

## 海産紅藻スサビノリ（紅色植物門，ウシケノリ目）

### 変異体の作出とそれらの特徴および凍結保存

#### 学位論文内容の要旨

海産の大型紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、水産業において重要な種であり、生物学的にも、“海洋のモデル生物”として注目され始めている。モデル生物の条件として、様々な基盤技術の整備が必要であるが、その中でも、突然変異体の作出は、遺伝解析を行う上で重要な作業である。これまで、スサビノリの変異体に関しては、色彩に関連するものが多く報告されているが、それらの成長や成熟などを包括的に研究した記録はほとんどないのが現状である。また、スサビノリの凍結保存および解凍技術は確立されているが、この技術を人為的に作出した変異体に適用した例は知られていない。そこで本研究では、海産紅藻スサビノリの遺伝・育種学的研究の一環として、異なる培養条件による野生株の成長を比較し、次に変異体の作出条件の検討を行い、得られた変異体の特徴や成長を記録し、さらに、それら変異体の凍結保存・解凍を行い、成長の傾向が変わらないことを確認した。

第2章においては、変異体選抜の為の基礎的データを得ることを目的とし、培養に用いる培地や容器が、野生株 (TU-1 株) の単孢子発芽体の成長、成熟および光合成色素含有量 (Chl. a: クロロフィル a, PE: フィコエリスリン, PC: フィコシアニン, Car: カロテノイド) にどのような影響を及ぼすかについて検討した。栄養強化型培地の場合、市販の人工海水 (シーライフ) に添加する栄養源 (ESS<sub>2</sub> 原液) の量を 3/2 にして培養すると、通常の培養と比べて葉長の成長は同様であったが、成熟開始が遅く、PE および PC 量が多くなることが確認された。同様に ESS<sub>2</sub> 原液の量を 1/2 にして培養すると、葉長の成長は同様であったが、葉幅が広がった。また、PE 量は多くなり、逆に PC 量は少なくなった。さらに、成熟開始は遅かったが、成熟後の藻体の崩壊は速かった。人工合成培地 (ASS<sub>3</sub>) を用いた培養では、藻体がほとんど成長しなかった。また、ポリオレフィン製の培養容器とガラス製の培養容器を用いて培養すると、培養する光量が同様であっても、ガラス製容器の培養においては、藻体が細長くなり、成熟後の藻体の崩壊が速いことが確認された。

第3章では、スサビノリ単孢子発芽体における効率的な変異体作成条件を設定するため、化学変異剤処理後の生存率の計測、変異体の作成およびそれら条件について検討した。コルヒチン処理においては、変異体は確認されなかった。EMS (エチルメタンサルホネート) 処理においては、処理濃度 0.05%~0.5%において、1, 2 および 3 時間処理にて、全ての藻体が生存していたが、処理濃度 1%, 3 時間処理において、全ての藻体が死滅し、同様に、濃度 2%, 2 時間、濃度 3%, 1 時間処理にて全ての藻体が死滅する極端な結果であった。また、色彩や形が異なる細胞が観察されたが、変異体の分離までは至らなかった。MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 処理においては、10 ppm~250 ppm の幅広い処理濃度において、全ての処理時間 (1, 2 および 3 時間) で藻体の生存が確認された。また、全ての処理条件で、色彩が変化した細胞や、藻体のよれが確認された。処理濃度を 25 ppm とし、処理時間 (1~3 時間) における、処理後の藻体の成長を比較すると、処理 1 ヶ月後において、処理時間 1

時間のみ再び葉長の伸長が確認された。さらに、処理濃度 25 ppm, 処理時間 1 時間において、処理 8 週間後の変異体の割合を計測すると、多くの個体 (89%) によれや色彩の変化が見られた。

第 4 章においては、第 3 章で決定した MNNG 処理条件 (25 ppm, 1 時間) により、変異体の作出、分離を行った。また、それら変異体の成長、成熟および光合成色素含有量を比較した。TU-1 株より MRR 株, MG 株, MBG 株, M-01 株, M-02 株, M-03 株, M-04 株および M-05 株を分離した。また、MBG 株に再度変異処理を行い、MM-01 株を得た。さらに、韓国 Geoje 株 (KGJ 株) を用いて、同様の変異処理を行い、KGJ-M-01 株を分離した。MRR 株は、TU-1 株と比べ赤色を呈した。また、藻体中の細胞の形が不均一となり、そのため藻体全体が歪となった。この形質は単胞子を介した次世代でも確認された。MG 株は、TU-1 株と比べ深緑色と呈した。また、PE 量は低かった。MBG 株は、TU-1 株と比べ鮮緑色を呈した。また、PE 量は顕著に低く、成長は遅い傾向であった。M-01 株は、TU-1 株と比べ、同様な色彩を呈した。また、全ての光合成色素含有量が多く、成長が速かった。M-02 株は、TU-1 株と比べ橙色を呈した。また、培養期間中に単胞子放出が確認されなかったが、藻体の細胞が単胞子様化し、母藻より直接発芽していることが確認された。M-03 株は、TU-1 株と比べて淡い赤色を呈した。また、PE 量は顕著に多く、藻体が細長くなる傾向を示した。M-04 株は、TU-1 株に比べて深赤色を呈した。また、藻体の面積が広がる傾向が確認された。M-05 株は、TU-1 株と比べ淡赤色を呈した。また、藻体中における細胞の形が不均一であり異なる色彩の細胞を含むことが確認された。この形質は単胞子を介した次世代でも確認された。MM-01 株は、MBG 株と比べ茶色を呈した。また、藻体中における細胞の形が不均一であり異なる色彩の細胞を含むことが確認された。この形質は単胞子を介した次世代でも確認された。KGJ-M-01 株は、赤色を呈した。また、藻体中における細胞の形が不均一であり異なる色彩の細胞を含むことが確認された。この形質は単胞子を介した次世代でも確認された。これら各変異株における光合成色素含有量比は、各変異株において傾向が異なった。その中で MRR 株の PE/Chl. *a* 比は、TU-1 株に比べて顕著に多くなった。また、MBG 株の色素含有量比は、PE/Chl. *a* 比と PE/PC 比より PC/Chl. *a* 比が多い傾向を示した。これは TU-1 株を含めた他の変異株とは異なる特徴であった。

第 5 章においては、凍結保存における変異体の形質への影響を確認するため、変異体の凍結・解凍を行い、それらを培養して、凍結していない株との成長の比較を行った。TU-1 株と、第 4 章にて得られた MG 株, MBG 株, M-01 株, M-03 株および M-04 株を選択し、凍結保存および解凍後の成長を比較した。凍結 4 週間後に解凍を行ったところ、これらの株の解凍直後の生存率は、全て 90% 以上の高い割合を示した。また、解凍後の培養における藻体の成長の傾向は、凍結していない株と変わらなかった。

本研究により、変異剤を用いたスサビノリ変異体作出の条件の検討が行われ、また、得られた変異体における詳細な形質が比較された。さらにそれら変異体は凍結保存が可能であることが確認され、遺伝情報を保存することが可能であることが示唆された。これらの結果はスサビノリにおける遺伝学および育種学の発展に大いに貢献するであろう。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 嵯 峨 直 恆  
副 査 教 授 阿 部 周 一  
副 査 教 授 板 橋 豊  
副 査 教 授 尾 島 孝 男

## 学位論文題名

### 海産紅藻スサビノリ（紅色植物門，ウシケノリ目） 変異体の作出とそれらの特徴および凍結保存

海産の大型紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) は、水産業において重要な種であり、生物学的にも、“海洋のモデル生物”として注目され始めている。モデル生物の条件として、様々な基盤技術の整備が必要であるが、その中でも、突然変異体の作出は、遺伝解析を行う上で重要な作業である。これまでスサビノリ変異体の報告は、色彩変異体がほとんどであるが、それらの成長や成熟などを包括的に研究した記録はないのが現状である。また、スサビノリの凍結保存および解凍技術は確立されているが、この技術を人為的に作出した変異体に適用した例は知られていない。そこで本研究では、海産紅藻スサビノリの遺伝・育種学的研究の一環として、変異体作出条件の検討を行い、得られた条件で変異体を作成し、さらに凍結保存・解凍を行い、得られた形質が変化しないことを確認した。

第2章では、変異体選抜の為の基礎的データを得ることを目的とし、培養に用いる培地や容器が、野生株 (TU-1 株) の単孢子発芽体の成長、成熟および光合成色素含有量 (Chl. *a*: クロロフィル *a*, PE: フィコエリスリン, PC: フィコシアニン, Car: カロテノイド) への影響を検討した。培地や容器が異なると葉幅、成熟開始時期および光合成色素含有量に差がみられた。

第3章では、スサビノリ単孢子発芽体における効率的な変異体作成条件の設定を検討した。コルヒチンおよびEMS (エチルメタンサルホネート) 処理においては、変異体は確認されなかった。MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 処理においては、10 ppm~250 ppm の幅広い処理濃度において、全ての処理時間 (1, 2 および 3 時間) で藻体の生存と変異体を確認された。また処理濃度を 25 ppm とし、処理時間 (1~3 時間) における、処理後の藻体の成長を比較すると、処理時間 1 時間のみ葉長の伸長が確認された。さらに、処理濃度 25 ppm, 処理時間 1 時間において、処理 8 週間後の変異体の割合を計測すると、多くの個体 (89%) によれや色彩の変化が見られた。

第4章においては、第3章で決定した MNNG 処理条件により、変異体の作出および分離を行い、それら変異体の成長、成熟および光合成色素含有量を比較した。TU-1 株より MRR 株, MG 株, MBG 株, M-01 株, M-02 株, M-03 株, M-04 株および M-05 株を分離した。また、MBG 株に再度変異処理を行い、MM-01 株を得た。MRR 株, M-03 株および M-04 株は赤色を呈した。また MG 株, MBG 株および MM-01 株は緑色を呈した。しかし、これら株の成長速度および葉長・葉幅には野生株と比べて差が見られた。M-01 株は TU-1 株に比べ、成長が早く、光合成色素含有量も多い為、育種に有用な株であ

ることが示唆された。また M-02 株は単孢子放出に特徴があった。これら各変異株における光合成色素含有量比は、各変異株において傾向が異なった。その中で MBG 株の色素含有量比は、PE/Chl. *a* 比と PE/PC 比より PC/Chl. *a* 比が多い傾向を示した。これは TU-1 株を含めた他の変異株とは異なる特徴であり、初めての報告である。

第 5 章においては、凍結保存における変異体の形質への影響を確認するため、材料を TU-1 株、MG 株、MBG 株、M-01 株、M-03 株および M-04 株として、未凍結区および解凍区に分け成長の比較を行った。凍結 4 週間後における解凍区の生存率は、全て 90% 以上の高い割合を示した。また、解凍区の培養における藻体の成長の傾向は、未凍結区と変化はなかった。

本研究により、変異剤を用いたスサビノリ変異体作出の条件の検討が行われ、また、得られた変異体における詳細な形質が比較された。さらにそれら変異体は凍結保存が可能であることが確認され、遺伝情報を保存することが可能であることが示唆された。これらの結果はスサビノリにおける遺伝学および育種学の発展に大いに貢献すると考えられる。

主論文は平成 19 年 1 月 24 日 14 時から 15 時まで第二研究棟特別講義室において、審査員および関連教官 13 名および一般聴講 35 名出席のもと発表された。一般聴講においては、色彩以外の変異株の作成や水産学・水産業において求められる変異体について質疑・応答がなされた。また、審査員および関連教官においては、野生株が可塑性であることの意義、変異体の成長が野生型と異なることへの考察、変異株として確立させることへの考え方、色彩変異株の色彩以外の変異した形質の有無などについて質疑・応答がなされた。スサビノリ変異体の作出とそれらの凍結保存に関する研究は、スサビノリの遺伝学および育種学への発展に大いに貢献すると判断し、よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。