

紫外線がノリプロトプラストに及ぼす影響

岩瀬 光伸
(有明海研究所)

Effect of UV-rays in *Porphyra* Protoplasts

Mitsunobu Iwabuchi
(Ariakekai Laboratory)

一個体から単離されたプロトプラストは、クローンであり特にプロトクローン¹⁾と呼ばれている。クローンであるため、それらが再生した個体の集団は非常に似通った特性を示す。そのためクローン集団中に変異を起こした個体が存在した場合、その変異個体は他の個体との判別が容易である。したがって、変異個体をスクリーニングする確率は、クローンを材料に使用した方が使用しない場合と比較して、格段に高くなることが期待される。さらに、プロトプラストに対して突然変異誘発処理を行って変異誘発率を高めれば、突然変異個体の選抜は一段と容易になろう。陸上高等植物でもプロトプラストを利用した変異体の選抜による育種が盛んに行われるようになり、実用的な新品種も開発されている。またノリについてもプロトプラストを利用して、新品種が開発されつつある^{2, 3)}。しかし、ノリに対してγ線や紫外線照射などの変異誘発処理を行って、変異体が確認された報告は無い。本報告では、ノリのプロトプラストに対する変異体作出に有効な紫外線照射線量を明らかにするとともに、紫外線による変異誘発効果を確認したので報告する。

材料および方法

ノリプロトプラストの紫外線に対する感受性

プロトプラストは冷凍保存したノリ葉体(品種名福岡1号)を処理前日に解凍し、常法にしたがって作出した。密度調整後、あらかじめ38℃に保温しておいたSWM-Ⅲアガロース培地を用いてプラスチックシャーレに混植した。培地が固化したのち、紫外線を照射した。

紫外線は紫外線殺菌ランプ(東芝GL15)を使用し、紫外線量の測定は紫外線強度計(トプコンUVR25)で

行った。照射線量は強度0.3mW/cm²の紫外線を1, 2, 3, 4及び5分間の5段階、ならびに強度0.6mW/cm²の紫外線を0.5, 1, 1.5, 2及び2.5分間の5段階に設定した。紫外線照射試験は強度0.3mW/cm²の照射を2回、強度0.6mW/cm²の照射を1回の計3回行った。

紫外線照射ののち、SWM-Ⅲ培養液をアガロース培地上に重ね、照度2,000lux, 温度18℃, 11L:13Dの条件下で培養した。30日間培養後、再生している個体数を計数し、照射線量別の生残率を求めた。

紫外線照射後の暗処理の効果

前記と同様にプロトプラストを固定した2枚のシャーレに、強度0.3mW/cm²の紫外線を2, 4, 6及び8分間照射し、SWM-Ⅲ培養液を重ねた。2枚のシャーレのうち1枚は3日間アルミ箔で包んで暗処理を行った。残りの1枚は、そのまま照度2,000lux, 温度18℃, 11L:13Dの条件下で培養した。暗処理を行ったシャーレも暗処理終了後は同様の条件下で培養した。32日間培養ののち再生個体数を計数して再生率を求めた。

紫外線による変異誘発試験

冷凍保存したノリ葉体(品種名福岡1号)から常法によりプロトプラストを単離した。アガロース培地に包埋後、1LのESS培養液で通気培養を行って再生葉体を得た。再生葉体の中から生長の良い1個体(葉長220mm, 葉幅22mm)を選抜し、その一部分から再びプロトプラストを単離した。SWM-Ⅲアガロース培地で密度 1.5×10^4 個と 1.0×10^4 個に調整してシャーレに固定後、 1.5×10^4 個に調整したシャーレのみ強度0.3mW/cm²の紫外

線を90秒間照射した。

どちらのシャーレも5日間暗処理を行ったのち、アガロース培地ごと1LのESS培養液で通気培養を行った。培養条件は、照度8,000lux、温度18℃、11L:13Dの条件であった。通気培養を開始後28日目に培養を終了し、葉長上位50個体の葉長と葉幅を測定した。

後代検定

紫外線照射したプロトプラスト再生葉体の中から、葉長43mm、葉幅14mm、葉長葉幅比3.1の葉体を選抜し、プロトプラストを単離した。調整したプロトプラストは、アガロース培地に包埋したのちESS培養液で通気培養を行った。培養条件は照度8,000lux、温度18℃、11L:13Dとした。33日間培養を行い、葉長と葉幅を測定した。

結果および考察

ノリプロトプラストの紫外線に対する感受性

紫外線照射線量別の個体生残率を図1に示した。生残率は紫外線強度に関係なく、紫外線照射線量とのみ強い関連性が認められ、照射線量の増加にともなって低下した。3回の試験の平均から、生残率は無処理区に比較して3.6~5.4Kerg/mm²で半減し、9Kerg/mm²では10%を下回ることが分かる。坂西らは*Macrocystis pyrifera*の培養細胞に対する紫外線の感受性を調べ、生残率が半減するのは20~40Kerg/mm²であると報告している⁴⁾。これに比較してノリのプロトプラストの感受性が高いのは、細胞壁が存在していないためであると考えられる。

紫外線などによって変異誘発処理を行う場合、照射線量が多いほど変異誘発率は高まることが期待される。し

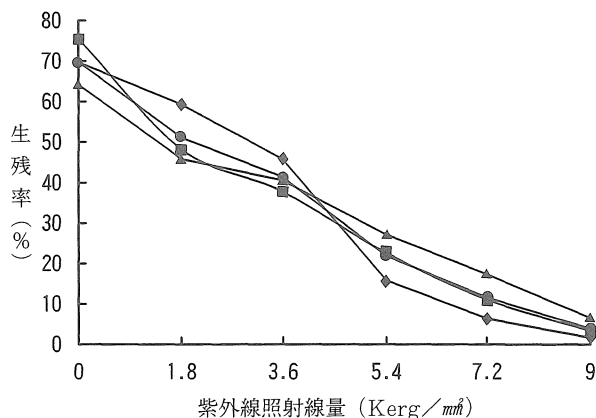


図1 紫外線照射線量とプロトプラスト生残率との関係
◆, ▲: 0.3mW/cm² ▲: 0.6mW/cm²
●: 平均

かし、逆に生残率は低下し、得られる変異個体数はかえって減少する。そこで多くの変異個体を得るには、生残率がほぼ半減する程度の照射線量が適当であると言われて⁵⁾。したがってノリのプロトプラストに関しては、約3.6~5.4Kerg/mm²の間の線量が適当であると考えられる。

紫外線照射後の暗処理の効果

紫外線照射後に暗処理をした試験区と、無処理の対照区の培養32日後における照射線量別の生残率を図2に示した。照射線量3.6Kerg/mm²では、対照区が約50%の生残率を示したのに対し、暗処理区は約20%であった。また照射線量7.2Kerg/mm²では対照区が約15%に対し、暗

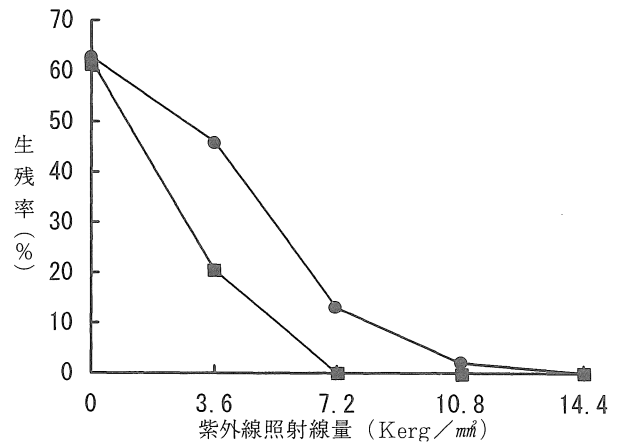


図2 紫外線照射後の暗処理がプロトプラストの生残に及ぼす影響
■: 暗処理区 ●: 対照区

処理区は0%といずれも暗処理区の方が生残率は低かった。

陸上植物では紫外線によってDNAが受けた損傷は、可視光線によって修復されることが明らかになっており、紫外線照射後には可視光線を遮断した方が、変異の誘発には適していることが確かめられている⁵⁾。今回の実験でも紫外線照射後に暗処理を行った方が生残率が低かったことから、ノリの場合にも可視光線によるDNAの修復作用が存在するものと考えられる。したがって、突然変異の効率を高めるためには、紫外線照射後に暗処理を行った方が良いと考えられる。

紫外線による変異誘発試験

紫外線照射区と未照射区における再生葉体の葉長上位50個体の葉長と葉長葉幅比の度数分布を図3ならびに図4に示した。紫外線未照射区の葉長は、110mm台をピー

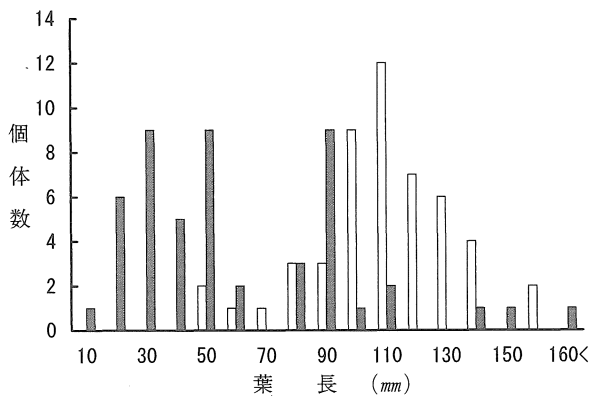


図3 紫外線照射区と未照射区のプロトプラスト再生葉体の葉長組成
 □ 紫外線照射区 ▨ 紫外線未照射区

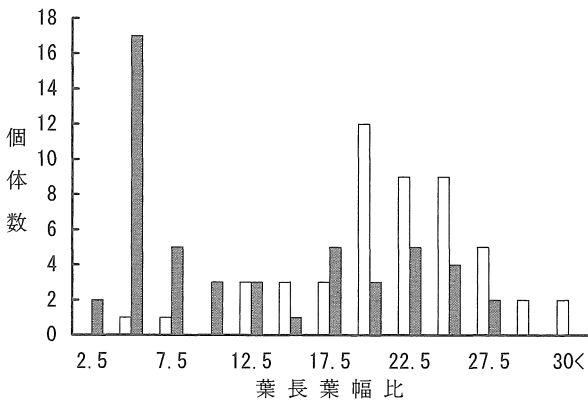


図4 紫外線照射区と未照射区のプロトプラスト再生葉体の葉長葉幅比の組成
 □ 紫外線照射区 ▨ 紫外線未照射区

クとして正規分布に近い分布を示しているが、照射区では多くの個体が100mm以下であり、ばらつきも大きかった。葉長葉幅比でも同様の傾向が認められ、未照射区は正規分布に近いが、照射区では10以下に多くの個体が見られるものの20以上にも14個体が存在し、ばらつきが大きかった。

表1には葉長、葉幅および葉長葉幅比の平均と標準偏差を示した。葉長の平均は、紫外線未照射区が104.5mm

表1 紫外線照射区と未照射区におけるプロトプラスト再生葉体上位50個体の葉長、葉幅、葉長葉幅比の平均と標準偏差

		紫外線照射区	紫外線未照射区
葉長 (mm)	平均	55.6	104.5
	標準偏差	37.5	23.1
葉幅 (mm)	平均	5.2	5.4
	標準偏差	2.8	1.2
葉長葉幅比	平均	11.4	20.1
	標準偏差	8.2	5.6

m、照射区が55.6mmと差が見られた。紫外線照射区の生長が遅れた理由は明らかではないが、紫外線によって損傷したDNAの修復にエネルギーと時間を要するために生長が遅れたのではないかと推察される。

一方、葉幅は紫外線照射区の方がやや大きく、このため葉長葉幅比は照射区が11.4、未照射区が20.1と、照射区の方が小さく、広葉となったことを示している。また標準偏差は、葉長、葉幅、葉長葉幅比のいずれも紫外線照射区の方が大きく、未照射区に比べてばらつきの大きいことが分かる。

再生葉体は遺伝的にクローンであることから、紫外線未照射区の標準偏差は環境変異を表していると考えられる。紫外線未照射区に比較して照射区のばらつきが大きかったのは遺伝変異を含んでおり、紫外線によって突然変異が誘発されたことを示唆している。実際には図5に示すように、紫外線未照射区では細葉で非常に似通った形態の葉体が再生したのに対して、紫外線照射区では細葉の葉体に混じって際立って広葉の葉体が見られ、この葉体が形態的な変異を起こした個体である可能性が高いと考えられる。

後代検定

紫外線照射によって生じた変異体ではないかと推察される、葉長43mm、葉幅14mm、葉長葉幅比3.1の葉体を母藻としてプロトプラストを単離した。プロトプラストを32日間アガロースビーズ培養して得られた再生葉体を図6に示した。また最大葉長上位50個体の葉長、葉幅ならびに葉長葉幅比の平均を表2に示した。再生した葉体の形態はすべて図5に見られる紫外線照射区の広葉の葉体に似ており、葉長、葉幅、葉長葉幅比いずれについてもその平均は母藻に近い値を示した。このことから、母藻の特性である広葉の形態は、遺伝的な形質であると判断された。したがって母藻は、紫外線照射によって突然変異が誘発され、それが形態的な変異として発現した個体であると考えられた。

変異誘発を確認した葉体の葉長葉幅比は3.1であったが、紫外線照射区の再生葉体のうち葉長葉幅比が3.1以下の個体は50個体中7個体に達する。これらがすべて変

表2 選抜葉体から単離したプロトプラスト再生葉体上位50個体の葉長、葉幅、葉長葉幅比平均

葉長 (mm)	38.9
葉幅 (mm)	10.3
葉長葉幅比	3.8

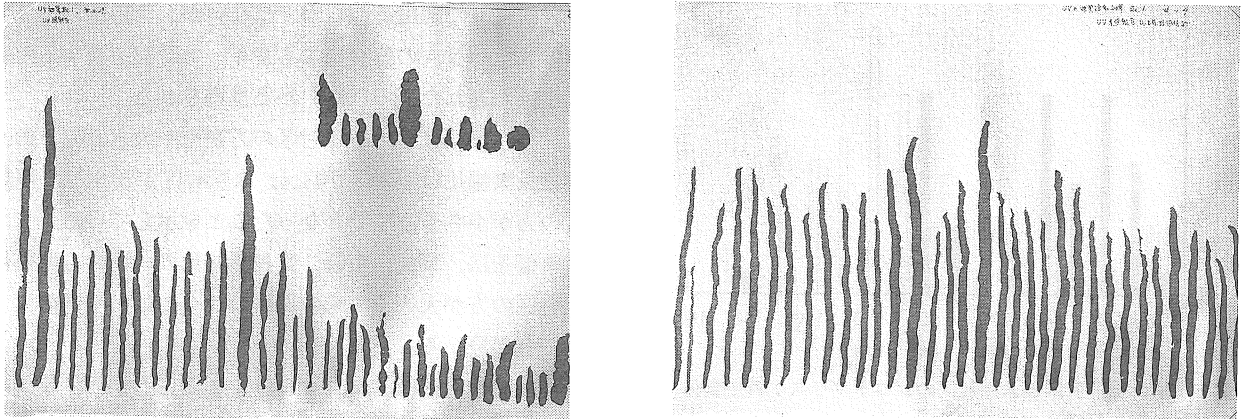


図5 紫外線照射区(左)と紫外線未照射区(右)の再生葉体

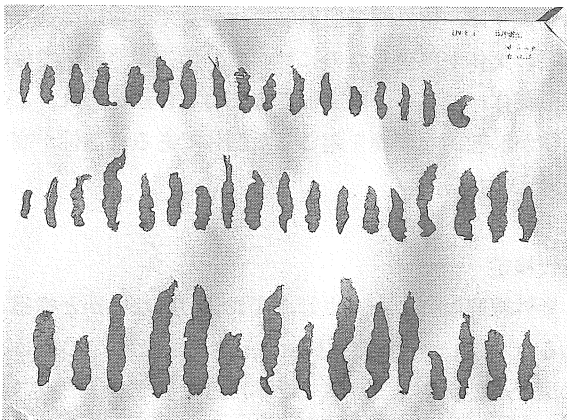


図6 紫外線照射区で見られた広葉の葉体から単離したプロトプラストの再生葉体

異体であると仮定すると変異誘発率は14%という高率になる。しかし、ノリプロトプラストは再生過程で2次芽に分化して個体数を増やすため、1個のプロトプラストに変異が起こってもそのプロトプラストから再生した葉体は多数得られること。ノリ葉体は単相世代であり非常に変異を起こしやすい性質を持っていると思われること。そして陸上植物においても種によってはプロトプラスト由来の再生体に多くの変異体が認められていることから¹⁾、今回のように変異体と推定される個体が多数得られたものと考えられる。

また、これらの変異の安定性については、糸状体期を経たのちの後代検定によって判断すべきものであり、変異によって獲得した性質と、安定した遺伝形質とは、明確に区別しなければならない。

いずれにしても、ノリのプロトプラストにとって紫外線は強い変異源であり、変異誘発効果が高いと判断して間違いはないであろう。今後は、この技術を利用して養殖に有用な形質を備えた品種を作出していくことが課題である。

文 献

- 1) 鈴木正彦：植物バイオの魔法，講談社，東京，1990，pp. 134-138.
- 2) 増田恵一，水田章，谷田圭亮：ノリ葉体プロトプラストを用いた選抜育種，月刊海洋，27，655-660 (1995).
- 3) 岩測光伸：体細胞変異の利用によるストレス耐性株の作出，月刊海洋，27，666-670 (1995).
- 4) Y. Sakanishi, N.Saga: The sensitivity of Cultured Cells to UV-rays in a Laminariales Plant., Nippon Suisan Gakkaishi, 56 (10), 1990, pp. 1699.
- 5) 西荒介：植物培養細胞の変異と選抜，講談社，東京，1985，pp. 1-56.