

## 海藻におけるバイオテクノロジー研究

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	内田, 卓志
巻/号	15巻2号
掲載ページ	p. 17-20
発行年月	1992年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 海藻におけるバイオテクノロジー研究

内田 卓志

海藻の分野では組織培養、細胞培養、あるいは細胞融合などの技術が開発され、これらバイオテクノロジーを用いた育種関連の研究が進展しつつある。組織培養はコンブ、ワカメなどの褐藻類を中心に研究が進み、カルスの誘導及びカルスの再分化が一部の種について可能となった。一方、細胞培養についてはプロトプラストの作出及び発生がアマノリ類及びヒトエグサ等の一部緑藻類を中心に研究され、1細胞から正常な個体を得る技術が開発されている。また、細胞融合はアマノリ類など主として有用海藻を用いて研究されており、融合細胞から成体を得ることに成功している。しかし、これらの研究はまだ端緒にすぎたばかりであり、実際の種苗生産や育種へ応用するにはまだ多くの課題が残されている。

### はじめに

優良な形質を持つ株を作出・育成し、安定的に保存することは水産養殖業にとって極めて重要であることは言う迄もない。現在海藻の分野では組織培養や細胞培養の技術が開発され、細胞融合による体細胞雑種の作出が試みられている。これらバイオテクノロジーを用いた優良種苗の生産や品種開発は今後の水産養殖業の発展を促すものとして大きな期待が寄せられている。しかし、カルスの誘導及びその再分化は一部の種で確認されているものの、その制御機構の解明は今後の問題であるし、プロトプラストの作出・再生については体制の分化した大型海藻で

は困難である場合が多い。また、高等植物で行われているような遺伝子操作による育種研究は海藻の場合皆無の状態であり、DNAの取扱いなど基礎的な技術の検討にとどまっている。

本稿ではバイオテクノロジーを用いた海藻の育種及び関連分野の研究についてその現状及び問題点について述べる。

### 1. 海藻類の遺伝資源保存及び種苗生産

優良な形質を持つ個体が得られた場合にその形質を固定し、種苗に反映させるためには、有性生殖を行わせることなく保存培養し、必要に応じて組織の一部を種苗として用いる手法が必要となる。そのためには組織培養あるいはプロトプラストを利用した細胞培養が有効な技術である。

## (1) 組織培養

### 1) カルス形成

海藻類の組織培養は主として褐藻類について研究が進められている<sup>1)</sup>。大型褐藻であるコンブ、ワカメ等の組織培養は摘出した組織を無菌化し、これを細片にして適当な培地に植え付けることにより行われる。培地としては A S P 系の人工培養液あるいは天然海水を栄養強化した P E S, PESI 培養液に 1~2% の寒天を加えたものが多く使用されている<sup>1)</sup>。

一般には海藻類のカルス誘導には植物生長調節物質その他の有機物は特に必要としない。カルスは多くの場合、寒天培地上で誘導されることが多く<sup>2-5)</sup>、形成されたカルスは寒天培地上では分化が抑制されるため、カルスの保存培養には寒天培地が使用されることが多い<sup>1)</sup>。

体制にかなりの程度の分化がみられる大型海藻では同じ個体でも用いる組織によりカルス形成能力に差のあることが知られている。褐藻ツルアラメを例にとると、仮根、莖状部、葉状体生長点付近の中では莖状部から形成されたカルスが最も活発な生長を示すことが確認されている<sup>3)</sup>。

髄及びその周辺組織から生じたカルスは色素体を殆ど含んでおらず、光合成依存の生長を行っているとは考え難い。また、カルス誘導培地にはエネルギー源となる有機物は加えられていないことから、カルスは周辺組織から生長に必要な物質を吸収しているものと考えられる。また、ホンダワラ属の 1 種であるタマハハキモクの莖上部髄組織から誘導したカルスは有機培地から無機培地に移すことにより色素体を形成することが観察されており<sup>4)</sup>、カルスの増殖に有効な有機物の存在が示唆される。

### 2) カルスの再分化

組織培養を遺伝子源の保存や種苗生産に応用するためにはカルスからの再分化が可能でなければならない。

藻体の再分化はカルスを適当な培養条件に移すことにより誘導されることが数種の褐藻類で

観察されている。現在のところ、寒天培地上に形成されたカルスを寒天を含まない培養液に移したり、温度、照度条件を変えることによって再分化が誘導されているが<sup>5, 6)</sup>、カルス形成と同様、カルスの再分化に植物生長調節物質等の有機物が効果を示した例は見あたらない。

カルスから再分化してくる組織は孢子体になる場合と配偶体になる場合がある。コンブ科植物についてみると、カジメ<sup>5)</sup>、アラメ<sup>6)</sup>、及びミツイシコンブ<sup>7)</sup>の葉状体(孢子体)組織から誘導したカルスは孢子体を生じることが観察されている。しかし、コンブ属の中には孢子体のカルスが配偶体に分化した例も知られている<sup>8)</sup>。また、マコンブでは天然の孢子体から誘導されたカルスは孢子体となるが<sup>9)</sup>、培養で得られた幼孢子体のカルスは配偶体に生長したことが観察されている<sup>1)</sup>。さらに、同じマコンブ孢子体のカルスから配偶体、孢子体の両方が生じた例も報告されており<sup>10)</sup>、一定の手法で得られたカルスから必ず一定の組織が分化するとは限らない。

このようにカルスの再分化に関する研究は現在のところ主として現象面での把握に留まっているが、今後カルスの再分化の機構を解析し、その制御を可能にすることが重要である。

### (2) プロトプラストの単離と育成

高等植物のように体細胞を酵素処理によってプロトプラスト化し、種苗生産あるいは育種研究に用いる研究がアマノリ類やワカメ、コンブ等有用海藻類で行われている。

海藻類のプロトプラスト作出は基本的に図 1 に示す手順で行われるが、最も問題となるのは酵素処理である。海藻の場合、種類によって細胞壁の分解に用いられる酵素の種類や処理時間は種ごとに決められている。

アマノリ類の細胞壁はポルフィラン、マンナン、キシラン等の多糖類を主成分としており、それぞれの多糖を分解する酵素はアワビやサザエなど海藻を餌とする動物の内臓<sup>11)</sup>、あるいは海藻を分解する細菌<sup>12)</sup>から抽出されている。

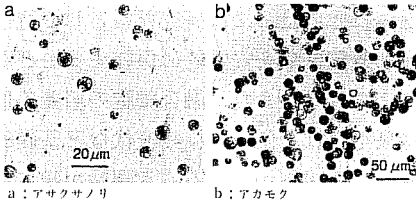


写真1 海藻のプロトプラスト

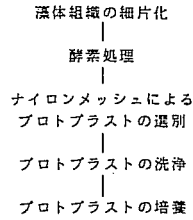


図1 プロトプラストの作出手順

また、アマノリ類は葉体表面にタンパク質を主成分とするクチクラ層を持つため、プロトプラストの分離にはパペイン処理による葉体表面のタンパク質分解と、細胞壁分解を順次行う方法が用いられている。このような処理により100mg (湿重量) のスサビノリ葉体から百万~千万個のプロトプラストを得ることが可能である<sup>13)</sup>。

コンブ、ワカメなど褐藻類は細胞壁や細胞間にフコイダンや褐藻特有の多糖であるアルギン酸を含んでいる。他の海藻と同様に酵素処理によりプロトプラストの作出が行われているが、Butler 他<sup>14)</sup> は  $Ca^{++}$  に特異的なキレート剤である EGTA を用いることによって効率的にコンブ属 2 種のプロトプラストを得ている。これは EGTA で処理することによりポリグルクロン酸の架橋となっている  $Ca^{++}$  が除かれ、アルギン酸ゲルが溶解した結果、酵素による細胞壁分解が促進されるためと考えられる。マコンブ及びミツイシコンブでも EGTA 処理と酵素分解を併用することにより活性の高いプロトプラストが得られており (本村, 私信), 筆者も同様の方法でホンダワラ属の 1 種であるアカモクから葉体 1 g (湿重量) 当たり約百万個のプロトプラストを得ている (写真 1)。

海藻のプロトプラスト作出は有用種を中心に多くの種で成功しているが<sup>13)</sup>, プロトプラストの発生は困難である場合が多い。アナアオサ<sup>12)</sup> やエゾヒトエグサ<sup>15)</sup>, アマノリ類<sup>19)</sup> など体制の単純な海藻のプロトプラストは比較的容易に発生し、正常な生活環を示すが、体制の複雑な褐藻類のプロトプラストは発生させるのが

難しく、発生しても数細胞で生育が止まるか、あるいは分裂を繰り返すだけで、正常な形態に生長した例は少ない。しかし、マコンブ及びミツイシコンブのプロトプラストから高い発生率で正常な個体の得られることが確認されており (本村, 私信), 今後さらに多くの種についてプロトプラストの育成が可能になるものと期待される。

海藻のプロトプラストは高等植物の場合と異なり、カルスを形成することなく直接発生して藻体を形成する場合が多く認められる。また、プロトプラストの培養条件も一般の培養と同一で良く、植物生長調節物質や糖などの有機物は特に必要としない。しかし、研究材料として用いられている種の多くは緑藻類やアマノリ類など体制の単純な海藻であり、ホンダワラ類など体制の高度に分化した種ではプロトプラストの発生・分化の制御機構が異なっている可能性もある。ホンダワラ類の一種であるタマハハキモクの側枝形成に植物生長調節物質が関与している可能性を考え合わせると<sup>16)</sup>, プロトプラストの発生・分化を物質コントロールの面から追求することは極めて興味深い。

海藻の葉体をプロトプラスト化し、直接種苗として用いることがアマノリ類など養殖種で期待されている。しかし、アマノリ類の場合はプロトプラストからの発生体は不定形の葉体になり易くノリ網に着生しにくいと言われており<sup>12)</sup>, 実際の養殖への応用は今後の課題である。

## 2. 細胞融合による育種研究

細胞融合は二種類あるいはそれ以上の個体間でプロトプラストを融合させ、人為的に体細胞雑種を作出する技術であり、品種開発への応用が期待されている。海藻では主としてアマノリ等紅藻類で研究が進められており<sup>17-19)</sup>、異種間雑種の作出も試みられている<sup>18)</sup>。方法としては高等植物と同様にポリエチレングリコール(PEG)を用いてプロトプラストを凝集させ、細胞を機械的に融合させるPEG法と、プロトプラスト懸濁液に交流電圧負荷をかけ、細胞を鎖状に配列させ、さらに直流パルスを加えることによって融合させる電気刺激法がある。電気刺激法は操作が簡単で融合細胞の単離が比較的容易であるため、最も多く用いられている。

細胞融合を行う場合、目的とする融合細胞の区別がまず問題となる。すなわち、同一藻体由来する細胞間で生じた融合細胞と異なる藻体由来する細胞間で生じた融合細胞を区別するための工夫が必要となる。現在のところ、色素体変異株を用いることにより、色調で融合細胞を選別することが行われている<sup>17-19)</sup>。

融合細胞の発生については、スサビノリの野生型株と緑色変異株の間で得られた融合細胞について詳細に研究され、発生した個体は細胞塊を形成した後、葉体を生じ、正常な生活環を示すことが明らかにされている<sup>17)</sup>。また、スサビノリの野生型株とアサクサノリの緑色型変異株の間で融合細胞を行った結果、褐色細胞、緑色細胞から成るキメラ葉体が得られている<sup>18)</sup>。

このようにアマノリ類をはじめとして体細胞雑種の作出が可能となってきたが、現在のところ融合細胞を選択するためのマーカーとしては色調が唯一のものである。栄養要求性や抗生物質抵抗性などについても現在検討されつつあるが、今後より多くのマーカーを実用に向けて開発する必要がある。

体細胞融合等育種研究を行う場合に重要なこ

とは、予め目的とする形質を明確にしておくことである。このためには研究材料として特性の明らかな遺伝資源を安定的に保存することが重要と考えられる。また、融合細胞の培養条件やその結果得られた個体の核相交代など基礎的な面においても明らかにするべき課題が残されている。

(南西海区水産研究所 藻類増殖研究室)

### 文 献

- 1) 能登谷正浩 (1990) 海洋科学, 12: 728~736
- 2) Saga N. and Sakai Y.(1983)Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49:1561~1563
- 3) Notoya M.(1988)Jpn. J. Phycol., 36: 175~177
- 4) Polne M. *et al.*(1986)Beih. Nova Hedwigia, 83: 30~36
- 5) Notoya M. and Aruga, Y.(1989)Jpn. J. Phycol., 37: 302~304
- 6) Notoya M. and Aruga Y.(1990)Jpn. J. Phycol., 38: 387~390
- 7) Saga N. *et al.*(1978)Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44: 87
- 8) Fries L.(1980)J. Phycol., 16: 475~477
- 9) Fang Z. *et al.*(1983)Kexue Tongbao, 28: 247~249
- 10) 桐原慎二 他 (1991) 平成3年度日本水産学会春季大会(東京), 講演要旨集168
- 11) 山口邦子 他 (1989) 日水誌, 55: 105~110
- 12) 藤田雄二・右田清治 (1985) 長崎大水研報, 57: 39~45
- 13) 藤田雄二 (1990) 海洋科学, 12: 737~742
- 14) Butler D. M. *et al.*(1989)J. Exp. Bot., 40: 1237~1246
- 15) Saga N. and Kudo T.(1989)J. Appl. Phycol., 1: 25~30
- 16) Chamberlain A. H. L. *et al.*(1978)Botanica Marina 22:11~19
- 17) Fujita Y. and Migita S.(1987)Jpn. Phycol., 35: 201~208
- 18) Araki T and Morishita T.(1990)Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 56: 1161
- 19) 水上 譲 他 (1990) 平成2年度日本水産学会春季大会(東京), 講演要旨集50