

DNA 分析によるアマノリ属とアオノリ属の識別について

小林 正和*, 八木 潤*, 中山 清貴*

Study on a DNA analysis method for discriminating between red algae and green algae

Masakazu KOBAYASHI*, Jun YAGI* and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In order to ensure proper tariff classification for seaweeds, DNA-based analysis for discrimination between *Pyropia* spp. and *Ulva* spp. was examined. DNA extraction was carried out with a QIAGEN DNeasy Plant mini kit and CTAB method; a better yield was obtained by the CTAB method. A PCR approach with a new primer set designed in the red algae, *Pyropia yezoensis*, chloroplast *Ycf18* gene (178 bp) and its adjacent *CpeB* gene (534 bp) regions was conducted using DNA extracted from commercial algal products as templates. The results suggested that the PCR-based method can discriminate between *Pyropia* spp. and *Ulva* spp. by detecting a *Pyropia*-specific band to be amplified through an electrophoresis.

1. 緒 言

海苔やワカメなどの海藻は、日本で日常的に食されている。歴史的観点から考えると、縄文・弥生時代の遺跡から、アラメ、ワカメ、ヒジキ、ホンダワラ等の海藻の一部が発見されており、また、8 世紀には、朝廷への献上品として海藻が登場していたことから類推し、日本には古くから海藻を食してきた文化がある。また、最近の研究では、ゾベリア・ガラクタニボランという海洋性バクテリアは、あまのり属の海藻に含まれる多糖分を分解する酵素を持っており、日本人の腸内からのみ検出されることが報告されている¹⁾。

あまのりは、アマノリ属 (genus *Pyropia*) に分類される紅藻類であり、その代表例にスサビノリが挙げられる。あまのりが原料である主な市販品には、焼き海苔、味付け海苔及び韓国海苔がある。一方、あおのりは、アオノリ属 (genus *Enteromorpha*) に分類される緑藻類であったが、近年、分類変更され、アオサ属 (genus *Ulva*) に統合された^{2),3)}。アオノリ属の輸入割当 (Import Quota, 以下 IQ) には、スジアオノリ、ヒラアオノリ、ボウアオノリ及びウスバアオノリなどが含まれる。あおのりは、主に味噌汁の具やゆかりかけに使われている。関税率表において、食用のあまのりは、同表第 1212.21 号-2、食用のあおのりは、同表第 1212.21 号-3 と分類が異なる。また、両藻類は、いずれも IQ 品目であり、輸入貿易管理令において個別に数量が管理されているため、両藻類の識別は重要である。

あまのりは、輸入品、国産品に拘らず、ほとんどが摘採後、火入れ (乾燥) 等の処理を施してあり⁴⁾、形態学的特徴の一つである外観の紅い色彩が生の状態と比べ深緑色に色落ちしている。ま

た、通常、原形ではなく裁断されている。このようなあまのりの製品は、あおのりの製品と外観が類似しているため、お互いの識別は困難である。また、経済産業省が発表した平成 27 年度のあまのりの輸入割当限度数量は、112 億 4 千万枚 (1 枚 3 g として換算した場合、約 33720 メトリック・トン) である。一方、あおのりは 130 メトリック・トンであり、あまのりの割当限度数量が、あおのりよりもはるかに多い。従って、今後、輸入割当限度数量が少ないあおのりを輸入割当限度数量が多いあまのりと偽って申告する虞があると考えられる。

分析依頼された試料について、形態学的特徴に基づく識別が困難な場合、生物の遺伝情報伝達分析である DNA の塩基配列の違いに着目した DNA 分析が非常に有効である。現状、アマノリ属とアオノリ属の識別に関する分析は、関税中央分析所等で、DNA シーケンサーを用いて、直接塩基配列決定法で行っているが、この分析には高価な分析機器と試薬が必要とされる他、煩雑な前処理を要する。

本研究では、各税関分析室において、あまのり及びあおのりの判別を行えるように、各関に配備されているサーマルサイクラーと電気泳動装置を活用した DNA 分析法の開発を試みたので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

試料 アマノリ属 4 種類 (国産品)、アオノリ属 1 種類 (国産品)

試料の詳細について Table 1 に示す。各試料の種名については、包装容器の外装に標記されたものを記載した。

* 財務省関税中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 Seaweed samples analyzed in this study

Sample name	Conditions
<i>Pyropia yezoensis</i>	Dried, commercial product
<i>Pyropia haitanensis</i>	Dried, commercial product
<i>Pyropia tenera</i>	Baked, commercial product
<i>Pyropia tenuipedalis</i>	Dried, commercial product
<i>Ulva linza</i>	Dried, commercial product

2.2 試 薬

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド [CTAB]

(和光純薬工業社製)

塩化ナトリウム, クロロホルム, イソアミルアルコール,

β -メルカプトエタノール, イソプロピルアルコール,

エタノール (特級 和光純薬工業社製)

1 M Tris-HCl (pH8.0), 0.5 M EDTA (pH8.0), TE (pH8.0)

(遺伝子工学研究用 和光純薬工業社製)

ジメチルスルホキシド, 臭化エチジウム

(生化学用 和光純薬工業社製)

プロテナーゼ K, TaKaRa Ex Taq®, Agarose (LO3), 100 bp DNA

Ladder (タカラバイオ社製)

DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN 社製)

PCR 産物精製キット: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

purification by centrifugation (Promega 社製)

シーケンス試薬: ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle

Sequencing Kits (Applied Biosystems)

2.3 装 置

PCR 増幅装置: Veriti 96well Thermal cycler (Applied Biosystems)

電気泳動装置: MUPID ミニゲル槽 (ADVANTEC)

画像解析装置: BIO-PROFILE Systems2 (VILBER LOURMAT)

DNA シーケンサー: 3500 XL Genetic Analyzer (Applied

Biosystems)

2.4 実 験

2.4.1 DNA 抽出方法の検討

試料 (アマノリ属 4 種) を細断後, 滅菌水で洗浄し, およそ 1 mm 角に分離した後, 減圧乾燥させた. 乾燥試料片 (1 片) を液体窒素で凍結させてからペッスルで粉碎し, その全量を DNeasy® Plant Mini Kit を用いた方法 (以下抽出キット法) 及び CTAB 法のそれれによる DNA 抽出に使用した.

抽出キット法による DNA 抽出は, 添付のプロトコルに従い, DNA 溶液の最終容量が 160 μ L になるようにした.

CTAB 法による抽出は, まず粉碎試料片に 3%-CTAB Buffer 700 μ L に対して β -メルカプトエタノール 7 μ L とプロテナーゼ K 3.5 μ L を加えて混ぜたもの 700 μ L を加え, 55 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした. その溶液に等量のクロロホルム・イソアミルアルコール液を加えて転倒攪拌し, 遠心分離によりタンパク質等の夾雑物

と DNA を分離後, イソプロピルアルコール沈殿により DNA を得た. この DNA を 70%エタノールで洗浄し, 更に乾燥させた後, TE Buffer に溶かした. DNA 溶液の最終容量は 50 μ L とした.

各抽出方法で得られた DNA 抽出液について, 260 nm における吸光度 (A_{260}) を測定し, それに 50 を乗じることで DNA の濃度 (ng/ μ L) を算出し, DNA 収量を求めた. また, DNA 抽出液の純度は, 波長 280 nm と 260 nm の吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) 及び波長 230 nm と 260 nm の吸光度の比 (A_{230}/A_{260}) より評価した. DNA の収量及び純度の確認は, 3 点並行で行い, その平均値を用いた (5, 6).

あおりの試料 (1 種類) からの DNA 抽出は, あまのりの試料からの DNA 抽出で最も良い結果を示した方法を採用した.

2.4.2 あまのり特異的プライマーの設計

アマノリ属の窒素欠乏による色落ちを誘引する遺伝子の探索を目的として, *Ycf18* 遺伝子及びその近傍の遺伝子を研究対象にした報告がされている⁷⁾. 本研究では, *Ycf18* 遺伝子及びその近傍をあまのりに特異的な遺伝子領域と考え, これらのアマノリ属に特異的と考えられる領域の一部を PCR 増幅し, 検出することで, アマノリ属とアオノリ属を識別可能かどうか検証するため, DDBJ (DNA Date Bank of Japan) に登録されているスサビノリの葉緑体 DNA 全ゲノムのデータを基に, *Ycf18* 遺伝子及びその近傍に複数の新規プライマーを設計した. プライマーの設計箇所について Fig.1 に示す.

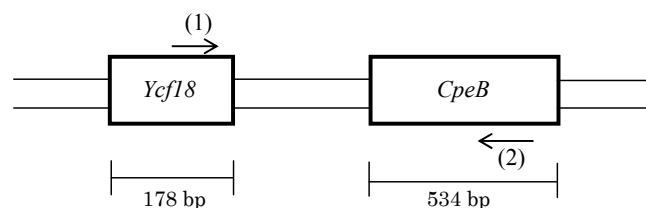


Fig.1 Schematic presentation showing the locations of *Ycf18* gene and *CpeB* gene in chloroplast DNA of *Pyropia yezoensis*.

The arrows indicate the locations and directions of the designed primers.

(1) Forward primers

(2) Reverse primers

2.4.3 PCR 法による *Ycf18* 遺伝子及びその近傍の増幅, 並びに PCR 産物の塩基配列の決定

各試料から抽出した DNA について, 葉緑体 DNA 上の *Ycf18* 遺伝子及びその近傍 (*CpeB* 遺伝子領域を含む) を *TaKaRa Ex Taq*® を用いて PCR 法で増幅した. PCR の反応溶液は, DNA 抽出液 (約 50–100 ng) 1 μ L, 10 \times Ex Taq buffer 3.0 μ L, dNTP mixture 2.4 μ L, ジメチルスルホキシド 1.5 μ L, プライマー (20 μ M) 各 0.5 μ L, 耐熱性ポリメラーゼ 0.75 U, 滅菌水 21 μ L (合計 30 μ L に調製) とした. PCR の反応条件は, 熱変性 94 $^{\circ}$ C (3 分) を行った後, 94 $^{\circ}$ C (30 秒), 55 $^{\circ}$ C (20 秒), 72 $^{\circ}$ C (30 秒) のサイクルを 30 回繰り返した.

1.5%アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色により, 増幅した DNA 断片 (PCR 産物) の有無を確認した. 得ら

れた PCR 産物は、PCR 産物精製キットで、添付のプロトコルに従って精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits で、添付のプロトコルに従い、5' 側及び 3' 側の両方向からサイクルシーケンス反応を行った。

サイクルシーケンス反応後、エタノール沈殿法により未反応の蛍光色素を除去し、DNA シーケンサーにより、各 PCR 産物の塩基配列を決定した。

3. 結 果

3.1 DNA 抽出方法の検討結果

試料（アマノリ属 4 種類）について、2.4.1 に記載のとおり、液体窒素を用いて凍結粉砕した後、抽出キット法及び CTAB 法の 2 法で DNA 抽出を行った。各試料から得られた DNA の収量及び抽出液中の DNA の純度を Table 2 に示す。

Table 2 Yields and purities of DNAs extracted from seaweed samples by either the CTAB method or with QIAGEN DNeasy® Plant mini kit

	CTAB method			Kit method		
	Absorbance ratio		yield (ng/μL)	Absorbance ratio		yield (ng/μL)
	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀		A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	
<i>Pyropia yezoensis</i>	3.15	2.11	82.75	0.85	1.18	15.75
<i>Pyropia haitenensis</i>	2.03	2.04	65.50	0.52	1.19	11.58
<i>Pyropia tenera</i>	1.85	1.67	83.80	0.53	1.20	10.13
<i>Pyropia tenuipedalis</i>	1.86	1.94	71.47	0.53	1.20	8.82

Yield (ng/μL) = A₂₆₀ × 50 × extract volume (μL) / total volume (μL)

DNA の収量は、全ての試料（アオノリ属 1 種類は除く）において、抽出キット法よりも CTAB 法の方が約 5–9 倍高かった。抽出溶液の DNA の純度に関連して、タンパク質除去の指標となる

A₂₆₀/A₂₈₀ は、1.2–2.5 の範囲内であることが原則とされている^{5),6)}が、今回の操作では、抽出キット法で 1.1–1.2、CTAB 法で 1.6–2.1 であったことから、CTAB 法の方が純度の高い DNA 抽出液が得られたことになる。一方、A₂₆₀/A₂₃₀ は、糖などの低分子化合物由来の夾雑物の指標とされており、値が 2 未満のものは夾雑物の影響により PCR 反応が阻害されることがあると報告されている⁵⁾。A₂₆₀/A₂₃₀ は、抽出キット法では、すべての試料において 1 以下、CTAB 法では 1.8–3.1 であったことから、抽出キット法で得られた DNA 抽出液は、CTAB 法によるものに比べて、PCR 反応が糖などの夾雑物の影響により阻害される可能性が高いことが示唆された。

以上の結果から、アマノリ属試料の DNA の抽出には、抽出キット法よりも CTAB 法の方が有効であることが分かった。

3.2 あまのり特異的プライマーの選定

2.4.2 において葉緑体 DNA の *Ycf18* 遺伝子及びその近傍の保存された領域に設計した 11 組のプライマーセットから、あまのり DNA に対して特異性を有するプライマーを選定するために、あまのり及びあおのりから CTAB 法で抽出した DNA を鋳型として PCR 反応を行った。PCR 反応は、使用するプライマーの T_m 値を参考に複数の条件で実施した (data not shown)。結果として、Table 3 に示す 1 組のあまのり特異的プライマーを得た。

Table 3 Information about primers designed in this study

Primer name	Base arrangement	T _m value (°C)	Base pair
yez5 F	5'-GAGCCACTAAATCTTGAGCAG-3'	56.69	21
yez5 R	5'-GCCATCTTACGTTGGAAGC-3'	59.27	20

3.3 PCR 法をベースとしたあまのり試料の特異的検出

各試料から CTAB 法で抽出した DNA を鋳型にし、Table 3 のプライマーを用いて PCR 増幅を行い、その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離した結果を Fig.2 に示す。

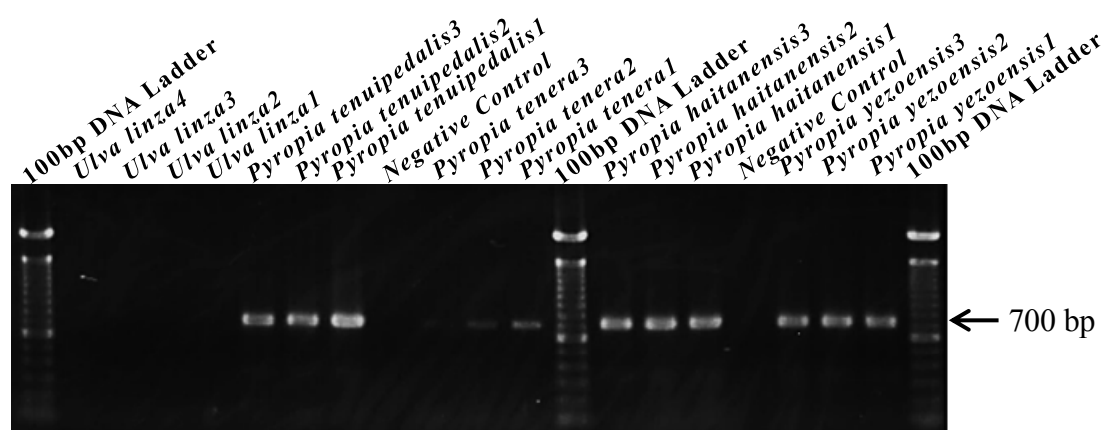


Fig.2 Electrophoresis of PCR productions amplified using *Pyropia*-specific primers designed in *Ycf18* gene and its adjacent region
A 1.5% agarose gel was used for the electrophoresis and stained with ethidium bromide.

試料のうち、アマノリ属 4 種類（スサビノリ *P. yezoensis*, ハイタンアマノリ *P. haitanensis*, アサクサノリ *P. tenera* 及びカイガラアマノリ *P. tenuipedalis*）については、いずれも約 700 bp 付近に単一のバンドを確認したが、アオノリ属 1 種類（*U. linza*）については、バンドが確認できなかった。*P. tenera*（アサクサノリ）のバンドのみ濃度が薄かった理由は、試料として用いたアサクサノリは焼き海苔であり、通常、火入れした後、100 °C 以上の高温で数時間焼いてあるため、抽出した DNA が断片化している可能性が高く、このために PCR 反応に有効なサイズの DNA 分子が不足

したのではないかと考えられる。

単一のバンドが確認できた各 PCR 産物（*P. yezoensis*, *P. haitanensis*, *P. tenera* 及び *P. tenuipedalis* 由来）について塩基配列を決定し、DDBJ に登録されているデータに対して相同性検索を行ったところ、*P. yezoensis* 及び *P. haitanensis* 由来のものについては、スサビノリの *Ycf18* 遺伝子及びその近傍の登録塩基配列（Accession No. DQ666478）と完全に一致した。また、*P. tenera* 及び *P. tenuipedalis* 由来のものについても、上記の登録塩基配列と高い相同性を示した（Fig.3）。

	<i>Ycf18</i> gene region →	
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	AAATTTACTGTCAGAAACGCTTAGAACAAATGTTGTTAAAAGATAACATTA	[50]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[50]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[50]
<i>Pyropia tenera</i>G..T.....A...A.....G.....	[50]
<i>Pyropia penuipedalis</i>G..T.....A...A.....G.....	[50]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	TTAAGTACGTAATAAAAAATTCTCAGTTTAGTCAGTAAATATTACAGATT	[100]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[100]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[100]
<i>Pyropia tenera</i>C.....	[100]
<i>Pyropia penuipedalis</i>C.....	[100]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	ATTACTTTGTTAGCTATTTATCTCGTAATATATTTTATATTGTACTTTTCG	[150]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[150]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[150]
<i>Pyropia tenera</i>T.....	[150]
<i>Pyropia penuipedalis</i>T.....	[150]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	ATACTAATACATCGGCTCGCCAATTTATTTGACAGCTGAAACAGTGAAGT	[200]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[200]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[200]
<i>Pyropia tenera</i>T..T.....C.....C.....	[200]
<i>Pyropia penuipedalis</i>T..T.....C.....C.....	[200]
	<i>CpeB</i> gene region →	
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	CCTTCATTATAATAGGGAGAGTTCAATGCTTGACGCATTTTCCAGAGTTG	[250]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[250]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[250]
<i>Pyropia tenera</i>	[250]
<i>Pyropia penuipedalis</i>	[250]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	TAGTAAATTCCGACGCTAAAGCTGCTTATGTAGGCGGTAGCGATCTACAA	[300]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[300]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[300]
<i>Pyropia tenera</i>C.....	[300]
<i>Pyropia penuipedalis</i>C.....	[300]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	GCTCTAAAAAAATTCATCGCAGATGGTAACAAACGTTTATAGATTCTGTTAA	[350]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[350]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[350]
<i>Pyropia tenera</i>T.....C.....C.....	[350]
<i>Pyropia penuipedalis</i>T.....C.....C.....	[350]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	CGCAATTGTTTCTAACGCTAGTTGTATCGTTTCTGATGCTGTTTCTGGTA	[400]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[400]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[400]
<i>Pyropia tenera</i>C..C.....	[400]
<i>Pyropia penuipedalis</i>C..C.....	[400]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	TGATCTGTGAAAAATCCTGGTCTAATTGCACCTGGTGGAAATTGTTACACT	[450]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[450]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[450]
<i>Pyropia tenera</i>C.....C.....	[450]
<i>Pyropia penuipedalis</i>C.....C.....	[450]
<i>P. yezoensis</i> (DQ666478)	AATCGTCGTATGGCTGCTTGTCTACGTGAC	[480]
<i>Pyropia yezoensis</i>	[480]
<i>Pyropia haitenensis</i>	[480]
<i>Pyropia tenera</i>C.....T.....	[480]
<i>Pyropia penuipedalis</i>C.....T.....	[480]

Fig.3 Sequence diversity of the chloroplast *Ycf18* gene and its adjacent region among *Pyropia yezoensis*, *P. haitenensis*, *P. tenera*, and *P. tenuipedalis*. “-” means nucleotide equal to that of the reference sequence (Accession no. DQ666478)

4. 考 察

今回設計したプライマーは、アマノリ属の試料（DNA）を特異的に認識し、PCR 反応で約 700 bp の DNA 断片が増幅するが、アオノリ属の試料からは DNA 断片が増幅されないため、PCR 増幅と電気泳動によるバンド検出から、アマノリ属とアオノリ属の製品を識別できる可能性が示唆された。

本来は、得られた各 PCR 産物について塩基配列を解読し、DDBJ の登録データを活用した相同性検索等により、間違いなく当該種の目的領域（*Ycf18* 遺伝子及びその近傍）が増幅されているか確認するところであるが、この論文の作成時点において、当該遺伝子領域の塩基配列の登録・公開データが充実しておらず、*P. tenuipedalis*（カイガラアマノリ）に至っては何ら登録データが存在していなかった。しかしながら、今回使用した試料 4 種についての PCR 産物の塩基配列が、スサビノリの *Ycf18* 遺伝子及びその近傍領域として登録された塩基配列（Accession No. DQ666478）と完全一致又は極めて類似していることは、予定されていた領域が PCR で正しく増幅されたことを示唆するものと考えられる。

本研究では、市販品のアマノリ属 4 種類、アオノリ属 1 種類のみを対象とした限定的な検討に留まっており、今後は、アマノリ属やアオノリ属の種を充実させると共に、輸入品の海苔製品を検体として加え、今回設計したプライマーでアマノリ属の試料のみを特異的に増幅することが可能かどうかを確認し、その有効性の検証を行う必要があると考えられる。また、現状では、PCR 後に電気泳動でバンドが検出されなかった場合、アマノリ属のりではないのか、それとも PCR 反応がうまくいかなかったのか判断できない。このため、例えば、アマノリ属及びアオノリ属の両方に有効な共通プライマーを開発し、本研究で開発したプライマーと

組み合わせたデュプレックス PCR に発展させる等、PCR 反応の成否を判定するための内部コントロールを組み込んだ検出系に改善する必要がある。

今回の研究では、アマノリ属の試料のみに特異性を有するプライマーを *Ycf18* 遺伝子及びその近傍領域に作成したが、*CpeB* 遺伝子領域や *CpeA* 遺伝子領域⁷⁾などの遺伝子領域もアマノリ属特異的プライマーを追加開発する際の有力な候補として検討する余地がある。

本研究で開発した PCR をベースとした分析法を発展させることにより、将来的に、アマノリ属の分析において、従来の DNA シーケンサーを用いた分析を行う必要がなくなり、試薬等のコストが削減できると共に、各税関分析室において迅速かつ簡易的な DNA 分析が可能になると考えられる。

5. 要 約

海藻類の適切な関税分類を確保するために、DNA 分析により、アマノリ属のものとアオノリ属のものの識別方法を検討した。DNA 抽出法については、抽出キット法及び CTAB 法を検討し、CTAB 法の方が、収率がよいことを確認した。

代表的なアマノリ属であるスサビノリの葉緑体 DNA 内に存在する *Ycf18* 遺伝子領域（178 bp）及びその近傍の *CpeB* 遺伝子領域（534 bp）の保存領域に新たに設計したプライマーを用いて、市販品のあまのり及びあおのりの各試料から抽出した DNA の *Ycf18* 遺伝子近傍領域を PCR にて部分的に増幅後、電気泳動で増幅の有無を確認した結果、アマノリ属の試料のみにバンドが確認されたことから、アマノリ属とアオノリ属の識別可能性が示唆された。

文 献

- 1) Jan-Hendrik Hehemann, Gaëlle Correc, Tristan Barbeyron, William Helbert, Mirjam Czjzek and Gurvan Michel :*Nature*, **464**, 908 (2010).
- 2) 甲田政則, 渥美貴博, 山上薫, 富田健次, 鳥田智 : 関税中央分析所報, **45**, 11 (2005).
- 3) 平岡雅規, 鳥田智 : “四十万川の特産品スジアオノリの生物学, 海洋と生物”, **155**, 508 (2004).
- 4) 澤田桂子, 井口潤, 浪越充司 : 食品関係等調査研究報告書, **38**, 16 (2014).
- 5) 新家薫子, 清水隆二, 芹川俊彦, 安田和弘, 竹田正美, 大西道代 : 石川県保健センター研究報告書, **48**, 42 (2011).
- 6) 杉島紋子, 大田朋楓, 中山清貴 : 関税中央分析所報, **54**, 19 (2014).
- 7) Tomohiro KAWAKAMI, Kazuaki SAKAGUCHI, Katsuaki TAKECHI, Hiroyoshi TAKANO and Susumu TAKIO :*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**,740(2009).