

DNA分析によるあまのりとあおのりの識別について

五十嵐 智大*, 八木 潤*, 片山 貴之*

Identification of *Pyropia* spp. and the former *Enteromorpha* spp. by DNA Analysis

Tomohiro IGARASHI*, Jun YAGI* and Takayuki KATAYAMA*

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

In the Japanese tariff schedule, *Pyropia* spp. and the former *Enteromorpha* spp. are classified in different statistical codes. Moreover, they are independently controlled as import quota items having different quotas. So, their identification is important to ensure fair customs procedures. In our previous study, to identify *Pyropia* spp. and the former *Enteromorpha* spp., we developed a PCR-based method using newly designed *Pyropia*-specific primers, which focused on the *ycf18* gene region (178bp) and *CpeB* gene region (534bp) in the chloroplast DNA of *Pyropia* spp. However, the method has the disadvantage of being unable to detect the former *Enteromorpha* spp. In this study, we focused on the ITS region and *rbc* gene region, both of which are generally used for identification of plant species, and examined a new method to detect and discriminate between *Pyropia* spp. and the former *Enteromorpha* spp. simultaneously.

1. 緒 言

あまのりは、アマノリ属に分類される紅藻類であり、その代表種にスサビノリが挙げられる。あおのりは、アオノリ属に分類される緑藻類であったが、2003年以降、分子系統学的な研究に基づき、学名がアオサ属と統一されている¹⁾。一方、アナアオサ、ミナミアオサ、リボンアオサなどのあおさは、アオノリ属と統一された前からアオサ属である。

関税率表において、食用のあまのりは同表第1212.21号-2、食用のあおのり及びあおさは同表第1212.21号-3に分類される。また、あまのり及びあおのりはいずれも輸入割当(Import Quota、以下IQと略す)品目であり、輸入貿易管理令によって規制されている。あおのりのIQ品目にヒラアオノリ、ボウアオノリ、ウスバアオノリ、スジアオノリなどが挙げられる²⁾。2018年度の輸入割当上限は、あまのりが約3,600トン(1枚を3gとして換算)³⁾、あおのりが130トン⁴⁾であり、あまのりはあおのりと比べて輸入割当数量が多い。従って、輸入割当数量が少ないあおのりを輸入割当数量の多いあまのりや、IQ品目ではないあおさと偽って申告する虞がある。

あまのりは、輸入品、国産品に問わらず、通常、裁断されており、また、ほとんどが摘採後、火入れ(乾燥)等の処理を施してあるため⁵⁾、形態学的特徴である紅い色彩が生の状態と比べ深緑色に色落ちしている。これらのことから、製品のあまのり、あおのり及びあおさは形態学的特徴が類似しているため、識別は困難である。

形態学的特徴に基づく種の識別が困難な場合、生物の遺伝情報に着目したDNA分析が有効である。現状、あまのり、あおのり及びあおさの識別は、DNA分析により特定領域の塩基配列を解析することで種の同定を行っている。この方法では高価な試薬と煩雑な前処理を必要とし、時間を要する。よって、より迅速かつ簡易な手法の開発が求められている。日本国内で流通している緑藻あおのり製品の主要な原料種についてのデュプレックスPCR法による識別については河嶋らが報告⁶⁾している。

本研究では、あまのりとあおのりを迅速かつ簡易に識別することを目的に、PCR法をベースとした手法の開発を検討している。小林らの報告⁷⁾では、葉緑体DNAに存在する*ycf18*遺伝子領域及び*CpeB*遺伝子領域⁸⁾において、スサビノリの塩基配列を参考にプライマーを設計し、PCRによる增幅の有無でアマノリ属の種とアオノリ属の種を属レベルで識別する手法を報告した。しかし、この手法は、あまのりを特異的に検出する方法であることから、検出しなかった場合において、検体があおのりであるという積極的な根拠はない。そのため、あおのりを特異的に検出する方法を開発し、組み合わせて識別することが望ましいと考えられた。

そこで本報においては、一般に種判別に用いられている葉緑体DNAの*rbc*遺伝子領域及び核DNAのITS領域に着目し、あまのり及びあおのりについてPCR法をベースとした簡便な方法での判別を検討したので報告する。

2. 実験

2.1 試料

試料 アマノリ属 3種類、アオノリ属 5種類
 カイガラアマノリ (*Pyropia tenuipedalis*)
 スサビノリ (*Pyropia yezoensis*)
 アサクサノリ (*Pyropia tenera*)
 ヒラアオノリ (*Ulva compressa*)
 ボウアオノリ (*Ulva intestinalis*)
 ウスバアオノリ (*Ulva linza*)
 スジアオノリ (*Ulva prolifera*)
 アナアオサ (*Ulva australis*)
 (一片に分離し、DNA を抽出したものについて、塩基配列の測定により、種を同定したもの)

2.2 試薬

DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN 社製)
 TaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ社製)
 プライマー (シグマ・アルドリッヂ社製)
 ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)

2.3 装置

ボールミル : MM300 (レッヂュ社製)
 PCR 増幅装置 : GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製)
 DNA シーケンサー : 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)
 画像解析装置 : BIO-PROFILE Systems2 (VILBER LOURMAT 社製)

2.4 実験

DNA の抽出は、各試料を一片に分離して減圧乾燥したものを、ボールミルを用いて粉碎し、DNeasy® Plant Mini Kit に添付のプロトコルにより行った。

各試料から抽出した DNA 抽出液について、TaKaRa Ex Taq™ を用いて PCR により、ITS 領域または *rbc* 遺伝子領域の増幅を行った。

PCR の反応溶液は、DNA 抽出液:2 μL, 10×Ex Taq buffer:3 μL, dNTP mixture: 2.4 μL, プライマー (5 μM): 各 2 μL, Ex Taq polymerase (5 U/μL): 0.15 μL, 減菌水: 18.45 μL (合計 30 μL に調製) を基準とし、DNA 抽出液の濃度等に応じて、DNA 抽出液及び減菌水の量を変更した。用いたプライマーの塩基配列及びアニーリング温度 (以下 Tm と略す) を Table 1 に、ITS 領域または *rbc* 遺伝子領域の各プライマーの位置を Fig.1 に示す。

Table 1 List of primers for PCR reactions.

region		primer	Sequence	Tm(°C)
<i>rbcL</i> (<i>Ulva</i>)	forward	F650	5'- GAAAACGTAAACTCACACC -3'	55
	reverse	rbcLend	5'- TTTCTTTCAAACCTTCACA -3'	
<i>rbc</i> (<i>Pyropia</i>)	forward	rbc-F	5'- TGTGGACCTCTACAAACAGC -3'	50
	reverse	rbc-R	5'- CCCCATAGTCCCCT -3'	
ITS1 (<i>Ulva</i>)	forward	TW-812	5'- TTTCCGTAGGTGAACTCTGC -3'	60
	reverse	Ulva-5.8S	5'- GATTGATGACTCACGGAAATTC -3'	
	reverse	Pyropia-5.8S	5'- GACTCAATGATTACCGGAGTCC -3'	
ITS2	forward	Univ-F	5'- CTCTCGCAACGATGAAGAAC -3'	45
	reverse	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	

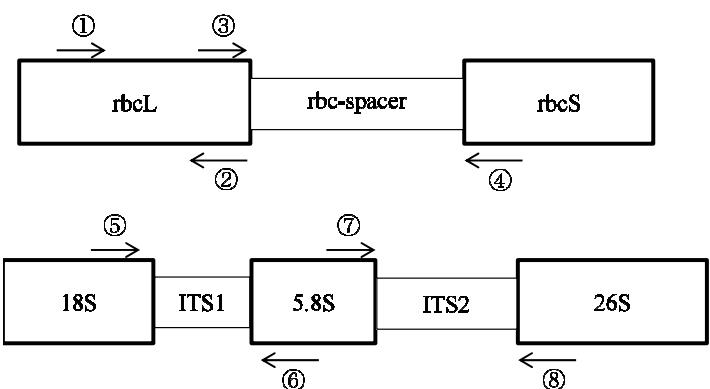


Fig.1 Scheme shows locations around ITS regions in nuclear DNA and *rbc* region in chloroplast DNA.

The arrows indicate the locations and directions of the primers.

- ① F650 ② rbcLend ③ rbc-F ④ rbc-R ⑤ TW-812
 ⑥ Ulva-5.8S and Pyropia-5.8S ⑦ Univ-F ⑧ ITS-4

PCR の反応条件は、熱変性を 94 °C で 5 分間行った後、94 °C (15 秒), Tm (15 秒), 72 °C (40 秒) のサイクルを 35 回繰り返し、72 °C で 10 分間伸長反応を行った。

増幅した PCR 産物は、0.01%エチジウムプロマイドを添加した 2%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行った後、紫外光照射装置で確認した。

3. 結果及び考察

3.1 PCR 産物の電気泳動の結果

各試料から抽出した DNA について、Table 1 に示したプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.2 ~6 に示す。

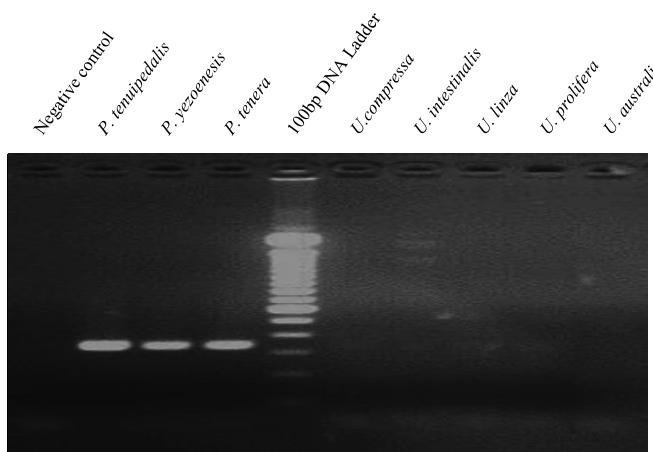


Fig.2 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of *rbc* gene region
rbc-F and rbc-R are used as primers.

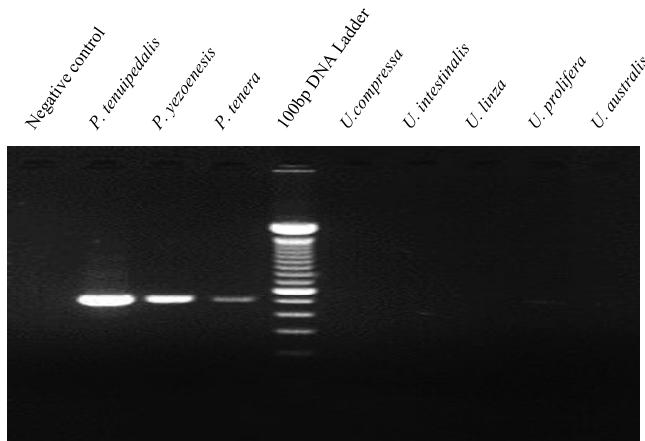


Fig.3 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS1 gene region
TW812 and Pyropia-5.8S are used as primers.

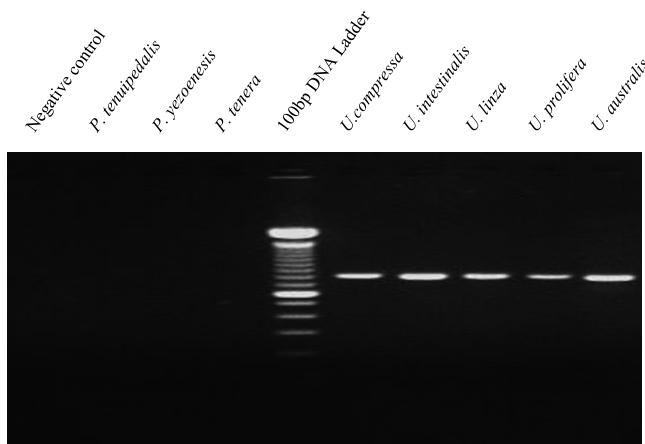


Fig.4 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of *rbcL* gene region
F650 and rbcLstart are used as primers.

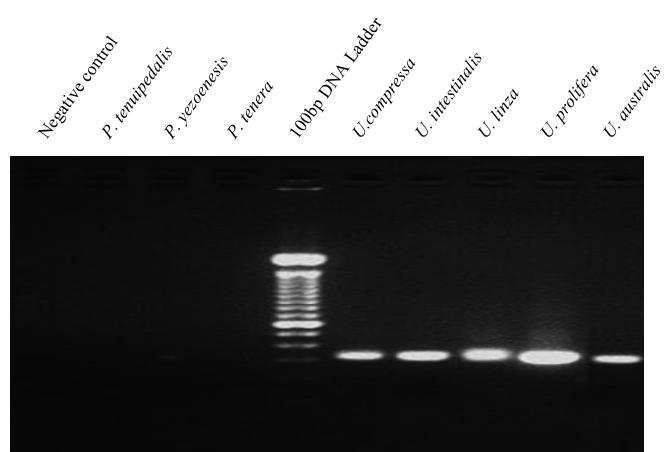


Fig.5 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS1 gene region
TW812 and Ulva-5.8S are used as primers.

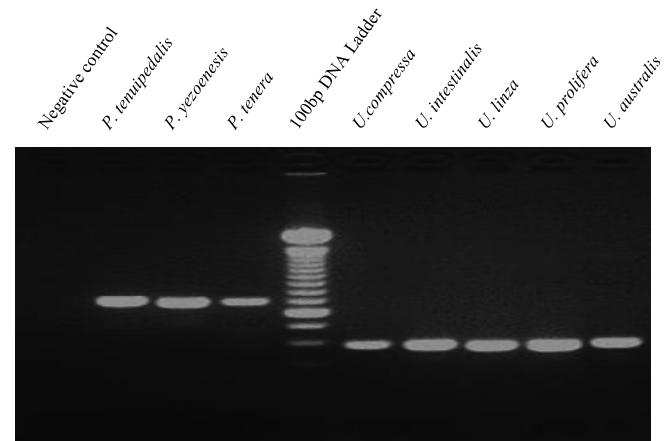


Fig.6 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS2 gene region
Univ-F and ITS4 are used as primers.

各試料において、rbc-F と rbc-R のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.2) 及び TW-812 と Pyropia-5.8S-R のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.3) においては、アマノリ属の種のみ単一のバンドが確認でき、アオノリ属の種は PCR 増幅が認められなかった。一方、各試料において、F650 と rbcLstart のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.4) 及び TW-812 と Ulva-5.8S-R のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.5) では、アマノリ属の種は PCR 増幅が認められず、アオノリ属の種のみ単一のバンドが確認できた。このことから、これらのプライマーを用いて PCR を行うことで、分析試料がアマノリ属のものか又はアオノリ属のものかを判別することが可能である。

また、各試料において、Univ-F と ITS4 のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.6) では、アマノリ属の種では約 700bp、アオノリ属の種では約 400bp に単一のバンドが確認でき、これらの増幅長が異なることから、分析試料がアマノリ属か又はアオノリ属のいずれのものであっても、検出すると同時に判別することが可能である。

なお、PCR 産物の增幅長の違いは、ITS2 領域の塩基長が、アマノリ属であるスサビノリは 561 塩基であるのに対し、アオノリ属であるスジアオノリは 181 塩基であることが寄与していると考えられる。

3.2 あおのり類の種特異的識別との同時適用

河嶋らは、緑藻あおのり類について迅速かつ簡易に識別することを目的に、デュプレックス PCR 法による識別手法を開発した。

今回、アマノリ属の種とアオノリ属の種の属レベルでの識別と同時に日本国内で流通している主要なあおのりであるヒラアオノリ、ボウアオノリ、ウスバアオノリ、スジアオノリの識別を行うことを目的として、河嶋らの手法を参考に、3.1 で用いた Univ-F と ITS-4 のプライマーの他に、U_comp-R, U_intest-R, U_linz_prol-R のプライマーを追加し、PCR を行った。

これらのプライマーの対象種及び塩基配列を Table 2 に、ITS2 領域の各プライマーの位置を Fig.7 に、得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.8-Fig.10 に示す。

Table 2 List of primers for PCR reactions in 3.2

target species	primer	sequence
<i>Ulva compressa</i>	U_comp-R	5'-CTTCAGCCAGCCGGCCGCAAGGACC-3'
<i>Ulva intestinalis</i>	U_intest-R	5'-CAGCCCGCGAGGGGCCGCC-3'
<i>Ulva linza</i> <i>Ulva prolifera</i>	U_linz_prol-R	5'-AGCCGGCCGGCGCCGAGGC-3'

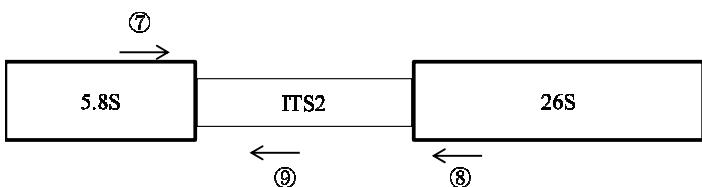


Fig.7 Scheme shows locations around ITS regions in nuclear DNA.

The arrows indicate the locations and directions of the primers.

- ⑨ U_comp-R, U_intest-R and U_linz_prol-R
- ⑦ Univ-F (same as Fig.1) ⑩ ITS-4 (same as Fig.1)

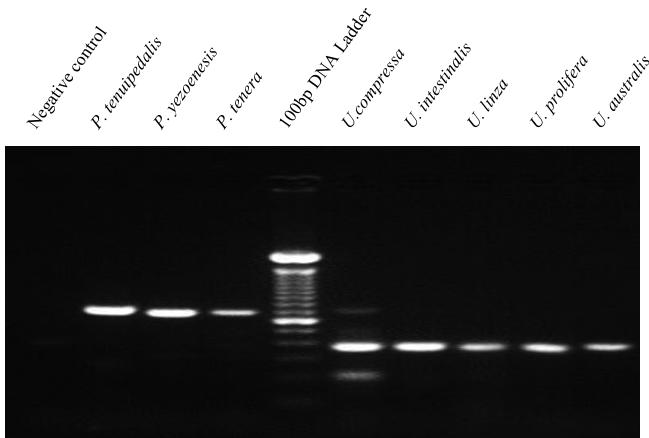


Fig.8 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS2 gene region

Univ-F, ITS4 and U_comp-R are used as primers.

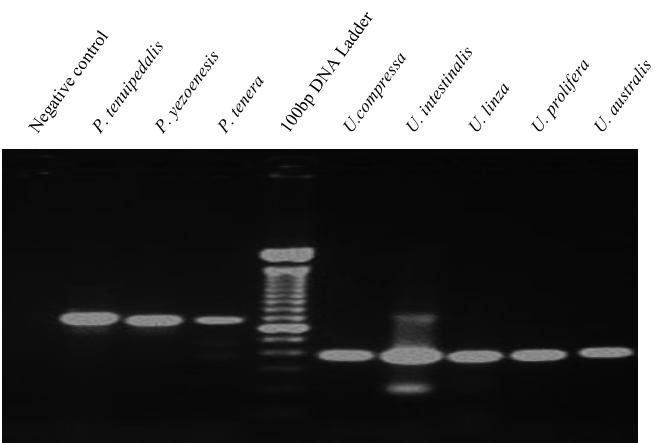


Fig.9 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS2 gene region
Univ-F, ITS4 and U_intest-R are used as primers.

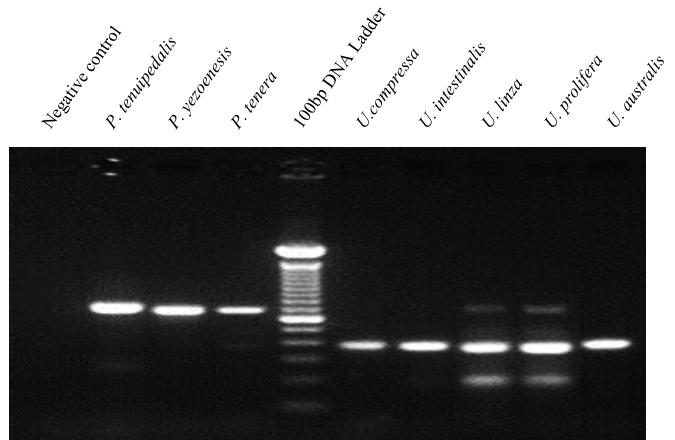


Fig.10 Electrophoresis of PCR products in the vicinity of ITS2 gene region
Univ-F, ITS4 and U_linz_prol-R are used as primers.

各試料において、Univ-F, ITS-4 及び U_comp-R を用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.8) ではアマノリ属の種では約 700bp、アオノリ属の種では約 400bp に PCR 産物が検出されるとともに、ヒラアオノリについては 200bp 付近にも PCR 産物が確認できた。同様に、各試料において、Univ-F, ITS-4 及び U_intest-R を用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.9) ではボウアオノリについて、各試料において、Univ-F, ITS-4 及び U_linz_prol-R を用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.10) ではウスバアオノリ及びスジアオノリについて、アオノリ属の種に共通の 400bp 付近の PCR 産物とは別に 200bp 付近に PCR 産物が確認できた。このことから、ITS2 領域を増幅する Univ-F と ITS-4 のプライマーに加えて U_comp-R, U_intest-R, U_linz_prol-R を用いて PCR を行うことで、アマノリ属の種とアオノリ属の種の属レベルでの識別と同時に IQ 品目であるヒラアオノリ、ボウアオノリ、ウスバアオノリ及びスジアオノリを種特異的に識別することも可能であり、IQ 品目の簡便な判別が可能である。

4. 要 約

アマノリ属及びアオノリ属について、一般的に種判別に用いられている葉緑体 DNA の *rbc* 遺伝子領域及び核 DNA の ITS 領域に着目し、アマノリ属の種又はアオノリ属の種のいずれか片方のみが増幅するプライマーを開発した。また、アマノリ属の種及びアオノリ属の種について増幅長が異なるプライマーも開発した。さ

らに、日本国内で流通している主要なあおのりであるヒラアオノリ、ボウアオノリ、ウスバアオノリ及びスジアオノリを、アマノリ属の種とアオノリ属の種の属レベルでの識別と同時に識別する手法も開発した。以上のことから、これらの手法を組み合わせることで、アマノリ属の種とアオノリ属の種の属レベルでの識別及びアオノリ属中の主要な IQ 品目の識別が可能となった。

文 献

- 1) Hillary S. Hayden, Jaanika Blomster, Christine A. Maggs, Paul C. Silva, Michael J. Stanhope and J. Robert Waaland :Eur. J. Phycol. **38**, 277(2003)
- 2) 小倉 郁史, 山上 薫, 富田 健次, 嶋田 智 :関税中央分析所報, **44**, 7(2004)
- 3) 経済産業省 :平成 29 年 1 月 20 日付輸入発表第 17 号
- 4) 経済産業省 :平成 28 年 7 月 25 日付輸入発表第 7 号
- 5) 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).
- 6) Yuumi Kawashima, Tetsuya Akasaki, Yoshitsugu Matsumoto, Satoshi Shimada :Fisheries Sci. **80**, 859(2014).
- 7) 小林 正和, 八木 潤, 中山 清貴 :関税中央分析所報, **56**, 25(2016)
- 8) Tomohiro KAWAKAMI, Kazuaki SAKAGUCHI, Katsuaki TAKECHI, Hiroyoshi TAKANO and Susumu TAKIO :Biosci. Biotechnol. Biochem., **73**, 740(2009).