

食用コンブの産地判別に関する研究 —DNA抽出法の開発とミトコンドリアDNA分析の利用—

清水健志, 加藤佑基, 加藤省吾*, 井上晶**, 尾島孝男**, 八十川大輔***

Technology for Geographic Origin Identification of Edible Kelps —Development of DNA Extraction and Utilization of Mitochondrial DNA Analysis—

Takeshi Shimizu, Yuki Kato, Syogo Kato*, Akira Inoue**, Takao Ojima**
and Daisuke Yasokawa***

要 旨

食用コンブの産地判別技術を開発するため、分析に適したDNA抽出法とミトコンドリアDNA分析の利用について検討を行った。その結果、エゾアワビ由来のアルギン酸リアーゼを利用することで、PCR増幅性が高い、高品質なDNAを安定して取得できる抽出法が開発できた。また、本抽出法は試料の粉碎を必要としない簡易な手法であり、様々な褐藻類に利用可能な技術と考えられた。

本抽出法を用いて10種の食用コンブからミトコンドリアDNAを抽出し、NAD5遺伝子を解析した結果、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブ、チヂミコンブ、ガゴメ、トロロコンブの識別が可能であることから、それぞれの生息分布により産地が推定でき、国産コンブと輸入コンブの判別にも利用可能であることが分かった。一方、マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブは塩基配列にほとんど違いが見られず、今回の結果から、それぞれの産地を判別するにはさらに詳細な検討が必要と考える。

1. はじめに

食用コンブは、種や産地により価格差があることから、これらを識別できる技術が求められている。現在、国内で流通している主な食用コンブとして国産のマコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブ、チヂミコンブ、ガゴメと中国・韓国から輸入されるマコンブが挙げられる。それぞれの種の生息分布はある程度限られているため、種の識別が可能であれば産地も推定できると考えられる¹⁾。

近年、様々な食品原料について種間で異なる塩基配列を見出しやすいミトコンドリアDNA (mtDNA) を用いた種判別技術が開発されており、^{2,5)} 当センターでは、コンブ類の種・産地判別技

術の開発を検討するため、植物DNA抽出法 (CTAB法や市販植物用抽出キット) を用いたmtDNA分析を進めてきた。しかしながら抽出されたDNAでは、分析する際に必要な操作であるDNAの増幅が阻害されることが多く、その原因としてコンブ類に多く含まれている多糖類 (アルギン酸) の混入が考えられた。

一方、これまでに我々は、海産軟体動物から様々な酵素の探索・同定を行っており、近年、エゾアワビなどの海産軟体動物からアルギン酸分解活性の高い酵素 (アルギン酸リアーゼ) を見出している^{6, 7)}。

そこで食用コンブを対象に、アルギン酸リアーゼを利用したDNA抽出法及びmtDNA分析による産地判別について検討した。

* 北海道小樽水産高等学校

** 北海道大学大学院水産科学研究院

*** 北海道立食品加工研究センター

2. 実験方法

2.1 褐藻類試料

北海道の各産地で採集された食用コンブ10種（マコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ、オニコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガッガラコンブ、チヂミコンブ、ガゴメ、トロロコンブ）を用いた。また、食用コンブ以外の褐藻類としてスジメ（スジメ属）を用いた（表1）。

表1 試料として用いた褐藻類

コンブ類試料	採集年	採集地
マコンブ	2009年	函館市
ホソメコンブ	2009年	松前町
リシリコンブ	2009年	利尻町
オニコンブ	2009年	羅臼町
ナガコンブ	2007年	釧路市
ミツイシコンブ	2007年	浦川町
ガッガラコンブ	2009年	根室市
チヂミコンブ	2006年	利尻町
トロロコンブ	2006年	根室市
ガゴメ	2007年	函館市
スジメ	2006年	函館市

2.2 エゾアワビ由来アルギン酸リアーゼの調製

函館市内の市場より購入したエゾアワビの中腸腺内から消化液を採取し、10 mM リン酸バッファー (pH8.0)で透析後、100,000×gで30分間遠心分離を行った。得られた上清を80~100%の硫酸アンモニウム水溶液で分画後、10mM リン酸バッファー (pH8.0)に溶解、透析し、得られた溶液をアルギン酸リアーゼ溶液として調製した。またアルギン酸リアーゼ活性は、10mM リン酸ナトリウム (pH8.0), 0.2% (w/v) アルギン酸ナトリウムを含む溶液を用い、30℃の条件下で235nmにおける吸光値が1分間に0.01上昇する活性を1 Uと定義した。

2.3 DNAの調製

コンブ類乾燥試料から約0.01gの葉片を採取し（図1）、0.5mlの洗浄液（125mM EDTA (pH8.0), 1M NaCl）に30分間浸漬して洗浄を行い、10,000×gで1分間遠心して洗浄液を除いた後、450ulの抽出溶液（50mM Tris-HCl (pH7.5), 20mM EDTA, 100mM NaCl, 1%SDS, 2%メルカプトエタノール, 0.5mg/ml プロテナーゼK）を加えて55℃で30分間インキュベートした。次いで、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール

(25:24:1) でタンパクを除去した溶液に、10 Uアルギン酸リアーゼを含む0.125 M EDTA溶液 (pH 8.0)を加え、30℃で4時間インキュベートした。エタノール沈殿処理により得られた沈殿をTEバッファー（10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA）に溶解した後、GENECLEAN SPIN KIT (Q-BIO gene)を用いて精製した。また、対照としてアルギン酸リアーゼで処理しないDNAを調製した。

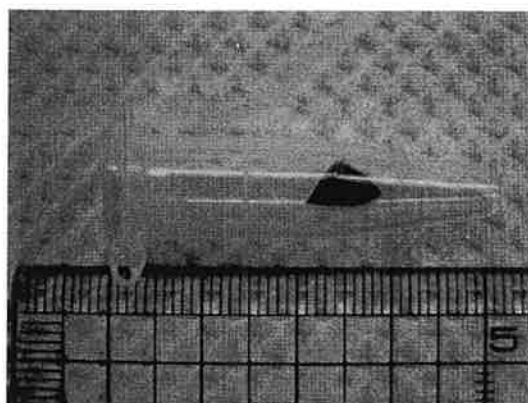


図1 DNA抽出に用いたコンブ葉片

2.4 DNAの増幅性の評価

マコンブ4個体から調製したDNAを用いて、PCR法によりmtDNA上のNAD5遺伝子領域の一部である562bpを増幅した（図2）。プライマーには各コンブ種に共通な配列となるよう設計したユニバーサルプライマー（表2）、DNA polymeraseにはKOD Dash（東洋紡績株式会社）を使用した。PCR条件は、94℃-3分のプレヒート後、94℃-30秒、58℃-2秒、72℃-30秒を35回繰り返し、最後に伸長反応を72℃-30秒で行った。PCR反応後の試料を1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により増幅の確認を行った。



図2 ユニバーサルプライマーの位置
 ▲ : フォワードプライマー、 ▼ : リバースプライマー

表2 ユニバーサルプライマー配列

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	増幅サイズ(bp)
フォワードプライマー	TCTATACGGCTTTTAGCTTT	562
リバースプライマー	AATAAATGAAGCCAACCCAC	

2.5 mtDNAの塩基配列解読

アルギン酸リアーゼ処理後、PCR法により得られた11種の褐藻類からの増幅DNAは、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った後、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) により塩基配列を解読した。

また、塩基配列の比較には、系統解析ソフトウェアであるMolecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.⁸⁾ を用いた。

3. 結果と考察

3.1 エゾアワビ由来アルギン酸リアーゼ処理によるDNAの増幅性

アガロースゲル電気泳動の結果、増幅されたDNAは全て予想されたサイズであり、エゾアワビ由来アルギン酸リアーゼ処理により抽出されたDNAは、無処理のDNAに比べて増幅性が高いことが確認された (図3)。この結果から、エゾアワビ由来アルギン酸リアーゼを利用したDNA抽出法は、食用コンブから高品質なDNAを安定して取得できることが分かった。

今回開発した抽出法は、通常行われる試料の粉碎工程を省略しても分析に必要な量のDNAを得ることができることから、食用コンブに適した簡易な手法を開発できたと考えている。

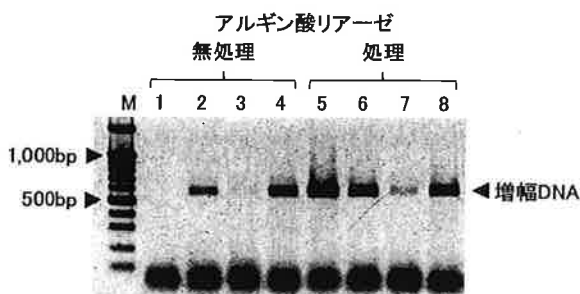


図3 アルギン酸リアーゼ処理による抽出DNAの増幅性

M: 分子量マーカー、1~4: アルギン酸リアーゼを用いないで抽出したマココンブ4個体 (a, b, c, d) のDNA、5~8: アルギン酸リアーゼ処理により抽出したマココンブ4個体 (a, b, c, d) のDNA

3.2 mtDNA分析による産地判別

アルギン酸リアーゼ抽出法を用いて11種の褐藻類からDNAを抽出し、mtDNA上にあるNAD5遺伝子を増幅した結果、全ての試料で増幅が確認さ

れた (図4)。この結果から、本抽出法は食用コンブだけでなくアルギン酸を多く含むその他の褐藻類に対しても適応できるものと考えられた。



図4 様々な褐藻類から抽出したDNAの増幅
M: 分子量マーカー、1: マココンブ、2: ホソメココンブ、3: リシリココンブ、4: オニココンブ、5: ミツイシココンブ、6: ナガココンブ、7: ガッガラココンブ、8: チヂミココンブ、9: ガゴメ、10: トロロココンブ、11: スジメ

次いで解読した塩基配列を用いて系統解析を行った結果を図5に示した。食用コンブ10種のうち、ミツイシココンブ、ナガココンブ、ガッガラココンブ、チヂミココンブ、ガゴメ、トロロココンブについては、それぞれが単独に識別されていることが確認された。この結果は、NAD5遺伝子の塩基配列中に明確な違いがあることを示しており、それぞれの生息分布から国内産地の推定が可能である。また、これらの種は輸入種であるマココンブとも明確に識別できることから、国内外の産地判別にも利用可能である。

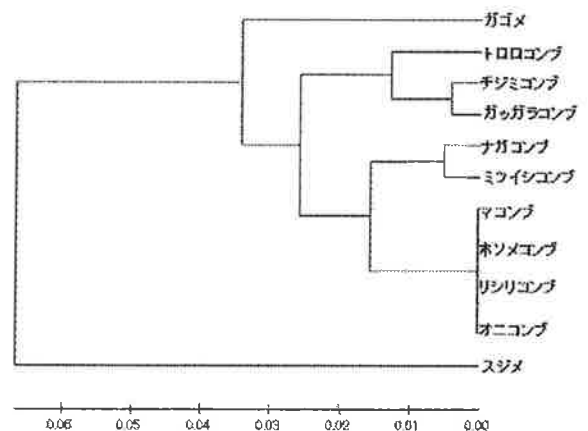


図5 系統解析によるNAD5遺伝子の塩基配列の比較

一方、マココンブ、ホソメココンブ、リシリココンブ、オニココンブの4種については明確に分けることができず、塩基配列にほとんど違いがないことが示された。マココンブ系ココンブと呼ばれるこの4種は、近年、同一種の可能性が高いことが報告されており⁹⁾、それぞれの産地を識別するには今後さらに詳細な解析が必要と考える。

輸入種であるマココンブを含むマココンブ系ココンブ

の産地判別技術の開発は重要な課題と考えており、現在、他の食品原料の産地判別に利用されている微量元素分析¹⁰⁾や安定同位体比解析¹¹⁾などの他の技術を組み合わせた高精度な産地判別技術の開発を検討している。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、試料の収集にご協力して頂きました、株式会社かまだ商店、北海道立食品加工研究センター錦織孝史部長に心から感謝いたします。なお、本研究の一部は、文部科学省の都市エリア産学官連携促進事業及び地域イノベーションクラスタープログラム事業の一環として実施しました。

参考文献

- (1) 川島昭二. 改定普及版日本産コンブ類図鑑 (株式会社北日本海洋センター), (1993)
- (2) 太田英明, 湯川剛一郎, 丹敬二, 土肥由長. 食品鑑定技術ハンドブック (株式会社サイエンスフォーラム), (2005)
- (3) 福田裕, 渡部終五, 中村弘二. 水産学シリーズ149 水産物の原料・産地判別 (恒星社厚生閣), (2006)
- (4) 柳本卓, 北村徹. 日水誌. 68 (6), 893-899 (2002)
- (5) 榎智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明. 日水誌 51 (9), 471-476 (2004)
- (6) Shimizu E. et al. Carbohydr Res. Vol. 338, 2841-2852 (2003)
- (7) Suzuki H. et al. Carbohydr Res. Vol. 341, 1809-1819 (2006)
- (8) Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. Mol. Biol. Evol. Vol. 24, 1596-1599 (2007)
- (9) Yotsukura N, Kawashima S, Kawai T, Abe T, Druehl LD. J Jpn Bot. Vol. 83, 165-176 (2008)
- (10) 高村巧, 清水健志, 木下康宣, 下野功. 北海道立工業技術センター研究報告. (10), 55-58 (2008)
- (11) 鈴木彌生子, 中下留美子, 赤松史一, 伊奈永隆史. 食科工. 55 (5), 250-252 (2008)