

学 位 論 文 題 名

Development of the protoplasts isolated from 7
species of Laminariales(Phaeophyceae)

(コンブ目植物7種から単離したプロトプラストの発生)

学位論文内容の要旨

植物細胞は全能性を持っている事が証明されている。近年、海藻でもこの特性を利用した新しい育種を目的に組織培養や細胞培養の研究が行われている。

プロトプラストを用いた細胞培養は、体構造の比較的簡単な紅藻アマノリ類や、緑藻アオサ類などで行われており、完全な植物体に再生することができる。しかし、体構造が複雑なコンブ目植物では単離細胞からの再分化や形態形成に関する詳しい知見はほとんど無い。

北海道には28種のコンブ目植物が生育している。これらの海藻は、生態系の維持に重要な役割を果たしている海中林や藻場を形成するだけでなく、アルギン酸の原料として利用され、古来から食用としてきた重要な海洋資源である。本研究では、コンブ目植物の中で有用な4属7種、コンブ属のマコンブ (*Laminaria japonica*)、ホソメコンブ (*L. religiosa*)、ミツイシコンブ (*L. angustata*)、ナガコンブ (*L. longissima*)、トロロコンブ属のガゴメ (*Kjellmaniella crassifolia*)、スジメ属のスジメ (*Costaria costata*)、ワカメ属のワカメ (*Undaria pinnatifida*)、計7種の胞子体からプロトプラストを単離し、この細胞の発生過程を詳細に観察した。さらに、プロトプラスト由来の幼胞子体と受精卵由来の幼胞子体(対照)を海中培養し、生長、成熟、外部および内部形態を比較する事によって、プロトプラストを用いた種苗の可能性について検討した。

プロトプラストを単離するために、市販されている Abalone acetone powder (2%) と Cellulase Onozuka RS (2%) の混合酵素を用いた。酵素処理2時間後、胞子体 0.5 g から $0.9 \sim 2.4 \times 10^7$

個のプロトプラスト（球形、直径 8～65 μm ）を容易かつ安定して単離することができ、その生存率は全ての種で 90% 以上の高い値であった。

プロトプラストを水温 5℃、10℃、15℃、18℃で培養したところ、全てのサイズ（8～65 μm ）のプロトプラストは 48 時間以内に基質に着生し、15 日以内に厚い細胞壁を再生する事を Calcofluor 試薬で確認した。全ての種において、10℃と 15℃が細胞壁の再生に適しており、また第一分裂も 10℃と 15℃で培養した細胞で最も早く見られた。細胞分裂は 10～30 μm のプロトプラスト由来の細胞のみで起こり、サイズから判断して、表層と外皮層由来の細胞だけが再生能力を有している事が分かった。

水温によるプロトプラストの生存率を比べると、マコンブ、ホソメコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブ、ガゴメでは低水温（5℃あるいは 10℃）、スジメ、ワカメでは高水温（15℃あるいは 18℃）が生存により適していた。また、コンブ目 4 種で比較すると、暖流海域に生育するホソメコンブが、水温に対し最も広い適応能力を示し、4 種の中で最も寒流域に生育するナガコンブが、高温で強く制限された。これらの結果は、プロトプラストを培養する際には生育場所の水温を顧慮すべきである事を示した。また、水温を一定に保った培養と変化させた培養結果から、コンブ目 4 種とガゴメでは、仮根の形成においても低水温、特に 5℃が最も適していた。

10, 20-40, 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光量でそれぞれ培養した場合、低光量は生存に適していたが、細胞分裂や仮根の形成を抑制した。一方、高光量はその生長を促進した。しかし、低光量で数ヶ月間生長が抑制されていた 1～数細胞の発生体を高光量下に移すと活発に分裂し始め、仮根を形成して正常な胞子体に生長した事は、低光量下での保存が可能である事を示した。

プロトプラストからの発生過程を詳細に観察したところ、コンブ目 4 種とガゴメでは、これらの受精卵の胚発生と同じ発生様式を示し、プロトプラストからの直接発生によって正常な胞子体に再生した。この発生過程で 2～10 細胞期に仮根を形成した初期胞子体は、生長の方向性が定まり、多層の葉状部、茎状部、付着器を発達させ、完全な胞子体に再生した。しかし、この数細胞の時期に仮根を形成しない発生体は正常な胞子体には発達せず、数細胞で発生が停止するものや、茎状部、付着器を形成しない単層あるいは多層の葉状部様の形態を示し、5 mm 以上には生長せず枯死した。この現象は 7

種全てに共通である事から、仮根細胞の分化が胞子体の生長の方向性を決定し、コンブ目植物の形態形成において最も重要な条件である事が初めて明らかになった。しかし、仮根を形成した初期胞子体でも、水温が高くなるにつれて正常な発達をしないものが多数観察され、高水温によって正常な発達が妨げられ、反対に、低水温ほど正常な発生を促した。スジメ、ワカメでは正常な胞子体に再生する次の発生様式が観察された。(1) 直接発生、(2) カルス様細胞塊からの発生、(3) コンブ配偶体様の糸状体からの発生。(1) はコンブ属 4 種とガゴメの発生様式と同じであり、比較的低温で見られた。(2) のカルス様細胞塊は全ての水温で見られ、特に 10℃と 15℃でよく発達した。細胞塊の先端細胞から仮根を発出している場合は葉状部様の発生体が形成され、正常な胞子体に発達した。この発生はワカメでは希であったが、スジメのプロトプラスト由来細胞は、ほとんどこの様なカルス様細胞塊に生長した。(3) の糸状体は高水温で 2~3 ヶ月培養した時に見られ、1~数細胞で分裂を停止している体上あるいはカルス様の細胞から発出し、雌雄同株の配偶体様の糸状体に発達した。この糸状体から発生する胞子体には、体細胞由来(ワカメのみ)と卵細胞由来の 2 タイプが認められた。後者は通常の $2n$ の胞子体(受精卵)の発生過程と同じであった。以上の結果は、培養水温によってこれらの発生様式を誘導できる事を初めて示した。

スジメ、ワカメで発生した配偶体様の糸状体と、それから発生した初期の胞子体の染色体数は $2n = \text{約 } 60$ であり、この胞子体は 2 倍体の糸状体由来の単為発生体である事を確認した。

7 種の再生した幼胞子体を海中培養すると、全ての種の再生胞子体と対照の胞子体は成体サイズに生長し、両胞子体はほぼ同じ(有意差なし)かあるいは生長率の高いコンブ属では対照より長くなる傾向を示した。外部、内部形態は両胞子体で同じであり、コンブ目植物に特有の表層、粘液坑道を持つ皮層(スジメを除く)、髄層からなるラミナリア構造を有していた。

マコンブ、ホソメコンブ、スジメ、ワカメでは正常な胞子嚢を形成し成熟した。また、これらの胞子嚢から放出された遊走子は、雌雄異株の配偶体に生長し、正常な胞子体を形成した。

本論文はコンブ目植物でプロトプラストから完全な成熟藻体を導いた初めての研究であり、この海中培養の結果は、1980 年代から提唱されていたカルスあるいはプロトプラストを用いたクローンによる種苗が可能である事を証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 弘 敏

副 査 教 授 山 崎 文 雄

副 査 教 授 中 尾 繁

副 査 助 教 授 安 井 肇

学 位 論 文 題 名

Development of the protoplasts isolated from 7 species of Laminariales(Phaeophyceae)

(コンブ目植物 7 種から単離したプロトプラストの発生)

海藻のプロトプラストを用いた細胞培養は、体構造の比較的簡単な紅藻アマノリ類や緑藻アオサ類などで行われており、完全な植物体に再生することができる。しかし、体構造が複雑なコンブ目植物では単離細胞からの再分化や形態形成に関する詳しい知見はほとんど無い。

本研究では、コンブ目植物の中で有用な 4 属 7 種、コンブ属のマコンブ (*Laminaria japonica*)、ホソメコンブ (*L. religiosa*)、ミツイシコンブ (*L. angustata*)、ナガコンブ (*L. longissima*)、トロロコンブ属のガゴメ (*Kjellmaniella crassifolia*)、スジメ属のスジメ (*Costaria costata*)、ワカメ属のワカメ (*Undaria pinnatifida*) の胞子体からプロトプラストを単離し、この細胞の発生過程を詳細に観察した。さらに、プロトプラスト由来の幼胞子体と受精卵由来の幼胞子体 (対照) を海中培養し、生長、成熟、外部および内部形態を比較する事によって、プロトプラストを用いた種苗の可能性について検討した。

プロトプラストの単離に Abalone acetone powder (2%) と Cellulase Onozuka RS (2%) の混合酵素を用いた。酵素処理 2 時間後、胞子体からプロトプラスト (球形、直径 8~65 μm) を容易かつ安定して単離することができ、その生存率は全ての種で 90% 以上の高い値であった。

プロトプラストを水温 5℃、10℃、15℃、18℃で培養したところ、全てのサイズ (8~65 μm) のプロトプラストは 48 時間以内に基質に着生し、15 日以内に厚い細胞壁を再生する事を Calcofluor 試薬で確認した。全ての種の細胞壁の再生に 10℃あるいは 15℃が適しており、また第一分裂も 10℃と 15℃で最も早く見られた。細胞分裂は 10~30 μm のプロトプラスト由来の細胞のみでおこり、サイズから判断して、表層と外皮層

由来の細胞だけが再生能力を有している事が分かった。

水温によるプロトプラストの生存率をコンブ属 4 種で比べると、暖流海域に生育するホソメコンブが水温に対し最も広い適応能力を示し、4 種の中で最も寒流域に生育するナガコンブが高温で強く制限された。この結果は、プロトプラストを培養する際には生育場所の水温を顧慮すべきである事を示した。

10, 20-40, 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の各光量で培養した場合、低光量は生存に適していたが、細胞分裂や仮根の形成を抑制し、高光量はその生長を促進した。

コンブ属 4 種とガゴメのプロトプラストの発生過程はこれらの受精卵の胚発生と同じで、プロトプラストからの直接発生によって正常な胞子体に再生した。この発生過程で 2~10 細胞期に仮根を形成した初期胞子体は、生長の方向性が定まり、多層の葉状部、茎状部、付着器を発達させた。しかし、この数細胞の時期に仮根を形成しない発生体は正常な胞子体には発達せず、茎状部、付着器を形成しない単層あるいは多層の葉状部様の形態を示し、5 mm 以上には生長せず枯死した。この現象は 7 種全てに共通である事から、仮根細胞の分化が胞子体の生長の方向性を決定し、コンブ目植物の形態形成において最も重要な条件である事を初めて明らかにした。ただし、仮根を形成した初期胞子体でも、水温が高くなるにつれて正常な発達をしないものが多数観察され、高水温によって正常な発達が妨げられ、反対に、低水温ほど正常な発生を促した。スジメ、ワカメでは正常な胞子体に再生する次の発生様式が観察された：(1) 直接発生、(2) カルス様細胞塊からの発生、(3) コンブ配偶体様の糸状体からの発生。(1) はコンブ属 4 種とガゴメの発生様式と同じであり、比較的低温で見られた。(2) のカルス様細胞塊は全ての水温で見られ、特に 10℃と 15℃でよく発達した。細胞塊の先端細胞から仮根を発出している場合は葉状部様の発生体が形成され、正常な胞子体に発達した。(3) の糸状体は高水温で 2~3 ヶ月培養した時に見られ、1~数細胞で分裂を停止している体上あるいはカルス様の細胞から発出し、雌雄同株の配偶体様の糸状体に発達した。

プロトプラストから再生した幼胞子体を海中培養すると成体サイズに生長し、対照の胞子体とほぼ同じ（有意差なし）かあるいは生長率の高いコンブ属では対照より長くなる傾向を示した。

マコンブ、ホソメコンブ、スジメ、ワカメでは正常な胞子嚢を形成し成熟した。また、これらの胞子嚢から放出された遊走子は雌雄異株の配偶体に生長し、正常な胞子体を形成した。

この結果はコンブ目植物でプロトプラストから完全な成熟藻体を導いた初めての知見であり、海藻の育種に多大な貢献をなすものである。審査員はこれを評価し、博士（水産学）の学位にふさわしいと認定した。