

## 紫外線照射により誘導された紅藻スサビノリの突然変異

川崎武仁\*<sup>1</sup>・中井涼子\*<sup>1</sup>・鬼頭 鈞\*<sup>1</sup>・國本正彦\*<sup>2</sup>・村瀬 昇\*<sup>1</sup>・水上 譲\*<sup>1</sup>

### Mutation of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) induced by ultraviolet irradiation

Takehito Kawasaki\*<sup>1</sup>, Ryoko Nakai\*<sup>1</sup>, Hitoshi Kito\*<sup>1</sup>,  
Masahiko Kunimoto\*<sup>2</sup>, Noboru Murase\*<sup>1</sup>, and Yuzuru Mizukami\*<sup>1</sup>

The effect of ultraviolet light (UV) irradiation on the induction of mutation was examined for *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). The protoplasts were irradiated with UV (254nm) and allowed to develop to conchocelis and thalli. The RAPD analyses of conchocelis DNA showed 51.4~91.5% similarities of RAPD DNA bands as long as approximately 300 RAPD DNA bands were examined between a control conchocelis that developed from a UV untreated protoplast and any UV conchocelis that developed from a UV treated protoplast, although 93.3 to 96.8% similarities of RAPD DNA bands were seen between two control conchocelis. The DNA sequences were changed by deletions, insertions and exchanges of bases between conchocelis that developed from UV treated and untreated protoplasts. The thalli that developed from UV treated protoplasts showed to some degree different characteristics in shape, color and growth rates from those developed from UV untreated protoplasts. These results suggest that the UV irradiation of protoplasts of *P. yezoensis* induced mutation with genetic and morphological variations.

## 1 緒 言

紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) はいわゆる「海苔」として食用にされ、多くの沿岸域で広く養殖されている我が国の重要な水産養殖種である。しかし、最近では主要なノリ漁場の環境変化や赤潮被害等のため生産性の低下が著しく<sup>1, 2)</sup>、生産性回復のため種々対策が検討されている。品種改良もこれらの重点的な対策の1つで、従来から行われている優良個体の選抜に加えて、新しい育種方法の開発が試みられるようになった。

紫外線 (UV) は非電離線の代表的な変異原として、これまで多くの動植物の突然変異研究に用いられ<sup>3, 4)</sup>、また、農業用作物の品種改良に利用されてきた<sup>5)</sup>。しかし、大型紅藻類品種改良への応用に関しては報告例が少なく<sup>6, 7)</sup>、また、スサビノリへのUV照射の効果に関する知見も極めて少ない。我々は以前スサビノリ葉体へのUVの影響について報告した<sup>5)</sup>。以前行なったの研究では、プロトプラストへのUV照射によって得た2種類の葉体を対

象に、葉体の大きさや細胞形態を観察し、UV照射のスサビノリ生長性に及ぼす影響について調査した。

本研究は、スサビノリの突然変異誘導に対するUV照射の効果と葉体の形質や生長率の変化及びDNAレベルの変異解析により明らかにすることを目的とした。UV照射したプロトプラストから多数の糸状体を得て、それらの中から任意に選んだ9株について、RAPD解析および塩基配列比較によってDNAレベルの変異を調べるとともに、糸状体から発生した葉体の形態や生長率等の変化を観察し、UV非照射プロトプラスト由来の葉体と比較した。

## 2 材料と方法

### 2.1 葉 体

平成14年に佐賀県有明水産振興センターから入手したスサビノリ養殖種の佐賀5号を実験に用いた。この葉体を有明海の養殖場で育成し、11月上旬、長さが約2~3cmになった頃収穫して約3時間屋外で乾燥させ、実験に使用す

るまでの間-20℃で冷凍保存した。

## 2.2 プロトプラストの調製, 培養および再分化

既報に従い<sup>8)</sup>, 冷凍保存葉体からプロトプラストを調製し, 二層寒天培養法で培養した。17℃で30~40日間培養し, プロトプラストから発生したカルス様多細胞体が肉眼で観察できるようになった時点で, これら多細胞体を液体培地へ移し, エアレーションしながら培養を継続した。多細胞体から糸状体が発生し, 直径が5 mm程度になった時点でフリー糸状体をミキサーで細断し, さらに培養を継続して多量の糸状体を得た。糸状体の一部をDNA抽出用として凍結保存するとともに, 他の一部については, 殻胞子の成熟および葉体の発生を誘導するための長日処理を行なった。長日処理は, 糸状体を26℃, 明:暗=13h:11hの条件下で2週間以上培養することによって行い, その後, 糸状体を15~17℃, 明:暗=12h:12hの条件下へ移して培養を継続した。葉体が発芽し, 糸状体に付着した状態で約1 cmの大きさに生長した時点で, これらの葉体を糸状体から分離し, 新たな培養瓶に移して葉体の生長を観察した。

## 2.3 紫外線照射

アマノリプロトプラストへのUV照射は短波長を用いた既報<sup>7)</sup>と同じ方法で行った。照射条件は光量130  $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ , 照射時間8~14分間であった。

## 2.4 DNA抽出とRAPD法による遺伝子類似度の解析

DNA抽出キット (DNase plant Maxi Kit, QIAGEN, Md.) を用いて, 添付のマニュアルに従い糸状体からDNAを抽出した。DNAの精製度を高めるため, 抽出キットを用いて抽出したDNAをさらにRNaseおよびプロテアーゼ処理し, その後フェノール/クロロホルム処理を2回繰り返した。糸状体DNAのRAPD解析は10塩基からなるランダムプライマー60種類を用いて, 既報<sup>9)</sup>に従って行った。遺伝子類似度は次の方法によって求めた。まず, UV非照射プロトプラスト由来 (コントロール糸状体) およびUV照射プロトプラスト由来の2つの糸状体DNAの間で, 各プライマーごとのRAPDパターンを比較した。次に, RAPDパターン上で電気移動度が一致しているDNAバンドの数 (移動度が一致し, 対をなしているバンドを1本として計数) と, 一致していないすべてのバンドの数をそれぞれ求め,

前者と後者の合計数を求めた。さらに, 一致しているバンドの数およびバンド合計数の60プライマー分をそれぞれ総合計し, バンドの総合計数に対する一致しているバンドの総合計数の割合を求めて, これを百分率で表わした。

## 2.5 塩基配列の解析

UV処理プロトプラスト由来糸状体UVC-5のDNAをRAPDプライマー5 = TTCGAGCCAG-3 =を用いて, また, 同様の糸状体UVC-9のDNAをRAPDプライマー5 = -CACACTCCAG-3 =を用いてPCR反応し, それぞれから大きさが0.5kb以下の1本のDNA断片を得た。(これらのRAPDプライマーではコントロール糸状体DNAから同様な断片は増幅されない。) これらDNA断片の塩基配列を解析し, その結果をもとに20塩基から成るプライマーを作成した。これらのプライマーを用いて, UV処理由来糸状体およびコントロール糸状体DNAからPCR反応によってそれぞれDNA断片を得, これらの塩基配列を解析して両者間で比較した。

## 2.6 生長率の測定

フリー糸状体から発生して長さが1 cm程度になった葉体を新たな培養瓶に移し, 生長率測定のための培養を開始した。3日ごとに葉体の面積を測定し, 生長倍率を求めて葉体間で比較した。生長倍率は, 測定時の葉面積/培養開始時の葉面積, から求めた。葉体の葉面積は, スキャナーを使って葉体像を電子画像としてパソコンにとり込み, パソコン上の画像解析ソフトによって求めた。

# 3 結 果

## 3.1 DNA変異

UV照射後1~2/10<sup>5</sup>細胞の割合でプロトプラストからカルス様多細胞体が発生した。これらの中から比較的大きな多細胞体を任意に選び, 個別に液体培養を継続して, 糸状体を得た。Fig. 1はUV非照射プロトプラスト由来の糸状体 (コントロール糸状体) とUV照射プロトプラスト由来の糸状体をRAPD解析し, そのパターンを比較した一例を示したものである。多くのRAPDプライマーを用いたRAPD解析において, コントロールおよびUV照射プロトプラスト由来の糸状体の間で, また, UV照射プロトプラスト由来の糸状体どうしの間で, DNAバンドパターンがそれぞれ異なっていた。このようなバンドパターンの比較から, 3種類のコントロール糸状体間, およびコントロー

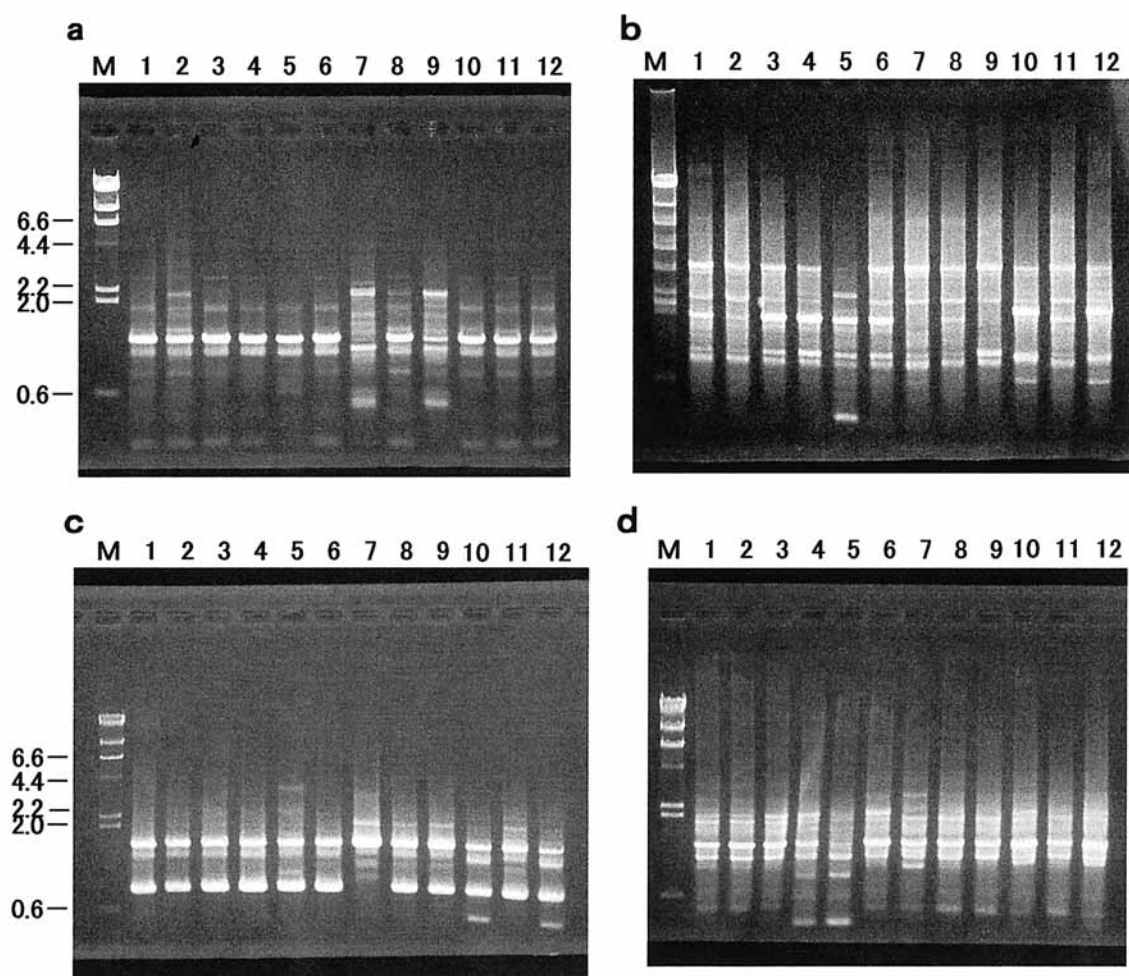


Fig. 1. RAPD patterns of various conchocelis DNA.

DNA was extracted from conchocelis that developed from UV untreated (1-3) and treated (4-13) protoplasts, and used for RAPD analyses using 60 different kinds of primers. In this figure, RAPD patterns obtained by four primers are shown as an example. The  $\lambda$ /HindIII DNA (M) were coelectrophoresed on the left side of gels as DNA size markers (Kb). a: primer GTGACGTAGG, b: primer GTTTCGCTCC, c: primer CTCACCGTCC, d: primer TCGGTGCTTG

ル糸状体 (Cont-1) とUV照射プロトプラスト由来の糸状体間でDNAバンドの類似度を調べた。Table 1 に示したように、コントロール糸状体間での類似度は93.3~96.8%であったのに対し、コントロール糸状体 (Cont-1) に対するUV照射プロトプラスト由来糸状体の類似度は51.4~91.5%であり、糸状体間でばらつきがあるものの、コントロール糸状体間の類似度より明らかに低い値を示した。

RAPD解析において、コントロールとUV照射プロトプラスト由来糸状体DNA (UVC-5およびUVC-9) の間で、どちらか一方のDNAにのみ増幅が見られたDNA断片の塩基配列を解析した。この配列をもとに20塩基からなる新たなプライマーを作成し、再び上記したコントロール及びUV照射プロトプラスト由来の糸状体DNAを用いてPCR反

応を試みたところ、両者間で大きさの等しいDNA断片を得た。Fig. 2 はこれらDNA断片の塩基配列を解析し、比較したものである。断片によって変異塩基数は異なったが、いずれの断片においても、コントロールとUV照射プロトプラスト由来の糸状体DNA間に塩基の欠失や置換など変異が認められた。

### 3.2 葉体の形態と生長率

UV照射プロトプラスト由来葉体の色調および形態をUV非照射プロトプラスト由来の葉体 (コントロール葉体) と比較した。Fig. 3 に示したように、UV照射由来葉体の形態はコントロール葉体に比べ、葉体全体の幅が狭く、細長いもの (UVC-7, 9)、葉体全体がねじれているもの (UVC-7, 9)、葉体の縁辺部にちぢれが見られるもの

**Table 1.** Similarities of DNA bands in RAPD patterns of conchocelis DNA.

The band comparisons were made for a total of 273-305 bands produced between DNA of a control (Cont-1) conchocelis and a conchocelis developed from UV treated protoplast by RAPD analyses using 60 primers. Similarities of DNA bands were obtained from the proportions of DNA bands that matched to those in a band pattern of a control (Cont-1) conchocelis to the total DNA bands by electrophoretic mobility, as control (Cont-1) was 100%. Cont 1-3: conchocelis developed from UV untreated protoplasts (control). UVC-1-9: conchocelis developed from UV treated protoplasts.

| No. | Thalli | Irradiation time (min) | Similarities (%) |
|-----|--------|------------------------|------------------|
| 1   | Cont-1 | 0                      | (100)            |
| 2   | Cont-2 | 0                      | 96.8             |
| 3   | Cont-3 | 0                      | 93.3             |
| 4   | UVC-1  | 8                      | 72.5             |
| 5   | UVC-2  | 8                      | 51.4             |
| 6   | UVC-3  | 8                      | 77.5             |
| 7   | UVC-4  | 10                     | 67.0             |
| 8   | UVC-5  | 10                     | 85.8             |
| 9   | UVC-6  | 10                     | 75.8             |
| 10  | UVC-7  | 12                     | 72.3             |
| 11  | UVC-8  | 12                     | 91.5             |
| 12  | UVC-9  | 14                     | 69.0             |

(UVC-5), 生長が悪く1~2cmの葉長でとまってしまうもの(UVC-1, 6)など異なるプロトプラスト由来葉体ごとに種々の形態が観察された。色調も, コントロール葉体に比べ, 黒みが強い葉体(UVC-5), あるいは, 逆に, 白みがかかった葉体(UVC-4)などが観察された。これらの葉体は, 同一糸状体から発生した葉体についてはどれもほぼ同じ形態および色調を呈し, また, 糸状体から異なった時期に発生した葉体間であってもこれらの特性に変化はみられなかった。

Fig. 4はいろいろな葉体の生長率を比較したものである。この図から明らかのように, UV処理プロトプラスト由来の葉体は, 調査した全てについて, コントロール葉体より生長率が劣り, さらに2種類の葉体は途中で枯死した。葉体のこのような生長率の特性は, 同一糸状体から発生した葉体については発生の時期にかかわらず, すべてにほぼ同様であった。

#### 4 考 察

RAPD解析に用いた60種類のプライマーはすべて塩基配列が異なっていることから, RAPDパターンで見たDNAバンドはそれぞれが少なくともDNA上の1つの座位に対応しているものと考えられる。Table 1に示されているように, UV照射プロトプラスト由来の糸状体DNAはコント

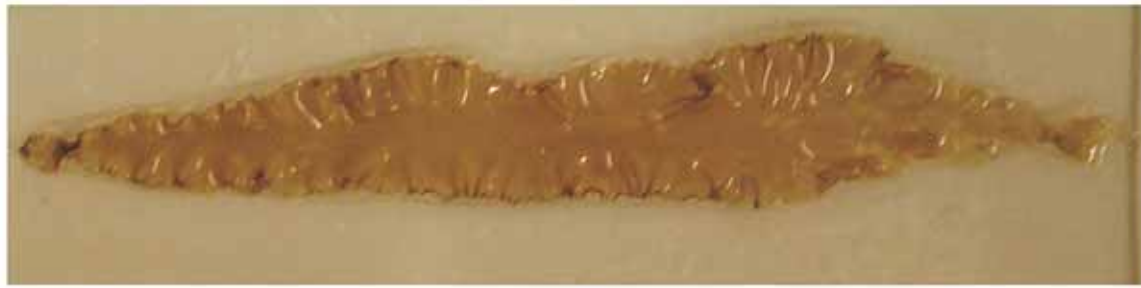
ロール糸状体DNAに対して, 約300座位について51.4~91.5%のDNA類似度を示した。また, コントロール株間では約93~97%の類似度であり, 数%の個体間変異が生じていることを示している。このことから, 本研究ではプロトプラストへのUV照射によって数%から40%前後の座位に変異が生じたものと推察された。突然変異の頻度は, 通常, 変異の対象とする形質に対して求められ, また, 変異株の出現率を基にして変異率が計算される<sup>10)</sup>。一方, 本研究のTable 1に示した変異率はゲノム全領域に誘発された塩基配列変異の頻度を調べたものであり, 育種学上の突然変異率と今回のDNA上の変異率を直接比較することはできない。また, 真核生物ではゲノムDNAの大半が形質や機能に直接関与しない領域で占められていることを考え合わせると, Table 1で求めた結果は, 変異の大部分がノリの形質に關与する遺伝子以外の領域に生じていることを示唆するものであった。

UV照射によって生じた変異について塩基配列レベルで解析したところ, Fig. 1に示したように多くの塩基に変異が観察された。このようなDNAレベルの変異は, UV照射によってスサビノリゲノムに突然変異が生じたことを直接示すものと考えられた。UVによるDNA変異はTT, CC, CT等ピリミジンダイマーの形成によって誘起されることがよく知られている<sup>11, 12)</sup>。スサビノリにおけるUV照射DNA変異も主にこのようなピリミジンダイマーの形成に

|        |              |            |            |            |             |                |
|--------|--------------|------------|------------|------------|-------------|----------------|
| C-01   |              |            |            |            |             |                |
| Cont-3 | GCTACAGAGT   | TTACTGTACA | GAAACGCTTA | GCAACAGATG | TTGTTAAAAG  | TATAACATTA 60  |
| UVC-5  | ...CG. A. -. | .....-..   | .....      | .A.-.-...  | .....       | .....          |
|        | TTAAGTACGT   | AATAAAAAAT | TCTCACTTTA | GTCAGTAAAT | ATTACAGATT  | ATTACTTTGT 120 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | TAGCTATTTA   | TCTCGTAATA | TATTTTATAT | TGTACTTTCG | ATACTAATAC  | ATCGGCTCGC 180 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | CAATTTATTT   | GACAGCTGAA | ACAGTGAAGT | CCTTCATTAT | AATAGGGAGA  | GTTCAATGCT 240 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | TGACGCATTT   | TCCAGAGTTG | TAGAAGGGCG | AATTCCAGCA | CACTGGCGGC  | CGTTACTAGT 300 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | GGATCCGAGC   | TCGGTACCAA | GCTTGGCGTA | ATCATGGTCA | TAGCTGTTTC  | CTGTGTGAAA 360 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | TTGTTATCCG   | CTCACAATTC | CACACAACAT | ACGAGCCGGA | AGCATAAAGT  | GTAAAGCCTG 420 |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....G..... | .....          |
|        | GGGTGCCTAT   | TGAGTGAGCT | AACTCACATT | .....      | .....       | .....          |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
| C-16   |              |            |            |            |             |                |
| Cont-3 | CACCTGCCCA   | CCGGGCCACA | CGAAAATGCA | GGACGATAAA | TGCCAGAAAA  | 50             |
| UVC-9  | ....C..A..   | .T.....    | .....      | .....      | ...-.....   | .....          |
|        | CCCTCAAATC   | CAAGTTGGAT | TTACTACTAA | GCTAACTATC | CCGAACTTAG  | 100            |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | GGAATATGGA   | GGGGGAGGAA | CGGATCAGGC | TAGTGGCCTG | CCGCCCTTG   | 150            |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | CATGGCACGT   | GTTGCCCCCT | ACCTGGGGGT | CAATACTGCC | ACACAGGCCG  | 200            |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | CACAGGTGCG   | CGCAGCAATG | ACGGCGATGT | GGGTCGAGGA | CGGCTCGTCC  | 250            |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | GCAATGTTCC   | CATCCTGGAG | TGTGAAGGGC | GAATCCAGC  | ACACTGGCGG  | 300            |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |
|        | CCGTTACTAG   | TGGATCCGAG | CTCGGTACCA | AGC        | .....       | .....          |
|        | .....        | .....      | .....      | .....      | .....       | .....          |

Fig. 2. Comparison of nucleotide sequences of the DNA fragments between UV treated and untreated protoplast-derived conchocelis.

The DNA fragments were obtained by PCR amplifications of the DNA from conchocelis developed from UV treated and untreated protoplasts using specific primers and gene walking system. These specific primers were constructed on the basis of nucleotide sequences of the 0.45kb DNA fragment of RAPD analysis shown in lane 7 of Fig. 1 - b and lane 12 of Fig. 1 - d.



Cont-3



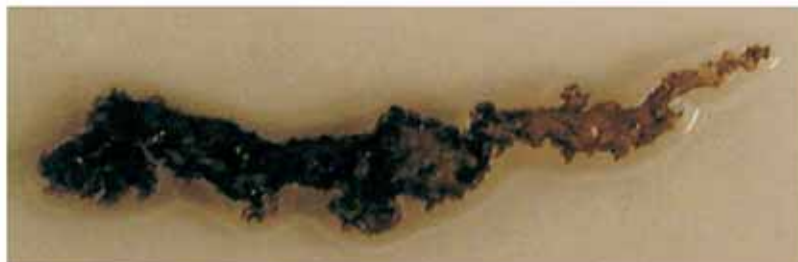
UVC-9



UVC-7



UVC-4



UVC-5

**Fig. 3.** Thalli developed from UV treated and untreated protoplasts. Thalli were transferred into newly prepared culture bottles after they grew about 1 cm in length clinging to the conchocelis that developed from protoplasts, and were cultured for a further 3 weeks.  
 Cont - 3: thalli developed from UV untreated protoplasts. UVC - 9, 7, 10, 5: Thalli developed from UV treated protoplasts. Cont - 3 and UVC - 9, 7, 4, 5 correspond to 3, 12, 10, 7 and 8 in Fig. 1, respectively. The scale bar indicate 1 cm.

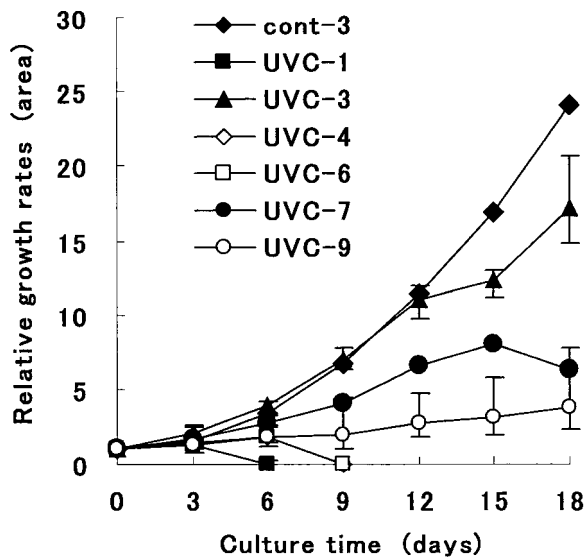


Fig. 4. Growth rates of thalli developed from UV treated and untreated protoplasts. The growth rates of thalli were calculated from the area of thalli regarding the area at the initiation of culture as 1. The Cont - 3, UVC - 1, 3, 4, 6, 7 and 9 correspond to 3, 4, 6, 7, 9, 10 and 12 in Fig. 1, respectively. The vertical bars indicate the standard deviations.

よって生じたものかどうか今後より詳細な解析が必要である。

UV照射プロトプラストから発生した種々葉体は、色調、形態および生長率がコントロール葉体や他のUV照射プロトプラスト由来葉体と異なっていた。これらの違いは、同一糸状体由来の葉体についてはすべてに共通にみられ、また、発生時期の異った葉体についても同様に観察された。これらの結果から、種々葉体にみられた形態および生長率の違いは葉体培養中の環境変化にもとづくものではなく、葉体に遺伝的に備った性質であることが示唆された。葉体のこのような性質の変化は糸状体DNAがUV照射によって変異した結果とよく一致しており、UV照射プロトプラスト由来の糸状体や葉体に突然変異が誘導されたことを示すものと考えられる。

本研究では、UV照射プロトプラスト由来株の9株につき育成し、糸状体や葉体の性質およびDNA解析を行った。これら9株の中には、形態、色調および生長性等から総合的に判断して、養殖上コントロール葉体より優れていると思われる葉体はなかった。今後は、UV照射プロトプラスト由来株の育成量を増やし、種々な形質および生長性を持った多種類の葉体を得て、養殖への実用化も検討することが重要である。

## 謝 辞

スサビノリ葉体試料を提供していただいた佐賀県有明水産振興センターの川村嘉応博士および横尾一成、三根崇幸の両氏に厚くお礼申し上げます。また、スサビノリ変異株作出についてご助言をいただいた福岡県有明海研究所の岩渕光伸氏に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 川村嘉応:海苔と海藻, 62, 1-12 (2001).
- 2) 藤井弘治:海苔と海藻, 62, 13-16 (2001).
- 3) M. Ikenaga and T. Mabuchi: Photoreactivation of endosperm mutations induced by ultraviolet light in maize. *Radiation Botany*, 6, 165-169 (1966).
- 4) T. Fujii: Photoreactivation of mutations induced by ultraviolet radiation of maize pollen. *Radiation Botany*, 9, 115-123 (1965).
- 5) IAEA: Application of nuclear techniques and research. IAEA, Vienna, 1962-1990. (1990).
- 6) 岩渕光伸:アマノリプロトプラストへ及ぼす紫外線の影響, 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 5, 41-44, (1996).
- 7) Y. Mizukami, N. Murase, H. Kito, and M. Kunimoto: Effect of ultraviolet irradiation on the survival rate and growth of protoplasts of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *SUISANZOSHOKU*, 51, 157-164 (2003).
- 8) Y. Mizukami, M. Okauchi, and H. Kito: Effects of cell wall-lytic enzyme on the electrofusion efficiency of protoplasts from *Porphyra yezoensis*. *Aquaculture*, 108, 193-205 (1992).
- 9) Y. Mizukami, M. Okauchi, H. Kito, and M. Kobayashi: Discrimination of laver cultivars with RAPD markers. *Fisheries Sci.*, 62, 547-551 (1996).
- 10) 鶴飼保雄:植物育種学, 東京大学出版会 (2003).
- 11) J. K. Setlow: Evidence for a particular base alteration in two 14 bacteriophage mutants. *Nature*, 194, 664-666 (1962).
- 12) K. C. Smith: Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light. *Radiation Res.*, 6, 54-79 (1966).