

クロノリのプロトプラスト作出試験

神野 剛・松岡 正義

海藻のプロトプラスト作出技術は近年になり多くの研究が行われ、現在では、緑藻・紅藻・褐藻類の多様な種類で作出が可能になっている。海藻のプロトプラストの作出と葉体の再生技術は次のような点で育種への応用が可能と考えられている。

異なる品種のプロトプラストを細胞融合させることにより両者の長所を合わせ持った新品種を作出する。

プロトプラストを植えた培地に生残・生長を抑制する負荷因子(病原体の毒素等)を与え、生き残った細胞を選抜する事により負荷に対する抵抗性を持った新品種を作出する。

そこで、クロノリのプロトプラスト作出の基礎技術の習得をかねて、使用酵素、供試葉体によるプロトプラスト作出量の差異について若干の検討を行ったので報告する。

材料と方法

1 供試葉体

試験には当场で選抜し、フリー糸状体で保存していたスサビノリ(品種名:G204)の培養及び養殖葉体を使用した。培養は試験管内で採苗後、補強海水(PES 培地)中、水温 15℃、照度 2,000lux、明暗比 10:14、連続通気の下で行い、葉長 5~10cm に生長した未成熟葉体を培養葉体とした。養殖は同品種の室内採苗を行っている業者に依頼し、冷凍網生産期に採取した葉長 10~15cm の未成熟葉体を養殖葉体とした。

供試葉体は滅菌濾過海水で付着物や珪藻を洗浄した後、辺縁部をカッターで取り除き、葉体の中央部~先端部を 2~3mm 角の大きさに細断して試験に供した。

2 酵素液

葉体の表面蛋白を取り除く前処理には 1%パパイン(メルク)・0.5%デキストラン硫酸カリウム濾過海水(pH6.0,以下パパイン溶液)を使用した。

プロトプラストの作出には 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・0.75M マンニトール・0.025M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0,以下 AHC 溶液)および 2%Abalone Acetone Powder(Sigma)・0.5%デキストラン硫酸カリウム・0.3M マンニトール濾過海水(pH6.0,以下 AAP 溶液)を使用した。

酵素液は-80℃で冷凍保存し、使用前に解凍、0.22µm ミリポアフィルターで濾過滅菌して使用し

た。

3 プロトプラストの作出と葉体の再生

プロトプラストの作出と葉体の再生は以下の手順で行った。

試料をパパイン溶液に浸漬し,125 回転 / 分で 30 分振盪する。

滅菌濾過海水で試料を 3 回洗浄する。

試料を AAP 溶液あるいは AHC 溶液に浸漬し,125 回転 / 分で 30 分振盪するとともに, 5 分毎に強く攪拌する。

滅菌濾過海水で試料を 3 回洗浄する。

顕微鏡下でプロトプラスト数を計数する。

40 μm ミューラーガーゼで濾過する。

20 μm ミューラーガーゼで濾過する。

プロトプラストを遠心分離 (600rpm,2 分,20) する。

プラスチックシャーレに入れた補強海水 (PES 培地) 20ml にプロトプラスト 100 細胞を接種し,15 ,2,000lux,明暗比 10 : 14,無通気の条件下で培養する。なお,補強海水には 100ml 当たりストレプトマイシン 200mg,ペニシリン G100mg,カナマイシン 100mg,ネオマイシン 20mg,ナイスタチン 2.5mg を加えた。

結 果

表 1 にプロトプラストの作出結果を示した。培養葉体を供試試料にした場合,AHC 溶液の作出量は 1.1×10^5 cells / g (実験区 1),AAP 溶液での作出量は 4.2×10^3 cells / g (実験区 2) であった。また,養殖葉体を供試試料にした場合,AAP での作出量は 2.7×10^2 Cells / g (実験区 3) であった。

実験区 1 で得られたプロトプラストを用いて葉体の再生を試みたが葉体再生率は 0% であった。

表 1 プロトプラストの作出量

実験区	使用 酵 素 液	反応 温度	反応 p H	パパイン 濃 度	供試葉体	プロトプラスト作出量 (Cells/g)
1	0.1%アルカリヘミセルラーゼ	30℃	8.0	1.0%	培養	1.1×10^5
2	2.0%アワピアセトンパウダー	20℃	6.0	2.0%	培養	4.2×10^3
3	2.0%アワピアセトンパウダー	20℃	6.0	2.0%	養殖	2.7×10^2

考 察

昨年度まではアワピアセトン抽出物 (AAP) を用いてプロトプラストの作出を行ってきたが,その作出量は $10^1 \sim 10^5$ cells / g と不安定であった。アルカリヘミセルラーゼ (AHC) は Pseudomonas 属細菌の菌体外酵素を精製したノリのプロトプラスト作出用の酵素で,AAP より効率的にプロトプラストを作出できる事が知られ¹⁾,今回の実験でも比較的,良好な作出結果を得る事ができた。しかしながら,プロトプラストから葉体を再生することはできず,AHC の反応条件や培地選択に検討すべき点があると

考えられる。

AAP 溶液を反応系に用いて培養葉体と養殖葉体のプロトプラストの作出量を比較した結果、培養葉体を用いた方が養殖葉体の約 10 倍のプロトプラストを得る事ができ、供試材料として適していると考えられた。

参考文献

- 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.