博士（水産科学）　二　村　和　視

学位論文題名

マコンブ（*Laminaria japonica* Areschoug）胞子体成熟に関する研究

学位論文内容の要旨

コンブ属植物は、世界的にも盛んに養殖されており、海藻類の中で最も高い養殖生産量を記録している（Zemke-White & Ohno 1999）。特にマコンブ（*Laminaria japonica* Areschoug）は主要な養殖対象種であり、1970 年代から促成栽培による養殖生産が行われるようになり、その生産量も飛躍的に増加した（Kawashima 1984）。養殖のための種苗は、成熟したマコンブを採集し、それから放出させた遊走子を種苗糸上で育成することで生産される。そのため、種苗生産は天然マコンブの成熟状況や時期に大きく左右される。また、マコンブでは母藻の形態的特徴や成長特性が次世代の胞子体に受け継がれることから（Sanbonsuga & Torii 1974；桐原ら 1995）、母藻の選別は良質なコンブの生産に極めて重要である。このため、安定した種苗生産や選抜育種の技術開発などを行うためには、マコンブ胞子体の成熟機構を解明し、成熟を人為的に制御する必要がある。

本研究では、自然環境下におけるマコンブ胞子体の成熟状況を把握するために、北海道南茅部町臼尻のコンブ養殖場で、胞子体を垂下養殖し、成長および成熟状況を観察した。胞子体の成熟は、子嚢斑と呼ばれる葉状部が隆起した生殖器官を形成することで視覚的に確認し、適宜組織観察を行った。また、マコンブ胞子体のさまざまな部位から切り出した胞子体片を用いて成熟誘導を試みた。この成熟誘導法を用い、葉状部から得た円盤状の胞子体片（直径 2cm）を、異なる水温（5, 10, 15 ℃）、光量（35, 65, 115 μE m^{-2} s^{-1}）、および光周期（8:16, 12:12, 16:8 light: dark hr）で培養し、各環境要因が子嚢斑形成に及ぼす影響を調べた。培地には、プロバゾリの栄養塩補強海水、硝酸態窒素またはリン酸態リン制限海水、貧栄養海水を用いた。培養期間中、経時的に胞

子体片を取り出し、子嚢斑形成に伴う組織変化を光学顕微鏡下で観察すると共に、光合成および呼吸速度、核酸含有量も測定した。栄養塩の影響を調べた培養では、マコンブに加え、ミツイシコンブ、ホソメコンブおよびリシリコンブ胞子体片を用いて培養し、子嚢斑形成部位と非子嚢斑部位の窒素およびリン含有量を測定した。さらに、より効率的な生活環制御のため、マコンブ胞子体片をインドール酢酸（10^{-8}～10^{-5} M）およびアブシジン酸（10^{-7}～10^{-5} M）添加培地で培養し、植物成長調整物質の効果を調べた。最後に、アナメ、ガゴメおよびスジメ胞子体片を用いて、コンブ属以外のコンブ科植物への成熟誘導法の適応を試みた。

その結果、マコンブの子嚢斑形成に伴う組織学的および生理学的変化は、以下の 4 段階に区分することができた。第 1 段階は、表層細胞が上下 2 細胞に分裂するのみで、表層の隆起が確認できない時期である。第 2 段階は、上方の細胞が伸長して側糸になり、下方の細胞が伸長する過程である。この時期には、子嚢斑形成前に比べて光合成速度は減少し、呼吸速度および RNA 含有量は増加する。第 3 段階に入ると、下方の細胞が分化し遊走子嚢が形成される。この時期には DNA 含有量が高くなるが、光合成、呼吸速度、および RNA 含有量は第 2 段階と差異はない。第 4 段階では遊走子の放出後、遊走子嚢および側糸は表層から脱落した。

マコンブの子嚢斑形成に及ぼす環境要因の影響を調べた結果、低水温（5°C）から高水温（15 °C）の広い水温範囲で成熟することが確かめられた。また、広範囲の光条件（光量 35～115μE m^{-2} s^{-1} および光周期 8L:16D～16L:8D）で子嚢斑を形成することが可能であった。しかし、それぞれの環境要因が子嚢斑形成に及ぼす影響は異なり、子嚢斑形成時期を早める条件として富栄養、高水温（15 °C）および短日条件（8L:16D）が挙げられる。また、子嚢斑面積を左右させる要因は栄養塩、水温および光量であり、いずれも高い場合に子嚢斑面積が大きくなった。中でも栄養塩を制限した場合、子嚢斑面積は著しく低下した。これは子嚢斑を形成するために多量の栄養塩を必要とすることを示している。これらの結果から、成熟の最適条件は、高水温、高光量、短日および富栄養条件であることが明らかになった。

栄養塩の影響について詳細に検討するため、コンブ属植物の要求量を 4 種（マコンブ、ミツイシコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ）の窒素およびリン含有量と子嚢斑形成との関係を調べた。その結果、培地の栄養塩条件に関わらず子嚢斑部の窒素含

有量およびリン含有量は、それぞれ 1.78 mgN cm^{-3} および 0.182 mgP cm^{-3} 以上を示した。この結果からコンブ属植物の子嚢斑形成には、少なくとも 1.78 mgN cm^{-3} 以上の窒素、および 0.182 mgP cm^{-3} 以上のリンの蓄積が必要であり、どちらか一方がこれらの閾値に達しない場合には、子嚢斑を形成しないと考えられた。

葉状部および付着器から得た胞子体片を培養した結果、すべての部位で子嚢斑を形成する能力を有することが明らかになった。また鉛直方向に長い長方形の胞子体片では、それらの基部側に子嚢斑が形成された。一方、水平方向に長い胞子体片においては、縁辺部と基部の移行部に子嚢斑が形成した。中帯部と縁辺部を切り離し培養した結果、中帯部では基部側から成熟し、縁辺部では中帯部側に子嚢斑が形成された。これらの子嚢斑は、先端部および縁辺部側にその面積を拡大する傾向を示した。コンブ目植物では光合成産物や栄養塩が、ソース（供給源）の役割を担う先端部および縁辺部から、シンク（供給先）である基部および中帯部へ移動する。また、子嚢斑形成には栄養塩の蓄積が不可欠であることから、子嚢斑形成部位は栄養塩の移動とそれによる蓄積により決定されていると考えられた。

上述した胞子体成熟における高い栄養塩の影響に加え、成長調整物質も成長と成熟に影響を及ぼすことが明らかとなった。10^{-5} M インドール酢酸添加培地は、成長を促進させる効果がある反面、子嚢斑の形成を遅らせる効果があった。一方、10^{-5} M アブシジン酸添加培地は、成長抑制効果を示すが、成熟を促進することが明らかになった。このように、マコンブの成長と成熟がインドール酢酸およびアブシジン酸類の成長調整物質により制御されていることが示唆された。

本研究において、マコンブ胞子体片を培養することにより子嚢斑形成を誘導し、これから得られた遊走子は、胞子体へと正常に成長し、子嚢斑も形成することが確認できた。また、この方法はミツイシコンブ、ホソメコンブおよびリシリコンブのコンブ属植物のみならず、アナメ、ガゴメおよびスジメのコンブ科植物胞子体においても、広く適用できることが分かった。従って、胞子体片を用いた成熟誘導法は、コンブ科植物に属する産業有用種の種苗生産や選抜育種など、水産学的に応用可能な技術であり、その実用化が期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　嵯　峨　直　恆

副　査　　教　授　　高　橋　是太郎

副　査　　教　授　　中　尾　　繁

副　査　　助教授　　安　井　　肇

学 位 論 文 題 名

マコンブ（*Laminaria japonica* Areschoug）胞子体成熟に関する研究

平成15年1月29日（水）15時から16時にかけて、北海道大学水産科学研究科第二棟特別講義室において、教官10名、その他大学院生・学生を含む16名、計26名の出席のもとで公開論文発表会を行った。

研究発表内容は、コンブ属植物の再生産を左右する子嚢斑形成の誘導およびその条件に関する研究であり、以下の新しい知見が得られた。

1．マコンブの子嚢斑形成に伴う組織学的および生理学的変化は、以下の4段階に区分することができた。第1段階は、表層細胞が上下2細胞に分裂するのみで、表層の隆起が確認できない時期である。第2段階は、上方の細胞が伸長して側糸になり、下方の細胞が伸長する過程である。この時期には、子嚢斑形成前に比べて光合成速度は減少し、呼吸速度およびRNA含有量は増加する。第3段階に入ると、下方の細胞が分化し遊走子嚢が形成される。この時期にはDNA含有量が高くなるが、光合成、呼吸速度、およびRNA含有量は第2段階と差異はない。第4段階では遊走子の放出後、遊走子嚢および側糸は表層から脱落した。

2．マコンブの子嚢斑形成に及ぼす環境要因の影響を調べた結果、低水温（5°C）から高水温（15°C）の広い水温範囲で成熟することが確かめられた。また、広範囲の光条件（光量35～115μE m^{-2} s^{-1} および光周期8L:16D～16L:8D）で子嚢斑を形成することが可能であった。しかし、それぞれの環境要因が子嚢斑形成に及ぼす影響は異なり、子嚢斑形成時期を早める条件として富栄養、高水温（15°C）および短日条件（8L:16D）が挙げられる。また、子嚢斑面積を左右させる要因は栄養塩、水温および光量であり、いずれも高い場合に子嚢斑面積が大きくなった。中でも栄養塩を制限した場合、子嚢斑面積は著しく低下した。これは子嚢斑を形成するために多量

の栄養塩を必要とすることを示している。これらの結果から、成熟の最適条件は、高水温、高光量、短日および富栄養条件であることが明らかになった。

3．栄養塩の影響について詳細に検討するため、コンブ属植物の要求量を4種（マコンブ、ミツイシコンブ、ホソメコンブ、リシリコンブ）の窒素およびリン含有量と子嚢斑形成との関係を調べた。その結果、培地の栄養塩条件に関わらず子嚢斑部の窒素含有量およびリン含有量は、それぞれ 1.78 mgN cm^{-3} および 0.182 mgP cm^{-3} 以上を示した。この結果からコンブ属植物の子嚢斑形成には、少なくとも 1.78 mgN cm^{-3} 以上の窒素、および 0.182 mgP cm^{-3} 以上のリンの蓄積が必要であり、どちらか一方がこれらの閾値に達しない場合には、子嚢斑を形成しないと考えられた。

4．葉状部および付着器から得た胞子体片を培養した結果、すべての部位で子嚢斑を形成する能力を有することが明らかになった。また、子嚢斑形成部位は栄養塩の移動とそれによる蓄積により決定されていると考えられた。

5．植物成長調整物質も成長と成熟に影響を及ぼすことが明らかとなった。10^{-5} M インドール酢酸添加培地は、成長を促進させる効果がある反面、子嚢斑の形成を遅らせる効果があった。一方、10^{-5} M アブシジン酸添加培地は、成長抑制効果を示すが、成熟を促進することが明らかになった。このように、マコンブの成長と成熟がインドール酢酸およびアブシジン酸類の成長調整物質により制御されていることが示唆された。

6．本研究において、マコンブ胞子体片を培養することにより子嚢斑形成を誘導し、これから得られた遊走子は、胞子体へと正常に成長し、子嚢斑も形成することが確認できた。また、この方法はミツイシコンブ、ホソメコンブおよびリシリコンブのコンブ属植物のみならず、アナメ、ガゴメおよびスジメのコンブ科植物胞子体においても、広く適用できることが分かった。従って、胞子体片を用いた成熟誘導法は、コンブ科植物に属する産業有用種の種苗生産や選抜育種など、水産学的に応用可能な技術であり、その実用化が期待される。

公開発表終了後、一般の出席者から子嚢斑形成の最適条件、RNA の時間的変化、および良質な製品生産のための子嚢斑形成抑制に関する具体的手法に関する質問があった。また、教官からコンブ類の分布と子嚢斑形成条件の関連性、単一栄養塩欠乏と複数栄養塩欠乏の相互関係について質問があった。全ての質問に対し、的確な解答がなされた。以上の公開発表会の後、審査報告準備会を開催し、本研究は今後の研究に多大な貢献をなすものと審査委員一同は評価し、博士（水産科学）の学位を授与される資格があるものと判定した。