

DNA を利用したコンブ類の種判別

片山 貴之*, 山盛 愛子*, 赤崎 哲也*, 朝長 洋祐*, 四ツ倉典滋**

Species Identification of *Laminariales* using DNA Method

Takayuki Katayama*, Aiko Yamamori*, Tetsuya Akasaki*, Hirosuke Tomonaga*, Norishige Yotsukura**

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan

**Muran Marine Station, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University

1-13 Bokoiminamimachi, Muroran, Hokkaido 051-0003, Japan

The genus *Laminaria* and genus *Kjellmaniella* within *Laminariales* are regulated as import quota items under Japanese domestic law. It is therefore necessary for customs officers to discriminate between regulated genera and others upon import clearance. In some cases, species identification of *Laminariales* based on morphological appearances is quite difficult, so we tried to identify species of *Laminariales* by the direct sequencing method using the ITS region of nuclear DNA and the RuBisCo-spacer region of chloroplast DNA with available DDBJ (DNA Data Bank of Japan) data. As a result, we succeeded to discriminate at the genus level whether *Laminariales* samples were regulated ones or not. To develop a rapid screening method, we also attempted to perform species identification of *Laminariales* by the PCR-RFLP (CAPS) method using the above regions. Fragment patterns of the ITS region by restriction enzyme (*Bcn* I, *Hin* I, *Fok* I, *Eco*O109 I) and of the RuBisCo-spacer region by restriction enzyme (*Alu* I, *Psh*B I, *Ssp* I, *Xsp* I) showed the possibility of species identification of *Laminariales* at the genus level.

1. 緒 言

コンブ目植物(コンブ類)には、マコンブ(*Laminaria japonica*)やワカメ(*Undaria pinnatifida*)などが含まれ、その多くは佃煮や昆布巻き、みそ汁の具、さらには出し汁用などとして、食卓には欠かせない食材として扱われている。さらに、コンブ類は高血圧の予防や治療に効果のあるラミニンを含むため、健康食品としても注目されている。その他にも、細胞間粘質多糖のアルギン酸は、繊維用の粘着剤、製紙用の光沢剤、食品や医薬品の乳化剤や安定剤などとして広く工業的に利用されている^{8,10)}。

コンブ類において、コンブ科コンブ属(family Laminariaceae, genus *Laminaria*)及びコンブ科トロロコンブ属(family Laminariaceae, genus *Kjellmaniella*)のものは、輸入貿易管理令により輸入が制限されている。このため、輸入通関に際しては属レベルでの種の確認が必要となっている。

一般に、コンブ類の種の判別は形態学的な知見により行うことが可能である。しかし、コンブ属内の種間では、形態学的特徴の相似した部分が多く、また、生育環境により形態学的特徴が変化するとされている^{6,7)}。更に、輸入品ともなると、形態学的特徴

がある部位の切除等といった加工がされ、形態学的な知見により種を判別するのは専門家でも確認し難い場合がある。

これに対して、DNA 分析では、外観や生育環境を考慮に入れる必要がなく、分子情報を直接的に数値化できることから、有用な方法と考えられる。近年、コンブ類の DNA 研究に関して、タンパク質合成にかかわる「ribosomal RNA の遺伝子 (rDNA)」や、光合成の過程で二酸化炭素を固定する「ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase を構成する大小サブユニット遺伝子 (rbcL, rbcS)」等、多くの報告がなされている^{1,2)}。更に、コンブ類の種判別については、「rDNA の転写スパーサー領域 (Internal Transcribed Spacer: ITS)」や「rbcL-rbcS 間のスパーサー領域 (RuBisCo-spacer)」の塩基配列情報を比較対照とする方法が報告されている¹⁻⁵⁾。

そこで今回、ITS 領域及び RuBisCo-spacer 領域を利用して、コンブ類の種判別に関する検討を行ったので報告する。

2. 実 験

2. 1 試 料

コンブ類の標準サンプルは、事前に形態学的な知見及び採取地から種の査証が行なわれ、北海道大学北方生物圏フィールド科学

* 財務省関税中央分析所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

** 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター室蘭臨海実験所

〒051-0003 北海道室蘭市母恋南町 1-13

Table 1 Origin of sample and sequence data used in this study

Species	Collection site	Origin or Collection data	DDBJ accession No. for ITS	DDBJ accession No. for RuBisCo-sapcer
PHAEOPHYCEAE				
Laminariales				
[Laminariaceae]				
<i>Laminaria japonica</i>	Minamikayabe, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022789-790	
— " —	Jindo, South Korea	Yoon et al.(2001)		AF318976
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2004.10.26	this study	this study
<i>L. religiosa</i>	Kumaishi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022791-792	
— " —	Otaru, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318979
— " —	Hakumura, Hokkaido, Japan	2004.10.22	this study	this study
<i>L. ochotensis</i>	Wakkanai, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022793-794	
— " —	Tomamae, Hokkaido, Japan	2002.12.16	this study	this study
<i>L. diabolica</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022795-796	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318975
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	2004.11.18	this study	this study
<i>L. longipedalis</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022797-798	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318977
— " —	Akkeshiko, Hokkaido, Japan	2004.11.18	this study	this study
<i>L. angustata</i>	Muroran, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022799-800	
— " —	—	Lane (Unpubl.sequence data)		AY851554
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2004.10.26	this study	this study
<i>L. longissima</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022801-802	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318978
<i>L. coriacea</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022803-804	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	2004.11.18	this study	this study
<i>L. cichorioides</i>	Wakkanai, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022805-806	
— " —	Wakkanai, Hokkaido, Japan	2004.10.06	this study	this study
<i>L. yendoana</i>	Muroran, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022807-808	
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2004.11.18	this study	this study
<i>L. yezoensis</i>	—	Lane (Unpubl.sequence data)		AY851555
— " —	Nemuro, Hokkaido, Japan	2004.11.17	this study	this study
<i>L. saccharina</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319019	AF318980
<i>L. digitata</i>	Dover, United Kingdom	Yoon et al.(2001)	AF319014	AF318971
<i>L. hyperborea</i>	Roscoff, France	Yoon et al.(2001)	AF319015	AF318972
<i>L. setchellii</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319016	AF318973
<i>L. sinclairii</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319017	AF318974
<i>Kjellmaniella gyrate</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022809-810	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318982
— " —	Nemuro, Hokkaido, Japan	2004.11.18	this study	this study
<i>Kj. crassifolia</i>	Kangnung, South Korea	Yoon et al.(2001)		AF318981
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2005.03.15	this study	this study
<i>Costaria costata</i>	Muroran, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022811-812	
— " —	Shinnam, South Korea	Yoon et al.(2001)		AF318988
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2005.03.15	this study	this study
<i>Agarum clathratum</i>	Muroran, Hokkaido, Japan	Sasaki et al.(2002)	AB087241	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318986
<i>Ag. turneri</i>	Kamchatka, Russia	Yoon et al.(2001)	AF319026	AF318987
<i>Ag. cribrorum</i>	Nemuro, Hokkaido, Japan	2004.11.17	this study	this study
<i>Thalassiophyllum clathrus</i>	Kamchatka, Russia	Sasaki et al.(2002)	AB087252	
— " —	Kamchatka, Russia	Yoon et al.(2001)		AF318989
<i>Arthrothamnus bifidus</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)		AF318984
— " —	Nemuro, Hokkaido, Japan	2004.11.17	this study	this study
<i>Hedophyllum sessile</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319024	AF318985
<i>Eckloniopsis radicata</i>	Kochi, Japan	Yoon et al.(2001)	AF319011	AF318969
<i>Cymathoe japonica</i>	Rausu, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)	AF319022	AF318983
[Alariaceae]				
<i>Alaria esculenta</i>	—	Yoon et al.(2001)	AF319002	
— " —	Nova Scotia, Canada	Yoon et al.(1999)		AF318958
<i>Al. praelonga</i>	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022813-814	
— " —	Akkeshi, Hokkaido, Japan	Yoon et al.(1999)		AF318960
— " —	Nemuro, Hokkaido, Japan	2004.11.17	this study	this study
<i>Al. crassifolia</i>	Hokkaido, Japan	Yoon et al.(2001)	AF319001	AF318957
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2005.03.15	this study	this study
<i>Al. marginata</i>	Kamchatka, Russia	Sasaki et al.(2002)	AB087237	
— " —	Hokkaido, Japan	Yoon et al.(1999)		AF318959
<i>Undaria pinnatifida</i>	Cheju, South Korea	Yoon et al.(2001)	AF319007	
— " —	Muroran, Hokkaido, Japan	2005.03.15	this study	this study
<i>Un. peterseniana</i>	Cheju, South Korea	Yoon et al.(1999)	AF319006	AF318961
<i>Un. undarioides</i>	Japan	Sasaki et al.(2002)	AB087240	
— " —	Wakayama, Japan	Yoon et al.(1999)		AF318962
<i>Ecklonia cava</i>	Chuksan, South Korea	Yoon et al.(2001)	AF319009	AF318967
<i>Ecklonia stolonifera</i>	Eupchon, South Korea	Yoon et al.(2001)	AF319010	AF318968
<i>Egregia menziesii</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319013	AF318970
<i>Eisenia bicyclis</i>	Ulreungdo, South Korea	Yoon et al.(1999)	AF319012	AF318963
<i>Pterygophora californica</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319005	AF318965
[Chordaceae]				
<i>Chorda filum</i>	Kamiiso, Hokkaido, Japan	Yotsukura et al.(1999)	AB022814-815	
— " —	Taeon, South Korea	Yoon et al.(1999)		AF318964
[Lessoniaceae]				
<i>Macrocystis pyrifera</i>	California, USA	Yoon et al.(2001)	AF319037	AF318998
<i>Ma. integrifolia</i>	California, USA	Yoon et al.(2001)	AF319036	AF318997
<i>Pelagophycus porra</i>	California, USA	Yoon et al.(2001)	AF319039	AF319000
<i>Lessonia flavicans</i>	Tierra del Fuego, Argentina	Yoon et al.(2001)	AF319031	AF318992
<i>Le. trabeculata</i>	Ilo, Peru	Yoon et al.(2001)	AF319030	AF318991
<i>Le. vadosa</i>	Chubut, Argentina	Yoon et al.(2001)	AF319032	AF318993
<i>Postelsia palmaeformis</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319034	AF318995
<i>Nereocystis luetkeana</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319033	AF318994
<i>Dictyonium californicum</i>	Carmel Bay, USA	Yoon et al.(2001)	AF319029	AF318990
<i>Lessoniopsis littoralis</i>	Oregon, USA	Yoon et al.(2001)	AF319035	AF318996

センターから提供されたものである。また、標準コンブ種の塩基配列データは、主に DDBJ (DNA Data Bank of Japan) よりダウンロードしたものである。各々の詳細については、Table 1 に示す。

2. 2 装置

- DNA 増幅装置 : GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 製)
- 塩基配列解析装置 : 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 製)
- 画像解析装置 : BIO-PROFILE System2 (VILBER LOURMAT 製)
- 電気泳動装置 : ミニサブマリン電気泳動装置 (Bio Craft 製)

2. 3 実験

コンブ類からの DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により行った後、精製を GENE CLEAN II Kit (BIO 101) により行った。抽出・精製後は一部を TE Buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) により 10 倍希釈した。

ITS 領域は、核 DNA の 18S-5.8S-25S rDNA におけるスペーサー領域であり、ITS1 及び ITS2 からなっている (Fig.1)。また、RuBisCo-spacer 領域は、葉緑体 DNA の rbcL-rbcS 間のスペーサー領域である (Fig.2)。PCR 反応に使用したプライマーは、コンブ目に属する種についての DDBJ データを参照して、ITS 領域及び RuBisCo-spacer 領域を増幅可能なものを作成した (Table 2)。ITS 領域は、18S-F-25S-R のプライマーペアで PCR を行い、RuBisCo-spacer 領域は、rbcL-F-rbcS-R のプライマーペアで PCR を行った。PCR 反応溶液は、鋳型 DNA : 2~10ng、プライマー : 各 10pmol、dNTP mixture (25mM each) : 2.4μl、Ex-Taq buffer : 3.0μl、Ex-Taq (ITS 領域)、Ex-Taq-HS (RuBisCo-spacer 領域) : 1.0 Unit、滅菌水 : (合計 30μl に調整) とした。PCR 反応条件は、94℃ : 5 分を行なった後、denature (94℃、30 秒)、annealing (ITS 領域 : 55℃、RuBisCo-spacer 領域 : 64℃、1 分)、extension (72℃、1 分) を 35 回繰り返す、Final extension を 72℃、10 分行うように設定した。PCR 産物は、アガロース電気泳動により確認を行った。

シーケンス反応は、PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、BigDye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 添付のプロトコールに従い、Table.2 記載のプライマーを用いて、5'側及び 3'側の両方向分の反応を行った。反応後、エタノール沈殿により未反応色素を除去し、塩基配列解析装置により両方向から PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データを用いて相互比較によりアライメントした後、近隣結合法により分子系統解析を行った。

制限酵素反応は、ITS 領域及び RuBisCo-spacer 領域の PCR 産物を用いて行った。制限酵素は、ITS 領域では *Bcn* I (*Cau* II)、*Hin* I (*Acy* I、*Bbi* II)、*Fok* I、*Eco*O109 I (*Dra* II) を用い、RuBisCo-spacer 領域では *Alu* I、*Psh* B I (*Vsp* I)、*Ssp* I、*Xsp* I (*Bfa* I、*Mae* I) を用いた。PCR 産物を制限酵素に添付のプロトコールに従い処理した後、アガロース電気泳動を行い、切断片長多型を調べた。



Fig. 1 Gene order and locations of primers in the 18S - 25S region (nuclear DNA) from *Laminaria japonica*. ITS1 and ITS2 are located between 18S and 5.8S and between 5.8S and 25S, respectively.



Fig. 2 RuBisCo-spacer and locations of primers in rbc genes (L, S; chloroplast DNA) from *Laminaria japonica*.

Table 2 List of primers used in this study

Code	Direction	Sequences (from 5' to 3')
18S-F	Forward	GTGGGAAGTTATCTAAACCTC
5.8S-R	Reverse	ATGCGTTCAAAGTTTGTATG
5.8S-F	Forward	ACGCAGCGAAATGCGATAC
25S-R	Reverse	GGTAGTTTCTTTTCCTCCGCT
rbcL-F	Forward	ACTATTGGTCACCCTGATG
rbcS-R	Reverse	GGAAGACCCCATTAATCCCC

3. 結果及び考察

3. 1 分子系統解析

コンブ類の一部の種において、各領域を PCR 法により増幅した生成物は、ITS 領域 : 約 800bp (Fig.3)、RuBisCo-spacer 領域 : 約 700bp であった (Fig.4)。各 PCR 産物における ITS 領域および RuBisCo-spacer 領域の部分抽出した塩基配列に DDBJ に登録されていたコンブ類の塩基配列データを加え、分子系統解析を行なった。ITS 領域、RuBisCo-spacer 領域及びそれらを結合したものの分子系統樹を Fig.5~7 に示す。

分子系統解析の結果、コンブ属 (genus *Laminaria*) およびトロロコンブ属 (genus *Kjellmaniella*) 等いくつかの属は、単一のクラスターを形成しないが、それぞれの属は他属から独立してクラスターを形成した。Yotsukura ら他¹⁻⁴⁾が構築した分子系統樹におい

ても、コンブ属等は他属から独立してクラスターを形成していることから、今回構築した分子系統樹は彼らのものと遜色のない結果が得られ、コンブ類の属レベルでの判別は可能と考えられる。しかし、マコンブ (*L.japonica*)、オニコンブ (*L.diabolica*)、ホソメコンブ (*L.relignosa*)、リシリコンブ (*L.ochotensis*)、エナガコンブ (*L.longipedalis*) の5種は外部形態、内部構造および分布域等から互いに極めて近縁と考えられており⁶⁾、ITS領域及びRuBisCo-spacer領域の塩基配列においてもほとんど違いが見られないため、これら5種の種レベルでの判別は困難である。同様に、ミツイシコンブ (*L.angustata*) とナガコンブ (*L.longissima*) の2種、チヂミコンブ (*L.cichorioides*)、ガツカラコンブ (*L.coricea*)、エンドウコンブ (*L.yendoana*)、カラフトコンブ (*L.saccharina*) の4種も極めて近縁のためこれら種間での判別は困難である。

以上のことから、ITS領域及びRuBisCo-spacer領域を利用した分子系統解析において、コンブ類の種レベルでの判別は困難なものがあるものの、属レベルの判別は可能と考えられる。

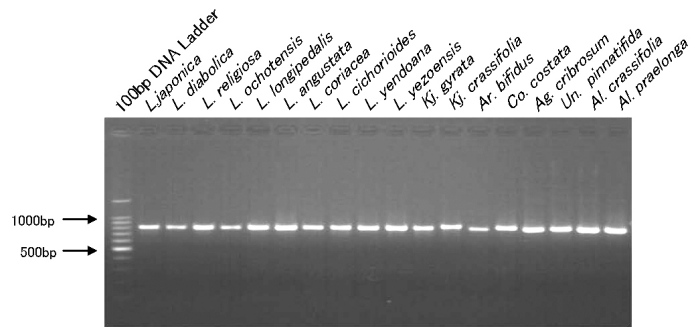


Fig. 3 PCR products of 18 species belonging to the family Laminariaceae, using primer pair 18S-F and 25S-R (ITS regions). Electrophoresis was performed on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

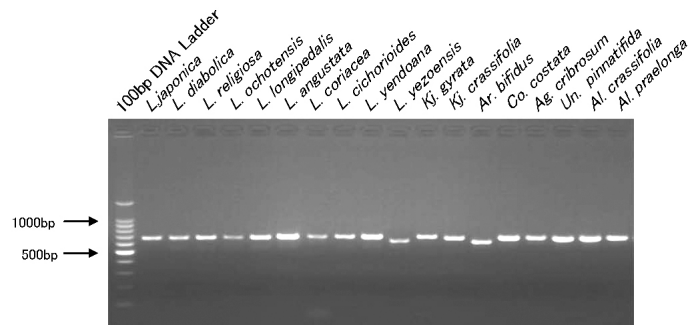


Fig. 4 PCR products of 18 species belonging to the family Laminariaceae, using primer pair rbcL-F and rbcS-R (RuBisCo-spacer regions). Electrophoresis was performed on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

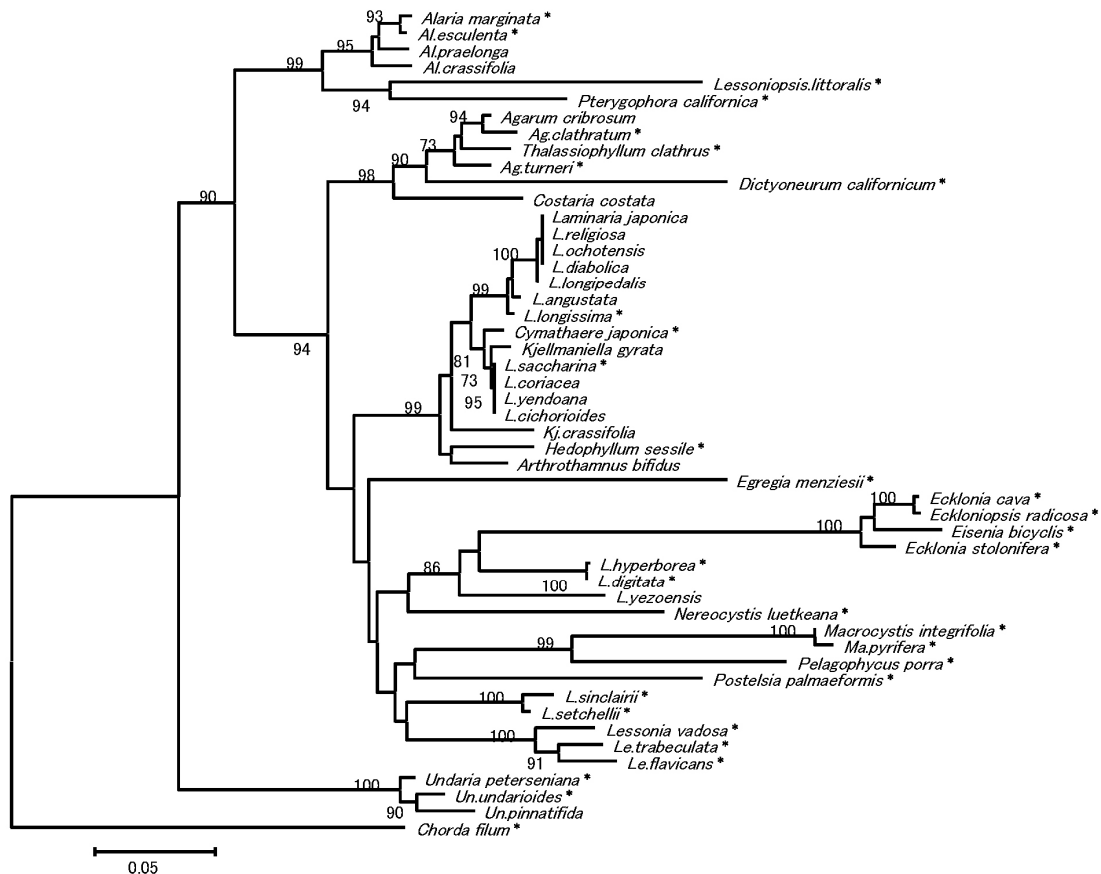


Fig. 5 Phylogenetic trees constructed using ITS sequences of Laminariaceae species. Bootstrapping was run with 1,000 replicates and values over 70% were shown at the nodes. Each asterisk indicates a sequence that was downloaded from GeneBank (see Table 1).

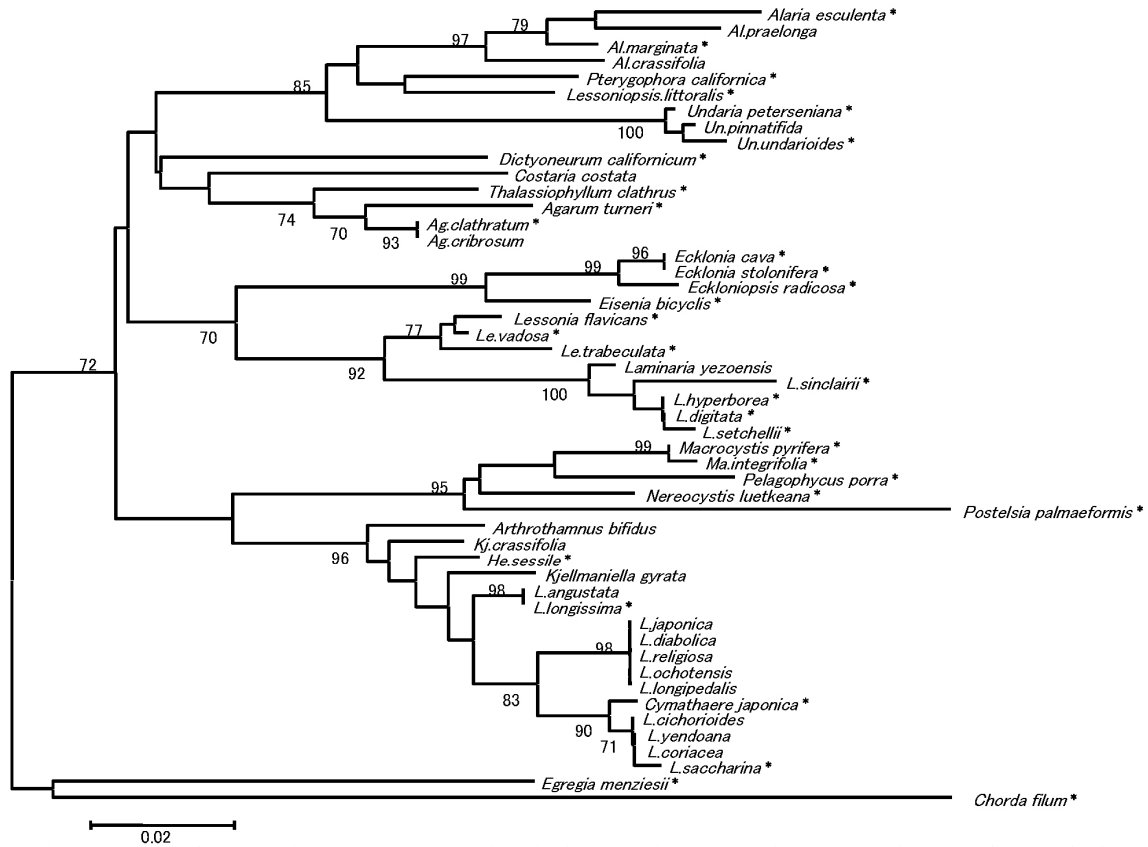


Fig. 6 Phylogenetic trees constructed using RuBisCo-spacer sequences of Laminariaceae species. Bootstrapping was run with 1,000 replicates and values over 70% were shown at the nodes. Each asterisk indicates a sequence that was downloaded from GeneBank (see Table 1).

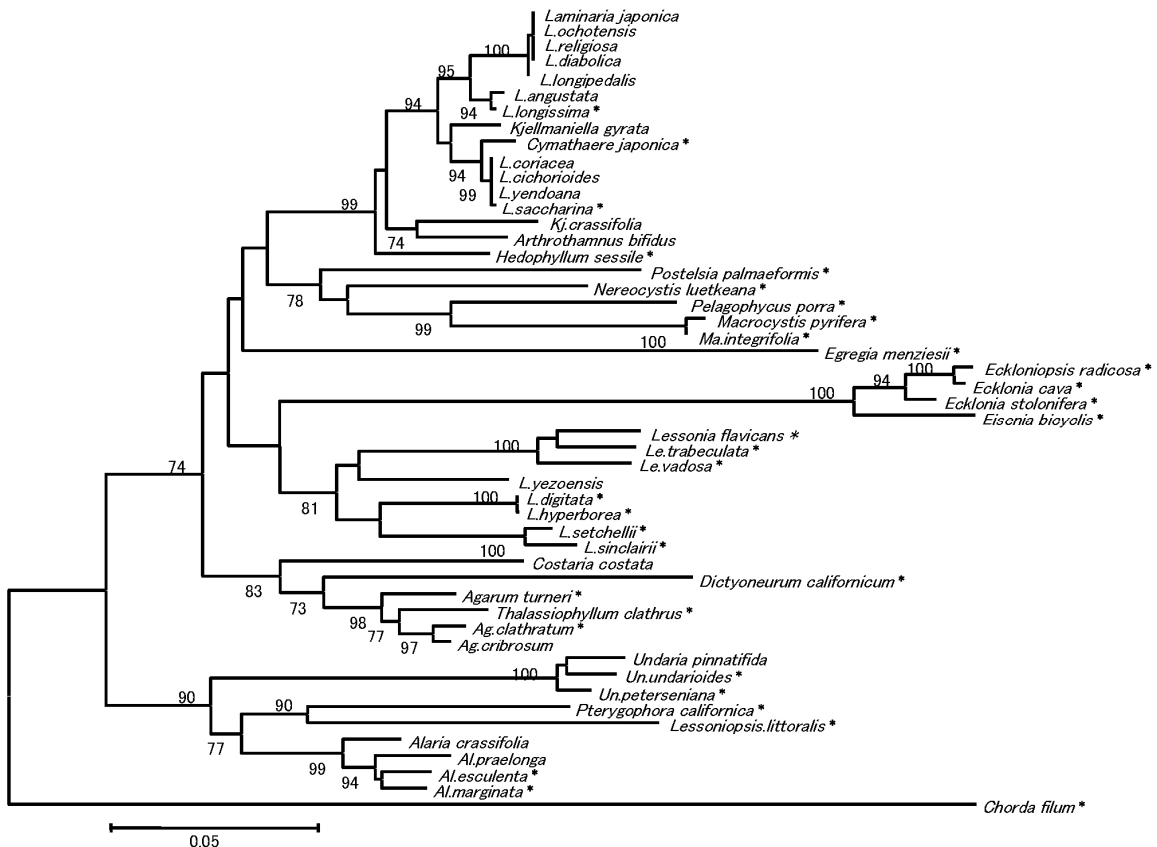


Fig. 7 Phylogenetic trees constructed using ITS and RuBisCo-spacer sequences of Laminariaceae species. Bootstrapping was run with 1,000 replicates and values over 70% were shown at the nodes. Each asterisk indicates a sequence that was downloaded from GeneBank (see Table 1).

3. 2 PCR-RFLP (CAPS) 法

PCR-RFLP (CAPS) 法は、PCR 法により特定の領域を増幅したものを、制限酵素により消化して切断片長多型を解析する手法である⁹⁾。コンブ目の試料 2 科 7 属 18 種について、ITS 領域の PCR 産物を *Bcn* I、*Hin* I、*Fok* I、*Eco*O109 I により制限酵素処理した切断片長多型を Fig.8 に、RuBisCo-spacer 領域の PCR 産物を *Alu* I、*Psh* B I、*Ssp* I、*Xsp* I により制限酵素処理した切断片長多型を Fig.9 に示す。また、それぞれの多型の切断片長を Table 3 に示す。

マコンブ (*L.japonica*)、オニコンブ (*L.diabolica*)、ホソメコンブ (*L.religiosa*)、リシリコンブ (*L.ochotensis*)、エナガコンブ (*L.longipedalis*) の 5 種、ガツカラコンブ (*L.coriacea*)、エンドウコンブ (*L.yendoana*) の 2 種は、切断片長多型において、ITS 領域及び RuBisCo-spacer 領域とも、ほぼ同一のパターンを示す。

このことは、これらのグループ内では、塩基配列がほぼ同一であることから、当然の結果と言える。また、これ以外のコンブ目 9 種の切断片長多型は、各条件の結果を総合的に評価するとそれぞれ異なっている。

以上のことから、ITS 領域及び RuBisCo-spacer 領域を用いた PCR-RFLP 法により、今回用いたコンブ類 18 種においては、コンブ類の種レベルでの判別は困難なものがああるものの、属レベルでの判別は可能であることが確認できた。しかし、今回の手法はあくまでもコンブ類 18 種内の判別方法であり、この他の種についての制限酵素切断パターンは確認できていないことから、今回用いたコンブ類 18 種以外の種が、今回のものと同一もしくは類似したパターンを示す可能性がある。このことから、PCR-RFLP 法はスクリーニングに用いることが望ましいと考えられる。

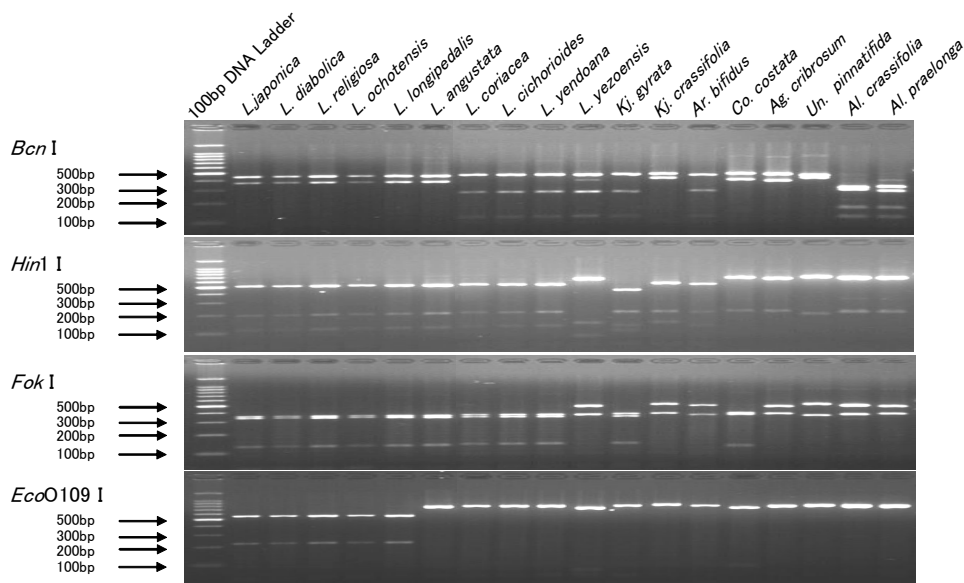


Fig. 8 Restriction fragment patterns observed in 18 species of the family Laminariaceae after digestion of the ITS region PCR product with four restriction enzymes (*Bcn* I, *Hin* I, *Fok* I and *Eco*O109 I).

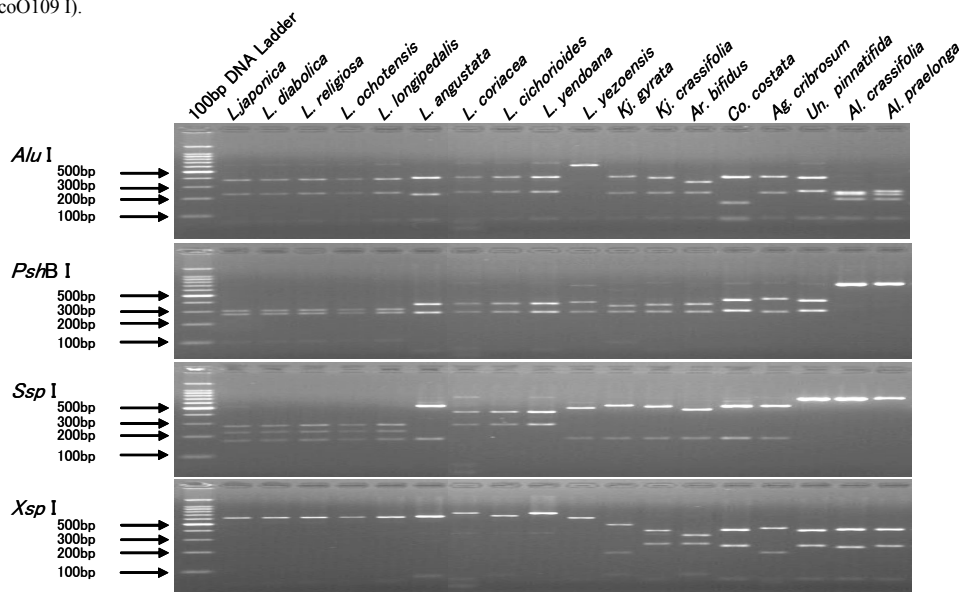


Fig. 9 Restriction fragment patterns observed in 18 species of the family Laminariaceae after digestion of the RuBisCo-spacer region PCR product with four restriction enzymes (*Alu* I, *Psh* B I, *Ssp* I and *Xsp* I).

Table 3 PCR-RFLP fragment sizes generated with each condition from 18 species of family Laminariaceae. The fragment sizes shown are exact as determined by sequencing.

	ITS									
	<i>Bcn</i> I			<i>Hin</i> I			<i>Fok</i> I			<i>Eco</i> O109 I
<i>Laminaria japonica</i>	445bp	369bp		503bp	195bp	116bp	352bp	332bp	130bp	545bp 220bp
<i>L. religiosa</i>	445bp	369bp		503bp	195bp	116bp	352bp	332bp	130bp	545bp 220bp
<i>L. ochotensis</i>	445bp	369bp		503bp	195bp	116bp	352bp	332bp	130bp	545bp 220bp
<i>L. diabolica</i>	445bp	369bp		503bp	195bp	116bp	352bp	332bp	130bp	545bp 220bp
<i>L. longipedalis</i>	445bp	369bp		503bp	195bp	116bp	352bp	332bp	130bp	545bp 220bp
<i>L. angustata</i>	445bp	371bp		503bp	195bp	118bp	352bp	332bp	132bp	767bp
<i>L. coriacea</i>	450bp	261bp	112bp	505bp	198bp	120bp	357bp	332bp	134bp	774bp
<i>L. cichorioides</i>	450bp	261bp	112bp	505bp	198bp	120bp	357bp	332bp	134bp	774bp
<i>L. yendoana</i>	450bp	261bp	112bp	505bp	198bp	120bp	357bp	332bp	134bp	774bp
<i>L. yezoensis</i>	449bp	257bp	114bp	619bp	130bp		465bp	356bp		709bp
<i>Kjellmaniella gyrata</i>	455bp	262bp	112bp	415bp	198bp	120bp	362bp	333bp	134bp	780bp
<i>Kj. crassifolia</i>	459bp	369bp		521bp	198bp	136bp	489bp	366bp		806bp
<i>Arthrothamnus bifidus</i>	441bp	266bp	112bp	504bp	195bp	120bp	471bp	348bp		770bp
<i>Costaria costata</i>	462bp	384bp		643bp	203bp		369bp	356bp	121bp	719bp
<i>Agarum cribrosum</i>	455bp	367bp		620bp	202bp		460bp	362bp		773bp
<i>Undaria pinnatifida</i>	436bp	402bp		656bp	182bp		495bp	343bp		789bp
<i>Alaria praelonga</i>	302bp	262bp	152bp 108bp	629bp	195bp		463bp	361bp		775bp
<i>Al. crassifolia</i>	297bp	274bp	152bp 108bp	636bp	195bp		475bp	356bp		782bp

	RuBisCo-spacer							
	<i>Alu</i> I		<i>Psh</i> B I		<i>Ssp</i> I		<i>Xsp</i> I	
<i>Laminaria japonica</i>	370bp	230bp	305bp	270bp	274bp	226bp	603bp	
<i>L. religiosa</i>	370bp	230bp	305bp	270bp	274bp	226bp	603bp	
<i>L. ochotensis</i>	370bp	230bp	305bp	270bp	274bp	226bp	603bp	
<i>L. diabolica</i>	370bp	230bp	305bp	270bp	274bp	226bp	603bp	
<i>L. longipedalis</i>	370bp	230bp	305bp	270bp	274bp	226bp	603bp	
<i>L. angustata</i>	383bp	216bp	360bp	270bp	513bp	173bp	616bp	
<i>L. coriacea</i>	383bp	230bp	360bp	270bp	412bp	274bp	686bp	
<i>L. cichorioides</i>	383bp	230bp	360bp	270bp	412bp	274bp	616bp	
<i>L. yendoana</i>	383bp	230bp	360bp	270bp	412bp	274bp	686bp	
<i>L. yezoensis</i>	573bp		376bp	270bp	473bp	173bp	576bp	
<i>Kjellmaniella gyrata</i>	383bp	216bp	332bp	270bp	513bp	173bp	446bp	170bp
<i>Kj. crassifolia</i>	366bp	216bp	343bp	270bp	496bp	173bp	365bp	234bp
<i>Arthrothamnus bifidus</i>	315bp	216bp	348bp	270bp	445bp	173bp	314bp	234bp
<i>Costaria costata</i>	376bp	149bp	399bp	281bp	507bp	173bp	375bp	217bp
<i>Agarum cribrosum</i>	380bp	216bp	413bp	270bp	510bp	173bp	397bp	170bp
<i>Undaria pinnatifida</i>	369bp	230bp	392bp	280bp	672bp		368bp	216bp
<i>Alaria praelonga</i>	230bp	208bp	173bp	684bp	684bp		380bp	206bp
<i>Al. crassifolia</i>	220bp	208bp	173bp	674bp	674bp		380bp	206bp

4. 要 約

コンブ類において、輸入制限品目であるコンブ属 (genus *Laminaria*) 及びトロロコンブ属 (genus *Kjellmaniella*) と他属を区別するために、DNA を利用した判別方法を検討した。核 DNA の ITS 遺伝子および葉緑体 DNA の RuBisCo-spacer 遺伝子についての塩基配列 (ITS 領域: 496 塩基、RuBisCo-spacer 領域: 269 塩基 (マコンブ (*L.japonica*) の場合)) を利用した結果、分子系統解析により、コンブ類の属レベルでの判別が可能であった。また、上記の 2 遺伝子座についての PCR-RFLP (CAPS) 法による切断片長多型により、コンブ類 18 種 (マコンブ (*L.japonica*)、オニコンブ (*L.diabolica*)、ホソメコンブ (*L.religiosa*)、リシリコンブ (*L.ochotensis*)、エナガコンブ (*L.longipedalis*)、ミツイシコンブ

(*L.angustata*)、ガツカラコンブ (*L.coriacea*)、チヂミコンブ (*L.cichorioides*)、エンドウコンブ (*L.yendoana*)、ゴヘイコンブ (*L.yezoensis*)、トロロコンブ (*Kj.gyrate*)、ガゴメ (*Kj.crassifolia*)、ネコアシコンブ (*Ar.bifidus*)、スジメ (*Co.costata*)、アナメ (*Ag.cribrosum*)、ワカメ (*Un.pinnatifida*)、チガイソ (*Al.crassifolia*)、アイヌワカメ (*Al.praelonga*) については、属レベルでのスクリーニングが可能と考えられる。

(謝 辞)

本研究に当たって、ご指導及び標準サンプルを提供して頂いた北海道大学北方生物圏フィールド科学センターの四ツ倉典滋氏に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Yotsukura, N. , Denboh, T. , Motomora, T. , Horiguchi, T. , Coleman, A. W. and Ichimura, T. 1999. Little divergence in ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 and -2 sequences non-digitate species of *Laminaria* (Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. *Phycol. Res.* **47**:71-80
- 2) Sasaki, H. , Sandra, C. L. , J, Robert, W. , Kawai, H. 2003. Occurrence of the gametophyte of *Agarum clathratum* (Laminariales, Phaeophyceae) as an endophyte in *Orculifilum denticulatum* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Phycol.Res.* **51**:192-202
- 3) Yoon, H. S. , Lee, J. Y. , Boo, S. M. and Bhattacharya, D. 2001. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) based on plastid-encoded RuBisCo spacer and nuclear-encoded ITS sequence comparisons. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21** (2), 231-243
- 4) Yoon, H. S. and Boo, S. M. 1999 Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to Undaria based on sequences of the RuBisCo spacer region. *Hydrobiologia* **398/399**, 47-55
- 5) Kawai, H. , Muto, H. , Fujii, T. and Kato, A. 1995. ALINKED 5S rRNA GENE IN *SCYTOSIPHON LOMENTARIA* (SCYTOSIPHONALES, PHAEOPHYCEAE). *J. Phycol.* **31**:306-311
- 6) 川嶋昭二編著：日本産コンブ類図鑑（1993），（北日本海洋センター）
- 7) 吉田忠生著：新日本海藻誌 日本産海藻類総覧（1998），（内田老鶴圃）
- 8) 能登谷正浩編著：海藻利用への基礎研究 その課題と展望（2003），（成山堂書店）
- 9) 種生物学会編：森の分子生態学 遺伝子が語る森林のすがた（2001），（文一総合出版）
- 10) 大野正夫編著：有用海藻誌（2004），（内田老鶴圃）