スサビノリ野生株とアサクサノリ緑色変異株からの プロトプラストの作出と再生^{*1}

荒木利芳, 青木恭彦, 北御門学

(1987 年 1 月 8 日受理)

Preparation and Regeneration of Protoplasts from Wild-type of *Porphyra yezoensis* and Green Variant of *P. tenera*^{*1}

Toshiyoshi Araki,^{*2} Takahiko Aoki,^{*2} and Manabu Kitamikado^{*2}

Porphyranase, β -1,4-mannanase, and β -1,3-xylanase, capable of degrading the cell wall of red algae, genus *Porphyra*, were prepared from the culture fluids of *Vibrio* sp. AP-2, *Aeromonas* sp. F-25, and *Vibrio* sp. AX-4, respectively. The thalli of *P. yezoensis*, after treatment with a 2% papain solution, were suspended in 5 ml of MES buffer, pH 6.0, containing 0.7 M mannitol and 1 unit each of porphyranase, β -1,4-mannanase, and β -1,3-xylanase. When a 100 mg weight of the thalli was shaken in the enzyme solution at 22°C for 90 min, ca. 8.6×10^5 protoplasts were released.

Protoplasts from *P. yezoensis* grew in a ASP₁₂ (NTA) medium and developed into brown thalli of ca. 10 cm in length after 3 months. A number of protoplasts were obtained from green variant of *P. tenera*, too. These green protoplasts developed into green thalli of ca. 10 cm in length after 2 months. A lot of monospores released from regenerated thalli of *P. yezoensis* (wild type) and *P. tenera* (green type) developed into brown thalli and green thalli, respectively.

海藻からのプロトプラストの作出ならびに再生技術の開発は、その生理学的研究や遺伝学的研究に有用であるばかりでなく、細胞融合による品種改良を行う上でも重要である。最近、主としてスサビノリ *Porphyra yezoensis* の葉状体を原料としてプロトプラストを作出し、さらに葉状体まで再生させたという報告が、藤田および右田,¹⁾ 著者ら,^{2),*3} 鬼頭ら⁴⁾ によって行われた。

一般に、細胞融合を成功させるためには、プロトプラストを大量に作出し、かつ再生させる技術と共に、融合体を選別するための指標が必要とされる。著者らはすでに、スサビノリ葉状体からプロトプラストを作出するために必要な酵素 (ポルフィラーナーゼ, β -1,4-マンナンナーゼ, β -1,3-キシランナーゼ) を、細菌を原料として大量に調製することに成功した。また、アサクサノリ *P. tenera* を研究室内で培養中、葉状体が通常の赤褐色のものとは異なった緑色の変異株を単離した (実験材料の項参照)。この緑色変異株を細胞融合による雑種形成の原料として使用すれば、色調を指標として雑種の選別が可能であると考えられる。

本研究では、融合による雑種作出の前段階として、赤褐色のスサビノリ野生株と緑色のアサクサノリ変異株から大量にプロトプラストを作出する方法ならびにそれらの葉状体への再生について検討したので報告する。

実験材料及び方法

供試海藻 スサビノリとアサクサノリ葉状体は福岡県有明水産試験場から供与されたカキ殻糸状体を培養して育成した。殻胞子の培養は Provasoli の ASP₁₂ (NTA) 培養液⁵⁾ を用い、温度 16~18°C, 照度 4,000 lx, 明期 9 時間/暗期 15 時間の光周期で行った。^{4,5)}

赤褐色のアサクサノリを培養中、葉状体の仮根部が赤褐色、先端部が緑色をした 1 枚の変異葉状体が生じたので、緑色の先端部を切り離して培養した。緑色切断片は生長すると多数の単胞子を放出し、その単胞子は緑色の葉状体に生長した。この葉状体をアサクサノリ緑色変異株として使用した。

使用酵素 ポルフィラーナーゼ, β -1,4-マンナンナーゼ及び β -1,3-キシランナーゼは、著者らが自然界から単離した

^{*1} 本報告の要旨は昭和 61 年度日本水産学会秋季大会において発表した。

^{*2} 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 46-04, Fukuoka 812, Japan).

^{*3} 幡手英雄, 青木恭彦, 荒木利芳, 北御門学: 昭和 60 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 120 (1985).

^{*4} 鬼頭 釣, 井上清和, 山崎 誠: 昭和 60 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 31 (1985).

3株の細菌, *Vibrio* sp. AP-2, *Aeromonas* sp. F-25, 及び *Vibrio* sp. AX-4 から前報²⁾ で示した方法によって調製した。すなわち, 各細菌を液体培養し, 遠心分離して得た上澄液に 75% 飽和になるまで固形硫酸を加えて静置した。遠心分離して得た沈澱物を少量の 50 mM 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid 緩衝液 (MES 緩衝液), pH 6.0, に溶解し, 同緩衝液で透析後, 酵素液として用いた。これら酵素の活性測定は前報と同様にポルフィラン, β -1, 4-マンナン, β -1, 3-キシランを基質として行い, 酵素の 1 単位は 1 時間に 1 μ mol のそれぞれの構成単糖に相当する還元力を生じる酵素量とした。

パペインはナガセ生化学工業から, アワビ内臓アセトン乾燥粉末はシグマ社 (Lot 41 F-9535) から購入した。

プロトプラストの作出 100 ml 容ビーカーに入れた 30 ml のパペイン液 (パペインと 0.7 M マンニトールを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.4) に葉長 1~3 cm の葉状体 (1~5 g) を浸し, 22°C で 15 分間振盪した。葉状体を 0.7 M マンニトール含有 MES 液 (5 mM CaCl_2 , 2% NaCl ならびに 0.5% potassium dextran sulfate を含む 25 mM MES 緩衝液, pH 6.0) で 5 回洗浄後, メスで数 mm 片に切断した。プロトプラスト計数試験に用いる葉状体切断片は重量を測定する前に滅菌ろ紙で附着水を吸収除去した。

次に, 20 ml 容三角フラスコ中の 5 ml の細胞壁溶解酵素液 (ポルフィラナーゼ, β -1, 4-マンナーゼ, β -1, 3-キシラナーゼ及び 0.7 M マンニトールを含む MES 液) に切断片 50~100 mg を懸濁し, 22°C で振盪した。懸濁液は 40 μ m のナイロンネットでろ別し, ネット通過液を 1,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離した。沈降したプロトプラストは 0.5 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA) 培養液で 3 回遠心洗浄した。プロトプラストの計数はトーマの計算盤を用いて, 1 条件につき 5 回行い, 平均値と標準偏差を求めた。

プロトプラストの培養 0.2 M マンニトールを含む ASP₁₂ (NTA) 培養液約 50 ml を入れた 9 cm ペトリ皿の中央に 3×3 cm のガラス板を置き, その上にプロトプラストを滅菌ピペットで移し, 16~18°C, 400 lx, 9 時間明/15 時間暗で静置培養した。2 日後, プロトプラストを乗せたガラス板を ASP₁₂ (NTA) 培養液へ移し, 照明を 1,000 lx にして, 静置培養した。さらに数日間培養し, 細胞壁を再生し, 仮根を出し, 細胞分裂を開始した後, 4,000 lx の照明下, 上記光周期で振盪培養した。数週間培養し, 数 mm のカルスに生長した後は, ASP₁₂ (NTA) 培養液 800 ml の入った 1 l のビーカーにカルスが付着しているガラス板を移し, 透明なラップフィルムでカバーをし, 培養液中に挿入したチューブを通して空気を送入しながら培養した。培養液は 10 日ごとに交換した。

実験結果

パペイン前処理 スサビノリの葉状体を種々の濃度のパペイン液で処理後, メスで細断した。細断片 50 mg を 0.1 単位ずつの前記 3 種の酵素を含む細胞壁溶解酵素液に浸漬し, 22°C, 90 分間振盪した後, 生じたプロトプラストを計数した。Fig. 1 に示すように, 葉状体を 1~2.5% のパペイン液で前処理してから細胞壁溶解酵素で分解すると, パペイン無処理の時よりプロトプラストの収量が約 2.5 倍多かった。

プロトプラスト作出時の温度と pH スサビノリ葉状体を 2% パペイン液で処理後, 細断した。細断片 100 mg を各 0.1 単位ずつのポルフィラナーゼ, β -1, 4-マンナーゼ及び β -1, 3-キシラナーゼを含む 0.7 M マンニトール含有 MES 液 (pH 6.0) か, または 0.7 M マンニトール含有トリス-塩酸液 (5 mM CaCl_2 , 2% NaCl ならびに 0.5% potassium dextran sulfate を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.4) に投入し, 22°C または 27°C で 90 分間振盪した。Fig. 2 に示すように, 各酵素を 0.7 M マンニトール含有 MES 液 (pH 6.0) に溶解

Fig. 1. Effect of papain treatment on protoplast isolation from vegetative thalli of *P. yezoensis*.

Fig. 2. Effect of pH value of the enzyme solution and incubation temperature on isolation of protoplasts from vegetative thalli of *P. yezoensis*.

□, MES buffer, pH 6.0; ▨, Tris-HCl buffer, pH 7.4.

し、22°C で反応を行った時に最も多くのプロトプラストが作出された。

プロトプラスト作出に及ぼす細胞壁溶解酵素の濃度と作用時間の影響 種々の濃度のポルフィラナーゼ、 β -1,4-マンナーゼ及び β -1,3-キシラナーゼを含む 0.7 M マンニトール含有 MES 液 5 ml に、2% パパイン液処理後の細断したスサビノリ葉状体片 100 mg を浸漬し、22°C で 90 分間振盪し、生じたプロトプラストをナイロンネットです別して計数した。未分解の葉状体は再び新しく調整した細胞壁溶解酵素液中に浸して 90 分間振盪し、生じたプロトプラストを計数した。ろ別した未分解の葉状体はさらに新しく調整した細胞壁溶解酵素液中に浸し、一夜 16°C の酵素液中で振盪して、プロトプラストを計数した。Fig. 3 に示すように、各 0.5 単位以上の酵素を含む溶解酵素液で 1.5 時間以上、または各 0.1

Fig. 3. Protoplast isolation as related to length of incubation period in enzyme solution.

Activities of porphyranase, β -1, 4-mannanase, and β -1,3-xylanase in enzyme solution: ○, 0.1 unit; □, 0.5 unit; ●, 1 unit.

Fig. 4. Thallus regeneration from protoplast culture of *P. yezoensis*.

A, protoplasts from thalli of *P. yezoensis*; B, dividing cells after 1-2 weeks; C, calli after 6-7 weeks; D, thalli after 11 weeks; E, thallus after 13 weeks; F, monospores and germlings formed from regenerated thallus after 14 weeks.

Fig. 5. Thallus regeneration from protoplast culture of *P. tenera*.

A, protoplasts from thalli of *P. tenera*; B, dividing cells after 1–2 weeks; C, callus and thallus after 5–6 weeks; D, calli and thalli after 7–8 weeks; E, thalli after 10 weeks; F, monospores and germlings formed from regenerated thallus after 12 weeks.

単位の酵素を含む溶解酵素液で3時間以上処理すると、葉状体 100 mg から 4.8×10^6 個以上のプロトプラストが得られた。

スサビノリ野生株と緑色型のアサクサノリ変異株から作出したプロトプラストの葉状体への再生 葉長 1–3 cm のスサビノリ及びアサクサノリからプロトプラストを作出し、実験方法の項で述べた条件で培養した。両藻のプロトプラスト (Figs. 4-A 及び 5-A) は 5–10 日後に仮根を出し、分裂を始めた (Figs. 4-B 及び 5-B)。いくつかのプロトプラストは規則的に分裂し、そのまま正常な形の葉状体へ生長した。他のプロトプラストは不規則な分裂を行い、数週間後不定形のカルスを形成した。不定形のカルスはその後の増殖に伴って形の整った葉状体 (Figs. 4-C, D, E) かまたは葉端がカールした肉厚の葉状体へ移行した。また、中には数百 μm から数 mm に

増殖したカルスから多数の幼芽が出芽し、その幼芽が正常な形の葉状体へ生長した (Figs. 5-C, D, E)。両藻の再生葉状体は多数の単胞子を放出し、それら単胞子は幼芽を生じた (Figs. 4-F, 及び 5-F)。スサビノリの幼芽はすべて赤褐色の葉状体へ、またアサクサノリの幼芽はすべて緑色の葉状体へ生長した (Fig. 6)。

考 察

著者らは前回²⁾ アマノリ属海藻からのプロトプラスト作出のために、3 株の細菌の培養ろ液を原料として硫酸塩析とセファデックスろ過とで部分精製したボルフィラナーゼ、 β -1,4-マンナーゼ及び β -1,3-キシラーナーゼの酵素標品を使用した。本研究では、培養ろ液を硫酸塩析しただけの粗酵素標品を使用した。再生力のあるプロトプラストの作出は可能であった。また、一般に植物細

Fig. 6. Thalli developed from monospores of regenerated thalli of *P. tenera* and *P. yezoensis*. The upper two green thalli in *P. tenera*; the lower two reddish brown thalli in *P. yezoensis*.

胞融合の実験では $5 \times 10^4/\text{ml} \sim 10^5/\text{ml}$ のプロトプラスト懸濁液が必要とされている。⁶⁾ 本研究の結果から明らかに、アマノリ属海藻を 2% パバイン液で前処理してから細断し、細断片 100 mg を 0.5 単位ずつの前記 3 酵素を含む細胞壁溶解酵素液 5 ml に浸漬、 22°C で 1.5~3 時間振盪すると、 $10^5 \sim 10^6$ 個という多量のプロトプラストの作出が可能であった。

アマノリ属海藻からのプロトプラストの作出に市販のアワビ内臓アセトン乾燥粉末がしばしば使用されている。^{4,7)} この乾燥粉末に含まれている酵素の活性を 50 mM 酢酸塩緩衝液、pH 6.0、及び反応温度 37°C の条件下で測定すると、乾燥粉末 1 g 中にポルフィラーナーゼ 1.4 単位、 β -1,4-マンナーゼ 12 単位、及び β -1,3-キシラーナーゼ 0.77 単位が検出された。最も含有率の低い β -1,3-キシラーナーゼを基準にして計算すると、各酵素とも 0.5 単位以上含む酵素液 5 ml を調整するためには、0.6 g 以上の乾燥粉末を 5 ml の緩衝液で抽出せねばならない。著者らは、アワビ内臓アセトン乾燥粉末と細菌起源の酵素標品との海藻プロトプラスト作出力を厳密に比較していないが、2% のアワビ乾燥粉末抽出液を使用した場合は 0.5 単位ずつの細菌起源酵素の混液と比較してアマノリ属海藻からのプロトプラスト作出力は著しく劣り、プロトプラスト作出に長時間を必要とし、作出されるプロトプラストの数も極めて少ないことをしばしば経

験した。なお、前報²⁾ に各細菌の酵素産生力を報告しているが、各培養液 1 l ずつを硫酸塩析すると、ポルフィラーナーゼで 21 単位、 β -1,4-マンナーゼで 1,500 単位、 β -1,3-キシラーナーゼで 56 単位の酵素標品を得ることができる。

藤田および右田¹⁾ は海洋環境から分離した細菌 *Pseudomonas* P-1 の培養ろ液を硫酸塩析した酵素標品を使用して、スサビノリ葉状体からプロトプラストの作出に成功しているが、彼等が使用した酵素標品に含まれる酵素の種類や活性については記載がないので不明である。彼等はまた、作出されたプロトプラストの再生にも触れ、細胞壁再生後仮根を形成し、細胞分裂を繰り返して円形あるいは不定形の葉状体へ生長したと報告している。著者らの実験結果でもスサビノリとアサクサノリ葉状体から作出したプロトプラストは同様な過程を経て葉状体へと生長している。

著者らは現在、赤褐色スサビノリ野生株とアサクサノリ緑色変異株とを原料として多数のプロトプラストを作出し、ポリエチレングリコールによる細胞融合処理を行い、その後、さらに数 cm の葉状体にまで生長させている。これらの葉状体の内には、色調を指標として判断した場合に雑種とみなされるものが存在する。この点についての研究結果は逐次発表する予定である。

終りに、ノリ糸状体を提供していただいた福岡県有明水産試験場の関係各位に感謝する。

文 献

- 1) 藤田雄二, 右田清治: 長崎大水产学部研報, **57**, 39-45 (1985).
- 2) 幡手英雄, 青木恭彦, 荒木利芳, 北御門学: 日水誌, **52**, 545-548 (1986).
- 3) L. Provasoli, J. J. A. McLaughlin, and M. R. Droop: *Arch. Mikrobiol.*, **25**, 392-428 (1957).
- 4) H. Iwasaki: *Biol. Bull.*, **121**, 173-187 (1961).
- 5) 藤山虎也: 藻類実験法 (田宮 博, 渡辺 篤編), 南江堂, 東京, 1972, pp. 171-184.
- 6) 中田和男: 植物組織培養の技術 (竹内正幸, 中島哲夫, 古谷 力編), 朝倉書店, 東京, 1983, pp. 74-77.
- 7) 嵯峨直恒, Aharon Gibor: 植物バイオテクノロジー (山田康之, 岡田吉美編), 東京化学同人, 東京, 1986, pp. 64-68.