

(Random Amplified Polymorphic DNA) 解析によって求め、データベースを用いた類似塩基配列の検索によって、緑色変異型株における変異遺伝子を推察した。

2 材料および方法

2.1 スサビノリ藻体

本研究では野生型 (正常型) 養殖種 (養殖名: 佐賀 5 号) を野生型株とし、緑色突然変異型養殖種 (養殖名: ナラワスサビミドリメ⁹⁻¹⁰) を自然発生突然変異型株として用いた。RAPD解析では、さらに2種類の野生型 (正常型) 養殖種 (養殖名: 福岡 1 号およびノマ 1 号) も用いた。有明海にて養殖されたこれらの葉状体を佐賀県有明水産センターおよび福岡県水産海洋技術センター有明海研究所から譲り受けた後、自家受精によってフリー糸状体として継代培養した。継代培養によって増殖したフリー糸状体の一部をDNA抽出のため-20℃に保存した。

2.2 DNAの抽出

凍結糸状体を液体窒素下で粉末化後、DNA抽出キット (DNAeasy Plant Maxi Kit, Qiagen社) を用いて糸状体からDNAを抽出した。抽出方法は添付のプロトコールに従っ

た。最終的に得たDNA抽出液について、さらに以下の操作を行った。DNA抽出液にプロテナーS K (最終濃度100 μg/ml) およびSDS (最終濃度0.5%) を加え、55℃に3時間保温後フェノール・クロロホルム抽出を2回行い、遠心 (3200rpm, 10分) 上清を得た。この上清からエタノール沈殿によってDNAの沈渣を得、これをTE溶液 (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.5) に溶解して最終的なDNA溶液とした。

2.3 葉緑体遺伝子の解析

葉緑体DNAに含まれる光合成色素遺伝子cpc-A, cpc-B, cpe-Aおよびcpe-B, また、cpcオペロンおよびcpeオペロンのプロモーター領域それぞれの塩基配列を解析した。既報¹²⁾ のチシマクロノリの塩基配列をもとにTable 1 に示した12種類のプライマーを作成した。これらのプライマーと野生型株および突然変異型株のそれぞれから抽出した全DNAを用いてそれぞれの遺伝子をPCRによって増幅させた。PCRの反応液組成および反応条件は既報¹³⁾ に従った。PCRによって増幅したDNAをアガロース電気泳動し、目的とするDNA断片をDNA回収・精製キット (Invitrogen 社) を用いてゲルから回収した後、塩基配列の解析を行った。塩基配列の解析はシーケンスキット (ABI PRISM Dye

Table 1. Primers used for amplifying and sequencing of the biliprotein genes

Primers	5'-3' sequences
cpc-A	
Forward	TTTGACCGCGCTGCTGTATCTGT
Reverse	ATGGCTAGCACTATAGGGTGAAC
cpc-B	
Forward	TCAGCTTTGAGAATTTTCGGTATT
Reverse	TCAGCAGATGCAATTCTTC AGT
cpe-A	
Forward	CTGAAGTAGCTAGCTATTGTGAT
Reverse	GCATCGCAGTAAGCAAGCCACCA
cpe-B	
Forward	TGACAGTCGAAACAGTGAAGTCC
Reverse	ACCAGCAGCATCTGCTGCTGCACTGA
cpc operon promoter	
Forward	CCGTGCAAGTTGGCTAATAGAGCC
Reverse	TTGCGTCTGCTTGAGCTACAAC
cpe operon promoter	
Forward	ACCCGTTAAATCTTGAGAGAAAGCTC
Reverse	CTACAACCTCTGGAAAATGCGTCA

Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit, ABI社)を用い、自動シーケンサー (310 Genetic Analyzer, ABI社)によって解析した。一部のDNA断片については上記の方法による塩基配列の解析が困難だったため、プラスミドベクター／大腸菌の形質転換系 (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen 社, CA) を用いて増幅DNA断片をクローン化した後、M13プライマー (Invitrogen 社) を用いて上記と同様に塩基配列を解析した。

Rubisco 遺伝子の塩基配列の解析については、既報^{14,15)}のPCRプライマーを用い、野生型株および突然変異型株それぞれの全DNAを鋳型としてRubisco遺伝子を増幅後、上記と同様の方法で遺伝子断片の塩基配列を解読した。

シーケンサーで得た塩基配列のデータをもとに、遺伝子解析ソフト (DNAsis-Mac Ver 3. 4, Hitachi Softwareengineering 社) を用いて、光合成色素遺伝子およびRubisco遺伝子について野生型株と突然変異型株間の遺伝子類似性を解析した。

2.4 RAPD-PCR法による遺伝子変異の解析

既報⁶⁾に従い、RAPD-PCRを行った。すなわち、野生型株あるいは突然変異型株の全DNAを鋳型とし、10塩基から成るプライマーを用いて反応液を調製した後、これを initial denature 94℃ - 1分, final extension 72℃ - 2分とし、94℃ - 1分, 36℃ - 1分, 72℃ - 2分, サイクル数45回の条件下でPCRを行った。10塩基プライマーは、オペロン社 (Operon Technologies, Alameda, CA.) のランダムプライマー60種類 (A-01~A-20, B-01~B-20, C-01~C-20) の中から、スサビノリゲノムを鋳型として再現性ある明確なDNA断片を増幅するプライマー40種を選択し、これらを用いた。それぞれのプライマーによって増幅されたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、泳動パターン (RAPDパターン) をプライマーごとに野生型株と突然変異型株間で比較した。

RAPDパターンをもとにして、野生型株と突然変異型株間の遺伝子類似度を次の式から求めた。 $B / (2A - B) \times 100$ (%), ただし、A: 40種類のRAPDパターンの中で野生型株と突然変異型株に検出された全DNAバンド数, B: 40種類のRAPDパターンの中で野生型株と突然変異型株間で電気移動度が一致した全DNAバンド数, とした。

2.5 変異領域の塩基配列の解析と類似遺伝子の検索

野生型株と突然変異型株間でどのような遺伝子 (塩基配

列) が変異しているかを調べるため、RAPD解析で得たDNA断片およびDNA断片末端近傍の塩基配列を解析した。RAPD解析において野生型株と突然変異型株間で電気移動度が異なるDNA断片を上記の方法でゲルから回収し、これらを上記と同様にプラスミドベクターを用いてクローン化後、塩基配列を解読した。DNA断片の両末端および両末端が接している近傍の塩基配列については、DNA断片の塩基配列をもとに設計したPCRプライマーとゲノムDNAを用いたジーンウォーキング法によって解析した。ジーンウォーキングはウォーキングキット (TOPO Walker Kit, Invitrogen 社) を用い、方法は添付のプロトコールに従った。

解読した塩基配列と類似な配列を持つ植物遺伝子を遺伝子データベースDDBJ (DNA Data Bank of Japan) によって検索した。

3 結 果

3.1 光合成色素遺伝子およびRubisco遺伝子

Fig. 1 にスサビノリ野生型株および緑色変異型株の葉状

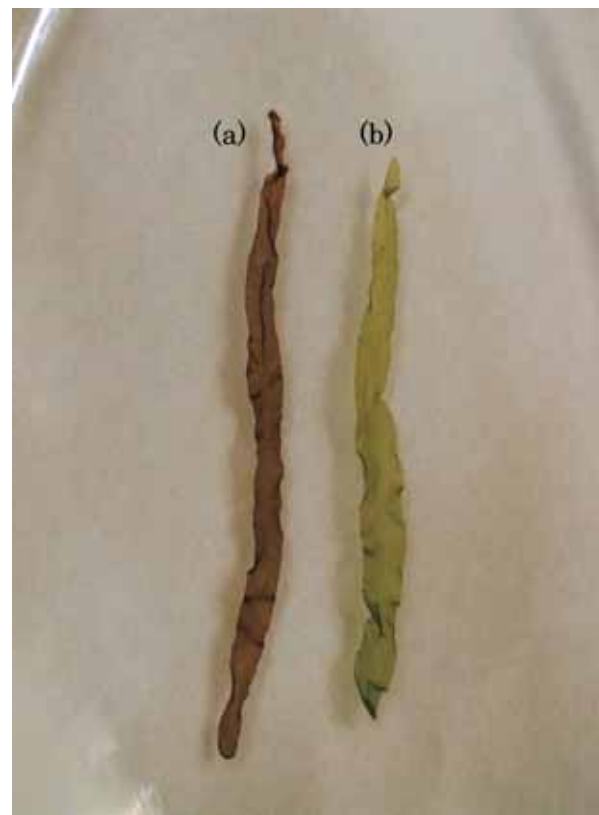


Fig. 1. Thalli of wild and green-type mutant strains of *Porphyra yezoensis*. (a): Wild-type strain, (b): Green-type mutant strain.

体を示した。スサビノリ野生型株の葉状体は濃い茶褐色を呈し、一方、緑色変異型株ナラワスサビミドリメの葉状体は緑色を呈している。緑色変異型株におけるフィコビルン蛋白のフィコシアニン α , β およびフィコエリスリン α , β のそれぞれに対応する遺伝子cpc-A, cpc-B, cpe-Aおよびcpe-B, また、これら遺伝子のプロモーターであるcpcオペロンプロモーター領域およびcpeオペロンプロモーター領域に

ついてそれぞれ塩基配列を解析し、野生型株のそれらと比較した。さらに、Rubiscoは色素蛋白質ではないが、CO₂固定に直接関与する光合成の鍵酵素であることからこの遺伝子の変異についても調査した。Fig. 2に、一例として、cpc-A, cpe-A遺伝子およびRubisco遺伝子のスペーサー領域の塩基配列について野生型株と緑色変異型株間で比較した図を示した。Table 2は、解析したフィコビルン関連遺

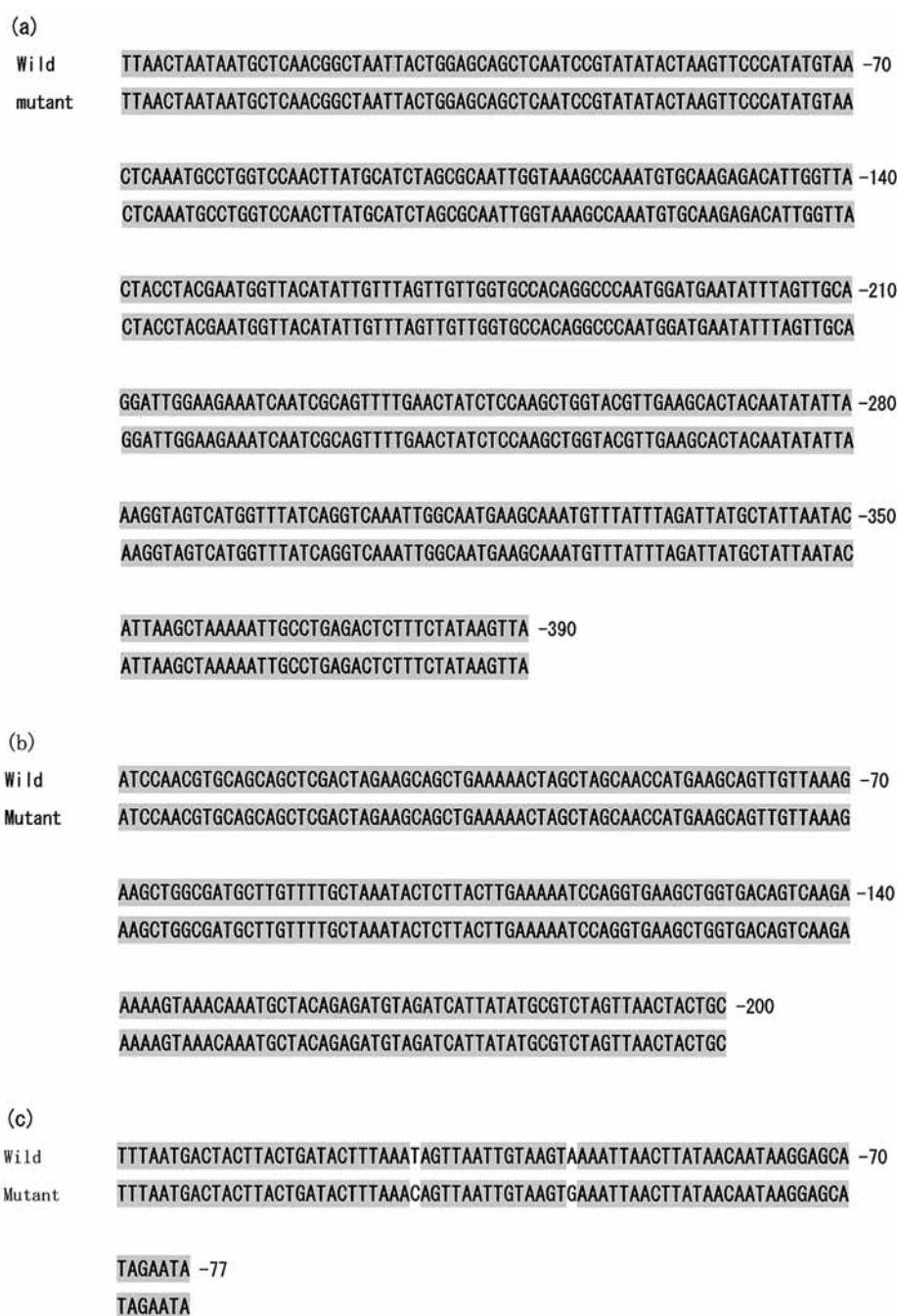


Fig. 2. Nucleotide sequences of the cpc-A and cpe-A genes and the spacer regions of Rubisco genes in the wild and green-type mutant strains. (a) cpc-A genes, (b) cpe-A genes, (c) spacer regions of Rubisco genes. Shaded areas indicate homologous nucleotides in the alignments. Numbers indicate nucleotide positions.

Table 2. Similarities of nucleotide sequences of the biliprotein and Rubisco genes between wild and mutant strains.

Genes (lengths * ¹)	Similarities (%) * ²
Biliprotein genes	
cpc-A(339)	100
cpc-B(292)	100
cpc- promoter(383)	100
cpe-A (198)	100
cpe-B (786)	100
cpe-promoter (373)	100
Rubisco genes	
Large subunit (1467)	100
Spacer region (77)	97
Small subunit (602)	100

*1: Numbers of nucleotides analyzed in this study.

*2: Nucleotide similarities between wild and mutant strains.

伝子, フィコビルン関連遺伝子プロモーター領域および Rubisco 遺伝子において, 野生型株と緑色変異型株間で変異 (置換, 欠失等) があつた塩基数をまとめたものである。Fig. 2 および Table 2 から明らかなように, 調査したすべてのフィコビルン関連遺伝子およびそれらのプロモーター領域には塩基配列の変異は全く検出されなかつた。Rubisco 遺伝子においては, スペーサー領域に 2 塩基の変異がみられたのみで, 大亜粒子および小亜粒子コーディング領域には塩基配列の変異は見られなかつた。

3.2 野生型株と緑色変異型株間の遺伝子類似度

40 種類のプライマーを用いた RAPD 解析によって, 野生型株と緑色変異型株間の遺伝子変異を解析した。Fig. 3 に, それぞれ 4 種類のプライマーを用いた時の RAPD パターンを一例として示した。両株間で電気移動度が一致しているバンドが多数検出されたが, 一致しているバンド以外に, 野生型株のみに見られ, 緑色変異型株には対応しているバンドがないもの, 逆に, 緑色変異型株のみにあつて, 野生

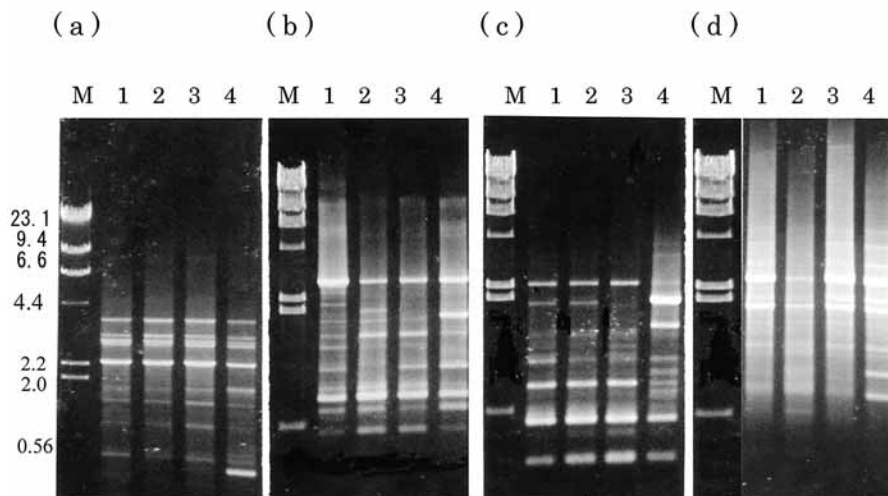


Fig. 3. RAPD patterns of genomic DNA from the wild and green-type mutant strains. The numbers above the lanes indicate DNA from wild strains (1: Saga-5, 2: Fukuoka-1, 3: Noma-1) and the mutant strain (4: Narawasusabimidorime). RAPD reactions were performed with primers A-11(a), A-12(b), A-16(c) and C-20(d). The size of the DNA standard is indicated in Kb on the left sides.

型株にはそれに対応しているバンドがないものなどが検出された。これらのRAPDパターン上の全バンド数と両株間で移動度が一致しなかったバンド数をもとに野生型株と緑色変異型株間の遺伝子類似度を求めたところ約80.1%であった。

3.3 変異領域塩基配列と類似な遺伝子 (塩基配列) の検索

RAPDパターンにおいて野生型株あるいは突然変異型株のみに特異的に検出されたDNA断片のうち、DNAサイズが比較的小さい断片8種類を任意に選び、断片および断片の両末端近傍の塩基配列を調べた。Fig. 4に、A-12-1.2-w およびC-14-0.7-mと名づけた領域の塩基配列を一例として示した。また、これら8種類の領域 (DNA断片) と同様な塩基配列を持つ遺伝子 (塩基配列) をDDBJにより検索した。Table 3は検索の結果をまとめたものである。80塩基以上の塩基配列中60%以上の類似度を持ち、その中で最も類似度の高い遺伝子 (塩基配列) を表に示した。ただし、8種類の領域のうち3種類については60%以上の類似度を示す遺伝子 (塩基配列) を検索することができなかった。また、2種類については60%以上の類似度をもつ配列が検索されたが、イネゲノム解析等で明らかにされた塩基配列が検索されたのみで、遺伝子名および機能は不明であった。残り3種類については、高い類似度

で被子植物レトロトランスポゾンに一致し、機能が推察された塩基配列すべてがレトロトランスポゾン遺伝子あるいはそれに関連した配列であった。

4 考 察

緑色変異型株の葉状体は常に緑色を呈し、外見上フィコピリン系色素を欠いていることから、これらの色素について関連遺伝子の変異を調べた。しかし、Fig. 2およびTable 2に示したように、フィコピリン系色素遺伝子の塩基配列に変異は見られず、また、光合成の鍵酵素遺伝子であるRubisco遺伝子のコーディング領域にも変異は全く検出されなかった。Ohmeら¹⁷⁾ およびYanら¹⁸⁾ は野生型株と緑色変異型株の交配によって生じた葉状体は茶褐色と緑色のキメラ状を呈することを報告し、緑色変異株の変異遺伝子は核遺伝子にあることを示唆した。本研究における葉緑体色素遺伝子の構造解析の結果は彼らの観察を支持するものであった。

全DNAのRAPD解析による野生型株と緑色変異型株間の遺伝子類似度は80.1%であった。川崎ら⁵⁾ は養殖アマノリ野生株3種間の遺伝子類似度は、全DNAを用いたRAPD法で約95%であることを報告している。本研究で求めた野生型株と緑色変異型株間の遺伝子類似度は、野生型株間に見られた類似度に比べて著しく低いことから、野生型株と

A-12-1.2-w

```
AAGGTCTTCA GTAAGCTCCC CTCAAGCCAG CAGGCACTGG CAAGTGCGGG CGGGCAACAG -60
GCCACCCCGA CTCAGTCGGG AGTTCGCTCG GGTGACACTT CTGATGTGGG TGGGCCGAAG -120
TCTGGCCACC GTGTGGTACA CTCAACGGGA ACGTCCCAAG GGGTGAGGAC TGTCCAAGGG -180
TGTAACCTGT TGAAGTATT CAGAGGCTAG GATAAGTCCT CGACTGGGCC TAAGGGCGAA -240
TCCAGCACAC TGGCGGGCTG TTAGTAGTTG GATTACGAG -279
```

C-14-0.7-m

```
CCTTGAAGCC TTCACGTTTC TACATGCCCA TGTGCATCAA CACCTGCCTT ACTTACATAC -60
AACAGCATCT AATTACTCTC TGCTCCTGCA CAGGTACTTT CGATCTTCTA CAAACAGTCT -120
GCTTCTGCTG CCAGTCGCAC CAAGCCTACT CGACAACATC TGACGGCGTT GCCGATCGTG -180
CGCATTACCC ATCAAGGCC CAGCGAAAGT TAAACAACCC TCATCTTACT TGCCTTTTAC -240
ACTTTGCGCT CGGCTCGCTG CACCCTCGTG ACAGCAGAGG TGCCCGCTTG ACGCTTGTTT -300
GATTGCGGCG GCGTCGGCCA AGCGTCATCC AATCTGTCCC TCCCTGCTAA TACGAGCCGA -360
CTCTCTTTAA TCTGCCCAT -379
```

Fig. 4. Nucleotide sequences of the A-12-1.2-w region (fragment) in the wild-type strain (shown in Fig. 3) and the C-14-0.7-m region (fragment) in the green-type mutant strain (not shown in Fig. 3). Numbers indicate nucleotide positions.

Table 3. DNA data bank search for homologous nucleotide sequences with those of eight regions (loci) varied between genomes of wild and green-type mutant strains.

Regions (loci)			Similar nucleotide sequences (Access No.)
Name	Size (Kb)	Primer and strain	
A-11-0.4-m	0.4	A-11, mutant	<i>Cicer arietinum</i> Ty1-copia retrotransposon (AJ535749)
A-11-0.5-w	0.5	A-11, wild	<i>Oriza sativa</i> copia-type retrotransposon (AB014755)
A-12-1.2-w	1.2	A-12, wild	<i>Lotus corniculatus</i> genomic DNA chromosome 1 (AP004491)
			<i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA chromosome 1 BAC T7P1 (AC018908)
A-16-0.7-m	0.7	A-16, mutant	<i>Arabidopsis thaliana</i> non-LTR retroelement (AC007018)
B-03-0.8-m	0.8	B-03, mutant	——*1
B-19-0.5-m	0.5	B-19, mutant	——*1
C-14-0.7-m	0.7	C-14, mutant	<i>Oriza sativa</i> genomic DNA chromosome 10 OSJNBa0029p06 (AC090873)
			<i>Oriza sativa</i> genomic DNA chromosome 10 (AE017055)
C-20-0.8-m	0.8	C-20, mutant	——*1

*1: Similar sequence was not detected.

緑色変異型株間には野生型株間の変異幅を超えた大きな遺伝子変異が存在するものと推察された。また、野生型株と緑色変異型株間の遺伝子類似度から両者の変異率は約20%と推定されるが、この変異率は農業用植物で報告されている実用形質や葉緑素突然変異の人為突然変異率 (0.001~10%)¹⁾ に比べ高い値であった。RAPD解析で調べた野生型株と緑色変異型株間の変異は実用形質等の変異でなく、DNAレベルの変異であることから、これら変異の多くが形質発現や蛋白質合成に直接関与していないDNA領域に生じているものと推察された。

Fig. 4 に、野生型株と緑色変異型株間で変異が推察されたDNA領域あるいはそれらの近傍領域の塩基配列の1例を、Table 3 には、それらの塩基配列と類似の配列を持つ植物遺伝子あるいは植物ゲノム領域の検索結果を示した。解析した8領域のうち5領域では類似な遺伝子あるいはゲノム領域が検索され、それらのうちの3領域が陸上植物のレトロトランスポゾンに極めて高い類似性を示した。これまでにコケ植物から被子植物まで100種類以上の陸上植物でレトロトランスポゾンの存在が確認され¹⁹⁾、さらに、Paquinら²⁰⁾ は酵母の低温培養で生じる自然突然変異の100%がレトロトランスポゾンによることを報告している。スサビノリは原始紅藻綱に属し、進化学上最も下位に位置する真核植物である。このような原始的な植物の突然変異

に高等植物同様のレトロトランスポゾンが関与していることは、植物進化およびレトロトランスポゾンの機能の観点から大変興味深いことである。

謝 辞

養殖アマノリの葉状体をご提供いただいた佐賀県有明水産センターの川村嘉広博士ならびに横尾一成、三根崇幸の各氏、また、福岡県水産海洋技術センター有明海研究所の岩淵光伸氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 鶴飼保雄：植物育種学、東京大学出版会 (2003)。
- 2) M. Ohme, Y. Kunifuji, and A. Miura: Cross experiments of the color mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda. *JPN. J. Phycol.*, **34**, 101-106 (1986)。
- 3) A. Miura, J.A. Shin: Crossbreeding in cultivars of *Porphyra yezoensis* (Bangiales Rhodophyta)-Preliminary report. *Korean J. Phycol.*, **4**, 207-211 (1989)。
- 4) 岩淵光伸：アマノリプロトプラストへ及ぼす紫外線の影響。福岡県水産海洋技術センター研究報告, **5**, 41-44 (1996)。

- 5) Y. Mizukami, N. Murase, H. Kito, and M. Kunimoto : Effect of ultraviolet irradiation on the survival rate and growth of protoplasts of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *SUISANZOSHOKU*, **51**, 157-164 (2003).
- 6) 川崎武仁, 中井涼子, 鬼頭 鈞, 國本正彦, 村瀬 昇, 水上 讓: 紫外線照射により誘導された紅藻スサビノリの突然変異. 水産大学校研究報告, **53**, 169-175 (2005).
- 7) 川村嘉応: 平成12年度佐賀県有明海のノリ不作と珪藻の増殖. 海苔と海藻, **62**, 1-12 (2001).
- 8) 藤井弘治: 有明海減産の影響. 海苔と海藻, **62**, 13-16 (2001).
- 9) 三浦昭雄: ノリの色彩の変異体と色彩の遺伝. 遺伝, **32**, 11-16 (1978).
- 10) 三浦昭雄, 国藤恭正: スサビノリの色彩変異型の遺伝子分析. 遺伝, **34**, 14-20 (1980).
- 11) A. Miura : Present trends and perspective in *Porphyra* (Nori) breeding. Genetics of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* development origin of variegated gametophytic thalli. *Suisan Ikushu*, **15**, 19-30 (1990).
- 12) M.E. Reith and J. Munholland : Complete nucleotide sequence of *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **13**, 333-335 (1995).
- 13) Y. Mizukami, Y. Kaminisi, M. Kunimoto, M. Kobayashi, N. Murase, and H. Kito : Comparison of partial nucleotide sequence in the exonic region of a small subunit ribosomal RNA gene for discrimination of laver (*Porphyra*) species and cultivars. *Fisheries Sci.*, **64**, 886-891 (1998).
- 14) D.W. Freshwater and J. Rueness: Phylogenetic relationship of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species based on *rbsL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia*, **33**, 187-194 (1994).
- 15) S.E. Douglas, D.G. Durnford, and C.W. Morden : The small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase is plastid-encoded in the chlorophyll c-containing algae *Cryptomonas*. *J. Phycol.*, **26**, 500-508 (1990).
- 16) Y. Mizukami, M. Okauchi, H. Kito, and M. Kobayashi : Discrimination of laver cultivars with RAPD makers. *Fisheries Sci.*, **62**, 547-551 (1996).
- 17) M. Ohme and A. Miura : Tetrad analysis in couchospore germlings of *Pophyra yezoensis* (Rhodophyta, Bangiales). *Plant Sci.*, **57**, 135-140 (1988).
- 18) X.H. Yan and Y. Aruga: Genetic analysis of artificial pigmentation mutants in *Pophyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *Phycol. Res.*, **48**, 177-187 (2000).
- 19) 廣近洋彦: 植物のレトロトランスポゾンとゲノム機能. 植物のゲノムサイエンス(秀潤社), 114-121 (1996).
- 20) C. E. Paquin and V. M. Williamson : Ty insertion at two loci account for most of the spontaneous antimycin A resistance mutations during growth at 15°C of *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking ADHI. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 70-79 (1986).