

短 報

クロロフィル蛍光画像を用いた *Amphidinium* sp. の藻体濃度 および光合成電子伝達収率の評価

Assesment of Cell Concentration and Yield of Photosynthetic Electron Transport of *Amphidinium* sp. with Chlorophyll Fluorescence Imaging

小西充洋¹、大政謙次^{1*}、林 正雄¹、遠藤良輔²、増田篤稔³、小澤知子³、津田正史⁴
Atsumi Konishi¹, Kenji Omasa^{1*}, Masao Hayashi¹, Ryosuke Endo², Atsunori Masuda³, Tomoko Ozawa³
and Masashi Tsuda⁴

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 日本大学大学院総合化学研究科 〒102-0073 東京都千代田区九段北 4-2-1
Advanced Research Institute for Sciences and Humanities, Nihon University
4-2-1 Kudan-kita, Chiyoda, Tokyo 102-0073, Japan

³ 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

⁴ 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4月26日受付、2007年10月2日受理)

ABSTRACT

In this study, chlorophyll fluorescence imaging of the maximal yield in the dark was applied to estimation of cell concentration of *Amphidinium* sp. As the result, a linear relationship was observed between chlorophyll fluorescence intensity and cell concentration. It was revealed that the method enabled rapid measurement of cell concentration without effect of chlorophyll fluorescence induction.

To investigate the effect of light qualities during the culture on photosynthetic activities of *Amphidinium* sp., changes in Φ_{PSII} of the algae cultivated under red, blue and red+blue lights were compared. As the result, the Φ_{PSII} of algae cultivated under red+blue light was higher than that under blue light. It was implied that the light quality affected the efficiency of the photosynthetic electron transport. Meanwhile, the Φ_{PSII} of algae cultivated under red light was similar to that under red+blue light in spite of its low growth rate. It was implied that the heat dissipation of *Amphidinium* sp. cultivated under red light did not increase because their low chlorophyll concentration led to low light absorbance.

Key words : *Amphidinium* sp., Cell concentration, Chlorophyll fluorescence imaging, Φ_{PSII}

*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. は、新規抗癌剤のリード化合物となる可能性があるマクロライド化合物を生産する (Kobayashi and Tsuda, 2004)。この *Amphidinium* sp. の大量培養のためには、増殖に適した培養環境の探索とその増殖状態のモニタリングが必要とされる。既報で分光蛍光計測が藻体濃度の測定や藻体のストレス評価に利用できることを報告した (Konishi et al., 2007a, 2007b)。ここでは、1 サンプル毎に多数の波長において蛍光計測をしたため、計測に時間がかかるという欠点があった。藻体濃度の推定にはクロロフィル (以下 Chl) 蛍光計測が用いられており (Parésysa et al., 2005)、さらに画像計測手法を用いれば、一度に多くのサンプルを計測できるが (Barbagallo et al., 2003)、Chl 画像計測を微細藻の濃度推定に適用した例は見られない。

Chl 蛍光画像計測には、インダクション法 (Omasa et al., 1987)、飽和パルス法 (Daley et al., 1989)、分光法 (Lichtenthaler, 1996) 等があり、光合成電子伝達反応の障害部位の特定、熱放散活性や光合成電子伝達収率の計測、含有色素量等を調べるのに利用されている。この中で、飽和パルス法によって得られる Φ_{PSII} というパラメータは、光合成電子伝達の量子収率を表し、嫌気条件では光合成速度と高い相関がある (Genty et al., 1989)。また、暗処理された植物に光照射を行うと光合成反応が誘導されるが、光合成関連酵素の光活性化や二酸化炭素吸収能力の程度によって Φ_{PSII} の経時変化が異なることが知られている (Bro et al., 1996)。

一方、既報 (Konishi et al., 2007a) において、*Amphidinium* sp. の増殖速度や含有色素量を変化させる培養条件として、培養時の光質の影響を調べた。具体的には、赤色光のみ照射した赤区、青色光のみ照射した青区、赤色光と青色光を照射した赤青混合区において *Amphidinium* sp. を培養した。その結果、赤区で培養された *Amphidinium* sp. の色素量が、その他の区で培養されたものの2分の1程度になり、培養期間中ほとんど藻体が増殖しないこと、さらに、赤色光に少し青色光を加えた場合、青色光のみで培養したものよりも増殖速度が大きくなることが明らかとなった。このことから、培養時の光質は、*Amphidinium* sp. の光合成活性に影響を及ぼしたと考えられたが、光合成活性については調べていなかった。

そこで本研究では、多くのサンプルの Chl 蛍光強度を一度に計測できる画像計測手法を用いて、藻体濃度の推定を試みた。また、培養時の光質が *Amphidinium* sp. の光合

成活性に及ぼす影響を調べるため、赤区、青区、赤青混合区で培養された *Amphidinium* sp. の Φ_{PSII} の光合成誘導期における経時変化を比較した。

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ヴ済みの海水に 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。培養時に用いた白色蛍光灯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。

Chl 蛍光画像計測システム

Fig. 1 に、本実験に用いた Chl 蛍光画像計測システムの概略図を示す。*Amphidinium* sp. 懸濁液をマイクロプレートに分注し、乾燥を防ぐためにスライドガラスで蓋をした。Chl 蛍光を励起する光源には、メタルハライドランプ (Sumita Optical Glass, Inc., LS-M180) を用いた。光源からの光を光ファイバーによって導き、集光レンズおよびショートパスフィルター (Corning, 4-96) を通して試料に照射した。Chl 蛍光画像の計測には冷却型 CCD カメラ (Hamamatsu Photonics, C5985) を用いた。CCD カメラのレンズにはバンドパスフィルター (Optical Coatings Japan, $\lambda = 682 \text{ nm}$) を装着し、励起光の反射を除き Chl 蛍光のみを計測するようにした。撮像された Chl 蛍光画像はコンピュータに取り込み、解析を行った。

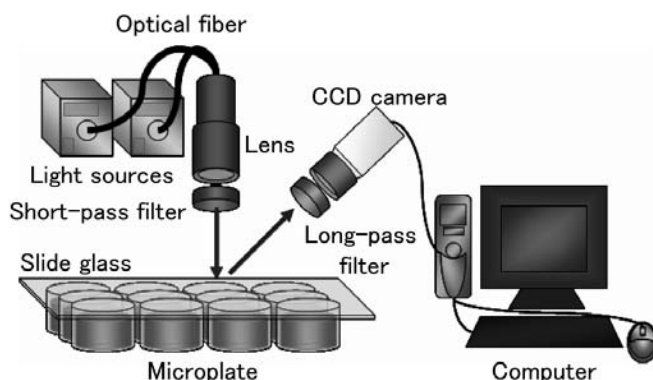


Fig. 1 Chlorophyll fluorescence imaging system for measuring cell concentration and Φ_{PSII} .

Chl 蛍光画像計測による藻体濃度の測定

既報で用いた蛍光計測手法である励起蛍光マトリックス計測では (Konishi et al., 2007a, 2007b)、励起光の PPFD が数 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と微弱であったため、計測時における Chl 蛍光強度の経時変化 (インダクション現象) は無視できた。一方、本研究における画像計測では、S/N を大きくするため、励起光の PPFD を少なくとも数 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とする必要がある。この条件では、光照射開始後のインダクション現象が避けられなかった。インダクションカーブは O-I-D-P-S-M-T で示されるピークをたどり (Govindjee, 1995)、Chl 蛍光強度が最大となるのは P 点である。照射光の PPFD を、*Amphidinium sp.* 培養時の 10 倍である $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ としたところ、P 点における Chl 蛍光強度は画像計測するのに十分な S/N となった。このとき、Chl 蛍光強度は、光照射開始から約 0.8 秒後に最大値に達し、1 秒程度その値を維持した。そのため、本計測のための光照射は 2 秒以内と短時間で済み、強光照射による色素のブリーチングや生理機能の変化は避けられる。以上より、本実験では、PPFD が $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 2 秒間照射し、P 点における Chl 蛍光強度を計測することにした。

株分け後、PPFD が $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯下で 4 週間培養した *Amphidinium sp.* の懸濁液の濃度を相対濃度 100% とし、液体培地で希釈することによって、相対濃度 10% から 90% まで 10% 刻みに調製した試料を作成した。なお、相対濃度 0% は *Amphidinium sp.* の含まれない液体培地のことである。これらの試料を各濃度につき 8 つのウェルに分注し、30 分間暗条件に置いた後、PPFD が $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を 2 秒間照射し、その間で強度が最大となった時の Chl 蛍光画像を計測した。また、あらかじめ、血球計算盤によって測定可能な濃度範囲であった相対濃度 0% から 50% の試料を用いて、藻体濃度と相対濃度の検量線を作成し、相対濃度と藻体濃度の変換に用いた (Konishi et al., 2007a)。

異なる光質下で培養した *Amphidinium sp.* の Φ_{PSII} の比較

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、赤色光のみを照射する赤区、青色光のみを照射する青区、赤色光および青色光を照射する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。

試料には、各光質区で株分け後 8 週間培養した *Amphidinium sp.* の培養液を用いた。各区につき 8 つのウ

ェルに分注し、計測に用いた。光合成を誘導する明期光の PPFD は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光合成電子伝達の初期電子受容体 Q_A を完全に還元するための飽和パルス光の PPFD は $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、照射時間は 2 秒間とした。この条件で明期最大蛍光収率が得られることは、予備実験により確認した。試料は分注後 30 分間暗処理し、その後に明期光照射を開始した。飽和パルス光照射は明期光照射開始から 2 分後に行った。光合成電子伝達の量子収率 (Φ_{PSII}) は次の式で算出される。

$$\Phi_{PSII} = \frac{\Phi F_m' - \Phi F}{\Phi F_m'}$$

ここで、 ΦF は明期蛍光収率、 $\Phi F_m'$ は明期最大蛍光収率を表す。なお、蛍光収率とは、色素に吸収された光子数に対する蛍光の光子数のことである。明期最大蛍光強度 F_m' の計測を、明期蛍光強度 F の計測の直後に飽和パルス光を照射して行うことにより、両者の計測時における色素の光吸収率変化は無視できる。したがって、ここでは、計測を簡単にするため、照射された光の PPFD に対する蛍光の光子数収率とした。

3. 結果および考察

Chl 蛍光画像計測による藻体濃度の測定

Fig. 2 に、マイクロプレートに分注した濃度の異なる *Amphidinium sp.* 懸濁液の Chl 蛍光強度画像を示す。相対濃度 0% から 100% へ近づくにつれて蛍光強度が大きくなった。Fig. 3 に、あらかじめ求めておいた検量線によって相対濃度から算出した藻体濃度と Chl 蛍光強度の関係を示

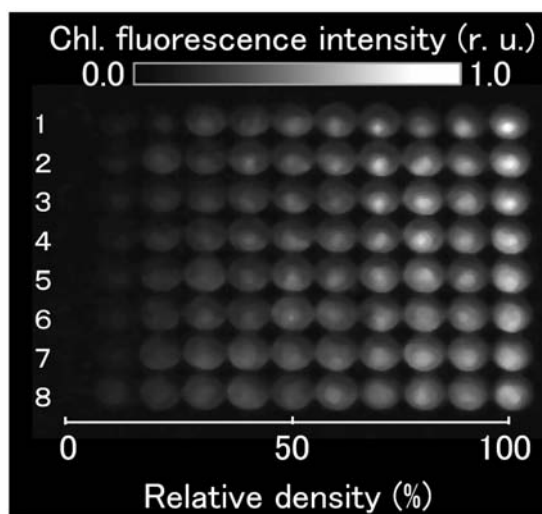


Fig. 2 Image of the maximal chlorophyll fluorescence intensity in the dark of *Amphidinium sp.* suspensions in the microplate.

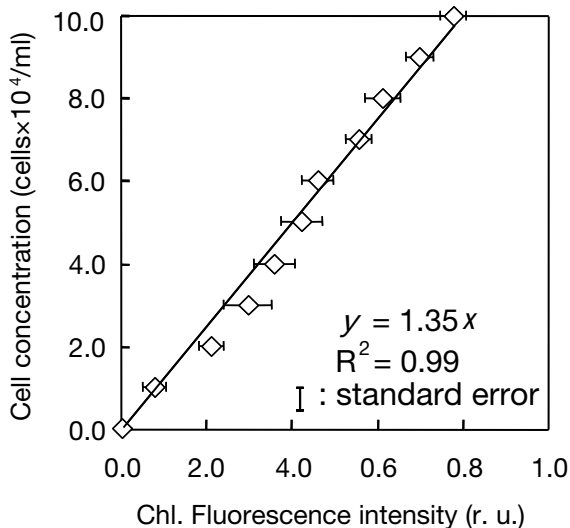


Fig. 3 Relationship between the maximal chlorophyll fluorescence intensity in the dark and cell concentration of *Amphidinium* sp. R^2 represents a coefficient of determination.

す。Chl 蛍光強度と藻体濃度にはほぼ直線的な関係がみられ、決定係数は $R^2 = 0.99$ であった。これは、藻体濃度推定に十分高い値と考えられるため、この方法は、多くのサンプルの藻体濃度を迅速に計測できる手法といえる。

異なる光質下で培養した *Amphidinium* sp. の Φ_{PSII} の比較

Fig. 4 に、各光質区で培養された *Amphidinium* sp. 懸濁液の Φ_{PSII} 画像の経時変化を示す。また、図中の 1 から 3 の列、

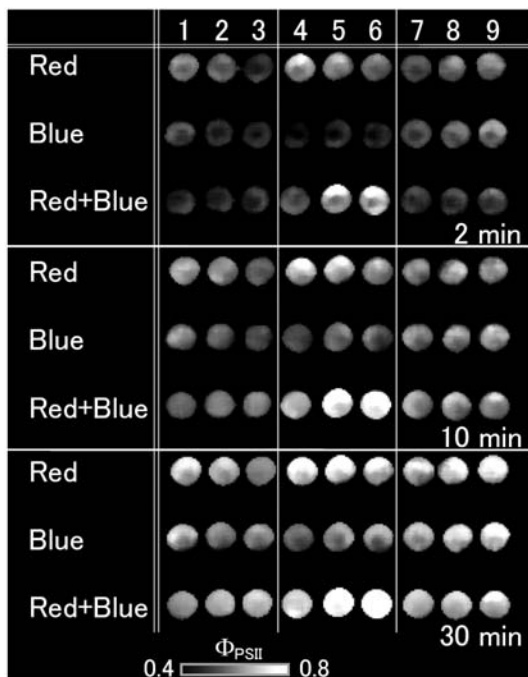


Fig. 4 Images of Φ_{PSII} of *Amphidinium* sp. suspensions cultivated under red, blue and red+blue LEDs measured at 2, 10 and 30 min after the start of actinic light illumination.

4 から 6 の列、7 から 9 の列は、同一の培養フラスコから取り出したサンプルの Φ_{PSII} を示す。いずれの区においても、光照射開始後から Φ_{PSII} の増加傾向が見られた。これは、暗条件におかれた *Amphidinium* sp. に光を照射したことで、光合成関連酵素の光活性化が生じたためと考えられる (Bro et al., 1996)。このことは、明期光照射開始後から徐々に光合成電子伝達効率が大きくなったことを示している。なお、明期光の PPFD は培養時と同じ $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であったが、明期開始直後においては、*Amphidinium* sp. の光合成関連酵素の多くはまだ不活性の状態であったため、吸収した光エネルギーの多くは熱として放散されたと考えられる。

Fig.5 に、各光質区で培養された *Amphidinium* sp. 培養液の Φ_{PSII} の経時変化を示す。いずれの区においても、 Φ_{PSII} は増加傾向を示し、その増加率は徐々に小さくなった。青区は、他の 2 区にくらべ、 Φ_{PSII} の値が常に小さかった。赤区の Φ_{PSII} の値は、明期光照射開始から 2 分後には 0.59 であり、30 分後には 0.75 となった。青区の Φ_{PSII} の値は、明期光照射開始から 2 分後には 0.44 であり、30 分後には 0.68 となった。さらに、赤青混合区の Φ_{PSII} の値は、明期光照射開始から 2 分後には 0.52 であり、30 分後には 0.76 となった。

ほとんど増殖がみられなかった赤区 (Konishi et al., 2007a) で培養された *Amphidinium* sp. の Φ_{PSII} の値は最も増殖速度が大きかった赤青混合区のものと同程度であった。これは、赤区で培養された *Amphidinium* sp. 1 個体当たりの Chl 量が他の区の半分程度であったことから (Konishi et al., 2007a)、吸光量が小さかったために熱放散活性が大きくならなかったことによると考えられる。このことは、明期光照射開始から 2 分後の Φ_{PSII} の値が、赤区において

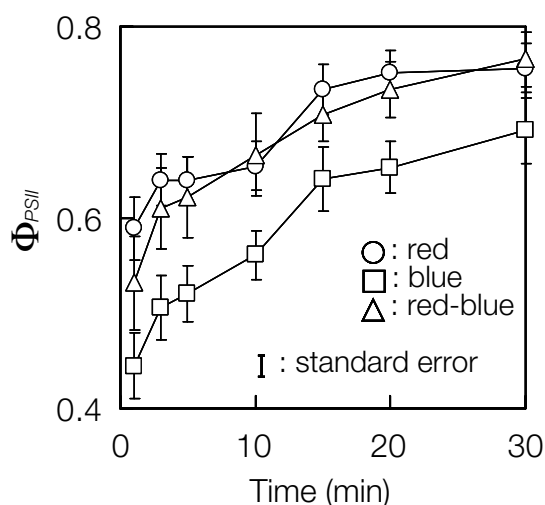


Fig. 5 Changes in Φ_{PSII} of *Amphidinium* sp. suspensions cultivated under red, blue and red+blue LEDs after the start of actinic light illumination.

最も大きかったことから支持される。また、本実験において、赤青混合区の *Amphidinium* sp. の Φ_{PSII} の値が、青区のものより常に大きいことが示された。このことから、*Amphidinium* sp. は、赤青混合区で培養することにより、光合成電子伝達効率が大きくなることが示唆された。

引用文献

- Barbagallo, R. P., Oxborough, K., Pallett, K. E. and Baker, N. R., 2003 : Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.*, **132**, 485-493.
- Bro, E., Meyer, S. and Genty, B., 1996 : Heterogeneity of leaf CO₂ assimilation during photosynthetic induction. *Plant Cell Environ.*, **19**, 1349-1358.
- Daley, P. F., Raschke, K., Ball, J. T. and Berry, J. A., 1989 : Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.*, **90**, 1233-1238.
- Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R., 1989 : The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **990**, 87-92.
- Govindjee, 1995 : 63 years since Kautsky - Chlorophyll-a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 131-160.
- Kobayashi, J. and Tsuda, M., 2004 : Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 77-93.
- Konishi, A., Omasa, K., Hayashi, M., Masuda, A., Ozawa, T. and Tsuda, M., 2007a : Measurement of *Amphidinium* sp. cell concentration by fluorometric method -effects of light quality on growth rate-. *Eco-Engineering*, **19**, 89-94.
- Konishi, A., Omasa, K., Hayashi, M., Masuda, A., Ozawa, T. and Tsuda, M., 2007b : Monitoring of culture conditions of *Amphidinium* sp. by excitation-emission matrices. *Eco-Engineering*, **19**, 217-222.
- Lichtenthaler, H. K., Lang, M., Sowinska, M., Heisel, F. and Miehe, J. A., 1996 : Detection of vegetation stress via a new high-resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.*, **148**, 599-612.
- Omasa, K., Shimazaki, K. I., Aiga, I., Larcher, W. and Onoe, M., 1987 : Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.*, **84**, 748-752.
- Parésysa, G., Rigarta, C., Rousseau, B., Wongb, A.W.M., Fanc, F., Barbierd, J. P. and Lavaud, J., 2005 : Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria. *Water Res.*, **39**, 911-921.