

遺伝マーカーを利用した球磨川産アオノリの種同定

吉永 圭介^{1*} 山本 大生²

Identification of green laver species grown in the Kumagawa River

Keisuke Yoshinaga^{1*}, Taisei Yamamoto²

In a previous report, we attempted to identify the species of green laver from the Kumagawa River based on the sequence of the *rbcL* gene on the plastid DNA, which turned out to be one of *U. linza*, *U. prolifera*, or *U. procera*. Since these three species form the *U. linza-procera-prolifera* (LPP) clade taxonomically and have completely identical *rbcL* sequences, it was necessary to determine the species by using other genetic markers. In this study, the 5S rDNA spacer regions on the chromosomal DNA were sequenced as a genetic marker to identify the species of green laver from the Kumagawa River. Our samples were confirmed as *U. prolifera* because of its highly homologous sequence with many *U. prolifera* sequences on database. Furthermore, the green laver grown in the Kumagawa River was identified as a group of *U. prolifera* mainly distributed along both the Pacific and Japan Sea Coasts in western Japan. This is consistent with its geographic relationship.

キーワード：アオノリ、球磨川、アオサ属、5S rDNA 非転写スペーサー

Keywords : Green laver, Kumagawa river, Kuma river, *Ulva*, 5S rDNA NTS (Non Transcribed spacer)

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。前報では、球磨川産の青のりの種同定を目的に、葉緑体DNA上 *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が、*U. linza* (ウスバアオノリ)、*U. prolifera* (スジアオノリ)、*U. Procera* (和名無し)のいずれかであるところまで判明した⁽¹⁾。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ため、他の遺伝マーカーによる種の確定が必要となった。

rbcL 以外の遺伝マーカーとして、アオサ属では染色体DNAにコードされている5.8S rDNAを含むITS (Internal Transcribed Spacers) 領域や、5S rDNA 非転写スペーサー (NTS: Non Transcribed Spacer) 領域が知られている。その

うち5S rDNA NTS 領域の方がより分解能が高く、LPP complex においても種間系統を推定するのに有効であることが既に報告されている^{(2),(3),(4)}。5S rDNA は、リボソーム大サブユニットの構成要素の1つである5S rRNA をコードする遺伝子であり、染色体上に多数の遺伝子がタンデムに並んでいる (図1)。これら5S rDNA 間のRNAへ転写されないスペーサーがNTSである。このNTS領域はRNAやタンパク質をコードしていないため、ある程度の突然変異を許容することができ、突然変異の蓄積により種間および種内においても多様化することから、より分解能の高い解析が可能と考えられる。よって、本研究では遺伝マーカーとして5S rDNA NTS 領域の塩基配列を解読することで、球磨川産アオノリの種同定および国内のアオノリとの類縁関係の比較をおこなった。

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球磨川産乾燥青のり (乾燥検体) を準備した。

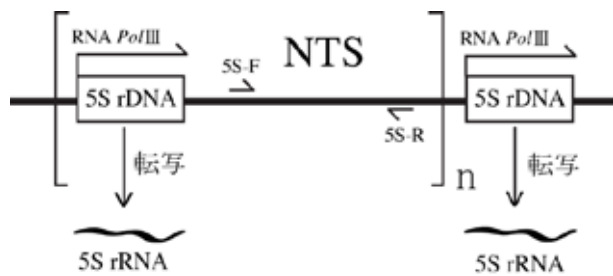
2.2 ゲノムDNAの簡易抽出と遺伝マーカーの増幅

検体より筋状の葉を約5mmの長さに1本切り取り、TE buffer (pH 8.0) 200 μL 中でディスポーザブルホモジナイザー (Bio Masher II: Nippi) を用いて破碎した。破碎液

¹ 生産システム工学系
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Faculty of Production System Engineering,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

² 生物化学システム工学系
〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627
Department of Biological and Chemical Systems Engineering,
2627 Hirayama-Shinmachi, Yatsushiro-shi, Kumamoto, Japan
866-8501

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



5S rDNA は染色体上に多数タンデムに並んでおり、その数は生物種によって異なる。5S rDNA は RNA ポリメラーゼ III によって転写され 5S rRNA となりリボソームの構成要素となる。これら 5S rDNA どうしの間が NTS である。PCR に使用したプライマーの位置を矢印で示す。

図 1 5S rDNA NTS の遺伝子構造

をサーマルサイクラーで 98 °C, 10 分加熱することでゲノム DNA を簡易抽出した。抽出液 5 µL (生検体) または 1 µL (乾燥検体) を鋳型とし、5S rDNA NTS 領域に特異的なプライマーセット⁽⁴⁾ (表 1) と fidelity の高い KOD DNA Polymerase (KOD -Plus- Neo: TOYOBO) を用いた PCR により増幅した。PCR は 94 °C, 1 分の後、98 °C, 10 秒、50 °C, 30 秒、68 °C, 1 分を 35 サイクル繰り返した。PCR は 50 µL の系でおこない、各プライマーは終濃度 0.3 µM になるよう加えた。

2.3 PCR 産物の TA クローニング

KOD DNA Polymerase による PCR 産物には 3' 末端に余分な A が付加されない。PCR 産物 9 µL に 1 µL の 10×A-attachment mix (TOYOBO) を加え、60 °C, 10 分反応させ 3' 末端に A を付加し突出させた。その後、3' 末端に T が突出した pTAC-2 ベクター (TA Cloning Kit; バイオダイナミクス研究所) に組み込み、DNA リガーゼで連結した。ライゲーション反応液の一部をコンピテント大腸菌株 DH5 α に加え、形質転換させた。形質転換体はアンピシリン (50 µg/mL) と X-gal を含む LB プレートで青白選択した。

2.4 塩基配列の解読と解析

白色のコロニーを、アンピシリンを含む LB 培地で培養し、1.5 mL の菌液より FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用いてプラスミド DNA を抽出した。

プラスミド DNA を、プラスミドに特異的プライマー (M13 Forward または M13 Reverse) と Big Dye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems) を用いて DNA 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 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 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 ゲノム DNA の簡易抽出と 5S rDNA NTS の増幅

通常、植物試料から染色体 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、以前葉緑体 DNA の簡易抽出に使用した方法⁽¹⁾ を用いた。PCR により 5S rDNA NTS 領域の増幅を試みたところ、生検体および乾燥検体ともに、約 450 bp および約 1,100 bp の 2 本のバンドが増幅された。この簡易抽出法は葉緑体 DNA^{(1), (5)} やミトコンドリア DNA⁽⁶⁾ など小さな DNA のみならず、今回の遺伝マーカーの増幅においては染色体 DNA の抽出にも十分有効であることがわかった。

3.2 遺伝マーカー塩基配列による種同定

生検体および乾燥検体ともに 5S rDNA NTS 領域の塩基配列の解読が可能であった。形質転換体により約 450 bp または約 1,100 bp の産物がクローニングされていた。生検体から得られた 419 bp の配列 (プライマー配列を除く) を使い BLAST による解析 (blastn) をおこなったところ、鳥田らの論文⁽⁴⁾ にみられる *U. prolifera* (スジアオノリ) のサンプル群の 5S rDNA NTS 配列と最も相関性が高かった (表 2)。塩基配列のアライメントを図 2 に示す。よって球磨川産のアオノリは *U. prolifera* (スジアオノリ) であることが判明した。

表 1 遺伝マーカーの増幅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
5S-F	5'-GGTTGGGCAGGATTAGTA-3'	5S rDNA NTS	Forward	文献(4)
5S-R	5'-AGGCTTAAGTTGCGAGTT-3'	5S rDNA NTS	Reverse	文献(4)

表2 球磨川産アオノリと相同性の高いサンプル

Clones	採取地点	種	遺伝マーカー	相同性 (%)	Accession No.
C270	入江 (中海)、松江市 (島根県)	<i>Ulva prolifera</i>	5S rDNA NTS	99.7	AB298655
C613	室見川、福岡市 (福岡県)	<i>Ulva prolifera</i>	5S rDNA NTS	99.5	AB298661
C107c2	四万十川、四万十市 (高知県)	<i>Ulva prolifera</i>	5S rDNA NTS	99.5	AB298657

Kumagawa R.	25	TCCCTGTGCTGTATCGCCAAACAAACCCCTTTTGGGGCTGCCTTACCCTCTGCATCTGT	84
Nakaumi L.	1	TCCCTGTGCTGTATCGCC-ACCAAACCCCTTTTGGGGCTGCCTTACCCTCTGCATCTGT	59
Muromi R.	1	TCCCTGTGCTGTATCGCC-ACCAAACCCCTTTTGGGGCTGCCTTACCCTCTGCATCTGT	59
Shimanto R.	1	TCCCTGTGCTGTATCGCC-ACCAAACCCCTTTTGGGGCTGCCTTACCCTCTGCATCTGT	59

Kumagawa R.	85	GTATCGCGCCGCGTACGAGCCTGCACGCGCTGCACGCGCTTCGAGCCGCACATACACAAG	144
Nakaumi L.	60	GTATCGCGCCGCGTACGAGCCTGCACGCGCTGCACGCGCTTCGAGCCGCACATACACAAG	119
Muromi R.	60	GTATCGCGCCGCGTACGAGCCTGCACGCGCTGCACGCGCTTCGAGCCGCACATACACAAG	119
Shimanto R.	60	GTATCGCGCCGCGTACGAGCCTGCACGCGCTGCACGCGCTTCGAGCCGCACATACACAAG	119

Kumagawa R.	145	CAGCCGTCGGCGCTGTGCCAGGCTCCAGTGCGCCCGCGCCCGCCCGCCGCGCTCAC	204
Nakaumi L.	120	CAGCCGTCGGCGCTGTGCCAGGCTCCAGTGCGCCCGCGCCCGCCCGCCGCGCTCAC	179
Muromi R.	120	CAGCCGTCGGCGCTGTGCCAGGCTCCAGTGCGCCCGCGCCCGCCCGCCGCGCTCAC	179
Shimanto R.	120	CAGCCGTCGGCGCTGTGCCAGGCTCCAGTGCGCCCGCGCCCGCCCGCCGCGCTCAC	179

Kumagawa R.	205	CTCTGTCTGCTGTTCTGTGCTCGCATCACACGCCCGCGCTCCATCCCACTCGCCGCGGC	264
Nakaumi L.	180	CTCTGTCTGCTGTTCTGTGCTCGCATCACACGCCCGCGCTCCATCCCACTCGCCGCGGC	239
Muromi R.	180	CTCTGTCTGCTGTTCTGTGCTCGCATCACACGCCCGCGCTCCATCCCACTCGCCGCGGC	239
Shimanto R.	180	CTCTGTCTGCTGTTCTGTGCTCGCATCACACGCCCGCGCTCCATCCCACTCGCCGCGGC	239

Kumagawa R.	265	TCCTTACCGTTGGCGGCCAGGCCCTCGCCTGCCTCCAATCACTGCCAGACCATTCCCCCG	324
Nakaumi L.	240	TCCTTACCGTTGGCGGCCAGGCCCTCGCCTGCCTCCAATCACTGCCAGACCATTCCCCCG	299
Muromi R.	240	TCCTTACCGTTGGCGGCCAGGCCCTCGCCTGCCTCCAATCACTGCCAGACCATTCCCCCG	299
Shimanto R.	240	TCCTTACCGTTGGCGGCCAGGCCCTCGCCTGCCTCCAATCACTGCCAGACCATTCCCCCG	299

Kumagawa R.	325	CAATGCCCTTCGTCGGGGCGGCTCATAGCCTCGACATCCGCTGCTTCTGGCGTGATAC	384
Nakaumi L.	300	CAATGCCCTTCGTCGGGGCGGCTCATAGCCTCGACATCCGCTGCTTCTGGCGTGATAC	359
Muromi R.	300	CAATGCCCTTCGTCGGGGCGGCTCATAGCCTCGACATCCGCTGCTTCTGGCGTGATAC	359
Shimanto R.	300	CAATGCCCTTCGTCGGGGCGGCTCATAGCCTCGACATCCGCTGCTTCTGGCGTGATAC	359

Kumagawa R.	385	GGTCATACCACCAGGAAAA	403
Nakaumi L.	360	GGTCATACCACCAGGAAAA	378
Muromi R.	360	GGTCATACCACCAGGAAAA	378
Shimanto R.	360	GGTCATACCACCAGGAAAA	378

上段から球磨川産、中海(AB298655)、室見川(AB298661)、四万十川(AB298657) の *U. prolifera* 5S rDNA NTS 領域の塩基配列を示す。数値は塩基配列の位置を示し、球磨川のサンプルは 5S-F プライマーの 3'末端の次を 1 として番号をつけている。それ以外はデータベースに登録されているままの文字位置を示している。4 列とも塩基配列が一致している箇所は*で示す。アライメントのためギャップ(-)を挿入している。

図2 5S rDNA NTS 塩基配列のアライメント

鳥田らの全国規模の解析では、日本国内の *U. prolifera* はおおまかに 1:太平洋沿岸に広く分布するグループ、2:東北地方の太平洋側から日本海側に分布するグループ、3:主に西日本(中国、四国、九州)の太平洋側から日本海側に分布するグループ、の3つに分けられることがわかっている⁽⁴⁾。球磨川産のアオノリは上記3の、主に西日本

の太平洋側から日本海側に分布するグループであり、地理的關係からも矛盾しない。

乾燥検体の塩基配列は後半の一部が *U. prolifera* と一致したものの、前半部が大きく異なり検索でも相同する配列を見つけることができなかった。多数の形質転換体の配列解読をおこない、詳細な解析が必要である。

4. まとめ

本研究は球磨川産アオノリについて、前報では種の確定にまで至らなかったため、別のより高分解能な遺伝マーカーを利用して構成藻の種の確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) アオノリ染色体 DNA は簡易抽出法により抽出されていた。
- 2) 生検体および乾燥検体の両方で 5S rDNA NTS の増幅と塩基配列解読が可能であった。
- 3) 5S rDNA NTS 塩基配列から *U. prolifera* (スジアオノリ) であると判明した。
- 4) 種の同定のみならず、国内のアオノリとの類縁関係も知ることができた。

今回は生検体の一部について解析をおこなったが、今後は検体数を増やし、球磨川産アオノリがどのようなハプロタイプで構成されているかを解析したい。

(令和 4 年 9 月 5 日受付)

(令和 4 年 11 月 4 日受理)

参考文献

- (1) 吉永圭介, 中島晃, 上久保祐志: 「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」, 熊本高等専門学校 研究紀要, Vol.10, pp.71-74 (2018).
- (2) Yotsukura N, Kawai T, Motomura T, Ichimura T: “Tandem 5S ribosomal RNA genes and spacer region sequences of three Japanese Laminaria species”, *J Appl Phycol*, Vol.14, No.4, pp.233-239 (2002).
- (3) Yotsukura N, Kawai T, Kawashima S, Ebata H, Ichimura T: “Nucleotide sequence diversity of the 5S rDNA spacer in the simple blade kelp genera *Laminaria*, *Cymathaere* and *Kjellmaniella* (Laminariales, Phaeophyceae) from northern Japan”, *Phycol Res*, Vol.54, No.4, pp.269-279 (2006).
- (4) Shimada S *et al.*: “Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvoephyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa”, *J Appl Phycol*, Vol.20, No.5, pp.979-989 (2008).
- (5) 山本大生: 「藻類のゲノム解析における簡易 DNA 抽出法の検討」, 熊本高専生物化学システム工学科 2021 年度卒業研究報告書 (2022).
- (6) 吉永圭介, 山口理絵, 林田ことの, 竹下亜佑, 元山葉月: 「熊本県南部に生息するカワニナ属の系統地理学的解析」, 熊本高等専門学校 研究紀要, Vol.10, pp.25-31 (2018).