

微細藻 SY-4 の分離と同定 並びに培養特性について

阪本憲司・沖増英治・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Isolation and Identification of a Microalga, SY-4, and Characteristics of the Autotrophic Culture.

Kenji Sakamoto, Eiji Okimasu and Akinori Amemura

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No. 5, 1-15 (1994).

A microalga, SY-4, capable of growing well at 35 °C was isolated from the Mekari Strait, Seto inland sea. SY-4 was characteristic of procaryote and unicellular spherocyte (4-5 μm in diameter) containing phycobiliprotein, and was classified into a blue-green alga (cyanobacterium), *Synechocystis*. SY-4 grew autotrophically and utilized ammonium sulfate more efficiently than sodium nitrate. Its optimum temperature, salinity and pH for growth were 25°C, 10‰ and 7, respectively.

海産微細藻類は、魚介類種苗生産の初期餌料として、また、動物性餌料シオミズツボワムシ等の餌料として利用され、水産増養殖において極めて重要な位置を占めている。とくに近年は、「つくり育てる漁業」など漁業体制の変化から、種苗の需要が増大し、餌料系列の第一段階である微細藻類の供給量の確保が重要で、その計画的安定生産が強く望まれている。

現在、各種苗生産機関で利用されている微細藻類は、比較的培養が容易な種類ではあるが、純粹大量培養や夏場の高温季における屋外培養が困難であるなど、その生産には限界がある。

このような状況下で、より優れた微細藻類の導入が望まれている。そこで本研究では、因島近海から未知の有用微細藻類の探索と分離を行い、得られた微細藻 SY-4 の同定と培養法の検討を行った。

実験材料および方法

SY-4の分離

因島の北東に位置する八重子島近海表層より、プランクトン・ネット(口径 18 cm, $\phi 75\mu\text{m}$)を用いて、船上より海水を採取した。直ちに採取した海水を $\phi 100\mu\text{m}$, 次いで $\phi 20\mu\text{m}$ のメッシュで濾過し、試料瓶に入れ氷上保存した。予め 500 ml 容坂口フラスコに調製しておいた培地(改変岩崎培地^{*1}) 100 ml に試料を適当量加え、 35°C , 100 rpm, 3000 lux \cdot 14 h/dayで振とう培養を行った。

培養開始 7 日後、優先的に増殖してきた藍青色の微細藻を寒天平板上で単一コロニーとして分離し、SY-4 と名付けた。

^{*1}改変岩崎培地 (mg/ ℓ 海水): NaNO_3 , 70; KH_2PO_4 , 4.5; Na-EDTA, 3.3; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.5; KNO_3 , 72.2; Na_2SiO_3 , 50; Clewat 32, 19; Vitamin B_{12} , 0.1; Biotin, 0.005; Vitamin B_{12} , 0.001; Na_2 -glycerophosphate, 25

核染色観察

SY-4を 1%(V/V)ホルマリンで固定し、遠心分離(3000 rpm, 15 min, 4°C)を行った。上澄みを除き、細胞を精密濾過海水に懸濁し、試料とした。試料に bisbenzimidazole (H 33342, 和光純薬工業(株))を添加し、 25°C で 30 min 反応を行った。反応後、精密濾過海水で細胞を洗浄し、倒立型落射蛍光顕微鏡(Olympus IMT2, IMT2-NIC)で観察を行った。

色素蛋白質分析

SY-4からの水溶性色素の分離・精製は、藻類細胞のフィコビルリン色素蛋白質の分離精製法^{1, 2)}に基づいて行った。

SY-4を 800 ml の改変岩崎培地で 7 日間、 35°C , 100 rpm, 3000 lux \cdot 14 h/dayで培養し、培養液を遠心分離(3000 rpm, 15 min, 4°C)し、細胞を集めた。上澄みを除き、細胞を 10^{-2} Mリン酸緩衝液(pH 6.5) 2.4 ℓ で洗浄し、遠心分離(3000 rpm, 15 min, 4°C)して細胞を集めた。再度細胞を同緩衝液 1.2 ℓ で洗浄し、遠心分離で細胞を集めた。細胞を、超音波発生機(UD-201, (株)トミー精工)で超音波処理(out put 3, 1 min \times 5, $5\sim 10^{\circ}\text{C}$)した。細胞破壊後、小型超遠心機(CS 1000, 日立工機(株))で遠心分離(43,000 rpm= $100,000\times g$, 1 hr, 4°C)を行った。クロロフィル、カロチノイド等水不溶性色素が細胞膜とともに沈殿する。上澄み(粗抽出液)を別の遠心管に取り 450 ~ 700 nm の吸光度を測定した(最大吸収を示す波長の吸光度が 3~4 になるように 10^{-2} Mリ

ン酸緩衝液で希釈)。粗抽出液に固体硫酸を40%飽和となるように加え³⁾、冷蔵庫内(4℃)で攪拌しながら2時間放置した。その後、高速冷却遠心機(CX-250, 株トミー精工)で遠心分離し(10,000 rpm = 12,300 ×g, 15 min, 4℃), 上澄みと沈澱(40%沈澱物)に分けた。その上澄みに、固体硫酸を50%飽和となるように加え³⁾、冷蔵庫内(4℃)で攪拌しながら2時間放置した。遠心分離(10,000 rpm = 12,300 ×g, 15 min, 4℃)し、上澄みと沈澱(50%沈澱物)に分けた。その上澄みに、固体硫酸を65%飽和となるように加え³⁾、冷蔵庫内(4℃)で攪拌しながら2時間放置した。遠心分離(10,000 rpm = 12,300 ×g, 15 min, 4℃)し、上澄みと沈澱(65%沈澱物)とに分けた。硫酸の各飽和度での沈澱物を0.2 M 塩化ナトリウム/10⁻³ Mリン酸緩衝液 1~2 mlに溶解し、予め1 mM EDTAで煮沸し、蒸留水で洗浄しておいた透析チューブに入れ同緩衝液を外液として透析を行った。途中、2回緩衝液を入れ換えて、冷蔵庫内(4℃)で攪拌しながら1夜放置した。透析後、透析試料を micro centrifuge tube に移し、微量高速冷却遠心機(CR15B, 日立工機株)で遠心分離(12,000 rpm = 11,400 ×g, 5 min, 4℃)した。不溶物を除いた後上澄みを濾過して、予め0.2 M塩化ナトリウム/10⁻³ Mリン酸緩衝液で洗浄(流速0.3 ml/min, 1 h)したHPLCカラムに注入した*²。カラム非吸着成分を同溶液で洗い出した後、塩化ナトリウム濃度を変えことなく、リン酸濃度を2.5×10⁻¹ Mまで上げる linear gradient elutionにより色素を溶出した。溶出液は280 nmの波長でモニターした。さらに、カラムに残留している蛋白質を除くため、1 mlの0.1%水酸化ナトリウム溶液でカラムを洗浄した。その後、0.2 Mの塩化ナトリウム/10⁻³ Mリン酸緩衝液でカラムを平衡化して次の試料をかけた。色素蛋白質が含まれている溶出液画分を石英セルを用いて、450 ~ 700 nmの吸収スペクトルを測定した。

*²HPLC system :

UV/UV-VIS 検出器 L-4000 (株日立製作所)
インテリジェントポンプ L-6200 (株日立製作所)
クロマトデータ処理装置 D-2500 (株日立製作所)
Super fraction collector SF-2120 (Advantec)
高速ハイドロキシアパタイトカラム : TSK-gel HA-1000 Glass (東ソー株)

SY-4の培養と増殖測定

①培地の検討

試験培地は、プラシノ藻テトラセルミスや真正眼点藻ナンノクロロプシスの培養に適しているナンノクロロプシス用施肥培地*³、珪藻やハプト藻の培養に適している改変岩崎培地*¹および簡易岩崎培地*⁴の3種を用いた。

*³ ナンノクロプシス用施肥培地 (mg / ℓ 海水) : (NH₄)₂SO₄, 65; Urea, 6.4; Ca(H₂PO₄)₂, 19;
Clewat 32, 9.6

*⁴ 簡易岩崎培地 (mg / ℓ 海水) : NaNO₃, 70; KH₂PO₄, 4.5; Na-EDTA, 3.3 ; Fe(NH₄)₂ · 6H₂O,
3.5; Na₂SiO₃, 50; Clewat 32, 19; Vitamin B₁₂, 0.001

② 最適培養温度の検討

実験区に, 20°C, 25°C, 30°C および 35°C の 4 区を設けた。

③ 至適塩分濃度の検討

実験区に, 5‰, 10‰, 20‰ および 30‰ の 4 区を設けた。

④ 至適 pH の検討

実験区に, pH 5, pH 6, pH 7 および pH 8 の 4 区を設けた。

培養は, 多孔性のシリコン栓を施した 500 ml 容坂口フラスコを用い, 培養温度 25 °C, 往復振とう数 100 rpm, 照度 3000 lux · 14 h/day の条件で行った。培養の初期細胞密度は 5 × 10⁴ cells/ml とした。尚, 無菌培養を徹底するため, 培地は滅菌 (1 atm, 120°C, 20 min) したものを
用い, 各操作は無菌的に行った。

培養期間中は, 経時的に培養液を採取し, 細胞を 1 % (V/V) ホルマリンで固定した。その後, 遠心分離 (3000 rpm, 15 min) により細胞を集め, 適当量の滅菌海水に懸濁してトーマ血球計算盤で細胞数を計測した。

増殖率は, 対数期における 1 日当たりの平均分裂回数 (K) で示した。K 値は, 通常, SY-4 が 2 分裂により増殖することから, 次式により算出した⁴⁾。

$$K = [1/(t_2-t_1)] \cdot [\log (N_2-N_1)] \\ = [3.322/(t_2-t_1)] \cdot [\log(N_2-N_1)]$$

ここで, N₁ は t₁ 日目の細胞密度, N₂ は t₂ 日目の細胞密度とした。

結果および考察

1. SY-4 の分離と形態学的観察

培養開始 7 日後に, 改変岩崎培地で約 2.5 × 10⁶ cells/ml まで増殖し, 耐高温性をもつ微細藻 SY-4 (Photo 1) が得られた。また, この微細藻は上記培地を含む寒天平板上でコロニー (Photo 2) を形成するため, 単離は容易であった。

SY-4 の形態は, 細胞直径が 5 μm の球形をしており, 頂端, 基部の区別はなく, 単細胞である。

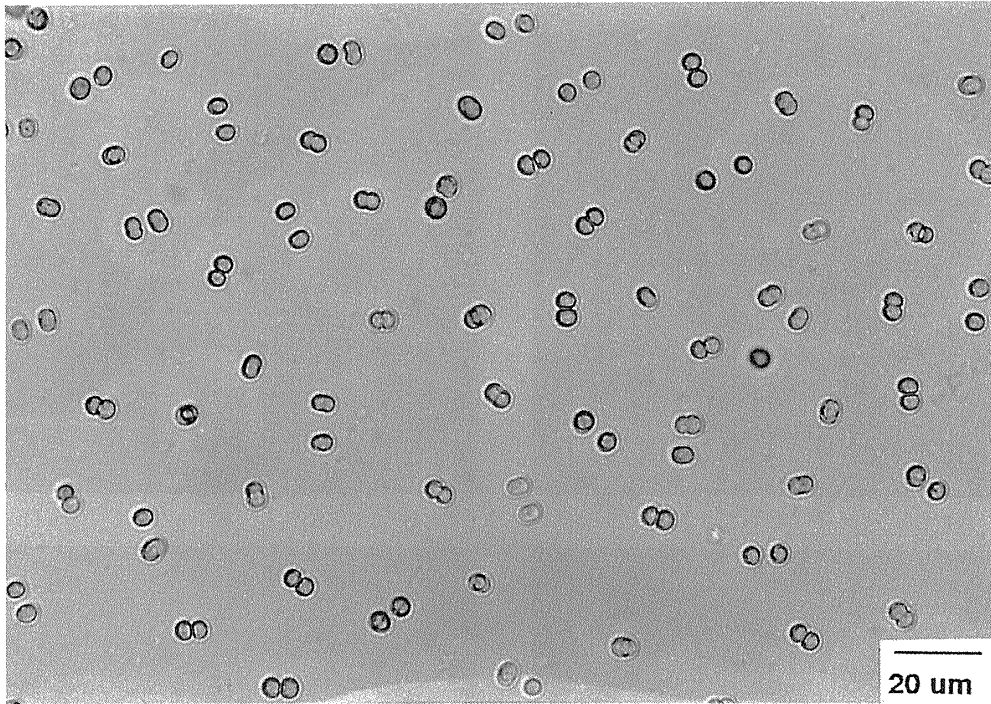


Photo 1. Micrograph of SY-4.

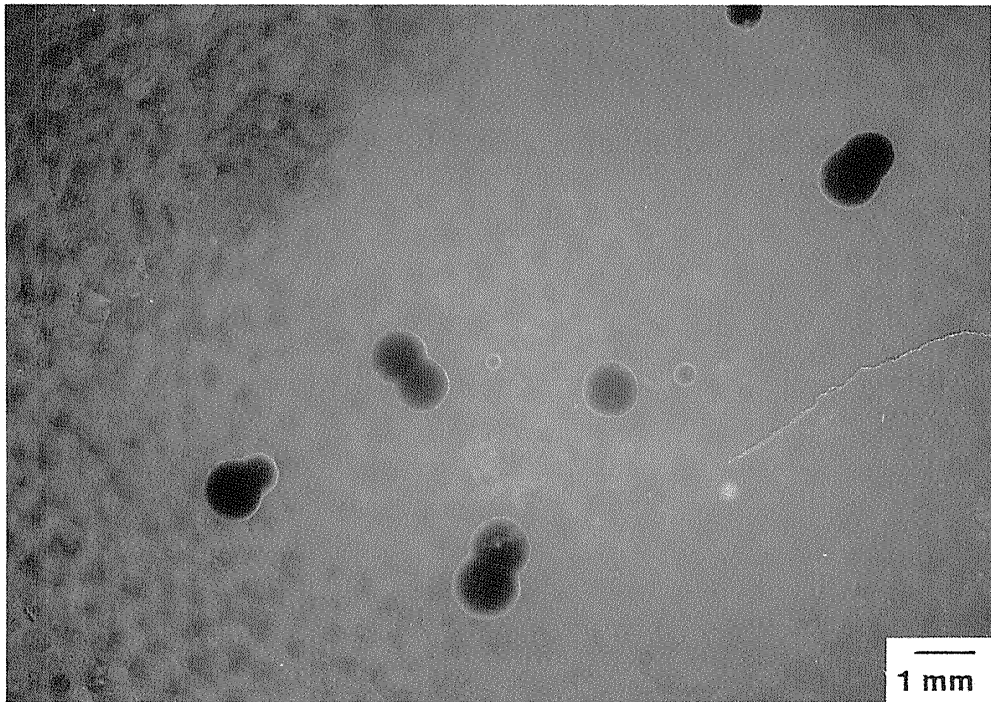


Photo 2. Colony of SY-4.

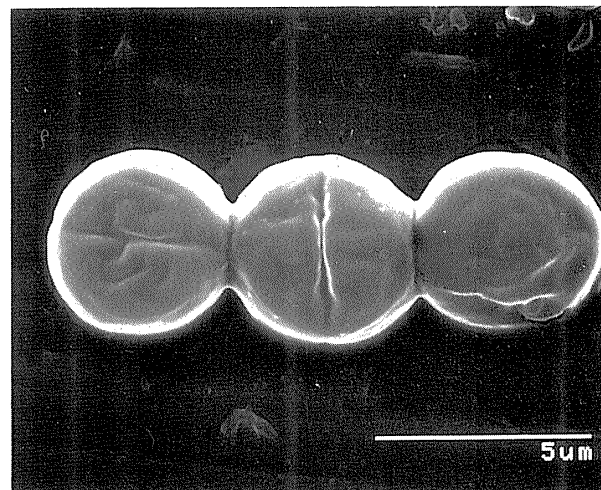
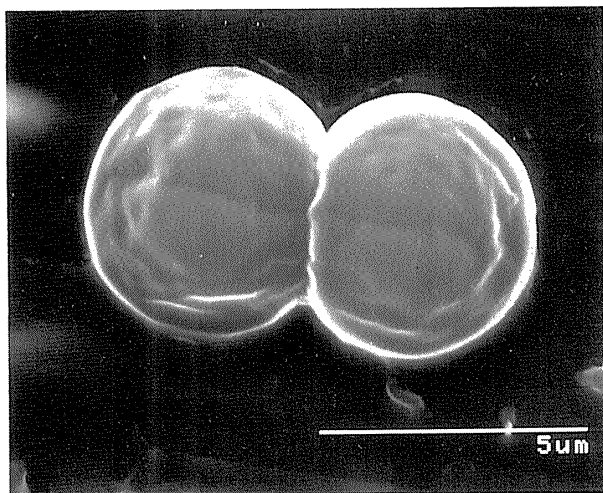
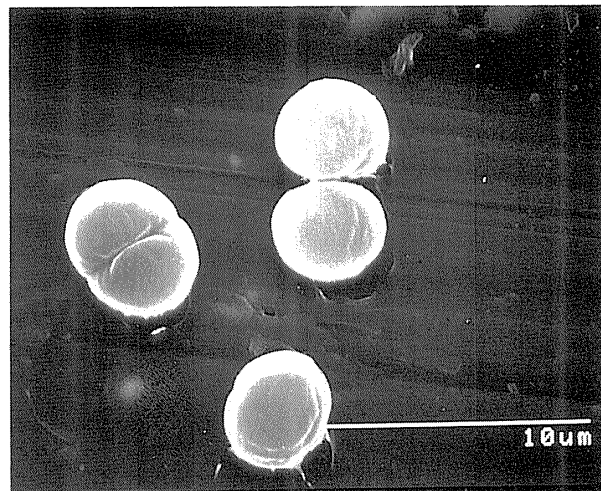
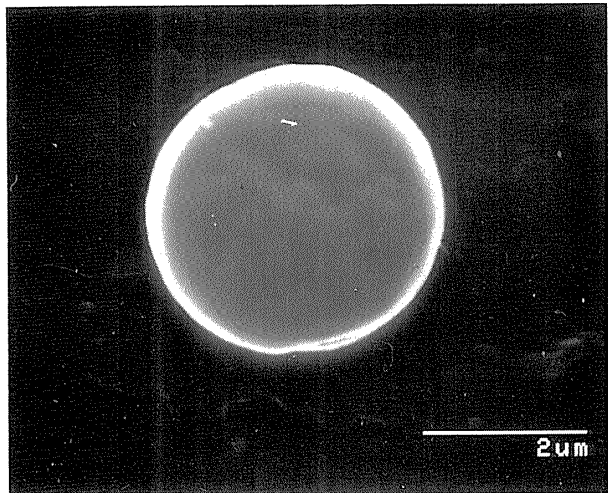
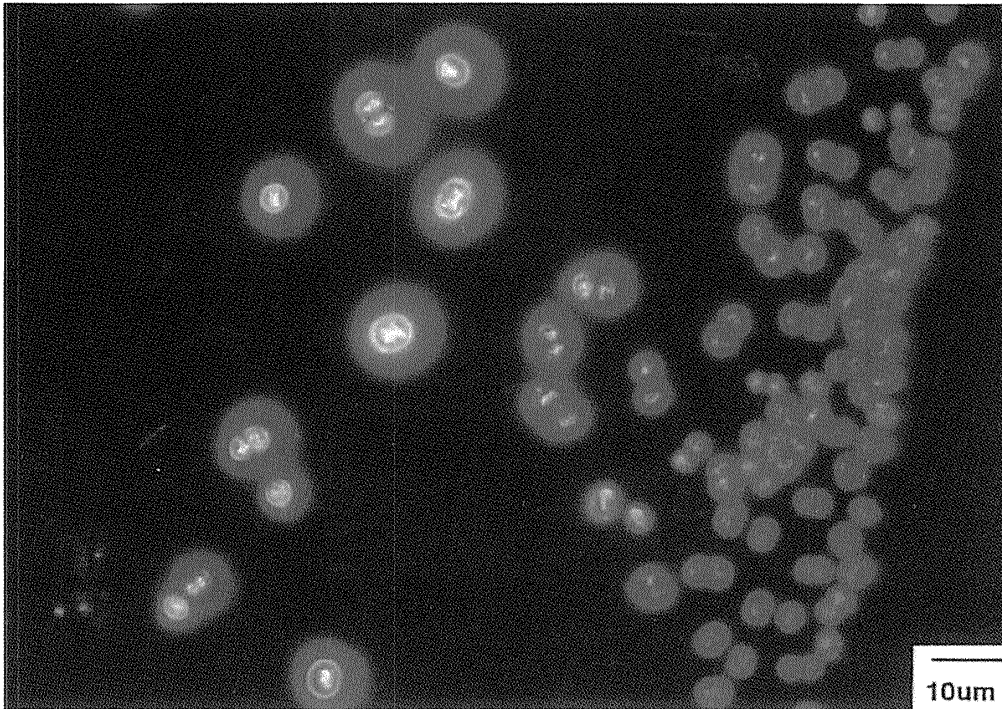


Photo 3. Scanning Electron Micrographs of SY-4.

(A)



(B)

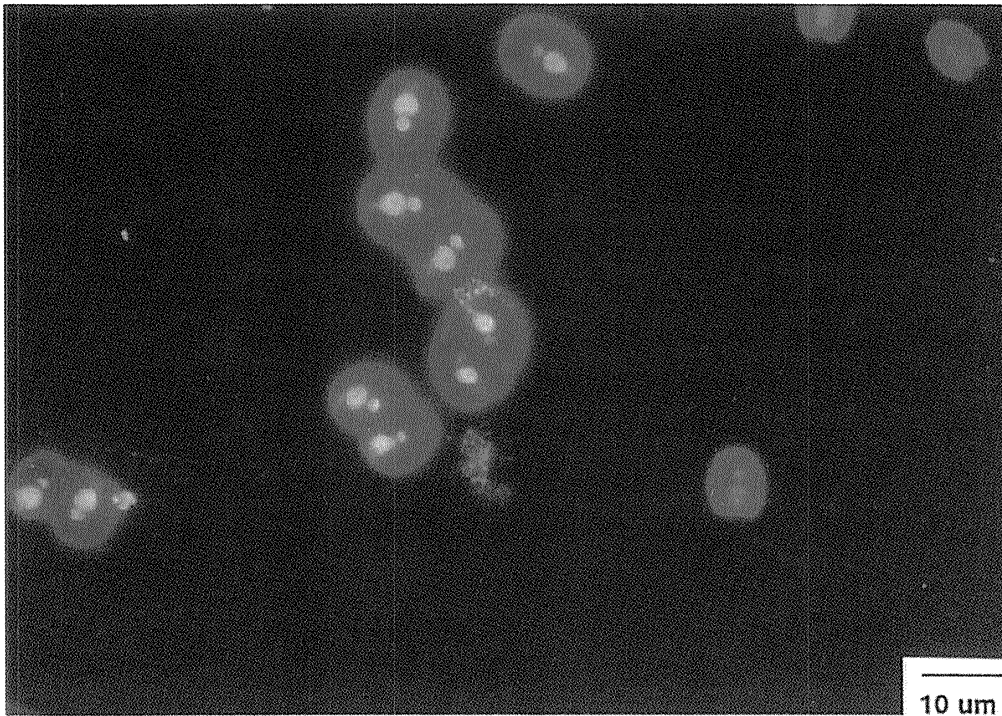


Photo 4. Micrographs of SY-4 and *Tetraselmis tetrathele* by Nuclear Staining (H 33342).

(A), SY-4; (B), *Tetraselmis tetrathele*.

増殖は、細胞の2分裂によって起こる。また、鞭毛や繊毛の類をもたず運動性はない(Photo 3)。

2. 核染色観察

SY-4には、明瞭な核構造が見られず、遺伝物質が細胞中央に存在していた。このことから、SY-4は原核細胞であることがわかった。また、対照としたプラシノ藻 *Tetraselmis tetraethele* では、核が明瞭に染まり、真核細胞の特徴を示した(Photo 4)。

3. 色素蛋白質分析

40%, 50%, 65%の各飽和硫酸沈澱物をハイドロキシアパタイトカラムを用いてリン酸緩衝液で linear gradient elution を行ったときの溶出パターンを Fig.1~ Fig.3 に示す。なお、図中の上部の図は、カラムで分取した色素蛋白質画分(a~j)の 450~700 nmにおける吸収スペクトルである。各画分は、分離が良好でなく、類似した吸収スペクトルを示すものもあったため、代表的なもののみを示した。

40% 沈澱物の画分 g, 50% 沈澱物の画分 g, 65% 沈澱物の画分 f に藍藻(シアノバクテリア)が多量に含有するフィコシアニン(620 nm), アロフィコシアニン(650 nm)と思われる吸収極大が見られた。このことから、SY-4が藍藻である可能性が示唆された。しかし、どの画分にも藍藻や紅藻が多量に含有するフィコエリトリン(藍藻, 紅藻に共通の 565 nm に吸収極大をもつ)の吸収極大は見られなかった。一方、画分 a (40% ppt), 画分 a, c (50% ppt), 画分 d, f (65% ppt) に 580 nm 付近, 画分 a (40% ppt), 画分 c (50% ppt) 600 nm 付近, 画分 g (40%, 50% ppt), 画分 f (65% ppt) に 680 nm 付近に吸収極大をもつスペクトラムが得られた。藍藻は、クロロフィル a とフィコビルン蛋白質によって 550~700 nm の波長の範囲で光が吸収される⁵⁾。藍藻の吸収帯と同じだとすると 680 nm の吸収極大はクロロフィルではないかと思われる。しかし、580, 600 nm に極大吸収をもつものは過去に報告されたフィコビルン色素蛋白質のなかにはなく、未知の色素ではないかと思われる。65% 沈澱の 482, 493 nm の波長はカロチノイド, 或いはクロロフィルの吸収極大であると思われるが、紅藻のフィコウロビンも 490 nm に吸収帯を形成する²⁾

フィコビルン蛋白質は抽出・分離・精製の過程で変化しやすく、等電点付近の pH 或いは濃厚な水溶液中で高度の会合体を形成して分光学的特性が変化する¹⁾。また、フィコビルン蛋白質は水溶液の状態にあるとクロロフィルと同じ強い蛍光を發し、この蛍光がしばしば吸光度測定に誤差を与える¹⁾。従って、これらの測定値も明確ではない。しかし、この蛍光を用いてフィコビルン蛋白質が定量できるので、今後の検討課題としている。また、フィコエリトリンを生成する多くの藍藻は色彩光の照射に対して補色色彩適応(complementary chromatic adaptation)という感応を示す⁵⁾。つまり、緑色光下で培養すると、藍藻はフィコシアニンよりフィコエリトリンを多く含有し、赤色光下で培養するとフィコエリトリンを殆ど合成しない。色彩光の違いによる色素蛋白質の組成の違いについても調べる必要がある。

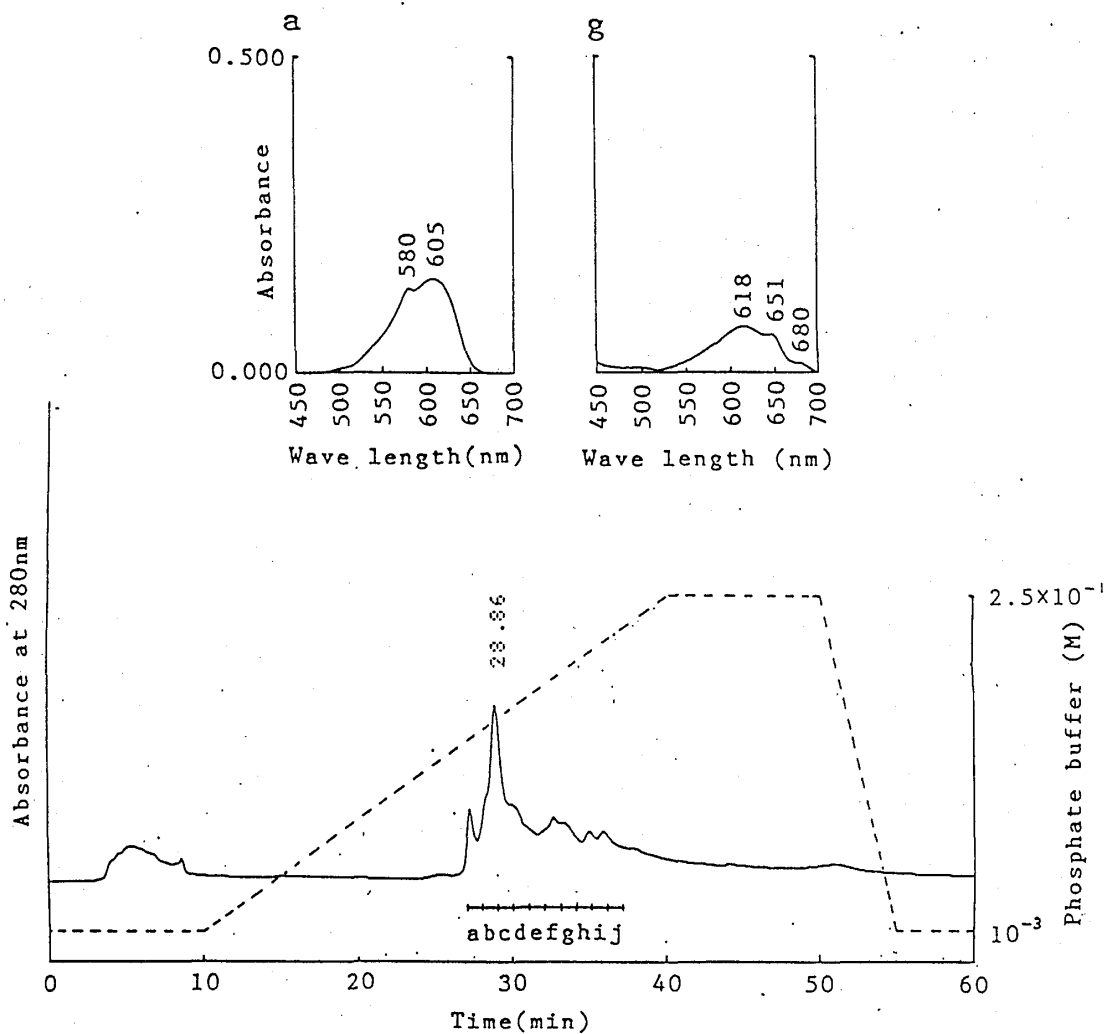


Fig. 1. Elution profile of 40 % ammonium sulfate ppt fraction from HPLC column. The protein was eluted with a linear gradient from 10^{-3} to 2.5×10^{-1} M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl at pH 6.8. The flow rate was 0.3 ml/min from 0 to 5 min, raised linearly to 0.5 ml/min from 5 to 10 min, and kept at 0.5 ml/min from 10 to 60 min.

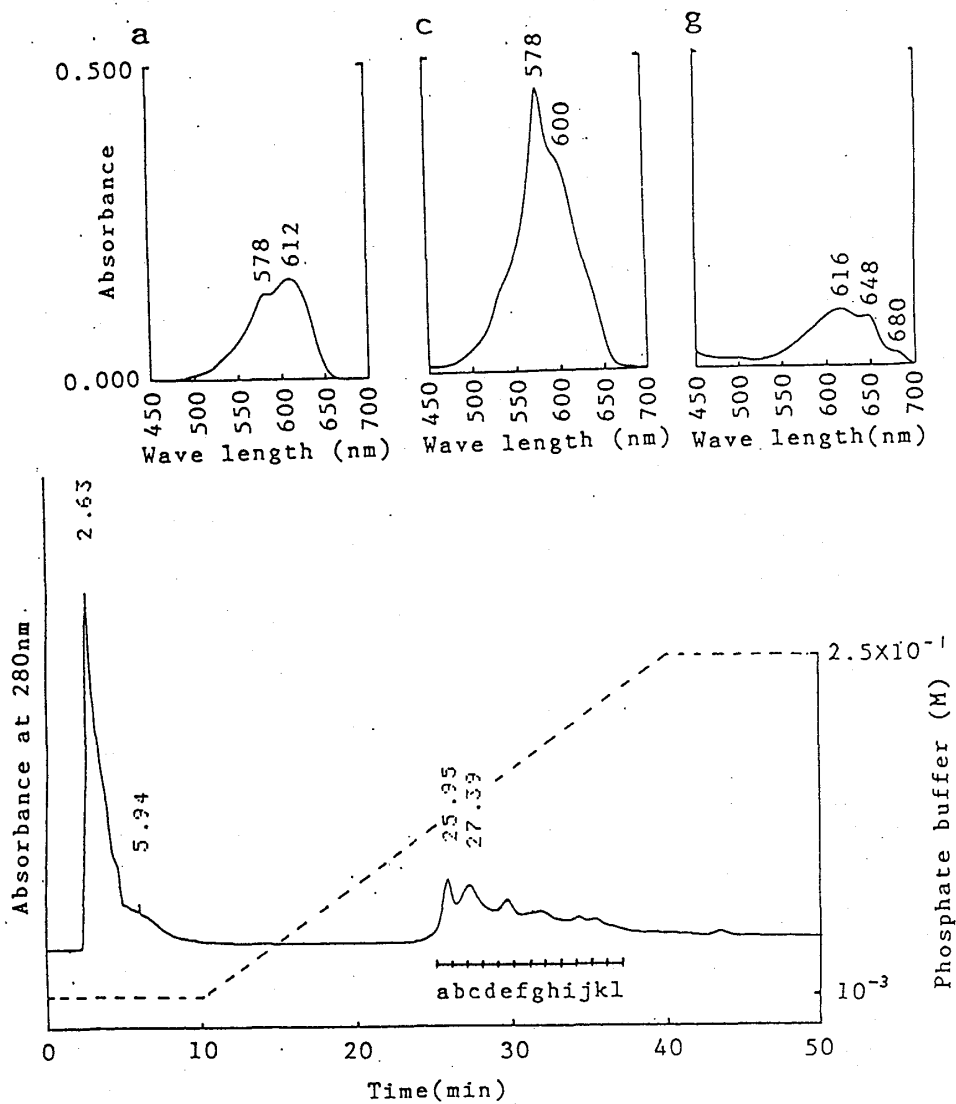


Fig. 2. Elution profile of 50 % ammonium sulfate ppt fraction from HPLC column. The protein was eluted with a linear gradient from 10^{-3} to 2.5×10^{-1} M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl at pH 6.8. The flow rate was 0.3 ml/min from 0 to 5 min, raised linearly to 0.5 ml/min from 5 to 10 min, and kept at 0.5 ml/min from 10 to 60 min.

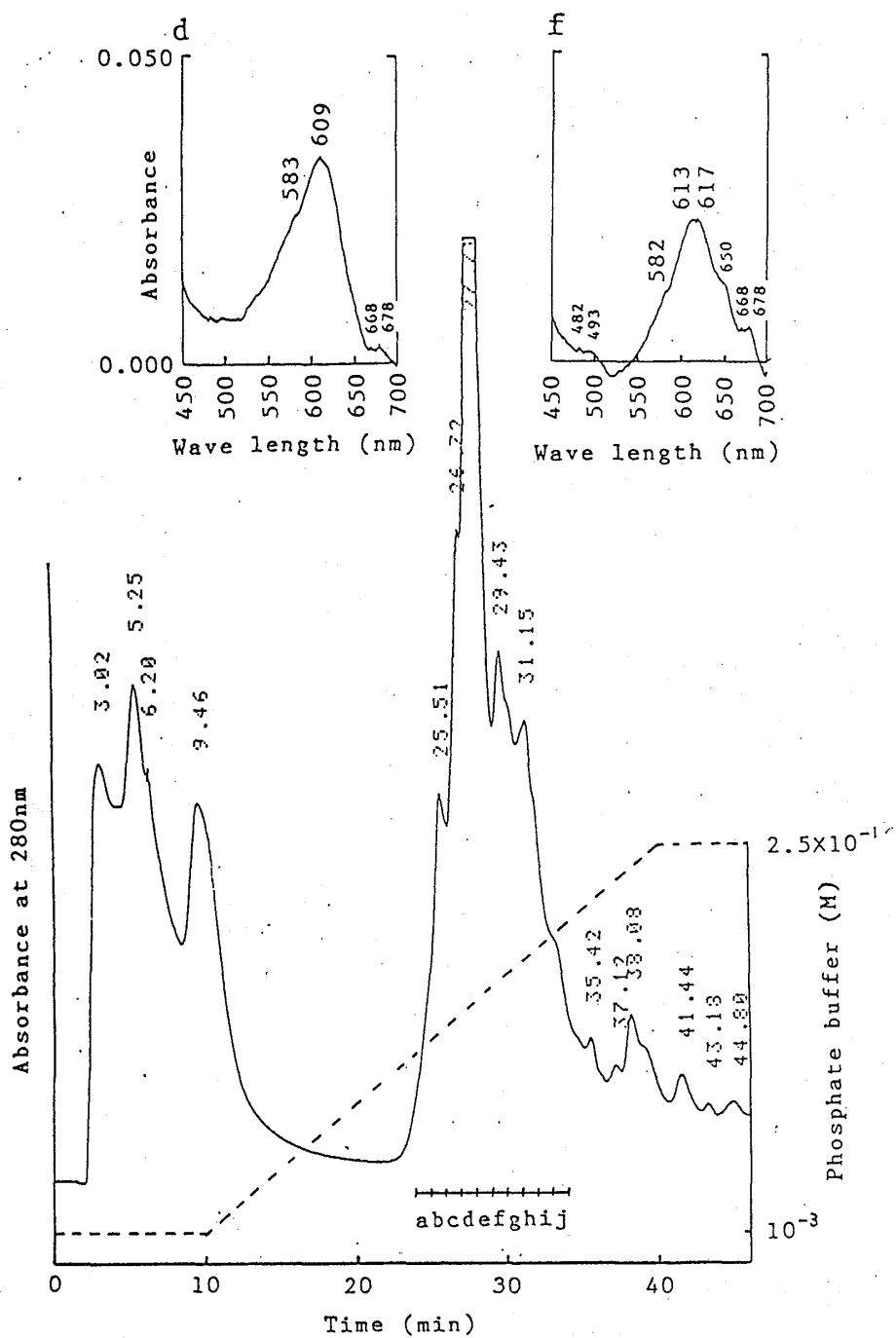


Fig. 3. Elution profile of 65 % ammonium sulfate ppt fraction from HPLC column. The protein was eluted with a linear gradient from 10^{-3} to 2.5×10^{-1} M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl at pH 6.8. The flow rate was 0.3 ml/min from 0 to 5 min, raised linearly to 0.5 ml/min from 5 to 10 min, and kept at 0.5 ml/min from 10 to 60 min.

4. SY-4の同定

SY-4は、鞭毛や纖毛の類をもたず、同化色素に藍藻に特有の色素蛋白質を含有していることが判った。また、核蛍光染色により、原核細胞であることが判った。これらは、藍藻の特徴を示すものであり、従って SY-4 は藍藻である可能性が非常に高いと思われる。

藍藻は、それぞれの特徴から、クロオコックス目 *Chroococcales*, カマエシフォン目 *Chamaesiphonales*, プレウロカプサ目 *Pleurocapsales*, ネンジュモ目 *Nostocales*, スチゴネマ目 *Stigonematales* の5つの目 (order) に分類される⁶⁻⁸⁾。そのうち、SY-4が属するのはクロオコックス目である。この目の特徴は、細胞が単細胞または群体で存在し、頂端、基部の区別がなく、連鎖体や異質細胞をつくらず、生殖は主として体の2分裂によって起こることである。

このクロオコックス目には、クロオコックス科 *Chroococcaceae* の一科しかなく、この科の特徴は、細胞が単細胞性の個体または同形の固体細胞が共通の基質内に多数埋もれた群体を形成し、浮遊性のものも多いことである。SY-4は、単細胞性で浮遊性を示すことから、この科に属するものと思われる。

このクロオコックス科には、単細胞性を示すシネコキスチス属 *Synechocystis*, シネココックス属 *Synechococcus*, クロオコックス属 *Chroococcus*, テトラペジア属 *Tetrapedia*, ダクチロコッコプシス属 *Dactyrococcopsis* 等がある⁶⁻⁸⁾。このうち、SY-4 が属するのはシネコキスチス属でこの属の特徴は、細胞の形態が球形であることである。

以上の項目から SY-4 を分類すると、下記のようになる。

Division	<i>Cyanophyta</i>	藍藻植物門
Class	<i>Cyanophyceae</i>	藍藻綱
Order	<i>Chroococcales</i>	クロオコックス目
Family	<i>Chroococcaceae</i>	クロオコックス科
Genus	<i>Synechocystis</i>	シネコキスチス属

5. SY-4の培養特性

①培地の検討

各培地で培養したSY-4の対数期における増殖率は、ナンノクロロプシス用施肥培地で 0.39, 改変岩崎培地で 0.36, 簡易岩崎培地で 0.31 であった。ナンノクロロプシス用施肥培地では、培養開始4日目までは顕著な増殖が認められなかったが、それ以後は増殖が見られた。改変岩崎培地および簡易岩崎培地では、培養開始5日目まで顕著な増殖が認められなかったが、それ以後は増殖が見られた。しかし、増殖効果はナンノクロロプシス用施肥培地に比べて低かった。また、両岩崎培地においては改変岩崎培地の方がやや増殖率が高かった。これらの結果から、試験した3種の培地のなかで、ナンノクロロプシス用施肥培地が SY-4 の培養に最も適していることが判った (Fig. 4)。

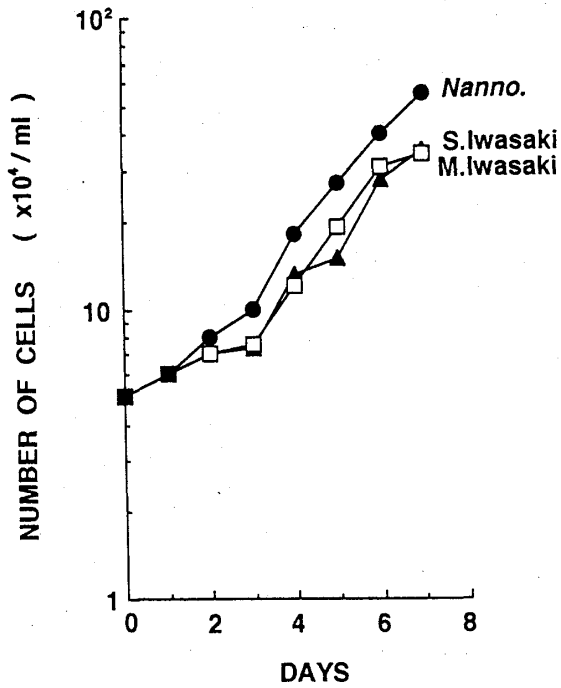


Fig. 4 Growth of SY-4 (*Synechocystis* sp.) in Various Media.

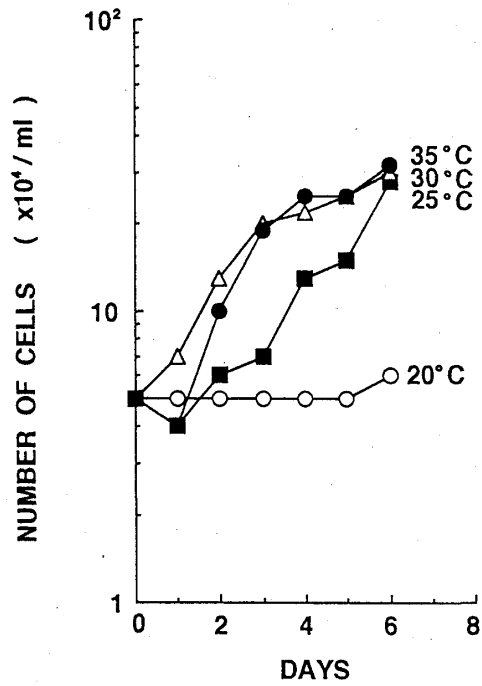


Fig. 5 Growth of SY-4 (*Synechocystis* sp.) at Various Temperatures.

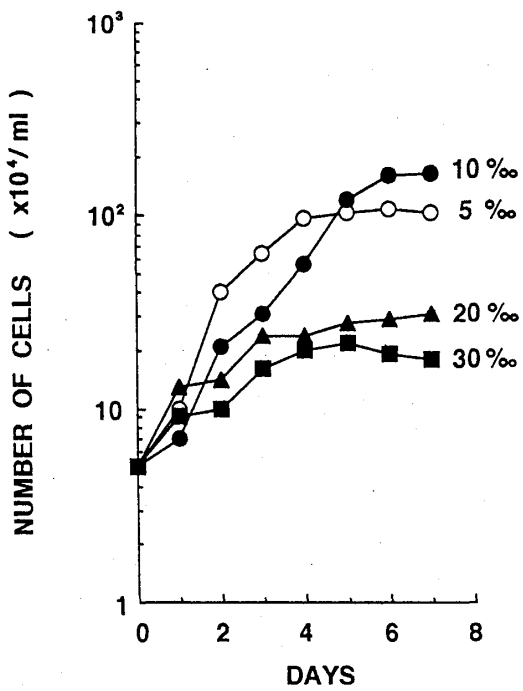


Fig. 6 Growth of SY-4 (*Synechocystis* sp.) at Various Salinities.

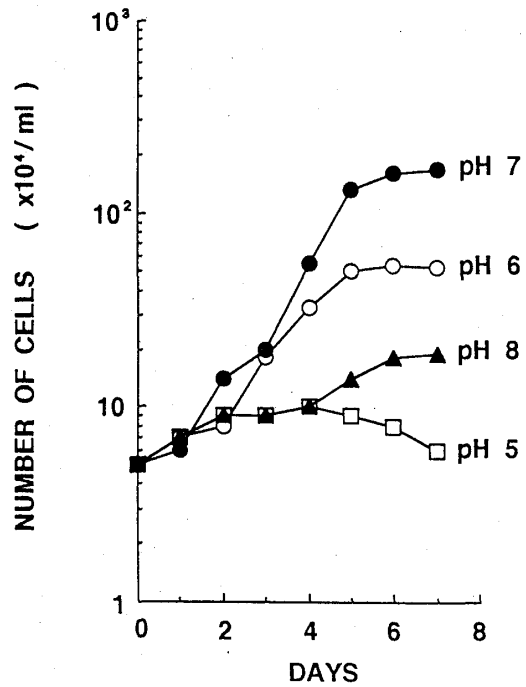


Fig. 7 Growth of SY-4 (*Synechocystis* sp.) at Various pH.

各培地の特徴を窒素源について注目すると、ナンノクロプシス用施肥培地では硫酸を用い、改変および簡易の両岩崎培地では硝酸ナトリウムを用いている。SY-4がナンノクロプシス用施肥培地でより高い増殖率を示したのは、窒素源として硝酸塩よりアンモニウム塩をより有効に利用しているからであると思われる。

②至適培養温度の検討

各温度区で培養したSY-4の対数期における増殖率は20℃区で0、25℃区で0.41、30℃区で0.31、35℃区で0.22であった。20℃区では、増殖が認められなかった。25℃区では、最も高い増殖率が得られ、培養開始11日目には 5×10^5 cells/mlまで増殖した。30℃および35℃の両区では、増殖は認められたが、その増殖効果は25℃区のものに比べて低かった。これらの結果から、SY-4の培養に適した温度は25℃であることが判った (Fig. 5)。

③至適塩分濃度の検討

各塩分濃度区で培養したSY-4の対数期における増殖率は、5‰区で0.67、10‰区で0.87、20‰区で0.32、30‰区で0.31であった。5‰区では、培養開始4日目まで順調な増殖が認められたが、その後は定常となった。10‰区では、培養開始4日目まで増殖率が5‰区よりも低かったが、その後は順調な増殖が認められ、培養開始5日目以降は全試験区において最も高い細胞数が得られた。20‰区、30‰区では若干増殖が認められる程度で増殖率は比較的lowかった。これらの結果からSY-4の培養に適した塩分濃度は、10‰であることが判った (Fig. 6)。

SY-4は、因島近海の八重子島付近の海表層から採取した微細藻である。この八重子島付近は、因島の大川の淡水と、海水が混ざり合う汽水域であり、本結果からSY-4が汽水性を示したことは、海域と生棲分布とのあいだに密接な関係があるものと思われる。

④至適pHの検討

各pH区で培養したSY-4の対数期における増殖率は、pH 5区で0.16、pH 6区で0.71、pH 7区で1.00、pH 8区で0.31であった。pH 5区では、殆ど増殖が認められなかった。pH 6区では、増殖は認められたもののpH 7区に比べて増殖率は低かった。pH 7区では、培養開始4日目以降に顕著な増殖が認められ、最も高い増殖率が得られた。pH 8区では、殆ど増殖が認められなかった。これらの結果からSY-4の培養に適したpHは7付近であることが判った (Fig. 7)。

また、培養期間中、各培地のpH変化は殆ど認められなかった。

以上のように、*Synechocystis* sp. SY-4は希釈した海水に無機塩を添加した簡単な培地で良好に増殖し、特に25℃～35℃での増殖が著しいことから夏期の屋外培養に適していると思われる。しかし、20℃ではほとんど増殖しないため冬期の培養は屋内での加温培養が必要である。

SY-4のシオミズツボムシに対する餌料価値を調べた結果、比較餌料としたテトラセルミスおよびナンノクロプシスよりも高い餌料価値が認められ(未発表)、今後、餌料用微細藻としての開発が期待される。

要 約

因島近海から未知の有用微細藻類の探索を行い、35°Cでも増殖可能な耐高温性を示す微細藻SY-4を分離した。

SY-4は、直径5 μm の単細胞で、浮遊性を示し、繊毛や鞭毛の類を持っていない。増殖は、細胞の2分裂によって行う。SY-4は、原核細胞で、同化色素にフィコシアニン、アロフィコシアニンなどの色素蛋白質を含有していることから、藍藻の一種シネコキスチス属(*Synechocystis*)に属することが判った。SY-4は、ナンノクロプシス用施肥培地で、培養温度25°C、塩分濃度10‰、pH 7付近の条件下で、最も良好な増殖を示した。

文 献

- 1) 藤田善彦：植物色素，林 考三編，養賢堂発行，pp. 238-242 (1988).
- 2) 藤田善彦：藻類研究法，西澤一俊，千原光雄編集，共立出版，pp. 493-497 (1979).
- 3) ロバート K. スコープス：タンパク質精製法，シュプリンガー・フェアラー東京，pp. 256-257 (1982).
- 4) 岡内正典：テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* (West, G. S.) Butcherの大量培養に関する研究，養殖研報 No. 14, 11 (1988).
- 5) R. Y. スタニエ，E. A. エーデルバーグ，J. L. イングラム：微生物学(下)第4版，培風館，pp. 152-161 (1978).
- 6) 広瀬弘幸：藻類学総説，内田老鶴園新社，pp. 213-233 (1981).
- 7) James T. Staley, Marvin P. Bryant, Norbert Pfenning, John G. Holt : Systematic Bacteriology Vol. 3, WILLIAMS & WILKINS, pp. 1742-1746 (1989).
- 8) 米田勇一：現代生物学大系，堀川芳雄監修，中山書店，pp. 73-101 (1966).