藻類 Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 65: 149-152, November 10, 2017

藻類学最前線

クロロフィル蛍光を利用したアマノリ類のストレス応答測定とその可能性

渡邉　裕基

アマノリ類は，紅藻ウシケノリ科アマノリ属（*Pyropia*）に属する藻類で，内湾の汽水域から外界に面した沿岸まで，広く分布している。また，食用として天然物が採取されるとともに，日本，韓国，中国などでは大規模な養殖が行われ，主に板海苔などに加工がされている（菊地 2012）。アマノリ類の生理生態に関する研究は 1950 年代から 60 年代にかけて多く報告されており，そこで得られた至適な生育条件等の知見は養殖技術の確立に大きく貢献してきた（Iwasaki 1961，右田 1964，1966，Dring 1967, Satomi *et al*. 1968, Miura 1988, 菊地 2012）。しかし，このような養殖技術の確立後の研究はほとんど報告されていない。そこで筆者らは，海藻類に対する光合成測定の手法として，新たに導入が試みられているパルス変調クロロフィル蛍光測定法（pulse-amplitude-modulated fluorometry，PAM）という手法を用いて，ストレス応答のモニタリング指標の確立を目的とした研究を行ってきた。大型海藻を対象とした光合成研究では，プロダクトメーターや酸素電極，Dissolved Oxygen（DO）メーターなどを用いて，光合成による酸素発生量や呼吸消費量を測定した研究が多く報告され（横浜・前川 1988，村瀬ら 1993，芹澤ら 2001），これらの知見は，至適な生育環境の把握のみならず，一次生産量の推定や，養殖技術の発展など，様々な分野で貢献してきた。一方，PAM はクロロフィル蛍光を利用する測定法であり，藻体を非破壊的かつ迅速に測定が可能なだけでなく，陸上・水中などのフィールドにおいても測定が可能であることから，陸上植物の他，藻類と共生したサンゴや海産種子植物など，様々な光合成生物を対象とした研究で活用されている（Winters *et al*. 2003, Campbell *et al*. 2006，Watanabe *et al*. 2014b）。PAM を利用した測定では，光合成の最大量子収率を示す F_v/F_m というパラメータが比較的頻繁に使用されている。詳しい原理については，本稿では省略するが，この測定は，光化学系 II に光エネルギーを与えた際に，光化学反応に利用されないエネルギーが熱ならびに蛍光エネルギーとして放出されることを利用したものである。このパラメータは測定が簡便なため広く使用されており，光化学系 II の機能低下の指標として，主にストレス応答の研究などにおいて使用されている（園池 2009）。本稿では，この手法を用いた筆者らによる研究と，その他の研究例を紹介したい。

アマノリの異型世代交代と光合成特性の変化

大型藻類の多くはその生活史において，染色体数が単相（n）となる配偶体世代と複相（2n）となる胞子体世代を持つ。この世代交代には大きく分けて 2 種類あり，配偶体・胞子体の両世代がほとんど同型同大になる同型世代交代型と，一方の世代が大型，もう一方の世代が微小な形態になる異型世代交代型の生活史が知られている。アマノリ類は異型世代交代型

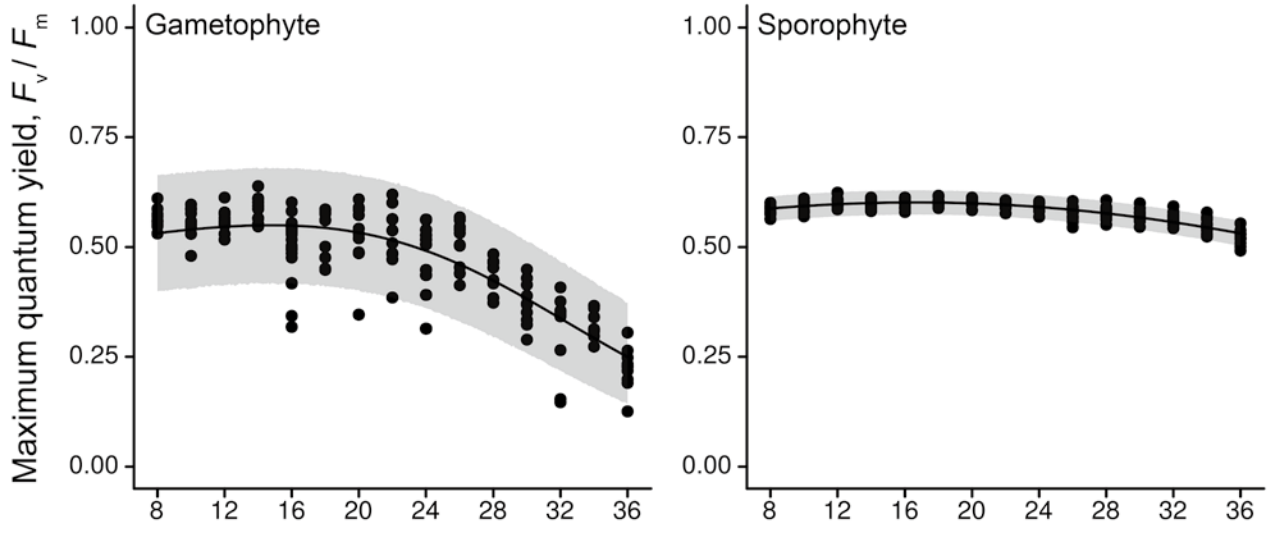

図 1．ナラワスサビノリ（*Pyropia yezoensis* f. *narawaensis*）の配偶体（左）と胞子体（右）の水温に対する F_v/F_m の変化。Watanabe *et al*. (2016) をもとに改訂。

の生活史を持っており，その形態は季節に応じて，大きく変化する。具体的に，秋季から冬季にかけては，巨視的な配偶体（葉状体）として岩場や貝殻上に生育し，春季から夏季にかけては微小な胞子体（コンコセリス）として，貝殻内等に穿孔生育する。そのため，一般的なアマノリ養殖では，カキ殻上に付着させた胞子体を陸上施設にて育成し，その後の養殖網への種付けを経て配偶体の海面養殖を行っている。

筆者らは，各世代の光合成特性の違いを最新の手法を用いて明らかにするため，アマノリ養殖で使用される，アサクサノリ *Pyropia tenera* (Kjellman) Kikuchi, Miyata, Hwang *et* Choi とナラワスサビノリ *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* Kikuchi, Niwa *et* Nakada について，水温に対する F_v/F_m の応答を測定した（Watanabe *et al*. 2014a，2016）。この測定では，アマノリ養殖にも使用されている株を佐賀県の研究機関から提供していただき，配偶体と胞子体それぞれの光合成活性を測定した。アマノリ類の光合成活性については，筆者らは以前にもアサクサノリの天然個体について，光合成に関する報告を行っていたが（渡邉ら 2013），Watanabe *et al*.（2014a, 2016）では，海面養殖を行っている配偶体に加え，カキ殻上に生育させた胞子体についても新たに測定を試みた。また，ナラワスサビノリについては，F_v/F_m だけでなく，DO メーターによる光合成速度についても，世代間での違いを比較した。この測定により，配偶体の F_v/F_m は，アサクサノリとナラワスサビノリの 2 種とも 8 ～ 20°C までの低水温に光合成の最大収率のピークを持つ右肩下がりの応答を示した。一方，胞子体では，アサクサノリは 26°C にピークを持つ緩やかな曲線の応答を示し，ナラワスサビノリ（図 1）は明瞭なピークを持たずほぼ横ばいの応答を示した。また，DO メーターを利用した光合成速度の測定についても，この応答と概ね似た傾向を示していた。

異型世代交代型の生活史を持つ海藻が，配偶体世代と胞子体世代で異なる温度特性を持つことはこれまでも報告されてきており（Bolton & Lüning 1983, tom Dieck 1992, Gevaert *et al*. 2002），筆者らの扱ったアマノリ類については，微小な世代が高いストレス耐性を持つことで，夏季の高水温を生存していると推察される。この測定による結果は，過去の培養・成長試験によっても裏付けられており，F_v/F_m による光合成特性の評価という点で，有用な知見を供することができた。

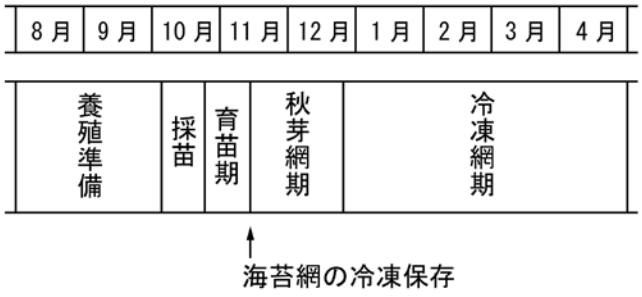

図 2．一般的な海苔養殖のスケジュール。育苗後の養殖網の一部は冷凍保存され，冷凍網期に解凍して養殖に使用される。

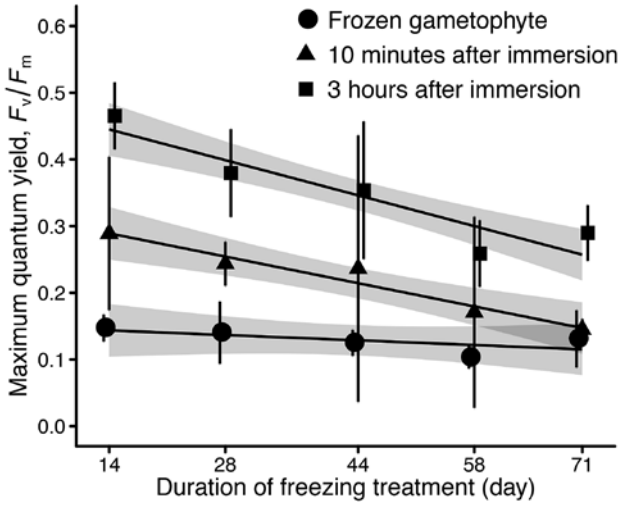

図 3．乾燥の後，凍結保存（– 20ºC）をしたナラワスサビノリ（*Pyropia yezoensis* f. *narawaensis*）配偶体の F_v/F_m の変化。測定は 2014 年 11 月 21 日から 2015 年 2 月 1 日まで行った。Watanabe *et al*. (2017) をもとに改訂。

乾燥，凍結環境下での F_v/F_m とその回復について

次に，筆者らは実際の海苔養殖の工程中の光合成活性の変化についても研究を行った（Watanabe *et al*. 2017）。前述のように，日本の海苔養殖の基礎技術は既に確立されており，それを基に各地で広く養殖が行われている。地域によっても異なるが，海苔養殖は図 2 のようなスケジュールによって行われる。そして，その養殖中には，養殖網の冷凍保存や，潮汐を利用した干出処理，疫病対策の酸処理など，様々な工程が存在している。Watanabe *et al*.（2017）では，その冷凍保存に着目し，その工程中の光合成活性の長期的な変化について明らかにしたので，その内容を紹介する。まず，この養殖網の冷凍保存が，具体的にどのようなものか説明をしたい。海苔の養殖期には，秋季に採苗から育苗，摘採まで一連の養殖を連続して行う秋芽（あきめ）網期と，冷凍保存をした網を冬季に解凍して行う冷凍網期がある。この冷凍網期に使用する養殖網は，秋季にまとめて育苗したものを，予備乾燥ののち冷凍保存したものが用いられる。そして，必要に応じて解凍して養殖網の交換が行われ 3 ～ 4 月まで葉状体の養殖が行われる。この冷凍保存方法の確立により，天候や病気の蔓延等による不漁のリスクを軽減することができる。

Watanabe *et al*.（2017）では，この間の光合成活性の変化に注目し，予備乾燥中，冷凍保存中，そして解凍後の光合成の最大収率の変化を，実際の養殖工程に準じてそれぞれ測定した。その結果，乾燥中の F_v/F_m は網干し開始時から急速に低下し，乾燥終了時には 0.1 前後と非常に低い値を示すことが明らかになった。その後，冷凍中および解凍後の $F_v/$

F_m をおよそ 2 週間毎に測定した（図 3）。冷凍中の F_v/F_m は，乾燥終了時の約 0.1 からほとんど変化しなかった。一方，10 分間および 3 時間の解凍後の F_v/F_m においては急速な回復がみられた。これは，乾燥により脱水されることで，細胞内に氷晶が形成されにくくなり，光合成機能が維持された結果によるものだと推察される。しかし，冷凍期間の長期化に伴い，時間あたりの回復量は徐々に低下していくことから，長期間の冷凍はその後の生長に影響を及ぼすことが示唆された。これらの結果は，生残率や培養試験などによる過去の報告とも概ね一致していた（右田 1966）。また，ここには示していないが，一般的な冷凍期間である 1 ～ 2 ヶ月間の冷凍を経たのち，海面にて通常通り養殖を行った冷凍網の F_v/F_m は，秋芽網とほとんど違いは見られず，冷凍による F_v/F_m への長期的な影響は確認できなかった（Watanabe *et al*. 2017）。このため，解凍直後の F_v/F_m の回復は低下するものの，適切な冷凍期間であれば，時間の経過で十分に回復することが明らかとなった。このように，実際の養殖工程中の光合成の最大収率の変化を，具体的な数値で示すことができたことは，養殖藻体の品質の統一や，冷凍保存中の品質管理など，養殖技術の高度化に繋がる可能性がある。しかし，アマノリ養殖には他にも様々な工程が存在することに加え，天候等により毎年の状況は変化する。筆者らの研究で扱ったのは，そのごく一部のみであることから，今後もさらなる知見の集積が求められることは言うまでもない。

海外における PAM を利用したアマノリ類の研究

ここまで，筆者らが行ってきた研究を中心に紹介をしてきたが，最後に，国外での研究事例についても簡単に紹介したい。

ここまで紹介してきたナラワスサビノリは，日本と同様に，中国や韓国においても養殖されているため，関連した研究も度々報告されている（Wang *et al*. 2011，Xu *et al*. 2012）。その他にも，中国で主に食用・養殖される *Pyropia haitanensis* (Chang & Zheng) Kikuchi & Miyata に関しても関連した研究が報告されている（Gao *et al*. 2013，Jia *et al*. 2013）。例えば，Wang *et al*.（2011）は室内実験に基づき，乾燥耐性と凍結耐性について報告している。この研究では，中国の一部養殖場が直面する冬季の海水面の凍結による影響に焦点を当て，水分量や凍結温度，凍結期間，解凍後の回復などについて，光合成の最大収率の変化を測定している。測定の結果，藻体を – 2ºC で 24 時間冷凍した場合，水分量が少ないほど，F_v/F_m は低下したが，– 20ºC では，水分量にかかわらず F_v/F_m は大きく低下している。その一方で，1 週間の冷凍保存後に解凍した場合は，水分量の少ない藻体のほうが F_v/F_m に顕著な回復が見られた。さらに，– 2ºC と比べ，– 20ºC のほうがより長期間の冷凍後も高い F_v/F_m を示すことも報告されている。そして，これらの測定で得られた結果に基づき，海水面が凍結する前に，養殖網を乾燥させ – 20ºC で冷凍保存し，海氷が溶けた後に再開する方法を提案している。

またその他にも，北大西洋沿岸の潮間帯に生育する *Porphyra umbilicalis* Kützing についても報告例がある（Green & Neefus 2014, 2016）。*Po. umbilicalis* は，食用として利用もされるため，北西大西洋沿岸などで養殖への導入が試みられている（Blouin 2007）。Green & Neefus (2016) では，生育に至適な環境を明らかにするため，温度や光条件などの複合的な環境要因による様々な影響について報告している。報告では，*Po. umbilicalis* の配偶体を対象に水温，光量，光周期を変化させ，その 36 通りの組み合わせについて，成長速度，F_v/F_m，色素と蛋白含有量について測定を行っている。彼女らの測定の結果，F_v/F_m については光周期が 12L：12D もしくは 16L：8D の場合，照射される光量の増加に伴い，その値が低下することが明らかとされた。また，培養期間が長くなるにつれ，F_v/F_m は低下する傾向があることも報告されている。そして，このような光合成収率の低下は，光による損傷を防ぐための防御反応を反映したものではないかと推察し，今後のさらなる研究の必要性について言及している。

このように，産業が抱える問題の解決や，藻類の光合成を理解するための一つの手法として，PAM を利用した蛍光測定が，様々な種類，地域において試みられている。本稿では，アマノリ類への応用例に限定して紹介を行ったが，他の藻類に関しても様々な報告が行われている。今後の研究の進展にも期待したい。

引用文献

Blouin, N., Xiugeng, F., Peng, J., Yarish, C. & Brawley, S. H. 2007. Seeding nets with neutral spores of the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützing for use in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). Aquaculture 270: 77–91.

Bolton, J. J. & Lüning, K. 1983. Optimal growth and maximal survival temperatures of Atlantic *Laminaria* species (Phaeophyta) in culture. Mar. Biol. 66: 89–94.

Campbell, S., McKenzie, L. & Kerville, S. 2006. Photosynthetic responses of seven tropical seagrasses to elevated seawater temperature. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 330: 455–468.

Dring, M. J. 1967. Effects of daylength on growth and reproduction of the conchocelis-phase of *Porphyra tenera*. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 47: 501–510.

Gao, S., Niu, J., Chen, W. et al. 2013. The physiological links of the increased photosystem II activity in moderately desiccated *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) to the cyclic electron flow during desiccation and re-hydration. Photosynth. Res. 116: 45–54.

Gevaert, F., Creach, A., Davoult, D., Holl, A. C., Seuront, L. & Lemoine, Y. 2002. Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. Plant Cell Environ. 25: 859–872.

Green, L. A. & Neefus, C. D. 2014. The effect of short- and long-term freezing on *Porphyra umbilicalis* Kützing (Bangiales, Rhodophyta) blade viability. J. Exp. Mar. Bio. Eco. 461: 499–503.

Green, L. A. & Neefus, C. D. 2016. Effects of temperature, light level, and photoperiod on the physiology of *Porphyra umbilicalis* Kützing from the Northwest Atlantic, a candidate for aquaculture. J. Appl. Phycol. 28:

1815–1826.

Iwasaki, H. 1961. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. Biol. Bull. 120: 173–187.

Jia, Z., Niu, J., Huan, L., Wu, X., Wang, G. & Hou, Z. 2013. *Cyclophilin participates* in responding to stress situations in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). J. Phycol. 49: 194–201.

菊地則雄 2012．アマノリ．渡邉信（編・監修）藻類ハンドブック．pp. 611–616，株式会社エヌ・ティー・エス，東京．

右田清治 1964．アマノリ葉体の生体凍結保存– 1：海水中および半乾燥状態で凍結保存したアサクサノリ葉体の生存能力について．長崎大学水産学部研究報告 17: 44–54．

右田清治 1966．アマノリ葉体の生体凍結保存– 2：冷却速度と葉体含水量の耐凍性に及ぼす影響．長崎大学水産学部研究報告 21: 131–138．

Miura, A. 1988. Taxonomic studies of *Porphyra* species cultivated in Japan, referring to their transition to the cultivated variety. J. Tokyo Univ. Fish. 75: 311–325.

村瀬昇・前川行幸・松井敏夫・大貝政治・片山舒康・齋藤宗勝・横浜康継 1993．アナアオサの不稔性変異株の生長と光合成 – 温度特性．日本水産学会誌 60: 625–630．

Satomi, M., Aruga, Y. & Iwamoto, K. 1968. Effect of aging on the seasonal change in photosynthetic activity of Porphyra yezoensis grown in the culture ground. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 34: 17–22.

芹澤如比古・高木裕行・倉島彰・横浜康継 2001．伊豆半島南部，下田市鍋田湾における海水の硝酸態窒素濃度と褐藻カジメの光合成活性の季節変化．日本水産学会誌 67: 1065–1071．

園池公毅 2009．クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定．低温科学 67: 507–524．

tom Dieck, I. 1992. North Pacific and North Atlantic digitate *Laminaria* species (Phaeophyta): hybridization experiments and temperature responses. Phycologia 31: 147–163.

Wang, W. J., Wang, F. J., Zhu, J. Y., Sun, X. T., Yao, C. Y. & Xu, P. 2011. Freezing tolerance of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) gametophyte assessed by chlorophyll fluorescence. J. Appl. Phycol. 23: 1017–1022.

渡邉裕基・Gregory N. Nishihara・寺田竜太 2013．熊本産アサクサノリ天然配偶体の光合成に対する光と温度の影響．藻類 61: 141–148．

Watanabe, Y., Morikawa, T., Mine, T., Kawamura, Y., Nishihara, G. N. & Terada, R. 2017. Chronological change and the potential of recovery on the photosynthetic efficiency of *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* (Bangiales) during the sporelings frozen storage treatment in the Japanese Nori cultivation. Phycol. Res. 65: 265–271.

Watanabe, Y., Nishihara, G. N., Tokunaga, S. & Terada, R. 2014a. Effect of irradiance and temperature on the photosynthesis of a cultivated red alga, *Pyropia tenera* (= *Porphyra tenera*), at the southern limit of distribution in Japan. Phycol. Res. 62: 187–196.

Watanabe, Y., Nishihara, G. N., Tokunaga, S. & Terada, R. 2014b. The effect of irradiance and temperature responses and the phenology of a native alga, *Undaria pinnatifida* (Laminariales), at the southern limit of its natural distribution in Japan. J. Appl. Phycol. 26: 2405–2415.

Watanabe, Y., Yamada, H., Mine, T., Kawamura, Y., Nishihara, G. N. & Terada, R. 2016. Photosynthetic responses of *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* (Bangiales, Rhodophyta) to a thermal and PAR gradient vary with the life-history stage. Phycologia 55: 665–672.

Winters, G., Loya, Y., Röttger, R. & Beer, S. 2003. Photoinhibition in shallow-water colonies of the coral *Stylophora pistillata* as measured in situ. Limnol. Oceanogr. 48: 1388–1393.

Xu, D., Qiao, H., Zhu, J., Xu, P., Liang, C., Zhang, X., Ye, N. & Yang, W. 2012. Assessment of photosynthetic performance of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) in conchocelis phase. J. Phycol. 48: 467–470.

横浜康継・前川行幸 1988．プロダクトメーター（差働式検容計）による大型試料の光合成および呼吸測定．藻類 36: 29–36．

（神戸大学内海域環境教育研究センター）