

ノリプロトプラストの生残と生長に有効なアミノ酸の探索

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

Screening of effective amino acids in survival and growth of *Neopyropia yezoensis* protoplasts

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

Abstract : In order to identify effective amino acid species, survival and growth of *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured using 18 amino acids were examined. Survival rates of each protoplast cultured for 1 week with arginine, asparagine, ornithine and tyrosine were similar to that of the control condition. Other amino acids significantly reduced the survival rates than the control. Growth of each protoplast cultured for 2 weeks with β -alanine, arginine, glutamine, histidine, lysine, ornithine and phenylalanine were significantly higher than that of the control. Histidine might be useful to make only thallus grow, although survival rate was very low. Arginine and ornithine had potentials to be able to promote the growth without negative influences on the survivals of nori cells.

Key words : *Neopyropia yezoensis*, amino acids, growth, protoplast, survival

緒言

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¹⁾。特に、有機態窒素の中でもアミノ酸類は液肥などで効果的に利用され、安定生産に貢献している²⁾。また、アミノ酸の種類や濃度によって、効果のある生育ステージが異なること³⁾や作物の地上部と地下部の生長が異なること¹⁾、植物における病害抵抗性を高めること⁴⁾も報告されている。これまでにノリ葉状体を用いた室内培養試験において、他の窒素源と比較して吸収は少ない⁵⁾ものの、アミノ酸添加が陸上植物同様に、生長促進に関係があると報告されている⁶⁻⁸⁾。また、寺本・木下⁷⁾や野田ら⁹⁾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。したがって、海藻類においてもアミノ酸を含む有機態窒素は、生長の促進という位置づけだけでなく、器官分化の誘導や

病害抵抗性の増強などに活用できる可能性がある。しかし、これまでの研究では、報告によって効果のある有機態窒素種が異なっている。陸上植物においては、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。そのため、ノリにおいても陸上植物の場合と同様に、無菌的な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¹⁰⁾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)に対して、アミノ酸の添加が発生率に影響を与えることを報告している。また、阿部ら¹¹⁾は、ノリの無菌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下での生残と生長に及ぼす影響を調べたところ、アルギニンに生長促進効果が認められ、グルタミン酸やタウリンは生長を停滞させることも確認された。

2021年8月18日受付、2021年10月22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

本研究では、ノリの生長に有効なアミノ酸をさらに絞り込むために、アルギニンを含む18種類のアミノ酸を用いて、ノリプロトプラストの生残と生長に及ぼす影響を調べた。

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）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) を培地100 mLあたり0.1 mL添加した1/2SWM-III改変培地^{12, 13)} 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^{10, 11, 14-16)}、細胞の状況を確認しながら時間を調整した。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%パパイニン溶液（CALBIOCHEM社）処理に続く細胞壁溶解酵素の処理では、β-1, 4-マンナンナーゼ、β-アガラーゼおよびβ-1, 3-キシランナーゼ（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バクテリアの有無を確認するために、阿部ら¹⁶⁾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℃で1週間

培養し、バクテリアのコロニー形成数を観察し、バクテリアのコロニーが形成されなければ、無菌状態と判断した。バクテリア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。

アミノ酸の添加試験

分離したプロトプラストは10⁴ 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を採取した。本研究で使用したアミノ酸は、β-アラニン (β-Ala), L-アルギニン (Arg), L-アスパラギン一水和物 (Asn), L-アスパラギン酸 (Asp), L-グルタミン (Gln), グリシン (Gly), L-ヒスチジン (His), L-イソロイシン (Ile), L-ロイシン (Leu), L-リシン (Lys), L-メチオニン (Met), L-オルニチン一塩酸塩 (Orn), L-フェニルアラニン (Phe), L-プロリン (Pro), L-セリン (Ser), L-トリプトファン (Trp), L-チロシン (Tyr) および L-バリン (Val) の18種類のアミノ酸（すべて和光純薬工業株式会社製）とした。各アミノ酸は100 mM水溶液（pH 7.8~8.0）を調製後、0.20 μm フィルター (Sartorius stedim biotech.) により濾過滅菌した。各アミノ酸の実験濃度は、阿部ら¹¹⁾の報告を参考に生残と生長の双方で影響を確認できる1.0 mMとした。ノリプロトプラスト懸濁液、1.0 mMに調製した各アミノ酸溶液および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。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℃、光強度50 μmol photons m⁻² 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アミノ酸無添加の試験区も作成した。各試験区は4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2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試験区においてランダムに細胞を6~21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、各試験区において測定した全細胞を用いた。

生残および生長における統計処理は、各アミノ酸試験区においてコントロールに対するDunnett testを行った。

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コントロールとアミノ酸18種の生残率を示した。コントロールの生残率は $57.1 \pm 3.7\%$ (平均値 \pm 標準偏差)であった。アミノ酸の添加によるプロトプラストの生残率は、コントロールと比較して有意な差は認められなかったが、アルギニンが $62.7 \pm 5.7\%$ と高かった。その他、コントロールに対して有意差が認められなかったアミノ酸は、 β -アラニン、アスパラギン、リシン、オルニチン、トリプトファンおよびチロシンであった。その他のアミノ酸の生残率はコントロールに対して有意に低い値となった ($p < 0.05$)。特に、ヒスチジンの生残率は、10%以下であり、ノリプロトプラストはほとんど生残しなかった。

Fig. 2に、培養2週間後におけるコントロールと各アミノ

酸試験区のノリプロトプラスト葉状部の面積を示した。培養2週間後のコントロールの葉状部の面積は、 $1237.5 \pm 222.3 \mu\text{m}^2$ であった。アルギニン、グルタミン、ヒスチジン、オルニチンおよびフェニルアラニンは、 $1621.9 \pm 419.3 \sim 2294.2 \pm 590.7 \mu\text{m}^2$ の範囲にあり、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、トリプトファン、チロシンおよびバリンは、 $687.2 \pm 140.3 \sim 784.3 \pm 187.9 \mu\text{m}^2$ の範囲にあり、コントロールに対して有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。その他のアミノ酸は、コントロールに対して有意な差は認められなかった。

Fig. 3に、培養2週間後におけるノリプロトプラストのコントロールおよび各アミノ酸試験区の代表的な再生体を示した。コントロールにおける葉状部は、5~14細胞程度で構成されていた。コントロールと比較して葉状部の生長が良好であった β -アラニン、アルギニン、グルタミン、リシン、オルニチンおよびフェニルアラニンの葉状部は、8~60細胞程度であり、葉状部だけでなく仮根の発達も良好であった。一方、ヒスチジンの葉状部は8~50細胞程度が観察され、葉状部の生長が良好であったが、仮根が発達していない再生体が多く認められた。葉状部の生長がコントロールよりも低かった試験区のうちセリン、トリプトファン、チロシンおよびバリンは葉状部の分裂が停滞していた

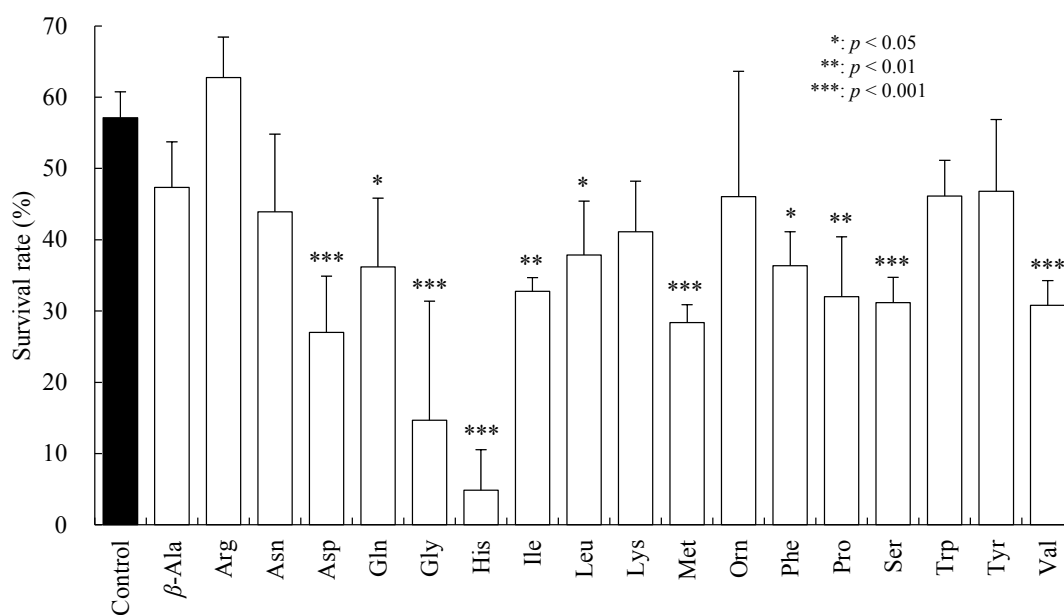


Fig. 1 Survival rates of axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 1 week with eighteen amino acids. β -Ala, Alanine; Arg, Arginine; Asn, Asparagine; Asp, Aspartic acid; Gln, Glutamine; Gly, Glycine; His, Histidine; Ile, Isoleucine; Leu, Leucine; Lys, Lysine; Met, Methionine; Orn, Ornithine; Phe, Phenylalanine; Pro, Proline; Ser, Serine; Trp, Tryptophan; Tyr, Tyrosine; Val, Valine. Vertical bars indicate SD. *, ** and *** indicate significant different of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

り, 正常に分裂していなかった。また, これらの試験区では, 仮根が未発達な再生体が多かった。葉状部の生長がコントロールと有意差がなかった試験区では, グリシンを除き葉状部と仮根のいずれの発達もコントロールと同程度であった。グリシンは, 多くの再生体で仮根が未発達であった。

考 察

本研究において, ノリプロトプラストのコントロールの生残率は $57.1 \pm 3.7\%$ であった。この値は過去の文献値^{10, 11, 16)}と同程度であった。本研究で使用した18種のアミノ酸において, ノリプロトプラストの生残率が高く, かつ生長が良好となったものは, アルギニンおよびオルニチンであった。 β -アラニンは, 生残率がやや低くなったものの, 生長においてはコントロールに比べて良好であった。また, ヒスチジンは特に強い阻害効果が認められた。藤田・山下¹⁰⁾では, 本研究と同じ添加濃度1.0 mMの発生率において, ヒスチジンはコントロールに対して90.8%と比較的高い値を示した。しかし, 10 mM添加時には, ヒスチジンの発生率もコントロールに対して1.8%と急激に低下した。また, メチオニンは, 0.1 mM添加時でコントロールに対して29.0%と低く, 1.0 mM以上の添加では発生率は0%で

あった。藤田・山下¹⁰⁾は, 材料に野生のスサビノリを用いているため, 本研究で用いたナラワスサビノリの場合には, アミノ酸の感受性に違いが生じていると考えられる。ノリ葉状体の生長に及ぼすアミノ酸の影響について, 金沢・柏田⁶⁾では, アラニン, システインおよびトリプトファンを含むカゼイン加水分解物の添加で生長の促進が確認された。寺本・木下⁷⁾では, β -アラニン, アスパラギン, リシンおよびセリンで生長が良好であった。今田・齋藤⁸⁾ではアルギニン, アスパラギン酸, ロイシン, リシン, オルニチン, フェニルアラニン, トリプトファン, チロシンなどが生長促進効果を有していると報告しているが, グルタミン, ヒスチジン, バリンもリシンと同程度の生長率を示している。寺本・木下⁷⁾と今田・齋藤⁸⁾では, 11種のアミノ酸が共通しているが, そのうち結果が一致したアミノ酸は, 生長が良好となったリシンと抑制されたグルタミン酸のみであった。これは, 上記した研究が生菌状態での実験であることから, アミノ酸添加により培地中に存在する微生物やその代謝物の増加が生長に影響を与えた可能性が考えられる。また, 本研究で生長が良好であった7種のアミノ酸(β -アラニン, アルギニン, グルタミン, ヒスチジン, リシン, オルニチン, フェニルアラニン)は, 寺本・木下⁷⁾または今田・齋藤⁸⁾のいずれかの研究で良好な生長が得られており, 混菌状態でも生長促進に有効となり得ることを

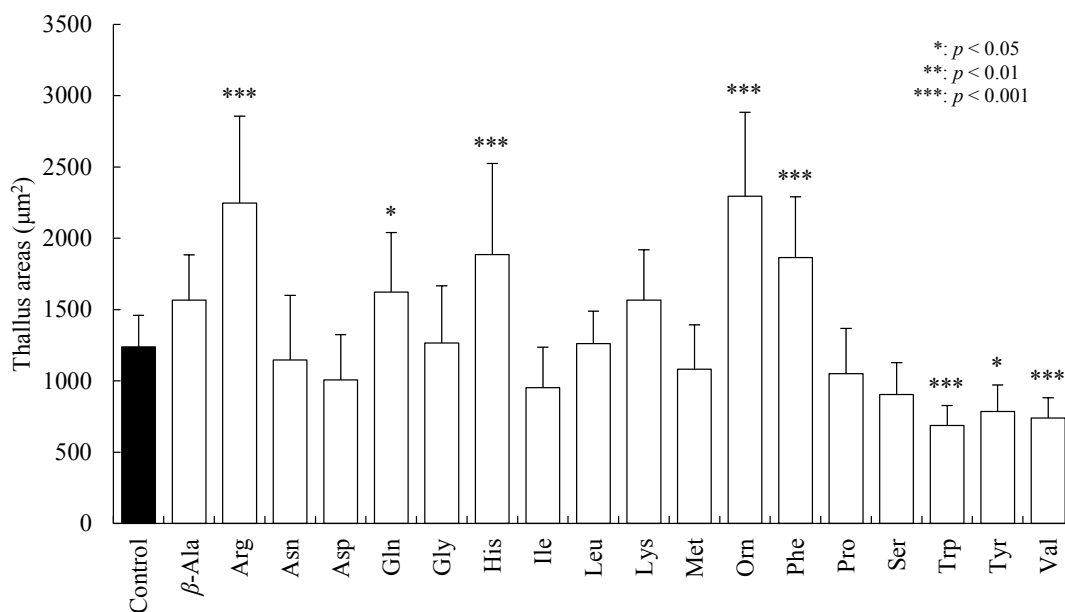


Fig. 2 Thallus area regenerated from axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 2 weeks with eighteen amino acids. Abbreviations see as Fig. 1. Vertical bars indicate SD. *, ** and *** indicate significant different of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

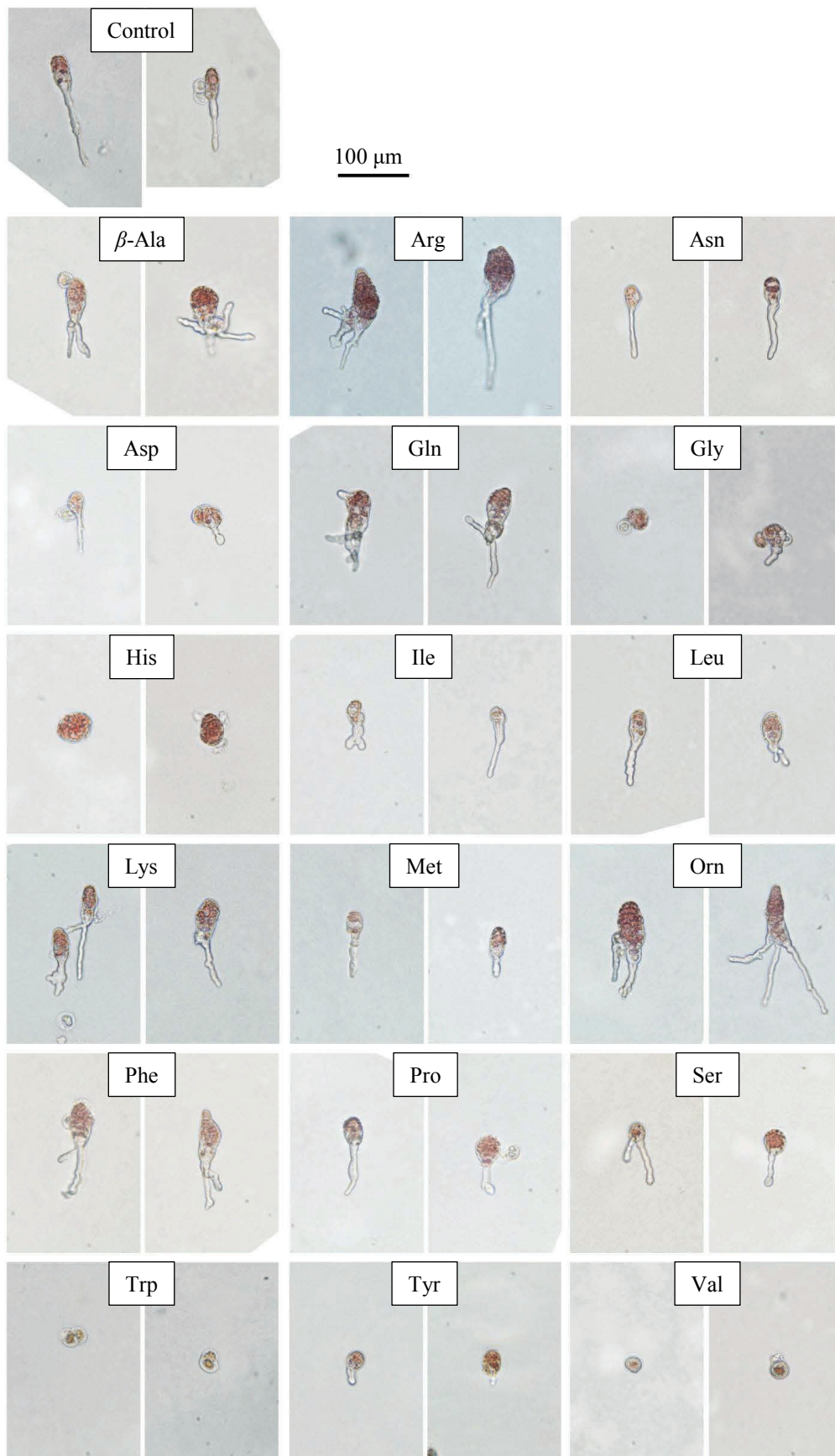


Fig. 3 Photographs of the regenerated thalli of axenic *Neopyropia yezoensis* protoplasts cultured for 2 weeks with eighteen amino acids. Abbreviations see as Fig. 1.

示している。

本研究では、葉状部の生長のみを測定したが、生長が良好であった β -アラニン、アルギニン、グルタミン、リシンおよびオルニチンは仮根も十分に発達していた。仮根の発達は、ノリの網への活着（ヒキ）を強めるため、これらのアミノ酸は芽落ち防止などにも有効と考えられる。ヒスチジンは、生残率は低かったものの、生残した再生体においては仮根がほとんど発達せず、葉状部の生長が良好であった。阿部ら¹⁶⁾では、抗生物質のアンピシリンが仮根形成に良好と報告されている。ヒスチジンは添加するタイミング等は検討する必要があるが、葉状部の分裂を促進するため、ノリの器官分化に関する研究において有効な物質になると思われる。

今田・齋藤^{8, 17)}は、培地に添加したグルタミン酸、リシン、チロシンについて、同位体を用いた実験により葉状体内部への取り込みを確認するとともに、一部は直接タンパク質合成に用いられている可能性を指摘している。一方、野田ら¹⁸⁾では、ヒスチジン浸漬によって葉状体内の不飽和脂肪酸の生産が活発になり、耐病性を高めていることを示唆している。本研究で効果の見られたアミノ酸については、体成分として利用しているのか、あるいは薬理効果により代謝系等に影響を与えているのか、今後明らかにしていく必要がある。また、これらのアミノ酸を養殖現場で活用していくためには、海域への環境負荷を考慮しつつ、生長促進や収量増大に繋がる技術を開発していく必要もある。

引用文献

- 1) 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. 日作紀, **81**, 194-200 (2012)
- 2) 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)
- 3) Spoerl E: Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *Am. J. Bot.*, **35**, 88-95 (1948)
- 4) 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 Physiol.*, **57**, 1932-1942 (2016)
- 5) 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. 日水誌, **26**, 938-943 (1960)
- 6) 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. 鹿大水紀要, **7**, 187-191 (1959)
- 7) 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)
- 8) 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-I アミノ酸のとりこみと生長促進効果. 日水誌, **37**, 1125-1133 (1971a)
- 9) 野田宏行, 天野秀臣, 太田扶桑男, 堀口吉重: アミノ酸の赤腐れ病治ゆおよび防除効果. 日水誌, **45**, 1155-1162 (1979)
- 10) 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)
- 11) 阿部真比古, 多良千鶴, 藤木伸哉, 川崎周作, 村瀬 昇: スサビノリ無菌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). 水大研報, **70**, 55-61 (2021)
- 12) 尾形英二: 新しい海藻培養液SWM-IIIについて. 藻類, **18**, 171-173 (1970)
- 13) Fujiyoshi E, Kikuchi N: Growth of excised species containing elongated denticles from the lower marginal parts of *Porphyra tanegashimensis* and *Porphyra haitanensis* gametophytes. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **16**, 9-13 (2006)
- 14) 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: 嵯峨直恒・松永 是編集), 裳華房, 東京, 69-85 (1991)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 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. 日水誌, **37**, 1134-1139 (1971b)
- 18) Noda H, Amano H, Kano S, Ohta F: Unsaturated fatty acids as antifungal substances effective against “Akagusare” disease of the laver *Porphyra* sp.. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1583-1586 (1983)