

# 珪藻細胞へのポリリン酸顆粒蓄積のための 培養条件に関する研究

環境計画研究室 田村 淳

## 1 背景と目的

リンはすべての生物にとって欠くことのできない元素である。わが国は国内で消費するリンの全量を海外からの輸入に頼っているが、リン鉱石は有限資源である。リンの再利用を図り、リン鉱石の探掘量を減らして資源を循環する取組を強化することが大切である。

本研究は、現存するリン鉱床の起源とも言われる珪藻を用いてリンを回収する技術を確認することを目的としている。その第一段階として増殖過程におけるポリリン酸の蓄積状況を把握するとともに、大腸菌で報告されているような、培養中のリンの枯渇によるポリリン酸蓄積の増加が珪藻においても生ずるか否かを調べた。また細胞内のポリリン酸を観察した。

## 2 研究方法

海産珪藻の一種である *Chaetoceros gracilis* を実験に使用した。リン飢餓によるストレスが、リンの取り込みやリン枯渇に備えたポリリン酸蓄積を活性化すると考え、リンを含まない培地での培養がその後のポリリン酸含量に与える影響について調べた。

培養した細胞を遠心して集め、トリス塩酸緩衝液 (pH=7.0) でボイルして珪藻が細胞内に蓄積したポリリン酸を抽出した。抽出した試料を DAPI と混合し、分光蛍光光度計 (励起波長 415nm, 蛍光波長 550nm) でポリリン酸に結合した DAPI を定量した。

細胞内のポリリン酸顆粒を観察するために、DAPI を用いて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (励起波長 405nm, 蛍光波長 420-520nm) で観察した。

## 3 結果と考察

増殖過程の 1 万細胞あたりのポリリン酸含量を図 1 に示す。細胞密度が高まるとポリリン酸含有量は低下した。定常期にポリリン酸含量が低下する原因としては①培地中のリン濃度の低下、②増殖停止によるポリリン酸合成活性の低下、③ポリリン酸をエネルギー源としての消費などが考えられる。

図 2 にリン飢餓ストレスを与えた細胞のポリリン酸含量を示す。P を含む培地だけで培養するよりも、リンを除いてストレスを与え、再びリンを再添加する方がポリリン酸を多く蓄積することを確認することができた。特に、図 2 の⑦の P 含む培地から P 除去培地に移して 12 時間培養し、リン飢餓のストレスを与えてからリン濃度が 10 倍濃い培地に移し 24 時間培養した条件のポリリン酸含量が  $6.14\text{ng}/1 \times 10^4\text{cells}$  で最も高い値であった。対数増殖期初期の細胞密度約  $1.0 \times 10^6\text{cells}/\text{mL}$  の細胞のポリリン酸含量と、図 2 の⑦の培養条件で培養したときのポリリン酸含量を比較すると、値は⑦の方が大きい。しかし⑦は通常の培地だけの培養よりも約 60 時間培養期間が長い。さらに培地交換の手順を考慮すると通常の培地で細胞密度が  $1.0 \times 10^6\text{cells}/\text{mL}$  になるまで培養し、ポリリン酸を溶出する方法が最も効率的であ

ると考える。細胞密度が低く、ポリリン酸含量の多い細胞にリン飢餓のストレスを与え、高濃度のリンを含む培地により、さらに大量のポリリン酸を蓄積する可能性も検討する必要がある。

図 3 は DAPI 染色した細胞である。DAPI でポリリン酸を染色すると、1 万細胞あたりのポリリン酸含量が高かった図 2 の⑦の培養条件の細胞では、非常に強く染色された。ポリリン酸顆粒と呼ばれる安定な構造をとっている可能性がある。また、位相差顕微鏡像の細胞内の黒い部分にポリリン酸を蓄積していることがわかった。

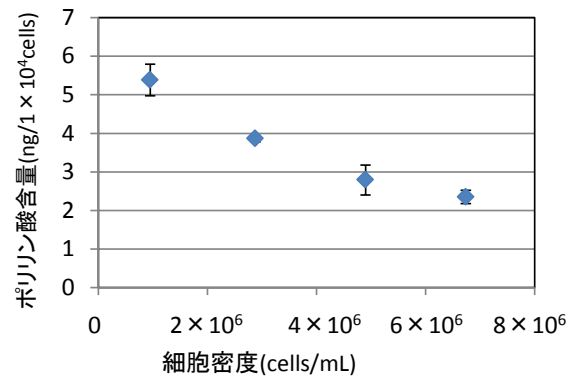


図 1. 増殖過程のポリリン酸含量

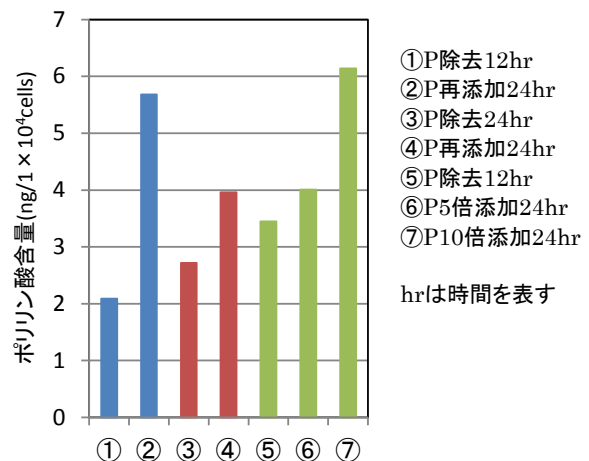


図 2. リン飢餓によるストレスを与えた細胞のポリリン酸含量



DAPI 蛍光

位相差顕微鏡像

図 3. 染色した細胞