

レクチンが *Microcystis aeruginosa* の群体形成に及ぼす影響

東北大学大学院	非会員	瀧澤翔太
東北大学大学院	学生会員	○八巻哲也
東北大学大学院	非会員	今江泰貴
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
東北大学大学院	学生会員	伊藤紘晃
東北大学大学院	フェロー会員	大村達夫

1 はじめに

夏のダムや湖などの閉鎖性水域では、富栄養化の影響によりアオコと呼ばれる藻類細胞の大量発生が起こる。アオコは浄水場の処理機能に様々な障害をもたらすため社会問題となっている。アオコの形成による処理障害はしばしば *Microcystis aeruginosa* によって引き起こされることが報告されている。自然水中において、個々の *M. aeruginosa* 細胞の周りは莢膜と呼ばれる粘性の有機物で囲まれており、*M. aeruginosa* はこの莢膜の結びつきによって群体と呼ばれる複数の細胞の塊を形成して存在している。莢膜の成分の多くは糖質が占めており、糖質の中でもグルコース、キシロース、構造内にウロン酸を含むガラクトース、グルクロースの割合が高いことが報告されている（雨宮ら、1986）。藻類由来以外の他の微生物の莢膜には、ウロン酸のような酸性糖はほとんど見られない（Decho ら、1992）。莢膜の生成過程や莢膜と *M. aeruginosa* の活性等の関係を明らかにしていくことにより、アオコの問題への有効な対処策が得られるものと期待される。

自然水中とは異なり、一般に実験室培養では *M. aeruginosa* の群体は形成されないとされている。自然水中と実験室培養の条件の違いは様々考えられるが、その3つとして、種々の糖質を架橋する性質を持つレクチンが *M. aeruginosa* の群体形成に影響を与える可能性がある。本研究では3種類のレクチン（peanut agglutinin: PNA, ConcanavalinA: Con A, wheat germ agglutinin: WGA）を MA 培地に添加したときの *M. aeruginosa* の様子を顕微鏡観察するとともに全有機炭素濃度（TOC）、全糖濃度、酸性糖濃度、細胞密度を測定し、レクチンを加えていない場合と比較した。

2 実験方法

2.1 藻類の培養

供試藻類には国立環境研究所より分与された *M. aeruginosa* NIES 843 株を用いた。培養には MA 培地を用いて、温度 30 °C、照度 4000 Lux（12 h 明暗）の条件で行った。MA 培地を入れた三角フラスコに PNA、Con A、WGA の3種類のレクチンを各濃度（0.05, 0.5, 5 µg/L）で添加したものを、3つの三角フラスコに 100 mL ずつ分注し、それぞれの培地中にて *M. aeruginosa* を培養した。定常期（培養 28 日目）における細胞の様子を顕微鏡により観察した。また、莢膜の存在と群体の形成を確認するために墨汁染色を施した細胞を観察した。

2.2 培地中の中性糖、酸性糖の測定

藻類細胞の入った培地を遠心分離（20,000×g, 10 min）して上澄みを濾過することによって細胞を除去し、濾液を回収した。続いて、回収した濾液をエバポレーターで濃縮することにより、各増殖時期（対数増殖期、定常期、死滅期）の濾液濃縮試料を得た。濃縮・回収した各増殖時期の濾液濃縮試料を用いて、全糖濃度はフェノール硫酸法（Bitter ら、1962）、酸性糖はカルバゾール硫酸法（Dubois ら、1956）により測定を行った。測定された全糖濃度から酸性糖濃度を減じたものを中性糖濃度とした。また TOC を TOC 計により計測した。細胞密度は血球計測板を用いて測定した。

3 結果と考察

3.1 顕微鏡観察の結果と考察

図1は培養 28 日目の WGA 5 µg/L 添加培地中の *M. aeruginosa* の写真である。それぞれ墨汁染色時と、非染色時の様子である。墨汁染色時では白く見える莢膜の中に *M. aeruginosa* の細胞が密集して群体を形成している様子が見て取れた。非染色時においても、細胞が密集して存在していることから、群体を形成していると思われる。レクチン濃度が高い培地で培養した藻類細胞ほど大きな群体を形成していたことが確認され、大きいものでは直径が 1 mm を越えるものもあった。また群体を形成していない細胞もそれぞれ莢膜に覆われた形で存在していた。

一般に実験室培養系においては、*M. aeruginosa* は莢膜や群体を形成しないとされないとされている。本研究ではレクチンを添加することによって、莢膜及び群体が形成され得ることが示された。これは、藻類細胞による生産物がレクチンによる糖質の架橋作用によって細胞表面に保持されたためと考えられる。

キーワード *M. aeruginosa*, 莢膜, 群体, 中性糖, ウロン酸

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学 環境水質工学研究室 TEL 022-795-7483

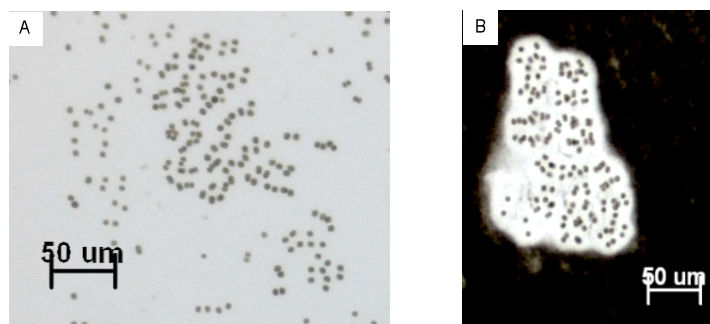


図1 WGA を 5 $\mu\text{g/L}$ 添加した系における培養 28 日目の (A) 墨汁染色時と (B) 非染色時の様子。

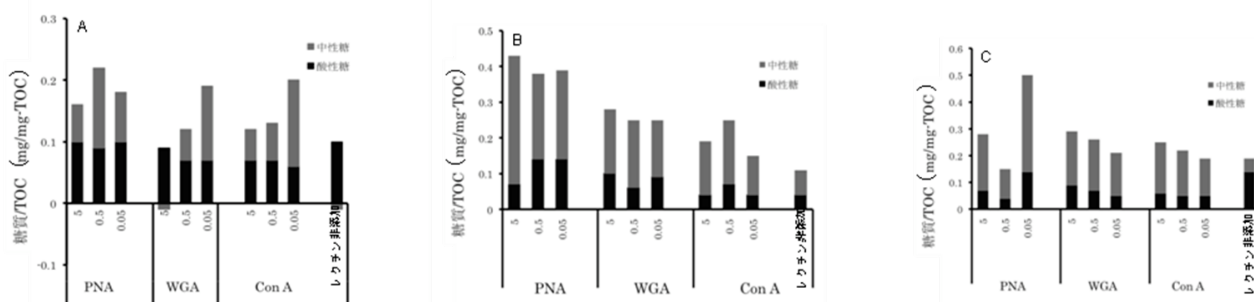


図2 (A) 対数増殖時期, (B) 定常期, (C) 死滅期における単位 TOC あたりの培地中の糖濃度。

3.2 全糖, ウロン酸に関する考察

図2に単位 TOC あたりの糖濃度を示した。ほぼすべての条件において、レクチンを添加した培地においては、レクチンを添加しなかった培地よりも全糖濃度が高かったことから、レクチンは糖類の生成にも影響を与えたと結論づけることができる。また、培養日数が経過するに従い全糖濃度が高くなった。これは Raungsomboon ら (2006) の研究結果と一致する。ほとんどの培養段階のそれぞれのサンプルにおいて、レクチンが存在することにより培地中に存在する中性糖濃度が高くなった。

レクチンは、細胞を凝集させ、また多糖類や糖タンパク質を沈降させる活性を持ち、免疫反応の産物 (抗体) ではない糖結合タンパク質 (Goldstein ら, 1980) として定義されてきた。レクチンは架橋作用によって、藻類細胞が放出する有機物を細胞表面に留まらせると共に、藻類の活性に影響を与え、糖の生成を促進させる働きを有していると考えられる。

4 まとめ

一般に実験室で *M. aeruginosa* の培養を行った場合、莢膜の産生及び群体の形成はないとされている。本研究ではレクチンを添加した培養を行い、莢膜産生及び群体形成が確認された。そのため、莢膜を形成するためにレクチンが重要な役割を担っていることが示唆された結果となった。今回行った顕微鏡観察により群体、莢膜を形成したのはレクチンの示す架橋作用の影響であると考えられた。また、レクチンの糖に対する特異的反応によって糖質が細胞表面に留まり、細胞外へ糖質が放出されなかったと考えられた。

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (挑戦的萌芽研究, 研究代表者: 真砂佳史) の補助を受けて行われたことを報告する。

参考文献

- 雨宮由美子, 中山大樹 (1984) 藍藻 *Microcystis* より単離した粘質鞘物質の化学的性質と金属類に対する吸着特性, 日本陸水学会雑誌, **45**, 187-193.
- Decho, A. W., Moriarty, D. J. W. (1990) Bacterial exopolymer utilization by a *Harpacticoid copepod* - A methodology and results. *Limnol. & Oceanograph.* **35**, 039-1049.
- Bitter, T., Muir, H. M., Modified, A. (1962) Uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.* **4**, 330-334.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980) What should be called a lectin. *Nature* **285**, 66.
- Raungsomboon, S., Chidthaisong, A., Bunnag, B., Inthorn, D., Harvey, N.W. (2006) Production, composition and Pb^{2+} adsorption characteristics of capsular polysaccharides extracted from a cyanobacterium *Gloeocapsa psagelatinosa*. *Water Research* **40** 3759-3766.