

原著論文

蛍光計測を用いた *Amphidinium* sp. の濃度測定
— 培養時の光質が増殖速度に及ぼす影響 —

**Measurement of *Amphidinium* sp. Cell
Concentration by Fluorometric Method
— Effects of Light Quality on Growth Rate —**

小西充洋¹、大政謙次^{1*}、林正雄¹、増田篤稔²、小澤知子²、津田正史³

Atsumi Konishi¹, Kenji Omasa^{1*}, Masao Hayashi¹, Atsunori Masuda², Tomoko Ozawa², and Masashi Tsuda³

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Science,

1-1-1 Yayoi Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

² ヤンマー株式会社環境事業開発部マリンファーム 〒873-0421 大分県国東市武蔵町糸原 3286

Environmental Plant Engineering Dept., Marine Farm, Yanmar Co., Ltd.,

3286 Itohara, Musashi-Cho, Kunisaki-City, Oita 873-0421, Japan

³ 北海道大学大学院薬学研究院 〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

Hokkaido University, Graduate School of Pharmaceutical Science, North

12th, West 6th, Kita, Sapporo-City, Hokkaido 060-0812, Japan

(2006 年 11 月 9 日受付、2007 年 3 月 12 日受理)

ABSTRACT

In this study, a convenient and stable measurement method of cell concentration of *Amphidinium* sp. growing in culture solution was developed and it was applied to investigation of effects of different light property on growth rates of the algae. As cell clusters of the algae were observed when the concentration was high, the cell concentration measured with a conventional hemocytometry was underestimated. However, high linear relationships were observed between cell concentration and chlorophyll fluorescence intensity excited at 470 nm light and measured at 680 nm in spite of high concentrations. The relationships were represented as the two regression lines. The one belonged to the algae in the white, blue and red-blue light LED conditions and the other belonged to it in the red light LED conditions. The growth rate of the algae cultured under blue light was much larger than that under red light, and that under red-blue light (red:blue = 4:1) was larger than that under blue light. These results imply that blue lights are necessary for the algae to proliferate rapidly, and even a bit of blue light has the effect of propagate the algae, and chlorophyll fluorescence measurement could be applied to estimation of normally-developed algae cell concentration.

Key words : *Amphidinium* sp., Fluorescence, Growth rate, Light quality

*Corresponding author : Phone: +81-3-5841-5342, Fax: +81-3-5841-8175, E-mail: aomasa@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

海棲性微細藻の一種である渦鞭毛藻 (*Amphidinium* sp.) の一部は、抗腫瘍性マクロリド化合物 (Amphidinolide) を産生する (Kobayashi and Tsuda, 2004)。この化合物は単離され、化学構造が解明されつつあり (Tsuda et al., 2003)、新しい作用機序をもつ抗がん剤のリード化合物への利用が期待されている。現在、マクロリド化合物生産効率の高い種の分子細胞学的なスクリーニングが進められているが (Iwamoto et al., 2005)、いまだに *Amphidinium* sp. のマクロリド化合物の生産効率は十分でないため、創薬には大量培養の必要がある。*Amphidinium* sp. は、光合成を行って増殖するため、光合成速度や分裂速度を大きくする培養条件の確立と、そのための培養状態のモニタリング手法が求められる。

最適培養条件を確立するためには、*Amphidinium* sp. の増殖速度を調べる必要がある。一般に、微細藻類の増殖速度を調べるためには、血球計算盤による顕微鏡下での直接計数が用いられるが、この方法は非常に労力を要する上に、サンプリングの仕方によって誤差が生じやすい。そのため、簡便で安定した藻体濃度の測定手法が求められる。また、非接触で藻体濃度が計測できれば、実際の培養時に培養槽の外から増殖速度をモニタリングできるシステムを構築することが可能となる。このような非接触計測手法の一つとして、蛍光計測がある。

蛍光計測手法の一つである励起-蛍光マトリックス計測では、多数の励起波長および蛍光波長における蛍光強度が網羅的に調べられるため、未知の情報を検出するのに適している。このため、海水中に含まれる様々な有機物の検出などに用いられているが (Kowalczyk et al., 2005)、藻体濃度の測定に適した波長の選定にも利用できると考えられる。

一方、光合成能力や分裂速度に影響を及ぼし、増殖速度を変化させる可能性がある要素の一つとして、培養時の光質があげられる。実際、珪藻を用いた研究では、異なる光質条件下で増殖速度を比較したところ、強光照射時には光質による差異が見られないが、弱光照射時には青色光照射による増殖促進効果があることが報告されている (Mouget et al., 2005)。さらに、青色の弱光照射によって、Chl a、Chl c およびフコキサンチン等のカロテノイド類が増加することなども知られている (Mouget et al., 2004)。しかしながら、培養時の光質が *Amphidinium* sp. の増殖速度や色素量に与える影響については調べられていない。また、*Amphidinium* sp. は細胞壁をもたず、光合成補

助色素としてペリディニンを有し、Chl a および Chl c をもつ (Papagiannakis et al., 2005)。培養時の光質の違いがこれらの色素生成等に影響すると、励起-蛍光マトリックスが変化し、蛍光計測による藻体濃度の測定の際に、誤差要因となることが懸念される。

そこで本研究では、まず、*Amphidinium* sp. の培養状態の簡便なモニタリング手法を確立するため、白色蛍光灯下で培養した *Amphidinium* sp. の励起-蛍光マトリックスを調べ、藻体濃度の測定に適した波長の選定を行い、従来の血球計算盤を用いた計数法と比較した。次に、培養時の光質が蛍光計測による藻体濃度測定に与える影響を明らかにするため、LED を用いて、赤色光、青色光、赤青混合光を照射する試験区をそれぞれ設け、*Amphidinium* sp. の培養を行い、各区における蛍光強度と藻体濃度の関係を調べた。併せて、培養時の光質の違いによる *Amphidinium* sp. の増殖速度を比較した。

2. 材料および方法

供試材料

供試材料には、北海道大学大学院薬学研究科で継代培養された *Amphidinium* sp. を用いた。培養液にはオートクレーブ済みの海水に P-ES 培地 1% を加えたものを用いた。200 ml 三角フラスコ内に、調製した培養液および種となる *Amphidinium* sp. を入れ、シリコ栓で蓋をした。培養時の光合成有効光量子束密度 (PPFD: Photosynthetic photon flux density) は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、明期は 16 時間で 25.5°C に保ち、暗期は 8 時間で 24.5°C とした。

血球計算盤による直接計数と蛍光計測の比較

本実験には、白色蛍光灯下で 30 日間培養した *Amphidinium* sp. を用いた。培養した *Amphidinium* sp. の懸濁液を液体培地によって希釈し、濃度の異なる試料を調製した。用意した試料の濃度は、希釈前の原液の濃度を 100% とし、50%、33%、25%、20%、14%、および 10% とした。これらの試料に含まれる藻体濃度を Burkerturk 型の血球計算盤を用いて顕微鏡下で計数した。計数時の顕微画像の撮像には CCD (Charge-Coupled Device) カメラ (SONY, XC-999) を用いた。計数は各濃度の試料に対し 6 回ずつ行った。この計数によって得られた藻体濃度と試料濃度との関係を調べた。

励起-蛍光マトリックス計測には、3次元分光蛍光光度計 (HITACHI, F-4500) を用いた。励起波長は 10 nm 刻みに 300 nm から 800 nm とし、蛍光波長は 10 nm 刻みに 350 nm から 850 nm とした。蛍光波長 500 nm 以上の計測時には、励起光の 2 倍光、3 倍光の影響を防ぐために、黄色の

ロングパスフィルター (HOYA, Y-48) を用いた。計測は各濃度の希釈試料ごとに3回ずつ行った。*Amphidinium* sp. の沈降の影響を軽減するために、マイクロピペットを用いてセル内で十分に攪拌した後、速やかに計測した。励起-蛍光マトリックスから得られた各波長における蛍光強度と試料濃度との相関を調べ、その決定係数のマトリックスを算出した。

異なる光質下における培養

培養室内に、赤色および青色の LED (IMAC, IDB-C27/34R, B) を設置することで、赤区、青区、赤青混合区を設けた。これら3区において、培養フラスコの中心のPPFDが $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるようにLEDからの出力およびフラスコとLEDとの距離を調節した。赤青混合区のPPFD比は赤:青=4:1とした。培養は株分け後から30日間行い、3日ごとに励起-蛍光マトリックス計測を行った。1つのフラスコにつき3回ずつ励起-蛍光マトリックス計測を行い、その平均値をそのフラスコ内で培養された *Amphidinium* sp. の励起-蛍光マトリックスとした。また、1つの区につき3つの培養フラスコを用意し、同一区における蛍光強度のばらつきを確認した (n=3)。蛍光強度と藻体濃度の換算には、血球計算盤によって計数可能な濃度範囲の試料を用いて予め算出した検量線を用いた。

3. 結果および考察

血球計算盤による直接計数と蛍光計測の比較

Fig. 1に、試料の希釈後の濃度と血球計算盤によって計数された藻体濃度の関係、および、試料濃度100%の計数時における血球計算盤の画像を示す (Fig. 1-B, C)。回帰直線および決定係数は、試料濃度100%のときの計数値を除いたものから算出したものを示す。希釈後の濃度が50%以下のときには、希釈濃度と藻体濃度の間にほぼ直線な関係がみられたが、濃度100%の計数値は回帰直線から予想される値より小さかった (Fig. 1-A)。濃度100%のとき、血球計算盤上に *Amphidinium* sp. が散らばって見られる場合 (Fig. 1-B) と、数十個の個体からなる塊が見られる場合 (Fig. 1-C) があった。

Amphidinium sp. は増殖に伴い、粘性のある多糖類を合成することで、培養瓶の底などに定着する。*Amphidinium* sp. の塊は、この粘性多糖類によってできたと考えられる。塊が形成されると、それ以外の部分では藻体濃度が小さくなる。濃度100%の計数値が回帰直線から予想される値より小さかったのは、塊部分とそれ以外の部分が平均化されるには計数回数が不十分だったためと考えられる。一方で、希釈後の濃度が50%以下の時に、相対濃度と藻

体濃度に高い相関が見られた。これは、上述の塊の影響がなくなったためと考えられる。濃度100%の試料を攪拌しただけでは塊はなくならなかったことから、試料の希釈により多糖類が溶解した可能性が考えられる。これらのことから、血球計算盤を用いて *Amphidinium* sp. の藻体濃度を計数するには、増殖に伴って形成される塊を破壊するか、塊部分とそれ以外の部分が平均化されるのに十分な回数だけ計数する必要があるといえる。

Fig. 2に、蛍光灯下で培養された *Amphidinium* sp. 試料の励起-蛍光マトリックスの経時変化を示す。励起波長300nmから400nm、蛍光波長350nmから500nmに蛍光強度の大きい領域が見られた。また、この領域における蛍光強度のピークは励起波長320nm、蛍光波長380nmであった。さらに、この領域の蛍光は培養開始後0日目から見られ、その強度は培養時間に伴い増加した。そのため、この領域の蛍光は、P-ES培地および海水に含まれていた物質、または、*Amphidinium* sp. の増殖に伴い生成された物質から発せられたと考えられる。この蛍光を発する物質が藻体内に存在するか、藻体外に存在するか確かめるために、試料を孔径0.20 μm のメンブレンフィルター

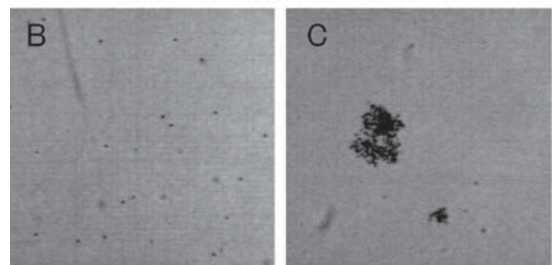
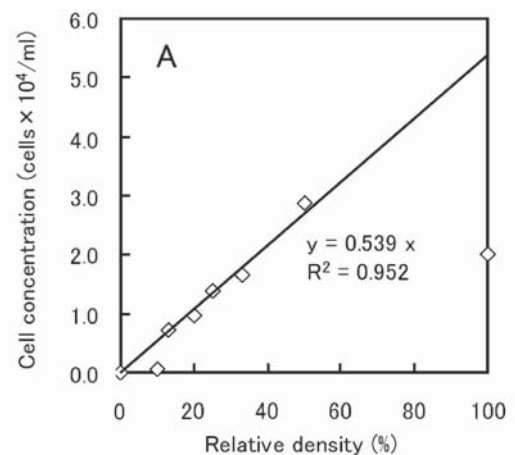


Fig. 1 A relationship between relative density (dilution ratio) of *Amphidinium* sp. culture solution and cell concentration of the algae measured with a hemocytometer (A). Microscopic images of the cell cluster in relative density of 100% (B and C).

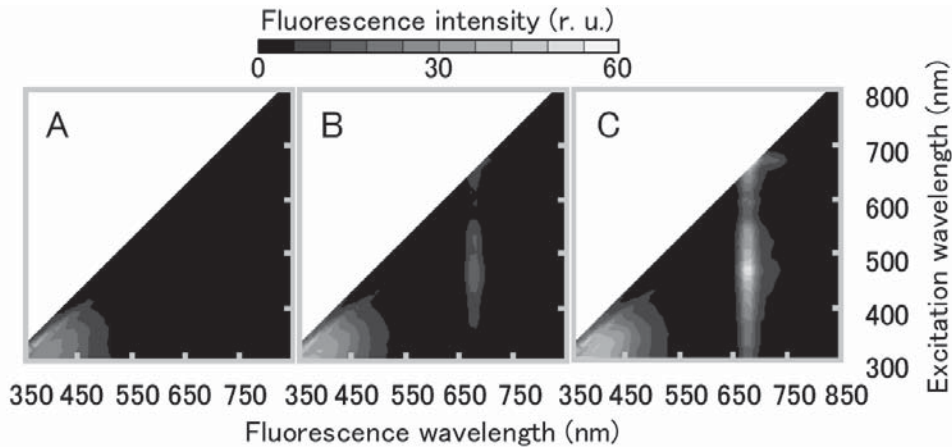


Fig. 2 Changes in excitation-emission matrices (EEM) of *Amphidinium* sp. culture solution measured with the spectrofluorometer. A, B and C represent respectively the EEMs of *Amphidinium* sp. cultured for 9, 21 and 30 days after the dividing into the culture flasks under the white fluorescent light.

(Advantec Toyo Kaisha, Ltd., DISMIC-25CS) で濾過し、その濾液の蛍光計測を行ったところ、この蛍光は濾過前後でほとんど変化が見られなかった。このことから、本領域に発する蛍光は、藻体外に含まれる物質から発せられたと考えられる。

また、培養開始後 30 日目の試料の励起-蛍光マトリックスには、励起波長 300 nm から 670 nm において、蛍光波長 680 nm をピークとする蛍光強度の大きい領域がみられた。この領域の蛍光は、培養開始後 9 日目まではほとんど見られなかったが、その後徐々に増加した。この領域における蛍光強度のピークは、励起波長 480 nm、蛍光波長 680 nm であった。一般に、常温における Chl *a* 蛍光のピークは 680 nm および 740 nm 付近に見られるため (Govindjee, 1995, Lichtenthaler et al., 1996)、この領域は Chl *a* 蛍光と考えられる。ピークが 680 nm にしか見られなかったのは、Chl *a* 濃度が比較的低かったため、蛍光の再吸収の影響が小さく、740 nm の蛍光が相対的に小さくなったことによると考えられる (Hak et al., 1990)。励起波長域 300 nm から 670 nm において連続的に Chl *a* 蛍光がみられたのは、Chl *c* やペリディニン等に吸収された光エネルギーも、最終的に Chl *a* に伝達されたためと考えられる。また、試料をメンブレンフィルターで濾過すると、この領域における蛍光は見られなくなった。このことから、Chl *a* は藻体内のみに含まれていたといえる。

Fig. 3 に、蛍光強度と、試料濃度との決定係数の励起-蛍光マトリックスを示す。励起波長 300 nm から 550 nm、蛍光波長 350 nm から 420 nm の範囲、および励起波長 300 nm から 690 nm、蛍光波長 630 nm から 780 nm の範囲に、

決定係数が 0.96 以上を示す領域がみられた。前者は藻体外の物質から発せられた蛍光波長の範囲、後者は藻体内の Chl *a* から発せられた蛍光波長の範囲である。上述の通り、Chl *a* は藻体内のみに含まれていたため、藻体濃度の推定には Chl *a* 蛍光の計測がより適しているといえる。血球計算盤による計数では過小評価された濃度範囲を含め、Chl *a* 蛍光強度と藻体濃度に高い相関が見られたのは、励起-蛍光マトリックス計測が一定の計測領域の平均値を算出する計測法であり、試料内に塊が形成された場合も平均化して計測できたためと考えられる。

異なる光質下における培養

Fig. 4 に、白区、赤区、青区、赤青混合区における蛍光強度と藻体濃度の関係を示す。蛍光強度は、いずれも励

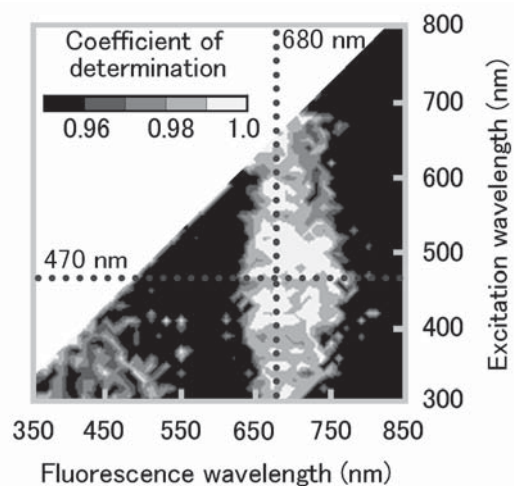


Fig. 3 Coefficients of determination between fluorescence intensity and cell concentration of *Amphidinium* sp. culture solution.

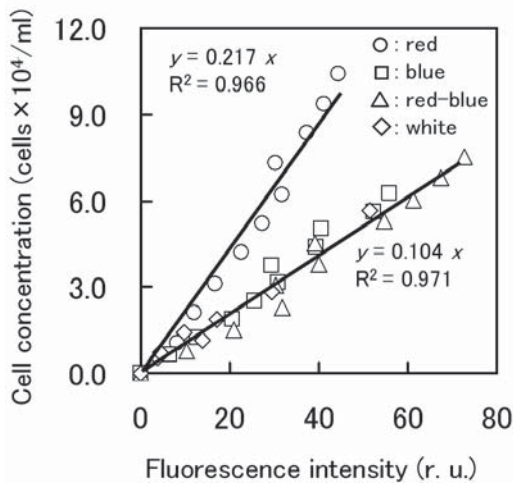


Fig. 4 Relationships between fluorescence intensity and cell concentration of *Amphidinium* sp. solution cultured for 30 days under red, blue, red-blue LED and white fluorescent light. R^2 represents the coefficient of determination.

起波長 470 nm、蛍光波長 680 nm における値を用いた。これは、Chl a 蛍光強度のピークであった。また、藻体濃度は、各区において予め求めておいた血球計算盤による計数値と試料濃度の検量線から算出した。なお、このとき用いた検量線は、血球計算盤上に *Amphidinium* sp. の塊ができない濃度範囲で求めた。全ての区において、蛍光強度と藻体濃度の間に高い相関が見られた。また、白区、青区、および赤青混合区における蛍光強度と藻体濃度の関係は一つの回帰式で表されたが、赤区におけるその関係は別の回帰式で表された。さらに、赤区の見方は他の区の見方のおよそ 2 倍となった。これは、赤区で培養された藻体一個あたりの蛍光強度がその他の区で培養された藻体一個あたりの蛍光強度のおよそ 2 分の 1 となったことを示している。一般に、暗条件に置いた植物に光を照射すると、Chl a 蛍光の経時変化が見られる (Govindjee, 1995)。しかしながら、励起-蛍光マトリックス計測の励起光は微弱であるため、蛍光クエンチングはほとんどなく、Chl a 蛍光の経時変化もほとんどないと考えられる。したがって、Chl a 蛍光強度の違いは、Chl a およびその他の光合成色素量の違いによる可能性が高い。このことから、赤区で培養された *Amphidinium* sp. は、他の区で培養されたものよりも、藻体一個あたりの光合成色素量がおよそ 2 分の 1 であったことが推察される。

Fig. 5 に赤区、青区、赤青混合区において、血球計算盤による直接計数から得られた藻体濃度の経時変化、および、励起波長 470 nm、蛍光波長 680 nm における Chl a 蛍光強度から換算された藻体濃度の経時変化を示す。血球

計算盤による計数値は、藻体濃度が大きくなるにつれてばらつきが大きくなったが (Fig. 5-A)、Chl a 蛍光計測による計数値は比較的ばらつきが小さかった (Fig. 5-B)。このことから、実際の培養時においても、血球計算盤より蛍光計測を用いた方が安定した藻体濃度測定ができたといえる。また、高濃度時の過小評価は、青区よりも赤青混合区のほうで顕著だった。これは、増殖に伴って塊を構成する藻体数が徐々に多くなったという観察結果から、青区よりも増殖速度の大きかった赤青混合区では、比較的早期に塊が形成されたためと考えられる。

Fig. 5-B において、赤青混合区の藻体濃度は、株分け後 12 日目から 21 日目まで急激に増加し、その後はほぼ一定値を示した。また、青区の藻体濃度は、株分け後 18 日目から藻体濃度のほぼ直線的な増加がみられた。一方、30 日目には赤青混合区の藻体濃度とほぼ一致した。一方、赤区では、藻体濃度にほとんど変化は見られなかった。Fig. 4 において、例外的に別の回帰直線で表された赤区で培養した *Amphidinium* sp. の増殖速度は、その他の区に比べ著しく小さかった。このことから、異常な培養状態でなければ、蛍光計測による濃度測定において、一つの回帰直線が適用可能であることが示唆された。

微細藻類である珪藻の研究において、青色光照射によって Chl およびカロテノイド類の色素量が増加し (Mouget et al., 2004)、さらに、増殖速度が大きくなったという報告がある (Mouget et al., 2005)。Fig. 4 から、赤区よ

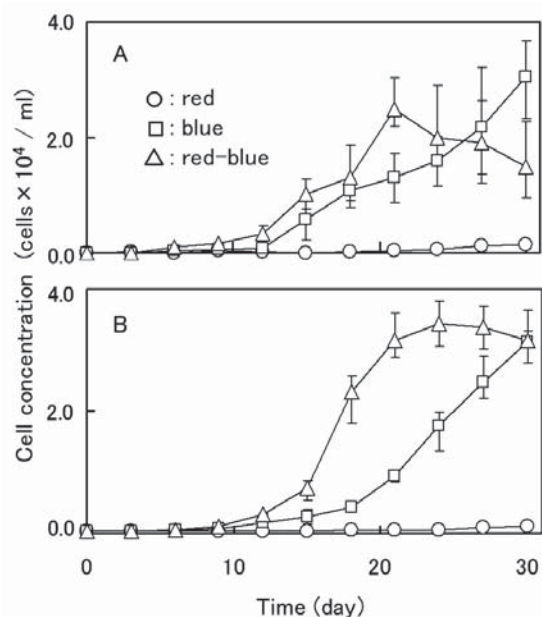


Fig. 5 Changes in cell concentration of *Amphidinium* sp. solution cultured under red, blue and red-blue LED measured by the hemocytometry (A) and by fluorometry (B). The vertical bars represent the width from minimal to maximal values.

りもその他の区で培養された *Amphidinium* sp. に光合成色素量が多く含まれたことが示唆され、Fig. 5 から、赤区よりも青区および赤青混合区で培養された *Amphidinium* sp. の藻体濃度増殖速度は、顕著に大きかった。このことから、*Amphidinium* sp. においても、青色光照射が藻体内の色素量を増やし、増殖速度を大きくする効果がある可能性が示唆された。さらに、青区に比べ、赤区における増殖速度が極端に小さかったこと、また、赤青混合区の PPF 比が赤：青 = 4：1 と、青色光割合が小さかったにもかかわらず、青区よりも赤青混合区で培養した *Amphidinium* sp. の増殖速度が大きかったことから、青色光強度は小さくても *Amphidinium* sp. の増殖には大きな影響があると考えられた。

4. おわりに

本研究では、励起-蛍光マトリックス計測を用いて、*Amphidinium* sp. 懸濁液の濃度測定に Chl *a* 蛍光計測が適していることを示した。Chl *a* 蛍光計測を用いると、増殖に伴い形成される塊を破壊する処理を必要とせず、簡便かつ安定した藻体濃度測定が可能となる。また、Chl *a* 蛍光計測は原理的に培養槽の外側から増殖速度を把握することが可能であり、工場などでの実際の培養時にも適用可能と考えられる。将来的には、LED やレーザーなどを励起光源として、Chl *a* 蛍光を計測することにより、藻体濃度を計測することで、培養状態の管理に用いることができると考えられる。また、*Amphidinium* sp. の光合成色素量の増加や増殖に青色光照射が不可欠であること、さらに、その青色光強度は小さくても、*Amphidinium* sp. の増殖速度に及ぼす効果は大きいことが示唆された。光強度ではなく、光質によって藻類の増殖を制御することは、電力コストの削減等につながると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、藻類の培養および蛍光計測に関する貴重なご意見、ご協力を頂いた遠藤良輔氏（日本大学大学院総合科学研究科）に深甚な謝意を表す。

引用文献

- Govindjee, 1995 : 63 years since Kautsky - Chlorophyll-a fluorescence, *Austral. J. Plant Physiol.*, **22**, 131-160.
- Hak R., Lichtenthaler H. K. and Rinderle U., 1990 : Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves radiation and development of leaves, *Radi. Environ. Biophysics*, **29**, 329-336.
- Iwamoto R., Kobayashi J., Horiguchi T. and Tsuda, M., 2005 : The discrimination of marine *Amphidinium* species (Dinophyta) that producing cytotoxic macrolides using hybridization methods, *Phycologia*, **44**, Supplement, 104
- Kim, M., McMurtrey J., Mulchi C., Doughty C., Chappelle E. W. and Chen Y., 2001 : Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves, *Applied Optics*, **40**, 157-166.
- Kobayashi J. and Tsuda M., 2004 : Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates, *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 77-93.
- Kowalczyk P., Ston-Egiert J., Cooper W. J., Whitehead R. F. and Durako M. J., 2005 : Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy, *Marine Chem.*, **96**, 273-292.
- Lichtenthaler, H. K., Lang M, Sowinska M., Heisel F. and Mische J. A., 1996 : Detection of vegetation stress via a new high-resolution fluorescence imaging system, *J. Plant Physiol.*, **148**, 599-612.
- Mouget J. L., Rosa P. and Tremblin G., 2004 : Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms, *J. Photchem. Photobiol. B*, **75**, 1-11.
- Mouget J. L., Rosa P., Vachoux C. and Tremblin G., 2005 : Enhancement of marenine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*, *J. Appl. Phycol.*, **17**, 437-445.
- Papagiannakis E., Stokkum I. H. M., Fey H., Büchel C. and Grondelle R., 2005 : Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms, *Photosyn. Res.*, **86**, 241-250.
- Tsuda M., Izui N., Shimbo K., Sato M., Fukushi E., Kawabata J. and Kobayashi J., 2003 : Amphidinolide Y, a novel 17-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp.: Plausible Biogenetic precursor of Amphidinolide X, *J. Org. Chem.*, **68**, 9109-9112.