

ノリのプロトプラスト作出試験

神 野 剛

海藻のプロトプラストは異なる品種のプロトプラストを細胞融合させたり、選別的に継代培養を行う事により、優良品種の作出に利用する事が可能と考えられ、緑藻、紅藻、褐藻類の多様な種類でその作出及び葉体再生技術の研究が行われている。

クロノリの原材料であるアサクサノリ、スサビノリについても研究が進み、最近では作出酵素の開発や培養方法の検討により、いくつかの研究機関では効率の良い作出と葉体再生が可能になり、育種及び養殖技術への利用が検討されている¹⁾²⁾。当場ではこれらの報告を参考にして本試験を行った。

目 的

ノリの育種への応用を目指し、効率の良いプロトプラストの作出技術と得られたプロトプラストからの葉体の再生技術の実用化を図る。

材料と方法

1 供試葉体

鳴門管内のノリ養殖漁場（浮き流し漁場）から採取した葉長 5cm 前後のスサビノリの葉体を脱水して 20℃ で冷凍保存したものを供試葉体とした。葉体は使用前に 4℃ の滅菌濾過海水中で 1 日間解凍し、付着物を洗い流した後、PES 培地（ビタミン B₁₂、チアミン、ビオチンは省略、以下同じ）中で、水温 15℃、照度 2,000lux、光周期 10L14D の条件下で 1 週間、連続通気培養した。顕微鏡下で果胞子及び単胞子の形成が認められない事を確認して試験に供した。

2 酵素液の調整

葉体表面の蛋白質の除去に 1% パパイン（Merk 社）・ 0.5% デキストラン硫酸カリウム・ 0.1M MES 海水（pH6.5）を、プロトプラストの作出に 0.1% アルカリヘミセルラーゼ（和光純薬）・ 0.5% デキストラン硫酸カリウム・ 0.025M トリス - HCl 海水（pH7.5）を使用した。酵素液は 0.22 μm ミリポアフィルターで濾過滅菌し、8ml ずつ 10ml 滅菌スピッツに分注し、 80℃ で冷凍保存した。

3 プロトプラストの作出

カミソリで葉体基部及び辺縁部を取り除き、5mm 角前後に細断した試料約 0.1g（湿重量）を、パパイン溶液中で 25℃ で 30 分間振盪（125 回転 / 分）させた。冷却遠心（1,000rpm、4℃、5 分）後、上澄みを捨て、PES 培地を加える操作を 3 回繰り返して洗浄した試料を、アルカリヘミセルラーゼ溶液中で 25℃

で2時間振盪(125回転/分)させた。この際15分間隔で強めの振盪を加えて細胞の遊離を促進させた。酵素液を20 μ m ミューラーガーゼで濾過して残った葉体片を除去し、得られたプロトプラストを前述の操作により洗浄して、PES培地に再懸濁させた。トーマの血球計数板を使用して作出したプロトプラスト数を算定した。

4 葉体の再生

PES培地にアガロース(Sigma Type)を1%濃度で添加し、80 前後で完全に融解させた後、40 に保温した。これにプロトプラストを接種し、緩やかに攪拌後、10ml ずつ直径90mmの滅菌プラスチックシャーレに分注した。PES培地にはあらかじめ100ml 当たりストレプトマイシン硫酸塩0.1g、ペニシリンGカリウム0.2g、カナマイシン硫酸塩0.1g、ネオマイシン硫酸塩0.01g、ナイスタチン2.5mgを加え、プロトプラストの接種量は培地10ml当たり 1.7×10^5 cells/mlとした。

培地が固化した後、PES培地10mlを重層し、シャーレをパラフィルムで密封して、20 で静置培養し、5~10日毎に倒立顕微鏡下で100倍10視野中のプロトプラスト数を計数して生残率を測定した。光条件による生残率の違いを比較するため、培養は照度500lux、光周期14L10D及び照度2,000lux、光周期10L14Dの条件下で行った。重層したPES培地は10日毎に交換した。

また、これとは別にプロトプラストを接種し、固化した培地を1cm角のプレート状に切り出し、PES培地中に浮遊させ、温度20 ,照度2,000lux、光周期10L14D、弱通気の条件下で連続通気培養を行い、葉体の再生を試みた。培養30日目までは10日間隔で、それ以後は3~5日間隔で培地の交換もしくはPES原液の補給を行った。

結果と考察

葉体湿重量1gからのプロトプラストの作出数を過去2年間の結果と合わせて表1に示した。使用酵素、酵素の反応条件、供試葉体の変更によりプロトプラストの作出量は年々向上し、今年度の作出量は 9.6×10^6 cells/mlであり、葉体再生試験を支障無く行えるだけのプロトプラストを初めて確保することができた。

図1に静置培養におけるプロトプラストの生残率の推移を示した。照度500lux、光周期14L10Dの条件下では培養開始直後から生残率は低下し続け、15日目にはすべての細胞が死滅した。一方、照度2,000lux、10L14Dの条件下では生残率は培養10日目に62%まで低下したが、その後はほぼ横ばい状態で推移し、試験終了時の培養40日目の生残率は55%であった。生残したプロトプラストは細胞分裂を繰り返し、多くはカルス状になった。図2に生残したプロトプラストの細胞分裂の進行状況を培養日数別に示した。照度500lux、光周期14L10Dの条件下では培養10日目に10細胞以上に分裂したプロトプラストがごく小数見られたが、ほとんどは未分裂のまま培養15日までに全数が死滅した。照度2,000lux、10L14Dの条件下では培養10日目には10細胞以上に分裂したプロトプラストは見られなかったが、培養40日目には生残したプロトプラストの85%(接種したプロトプラストの46%)が10細胞以上に分裂した。培養初期の細胞分裂の様式には異なる方向に2分裂し、4細胞になるものと、同一方向の分裂が先行し、縦に4~8細胞が並んだ後、縦方向の分裂が始めるものが見られたが、いずれの場

合も最終的にはカルス状になるようであった。また、1~20 本程度の仮根の形成が認められ、照度 2,000lux, 10L14D の条件下では培養 40 日目には生残したプロトプラストの 94%が仮根を持っていたが(図3), 仮根の発生時期はプロトプラストにより異なり, 2 細胞の時期に仮根を持つものもあるが, カルス状になっても仮根を持たないものもあった。静置培養(培養日数: 40 日)では葉体の再生には至らなかった。

通気培養においては, 培養 10 日目に幼芽が肉眼で観察され, 培養 30 日目には葉長 5~10mm に成長した幼芽が 1 プレート当たり平均 225 個得られた。幼芽はプレート上に株状に生育しており, 一つのプロトプラストから複数の幼芽が発芽したものと考えられた。これらの一部をプレートを砕いてさらに通気培養した結果, 培養 50 日目には平均葉長は 78mm に達した。

本県では昭和 61 年からノリのプロトプラスト作出試験に取り組んできたが, 作出数は必ずしも安定しなかった。また, 平成 3 年度には得られたプロトプラストを液体培地中に静置して葉体の再生を試みたが, プロトプラストは培養 5 日以内に死滅した。今年度の試験はその大部分を岩淵・福永(1992) 1)の方法に拠ったが, ほぼ満足できる結果が得られ, ノリの育種への応用が可能になったと考えられる。

表 1 プロトプラストの作出条件と作出数

年 度	使用 酵 素 液	酵素の 反応条件	マンニトールに よる浸透圧調整	供試 葉体	プロトプラ スト作出数 (cells/g)
平成 4	0.1%アルカリヘミセルラーゼ	25℃, pH7.5	無	培養	9.6×10^6
3	0.1%アルカリヘミセルラーゼ	30℃, pH8.0	有	培養	4.2×10^5
2	2.0%アワビアセトンパウダー	20℃, pH6.0	無	養殖	1.3×10^2

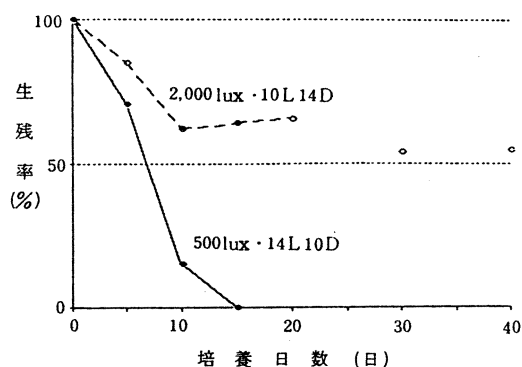


図 1 静置培養におけるプロトプラストの生残
(: 500lux · 14L10D, : 2,000lux · 10L14D)

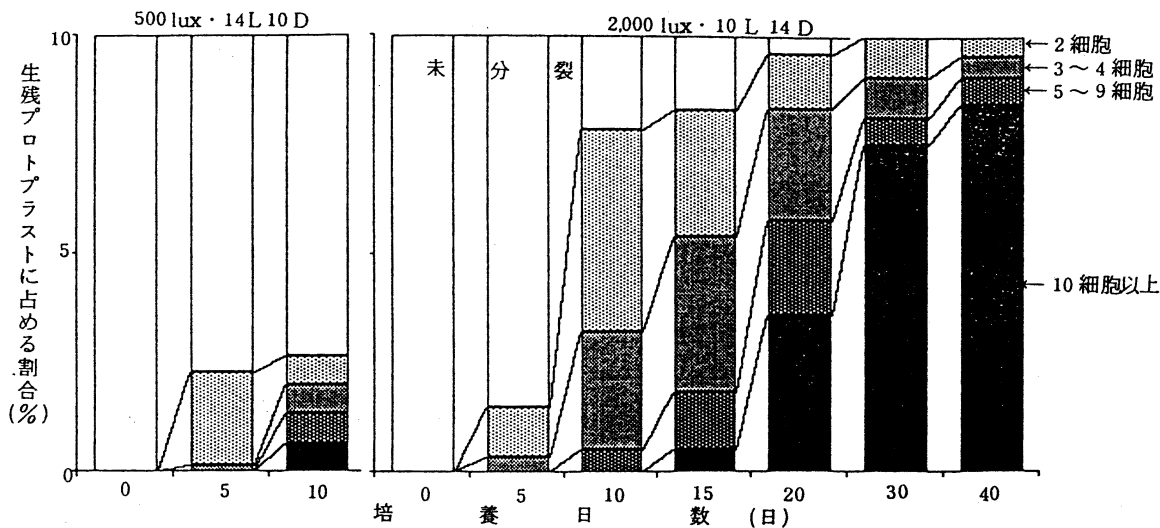


図2 静置培養におけるプロトプラストの細胞分裂の進行

(白抜き：未分裂, 網がけ(淡)：2細胞, 網がけ(中)：3~4細胞 網がけ(濃)：5~9細胞, 塗りつぶし：10細胞以上)

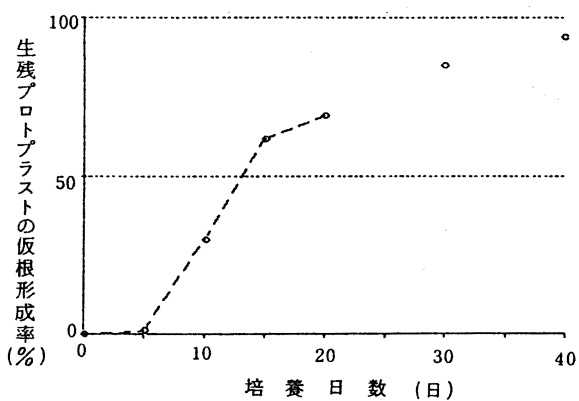


図3 静置培養におけるプロトプラストの仮根形成 (2,000lux · 10L14D)

文 献

- 1) 岩淵光伸・福永剛(1992): 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(). 福岡有明水試研報, 平成2年度, 9 - 25.
- 2) 谷田圭亮・増田恵一(1991): プロトプラストを選抜育種に用いた養殖ノリ形質の固定化. 兵庫水試研報, 29, 17 - 24 .