

ノリのバイオテクノロジー研究の現状と課題

岩淵 光伸
(有明海研究所)

Progress of studies on Biotechnology in *Porphyra*

Mitsunobu IWABUCHI
(Ariakekai Laboratory)

はじめに

ノリのバイオテクノロジー研究開始以前にはノリの葉体からプロトプラストを単離して、それを再生させることはかなりの困難を伴うことではないだろうか危惧していた。それはバイオテクノロジー研究が進んでいた陸上植物でさえ、プロトプラスト再生系が確立されていた種はごく少数だったからである。ところが研究を進めていくと、ノリのプロトプラスト単離と再生は陸上植物に比べてかなり容易であることが分かってきた。ここでは現在までの当所におけるバイオテクノロジー研究の経過について簡単にまとめてみたい。

1. ノリ葉体からのプロトプラスト単離

ある植物からプロトプラストを大量に単離するには酵素の種類と、材料となる組織(一般的には葉)の条件が重要である。陸上植物の場合には、細胞壁の主成分であるセルロースを分解する酵素として多数のセルラーゼが市販されており、それらの酵素の中からそれぞれの材料に適したものを選べる。ところがアマノリ類の細胞壁はポルフィラン、マンナン、キシランから構成されており、市販のセルラーゼでは役に立たない。そこで海藻を餌料とするアワビ、ウニ、サザエの消化器官から抽出した粗酵素が、どの程度ノリのプロトプラスト単離に有効であるか検定した。¹⁾

その結果いずれの粗酵素を用いてもプロトプラストを単離することが可能であった。プロトプラストが最も多く単離され、また市販されているという理由から、アワビ消化器官のアセトン粉末(AAP)を選び、この酵素で活性の高いプロトプラストを最も効率よく単離するための条件検定に多くの時間を要した。^{1, 2)}しかしAAPの活性はそれほど強力なものではなく、またLot.による活性の違いもあって、常に安定してプロトプラストを単離するためには、材料となる葉状体の選別が重要であった。このことは、材料によってはプロトプラストが単離できないということであり、プロトプラストを育種素材として実用的なものとするためには、より強力な酵素を必要とした。

そのような中、1989年にノリのプロトプラスト単離用として、アルカリヘミセルラーゼ(AHC)という酵素が市販されるようになった。この酵素の出現によってノリのプロトプラスト単離効率は飛躍的に高まった。プロトプラストの単離しやすい有明海で養殖した葉体を材料にプロトプラスト単離数を比較すると、AHCはAAPの100~1000倍のプロトプラストを得ることができた(表1)。またプロトプラストの単離が難しい室内培養によって葉長10cm以上に生育した葉体でさえ、酵素処理時間を長くすることによってプロト

表1 AAPとAHCのプロトプラスト単離量の比較
(葉体 0.1 g 当たり)

AAP	4.0~5.0×10 ⁴ 個
AHC	0.4~1.4×10 ⁷ 個

プラストを単離することが可能となった。このことは、プロトプラストを葉体に再生させることが可能となれば、その葉体を材料にして再びプロトプラストを単離することが可能であることを意味するもので、プロトプラストを育種素材として利用するための第一の難関を越えたと言える。

現在筆者がノリ葉体からプロトプラストを単離する際の手順を図1に示した。これから分かるように材料によってAHCの処理時間にかかなりの違いが見られる。例えば有明海で養殖された葉長3~5 cmの葉体の場合は、2、3時間の処理で十分な数のプロトプラストが得られる。しかし室内培養による日令のかなり経過した葉体の場合は、20時間程度AHC処理をして初めてプロトプラストが単離される。余程硬い葉体でない限りこの処理法によってプロトプラストが得られる。このような長時間のAHC処理によって単離されたプロトプラストは、再生しないのではないかと懸念もあったが、ビーズ培養法で培養することによって葉体に再生させることが可能である。

このように現状ではプロトプラストを単離するという点において技術的な問題はない。ただAHCの価格は非常に高く、またLot.によって酵素活性に差がある。このため材料となる葉体の硬さに合わせて酵素濃度を調整したり、あるいはAAPとの混合を考えてできるだけ経済的にプロトプラストを単離することを考えねばならない。

2. プロトプラストの再生方法

ノリプロトプラストは液体培地、固形培地いづれでも培養可能である。しかし液体培地の場合、培養初期の分裂で生じた娘細胞同志が離れてしまう現象がかなり高い頻度で確認された。^{2, 3)} 陸上植物のプロトプラストでこのような現象が認められたと言う報告は見あたらない。この現象を説明

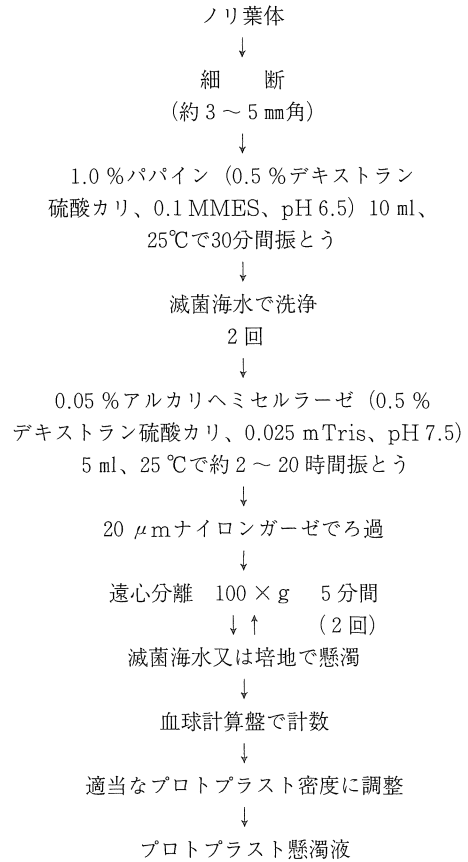


図1 プロトプラストの単離方法

するものとして青戸ら⁴⁾は液体培地では細胞壁の構成糖が培地中に溶出するためであろうと推論している。また多取性を追究したノリ養殖品種から単離したプロトプラストだから見られる現象ではないかとも推察され、今後の検証が必要である。

筆者は現在、アガロースを1.0~1.2%含むSWM-Ⅲ改変培地を用いてプロトプラストをシャーレ中に固定させた後、SWM-Ⅲ改変培養液を重層して培養している。特にアガロースについては、培地に固定する際にできるだけ高温にならないように、ゲル化温度の低いシグマ社製のType VIIを使用している。⁵⁾ また培養条件としては、温度15~20°C、照度2,000~5,000 lux、日長周期10L14Dである。この条件で培養開始後40日目まで60~80%の高い生残率が得られる。しかしこのよ

うに固形培地中で静置培養した場合、生残率は低くないが、個体が数百 μm に生長した後は生育が止まり、やがて細胞の色調が薄くなってしまって葉体に再生した個体を得ることは出来ない。そこでプロトプラストを一度アガロース培地に固定した後、培地を小ブロックに切り分けて培養液中で通気培養するビーズ培養を試みた。こうすることによって個体は生育を停止させることなく生長し、培養40日目には10数cmの葉体を得ることが可能となった。⁶⁾これらの培養法をまとめると図2のようになり、プロトプラストを生理実験や育種のためのスクリーニングに使用するにはシャーレ中で静置培養を行い、再生させて葉体を得るにはビーズ培養を行って、目的に応じて培養法を選択すればよい。なお固形培地で30~40日間静置培養して生育の停止した個体でも、ビーズ培養に切り替えることによって再び生長を始め、大型の葉体に生長することが確かめられている。

以上述べた培養法における培地中には、ビーズ培養の培養液を除いて、基本的に抗生物質（ペニシリンG）を添加しなければならない。固形培地の場合には抗生物質を添加しなければ細菌の増殖が著しく、プロトプラストの再生が阻害される。幸い少量のペニシリンGはプロトプラストの再生に有害な影響を与えないと考えられるが、まったく影響が無いことは証明されていない。本来プロトプラストの培養は、無菌的な条件下で行うことが望ましい。なぜならプロトプラストの再生における栄養要求性等を調べるには、無菌的な条件が必要不可欠なためである。プロトプラストの無菌培養系の開発が望まれる。

3. プロトプラストの再生形態

陸上植物のプロトプラストは細胞壁の再生後分裂を始め、カルスとなる。このカルスは植物生長調整物質の働きによって、個体へと分化する。しかし個体への分化は非常に困難を極め、個体再生技術の確立した植物種は未だそう多くはない。¹³⁾ノリのプロトプラストでは葉体への再生そのものは前述したようにそれほど困難なことではない。つまり植物生長調整物質を必要としないし、細菌

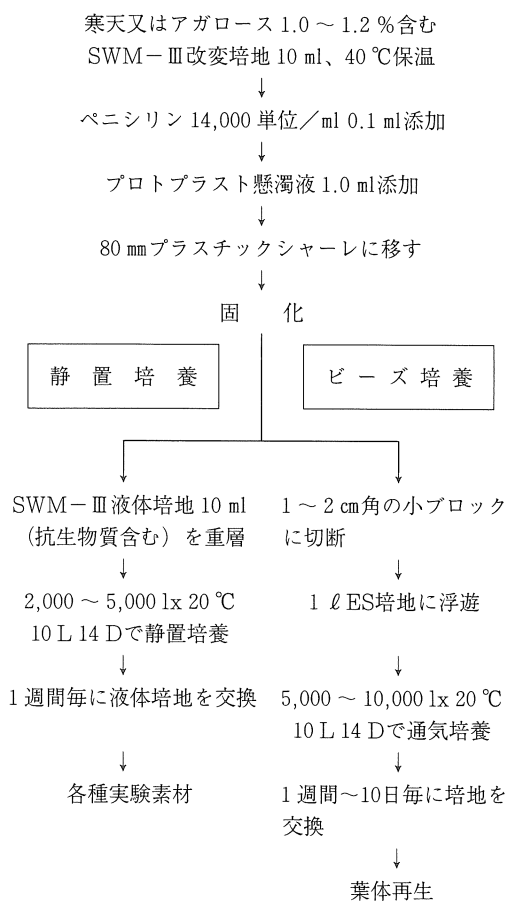


図2 プロトプラストの培養方法

の増殖を抑えるために添加する抗生物質も、再生葉体を得るということに関してはそれほど大きな障害とならない。しかしその再生形態は、材料となる母藻の性質、培養の条件それに培地の組成などによって異なり、ノリのプロトプラストは必ずこのように再生するという確たるものはない。したがって同条件で培養しても再生形態に相違が生じることがある。ただストレプトマイシンのように再生に影響を与えることが報告されている物質を含まないアガロース培地では、高い確率でほぼ次のような再生をする。

アガロース培地に固定されたプロトプラストは、早いものでは単離した翌日、多くのものは2~3日後には最初の分裂を行って2細胞となる（図3 B）。その後は時間の経過とともに分裂を繰り返

して細胞数は増加するが、この分裂は殻胞子や中性胞子の分裂とは異なり、分裂方向に規則性が認められない(図3C)。培養5日を過ぎる頃から細胞質の色調が濃くなり、細胞が丸みを帯びた個体が出現する。これは細胞が中性胞子に分化していることを示し、やがて個体の細胞壁は破れ中性胞子が複数個放出される(図3D)。ただしアガロース培地中であるため中性胞子はお互いにごく近い場所に留まる。この中性胞子はすぐに発芽していわゆる二次芽となる(図3E)。この二次芽は通常の中性胞子と全く同様の発生を行う。静置培養では、この二次芽は30~40日も経過すると生育が止まり、二次芽の集合体となる(図3F)。ところがビーズ培養を行うと個体の生長は早く、培養40日程度でまったく正常な葉体に再生する(図3G・H)。

個体の細胞の中には単胞子化と同時に成熟化するものも存在し、精子、造果器に分化するものがある。これらは受精後糸状体として発芽する。この糸状体はアガロース培地中に固定した中で発芽したことから、明らかに自家受精によって生じた糸状体と言える。糸状体が生じる割合は静置培養では高く、遺伝的にホモな糸状体を確実に得られることから、品種の固定に役立つものと考えられる。

4. プロトプラスト再生系の実験素材としての利用

プロトプラストを単離培養して、それが60~80%程度の率で生残・再生することが確実にとなると、プロトプラストを種々の実験素材として利用することが可能になる。またプロトプラストから再生した一枚の葉体を材料にして、再び単離したプロトプラスト、あるいは再生葉体は遺伝的にクローンであり、種々の実験材料として有利である。

例えば筆者らは、スミノリ症の原因を究明するための基礎的な実験として、製品にするとスミノリになるノリ葉体を培養し、その培養海水をプロトプラストを固定したアガロース培地上に重ねた。その結果、無処理のものはプロトプラスト生残率

は著しく低下したが、熱処理を加えたものは対照区と同程度の高い生残率を示した(図4)。このことからスミノリ症葉体を培養した海中には、プロトプラストの再生に悪影響を及ぼす物質が存在する事が証明された。⁷⁾

またプロトプラストの紫外線に対する感受性をその生残率として数値化することも可能である(図5)。

この他にも、種々の薬剤がノリに及ぼす影響をプロトプラストの生残率や再生形態の違いで調べることが可能である。従来これらは葉体の生長度等によって調べるしか方法がなく、実験素材としてのノリ葉体は、遺伝的不均一性や健全性に問題があった。陸上植物のプロトプラスト再生には極めて高度な技術を必要とするものも多いが、ノリのプロトプラスト再生には特別な技術を必要とせず、極めて容易である。このことから今後はプロトプラストから再生した葉体やプロトプラスト再生系を利用した実験が増えるものと予想される。

5. 育種研究の今後

バイオテクノロジー研究には、新品種を開発するという極めて実用性の高いことを直接の目的とするもの、あるいは遺伝子解析のように生物の本質を追究する中から実用性を求めるという研究がある。ここでは育種におけるノリのバイオテクノロジー研究が抱える問題について述べたい。

ノリのプロトプラストを単離して、それを葉体に再生させることは、極めて容易である。プロトプラスト再生系を利用した育種についてはすでに研究が始められており、筆者らは細胞育種という観点からプロトプラスト再生系によって突然変異体を効率良く選別し、実用性の高い新品種を開発する事を目標にしている。⁸⁾ また細胞融合についてはすでに報告がなされ、^{9, 10)} さらに遺伝子導入についても研究が始められている。

このようにバイオテクノロジーを利用した育種についての技術的な問題は年々解決されつつあるものの、すぐに優れた品種が開発されることを期待して良いかというと、それは簡単な事ではない。なぜならば優れた品種を開発するためには、我々

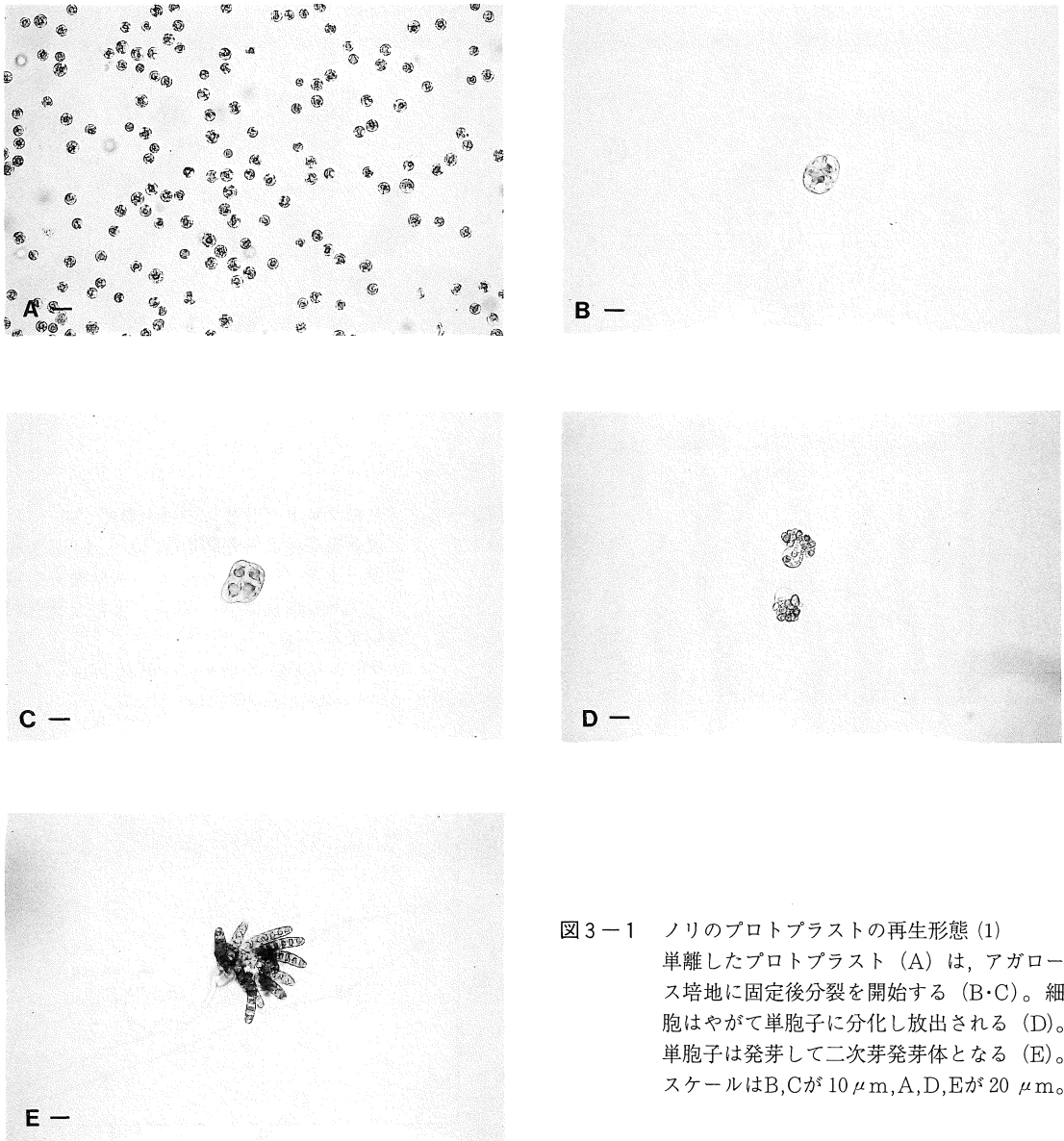


図3-1 ノリのプロトプラストの再生形態 (1)
単離したプロトプラスト (A) は、アガロース培地に固定後分裂を開始する (B・C)。細胞はやがて単胞子に分化し放出される (D)。単胞子は発芽して二次芽発芽体となる (E)。スケールはB,Cが $10\ \mu\text{m}$, A,D,Eが $20\ \mu\text{m}$ 。

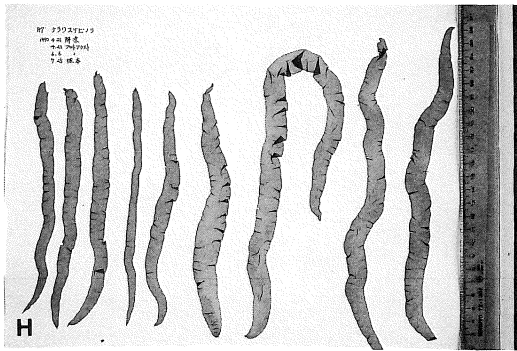
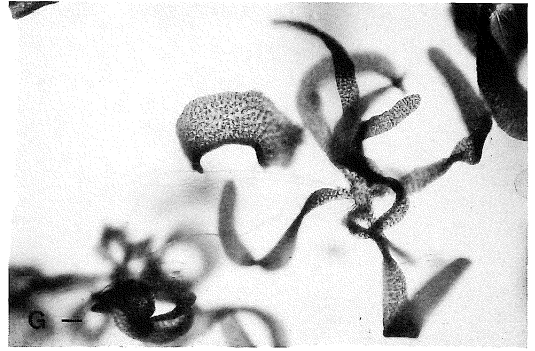
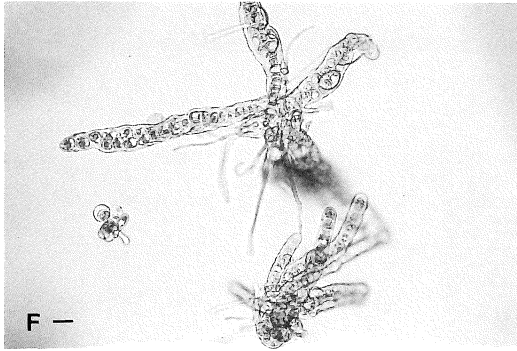


図3-2 ノリのプロトプラストの再生形態 (2)
 二次芽発芽体は培養開始後 30 ~ 40 日で生育が止まる (F)。しかしビーズ培養を行うと二次芽の成長は早く (G), 正常な葉体に再生する (H)。
 スケールはFが 20 μm , Gが 50 μm 。

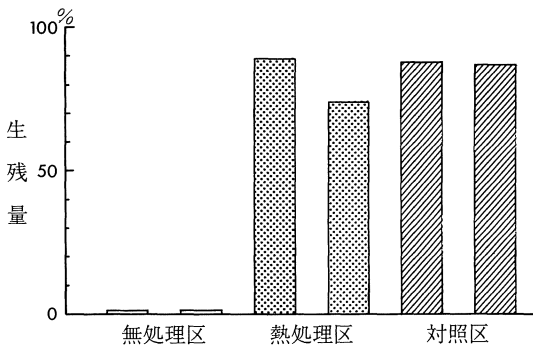


図4 スミノリ葉体培養海水を培地に使用した場合のプロトプラスト生残率
 無処理区: そのまま使用
 熱処理区: 80°Cで5分間処理して使用
 対 照 区: 通常の海水を使用

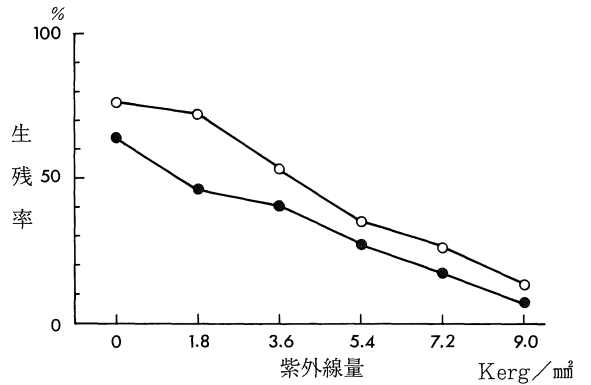


図5 紫外線量とプロトプラスト生残率との関係
 ○: 培養14日目 ●: 培養30日目

が望む特性, 例えば, 色が黒いとか味がよいなどの特性をいかにして評価するのかという問題が解消されなければならないからである。これまで我々は生長が良いという特性についてのみ追究を続け, 現在の様な大量生産時代を作ってきた。それは生長が良いという特性が非常に判別しやすい特性であったからに他ならない。それ以外の特性を評価する手段を我々が今後も持ち得なければ, いかにバイオテクノロジーを利用しても, 結局これからも生長の優れた品種が開発されるのみである。ノリの品種改良に関する限り, 特性評価技術の開発が早急に望まれ, それによって初めてバイオテクノロジーによる育種も大きな可能性を持つものと思われる。

文 献

- 1) 切田正憲・佐々木和之・岩渕光伸：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.
- 2) 佐々木和之・岩渕光伸：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.
- 3) 川村嘉応・馬場浴文・中武敬一：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.
- 4) 青戸泉・馬場浴文・北嶋博卿：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.
- 5) 岩渕光伸・福永剛：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.
- 6) 岩渕光伸・福永剛：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.
- 7) 半田亮司・福永剛・山下輝昌・岩渕光伸・池田伸義：高品質ノリ生産技術の開発に関する研究, 平成2年度水産業関係地域重要新技術開発促進事業報告書.
- 8) 岩渕光伸・福永剛：ノリのプロトプラスト種苗の利用による地域に適合した新品種の開発. 平成3年度地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業報告書.
- 9) Y. FUJITA and S. MIGHTA : Fusion of protoplasts from thalli of two different color type in *Porphyra yezoensis* UEDA and development of fusion products. *Jpn. J. Phycol.*, 35, 201 - 208 (1987).
- 10) Y. FUJITA and M. SAITO : Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia.*, 204 / 205. 161 - 166 (1990).
- 11) 中島哲夫：細胞融合技術開発の現状 研究ジャーナル, 東京, 1990, 13 (5), 3 - 12.