

平成29年度 委託プロジェクト研究
「農林水産分野における気候変動対応のための研究開発」
最終年度報告書

13404790

温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構
研究開発責任者	加藤 雅也
共同研究機関	国立研究開発法人 水産研究・教育機構（中央水産研究所、西海区水産研究所、水産大学校）
普及・実用化支援組織	
研究開発責任者 連絡先	TEL : 045-788-7615 FAX : 045-788-5001 E-mail : mkatoh@affrc.go.jp

<別紙様式3. 平成29年度の最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. 細胞融合技術の安定化と細胞融合により得られた新規株の選抜技術の検討 (11110)	同種間における細胞融合技術の安定化					水産大学校	生物生産学科・生物環境学講座
	異種間における細胞融合技術の安定化						
	細胞融合技術に関するガイドライン作成						
	細胞融合により得られた新規株の選抜方法の検討						
2. 融合細胞への共生細菌添加による効率的かつ安定的な育種技術の開発及び高水温耐性ノリ育種素材の開発 (11120)	安定的かつ効率的な育種技術の開発					水産大学校	生物生産学科・生物環境学講座
	高水温耐性を有するノリ育種素材の開発						
3. プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発 (11130)	元株候補品種の特性調査					西海区水産研究所	資源生産部・藻類沿岸資源管理 G
	高水温判別法の開発						
	プロトプラスト分離法と培養法の開発						
	高水温耐性系統選抜法の開発						
4. プロトプラスト選抜株への共生細菌添加等による高水温耐性ノリ育種素材の開発 (11140)	高水温耐性系統選抜法の改良					西海区水産研究所	資源生産部・藻類沿岸資源管理 G
	高水温耐性細胞の選抜						
	高水温耐性候補系統の育成						
	高水温耐性候補系統の高水温調査						

5. 共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討 (12110)	共生細菌の種類と効果的な添加条件の検討	中央水産研究所	水産物応用開発研究 C・衛生管理 G
	共生細菌を用いたノリの育種技術の開発	中央水産研究所	水産物応用開発研究 C・衛生管理 G
	ノリと共生細菌の発現遺伝子カタログ作成	中央水産研究所	水産生命情報研究 C・分子機能 G 水産物応用開発研究 C・衛生管理 G
	ノリの有用形質に関する遺伝子の同定	中央水産研究所	水産生命情報研究 C・分子機能 G 水産物応用開発研究 C・衛生管理 G
	共生細菌が産生する物質の探索	中央水産研究所	水産生命情報研究 C・分子機能 G 水産物応用開発研究 C・衛生管理 G
6. 細菌産生物質の探索と細菌添加による遺伝子発現の比較解析による効率的育種技術の開発 (12120)			

I-2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	中央水産研究所	水産生命情報研究センター・分子機能グループ長 センター長	◎ 小林正裕 (～2017.3) ◎ 加藤雅也 (2017.4～)
中課題11000:プロトプラストを用いた細胞融合等による効率的育種技術の開発			
1. 細胞融合技術の安定化と細胞融合により得られた新規株の選抜技術の検討	水産大学校	生物生産学科・生物環境学講座	○ 阿部真比古 村瀬 昇
2. 融合細胞への共生細菌添加による効率的かつ安定的な育種技術の開発及び高水温耐性ノリ育種素材の開発	水産大学校	生物生産学科・生物環境学講座	○ 阿部真比古 村瀬 昇

<p>3. プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発</p>	<p>西海区水産研究所 中央水産研究所</p>	<p>資源生産部・藻類・沿岸資源管理グループ 水産生命情報研究センター・分子機能グループ</p>	<p>○ 藤吉栄次 玉城泉也 小林正裕</p>
<p>4. プロトプラスト選抜株への共生細菌添加等による高水温耐性ノリ育種素材の開発</p>	<p>西海区水産研究所 中央水産研究所</p>	<p>資源生産部・藻類・沿岸資源管理グループ 水産生命情報研究センター・分子機能グループ</p>	<p>○ 藤吉栄次 玉城泉也 中川雅弘 (2016. 4～) 小林正裕 (～2017. 3)</p>
<p>中課題12000：共生細菌添加による効率的な生産技術の開発</p>			
<p>5. 共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討</p>	<p>中央水産研究所</p>	<p>水産物応用開発研究センター・衛生管理グループ 水産生命情報研究センター・分子機能グループ</p>	<p>○ 福井洋平 里見正隆 小林正裕</p>
<p>6. 細菌産生物質の探索と細菌添加による遺伝子発現の比較解析による効率的育種技術の開発</p>		<p>水産生命情報研究センター・分子機能グループ 同・ゲノム情報解析グループ 水産物応用開発研究センター・衛生管理グループ</p>	<p>○ 尾島信彦 (～2017. 3) 丹羽健太郎 (2017. 4～) 馬久地みゆき 安池元重 小林正裕 (～2017. 3) 中村洋路 里見正隆 ○ 福井洋平 (～2017. 3従担当； 2017. 4～主担当)</p>

(注1) 研究開発責任者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
委託プロジェクト研究名	農林水産分野における気候変動対応のための研究開発		
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所 水産生命情報研究センター 分子機能グループ グループ長・小林正裕 (～2017.3) センター長・加藤雅也 (2017.4～)		

I-1. 研究目的

水温が23℃以下で生産を行うノリ養殖業では、高水温による生産開始の遅れなどから生産量の減少や不安定化が生じている。そのため、高水温耐性を持ったノリ品種の開発が望まれている。そこで本課題では、水温24℃以上で2週間以上生育可能なノリの育種素材を開発することを目標とする。しかし、既存の細胞融合やプロトプラスト選抜などは新規の形質導入技術としては有望であるが、技術として不安定なため実用化は困難と考えられてきた。

このため、本研究では、

1. 細胞融合技術の安定化と細胞融合により得られた新規株の選抜技術の検討
2. 融合細胞への共生細菌添加による効率的かつ安定的な育種技術の開発及び高水温耐性ノリ育種素材の開発
3. プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発
4. プロトプラスト選抜株への共生細菌添加等による高水温耐性ノリ育種素材の開発
5. 共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討
6. 細菌産生物質の探索と細菌添加による遺伝子発現の比較解析による効率的育種技術の開発

により、細胞融合技術、プロトプラスト選抜技術、共生細菌添加技術を開発するとともに、発現遺伝子の比較解析等により共生細菌が産生する物質を探索し、これらの技術を活用して高水温耐性ノリ育種素材を開発することを目標とする。

その結果、

1. 地球温暖化の高水温下におけるノリ生産量の増加及び生産の安定化
2. 開発した育種技術を用いた他の優良形質を有する新品種の開発

が期待される。

I-2. 研究結果

水温24℃以上で2週間以上生育可能な育種素材の開発を目指して、様々な技術を用いて研究した。例えば、選抜に便利なバラバラにした細胞（プロトプラスト）を用いたり、分離した高温で生き残ったノリを選抜したり、ノリに共生している細菌を利用して育種に取り組んだ。ノリを含む植物の一つひとつの細胞には、硬い細胞壁があり、プロトプラストはこの細胞壁を酵

素で溶かして取り除いた裸の細胞のことである。細胞壁は細胞同士をつなぎ合わせる役目をもっているため、プロトプラストでは、一つひとつの細胞がバラバラになっている。また、ノリには多くの細菌が細胞壁に付着しているため、細胞壁を取り除くことで、無菌化が可能となり、共生細菌のノリ・プロとプラストへの添加条件やノリの安定的な培養技術を開発することができた。また、分離したプロトプラストに処理を施し、同種間細胞融合由来株の作成と異種間細胞融合由来株の作成を行い、24℃条件下における生長および生理的評価を行った。異種間細胞融合由来株の多くは、ある値の塩分培地を用いることにより、比較的安定した殻胞子の放出が確認された。また、塩分調製、低温処理および通気の種々の組み合わせにより、実験に耐えうる殻胞子量を確保することができた。次に多層化率による高水温耐性候補株の選抜を行ったところ、異種間細胞融合由来の6株と同種間細胞由来株1株で低い値を示し、高水温耐性を有している可能性が高いことが分かった。更に、高水温選抜で生き残った個体由来の葉状体を培養し、この葉状体を成熟させ自家受精により生じた果胞子から候補系状体（高水温耐性候補系統）を得た。高水温耐性候補系統とアオクビ（元株）について、殻胞子から高水温条件で葉状体の培養を実施し、終了時に高水温障害による多層化によって増加したくびれ数を測定した。その結果、選抜株4株について、アオクビよりくびれ数が少なく、高水温耐性の向上がみられた。細菌の添加がノリに及ぼす好影響を調べるためにノリプロトプラストへの細菌添加実験を行い、これまでのバイオインフォマティクス解析によって抽出されたノリおよび細菌における共生関連候補遺伝子の発現量を正確に定量した。これまでのRNA-Seq解析によって抽出されたノリおよび細菌における共生関連候補遺伝子について、リアルタイムPCR法により各10遺伝子の発現を検証することができた。現在、いくつかの高水温耐性育種素材が、夏を超えて飼育されている。

I-3. 今後の課題

ノリは今後もコンビニや外食産業での需要の伸びが期待され、さらに海外での日本食ブームもあって、需要が増える可能性がある。水産研究・教育機構は、ノリの国内生産量を増やすために、品種改良に向けて生産県などと協力し、本プロジェクト終了後、高水温耐性育種素材を用いてフラスコより大きい水槽や屋外で飼育試験をして実用化を目指す予定である。更に、水産研究・教育機構はノリの安定供給に貢献すべく、ノリの病気や環境や味に関する研究も継続する。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	11110	研究期間	平成25～27年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	プロトプラストを用いた細胞融合等による効率的育種技術の開発		
小課題名	細胞融合技術の安定化と細胞融合により得られた新規株の選抜技術の検討		
小課題責任者名・研究機関	阿部真比古・水産大学校 生物生産学科 生物環境学講座		

1) 研究目的

育種に活用可能な技術となるよう細胞融合技術を安定化させるとともに、その技術のガイドラインを作成する。さらにその細胞融合技術を用いてスサビノリ養殖品種とその同種間およびスサビノリ養殖品種と高温耐性を有する南方系アマノリ類を含む他種間の細胞融合を行うことにより、両者の優良形質を合わせ持った新規株の作出に向けた選抜方法を検討する。

2) 研究成果

(1) スサビノリU-51株, スサビノリ緑芽, タネガシマアマノリを用いて, 以下の実験を行った。

1) 温度別培養 (18℃, 24℃) によるノリ葉状体の生長

U-51株は, 18℃で生長が良好であった。一方, タネガシマアマノリは24℃で生長が良好であった。

2) 温度別培養 (18℃, 24℃) によるプロトプラストの生長

U-51株およびタネガシマアマノリともに24℃で生長が良好であった。

3) 温度別培養 (18℃, 24℃) による融合細胞の生長

融合率は6.0～15.8%であり, 生長は24℃で良好であった。

4) 画像クロロフィル蛍光測定器 (Imaging-PAM) を用いた葉状体内の変異細胞の探索

U-51株の実効量子収率 (Φ_{II}) は, 18℃が最も高い値を示し, 24℃ではやや低い値であった。30℃では, 培養6日目には測定が不可能であった。一方, タネガシマアマノリの Φ_{II} は, 18℃, 24℃および30℃において同等の値であった。蛍光顕微鏡によるクロロフィル蛍光の観察においては, U-51株では18℃および24℃で差異は認められなかったが, 30℃では培養期間中に蛍光強度が著しく強まった後, 蛍光なくなり, 培養14日目には仮根付近の数細胞のみが正常な蛍光を示した。また, 30℃で生残した細胞を18℃で培養を継続したところ, 葉状体へと再生した。一方, タネガシマアマノリのクロロフィル蛍光はいずれの温度でも差異は認められな

かった。

(2) スサビノリU-51株およびスサビノリ緑芽を用いて、以下の実験を行った。

1) PEG法による融合処理の検討-1

PEGの添加時間を10, 20, 30, 40および60分, 0.3Mマンニトール海水での希釈時間を20~30分としたところ, 細胞融合率は, PEGの添加時間が20~60分においては0.49~0.60%とほとんど差がなく, 10分では0.10%と低かった。融合細胞の生長は, 添加時間が10分で良好で, 次いで30分が良かった。本実験では, 融合処理および顕微鏡観察時にシャーレ内で起こる溶液の移動により, 細胞の融合率や生残率を低下させていることが考えられた。

2) PEG法による融合処理の検討-2

1) の実験から, 融合処理および顕微鏡観察時にシャーレ内で起こる溶液の移動が細胞の融合率や生残率を低下させていることが考えられたことから, 溶液の移動の抑制を考慮し, 1) を再度検討した。その結果, 細胞融合率は1.0~1.5%となった。細胞融合率に関して1) と比較すると, PEGの添加時間が20~60分では2.0~3.1倍, 10分では9.5倍も上昇した。また, 融合細胞の生長は, 添加時間が10分で良好で, 次いで20分, 40分, 30分および60分の順であった。

3) 融合細胞への共生細菌の効果に関する予備実験

細菌添加の有無および細菌添加のタイミングに関わらず融合率(5.2~18.6%)とこれまでと同程度であった。一方, 融合細胞の生残率については, 細菌を添加した方が高くなった。

以上の1), 2) および3) の結果から, PEG法による融合処理において, シャーレ内の溶液の移動を抑制したうえで, 細胞融合率および融合細胞の生長からPEGの添加時間は20~30分程度が望ましいと考えられた。

(3) 細胞融合により得られた新規株の選抜方法の検討を行った。

U-51×野生スサビノリの同種間細胞融合およびU-51×タネガシマアマノリの異種間細胞融合によって新規株は, 糸状体として24株得られた。これらのうち6株において糸状体から殻胞子嚢を形成させ, 殻胞子を放出させた。放出させた殻胞子はクレモナ単糸に付着させ, "アマノリ養殖品種の特性" において24℃下での多層化を基にした高温耐性評価を行った。いずれの新規株も24℃下での培養では, 18℃下と比べて多層化率が高くなった。しかし, 数株においては高水温下で多層化の発生が少なかった。したがって, 細胞融合により得られた新規株は, 放出された殻胞子を24℃下で培養し, 初期生長の多層化率を算出することで選抜が可能であると考えられた。

(4) 「アマノリ類の細胞融合技術に関するガイドライン」を作成した

これまでの実験により「アマノリ類の細胞融合に関するガイドライン」を作成した。従来の方法に比べて顕微鏡観察等による実験者が経験的に判断しなくてはならない項目を少なくした。また, 融合処理した細胞の歩留まりを高くするために作業過程での全換水を少なくした(図1)。この結果, 説明文の中にある「静かに混合」などの表現で作業の程度が実験者によって変動するものの, 細胞融合率はおおよそ1.5%程度維持でき, 融合細胞も生長した。さらに, 文章による実験者のハンドリングの誤差を少なくするために, 「アマノリ類の細胞融合操作に関

する動画集」を作成した。

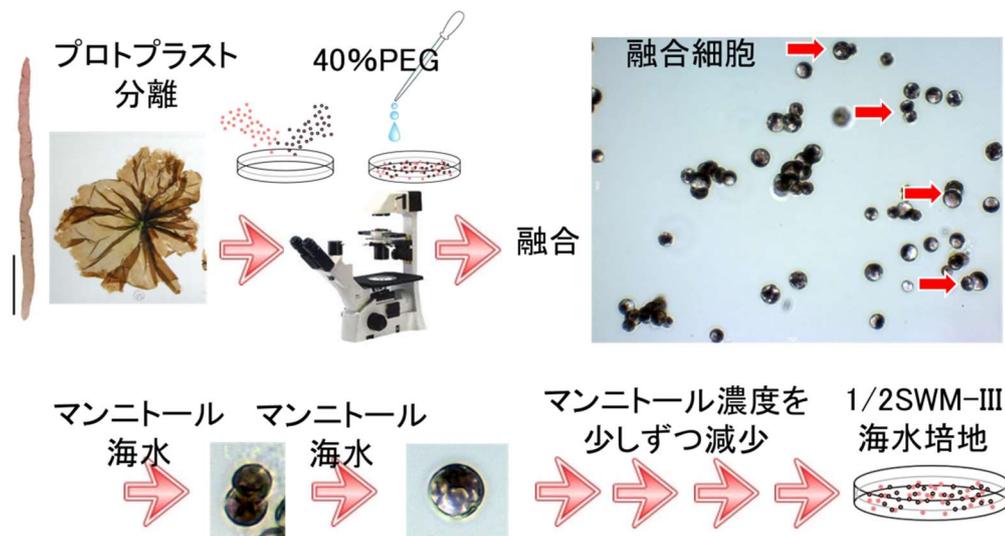


図1 細胞融合過程のイメージ図

3) 成果活用における留意点

本課題で作成した「アマノリ類の細胞融合に関するガイドライン」および「アマノリ類の細胞融合操作に関する動画集」においては、一般配布やホームページによる自由閲覧は予定していない。しかし、公的機関を対象とした定期的な技術講習会を開催し、本成果物を基に技術移転に努める。

4) 今後の課題

現在、細胞融合により得られた株の現場海域への展開において、規程の作成が進められているため、直ちに使用はできない。

細胞融合に関するガイドラインを基に技術講習会を開催し技術移転を図るなかで、より実践的な技術にしていくための修正が必要になると思われる。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	11120	研究期間	平成27～29年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	プロトプラストを用いた細胞融合等による効率的育種技術の開発		
小課題名	細胞融合への共生細菌添加による効率的かつ安定的な育種技術の開発及び高水温耐性ノリ育種素材の開発		
小課題責任者名・研究機関	阿部真比古・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 生物環境学講座		

1) 研究目的

小課題11110「細胞融合技術の安定化と細胞融合により得られた新規株の選抜技術の検討」において開発した細胞融合技術を12110「共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討」及び小課題12120「細菌産生物質の探索と細菌添加による遺伝子発現の比較解析による効率的育種技術の開発」で得られた知見を活用してより安定的かつ効率的なノリの育種技術を開発する。さらに、開発した技術を用いて24℃以上で2週間以上生育可能なノリの育種素材を開発する。

2) 研究成果

(1) 小課題11110により得られたスサビノリU-51株×野生スサビノリの同種間およびスサビノリU-51株×タネガシマアマノリの異種間の細胞融合由来の糸状体24株(同種間:12株, 異種間12株)を用いて, 多層化率と高温耐性候補株の選抜を行った。

1) 同種間細胞融合由来株における多層化率と高温耐性候補株の選抜

24℃下における多層化率は, 39.4～100%と株によって差があった。このうち2株の多層化率が39.4%および43.1%と低かった(図1)ことから, 18℃へ移し, 培養を継続した。その結果, 生長が良好な葉状体が作出され, この葉状体から保存株(C1-2株)を得た。

2) 異種間細胞融合由来株における多層化率と高温耐性候補株の選抜

24℃下における多層化率は, 42.5～56.9%と低くなる株と89.6～96.9%と高くなる株が存在した(図2)。すべての株について24℃で2週間培養した後, 18℃に移動し培養したところ, ほとんどの葉状体で単胞子の放出が認められ, 生長が著しく停滞した。一方で, 黒み, 生長性, 形態などで特長を持った葉状体も確認された。これらの葉状体から保存株(A1株, A5株, A6株およびB1株)を得た。

(2) 小課題11110において派生的に得られた細胞選抜由来の糸状体2株(再生株, 再々生株)を用いて, 高温条件下での多層化率, 生長特性および生理特性を試験した。

再々生株の24℃下での多層化率は, 77.4±12.8%と高かった。また, スサビノリU-51株, 再生株および再々生株の葉状体を用いて24℃下で15日間培養したところ, U-51株の相対生長率

が培養8日目から急激に低下するのに対し、再生株や再々生株はほぼ一定であった。培養期間中、Imaging-PAMを用いて実効量子収率 Φ_{II} を測定したところ、いずれの株も18℃で培養した葉状体よりも24℃で培養した葉状体の Φ_{II} が低くなり、高水温による影響は受けていた。

(3) 細胞選抜由来の葉状体における糖含有量を分析した。

スサビノリU-51株、再生株および再々生株のそれぞれの葉状体を18℃および24℃で培養し全糖含有量を分析したところ、それぞれの全糖含有量は $0.129 \pm 0.012 \sim 0.158 \pm 0.004$, $0.235 \pm 0.009 \sim 0.225 \pm 0.004$ および $0.190 \pm 0.015 \sim 0.191 \pm 0.020$ mg-sugar/mgDWと細胞選抜した葉状体が高い値を示した。24℃で培養した葉状体の全糖含量は、U-51株では18℃で培養した葉状体に比べて高くなったが、細胞選抜した葉状体は18℃とほぼ同等であった。また、細胞間粘質多糖のひとつであるガラクトース含有量を調べたところ、18℃で培養したU-51株のガラクトース含有量は $165.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ であり、24℃で培養すると $208.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ まで増加した。細胞選抜した再生株と再々生株のガラクトース含有量は $187.0 \sim 235 \mu\text{g}/\text{mg}$ とU-51株よりも高い傾向にあった。

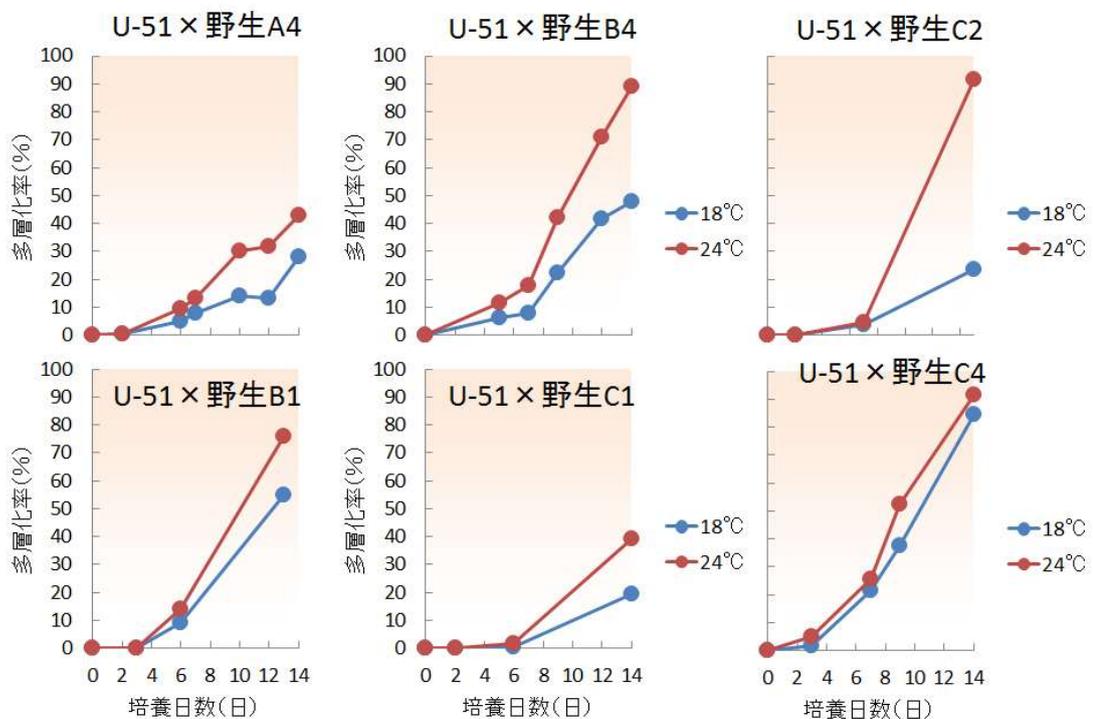


図1 同種間融合細胞由来株における多層化率の違いの一例

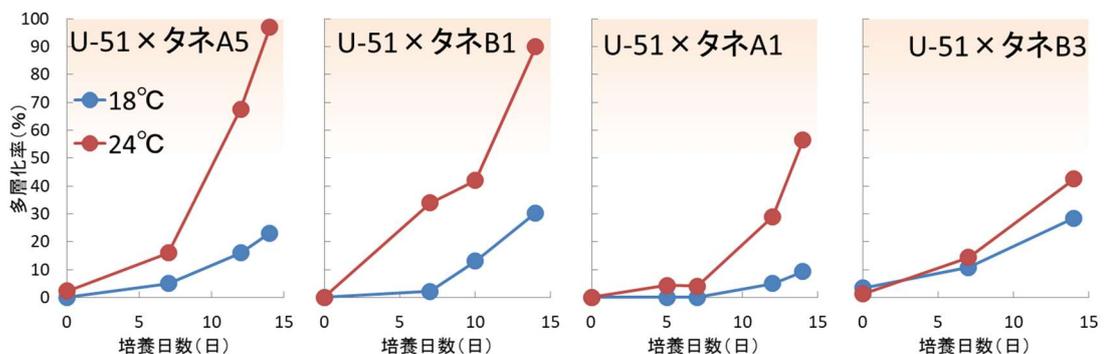


図2 異種間融合細胞由来における多層化率の違いの一例

3) 成果活用における留意点

本課題の成果物のうち細胞融合により得られた株においては、現場海域への展開に関する規程の作成が進められているため、直ちに現場海域では使用はできない。

多層化率は高温耐性候補株の選抜には有効と思われるが、多層化率の結果に関わらず様々な葉状体が作出されることから、状況に応じて対応されたい。

4) 今後の課題

形質（本課題では高温耐性）の固定に関して、今後十分に検討していく必要がある。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	11130	研究期間	平成25～27年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	プロトプラストを用いた細胞融合等による効率的育種技術の開発		
小課題名	プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	藤吉栄次・国立研究開発法人 水産研究・教育機構 西海区水産研究所 資源生産部藻類・沿岸資源管理グループ		

1) 研究目的

近年の地球温暖化の進行により、ノリの生産に悪影響を与えている。特に漁期開始時の水温低下の遅れは、幼芽に異常を生じさせ、生産量や品質の低下を招く原因とされている。本課題においては、24℃で2週間を目標に、漁期初期の高水温条件下を乗り切れる育種素材を育成することを目指している。本小課題では、プロトプラスト選抜に向けて葉状体プロトプラストの分離、培養、選抜法の検討および高水温耐性判別法の開発を目的とする。

2) 研究成果

(方法)

プロトプラストの分離、培養法等の概要は、原則として以下の通りに行った。材料にはスサビノリ養殖品種アオクビを用いた。フリー糸状体よりカキ殻糸状体を作り、増殖および成熟させ、殻胞子を放出させた。得られた殻胞子を18℃(適水温)で培養し、葉長約2cmまで生長した葉状体をプロトプラスト分離用に用いた。培養時の光条件は光量60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、日長10時間明期、14時間暗期で、培養液には栄養強化海水の1/2SWM-III改変培地を用いた。プロトプラストの分離は、葉状体を濾過海水で2回洗浄し、0.6Mマンニトールおよび20mM HEPESを添加した2%パパイナ海水(pH 7.4)で15分間処理後、細胞壁の溶解を行った。細胞壁溶解用には、西海区水産研究所で製造した長崎県産サザエ中腸腺アセトンパウダーから、蒸留水に浸透圧調節物質として0.51M(3%)塩化ナトリウム、0.6Mマンニトールおよび50mM MESを添加した溶液で抽出した粗酵素液(2%アセトンパウダー)を用いた。粗酵素液には0.5%デキストラン硫酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤の50 μM アンチパイン(分離法検討時を除く)、植物プロトプラスト分離用酵素の2%セルラーゼオノズカ(分離法検討時を除く)を添加した。粗酵素液(pH 6.0に調整)は、遠心分離後に上澄みを0.22 μm ミリポアフィルターでろ過して使用した。プロトプラストの分離は約25℃の条件で振とうしながら約1.5時間かけて行った。プロトプラストを含む粗酵素液を、40 μm メッシュおよび10 μm メッシュで濾過し残渣を除去後、400 \times g、1500rpmでの遠心分離と0.6Mマンニトール海水による洗浄を3回繰り返して分離した。得られたプロトプラストは、計数後、1/2SWM-III改変培地(液体培地)を用いて、または同培地ベースの低融点寒天培地(1%)に包埋したのち、18℃で培養した。培地には抗菌剤ペニシリンGカリウム(0.1mg/ml)およびス

トレプトマイシン (0.2mg/ml) を添加した。

1) プロトプラスト分離法の開発

粗酵素液での処理時間、浸透圧調節物質について検討を行うとともに、デキストラン硫酸ナトリウム (0.5%)、植物プロトプラスト分離用酵素 (セルラーゼオノズカおよびマセロザイム、濃度各 2%)、プロテアーゼ阻害剤 (アンチパインおよびロイペプチン、濃度各 5 μ M と 50 μ M) の粗酵素液への添加によるプロトプラスト分離数と再生率への影響について調べた。

2) プロトプラスト培養法の開発

プロトプラストを液体培地または固体培地 (低融点寒天、低融点アガロース) で培養し、培地の違いが再生率に与える影響について調べた。低融点寒天はナカライテスク製低温ゲル化用特性試薬寒天末 (ゲル化温度 30-31 $^{\circ}$ C) を、低融点アガロースは BM Bio 社製 Gene Pure SoftPrep (ゲル化温度 8-16 $^{\circ}$ C) を用いた。ゲル化剤の濃度は 1% とした。

低融点アガロース培地を用いた場合、プロトプラストの再生率について実験ごとに大きな違いがみられたため、ゲル化温度の異なる 4 種の低融点アガロースを用いて再度実験を行った。用いたアガロースは A (BM Bio, Gene Pure SoftPrep, ゲル化温度 8-16 $^{\circ}$ C)、B (ニッポンジーン, Agarose L, 30 $^{\circ}$ C)、C (タカラバイオ, PrimeGel Agarose LMT 1-20K, 24-28 $^{\circ}$ C)、D (シグマアルドリッチ, 低融点アガロース, 26-30 $^{\circ}$ C) である。A については、ゲル化温度が低いので、いったん 10 $^{\circ}$ C に下げてゲル化を確認した後 18 $^{\circ}$ C で培養した。

3) 高水温耐性系統選抜法の検討

プロトプラストを、安定的に高い再生率が得られた低融点寒天培地を用いて培養した。プロトプラストは 18 $^{\circ}$ C で 1 日間培養したのち、26、28、30 $^{\circ}$ C の条件で 1、2、7、14 日間高水温処理し、再び 18 $^{\circ}$ C に戻して培養した。18 $^{\circ}$ C に戻して約 1 か月後に検鏡し、シャーレ中の再生体数を実験開始時に分注したプロトプラスト数で除して再生率を算出した。

4) 元株候補品種の特性調査と高水温耐性判別法の開発

材料にはスサビノリ養殖品種アオクビと女川ササビを用いた。両品種の殻胞子を 18 $^{\circ}$ C (対照) と 24 $^{\circ}$ C (高水温) で通気培養し、24 $^{\circ}$ C 区では 7 日ごとに一部の葉状体を 18 $^{\circ}$ C に移した。培養中は、葉長の測定および葉状体に生じる障害の観察を行った。培養期間は 21 日または 28 日で、光条件は光量 60 μ mol m⁻² s⁻¹、日長 10 時間明期、14 時間暗期で、培養液には栄養強化海水の 1/2SWM-III 改変培地を用いた。

(結果)

1) プロトプラスト分離法の実験

酵素処理時間については 1 時間半から 3 時間で分離数が増加したものの、3 時間以降は再生率が低下した。浸透圧調節物質については蒸留水に 0.51M (3%) 塩化ナトリウムおよび 0.6M マンニトールを添加した実験区は、海水に 0.6M マンニトールを添加した実験区と比較して分離数が多く再生率も高い傾向がみられたことから、この溶液を基本溶液としてデキストラン硫酸ナトリウム、植物プロトプラスト分離用酵素およびプロテアーゼ阻害剤の添加による影響を調べた。デキストラン硫酸ナトリウムの添加は分離数の向上に有効であり、植物プロトプラスト分離用酵素のうちセルラーゼオノズカの添加により分離数および再生率の向上がみられた。また、プロテアーゼ阻害剤としてアンチパインおよびロイペプチンの 2 種類を 5 μ M および 50 μ M の濃度でそれぞれ添加したところ、いずれも分離数と再生率が向上した (図 1)

これらの結果を踏まえ、プロトプラスト分離時はデキストラン硫酸ナトリウム、セルラーゼオノズカおよびアンチパインを酵素液へ添加することが適当であると考えられた。

2) プロトプラスト培養法の開発

分離したプロトプラストを、低融点寒天培地、低融点アガロース培地、液体培地の3種の培地で培養し再生率を比較した。実験は3回行った。低融点寒天培地を用いた場合、3回の実験とも液体培地を用いた場合より高い再生率が得られた(図2)。低融点アガロース培地を用いた場合は、実験毎の再生率の変動が大きかった(図2)。3種の培地のうち低融点寒天培地を用いた場合には、3回の実験すべてで15%以上の安定して高い再生率が得られた。

ゲル化温度の異なる4種の低融点アガロース培地を用いた実験では、Aを除いたB,C,Dでは3回の実験とも対照の低融点寒天培地より若干高い再生率が得られたが、Aでは10%以下の低い再生率しか得られなかった(図3)。これらの結果から、分離したプロトプラストの培養に用いる培地として、取り扱いやすさを考慮すると低融点寒天培地が適当であると考えられた。

3) 高水温耐性系統選抜法の検討

18°Cで培養を続けた対照(高水温処理0日)の再生率30.8%と比較して、26°C、28°C、30°Cの高水温条件で培養すると、1日間でも再生率は大幅に低下し、30°Cでは死滅した。2日間では再生率は26°Cで15.1%、28°Cで0.0023%となった。7日間では、26°Cでは0.2%の再生がみられたが、28°Cでは死滅した。26°Cでは14日間でも0.005%の再生がみられた。これらの結果から、高水温での選抜は26-28°Cで行うのが適当であると考えられた。

4) 元株候補品種の特性調査と高水温耐性判別法の開発

アオクビと女川スサビの両品種とも18°Cでは葉状体の組織に異常は観察されなかった。24°Cの高水温での培養では18°Cでの培養と比較して、初期の生長は早いがその後の生長は組織の異常により遅滞がみられた(図4)。7日後、14日後に24°Cから18°Cに移した区は、その後他の区より葉状体の生長が速かったが(図4)、28日後の葉状体には多層化した部分や多数のくびれが観察され、その程度は24°Cで14日間培養したほうが大きかった(図5)。21日後に24°Cから18°Cに移した区は、24°C区同様に葉状体に縮れが目立ち(図5)、28日後の葉長も7日後、14日後に移した区より小さくなった(図4)。これらの結果から、24°Cでの培養期間が長いほど障害の程度が大きく、18°Cに移しても障害は消滅しないことが明らかになった。尚、女川スサビは18°Cでの生長がアオクビよりかなり劣る結果となったので、選抜用にはアオクビを用いることにした。

本研究の目標は24°Cの高水温に2週間耐えうる系統を育成することであるが、殻胞子を24°Cで2週間培養すると、アオクビ、女川スサビの両品種ともすべての個体に多層化による縮れが見られ(図6)、多層化率(個体毎の多層化の有無により算出)による高水温耐性の判別はこの条件では難しいと考えられた。多層化面積による判別についても、巻葉となり広げて面積を測定することが難しく、さらに多層化部と正常部の色調が類似しているため困難であると考えられた。

24°Cで14日間培養した個体を18°Cに移し、7日後(合計21日後)に観察すると、顕微鏡観察では多層化部分と正常部の色調が明瞭に区分される(図7)とともに、28日後の場合と同様にくびれ数が増加しているのがみられた(図8)。正常部と多層化部の生長の違い(多層化部が遅い)によりくびれが増加したものと考えられた。21日後のくびれ数をまとめると表1となる。18°Cで培養してもくびれは見られるが平均1未満であるが、24°Cで7日間培養した区は両品種とも3倍以上に増加した。さらに高水温障害の大きい24°Cで14日間培養した区ではくびれ数がさらに増加し、くびれ数の多寡により高水温障害の程度を簡便に判別できる可能性が示唆された。

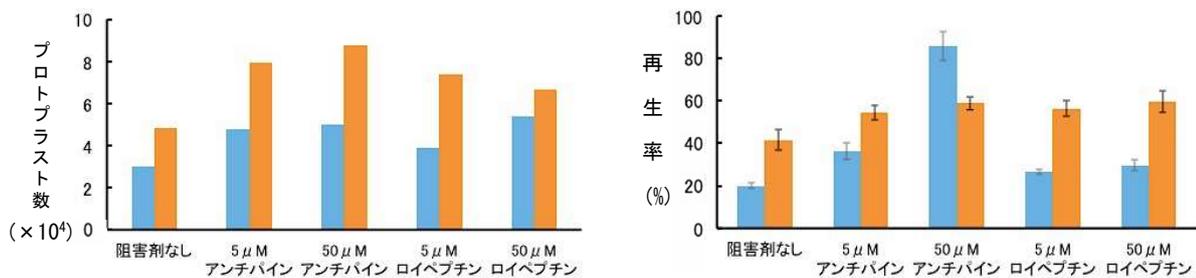


図1 プロテアーゼ阻害剤の添加がプロトプラスト数（左）および再生率（右）に及ぼす影響
棒グラフは左側から順に1回目および2回目の実験結果.

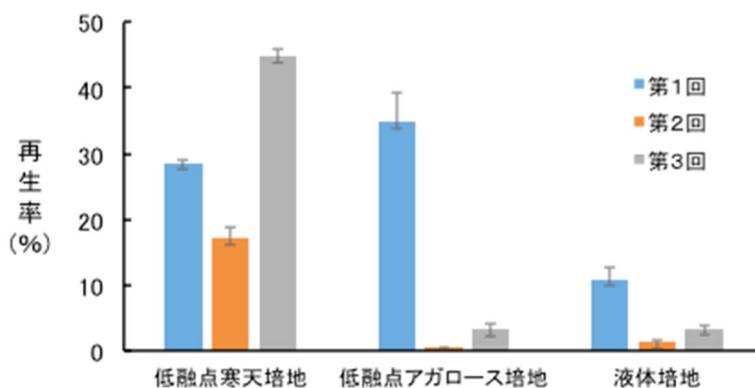


図2 プロトプラストの再生率および培地の影響

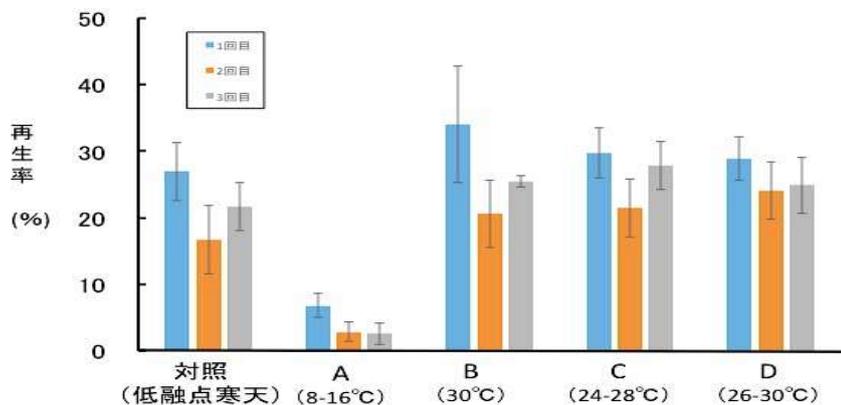


図3 培地に用いたアガロースの種類によるプロトプラスト再生率の違い
A-Dアガロース, ()内はゲル化温度.

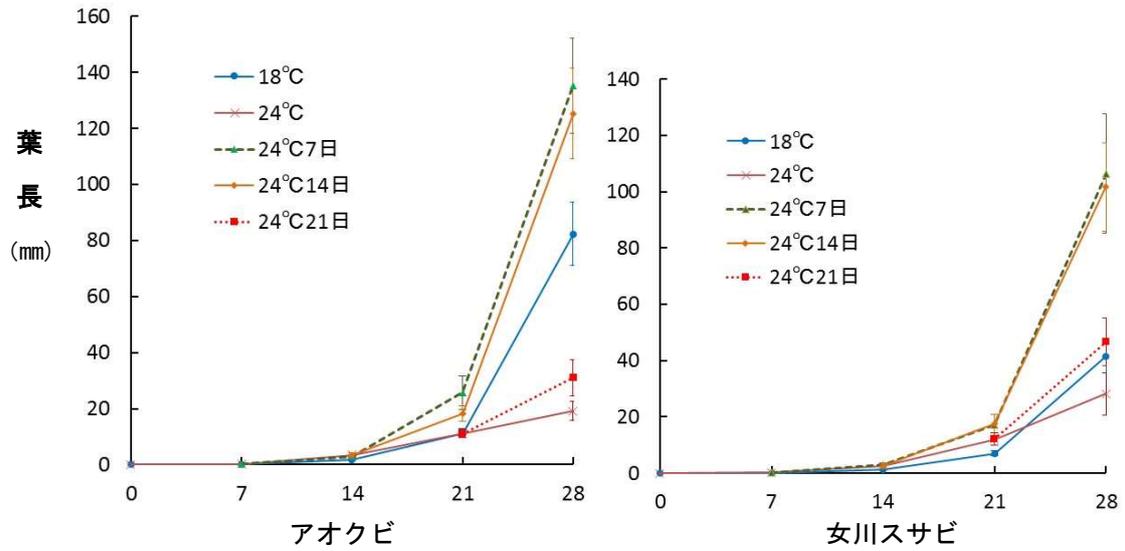


図4 培養7日後から21日後に24°Cから18°Cへ移した葉状体の葉長の変化

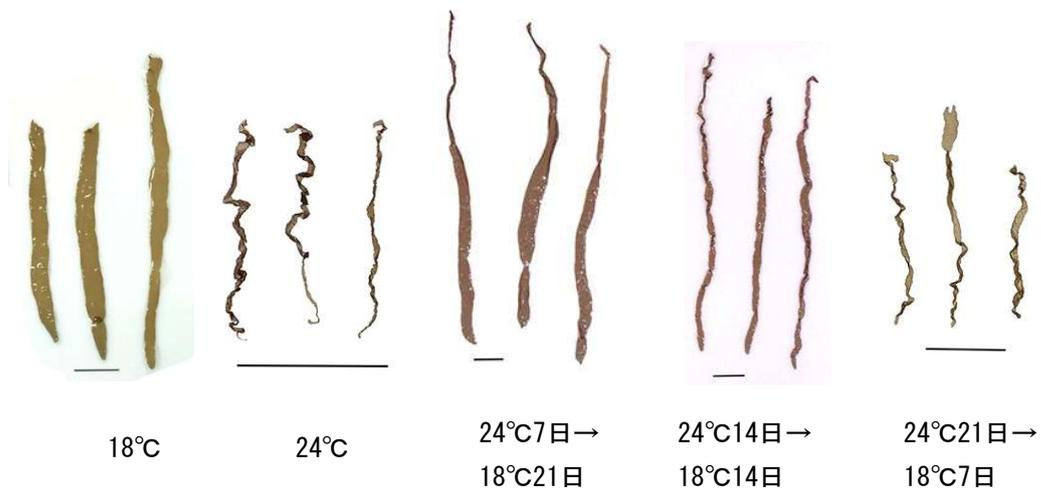


図5 培養7日後から21日後に、24°Cから18°Cへ移した葉状体 (28日後、アオクビ)

Bar: 1cm



図6 培養14日後の葉状体 Bar: 1mm

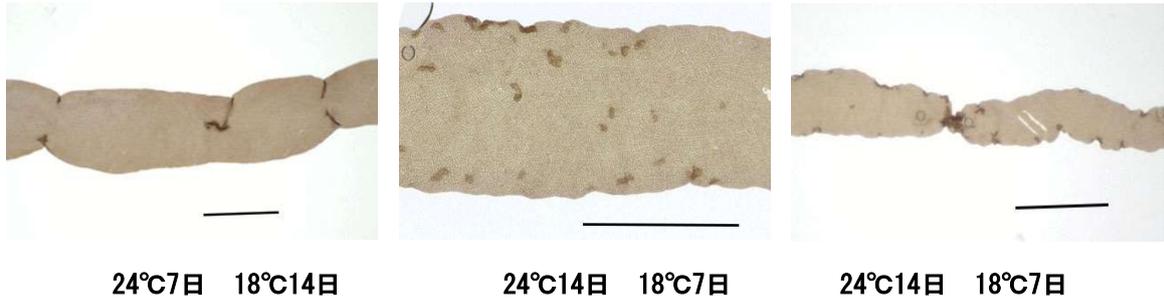


図7 24°Cから18°Cへ移した葉状体の組織の状態（21日後，アオクビ）
 ※ 多層化した部分（色の濃い部分）をかなり明瞭に識別可能. Bar: 1mm

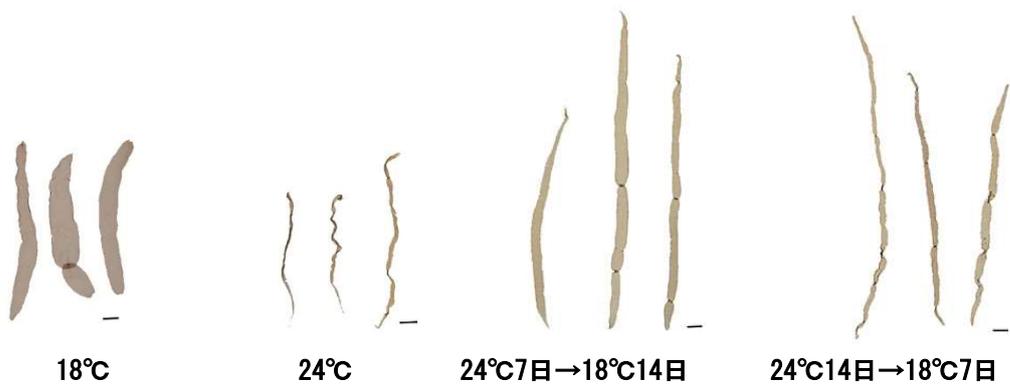


図8 24°Cから18°Cへ移した葉状体（21日後，アオクビ） Bar: 1mm

表1 24°Cから18°Cへ移した葉状体のくびれ数（21日後）

高水温期間	くびれ数（1個体あたり）					
	アオクビ			女川スサビ		
C (18°C)	0.75	±	0.79	0.25	±	0.44
24°C7日	2.65	±	1.50	1.55	±	1.57
24°C14日	4.90	±	1.59	3.70	±	1.56

3) 成果活用における留意点

アマノリ葉状体プロトプラスト分離用の酵素の販売が中止されたため、サザエの中腸腺を用いてアセトンパウダーを作成し実験で使用した。サザエの産地等により細胞壁の溶解能力が変動する可能性があるため注意が必要である。

4) 今後の課題

実験により葉状体の生長に違いがみられた。原因は培地中の細菌相の影響と推定される。共生細菌等の研究が進み安定した培養系が確立されることが望まれる。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	11140	研究期間	平成27～29年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	プロトプラストを用いた細胞融合等による効率的育種技術の開発		
小課題名	プロトプラスト選抜株への共生細菌添加等による高水温耐性ノリ育種素材の開発		
小課題責任者名・研究機関	藤吉栄次・国立研究開発法人 水産研究・教育機構 西海区水産研究所 資源生産部藻類・沿岸資源管理グループ		

1) 研究目的

近年の地球温暖化の進行により、ノリの生産に悪影響を与えている。特に漁期開始時の水温低下の遅れは、幼芽に異常を生じさせ、生産量や品質の低下を招く原因とされている。本課題においては、24℃で2週間を目標に、漁期初期の高水温条件下を乗り切れる育種素材を育成することを目指している。

2) 研究成果

(材料)

スサビノリ養殖品種アオクビ(元株)および課題11130「プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発」で、26℃または28℃の高水温条件で最も長く生残した区の再生体を用いた。選抜概要は以下の通りである。スサビノリ養殖品種アオクビの葉状体プロトプラストを低融点寒天培地に包埋後18℃で1日間培養したものを、高水温条件(26℃14日間、28℃2日間)に移して培養したのち、再び18℃に戻して培養した。18℃に戻して約1か月後に検鏡し、生残・再生した個体を取り出した。

(方法)

プロトプラストの分離、培養法等の概要は、原則として以下の通りに行った。フリー糸状体よりカキ殻糸状体を作り、増殖および成熟させ、殻胞子を放出させた。得られた殻胞子を18℃(適水温)で培養し、葉長約2cmまで生長した葉状体をプロトプラスト分離用に用いた。培養時の光条件は光量60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、日長10時間明期、14時間暗期で、培養液には栄養強化海水の1/2SWM-III改変培地を用いた。プロトプラストの分離は、葉状体を濾過海水で2回洗浄し、0.6Mマンニトールおよび20mM HEPESを添加した2%パバイン海水(pH 7.4)で15分間処理後、細胞壁の溶解を行った。細胞壁溶解用には、西海区水産研究所で製造した長崎県産サザエ中腸腺アセトンパウダーから、蒸留水に浸透圧調節物質として0.51M(3%)塩化ナトリウム、0.6Mマンニトールおよび50mM MESを添加した溶液で抽出した粗酵素液(2%アセトンパウダー)を用いた。粗酵素液には0.5%デキストラン硫酸ナトリウム、50 μM アンチパイン(プロテアーゼ阻害剤)、2%セルラーゼオノズカを添加した。粗酵素液(pH 6.0に調整)は、遠心分離後に上澄みを0.22 μm

ミリポアフィルターでろ過して使用した。プロトプラストの分離は約25°Cの条件で振とうしながら約1.5時間かけて行った。プロトプラストを含む粗酵素液を、40 µmメッシュおよび10µmメッシュで濾過し残渣を除去後、400×g、1500rpmでの遠心分離と0.6M マンニトール海水による洗浄を3回繰り返した。得られたプロトプラストは、計数後、1/2SWM-III改変培地ベースの低融点寒天培地（1%）に包埋したのち、18°Cで培養した。培地には抗菌剤ペニシリンGカリウム（0.1mg/ml）およびストレプトマイシン（0.2mg/ml）および共生細菌を添加した。共生細菌はLNM10-16株を用い、課題12110「共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討」と同様に調製した細菌液（約10⁸CFU/ml）を1/100量を添加した。高水温選抜は、プロトプラストを18°Cで1日間培養したのち、高水温条件で一定期間培養し、再び18°Cに戻して培養した。再生率は、18°Cに戻して約1か月後に検鏡し、シャーレ中の再生体数を実験開始時に分注したプロトプラスト数で除して算出した。

(1) 高水温耐性系統選抜法の改良

アオクビの殻胞子を18°Cで培養し、生長した葉状体を材料にプロトプラストを分離した。プロトプラストを、共生細菌液を添加した低融点寒天培地に包埋したのち18°Cで培養し、共生細菌液の添加がプロトプラストの再生に与える影響を調査した。

(2) 高水温耐性細胞の選抜

取り出した再生体を液体培地を用いて18°Cで通気培養し、再生体から発出生長した葉状体を成熟させ糸状体を形成させた。26°C区および28°C区由来の糸状体を、それぞれ26°C選抜株および28°C選抜株とした。

26°C選抜株および28°C選抜株の殻胞子を18°Cで培養し、生長した葉状体を材料にプロトプラストを分離した。分離したプロトプラストを18°Cで1日間培養し、高水温条件に移して培養した後18°Cに戻し、約1か月後に生残、再生した個体を調査した。培地には低融点寒天培地を用い、一部の培地には共生細菌を添加した。

(3) 高水温耐性候補系統の育成

育成手法の概要は図4に示した。2回目の高水温選抜（再選抜）で生き残った個体を寒天培地から取り出して液体培地で培養した。カルス状の生残個体が生長し直径が約1mm程度に達すると、通気培養に移して培養した。約1か月後、発出してきた単胞子由来の正常な形態の葉状体を選び培養し、その中から大型に生長した個体（高水温選抜個体）を選別した。高水温選抜個体は長日条件での培養により成熟させ、自家受精させた。

これらの他に、24°Cで葉状体を28日間培養、その後18°Cで培養し生長した葉状体から多層化していない正常部を切り出し、この小葉片を成熟、自家受精させて糸状体を得た。この糸状体をもとに上記の一連の操作をもう1回行った（葉状体選抜株）。葉状体選抜株についても、同株の葉状体プロトプラストを材料に、共生細菌を添加した状態で高水温選抜（30°C）を行い、最長生残区由来の正常な形態の葉状体を選び培養し、その中から大型に生長した個体（高水温選抜個体）を選別し、自家受精させた。

(4) 高水温耐性候補系統の高水温耐性調査

高水温耐性候補系統（図4）を材料に用いた。これらとアオクビの殻胞子を24°Cの高水温で14日間、続いて18°C（適水温）で7日間、計21日間枝付きフラスコを用いて通気培養し、生長した葉状体にみられる高水温障害により生じた組織の多層化によるくびれ数の増加を調べ、適水温の18°Cで21日間培養した葉状体と比較した。実験は2回行い、測定は生長の良好な大型の個体について行った。光条件は光量60µmol m⁻² s⁻¹、日長10時間明期、14時間暗期とし、培養液には栄養強化海水の1/2SWM-III改変培地を用いた。

(結果)

(1) 高水温耐性系統選抜法の改良

プロトプラストを培養する培地に共生細菌液を添加し、プロトプラストの再生率に与える影響を調査した。結果は、3回の実験とも共生細菌液を添加した場合に無添加の場合より高い再生率が得られた(図1)。このことから、共生細菌液の培地への添加は再生率の向上につながり、効率的な選抜育種に有効な手法であると考えられた。そのため、再選抜では共生細菌を培地に添加した。

(2) 高水温耐性細胞の選抜

プロトプラストを低融点寒天培地に入れ、26°Cで14日間または28°Cで2日間の高水温処理後に再生した個体を材料に用いた。再生体の形態はカルス状であり、寒天培地中では1か月以上培養してもカルス状のままであった。再生体を液体培地に移し18°Cで通気培養すると、単孢子由来と推定される小さな葉状体の発出が観察された。培養を続けるとこの葉状体は生長し、縁辺部に成熟が見られたので、果胞子の発芽により生じた再生体由来の糸状体を分離した。26°Cおよび28°C区再生体由来の糸状体を、それぞれ26°C選抜株および28°C選抜株とした。

28°Cで2日間の高水温処理後に再生した個体の培養例は下記のとおりである。再生体は18°Cで培養を続けても低融点寒天培地中では3か月後もカルス状であった(図2A)。これを液体培地で通気培養すると、14日後には小葉状体(図2B矢印)が確認され、それらは28日後には大きいもので葉長約1cmまで生長した(図2C)。大型の葉状体を切り取り個別に通気培養を続けるとさらに生長し、57日後には葉長約6cmまで生長し、縁辺部を中心に成熟が見られた(図2E)。顕微鏡で観察すると、果胞子が発芽し糸状体が生じていた(図2D)。

共生細菌を添加し、アオクビ(元株)、26°C選抜株、28°C選抜株の葉状体プロトプラストを26°Cおよび28°Cの高水温で最大14日間培養した結果を図3に示した。26°Cでは、26°C選抜株と28°C選抜株においてアオクビより高い再生率が観察された。28°Cでは3株とも10日間まで再生がみられ、その再生率は26°Cの場合と同様にアオクビより両選抜株のほうが高く、高水温選抜の影響と考えられた。両選抜株については、26°Cでは14日後でも再生率の低下が小さく、再選抜には低すぎる温度設定と判断された。また、アオクビは、課題11130「プロトプラスト選抜技術の安定化と高水温負荷による選抜技術の開発」で行った共生細菌無添加の場合より、26°Cおよび28°Cでの再生率が向上した。

上記の実験結果では、26°Cは選抜には低すぎると判断され、28°Cでも10日間まで生残、再生が観察された。そこでさらに過酷な条件での選抜を目指し、両選抜株のプロトプラストを大量に分離し、28°Cと30°Cで再選抜を試みた(共生細菌添加)。その結果、両選抜株とも28°Cの条件で最大21日間まで、30°Cの条件で最大3日間まで若干の生残、再生が確認された(再生率未調査)。最も長く再生がみられた28°C21日間、30°C3日間区の再生体を取り出した。

(3) 高水温耐性候補系統の育成

再選抜で生き残った再生体由来の葉状体から、できる限り正常な形態の大型の葉状体を選抜し高水温選抜個体とした(図5 A1~B2)。葉状体選抜株由来の個体については、30°Cの条件で最大5日間まで若干の生残、再生が確認された(再生率未調査)。そこで、30°C5日間区の再生体を取り出して通気培養したが、再生体由来の葉状体に細葉型の個体を確認できなかったため、大型の広葉型個体を選抜個体とした(図5C)。これらを長日条件で培養し成熟させ、自家受精により生じた果胞子が発芽した糸状体(高水温耐性候補系統、図4)を分離した。26°C選抜株をもとに葉状体プロトプラストを再選抜した候補系統は、28°Cで21日間再選抜したA1株と30°Cで3日再選抜したA2株で、28°C選抜株をもとに再選抜したものは、28°Cで21日間再選抜したB1株と30°Cで3

日再選抜したB2株で、葉状体選抜株をもとに再選抜したものはC株である（図4）。これらは、高水温条件で最も長期間生存した区の生残個体を由来とする株である。

（4）高水温耐性候補系統の高水温耐性調査

実験は各系統2回行い、結果は図6に示した。高水温耐性候補系統5株（A1, A2, B1, B2, C）およびアオクビ（元株）の葉状体を、殻胞子から適水温の18℃で21日間培養した結果、葉状体に異常は観察されず比較的順調に生長し（図7）、葉長は実験ごとに差が見られたが、候補系統で平均5.8mm以上、アオクビで平均6.1mm以上であった。くびれは候補系統およびアオクビともに少なく、1個体あたりのくびれ数は実験毎の平均でいずれも0~0.5と小さな値であった

24℃の高水温で14日間、続いて18℃で7日間、計21日間培養した結果、高水温耐性候補系統およびアオクビの多くの個体に多層化部やくびれが観察された（図7）。葉長は18℃区より大きく、実験毎の平均葉長は候補系統で15.6~35.3mm、アオクビで7.4~25.5mmであり、また各候補系統の平均葉長は実験毎にみるとアオクビと同程度またはアオクビより大きかった。1個体あたりのくびれ数は、候補系統の内B2株を除きアオクビより少なかった（図6）。B2株については、アオクビよりくびれ数が多い場合があり（図6B2）、くびれ数の点では選抜効果がみられなかった。B2は葉長が平均33.4mmと大きく（図7B2）、高水温条件で障害を受けながらも生長の速い系統が選抜された可能性も考えられる。

くびれ数がアオクビより少なかった4株については、高水温による障害がアオクビより小さく選抜による高水温耐性の向上が示唆された。相対くびれ数（候補株のくびれ数／アオクビのくびれ数）を調べると、A1、A2、B1、C株でそれぞれ、0.62、0.44、0.52、0.51となった。この結果からA2、B1、C株では、相対くびれ数がアオクビの約半数と小さく、かなりの高水温耐性が期待できるため、これらの特性調査を進めていくとともに、高水温耐性育種素材として活用を検討していきたい。

3）成果活用における留意点

今回の結果は室内培養によるものなので、実際の海面養殖では異なる部分が生じる可能性も考えられる。

4）今後の課題

本課題では高水温障害で生じる大きな問題点である多層化に着目し、高水温条件でのプロトプラスト選抜によりその改善を図った。高水温障害としては、多層化の他に付着能力（引きの強さ）の低下が知られており、この点も改善を図っていく必要がある。

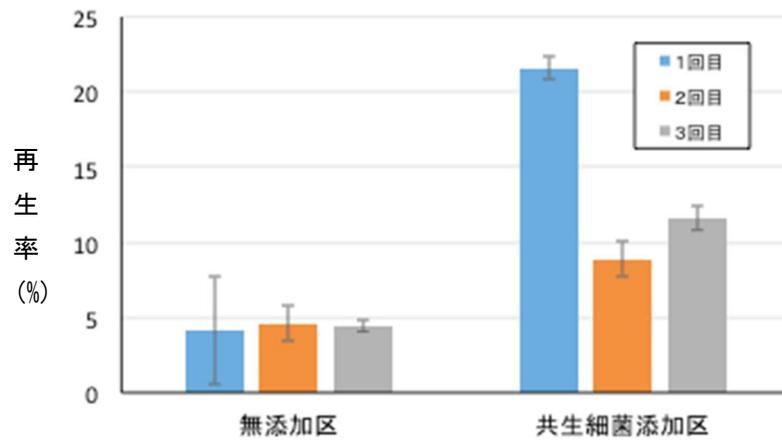


図1 共生細菌の添加がプロトプラストの再生率におよぼす影響

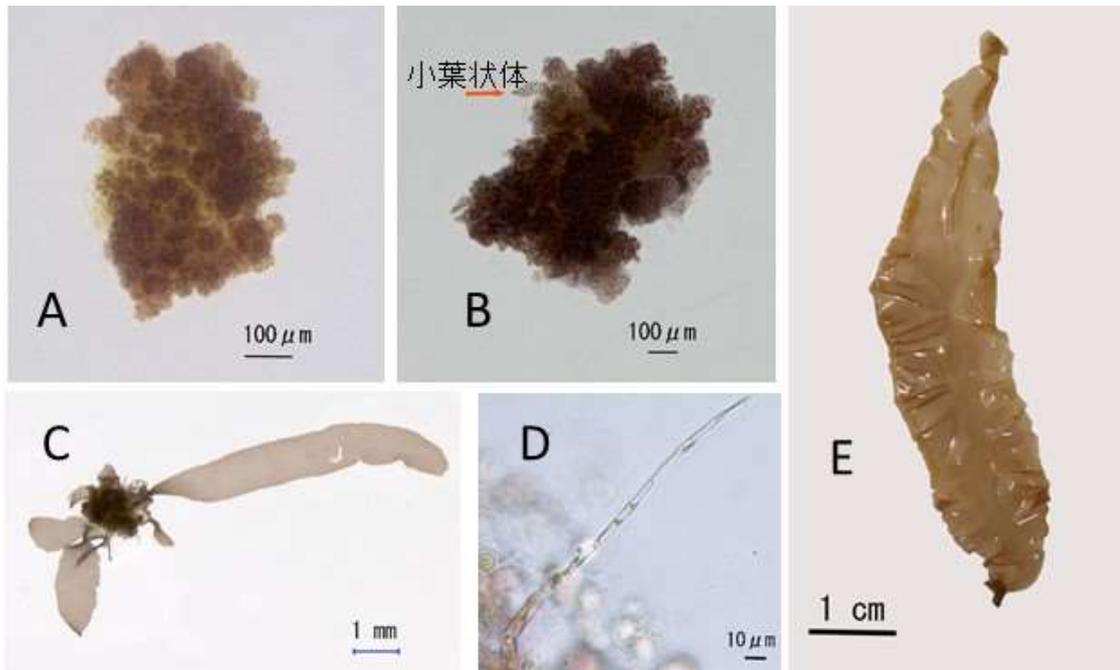


図2 液体培地での通気培養に移した高水温処理プロトプラストの再生体の変化

A 低融点寒天培地から取り出した再生体, B 14日後 (小葉状体を確認), C 28日後,
D 57日後 (葉状体Eの縁辺に生じた糸状体), E 57日後 (再生体由来の葉状体)

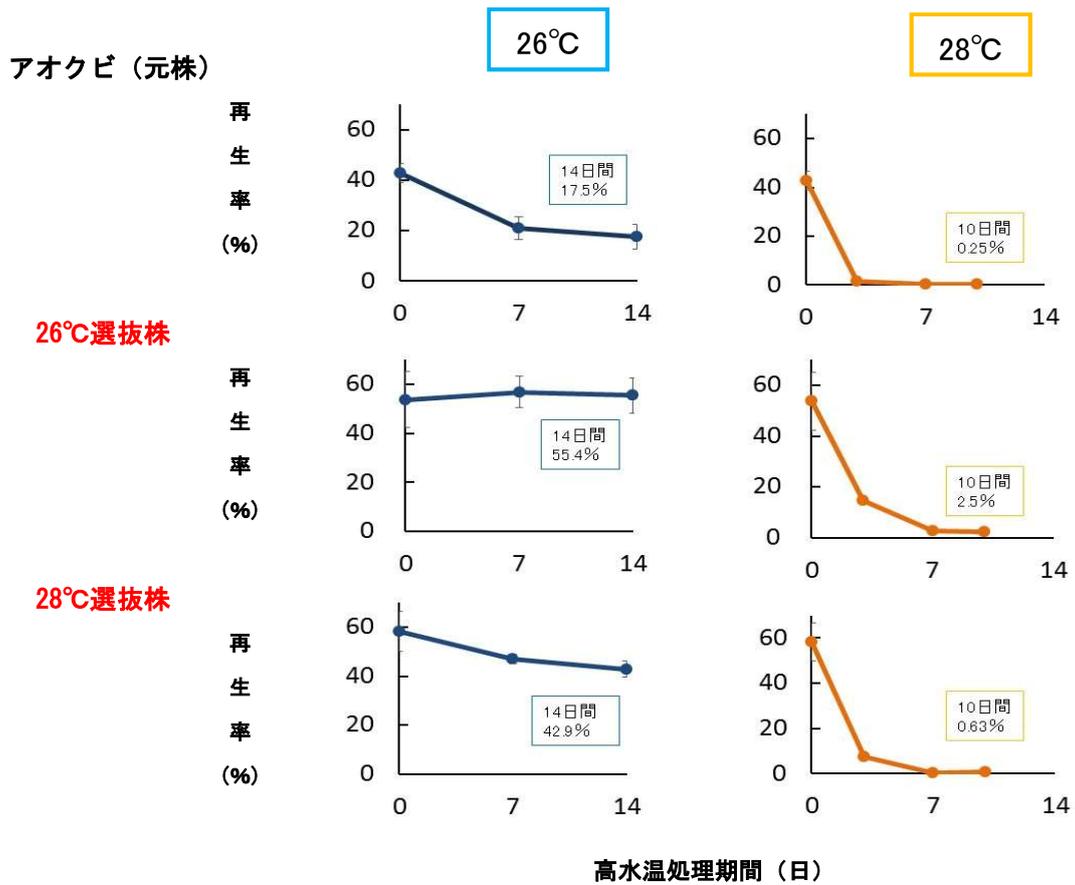


図3 選抜株葉状体プロトプラストの高水温処理による再生率の変化 (共生細菌添加)

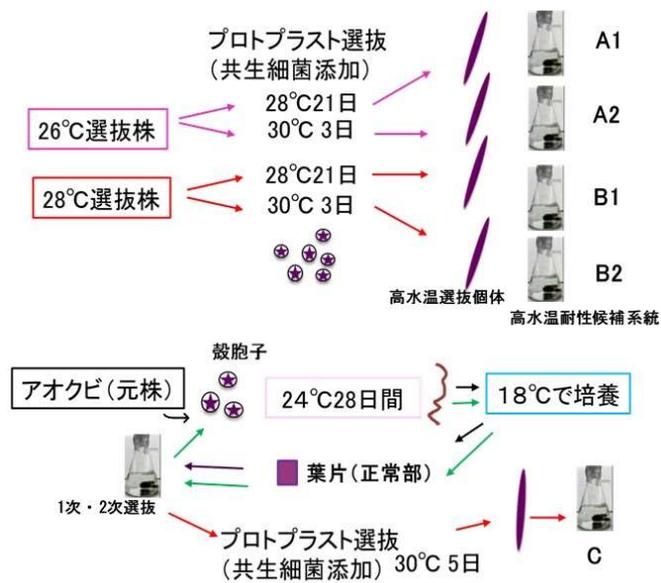


図4. 高水温選抜個体および高水温耐性候補株の育成手法

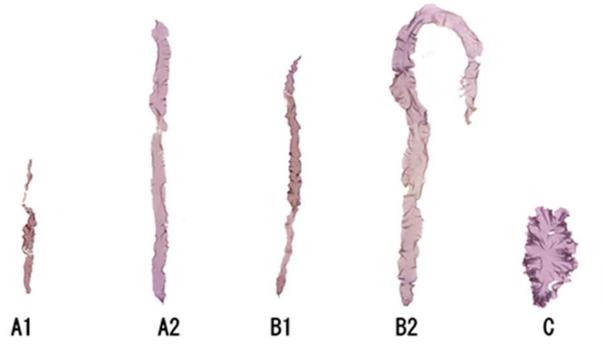


図 5. 高水温選抜個体 (標本)
A1~Cは図1参照. Bar:5cm. 標本のため時間経過により退色している.

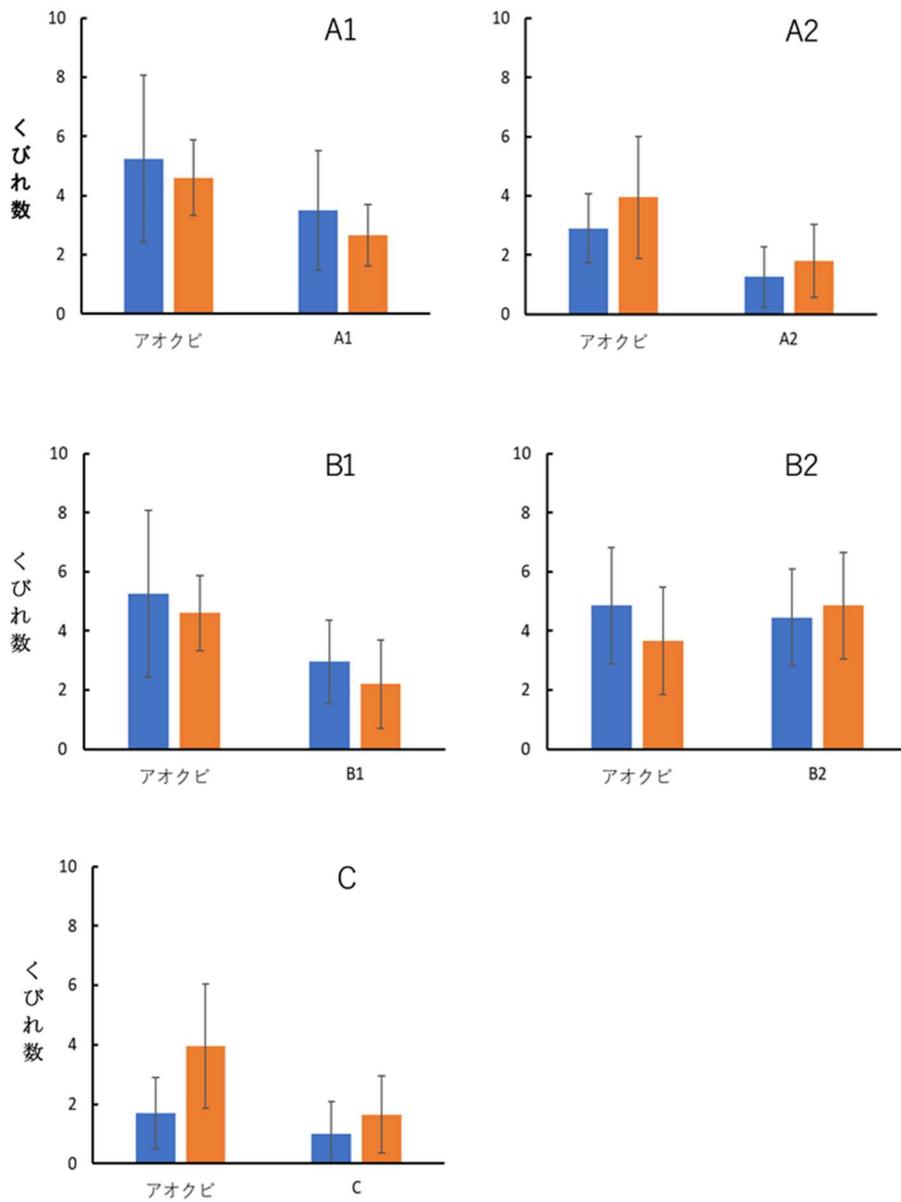
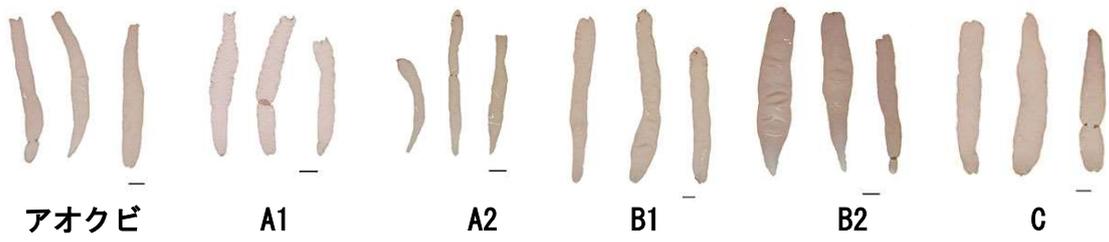


図 6 高水温区におけるアオクビ (元株) および候補株における 1 個体あたりのくびれ数
実験は2回実施, 同一回が同一色. バーは標準偏差.

18°C区 (21日)



高水温区 (24°C14日→18°C7日)

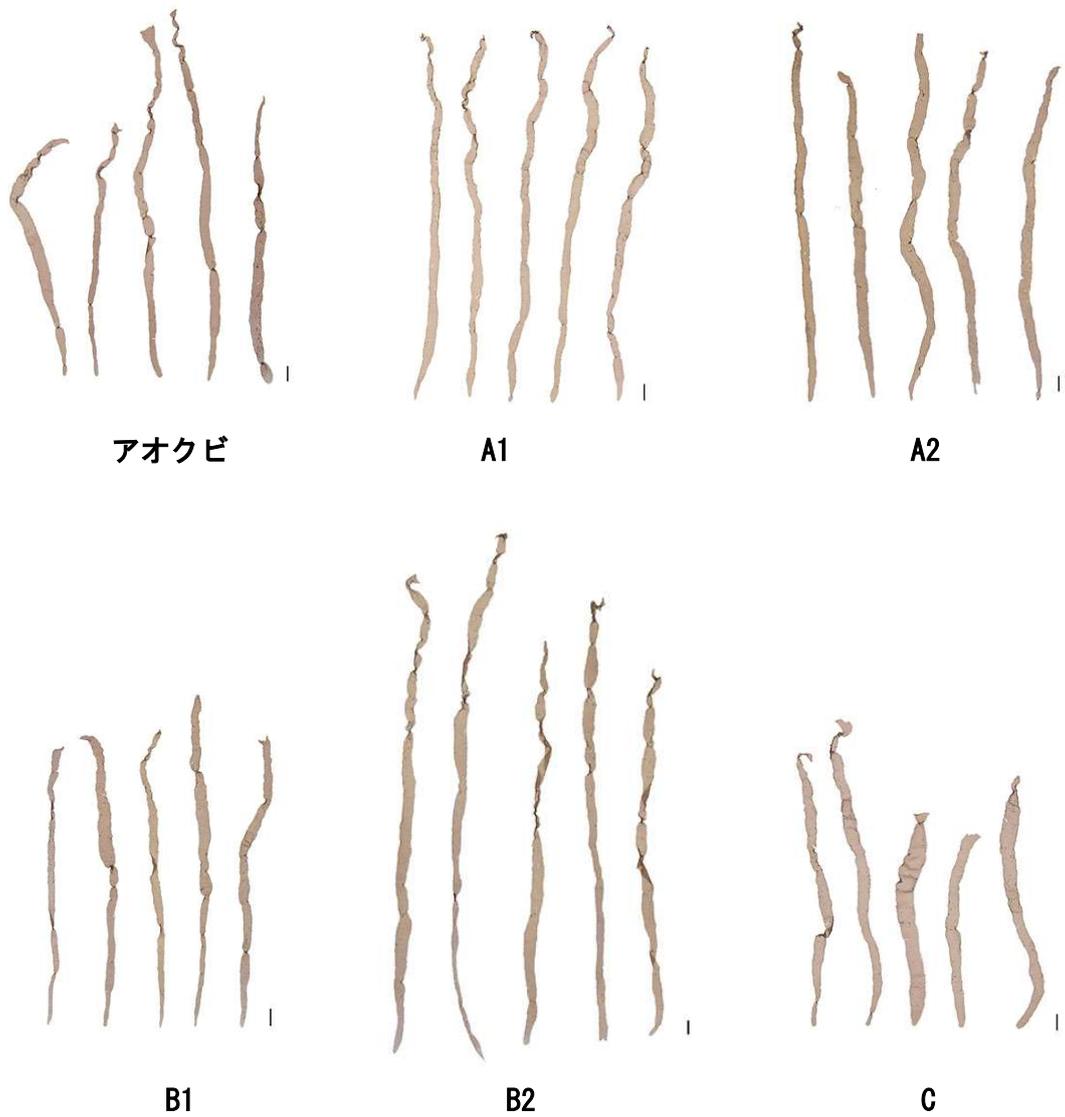


図7 21日間培養した葉状体
Bar : 1mm

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	12110	研究期間	平成25～27年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	共生細菌添加による効率的な生産技術の開発		
小課題名	共生細菌の添加による安定的な育種方法の検討		
小課題責任者名・研究機関	福井洋平・水産研究・教育機構 中央水産研究所 水産物応用開発研究センター 衛生管理グループ		

1) 研究目的

これまでに、大型藻類を無菌状態で培養するとその形態形成や生長が阻害され、特定の細菌が藻類の形態形成や生長に関与することが報告されてきた。ノリの室内培養試験においても、ノリに付随する細菌の有無がノリの形質発現の変化に影響を与えることから、共生細菌の存在が示唆されてきた。しかし、これまでの研究では細菌無添加区との比較や定量的な解析は十分に行われなかった。本課題の研究者らは、ノリ室内培養系における細菌叢解析を行い、多くの細菌株を分離・同定してきた。そして、これらのノリに付随する細菌株をスサビノリ・無菌プロトプラストに添加することで、ノリ・プロトプラストの生残や形態形成を有意に高める細菌を特定することに成功した。本課題では、小課題11120及び11140の細胞融合及びプロトプラスト選抜による高水温耐性等の優良形質の導入を効率的かつ安定的に行うため、共生細菌を利用したノリの育種技術を開発することを目的とする。

2) 研究成果

1) 共生細菌の種類と効果的な添加条件の検討

スサビノリ・プロトプラストの正常再生能の高かった共生細菌3株の種類を遺伝学的特性試験および表現形質により調べた。その結果、これらの3菌株は α -プロテオバクテリアの *Hyphomonas* 属の細菌種であることを明らかにした。また、これらの3菌株の温度増殖特性を17℃、24℃、30℃で調べたところ、3菌株は17℃よりも24℃もしくは30℃のときに増殖が速かったことから、共生細菌はノリの高水温耐性株を開発するときの水温（24℃）に適していることが示された。

次に、共生細菌のスサビノリ・プロトプラストへの効果的な添加濃度と添加時期を検討した。共生細菌の菌液を3段階に希釈・調製し、プロトプラストに添加し、その正常再生率および生残率を比較した。その結果、最も高い菌液濃度を添加したときのプロトプラストの正常再生率および生残率は最も高く、添加した菌液濃度が低くなるにつれ、それらの値は低くなる傾向を示した。次に、共生細菌をプロトプラスト分離直後、24時間～7日後に添加した結果、プロトプラストの正常再生率および生残率は分離直後の添加で最も高く、添

加時期を遅らせると、それらの値は低くなる傾向を示した。以上の結果から、共生細菌の高濃度の菌液をプロトプラストの分離直後に添加する条件が最適であることを明らかにした。

2) 共生細菌を用いたスサビノリの育種技術の開発

ノリの正常再生能の高かった共生細菌をスサビノリ・プロトプラストに添加して、プロトプラストが葉体まで正常に再生・生長するかを調べた。共生細菌3菌株をそれぞれプロトプラストに添加した後、寒天培地で包埋し培養後、液体培地で通気培養を行った。細菌無添加区ではスサビノリ・プロトプラストの生残細胞が観察されなかったのに対して、細菌添加区では葉状体形成細胞が観察された。培養終了時に、スサビノリ再生葉体の葉長を添加した菌株間で比較したところ、特定の一菌株を添加したときのノリの葉長は、他の2菌株を添加したときの葉長に比べて大きく、その葉体は線形の正常な形態を示した。これらの結果から、スサビノリの育種を効率的かつ安定的なものにするためには、特定の菌株の添加が有効であると考えられた。

3) 共生細菌を用いたアマノリ類・他種の育種技術の開発

共生細菌を利用したスサビノリの育種技術をアマノリ類の他種に応用し、共生細菌3株が、スサビノリ以外のアマノリ類の他種に対しても正常な再生及び生長を促進するかを調べた。スサビノリと同様、アマノリ類・他種においても、細菌無添加区ではプロトプラストの生残細胞は観察されなかったが、共生細菌添加区では葉状体形成細胞が認められ、その後、葉体に生長した。培養終了時に、再生葉体の葉長を比較したところ、特定の一菌株を添加した試験区のノリの葉長は、他の2菌株添加区の葉長に比べて、大きい結果が示された。この生長促進能の高かった菌株は上記のスサビノリに対して高かった菌株と同一であった。これらの結果から、本菌株のスサビノリや他種に対する生長促進能は、他の2菌株よりも高いことが示され、ノリ養殖品種の効率的かつ安定的な育種技術に利用可能であることを明らかにした。

3) 成果活用における留意点

ノリ共生細菌の種類と効果的な添加条件を見出し、室内培養試験により、ノリ共生細菌の複数株の中から、ノリ・プロトプラストから葉体への再生及び、安定的な生長を可能にする菌株を特定することができた。共生細菌のノリへの添加は、室内で評価する細胞融合やプロトプラスト選抜において、ノリの正常再生率や生残率を上昇させるという点で有効であり、高水温等の優良形質をもつノリの効率的な選抜育種につながる。

4) 今後の課題

室内培養試験において、共生細菌がノリ・プロトプラストの再生及び生長に対して好影響を及ぼすことを明らかにした。このことから、ノリ養殖環境下においてもノリの発育は現場に生息する細菌群の影響を受けている可能性がある。今後、共生細菌が、実際の養殖環境下のノリに対してどのような効果を示すかを調べる必要がある。

委託プロジェクト研究課題番号(e-Radシステム課題 ID8 桁)	A8:13405684 ノリ: 13404790	研究期間	平成25～29年度
小課題番号(桁数は任意)	12120	研究期間	平成25～29年度
契約課題名	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発		
中課題名	共生細菌添加による効率的な生産技術の開発		
小課題名	細菌産生物質の探索と細菌添加による遺伝子発現の比較解析による効率的育種技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	尾島信彦(～2017.3)・国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所 水産生命情報研究センター 分子機能グループ 福井洋平(2017.4～)・同 中央水産研究所 水産物応用開発研究センター 衛生管理グループ		

1) 研究目的

ノリにおいては共生細菌の存在が以前から示唆されており、ノリの培養実験時に形質発現が安定しない点に関しても、ノリと細菌の共生関係の有無などで異なるとの指摘がなされてきた。また、陸上植物では高温等の環境ストレス耐性の向上に共生細菌が寄与することが報告されているが、藻類では高温ストレス等に対する耐性に共生細菌が及ぼす影響は未解明のままである。本小課題担当者らはこれまで共生細菌の候補株を単離・同定することに成功し、無菌プロトプラストへの共生細菌添加の効果に関する研究をノリの形質評価の観点から進めてきた。その一方で、ノリと共生細菌との相互作用に関する分子機構については未だ明らかとなっていない。そこで、本小課題では共生細菌のノリへの作用機構を明らかにするため、細菌が産生する物質を探索し、より効率的な育種技術への改良を目指す。また、細菌の添加がノリに及ぼす影響を遺伝子発現変化の観点から網羅的に解析し、高温耐性をもつノリの育種技術への応用を図る。

2) 研究成果

1) ノリと共生細菌の発現遺伝子カタログ作成

オリゴキャップ法を用いたcDNA合成およびcDNAライブラリーの均一化処理により、スサビノリに由来する均一化完全長cDNAライブラリーの作製に成功した。ノリ由来cDNA断片の塩基配列を次世代DNAシーケンサーにより決定してアセンブルし、コンティグ(遺伝子に相当)を構築した。得られたコンティグ配列をblastx検索した結果、約47%のコンティグに既知遺伝子との相同性が認められ、約53%は未知遺伝子であることが推定された。さらに既知遺伝子との相同性が認められたコンティグのうち、約69%にはGOアノテーションが付与され、各遺伝子の機能等を予測することが可能となった。以上の結果、ノリで発現している遺伝子を網羅的にカタログ化することに成功し、ノリの遺伝子発現変化を網羅的に調べるためのリファレンスとなるデータを整備することができた。

2) ノリの有用形質に関与する遺伝子の同定

高水温によるノリ遺伝子の発現変化を網羅的に解析するために、対照区（17℃）と高水温曝露区（27℃、24時間）のノリ葉状体からそれぞれ全RNAを調製して次世代DNAシーケンス解析を行った。RNA-Seq解析により対照区と高水温曝露区の2群間において発現が変動する遺伝子を抽出した結果、高水温曝露後に13種類の遺伝子の発現量が有意に増加していることが明らかとなった。これら遺伝子の中には分子シャペロン機能をもつ熱ショックタンパク質（HSP）ファミリー遺伝子等が含まれており、ノリの高水温耐性に関与する遺伝子群であることが示唆された。一方、13種類のうち9種類の遺伝子が世界的にも報告例のない新規遺伝子であり、ノリには未だ機能未知遺伝子が多く存在することが示唆された。

3) 共生細菌が産生する物質の探索

共生細菌3株（ノリ・プロトプラストの正常再生能の高いA株及びB株、正常再生能の低いC株）から調製したゲノムDNA断片を次世代シーケンサーで解析してアSEMBルし、これらのドラフトゲノム配列を取得した。次に、共生細菌の産生物質を探索するため、ノリ・プロトプラストの正常再生能が異なる細菌株をプロトプラストに添加して遺伝子発現を網羅的に比較解析した。ノリ・プロトプラストに共生細菌2株（正常再生能の高いA株と低いC株）をそれぞれ添加し、最適条件下で添加、17℃で1週間、共培養した。両添加区におけるノリと細菌を分離して全RNAを抽出した後、mRNAを選択的に増幅、及びcDNAを合成し、次世代シーケンス解析に供した。得られたcDNA断片配列データを用いてRNA-Seq解析を行ったところ、正常再生能の高いA株の添加区において、発現量が2倍を超えて増減したノリと細菌の遺伝子を共生関連候補遺伝子として抽出した。次に、RNA-Seq解析によって得られたデータの信頼性を検証するため、抽出したノリ及び細菌のうち発現量変動の大きい上位10遺伝子について、リアルタイムPCR法で発現量を比較した。その結果、ノリ及び細菌の多くの遺伝子について、RNA-Seqから得られた発現量変動とほぼ同じ傾向がみられた。正常再生能の高い共生細菌を添加することで、ノリの光合成や構造などに関与する遺伝子の発現が増加し、ノリの正常再生に寄与している可能性が推察された。また、共生細菌はノリと共培養することで、細胞内部の代謝等に関与する遺伝子の発現が促進されることを明らかにした。

3) 成果活用における留意点

本研究において、共生細菌のノリへの作用機構は、ノリ・プロトプラストの初期過程における遺伝子発現の変化を調べているため、共生細菌が通常の形態であるノリ葉状体に及ぼす作用については新たに検討する必要がある。

4) 今後の課題

本研究では、ノリの適水温下でのノリ・プロトプラストと共生細菌の相互作用を明らかにしたが、今後、共生細菌の添加がノリの高水温耐性に及ぼす影響を高水温の条件下で検討する必要がある。網羅的遺伝子発現解析によってノリ及び共生細菌における共生関連候補遺伝子や、ノリ高温耐性関連遺伝子の抽出に成功したが、ノリの研究例は世界的にも少なく、機能未知遺伝子が多数あることが課題となっている。

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及する成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13404790	0	0	8	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2

(1)学術論文

該当無し

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	スサビノリ形態形成促進菌のノリへの効果的な添加条件の検討	福井洋平	(研)水産研究・教育機構 中央水産研究所	日本水産学会	2015	3
2	スサビノリ正常再生促進菌の株間でのノリ生長比較	福井洋平	(研)水産研究・教育機構 中央水産研究所	日本水産学会	2017	3
3	スサビノリおよびタネガンマアマノリの生長と光合成活性に及ぼす温度の影響	阿部真比古	(研)水産研究・教育機構 水産大学校	日本藻類学会	2017	3
4	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発	加藤雅也	(研)水産研究・教育機構 水産大学校	気候変動対策プロジェクト成果発表会	2018	2
5	温暖化の進行に適応するノリの育種技術の開発	丹羽健太郎	(研)水産研究・教育機構 水産大学校	気候変動対策プロジェクト成果発表会	2018	2
6	アマノリ類の細胞融合ガイドライン	阿部真比古	(研)水産研究・教育機構 水産大学校	気候変動対策プロジェクト成果発表会	2018	2
7	プロトプラスト選抜によるスサビノリ葉状体の高水温耐性の向上	藤吉栄次・玉城泉也	(研)水産研究・教育機構 西海区水産研究所	気候変動対策プロジェクト成果発表会	2018	2
8	ノリ共生細菌の添加によるノリの安定的な育種技術の開発	福井洋平	(研)水産研究・教育機構 中央水産研究所	気候変動対策プロジェクト成果発表会	2018	2

(3) 出版図書

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	④	ノリの高水温耐性品種を開発	加藤雅也	(研)水産研究・教育機構 中央水産研究所	(研)水産研究・教育機構	2017	12
2	③	里海の保全, 活用による地域振興	阿部真比古 他	(研)水産研究・教育機構 水産大学校生物生産学科・食品科学科、山口県、山口大学農学部・工学部、山口県産業技術センター、新光産業(株)、(研)水産研究・教育機構 中央水産研究所 西海区水産研究所	(研)水産研究・教育機構	2018	1

(4) 国内特許権等

該当無し

(5) 国際特許権等

該当無し

(6) 報道等

該当無し

(7) 普及に移しうる成果

該当無し

(8) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
		年	月	日				
1	研究成果発表会「地球温暖化による「海」と「さかな」の変化」	2014	12	4	東京国際フォーラム		(研)水産研究・教育機構	
2	研究成果発表会「地球温暖化時代の日本の農業・水産業」	2018	2	14	一橋大学一橋講堂		農水省農林水産技術会議事務局、(研)農業・食品産業技術総合研究機構、(研)水産研究・教育機構	

(9)アウトリーチ活動の状況

当事業の研究課題におけるアウトリーチ活動の内容は以下のとおり。

区分； ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、 ②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、
③その他(子供向け出前授業等)

整理 番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者 数	主な参加者	機関名	備考
			年	月	日					
1	①	研究成果発表会「地球温暖化による「海」と「さかな」の変化」	2014	12	4	東京国際フォーラム		会社員、主婦、学生、行政等	(研)水産研究・教育機構	
2	①	研究成果発表会「地球温暖化時代の日本の農業・水産業」	2018	2	14	一橋大学一橋講堂		会社員、主婦、学生、行政等	(研)水産研究・教育機構	