



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	紅藻の培養, 入手
Author(s)	榎並, 勲
Description	1章 植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養 10
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, 61-62
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39093
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-011.pdf



10. 紅藻の培養，入手

榎並 勲¹⁾

ここでは，紅藻の中で，私たちが光合成の研究材料として用いてきた紅藻 *Cyanidium caldarium* (シアニジウム) とその近縁種である *Cyanidioschyzon merolae* (略してシゾンと呼ぶ) の培養法と入手法について紹介する．これらの紅藻は，世界各地の酸性温泉に生息し，pH 1～3 の酸性領域で増殖し，中性 pH では増殖できない好酸性，好熱性の単細胞藻である．光合成色素としては，クロロフィル *a*，カロチノイドと青色のフィコシアニン，アロフィコシアニンをもつが，紅色のフィコエリスリンはもたないため，ラン色細菌に似た青緑色をしているが，細胞内に 1 個の葉緑体とミトコンドリア，核をもつ真核生物で，原始的な紅藻と考えられている．

Culture and acquisition of red algae

Isao Enami

In this chapter, culture and acquisition of red algae, *Cyanidium caldarium* and *Cyanidioschyzon merolae*, were described.

10.1 *Cyanidium caldarium* (シアニジウム)

私たちが培養しているシアニジウムは草津温泉から採集した株である．シアニジウム細胞は，強固な厚い細胞壁をもち，4 個の内生孢子を作り増殖する．後で述べるシゾン細胞に比べ，温度などの環境変化に対して強い．外液 pH が強酸性であるにもかかわらず，細胞内 pH は強力なプロトンポンプの働きにより中性に保持されていることが分っている^{1,2)}．しかし，好酸機構(なぜ中性 pH では増殖できないか)については不明のままである．すでに，高い酸素発生能をもつ系 II が精製されており³⁾，その結晶構造解析が進行中である⁴⁾ (4. タンパク質複合体の単離 b. 系 II 参照)．

[培養方法と入手法]

表 1 に示す培養液⁵⁾を調製し，オートクレイブで滅菌する．少し濃い目に植え継いだ方が培養しやすい．薄く植え継ぐと，最初は弱い光強度で培養する必要がある．通常は，30～50 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照射下で培養している．約 40°C で，5% CO_2 を含む空気をフィルター (Millex MILLIPORE) を通して強めにバブリングしながら 7～10 日間培養してから，3,000 x g，5 分の遠心により細胞を回収する．なお，細胞が培養中に沈殿

するのを防ぐためにスターラー攪拌しながら培養すると良い．最近，シゾンの培養に用いる表 2 に示す大量の無機栄養源を含む培養液を用いて，同様の培養条件で培養

表 1: *Cyanidium caldarium* の培養液組成 (5 L)

CaCl ₂	0.9 g
MgCl ₂	0.9 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8 g
Microelement	5 ml

5 L の DW に上の無機塩から順に溶解した後，H₂SO₄ により pH を 2.5～3.0 に合わせる．

Microelement の組成

それぞれ 2.6 g の Co (NO₃)₂，CuSO₄，FeCl₃，MnCl₂，Na₂MoO₄ を 1 L の DW に溶解する．

表 2: *Cyanidioschyzon merolae* の培養液組成 (5 L)
(2 x Allen's medium)

CaCl ₂	0.74 g
MgCl ₂	2.46 g
KH ₂ PO ₄	2.72 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.2 g
P4 metal	20 mL

5 L の DW に上の無機塩から順に溶解した後，H₂SO₄ により pH を 2.2～2.5 に合わせる．

P4 metal の組成 (1 L)

CoCl₂ 4 mg，FeCl₃ 196 mg，MnCl₂ 36 mg，Na₂MoO₄ 2.5 mg，ZnSO₄ 22.2 mg，Na₂EDTA 1000 mg を 1 L の DW に溶解する．

1) 東京理科大学理学部

すると、より早く増殖する結果を得ているので、表2の培養液を使用した方がよいかもしれない。なお、岡山大学の沈研究室では、系IIの結晶化標品調製のため、大きな水槽を用いて大量培養をしている。

シアニジウム株は国内外の藻類保存施設からも入手可能であるが、国内では岡山大学の沈研究室で大量培養しているので、生きの良い株が入手できる。

10.2 *Cyanidioschyzon merolae* (略してシゾンと呼ぶ)

シゾンは、立教大学の黒岩先生がイタリアの酸性温泉から採集された株である。シゾン細胞は、シアニジウム細胞と異なり、強固な細胞壁を持たず、2分裂で増殖する。25℃以下にすると細胞が破壊されるので、温度変化には注意が必要である。すでに、黒岩グループによりシゾンの全ゲノムが完全に解明されている⁶⁾ので、プロテオーム解析などが可能である。また、シゾン細胞の同調培養系を用いて、葉緑体やミトコンドリアの分裂機構が解明された⁷⁾。最近、シゾン細胞は凍結融解により簡単に細胞破壊でき、活性の高い系II、系Iが精製できることを我々は見出した。従って、シゾンは光合成の生化学的研究にも有用な材料と言える。

[培養方法と入手法]

表2に示す培養液を調製し、オートクレイブで滅菌する。シゾンは温度変化に弱いので、植え継ぐ時に培養液を予め42℃付近に温めておく必要がある。濃い目に植え継いだ後、42℃で5% CO₂を含む空気をフィルター(Millex MILLIPORE)を通して強めにバブリングしながら、約100 μmol photon m⁻²s⁻¹の蛍光灯照射で培養す

る。7日間培養した後、3,000 x g、5分の遠心により細胞を回収する。低温で遠心すると細胞が壊れるので、細胞を壊さないように回収したい場合には、25℃以上の温度で遠心する必要がある。

なお、黒岩グループでは、12時間毎の明暗周期によりシゾン細胞の同調培養にも成功している⁷⁾。濃い目に植え継いだ後、12時間明期、12時間暗期の繰り返しで、最初の細胞分裂が起こるのは18時間前後(1回目の暗期6時間目)で、2度目の分裂期が36~37時間目(2回目の暗期直後から1時間程度)である。2回目の分裂で最も同調された細胞が得られるが、それ以降は、高い割合で同調することは難しい。

シゾン細胞は、立教大学の黒岩先生にお願いすれば、分与していただける。

参考文献

- 1) I. Enami, H. Akitsu, & Y. Kyogoku, Plant Cell Physiol. **27** (1986) P.1351.
- 2) H. Ohta, H. Shirakawa, K. Uchida, M. Yoshida, Y. Matuo, & I. Enami, Biochim. Biophys. Acta **1319** (1997) P.9.
- 3) I. Enami, H. Murayama, H. Ohta, M. Kamo, K. Nakazato, & J-R. Shen, Biochim. Biophys. Acta **1232** (1995) P. 208.
- 4) H. Adachi, Y. Umena, I. Enami, T. Henmi, N. Kamiya, & J-R. Shen, Biochim. Biophys. Acta in press.
- 5) I. Enami, & I. Fukuda, Plant Cell Physiol. **16** (1975) P. 211.
- 6) M. Matsuzaki, O. Misumi, T. Shin-i, S. Maruyama, M. Takahara, S. Miyagishima et al. Nature **428** (2004) P.653.
- 7) S. Miyagishima, R. Itoh, S. Aita, H. Kuroiwa, & T. Kuroiwa, Planta **209** (1999) P.371.