

ゲル包埋によるノリのプロトプラスト，単離細胞の通気培養と再生

青戸 泉*・馬場 浴文・北嶋 博卿

Regeneration of Protoplasts and Isolated Cells
from *Porphyra yezoensis* Embedded in Gels by Aeration Culture

Izumi AOTO*, Hirofumi BABA and Hiroaki KITAJIMA

Abstract

Experiments to find a regenerating condition of protoplasts and isolated cells were conducted by aeration culture in agars and calcium alginate gels in SMW-III.

As a result, protoplasts and isolated cells regenerated to thalli after changing to monospores from the cell clumps in a high ratio. In the culture embedded in agars, the rates of survival and changing to the monospores showed high values at 1.5% gel's concentration, and the thallus showed a high growth at the lower gel's concentration. Therefore, it became clear that it would be better to culture at 1.0 to 1.5% gel's concentration for effective regeneration. On the other hand, in the culture embedded in calcium alginate gel, it would be better to culture at about 1% gel's concentration from point of the growth of thallus and the strength of the gel at time of culture.

はじめに

現在ノリ養殖は病害の発生や環境の変動により全国的に生産が不安定で，このような病害や環境変動に対応した品種の開発が急務とされている。こうした中で，ノリのプロトプラスト，単離細胞は育種素材として注目され，単離技術¹⁻⁵⁾や細胞融合技術⁶⁻⁹⁾の開発，突然変異誘発による品種改良への応用の検討¹⁰⁾，プロトプラスト，単離細胞を用いた採苗技術の開発^{11,12)}が進められているが，いま

だ最適な再生条件が確立していない¹¹⁻¹⁶⁾。

本研究では，プロトプラスト，単離細胞を寒天及びアルギン酸カルシウムゲル（以下，アルギン酸ゲルと略す）に包埋し，液体培地中で通気培養するとその生残率が高く，また，単胞子化を経て葉体に再生する個体の比率が高いことが明らかになったので報告する。

*：現佐賀県栽培漁業センター（Saga Prefectural Sea Farming Center）

材料及び方法

1. プロトプラスト, 単離細胞の作出材料及びその前培養

材料としたノリ葉体は, ナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis f. narawaensis* (品種名 佐賀5号) で, 1989年10月2日に陸上でカキ殻糸状体を用いて殻胞子を採苗し, 六角川沖合の養殖試験地で養殖したものである。一定の大きさに生長したノリは, $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍庫で凍結保存した。このノリ葉体を適宜取り出し, 滅菌海水中に戻して解凍した後実験に供した。葉長4~6 cmの葉体は, 根部約5 mmを切除した後濾紙で水分を除き, ペニシリンGカリウム12万単位, ストレプトマイシン硫酸塩 $200\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ を添加した滅菌海水中で, 数十秒間強振してから換水する操作を3回繰り返し滅菌した後, 再び滅菌濾紙で水分を除いた。さらに, このノリ葉体を前記の濃度の抗生物質を添加した滅菌海水中で24時間前培養した。前培養条件は, 日長条件11L:13D, 照度は $3,500\sim4,000\text{lx}$, 温度 18°C , 塩分濃度27.0%であった。

2. プロトプラスト, 単離細胞の作出

プロトプラスト, 単離細胞の作出は, 鬼頭の方法¹⁾に準じたが¹⁷⁾, パパイン処理に続く細胞壁消化酵素による処理では, 2.0% AAP に0.005% アルカリヘミセルラーゼを混合して用いた。後者の酵素による処理時間は, プロトプラスト, 単離細胞の作出量に応じて1.5~3.0時間とした。処理時間が1.5時間以上に及ぶ場合には, 1~2回処理を中断し, プロトプラスト, 単離細胞と組織片をミューラーガーゼを用いて分離した後, 酵素を取り替えて組織片のみ処理を続けた。

3. プロトプラスト, 単離細胞の培養

1) 寒天包埋によるプロトプラスト, 単離細胞の通気培養

作出したプロトプラスト, 単離細胞は 2.0×10^4 cells $\cdot\text{ml}^{-1}$ に密度を調整し, プラスチック滅菌シャーレにその1 mlを分取した。これに混釈後各寒天濃度となるように調製した寒天溶液9 mlを加

え, よく混釈して放置, 冷却した。寒天冷却後, 寒天プレート $0.25\sim 1.0\text{mm}^2$ をスパーテルを用いて切り出し, 改変SWM-III培地¹⁷⁾にその数片を入れ, 緩やかに攪拌される程度に通気しつつ培養した。寒天濃度は0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の5段階である。使用した寒天は, 高品質寒天(伊那食品製, 1.0%でのゲル化温度 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$)で, プロトプラスト, 単離細胞を包埋する際には, あらかじめオートクレイブで滅菌し, 36°C まで冷却してから使用した。

培養容器は, 1 ℓ 容の球状平底フラスコを使用し, 培養条件は日長条件11L:13D, 照度 $3,500\sim 4,000\text{lx}$, 温度 18°C , 培地の塩分濃度28.5%とした。培地は3日に一度全量交換し, 培地中にはペニシリンGカリウム12万単位, ストレプトマイシン硫酸塩 $200\text{mg}\cdot\ell^{-1}$ を添加した。

2) アルギン酸ゲル包埋によるプロトプラスト, 単離細胞の通気培養

アルギン酸ゲルの濃度を, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の7段階とした。

作出したプロトプラスト, 単離細胞は 2.0×10^4 cells $\cdot\text{ml}^{-1}$ に調製し, その1 mlをあらかじめ規定の濃度になるように調製し, オートクレイブ滅菌, 冷却したアルギン酸ナトリウムゾル9 mlと混合した。このゾルを2 ml容のピペットで分取し, $100\text{m mol}\cdot\ell^{-1}$ の CaCl_2 を添加したNaCl海水(28.5%)中に滴下してビーズ状とし, そのまま1時間放置してゲル化させた(ゲルビーズ)。引き続き, このゲルビーズを正常滅菌海水に移して30分放置し, 余分の CaCl_2 を除去した後, 改変SWM-III培地中で通気培養した。培養条件は, 寒天での培養と同じであったが, アルギン酸ゲルを維持するために, 培地交換の都度 $5\text{m mol}\cdot\ell^{-1}$ の CaCl_2 を添加した。

4. プロトプラスト, 単離細胞の再生の観察

プロトプラスト, 単離細胞の再生の観察は, 倒立顕微鏡(オリンパス製)の100~200倍で, 3~6

日毎に全生残個体について行った。また、プロトプラストから直接葉体に再生したものと細胞塊を経て単孢子化し、葉体に再生したものについてその大きさの変化を測定した。なお、ゲル中で単孢子化を経て再生した個体については、葉体がい

くつか仮根部を絡み合っつながっているため、その個体の中で最も大きな葉体の葉長を個体長として測定した。測定個体数は、原則として20個体以上とした。

結果及び考察

1. 寒天包埋によるプロトプラスト、単離細胞の通気培養と再生

1.5%の寒天に包埋し、通気培養した場合のプロトプラスト、単離細胞の生残率と再生形態の変化を Fig. 1. に、寒天濃度と生残率、再生形態の関係を Fig. 2. に示した。プロトプラスト、単離細胞の再生過程において、2細胞以下で分裂が進行しない個体が観察されたので、これを“2細胞以下 (One or two cells)”，3細胞以上の小細胞塊を“細胞塊 (Cell clumps)”，細胞塊を経て個体全体が単孢子化した個体を“単孢子化 (Changed to monospores)”として示し、それ以外の形状に再生したものは“その他 (Other forms)”でまとめて示した。

また、プロトプラスト、単離細胞の再生形態のうち、細胞塊から単孢子化を経て葉体となる場合の変化を Plate 1. に示した。

再生形態の中で最も多く観察されたのは、プロトプラスト、単離細胞が細胞塊となり、やがてこの細胞塊全体が単孢子化し、それぞれの胞子が葉体に生長していくものであった。培養開始後一週間は徐々に細胞塊の比率が増加していくのが観察された。約一週間が経過する頃から、数細胞程度の小細胞塊の一部で細胞間の間隙が明瞭となり (Plate 1. A.)、全体が単孢子化するのが観察されるようになった (Plate 1. B.)。その他の細胞塊でも、数十～数百細胞の大きさに達した時点で全体が単孢子化するのが観察され (Plate 1. C-F.)、単孢子化を経て葉体へ再生する個体 (Plate 1. G.) の比率が高くなっていった。培養開始21日目には、単孢子化した個体は1.5%濃度の場合、全体の87.8%を占めるようになった。この傾向は同時に

行った寒天濃度0.8, 1.0, 2.0, 3.0%の場合でも同様であった。また、1.0%の寒天濃度でやや培養

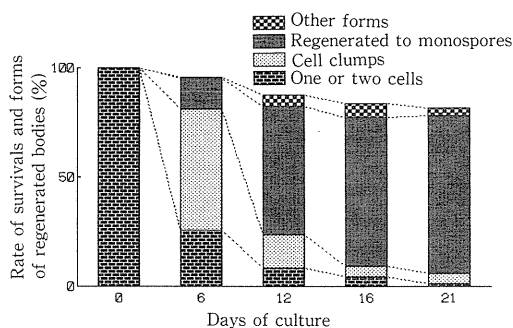


Fig. 1. プロトプラスト、単離細胞からの生長個体の生残率と形態の変化

Changes of survival rates and forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolated cells were embedded in agars of 1.5% concentration by aeration culture.

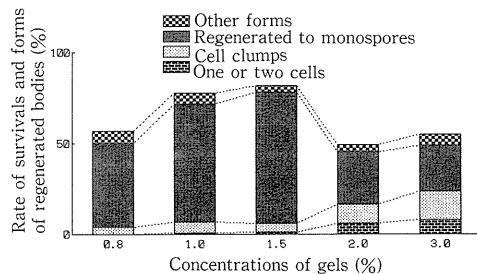


Fig. 2. プロトプラスト単離細胞からの生長個体の生残率と形態の比率

Rates of survival and forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolated cells were embedded in agars of five concentrations by aeration culture for 21 days.

条件を変えて培養した場合にも、再生形態は同様の傾向を示した¹⁴⁾。

寒天濃度とプロトプラスト、単離細胞の生残率については、0.8%から1.5%では寒天濃度の上昇に伴って生残率は順に、57.2, 77.8, 82.0%と上昇が見られるが、2.0, 3.0%ではそれぞれ49.4, 55.2%と逆に低下した。

寒天濃度の上昇と生残率の関係については、0.1, 0.3, 1.0%の3段階の寒天濃度で平板培養を行った場合でも、寒天濃度の上昇とともに生残率の向上が見られている¹⁴⁾。また、液体培地でのプロトプラスト、単離細胞の培養については、生残率が著しく低く、生残率の値が安定しないことが報告されている^{11,13,14)}。この原因の一つとして、ノリのプロトプラスト、単離細胞の作出材料となるノリ葉体の無菌化が難しく、液体培地中や低濃度の寒天中では、細菌の攻撃を受けやすいことが推察される。

また、Takeuchiら¹⁸⁾が *Vinca rosea* L. (ニチニチソウ)、石崎¹⁹⁾が糸状菌について検討して述べているように、ノリについても液体培地中や低濃度の寒天培地中では、プロトプラスト、単離細胞の細胞壁構成糖の培地中への溶出が生じ、細胞壁が再生しにくくなることも推察される。

高濃度側でプロトプラスト、単離細胞の生残率が低下する原因については、寒天では濃度上昇に伴って凝固点が高くなり、このためプロトプラスト、単離細胞が寒天への包埋時に高温の影響を受けるためと考えられる²⁰⁾。

本研究はプロトプラスト、単離細胞を利用した採苗技術の開発も目的の一つとしている。プロトプラスト、単離細胞から葉体に効率的に再生する経路は、単胞子化を経るものであり、直接プロトプラスト、単離細胞から葉体に再生した個体が極端に少なかったことから、生残個体数に占める単胞子化率について注目してみると、寒天濃度0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の順にそれぞれ80.4, 83.2, 87.8, 58.5, 45.8%となった。各実験区の供試個体数に対する単胞子化率は、順に46.0, 64.7, 72.0, 28.9, 25.2%となり、1.5%で最も高くなっ

た。

プロトプラスト、単離細胞から、細胞塊、単胞子化を経て葉体化した個体の生長を Fig. 3. に示した。通気培養開始後30日目には、寒天濃度0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の順に、葉長はそれぞれ1.93, 1.36, 1.10, 0.85, 0.51mmとなり、低濃度のもほど生長が早かった。これとは別に、1.0%の寒天による包埋、通気培養の結果、偶然寒天からはずれた個体で生長が早いこと、また、寒天中に埋没したままの個体では生長が遅く、一部の個体では葉体が多層化することが報告されている¹⁴⁾。したがって、再生葉体の生長には寒天濃度が影響することが示唆された。

以上の結果より、35°C前後でゲル化する高品質寒天にプロトプラスト、単離細胞を包埋、培養し、葉体に再生させるには、1.0~1.5%の寒天濃度が適当と考えられる。

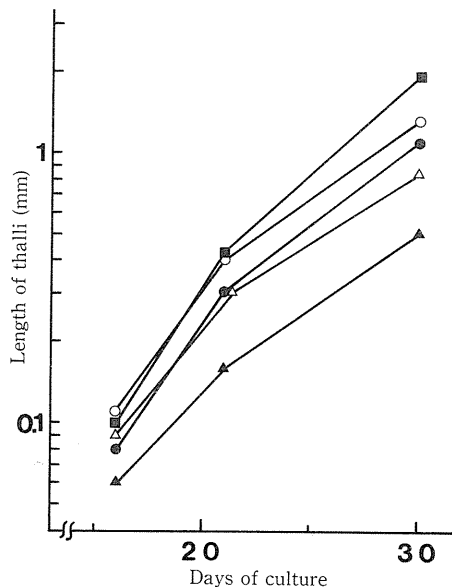


Fig. 3. プロトプラスト、単離細胞に由来する葉体の生長
Growth of thalli regenerated from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolated cells were embedded in agars of five concentrations by aeration culture.
■ : 0.8%, ○ : 1.0%, ● : 1.5%, △ : 2.0%, ▲ : 3.0%

2. アルギン酸ゲル包埋によるプロトプラスト、単離細胞の通気培養と再生

2.0%アルギン酸ゲル中にプロトプラスト、単離

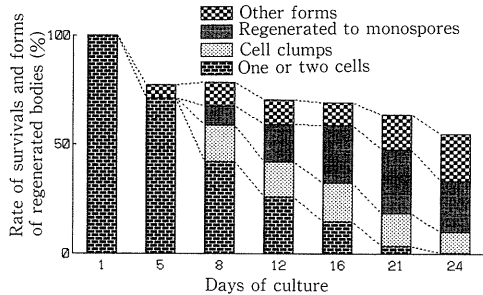


Fig. 4. プロトプラスト、単離細胞からの生長個体の生残率と形態の変化

Changes of survival rates and forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolats cells were embedded in calcium alginate gel of 2.0% concentration by aeration culture.

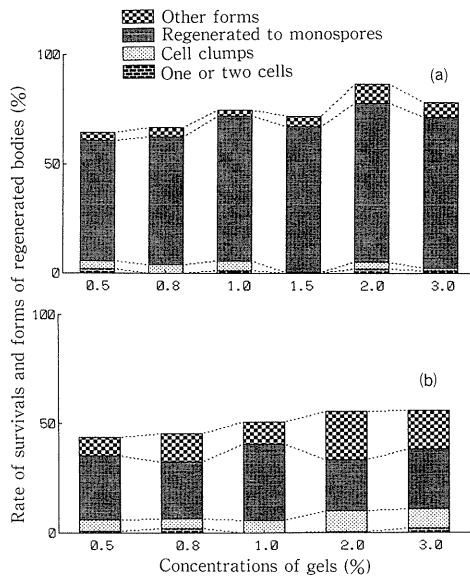


Fig. 5. プロトプラスト、単離細胞からの生長個体の生残率と形態の比率

Rates of survivals and forms of regenerated bodies from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolated cells were embedded in calcium alginate gels of six concentrations by aeration culture for 17days (a), and 24days (b).

細胞を包埋培養した場合の、生残率と形態の変化を Fig. 4. に、また、包埋に用いるアルギン酸ゲルの濃度と、プロトプラスト、単離細胞の生残率及び再生個体の各形態の占める比率の関係を Fig. 5. に示した。

プロトプラスト、単離細胞からの再生個体の形態については、寒天の場合と同様の傾向を示し、培養日数の経過とともに細胞塊となり、単胞子化を経て葉体となる個体が最も多く観察された。

ゲル濃度と生残率の関係についてみると、寒天の場合と同様に、ゲルの濃度上昇とともに生残率の上昇傾向が見られている。

培養開始後17日目の値を Fig. 5. (a) に示した。生残率はアルギン酸ゲル濃度0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の順に、64.5, 67.1, 75.1, 72.1, 87.2, 78.6%となり、高濃度側で高くなっている。

別の培養実験による培養開始後24日目の値を Fig. 5. (b) に示した。生残率はアルギン酸ゲル濃度0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0%の順に、43.8, 45.6, 50.5, 55.2, 55.7%となり、(a)と同様高濃度側で高くなった。

単胞子化率に注目してみると、(a)の生残個体に対する単胞子化率は、アルギン酸ゲル濃度0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の順に、85.6, 87.2, 88.1, 92.5, 83.6, 88.2%となり、各実験区の供試個体数に対する単胞子化率は、55.2, 58.5, 66.1, 66.7, 72.9, 69.3%となった。

(b)での生残個体に対する単胞子化率は、アルギン酸ゲル濃度0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0%の順に、66.9, 56.8, 68.7, 42.4, 48.7%となり、各実験区の供試個体数に対する単胞子化率は29.3, 28.7, 34.7, 23.4, 27.1%となった。なお、0.3%濃度についてはゲルの分解が激しく、生残率、単胞子化率の観察はできなかった。

以上の結果より、寒天と同様にゲル濃度の上昇に伴って、生残率は上昇する傾向を示すと判断できよう。また、プロトプラスト、単離細胞から単胞子化を経て葉体となる個体の割合は、アルギン酸ゲルの場合、0.5~3.0%の範囲内では大きな違

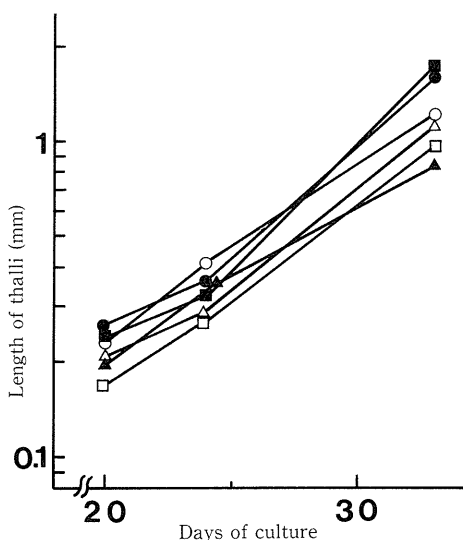


Fig. 6. 通気培養したプロトプラスト, 単離細胞に由来する葉体の生長

Growth of thalli regenerated from protoplasts and isolated cells.

Protoplasts and isolated cells were embedded in calcium alginate gels of six concentrations by aeration culture.

■: 0.3%, ○: 0.5%, ●: 0.8%, △: 1.0%
▲: 2.0%, □: 3.0%

いはなかった。しかし、液体培地中で通気培養を行う場合、ゲル濃度0.8%以下ではゲルは分割小片化して消滅しやすく、ゲルの強度の点からは、

1.0%以上の濃度が必要であった。

0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0%の6段階の濃度のアルギン酸ゲルに、プロトプラスト, 単離細胞を包埋して培養した場合の葉体の生長を Fig.6. に示した。培養開始後33日目には、濃度の順に 1.75, 1.22, 1.63, 1.15, 0.84, 0.98mmとなり、寒天と同様に、ゲル濃度の上昇とともに生長が遅れる傾向が見られる。

先述のように、アルギン酸ゲルは液体培地中で通気培養する場合、0.8%以下では分割小片化しやすく、3.0%までは濃度の上昇とともに生残率が上昇する傾向を示したが、生長は高濃度側で悪くなる傾向を示し、したがって、ゲルの強度、プロトプラスト, 単離細胞の生残率, 生長速度の点から、1.0%前後の濃度が適当と考えられる。

3. 今後の問題点

プロトプラスト, 単離細胞の作出材料としたノリの品種“佐賀5号”は、比較的単胞子を多量に放出する性質を持っているが、単胞子形成能の低い品種についても同様の傾向を示すかどうか検討を加える必要があろう。また、ノリについては、プロトプラスト, 単離細胞の再生形態を制御する技術が確立されておらず、今後の大きな課題である。

要 約

1. ノリのプロトプラスト, 単離細胞を寒天及びアルギン酸カルシウムのゲルに包埋し、液体培地中で通気培養した。
2. プロトプラスト, 単離細胞の再生形態としては、細胞塊から単胞子化を経て葉体となるものの比率が高かった。
3. 寒天での包埋培養では、1.5%での生残率と単

約

- 胞子化率が高く、葉体の生長は低濃度で高くなり、効率的に葉体の再生を起こさせるには、1.0~1.5%での培養が適当と考えられる。
4. アルギン酸カルシウムゲルでの培養では、葉体の生長及び培養時のゲルの強度の点から、1.0%前後の濃度が適当と考えられる。

文 献

- 1) 鬼頭 鈞 1985: ノリのプロトプラストの作出と個体の再生. 研究ジャーナル, 8(9), 20-24.
- 2) 藤田雄二・右田清治 1985: 数種海藻からのプロ

- トプラストの分離と培養. 長崎大学水産学部研究報告, (57), 39-45.
- 3) 幡手英雄・青木恭彦・荒木利芳・北御門 学

- 1986：細菌起源のスサビノリ細胞壁溶解酵素の調製。Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.,52(3),545-548.
- 4) 荒木利芳・青木恭彦・北御門 学 1987：スサビノリ野生株とアサクサノリ緑色変異株からのプロトプラストの作出と再生。Nippon Suisan Gakkai-shi,53(9),1623-1627.
- 5) 川村嘉広・馬場浴文 1990：細菌粗酵素によるノリのプロトプラスト，単離細胞の作出。佐有水試研報，(12)，101-107.
- 6) Yuji Fujita and Seiji Migita 1987：Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* UEDA and development of fusion products. Jap. J. Phy. col.,35, 201-208.
- 7) Toshiyoshi Araki and Tatsuo Morishita 1990：Fusion of Protoplasts from Wild Type *Porphyra yezoensis* and Green Type *P. tenera* Thalli (Rhodophyta). Nippon Suisan Gakkaishi, 56(7), 1161.
- 8) C. R. K. Reddy, Munehisa SAITO, Seiji MIGITA and Yuji FUJITA 1990：Intragenetic fusions of isolated protoplasts from *Ulva* and *Porphyra* by electrofusion method. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.,(68),21-27.
- 9) 水上 譲 1990：アマノリプロトプラストの融合細胞形成率に及ぼす細胞壁溶解酵素の影響。西海ブロック藻類・介類研究会報，(7)，21-26.
- 10) 片山勝介 1986：養殖ノリの変異株とそのプロトプラスト。岡山水試報，(1)，9-93.
- 11) 佐賀県有明水産試験場 1988：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-35.
- 12) 福岡県有明水産試験場 1990：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-19.
- 13) 佐賀県有明水産試験場 1989：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-15.
- 14) 佐賀県有明水産試験場 1990：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。平成元年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-16.
- 15) 福岡県有明水産試験場 1988：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-30.
- 16) 福岡県有明水産試験場 1989：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-17.
- 17) 佐賀県有明水産試験場 1987：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。昭和61年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-18.
- 18) Yuichi T. and Atushi K. 1982：Effects of Culture Condition on Cell Division and Composition of Regenerated Cell Walls in *Vinca rosea* Protoplasts. Plant and Cell Physiol., 23 (2), 249-255.
- 19) 石崎 寛 1986：糸状菌のプロトプラスト。遺伝，40(6)，9-14.
- 20) 佐賀県有明水産試験場 1991：ノリのプロトプラスト，単離細胞及び組織片の培養による優良株クローン種苗化技術開発研究。平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書，1-23.

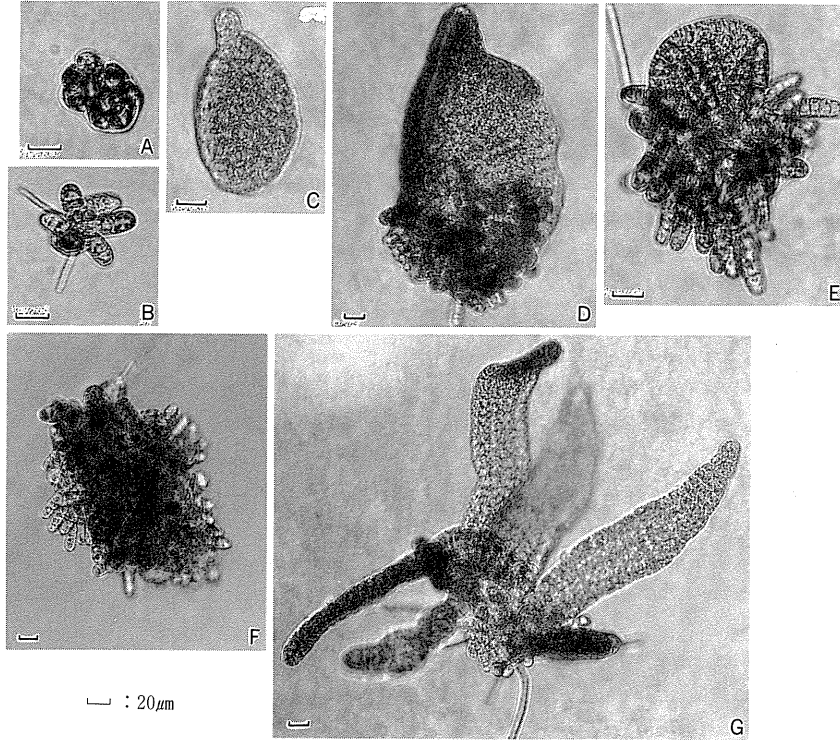


Plate 1.

- A : Small cell clump just changing to monospores, wholly.
- B : Growth of monospores.
- C : Large cell clump.
- D : Same cell clump as C just changing to monospores, partially.
- E : Large cell clump half changing to monospores.
- F : Large cell clump changed to monospores, wholly.
- G : Regenerated thalli.