

紅藻カイガラアマノリ低塩分耐性候補株2株の生長に及ぼす塩分の影響

阿部真比古^{1†}・大柱智美¹・村瀬 昇¹・岸岡正伸²

Influences of salinity on growth of two *Pyropia tenuipedalis* strains selected in low salinity condition

Mahiko Abe^{1†}, Tomomi Ohashira¹, Noboru Murase¹, Masanobu Kishioka²

Abstract : We investigated the influences of salinity on growth of two strains of *Pyropia tenuipedalis* selected in low salinity condition (approximately 3 salinity). At the different salinity conditions of seawater concentrations (0, 25, 50, 75 and 100%), original, a month selection and four months selection strains were able to grow under 25–100% (approximately 8–32 salinity) seawater conditions, particularly it had well growth under 75% condition. The growth of original and a month selection strains under 100% condition were better than those under 50% condition. On the other hand, the growth of four months selection strain under 50% condition was better than that under 100% condition. Therefore, it was thought that four months selection strain had tolerance to the lower salinity in comparison with the original and a month selection strains. Moreover, it was thought that the cell selection technique in the present study was useful for *Pyropia* breeding.

Key words : *Pyropia tenuipedalis*, cell selection, growth, low salinity

緒 言

カイガラアマノリ *Pyropia tenuipedalis* (Miura) Kikuchi et Miyata は、紅藻綱ウシケノリ目ウシケノリ科に属するアマノリ類である。本種は、東京湾、伊勢湾、大阪湾および瀬戸内海の一部に分布し¹⁻⁵⁾、環境省のレッドデータブックで絶滅危惧 I 類に指定されている⁶⁾。本種は、山口県において樫野川河口域、秋穂湾、佐波川河口域および厚東川河口域で確認されている^{3,5)}。山口湾沿岸域では、本種が鮮やかな赤色を呈することから「アカノリ」と称されて食用利用されてきた^{3,5)}。山口県では、本種を地域特産種として平成14年度から増養殖生産技術の開発に取り組み、平成20年度には地域特産品として試験販売を開始した。

本種の養殖は平成19～23年度は山口湾で、平成24年度は山口湾と厚東川、平成25年度以降は厚東川のみで行われてきた。平成23年度の本種の生産量は山口湾のみで823kg

(湿重量)に達したが、平成24年度の実生産量は山口湾と厚東川を合わせても320kgと前年度に比べて、半分以下となった。その後も生産は不安定な状況にある。この要因として増養殖プレートを展開した漁期当初の12月頃の低水温、繁茂期である2月下旬～3月上旬における低栄養塩および水温上昇が挙げられた⁷⁾。また、平成27年度での試験養殖では、発育の遅れ、生長不良および葉状体の流失が生じた⁸⁾。この要因として、11月上旬～12月下旬にかけての高水温および低塩分による生長不良が報告されている⁸⁾。低塩分に関しては、中山ら⁹⁾が室内培養において、塩分約8のような低塩分下では培養3日目まではほとんど影響が認められないが、それより長期間曝された場合には生長が鈍化する可能性があるとして報告している。このように環境変動の激しい河口域でのカイガラアマノリ養殖においては、水温変動だけでなく低塩分を含む激しい塩分変動下でも安定して生産できる養殖株の作出が求められている。

新規養殖株を作出する技術の一つとして、プロトプラス

¹ 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

² 山口県水産研究センター内海研究部 (Inland Sea Division, Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center)

[†] 別刷り請求先 abemahi@fish-u.ac.jp

ト（細胞壁を取り除いた細胞膜に包まれた原形質塊のこと）を用いた細胞融合や変異細胞の探索がある^{10, 11)}。この技術を用いて、福永・岩淵¹²⁾は、スサビノリの低塩分に耐性を持つ株を作出している。また、プロトプラストを用いた細胞融合による育種において、今までに、スサビノリ *P. yezoensis*とアサクサノリ *P. tenera*, スサビノリとウツプルイノリ *P. pseudolinearis*, スサビノリとマルバアマノリ *P. suborbiculata*のそれぞれの融合により高水温耐性の品種、赤腐れ菌に対して抵抗性のある株などが作出されている¹³⁾。しかし、プロトプラストによる細胞選抜法や細胞融合法は、再生体のほとんどがカルス化し、正常な葉状体に生長しないという形態形成の制御に大きな課題がある^{14, 15)}。一方、能登谷¹⁶⁾は、ノリ葉状体の組織片を培養すると極性を失わず、正常な形態の葉状体へと生長すると報告している。また、坂口¹⁷⁾はプロトプラスト化せずにノリ葉状体内の細胞選抜を活用した育種により、三重県の高水温耐性品種「みえのあかり」を作出している。つまり、葉状体をプロトプラスト化せずに、細胞選抜することにより環境ストレス耐性株を作出することが可能であると考えられる。

本研究では、これまでにカイガラアマノリの低塩分耐性株の作出を目的として、坂口¹⁷⁾の方法を参考に、塩分を1/10倍にした海水下で葉状体内の低塩分耐性細胞を選抜し、その細胞から葉状体の再生、成熟後に保存株を確立した。本研究では、作出されたカイガラアマノリの低塩分耐性候補株2株の生長に及ぼす塩分の影響を調べた。

材料と方法

本研究に用いたカイガラアマノリ葉状体は、水産大学校藻場生態系保全研究室にて保存されている山口県宇部市厚東川産の糸状体から得た。この糸状体を1/2SWM-III改変培地（SWM-III¹⁸⁾からS-3vitamin, 土壌抽出物, Trisおよび肝臓抽出物を除去し、処方量の1/2量を添加したもの¹⁹⁾を用いて、温度18°C, 光量40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期10時間明期：14時間暗期の条件下で通気培養し、得られた葉状体から低塩分選抜候補株を作出した。

低塩分耐性候補株2株は以下の手順で作出した（Fig. 1）。上記の葉状体を直径8mmの生検トレパン（カイ インダストリーズ株式会社製）で葉片6枚を切り出した。葉片

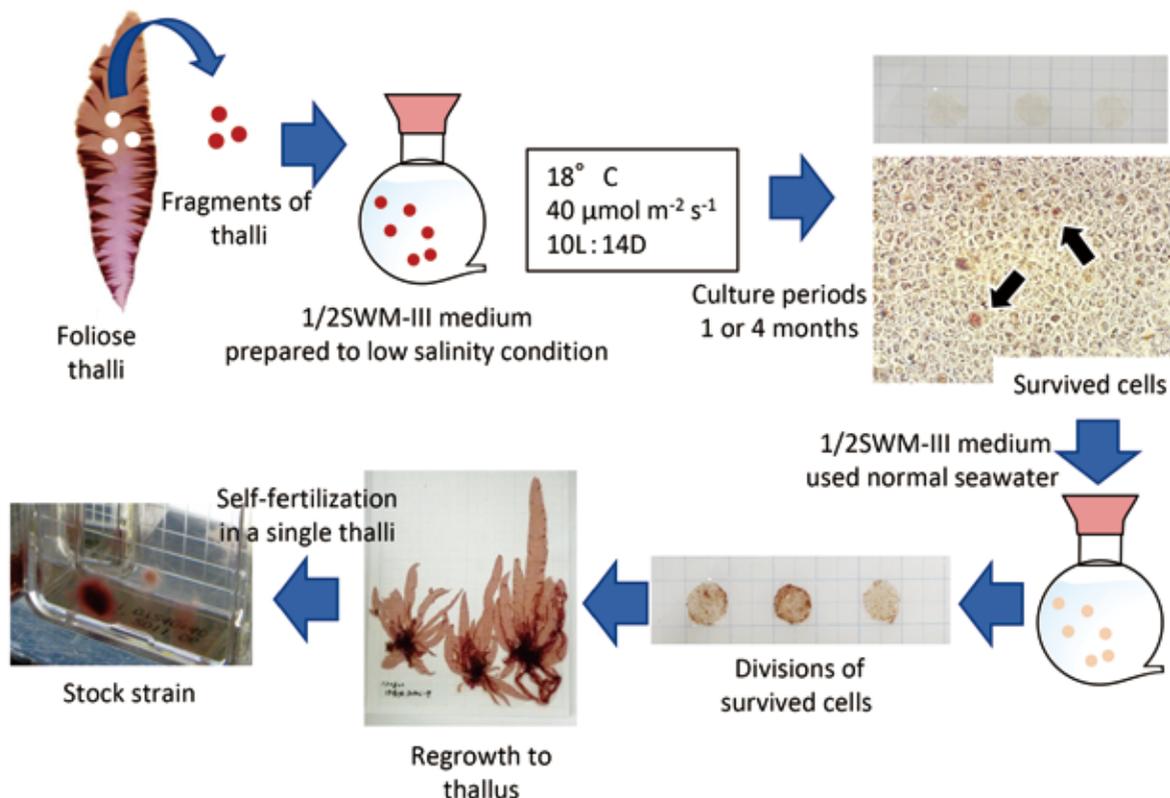


Fig. 1. Process for making low salinity tolerant strains using cell selections within *Pyropia tenuipedalis* thalli.

は、容量500mLの枝付き培養フラスコを用い、塩分を1/10倍に希釈した1/2SWM-III改変培地を用いて通気培養した。温度18°C、光量40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光周期10時間明期：14時間暗期とし、培養期間は1ヵ月または4ヵ月間とした。塩分を1/10倍に希釈した1/2SWM-III改変培地で1ヵ月間培養したものを1ヵ月低塩分選抜株、4ヵ月間培養したものを4ヵ月低塩分選抜株とした。低塩分環境下での培養により、細胞の選抜を行った。その後、通常の塩分に戻した1/2SWM-III改変培地を用いて前述と同様の条件で通気培養すると、それぞれの株の葉状体が再生した。再生した葉状体を成熟させ、1ヵ月低塩分選抜株および4ヵ月低塩分選抜株のそれぞれの糸状体保存株を確立した。確立したそれぞれの糸状体を温度18°C、光量40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光周期10時間明期：14時間暗期の条件下で培養し、葉長1~3cmの葉状体を得て、実験に用いた。なお、対照区には元株の厚東川産葉状体（以後、元株）を用いた。

実験は、滅菌した濾過海水を100%（塩分約32~34）およびそれを蒸留水で75%（塩分約24~25）、50%（塩分約16~17）、25%（塩分約8~9）、0%（塩分0、蒸留水のみ）に希釈することにより塩分の異なる5試験区を設けた。塩分の異なる各試験区の培養液から1/2SWM-III改変培地を作製した。培養条件は温度18°C、光量40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光周期10時間明期：14時間暗期とし、15日間通気培養した。培養には容量1Lの枝付き培養フラスコを用い、換水および測定は3日ごとに行った。各試験区において、元株、1ヵ月低塩分選抜株および4ヵ月低塩分選抜株の葉状体をそれぞれ単独の別容器に6個体ずつ入れ、計15試験区を設けた。測定は生長で評価をし、一連の実験は2~3回繰り返した。

生長は、すべての葉状体について個体識別を行い、葉面積を測定した。測定には、デジタルカメラ（PENTAX Optio W90、株式会社リコー）を用いて葉状体を3日ごとに撮影し、画像処理ソフト（Paint.net）および画像解析ソフト（ImageJ²⁰）により葉面積を求めた。これらの結果から、培養15日間の相対生長率（% day⁻¹）を算出した。相対生長率（% day⁻¹）の算出式を以下に示す。

相対生長率（% day⁻¹）

$$= \log_e (\text{培養最終日の葉面積} / \text{培養開始日の葉面積}) / \text{培養日数} \times 100$$

統計処理は、天然株、1ヵ月低塩分選抜株および4ヵ月低

塩分選抜株におけるそれぞれの培養15日間の相対生長率（% day⁻¹）について、各試験区間でKyplot 5.0 Free ver 5.0.3（株式会社カイエンス）を用いてTukeyの多重比較検定を行った。

結 果

Fig. 2には、元株、1ヵ月低塩分選抜株および4ヵ月低塩分選抜株の各試験区におけるカイガラアマノリの培養15日間の相対生長率を示す。元株（Fig. 2-A）では、75%区で25.8 ± 1.7% day⁻¹（平均値 ± 標準偏差）と最も生長が良好であった。次いで、50%区および100%区でそれぞれ21.7 ± 2.3% day⁻¹と20.0 ± 1.8% day⁻¹であった。25%区では14.9 ± 2.0% day⁻¹と低い値を示した。75%区は50%区および100%区に対して有意に高い値を示し、25%区は50%区および100%区に対して有意に低い値を示した（ $p < 0.05$, $n = 12$ ）。0%区では、培養3日目には脱色し、その後も生長は認められなかった。

1ヵ月低塩分選抜株（Fig. 2-B）では、75%区で21.4 ± 1.3% day⁻¹と最も生長が良好であった。次いで、50%区および100%区ではそれぞれ17.4 ± 0.8% day⁻¹と17.0 ± 1.3% day⁻¹であった。25%区では12.6 ± 0.8% day⁻¹と最も低い値を示した。75%区は50%区および100%区に対して有意に高い値を示し、25%区は50%区および100%区に対して有意に低い値を示した（ $p < 0.05$, $n = 12$ ）。0%区では、元株と同様に培養3日目には脱色し、その後も生長は認められなかった。

4ヵ月低塩分選抜株（Fig. 2-C）では、75%区で21.8 ± 3.1% day⁻¹と最も高い値を示した。50%区では18.5 ± 2.0% day⁻¹、100%区では14.5 ± 1.3% day⁻¹であり、50%区の方が100%区よりも高い値を示した。25%区は12.6 ± 3.4% day⁻¹となり100%区と同程度の値を示した。75%区は50%区に対して有意に高い値を示し、50%区は25%区および100%区に対して有意に高い値を示した（ $p < 0.05$, $n = 18$ ）。0%区では、元株および1ヵ月低塩分選抜株と同様に培養3日目には脱色し、その後も生長は認められなかった。

考 察

本研究では、低塩分環境下において葉状体内から細胞を選抜し、作出されたカイガラアマノリの低塩分耐性候補株2株の生長に及ぼす塩分の影響を調べた。

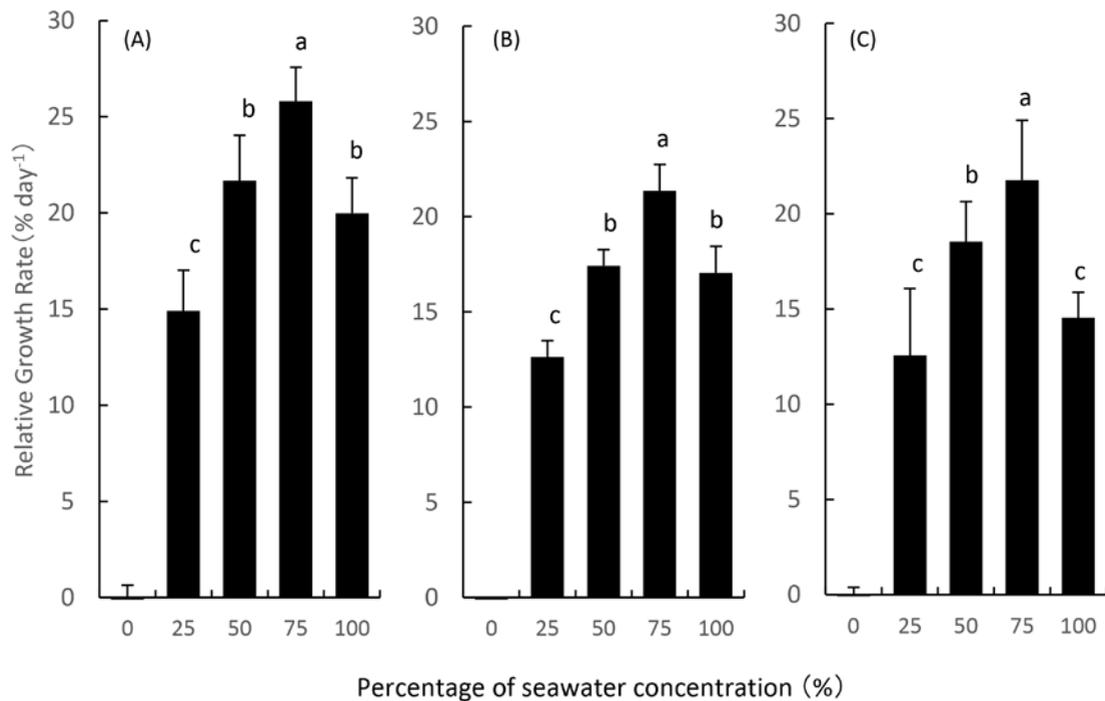


Fig. 2. Relative growth rates of *Pyropia tenuipedalis* thalli from Koto river as original strain (A), a month selection strain (B) and four months selection strain (C). Different letters on bars indicate significantly different among seawater concentration by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).

元株, 1ヵ月低塩分選抜株および4ヵ月低塩分選抜株において, 25~100%区で培養した葉状体は全て生長し, 特に75%区(塩分24~25)で最も生長が良好であった。中山ら⁹⁾は山口県宇部市厚東川河口域における塩分の日変動は0~23.8と激しいものの, 日平均は16.2~23.6であったと報告している。75%区の塩分は, 本研究で用いた厚東川産カイガラアマノリが自生している塩分環境に近いため, 良好に生長したと考えられる。また, 元株および1ヵ月低塩分選抜株の生長は, 50%区と100%区で同程度, 25%区で最も低い値を示した。一方, 4ヵ月低塩分選抜株の生長は, 75%区の次に50%区で良好で, 100%区および25%区で同程度の値を示した。1ヵ月低塩分選抜株を作出する際に, 塩分を通常の1/10倍に希釈した海水で1ヵ月間培養しても葉状体内の細胞の多くが生残した。一方, 4ヵ月低塩分選抜株を作出する際には, 葉状体内の生残細胞は数細胞のみであった。陸上植物では水環境ストレスにより, 脂質やタンパク質などの代謝遺伝子が発現することが知られている²¹⁾。また, 瀬戸ら²²⁾はアマノリ類では低塩分ストレスで多価不飽和脂肪酸の割合が増加すると報告している。本研究では, 1ヵ月低塩分選抜株は元株と生長特性がほとんど変化

しなかった。しかし, 4ヵ月低塩分選抜株では, 元株や1ヵ月低塩分選抜株とは異なる生長特性を示した。これは, 4ヵ月低塩分選抜株の作出時の生残細胞が少なく, より特異的な細胞が選抜されたためと思われる。したがって, 細胞選抜による環境ストレス耐性候補株を作出するには, 葉状体内の数細胞のみが生残するような強い環境ストレスを与える必要があると思われる。

相対生長率に関しては, 1ヵ月低塩分選抜株や4ヵ月低塩分選抜株は元株に比べて低い値を示した。大型藻類においては, 物理的な強度や藻体内の窒素含量などはトレードオフの関係にあることが知られている²³⁾。本研究ではカイガラアマノリ葉状体の生理的・生化学的な研究は行っていないが, 低塩分選抜株は多価不飽和脂肪酸などの代謝産物の増加に伴い, 生長が鈍化した可能性が示唆される。

本研究で使用したプロトプラスト化しない細胞選抜においては, これまでの高水温耐性だけでなく低塩分耐性についても活用することができた。この技術は, 高温や低塩分以外の環境ストレス耐性品種の作出にも有効であると考えられる。

引用文献

- 1) 能登谷正浩, 菊地則雄: *Porphyra tenuipedalis* Miura (カイガラアマノリ). 堀輝三(編), 藻類の生活史集成. 内田老鶴圃, 東京, 214-215 (1993)
- 2) 阿知波英明: カイガラアマノリ葉状体の冷凍および乾燥耐性について. 愛知県水試研報告, 3, 49-51 (1996)
- 3) 岸岡正伸, 松野 進, 多賀 茂: カイガラアマノリ分布調査. 平成13年度山口県水産研究センター事業報告書, 山口県水産研究センター, 145-149 (2003)
- 4) 島村嘉一, 菊地則雄: 千葉県浦安市沿岸における絶滅危惧種カイガラアマノリ *Porphyra tenuipedalis* (紅藻ウシケノリ目) の生息地について. 千葉中央博自然誌研究報告 9, 55-61 (2007)
- 5) 阿部真比古, 村瀬 昇, 畑間俊弘, 鹿野陽介, 金井大成: カイガラアマノリの新産地~山口県厚東川河口域~. 水産大学校研究報告, 63, 244-248 (2015)
- 6) 環境省: 植物II (藻類), 第4次レッドリスト (2019)
- 7) 畑間俊弘, 金井大成, 松尾圭司, 原川泰弘, 鹿野陽介, 茅野昌大: カイガラアマノリ増養殖技術開発試験事業. 平成22年度山口県水産研究センター事業報告書, 山口県水産研究センター, 45-46 (2012)
- 8) 鹿野陽介, 畑間俊弘, 和西昭仁: カイガラアマノリ増養殖技術開発試験事業. (2) プレート型基質改良試験. 平成25年度山口県水産研究センター事業報告書, 山口県水産研究センター, 50-51 (2015)
- 9) 中山冬麻, 阿部真比古, 村瀬 昇, 鹿野陽介: 紅藻カイガラアマノリおよびスサビノリ葉状体の生長に及ぼす塩分の影響. 水産増殖, 65, 321-330 (2017)
- 10) 藤田雄二, 右田清治: 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, 57, 39-45 (1985)
- 11) 阿部真比古, 藤田雄二, 小林正裕, 藤吉栄次, 玉城泉也, 福井洋平, 里見正隆, 村瀬 昇: スサビノリプロトプラストの生残と生長に対する抗生物質の影響. 水産増殖, 63, 1-8 (2015)
- 12) 福永 剛, 岩淵光伸: 低塩分条件下で選抜したアマノリ系統の特性. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 14, 45-49 (2004)
- 13) 藤田雄二, ウツバラバティ スリニヴァサ ラオ: 体細胞融合と耐病性. 能登谷正浩(編), 海苔の生物学. 成山堂書店, 東京, 114-127 (2000)
- 14) 鬼頭 鈞: ノリのプロトプラストの作出と個体の再生. 農林水産技術研究ジャーナル, 8, 20-24 (1985)
- 15) 荒木利芳, 青木恭彦, 北御門学: 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. 日本水産学会誌, 53, 1623-1627 (1987)
- 16) 能登谷正浩: アマノリ類の組織培養と養殖への応用. 水産増殖, 45, 405-409 (1997)
- 17) 坂口研一: 三重県の高水温耐性黒ノリの新品種「みえのあかり」. 農林水産技術研究ジャーナル, 34, 42-43 (2011)
- 18) 尾形栄二: 新しい海藻培養液SWM-IIIについて. 藻類, 18, 171-173 (1970)
- 19) 藤吉栄次・小林正裕・有瀧真人: 3-1. 培養条件について. アマノリ養殖品種の特性. 藤吉栄次, 玉城泉也, 小林正裕, 有瀧真人(編), 独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所, 長崎, 24-28 (2014)
- 20) Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2016, 2014年5月27日.
- 21) 平沢 正: 第2章 水環境に対する応答 1, 水環境と植物の生態生理. 渡邊 昭, 篠崎一雄, 寺島一郎 監修. 植物の環境応答, 生存戦略とその分子機構. 秀潤社, 東京, 50-58 (1999)
- 22) 瀬戸彩映里, 小林哲幸, 菊池則雄, 寫田 智: アサクサノリ・スサビノリの多価不飽和脂肪酸と環境適応の関係. 藻類, 67, 63 (2019)
- 23) Sakanishi Y, Kasai H, Tanaka J: Trade-off relationship between productivity and thallus toughness in Laminariales (Phaeophyceae). *Phycol Res*, 65, 103-110 (2017)

