イネ実生の総可溶性タンパク質量を増加させる窒素源の探索

A search of a nitrogen source that increases the amount of total soluble protein in rice seedlings

岡崎　百花[1,2]，杉尾　花音[1,3]，春原　美咲[1,4]，木村　知美[1,5,11]，菊池　涼汰[1,6,12]，津川　真央[7,8,13]，叶内　愛莉[9]，清水　瞭太[10]、竹島　幸乃[9]，伊藤　幸博[1,10]

OKAZAKI Momoka[1,2], SUGIO Kanon[1,3], SUNOHARA Misaki[1,4], KIMURA Tomomi[1,5,11], KIKUCHI Ryota[1,6], TSUGAWA Mao[7,8], KANOUCHI Airi[9], SHIMIZU Ryota[10], TAKESHIMA Yukino[9], ITO Yukihiro[1,10]

東北大学「科学者の卵養成講座」[1]，東京学芸大学附属高等学校[2]，渋谷教育学園渋谷高等学校[3]，横浜市立横浜サイエンスフロンティア高等学校[4]，宮城県古川高等学校[5]，岩手県立一関第一高等学校[6]，グローバルサイエンスキャンパス広島[7]，広島県立福山誠之館高等学校[8], 東北大学農学部[9], 東北大学大学院農学研究科[10], 現所属：東北大学農学部[11], 現所属：東京理科大学理学部第一部[12]，現所属：岡山大学教育学部[13]

EGGS, Tohoku University[1], Tokyo Gakugei University Senior High School[2], Shibuya Senior High School[3], Yokohama Science Frontier High School[4], Furukawa Senior High School[5], Ichinoseki Daiichi Senior High School[6], Global Science Campus Hiroshima[7], Fukuyama Seishikan High School[8], Faculty of Agriculture, Tohoku University[9], Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University[10], Present address: Faculty of Agriculture, Tohoku University[11], Present address: Faculty of Science, Tokyo University of Science[12], Present address: Faculty of Education, Okayama University[13]

Corresponding Author's e-mail: yukito@tohoku.ac.jp

(Received: 29 May 2024; Accepted: 20 September 2024; Released: 15 November 2024)

［要約］

本研究では、イネもやしを用いて有用タンパク質を生産することを念頭に、植物培養用の培地やクラゲ溶解液がイネ実生の総可溶性タンパク質量に与える影響を調べた。イネの種子を明所および暗所で発芽させ、発芽後7日、10日、14日の総可溶性タンパク質量を調べたところ、明所、暗所ともに培地を添加すると総可溶性タンパク質量が大幅に増加することがわかった。窒素源としては有機態窒素より無機態窒素がタンパク質量増加効果が大きかった。クラゲ溶解液の添加でも総可溶性タンパク質量の増加は見られたが、培地の添加よりは増加量が少なかった。以上の結果、培地やクラゲ溶解液等の肥料となる成分を添加することにより、イネ実生の総可溶性タンパク質量が増加することがわかった。ただし、クラゲ溶解液の効果は低く、タンパク質量増加効果を十分発揮させるには塩化ナトリウムの濃度を低下させ、増加効果をもたらす成分を濃縮する必要があると考えられた。

［キーワード］タンパク質生産，培地，クラゲ，イネ

Protein production, Medium, Jellyfish, Rice

1．はじめに

タンパク質には、日々の生活で利用されたり、医療に用いられるものが多数存在する。しかし、安価な合成法がなく、微生物や動物細胞を培養して生産されており、生産コストの高さが問題の１つとなっている。さらに、毒素や病原体の混入のリスクも抱えている。

安価で安全なタンパク質生産法として、植物を使った手法が期待されている（Fischer and Buyel 2020）。植物は太陽光をエネルギー源として自ら光合成を行うため、植物の生育には水と肥料を与えるだけでよく、低コストの生産が期待できる。また、植物は室温で長期間保存することが可能であり、植物が生産したタンパク質も同様に長期間保存できる。そのため、輸送や保存に冷蔵、冷凍が必要なく、これらのコストも削減することができる。さらに、微生物や動物細胞を用いて生産させる場合には、常に毒素や病原体の混入の可能性が伴うが、植物で生産した場合にはヒトを含む動物に感染する病原体が混入する可能性が極めて低く、安全性が高いという利点もある。一方、植物が生産するタンパク質の量は動物細胞や微生物より少なく、タンパク質量を増加させる手法の開発が必要である。

私たちは、イネもやし（暗所で発芽したイネの実生）を用いて有用タンパク質を生産する手法の開発を行っており、その過程で、MS 培地の添加により総可溶性タンパク質量が増加することを見出した（Watanabe et al 2022）。MS 培地は植物の培養に最も頻繁に用いられる培地で、植物の生育に必要な各種ミネラル成分が含まれている。さらに、MS 培地の成分の中で特に窒素、カリウム、硫黄が総可溶性タンパク質量の増加に効果があること、窒素は硝酸態窒素の方がアンモニア態窒素よりタンパク質増量効果が高いことも明らかにした（Watanabe et al 2022）。また、MS 培地添加条件では、種子

©2024 The EGGS program committee of Tohoku University

の大きさとイネもやし1個体あたりの総可溶性タンパク質量に正の相関が見られることも明らかにした。イネもやしでタンパク質を生産することは、胚乳のデンプンをタンパク質に変換することであるが、これらの結果は、窒素、カリウム、硫黄などのミネラルの量が種子では限られており、それがタンパク質量を制限する要因となっていることを示している。このことは、これらのミネラルを添加することにより、イネもやしが生産するタンパク質量を増加させることが可能であることを意味している。

クラゲは刺胞動物門に属する動物で、その多くが海水中に生息している。クラゲの一部は食用にされ、また、観賞用に飼育されることもあるが、多くの種が触手をもち、刺傷事故を起こすこともある。また、漁具の破損等の漁業被害や火力発電所、原子力発電所等の海水取水口に押し寄せることによる出力制限などの産業上の被害も出ており、そのようなクラゲの回収と廃棄処理が行われている。

廃棄処理されるクラゲの有効利用を目指して、クラゲの新たな利用法を開発しようという研究が行われている。クラゲ溶解液をチンゲンサイ、エダマメ、シソに肥料として与えたところ、チンゲンサイの可食部の重さが増加し、エダマメとシソの生育の向上が見られた（Fukushi et al 2003）。ホウレンソウでも可食部の増収が見られた（福士ら 2005）。さらにカイワレダイコンとサンチュの生育も向上した（津川 2022）。これらの結果は、クラゲ溶解液を植物の成長促進剤として利用可能であることを示している。

本研究では、イネ実生の総可溶性タンパク質量の増加を目指し、その効果が大きい培地の探索を行った。さらに、クラゲの新たな利用法の開発を目指し、日本近海で最も頻繁にみられるミズクラゲ（*Aurelia aurita*）を用い、その溶解液の添加がイネ実生の総可溶性タンパク質量に与える影響も調査した。

２．実験方法

・ミズクラゲの採取

ミズクラゲは広島県福山市の沿岸で2022年および2023年の夏に採取した。採取したクラゲは一晩バケツにいれて室温で静置し、溶解後、-20℃で保存した。

・イネの発芽、生育

イネ（*Oryza sativa*）品種、日本晴とPokkaliを用いた。次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌後、直径9 cmのシャーレに播種した。シャーレには高圧蒸気滅菌した濾紙1枚とMS培地、N6培地、AA培地、0.3%および0.03%塩化ナトリウム溶液、濾過滅菌した各濃度のクラゲ溶解液を加えた。ショ糖を添加する場合は、濃度を3%とした。溶液の量は5 mLに合わせた。1枚のシャーレには10粒を播種した。パラフィルムで封印した後、28℃、24時間、明条件あるいは暗条件で各日数、保温した。

MS培地（Murashige and Skoog 1962）はムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(塩谷エムエス)、N6培地(Chu et al 1975)はChu N6 Basal Salt Mixture（PhytoTech LABS）を用い、AA培地（Toriyama and Hinata 1985）は富士フィルム和光純薬の試薬を混合して作製した。

・タンパク質量の測定

各条件から生育の良いイネ実生5個体を選抜し、1個体ずつ総可溶性タンパク質を抽出した。まず、液体窒素で凍結させ、乳棒、乳鉢を用いて粉砕したのち,TBSを1mL加え、さらによくすり潰した。1.5mLチューブに全量移し、-20℃で保存した。

タンパク質濃度の測定はバイオ・ラッドプロテインアッセイ（バイオ・ラッド）を用いてブラッドフォード法で測定した。検量線はウシ血清アルブミンを用いて作成した。

検定はTukeyの多重検定を用いた。

３．結果と考察

・各培地の総可溶性タンパク質量に与える影響

イネの培養によく用いられる3種類の培地、MS培地（Murashige and Skoog 1962）、N6培地（Chu et al 1975）、AA培地（Toriyama and Hinata 1985）の総可溶性タンパク質量に与える影響を調べた。MS培地とN6培地は無機態窒素を窒素源とし、AA培地は有機態窒素であるアミノ酸を窒素源としている。

イネ品種日本晴を3%のショ糖を含む各培地に播種し、明所あるいは暗所で発芽、生育させ、播種7日後、10日後、14日後に可溶性タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質の濃度を測定し、抽出液の量を掛けて総可溶性タンパク質量とし

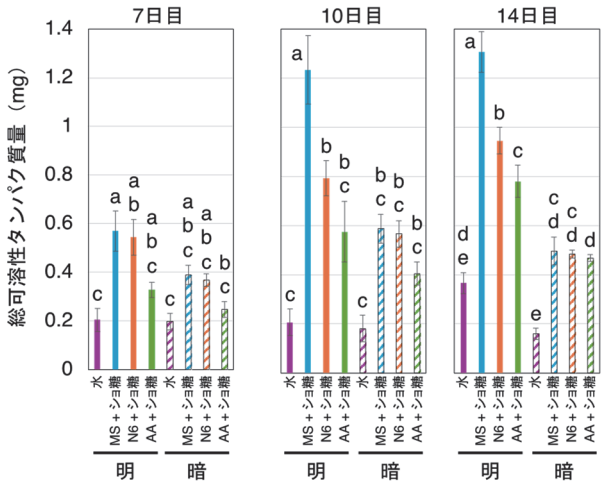

図1、各培地で発芽、生育したイネ実生の個体あたりの総可溶性タンパク質量

3%ショ糖を添加した培地にイネ品種日本晴を播種し、明所あるいは暗所で7日後、10日後、14日後の総可溶性タンパク質量を測定した。各日数の異なるアルファベットは5%水準で有意差があることを示す。n = 5。

た。結果は図 1 に示した。

総可溶性タンパク質量を播種後の日数で比較すると、3 種類のいずれの培地を用いた場合でも、播種後 10 日から 14 日が最も総可溶性タンパク質量が多かった。水だけの場合は大きな差は見られなかった。

培地の有無および種類で比較すると、水だけの場合が日数および明暗によらず、常に最も総可溶性タンパク質の量が少なかった。3 種類の培地を比較すると、日数および明暗によらず、MS 培地が最も多く、次に N6 培地が多かった。MS 培地と N6 培地は窒素源が無機態窒素であり、AA 培地は有機態のアミノ酸であることから、無機態窒素の方がイネ実生の総可溶性タンパク質量を増加させると考えられた。

明暗で比較すると、3 種類の培地のいずれの日数も明所の方が暗所より総可溶性タンパク質量が多く、1.3 倍から 2 倍であった。水だけの場合、7 日目と 10 日目では差が見られず、14 日目では明所の方が多かった。

イネ実生を用いて有用タンパク質を生産する場合、遺伝子組換え体の規制と医薬品タンパク質の場合は生産管理の点から植物工場で栽培することになる。植物工場では電気エネルギーを用いて植物に光を当てており、その電気コストがかかる。さらに、用いた電気エネルギーは最終的にはほぼ全てが熱に変換されるため、空調の電気コストもかかる。暗所での総可溶性タンパク質量は明所より少なかったものの、暗所でのこれらの電気コストの大幅な削減は有用タンパク質を生産する際の大きな利点であると考えられる。

・クラゲ溶解液の総可溶性タンパク質量に与える影響

イネ品種日本晴と Pokkali を各濃度のクラゲ溶解液に播種し、10 日後の総可溶性タンパク質量を調べた。Pokkali は耐塩性品種であることが知られている。

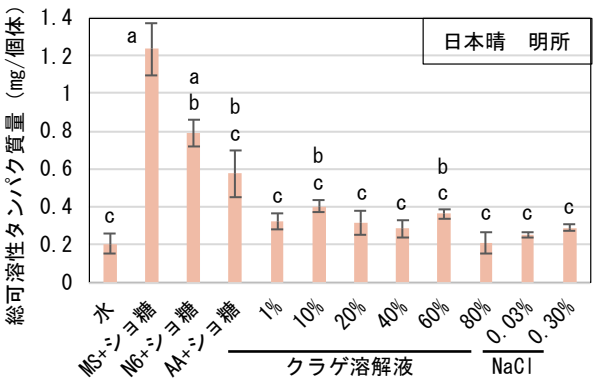

図 2、クラゲ溶解液を添加した明所で発芽、生育した日本晴の実生の総可溶性タンパク質量

イネ品種日本晴をショ糖を添加した培地、クラゲ溶解液、塩化ナトリウム溶液に播種し、明所で 10 日後の個体あたりの総可溶性タンパク質量を測定した。異なるアルファベットは 5%水準で有意差があることを示す。n = 5。

日本晴を明所で発芽、生育させた場合、クラゲ溶解液の濃度が 60%までは、水だけの場合と比較して総可溶性タンパク質量の増加が見られた（図 2）。また、0.03%および 0.3%の塩化ナトリウムを添加しても水だけの場合とほぼ同量の総可溶性タンパク質量となった。クラゲ溶解液 100%では、発芽が見られなかった。塩害の結果と考えられた。

Pokkali を明所で発芽、生育させた場合、クラゲ溶解液の濃度が 80%までは、水だけの場合と総可溶性タンパク質量に大きな違いは見られなかった（図 3）。0.03%および 0.3%の塩化ナトリウムを添加した場合は水だけの場合より総可溶性タンパク質量が減少した。クラゲ溶解液には海水と同程度の塩が含まれていると推定されることから、クラゲ溶解液の添加

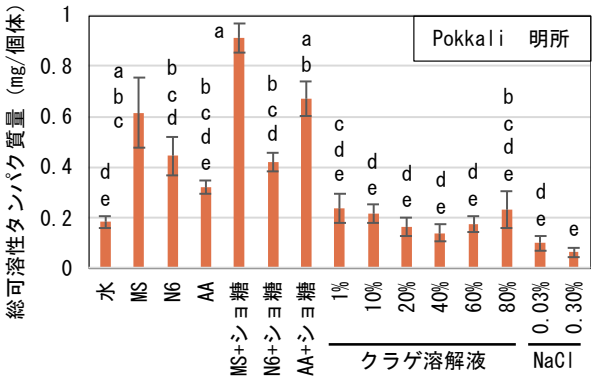

図 3、クラゲ溶解液を添加した明所で発芽、生育した Pokkali の実生の総可溶性タンパク質量

イネ品種 Pokkali を培地、クラゲ溶解液、塩化ナトリウム溶液に播種し、明所で 10 日後の個体あたりの総可溶性タンパク質量を測定した。異なるアルファベットは 5%水準で有意差があることを示す。n = 5。

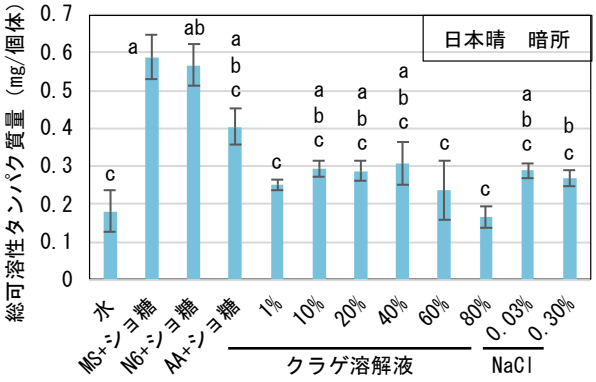

図 4、クラゲ溶解液を添加した暗所で発芽、生育した日本晴の実生の総可溶性タンパク質量

イネ品種日本晴をショ糖を添加した培地、クラゲ溶解液、塩化ナトリウム溶液に播種し、暗所で 10 日後の個体あたりの総可溶性タンパク質量を測定した。異なるアルファベットは 5%水準で有意差があることを示す。n = 5。

により総可溶性タンパク質量は増加しようとするが、塩害によりそれが相殺されたと考えられた。クラゲ溶解液 100%では、発芽が見られなかった。Pokkali は耐塩性品種と知られているが、実生期の総可溶性タンパク質量に関しては、日本晴と比較して耐塩性を示さないと考えられた。

次に、暗所でのクラゲ溶解液の総可溶性タンパク質量に与える影響を調べた（図 4）。まず日本晴を明所と同様に播種したところ、クラゲ溶解液 60%までは総可溶性タンパク質量の増加が見られた。80%では水だけと同量で、100%では発芽が見られなかった。0.03%および 0.3%の塩化ナトリウムを添加しても、総可溶性タンパク質量の減少は見られず、逆にやや増加した。

次に、Pokkali の総可溶性タンパク質量を調べた（図 5）。Pokkali ではクラゲ溶解液 80%までは総可溶性タンパク質量の増加が見られた。80%では日本晴と同程度の総可溶性タンパク質量であったが、それ以外は塩化ナトリウムを添加した場合も含めて日本晴より総可溶性タンパク質量が少なかった。

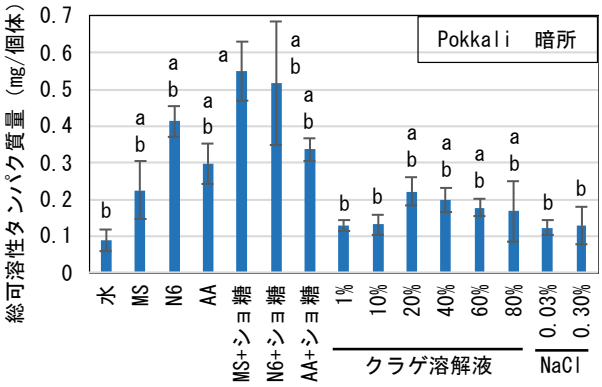

図 5、クラゲ溶解液を添加した暗所で発芽、生育した Pokkali の実生の総可溶性タンパク質量

イネ品種 Pokkali を培地、クラゲ溶解液、塩化ナトリウム溶液に播種し、暗所で 10 日後の個体あたりの総可溶性タンパク質量を測定した。異なるアルファベットは 5%水準で有意差があることを示す。n = 5。

以上の結果、クラゲ溶解液は総可溶性タンパク質量を増加させる効果があるが、その程度は小さいと考えられた。クラゲ溶解液中のタンパク質量を増加させる成分の濃度が低いためと考えられる。MS 培地も濃度を下げて添加すると、濃度に応じて総可溶性タンパク質量が減少する（Watanabe et al 2022）。塩化ナトリウムを除去し、クラゲ溶解液を濃縮して添加すれば、イネもやしの総可溶性タンパク質量をさらに増加させることができる可能性がある。

4．結論

イネでよく用いられる 3 種類の培地の総可溶性タンパク質量に与える効果を比較した結果、無機態窒素を含む MS 培地、N6 培地が最も効果が高かった。窒素源として有機態のアミノ酸を含む AA 培地も総可溶性タンパク質量を増加させる効果が見られたが、MS 培地、N6 培地よりは低かった。クラゲ溶解液は総可溶性タンパク質量を増加させる効果があるが、その程度は小さかった。クラゲ溶解液を添加した効果は、Pokkali より日本晴が大きかった。クラゲ溶解液の効果を高めるには、塩化ナトリウムの濃度を低下させて塩害の発生を防止したうえで、他の成分を濃縮して利用することが必要と考えられた。

謝辞

本研究は東北大学「科学者の卵養成講座」（JST グローバルサイエンスキャンパス、JST 次世代科学技術チャレンジプログラム、三菱みらい育成財団）および広島大学グローバルサイエンスキャンパス広島（JST グローバルサイエンスキャンパス）の支援のもとで実施された。

引用及び参考文献

津川真央（2022）クラゲの肥料としての活用. *グローバルサイエンスキャンパス令和 4 年度全国受講生研究発表会 研究成果の要約集* 9

福士惠一、辻本淳一、横田久里子（2005）クラゲ中の無機成分の.定量. *分析化学* 54, 175-178

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* (Peking) 18, 659–668

Fischer R, Buyel JF (2020) Molecukar farming – the slope of enlightenment. *Biotech. Adv.* 40, 107519

Fukushi K, Ishio N, Tsujimoto J, Yokota K, Hamatake T, Sogabe H, Toriya I, Ninomiya T (2003) Preliminary study on the potential usefulness of jellyfish as fertilizer. *Bull. Soc. Sea Water Sci. Jpn.* 58, 209-217

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497

Toriyama K, Hinata K (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41, 179-183

Watanabe A, Hatanaka Y, Takeshima Y, Sasaki K, Takahashi N, Ito Y (2022) Evaluation of protein production in rice seedlings under dark conditions. *Sci. Rep.* 12, 7759