

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)

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
巻/号	564
掲載ページ	p. 497-503
発行年月	2008年12月

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)

阿部真比古^{1,*}・小林正裕¹・玉城泉也¹・藤吉栄次¹・菊地則雄²

Discrimination of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta) Based on Partial Sequence of Mitochondrial DNA Related to ATP6 Gene – A Preliminary Study

Mahiko ABE^{1,*}, Masahiro KOBAYASHI¹, Motoya TAMAKI¹, Eiji FUJIYOSHI¹ and Norio KIKUCHI²

Abstract: In order to discriminate between *Porphyra tenera* Kjellman and *P. tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura, the partial sequences (670 bp) of mitochondrial DNA related to ATP6 gene were examined for use as a genetic marker. The partial sequences were identical within the three strains examined of *P. tenera* var. *tamatsuensis*, but the sequences had a single substitution compared with the three strains examined of *P. tenera*. The region used in the present study is concluded as an effective marker for discrimination between *P. tenera* var. *tamatsuensis* and *P. tenera*. Moreover, the sequences of two closely related species *P. yezoensis* Ueda f. *narawaensis* Miura and *P. tenera* had differences of 20–21 bases. Thus, this region may also allow discrimination of species within genus *Porphyra*.

Key words: *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis*; ATP synthase F0 subunit 6 (ATP6); Discrimination; Mitochondrial DNA

我が国のノリ養殖では、スサビノリ *Porphyra yezoensis* Ueda から選抜育種された高生長・多収性のナラワスサビノリ *P. yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura に属する養殖品種が養殖されており、野生種やアサクサノリ *P. tenera* Kjellman に属する養殖品種はほとんど養殖されなくなっている。ナラワスサビノリの導入や養殖技術の進歩により、1983年度以降はおおむね年間90億枚以上(乾海苔)という高い水準で養殖生産が行われているが、乾海苔1枚あたりの単価は低迷しており(大房 2001)、2006年度には共販単価の平均が1964年度以降初めて1枚あたり9円を下回った。このように単価が低下する状況下で味を重視する海苔

作りを目指す生産者が増え、食味のよいアサクサノリが注目されるようになってきた(大房 2001)。しかし、現在までのところ既存の産地を除きアサクサノリの養殖は定着していないようである(能登谷 2002)。ナラワスサビノリと比較して生長が悪く、病気にかかりやすいため淘汰されてきたアサクサノリの養殖が再び普及するためには、良好な食味と高生長・多収性を併せ持つ優良な養殖品種の開発が必要である。

アサクサノリには、養殖漁場において選抜分離された生長のよい変種オオバアサクサノリ *P. tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura が知られており(三浦 1972; Miura 1984)、かつては広く養殖されていた

2008年5月14日受付：2008年8月17日受理。

¹水産総合研究センター西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Nagasaki 851-2213, Japan).

²千葉県立中央博物館分館海の博物館 (Coastal Branch of Natural History Museum and Institute, Chiba, Katsuura, Chiba 299-5242, Japan).

* Corresponding author: E-mail: abemahi@affrc.go.jp

が、ナラワスサビノリよりも色調が劣り、生産方法によっては製品の品質が低下するため、近年ではほとんど養殖されなくなった (Miura 1988; 能登谷 2002)。オオバアサクサノリはアサクサノリの中でも養殖しやすく多収性で、かつナラワスサビノリよりも薄く滑らかで仕上がりの良い製品となる特性を持っている (三浦 1972)。そのため、アサクサノリの特性を持つ養殖品種を作出するための素材として大変有望であると考えられ、新品種開発にも利用されている (三浦ら 1992; Niwa et al. 2002)。

近年、DNA の塩基配列比較や PCR-RFLP 分析などの分子生物学的手法の進歩により、スサビノリとアサクサノリの判別が容易となってきた (Kunimoto et al. 1999, 2003; Niwa et al. 2005a, 2005b, 2008)。オオバアサクサノリと野生のアサクサノリは、核 rDNA の ITS 領域および葉緑体 DNA の RuBisCO スペーサー領域を用いた PCR-RFLP 分析のバンドパターンは同じであるため、その判別のためにはそれぞれの葉状体を培養し、その生長特性を比較することが必要である (Niwa et al. 2008)。したがって、オオバアサクサノリの判別には保存糸状体から葉状体の形態観察と生長特性を把握するまでの数ヶ月の培養期間とその培養技術が必要となってくる。アサクサノリの養殖品種の育成を進めていくためには、その素材候補となるオオバアサクサノリを判別、収集することが重要である。現在、試験研究機関や漁連等には、膨大な数のアマノリ養殖品種の保存株 (糸状体) が存在する。育種素材を確保するためには、その保存株あるいは野生アサクサノリの中からオオバアサクサノリを迅速、簡便かつ正確に選別する技術の開発が必要となる。

本研究では、アサクサノリの一変種であるオオバ

アサクサノリを迅速に判別するため、ミトコンドリア DNA 領域に着目し、ミトコンドリア ATP synthase F0 subunit 6 (ATP6) 遺伝子 (770 塩基) のうち約 75% (580 塩基) を含むミトコンドリア DNA 部分塩基配列 (670 塩基) がマーカーとして有望であることを明らかにしたので報告する。尚、本論文ではオオバアサクサノリに属する養殖品種の他、野生のアサクサノリ等を材料として使用しているため、用語の混乱を避けるため、アサクサノリに属する株のうちオオバアサクサノリではないものをアサクサノリ系統と便宜上定義する。

材料および方法

本研究で使用した株を Table 1 に示した。オオバアサクサノリの養殖品種としては、オオバアサクサノリ 4 (水産総合研究センター西海区水産研究所保存株番号 4)、オオバグリーン (株番号 10) およびナルトオオバ (株番号 SN47) の 3 株を用いた。比較対照として、アサクサノリ系統の数少ない自生地として知られる (三浦 1994; 吉田ら 1999; 菊地ら 2002) 熊本県天草市河浦町産の野生アサクサノリ (株番号 78, 以下河浦産アサクサノリ)、三重県伊勢市大湊産の野生アサクサノリ (株番号 MU1, 以下大湊産アサクサノリ)、Niwa et al. (2005a) によりオオバアサクサノリではないことが明らかにされたアサクサノリ系統の“サシキ” (株番号 57) および養殖品種ナラワスサビノリの U-51 (株番号 1) を用いた。使用した材料は全て糸状体で、三重大学より分譲された大湊産アサクサノリを除き、西海区水産研究所において保存培養されているものである。

DNA の抽出と精製には ISOPLANT II (NIPPON

Table 1. List of strains used in the present study

Species and Strain name	Strain number	Strain origin	Source
<i>Porphyra tenera</i> var. <i>tamatsuensis</i>			
Oba-Asakusanori4	4	Saijyo, Ehime Pref.	Ariakekai Laboratory, Fukuoka Fisheries and Marine Technology Research Center
Oba-Green	10	Uchino-umi, Tokushima Pref.	Ariakekai Laboratory, Fukuoka Fisheries and Marine Technology Research Center
Naruto-Oba	SN47	Uchino-umi, Tokushima Pref.	Kabashima Suisan
<i>Porphyra tenera</i>			
Wild Type	78	Kawaura, Amakusa, Kumamoto Pref.	Seikai National Fisheries Research Institute
Wild Type	MUI	Ohminato, Ise, Mie Pref.	Mie University
Sashiki	57	Sashiki, Ashikita, Kumamoto Pref.	Ariakekai Laboratory, Fukuoka Fisheries and Marine Technology Research Center
<i>Porphyra yezoensis</i> f. <i>narawaensis</i>			
U-51	1	Ushigome, Chiba Pref.	Tokyo University of Fisheries

GENE Co., Ltd.) を用い、プロトコールに従い糸状体から全 DNA を抽出し、DNA 溶液をテンプレートとして使用した。

使用するオオバアサクサノリの種判別は Niwa et al. (2005a, 2005b) に従い、アサクサノリとナラワスサビノリの判別が可能な核 rDNA の ITS 領域および葉緑体 DNA の RuBisCO スペーサー領域を用いた PCR-RFLP 分析を行った。

ミトコンドリア ATP6 遺伝子の一部を含むミトコンドリア DNA の増幅および塩基配列を決定するために、Burger et al. (1999) により報告されている *P. purpurea* ミトコンドリア全塩基配列 (GenBank accession number AF114794) からセンスプライマー: mit12BF (5'-CGTGTGGCCTGATGTCATAT-3'), アンチセンスプライマー: mit12CR (5'-GCTCAATGGTCAGAGCATACG-3') を設計した。これら 2 種類のプライマーと前述のテンプレート全 DNA を使用し、i-Cycler サーマルサイクラー (BIO-RAD 社製) で PCR を行った。PCR 反応は Takara Ex Taq™ 0.2 μ l (5 units/ μ l), 10 \times Ex Taq™ Buffer 2.0 μ l, dNTP Mixture 1.6 μ l (各 2.5 mM), プライマー 0.2 μ l (終濃度 0.2 pmol/ μ l), テンプレート DNA 1.0 μ l (10 ng/ μ l) に滅菌水を加えて最終容量を 20 μ l とした。PCR は 97°C, 1 分のプレヒーティング後, 97°C, 15 秒; 55°C, 30 秒; 72°C, 3 分の条件で 35 サイクル行い, 72°C, 5 分の処理後 4°C に保存した。増幅した PCR 産物は, 2% アガロースゲル, 1 \times TAE バッファーを用いて電気泳動し, DNA 断片の増幅を確認した。PCR 産物の精製には GFX™ PCR DNA 精製キット (Amersham Biosciences 社製) を使用し, 添付のプロトコールにしたがって精製した。精製した DNA 断片を鋳型とし, BigDye Terminator Sequencing Kit Ver. 3.1 (Applied Biosystems 社製) によりサイクルシーケンシングを行った。塩基配列の決定には ABI PRISM 310 型ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems 社製) を用いた。また, Niwa et al. (2005a; 2005b) により解析されている ITS-1 領域と RuBisCO スペーサー領域についても使用した全株で塩基配列を決定し, GenBank に登録されているオオバアサクサノリ C-32, Sashiki 90-02 およびオオバグリーン F1 HGT-6 の延べ 6 配列と比較した (GenBank accession number: ITS-1: C-32, AB193583; 90-02, AB193584; F1 HGT-6, AB365190; RuBisCO spacer: C-32, AB193585; 90-02, AB193586; HGT-6, AB365191)。

結 果

ITS および RuBisCO スペーサー両領域における PCR-RFLP 分析 (Niwa et al. 2005a, b) の結果から, オオバアサクサノリ 4, オオバグリーンおよびナルト

オオバのオオバアサクサノリ 3 株はいずれも河浦産アサクサノリ, サシキおよび大湊産アサクサノリのアサクサノリ系統 3 株とバンドパターンが一致し, ナラワスサビノリ U-51 株とは異なっていた。したがって, 本研究に用いたオオバアサクサノリ 3 株はいずれもアサクサノリであると判断された。

ITS-1 領域の塩基配列を比較した結果を Niwa et al. (2005b, 2008) の結果とあわせて Fig. 1 に示した。オオバアサクサノリ 3 株は塩基配列が一致し, 河浦産アサクサノリおよびサシキと 1 塩基置換が認められた。大湊産アサクサノリに関しては, 河浦産アサクサノリおよびサシキとの間に 12 塩基のギャップと 2 塩基の挿入および 5 塩基置換が認められ, アサクサノリ系統内での変異があった。一方, ナラワスサビノリ U-51 株は河浦産アサクサノリおよびサシキとの間に 22 塩基のギャップと 24 塩基置換 (置換塩基番号: 46, 55, 56, 78, 79, 90, 106, 132, 140, 145, 228, 229, 230, 289, 295, 297, 300, 318, 324, 326, 346, 351, 354, 375), オオバアサクサノリとの間には 22 塩基のギャップと 25 塩基置換 (置換塩基番号: 前述番号に加えて 308) が認められた。また, 本領域の PCR 反応を行った際には, U-51 株において複数の断片が増幅された。オオバアサクサノリ 3 株の塩基配列は, Niwa et al. (2005b) によるオオバアサクサノリのオオバグリーン F1 株 HGT-6 およびオオバアサクサノリ C-32 株の塩基配列と一致し, 河浦産アサクサノリおよびサシキはアサクサノリ系統の 90-02 株 (Sashiki) と一致した。

RuBisCO スペーサー領域の塩基配列は, 本研究で使用したアサクサノリ系統 3 株およびオオバアサクサノリ 3 株の全てで一致した。また, Niwa et al. (2005b, 2008) の HGT-6, C-32 および 90-02 における塩基配列を加えて比較してもアサクサノリ種内の全てで一致した。一方, ナラワスサビノリ U-51 株とアサクサノリでは 7 塩基置換が確認された。

本研究ではミトコンドリア DNA 中の ATP6 遺伝子 (770 塩基) の約 75% (580 塩基) を含むミトコンドリア DNA 部分塩基配列 670 塩基を決定した (Fig. 2)。その結果, オオバアサクサノリのオオバアサクサノリ 4, オオバグリーンおよびナルトオオバのそれぞれの塩基配列は完全に一致した。また, アサクサノリ系統の河浦産アサクサノリ, 大湊産アサクサノリおよびサシキについてもそれぞれの塩基配列は完全に一致した。一方, オオバアサクサノリとアサクサノリ系統との間には 1 塩基置換が確認された。アサクサノリとナラワスサビノリ U-51 株の種間では 20-21 塩基の置換が認められた。

90-02*	1	TTCAACAAC--TATTGACACAACACACGCGAACCAATCGTCCACACAGGTGCCG---A	55
C-32*	1--.....	55
HGT6*	1--.....	55
Oba-Asakusanori4	1--.....	55
Oba-Green	1--.....	55
Naruto-Oba	1--.....	55
Kawaura	1--.....	55
Ohminato	1AC.....G.....	57
Sashiki	1--.....	55
U-51	1--.....G.....GT.GCA.	58
90-02*	56	TGAAAGAGAGAATCTGTTTGTGCGCCTTTTGGGGTATA-CAAGCAC---TCTTTT-CCATC	110
C-32*	56-.....	110
HGT6*	56-.....	110
Oba-Asakusanori4	56-.....	110
Oba-Green	56-.....	110
Naruto-Oba	56-.....	110
Kawaura	56-.....	110
Ohminato	58A.....	112
Sashiki	56-.....	110
U-51	59CA.....C.....G.....GCAC.....G.....	118
90-02*	111	GCCTCTGTGCAGGGCGTAACTTCCCATTGAGAGGATGTGAGGGCACCACAGGAAGCTTTT	170
C-32*	111	170
HGT6*	111	170
Oba-Asakusanori4	111	170
Oba-Green	111	170
Naruto-Oba	111	170
Kawaura	111	170
Ohminato	113	172
Sashiki	111	170
U-51	119C.....A.....T.....	178
90-02*	171	CCACAGGAAGTCGCCATCCTTCTCCCTCCACGACGGCGGCGCTTACAGGCTTGGCAGTT	230
C-32*	171	230
HGT6*	171	230
Oba-Asakusanori4	171	230
Oba-Green	171	230
Naruto-Oba	171	230
Kawaura	171	230
Ohminato	173-T.T.....	228
Sashiki	171	230
U-51	179-TGT.....	234
90-02*	231	TTTTTTTTTTTTTATTGCCTTCCAGGGAGGATGCCGCCAATGGAGCCACATA-GACATTT	289
C-32*	231	289
HGT6*	231	289
Oba-Asakusanori4	231	289
Oba-Green	231	289
Naruto-Oba	231	289
Kawaura	231	289
Ohminato	229	279
Sashiki	231	289
U-51	235C.....TA.T.A.	287
90-02*	290	ACATCATCATATGCCCGTTTTTCTTCTTAACCGCTTGCCACAGTTTCTCTGTGAGGAG	349
C-32*	290C.....	349
HGT6*	290C.....	349
Oba-Asakusanori4	290C.....	349
Oba-Green	290C.....	349
Naruto-Oba	290C.....	349
Kawaura	290	349
Ohminato	280T.....	339
Sashiki	290	349
U-51	288C.....T.C--.....C.....T.A.....	345
90-02*	350	CTTGTGGGAAGACCGTCTCCATACAA	375
C-32*	350	375
HGT6*	350	375
Oba-Asakusanori4	350	375
Oba-Green	350	375
Naruto-Oba	350	375
Kawaura	350	375
Ohminato	340	365
Sashiki	350	375
U-51	346T.....	371

Fig. 1. ITS-1 sequence alignments of 3 strains of *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis* (Oba-Asakusanori4, Oba-Green and Naruto-Oba), 3 strains of *P. tenera* (Kawaura, Ohminato and Sashiki), 1 strain of *P. yezoensis* f. *narawaensis* (U-51) and three individuals of *P. tenera* (90-02, AB193586; C-32, AB193585; HGT6, AB365190) sequenced by Niwa et al. (2005b, 2008). Asterisk (*) indicates the individuals used in Niwa et al. (2005b, 2008). The dots indicate the presence of the corresponding nucleotide in the ITS-1 of 90-02.

Oba-Asakusanori4	1	CGTGTGGCCTGATGTCATATTTGCAAAAAGTCTTATAGATATTGTGAAAACCTTTACGAC	60
Oba-Green	1	60
Naruto-Oba	1	60
Kawaura	1	60
Ohminato	1	60
Sashiki	1	60
U-51	1C.....	60
Oba-Asakusanori4	61	GTAAGATACGAATTCATTTGCGACTACTAAAGGTACAATAAATAAGGAACACCTTTTGG	120
Oba-Green	61	120
Naruto-Oba	61	120
Kawaura	61	120
Ohminato	61	120
Sashiki	61	120
U-51	61A..C.....T...A..	120
Oba-Asakusanori4	121	TAAAAAATTTGTGAAAACCTTTATACCGTGGTCTGAAGCCAATAATGTTAATTCCTAT	180
Oba-Green	121	180
Naruto-Oba	121	180
Kawaura	121C.....	180
Ohminato	121C.....	180
Sashiki	121C.....	180
U-51	121A.....	180
Oba-Asakusanori4	181	GTAATAGATAAAGCTAAGCCAATGTGAAAGCTATGTGACTTGTACAGTAAACTATA	240
Oba-Green	181	240
Naruto-Oba	181	240
Kawaura	181	240
Ohminato	181	240
Sashiki	181	240
U-51	181C.....A.....	240
Oba-Asakusanori4	241	TGGTACCATACCTATTAATTAACAATAAAGTATTATTGTAAGATTGTAAAAATAATGG	300
Oba-Green	241	300
Naruto-Oba	241	300
Kawaura	241	300
Ohminato	241	300
Sashiki	241G..A.GG.....	300
U-51	241C.....	300
Oba-Asakusanori4	301	AAAATATCGTAACCTTTTTTACCTAAATTATCTTTTACCAACGTTAAGTGGTATCATA	360
Oba-Green	301	360
Naruto-Oba	301	360
Kawaura	301	360
Ohminato	301	360
Sashiki	301	360
U-51	301	G.....CGA.....	360
Oba-Asakusanori4	361	AAATATTTCTTTTACAGATTGTCAGTTCCAGGAACATAATTTATTTTGTATATGACTAA	420
Oba-Green	361	420
Naruto-Oba	361	420
Kawaura	361	420
Ohminato	361	420
Sashiki	361	420
U-51	361	420
Oba-Asakusanori4	421	AGTGGATCAAAAAATAGATAACGCAACAGATAGTATCAAAAAATGGACCGTTTGTAA	480
Oba-Green	421	480
Naruto-Oba	421	480
Kawaura	421	480
Ohminato	421	480
Sashiki	421	480
U-51	421	480
Oba-Asakusanori4	481	CGACATGTTTAAACCAATAATTCTAAAGGAATTAAGGTATAATTTCAAATGTTCTAA	540
Oba-Green	481	540
Naruto-Oba	481	540
Kawaura	481	540
Ohminato	481	540
Sashiki	481	540
U-51	481	540
Oba-Asakusanori4	541	AGGGCTTGCTGAAAAAATAATTTGTTTATTTGTACATATTTTATTTATGTTTGTAA	600
Oba-Green	541	600
Naruto-Oba	541	600
Kawaura	541	600
Ohminato	541	600
Sashiki	541	600
U-51	541GT..G.....	600
Oba-Asakusanori4	601	ATAGTATAAGTCTAAATTTGATTCGAACAATCAACCTTACGCTTATCAAGCGTATGCTCTG	660
Oba-Green	601	660
Naruto-Oba	601	660
Kawaura	601	660
Ohminato	601	660
Sashiki	601	660
U-51	601	660
Oba-Asakusanori4	661	ACCATTGAGC	670
Oba-Green	661	670
Naruto-Oba	661	670
Kawaura	661	670
Ohminato	661	670
Sashiki	661	670
U-51	661	670

Fig. 2. Partial mitochondrial DNA sequence alignments related to ATP6 gene of 3 strains of *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis* (Oba-Asakusanori4, Oba-Green and Naruto-Oba), 3 strains of *P. tenera* (Kawaura, Ohminato and Sashiki) and 1 strain of *P. yezoensis* f. *narawaensis* (U-51). The dots indicate the presence of the corresponding nucleotide in the sequence of Oba-Asakusanori4.

考 察

Niwa et al. (2008) は、オオバアサクサノリとされる緑色変異株とアサクサノリ系統の野生株の形態比較と ITS および RuBisCO スペーサー両領域における PCR-RFLP 分析を行い、オオバアサクサノリはアサクサノリ系統の野生株に比べ良く生長すること、かつアサクサノリ系統の野生株と同じバンドパターンを示すことを明らかにした。また、核 rDNA の ITS-1 領域の塩基配列の比較を行った結果、オオバアサクサノリの 2 株の塩基配列が一致し、アサクサノリ系統の野生株とは異なるまとまった群を形成すると報告している (Niwa et al. 2005a)。本研究においても、オオバアサクサノリ 3 株の ITS-1 領域の塩基配列は Niwa et al. (2005a) と一致した。つまり、ITS-1 領域の塩基配列を用いるとオオバアサクサノリのみを判別することが可能と示唆される。しかし、現在アマノリ類の種判別で用いられている核 rDNA の SSUrRNA 領域や ITS 領域は、PCR の際に複数のバンドが増幅されたり、同種内での欠損や置換、イントロンの有無や位置・長さなどに変異があることが知られている (岡内 2000; Kunimoto et al. 1999, 2003; Niwa et al. 2005a)。本研究においても、ナラウスサビノリの U-51 株において複数のバンドが認められ、ITS-1 領域の塩基配列においては大湊産アサクサノリに欠損と置換が認められた。また、別領域で種判別に用いられている RuBisCO スペーサー領域では種間に差異は確認されるが、アサクサノリ系統とオオバアサクサノリの間で差異は見つかっておらず (Niwa et al. 2005a, 2005b, 2008)、本研究においても同様の結果を得た。これらのことから、オオバアサクサノリの判別を含むアマノリ類の種判別には、より安定的で解釈しやすい領域の探索が必要である。多くの動物ではミトコンドリア DNA 領域が種判別や集団解析に使用されており (Gyllensten and Wilson 1987; 瀬崎ら 2001; Hebert et al. 2003; 宇山ら 2005)、最近では褐藻類の種内変異解析や紅藻類の系統解析でもミトコンドリア DNA 領域がマーカーとして用いられている (Robba et al. 2006; Uwai et al. 2006)。ミトコンドリアマーカーは片親由来であるため基本的に組み換えがなく、ITS 領域に比べると結果やその解釈が明瞭で、種内でハプロタイプ間の系統関係を推定するような場合には大きな利点となる (上井 2007)。

本研究で用いた 7 株に関して、ミトコンドリア DNA 中の ATP6 遺伝子の約 75% を含むミトコンドリア DNA 部分塩基配列比較 (670 塩基) では、ナラウスサビノリとアサクサノリの間で 20-21 個の塩基置換、

アサクサノリ系統とオオバアサクサノリの間で 1 塩基の置換が確認された (Fig. 1)。使用したオオバアサクサノリのうち 2 株は徳島県内の海産、1 株は愛媛県西条市産の葉状体に由来するとされている (Table 1) が、産地に関係なくオオバアサクサノリ 3 株の本研究領域における塩基配列が一致した。また、ITS-1 領域では変異が見られたアサクサノリ系統においても本領域の塩基配列は一致した。したがって、ミトコンドリア ATP6 遺伝子の一部を含む本領域がアサクサノリ系統とオオバアサクサノリの判別マーカーとなる可能性が示唆された。さらに、本領域はアマノリ類の中では近縁と推定されているアサクサノリとスサビノリ (樽田ら 2007) との間でも特異的な配列があり、アマノリ類の種判別技術開発に活用できるマーカーとなる可能性もある。しかしながら、ミトコンドリアゲノムは核ゲノムに比べて遺伝的浮動の影響を受けやすく地域差がでやすいことが報告されているため (上井 2007)、今後は産地別のサンプル数を増やして解析をすすめ、種判別あるいは変種判別技術として利用可能かどうかの検討を行っていく予定である。

一方、現在のナラウスサビノリ養殖品種より優れた養殖品種を育成するためには異種間交配などの新しい育種法が必要とされている (ウッパラパティ 2000)。前述のようにオオバアサクサノリは育種に向けた有望な特性を持っており、異種間交配の候補としても最適であり、新品種の育成に利用されている (三浦ら 1992)。本研究で開発したミトコンドリア ATP6 遺伝子の一部を含むミトコンドリア DNA 部分塩基配列を利用することにより、全国の試験研究機関が持つ膨大な保存株の中から迅速、簡潔かつ正確にオオバアサクサノリを判別することが可能になると考えられ、新品種の育種促進につながることを期待される。

要 約

アサクサノリと変種オオバアサクサノリを判別することを目的とし、ミトコンドリア ATP6 遺伝子に関連したミトコンドリア DNA 部分塩基配列 (670 塩基) をマーカーに解析を試みた。その結果、オオバアサクサノリ 3 株において塩基配列が完全に一致し、ITS-1 領域で変異が見られたアサクサノリ系統 3 株においても本領域の塩基配列は完全に一致した。また、アサクサノリ系統とオオバアサクサノリの間で 1 塩基置換が確認された。このことから、本領域はオオバアサクサノリの判別に有効なマーカーとなる可能性があることが示唆された。また、本領域はアサクサノリとナラウスサビノリの間でも 20-21 塩基置換が認められた。これらのことから、オオバアサクサノリの判別だけで

なく、アマノリ類の種判別技術開発に活用できるマーカーとなる可能性もある。

謝 辞

本研究の遂行に先立ち多くの有益な御意見を頂いた兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター二羽恭介博士に深く感謝致します。また、材料の入手にご協力いただいた栲島水産、福岡県水産海洋技術センター有明海研究所、熊本県水産研究センター、山口県水産研究センター内海研究部、水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所の皆様および三重大学大学院生物資源学研究所教授前川行幸博士に深く感謝致します。

文 献

- Burger, G., D. Saint-Louis, M. W. Gray and B. Franz Lang (1999) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the red alga *Porphyra purpurea*: Cyanobacterial introns and shared ancestry of red and green algae. *The Plant Cell*, **11**, 1675-1694.
- Gyllensten, U. and A. C. Wilson (1987) Mitochondrial DNA of Salmonids, Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. In "Population Genetics and Fishery Management" (ed. By N. Ryman and F. Utter), University of Washington Press, Seattle and London, pp. 301-317.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasinghem and J. R. deWaard (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B(Suppl.)*, **270**, S96-S99.
- 菊地則雄・吉田忠生・吉永一男 (2002) 絶滅が危惧される紅藻アマノリ属植物数種の生育状況. エコソフィア, **9**, 112-117.
- Kunimoto, M., H. Kito, Y. Yamamoto, C. P. Cheney, Y. Kaminishi and Y. Mizukami (1999) Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Appl. Phycol.*, **11**, 203-209.
- Kunimoto, M., H. Kito, Y. Mizukami, N. Murase and I. Levine (2003) Molecular features of a defined genetic marker for the determination of the *Porphyra tenera* lineage. *J. Appl. Phycol.*, **15**, 337-343.
- 三浦昭雄 (1972) オオバアサクサノリとナラワササビノリの品種特性. 海苔増殖振興会会報, **2**, 53-66.
- Miura, A. (1984) 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.*, **71**, 1-37.
- Miura, A. (1988) Taxonomic studies of *Porphyra* species cultivated in Japan, referring to their transition to the cultivated variety. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **75**, 311-325.
- 三浦昭雄・符 鵬飛・申 宗岩 (1992) 紅藻ササビノリとアサクサノリの色素変異体による種間交雑実験. 東京水産大研報, **79**, 103-120.
- 三浦昭雄 (1994) アサクサノリ. 日本の希少な野生水生生物に関する基礎資料(I). 水産庁(編), 水産庁, 東京. pp. 664-672.
- Niwa, K., H. Furuita, T. Yamamoto and A. Kobiyama (2008) Identification and characterization of a green-type mutant of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, **274**, 126-131.
- Niwa, K., N. Kikuchi and Y. Aruga (2005a) Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.*, **41**, 294-304.
- Niwa, K., A. Kobiyama and Y. Aruga (2005b) Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA. *Phycol. Res.*, **53**, 296-302.
- Niwa, K., A. Mizuta and Y. Aruga (2002) Genetic characterization of a spontaneous green-type pigmentation mutant of *Porphyra yezoensis* and the significance of using heterozygous conchocelis in nori farming. *Fish. Sci.*, **68**, 729-735.
- 能登谷正浩 (2002) 海苔という生き物. 成山堂書店, 東京. 175pp.
- 大房 剛 (2001) 図説 海苔産業の現状と将来. 成山堂書店, 東京. 223pp.
- 岡内正典 (2000) DNA 情報からみ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), 成山堂書店, 東京, pp. 35-49.
- Robba, L., S. J. Russell, G. L. Baker and J. Brodie (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am. J. Bot.*, **93**, 1101-1108.
- 瀬崎啓次郎・久保島康子・三谷 勇・福井 篤・渡部終五 (2001) ミトコンドリア・シトクローム *b* 遺伝子によるマサバおよびゴマサバの種判別とホルマリン固定浮遊卵同定への応用. 日本水産学会誌, **67**, 17-22.
- 樽田真依・黒木敏成・鬼頭 鈞 (2007) アマノリ属植物の SSUrRNA 遺伝子と RuBisCO 遺伝子領域の解析による類縁関係の推定と種同定の開発. 海苔と海藻, **73**, 1-42.
- ウッパパラパティ・スリニヴァサ・ラオ (2000) 体細胞融合と耐病性. 海苔の生物学 (能登谷正浩編), 成山堂書店, 東京, pp. 114-128.
- Uwai, S., N. Yotsukura, Y. Serisawa, D. Muraoka, M. Hiraoka and K. Kawai (2006) Intraspecific genetic diversity of *Undaria pinnatifida* in Japan, based on the mitochondrial *cox3* gene and the ITS1 of nrDNA. *Hydrobiologia*, **553**, 345-356.
- 上井進也 (2007) 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, **55**, 177-180.
- 宇山博人・池田 実・谷口順彦 (2005) mtDNA の PCR-RFLP によるタラバガニとアブラガニの判別. 水産育種, **34**, 111-11.
- 吉田忠生・菊地則雄・吉永一男 (1999) アサクサノリの野生個体群. 藻類, **47**, 119-122.