

# 珪藻細胞からのポリリン酸抽出と蛍光測定による定量

環境計画研究室 安部大志

## 1. 研究背景・目的

近年、人口増加や経済発展により、食糧生産に必要なリン肥料の消費が増加している。一方、有限であるリン鉱石資源の枯渇が懸念され、リン資源のリサイクルの必要性が高まっている。肥料として使われたリンは人体や家畜などを通して排泄され、最終的に下水に流れ込む。これが湖沼内湾に流れ込み、富栄養化を引き起こす原因となった。リン資源のほとんどを輸入に依存している日本にとって、持続的社會を形成していくためにリン資源のリサイクルは必要である。そこで、微生物を利用したリンのリサイクルシステムが考えられている。微生物に蓄えられたリン酸のポリマーであるポリリン酸を抽出し、回収することで、リンのリサイクルに役立てようとする研究が行われている。本研究では、微細藻類のひとつである海産珪藻、*Chaetoseros gracilis* によるポリリン酸合成に着目し、細胞内に蓄えられたポリリン酸を、抽出する方法について検討した。

## 2. 研究方法

珪藻に含まれるポリリン酸塩の効率の良い抽出条件を知る為に、Martin Pらが報告しているボイル法について、より詳細な検討を行った。実験は培養、抽出、蛍光測定、電気泳動の4つの部分により構成されている。抽出方法の検討においては、緩衝液のpH、ボイルする時間、抽出温度を変え、細胞から抽出できるポリリン酸顆粒の量にどれだけの影響が出るか、比較・検討した。抽出したポリリン酸を、DAPIを用いて染色し、蛍光分光光度計を用いて、ポリリン酸と結合したDAPIの蛍光を測定することにより定量した。細胞1万個当たりの重量としてポリリン酸の回収量を比較した。また、抽出条件がポリリン酸塩の鎖長に与える影響を検討するため、電気泳動解析を行った。

## 3. 結果と考察

図1に示すように、トリス塩酸緩衝液のpHを変化させる抽出実験では、pH7.0~8.5の間では抽出量に大きな差はなかった。しかし、pH6.5~6.0にpHを下げた場合、若干の減少が見られた。図2に示すように、抽出時の温度を変えることによってポリリン酸の抽出量を比較した結果、100℃の時、最も良い結果が得られた。50℃から90℃の間での抽出量は100℃の時と比べて低くなったが、50℃から90℃の間では抽出量に、差がほとんどないことが分かった。図3に示すように、抽出時間を変化させた実験では、10分から25分間珪藻をボイルすることにより、良い結果が得られた。また、5分より短い抽出時間では、抽出量が低下した。

電気泳動で、抽出条件によるポリリン酸の鎖長の違いを調べたが、ポリリン酸がゲルに浸透せず、ゲル上部に残っていた為、鎖長の違いを検出することは出来なかった。大腸菌から抽出したポリリン酸顆粒については、抽出後、速やかに可溶性のポリリン酸になると報告されている。しかし珪藻から抽出されたポリリン酸は可

溶することなく、安定した顆粒状態であったのではないかと考えられる。

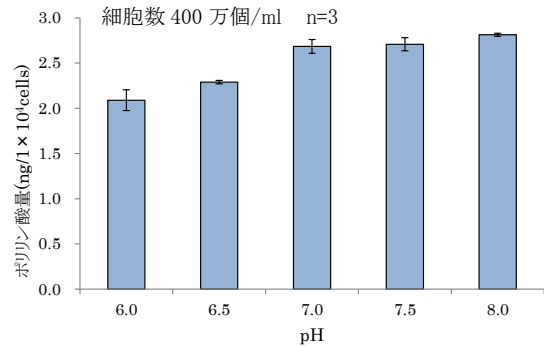


図1 pHを変化させた抽出実験  
(エラーバー: 標準誤差)

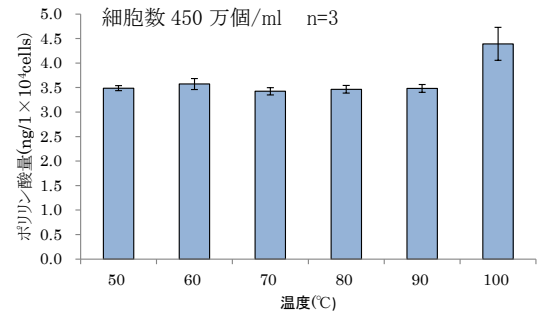


図2 温度変化による抽出実験  
(エラーバー: 標準誤差)

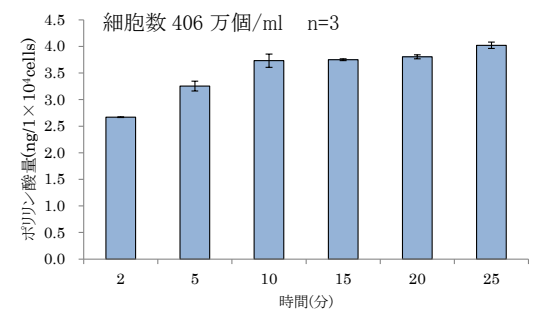


図3 抽出時間を変化させた抽出実験  
(エラーバー: 標準誤差)

## 4. 結論

本研究では、海産藻類のひとつである *Chaetoseros gracilis* の細胞内に蓄積されたポリリン酸について、抽出条件を検討した。pH7.0~8.0のトリス塩酸緩衝液中で、100℃で10分から25分間ボイルすると抽出量が増えることが分かった。抽出されたポリリン酸の鎖長については、今回の抽出条件では結果が得られなかったが、珪藻から抽出されたポリリン酸は、安定した顆粒状態ではないかという可能性が示唆された。