

スサビノリプロトプラストの生残と 生長に及ぼす有機態窒素4種の影響 (予報)

阿部真比古^{1†}, 多良千鶴², 藤木伸哉², 川崎周作³, 村瀬昇¹

Effects of four organic nitrogen in survival and growth of *Neopyropia yezoensis* protoplasts -Preliminary study-

Mahiko Abe^{1†}, Chizuru Tara², Shinya Fujiki², Shusaku Kawasaki³
and Noboru Murase¹

Abstract : In order to research useful organic nitrogen, survival and growth of *Neopyropia yezoensis* protoplasts were examined using L-arginine (Arg), L-glutamic acid (Glu), Inosine (Ino) and taurine in 0.1, 1.0 and 10 mM. For survival rates for 1 week in culture, there were no significant differences except Glu in 1.0 and 10 mM. For growth for 3 weeks in culture, Arg in 10 mM was grown over two-times higher compared with control. On the other hand, growth in Glu and taurine were suppressed under every condition. Moreover, growth in Ino in 10 mM was suppressed. Our data suggested that *Neopyropia yezoensis* use directly organic nitrogen and has a potential to induce growth using organic nitrogen.

Key words : *Neopyropia yezoensis*, growth, organic nitrogen, protoplast, survival

緒言

スサビノリ *Neopyropia yezoensis* は、紅藻綱ウシケノリ目ウシケノリ科アマノリ属に属し、海苔として我が国沿岸で広く養殖されている重要な食用種である。近年、地球温暖化による海水温の上昇に伴う漁期の開始時期の遅れや漁期の短縮化などが起こり、国内ノリ養殖産業は大きな打撃を受けている。また、瀬戸内海は陸域から適正な栄養塩が流入せず、漁場の貧栄養化によりノリの色落ち現象が多発している¹⁾。これらに加えて、日本のノリ養殖産業は生産量の減少や韓国や中国からのノリ製品の輸入増大により単価が著しく低迷している^{1, 2)}。

このような背景から、環境変動への耐性や高品質化など、

差別化を図れる新しい特性を持った養殖品種の作出が急務となっている。しかし、長年にわたり選抜を繰り返し、養殖品種として確立されてきたナラワスサビノリ *Neopyropia yezoensis* f. *narawaensis*³⁾ は遺伝的な多様性が乏しく¹⁾、新たな優良特性を探し出すには時間を要する。そのため、育種と並行して、現行の養殖手法の中で生産の安定化を図る技術開発も求められている。

養殖ノリの色落ちに関しては、栄養塩不足が起因していることから、ダムからの計画放水による漁場への栄養塩供給^{4, 5)} や下水処理施設の栄養塩管理運転⁶⁾、散布した栄養塩(施肥)の効果を持続させるためのノリスカート⁷⁾ などの対策が報告されている。これらのような海域への栄養塩

2021年8月18日受付、2021年10月18日受理

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, Japan Fisheries Research and Education Agency)

2 味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 (AJINOMOTO CO. INC., Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals)

3 兵庫県漁業協同組合連合会兵庫のり研究所 (Hyogo Prefectural Federation of Fisheries Co-operative Associations, Hyogo Nori Institute)

† 別刷り請求先 (corresponding author): abemahi@fish-u.ac.jp

供給は、環境負荷、生態系への影響、ノリと栄養塩を競合する植物プランクトンの増殖などが懸念されている。一方、坂口ら⁸⁾は、ノリの摘採後から加工に入るまでの陸上での工程の中で、25 mg L⁻¹という高濃度のアンモニア態窒素に浸漬することによって色調が回復することを報告している。しかし、この技術は産業規模としての実施を課題に挙げている。

陸上植物では、アンモニアや硝酸などの無機態窒素に加えて、有機態窒素の利用に関する研究が行われている⁹⁾。特に、有機態窒素の中でもアミノ酸類は植物細胞の無菌培養においても、水耕栽培においても効果的に利用され、安定生産に貢献している¹⁰⁾。また、生育ステージによって効果のあるアミノ酸が異なること¹¹⁾やアミノ酸の種類と濃度によって作物の地上部と地下部の生長が異なること⁹⁾、植物における病害抵抗性を高めること¹²⁾も報告されている。海藻類においてもアミノ酸を含む有機態窒素は、栄養塩添加という位置づけだけでなく、器官分化の誘導や初期生育の促進、病害抵抗性の増強などに活用できる可能性がある。

これまでにノリ葉状体を用いた室内培養試験において、無機態窒素よりも吸収は少ないものの¹³⁾、アミノ酸などを添加することにより生長促進効果や取り込みなどが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。また、寺本・木下¹⁵⁾や野田ら¹⁸⁾では、アミノ酸が赤腐れ病の防除に有効であることも報告されている。しかし、これらの研究は、スサビノリあるいはアサクサノリ *Neopyropia tenera*が用いられているが、報告によって生長促進や赤腐れ病防除に効果のある有機態窒素種が異なっている。アミノ酸などの有機物質は自然環境下に多く含まれており、植物に対するそれらの直接的な影響を知るためには微生物を除いて実験を行う必要がある¹⁹⁾。陸上植物においては、無菌培養技術が存在することから、無菌培養実験を始めとして、有菌状態での実験、生育ステージを踏まえた実験を行い、最終的に有効な窒素源を見出している。一方、ノリにおいても、プロトプラストの無菌分離技術が報告されている²⁰⁾ものの、陸上植物のような体系的な実験は行われていない。そのため、陸上植物の場合と同様に、無菌的なプロトプラスト培養試験を実施した上で、有機態窒素の絞り込みや活用を図っていく必要がある。

藤田・山下²¹⁾は、無菌的なノリプロトプラストを使用し、プロトプラストの再生(発生)に対するアミノ酸類の影響を調べている。この報告では、アミノ酸の種類や濃度によってノリプロトプラストへの影響が異なり、一部のアミノ酸

類は発生率を高めている。しかし、藤田・山下²¹⁾では、アラニン、グルタミン酸、リジンなど一部のアミノ酸にはプロトプラストの生長を促進していることも述べられているが、具体的な数値などは書かれていない。そのため、ノリプロトプラストの生長においては、無菌培養下での有機態窒素の影響を明確にしていく必要がある。

本研究では、藤田・山下²¹⁾の方法を参考に、無菌状態のノリプロトプラストを用い、4種類の有機態窒素の異なる濃度での培養実験を行うことで、生残だけでなく生長に及ぼす影響も調べた。

材料と方法

ノリ葉状体の培養

実験には、兵庫県漁業協同組合連合会兵庫のり研究所において陸上採苗されたナラワスサビノリ *Neopyropia yezoensis* f. *narawaensis* HG-4株の葉状体を用いた。葉状体は網上で全長約1 cmまで育苗した状態で、乾燥・凍結させて水産大学校に送付され、実験開始まで-20℃で凍結保存された。凍結保存した葉状体を適量とりだし、予備培養を行った。予備培養は、葉状体表面に付着している珪藻や微生物を除去するために、濾過滅菌した抗生物質混液(ペニシリンGカリウム 10 mg mL⁻¹, スプレプトマイシン硫酸塩 5 mg mL⁻¹, いずれも和光純薬工業株式会社)を培地100 mLあたり1 mLおよび二酸化ゲルマニウム(1 mg mL⁻¹, 和光純薬工業株式会社)を培地100 mLあたり0.1 mL添加した1/2SWM-III改変培地^{22, 23)}に3日間通気しながら浸漬した。その後、培地を3日間隔で換水しながら、約1ヶ月間通気培養し、葉長15~20 cmまで生長させた。培養条件は温度20℃, 光強度60 μmol photons m⁻² s⁻¹, 明暗周期12時間明期:12時間暗期とした。

ノリプロトプラストの分離

ノリ葉状体は湿重量で50~100 mg 使用し、ノリプロトプラストの分離方法は既報に準じつつ^{20, 24, 25)}、細胞の状況を確認しながら処理時間を調整した。0.5%クエン酸(クエン酸一水和物, 和光純薬工業株式会社)を含む滅菌海水(pH 2.0~2.5)による除菌処理は120秒とし、2%パバイン溶液(CALBIOCHEM社)処理に続く細胞壁溶解酵素の処理では、β-1, 4-マンナーゼ, β-アガラーゼおよびβ-1, 3-キシラーゼ(ヤクルト薬品工業株式会社)のそれぞれが8 mLの酵素液中に1unitずつになるように調製した。細

胞壁溶解酵素による処理時間は、プロトプラストの分離状況を確認しながら、60~90分間とした。

分離したプロトプラスト懸濁液における細菌の有無を確認するために、阿部ら²⁰⁾と同様の無菌化チェックを行った。プロトプラスト懸濁液から100 μL を採取し、滅菌海水で10倍希釈後、2分間激しく攪拌した。その後、希釈した懸濁液から100 μL を採取し、Marine Agar (Difco社) プレート上に塗抹した。プレートは温度20°Cで1週間培養し、細菌のコロニー形成数を観察し、細菌のコロニーが形成されなければ、無菌状態と判断した。細菌のコロニーが確認された場合、直ちに実験は中止し、再度プロトプラストの分離を行った。

有機態窒素の添加試験

分離したプロトプラストは 10^4 cell mL^{-1} に密度調整し、6ウェル平底マイクロプレート (IWAKI社) に100 μL を分取した。これにf/2 (Sigma社) を添加した1%寒天培地を1.5 mL加え、よく混釈して、冷却、静置した。本研究で使用した有機態窒素は、L-アルギニン (Arg, 和光純薬工業株式会社), L-グルタミン酸 (Glu, 和光純薬工業株式会社), イノシン (Ino, 和光純薬工業株式会社) およびタウリン (Taurine, 和光純薬工業株式会社) の計4種類とした。各有機態窒素は100 mM溶液 (pH7.8~8.0) に調製後、0.20 μm フィルター (Sartorius stedim biotech.) により濾過滅菌した。各有機態窒素は、濃度が0.1, 1.0および10 mM

になるように寒天培地中に添加した。寒天には、低温ゲル化寒天末 (ナカライテスク株式会社, ゲル化温度30~31°C) を使用し、プロトプラストを包埋する際には、あらかじめ滅菌し、40°Cまで冷却してから使用した。ノリプロトプラストを包埋したプレートは、温度20°C, 光強度50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 明暗周期12時間明期:12時間暗期の条件下で3週間静置培養した。また、コントロールとして有機態窒素源無添加の実験区も作成した。各実験区は3ウェルずつとした。

プロトプラストの生残と生長の測定

生残細胞の計測は、細胞の破裂や萎縮などによる枯死および細胞壁の形成が判別できる培養1週間後に行った。顕微鏡下で100~200細胞を観察し、細胞壁が形成されているものを生残細胞とし、生残率を算出した。

生長の観察は、培養3週間後に行った。生長は面積によって評価した。デジタルカメラで各実験区における任意の再生体を1ウェルあたり4~13個体撮影し、画像データをパソコンに取り込んだ。取り込んだ画像データは、画像処理ソフト (Photoshop Adobe) を用いて葉状部の細胞を黒く塗りつぶし、面積測定ソフト (LIA for Win32) を用いて黒い部分の面積を求めた。生長比較には、各実験区において測定した全個体を用いた。

統計処理は、各有機態窒素の各濃度においてコントロールに対するDunnett testを行った。

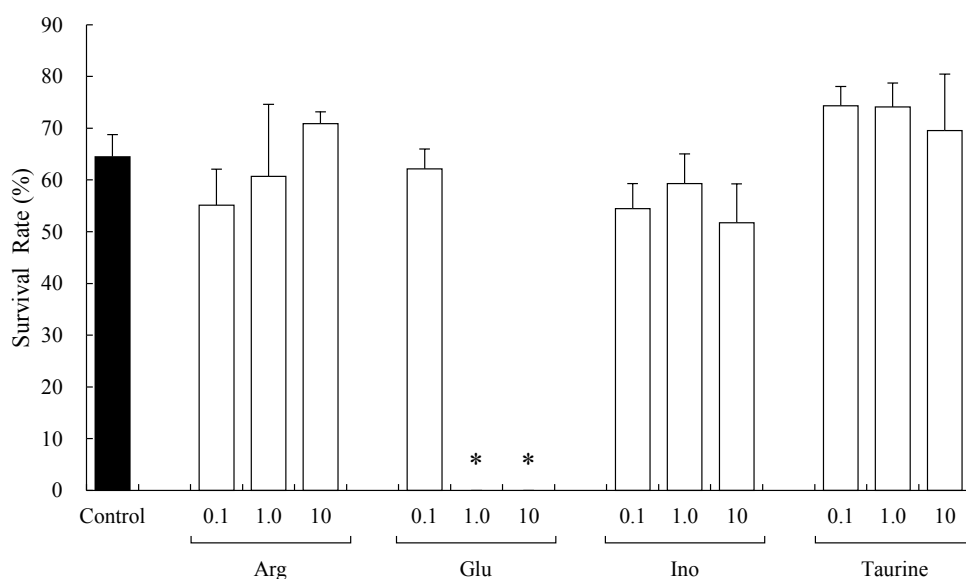


Fig. 1 Survival rates of axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 1 week with four organic nitrogen. Arg, Arginate; Glu, Glutamic acid; Ino, Inosine. Numbers after abbreviation of organic nitrogen indicate concentrations (mM). Vertical bars indicate SD. Asterisks (*) indicate significant different ($p < 0.01$).

結 果

Fig. 1に, 培養1週間後のノリプロトプラストにおける有機態窒素4種の各濃度での生残率を示した。コントロールの生残率は $64.5 \pm 4.3\%$ (平均値 \pm 標準偏差)であった。有機態窒素の添加による生残率は, グルタミン酸の1.0 mMおよび10 mMのそれぞれの添加を除いて, 添加濃度に関わらず 51.7 ± 7.5 (イノシン10 mM) \sim 74.3 ± 3.7 (タウリン0.1 mM) %であり, コントロールに対する有意差は認められなかった。また, 添加した有機態窒素の濃度間においても, グルタミン酸を除いて有意差は見られなかった。今回使用した有機態窒素の中では, タウリンは生残率が $69.5 \pm 10.9 \sim 74.3 \pm 4.6\%$ と高い傾向にあった。一方, グルタミン酸は1.0 mMおよび10 mMの添加において全細胞が枯死した。アルギニンは, 添加濃度が高くなると, 生残率が上昇する傾向にあった。

Fig. 2に, 培養3週間後のノリプロトプラスト葉状部の面積を示した。また, Fig. 3には培養3週間後の各有機態窒素を添加したプロトプラストの再生体を示した。培養3週間後のコントロールの葉状部の面積は $3039.1 \pm 362.5 \mu\text{m}^2$ であった。生長は, アルギニン10 mM添加とイノシン1 mM添加では, それぞれ $6620.2 \pm 1241.3 \mu\text{m}^2$ および $3624.9 \pm 543.3 \mu\text{m}^2$ とコントロールに対して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。一方, グルタミン酸およびタウリンでは,

$545.0 \pm 192.2 \sim 1713.2 \pm 536.2 \mu\text{m}^2$ とコントロールに対して有意に低い値を示した ($p < 0.01$)。イノシン10 mM添加では, 再生体は1個体しか観察できなかった。

考 察

本研究におけるノリプロトプラストのコントロールの生残率は $64.5 \pm 4.3\%$ であった。この値は過去の文献値^{20, 21)}と同程度であった。有機態窒素の添加においては, 本研究では, グルタミン酸は1.0 mMや10 mMの添加で全細胞が枯死し, タウリンは添加濃度に関わらずコントロールと同程度の生残率を示した。また, アルギニンは添加濃度が高くなると生残率が高まる傾向にあった。藤田・山下²¹⁾では, グルタミン酸はコントロールと同等の生残率を示し, タウリンやアルギニンに関しては10 mMの添加ではコントロールの50~80%程度まで生残率が低下している。藤田・山下²¹⁾は, 材料に野生のスサビノリを使用しているため, 本研究で用いた室内培養のナラワスサビノリとはアミノ酸に対する感受性が異なる可能性が考えられる。

ノリ葉状部の生長を濃度別にみても, アルギニンでは添加濃度を高くすると生長が促進され, 10 mM添加では $6620.2 \pm 1241.3 \mu\text{m}^2$ とコントロールの2倍以上の生長を示した。一方, イノシンは, 添加濃度を10 mMまで高めると生長は抑制された。タウリンは, 添加濃度に関わらず

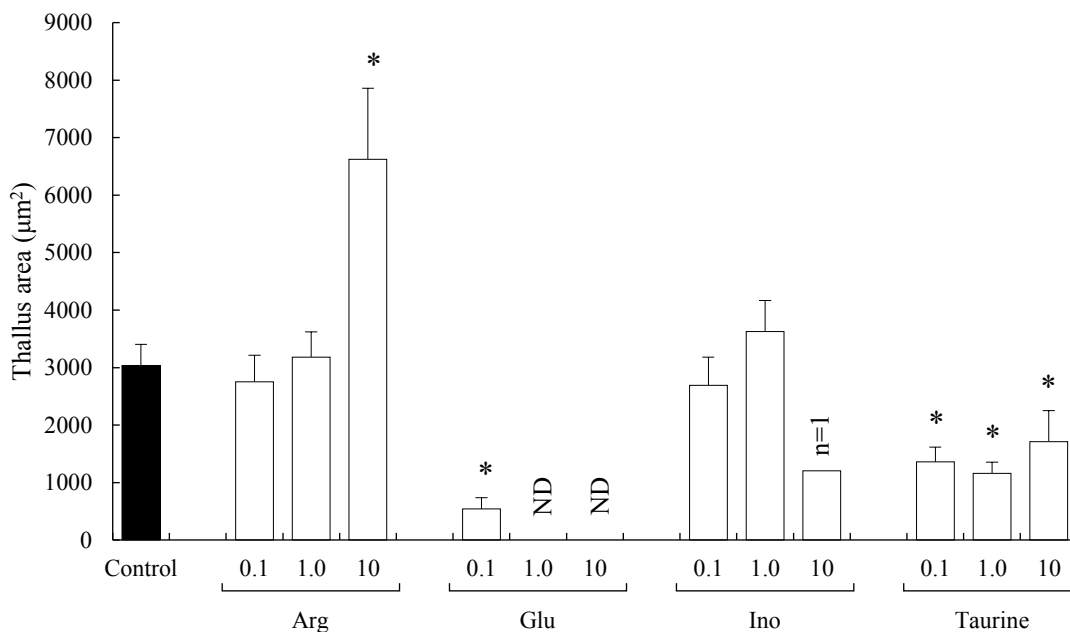


Fig. 2 Thalassus area regenerated from axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 3 weeks with four organic nitrogen. Abbreviations see as Fig. 1. Numbers after abbreviation of organic nitrogen indicate concentrations (mM). Vertical bars indicate SD. Asterisks (*) indicate significant different ($p < 0.01$). ND indicates no data due to wither.

1160.7~1713.2 μm^2 とコントロールの半分程度の生長であった。1.0 mM以上の添加では生残細胞が確認されなかったグルタミン酸においては、0.1 mMの添加でも545.0 \pm 192.2 μm^2 とコントロールよりも有意に低い値を示した。アサクサノリの葉状体を使用した今田・齋藤¹⁶⁾でも、ア

ルギニンは添加効果が高く、グルタミン酸は添加効果が少ないと報告されている。しかし、同じくアサクサノリを使用した寺本・木下¹⁵⁾では、アルギニンとグルタミン酸は幼芽の生長を著しく阻害するものの、葉状体葉片の生長については若干の生長促進効果を有すると報告している。今

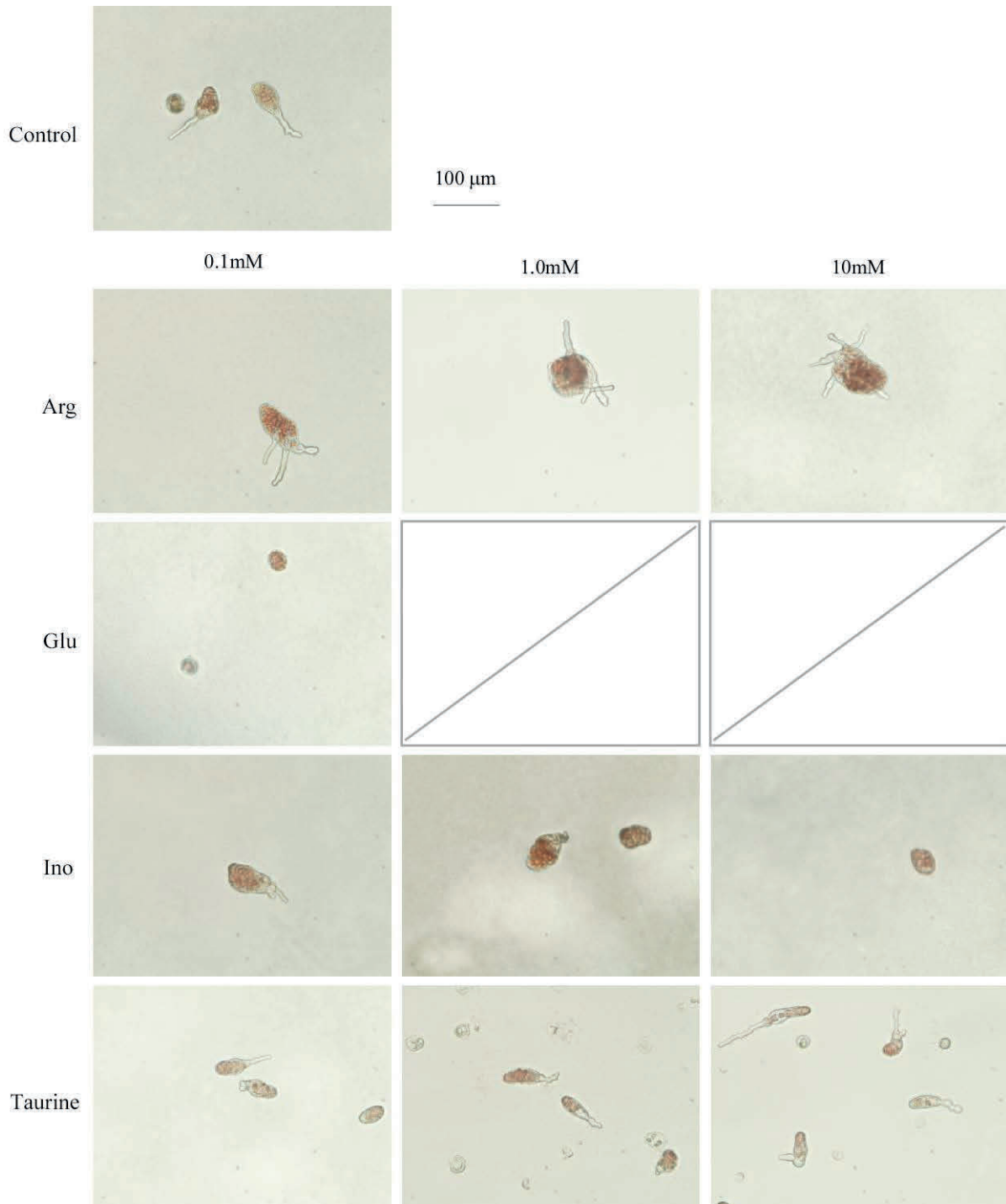


Fig. 3 Photographs of the regenerated thalli of axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 3 weeks with four organic nitrogen. Abbreviations see as Fig. 1. Boxes with diagonal line indicate no photograph due to wither.

田・齋藤¹⁶⁾では, アミノ酸添加量は10 ppm (アルギニン 0.06 mM相当, グルタミン酸 0.07 mM相当)であり, 寺本・木下¹⁵⁾では2.5 mg L⁻¹ (アルギニン 0.01 mM相当, グルタミン酸 0.02 mM相当)と添加濃度に違いがある。グルタミン酸については, 無菌や有菌に関係なく, 低濃度の添加でも生長阻害が起こることが示唆される。一方, アルギニンにおいては, 生長を促進させるためには少なくとも0.1 mM程度必要であることが考えられた。寺本・木下¹⁵⁾, 藤田・山下²¹⁾および本研究において, アルギニンは発芽や発生初期の実験試料で培養期間が12~21日間程度の場合, 添加効果がない, あるいは生長阻害を起こしている。しかし, 実験試料がある程度生長した葉状体であったり, 培養期間が40日と長期であった場合, 生長促進効果が認められている^{15, 16)}。したがって, 濃度だけでなく, ノリの生育段階やアルギニンの添加時間も生長に影響を及ぼすと考えられた。特に, 生長阻害から生長促進に切り替わるタイミングなどは今後明らかにしていく必要がある。

本研究で用いた4種類の有機態窒素の添加において, ノリプロトプラストの生残や生長に差異が認められた。このことから, アマノリ類が有効に利用できる有機態窒素や濃度範囲が異なることが示唆された。また, ノリプロトプラストを用いて有機態窒素の影響を調べるためには, 本研究でのグルタミン酸のように低濃度で生残や生長が可能な場合もあるが, 生残においては1.0 mM以上, 生長においては0.1 mM以上の濃度を添加する必要があると考えられた。これまでに, アマノリ類の細胞培養および組織培養における生長促進効果をもつものには, α プロテオバクテリアに属する細菌²⁶⁾, フェニル酢酸などの植物生長調節物質²⁷⁾や一部の抗生物質²⁰⁾が挙げられる。本研究でのノリプロトプラストの無菌培養において, 有機態窒素も生長促進効果があることが明らかとなった。今後, 他の有機態窒素においても, 本研究の手法を用いてその効果を明らかにできれば, ノリ養殖における安定生産だけでなく, ノリでは解明されていない器官分化や栄養塩要求などノリの生物学的研究に貢献できると考えられる。

引用文献

- 1) 二羽恭介: ノリの科学. 朝倉書店, 東京 (2020)
- 2) 大房 剛: 図説 海苔産業の現状と将来. 成山堂書店, 東京 (2001)
- 3) Kikuchi N, Niwa K: New combinations in *Neopyropia*

- J.Brodie & L-E.Yang (Bangiaceae, Rhodophyta) from Japan. *Notulae algarum*, **140**, 1-5 (2020)
- 4) 岩本俊樹, 難波洋平: 児島湾周辺のノリ養殖漁場に及ぼすダム上乗せ放流を含む河川水の影響 (平成17~19年度). 岡山県水産試験場報告, **24**, 63-69 (2009)
- 5) 高木秀蔵, 清水泰子, 草加耕司, 藤沢節茂, 藤原宗弘, 渡邊康憲, 藤原健紀: 河川から間欠的に供給される栄養塩によるノリ色調の回復. 日本水産学会誌, **78**, 246-255 (2012)
- 6) 原田和弘, 阿保勝之, 川崎周作, 竹迫史裕, 宮原一隆: 港湾水および下水処理放流水に含まれる溶存態無機窒素が播磨灘北東部沿岸のノリ漁場に与える影響. 水産海洋研究, **82**, 26-35 (2018)
- 7) 龍満直起, 宮川昌志, 阿保勝之, 末永慶寛, 多田邦尚, 本城凡夫: 香川方式ノリスカートによるノリ養殖漁場への新施肥技術. 日本水産学会誌, **87**, 23-30 (2021)
- 8) 坂口研一, 落合 昇, Park CS, 柿沼 誠, 天野秀臣: 色落ちノリの色調評価と硫酸アンモニウム添加海水への浸漬による色調回復. 日本水産学会誌, **69**, 399-404 (2003)
- 9) 二瓶直登, 増田さやか, 田井野慶太郎, 頼 泰樹, 中西友子: 無菌栽培でアミノ酸を窒素源にしたときの作物の初期生育. 日本作物学会紀事, **81**, 194-200 (2012)
- 10) 山田康之, 岡田吉美: 植物バイオテクノロジー II. 東京化学同人, 東京 (1991)
- 11) Spoerl E: Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *American Journal of Botany*, **35**, 88-95 (1948)
- 12) Seo S, Nakaho K, Hong SW, Takahashi H, Shigemori H, Mitsuhara I: L-histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant Cell Physiology*, **57**, 1932-1942 (2016)
- 13) 伊藤啓二, 佐藤孜郎, 佐藤美和, 松本文夫: アサクサノリの生化学的研究-II 諸種窒素源の利用機構について. 日本水産学会誌, **26**, 938-943 (1960)
- 14) 金沢昭夫, 柏田研一: 藻類の栄養代謝に関する研究I アサクサノリの生育に対するアミノ酸及びビタミン類の効果. 鹿児島大学水産学部紀要, **7**, 187-191 (1959)
- 15) 寺本賢一郎, 木下祝郎: “アサクサノリ”の生長に対するアミノ酸及びプリン類の効果. 藻類, **8**, 90-95(1960)
- 16) 今田 克, 齋藤祐一: ノリ葉体の生長に及ぼすアミノ

- 酸等の効果-I アミノ酸のとりこみと生長促進効果.
日本水産学会誌, **37**, 1125-1133 (1971a)
- 17) 今田 克, 斎藤祐一: ノリ葉体の生長に及ぼすアミノ酸等の効果-II ノリ葉体のアミノ酸とりこみ部位と葉体内での消長. 日本水産学会誌, **37**, 1134-1139(1971b)
- 18) 野田宏行, 天野秀臣, 太田扶桑男, 堀口吉重: アミノ酸ののり赤腐れ病治ゆおよび防除効果. 日本水産学会誌, **45**, 1155-1162 (1979)
- 19) 門脇 信: 無菌植物-その必須性と有用性について. 日本農芸化学会誌, **54**, 313-315 (1980)
- 20) 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)
- 21) 藤田雄二, 山下亜純: II アマノリ類の育種. 7. 細胞培養と細胞雑種藻体. 有用海藻のバイオテクノロジー (能登谷正浩編), 恒星社厚生閣, 東京, 73-82 (1997)
- 22) 尾形英二: 新しい海藻培養液SWM-IIIについて. 藻類, **18**, 171-173 (1970)
- 23) Fujiyoshi E, Kikuchi N: Growth of excised species containing elonged denticles from the lower marginal parts of *Porphyra tanegashimensis* and *Porphyra haitanensis* gametophytes. Bull. Fish. Res. Agency, **16**, 9-13 (2006)
- 24) 藤田雄二: 海洋植物の細胞操作. ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー (宮地重遠監修, 嵯峨直恆・松永 是編集), 裳華房, 東京, 69-85 (1991)
- 25) 荒木利芳: II アマノリ類の育種. 6. プロトプラスト単離技術. 有用海藻のバイオテクノロジー (能登谷正浩編), 恒星社厚生閣, 東京, 62-72 (1997)
- 26) 山崎綾乃, 関田諭子, 半澤直人, 奥田一雄, 嵯峨直恆: 海産紅藻スサビノリ無菌培養株の成長促進・形態形成回復要因・特に馴化培地中の共生細菌の影響について. 東海大学海洋研報, **21**, 57-76 (2000)
- 27) 天野秀臣: I 組織培養. 5. 緑藻類と植物生長調節物質. 有用海藻のバイオテクノロジー (能登谷正浩編), 恒星社厚生閣, 東京, 52-61 (1997)