

***Haematococcus pluvialis* の遊泳型におけるオゾン耐性の評価**

岡山大学大学院 学生会員 ○石川 千遥
 岡山大学大学院 正会員 永禮 英明

1. 研究背景

日本では枯渇資源であるリンを下水から回収する技術はあるものの、コスト面の問題から実用化には至っていない。本研究室ではこの問題に着目し、微細藻類を下水中で培養することで、リンとアスタキサンチンと呼ばれる高価値な物質を同時回収する新規廃水処理プロセスを開発している。しかし、下水中には様々な微生物が存在しており、そのような環境下で微細藻類を培養することは非常に困難である。微細藻類を下水を用いて培養するためには、微細藻類の優占培養法を確立する必要がある。

培養している微細藻類 *Haematococcus pluvialis*（以下、ヘマトコッカスと称す）は3つの生活形が存在する。培養初期は鞭毛を2本もつ遊泳型という形で存在するが、成長もしくはストレスを与えるとパルメロイドと呼ばれる不動孢子に形態が変化する。その後、さらに強いストレスを与えるとアスタキサンチンを体内に蓄積したシストと呼ばれる休眠細胞になる¹⁾。

本研究室は、アスタキサンチンの抗酸化作用に着目し、オゾンを利用したヘマトコッカスの優占培養法の確立を目指している。オゾンは酸化剤であり、その強い酸化力によって微生物を殺菌や不活性化する。ヘマトコッカスは、細胞内で生成される過酸化水素のような活性酸素種から身を守るために、抗酸化性物質であるアスタキサンチンを生成していると考えられている²⁾。したがって、アスタキサンチンがヘマトコッカスの体内で発生する活性酸素種を消去できるのならば、酸化剤であるオゾンを添加したとしても、他の微生物より細胞損傷が小さいのではないかと推測し、オゾンを選択した。しかし、アスタキサンチンを蓄積するシストはオゾンに耐性があったとしても、遊泳型やパルメロイドのような非アスタキサンチン蓄積細胞にオゾン耐性があるのかは不明確である。

本研究では、まずヘマトコッカスの遊泳型に着目し、オゾン添加による見た目の変化、活性酸素の発生器官である葉緑体およびミトコンドリアの損傷度を定量的に明らかにすることで、遊泳型のオゾン耐性の評価を行なった。

2. 研究方法**2.1. オゾン添加実験**

オゾン添加実験では、まずオゾン発生器（オーニット、SEG-1210M）で生成されるオゾン量を測定し、1分あたりのオゾン発生量を把握した。次に、0.05%NaClで3回洗浄したヘマトコッカス濃縮液を適量とり、0.05%NaClを加えて100mLのヘマトコッカス懸濁液を準備した。最後に、準備したヘマトコッカス懸濁液にオゾンを2～20分間添加した。このとき、ヘマトコッカスと完全に反応しなかったオゾンはKI溶液で吸収し、オゾン添加後にKI溶液の吸光度を410nmで測定することでオゾン量を求めた。ヘマトコッカスと反応したオゾン量は、オゾン発生機から発生したオゾン量からKI溶液と反応したオゾン量を差し引いた値とした。

キーワード *Haematococcus pluvialis*, 遊泳型, オゾン, 優占培養法

連絡先 〒700-8539 岡山市北区津島中3丁目1番1号

岡山大学大学院 環境生命科学研究科 水質衛生学研究室

2.2. オゾン耐性の評価方法

オゾン耐性は、ヘマトコッカスのオゾン未添加のもの、オゾン添加のもの（1）～（3）の測定値を相対的に評価した。なお、オゾンの添加時間は2～20分とした。

1) 光合成活性度

ヘマトコッカス懸濁液に25℃の条件で40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の強度で蛍光灯の光を照射し、溶存酸素濃度の変化を15分間、1分おきに計測し、酸素の生産速度を算出した。その後、SSの測定結果を用いてヘマトコッカス1gあたりの酸素の生産速度を算出し、この値を光合成活性度とした。

2) 呼吸活性度

ヘマトコッカス懸濁液を25℃の暗所に置き、溶存酸素濃度の変化を15分間、1分おきに計測し、酸素の消費速度を算出した。その後、SSの測定結果を用いてヘマトコッカス1gあたりの酸素の消費速度を算出し、この値を呼吸活性度とした。

3) 細胞膜の損傷度

細胞膜の損傷度は、損傷がある細胞 / 損傷がない細胞の細胞数の比率として算出した。損傷がある細胞と損傷がない細胞の計測には、顕微鏡（オリンパス、BX50）を使用した。細胞数はおよそ350個を目安として計数した。

最後に、これら1）～3）の測定結果を用いて相対活性度（オゾン添加後の結果 r /オゾン未添加の結果 r_0 ）を算出した。

2.3. 評価指標

オゾン添加による相対活性度の低下度合いは、Chick-Watsonの式を参考に次式で表し、反応速度定数 k を算出することで評価した。

$$\ln \frac{r}{r_0} = -kx$$

r/r_0 = 光合成、呼吸に関する相対活性度の値(-)、損傷がある細胞 / 損傷がない細胞の比率の相対値(-)、 x = ヘマトコッカス1gあたりのオゾンの消費量(mgO_3/gSS)

2.4. 染色試験

細胞外マトリックスと細胞膜を識別するため、細胞外マトリックスの染色試験を行なった。染色液は、特定の糖鎖と特異的に反応するレクチン（Concanavalin A）を用いた³⁾。

3. 結果

3.1. 顕微鏡での観察結果

オゾンがヘマトコッカス遊泳型細胞の細胞構造に及ぼす影響を評価するため、顕微鏡観察を行なった。オゾン未添加時の遊泳型細胞は、細胞の最外殻に位置する細胞外マトリックスと細胞膜が明確に分かれている。しかし、オゾン添加後は細胞外マトリックスと細胞膜の境界が消失していたことから、細胞外マトリックスもしくは細胞膜のどちらかがオゾンによる攻撃を受け細胞の形が変化したと推測した。

そこで、オゾン添加後に細胞外マトリックスと細胞膜のどちらが残存しているのか染色試験によって確認した。その結果、オゾン添加後の細胞で細胞外マトリックスの存在を確認した（データは示していない）。したがってオゾン添加後の細胞は、細胞膜がオゾンによる損傷を受けたことで、形状が大きく変化したと結論づけた。

3.2. オゾン添加による細胞膜の損傷速度，光合成活性度および呼吸活性度の変化

図1に，オゾン消費量と細胞の損傷度，光合成活性度，呼吸活性度の変化を示す．結果として，オゾンの消費量が高くなるにつれて細胞膜の損傷と，光合成および呼吸に関する相対活性度が大きく低下した．これらの値の低下は，ヘマトコッカスの遊泳型細胞がオゾンによる影響を受けていること，さらに，オゾンの暴露による影響が，細胞膜だけではなく光合成を行う葉緑体や，呼吸を行うミトコンドリアにまで及んでいる可能性を示している．

次に，それぞれのグラフの傾きから，オゾンと細胞膜，葉緑体，ミトコンドリアの反応速度定数 k を求めることで，それぞれの損傷度の違いを比較評価した．結果として，細胞膜の損傷速度，光合成活性度，呼吸活性度の低下速度は大きく異なった．細胞膜の損傷速度は $k=0.269$ と最も高く，次に光合成活性度の低下速度で $k=0.048$ ，呼吸活性度の低下速度は $k=0.028$ と最も低かった．これらの結果は，細胞膜がオゾンの影響を最も受けやすく，葉緑体，ミトコンドリアは細胞膜ほどではないが，損傷を受け機能が低下することを示唆している．また，細胞膜，葉緑体およびミトコンドリアはヘマトコッカスの生命活動に重要な構造・器官であることから，細胞が今後の生命維持に無視できない損傷を受けていると考えられる．

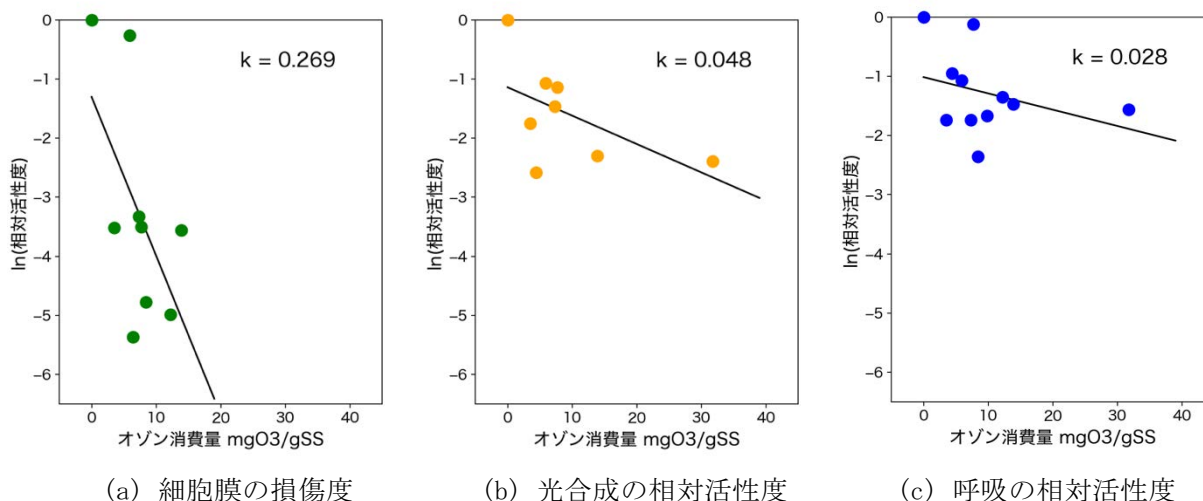


図1 オゾン添加によるヘマトコッカスの遊泳型の各相対活性度の変化

4. 考察

4.1. 損傷速度の違いに関する考察

細胞膜，葉緑体，ミトコンドリアの損傷速度の違いがあった理由について 1)細胞内で発生する過酸化水素による損傷および，2)オゾンによる直接的損傷の2つの観点から考察する．まず，細胞膜，葉緑体，ミトコンドリアで細胞損傷があった理由として，細胞内で生成された過酸化水素による影響が考えられる．高等植物では，オゾン暴露後に過酸化水素が細胞膜，葉緑体およびミトコンドリアなどで生成されることが報告されている⁴⁾．ヘマトコッカスでも同様に，オゾンに暴露することで過酸化水素が細胞膜，葉緑体およびミトコンドリアで生成され，それにより損傷を受けているのではないかと考えられる．また，細胞膜で最も損傷速度が早かった理由は，過酸化水素による影響に加え，オゾンによる直接的な損傷が原因であると考えられる．細胞膜には不飽和脂肪酸を持つリン脂質が存在することから，不飽和化合物と高い反応性を持つオゾンが，リン脂質に存在する不飽和脂肪酸と反応し，細胞膜に損傷を与えたと考えられる．

4.2. 下水中に存在する微生物のオゾン耐性の比較

ヘマトコッカスの遊泳型が下水中の微生物よりもオゾン耐性が高いかどうかを確認するために、下水中の微生物と反応速度定数 k を比較した（表 1, 未公表）。なお、ヘマトコッカスは光合成生物であることから、ヘマトコッカスの反応速度定数 k は、光合成活性度の低下速度の値を用いて評価した。それぞれの微生物とオゾンの反応速度定数 k は、ヘマトコッカスの遊泳型で 0.048 であり、下水中に存在する微生物は 0.038~0.052 であった。両者を比較すると、ヘマトコッカスの遊泳型の反応速度定数 k は、下水中に存在する微生物と同程度であった。この比較結果は、オゾン添加時に下水中に存在する微生物だけでなく、遊泳型も共に損傷を受け、死滅する恐れがあることを示している。なお、パルメロイド、シストの形態でのオゾン耐性について別途評価している。パルメロイドでの k は 0.010 と遊泳型や他の微生物に比べて小さく、シストでは <0 とオゾンの影響が観察されなかった。したがって、下水中におけるヘマトコッカスの優占培養法を確立するためには、オゾンはパルメロイドもしくはシストのようなオゾンに耐性がある生活形に変化させた後にオゾンを添加する必要があることが明らかになった。

表 1 ヘマトコッカスの遊泳型および下水中に存在する微生物群の反応速度定数 k の比較

	反応速度定数 k
ヘマトコッカス遊泳型	0.048
従属栄養細菌	0.042
ポリリン酸蓄積細菌	0.052
アンモニア酸化細菌群	0.046
脱窒細菌群	0.038

5. まとめ

本研究では、下水中におけるヘマトコッカスの優占培養法を確立するべく、ヘマトコッカスの遊泳型のオゾン耐性を評価した。ヘマトコッカスの遊泳型のオゾン耐性を評価した結果、細胞膜や葉緑体、ミトコンドリアといった生命活動に重要な構造・器官が損傷を受けていること、オゾンによって細胞膜の破壊が生じ、その後に葉緑体、ミトコンドリアの損傷が生じていることが示唆された。また、ヘマトコッカスの遊泳型と下水中の微生物のオゾン耐性を比較するために、両者の反応速度定数 k の値を比較した。結果として、ヘマトコッカスの遊泳型は 0.048、下水中に存在する微生物群では 0.038~0.052 であり、両者の値は同程度であった。遊泳型は、パルメロイド、シストに比べてオゾンと反応しやすく、ヘマトコッカスの優先培養法を確立するためには、遊泳型へのオゾン添加は望ましくなく、ヘマトコッカスの生活形をパルメロイドもしくはシストに変化後にオゾンを添加するべきであることが明らかになった。

参考文献

- 1) 北村 晃利, 平井 克幸, 山下 栄次: *Haematococcus* 属緑藻によるアスタキサンチンの商業生産, 日本生物工学会, Vol. 93, No. 7, pp. 383-387, 2015.
- 2) He B., Hou, L., Zhang F., Cong X., Wang Z., Guo Y., Shi J., Jiang M., Zhang X., Zang X.: Ultrastructural changes of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in process of astaxanthin accumulation and cell damage under condition of high light with acetate, *Algae.*, Vol. 35, No. 3, pp. 253-262, 2020.
- 3) Jenia G., Aliza Z., Sammy B.: Evidence for the involvement of surface carbohydrates in the recognition of *Haematococcus pluvialis* by the parasitic blastoclad *Paraphysoderma sedebokerensis*, *Fungal Biology.*, Volume 115, Issue 8, pp. 803-811, 2011
- 4) Pellinen R, Palva T, Kangasjarvi J.: Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells, *Plant Journal.*, Vol. 20, No. 3. pp. 349-356, 1999.