAATTTATATGCATGACTACATT
U.prolifera AATGCAACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATGGAACGTGGTCAATTTGCTAAAGATTTAGGTGTTCCAATTTATATGCATGACTACATT
U.procera AATGCAACTGCGGGTACATGTGAAGAAATGATGGAACGTGGTCAATTTGCTAAAGATTTAGGTGTTCCAATTTATATGCATGACTACATT
*****

sample ACTGGTGGTTTTACAGCTAACACTTCATTAGCTCATTCTGTCGTGCTAGTGGATTATTATACATATTCACCGTGCATGCACGCTGTT
U.linza ACTGGTGGTTTTACAGCTAACACTTCATTAGCTCATTCTGTCGTGCTAGTGGATTATTATACATATTCACCGTGCATGCACGCTGTT
U.prolifera ACTGGTGGTTTTACAGCTAACACTTCATTAGCTCATTCTGTCGTGCTAGTGGATTATTATACATATTCACCGTGCATGCACGCTGTT
U.procera ACTGGTGGTTTTACAGCTAACACTTCATTAGCTCATTCTGTCGTGCTAGTGGATTATTATACATATTCACCGTGCATGCACGCTGTT
*****

sample ATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATTCACCTCCGAGTATTAGCGAAAATTTTACGTATGTCAGGTGGTGATCACTTACACTCAGGAACA
U.linza ATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATTCACCTCCGAGTATTAGCGAAAATTTTACGTATGTCAGGTGGTGATCACTTACACTCAGGAACA
U.prolifera ATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATTCACCTCCGAGTATTAGCGAAAATTTTACGTATGTCAGGTGGTGATCACTTACACTCAGGAACA
U.procera ATTGACCGTCAACGTAATCACGGTATTCACCTCCGAGTATTAGCGAAAATTTTACGTATGTCAGGTGGTGATCACTTACACTCAGGAACA
*****

sample GTAGTAGGTAATTTAGAAGGTGAACGTGAAATTAATTTAGGTTTCGTTGACTTAATGCGTGATGATTACATTGAAAAGATCGTAGTCGT
U.linza GTAGTAGGTAATTTAGAAGGTGAACGTGAAATTAATTTAGGTTTCGTTGACTTAATGCGTGATGATTACATTGAAAAGATCGTAGTCGT
U.prolifera GTAGTAGGTAATTTAGAAGGTGAACGTGAAATTAATTTAGGTTTCGTTGACTTAATGCGTGATGATTACATTGAAAAGATCGTAGTCGT
U.procera GTAGTAGGTAATTTAGAAGGTGAACGTGAAATTAATTTAGGTTTCGTTGACTTAATGCGTGATGATTACATTGAAAAGATCGTAGTCGT
*****

sample GGTATTTACTTTACACAAGATTGGGTTAGTTTACCAGGTACAATGCCTGTAGCTTACAGGTGGTATTACGTTTGGCATATGCCAGCATT
U.linza GGTATTTACTTTACACAAGATTGGGTTAGTTTACCAGGTACAATGCCTGTAGCTTACAGGTGGTATTACGTTTGGCATATGCCAGCATT
U.prolifera GGTATTTACTTTACACAAGATTGGGTTAGTTTACCAGGTACAATGCCTGTAGCTTACAGGTGGTATTACGTTTGGCATATGCCAGCATT
U.procera GGTATTTACTTTACACAAGATTGGGTTAGTTTACCAGGTACAATGCCTGTAGCTTACAGGTGGTATTACGTTTGGCATATGCCAGCATT
*****

sample GTTGAATCTTCGGTGACGACGCATGTTTACAATTCGGTGGTGGTACATTAGGACACCCCTGGGGTAAATGCTCCAGGAGCCGCTGCAAAAC
U.linza GTTGAATCTTCGGTGACGACGCATGTTTACAATTCGGTGGTGGTACATTAGGACACCCCTGGGGTAAATGCTCCAGGAGCCGCTGCAAAAC
U.prolifera GTTGAATCTTCGGTGACGACGCATGTTTACAATTCGGTGGTGGTACATTAGGACACCCCTGGGGTAAATGCTCCAGGAGCCGCTGCAAAAC
U.procera GTTGAATCTTCGGTGACGACGCATGTTTACAATTCGGTGGTGGTACATTAGGACACCCCTGGGGTAAATGCTCCAGGAGCCGCTGCAAAAC
*****

sample CGTGTGCTTTAGAAGCTTTGTACACAAGCTCGAAACGAGGGACG-----
U.linza CGTGTGCTTTAGAAGCTTTGTACACAAGCTCGAAACGAGGGACGTTTAGCATCTGAAGGTGGTGTATGTAATTCG
U.prolifera CGTGTGCTTTAGAAGCTTTGTACACAAGCTCGAAACGAGGGACGTTTAGCATCTGAAGGTGGTGTATGTAATTCG
U.procera CGTGTGCTTTAGAAGCTTTGTACACAAGCTCGAAACGAGGGACGTTTAGCATCTGAAGGTGGTGTATGTAATTCG
*****

```

図1 球磨川産アオノリサンプル *rbcl* と近縁種の塩基配列アライメント

上段から球磨川産アオノリ、ウスバアオノリ (*U. linza*: KP233764)、スジアオノリ (*U. prolifera*: AB598810)、*U. Procera* (AY422562) を示す。4列とも塩基配列が一致している箇所は*で示す。ギャップ(-) はサンプルにおける未解読領域を示す。

子断片の増幅と塩基配列解読が可能であった。

(3) *rbcL* 配列から *U. linza* (ウスバアオノリ)、*U. prolifera* (スジアオノリ)、*U. Procera* のいずれかであると考えられた。

(4) 形態的特徴を加味すると球磨川産のアオノリは四万十川と同様 *U. prolifera* (スジアオノリ) であると考えられる。

球磨川産青のりの保全や養殖法、活用法、有効成分などについてさらなる研究を進めるためにも種の正確な同定は必須である。今後、5.8S rDNA の ITS 領域など他の遺伝マーカーも解析し球磨川産アオノリの種の同定を完了させたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり球磨川青のり生産者である中村秀徳氏に協力をいただいた。この場を借りて感謝する。

(平成 30 年 9 月 25 日受付)

(平成 30 年 12 月 5 日受理)

参考文献

- (1) 中村秀徳:「八代海にそそぐ球磨川の恵みアオノリ養殖について」, 第 7 回全国青年・女性漁業者交流大会資料, pp.148-152 (2001).
- (2) 平岡雅規, 鳥田 智:「四万十川の特産品スジアオノリの生物学」, 海洋と生物, Vol.26, No.6 pp.508-515 (2004).
- (3) 田辺 (細井) 祥子, 左子芳彦:「分子マーカーによる微細藻の同定」, 日本藻類学会創立 50 周年記念出版「21 世紀初頭の藻学の現況」, pp.150-153 (2002).
- (4) Shimada S *et al.*: “Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*”, *Phycological Research*, Vol.51, No.2 pp.99-108 (2003).
- (5) Hayden H *et al.*: “Linnaeus was light all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera”, *Eur. J. Phycol.*, Vol.38, No.3 pp.277-294 (2003).
- (6) Richard M *et al.*: “Phylogeny of the conjugating green algae (Zygnemophyceae) based on *rbcL* sequences”, *J. Phycol.*, Vol.36, No.4 pp.747-758 (2000).
- (7) Manhart JR: “Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences”, *Molec. phylo. Evol.*, Vol.3, No.2 pp.114-127 (1994).
- (8) Shimada S *et al.*: “Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa”, *J Appl Phycol.*, Vol.20, No.5, pp.979-989 (2008).
- (9) Shimada S *et al.*: “Phylogeographic analysis of the genus *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta), including bloom sample in Qingdao, China”, *Coastal Marine Science*, Vol.34, No.1, pp.117-122 (2010).