

阿知波英明・伏屋満：スサビノリの3または4細胞の融合で形成されたプロトプラストの成長、生存および再生体の形態の変化について

Hideaki Achiha and Mituru Fuseya 1995: Growth, survival rate, and morphological variation of regenerated structures of protoplasts generated by fusion of three or four protoplasts in *Porphyra yezoensis* Ueda. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 43:99-102.

Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamichita, Chita, Aichi 470-34, Japan,
〒470-34 愛知県知多郡南知多町豊浜 愛知県水産試験場漁業生産研究所

The present work was carried out to know the growth characteristics of the fused protoplasts that were generated by fusion of three or four single (non-fused) protoplasts isolated from *Porphyra yezoensis*. The results observed are summarized as follows: 1) The survival rate of the fused protoplasts derived from three or four single protoplasts were slightly lower than non-fused protoplasts. 2) In 43 days cultures, the mean size of the plants regenerated from the fused protoplasts were larger than those from non-fused protoplasts. 3) Fused protoplasts derived from four protoplasts did not form monospores, but 28% of the non-fused protoplasts and 23% of the fused protoplasts derived from three protoplasts formed monospores in 43 days cultures.

Key Index Words: Porphyra yezoensis - protoplasts - survival rate - regenerated plants

近年アマノリ属の種間 (Fujita and Migita 1987, Fujita and Saito 1990, Araki and Morishita 1990, 藤田 1993) やアマノリ属とウシケノリ属との属間 (藤田 1993) で細胞融合法を用いた育種が試みられている。これらの研究では、プロトプラストの色彩の違いによって、または細胞を染色することで融合細胞を区別し、これを分離して培養をおこなっている (藤田 1991)。しかし、融合を育種に応用してゆく場合、このような個々の融合プロトプラストを拾い上げて培養する方法では効率が悪く、選抜できる数にも限界がある。そのため、今後は融合処理した全細胞を培養して、その中から有用な系統を選択する方法も考える必要がある。

このような全細胞を用いた培養では、2個のプロトプラストの融合体以外に3個以上のプロトプラスト融合体も形成されるが (阿知波, 未発表), これらの成長についての知見はない。そこで、1系統 (品種) を用いて3または4細胞のプロトプラストの融合で形成された融合体の成長、生存等を調査した。その結果を融合をおこなわないプロトプラストと比較したところ、融合プロトプラストの数により成長と生存に差違がみられたので報告する。

材料にはスサビノリ *Porphyra yezoensis* Ueda (系統名: ライトグリーン2-2) を使用した。数個体から単孢子採苗を2回おこなった葉令20日の葉状体 (葉長約3mm) を -75°C で冷凍保存し、試験に用いた。

葉状体を2%パパインで処理後、アバロンアセトンパウダー (SIGMA社) とアルカリヘミセルラーゼ (和光純薬) をもちいてプロトプラストを単離作成した。その結果、湿重量 0.1g 当たり 0.8×10^6 個のプロトプラストが単離された。単離されたプロトプラストは、0.6Mのマンニトールを純水に溶かした溶液で3回洗浄した。その後、プロトプラスト数を1ml 当たり約 5×10^5 個に調整し、CaCl₂ を1mMの濃度になるよう添加してプロトプラスト懸濁液とした。

細胞電気融合装置 (SSH-10型, 島津製作所) を用い、プロトプラスト懸濁液約300μl をFTC-02型の融合チャンバーの電極間溝に滴下し、15分間の静置後、交流1MHz, 35V, 10s に続いて直流250V, 25μs の印加の融合操作を、融合細胞数を増やすため2回おこなった。

融合細胞を含んだプロトプラストは、約40°C に保温した1%アガロース (FMC社, 商品名SEA PLAQUE) 培地にプロトプラスト数に換算して約 4.5×10^4 個/ml になるよう懸濁した。この懸濁液1mlを、あらかじめ1%アガロース (FMC社, 商品名SEA KEN) 培地3.5ml を用いて滅菌プラスチックペトリ皿 (90 × 20mm) 中に作成しておいたアガロース平板上に流し込み2層とした。冷却固化した後、アガロース2層平板上に液体培地15mlを重層した (Fig.1)。培地はSWMIIIの組成 (尾形1970) から肝臓抽出液と土壌抽出液を除いて作成した改変培地を用いた。培養は16°C, 白色蛍光灯照

明4000~5000lux, 11hL:13hDの条件でおこなった。また、すべての培地に抗生物質混液 (Polne-Fuller and Gibor 1984) を200ml当たり1ml添加し、液体培地は13~17日おきに新しい培養液に交換した。

99日間静置培養をおこない、その後再生体の一部はアガロース培地からピンセットで取り上げ、液体培地中での8の字振とう培養(約120回転/分)に移行した。なお、対照区として融合処理をおこなわない単一のプロトプラストの培養を静置培養で60日間おこなった。

今回の試験ではプロトプラストが1系統であるため、色調を融合確認の指標に利用できない。したがって細胞が球状になると融合プロトプラストかどうかの判定が困難になる。そのために融合体が球状になる前に、早期に検索する必要があった。そこで、融合操作後なるべく早く融合細胞を含んだプロトプラスト懸濁液をアガロース培地上に広げ、倒立顕微鏡を用いて融合体を検索した。融合直後の細胞はクローバー形のように凹凸のある形状を示す。このような複数の細胞の融合によると判定される細胞を見出し、融合に関わった細胞数をその形状から判断し、記録した。このとき、対象が複数の細胞が単に密着したものではないことは、細胞境界がみられないことを指標にして判定した。このような融合体と判断された細胞のところにはペトリ皿の底の外側から印を付け、その後の成長を追跡した。つまり、本試験では、形態的特徴から融合を判定した。核融合まで完了したのか、あるいは細胞質の融合で終わったのか等についての細胞学的確認はおこなっていない。

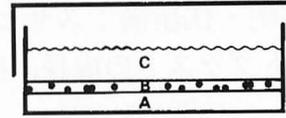


Fig.1. Culture methods of protoplasts. A. agarose medium, B. protoplasts embedded in agarose medium, and C. liquid medium. プロトプラストの培養法。

プロトプラストからの再生体の形態はいろいろなタイプがみられたので、便宜的に以下の4通りに分類した (Fig.2)。1) 非再生: 融合体のままで成長しなかったもの。2) 細胞塊形成 (Fig.2A): 融合体が細胞分裂し、平面的あるいは塊状に成長したもの。3) 根様糸形成 (Fig.2B): 根様糸が伸長したもの。根様糸は融合体から直接形成されるものと2)の細胞塊に分化した後に形成されるもの、さらに単孢子に再生後形成されるものがあった。4) 単孢子形成 (Fig.2C): 上記の2)や3)に再生後1部または全ての細胞が分離してそれぞれの細胞が単孢子となり葉状体に成長したもので、そのほとんどが正常な葉状体に成長した。

本試験では、3個のプロトプラストに由来する融合体50個と4個のプロトプラストに由来する融合体15個、5個および6個のプロトプラストに由来する融合体各1個の成長を追跡することができた。また、対照区の単一のプロトプラストについては、ペトリ皿上の特定の16カ所を追跡観察した。

培養43日後に、融合体についてはすべての再生体について、単一のプロトプラストからの再生体については大きな個体を選び大きさを測定した。また、培養4日、14日、22日、30日、43日、60日、80日および

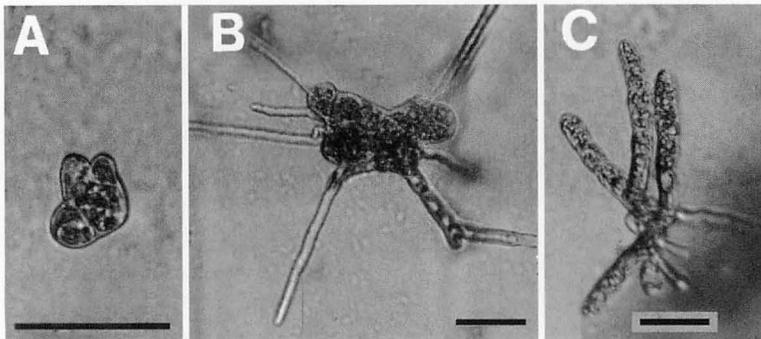


Fig.2 Various forms of regenerated plants of *Porphyra yezoensis*. A. Callus-like form (30 days culture). B. Rhizoidal form (43 days culture). C. Monofilamentous form regenerated from a monospore (30 days culture). Scale bars = 50 μ m. スサビノリのプロトプラスト融合体から成長した4つの再生形態。A. カルス様の細胞塊 (培養30日後)。B. 根様糸を形成したもの (培養43日後)。C. 融合体が細胞塊に再生し、さらに単孢子を形成後それぞれが葉状体に成長したもの (培養30日後)。

Table 1. Mean size and percentage of regenerated plants of single and fused protoplasts of *Porphyra yezoensis* (43days cultures) (Blade width × length, μm) 再生体の大きさと割合.

Number of single protoplasts composing the fused protoplast	Regenerated plants		
	Callus-like form	Rhizoidal form	Monospore-producing form
1	No data (14%)	146 × 176 (58%)	32 × 248 (28%)
3	60 × 64 (23%)	62 × 88 (54%)	24 × 90 (23%)
4	34 × 48 (43%)	58 × 62 (57%)	- (0%)
5	- (0%)	60 × 60 (100%)	- (0%)
6	- (-)	- (-)	- (-)

99 日後に再生体の形態変化と生存率を調べた。

培養43日後の大きさは、Table 1 に示されるように、3つの再生形態では単一のプロトプラストの成長がもっとも良く、融合に関わったプロトプラストの数が増すほど成長は劣っていた。

培養60日間の生存率の変化をFig.3に示す。培養60日後の生存率は、3個または4個のプロトプラストに由来する融合体は単一のプロトプラスト (49%) とほぼ同じかやや低く、それぞれ48%, 33%であった。2個または3個の同一品種のプロトプラストに由来する融合体の生存率は単一のプロトプラストより劣ることが観察されているが (阿知波, 未発表), 今回もほぼ同じ

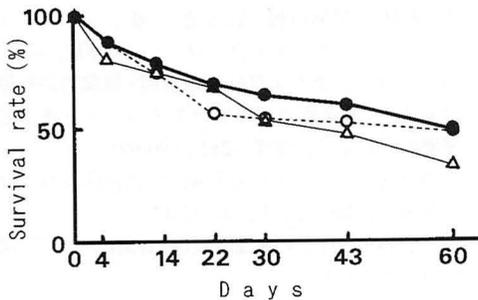


Fig.3. Survival rates of non-fused and fused protoplasts of *Porphyra yezoensis*. (●: non-fused protoplasts, ○: fused protoplasts derived from three single protoplasts. △: fused protoplasts derived from four single protoplasts.) スサビノリの単一プロトプラストおよび3または4細胞の融合で形成されたプロトプラストの生存率。(●:単一のプロトプラスト, ○:3個のプロトプラストに由来する融合体, △:4個のプロトプラストに由来する融合体。)

傾向がみられた。また、スサビノリの異系統間やスサビノリとマルバアマノリの異種間の2個のプロトプラストの融合体の生存率は、培養20~21日で60%前後であることが観察されており (石元ら, 未発表), 今回の3個または4個のプロトプラストに由来する融合体でみられた培養20日前後の生存率とほぼ同じであった。

次に、再生体の形態の変化についてみると (Fig.4), 単一のプロトプラストは根様糸および単胞子の形成が早くまた多くみられた。例えば培養43日後に単胞子に再生したものは単一のプロトプラストでは28%みられたものの、3個のプロトプラストに由来する融合体では23%で、4個のプロトプラストに由来する融合体ではみられなかった。2個または3個のプロトプラストに由来する融合体は単一のプロトプラストと比べ根様糸の形成が遅いことを観察しているが (阿知波, 未発表), 今回も同じ傾向がみられた。

ところで、再生体の形態はいろいろみられるが、正常な形態の葉状体 (一層の細胞からなり円形から線、広線、披針形のもの) に再生するものは、プロトプラストから直接成長するものといったん他の形態に再生後単胞子を形成し成長するものの2通りがみられ、後者から成長するものの割合が多かった (阿知波, 未発表)。さらに後者は1再生個体から多くの葉状体を形成

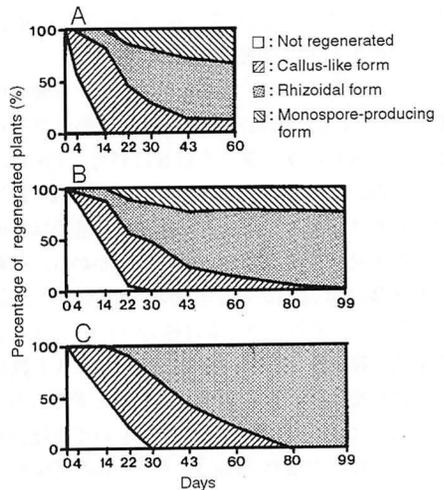


Fig.4 Morphological changes of regenerated plants of single and fused protoplasts of *Porphyra yezoensis*. (A: Single protoplasts, B, C: Fused Protoplasts. B: Protoplasts derived from three single protoplasts. C: Protoplasts derived from four single protoplasts.) 再生体の形態の変化。

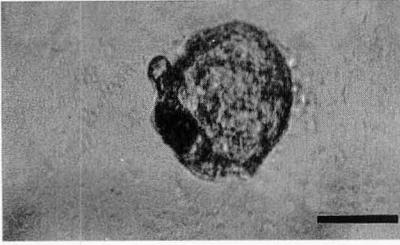


Fig. 5. Giant globular cell differentiated from fused protoplast of three single protoplasts (43 days culture). 巨大球状細胞 Scale bar = 50 μ m

するので、再生個体全体に占める割合はさらに多くなる。今回の試験で培養43日後に正常な葉状体に再生したものは、単一のプロトプラストから再生したものは再生個体全体の25%みられたが、3個のプロトプラストに由来する融合体では17% (単胞子を形成後成長した3個体と融合体から直接成長した1個体) で、4個のプロトプラストに由来する融合体では全くみられなかった。また、培養99日後に正常な葉状体に再生したものは、3個のプロトプラストに由来する融合体では培養43日後より増加し、生存個体全体の32% (単胞子から成長した6個体と融合体から直接成長した1個体) であったが、4個のプロトプラストに由来する融合体では依然正常な形態に再生せず、この時点で生存した4個体は細胞塊になり根様系を形成していた。しかし、この4個体を液体培地での振とう培養へ移行したところ、生存したのは1個体のみであったが、単胞子によって再生し正常な葉状体を生じた。

一方、5個のプロトプラストに由来する融合体は培養14日後までに細胞分裂と根様系の形成がみられたが、培養99日後から振とう培養に移行し188日後まで培養したが単胞子の形成はみられなかった。また、6個のプロトプラストに由来する融合体は培養14日後の時点で再生せずに死亡した。以上のことから、正常形態の葉状体は単胞子から生じる場合が多いことがわかる。そして、単胞子の形成は融合プロトプラスト数が増すほど難しくなるため融合プロトプラスト数が増すと正常な葉状体の形成が少なくなると考えられる。

ところで、培養の途中で大きなもので直径約100 μ mにもなる球状の細胞 (Fig. 5) が、3個のプロトプラストに由来する融合体で7個体、4個のプロトプラストに由来する融合体で1個体みられた。水上 (1989) も2個のプロトプラスト融合体の再生体から、細胞や色素体の増加がみられず細胞体積のみ大きくなるものを認め

ているが、その後の成長については追跡していない。今回みられた巨大球状細胞で生存したものは、培養が進むにつれて球状細胞の一部が細胞塊に再生後、根様系を形成した。その後振とう培養への移行により生存した2つの球状細胞は単胞子に再生し正常な葉状体に成長した。

以上の結果から、3個および4個のプロトプラストに由来する融合体の生存率は単一プロトプラストとほぼ同じかやや劣り、融合プロトプラスト数が多いほど根様系、単胞子の形成が遅れ、また成長も劣ることが示された。さらに、正常な形態に再生する個体の多くは単胞子を形成後再成長したものであり、正常な葉状体の出現率は融合プロトプラスト数が増えるに従い低下した。これらのことから、融合操作したプロトプラストから融合体を選別せずに培養する場合、融合体の再生、成長は単一プロトプラストより遅れることに注意する必要があることが示された。

引用文献

- Araki, T. and Morishita, T. 1990. Fusion of protoplasts from wild type *Porphyra yezoensis* and green type *P. tenera* thalli (Rhodophyta). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1161.
- Fujita, Y. and Migita, S. 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* UEDA and development of fusion products. *Jpn J. Phycol.* 35: 201-208.
- Fujita, Y. and Saito, M. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 161-166.
- 藤田雄二 1991. 海洋植物の細胞操作. p 69-85. 宮地重遠 (監修). 嵯峨直恒・松永是 (編). ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー. 裳華房. 東京.
- 藤田雄二 1993. 緑藻および紅藻の種間・属間の細胞融合藻体. 大型藻類のバイオテクノロジー—更なる発展のために—. 海洋. 281: 690-695.
- 水上 譲 1989. アマノリの細胞融合. 西海区ブロック藻類・貝類研究会報. 6: 43-47.
- 尾形英二. 1970. 新しい海藻培養液SWMについて. 藻類 18: 171-173.
- Polne-Fuller, M. and Gibor, A. 1984. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.* 20: 609-616.