HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シアノバクテリア
Author(s)	広瀬, 侑; 佐藤, 桃子; 池内, 昌彦
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 2
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 9-15
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39084
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-003.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2．シアノバクテリア

広瀬　侑[1)]，佐藤　桃子[1)]，池内　昌彦[1)]

シアノバクテリアは真正細菌の中で独自の分類群を構成するが，非常に多様で生態学的にも重要である．またモデル生物として研究が非常に進んでいる．研究材料として代表的な種を選んでその特徴を概説する．

Cyanobacteria

Yuu Hirose, Momoko Sato, Masahiko Ikeuchi

Cyanobacteria are the only group of prokaryotes that perform oxygenic photosynthesis. They consist of diverse varieties of species, such as unicellular or filamentous, nitrogen-fixing, motile or non-motile, obligate or facultative phototrophic ones. We summarized features of these various cyanobacterial species and a primitive eukaryote Cyanophora. Culture protocols and some tips were also included.

2.1　背景

シアノバクテリア（ラン色細菌，ともいう）は酸素発生型光合成を行う唯一の真正細菌として独自の分類群を形成しており，光合成をしない種は知られていない．多くの系統樹によれば，シアノバクテリアの群の内部から植物の葉緑体が派生したようにみえるが，葉緑体の直系の祖先種は確定していない．シアノバクテリアは古くは「ラン藻（藍藻）blue-green algae」ともいわれたが，真正細菌に属する原核生物であるため，分子生物学や光合成の分野ではあまり使われなくなった（藻類学や植物学では今でも使われている．）．シアノバクテリアの分類・学名は非常に混乱しており，現在通用している属名や種名のいくつかはリボソーム RNA などの塩基配列による分子系統を反映していない．そのため，種名の同定を延期して，世界的に通用している株保存センター（PCC：仏 Pasteur Culture Collection など）の「株番号」で代用しているものも多い．また，*Synechococcus* や *Oscillatoria* などは異なるグループに分かれるので，近い将来にはその属名も改訂されると思われる．なお，多くのシアノバクテリアのゲノム情報は CyanoBase（http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/）から得られる．また，遺伝子機能などから得られる．詳細は 6.4 を参照されたい．

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

2.2　代表的なシアノバクテリアの特徴と入手法

シアノバクテリアのゲノム情報は多くの種で決定されており，研究の標準株は，特定の古典的な培養株からゲノム決定種に大きく移行しつつある．以下に，代表的なゲノム決定種もしくは進行中の株の特徴と入手法を記す．

2.2.1　*Synechocystis* sp. PCC 6803

1968 年に淡水から単離され，1996 年に全ゲノムの塩基配列が決定された[1)]．3573471 bp の環状ゲノムで，約 3100 個の遺伝子，ORF が推定されている．7 種のプラスミドも決定されている．*Synechocystis* は単細胞性球菌（約 2 μm）で，直交する 3 平面で細胞分裂する．非窒素固定型だが，グルコースを利用して光従属栄養増殖や光活性化による完全従属栄養増殖ができる．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリンをもち，フィコエリスロビリンをもたない．起源は同じであるが，実際の表現型は異なる多数の培養株が，同じ〝PCC 6803〟で記載されることが多いので注意が必要である[2)]．代表的な株は，フランスのパスツール研究所の PCC（http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/）に頼めば有償で送付してもらえる．しかし，この株は均一でなく運動性があり，グルコース感受性なので，光合成の研究にはあまり使われていない（しばしば〝PCC 株〟といわれる）．光合成の必須遺伝子をノックアウトするためには，ヘテロ増殖に必要な糖などを与える必要がある．このような実験には DuPont の Williams

が開発したグルコース耐性株がよく利用されている[3]．日本でもこの〝グルコース耐性株〟は広く使われており，株名を詳しく指定しない場合は通常この株のことである．この株は公には配布されていないが，国内の関連研究者に頼めば，無償で入手できる．自然形質転換の方法が確立されている（5章1-a参照）が，ゲノム情報が決定された，いわゆる〝かずさ株〟は自然形質転換能を失っている．また近縁種の *Synechocystis* sp. PCC 6714は形質転換もグルコースによる培養も同様にできるが，遺伝情報にはかなりの違いがあり，6803の形質転換用DNAコンストラクトで相同組換はできないと思われる．

2.2.2 *Anabaena* sp. PCC 7120

糸状性で，窒素飢餓状態でヘテロシストを形成し，窒素固定をおこなう．絶対光独立栄養で非運動性．接合による形質転換法が確立されており，窒素固定を中心によく研究されている．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコビオロビリンをもつ．培養の光強度に応じた色素組成の調節を行うが，いわゆる補色適応を示すかどうかは不明．この株を使っている研究者はP. Wolkを含めてほとんど*Anabaena* sp.としているにもかかわらず，PCCはしばらく前からその属名を *Nostoc* と変更している．NCBIなど主要なゲノムデータベースはPCCの命名法を尊重しているため，田畑グループが *Anabaena* としてゲノムデータを登録しても[4]，〝*Nostoc* sp. PCC 7120〟として公開しているという異常事態が続いている．ともかく，この株はPCCから入手できるし，国内の関連研究者からも入手できる．また，近縁種に *Anabaena variabilis* ATCC 29413がある．その特徴は *A.* 7120とほぼ同じであるが，フルクトースを利用して非光合成的に生育できるなどいくつか重要なちがいがある．

2.2.3 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

糸状性で，窒素飢餓状態でヘテロシストを形成して窒素固定をおこなうが，*Anabaena* とちがって，アキネート（休眠胞子）や運動性のホルモゴニア（連鎖体）も形成する．シダや裸子植物と共生関係を樹立する[5]．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコエリスロビリンをもつ．緑色光でフィコエリスリンを蓄積するいわゆる補色適応（正確には，〝順化〟現象なので，以下，補色順化に統一する）を示す．グルコースによるヘテロ増殖も可能であり，非常に幅広い機能をもっている．接合により形質転換する方法が確立されている（5章1-a参照）．ATCC（American Type Culture Collection）から入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．

2.2.4 *Synechococcus elongatus* PCC 6301およびPCC 7942

単細胞性で，絶対光独立栄養増殖する．両者のゲノムは非常によく似ており，ほぼ同一種といえる．しかし，PCC 6301は自然形質転換ができないが，接合による形質転換が可能であり，一方PCC 7942は自然形質転換できる．どちらも細胞破砕が容易で，生化学研究によく使われている．PCCから入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．

2.2.5 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1および *T. vulcanus* RKN

増殖の至適は57°C．BP-1は別府温泉由来，RKNは湯の峯温泉由来である．BP-1のゲノムは決定されており，RKNの遺伝子はこれに酷似している．単細胞性桿菌で絶対光独立栄養増殖．BP-1はエレクトロポレーションや自然形質転換による形質転換法が確立しており，RKNでも自然形質転換が可能（5章1-a参照）．ともに耐熱性タンパク質をもち，とくに光化学系2や光化学系1複合体の結晶解析に適している．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリンをもつ．NIES（国立環境研の藻類保存施設）や関連研究者から入手できる．

2.2.6 *Tolypothrix* sp. PCC 7601

Calothrix sp. PCC 7601, *Fremyella diplosiphon* ともいう．本来窒素飢餓条件でヘテロシストを形成し窒素固定を行うはずだが，PCCによれば，PCC 7601はヘテロシスト形成できない変異体であり，その復帰変異体PCC 7601/1はヘテロシスト形成と窒素固定できるという（ややこしいが，PCCのTandeau de MarsacらがPCC 7601として論文に引用するものは窒素固定できる）．また，一般に *Calothrix* 属の糸状体は円錐状の形態をとるのに対し，本株はむしろ *Nostoc* や *Anabaena* などと似た一様な糸状体を形成するので，*Tolypothrix* の方が妥当な属名といえる．どちらにしても，本株は赤色光でフィコシアニンを蓄積し，緑色光でフィコエリスリンを蓄積する典型的な補色順化を示すことで有名である．D. Kehoe（米・インディアナ大）グループは，この株由来で糸状体を形成する細胞数が数個にまで減少した突然変異体（SF33という）を用いて補色順化の研究を進めており，ゲノム研究も進行中であるが，歴史的な経緯から *Fremyella diplosiphon* と呼んでいる．どちらも形質転換できる．*T.* PCC 7601はPCCから，*F. diplosiphon* はD. Kehoe（米・インディアナ大）などの研究者から入手できる．

2.2.7 *Microcystis aeruginosa*

淡水性で湖沼で大量発生してアオコを生成する．強力な肝毒性をもつミクロシスチンを合成する．ゲノムが決定されており，自然形質転換も報告されているが効率は低い．

2.2.8 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

チラコイド膜をもたず，細胞膜にフィコビリソームや光化学系が存在し，光合成を行う．そのため，培養液のpH が光合成に大きな影響を与えるというが，生理学的な研究は少ない．系統的にもっとも古く分岐した原始的な種である．絶対光独立栄養増殖性．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロテノイドとフィコシアノビリン，フィコエリスロビリンをもつ．PCC から入手できるが，国内の関連研究者からも入手できる．形質転換の報告はない．

2.2.9 *Prochlorococcus* 類

海洋性で，クロロフィル *a* をもたず，ジビニルクロロフィル *a* とジビニルクロロフィル *b*，カロテノイドをもち，フィコビリンをほとんどもたない．世界中の海洋に広く分布し，生態学的に重要な種である．多数の培養株が樹立されており，その多くのゲノムも決定されているが，どれも形質転換法は確立されていない．国内では扱っている研究者が少ないので，多数の培養株を保有しているMassachusetts Institute of Technology Cyanobacteria Culture Collection (Sallie W. Chisholm) から入手するのがよい．

2.2.10 海洋性 *Synechococcus* sp.

Prochlorococcus 類と近縁で，様に世界中の海洋に広く分布している．生態学的には沿岸性から大洋性まで多様な種が記載・単離されている．光合成色素として，クロロフィル *a*，カロテノイド，フィコシアノビリン，フィコエリスロビリンのほかに，フィコウロビリンをもつこともある．青色光でフィコウロビリンの蓄積が誘導される新規の補色順化を示すものもいる．WH 8102 株などでは形質転換法が報告されているが，例数が少ない．国内では扱っている研究者が少ないので，多数の培養株を保有しているWoods Hole Oceanographic Institution (WHOI) Cyanobacteria Culture Collection (John B. Waterbury)から入手するのがよい．

2.2.11 *Cyanophora paradoxa*

灰色藻．プラスチドにペプチドグリカンをもち，系統的にもっとも原始的な真核生物である．NIES 547 株はNIES（国立環境研）から入手できる．また，CCMP329 株のゲノムプロジェクトが進行しており，EST データベースもアクセスできる（http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/）．これらの株は同一起源というが，配列に明らかなちがいがあるので別の株である．形質転換の報告はまだない．

2.2.11 その他のシアノバクテリア

このほかにも，海洋性で窒素固定を行うがヘテロシストを形成しない *Trichodesmium* や *Cyanothece*, *Crocosphaera*，また，食用として注目されている *Arthrospira platensis*（いわゆる〝スピルリナ〟）などもゲノムとポストゲノム研究が進んでいる．*Trichodesmium* は特有の赤潮を発生させることでも有名である．これらは *Arthrospira* を除いては，まだ形質転換は報告されていない．*A. platensis* IAM-135 は NIES から入手できるが，他の株は海外の研究者から入手する必要がある．

これらの代表的な株のほかにも，多数のシアノバクテリアが株保存施設に保存されている．日本では，国立環境研（NIES）がほぼ一手に収集，保存，配布している．また，野外からシアノバクテリアを新たに単離・無菌化することも容易である．後述する BG11 培地などは汎用培地として多くのシアノバクテリアが増殖でき，しかも無機培地のため雑菌はあまりよく増殖できないためである．自然界から単離されたばかりの株は多様な表現型（糸状菌体 trichome の分岐，内生胞子 baeocyte の形成など）や環境応答（補色順化や光屈性，多様な共生など）を示すことが知られており，興味深いものが多い．しかし，これらの株を研究材料にするときには，上記の扱いやすい株と比べてさまざまな問題に遭遇する可能性がある．たとえば，制限系が発達しているなどの理由で形質転換ができないことも多い（5 章 1-a 参照）．また，陸生の種は多糖類を分泌し凝集塊を形成し液体培養がむずかしいもの，オリゴトロフで増殖速度が極端に遅いもの，細胞の外に厚い鞘をもち無菌化が難しいものなども多い．しかし，シアノバクテリアが生態学的に重要であるため，実に多様な種が研究の対象となっており，他の細菌類と比べても特異な状況といえる．

2.2.12 株名の規則

最後に，光合成研究者にはあまり知られていない株の名前の規則について述べる．株の命名法では一般に PCC や NIES などの保存施設の名前と番号がつけられるが，その株名はその施設から直接譲渡された場合のみ使用できるが，これを第 3 者に配布してはいけない．もしくは配布されたものには新たな株名をつけなければならない．例を挙げると，世の中で研究発表されている *Synechocystis* sp. PCC 6803 の大半は，本来はそのように名乗ることは許されないものである．この規則は，株の培養，維持の間に突然変異や培養時の形質の選択などが起

こることによる混乱を避けるためであるが，研究者のコミュニティが発達しているシアノバクテリアの分野では，この規則に基づいて別の名前をつけるとむしろわかりにくくなる．さらに皮肉なことに，世界中でもっとも広く使われているグルコース耐性株は PCC 株から直接に由来したものではなく，おそらく同じ起源の ATCC 27184 由来と考えられる．このような事態にもかかわらず，PCC 6803 の名前で広く流通していることを PCC が放置しているのは，その宣伝効果を考えてのことかもしれない．

2.3 株保存施設

PCC：Pasteur Culture Collection（仏），シアノバクテリアの株保存の老舗．属名，type strain などを保持し更新している，多様な種，確かな株の品質維持では定評があり，GenBank の生物名の根拠となっている．

NIES：国立環境研究所，シアノバクテリアや藻類を広く収集しており，日本の株保存の中核組織である．水の華を引き起こす淡水性の *Microcystis* などをとくに多く収集している．

ATCC：American Type Culture Collection（米国），UTEX，CCAP など多数の施設がある．ホームページなどで株を請求すると，スラントなどで送られてくるが，通常は有償である．新たな株の培養は意外と難しいもので，送られてきた細胞が増殖しないこともあるが，すぐにクレームをつければ再送付してくれるはずである．

2.4 シアノバクテリアの培地と培養

シアノバクテリアの培地は多数報告されているが，おおまかには栄養塩がリッチな BG11，これから窒素を除いた $BG11_0$，やや貧栄養な AA 培地，海洋性の種を培養する培地などがある．

2.4.1 BG11 培地

下記の BG11 培地は *Synechocystis* だけでなく，*Anabaena* や *Synechococcus*，*Thermosynechococcus* などの多くのシアノバクテリアがよく増殖する．

［ストック液］

Ⅰ液	Ferric ammonium citrate	0.3 g
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.05 g
	ddH_2O[注1]	100 mL

[注1] ddH_2O: deionized and distilled water

Ⅱ液	$NaNO_3$	30 g
	K_2HPO_4	0.78 g
	$MgSO_4$ 無水	0.73 g
	ddH_2O	1 L
Ⅲ液	$CaCl_2$ 無水	1.43 g/100 mL
Ⅵ液	Na_2CO_3	2 g/100 mL

A 6 液（微量元素液）

H_3BO_4	2.86 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.021 g
濃硫酸	1 droplet
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494 g
ddH_2O	1000 mL

緩衝液 1M TES-KOH（pH 7.0–8.2）

［培地の作製］

プレートの場合：Ⅰ液：2 mL/Ⅱ液：50 mL/Ⅲ液：2 mL/Ⅵ液：1 mL/A6 液：1 mL/1M TES-KOH：5 mL/チオ硫酸ナトリウム 3 g/バクトアガー15 g/純水：939 mL＝計 1000 mL

＊アガーのみ別途オートクレーブする．アガーは，バクトアガー（Difco 社）を使用する．他社のものでは生育が遅くなる．プレートでは，チオ硫酸ナトリウムに増殖の促進効果があるが，液体では多くの場合効果がない．

液体培地の場合：Ⅰ液：2 mL/Ⅱ液：50 mL/Ⅲ液：2 mL/Ⅵ液：1 mL/A6 液：1 mL/1M TES-KOH：20 mL/純水：924 mL＝計 1000 mL

液体培地はオートクレーブ後，室温保存できるが，沈澱物を生じる．後で小分けにする場合は，よく混ぜて行う．沈澱は不溶性の鉄の生成によるもので，マイクロアレイ解析で鉄飢餓応答遺伝子が発現誘導されていることがよくある．Ⅰ液を別途オートクレーブすれば避けられる．

［培養の一般的注意］

液体培地に通気する気体の無菌化には，青梅綿（脱脂していないもの）を約 5 cm くらいかたく詰めた綿濾管（乾熱滅菌），または滅菌用フィルタ（ガス用，孔径 0.2 μm）を使用する．

プレート培養では生育が遅いので，空気循環しているインキュベータ内に放置すると，雑菌が混入することがある．一方，パラフィルムを巻けば雑菌の混入は防げるが，増殖は極端に遅くなり，高密度の増殖は期待できない．私たちは空気の循環から遮断する透明なプラスチックの箱に入れて培養している．この方法では，増殖は正常でしかもコンタミしない．また，箱内に炭酸ナトリウム溶液を一緒に入れておいて，プレートの乾燥と CO_2 の欠乏に対処している．

[凍結保存]

ジメチルスルホキシド（DMSO，最終 5 %）を含む BG11 培地に細胞を懸濁し，スクリューキャップのチューブに入れて，−85℃のフリーザーで保存する．なお，液体窒素中で保存する方がよいともいうが，液体窒素はチューブ内に入るため，雑菌が混入する可能性がある．

[*Synechocystis* sp. PCC 6803 の培養]

至適温度約 34℃．白色蛍光灯などによる連続光照射する．光強度は，約 50–100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$．液体培地の場合は，炭酸ガス（1–3%）を通気すると増殖は速くなり，最終到達濃度も高くなる．倍加時間は約 8 時間だが，単なる振盪培養では．約 24 時間以上．プレートでは，数日で濃い青緑色に増殖する．プレートでの増殖には数日以上要するので，寒天培地が乾燥したり．蓋に水滴がつかないように注意する．なお，保存にはパラフィルムでシールするとよいが，パラフィルムは増殖を阻害するので，培養中はシールしない．グルコースを添加すると生育を改善できることが多いが，培養が古くなると死滅しやすくなるという欠点もあるので，株の維持にはあまり薦められない．培養に使用する薬剤については，表 1 に示す．

[*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 および *T. vulcanus* RKN の培養]

培養温度の至適は 57℃であるが，形質転換のスクリーニングや変異体の培養は 45℃で行うのがよい．生育の温度範囲は約 30℃〜59℃で，室温以下の温度では，低温障害によって死滅しやすいので注意が必要である．また，30℃以上の温度でも，低めの温度では光阻害が起こりやすい．なお，ある程度培養させたプレートを室温に保存することは可能であり，DMSO を添加して凍結保存することもできる．

2.4.2 $BG11_0$ および AA 培地

窒素源を含まない培地での培養は，窒素固定するシアノバクテリアの維持には必須である．PCC の株リストには，「窒素固定をするはずだができない」などと記載された株が多いが，これらは通常の BG11 培地などで維持される間に生じた変異体である．

[培地の作製]

$BG11_0$ 培地は，窒素源を含まない BG11 培地である．上記の BG11 培地から $NaNO_3$ を除いて作製する．*Anabaena* や *Nostoc* など窒素固定するシアノバクテリアの培地としてよく使われている．一方，Allen and Arnon（AA）培地は，窒素源を含まないやや貧栄養の培地である．これを ddH_2O によって 4 倍に希釈したものが AA/4 培地である．

まず，以下の＋Pi 溶液と−Pi 溶液を作製する．

①＋Pi 溶液

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$　28.0 g/500 mL H_2O（無水 K_2HPO_4 21.4 g/500 mL でもよい）

オートクレーブし，4 ℃で保存．

②−Pi 溶液

以下の (a)〜(d) の溶液を 1：1：1：1 で混合し，4 ℃で保存．

表 1：*Synechocystis* 培養におけるグルコースと薬剤のストック液

	ストック液	最終濃度	特徴
グルコース	2 M[注2]	5 mM	呼吸基質
DCMU	20 mM/EtOH	10 μM	光合成系 2 の阻害剤
カナマイシン	20–50 mg mL^{-1}[注2]	20 μg mL^{-1}	Tn5 由来
スペクチノマイシン	40 mg ml^{-1}[注2]	20 μg mL^{-1}	*aadA*，ストレプトマイシン耐性もあり
クロラムフェニコール	50 mg mL^{-1}EtOH	25 μg mL^{-1}	pACYC184 由来
エリスロマイシン	100 mg mL^{-1}EtOH	20 μg mL^{-1}	黄色ブドウ球菌由来

[注2] 0.2 μm フィルターで濾過滅菌する

(a) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$　20 g/500 mL H_2O（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(b) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$　6 g/500 mL H_2O（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(c) NaCl　20 g/500 mL H_2O（オートクレーブ，4 ℃で保存）
(d) Microelement stock[注3]（オートクレーブしない，4 ℃で保存）

液体培地を作る場合，970 mL の H_2O に，＋Pi 溶液を 25 mL，－Pi 溶液を 6.25 mL を加え，オートクレーブする．＋Pi 溶液と－Pi 溶液は沈殿を形成するので，先に混ぜないこと．また，プレートを作製する場合は，10 g のバクトアガーを 1 L の AA 培地に加えてオートクレーブする．プレートはパラフィルムで封をし，4 ℃で保存する．

[*Nostoc punctiforme* ATCC 29133 の培養]

24～31℃の範囲で培養する．通気培養・振盪培養いずれも可能だが，細胞が増殖すると凝集して沈殿を形成しやすい．AA 培地や窒素源を除いた $BG11_0$ 培地，AA プレートで増殖する．BG11 培地や，窒素を加えた AA 培地では増殖が速くなるが，長期間培養を続けると窒素固定能が低下する可能性がある．Jack Meeks らは *Nostoc* の液体培養には AA 培地を 4 倍に希釈して用いている（AA/4 培地）．

2.4.3 *Cyanophora* の培養方法

【C 培地】

$Ca(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$	15 mg
KNO_3	10 mg
Na_2 β-glycerophosphate$\cdot 5H_2O$	5 mg
$MgSO_4$	2 mg
Vitamin B_{12}	0.01 μg
Biotin	0.01 μg
Thiamine HCl	1 μg
PIV metals	0.3 mL
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50 mg
Distilled water	99.7 mL
pH 7.5	

【PIV metals】

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	19.6 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3.6 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.2 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 mg
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg
Distilled water	100 mL

Cyanophora paradoxa NIES 547 は液体のC培地を用いて 25℃で 1％　CO_2 を含む空気を通し，白色光を照射して培養する．光強度は 20～30 $\mu E\ m^{-2}\ sec^{-1}$ 程度．増殖速度が遅いので，雑菌の混入がないように留意する．混入すると，さらに増殖は遅くなり，最終の細胞密度も低下する．なお，寒天培地では増殖しない．また，凍結保存もできないと思われる．

[細胞の回収とシアネル（プラスチド）の単離]

以下の方法で穏和に細胞を破砕する[6]．

1．培養液を 2,000×g で 10 分間遠心し，細胞を回収する．
2．回収した細胞を等張の HEMS buffer を用いて 2 回洗浄．
3．細胞を HEMS buffer で再懸濁したものを，低張の HEM buffer で 10 倍希釈する．これによって浸透圧により細胞膜が壊れる．
4．2,500 g で 10 分間遠心し，シアネルを回収する．

※この方法では遠心によって，壊れた細胞膜も一緒に回収されてしまう．タンパク質の輸送実験などに用いる高純度のシアネルを単離するには，この標品をさらにパーコールなどの密度勾配遠心分離法によって精製する．

【HEMS buffer】

50 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）
2 mM EGTA

[注3] 以下の試薬を溶解して混ぜて調製する．

1）Double distilled water	545 mL
2）H_3BO_3(boric acid)	286 mg
3）$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180 mg
4）MoO_3（純度 85％）	18.0 mg
（又は $Na_2Mo4 \cdot 2H_2O$　純度 99％，30.5 mg）	
5）$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22.0 mg
6）$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	7.9 mg
7）$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4.0 mg
8）NH_4VO_3(NH_4^+metavanadate)	2.3 mg
9）Fe-EDTA 溶液[注4]	80 mL

[注4] Fe-EDTA 溶液の作製法
2.6 g の KOH を 93 mL の H_2O に溶かし，さらに 10.2 g の $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ を加えて溶かす．そして，6.9 g の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$（または $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$）を 182 mL の H_2O に溶かす．二つの溶液を混ぜ合わせると濁りが除かれる．フィルター（Millipore，孔径 0.45 μm）を通した空気を約 4 時間通気する．溶液が褐色から，赤ワイン色に変化する．その後，4 ℃で保存する．

10 mM NaCl
1 mM $MgCl_2$
0.5 M sucrose

【HEM buffer】
50 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）
2 mM EGTA
10 mM NaCl
1 mM $MgCl_2$

文献

1）T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, & S. Tabata, DNA Res. **3** (1996) P. 109.

2）M. Ikeuchi, & S. Tabata, Photosynth. Res. **70** (2001) P. 73.

3）J. G. K. Williams, Methods Enzymol. **167** (1988) P.766.

4）T. Kaneko, Y. Nakamura, C. P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, M. Takazawa, M. Yamada, M. Yasuda, & S. Tabata, DNA Res. 8 (2001) P.205.

5）J. C. Meeks, E. L. Campbell, M. L. Summers, & F. C. Wong, Arch. Microbiol. **178** (2002) P.395.

6）H. Koike, M. Shibata, K. Yasutomi, Y. Kashino, & K. Satoh, Photosynth. Res. **65** (2000) P.207.