

氏 名 (本 國 籍)	若 林 知 明 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 262 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	褐藻類のプロトプラストの培養
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 久保井 徹 副査 静岡大学 教授 横 田 博 実 副査 岐阜大学 教授 原 徹 夫 副査 信州大学 教授 唐 澤 傳 英

論 文 の 内 容 の 要 旨

海藻、特に褐藻類は、プロトプラスト単離と培養の研究例が高等植物よりずっと少ない。そこで、
1) 褐藻プロトプラスト多量調製法の開発、2) 褐藻プロトプラストの培養、3) その生育に対する Mg の効果を調べた。

1) アメフラシ内臓器官(そのう液、そのう、中腸腺)の中で、そのう液が最も高いアルギン酸(褐藻細胞壁構成多糖)の分解活性(5.6 μg 還元糖/mg 蛋白/分)を持っていた。褐藻ワカメのプロトプラスト単離用の最適酵素液組成は、48 μg 蛋白/ml そのう液酵素、10 mg/ml セルラーゼオノズカ RS、0.4M NaCl、0.8M ソルビトール、2mg/ml デキストラン硫酸ナトリウム、1 $\mu\text{l/ml}$ 2-メルカプトエタノール、10mM MES-NaOH (pH 6.0)であった。褐藻のワカメ、ハバノリ、アラメと緑藻と紅藻からも多量のプロトプラストをえられた(10^7 - 10^8 プロトプラスト/g 新鮮重)。

2) 次に単離したワカメとハバノリのプロトプラストを、PESI 液体培地で、15℃、10 又は 14 時間明期日で培養した。ワカメのプロトプラストは低頻度(0.01%以下)で発芽して糸状体に生育したが、葉状体へは再生しなかった。ハバノリプロトプラストは糸状体に成長し、そこから配偶体葉を形成した。

3) ワカメとハバノリプロトプラストをASP₁₂NTA 培地 (Mg 0-300mM) で、15℃、10 時間明期で培養した。両種の糸状体の形成率は、Mg 濃度の増加とともに増加した。また、糸状体当たりの細胞数は、それぞれ200 と150mM で最大になった (ASP₁₂NTA 培地 (50mM Mg 処理区) のそれぞれ、3.3 と10 倍)。培養物のクロロフィル a 濃度は、50mM の Mg 処理区では培養中に低下する一方、100mM 以上の Mg 処理区では藻体と同じレベルに維持されていた。このように、褐藻のプロトプラストは葉状体より高濃度の Mg 処理を必要とする。

以上のように、褐藻ワカメ、ハバノリのプロトプラストを培養・分化させることがではじめて高頻度でできるようになった。

審 査 結 果 の 要 旨

海藻(海に生育する大型藻類)は、緑藻・紅藻・褐藻に分類される。コンブ(昆布)、ワカメ(和布)、ハバノリをはじめ、多くの褐藻が食用となっており、また家畜の飼料、医薬品、化粧品、食品添加物、工業原料やバイオマス資源に利用されている。しかし、褐藻の育種は進んでいないのが現状である。

本研究は、褐藻のワカメとハバノリのプロトプラスト(細胞壁のない細胞)の培養を成功したものである。これらのプロトプラストの多量調製法、培養に伴う形態形成、マグネシウムによって高頻度の分裂・形態形成を達成した。

1) プロトプラストの多量調製法: アメフラシそのう液から粗酵素(アルギン酸リアーゼ等)をとった。これ(48 µg 蛋白/ml)とセルラーゼオノズカ RS(10 mg/ml)を主体としたプロトプラスト調製酵素中で各種(ワカメ、ハバノリ、アラメなど)藻体を1 時間(30℃)で処理をすると、 10^7 - 10^8 /g 新鮮重のプロトプラストを得られた。

2) 培養に伴う形態形成: ワカメとハバノリのプロトプラストを PESI 液体培地に入れ、15℃、10~14 時間明期の条件下で培養すると、糸状体に分化した。ハバノリの場合にはさらに葉状体(配偶体葉)まで分化した。しかし分化の頻度が低かった。

3) 高頻度の分裂・形態形成: Mg を150~200mM にあげて、ワカメとハバノリのプロトプラストを培養すると、2) よりもそれぞれ3.3 と10 倍にふえた。これは細胞内 Mg とクロロフィル a 含量は、もとの藻体と同レベルに維持されていたことによるためであった。

本研究の系を利用すれば、褐藻のプロトプラストは培養・分化させることができると

考える。これを使って褐藻の育種が将来的に期待できる。それ故、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1) Wakabayashi, T., T. Kuboi, T. Tuboi, M. Kaji, and M. Hara: Preparation of high yields of algal protoplasts using buccal juice of sea hare and commercial cellulase. *Mar. Biotechnol.*, 1, 407-410 (1999)

2) Wakabayashi, T., M. Hara, and T. Kuboi: Effect of Magnesium on the Division of Protoplasts of Brown Algae (*Undaria pinnatifida* and *Petalonia binghamiae*), *Plant Biotechnol.*, in press.