

レクチン添加による *Microcystis aeruginosa* の糖生産および莢膜形成への影響の評価

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

1 はじめに

ダムや湖沼などの閉鎖性水域にリンや窒素を含む栄養塩が流れ込むと、アオコと呼ばれる藻類細胞の大量発生が起こる。アオコが発生するとこれらの水源から取水を行っている浄水場では、藻類細胞によって様々な障害が引き起こされる。藻類によって引き起こされる障害を藻類障害と言い、凝集阻害は藻類障害の一つである。凝集阻害は夏期に顕著に発生する。夏期はアオコ中の *M. aeruginosa* の個体濃度が一年間で最も高く、凝集剤の添加量も一年間で最も多い。*M. aeruginosa* は自然水中では群体という群れをなして存在している。群体は藻類細胞一つ一つが放出する粘性の有機物膜（莢膜）によって結びついており、群体は莢膜に囲まれた形で存在している。*Microcystis* は莢膜を大量に生産する種だと言うことが知られている（雨宮ら, 1984）。これらの理由より、莢膜が原因となって凝集阻害が引き起こされている可能性が高い。

実験室で *M. aeruginosa* を培養すると莢膜を伴った細胞が培養されないため、群体も形成されない。*M. aeruginosa* が実験室での莢膜を伴った藻体の培養系は確立していないとされている（Robert. et al. 2005）。*M. aeruginosa* が群体を生成する理由としてはウィルスや細菌から身を守るためだとされている（雨宮ら, 1984；Roger ら, 1986）。自然水中と実験室での培養条件の相違点としては外敵の存在、紫外線、攪拌、有機物など、種々の条件が考えられる。莢膜の主な成分としてはガラクトース、ラムノース、キシロース、ガラクトース、グルコース、フルクトース、アラビノース、マンノースなどがあると報告されている（Nakagawa ら, 1987）。

レクチンは、細胞を凝集させたり、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。佐々木(2010)は *M. aeruginosa* NIES478 株を、3 種類のレクチン（peanut agglutinin: PNA, ConcanavalinA: Con A, wheat germ agglutinin: WGA それぞれ 5 μ g/L）を添加した Fraquil 培地で温度 30 $^{\circ}$ C、照度 4000Lux(12h 明暗)の条件で培養を行い、レクチンを加えた培地中と非添加培地中の全糖、ウロン酸の濃度を測定したところ、7 日目において Con A, PNA 添加培地中の全糖、ウロン酸の量が非添加培地中の濃度を上回ったと報告した。Con A は、マンノースとグルコース、WGA は N-アセチルグルコサミン、そして PNA はガラクトース特異性があるレクチンである。

レクチンが示す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り莢膜を形成する可能性がある。本研究ではレクチンが *M. aeruginosa* に与える影響に注目し、種々のレクチンを 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

TOC 量、ウロン酸量、細胞密度測定し、レクチンを加えていない場合と比較した。本研究では対数増殖期、定常期でのそれらの量を測定し、細胞の培養時期による生産量の違いを調った。

2 実験方法

2.1 藻類の培養および濾液の回収

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。培養は MA 培地で、温度 30 $^{\circ}$ C、照度 4000 Lux (12 h 明暗) の条件で行った。MA 培地の入っている 100 mL 三角フラスコに PNA, Con A, WGA の 3 種類レクチンを各濃度 (0.05, 0.5, 5 μ g/L) で添加し、MA 培地を 100 mL ずつ 3 本用意して *M. aeruginosa* を培養し、藻類細胞が群体を形成しているかを顕微鏡観察により確認した。

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 $\times$ 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、糖質はフェノール硫酸法 (Bitter ら, 1962)、ウロン酸はカルバゾール硫酸法 (Dubois ら, 1956) により測定を行った。

3 結果と考察

3.1 顕微鏡観察の結果

レクチンを添加して *M. aeruginosa* NIES 843 株の培養を行い、定常期 (28 日目) における藻類細胞の顕微鏡観察を行った。その結果、レクチンを添加して培養を行った全ての培養液中の藻類細胞で莢膜に包まれた群体が形成されていることが確認された。図 1.1 は培養 28 日目の WGA 5 μ g/L 添加培地中の写真であり、細胞が密集して群体を形成していると考えられた。図 1.2 は図 1.1 と同じサンプルを墨汁染色した時の写真であり、莢膜に囲まれている様子が見て取れた。レクチン濃度が濃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 1mm 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。

一般的に実験室で *M. aeruginosa* の培養を行った場合、莢膜の産生及び群体の形成はされないとされている。一方で、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。今回の実験で群体、莢膜を形

Key words: *M. aeruginosa*, 莢膜, 群体, 中性糖, ウロン酸

連絡先: 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL: 022-795-7483, E-mail: takizawa@water.civil.tohoku.ac.jp

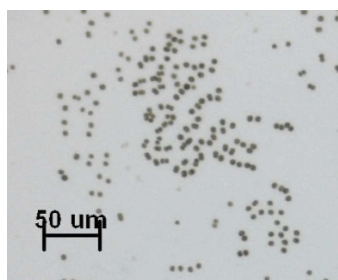


図 1.1 培養 28 日目
WGA 5 μg/L 添加時
の様子

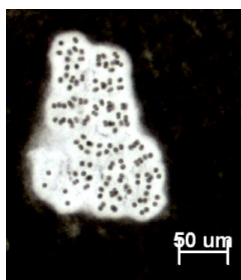


図 1.2 図 1.1 のサンプルを墨
汁染色した場合の様子

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細胞外へ糖質が放出されず、細胞表面に留まったと考えられた。

3.2 対数増殖期、定常期の全糖、中性糖の測定

図 2.1 は 3 種類のレクチンを各濃度 (0.05, 0.5, 5 μg/L) で加えたときの培養日数 14 日目 (対数増殖時期) における濾液濃縮試料中の中性糖及びウロン酸量を示したグラフである。全糖及びウロン酸量は単位 TOC あたりの値で示した。その結果、レクチンを添加して培養を行った場合、レクチン非添加時と比較して濾液濃縮試料中の中性糖の濃度の値が高くなった。また、レクチン添加濃度が減少するに従って WGA, ConA 添加時の中性糖、ウロン酸量が高くなった。PNA を添加した濾液濃縮試料はレクチン濃度が 0.5 μg/L の時に中性糖、ウロン酸量ともに一番濃度が高くなっているが、0.05 μg/L 添加時方が 5 μg/L 添加時よりも中性糖、ウロン酸濃度の値が高くなっている。このことからレクチンの添加濃度を減少させると中性糖、ウロン酸の生産量が増加する傾向にあるといえる。レクチン添加濃度が減少すると中性糖、ウロン酸濃度が増加するということは、レクチンの影響によって中性糖、ウロン酸が細胞の表面に莢膜として保持されているからであり、細胞表面に保持された中性糖、ウロン酸はフェノール硫酸法、カルバゾール硫酸法では検出されないと考えられる。顕微鏡観察ではレクチンの添加濃度が濃くなるに従って群体のサイズが大きくなることが見受けられた。

図 2.2 種類のレクチンを各濃度 (0.05, 0.5, 5 μg/L) で加えたときの培養日数 28 日目 (定常期) における濾液濃縮試料中の中性糖及びウロン酸量を示したグラフである。これに関して傾向は見受けられなかったが、レクチン添加時の時の方がレクチン非添加時よりも全糖量、ウロン酸量ともに増加する傾向が見受けられた。

4. おわりに

今回の研究では MA 培地中の *M. aeruginosa* にレクチン添加すると *M. aeruginosa* は群体を形成することが分かり、0.05~5 μg/L の範囲でレクチン濃度が高いほど群体のサイズが大きくなることが分かった。またレクチンの添加により *M. aeruginosa* の生産する全糖量、ウロン酸量が増加することが分かった。

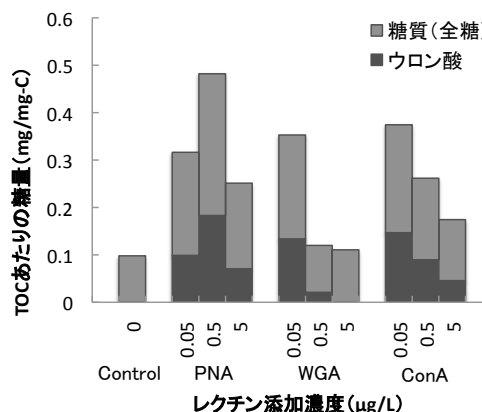


図 2.1 各レクチン添加濃度における培養 14 日目 (対数増殖時期) の濾液濃縮試料中の TOC あたりの中性糖及びウロン酸量

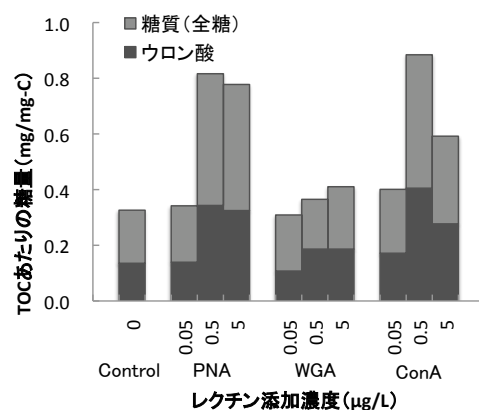


図 2.2 各レクチン添加濃度における培養 28 日目 (定常期) の濾液濃縮試料中の TOC あたりの中性糖及びウロン酸量

5. 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, 研究課題番号: 21656130) によって遂行された。

参考文献

- Bitter, T., Muir, H. M.: A Modified Uranic Acid Carbazole Reaction, *Anal. Biochem.*, Vol. 4, pp. 330-334, 1962.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, Vol. 28, No. 3, pp. 350-356, 1956.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980) What should be called a lectin, *Nature* 285, 66.
- Nakagawa, M., et al., *Agric. Biol. Chem.*, 51 (2), 329-337, 1987.
- Roger, Y. S., et al., 微生物学 [上], 培風館, 1989.
- 雨宮由美子, 中山大樹: 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, Vol.45, No.3, pp187-193, 1984.
- 佐々木史織 *Microcystis aeruginosa* の鉄摂取に及ぼすレクチンの影響. 平成 21 年度東北大学大学院修士論文. 2010