

原著論文

励起-蛍光マトリックスによる *Amphidinium* sp. の 成育過程のモニタリング

Monitoring of Growth Process of *Amphidinium* sp. by Excitation-emission Matrices

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

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

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

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

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

³ 高知大学海洋コア総合研究センター 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University

Monobe-B200, Nankoku-City, Kochi 783-8502, Japan

(2007年3月29日受付、2007年6月28日受理)

ABSTRACT

In this study, the excitation-emission matrix (EEM) was used to select suitable wavelengths for monitoring growth process of *Amphidinium* sp. As the result, the chlorophyll fluorescence intensity at 680 nm excited by the 470 nm light (E470 F680) which was suitable for measuring cell concentration changed with reflection intensity of suspension in a culture flask. Meanwhile, the fluorescence intensity at 620 nm excited by the 400 nm light (E400 F620) increased with culture time even when cell concentration of *Amphidinium* sp. decreased. It was implied that the E400 F620 matter was an exudate of porphyrin-like compounds derived from photooxidized chlorophyll (Chl). The EEM spectroscoped both the excitation and emission wavelengths, therefore the EEM was an efficient method to detect the increase of the compounds because the excitation and fluorescence wavelengths of the compounds were neighbouring those of Chl *a*. Consequently, it was able to simultaneously monitor living and dead cell concentrations by measuring E470 F680 and E400 F620.

Key words : *Amphidinium* sp., Excitation-emission matrix, Fluorescence, Monitoring

*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

海棲性渦鞭毛藻類の一種である *Amphidinium* sp. が生産するマクロライド化合物は、新規抗がん剤のリード化合物となる可能性が期待されている (Tsuda et al., 2003; Kobayashi and Tsuda, 2004)。実際の創薬に用いるためには、できるだけ多くのマクロライド化合物を得る必要がある。しかしながら、*Amphidinium* sp. の生産するマクロライド化合物量および増殖速度は、実際に創薬に利用するには十分でないのが現状である。そのため、マクロライド化合物の生産性が高い種のスクリーニングに加え、大量培養のための最適培養条件の探索と成育状態のモニタリング手法の確立が求められている。

マクロライド化合物の生産性が高い種のスクリーニングには、分子遺伝学的手法が用いられており、より多くのマクロライド化合物を生産する種が次々に選び出されている (Iwamoto et al., 2005)。また、最適培養条件の探索では、温度や明暗周期、培養液の成分や濃度、ガス組成、培養時の光質の影響などが調べられつつある。さらに、成育状態のモニタリング手法としては、多くの情報を網羅的に得ることができる分光手法が注目されている (Matousov et al., 1999; Konishi and Omasa, 2003; Konishi et al., 2007)。

分光手法の中でも、励起-蛍光マトリックス計測は、励起波長と蛍光波長の両者を細かく分光するため、その組合せは膨大で、特定の波長の計測では見逃す可能性のある蛍光の特徴を網羅的な計測によって調べることができる。そのため、未知の情報を得るのに適した手法であり、植物のストレス診断 (Konishi and Omasa, 2003) や、海水中に含まれる微量成分の検知 (Kowalczyk et al., 2005) などに用いられている。*Amphidinium* sp. に含まれるクロロフィル (以下 Chl) やペリディニンが増殖に伴って増加するため、これら色素の量を励起-蛍光マトリックスによって計測することで、藻体濃度が測定可能である (Konishi et al., 2007)。さらに、藻体濃度だけでなく、成育過程で生じる肉眼では確認できない色素の微妙な変化を励起-蛍光マトリックスによって検出できる可能性がある。

そこで、本研究では、培養に伴って変化する励起-蛍光マトリックスから、*Amphidinium* sp. の成育過程のモニタリングに適した波長の組合せを選択することを目的とした。

2. 材料および方法

2.1 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。培養時の光源には赤色および青色の LED を使い、赤色光および青色光が混合した状態で、光合成有効光量子束密度 (PPFD: Photosynthetic photon flux density) を $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。赤色 LED および青色 LED の光合成有効光量子束密度は、フラスコ中央部で 4 : 1 となるように LED 出力、および、LED と培養フラスコの位置を調節した。明期は 16 時間で $25.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ とし、暗期は 8 時間で $24.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ とした。同一の光条件に培養フラスコをそれぞれ 4 つ用意し、そのうち 1 つを下記の可視画像計測用とし、残り 3 つを励起-蛍光マトリックス計測用とした。

2.2 可視画像の計測

培養開始から 3 日ごとに、フラスコ内の培養液の可視画像の計測を行った。可視画像の計測には、デジタルカメラ (RICOH, RDC-7S) を用いた。可視画像計測は、冷陰極管を用いた面光源 (HAKUBA, KLV-5700) 下で行った。濃度分布および変化を見やすくするために、フラスコの底面および背面には白色のボール紙を設置した。

2.3 励起-蛍光マトリックス計測

培養開始から 3 日ごとに、励起-蛍光マトリックス計測を行った。励起-蛍光マトリックス計測には三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 以上の計測の際には、励起光の 2 倍光、3 倍光の影響を防ぐために、ロングパスフィルター (HOYA, Y-48) を用いた。

培養中の光照射による Chl *a* 蛍光クエンチングの影響を避けるために 20 分間の暗処理を行った。その後、フラスコ内における藻体濃度分布を均一にするために、フラスコ内で培養液を十分に攪拌してから計測用石英セルに取り出した。さらに、*Amphidinium* sp. の沈降の影響をさけるために、マイクロピペットを用いてセル内で静かに攪拌した後、速やかに計測した。同一のフラスコから 3 サンプル取り出し、平均値を求めた。この計測を励起-蛍光マトリックス計測用の 3 つの培養フラスコについて行い、計測値のばらつきを確認した ($n=3$)。

3. 結果

3.1 可視画像の計測

Fig. 1に *Amphidinium* sp. 培養フラスコの可視画像の経時変化を示す。撮像したRGB画像からG画像を作成し、グレースケールで表示した。図中のa、b、c、dおよびeの記号はFig. 3内のa、b、c、dおよびeに対応し、それぞれ培養開始後12、21、30、39および48日目を表す。培養開始後30日 (Fig. 1-c) までは、特にフラスコ底面付近で培養液の色が濃くなり、その後徐々に薄くなった。

3.2 励起-蛍光マトリックス計測

Fig. 2に、*Amphidinium* sp. 培養時における励起-蛍光マトリックスの経時変化を示す。図中のa、b、c、dおよびeの記号はFig. 3のa、b、c、dおよびeに対応し、それぞれ培養開始後12、21、30、39および48日目を表す。培養開始後30日目以降から、励起波長400 nm、蛍光波長620 nmを中心とした蛍光が確認された。この蛍光の分布位置を矢印で示した。この領域の蛍光強度は培養日数とともに、徐々に大きくなった。励起波長300 nmから450 nm、蛍光波長350 nmから550 nmに蛍光強度の大きな領域が見られた。この領域の蛍光強度は培養に伴い、徐々に大きくな

った。なお、Konishi et al. (2007)でも報告したように、励起波長300 nmから650 nmにおいて、蛍光波長680 nmをピークとする蛍光強度の分布が見られた。そして、この領域において最も顕著なピークは、励起波長470 nm、蛍光波長680 nmに見られた (Fig. 2-a)。この領域の蛍光強度は、培養開始後30日目までは培養日数の経過に伴い大きくなり、30日目以降から徐々に小さくなった。

Fig. 3に、励起波長470 nm、蛍光波長680 nmの蛍光 (以下 E470 F680) 強度の経時変化 (A)、および、励起波長400 nm、蛍光波長620 nmの蛍光 (以下 E400 F620) 強度の経時変化 (B) を示す。蛍光強度は、培養開始後15日目から急激に大きくなり、21日目から増加率が小さくなったが、30日目まで増加した (Fig. 3-A)。その後、蛍光強度は徐々に小さくなった。一方、蛍光強度は、培養開始後15日目から徐々に大きくなり、培養期間を通して増加が見られた (Fig. 3-B)。

Fig. 4に、培養開始後48日目の励起-蛍光マトリックス (A)、および、その培養液の濾液の励起-蛍光マトリックス (B) を示す。濾過には、孔径0.20 μm のメンブレンフィルター (Advantec Toyo Kaisha, Ltd., DISMIC-25CS) を用いた。励起波長300 nmから450 nm、蛍光波長350 nm

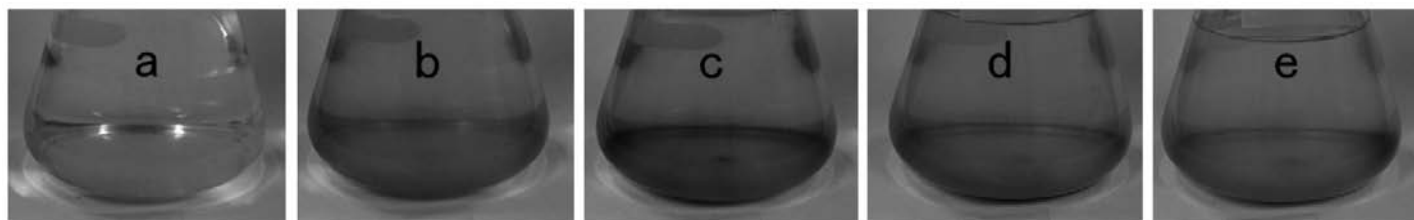


Fig. 1 Visible images of suspensions of *Amphidinium* sp. in culture flasks labeled by a, b, c, d and e which respectively represent 12, 21, 30, 39 and 48 days after the start of culture.

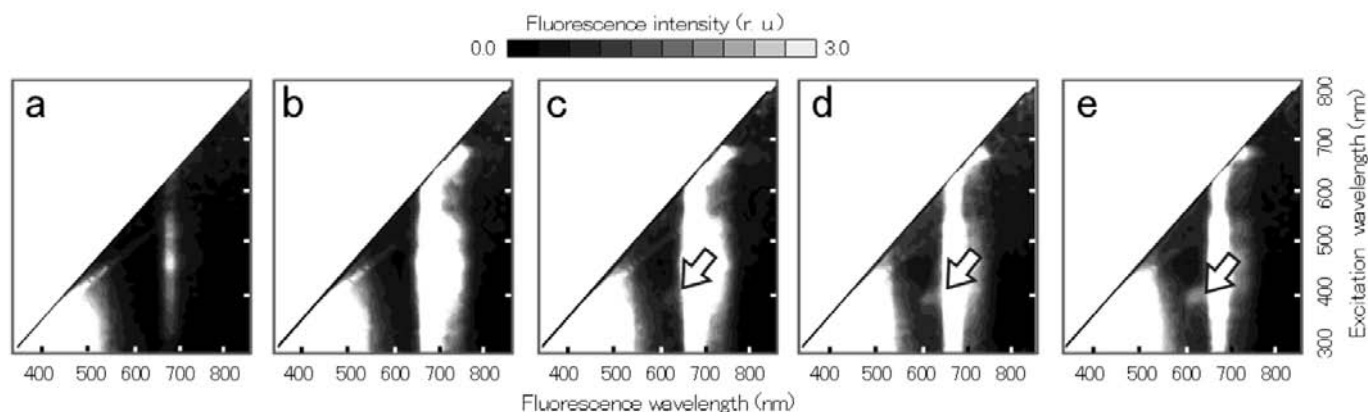


Fig. 2 Changes in excitation-emission matrices of *Amphidinium* sp. in culture flasks labeled by a, b, c, d and e which respectively represent 12, 21, 30, 39 and 48 days after the start of culture.

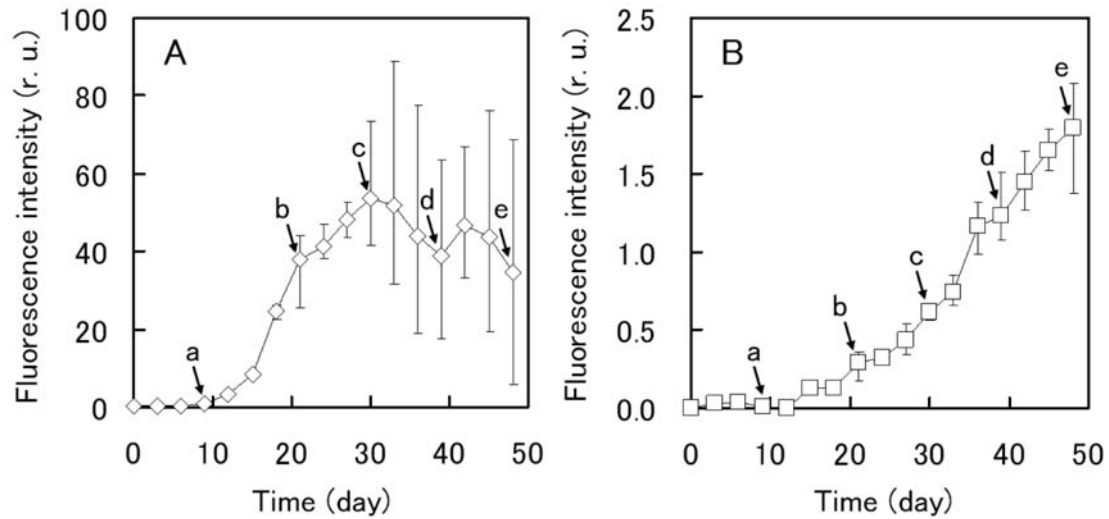


Fig. 3 Changes in fluorescence intensity at 680 nm excited by 470 nm light (A) and at 620 nm by 400 nm light (B). Label a, b, c, d and e correspond to the date in Fig.1 and Fig. 2.

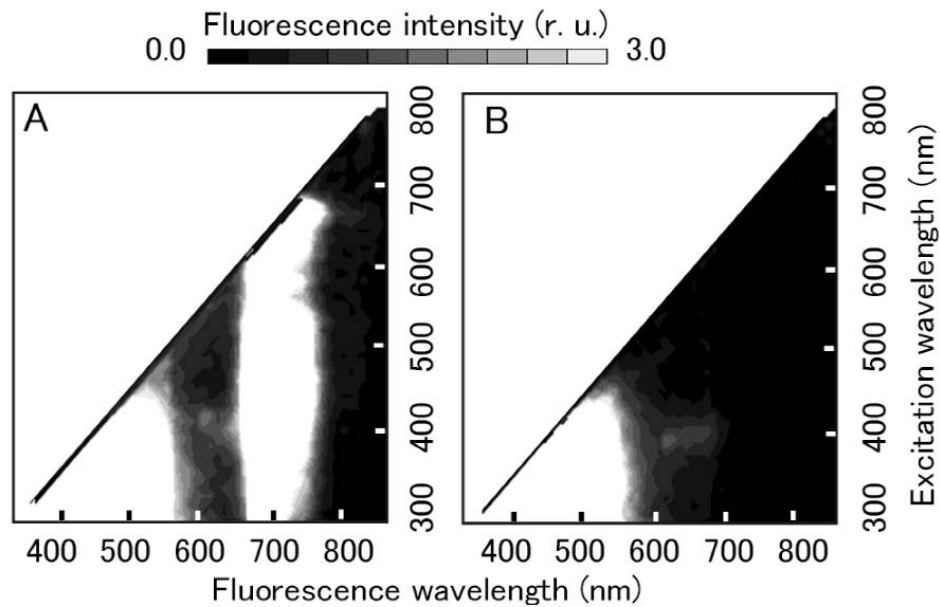


Fig. 4 Excitation-emission matrices of suspensions of *Amphidinium* sp. cultured for 48 days before (A) and after (B) the filtration.

から 550 nm における蛍光強度の大きな領域と、E400 F620 は、濾過前後でほとんど変化が見られなかった (Fig. 4-A,B)。一方、濾過前の培養液の励起-蛍光マトリックスには、励起波長 300 nm から 650 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な領域が見られたが (Fig. 4-A)、濾過後の培養液の励起-蛍光マトリックスには、蛍光波長 680 nm をピークとする強い蛍光はみられなくなった (Fig. 4-B)。

4. 考察

Amphidinium sp. は増殖に伴い、粘性のある多糖類を合成することで、数個から数十個の個体が塊となり、培養

瓶の底などに定着する。Fig. 1 において、特に培養フラスコの底において色が濃くなったのは、*Amphidinium* sp. が増加し、定着していったためと考えられる。また、Konishi et al. (2007) でも述べたように、E470 F680 は、Chl *a* 蛍光であり、藻体濃度と相関がある。なお、フラスコ内の培養液の可視画像 (RGB の G) における反射光強度と E470 F680 強度は、培養開始後 30 日目までは増加し、その後徐々に減少するという同様の挙動を示した。このことから、可視画像に反映されるのは *Amphidinium* sp. の藻体濃度といえる。

Chl は光酸化を受けたときに、中間産物としてポルフィリン様物質を生じる (Llewellyn et al., 1990; Merzlyak et al.,

1996) ことが知られている。Chl が光酸化を受けて生じるポルフィリン様物質には様々なものがあり、シアノバクテリアの障害検知 (Merzlyak et al., 1996) や食品の劣化状態を示す指標 (Wold et al., 2005) として用いられる。これらのポルフィリン様物質はいずれも 405 nm から 410 nm 付近に吸光度のピークをもち、620 nm から 630 nm 付近に蛍光強度のピークをもつ (Merzlyak et al., 1996; Wold et al., 2005)。これらのことから、本研究で見られた E400 F620 は、ポルフィリン様物質からの蛍光と考えられた。

ポルフィリン様物質の量を調べる方法としては、クロマトグラフィーや吸光法がある。クロマトグラフィーでは、有機溶媒を用いて試料から色素を抽出する必要があるが、簡便ではない。また、吸光スペクトル計測は簡便であるが、Chl *a* とポルフィリン様物質の吸収波長が重なっているため誤差が大きくなる。一方、励起-蛍光マトリックス計測では、励起波長および蛍光波長をともに分光するため、Fig. 2 に示されるように E400 F620 が Chl *a* 蛍光の領域から島状に分離された形で検知することが可能であった。

E400 F620 を発する物質は濾液に含まれ、Chl *a* は濾液に含まれなかった。藻体はメンブレンフィルターの孔径よりも大きいことから、Chl *a* は藻体内のみに存在し、E400 F620 を発する物質は藻体外に存在したといえる。このことから、ポルフィリン様物質は *Amphidinium* sp. の藻体から滲出していたと考えられる。このとき、ポルフィリン様物質を生じた *Amphidinium* sp. の多くは死んでいたと考えられる。これは、E400 F620 強度が、藻体濃度が小さくなくても増加し続けたことから支持される。したがって、E400 F620 強度は、色の濃さや Chl *a* 蛍光強度だけではわからない *Amphidinium* sp. の死細胞濃度の指標となる波長の組合せといえる。

以上のことから、*Amphidinium* sp. の培養時に E470 F680 と E400 F620 の蛍光計測を行うことによって、生細胞および死細胞の藻体濃度の同時計測が可能と考えられる。したがって、励起-蛍光マトリックスを用いることで、*Amphidinium* sp. の成育過程のモニタリングに有用な波長の組合せを選択することができたといえる。

5. おわりに

本研究では、*Amphidinium* sp. の成育過程のモニタリングに適した励起波長および蛍光波長を選択するために、励起-蛍光マトリックス計測を用いた。その結果、藻体濃度と相関のある E470 F680 強度は、フラスコ内の培養液の反射光強度とも同様の挙動を示した。一方、E400 F620 強度

は、藻体濃度が減少しても増加し続けた。E400 F620 を発する物質は、Chl が光酸化を受けて生じたポルフィリン様物質と考えられ、藻体外に存在したため、死細胞濃度の指標となることが示唆された。また、Chl *a* 蛍光波長と近接した E400 F620 を検出するには、励起波長および蛍光波長をともに分光する励起-蛍光マトリックス計測が有効といえた。以上のことから、*Amphidinium* sp. の培養時に E470 F680 と E400 F620 の蛍光計測を行うことによって、生細胞および死細胞の藻体濃度の同時計測が可能であり、*Amphidinium* sp. の成育過程のモニタリングに有用であることが示唆された。

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

- 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.
- Kobayashi, J. and Tsuda, M., 2004 : Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates, *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 77-93.
- Konishi, A. and Omasa, K., 2003 : Effects of water deficit on excitation-emission matrix of spinach leaves, *Agri. Infor. Res.*, **12**, 25-32.
- Konishi, A., Omasa, K., Hayashi, M., Masuda, A., Ozawa, T. and Tsuda, M., 2007 : Measurement of *Amphidinium* sp. cell concentration by fluorometric method – effects of light quality on growth rate –. *Eco-Engineering*, **19**, 89-94.
- Kowalczyk, P., Stoń-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.
- Llewellyn, C. A., Mantoura, R. F. G. and Brereton, R. G., 1990 : Products of chlorophyll photodegradation : 2. structural identification. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1043-1047.
- Matouskova, M., Bartoskova, H., Naus, J. and Novotny, R., 1999 : Reaction of photosynthetic apparatus to dark desiccation sensitively detected by the induction of chlorophyll fluorescence quenching, *Plant Physiol.*, **155**, 399-406.
- Merzlyak, M. N., Pogosyan, S. I., Lekhimena, L., Zhigalova, T. V.,

- Khozina, I. F., Cohen, Z. and Khrushchev, S. S., 1996 : Spectral characterization of photooxidation products formed in chlorophyll solutions and upon photodamage to the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Rus. J. Plant Physiol.*, **43**, 160-168.
- 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.
- Wold, J. P., Veberg, A., Nilsen, A., Inani, V., Juzenas, P. and Moan, J., 2005 : The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. a study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *Inter. Dair. J.*, **15**, 343-353.