

アオノリ属の識別

小倉 郁史*, 山上 薫*, 富田 健次*, 喜田 智**

Identification of *Enteromorpha*

Takashi OGURA*, Kaoru YAMAKAMI*, Kenji TOMITA* and Satoshi SHIMADA**

*Yokohama Customs Laboratory

2-1-10, Shin-urashima-cho, kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0031 Japan

**Center for Advanced Science and Technology, Hokkaido University

Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-0810 Japan

Among the algae of Ulvaceae, *Enteromorpha* is an import quota (IQ) item whereas the remaining *Ulva* is not. Therefore, the identification of *Enteromorpha* is important. To judge whether algae was *Enteromorpha* or not, morphological observation by a microscope was carried out, but it was not easy to discriminate a large number of samples. Therefore, molecular phylogenetic analysis by using DNA sequences was performed. The results showed that identification by comparing with DNA sequence data would be possible.

1. 緒 言

関税率表 1212.20 - 1 - (3) に分類されるアオサ科の海藻は、アオノリ属とアオサ属からなり、その多くは粉状に加工され、商品名「青海苔」として食用に供されている。このうち、アオノリ属については輸入割当 (IQ) 該当品目であり、アオサ属はIQ非該当品目であることから、アオノリ属の識別は重要である。

海藻類の識別法には、主に外形、体の断面及び表面細胞の観察を行う形態学的な方法がある。これまで税関では、海藻の種属を主にこの方法により同定している。

アオノリ属は一般に外形が管状であり、体の断面は内部が中空で1層の細胞が並ぶ。一方、アオサ属は一般に外形が膜状であり、体の断面は2層の細胞が並ぶ¹⁾。また、アオノリ属は成長方向が一方向のために表面細胞は規則的に並び、一方、アオサ属は成長方向が無秩序のために表面細胞が不規則に並ぶ傾向にあるとされている (Fig.1)。例外として、アオノリ属のウスバアオノリ (*Enteromorpha linza*) のように、外形、体の断面及び表面細胞の並びも両属の中間形を持つ種も存在している (Fig.2)。また、同種であっても世代によって、あるいは生息水域などの環境によって形態が異なることが報告されており²⁾、

形態学的観察だけでは識別が困難な場合がある。

近年、新たなアオサ科の種の識別法として、アオサ科のDNA塩基配列のデータベースと分析試料のDNA塩基配列を比較する分子系統学的手法が知られている²⁾。そこで本研究では、アオサ属として輸入申告された貨物について、形態学的な観察、そして分子系統学的手法を用いて種の同定を試みたので報告する。

2. 実験

2. 1 試料及び試薬

試料 アオサ属として輸入申告された1片約2 mm四方の粉状物

試薬 DNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN社製)

2. 2 装置

PCR増幅装置 Perkin-Elmer GenAmp PCR system
(Applied Biosystems社製)

DNA自動シーケンサー ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
(Applied Biosystems社製)

* 横浜税関業務部分析部門 ☎ 221-0031 横浜市神奈川区新浦島町

2-1-10

** 北海道大学先端科学技術共同研究センター

〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

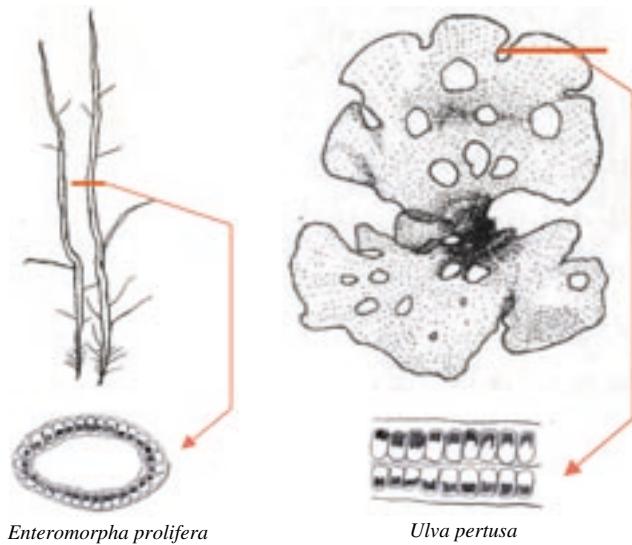


Fig.1 Figure and cross section of *Enteromorpha* and *Ulva*.

Enteromorpha prolifera and *Ulva pertusa* are standard *Enteromorpha* and *Ulva* respectively.

<全形図>出展：能登谷正弘 編著 「アオサの利用と環境修復（改訂版）」成山堂書店 2001年
<断面図, 棒線及び矢印>筆者による

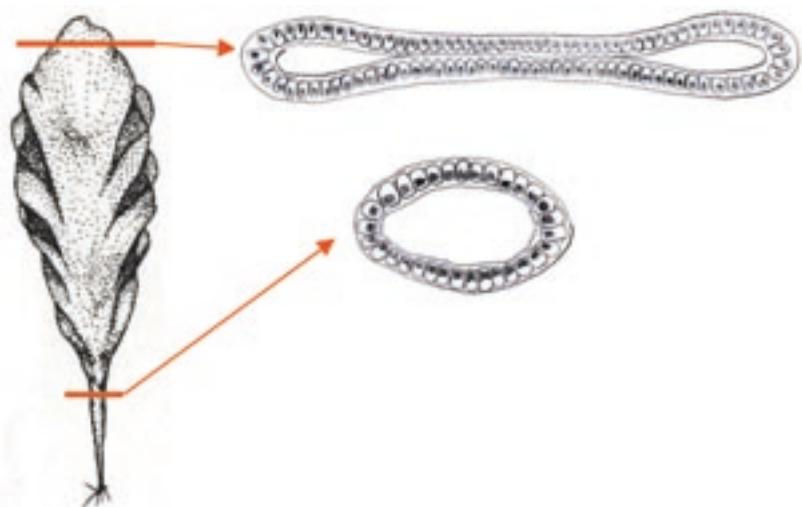


Fig.2 Figure and cross section of *Enteromorpha linza*.

<全形図>出展：能登谷正弘 編著 「アオサの利用と環境修復（改訂版）」成山堂書店 2001年
<断面図, 棒線及び矢印>筆者による

2. 3 方法

2. 3. 1 形態学的観察³⁾

試料の体の断面及び表面における細胞配列を顕微鏡により観察した。断面を観察する際は、水に浸して膨潤させた試料を剃刀ですばやく切り刻み、微細に切断したものを観察した。

2. 3. 2 DNA分析による分子系統解析⁴⁾

(1) サンプリングとDNA抽出

試料を水に浸して1片ずつに分離し、その中から任意に選んだ1片を減圧乾燥し、少量の液体窒素で凍結させ、碎いたものを1検体とした。各検体についてDNeasy Plant Mini Kit を用いてDNAを抽出した。

(2) PCR法による目的領域の増幅

アオサ科の種を識別する核コードのITS2領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。プライマーの塩基配列は、ITS3 (5'-CTCTCAACAACGGATATCT-3') -ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') である。PCRの反応条件は94°C 45秒、50°C 45秒、68°C 60秒を35サイクルで行った。

(3) サイクルシーケンス

PCR産物を精製し、ダイターミネーター法シーケンシングキット (BIG DYE : Applied Biosystems 社製) を用いてサイクルシーケンスを行った。反応条件は96°C 30秒、

50°C 15秒、60°C 240秒の30サイクルで行った。

(4) 塩基配列の解読と種の同定

サイクルシーケンス反応産物をDNA自動シーケンサーにより塩基配列を解読した。得られたデータに対して、PAUP 4.0 var.10を用いて最大節約法により分子系統樹を構築し、種を同定した。

3. 結果及び考察

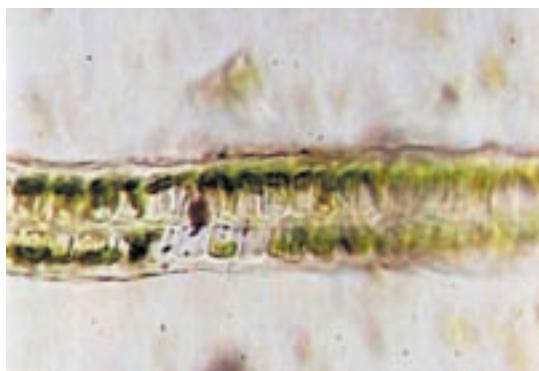
3. 1 結果

3. 1. 1 形態学的観察

試料を顕微鏡観察したところ、試料は粉状に加工されていたため、全形を確認できるものがなかった。

体の断面の細胞配列は2層のもの (Fig.3(a)(b)) と断面の縁辺が1層で中空を有するもの (Fig.3(c)(d)) が観察された。前者についてはアオサ属かアオノリ属かの同定は困難であったが、後者はウスバアオノリと認められた。

縁辺が1層で中空を有する断面は、ウスバアオノリの縁辺部のみに観察されるものであり、今回のように試料が粉状の場合、その縁辺部を確認することは確率的に非常に困難である。また、同一種であってもその生育環境によって形態が異なるという報告があることから、形態学的観察のみでのアオノリ属の識別は困難な場合があるといえる²⁾。



(a)



(b)



(c)



(d)

Fig.3 Cross section views of samples ; (a) and (b) appear to be *Ulva* or *Enteromorpha*, (c) and (d) *Enteromorpha linza*.

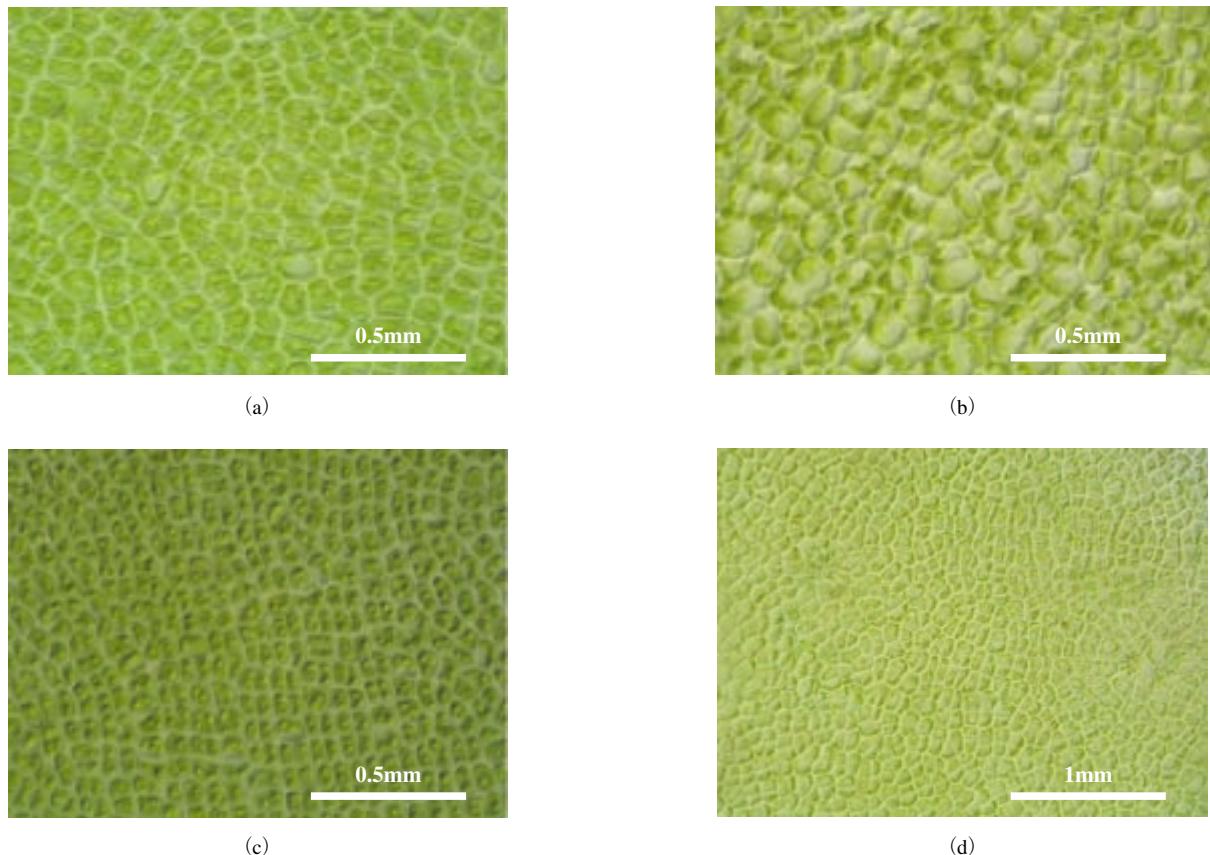


Fig.4 Plan views of sample surface. (a) and (b)*Ulva armoricana*. (c)*Ulva scandinavica*. (d)*Enteromorpha linza*.

試料表面の細胞配列は、規則的に並んでいる部分と不規則に並んでいる部分が混在しているものがあり、表面の細胞配列による属の識別は困難であった (Fig.4)。

3. 1. 2 分子系統解析

試料から任意に選んだ13検体について、核にコードされたITS2領域の塩基配列を解読し、得られた塩基配列データと既存のアオサ科の塩基配列データから分子系統樹を構築した (Fig.5)。

試料13検体中、アオノリ属のものが4検体（未同定種：YZ012, YZ013及びYZ014, ウスバアオノリ：YZ015）、アオサ属のものが9検体（*Ulva scandinavica*：YZ005, *Ulva armoricana*：YZ001, YZ002, YZ004, YZ006, YZ008, YZ009, YZ010及びYZ011）同定された (Fig.5 青色部分) が、これまで報告²⁾されているように、アオサ属とアオノリ属は互いに混じり合っており、両属とも単系統にはなっていないことがわかる。

3. 2 考察

DNA分析による分子系統解析は、種の遺伝情報を比較するため、環境による影響が小さいという利点があり、既存のアオサ科の塩基配列データとの比較により、試料の属の同定が容易に行えた。

アオサ属とアオノリ属は、形態学的にも分子系統学的にも明

確な分類ができないため、両属をアオサ属として統合することが提案されている⁵⁾。

なお、国内産業保護という観点から、国内で食用として流通するアオノリ属4種（スジアオノリ、ボウアオノリ、ヒラアオノリ、ウスバアオノリ）の識別を考えると、それぞれの種に特異的な塩基配列を明らかにし、その領域を増幅するプライマーを設計することにより、自動シーケンサーを用いて塩基配列を解読することなく、PCR産物の電気泳動パターンにより、迅速で正確な識別が可能になると思われる。

4. 要約

アオノリ属の識別について、顕微鏡観察による形態学的観察と、DNA分析による分子系統解析を行った。その結果から、形態学的観察では識別が困難な場合があり、分子系統解析では比較的容易に識別が可能であることがわかった。

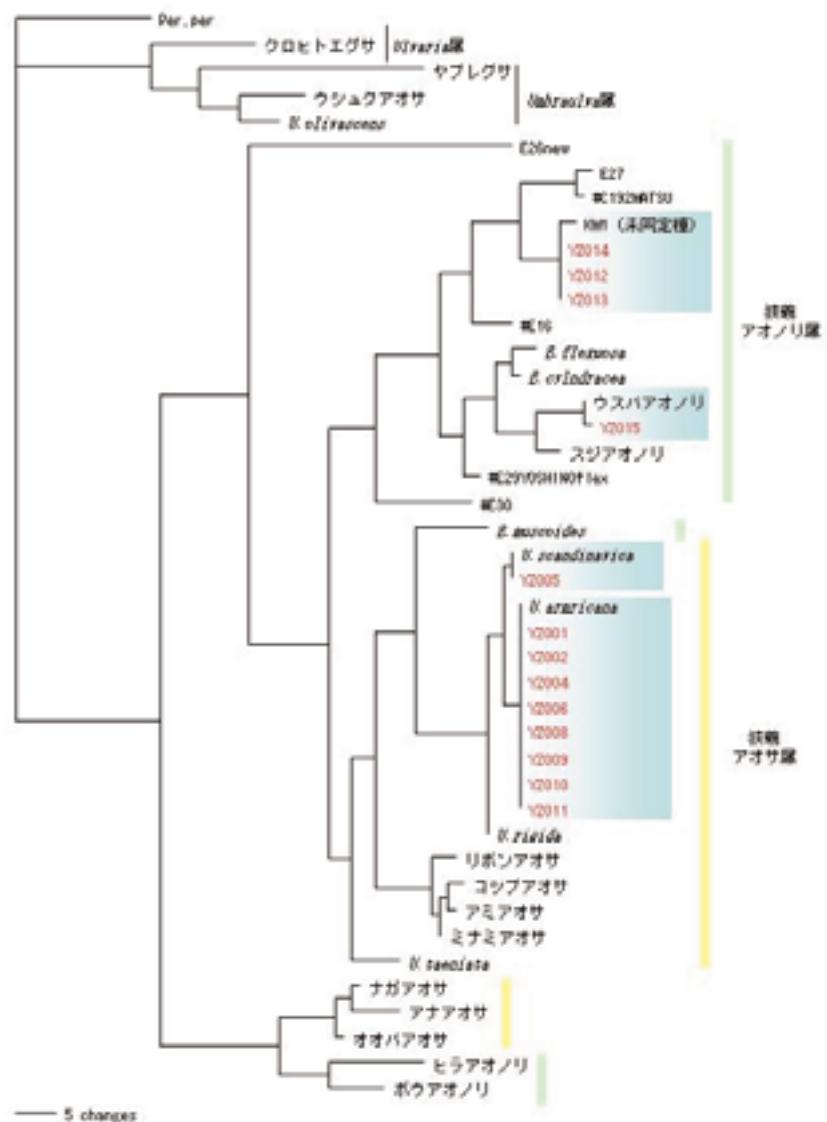


Fig.5 Maximum parsimony tree constructed from analysis of internal transcribed spacer sequences (YZ001, YZ002, YZ004-YZ006, YZ008-YZ015 : Samples of this study).

文 献

- 1) 能登谷正浩 編著：“アオサの利用と環境修復（改訂版）”,p.1 (1999) (成山堂書店)
 - 2) 能登谷正浩 編：“海藻利用への基礎研究”,p.70 (2003), (成山堂書店)
 - 3) 有賀祐勝, 井上勲, 田中次郎, 横濱康継, 吉田忠生編：“藻類学 実験・実習”,p.160 (2000) (講談社サイエンティフィック)
 - 4) Satoshi Shimada, Masanori Hiraoka, Shinichi Nabata, Masafumi Iima, Michio Masuda: *Phycological Research*, **51**,99 (2003)
 - 5) Hillari S. Hayden, Jaanika Blomster, Christine A. Maggs, Paul C. Silva, Michael J. Stanhope, J.Robert Waaland: *Eur.J.Phycol.*, **38**,277 (2003)