

論文の内容の要旨

論文題目

Physiological and ecological studies on nutrient uptake kinetics and the development of a new cultivation technique of *Saccharina ochotensis* and *Undaria pinnatifida*

(栄養塩吸収特性を中心としたリシリコンブとワカメの生理生態学的研究および新たな養殖技術の開発)

氏名 佐藤 陽一

序論

大型褐藻類のコンブ属およびワカメ属は、異型世代交代の生活環をもち、遊走子から発芽する微視的な配偶体世代 (n) と卵と精子が受精して発芽する巨視的な孢子体世代 (2n) とを繰り返す (図 1)。これらの種は、食糧、化成品原料ならびに餌料として世界的に利用されているが、その資源量は海洋の環境変動の影響を受けて、天然、養殖ともに安定しない。特に海水中の栄養塩 (NO_3^- -N, NH_4^+ -N, PO_4^{3-} -P) 濃度の変動はコンブ属およびワカメ属の生長と藻体内の窒素含有量に正の相関をもつことが知られている (e. g. Chapman and Cragie 1977)。しかし、海水中の栄養塩濃度の変化に対して藻体がどのように適応しているのか、その栄養塩吸収に関する生理生態学的特性は十分に理解されていない。コンブ属の中でもリシリコンブ *Saccharina ochotensis* は近年の資源量減少がもっとも著しい (Nabata et al. 2003)。また、ワカメ属ワカメ *Undaria pinnatifida* は 1970 年代以降侵入種として世界中に急速に分布域を拡大している (Wallentinus 2007)。これら両種の栄養塩吸収特性は、大型褐藻類の種ごとの環境への適応機構を明らかにする上で重要であると考えた。

産業的には、漁業従事者の減少や高齢化にともなう生産低下が深刻な問題である。生産性を向上させるとともに、高付加価値原料を安定的に生産するためには優良系統の開発が強く求められている。従来の大型褐藻類の育種試験は、年に 1 回の海上養殖で行われており、育種年数を短縮できる養殖技術が必要とされていた。

本研究では、栄養塩吸収特性についてリシリコンブでは季節変化を、ワカメでは地域系統間の差異を明らかにした。また、複数個体のコンブ類およびワカメを同時に、同一環境下で養殖できる新型装置を開発し、選抜育種および突然変異育種による優良系統開発を行い、得られた系統の生理学的な特性を明らかにした。



図 1. ワカメの生活環

結果と考察

1. リシリコンブ *Saccharina ochotensis* の生長と成熟に関する生理生態学的研究

リシリコンブ原産地の北海道利尻島沓方で採苗された種苗を宮城県松島湾に移植して実験に供した。リシリコンブの形態、藻体部位別の重量、炭素 (C)・窒素 (N) 含有量、光合成速度、ならびに栄養塩吸収特性の指標となる V_{\max} , K_s , V_{\max}/K_s を求めた。これらのパラメーターは濃度段階別の栄養塩吸収速度によって得られたデータをミカエリス・メンテンの式に当てはめて算出したものであり、 V_{\max} および K_s が高いほど高栄養塩濃度への適応性が高く、 V_{\max}/K_s が高いほど低栄養塩濃度への適応性が高いことを示している (Harrison and Hurd 2001)。

リシリコンブは5月まで大型化しその後先端部からの末枯れによって短くなるが、生長部位である葉状部下部の重量およびCN含有量は夏期に向けて増大した。光合成速度は冬から夏にかけて低下したが、栄養塩吸収速度は上昇する傾向を示した。 V_{max} および K_s は冬に高く、 V_{max}/K_s は夏期に向けて上昇する傾向を示した。これは、北部日本沿岸において海水中の栄養塩濃度は冬に高く、春にかけて急激に減少する季節変化に適応したメカニズムであると考えられる。

2. 大型褐藻類のための新たな養殖装置の開発と性能評価

環境条件を制御できる養殖を可能とするために、2,000 L ポリカーボネート製水槽の中央部分に改良を加えて、「浮遊回転式陸上養殖装置 (CFCS)」を開発した。本装置によって藻体は全長 2 m を超えても相互に絡まらずに水槽内を流動した。藻体の形態や生長に影響を与える流速は、注水角度の調整で変化可能であり、その最高値 (18.05 cm/s) は岩手県における一般的なワカメ漁場よりも高かった。藻体の生長に合わせて水槽の大きさを変化させることで生長を最適化し、年間 2~3 回の養殖を可能にした (図 2)。

CFCS においてワカメを養殖した結果、高流速条件ほど生長が促進され、葉状部の切れ込みが深く、メカブの形成が促進された。マコンブを養殖した結果、低流速条件ほど藻体の幅は広く重量は増大した。これらは養殖漁場における観察結果と同様であり、本装置は海上の養殖環境を再現できていることが示された。一遊走子を起源とするワカメ胞子体 320 個体に標識を施して養殖したところ、日間生長量は 3.32–9.65 %/day を示した。したがって、本装置によって、ワカメの量的形質を元にしたスクリーニングが可能である。

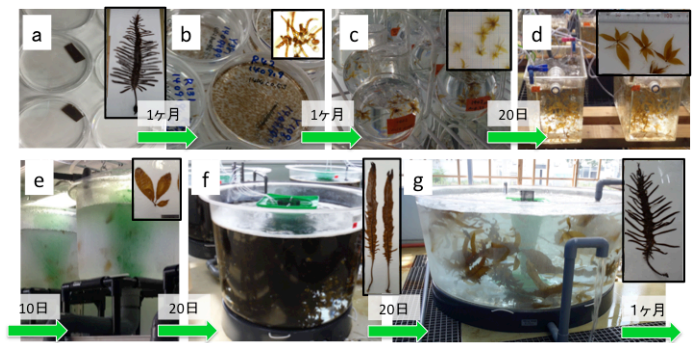


図2. CFCS を用いた大型褐藻類の完全陸上養殖システム (a) メカブから遊走子の採取、(b) シャーレ内の配偶体、(c) 通気フラスコ(胞子体 1–5 mm)、(d) 角形水槽(0.3–3 cm)、(e) CFCS-30 L(3–10 cm)、(f) CFFCS-500 L (10–100 cm)、(g) CFCS-2000 L(1–3 m)

3. 日本の6産地において養殖したワカメ *Undaria pinnatifida* の形態学および生理学的な遺伝的変異および環境変異

日本の主要な養殖産地の中から6地点(岩手県広田湾(HRT)、宮城県松島湾(MAT)、兵庫県明石(AKA)、徳島県鳴門(NAR)、山口県下関(SIM)、秋田県男鹿(OGA))を選び、各地に自生する天然ワカメから試験用種苗を準備した。これを各漁場にて養殖し、形態および栄養塩吸収特性(V_{max} , K_s , V_{max}/K_s)を調べた。また、AKAを除く5地点については、養殖藻体から得た次世代の胞子体を第2章で開発したCFCS水槽において養殖した。

ワカメの形態は、海上養殖ではMATは早期に大型化し、SIMは小型の形状を呈した。これらの特徴は水槽養殖においても同様の結果を示し、形態的には①HRT(図3a)、NAR、OGA、②MAT、③SIM(図3b)の3グループに分けられた。これらの分類は、ワカメの集団レベルの解析に用いられている遺伝子マーカーであるミトコンドリア *atp8-trnS* および *trnW-trnI* 遺伝子 (Voisin et al. 2005) の塩基配列情報により得られた分子系統解析からも支持された(図3c)。

海上養殖個体の栄養塩吸収特性は産地ごとに異なっており、AKAおよびNAR系統は V_{max} および K_s が高く、OGA系統は V_{max}/K_s が高かった(図4)。これは、AKAおよびNARは生育地の瀬戸内海におけ

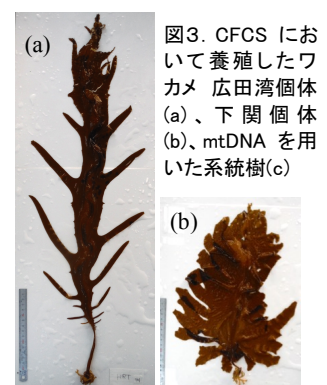


図3. CFCS において養殖したワカメ 広田湾個体 (a)、下関個体 (b)、mtDNA を用いた系統樹(c)

る陸域からの一時的な栄養負荷に、OGA は日本海沿岸の低い栄養塩濃度に、それぞれ馴化した特性であると考えられた。

これに対して水槽養殖の結果、NAR の V_{max} および K_s は海上養殖で得られた値よりも低下して他系統と同等のレベルとなった一方で、OGA の V_{max}/K_s は海上養殖の結果と同様に高い値を示した。これらの結果から、MAT および SIM の形態的特徴や OGA の貧栄養適応的な栄養塩吸収特性は遺伝的変異形質であることが示唆された。早生種苗の開発のためには MAT のような初期生長の高い系統を、貧栄養海域において適した種苗開発のためには OGA のような高い V_{max}/K_s をもつ系統を、それぞれ母藻に用いることが有効であると考えられる。

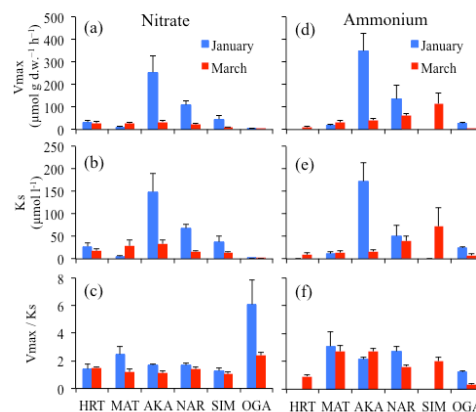


図4. 6産地における養殖ワカメの NO_3^- -N および NH_4^+ -N の1月と3月における吸収特性の比較
 広田湾; HRT, 松島湾; MAT, 明石浦; AKA, 鳴門; NAR, 下関; SIM, 男鹿; OGA.

4. 新型水槽装置を用いたワカメの優良系統開発と海上養殖による実証試験

ワカメの早生系統と晩生系統を、前章で得た遺伝的変異形質に基づいて候補を作出し、その形質を海上養殖試験によって確かめた。雌雄1個体ずつの配偶体から発芽した松島湾個体 (MT) および広田湾個体 (HR) の胞子体を CFCS において養殖し、日間生長量が最も高い個体を選抜した。選抜個体由来の種苗系を作成し、岩手県広田湾において2014年9月17日、10月9日、10月19日、11月6日、12月12日の5回に分けて養殖を開始した。MT系統の10月9日と10月19日に養殖開始した個体はHR系統よりも重量が増大した。これに対して11月6日養殖開始個体はHR系統がMT個体よりも大型化し、12月12日養殖開始個体はHR系統のみが生育したことから、MT系統の早生、HR系統の晩生の特性を海上養殖において確認できた。通常種苗と比較すると、両系統ともに収穫量が高かったことから、生産性の向上が期待できる。水温別の光合成速度および栄養塩吸収速度は、MT系統が高水温で、HR系統が低水温で高い傾向を示したことから、生理学的な特性によって両系統の特性が裏付けられた。

5. 重イオンビーム育種技術を用いたワカメの優良系統開発

CFCS 養殖方法を用いてワカメに対する突然変異育種を試みた。変異原は理化学研究所のリングサイクロトロンで生成される重イオンビームを用いた。重イオンビーム育種は陸上作物では多くの種において優良変異体を作成する効果的な方法として用いられている (Abe 2012)。

広田湾個体から得られたワカメ配偶体および全長 2 mm 程度の幼胞子体に対する照射核種および線量別に測定した生存率から、高い変異率が得られると推定される最適線量域は、炭素イオンでは 2~5Gy、アルゴンイオンでは 0.2~2.5Gy と推定された。照射当代を CFCS において養殖し、形成したメカブから M_2 世代の配偶体を得た。これらを CFCS において養殖した結果、胞子体の初期生長が著しく促進される系統 (図5)、および高水温においても発芽し生長する系統が得られた。これら M_2 から遊走子を得て配偶体を培養し、 M_3 における生長を確認した結果、生長は野生型に対して有意に増大した。特に生長が促進された系統から得られた M_3 個体の栄養塩吸収特性を測定した結果、 V_{max} の値は野生型の約 50 倍の



図5. 重イオンビーム照射第2世代のワカメ 著しく大型化した個体が複数個体認められた。

値を示した。栄養塩吸収能力の向上は、変異体の著しい生長をもたらしていると考えられる。M₂で得られた変異候補系統について食味試験を行った結果、野生型のワカメと同等の品質であったことから、食用として問題なく利用できる。特に高水温で発芽した一系統は食感が良好であり、高品質原料としての活用も期待できる。

結論

本研究では、大型褐藻リシリコンブおよびワカメの栄養塩吸収に関する生理学的特性を中心に、以下のことを明らかにした。

- 1) リシリコンブは栄養塩吸収特性を季節的に変化させて、海水中の栄養塩濃度の季節変化に適応している。
- 2) 大型藻類を同一環境条件下で養殖できる新型水槽装置を開発し、優良系統作出のためのスクリーニングの系を確立した。
- 3) ワカメを海上および水槽において養殖し、形態的特徴および栄養塩吸収特性を比較した結果、松島湾個体の早期成長や下関個体の小型となる特徴は遺伝的変異であり、葉厚は環境変異であることが示唆された。栄養塩吸収特性は、松島湾個体や男鹿個体の低い栄養塩に適応的な形質は遺伝的変異形質であると考えられた。
- 4) 遺伝的変異形質に基づいて選抜した松島湾と広田湾由来の優良系統候補を、岩手県広田湾において5回に分けて養殖を行った結果、それぞれ早生と晩生の特性を有することが確かめられた。
- 5) 広田湾個体から得たワカメ配偶体および孢子体に重イオンビームを照射し、M₂世代において高生長および高水温耐性をもつ優良変異体候補を作出した。得られた高生長候補系統の栄養塩吸収速度は高濃度でも飽和せず、V_{max}は野生型の50倍を示した。

発表論文

- 1) Sato, Y., Hirano, T., Yamaguchi, M., Hayashi, Y., Fukunishi, N., Abe, T. (2012) Effects of heavy-ion beam irradiation on gametophyte survival and sporophyte formation of *Undaria pinnatifida*. RIKEN Accelerator Progress Report **46**, 267
- 2) Hirano, T., Sato, Y., Ichinose, K., Hayashi, Y., Fukunishi, N., Abe, T. (2013) Rapid evaluation of mutational effects resulting from heavy-ion irradiation of *Undaria pinnatifida*. RIKEN Accelerator Progress Report **47**, 299
- 3) Sato, Y., Hirano, T., Hayashi, Y., Kasahara, M., Fukunishi, N., Abe, T., Kawano, S. (2013) Effects of heavy-ion beam irradiation on sporophyte survival and growth in *Undaria pinnatifida*. RIKEN Accelerator Progress Report **47**, 300
- 4) Sato, Y. and Agatsuma, Y. (2015) Resource accumulation of the kelp *Saccharina ochotensis* based on photosynthetic rate and specific nutrient uptake kinetics. Journal of Applied Phycology (in printed) DOI 10.1007/s10811-015-0578-5
- 5) Sato, Y., Yamaguchi, M., Hirano, T., Ito, Y., Fukunishi, N., Abe, T., Kawano, S. Effect of water flow velocity on *Undaria pinnatifida* and *Saccharina japonica* growth in a novel tank system designed for macroalgae cultivation. Bioresource Technology (in submitted)
- 6) Sato, Y., Hirano, T., Niwa, K., Suzuki, T., Fukunishi, N., Abe, T., Kawano, S. Phenotypic differentiation in the morphology and nutrient uptake kinetics among *Undaria pinnatifida* thalli cultivated at six sites in Japan. Journal of Applied Phycology (in preparation)