

アナアオサ・ヒトエグサ・ヒロメからの プロトプラストの分離と培養*

木 村 創

近年、高等植物を中心として植物体の組織、器官あるいは培養細胞からプロトプラストが分離され、遺伝物質の取り込みや細胞融合による雑種の作出など育種の分野でも利用されている。

海藻類でも藤田¹⁾や嵯峨²⁾らによって数種の海藻からプロトプラストが分離されているとともに、福岡県有明水産試験場³⁾や佐賀県有明水産試験場⁴⁾ではノリのプロトプラストを分離し、培養しているが、海藻類のプロトプラストの分離、培養方法はまだ十分に確立されていない。海藻の育種にプロトプラストによる手法を導入するにはまず、発生能力を備えたプロトプラストの分離方法を確立する必要がある。ここではアナアオサ・ヒトエグサ・ヒロメの葉体から酵素処理法によってプロトプラストを分離し、それらの培養を行った結果を報告する。

材料および方法

供試海藻： アナアオサ・ヒトエグサは当場の排水溝に自然に繁茂していたものを採取し試験に供した。ヒロメは当場にて種苗生産したヒロメの幼体を用いた。

プロトプラストの分離： 採取したアナアオサ・ヒトエグサ・ヒロメを $1 \times 1 \text{ mm}$ くらいの大きさに細断した後、ペニシリンG 500単位/mlとストレプトマイシン 0.75 mg/ml を加えたPES補強海水に 20°C 、24時間通気洗浄した。その後これらの海藻は5%セルラーゼ・オノヅカR-10(ヤクルト工業製)と 0.8 M マンニトールを添加した $\text{pH } 6.0$ の酵素液 5 ml 中に海藻 0.25 g をいれ、水平ローター式による緩慢な振盪を 20°C 4時間継続した。また、緑藻類のアナアオサとヒトエグサについては酵素濃度の差によるプロトプラストの作出能力の違いを見るため、5%セルラーゼ・オノヅカR-10で 20°C 、2時間振盪した後、セルラーゼ・オノヅカR-10の濃度を10%にして2時間振盪した(図1)。ヒロメは上述の方法以外に 0.3 M のマンニトールを加えた $\text{pH } 7.0$ の8%パイン液 5 ml に 0.25 g のヒロメをいれ、 20°C 、30分間の振盪を行った後、滅菌海水にて5回洗浄した。その後、4%AAPと5%セルラーゼ・オノヅカR-10と 0.3 M のマンニトールを添加した $\text{pH } 7.0$ の酵素液 5 ml にパインで処理したヒロメを 0.25 g ずついれ 20°C 、4時間振盪した(図2)。各酵素液は海水で調整し、薬剤として酵素液 5 ml 当りペニシリンG 2,500単位、ストレプトマイシン 4 mg を添加した。

各海藻ともに4時間後にプロトプラストの作出が観察されたときには、酵素液を 40μ のナイロンネットで濾過し、葉体片の残査を除いた。濾液は遠心分離($3,000 \text{ rpm}$ 、5分間)し、上澄み液の約半分を除去した後、等量の滅菌海水を加えプロトプラストを再び懸濁させ遠心分離した。この操

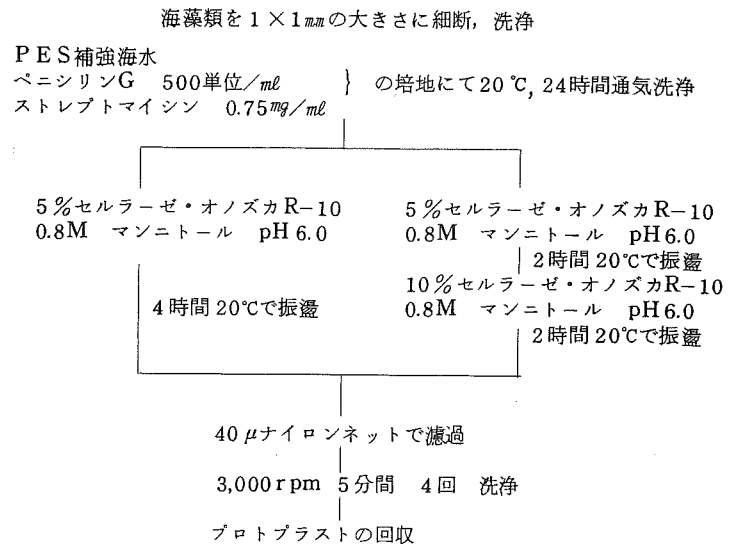
* 藻類新品種技術開発研究事業費による

木村：アナアオサ・ヒトエグサ・ヒロメからのプロトプラストの分離と培養

作を4回繰り返しプロトプラストを洗浄した。洗浄したプロトプラストはトーマの血球計算板を用いて計数した。

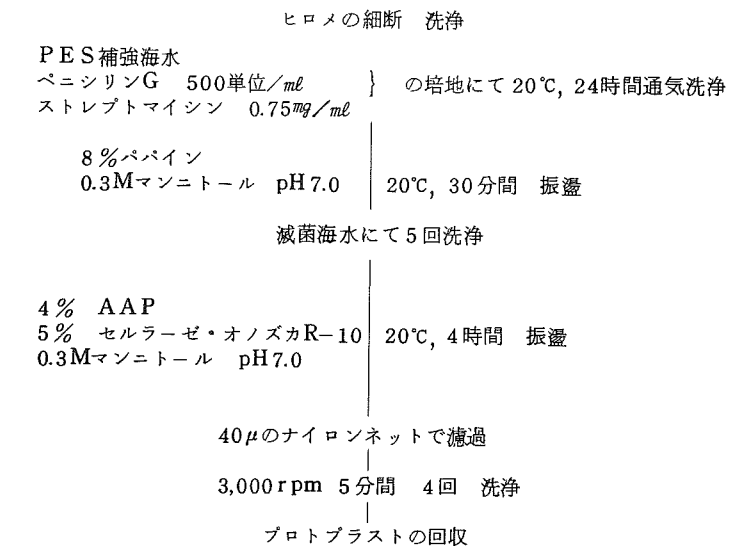
プロトプラストの培養： ヒトエグサ

のプロトプラストはPES補強海水を0.4 mlずつ入れたマルチュエルプレートの中の1つの穴の中へ100個ずつ入れ養し、その後1つの穴の中の全ての細胞を観察し、細胞膜再生率、発生率を調べた。アナアオサはPES補強海水の入ったシャーレの中で細胞膜が再生されるまで培養し、その後PES補強海水が0.4 mlずつはいったマルチュエルプレートの1つの穴に細胞膜の再生された細胞を1個ずつ入れその後の生長の過程を観察した。ヒロメのプロトプラストは0.4 mlずつ各種培地を入れたマルチュエルプレートの1つの穴に50個ずつ入れ培養した。培地としてはPESI補強海水、PESI補強海水にカジメ抽出液⁵⁾1000ppm添加したもの、PESI補強海水に二酸化ゲルマニウム1 mg/lを添加した3種類を用いた。その後の観察方法はヒトエグサと同じである。また培養条件はどの海藻のときも20℃, 3,000 Lux, 12 : 1時間光周期のもとで行った。



各酵素液には5 ml当りペニシリンG 2,500単位, ストレプトマイシン 4 mgを添加

図1 各海藻からのプロトプラスト分離方法



各酵素液には5 ml当りペニシリンG 2,500単位, ストレプトマイシン 4 mg添加

図2 ヒロメのプロトプラスト分離方法

結 果

プロトプラストの分離： アナアオサ・ヒトエグサ・ヒロメ葉体からのプロトプラストの分離に対するセルラーゼ・オノズカR-10の効果, 並びにヒロメ葉体に対するパバイン, AAP, セルラーゼ・オノズカR-10を併用した時のプロトプラスト分離能力については表1に示した。アナアオサやヒトエグサなどの緑藻類は5%セルラーゼ・オノズカR-10による処理でプロトプラストの分離が可能であり, 藻体1 g当りアナアオサで 1.5×10^5 個, ヒトエグサで 2.0×10^6 個のプロトプラストが分離された。また, 酵素濃度を途中で2倍とすると, ヒトエグサの場合は藻体1 g当り約2

倍のプロトプラストが分離されたが、アナアオサではあまり大きな差は認められなかった。ヒロメはセルラーゼ・オノヅカR-10単独ではプロトプラストは分離

表1 各種海藻のプロトプラスト作出量(海藻1g当り)

	セルラーゼ・オノヅカR-10		パパイン, AAP,
	5%	5-10%	セルラーゼ・オノヅカ
アナアオサ	1.5×10^5 個/1g	1.2×10^5 個/1g	……
ヒトエグサ	2.0×10^6 個/1g	4.0×10^6 個/1g	……
ヒロメ	0	…	1.0×10^5 個/1g

されなかったが、パパインとAAPの併用により藻体1g当り 1.0×10^5 個のプロトプラストが分離された。緑藻類のプロトプラストは楕円形のものが多く、大きさはアナアオサで $13.8 \sim 25.2 \mu m$ 、ヒトエグサで $12.5 \sim 18.5 \mu m$ であった。ヒロメのプロトプラストは緑藻類のプロトプラストとは少し異なり、形は球形のものも多く、大きさも $11.2 \sim 15.5 \mu m$ と小さかった。

プロトプラストの培養: ヒトエグサの細胞膜再生率と発生率は表2に示す。細胞膜再生率の中にはプロトプラストから再発生した個体も含んで計算している。

表2 ヒトエグサのプロトプラストの細胞膜再生率並びに発生率

6日後		14日後		20日後		28日後	
再生率	発生率	再生率	発生率	再生率	発生率	再生率	発生率
19.9%	0%	20.6%	2.2%	22.9%	3.1%	23.9%	6.1%

発生率はプロトプラストを100%とした。(n=1,000)

ヒトエグサのプロトプラストは培養開始2~3日後から細胞膜の再生が認められ、培養28日目には23.9%のプロトプラストに

細胞膜が観察された。また、発生は培養開始10日後から観察され始め培養28日目プロトプラストの6.1%が、すなわち細胞膜を再生した細胞の25.5%がヒトエグサの幼芽となった。

アナアオサのプロトプラストから細胞膜を形成した1つの細胞を取り出し、PES補強海水で培養した結果は発生過程で3つのパターンが観察された。その模式図を図3に示す。一つは1個の細胞内に生殖細胞と思われるものを形成するが、この生殖細胞は細胞外に放出されることなく、生殖細胞を含んだまま1個の細胞から発芽を始め、正常な発生過程をたどりアナアオサとなるもの。もう一つは1個の細胞が増殖し、1層の球状の細胞に生長した後、球状細胞から $5 \mu m$ くらいの配偶子もしくは遊走子が多数放出され、この配偶子もしくは遊走子から正常の発生過程をたどりアナアオサとなるもの。最後のパターンは球状の細胞が増殖し、直径 $2 \sim 3 mm$ の大きさとなった。幼芽はマルチウェルプレートである程度の大きさにした後、PES補強海水で通気培養した結果、大多数が生殖細胞を形成した。1層の球状細胞を通気培養すると大きくなり、通気培養開始10日後には再び小さな球状細胞を無数に作り出した。この球状細胞の中には配偶子が遊走子を放出し、正常の発生過程をたどりアナアオサとなるものもあった。

ヒロメのプロトプラストの細胞膜再生率並びに発生率は表3に示す。ヒロメのプロトプラストは、培養開始3~5日後から細胞膜の再生するのが観察された。培養開始5日後にはPESI補強海水で5.7%、カジメの抽出液を入れたPESI補強海水で12.7%、ゲルマニウムを入れたPESI補強海水では7.8%の細胞膜再生個体が観察された。その後、これらの細胞膜再生個体は増え続け発生した個体も細胞膜再生個体と考えると、培養開始30日目にはPESI補強海水で13.8%、カジメ抽出液入りPESI補強海水で24.2%、ゲルマニウム入りPESI補強海水で38.0%となった。こ

これらの細胞膜を再生した個体の大部分は、細胞分裂を始め配偶体のような形となった。これらの配偶体のような個体を発生した細胞と考えると、培養30日目にはPESI補強海水で細胞膜を再生した細胞の71.1%が、カジメ抽出液入りPESI補強海水では99.8%が、ゲルマニウム入りPESI補強海水では64.8%が発生を始めた。また、細胞膜を再生した細胞の中には配偶体のような形にならず団子状に細胞が増え続けカルスのようになったものも認められた。また、この配偶体のような再生個体は成熟する様子も見られず、ただ単に細胞増殖を繰り返すのみであった。

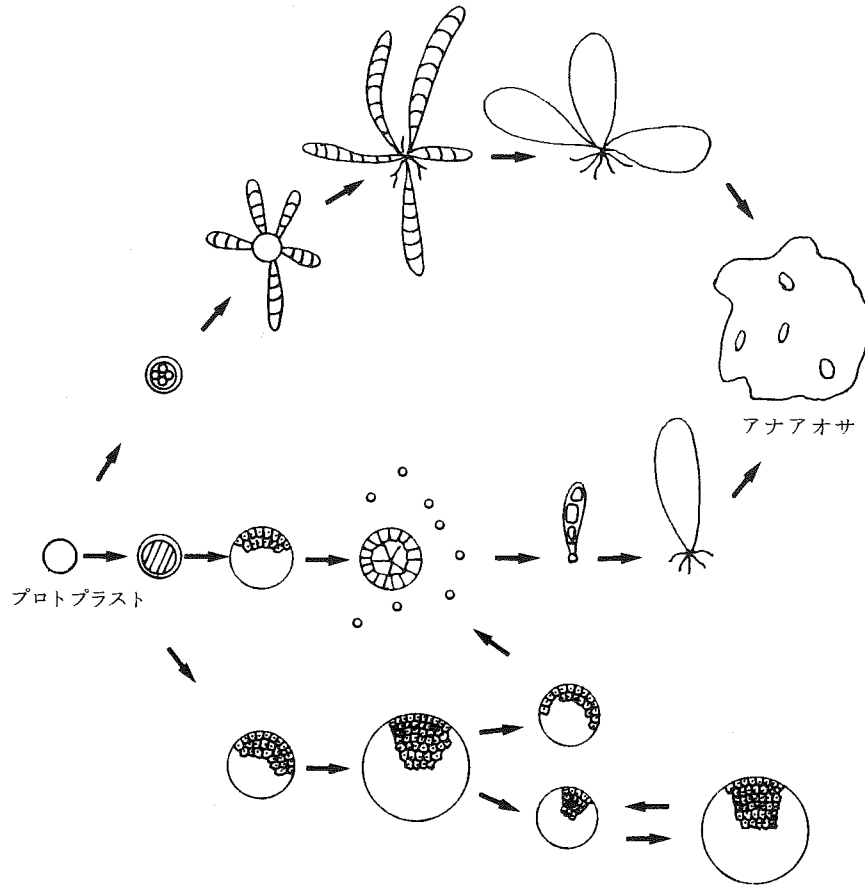


図3 アナアオサのプロトプラストの発生過程

表3 ヒロメのプロトプラストの細胞膜再生率並びに発生率

	5日後		14日後		22日後		30日後	
	再生率	発生率	再生率	発生率	再生率	発生率	再生率	発生率
PESI	5.7%	0%	11.7%	7.8%	14.3%	9.8%	13.8%	9.8%
PESI+カジメ	12.7%	0%	21.3%	15.0%	24.2%	20.0%	24.2%	23.1%
PESI+Ge	7.8%	0%	24.5%	12.8%	34.2%	20.0%	38.0%	24.3%

発生率はプロトプラストを100%とした。(n=600)

考 察

現在、多細胞藻類からのプロトプラストの分離はおもにノリを用いて研究が進んでおり、福岡有明水試や佐賀有明水試でAAPやサザエの消化酵素、細菌の粗酵素などを用いて藻体1g当り 10^5 個のプロトプラストが作出されるにまでいたっている。また、ノリのプロトプラストの発生についても研究が進んでおり、プロトプラストの30~50%の個体が再生されることが報告されている。緑藻類については藤田ら¹⁾によって市販のセルラーゼ・オノヅカR-10や*Pseudomonas* sp.の培養濾液を用いて酵素液1ml当り 10^5 ~ 10^6 個のプロトプラストが分離され、培養10日後にはヒトエグサで90.4%のプロトプラストが細胞膜を再生したことを報告している。褐藻類では嵯峨ら²⁾がバフソウの消化酵素を用いてマコソウ葉体から酵素液1ml当り 10^3 個のプロトプラストを分離し、これらの生存率は10%前後であったことを報告している。

本報では緑藻類としてアナアオサ・ヒトエグサ、褐藻類としてヒロメを用いてプロトプラストの分離方法を検討するとともに、各藻類のプロトプラストの発生過程を観察した。アナアオサやヒトエグサなどの緑藻類の葉体からは市販のセルラーゼ・オノヅカR-10の処理によってプロトプラストが分離されたが、ヒロメの葉体からはセルラーゼ・オノヅカR-10の単独処理ではプロトプラストは分離されなかった。このことは藤田らの報告と一致している。ヒロメはノリで報告されているパイニンやAAP、セルラーゼ・オノヅカR-10の混合酵素によって藻体1g当り 10^5 個のプロトプラストが分離された。このことからヒロメの細胞膜組成はノリの細胞膜組成とほぼ同じと考えられる。

ヒトエグサにおける細胞膜の再生率は培養28日目に23.9%となり、発生率は細胞膜を再生した個体を100%とすると25.5%となり、藤田らの報告と比較するとかなり低い値となった。これはプロトプラストの培養密度の高かったことが一因と考えられるが、ほかにも試験に供した葉体の状況、プロトプラストの分離方法などにも関係しているものと考えられるので、今後これらのことを十分考慮して検討する必要がある。ヒロメの細胞膜再生率はゲルマニウム入りのPESI補強海水で38.0%、カジメ抽出液入りのPESI補強海水で24.2%となり、PESI補強海水では13.8%となった。また、発生率は細胞膜を再生した個体を100%とするとカジメ抽出液入りのPESI補強海水で99.8%、PESI補強海水で71.1%、ゲルマニウム入りのPESI補強海水で64.8%となった。ゲルマニウム入りの培地が細胞膜の再生率は最もよく、発生率は最も悪かった。これはゲルマニウムが細胞膜の再生にはよい影響を与えるが、発生については従来言われているように生長の阻害が起こったものと考えられる。ヒロメのプロトプラストからの発生個体は配偶体のようなものの成熟も見られず、ただだんに細胞分裂を繰り返すのみであった。今後、ヒロメについては細断する藻体の条件、酵素の種類、処理方法、培地などについて検討し、発生能力を持ったプロトプラストを作る必要がある。

アナアオサのプロトプラストからの発生過程を追った結果、3つのパターンが観察されたが、このようなことはノリのプロトプラストでも観察されており、なぜこのような変化が起こるのかはまだ解明されていない。

現在、ノリではプロトプラストを生理学的研究や育種の分野で活用していくことが検討されており、緑藻類などについても今後このような研究を進めていく必要があると考えられる。また、褐藻類については不明な点が多くあるが、プロトプラストの作出されたことにより、育種の面で利用が可能になると考えられる。

文 献

- 1) 藤田雄二・右田清治, 1985: 数種海藻からのプロトプラストの分離と培養, 長崎大学水産学部研究報告書, 57, 39 - 45.
- 2) N. S a g a and Y . S a k a i, 1984 : I s o l a t i o n o f P r o t o p l a s t s f r o m *L a m i n a r i a* a n d *P o r p h y r a*, *B u l l . J a p a n S o c . S c i . F i s h .*, 50 1085.
- 3) 福岡県有明水産試験場, 1988: 昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業, 昭和62年度西海区ブロック会議資料.
- 4) 佐賀県有明水産試験場, 1988: 昭和62年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業, 昭和62年度西海区ブロック会議資料.
- 5) 和歌山県水産増殖試験場, 1987: 昭和61年度試験研究結果概要, 昭和62年度南西海ブロック会議藻類研究会誌第7号, 65 - 67.