

PCR-RFLP 法によるセンジュアマノリの判別

阿部 真比古^{1*}・藤井 香帆^{1,2}・玉城 泉也³・菊地 則雄⁴・村瀬 昇¹¹ 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校生物生産学科
(〒759-6595 山口県下関市永田本町 2-7-1)² 現所属：国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所長崎庁舎
(〒851-2213 長崎県長崎市多以良町 1551-8)³ 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所八重山庁舎
(〒907-0451 沖縄県石垣市桴海大田 148)⁴ 千葉県立中央博物館分館海の博物館 (〒299-5242 千葉県勝浦市吉尾 123)Mahiko Abe^{1*}, Kaho Fujii^{1,2}, Motoya Tamaki³, Norio Kikuchi⁴ and Noboru Murase¹: Identification of *Pyropia kitoi* with PCR-RFLP method. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 72: 165–168, November 10, 2024

It is difficult to discriminate the thalli of red alga *Pyropia kitoi* from related *Pyropia* species based on morphological features. In the present study, we examined the availability of molecular identification of *P. kitoi* using PCR-RFLP method for partial mitochondrial DNAs according to our previous studies. Two mitochondria-encoded genes *trnC-rns* and *ATP6* regions were amplified, and subsequently digested by using a restriction enzyme (*TaqI*) for *trnC-rns*, and four enzymes (*SspI*, *AclI*, *AluI* and *BmgT120I*) for *ATP6*. In *P. kitoi*, PCR-RFLP patterns of *TaqI* showed five fragments (726, 439, 150, 37, 7 bp), *SspI* showed five fragments (196, 178, 168, 90, 32 bp), and *AluI* showed two fragments (512, 152 bp). PCR-RFLP patterns of these three enzymes were identical among the four strains and four wild thalli of *P. kitoi*, and differed from those of *Pyropia pseudolinearis* and any other species examined in previous studies.

Key Index Words: DNA, morphology, PCR-RFLP, *Pyropia kitoi*, simple method

¹ Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan² Present address: Nagasaki Field Station, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, 1551-8 Tairamachi, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan³ Yaeyama Branch, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, 148 Ota, Fukai, Ishigaki, Okinawa 907-0451, Japan⁴ Coastal Branch of Natural History Museum and Institute, Chiba, 123 Yoshio, Katsuura, Chiba 299-5242, Japan

* Author for correspondence: abemahi@fish-u.ac.jp

アマノリ類は、日本沿岸に広く分布し、古くから食用利用されてきた(藤塚 2020)。センジュアマノリ *Pyropia kitoi* (Ma. Abe, N.Kikuchi, Tamaki, Tom.Sato, Murase, Fujiyoshi et Mas. Kobayashi) D.J.Kim, T.O.Cho et B.Y.Won は、Abe *et al.* (2021) により記載された新種のノリで、千葉県の一部では天然葉状体が食用利用されており、養殖種苗としても有望である可能性が指摘されている (Niwa *et al.* 2022, Kim *et al.* 2023)。本種の形態は、ウップルイノリ *P. pseudolinearis* (Ueda) N.Kikuchi, Miyata, M.S.Hwang et H.G.Choi に類似し、根様糸細胞から新しい葉状部を発生させる点で両種は区別できるが、それ以外の形態的特徴での区別は困難である (Abe *et al.* 2021)。また、センジュアマノリの根様糸細胞からの葉状部の発生は室内培養では高頻度で確認できるが、天然では単葉の個体も普通に見られる (Abe *et al.* 2021)。そのため、天然の単葉個体は形態での種判別は困難である。複数の葉状部を有する個体であっ

ても、根様糸細胞から新しく発生した葉状部であるのか、裂葉であるのかを区別することは天然の個体では非常に困難であり、そのような葉状体の形態のみでの種判別はほぼ不可能である。Niwa *et al.* (2023) は、センジュアマノリの簡易判別法として葉緑体と核の遺伝子を用いた PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 解析による方法を開発したが、それはノリ養殖種苗の判別を目的としたもので、主たる養殖対象であるナラウスサビノリ *P. yezoensis* f. *narawaensis* N. Kikuchi, Niwa et Nakada との判別のみを検討していた。一方、天然では複数のアマノリ類が同所的に生育することが多いため、多種を同時に判別できることが望ましい。そこで本研究では、センジュアマノリとウップルイノリなど日本産アマノリ類の他種とを判別するための簡易種判別法の開発を目的として、Abe *et al.* (2013) や玉城ら (2019) が報告し、日本沿岸に生育するアマノリ類の多くを判

別できる mtDNA の PCR-RFLP 法を用いた方法を検討した。

本研究では, Abe *et al.* (2021) によりセンジュアマノリと判別されている 4 株 (UM-KT6, UM-KT11, UM-KT12, Psp1) および Abe *et al.* (2013) によりウップルイノリと判別されている 1 株 (水産生物遺伝資源保存事業ジーンバンク株名: 82 ウップルイノリ北浜, 島根県出雲市産) のそれぞれの糸状体を用いた。UM-KT6, UM-KT11 および UM-KT12 株は国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校と千葉県立中央博物館分館海の博物館に, Psp1 株は水産大学校で保存培養されており, 82 ウップルイノリ北浜については, 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所長崎庁舎から分与された。DNA の抽出は, Koike *et al.* (2007) および玉城ら (2012) に従い, TNES-8M Urea 緩衝液中で糸状体を鋏で細かく刻み, 加熱処理した。加熱処理した TNES-8M Urea 緩衝液に 3M 酢酸ナトリウムを添加, 遠心後, 上澄み液のみを取り出しエタノール沈殿させ, 沈殿物を TE 緩衝液に溶解した。この溶液は, GENE CLEAN KIT (MP-biomedicals) を用いて精製した。なお, 本抽出法により抽出された DNA を鋳型として, 約 2,000 塩基の DNA を PCR 法で増幅可能であることは予め確認されている (玉城ら 2012)。抽出した DNA を鋳型として, mtDNA の *trnC-rns* 領域と *ATP6* 領域について, Abe *et al.* (2013) に従い PCR を行った。PCR に用いたプライマーは, 前者は mit17BF (5'-GTCAGTTCGAATCTGGCCCTAGTT-3') と mit17R (5'-ATGTGTTAGGCCGACCACTA-3'), 後者は mit12BF (5'-CGTGTGGCCTGATGTCATAT-3') と mit12CR (5'-GCTCAATGGTCAGAGCATACG-3') である。

制限酵素は, *trnC-rns* 領域では *TaqI* (Takara) を, *ATP6* 領域では *SspI* (Takara), *AciI* (BioLabs), *AluI* (Toyobo) およ

び *BmgT120I* (Takara) を用い, マニュアルに従って処理した。また, UM-KT12 株については, 阿部ら (2008) や Abe *et al.* (2010, 2013) に従い, ダイレクトシーケンスにより *trnC-rns* 領域および *ATP6* 領域の塩基配列を決定した後, 各制限酵素の認識配列を検索し, 切断長を推定した。

センジュアマノリと判別されている 4 株およびウップルイノリと判別されている 1 株について, *trnC-rns* 領域および *ATP6* 領域のいずれも 1 本ずつの断片を増幅することができた (Fig. 1a, b)。センジュアマノリの *trnC-rns* 領域および *ATP6* 領域における PCR 産物は, UM-KT12 の塩基配列より *trnC-rns* 領域で 1,359 bp (DDBJ accession number, LC752534), *ATP6* 領域で 664 bp (LC752535) であった。センジュアマノリは, *TaqI* により切断された *trnC-rns* 領域は 5 本の断片 (726, 439, 150, 37, 7 bp) と推定されたが, 泳動像では 3 本の断片が確認された (Fig. 1c)。また, *ATP6* 領域では, *SspI* では 5 本の断片 (196, 178, 168, 90, 32 bp) と推定されたが泳動像では 2 本の断片が確認され (Fig. 1d), *AluI* では 2 本の断片 (512, 152 bp, Fig. 1g) が確認された。*AciI* と *BmgT120I* では切断されなかった (Fig. 1e, f)。センジュアマノリの *SspI* による断片像はウップルイノリのそれと同じであった (Fig. 1d)。しかし, *TaqI* (Fig. 1c) および *AluI* (Fig. 1g) の断片像は両種で異なっていた。これらのことから, センジュアマノリとウップルイノリは, *trnC-rns* 領域には *TaqI*, *ATP6* 領域には *AluI* を使用すれば区別できることが明らかとなった。また, 本研究におけるセンジュアマノリと Abe *et al.* (2013) で報告されているアマノリ類 18 種および玉城ら (2019) で報告されたアツバソメワケアマノリ *Porphyra katadae* var. *hemiphylla* C.K.Theng et T.J.Chang のバンドパター

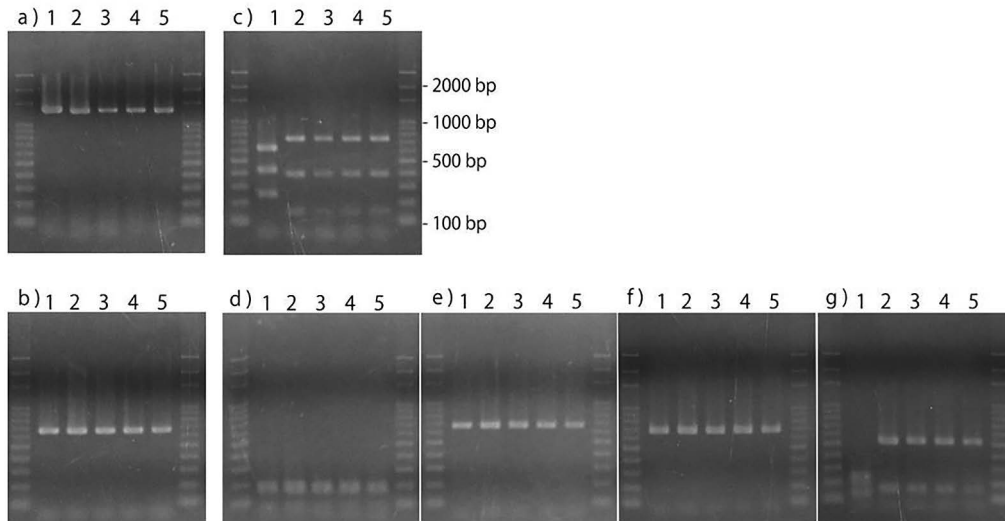


Fig. 1. Gel electrophoresis band patterns of amplified mitochondria-encoded DNAs (a, b) and PCR-RFLP fragments (c–g) of *Pyropia* strains. Non-restricted amplicons of *trnC-rns* (a) and *ATP6* (b) from filamentous thalli of a *Pyropia pseudolinearis* strain (1: 82 Uppuruinori-Kitahama, from Izumo, Shimane), and four *Pyropia kitoi* strains (2: UM-KT6 from Isumi, Chiba; 3: UM-KT11 from Isumi, Chiba; 4: UM-KT12 from Choshi, Chiba; 5: Psp1 from Shimonoseki, Yamaguchi). Restriction enzymes used for *trnC-rns* is *TaqI* (c), and for *ATP6* are *SspI* (d), *AciI* (e), *BmgT120I* (f) and *AluI* (g). Both sides in each photograph show size markers.

ンを比較したところ、センジュアマノリのバンドパターンは報告された他のアマノリ類のいずれのバンドパターンとも異なりました。したがって、本研究の PCR-RFLP 法を使用すれば、形態観察は必要であるが、一層のアマノリ類 19 種と 1 変種を簡易的に判別できることが明らかとなった。

この結果を受けて、2022 年 2 月に山口県下関市沿岸 (34°04'13"N, 130°53'19"E) において、形態観察からセンジュアマノリと思われる葉状体を採集し (Fig. 2), 上記の手順で DNA 抽出および PCR-RFLP 分析を行った。分析した 4 個体はいずれもセンジュアマノリのバンドパターンを示した (Fig. 3)。このことから、天然に生育しているノリ葉状体においても、本手法を活用することができた。PCR-RFLP 法は簡便な手法ではあるが、制限サイトに塩基置換が起こっている場合はバンドパターンが容易に変化してしまう。本手法による種判別の精度を上げていくためには、個体差や地域差などを考慮したサンプリングを行っていく必要がある。

引用文献

- 阿部真比古・小林正裕・玉城泉也ら 2008. 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ケサノリ *Porphyra tenera* var. *tamatsuensis* の判別について (予報). 水産増殖 56: 497-503.
- Abe, M., Kobayashi, M., Tamaki, M. *et al.* 2010. Rapid discrimination of *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura by PCR-RFLP. J. Appl. Phycol. 22: 405-408.
- Abe, M., Kobayashi, M., Fujiyoshi, E. *et al.* 2013. Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 25: 225-232.



Fig. 2. Specimens of *Pyropia kitoi* collected around the coast of Shimonoseki, Yamaguchi in February 2022.

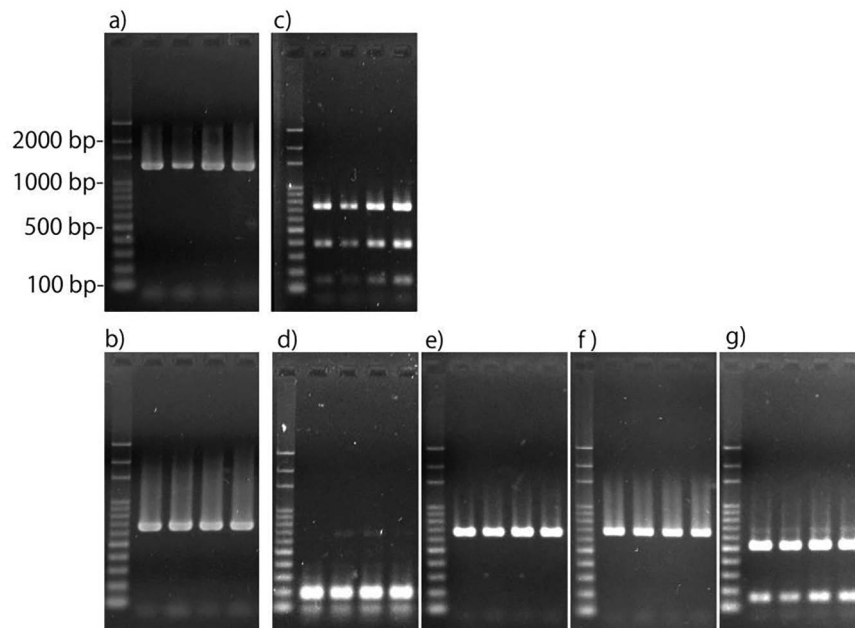


Fig. 3. Gel electrophoresis band patterns of amplified mitochondria-encoded DNAs (a, b) and PCR-RFLP fragments (c-g) of natural foliose thalli of *Pyropia kitoi* from Shimonoseki, Yamaguchi in February 2022. Non-restricted amplicons of *trnC-rns* (a) and *ATP6* (b) of four natural thalli of *P. kitoi*. PCR-RFLP profiles of *TaqI* (c) for *trnC-rns*, and *SspI* (d), *AcI* (e), *BmgT120I* (f) and *AluI* (g) for *ATP6*. Left lanes in each photograph show size marker.

- Abe, M., Kikuchi, N., Tamaki, M. *et al.* 2021. *Neoporphyra kitoi* sp. nov. (Bangiales, Rhodophyta) from Japan, with new blades arising from rhizoidal cells. *Phycol. Res.* 69: 237–245.
- 藤塚悦司 2020. 養殖以前のノリ文化. 二羽恭介 (編) ノリの科学. pp. 4–7. 朝倉書店, 東京.
- Kim, D. J., Romero-Orozco, P., Kim, G. W. *et al.* 2023. A new record of high temperature tolerance species, *Pyropia kitoi* com. nov. (Bangiaceae, Rhodophyta), from Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 41: 223–228.
- Koike, K., Yamashita, H., Ohuchi, A. *et al.* 2007. A quantitative real-time PCR method for monitoring *Symbiodinium* in the water column. *Galaxea, J. Jpn. Coral Reef Soc.* 9: 1–12.
- Niwa, K., Iga, H. & Sato, T. 2022. Potential of *Neoporphyra kitoi* (Bangiales, Rhodophyta) as a candidate species for marine crops with high temperature tolerance. *Aquaculture* 548: 737650.
- Niwa, K., Iga, H., Shimada, Y. *et al.* 2023. Simple molecular identification and free amino acid contents of *Neoporphyra kitoi* (Bangiales, Rhodophyta) with potential use as new species for nori cultivation. *J. Appl. Phycol.* 35: 331–338.
- 玉城泉也・藤田雄二・藤吉栄次ら 2012. 沖縄県宜野湾市にて採集したツクシアマノリ葉状体の形態的特徴と分子生物学的解析. *沖縄生物学会誌* 50: 1–15.
- 玉城泉也・藤吉栄次・小林正裕ら 2019. 岩手県以南の我が国各地から採集したソメワケアマノリ *Pyropia katadae* (紅藻綱ウシケノリ目) の DNA 分析. *DNA 多型* 27: 18–24.

(2024 年 5 月 9 日受付, 2024 年 7 月 5 日受理)

通信担当編集委員: 秋野 秀樹