

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450268

研究課題名(和文)コンブ胞子体における傷害抵抗性誘導条件の解明

研究課題名(英文)A research on wounding-resistance inducing conditions in kelp sporophytes

研究代表者

水田 浩之(Mizuta, Hiroyuki)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00250499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コンブ類の傷害抵抗性を誘導する条件を探索し、その機構解明を試みた。その結果、マコンブ幼胞子体への赤色光照射により、他の光(青色光、緑色光及び白色光)では認められない体の硬化を導くことが明らかになった。そこでリグニン様物質を測定したところ、赤色光下の幼胞子体は他の光条件のものに比べ高い含有量を示していた。また、赤色光照射による活性酸素発生の誘導や、表皮細胞の細胞壁に高いペルオキシダーゼ活性とリグニン様物質の分布が観察された。以上のことから、赤色光照射は、ペルオキシダーゼと活性酸素によって触媒されるリグニン様物質の合成を促し、葉状部の硬化を導き、物理的な抵抗力を付加する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We tried to search the effective conditions to induce the wounding-resistance in the kelp, particularly *Saccharina japonica* sporophyte. As a result, it has been found that the irradiation of monochromatic red light induces the hardening in the young sporophytes. In addition, the monochromatic red light irradiation resulted in the increase of lignin-like substance content. The lignin-like compounds and high peroxidase activity were histochemically detected in the cell wall and the adjacent apoplast, particularly of the epidermal cells. Moreover, the monochromatic red light irradiation induced the production of radical oxygen species, which play an important role for the defense mechanism. These observations suggest that red light irradiation functions for the young sporophytes to give the wounding-resistance by hardening of the epidermal cell wall with the deposition of lignin-like substances catalyzed by hydrogen peroxide and peroxidase.

研究分野：海藻繁殖学

キーワード：コンブ 赤色光 傷害 リグニン 静的抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

産業重要海藻の1つであるコンブ類において、1960年代にマコンブの促成養殖技術が確立されて以降、その国内における養殖生産は、全生産量の約3割を占めるまでになっている。その養殖は、まず天然から採集した母藻を用いた陸上採苗、育苗に始まり、得られた種苗は沿岸域での仮植、本養成へと移される。その過程で、病害の発生により種苗の脱落・枯死が見られることがあり、時として社会問題にまで発展することもある。また、天然海域における養成の際には、脱落、穴あき症や食植性動物による摂食といった問題も起こることがあり、その防御は産業的に重要な課題である。

## 2. 研究の目的

コンブ類の胞子体から配偶体への世代交代は、胞子体の成熟に始まり、種苗生産や天然資源の更新に重要な意味を持つ。この胞子体の成熟(胞子体の生殖器官である子嚢斑形成)は、水温、光および栄養塩などの環境要因により大きく左右され、その後の生産量に大きく影響を及ぼすことになる。また、子嚢斑の形成時には、静的抵抗性に関与すると考えられる構造的性質(構造的障壁)やフェノール類など化学的性質(化学的障壁)が強化され、繁殖を成功させるメカニズムが働いていることが明らかにされている。さらに、胞子体の成熟過程において静的抵抗性と動的抵抗性(過敏反応能力など)が同時に働いて、繁殖の成功に貢献していることも示されている。そのため、コンブ類が潜在的に有する抵抗力を向上させることは、安定的かつ高品質のコンブ類の生産を維持する上で、極めて有効な手段の一つとなると考えられる。そこで、コンブ類が有する潜在的な抵抗力を強化する条件の解明を目指すことを目的とし、特に異なる波長の光(光質)条件に注目し、以下の実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 異なる光質条件下での幼胞子体の培養

成熟したマコンブ胞子体から得た遊走子を培養し、雌雄配偶体を経て発生した芽胞体をビタミン無添加プロバゾリの栄養強化培地の入った1Lプラスチックボトル中で、5-10、光量20-60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、中日条件下で培養した。葉長約5cmになった幼胞子体を、以下の実験に供した。また、海中培養した胞子体から胞子体ディスク(1.4-3.0cm)も実験に用いた。これらの幼胞子体と胞子体ディスクを白色光(ナチュラル色蛍光灯FL10ENW, Panasonic)、赤色光(波長ピーク660nm)(MIL-R18, SANYO Electric Biomedical)、緑色光および青色光(波長ピーク470nm)(MIL-B18, SANYO Electric Biomedical)の4光質条件下で2~3週間培養した。培地には、ビタミン無添加プロバゾリの栄養強化海水を用い、その培地900mL中

6-9個体の密度で、10、中日( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )の条件で培養を行った。尚、事前に実験温度で1週間以上培養することで幼胞子体や胞子体ディスクを順化させた。

### (2) 異なる光質の藻体硬度への影響

異なる4光質条件下で2週間培養した幼胞子体および胞子体ディスク(葉長約3cmの葉状部と茎状部の移行部から1-2cm先端に位置する縁辺部位から得た直径16mmディスク)の硬度を、硬度計にて測定した。培養後、幼胞子体の葉状部と茎状部の移行部から5mmの位置を始点として直径16mmのディスクを採取し、そのディスクを硬度計の軸(スピンドル)が胞子体組織を貫通した時の圧力を硬度として算出した。また、硬度測定に使用した部位の厚みと表層細胞密度を顕微鏡下で観察した。さらに、葉状部の硬度がその厚みや表層細胞密度に起因しているのかを調べるために、葉状部の部位ごとの葉状部組織の厚み、表層細胞密度および硬度の関係を比較した。

### (3) 異なる光質の藻体の生理状態への影響

光合成活性に及ぼす光質の影響:異なる4光質条件下で3週間培養した幼胞子体を、OS1p Modulated Chlorophyll Fluorometer (OPTI-SCIENCE)を用いて、最大量子収率( $F_v/F_m$ )、電子伝達速度(ETR)および非光化学消光(NPQ)を測定した。また、幼胞子体の光合成色素含有量を吸光度法により測定した。

イオン漏出量とマロンジアルデヒド含有量に及ぼす影響:異なる4光質条件下で3週間培養したマコンブ胞子体ディスク(3cm)のイオン漏出量を、電気伝導率計(CM-30R, DKK-TOA corporation)を用いて測定した。また、細胞膜の酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド(MDA)含有量も測定した。

リグニン様物質含有量に及ぼす影響:異なる4光質条件下で3週間培養した幼胞子体のリグニン様物質含有量をチオグリコール酸法により測定した。また、幼胞子体内におけるリグニン様物質の分布を、フロログルシノール塩酸塩法とヨウ素ヨウ化カリウム硫酸法を用いて組織化学的に調べた。さらに、ペルオキシダーゼ活性染色の分布をジアミノベンジン(DAB)染色し、生物顕微鏡下で観察した。

## 4. 研究成果

幼胞子体を異なる4光質条件下で培養し、その硬度を測定したところ、赤色光で培養した幼胞子体の硬度は他の光質下の幼胞子体に比べ有意に高く、他の光質下で培養したものの約1.5-1.7倍高い値を示した(図1)。一方、硬度を測定した部位の厚さと表層細胞密度

は、光質条件間で有意な差は認められなかった。

海中培養した大型の胞子体から得た胞子体ディスクは、幼胞子体に比べはるかに高い硬度を示したが、幼胞子体で認められた赤色光の硬度の増加効果は、胞子体ディスクでは認められなかった。

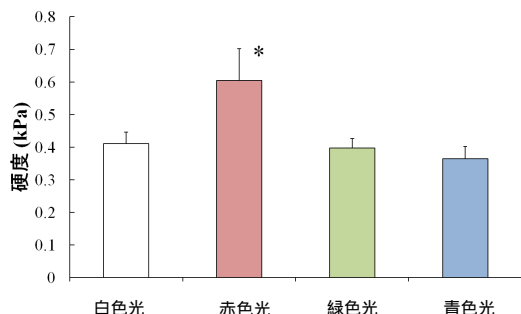


図1. 異なる光質条件下で培養した幼胞子体の硬度

光合成活性に及ぼす光質の影響を調べたところ、4つの光質条件で3週間培養した幼胞子体の最大量子収率 ( $F_v/F_m$ )、電子伝達率 (ETR) 及び非光化学消光 (NPQ) は、いずれも赤色光で培養した幼胞子体で低い値を示し、他の光質下で培養したものの、 $F_v/F_m$  で約 15%、ETR で約 15%、NPQ で 28-40% 低い値であった。

赤色光下で培養した幼胞子体のクロロフィル *a* 含有量は他の光質下で培養したものの 74-83% の値を示した。フコキサンチン含有量も赤色光下の幼胞子体で最も低く、他の光質下で培養した藻体の 60-83% 程度であった。しかし、クロロフィル *c* およびカロテン含有量は光質間で有意な差は認められなかった。

コンブ類のイオン漏出量は、浸透圧ストレスや重金属ストレスを受けると上昇することが知られている。本研究において、赤色光下で培養した胞子体のイオン漏出量は徐々に抑えられ、測定開始 15 分後の平均イオン漏出量は  $57.8 \pm 10.9\%$  であり、他の光質 (73-75%) に比べて有意に低かった。しかし、藻体内の電気伝導率から推察される総イオン量は、 $56.5 \pm 6.1 \text{ mS m}^{-1}$  から  $74.5 \pm 15.1 \text{ mS m}^{-1}$  の範囲であり、光質間に有意な差は認められなかった。

一般的にイオン漏出量が高くなると膜酸化の指標である MDA 含有量も増加することが知られている。異なる 4 光質条件で培養した幼胞子体の平均 MDA 含有量を測定したところ、 $125-146 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$  の範囲にあり、光質条件間で有意な差は認められなかった。イオン漏出量と MDA 含有量の結果から、実験で用いた光質条件における藻体はストレスを受けている状態にはないと考えられた。

幼胞子体のリグニン様物質含有量を異なる 4 光質条件下で 3 週間培養した藻体を用いて測定したところ、赤色光下で培養した幼胞子体で最も高かった (図 2)。青色光下で培養した幼胞子体のリグニン様物質含有量は、

赤色光下のその 26% 程度であった。白色光および緑色光では、赤色光と青色光の中間的な値を示した。

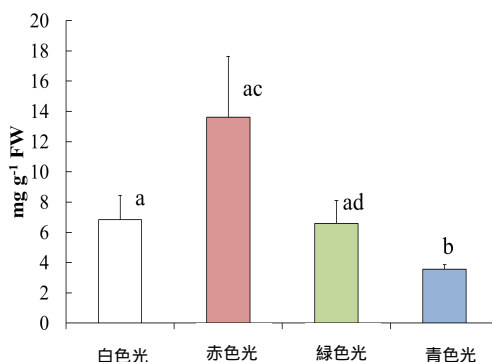


図2. 異なる光質条件下で培養した幼胞子体のリグニン様物質含有量

リグニン様物質の分布を調べるため、フロログルシノール塩酸塩法による染色を行ったところ、細胞壁、特に表層組織や外皮層が赤色に染まり、リグニン様物質はそれらの部位に分布している様子が観察された (図 3)。また、ヨウ素ヨウ化カリウム硫酸法でも、特に表層細胞の外側が濃染されていた。

また、DAB 染色によりペルオキシダーゼ活性の分布を見たところ、いずれの光質下の体でも表層細胞と外皮層が褐色に染色され、高いペルオキシダーゼ活性が認められた。特に、赤色光下で培養した幼胞子体の表層細胞において他の光質条件と比べて濃染される様子が観察された (図 3)。

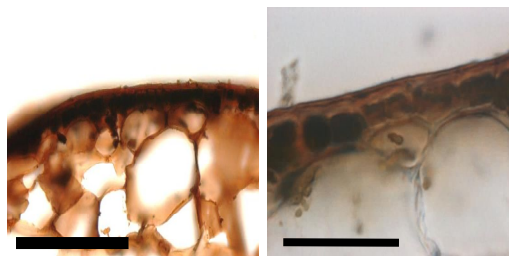


図3. 赤色光照射された幼胞子体片におけるフロログルシノール塩酸塩法によるリグニン様物質 (左) と DAB 染色によるペルオキシダーゼ活性 (右) の分布。スケール: 100  $\mu\text{m}$

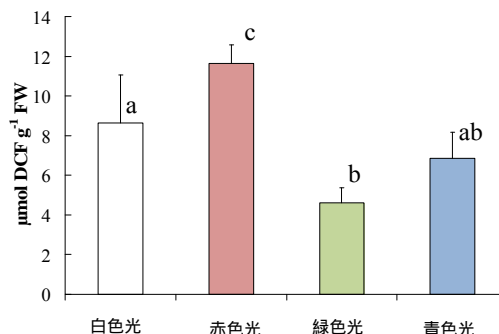


図4. 異なる光質条件下で培養した幼胞子体片における活性酸素生成

異なる光質条件下で培養した幼胞子体の

活性酸素発生量を測定したところ、赤色光下で培養した幼孢子体の活性酸素種の発生量が他の光質条件に比べて有意に高い値 ( $11.6 \pm 0.9 \mu\text{mol DCF equivalent g}^{-1}\text{FW}$ ) を示した (図4)。

以上のことから、特に幼孢子体において赤色光の照射は、活性酸素の発生を誘導すると共に、リグニン様物質の合成・沈着による構造的隔壁の強化をもたらすことが示唆された。得られた知見は、種苗生産・陸上育成における生理障害に対する栽培上重要な知見となるだけでなく、育種に向けた抵抗性強化技術の開発に貢献する知見となるであろう。

5．主な発表論文等 該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

水田 浩之 (Mizuta Hiroyuki)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：00250499