

第3章 成熟と仮根形成に及ぼす環境要因の影響

スジアオノリ藻体の先端部の栄養細胞は、生殖細胞へ直接分化することが、よく観察される。野外においては、アオノリ類の遊走細胞の放出は月齢に関係していると言われている。また、干出による物理刺激だけでなく、水温、光量、塩分も影響する (Christie and Evans 1962; Pandey and Ohno 1985)。室内実験においては、スジアオノリ藻体から直径 0.9 mm 程度の円形に切り取った小さな藻体片 (ディスク) の栄養細胞は 2~3 日で生殖細胞を形成し、放出することが報告されている (園ら 1997)。生殖細胞が放出された後の空の細胞は白く見えるため、栄養細胞および未放出の生殖細胞と容易に区別できる (図 3-1)。本章では、藻体を人為的に成熟誘導しスジアオノリの人工採苗をおこなうための藻体細断片のサイズ、温度、塩分、

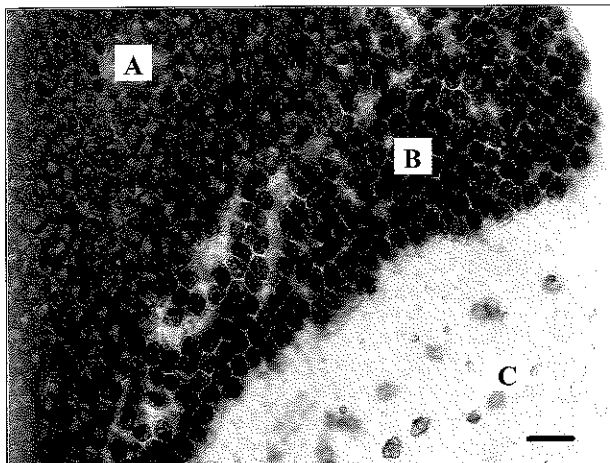


図3-1 成熟誘導後のスジアオノリのディスクの組織細胞。栄養細胞、成熟細胞、遊走細胞放出後の細胞の境界は色調により明瞭に識別できる。A, 緑色の栄養細胞; B, 生殖細胞を形成している茶色の細胞; C, 遊走細胞を放出した白色の空の細胞。横棒は 20 μm 。

光量についての最適条件を明らかにした。

アオノリの藻体を小さく切断すると基部方向の藻体片に仮根が形成されることが報告されている (Lersten and Voth 1960; Eaton *et al.* 1966; Moss and Marsland 1976; Reed and Russell 1979; Lee and Wichroski 1996; 園ら 1998)。本章では、成熟特性のほか仮根形成をおこなうための温度、塩分、光量についての最適条件を明らかにし、切断藻体片の組織培養によるスジアオノリの種苗作成の可能性を検討した。

材料および方法

1. 細断片のサイズ・温度

材料: 実験に用いたスジアオノリ藻体は、1997年12月に徳島県吉野川河口から2~4 kmの地点に自生していた

ものを採取し、15 $^{\circ}\text{C}$ の恒温室で塩分濃度 20 psu (滅菌海水に蒸留水を加え調整) の PES 培地中で実験開始まで保存したものである。藻体保存のための光量は調光装置付き白色蛍光灯下で 20 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期, 12時間暗期条件) に調整した。

藻体の細断ディスク・サイズと成熟との関係: 実験は、採取後2日間保存 (短期保存処理: 藻体長 25 cm, 30 cm, 藻体幅 3~4 mm) と5週間保存 (長期保存処理: 藻体長 90 cm, 藻体幅 3~4 mm) した藻体について行われた。短期処理の試料は、直径 0.9, 2.1 および 3.0 mm のディスクを作成した。それぞれのサイズのディスクを 48枚ずつ細断したが、藻体の先端よりサイズを違えて交互に皮細工用パンチを用い細断し、藻体の部位による成熟の影響を少なくした。長期処理の試料は、直径 0.9, 2.1, 3.0, 3.6, 4.5 および 9.0 mm (但し直径 4 mm 以上のディスクは円形ならず筒状になった) の6種類ディスクを 24枚ずつ細断した。

これらのディスクを塩分濃度 20 psu の海水でよく洗浄し、組織培養用マイクロプレート (48穴, イワキ株式会社) の各ウエルに1枚ずつ入れて培養した。短期保存処理の試料は6日間, 長期保存処理の試料は7日間培養し観察を行ったが、培養条件は 20 $^{\circ}\text{C}$ の恒温室で、塩分濃度 20 psu の PES 培養液に入れて、光量は 19 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期・12時間暗期条件) とした。毎日定時に顕微鏡による観察を行ったが、細断したディスク細胞の 50% 以上が遊走細胞になったものを、「成熟」と表示した。また、細断したディスク細胞の 50% 以上が遊走細胞の放出が終わった細胞で白い細胞壁だけになったものを「遊走細胞放出」と表示した。同時に仮根を持つディスクの測定を2日後あるいは5日後に行った。ディスクの成長量を知るために長径の長さを測定した。

培養温度と藻体ディスクの成熟との関係: 長期保存処理した藻体 (藻体長 90 cm, 藻体幅 3~4 mm) から直径 0.9 mm のディスクを 144枚作成し、塩分濃度 20 psu の海水でよく洗浄した。培養温度については、ディスクの入ったマイクロプレートを温度勾配恒温器 (TG 200-AD, 株式会社日本医化機械製作所) に静置し、5, 10, 15, 20, 25 および 30 $^{\circ}\text{C}$ の6実験区を設定した。顕微鏡観察、仮根出現数、ディスクの長径測定の方法と培養水の塩分濃度、光量の条件は前項の実験と同様とした。培養期間は7日間とした。

2. 塩分濃度・光量

材料: 実験に用いたスジアオノリ藻体は、1999年11月に徳島県吉野川河口から 5 km 上流の汽水域に自生していたものを採取し、塩分濃度 20 psu の PES 培地 1 l の入ったビーカーに入れ、実験開始まで保存したものである。藻体保存のための光量は調光装置付き白色蛍光灯で 40 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期, 12時間暗期条件) に調整した。

塩分濃度と藻体ディスクの成熟との関係： 遊走細胞形成のための最適な塩分条件を調査するために、海水を60℃以下で加熱または蒸留水で希釈し、様々な塩分濃度の海水を準備した。作成された海水の塩分濃度はサリノメーター(T.S. Digital lab. 鶴見精機株式会社)で測定され、その値は0, 1.6, 3.3, 5.0, 6.6, 13.2, 19.9, 26.3, 32.1, 39.4, 45.3, 52.0, 59.4, 66.3 psuであった。生殖細胞形成及び放出の程度を確認するために保存藻体(藻体長150 cm, 藻体幅3~4 mm)から皮細工用パンチを用い直径1.2 mmのディスクを切り出した。全部で336枚のディスクが使われた。ディスクを塩分濃度3.3 psuの滅菌海水で洗浄し、組織培養用マイクロプレート(48穴, イワキ株式会社)に移した。ディスクは、様々な塩分濃度の海水の満たされたウエルに1枚ずつ入れられ、20℃の恒温室内で調光装置付き白色蛍光灯下で40 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期, 12時間暗期条件)で5日間培養された。毎日、午前9:00~10:00に顕微鏡により観察をおこなった。遊走細胞を形成した藻体の成熟部分は黄色から茶色になるので認識できた。50%以上の成熟部分を持つディスクを「成熟」と定義した。また、遊走細胞の放出は空になった白色の細胞により容易に認識できた。遊走細胞を放出した部分を50%以上持つディスクを「遊走細胞放出」と定義した。成熟及び遊走細胞の放出の割合が、それぞれの試験区ごとに決定された。また、仮根を形成したディスクの数を細断3日後に計数した。

光量と藻体ディスクの成熟との関係： 生殖細胞形成のための最適な光量条件を調査するために、直径1.2 mmのディスク240枚が保存藻体(藻体長120 cm, 藻体幅4 mm)から切り出された。ディスクを塩分濃度20 psuの滅菌海水で洗浄し、1ウエルに20 psuの滅菌海水0.6 mlが満たされた48穴組織培養用マイクロプレートに移した。これらマイクロプレートは20℃, 光量0, 4, 8, 16, 24, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期, 12時間暗期条件)で5日間置かれた。光源は40Wの白色蛍光灯(日立株式会社)2本と27Wの白色蛍光灯(三菱株式会社)4本を上方にセットした。光量の調節は、光源からのマイクロプレートの距離を変えることと、薄い黒色のメッシュ布をフィルターとして用いることによりおこなった。光量は光量子計(ライカLI-250)で測定した。成熟, 遊走細胞放出, 仮根形成の観察は上記と同様の方法でおこなった。

3. 藻体の基部から先端部までの遊走細胞放出の割合

2001年11月に吉野川の河口から6 km上流で採取したスジアオノリ天然藻体(藻体長1670 mm, 幅4~5 mm)を、先端から20 cmごとに皮細工用のパンチを用い直径0.9 mmのディスクを30枚ずつ切り出した。ディスクを20 psuの海水で充分洗浄したのち、20 psuの海水50 mlが満たされた滅菌プラスチックペトリ皿(直径90 mm, 高さ

20 mm)に入れ、切り出した場所ごとに最先端を1番とし基部に向かい9番まで番号を割り当てた。ディスクは、20℃, 光量40 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (12時間明期, 12時間暗期条件)で3日間培養した。ディスクを正立顕微鏡(Nikon OPTIPHOT, 株式会社ニコン, 東京)に装着したデジタルカメラ(COOLPIX990, 株式会社ニコン)で1枚ずつ撮影し、画像解析ソフト(Win Roof 3.5, MITANI CORPORATION)で未成熟部分及び生殖細胞の未放出部分がディスク全体に占める面積の割合を測定し、次式により遊走細胞放出部分の面積の割合を求めた。

$$\text{遊走細胞放出の面積(\%)} = 100\% - \% \text{ディスクにおける緑色と茶色の面積}$$

結果

1. 細断片のサイズ・温度

藻体の細断ディスク・サイズと成熟との関係： 短期保存処理藻体について、細断後経過日数に伴う「成熟」ディスク割合の推移を図3-2に示した。直径0.9 mmディスクでは経過日数につれて「成熟」ディスクの割合が高くなり、6日後には100%になった。2.1と3.0 mmディスクでは実験期間中10%以下の低い値で推移していった。これらのディスクは実験期間を通じ一部が成熟しただけであった。また、2.1 mmディスクでは6日後においても10%のディスク

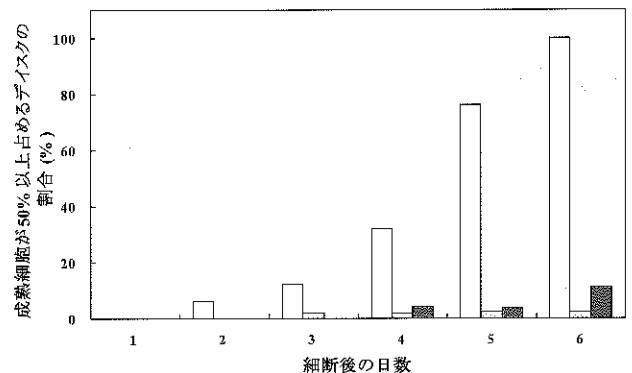


図3-2 細断後の日数と成熟との関係を示した。ディスクは採取後2日の藻体から切り出され、6日間培養された。成熟細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。

ディスクの直径: □, 0.9 mm; ▨, 2.1 mm; ■, 3.0 mm

表3-1 異なるディスクの大きさにおける相対成長割合と仮根形成割合

ディスクの大きさ(直径)	0.9mm	2.1mm	3.0mm
相対成長割合(%) ¹⁾	107	166	121
相対仮根形成割合(%) ²⁾	27	96	76

1)相対成長割合(%)=5日後の平均直径値/初期直径値×100
2)相対仮根形成割合=5日後の仮根保有ディスク数/48×100

が未成熟であった。2.1と3.0 mm ディスクは0.9 mm ディスクに比べて成長に向かい、仮根を持つ割合も高くなった(表3-1)。

長期保存処理藻体について、細断後の経過日数に伴う「成熟」ディスク割合の推移を図3-3に示した。経過日数に伴う「成熟」と判定されるディスク割合の増加率を成熟速度とみなすと、ディスクの大きさが小さいものほど成熟速度が速くなっており、しかも直径9.0 mmのディスクは、7日後に90%以上「成熟」した。

細断後の経過日数に伴う「遊走細胞放出」と判定されるディスク割合の推移を図3-4に示した。遊走細胞放出についても「成熟」と同様に、ディスクの大きさが小さいものほど短期間の内に胞子を放出したが、それぞれの値は、成熟についての値(図3-3)より1日ほどずれて値が高くなる傾向が見られた。ディスクは各サイズとも実験終了時まで、成長が少なかった。細断後2日ではディスクのサイズが大きくなるにつれ仮根を持つディスクの割合が高い傾向にあったが、5日後では0.9 mmを除きどのサイズも90%以上の有仮根率を示した(表3-2)。

培養温度と藻体ディスクの成熟との関係： 細断後の

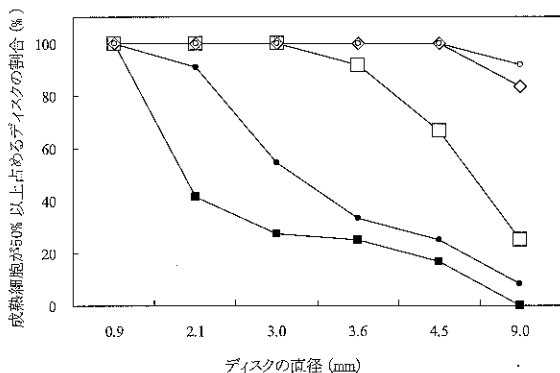


図3-3 ディスクの大きさと成熟との関係を示した。ディスクは採取後5日の藻体から切り出され、7日間培養された。成熟細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(■)、4日間後(●)、5日間後(□)、6日間後(◇)、7日間後(○)

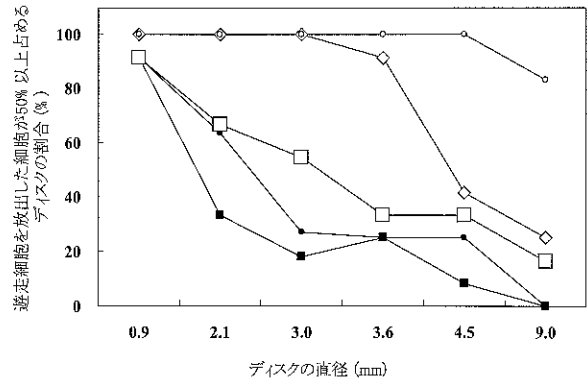


図3-4 ディスクの大きさと遊走細胞放出との関係を示した。ディスクは採取後5日の藻体から切り出され、7日間培養された。遊走細胞を放出した細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(■)、4日間後(●)、5日間後(□)、6日間後(◇)、7日間後(○)

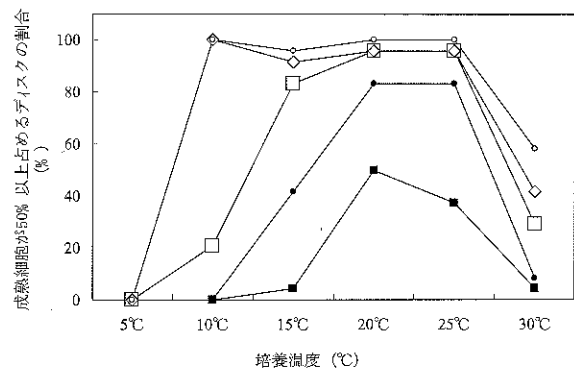


図3-5 培養温度と成熟との関係を示した。ディスクは採取後5日の藻体から切り出され、7日間培養された。成熟細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(■)、4日間後(●)、5日間後(□)、6日間後(◇)、7日間後(○)

経過日数に伴う「成熟」ディスク割合の推移を図3-5に示した。20°Cで最も成熟速度が速く、それよりも培養温度が高く、若しくは低くなると成熟速度は落ちた。実験終了時に、5°Cでは全ディスク、10°Cでは4%、30°Cでは8%のディスクが未成熟であった。細断後の経過日数に伴う「遊走細胞放出」ディスクの割合の推移を図3-6に示し

表3-2 採取後5日後の藻体を用いた、異なるディスクの大きさにおける相対成長割合と仮根形成割合

ディスクの大きさ	0.9 mm	2.1 mm	3.0 mm	3.6 mm	4.5 mm	9.0 mm
相対成長割合 ¹⁾ (%)	105	113	114	110	110	114
相対仮根形成割合 ²⁾ (%)						
2日後	50	67	75	88	92	92
5日後	58	92	92	100	100	100

1) 相対成長割合 (%) = 7日後の平均直径値 / 初期直径値 × 100

2) 相対仮根形成割合 (%) = 2または5日後の仮根保有ディスク数 / 24 × 100

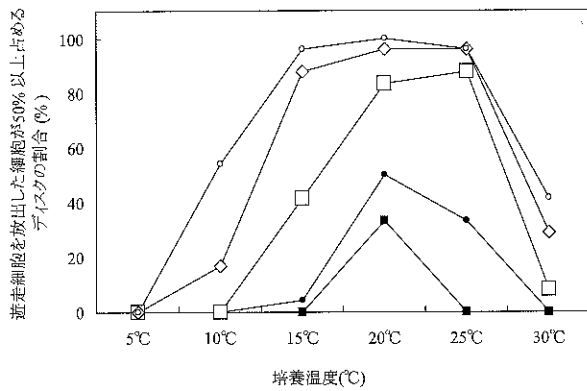


図3-6 培養温度と遊走細胞放出との関係を示した。ディスクは採取後5日の藻体から切り出され、7日間培養された。遊走細胞を放出した細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(■), 4日間後(●), 5日間後(□), 6日間後(◇), 7日間後(○)

た。「成熟」と同様に20℃が最も短期間に孢子放出割合が高くなり、10℃及び30℃では遊走細胞放出速度は遅れた。15℃以下で有根率は95%以上を示したが、20℃以上は0~30%と低かった。どの温度においてもディスクの大きさは実験終了時まで目立った増加が見られなかった(表3-3)。

2. 塩分濃度・光量

塩分濃度と藻体ディスクの成熟との関係： 図3-7に、異なる塩分濃度での「成熟」の割合を示した。藻体から切り出して5日後に、「成熟」となった割合が70%以上になったのは塩分濃度5.0~52.0 psuの範囲であった。6.6 psu以下および59.4 psu以上では、割合が減少した。0, 1.6, 66.3 psuでは、「成熟」となる割合は0%であった。図3-8に、「遊走細胞放出」となる塩分濃度の範囲を示した。藻体から切り出して4および5日後に、「遊走細胞放出」となった割合が50%以上になったのは塩分濃度13.2~45.3 psuの範囲であった。「遊走細胞放出」となる割合は、13.2 psu以下と45.3 psu以上で減少した。3.3 psu以下と59.4 psu以上では、「遊走細胞放出」となる割合は0%であった。

光量と藻体ディスクの成熟との関係： 図3-9に、異なる光量値での「成熟」の割合を示した。培養5日後では、16 μmol s⁻¹m⁻²以上の条件下で「成熟」となる割合が

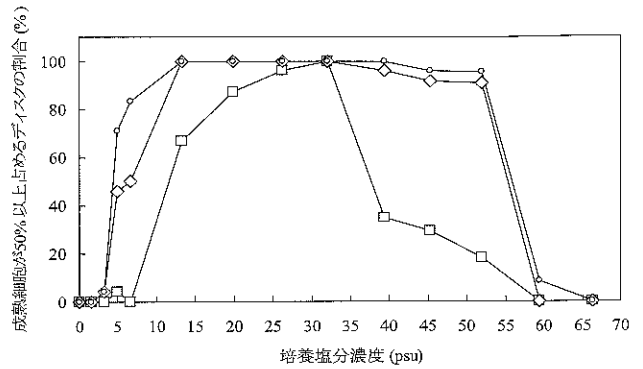


図3-7 培養塩分と成熟との関係を示した。ディスクは5日間培養された。成熟細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(□), 4日間後(◇), 5日間後(○)

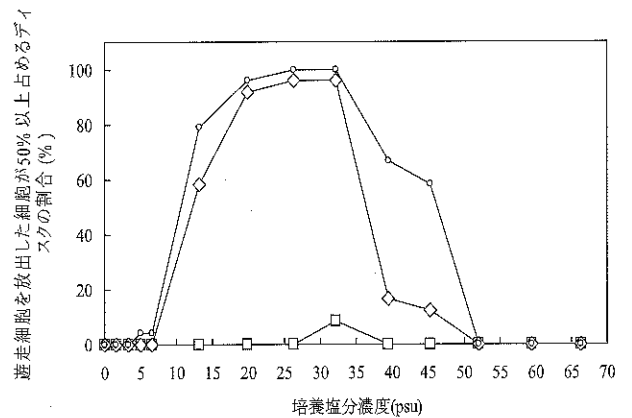


図3-8 培養塩分と遊走細胞放出との関係を示した。ディスクは5日間培養された。遊走細胞を放出した細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(□), 4日間後(◇), 5日間後(○)

100%となった。4 μmol s⁻¹m⁻²以下では、「成熟」となる割合は0%であった。光量40 μmol s⁻¹m⁻²以上では、培養3日後に「成熟」となる割合は100%に達した。また、光量40 μmol s⁻¹m⁻²までは光量値の上昇に伴って、「成熟」となる割合が増大した。図3-10に、「遊走細胞放出」となる割合の光量値の範囲を示した。5日後には、16 μmol s⁻¹m⁻²以上で「遊走細胞放出」となる割合は100%となった。4 μmol s⁻¹m⁻²以下では、割合は0%であった。

仮根形成： 図3-11に、成熟部分を持ち、仮根を形成したディスクの写真を示した。仮根は遊走細胞を放出したディスクの反対側でのみ形成されるという極性を示した。

表3-3 異なる培養温度における相対成長割合と仮根形成割合

培養温度	5℃	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃
相対成長割合 ¹⁾	(%) 100	103	106	102	105	108
相対仮根形成割合 ²⁾	(%) 96	100	96	30	11	0

1) 相対成長割合(%) = 5日後の平均直径値 / 初期直径値 × 100
 2) 相対仮根形成割合(%) = 5日後の仮根保有ディスク数 / 24 × 100

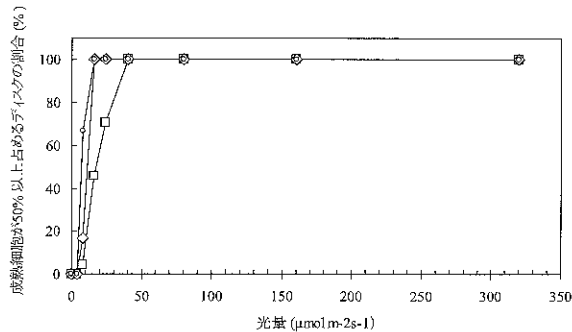


図3-9 光量と成熟との関係を示した。ディスクは5日間培養された。成熟細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(□), 4日間後(◇), 5日間後(○)

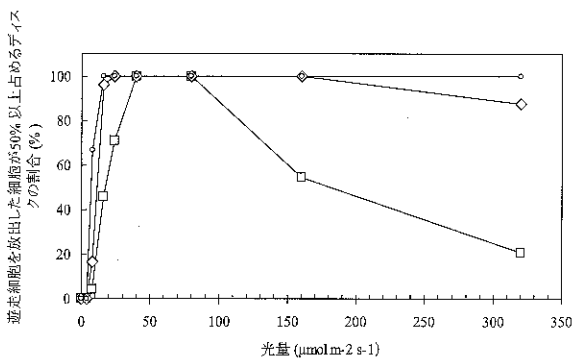


図3-10 光量と遊走細胞放出との関係を示した。ディスクは5日間培養された。遊走細胞を放出した細胞が50%以上占めるディスクの割合を示した。3日間培養後の割合(□), 4日間後(◇), 5日間後(○)

図3-12に、培養3日後の異なる塩分濃度での仮根を形成したディスクの割合を示した。塩分濃度0, 59.4, 66.3 psuでは仮根は形成されなかった。仮根を形成したディスクの割合が70%以上となるのは塩分濃度1.6~52.0 psuの範囲であった。図3-13に、培養3日後の異なる光量値での仮根を形成したディスクの割合を示した。光量0 μmol s⁻¹m⁻²では仮根は形成されなかった。光量が増加するにつれ、4~40 μmol s⁻¹m⁻²の範囲では仮根を形成したディスクの割合は増加したが、80 μmol s⁻¹m⁻²以上では減少した。

3. 藻体の基部から先端部までの遊走細胞放出の割合

図3-14に藻体の基部から先端部までにおける切り出されたディスクの遊走細胞放出の面積の割合の平均値を示した。藻体の最先端部である1番では遊走細胞放出の面積割合が58%であるが、次の2~3番では30~35%と急激に下がった。先端部から基部に向かい放出率は減少傾向にあり、基部付近では1~5%と、ほとんど遊走細胞の放出が見られなくなる。このことから、藻体の先端から基部に向かい放出面積割合が低下する傾向が認められた。

考 察

スジアオノリの成熟には、月齢リズムがあり大潮時に合

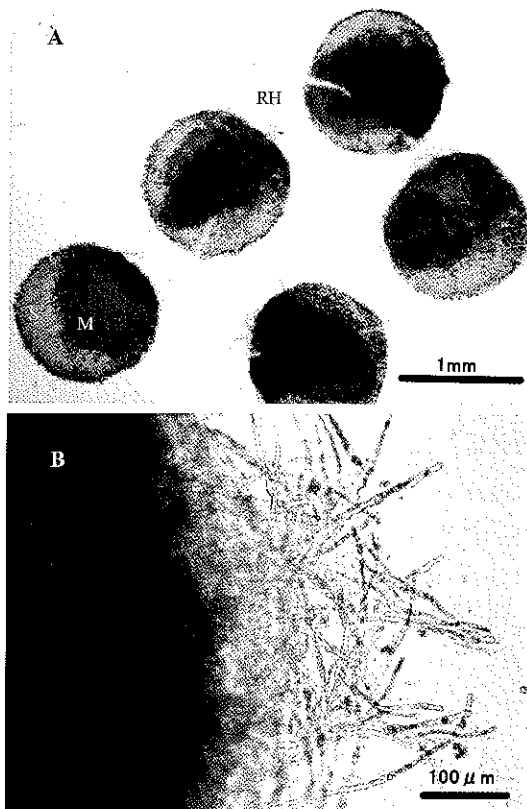


図3-11 塩分濃度45.3 psuの滅菌海水、培養温度20℃、12時間明期、12時間暗期、光量40 μmol m⁻²s⁻¹で5日間培養したディスク。

A: ディスクの明るい部分は成熟した細胞(M)と遊走細胞を放出した細胞(S)を示している。RHは、仮根を示している。

B: Aで示されたRH部分を拡大したディスクの縁に発達した仮根を示している。

わせて生殖細胞の放出のピークがあることが知られている(Christie and Evans 1962; Pandey and Ohno 1985)。このため、自生のスジアオノリから生殖細胞を得るためには成熟時期に合わせて採取しなければならなかった。しかし、藻体を数ミリに細断することで栄養細胞が数日のうちに生殖細胞へと分化する現象が見つけられたため任意

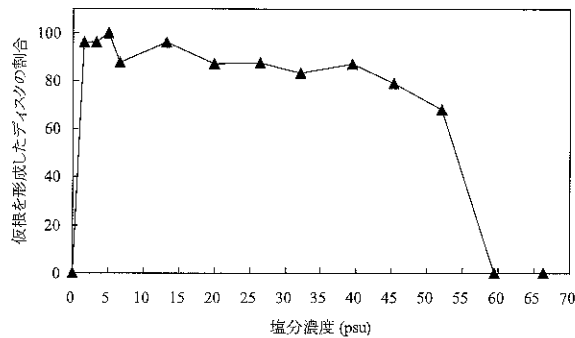


図3-12 塩分と仮根形成との関係を示した。塩分に対する仮根を形成したディスクの割合で、ディスクは3日間培養した。

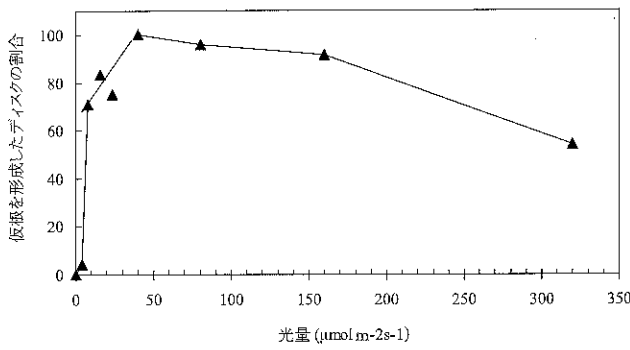


図3-13 光量と仮根形成との関係を示した。光量に対する仮根を形成したディスクの割合で、ディスクは3日間培養した。

に生殖細胞を得ることができるようになった (團ら 1997)。この現象はアオサ属植物でも見られる (Nordby and Hoxmark 1972; Hiraoka and Enomoto 1998)。アオサ細胞は成熟阻害物質を生産分泌しており、藻体を細断することにより成熟阻害物質が流出し、成熟が開始すると報告されている (Stratmann *et al.* 1996)。スジアオノリ藻体にも成熟阻害物質が存在すると考えるならば、今回の実験で得られた結果の説明は容易にできる。すなわち、成熟阻害物質は藻体内に蓄積されていると思われ、細断サイズが小さいディスクほど成熟阻害物質の流出が短期間に起こり、成熟が早く進むのに対し、サイズが大きいと流出に時間がかかり成熟が遅なると推察された。

本研究では、用いた藻体の保存期間が短い場合には、ディスクの成熟は一部にとどまり成長に向かった。「細断ディスク・サイズと成熟度の関係」の項での2実験の基本的な違いは、藻体の日齢の違いだけである。つまり、天然から採取してきた直後の藻体と5週間恒温室で保存したものととの差である。成長期の藻体には成熟阻害物質が多く存在すると考えるならば、長期保存処理により成熟阻害物質に変化が生じたと推察される。しかし、直径0.9mmのディスクでは保存期間にかかわらず高い成熟度を示しており、このサイズが成熟誘導には最適の大きさと言える。

吉野川での天然採苗は、河川水温が25℃を下回る10月上旬から開始され、15℃を下回る11月下旬に終了する。今回の実験結果から、「遊走細胞放出」ディスクの割合が実験開始7日目に90%以上となった温度は15~25℃であり(図3-6)、この範囲がスジアオノリの遊走細胞が放出され易い温度帯と考えられた。これは、天然採苗の期間内の温度帯と一致した。スジアオノリの「成熟」及び「遊走細胞放出」に最適な温度帯、すなわち、人工採苗に最適な温度帯は20~25℃であることが今回の実験結果で分かった。人工採苗は通常、屋外の止水タンクで行うため水槽内水温は外気温の影響を受け易い。20~25℃の範囲の外気温は徳島県北部では5~6月、9~10月中旬

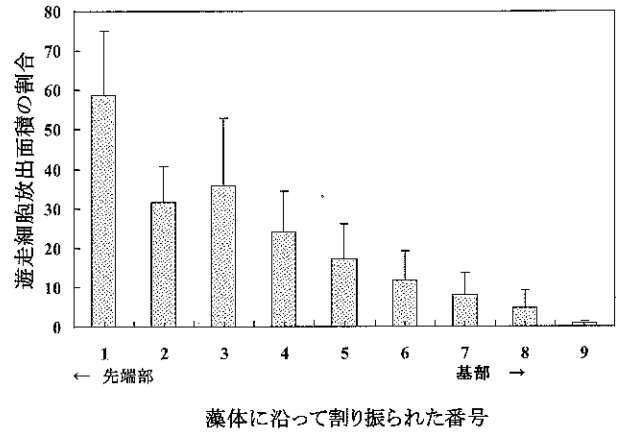


図3-14 藻体軸に沿った遊走細胞放出率の分布。番号は、先端部から基部にかけて20cmごとに割り振られている。垂直の棒はSDを示している (n=30)。

にあたる。春の漁期では3~4月に人工採苗する必要があるため、水槽の加温等の工夫が必要となるであろう。スジアオノリの成長に適した温度は、室内培養では15℃が成熟量より生長量が上回る温度帯である(平岡ら 1999)。吉野川でのスジアオノリ養殖では20℃を下回らないと藻体の成熟等により成長しないと経験的に言われており、成熟および遊走細胞放出に適した温度帯と成長に適した温度帯は異なると言える。

本研究では、塩分濃度5.0~52.0 psuの範囲がスジアオノリの成熟のために好適な条件であることが示されている。しかしながら、遊走細胞放出のために好適な条件は13.2~45.3 psuと狭まっている。Nordby (1977)は、*U. mutabilis*の細断4日後の高い成熟の割合は13~45 psuであると報告しており、本研究での結果と大きく異なることはなかった。ポウアオノリ*E. intestinalis*の発芽体の成長にとっての好適な塩分濃度は16~40 psuの範囲である (Kim *et al.* 1996)。スジアオノリの発芽体の成長にとっての最適な範囲は15.7~35.0 psuである (Htun *et al.* 1986)。広塩性であるスジアオノリは、四万十川で0.3~33.1 psuの塩分範囲で成長することができる (大野・高橋 1988)。本研究で、スジアオノリの遊走細胞放出のための好適な塩分濃度は13.2~45.3 psuであることを示したが、この値は塩分が変動する生息環境を考慮しても狭い値のようである。

通常的好適な条件下では成熟に引き続き遊走細胞の放出が起こるが、過去の研究者達は成熟と遊走細胞の放出という2つの段階を区分することはなかった。しかし、極端な条件下では成熟が遊走細胞の放出まで完了しないことがあるので、この2つの段階は厳密に区分されなければならない。例えば、塩分濃度が3.3や59.4 psuという極端な場合では、成熟した細胞はみられるが遊走細胞の放出は観察されない。

スジアオノリの養殖は徳島県吉野川の河口域でおこな

われており、塩分濃度は通常は20~30 psuの範囲である(北角ら1991, 湯浅ら1997, 湯浅ら1998, 高木ら1999, 高木ら2000, 天眞ら2001)。そのため、これは好適な遊走細胞放出のための塩分濃度の範囲内に入っているといえる。本研究での結果は6.6 psu以下の極端な低塩分では遊走細胞の良好な放出は起こらないことを示している。降雨による養殖漁場の低塩分は、養殖スジアオノリの成長を低下させ、さらには藻体の消失を引き起こすことが知られている(大野・松岡1992)。塩分濃度3.3~6.6 psuの範囲では、スジアオノリ藻体は遊走子嚢または配偶子嚢に生殖細胞を形成することができるが、このような低塩分では遊走細胞を良好に放出しない。養殖漁場の塩分濃度が13.2 psu以上に上昇したならば、遊走細胞の良好な放出が始まり、その過程で成熟藻体が消失してゆくと考えられる。

本研究では、成熟および遊走細胞放出のための最適な光量は $16 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 以上であることが分かった。さらに、光量の増加はディスク細胞の成熟を誘導する傾向があった。培養5日後の観察では、光量 $16 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 以上では「成熟」とされる割合は100%であった。Nordby (1977)は、*U. mutabilis*の藻体片を培養2日後に観察した結果、最適な成熟を誘導するための光量は $42 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 以上であり、成熟を起こすための下限の光量は $2\sim 5 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 付近にあると報告している。本研究では成熟を誘導する光量の下限は $8 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ であり、Nordbyの値と大きく異なることはなかった。しかし、最適な光量についてはNordbyの値より低いものであった。この理由としては、用いた種の違いにもよるだろうがNordbyの観察期間が2日間であったために、その後、成熟が $42 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ よりも低い光量でも進んだ可能性があると考えられた。

スジアオノリ養殖のための人工採苗技術は、細断した藻体を養殖網とともにタンクに入れ、放出された遊走細胞を網に付けるというものである。多くの網をタンクに入れた場合、網の中央部では外側に比べ光量は低下する。遊走細胞放出のために必要な光量が $16 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ という低いものであるならば、タンク内に入れることができる網数を増やすことができ、人工採苗をおこなう上では有利なことと考えられる。

スジアオノリの形態は紐状の長い藻体である。スジアオノリやヒラアオノリでは成熟は先端部から始まることが多く(館脇1994)、藻体の基部から先端部にかけて成熟率に差があるのではないかと予想された。アナアオサの成熟は、葉の縁辺部から中心部に向かい段々と明瞭な帯状に進む(館脇1994)。Hiraoka *et al.* (1998)は、アナアオサを用いた場所を違えてディスクを切り出したが、縁辺部では成熟しやすい状態になっているが付着根付近から切り出されたディスクはほとんど成熟しなかった。このため、アナアオサの栄養藻体には付着根から縁辺にかけて成熟

阻害物質の濃度勾配が存在し、付着根付近で濃度が高くなっている、若しくは縁辺部で成熟しやすい状態になっていると彼は示唆している。本研究では、これと同様の手法の実験をスジアオノリで行ったが、藻体の基部から先端部までに成熟率に差が存在し、先端部付近にかけ成熟率が上昇することが明らかとなった。スジアオノリにも成熟阻害物質が存在すると考えれば、スジアオノリの成熟は先端部方向から始まるのは成熟阻害物質が藻体内で軸に沿って濃度勾配があり、先端部ではその濃度が最も低いためであると考えられた。

Lersten *et al.* (1960)は、タレットアオノリ *E. clathrata*, ボウアオノリ *E. intestinalis*, ウ斯巴アオノリ *E. linza*の藻体片の再生について調べ、完全に遊走細胞の放出をおこなわない場合には、仮根の形成をおこなうことを報告している。團ら(1998), Dan *et al.* (2002)もスジアオノリから切り出したディスクが仮根を形成することを報告している。Lersten *et al.* (1960)は、ボウアオノリとウ斯巴アオノリの藻体片では元の藻体基部方向の端にのみ仮根を形成するとういう極性を報告している。本研究でも、切り出されたスジアオノリのディスクは仮根を形成し、ボウアオノリやウ斯巴アオノリと同様に仮根形成は極性を持っていることを示している。

図3-15に、スジアオノリの葉体を細断した後の、ディスクの変化を模式的に示した。藻体片の上部(元の藻体の基部の反対方向)で成熟や遊走細胞の放出が起こり、日数の経過とともに成熟および遊走細胞放出部位が広がってゆく(図3-15A, B)。成熟が起こらないか、または、一部でしか起こらなかった場合には、藻体片は仮根を形成しながら成長する(図3-15C)。藻体を非常に小さなサイズの藻体片に切った場合、仮根は形成されることはない。短時間に成熟と遊走細胞の放出が起こるため、全ての栄養細胞は遊走細胞となり、それゆえ仮根を形成することはできないのである(図3-15F)。藻体片の仮根形成と成熟は、それぞれ独立して起こり、細断後のディスクが成長に向かうか成熟に向かうかは、ディスクに残っている成熟阻害物質の量とその流出の速度により決定されると考えられる。

塩分濃度0~102 psuの範囲で5~6 mmのボウアオノリ藻体片を用いた仮根形成について研究が行われている(Reed *et al.* 1979)。彼らは、潮間帯、潮間帯上部および海のボウアオノリ群落から採取したものからの藻体片の塩分濃度に対する仮根形成率を報告しており、その報告によると潮間帯の群落からの藻体片では塩分濃度0および95 psuでは仮根を形成しなかった。そして、64 psuで仮根形成率は著しく低下したとある。本研究でも、0, 59.4, 66.3 psuでは仮根を形成しなかった。これらの結果はReed *et al.* (1979)の結果に非常に近いものであった。本研究で分かった仮根形成のための好適な細断サイズ、温度、塩

分および光量の範囲はアオノリ属の培養された藻体片を用いた種苗作りのために有益な情報となった。もし、大きなサイズの藻体片を養殖網に付けることが可能であるならば、通常の天然採苗を用いた場合より早く収穫することができるであろう。切断されたスジアオノリの藻体

は新しい分枝を再生する (Moss and Marsland 1976) ため、スジアオノリ養殖にとり効果的な種苗となると考えられる。

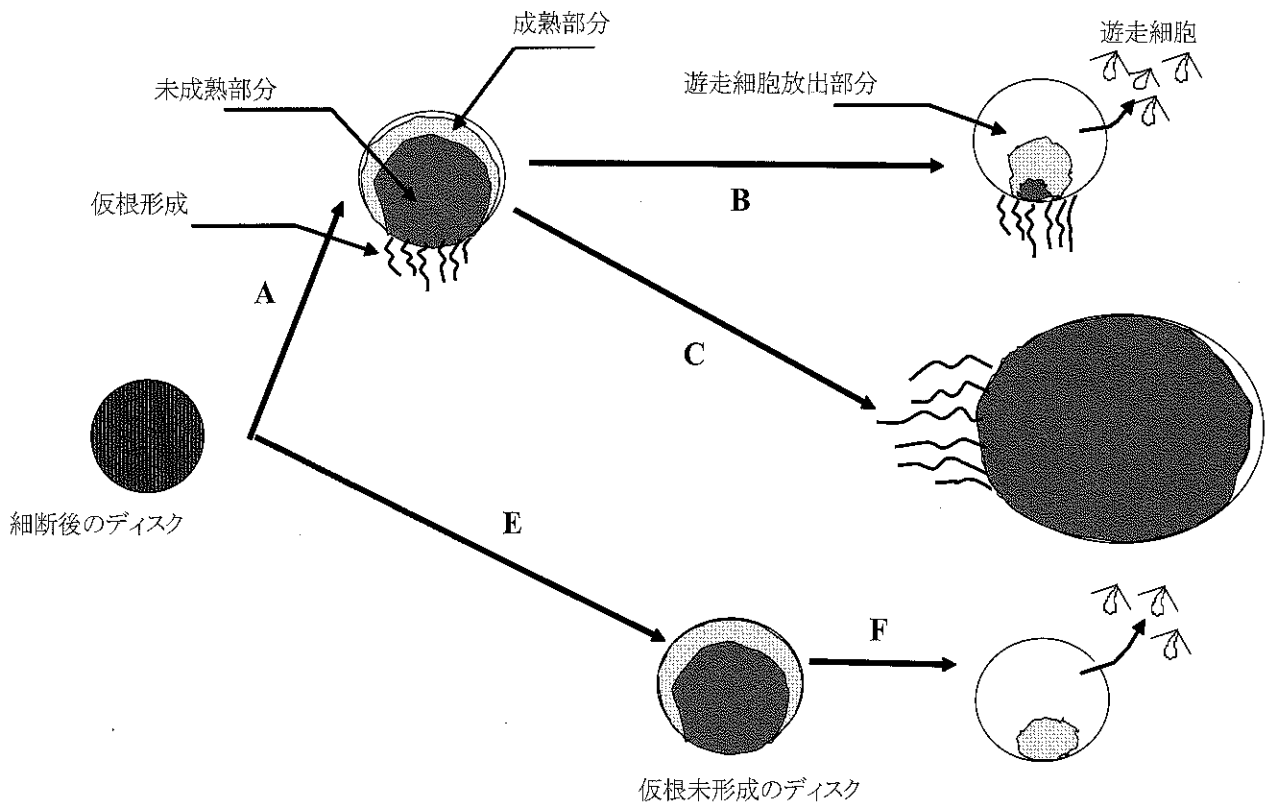


図 3-15 細断後ディスクの推移の模式図。藻体からディスクを切り出した場合、切り出した面で藻体の基部の方向に仮根がしばしば形成される (A)。成熟と遊走細胞の放出は、仮根が形成された反対の縁で起こる (A, B)。成熟が起こらない、または、一部にしか起こらなかった場合は、ディスクは大きくなる (C)。ディスクが非常に小さい場合は、成熟や遊走細胞の放出は素早く起こり、仮根は形成されない (E, F)。D, G, H は、極端な低塩分、低光量、高温などの状態を示している。

第4章 成熟機構

アオノリ類の生育特徴には急激なバイオマスの増加または減少がある(大野ら1999)。アオノリ養殖では、春季の水温上昇時の急激な藻体の成長と、降雨の後などの生育環境の低塩分が引き金となった急激な藻体の流出が養殖管理上の問題となっている(團ら1997)。アオノリ属のバイオマスの減少は、藻体の栄養細胞の生殖細胞嚢への分化と、生殖細胞の放出により藻体組織が流出するためである。

Ulva mutabilis とアナアオサ *U. pertusa* では、藻体に成熟を阻害する物質を含んでおり、ある程度の濃度に保たれている時には栄養成長をするが、何らかの原因で減少すると、成熟するといわれている(Nilsen and Nordby 1975, Nordby 1977, Hiraoka and Enomoto 1998)。スジアオノリにおいても、類似した働きのある物質が存在する可能性が高いと考えられるが、このことについての研究は見当たらない。本章では、スジアオノリ藻体の成長、成熟に関わる孢子形成阻害活性を決定する方法を明らかにし、成熟を起こす作用機構について検討した。

材料と方法

スジアオノリ藻体から直径0.9 mm程度の円形に切り取った小さな藻体片(ディスク)の栄養細胞は、2~3日で生殖細胞を形成して放出する(團ら1997, 團ら1998)。切り出されたディスクを孢子形成阻害物質が含まれる溶液に入れたならばディスクは周囲の孢子形成阻害物質の影響を受け成熟が抑制されると推察される。生殖細胞が放出された後の細胞は白く見えるため、栄養細胞(緑色)及び未放出の生殖細胞嚢(茶色)と容易に区別することができる(第3章, 図3-1)。ディスクの孢子を形成した部分の面積は孢子形成阻害物質の濃度依存的に変化する(Dan *et al.* 2003)ため、ディスクを用いた培養で孢子形成阻害物質の相対量としての活性を把握することができる。本章では、このディスクを利用した生物検定を実施し、スジアオノリ藻体に含まれる孢子形成阻害物質の存在の確認、藻体中での分布、成長の段階での孢子形成阻害物質が生産蓄積される時期について検討した。なお、本章で材料として用いた藻体は2000年11月に吉野川で採取されたものを継代培養した吉野川スジアオノリ系統株で、無性の生活史をおこない、2本鞭毛を持った遊走細胞を常に放出するものである(Hiraoka *et al.* 2003)。

実験1. 成熟阻害物質の存在

図4-1に、藻体からの抽出濾過液の作成と藻体ディスクを利用した生物検定についての手順を示した。培養藻体2 gを外径9 cmのガラス乳鉢に入れ-20℃で1時間凍結後、海砂(425~850 µm, 20~35 mesh, 和光純薬工業株式会

社)を0.8 g加え摩砕したものを、20 psuの海水100 mlで洗浄しながら200 mlビーカーに入れ、往復振とう機(MULTI SHAKER MMS, 東京理化工機株式会社)上で1時間攪拌した。この溶液をメンブレンフィルター(Cellulose Acetate Filter, アドバンテック株)孔径3, 0.45, 0.2 µmで吸引濾過した。このスジアオノリ藻体抽出濾過液を20 psuの滅菌ろ過海水で希釈し、9段階の濃度勾配液を作成した。すなわち、抽出濾過液原液の2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70%になるように希釈した溶液を50 mlずつ作成した。生物検定に用いるディスクの作成として、培養藻体から皮細工用のパンチを用い直径0.9 mmのディスクを250枚切り出した。ディスクを20 psuの海水で充分洗浄したのち、先ほどの希釈液と20 psuの海水だけが入っている50 mlの培養液が満たされた滅菌プラスチックペトリ皿(直径90 mm高さ20 mm)に25枚ずつ入れた。ディスクは、20℃, 光量40 µmol s⁻¹ m⁻² (12時間明期, 12時間暗期)で3日間培養された。

培養後のディスクは、第3章の「藻体の基部から先端部までの遊走細胞放出率」の項の方法と同様の画像解析処理を行い、遊走細胞放出部分の面積の割合を求めた。

実験2. スジアオノリ藻体管状構造における孢子形成阻害活性の分布

系統株(藻体長640 mm, 藻体幅4-5 mm)から湿重量1.12 gを採取し、20 psuの海水100 mlを満たした200 mlビーカーに入れ、往復振とう機上で1時間攪拌した。藻体を取り出した後の海水を孔径0.2 µmのメンブレンフィルターで濾過した。この濾液を生物検定開始まで-20℃で凍結保存した(以下、この濾液を「藻体外液」と呼ぶ)。次に、管状の分枝の内側に孢子形成阻害物質が含まれる可能性が考えられるので、藻体から伸びている分枝全てを、眼科用ハサミで分枝基部から切断除去した。この藻体を20 psuの海水100 mlとともにブレンダーに入れ、藻体片が1層細胞になるまで切断した。この時、切断する大きさはなるべく大きくなるようにするために切断に要する時間をできるだけ短くした。切断後、藻体片の入った海水を200 mlビーカーに移し、往復振とう機(MULTI SHAKER MMS, 東京理化工機株式会社)にのせて1時間攪拌した後、孔径20 µmのミューラーガーゼで藻体片と濾液とに分離し、さらにこの濾液を孔径0.2 µmのメンブレンフィルターで濾過したものを、生物検定開始まで-20℃で凍結保存した(以下、この濾液を「管内液」と呼ぶ)。残った藻体片を用い、実験1と同様の摩砕濾過処理をした100 mlの濾液を生物検定開始まで-20℃で凍結保存した(以下、この濾液を「細胞内液」と呼ぶ)。

凍結しておいた3種類の濾液を室温(約20℃)で解凍したものに抗生物質混液(Penicillin 5000 Units/ml・Streptomycin 5mg/ml, 和光純薬工業株式会社)0.2 mlを添

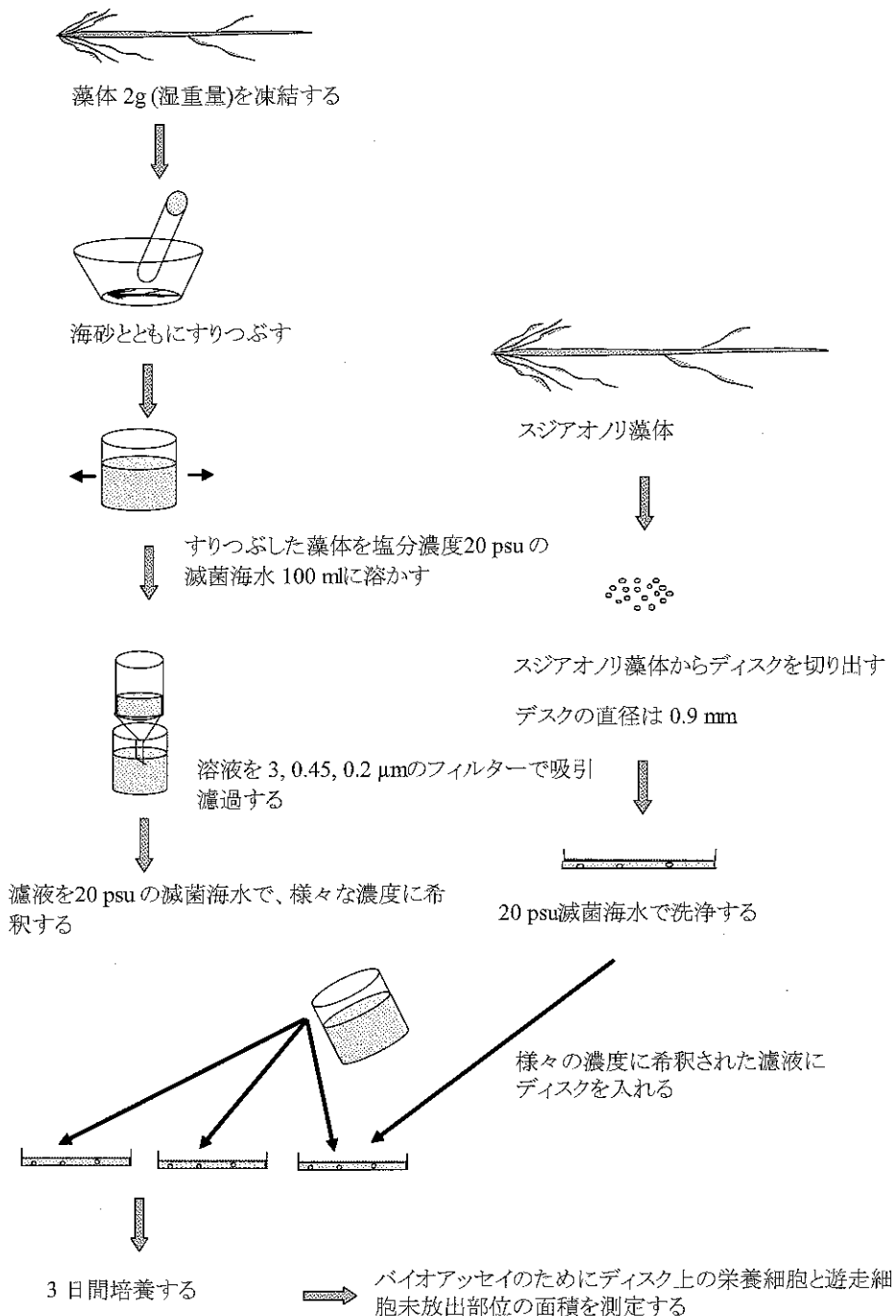


図4-1 スジアオノリのディスク小片と濾液を用いたバイオアッセイの工程

加し、それぞれ 50 ml ずつを滅菌プラスチックペトリ皿 (直径 90 mm, 高さ 20 mm) に満たした。生物検定を行うため、スジアオノリ藻体から、皮細工用のパンチを用い直径 0.9 mm のディスクを 100 枚切り出し、20 psu の海水で充分洗浄したのち、先ほどの濾液 50 ml が満たされたペトリ皿と、対照として 20 psu の海水 50 ml だけが入ったペトリ皿に、ディスクを 25 枚ずつ入れた。ディスクは、20 °C、光量 40 μmols⁻¹m⁻² (12 時間明期, 12 時間暗期) で 3 日間培養されたのち実験 1 と同様の方法で測定し、遊走細胞放出面積の割合を求め、Nilsen and Nordby(1975)の方法を改変した次式により孢子形成阻害活性 (Activity rate of SI [Sporulation Inhibitor]) を決定した。

$$\text{孢子形成阻害活性 SI (\%)} = \frac{\text{対象の遊走細胞放出面積 (\%)} - \text{試料の遊走細胞放出面積 (\%)}}{\text{対象の遊走細胞放出面積 (\%)}} \times 100$$

実験 3. スジアオノリ幼体の培養条件と孢子形成阻害活性の関係

実験 3-1 スジアオノリの遊走細胞を、塩分 20 psu の PES 培地を 50 ml 満たした滅菌プラスチックペトリ皿 (直径 90 mm, 高さ 20 mm) 数枚に播種し、20 °C、光量 40 μmol s⁻¹m⁻², 12 時間明期, 12 時間暗期で培養し、平均藻体長 1.6 mm となったところでスジアオノリ藻体を葉匙でペト

リ皿の底から削り取った。このスジアオノリ藻体の湿重量2 gを塩分20 psuのPES培地2lを満した3l三角フラスコに入れ、15℃、光量 $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ （12時間明期、12時間暗期）で39日間、通気培養した。この間、3～4日ごとに培地を交換し藻体抽出液を作成するために藻体を0.5 g（湿重量）ずつ採取した。同時に、50本分の藻体長も測定した。培地交換の方法は孔径20 μm のミューラーガーゼで藻体を受け、藻体にストレスを与えないよう速やかに新しい培地の入った容器へ移した。植継ぎ量は、藻体にストレスを与えると成熟が引き起こされるため正確には測定できなかったが、最初は湿重量2 g程度とし、藻体の成長に伴い増加させた。なお、培養容器は藻体の成長に伴い培養開始21日目からは10l培養ビンに変え培養を行った。通気量は、図4-2に示したように藻体が充分回

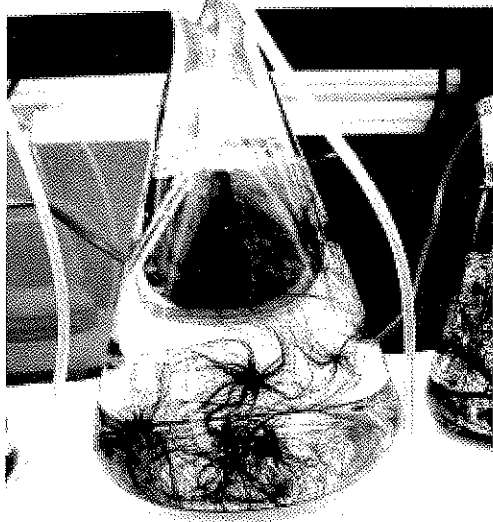


図4-2 スジアオノリの培養。藻体は、常に水流により回転している。

転する量の通気とした。

実験3-2 次に培養中成熟が起きた場合の藻体中に含まれる胞子形成阻害活性を確認した。平均藻体長が0.47 mmとなったところでスジアオノリ藻体を葉匙でペトリ皿の底からこそぎ取り、湿重量2 gを塩分20 psuのPES培地を9 l満した10 l培養ビンに入れ、20℃、光量 $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 、12時間明期、12時間暗期で42日間、通気培養した。この時、スジアオノリの最適な成長水温より高めの20℃で培養し（平岡ら1999）、成熟を起こしやすくした。7日ごとに培地を交換し藻体抽出液を作成するために藻体を0.25 g（湿重量）ずつ採取するとともに、50本分の藻体長を測定した。培地交換の方法は孔径20 μm の

ミューラーガーゼで藻体を受け、回収した藻体全てを網付きの遠沈管に入れ、遠心機で1100 rpm、5分間脱水した。このうち湿重量2 gを新しい培地へ植継いだ。通気量は、藻体が充分回転する量の通気とした。

抽出濾過液の作成は、培養液の交換時に採取した藻体（実験3-1は、湿重量0.5 g、実験3-2は0.25 g）を前項と同様の摩砕濾過処理をし、濾液を生物検定開始まで-20℃で凍結保存した。

生物検定は、採取時ごとに凍結しておいた100 mlの濾液を室温（約20℃）で解凍し、実験3-1では、抽出液の4%に、実験3-2では10%の濃度となるように20 psuの海水で希釈した。この溶液50 mlと対照として20 psuの海水50 mlを滅菌プラスチックペトリ皿（直径90 mm、高さ20 mm）に満し、実験2と同様の抗生物質を添加した。スジアオノリ藻体から直径0.9 mmのディスクを450枚切り出し20 psuの海水で充分洗浄したのち、先ほどの濾液と海水が満たされたペトリ皿にディスクを25枚ずつ入れた。ディスクを、20℃、光量 $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ （12時間明期、12時間暗期）で3日間培養したのち、実験2と同様の方法で測定し、胞子形成阻害活性を求めた。

実験4. 野外養殖藻体の成長と胞子形成阻害活性との関係

2000年12月1日に、徳島県吉野川汽水域のスジアオノリ養殖漁場で養殖漁業者の立ち会いのもと、筆者らが肉眼的観察により藻体長が長いと判断するスジアオノリが生育している4枚の養殖網と、藻体が短いと判断した養殖網3枚を選び出した。それぞれの網から1節分の藻体を網糸ごと採取した。藻体が短いと判断されたスジアオノリ（図4-3-B）は、藻体の長いスジアオノリ（図4-3-A）に比べ先端部が成熟し流出した個体が多く認められた。採取したスジアオノリ藻体は、塩分20 psuの海水の入ったビニール袋に入れ、5℃の条件下で研究室に持ち帰った。各網の採取物ごとに、網糸1cmに生育しているスジアオノリの藻体長を長いものから30～50本ずつ測定した。また、藻体に含まれる胞子形成阻害物質を抽出するため、各網からの採取物で6 cm以上の藻体（6 cm未満の場合はできるだけ大きな藻体）を選び、湿重量1.0 gを取り、外径9 cmのガラス乳鉢に入れ-20℃で1時間凍結後、海砂（425～850 μm 、20～35 mesh、和光純薬工業株式会社）を0.8 g加えて擦り潰した。藻体摩砕物の入ったガラス乳鉢に20 psuの滅菌海水100 mlを入れ、摩砕物を洗浄しながら200 mlビーカーに流し込み、往復振とう機（MULTI SHAKER MMS、東京理化学器械株式会社）上で振とう速度160 r.p.m.で1時間攪拌した。攪拌後の溶液をメンブレンフィルター（Cellulose Acetate Filter、アドバンテック株式会社）の孔径3、0.45、0.2 μm の順で吸引濾過した。この濾液を生物検定開始まで-20℃で凍結保存した。

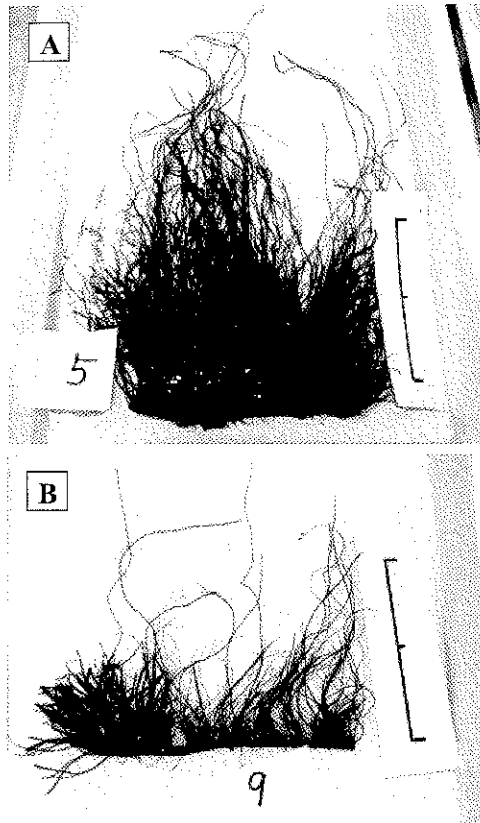


図4-3 2000年12月、徳島県吉野川汽水域で採取した養殖網系上のスジアオノリ藻体。写真上の試料番号5は、よく成長した藻体を示している。写真下の試料番号9は、成熟した藻体を示している。写真中の垂直の棒は10 cm。

生物検定をおこなうため、各網の採取物からの抽出濾過液を室温(約20℃)で解凍し、20 psuの滅菌海水で抽出濾過液の7.5%になる割合に希釈した。これらの希釈された濾液50 mlが満たされた滅菌プラスチックペトリ皿(直径90 mm, 高さ20 mm)7枚と対照区としての20 psuの滅菌海水50 mlが入ったペトリ皿に抗生物質混液(Penicillin 5000Units/ml・Streptomycin 5mg/ml, 和光純薬工業株式会社)を0.2 mlずつ添加した。生物検定を行うため、採取した養殖藻体と生活史が同じスジアオノリ系統株から皮細工用のパンチを用いて直径0.9 mmのディスクを175枚切り出し、20 psuの海水で充分洗浄した。これを希釈濾液と滅菌海水50 mlが満たされたペトリ皿に25枚ずつ入れ、20℃, 光量40 μmol s⁻¹ m⁻², 光周期12時間明期, 12時間暗期で3日間培養し、実験2と同様の方法で活性を求めた。

結果

実験1. 胞子形成阻害物質の存在

図4-4に抽出濾過液の希釈液中で培養した結果のディスクの写真を示した。各ディスクには遊走細胞が放出され白くなった部分が見られる。図4-5に抽出濾過液の濃

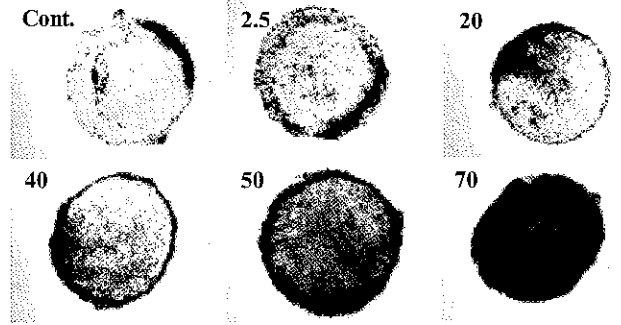


図4-4 遊走細胞の放出は、ディスク上の遊走細胞を放出した細胞の面積の割合として示されている。濾液の濃度(%)は、それぞれの写真の左上に示されている。

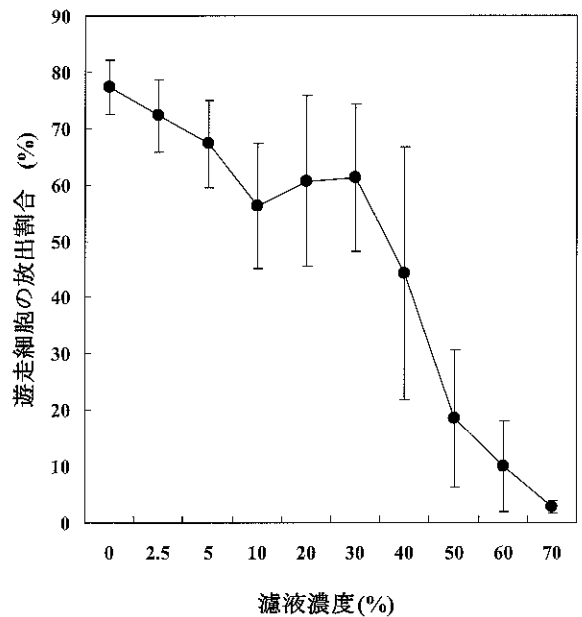


図4-5 遊走細胞の放出割合(%)とスジアオノリ藻体の抽出濾過液の濃度との関係。垂直の棒は±標準偏差を示す(n=25)。

度勾配に対する遊走細胞放出面積の割合を25枚のディスクの平均値で示した。対照として抽出濾過液を加えていない場合の遊走細胞放出面積の割合は77.4%であり、希釈濾過液の濃度が10~30%と低い場合は遊走細胞放出面積の割合は約60%であった。しかし、濾過液の濃度が上昇するにつれ遊走細胞放出面積の割合は低下し、70%の場合では放出面積の割合は2.8%であり、ほとんど遊走細胞の放出部位は見られなかった。この結果、スジアオノリ藻体をすり潰して得られた抽出濾過液は濃度依存的に成熟抑制効果がみられた。

実験2. スジアオノリ藻体管状構造における胞子形成阻害活性の分布

図4-6に、スジアオノリ藻体管状構造における「管内」、

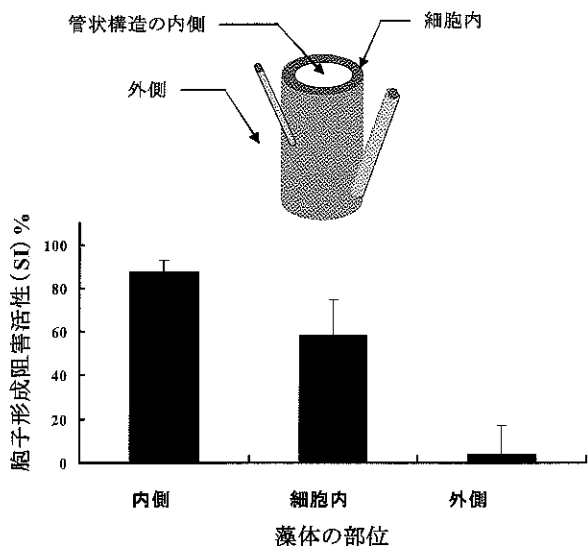


図4-6 藻体の管状構造の部位ごとの孢子形成阻害活性 (SI)。垂直の棒は±標準偏差を示している (n=25)。

「細胞内」および「管外」間の生物検定の結果としての孢子形成阻害活性を示した。これによると「管内液」が最も活性が高く87%であり、次いで「細胞内液」が58%であった。「藻体外液」は活性度が10%以下と最も低い値であった。これらの結果から、孢子形成阻害物質は主に管状構造の内側に存在することが示唆された。

実験3. スジアオノリ幼体の培養条件と孢子形成阻害活性の関係

図4-7に40日間室内培養において、順調に成長したスジアオノリ藻体の平均藻体長の推移とそれに対応した孢子形成阻害活性を示した。活性は培養開始5日目付近から21日にかけて急激に増大し、極大に達した(100%)。平均藻体長は培養期間中、指数関数的な成長を示した。活性は、培養開始後21日目(平均藻体長が138mm)以降最大となった。

図4-8に40日間室内培養において、培養開始28日目直後に成熟が起き、成長がみられなくなったスジアオノリ藻体の孢子形成阻害活性とそれに対応した平均藻体長の推移を示した。このとき、活性は28日目で最大を示し、以後平均藻体長の減少と一致して活性も低下した。

実験4. 野外養殖藻体の成長と孢子形成阻害活性との関係

図4-9に、野外養殖藻体の試料の孢子形成阻害活性と平均藻体長を示した。試料番号3, 5, 4, 2番は養殖漁業者からの聞き取りを基に、肉眼的観察により藻体長が長いと判断した藻体であり、試料番号10, 6, 9番は、藻体が短いと判断した先端部が成熟流出した藻体であった。また、測定した藻体長と孢子形成阻害活性のデータで、藻体長

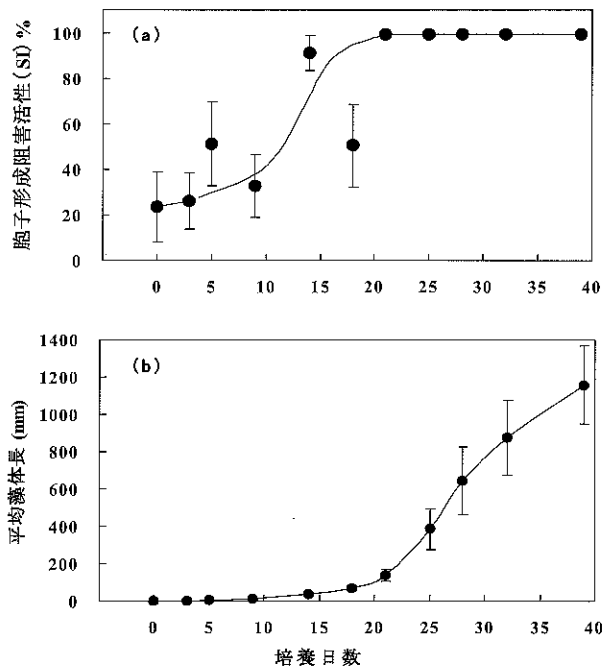


図4-7 上の図は孢子形成阻害活性 (SI) (垂直の棒は±標準偏差 (n=25)) を、下の図は平均藻体長(垂直の棒は±標準偏差 (n=50)) を示す。藻体の培養は正常な条件下(培養温度15℃)で行われ、開始時の藻体長は1.6 mmであった。

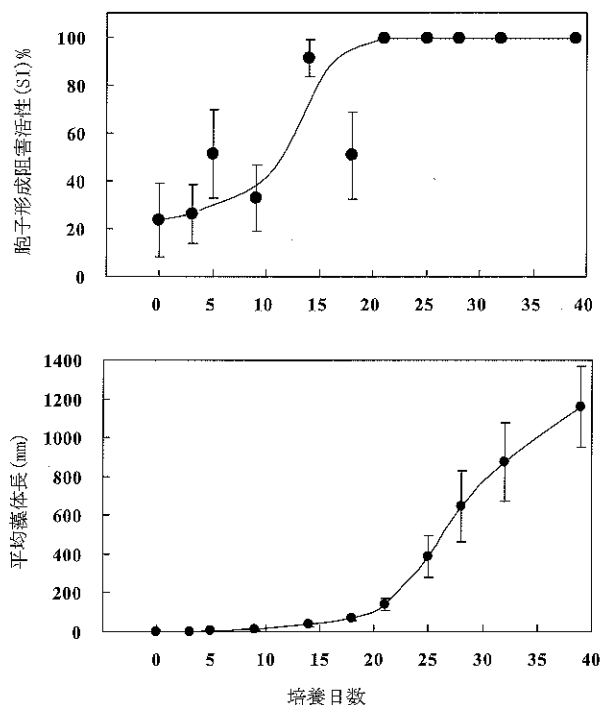


図4-8 上の図は孢子形成阻害活性 (SI) (垂直の棒は標準偏差 (n=25)) を、下の図は平均藻体長(垂直の棒は標準偏差 (n=25)) を示す。藻体の培養は培養温度20℃の条件下で行われ、開始時の藻体長は0.5 mmであった。

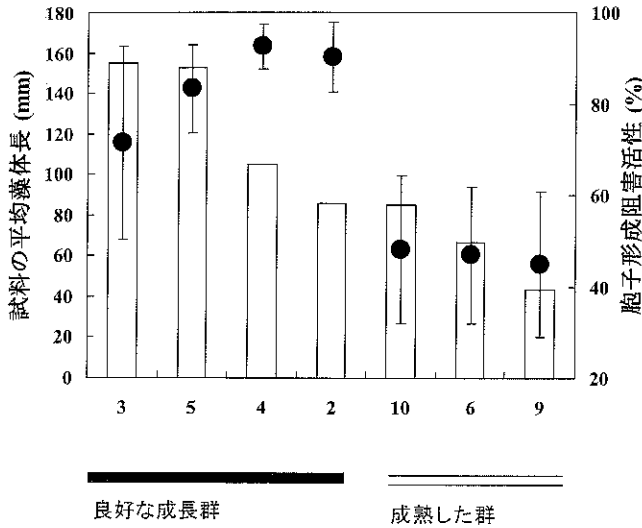


図4-9 スジアオノリ養殖漁場から採取した良好な成長の藻体と成熟した藻体の孢子形成阻害活性 (SI) の違い。●, 孢子形成阻害活性; □, 平均藻体長。垂直の棒は標準偏差を示す。

が長いと判断した4網分と藻体と短いと判断した3網分をそれぞれ1つにまとめ、長い藻体群と短い藻体群とした。長い藻体群(試料番号3, 5, 4, 2番)では孢子形成阻害活性が71.4~92.5%の範囲であるのに対し、短い藻体群(試料番号10, 6, 9番)では44.9~48.0%の範囲となった。表4-1に2群の平均藻体長と孢子形成阻害活性を示した。藻体長と活性とも長い藻体群と短い藻体群との間に有意な差が認められた(Mann-WhitneyのU検定, $p < 0.001$)。この結果から、順調に成長し藻体長が長くなったスジアオノリは孢子形成阻害物質を多く含み、逆に成熟が起こり藻体が短くなったものは孢子形成阻害物質の含有が少ないことが推察された。

考 察

Nordby and Hoxmark (1972), Nilsen and Nordby (1975) は, *Ulva mutabilis* 藻体が孢子形成阻害物質を常に作り、藻体が細断されると、この物質が藻体から流出し孢子形成が引き起こされると報告している。Stratmann et al. (1996) は, *U. mutabilis* の孢子形成阻害物質は少なくとも2つの物質が存在し、1つは糖蛋白質で、もう1つは非蛋白質で低分子量の物質であると報告している。Hiraoka and Enomoto (1998) は, アナアオサ *U. perutsa* で *U. mutabilis* と同様の孢子形成阻害物質が存在することを

示唆している。本研究では、藻体抽出濾過液を希釈した培地でのスジアオノリ藻体から切り出したディスクを用いた生物検定の結果、濃度依存的に孢子形成抑制効果がみられ、スジアオノリ藻体中にも孢子形成を阻害する物質が存在していることが明らかになった。

アオノリ属の成熟と生殖細胞の放出は、潮汐周期に従うという報告がある(Christie and Evans 1962, Pandey and Ohno 1985, Pringle 1986)。アオサ属についても同様の報告がある(Christie and Evans 1962)。アオサ属では、2層細胞の間に孢子形成阻害物質を蓄積しており、潮汐による干出や波動などの物理的ストレスにより藻体に傷がつき、それが環境中に流出したり薄められたりすることによって、孢子形成が引き起こされる(Nordby 1977)。本研究でのディスクを用いた生物検定の結果、主に「管内液」に孢子形成阻害物質が多く蓄積されていることが明らかとなったが、藻体の外側にはほとんど蓄積はない結果となった。スジアオノリの管状構造を形成している細胞は1層の細胞であり、もし孢子形成阻害物質が細胞内で作られているのであれば管状構造の内側と外側の両方に分泌しているはずである。しかし、藻体の外側に分泌された物質は環境により短時間に薄められるため、藻体を細断せず洗浄しただけの「藻体外液」が最も活性が低く、藻体が物理的に破れない限り孢子形成阻害物質を蓄積し続ける「管内液」が最も高くなった結果は妥当であると考えられる。今回の実験では、「管内液」は完全に管状構造の内側のみの活性ではなく、細胞間にあるものも含まれていると考えられる。この細胞間にも孢子形成阻害物質が含まれていると思われ、細胞は孢子形成阻害物質を生産し細胞外へ分泌するが蓄積する機能はないと考え、今回の結果の「管内液」が「細胞内液」よりも活性が高い理由になる。しかし、今後もう少し改善を加えた方法により孢子形成阻害物質の分布について更に検討する必要がある。

スジアオノリの成長過程で、孢子形成阻害物質はどの時期に最も多く分泌、蓄積されてゆくのかを知ることは、スジアオノリの天然での消長を理解する上で重要である。また、人工採苗に用いる母藻については孢子形成しやすくなった藻体を使うと効果的な採苗がおこなえることになる。本研究では、培養スジアオノリを一定期間ごとに採取し、藻体抽出液を作成し生物検定をおこなうことに

表4-1 スジアオノリ養殖漁場から採取した良好な成長の藻体と成熟した藻体の孢子形成阻害活性 (SI) の違い

群	成長の良好な藻体	成熟した藻体
平均藻体長(mm)	112.4±43.8	59.1±23.1
孢子形成阻害活性 SI (%)	85.0±11.8	46.6±15.6

より、藻体長の経時的変化と孢子形成阻害物質の含有量との関係を把握した。また、培養及び抽出を藻体の成長が良好な場合と培養途中で孢子形成が起きた場合に分け、その活性の違いを把握した。この結果、スジアオノリは良好な成長をしている限り、培養後21日目に活性は極大に達した。図4-7では培養後21日以降の活性度は100%と変わらないが、この間も藻体は成長している。ディスクを利用した生物検定により孢子形成阻害物質の量を活性として推定しているため、この方法では21日以降の値はすべて100%となっている。しかし、実際の孢子形成阻害物質量は藻体の成長にともなって多少とも増大した可能性はある。図4-8では、成長過程で孢子形成を起こした場合は藻体長の推移と平行して、活性も減少する結果となった。Stratmann *et al.* (1996) は、*U. mutabilis* の培養過程で培養後の液に対し藻体片を利用した生物検定を実施し、孢子形成阻害物質量の推移を報告している。それによると孢子形成阻害物質は細胞壁が形成された時から藻体外へ排出され始め、発芽体が4~10細胞になるとき孢子形成阻害物質量が最大に達し、その後低下すると報告している。このことは、本研究の結果とやや異なるものであった。本研究では、スジアオノリの孢子形成阻害

物質は藻体が成長している間は増加するが、孢子形成が起きた場合に低下した。つまり、孢子形成阻害物質の生産分泌がある限り藻体は成長するが、何らかの原因で生産が止まり、環状構造の内側に蓄積された孢子形成阻害物質の濃度が低下すると先端部から孢子形成を起こし、その結果藻体は短くなってゆくと説明できる。この孢子形成阻害物質の濃度低下を引き起こす原因については、潮汐による波動などの物理的刺激、水温、塩分、光量などの藻体を取り巻く環境要因が影響しているものと考えられる。

また、スジアオノリの養殖藻体でも成長、成熟と孢子形成阻害活性との関係において上記の室内実験と同様の結果が示された。スジアオノリ養殖では、急激な藻体の流出のほか、生殖細胞放出後の白化藻体が製品に混じることによる品質低下が問題となっている。本研究によりスジアオノリ養殖藻体の成長、成熟に関わる孢子形成阻害活性を評価する方法を明らかにすることができたため、この手法を利用した藻体に含まれる孢子形成阻害物質の量の予測をおこなうことは、養殖生産の安定化と品質の向上に繋がるのが期待できる。