



Title	藻類
Author(s)	村上, 明男; 小檜山, 篤志
Citation	低温科学, 67, 53-59 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39092">http://hdl.handle.net/2115/39092</a>
Type	bulletin (article)
Note	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 9
File Information	67-010.pdf



[Instructions for use](#)

## 9. 藻類

村上 明男<sup>1)</sup>, 小檜山篤志<sup>2)</sup>

藻類は、多様な光合成色素、単純な体制、均質な細胞が取得可能、などの特徴が活かされ、酸素発生型光合成の研究に大きく貢献している。本章では、光合成研究における藻類の活用法を紹介する。

### Algae

Akio Murakami, Atsushi Kobiyama

Algae, which are an important primary producer in aquatic habitat, consist of phylogenetically-various groups of oxygenic photoautotroph. In this chapter, we introduce the techniques to utilize algae in photosynthetic study; maintenance of algal strains, preparation of culture media, usage of culture instruments/devices, and conditions to control algal growth.

#### 9.1 藻類を活かした光合成研究

藻類は、分類群ごとに光合成色素の組成が異なる他、細胞の体制（単細胞、糸状体・葉状体などの多細胞、莖状部や葉状部等の器官分化）やサイズ（1 μm 程度のピコプランクトンから体長 50 m 以上の大型褐藻類）などの多様性に富み、生育環境（淡水、汽水、海水、土壌、岩上、無脊椎動物や菌類との共生、強酸性・高温・高塩・温泉などの特殊環境）も広範囲に及ぶ<sup>1,2)</sup>。約 10 の門から構成される藻類の分類は、光合成色素の組成を基準としている。光合成色素（クロロフィル・カロテノイド/キサントフィル・フィコビルン）の宝庫でもある藻類は、アンテナ色素系をはじめ、光化学反応中心、電子伝達系、酸素発生系、さらに炭素固定反応の研究に幅広く活用され、酸素発生型光合成の解明に大きく貢献してきた<sup>3)</sup>。また、光や栄養物などの水環境特有の環境要因に対する適応・応答の解明は藻類ならではの研究テーマでもある。

単細胞の微細藻類（緑藻 *Chlorella/Chlamydomonas/Senedesmus/Dunaliella*, ユーグレナ藻 *Euglena*, 紅藻 *Porphyridium/Rhodella/Cyanidium/Galdieria*, 黄金色藻 *Ochromonas*, 珪藻 *Chaetocerus/Nitzschia*) は、微生物学的培養法の適用により増殖ステージが揃った均質な細胞を得ることができ、光合成の生理学、生化学、遺伝学などの研究に用いられてきた<sup>4,5)</sup>。また、突然変異株や従属栄養培養の可能な藻株も活用され、大量培養法や同

調培養法も開発されている。一方、多細胞体制の大型藻類（アオサ藻 *Bryopsis/Codium/Ulva/Acetabularia*, 褐藻 *Sarugassum/Ecklonia/Scytosiphon*, 紅藻 *Porphyra/Aglaothamnion/Anthithamnion*) も、それぞれの特色（色素系、葉状体、多核体など）が活かされ利用されてきた。

多くのシアノバクテリア（ラン藻）でゲノムが公開されているが、単細胞の緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri*, 紅藻 *Cyanidioshyzon merolae*, 珪藻 *Thalassiosira pseudonata*, *Phaeodactylum tricorutum* においても全ゲノムが解明されている。また、葉緑体（プラスチド）ゲノムについては、他の分類群の藻類（ユーグレナ藻、クロララクニオン藻、クリプト藻など）でも報告されている。一方、大型藻の褐藻 *Ectocarpus siliculosus* や紅藻 *Porphyra yezoensis* においてもようやくゲノム解析が開始され、形質転換系などの開発も並行して進められている。これらのゲノム情報を光合成研究に活用するためにも藻類の培養に関する技術の習熟は不可欠である。

#### 9.2 藻株の入手

藻株は国内外のカルチャーコレクションから購入する方法が一般的であるが、株を分離した研究者へ分譲依頼することも可能である。また、大型藻の場合はフィールドで採集した藻体を用いることも有用である。

国内外には微細藻を中心とした藻類のカルチャーコレクションが設置されている（表 1）。広範囲の分類群の藻株を収集している分譲機関や特定の分類群の藻株だけを収集している分譲機関など、それぞれ特徴がある。各カ

1) 神戸大学・自然科学系先端融合研究環・内海域環境教育研究センター

2) 北里大学・海洋生命科学部

表1：国内外の藻類カルチャーコレクションのリスト

2008年11月現在

コレクション名	特徴	URL
国立環境研究所 微生物系統保存施設 (NIES)	微細藻約 1000 株, 1958 年創設の IAM 株(旧東大応微研) を 2007 年に移管	<a href="http://mcc.nies.go.jp/top.jsp">http://mcc.nies.go.jp/top.jsp</a>
製品評価技術基盤機構 (NITE) — 生物遺伝資源部門 (NBRC)	(株)海洋バイオテクノロジー研究所(MBIC) 収集の海産微細藻 270 株を移管	<a href="http://www.nbrc.nite.go.jp/070328.html">http://www.nbrc.nite.go.jp/070328.html</a>
神戸大学 海藻類系統株コレクション (KU-MACC)	海産の大型藻(褐藻, 紅藻, 緑藻, 他) 約 500 株	<a href="http://www.research.kobe-u.ac.jp/rcis-kumacc/">http://www.research.kobe-u.ac.jp/rcis-kumacc/</a>
Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP)	海産のシアノバクテリアと微細藻約 2500 株	<a href="https://ccmp.bigelow.org/">https://ccmp.bigelow.org/</a>
Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)	EG Pringsheim の藻株をもとに創設, 藻類と原生動物約 2500 株, UTEX や SAG の基礎	<a href="http://www.ccap.ac.uk/">http://www.ccap.ac.uk/</a>
CSIRO Collection of Living Microalgae	海産と淡水産の微細藻約 800 株	<a href="http://www.marine.csiro.au/algaedb/default.htm">http://www.marine.csiro.au/algaedb/default.htm</a>
Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC)	シアノバクテリア	<a href="http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/">http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/</a>
Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG)	シアノバクテリアと微細藻約 2200 株	<a href="http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html">http://www.epsag.uni-goettingen.de/html/sag.html</a>
The Culture Collection of Algae at The University of Texas (UTEX)	RC Starr が創設, Indiana 大から移管, 微細藻を中心に約 3000 株, 1 L 培養の細胞も供給	<a href="http://www.utex.org/">http://www.utex.org/</a>
ATCC The Global Bioresource Center	微藻類, 微生物や培養細胞等のバイオリソースを扱う研究機関	<a href="http://www.atcc.org/">http://www.atcc.org/</a>
Canadian Center for the Culture of Microorganisms (CCCM)	海産微細藻が中心 (淡水産約 60 株含む)	<a href="http://www3.botany.ubc.ca/cccm/">http://www3.botany.ubc.ca/cccm/</a>
Canadian Phycological Culture Centre (CPCC)	Tronto 大から移管した微細藻とシアノバクテリア約 500 株	<a href="http://www.phycol.ca/">http://www.phycol.ca/</a>
Roscoff Culture Collection (RCC)	Roscoff 臨海実験所, 海産の微細藻とシアノバクテリア約 1300 株	<a href="http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/">http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/RCC/</a>
Culture Collection of Microorganisms from Extreme Environments (CCMEE)	極限環境(砂漠, 温泉, 高塩, 酸性など)の微生物(微細藻とシアノバクテリアを含む)	<a href="http://cultures.uoregon.edu/default.htm">http://cultures.uoregon.edu/default.htm</a>
Culture Collection of Algae of Charles University of Prague (CAUP)	シアノバクテリアと微細藻約 200 株	<a href="http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html">http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html</a>
Culture Collection of Algal Laboratory (CCALA)	チェコ科学アカデミー, 微細藻とシアノバクテリア約 500 株	<a href="http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php">http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php</a>
Microalgal Culture Collection of the University of Caen	海産, 汽水産, 淡水産の微細藻約 380 株	<a href="http://www.unicaen.fr/ufr/ibfa/algobank/">http://www.unicaen.fr/ufr/ibfa/algobank/</a>
Culture Collection of Algae at the University of Cologne (CCAC)	微細藻約 1800 株, Algenkultur-Sammlung Wien (ASW) 株も移管	<a href="http://www.ccap.uni-koeln.de/">http://www.ccap.uni-koeln.de/</a>
Culture collection of Algae	Marburg 大, 微細藻とシアノバクテリア	<a href="http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/welcomeframe.html">http://staff-www.uni-marburg.de/~cellbio/welcomeframe.html</a>
Scandinavian Culture Centre for Algae and Protozoa (SCCAP)	Copenhagen 大, 微細藻約 600 株	<a href="http://www.sccap.bot.ku.dk/">http://www.sccap.bot.ku.dk/</a>
ACOI Coimbra Collection of Algae	Coimbra 大, 微細藻約 1500 株	<a href="http://www1.ci.uc.pt/botanica/ACOI.htm">http://www1.ci.uc.pt/botanica/ACOI.htm</a>
The Chlamydomonas Center culture collection	緑藻 <i>Chlamydomonas</i> 株専門	<a href="http://www.chlamy.org/strains.html">http://www.chlamy.org/strains.html</a>
Dunaliella Culture Collection at Brooklyn College	緑藻 <i>Dunaliella</i> 属約 40 株	<a href="http://www.dunaliella.org/dccbc/">http://www.dunaliella.org/dccbc/</a>
Antarctic Protist Culture Collection at Woods Hole	南極 Ross Sea 産の微細藻 (分譲の可否は不明)	<a href="http://www.whoi.edu/science/B/protists/">http://www.whoi.edu/science/B/protists/</a>
Loras College Freshwater Diatom Culture Collection	淡水産珪藻 (分譲の可否は不明)	<a href="http://www.bgsu.edu/departments/biology/facilities/algae/html/DiatomCulture.html">http://www.bgsu.edu/departments/biology/facilities/algae/html/DiatomCulture.html</a>

ルチャーコレクションは、保存株のリストをホームページ上で公開している。ホームページには、各藻株についての学名・株番号のほか、産地、特徴、培地、培養条件などの情報、さらに分譲・購入の手続き、価格、契約事項などが掲載されている。コレクションによっては藻株ばかりでなく、大量培養した細胞ペレットやDNA/RNAなどの注文を受け付ける。文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトに参画した国内機関が収集している藻株の情報は、“Algae Resource Database”として公開されている (<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/top.jsp>)。

購入した株の取扱いについては、契約事項を遵守しなければならない(第三者への再分譲・販売を禁止している機関もある)。分譲価格は藻株の維持管理の手間などから判断すると適正な設定である。ほとんどの分譲機関は少人数の研究者・キュレーターボランティアの活動で維持され、運用資金や人材の確保に苦労していることが多い。コレクションの閉鎖や機器の故障により、長年維持してきた株が散逸・喪失した事例もある。最近では、凍結保存法の開発も行なわれ一部の藻株では成功しているが、まだ藻類全般に通用する保存法にはなっていない。そのため、分譲機関間で藻株を交換することで藻株の喪失リスクを低減させているケースもある。特に、培養が不安定な藻株の維持においては重要な対応と思われる。

微細藻の場合は、見た目はもちろんのこと顕微鏡レベルでも判別不能ことが多い。このような藻株を維持する上での注意としては、株間のコンタミや株の取り違いのミスを避けるための工夫である。また、不要になった藻株の廃棄にあたっては、自然界に放出・漏洩させないように処理する。毒性物質を生成する種ではもちろんのこと、生態系保護の観点からも重要な点である。現に、地中海の水族館から漏出した熱帯起源の海藻が周辺海域の在来種を駆逐していることが報告されている。なお、分譲株を用いた研究での成果(論文)を分譲機関へ報告することも大切である。各コレクションでは藻株毎の文献情報を収集・公開している場合もあり、研究成果の宣伝やコレクションの支援にもつながる。

海藻などの大型藻類も、特有の光合成色素や色素タンパク質の精製や多核体(緑藻カサノリ *Acetabularia* やハネモ *Bryopsis*) の特徴を活かした未損傷葉緑体の単離に活用されてきた。しかし、大型藻の実験室での培養は時間と手間を要することが多く大量培養は困難である。そのため、大型藻などの場合は野外に生育する自然藻体を用いることも多い。野外採集にあたっては、資源や生態系の保護に留意する必要がある。特に、食用海藻などの

水産資源は漁業権の対象にもなっているため、採集に際し漁業協同組合などへの許可申請なども必要である。養殖のワカメやノリなどは加工前の生の藻体を栽培業者から購入することも可能である。なお、繁殖に季節性がある大型藻を通年入手することは困難なので、計画的な実験が必要となる。

野外採集ではラボとは次元の異なる危険が伴うので、周知な準備が必要である。日本生態学会のホームページ掲載の「野外調査の安全マニュアル(案)」や東京大学が公開している「野外活動における安全衛生管理・事故防止指針」などを参考に安全対策を講ずる。

### 9.3 培養の基本

カルチャーコレクションから藻株を購入する際には、各コレクションで使用している培地名(組成や作成法)や培養条件(光強度や温度)なども提供される。しかし、培地の種類は、各分譲機関や研究者が経験的に選択しているため、同じ藻株でも異なる培地が使用されていることもある。また、実験の目的に応じて培地や組成の一部を変更する必要もある。培養に用いる機器や光源などについては文献などを参照するとともに、最新の培養器具などを取り入れていくと良い。なお、藻株の分離や培養法などの藻類についての多岐にわたる実験手法については多くの成書が刊行されている<sup>6-14)</sup>。各成書にはそれぞれ特色があるので、研究の目的に応じて参照することを薦める。

#### 9.3.1 培地

培地の作成にあたっては、成分毎の保存液の作成や培地の作成順序などに注意する。細菌やカビの混入を防ぐため、培地や培養器具は原則的に滅菌処理する。培地の滅菌はオートクレーブが基本であるが、沈殿物の生成や有機物の変質を防ぐためには、培地成分をいくつかに分けて滅菌した後、クリーンベンチや無菌箱で混合することもある。海産藻類の培地は、天然海水あるいは人工海水をベースに各栄養塩を添加して作成する。海水を採水する際には、河川水や降雨の混入に注意し海水の塩濃度は必ず確認する。また、市販の人工海水を利用する場合は、品質や継続した供給に留意する。海水をオートクレーブすると少量の沈殿物が生成する。藻株の生育に問題が生じた場合には、面倒でも濾過滅菌(0.22 μm ポアサイズのメンブレンフィルターを使用)を行なう。多くの培養実験は光独立栄養で行うため無機培地を用いるが、従属栄養培養あるいは光従属栄養培養ではグルコースなどの有機物を培地に添加する。また、藻株によってビタミ

ン類の添加も必要である。添加する有機物やビタミンの種類や濃度は文献を参照する。

### 9.3.2 器具

培養に使用する容器は、シャーレ、試験管、培養フラスコ、特殊形状の培養瓶、など市販品から特注品まで研究者の好み、培養の規模、実験目的に応じて使いわけられる。オートクレーブ滅菌(例：120°C, 20分)や乾熱滅菌(例：150°C, 3時間)を行うため、培養容器は耐熱ガラス製が好ましい。特殊な培地の使用や大容量の培養では、オートクレーブ可能な透明ポリカーボネート製の容器を用いる。また、培養細胞用の滅菌済プラスチック器具(多孔プレートや扁平培養フラスコなど)は培養経過の顕微鏡観察など藻類の培養にも活用できる。植え継ぎ用のガラスピペットなどは乾熱滅菌する。ポリカーボネート製以外のプラスチック製品はオートクレーブ滅菌できないことが多い。

### 9.3.3 光・温度・攪拌

培養用の光源として、蛍光灯(白色、昼光色など)が用いられることが多いが、白熱電球が有効な場合もある。大量培養などの際の広面積照射では、高圧ナトリウムランプやメタルハライドランプを用いることもある。蛍光灯は様々な発光特性(波長分布)をもつ種類が市販されているので、カタログ等で確認する。発光ダイオード(LED)や陰極管なども培養に使用されているが、既製品は高価で融通性が低い。培養光の色(波長組成)を変える場合は、光学フィルター(色ガラス製、プラスチック製)を各種の光源と組み合わせて用いる。長寿命のランプが開発されているが、時間とともに劣化するので光強度は定期的に確認する。

培養温度の設定は文献や分譲機関からの情報を参考にする。光源による熱の影響を避けるためには、培養瓶を恒温水槽に入れて培養すると温度を安定に保つことが出来る。最近では、温度安定性が向上した培養庫(インキュベータ)を使うことが多いが、光源の種類や設置場所を変更する際には注意が必要である。保存培養では、至適温度より5°C程度低めに設定することが多い。

培養液中の藻を均一に懸濁し、藻の沈殿を防ぐため培養液を攪拌する。スターラーでの培地攪拌、培養容器の振とう、培地のエアレーションなど、藻株の特性に応じて選択する。エアレーションでは、エアポンプ(コンプレッサー)からの配管にエアフィルターを挿入し細菌の混入を防止する。二酸化炭素濃度を変える実験では、ガスボンベからの二酸化炭素を空気と混合して供給する。二酸化炭素濃度は流量計で調節し、必要に応じて実測する。なお、培養途中での培地のpH変動や蒸発による培地

の濃縮などにも注意する。

### 9.3.4 増殖・収穫・破碎

微細藻の増殖速度の測定は、細胞数(血球計算盤、コーンカウンターで計測)、濁度(分光光度計で測定)、クロロフィル量(色素抽出液を分光光度計で定量)などの指標を使いわけられる。大型藻では葉面積や生重量などの指標も用いる。

微細藻の収穫では遠心沈澱とフィルター濾過を細胞サイズに応じて使い分ける。いずれの方法でも迅速に回収することで細胞へのダメージを最小限にする。遠心回収した細胞は新鮮培地や緩衝液での再懸濁により洗う。

微細藻類の細胞からチラコイド膜を分取するためには、超音波、フレンチプレス、パープレスなどを用いて細胞を破碎する。小規模の細胞破碎ではガラスビーズ法を用いることが多いが、他の方法に比べ破碎効率が低い。大型藻の場合でも、予め藻体を小さく切り刻むことでこれらの方法が適用できる。

## 9.4 微細藻の培養

購入した藻株は、少量の液体培地あるいは寒天上の小コロニーとして送付されてくることが多い。輸送中のストレスで弱っているため、直ちに新鮮な培地に植え継ぐ。野外採集した藻から得たクローン培養株は二度と入手できないことが多いので、絶やさないように維持する。ここでは、珪藻や渦鞭毛藻を例にあげ、微細藻類培養株の維持と各種の培養法について紹介する。

### 9.4.1 保存培養

藻株を絶やさないように、実験培養とは別に保存培養(元種培養)として維持する。微細藻は通常は無性的に二分分裂で増殖するため、新鮮培地への植え継ぎを繰り返すことで藻株を維持する。珪藻は細胞分裂の度に被殻が小型化し細胞内小器官を維持できなくなるため、有性生殖により増大胞子を形成させ細胞サイズを回復させる。また、凍結保存法も開発されているが一部の藻株を除いて未確立であり、一般的には適用できない。

微細藻の継代培養では固形寒天培地や液体培地を用いるが、寒天培地では生育しない藻株もいる。寒天培地で培養できる微細藻(例：渦鞭毛藻 *Symbiodinium*)では、クローン株の確立や無菌化が容易である<sup>15)</sup>。しかし、多くの微細藻(例：渦鞭毛藻 *Alexandrium*)は寒天培地では増殖できない。

海産微細藻用として、SWII培地<sup>16)</sup>、T<sub>1</sub>培地<sup>17)</sup>、f/2培地<sup>18)</sup>、ダイゴIMK培地(日本製薬)等の天然海水をベースにした培地の他、ASP培地<sup>19)</sup>やAquil培地<sup>20)</sup>等の人

工海水培地も開発されている。各培地は生物種や研究目的に合わせて選択する。培地の種類により増殖速度は速いが細胞密度が濃くならない、反対に増殖は遅いが高密度になるものがある。長期間保存の場合など、光量や温度を至適条件から下げて増殖速度を遅くさせ、継代間隔を長くすることも可能である。例えば、生存の温度範囲が広い広温性株では、20°Cでは1～2週間毎の継代が必要であるが、4°Cでは1～2ヶ月間隔で十分な場合もある。藻株によって光・温度の許容範囲が異なるため、培養の状態が安定した後に条件検討する。

休眠細胞を形成する藻株の場合、休眠細胞での長期保存が可能である。渦鞭毛藻や珪藻の休眠細胞は、5°C、暗所で20ヵ月以上の生存が確認されている。また、珪藻の栄養細胞でも2～3ヵ月は生存する<sup>21)</sup>。休眠細胞の発芽は、増殖培地へ移し光や温度を至適条件にすることで行う。休眠細胞は有性生殖の結果生じるので、異なる交配型の栄養細胞をもつ種ではクローン株での維持はできない。休眠細胞から発芽した後、交配型の異なる栄養細胞へと分化する株もあることから、クローン株の維持および異なる交配型の細胞を得るには休眠細胞から発芽(分裂)後の細胞をキャピラリーで一個ずつ拾い再培養する。このように、微細藻の保存培養を行う上でも生活環の理解が必要である。海藻(大型藻)の生活環では配偶体と孢子体の世代を交互に繰り返すが、微細藻の生活環には栄養細胞が二分する無性生殖と配偶子接合による有性生殖の過程が含まれる。有性生殖の形式も種により異なり、単一クローン細胞から生じた細胞間で有性生殖するホモタリクな種と異なる交配型のクローン間で有性生殖するヘテロタリクな種が存在する。

継代培養による藻株の保存では日常的な観察が必須である。培養株への細菌の混入による藻株の衰弱・死滅などの異常を早く察知し、培地の作り直しや植え継ぎなどの対応を速やかに行う。天然海水を用いる場合、水質(塩濃度や溶存成分など)の微妙な違いが藻株の増殖に悪影響を与えることもある。

#### 9.4.2 大量培養

藻体を実験に供する場合、保存培養規模の量(数mL)で十分な場合もあるが、タンパク質精製などの生化学実験では10L単位の大量培養(高密度培養)が必要となる。通常のラボの設備ではこの規模の培養が限界である。培養容器として、ガラス製の3L平底丸フラスコや5L三角フラスコ、あるいはポリカーボネート製の10L広口瓶を用いる。浮遊性の海産微細藻の大容量培養では、培養開始時の細胞密度の低さや光量不足のため小規模培養より増殖が悪くなることが多い。大量培養において高密度

培養を維持するためには、培養光源(蛍光ランプの増加、高圧ナトリウムやメタルハライドなどの高輝度ランプへの変更)や照明方式(外照射から内照射への変更)などの工夫も必要となる。これに伴い、培養液の過熱対策(冷却ファンの使用)や省エネ対策(細胞密度に合わせた照度の調節)なども講ずる。

培養容器内の細胞や培地を均一に維持するため、エアレーションやスターラーなどにより攪拌する。

#### 9.4.3 連続培養

上記のバッチ培養法では、増殖に伴い個々の細胞が受ける光条件や栄養状態が変わる。細胞の生理状態を安定に保つためには連続培養法(ケモスタット法、タービドスタット法)を採用する<sup>22)</sup>。ケモスタット法では培養タンク内に培地を一定流量で供給することで、培地中の栄養条件を一定に保つ。この際、培地の窒素などの栄養分が増殖の制限要因になるように濃度を調節することで、細胞密度を一定に維持する。

タービドスタット法は、培養タンクへの培地の供給速度(培養液の希釈速度)を細胞の増殖速度に合わせることで、細胞密度を一定に保つ方法である。細胞密度を濁度で連続モニターし培地の供給速度をフィードバック制御して、細胞密度を調節する場合もある。連続培養装置の模式図を図1に示す。連続培養には、培養タンク、エアポンプ、シリコンチューブ、添加培地用のタンク、流速可変のポンプ、オーバーフローした培養液を回収するタンクなどが必要である。タンク類はオートクレーブ滅菌可能な材質の容器を使用する。また、各タンクのエアの出入口には細菌の混入防止用にエアフィルターを接続する。エアレーションの流量調節にも注意する。本法では、長期間にわたり細胞の状態を一定にした培養が可能で、阻害剤の添加実験などにも活用できる。

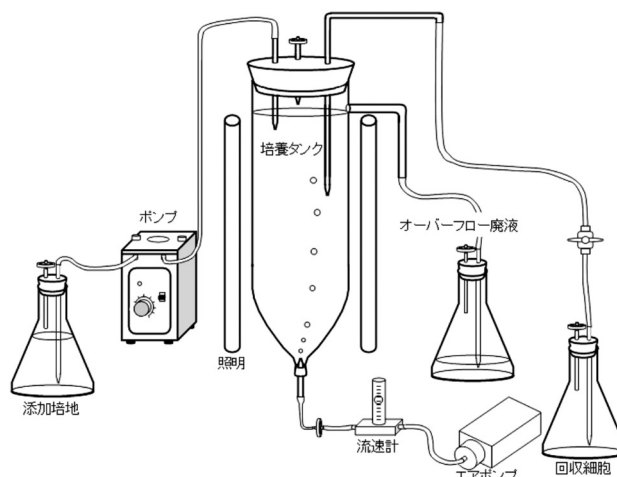


図1：連続培養装置の模式図

#### 9.4.4 同調培養

細胞の生理状態をさらに均一に保つためには細胞周期の同調が必要である。藻類の同調培養においても、動物培養細胞で用いられている栄養成分の除去、あるいは成長調節物質や細胞分裂阻害剤 (DNA 合成阻害剤等) の添加などの方法が適用できる。また、藻類では光が細胞周期の制御要因であるため、光周期を制御した同調法も利用されている。緑藻 *Chlamydomonas* では、12 時間明期-12 時間暗期の光条件による細胞周期の同調が報告されている<sup>23)</sup>。珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では、ASW 培地 (ASWT)<sup>24)</sup> 中のケイ素の欠乏-再添加による細胞周期の同調法が報告されている<sup>25)</sup>。また、珪藻 *Seminavis robusta* では、対数増殖期の細胞を 24 時間暗所に置き、細胞周期を G<sub>1</sub> 期で停止させる同調法も報告されている<sup>26)</sup>。

渦鞭毛藻では、細胞分裂の様態 (染色体が常に凝集し核膜が消失しない) が他の藻類とは異なることもあり細胞周期に関する研究が遅れている。また、明期にだけ細胞の遊泳運動が見られる *Symbiodinium sp.* や明期-暗期を通して遊泳運動を継続する *Alexandrium tamarense* のような種が存在するため、渦鞭毛藻の細胞周期制御については個別の対応が必要である。*A. fundyense* では 82 時間の連続暗処理後に、通常の明暗周期に戻すことで同調させている<sup>27)</sup>。また、*Cryptocodinium cohnii* では、寒天培地培養した細胞を液体培地で洗浄し遊離した細胞をメンブレンフィルター (10 μm ポアサイズ) でろ過することで、G<sub>1</sub> 期の遊泳細胞を得ている<sup>28)</sup>。さらに、薬剤 (ヒドロキシ尿素や 2, 6-ジクロロベンゾニトリル) 処理による G<sub>1</sub> 期での細胞周期停止も報告されている<sup>29)</sup>。

### 9.5 大型藻の課題

大型藻は微細藻よりも培養が難しく実験室での成長速度も遅いため、光合成研究で使われることは少ない。大型藻を生化学や生理学実験などに用いるためには、組織や細胞に含まれる粘性多糖類の対策や複雑な形態や生活史の理解も必要である。海洋の環境や生態系を理解する上からも、石灰藻 (紅藻, アオサ藻の一部) も含めた大型藻の光合成研究を進める必要が高くなっている。

#### 参考文献

- 1) 井上勲「藻類 30 億年の自然史 — 藻類からみる生物進化・地球・環境」第 2 版, 東海大学出版会, 2007, p.643
- 2) R. E. Lee, Phycology, 4th ed. Cambridge University

- Press, 2008, p.560.
- 3) 三室守, 土屋徹「光合成微生物の系統・多様性とその応答系」 「光合成微生物の基礎と応用: 上原赫編」シーエムシー出版 2006, p.1
  - 4) 大城香「シアノバクテリア」 「光合成微生物の基礎と応用: 上原赫編」シーエムシー出版 2006, p.102
  - 5) 村上明男「藻類」 「光合成微生物の基礎と応用: 上原赫編」シーエムシー出版 2006, p.116
  - 6) 岩崎秀雄「微細藻類の分離と培養」日本水産資源保護協会 1967, p.56
  - 7) 田宮博・渡辺篤「藻類実験法」第 4 版 南江堂 1975, p.455
  - 8) 西沢一俊・千原光雄「藻類研究法」共立出版 1979, p.754
  - 9) 杉山純多他「微生物学実験法」新版 講談社サイエンティフィック 1999, p.324
  - 10) 有賀祐勝, 田中次郎, 吉田忠生, 井上 勲「藻類学 実験・実習」講談社 2000, p.188
  - 11) J. R. Stern, Handbook of Phycological Methods. Cambridge Univ. Press. 1973, p.448.
  - 12) C. L. Loban et al. Experimental Phycology. Cambridge Univ. Press. 1988, p.295.
  - 13) A. Richmond, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell, 2003, p.584.
  - 14) R. A. Andersen, Algal Culturing Techniques, Academic Press, 2005, p.578.
  - 15) M. Ishikura, K. Hagiwara, K. Takishita, M. Haga, K. Iwai, & T. Maruyama, Marine Biotech. **6** (2004) P.378.
  - 16) H. Iwasaki, Biol. Bull. **121** (1961) P.173.
  - 17) T. Ogata, T. Ishimaru, & M. Kodama, Mar. Biol. **95** (1987) P.217.
  - 18) R. R. L. Guillard, & D. Ryther, Can. J. Microbiol. **8** (1962) P.229.
  - 19) L. Provasoli, J. J. A. McLaughlin & M. R. Droop, Arch. Mikrobiol. **25** (1957) P.392.
  - 20) N. M. Price, G. L. Harrison, J. G. Hering, R. J. Hudson, P. M. V. Nirel, B. Palenik, & F. M. M. Morel, Biol. Oceanogr. **6** (1989) P.443.
  - 21) J. Lewis, A. S. D. Harris, K. J. Jones, & R. L. Edmonds, J. Plankton Res. **21** (1999) P.343.
  - 22) I. Maeda, Y. Seto, S. Ueda, Y. Cheng, J. Hari, M. Kawase, H. Miyasaka & K. Yagi. Biotechnol. Bioengin. **94** (2006) P.722.
  - 23) S. Surzycki, Methods Enzymol. **23** (1971) P.67.
  - 24) W. M. Darley, & B. E. Volcani, Exp. Cell Res. **58** (1969) P.334.
  - 25) L. G. Frigeri, T. R. Radabaugh, P. A. Haynes, & M. Hildebr, Mol. Cell. Proteomics **5** (2006) P.182.
  - 26) J. Gillard, V. Devos, M. J. Huysman, L. De Veylder, S. D'Hondt, C. Martens, P. Vanormelingen, K. Vannerum, K. Sabbe, V. A. Chepurnov, D. Inzé, M. Vuylsteke, & W. Vyverman, Plant Physiol. **148** (2008) P.1394.
  - 27) G. Taroncher-Oldenburg, D. M. Kulis, & D. M. Ander-

---

son, *Limnol. Oceanogr.* **42** (1997) P.1178.  
28) J. T. Y. Wong, & A. Whiteley, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*  
**197** (1975) P.91.

29) C. M. Kwok, & J. T. Y. Wong, *Plant Physiol.* **131**  
(2003) P.1681.