

アオノリ属の識別（第2報）

甲田 政則*, 渥美 貴博*, 山上 薫*, 富田健次*, 瀧田 智**

Identification of *Enteromorpha* (2nd report)

Masanori KOUDA*, Takahiro ATUMI*, 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 Creative Research Initiative "Sousei", Hokkaido University
Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-0810 Japan

Among edible seaweeds classified under Subheading 1212.20 of the Customs Tariff Schedule, *Enteromorpha* is designated as an import quota item under the Japanese Foreign Exchange Law and the Import Trade Control Order but some other genera such as *Ulva* are not. Since these two are commercially called "Aonori" and are imported as a mixture of dried flakes of both plants, it is impossible to identify their names or even the names of their genera based on their morphological differences. The authors, therefore, tried to identify them by means of a genomic (phylogenetic) approach and found a method to distinguish them accurately as reported last year. However, the method takes time to identify raw material plants, so three *Enteromorpha*-specific primers (nuclear ribosomal DNA region) were designed and PCR amplification was carried out. PCR products showed different patterns; with one band for *Enteromorpha*, and without band for *Ulva*. Using morphological observation and PCR with *Enteromorpha*-specific primers, they can be distinguished efficiently and accurately.

1. 緒 言

実行関税率表 1212.20-139 に分類されるアオノリ属の海藻は、輸入割当(IQ)該当品目である。これに対し、その代用品として使用されるアオサ属の海藻は輸入自由化品目であるが、商品名が共に「青のり」であること、輸入時の形態が主に乾燥粉末であることから、通関の現場でこれらを識別することは極めて困難である。

アオノリ属とアオサ属のそもそもの定義は、アオサ科のうち「体中空で、1層の細胞からなる」ものがアオノリ属、「体が2層の細胞からなるもの」がアオサ属¹⁾であるが、輸入時の形態が粉末であること、アオノリ属とアオサ属が混ざった貨物の存在等より、顕微鏡観察でも両者の区別は困難である場合が多い。そこで、近年急速に発展しているDNA分析の技術を用いて、

両属の識別を試みている。

昨年の報告²⁾では、核コードのITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) 領域の塩基配列を比較することで、両属の識別が可能なことを報告したが、分析にDNAシーケンサーが必要であり、全国税関に機器が配備されていないことから、迅速性を必要とされるIQ関係貨物の分析法として現時点では適当ではない。また、多検体を処理する場合、分析に時間がかかるうえ、コスト的にも問題である。

そこで今回は、アオノリ属に特異的なプライマーを用いたPCR法を用いることにより、多検体を効率的に識別する方法について検討を行ったので報告する。

なお、現在アオノリ属、アオサ属は形態学的な特長により定義されているが¹⁾、近年のDNAを用いた分子系統解析では、アオノリ属とアオサ属が分かれず、互いに交じり合うという樹形図が得られている^{3,4,5,6)}。このような研究成果により、アオノ

* 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創成科学共同研究機構

〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

リ属がアオサ属に統合され、無くなる方向にある⁷⁾

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2mm四方の細片状物(輸入貨物)。

アオノリ属3種類, アオサ属1種類

Enteromorpha linza (ウスバアオノリ)

Enteromorpha intestinalis (ボウアオノリ)

Enteromorpha compressa (ヒラアオノリ)

Ulva pertusa (アナアオサ)

試薬 DNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN 社製)

TaKaRa Ex TaqTM (タカラバイオ社製)

プライマー (タカラバイオ社 DNA 合成サービス
HQ-PCR グレード)

ジメチルスルホキシド (生化学用 和光純薬工業社製)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール

[TRIS] (生化学用 和光純薬工業社製)

酢酸 (特級 和光純薬工業社製)

AgaroseH14「TAKARA」(タカラバイオ社製)

100bp DNA ladder (タカラバイオ社製)

臭化エチジウム (生化学用 和光純薬工業社製)

2. 2 装置

サーマルサイクラー: GeneAmp[®] PCR system9700
(Applied Biosystems 社製)

2. 3 実験方法

(1) 顕微鏡観察

試料を水に浸し、断面及び表面を顕微鏡で観察する。

(2) DNAの抽出・確認

1片ずつに分離した試料を滅菌水で洗浄し、減圧乾燥する。乾燥させたものを液体窒素で冷却、破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN 社製) を用いて DNA を抽出する。

粉末状の試料1片から抽出した DNA は量が少なく、アガロースゲル電気泳動後の臭化エチジウムと、染色では確認が困難である。そこで、rRNA 遺伝子の ITS1領域における、アオノリ属、アオサ属に共通な配列に基づいて、プライマー UlvaITS1f (5'TTTGTACACACCGCCCG3'), UlvaITS1r (5'GAATTCTGCAATTCACA3')を設計し、94度で2分間加熱した後に、94度30秒、50度30秒、68度40秒の反応条件で35サイクルの PCR 反応を行い、DNA 断片が増幅されているかを確認する。

(3) アオノリ属に特異的なプライマーを用いた PCR 法によるアオノリ属の同定⁸⁾ (国立大学法人北海道大学より特許出願済み)

rRNA 遺伝子の ITS1領域と26S rRNA 遺伝子に設計したアオノリ属に特異的なプライマーを用い、94度で2分間加熱

した後に、94度30秒、50度30秒、68度40秒の反応条件で35サイクルの PCR 反応を行った。

(a)ウスバアオノリ/スジアオノリ

lin/pro (5'CGCGTGCCTCCCCCTCGGGGGCG3')

Ulva26S (5'TGATATGCTTAAGTTCAGC3')

(b)ボウアオノリ

int(5'TGGGAGGGGGTGGTGGTGTCTACG3')

Ulva26S (5'TGATATGCTTAAGTTCAGC3')

(c)ヒラアオノリ

com(5'TGAGGTGCCTCCCCGGGGGCGCGCC CCT3')

Ulva26S (5'TGATATGCTTAAGTTCAGC3')

3. 結果及び考察

3. 1 顕微鏡観察

輸入貨物の顕微鏡観察において、細胞配列が2層であることが確認できた。よって、当該貨物は、アオサ属又はウスバアオノリであろうと推定された。また、ウスバアオノリの特徴である「縁部の断面が1層で中空」を確認することができたが、細片状では、縁部部の確認に多くの時間を要し、迅速性が必要とされる IQ 貨物の分析法としては適切で無いと考えられた²⁾。

3. 2 DNAの抽出・確認

アオノリ属、アオサ属から抽出した DNA を用いて PCR 反応を行うことにより、約500bp の DNA 断片を増幅することができた(Fig1-A)また、輸入貨物から抽出した DNA を用いて PCR 反応を行い、同様に約500bp の DNA 断片を増幅することができた(Fig2-A)。従って、この方法を用いることで、試料から DNA が抽出されたか否かを確認できることが示された。

3. 3 アオノリ属に特異的なプライマーを用いた PCR 法によるアオノリ属の同定

アオノリ属に特異的なプライマーを用いてPCR反応を行うと、アオノリ属のものからは約500bp の DNA 断片が増幅されるが、アオサ属のものからは DNA 断片は増幅されなかった(Fig1-B Fig1-C Fig1-D)。従って、この方法により DNA の観点からアオノリ属とアオサ属を識別可能なことが示された。

輸入貨物10検体について、上記の条件で PCR 反応を行った結果、6検体がウスバアオノリ又はスジアオノリに陽性という結果が得られ、当該貨物はアオノリ属とアオサ属の混合物であることが分かった(Fig2-B, Fig2-C, Fig2-D)。従来の形態学的な識別と DNA 分析を併用することで、時間を要する縁部部の断面の確認作業を必要としなくなり、非常に効率的であった。また、前回報告した分子系統解析による識別法²⁾と比較しても時間、コストの面で優れていると考えられる。

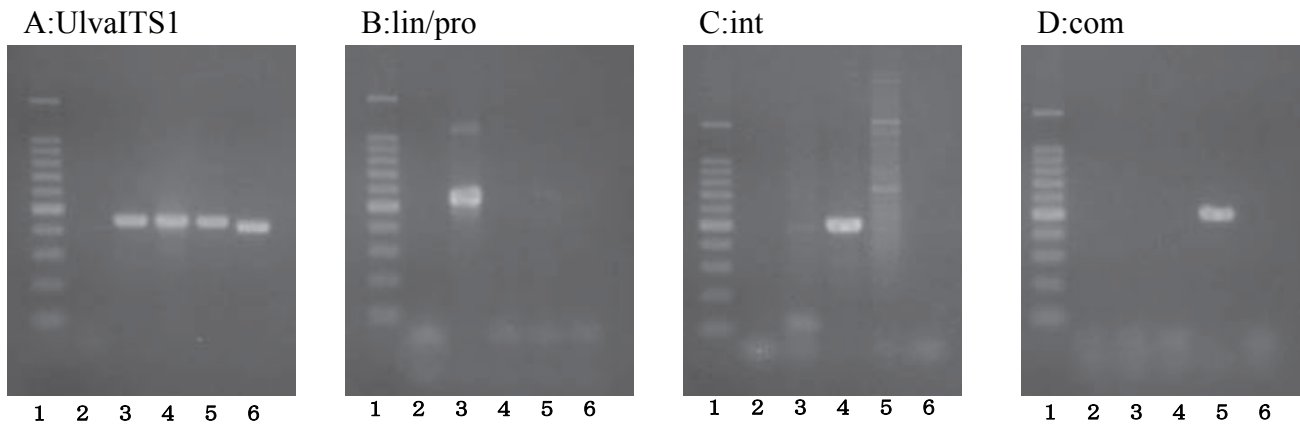


Fig1. PCR product patterns of three *Enteromorpha* species and one *Ulva* specie. (2% Agarose gel TAE buffer)

Lane1:100bp DNA ladder as a molecular weight marker. Lane2: Negative control (water)

Lane3:*Enteromorpha linza* Lane4:*Enteromorpha intestinalis* Lane5:*Enteromorpha compressa* Lane6: *Ulva pertusa*

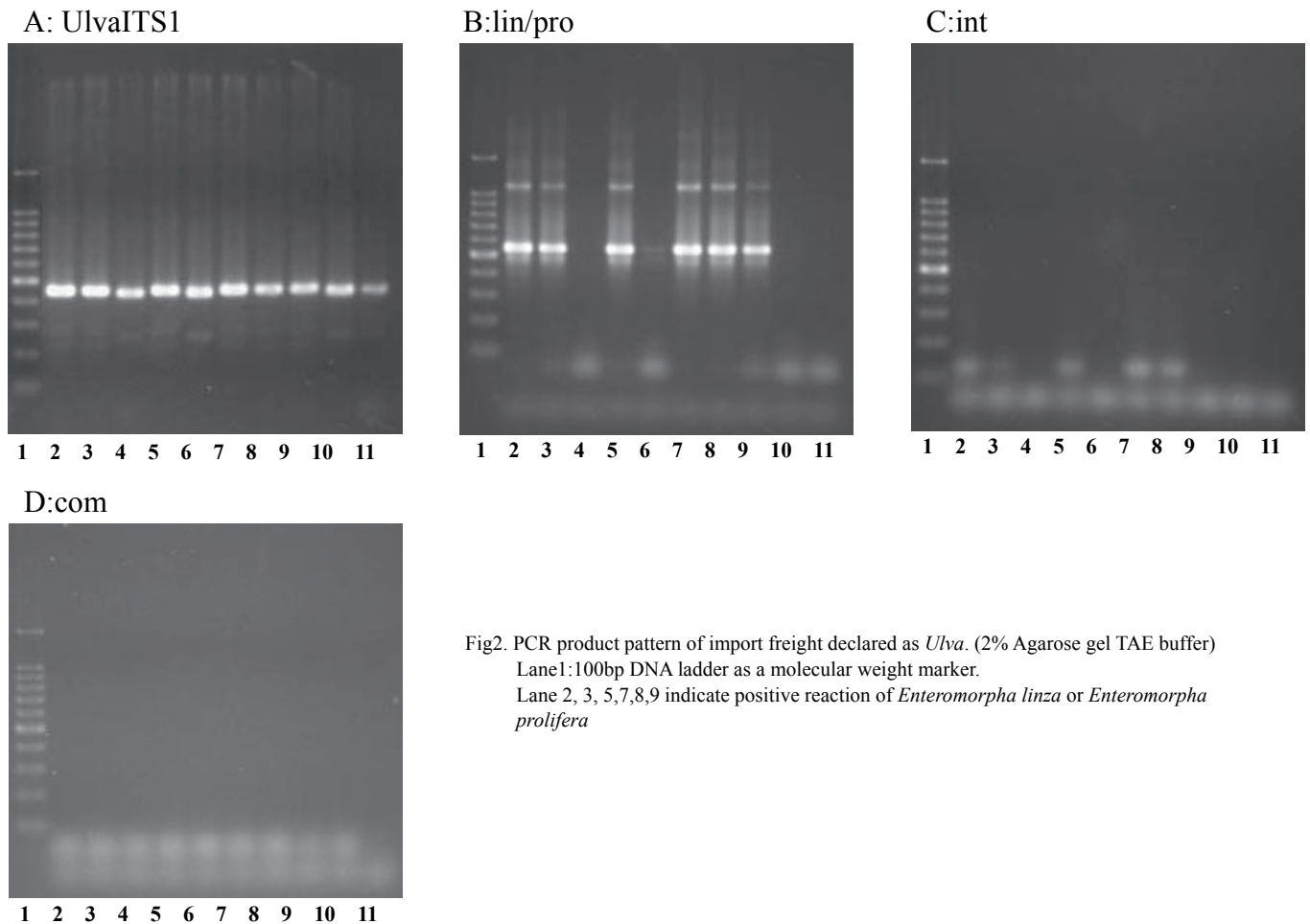


Fig2. PCR product pattern of import freight declared as *Ulva*. (2% Agarose gel TAE buffer)

Lane1:100bp DNA ladder as a molecular weight marker.

Lane 2, 3, 5, 7, 8, 9 indicate positive reaction of *Enteromorpha linza* or *Enteromorpha prolifera*

4. 要 約

従来の形態学的な識別法に加えて、アオノリ属に特異的なプライマーを用いた PCR 法を併用することで、アオノリ属とアオサ属の効率的な識別が可能であることがわかった。

文 献

- 1) 山田幸男, 瀬川宗吉: “原色日本海藻図鑑 (増補版)”, p.3 (1977), (保育社).
- 2) 小倉郁史, 山上薫, 富田健次, 鷗田智: 関税中央分析所報, **44**, 7 (2004).
- 3) Satoshi Shimada, Masanori Hiraoka, Shinichi Nabata, Masafumi Ima, Michiko Masuda: Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*: *Phycological Research*, **51**, 99 (2003).
- 4) Hayden, H.S., Blomster, J., Maggs, C.A., Silva, P.C., Stanhope, M.J. and Waaland, J.R.: Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.*, **38**, 277 (2003).
- 5) Tsai, I.H., Blomster, J., Hansen, G., Leskinen, E., Maggs, C.A., Mann, D.G., Sluiman, H.J. and Stanhope, M.J.: Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 1011 (1999).
- 6) Blomster, J., Maggs, C.A. and Stanhope, M.J.: Extensive intraspecific morphological variation in *Enteromorpha muscoides* (Chlorophyta) revealed by molecular analysis. *J. Phycol.*, **35**, 575 (1999).
- 7) 平岡雅規, 鷗田智: “四万十川の特産品スジアオノリの生物学, 海洋と生物”, **155**, 508 (2004).
- 8) 北海道大学長: 特許出願番号 2005-115522, 出願時名称「海藻の分析方法」.