

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12386

研究課題名(和文) 付着共存微生物由来物質による海藻代謝変動とその水圏環境浄化への利用の研究

研究課題名(英文) Algal metabolic change caused by substances derived from adherent coexisting microorganisms and its application to hydrosphere environmental purification

研究代表者

垣田 浩孝 (KAKITA, Hirotaka)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：40356754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：水圏環境浄化に適している海藻の生物機能は海藻種で決まるのか海藻生育環境が関連するのかを明らかにするために、四国北東部瀬戸内海周辺の生育水域が異なる紅藻類オゴノリ科海藻6株の成長率、成熟性、有用物質生産能を比較し、同一種でも生育水域により生物機能に違いがあることを明らかにした。微生物由来物質であるIAA(Indole-3-acetic acid)が海藻成長との関連性が予想されるタンパク質の変動に影響を与えているかを知るために、IAA濃度の異なる培地で生育した海藻の抽出液を分析し、一部の酵素の生合成量が変わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では高成長率、非成熟性、有用物質高生産量等の水圏環境浄化に適した海藻の性質は海藻種内でも異なり、海藻生育水域の影響を受ける場合があることを明らかにした。このことは同一海藻種でも生育水域により生物機能に相違があることを明らかにした点で価値がある。この結果は、所望の生物機能を有する海藻株の獲得には天然水域生育海藻の幾つかの性質(例えば成長率や成熟性)の調査が有効であることも示唆している。またIAAが海藻の一部の酵素量に影響を及ぼしていることが示唆された。このことはIAA等の微生物由来物質により海藻の生産量や栄養塩吸収特性を変動できる可能性を示唆している点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify whether the biological functions of seaweeds suitable for hydrosphere environment purification are determined by seaweed species or related to the seaweed growing environment. Six strains of red algal family Gracilariaceae seaweeds with different habitats around the Seto Inland Sea in northeastern Shikoku in Japan were compared in growth rate, maturity, and hemagglutinin production. It was clarified that the biological functions of the same species differ depending on the growing water area. The purpose of this study is also to find out whether IAA, which is a microbial substance, influences the fluctuation of proteins that are expected to be related to seaweed growth. Extracts obtained from seaweeds grown in different IAA concentrations were analyzed by LC-MS/MS. The results of LC-MS / MS analysis showed that the concentration of IAA in the seawater medium affected the amount of biosynthesis of some enzymes in seaweed.

研究分野：応用藻類学

キーワード：海藻 水圏環境浄化 海洋資源 植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類養殖場からの栄養塩負荷は水圏への重大な環境負荷の一つである。高濃度栄養塩(窒素・リン)により異常発生を助長された植物プランクトン(赤潮)からは貝毒等の大量放出が起こる。水圏環境浄化には環境から高濃度栄養塩を取り上げ陸上に長時間隔離することが大切である。富栄養化海中の窒素・リンを吸収して増殖した大型海藻を陸上に上げることで水圏の栄養塩を陸上に長時間隔離できる。水圏環境浄化には生態系リサイクル可能な海藻が必要である。栄養塩吸収した海藻が余れば生態系リサイクルは停滞する。死んで腐敗すれば海藻が水質汚染の源になる。栄養塩素吸収して増殖した海藻の新たな利用法(食品等の新規用途や有用物質原料としての利用法)を開発することは、海藻を用いた水圏環境浄化技術の実装化の観点からも重要である。上記観点に立ち、水圏環境浄化に活用可能性のある海藻を探索した結果、環境浄化生物としての栄養塩吸収能力が高く、藻体が丈夫で大量培養でき、栄養成長して成熟せず、免疫増強成分等の有用成分を生産する有用な非成熟性オゴノリ科海藻を見出した。しかし、同一海藻種でも海藻株の生育環境が海藻株の生物機能に影響を与えているか否かは明確ではなかった。また海藻付着微生物由来の物質が海藻の成長あるいは栄養塩吸収に関連可能性のあるタンパク質の変動に影響を与えているか否かも不明確であった。

2. 研究の目的

(1) 環境浄化生物として有用な非成熟性オゴノリ科海藻を発見し、その海藻成長促進微生物を単離し、微生物由来物質である IAA (Indole-3-acetic acid) と微生物の添加による海藻成長量と栄養塩吸収能上昇を見出した。次に IAA 濃度の異なる培地中で生育した海藻の幾つかの成分の分析を行い、IAA は紅藻類オゴノリ科海藻の代謝物質変動(糖、カロテノイド、電気泳動ゲル上でのタンパク質バンド変動、一部の酵素活性、窒素吸収特性の変動)に関係していることが示唆された。しかしタンパク質変動に関しては電気泳動ゲル上でのタンパク質バンド変動にとどまり、どのタンパク質が量的に変動しているかは未解明であった。有用なオゴノリ科海藻に関しても、同一海藻種でも海藻株の生育環境が海藻株の生物機能に影響を与えているか否かは明確ではなかった。そこで本研究では、四国北東部瀬戸内海周辺の異なった場所で生育しているオゴノリ科海藻オゴノリ 3 株とオゴノリ科海藻ツルシラモ 3 株の単藻培養株を調製し、その増殖藻体の成長率、成熟性、有用物質生産能を比較し、同一海藻種でも海藻株の生育環境が海藻株の生物機能に影響を与えているか否かを解明することを目的とした。また、IAA 濃度の異なる培地中で生育した海藻から得た抽出液を試料として、タンパク質生合成差異を網羅的に解析可能な最新手段である LC-MS/MS によりタンパク質変動を解析することも目的とした。本研究成果により海藻大量供給技術や栄養塩高吸収海藻の選抜技術のための基礎データを収集し、海藻の栄養塩吸収機能を活用した効率的な水圏環境浄化技術の確立に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 天然水域生育海藻の成熟調査

四国北東部瀬戸内海周辺の 6 か所で海藻成熟調査を行った。紅藻類オゴノリ科ツルシラモ *Gracilariopsis chorda* (Holmes) Ohmi は Site 1、Site 2、Site 3 の天然水域で生育している海藻株について、紅藻類オゴノリ科オゴノリ *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss は Site 4、Site 5、Site 6 の天然水域で生育している海藻株について調査した。海藻株全数中の成熟藻体数の割合を算出した。成熟の有無は光学顕微鏡を用いて、四分胞子が検出された藻体を成熟四分胞子体として、果胞子嚢が形成されている藻体を成熟雌性配偶体として判断した。

(2) 保存用単藻培養株の調製と成長率測定

G. chorda と *G. vermiculophylla* の成熟四分胞子体をそれぞれ 6 月、5 月に天然海域から採取した。30 mL の培地(塩分濃度 30 PSU、pH 8.0)の入った 50 mL スクリュー管に四分胞子を植え、14、40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期で 10 週間静置培養した。静置培養で成長した直立体(長さ 10~20 mm)を 200 mL の培地(塩分濃度 30 PSU、pH 8.0)の入った 250 mL 三角フラスコに移し、14、40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期で振とう培養(100 rpm)を行った。2 週間毎に培地交換した。比較培養実験の少なくとも 5 週間前に培養条件を前培養条件(18、40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期)に変更して振とう培養(100 rpm)を継続した。2 週間毎に培地交換した。前培養条件で増殖した藻体は単藻培養株として引き続き比較培養実験で使用した。

成長率測定実験は次のように行った。長さ 5mm の頂端切片を単藻培養株から調製した。各海藻株毎に 12 個の異なる保存用単藻培養株から 1 本ずつ切り出した頂端切片合計 12 本を 200 mL の培地(塩分濃度 30 PSU、pH 8.0)の入った 250 mL 三角フラスコ 1 本に植えた。単藻培養株の成長率と成熟性評価は以下の 11 条件で振とう培養(100 rpm)で行った。温度実験(60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期)は水温 10 から 4 毎に 30 まで 6 条件で実施した。光強度実験(22、14 時間明期 - 10 時間暗期)は光強度 20 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から 20 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 毎に 100 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで 5 条件で実施した。Site 1 で採取した成熟四分胞子体由来の胞子から調製した *G. chorda* 保存用単藻培養株(ASGCKR 株)に

については日長実験（14 時間明期 - 10 時間暗期、12 時間明期 - 12 時間暗期、10 時間明期 - 14 時間暗期）も行った。海藻の相対成長率（R）は、式 $R = (\ln W_t - \ln W_0) / t$ で計算し、日成長率（%day⁻¹）は R に 100 を掛けて算出した。開始時の海藻湿重量および培養 t 後の海藻湿重量は W_0 および W_t として定義した。継続培養は 800 mL の培地（塩分濃度 30 PSU、pH 8.0）の入った 1000 mL 丸型平底フラスコに単藻培養株を植え、水温 22、60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期、エアレーション付で実施した。培地交換は 2 週間毎とし、フラスコ内の海藻湿重量が 0.8 g を超えた場合は海藻湿重量を 0.02 g まで削減後、培養を継続した。

(3) 成熟性評価実験

四分孢子から発芽した単藻培養株を使用し、(2)記載と同様に、温度実験 6 条件（60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期）、光強度実験 5 条件（22、14 時間明期 - 10 時間暗期）で実施した。果孢子囊の形成の有無で四分孢子体の成熟を判断した。

(4) 赤血球凝集活性測定実験

G. chorda 保存用単藻培養株 3 株（ASGCKR 株、ASGCKC 株、ASGCWC 株）と *G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 株（ASGVHC 株、ASGVTC 株、ASGVAC 株）を 20 L の培地（塩分濃度 30 PSU、pH 8.0）の入った 30 L タンクで水温 22、光強度 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期の条件下で 4 週間エアレーション培養した。4 週間培養で増殖した藻体は洗浄後、凍結乾燥し、海藻を細かく切り、抽出用緩衝液を添加して 60 分間攪拌後に遠心分離して粗抽出液を得た。硫酸沈殿法によりタンパク質を濃縮した硫酸画分を得た。ウサギ赤血球を赤血球凝集活性に用いた。赤血球凝集活性の 1 unit はウサギ赤血球を凝集することができる最高希釈率の逆数と定義した。赤血球特異性、糖認識特異性、pH 安定性、熱安定性、二価陽イオン要求性を測定した。単糖と糖タンパク質として D-glucose、L-fucose、D-mannose、L-ascorbic acid、L-rhamnose、D-arabinose、D-galactose、D-ribose、D-galactosamine、D-glucosamine、N-acetyl-D-galactosamine、N-acetyl neuraminic acid、N-acetyl-D-glucosamine、N-acetyl-D-mannosamine、fetuin、asialofetuin、asialomucin、mucin、lactoferrin、ribonuclease B、mannan、ovalbumin、trypsin inhibitor、thyroglobulin を用いた。二価陽イオンの影響評価は EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) での透析と 20 mM CaCl₂、20 mM MgCl₂、20 mM MnCl₂ の添加実験で行った。

(5) 代謝物質分析

400 mL の培地（塩分濃度 30 PSU、pH 8.0）の入った 500 mL 三角フラスコに *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の頂端切片（長さ 5 mm）12 本を植え、IAA 添加培地と IAA 無添加培地で振とう培養を行った。培養条件は前述の水温実験と光強度実験での高成長率の培養条件（水温 22、光強度 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期）とした。海藻湿重量測定と培地交換をクリーンブース内で 1 週間毎に行った。海藻湿重量から成長率を算出した。培養で増殖した海藻を洗浄、凍結乾燥、粉碎して乾燥粉末を得た。海藻粉末に抽出用緩衝液を添加して 18 時間抽出後、遠心分離して不溶化物と分離した上澄みを海藻抽出液として回収した。海藻抽出液中の還元糖の超高感度分析にはポストカラム蛍光誘導体化 HPLC 法（検出限界値 glucose 注入量 1.78 pmol）を用いた。ポストカラム蛍光誘導体化 HPLC 法としては、還元糖を順相分配 HPLC で分離した後のカラム溶出液を発蛍光試薬であるベンズアミジンと蛍光誘導体化促進剤である水酸化カリウム水溶液と混合し 95℃ で 2 分間加熱することによって還元糖を蛍光誘導体化し、蛍光検出器で検出する方法を用いた。タンパク質は標準物質としてウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法により定量した。総糖量は標準物質としてガラクトースを用い、フェノール - 硫酸法により定量した。電気泳動は 1 次元目に等電点電気泳動を、2 次元目に SDS-PAGE を行い、CBB 染色及び銀染色でタンパク質を染色した。IAA 添加により海藻代謝変動が起こり、どのタンパク質が量的に変動しているかを調べるために、IAA 濃度の異なる培地中で生育した海藻の抽出液を試料として、LC-MS/MS によりタンパク質変動を解析した。酵素活性としては重要な糖代謝酵素の一つであるアルドラーゼ（class ）の活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 天然水域生育海藻の成熟調査

天然水域生育海藻は円筒形の分岐軸を生成し、仮根（付着器）部分が泥等の柔らかい堆積物に部分的に埋まっているか、または岩や貝殻等に付着している状態で存在していた。Site 1 以外では晩春から夏までは成熟した雌性配偶体が検出された。Site 1 では成熟雌性配偶体は検出できなかった。6 か所それぞれの海藻株の総量は季節的に変動した。藻体総量は春から夏まで増加し、その後の藻体主軸の流出により夏から冬にかけて最大値の 10%未満まで減少した。

(2) 保存用単藻培養株の調製と成長速度測定

Site 1、Site 2、Site 3 でそれぞれ採取した成熟四分孢子体からそれぞれの *G. chorda* 保存用単藻培養株（ASGCKR 株、ASGCKC 株、ASGCWC 株）が調製できた。Site 4、Site 5、Site 6 でそれぞれ採取した成熟四分孢子体から *G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株（ASGVHC 株、ASGVTC 株、ASGVAC 株）が調製できた。

温度実験により、*G. chorda* 保存用単藻培養株 3 株は水温 18 から 26 で最大成長率を示すことが明らかとなった。一方、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 株の最大成長率を示す温度範囲は水温 14 から 22 であった。単藻培養株 6 株とも水温 10 では成長は遅かった。光強度実験により、*G. chorda* 保存用単藻培養株 3 株は $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で最大成長率を示すことが明らかになった。一方、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 株の最大成長率を示す光強度範囲は光強度 $80 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。培養 3 週間目の成長率を比較すると、最も高い *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株 ($\text{RGR} = 13.8\% \cdot \text{day}^{-1}$) であった。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKC 株、ASGCWC 株、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 ASGVHC 株、ASGVTC 株、ASGVAC 株の成長率はそれぞれ $8.5\% \cdot \text{day}^{-1}$ 、 $8.0\% \cdot \text{day}^{-1}$ 、 $4.1\% \cdot \text{day}^{-1}$ 、 $4.2\% \cdot \text{day}^{-1}$ 、 $4.4\% \cdot \text{day}^{-1}$ であった (表 1)。*G. chorda* 保存用単藻培養株 3 種の成長率は、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 種の成長率より高かった。3 年間継続培養した *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株から調製した 5 mm 長の頂端切片を水温 22、 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期で 3 週間培養した時の成長率は $13.0\% \cdot \text{day}^{-1}$ であった。このことから *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株は 3 年間にわたって高い成長率を維持していることが明らかになった。日長実験において、*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の成長率は明期時間が長いほど高くなった。*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 株 (ASGVHC 株、ASGVTC 株、ASGVAC 株) は水温最適値、光強度最適値、成長率が同等であった。*G. chorda* 保存用単藻培養株 3 株 (ASGCKR 株、ASGCKC 株、ASGCWC 株) は水温最適値、光強度最適値は同等であったが、ASGCKR 株だけがその成長率が他 2 株と異なっていた。このように同一種でも生育水域により生物機能の違いがあることが明らかとなった。Yokoya and Oliveira(1992) は紅藻類 *Pterocladia capillacea* (Gmelin) Bornet et Thuret (カタオバクサ) の 2 つの個体群が温度許容範囲は同等だが成長に最適な温度範囲が異なることを見出し、温度に対する環境型の存在を報告している。この報告例を考慮すると、ASGCKR 株は日本産 *G. chorda* の成長率に関する環境型の一つである可能性あるいは環境変異の一つであると考えられる。

表 1 6 種類の海藻株の生物機能比較

海藻株	成長率 (%day ⁻¹)	成熟性	ヘマグルチニン比活性 (units·mg ⁻¹)
ASGCKR	13.8	難成熟性	7014
ASGCKC	8.5	成熟性	3241
ASGCWC	8.0	成熟性	3122
ASGVHC	4.1	成熟性	928
ASGVTC	4.2	成熟性	941
ASGVAC	4.4	成熟性	977

(3) 成熟性評価実験

G. chorda 保存用単藻培養株 ASGCKR 株は 12 週間の培養でも成熟しなかった。継続培養 3 年まで延長した ASGCKR 株も成熟しなかった。一方、*G. chorda* 保存用単藻培養株 2 株 (ASGCKC 株、ASGCWC 株) は水温 14 から 30 までの条件 ($60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期) でそれぞれ培養 12 週目と 11 週目で成熟がみられた。光強度実験 (22、14 時間明期 - 10 時間暗期) では光強度 $20 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の条件で成熟がみられた。一方、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 株 (ASGVHC 株、ASGVTC 株、ASGVAC 株) は水温 14 から 30 までの条件 ($60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14 時間明期 - 10 時間暗期) で培養 5 週目において成熟がみられた。光強度実験 (22、14 時間明期 - 10 時間暗期) では光強度 $20 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の条件で培養 5 週目において成熟がみられた (表 1)。実験に使用した 6 種類の単藻培養株は水温 10 では培養 12 週間経過時までには成熟する株はなかった。日長実験において、3 種類の異なる日長時間条件下で、*G. chorda* 保存用単藻培養株 (ASGCKR 株) は培養 12 週間経過時までには成熟する株はなかった。成熟性評価実験に用いた 6 株の中で、*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株だけが 3 年間成熟しなかったことから、日本産 *G. chorda* の成熟性に関する環境型の一つである可能性あるいは環境変異の一つである可能性が考えられる。オゴノリ科海藻 *Gracilaria* と *Gracilariopsis* の生活史の考察と本研究の結果は *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の元となった天然海藻の四分孢子由来の海藻の成熟が難しいことを支持しているようであった。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株が難成熟性である理由は解明されていないが、本研究の結果は、特殊な性質を持つ海藻の発見のためには、天然水域で生息する海藻の幾つかの性質 (例えば成長率や成熟性) のスクリーニングが不可欠であることを示唆している。また本研究の結果は、同一海藻種でも海藻株の生育環境が海藻株の生物機能に影響を与えていることを示唆している。何が紅藻類オゴノリ科海藻の生物機能を変えたのかを解明することは今後の課題として残っているが、同一海藻種でも生育水域により生物機能に相違があることを明らかにした点で本研究の結果は価値があると考えられる。

(4) 赤血球凝集活性測定実験

G. chorda 保存用単藻培養株 3 種の海藻抽出液の赤血球凝集活性は、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 種の海藻抽出液の赤血球凝集活性よりも高かった。*G. chorda* 保存用単藻培養

養株 3 種の海藻抽出液の赤血球凝集活性総活性と比活性は、それぞれ $5,000 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ 超と $3,000 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$ 超であった。一方、*G. vermiculophylla* 保存用単藻培養株 3 種の海藻抽出液の赤血球凝集活性総活性と比活性は、それぞれ $3,000 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ 未満と $1,000 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$ 未満であった (表 1)。本研究で試験した中で最も赤血球凝集活性が高いのは *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液であった (赤血球凝集活性総活性 $10,240 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、比活性 $7,014 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$)。3 年間継続培養した *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液は赤血球凝集活性総活性 $10,240 \text{ units}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、比活性 $6,827 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった。このことから *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株は 3 年間にわたって高い赤血球凝集素生産能を維持していることが分かった。硫酸画分の赤血球凝集活性は粗抽出液の赤血球凝集活性より高かった。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液の硫酸画分は、ウサギ赤血球と SETP (表面糖鎖をむき出しにしたヒツジ赤血球) を強く凝集し、モルモットの赤血球を弱く凝集した。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液の赤血球凝集活性は asialofetuin、fetuin、thyroglobulin で阻害されたが、実験に用いた他の糖タンパク質 ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) および単糖 (250 mM) では阻害がからなかった。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液は二価の陽イオンが無くても赤血球凝集活性を示した。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液は加熱処理をしても赤血球凝集活性が失活しなかった。広い pH 範囲で活性が保持されていた。これまで記述した (2)(3)(4)の結果を総合して考察すると、本研究結果は、高成長率、有用物質高生産量、非成熟性はオゴノリ科海藻全般の性質ではなく、*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株に特有の性質であることを明らかにし、環境浄化海藻として本研究で当該海藻を選択していることの正当性を支持する点でも重要である (図 1)。

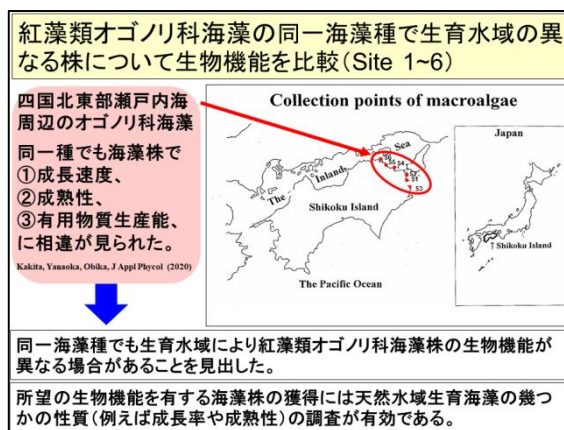


図 1 生育水域の海藻生物機能への影響

(5) 代謝物質分析

G. chorda 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の頂端切片を IAA 無添加培地で振とう培養 (水温 22°C 、光強度 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期) した時の成長率は $\text{RGR} = 13.0\%\cdot\text{day}^{-1}$ であった。一方、*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の頂端切片を IAA 添加培地で振とう培養 (水温 22°C 、光強度 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期) した時の成長率は $\text{RGR} = 16.3\%\cdot\text{day}^{-1}$ であり、IAA 添加により成長率が約 1.3 倍上昇した。IAA 無添加培地で培養した *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液中の全糖濃度は $5.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、タンパク質濃度は $1.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ であった。一方、IAA 添加培地で培養した *G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の抽出液中の全糖濃度は $6.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、タンパク質濃度は $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、IAA 添加によりそれぞれ 1.2 倍、1.1 倍上昇した。糖成分の中で還元性単糖は IAA 添加により約 1.9 倍上昇した。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の頂端切片を IAA 添加培地で振とう培養 (水温 22°C 、光強度 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期) した時のアンモニア態窒素培地の吸収量は、IAA 無添加培地で同条件で振とう培養した時のアンモニア態窒素の吸収量の約 1.4 倍まで上昇した。*G. chorda* 保存用単藻培養株 ASGCKR 株の頂端切片を IAA 添加培地で振とう培養 (水温 22°C 、光強度 $60 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、日長時間 14 時間明期 - 10 時間暗期) して得た海藻からの抽出液および IAA 未添加培地で増殖した海藻からの抽出液を LC-MS/MS によりタンパク質変動を解析し、IAA 添加により一部の酵素の生産量増加 (澱粉分解酵素 α -1,4-glucan lyase が約 7.3 倍上昇、炭酸固定酵素 RubisCO が約 3.8 倍上昇等) を見出した。これらの実験結果は IAA 等の微生物由来物質により海藻の生産量や窒素吸収特性を変動できる可能性を示唆している点で意義がある。実際に海藻抽出液中のクラス アルドラーゼ (FBPA) 活性 (解糖系の必要な酵素の一つであり、フルクトース-1,6-ビスリン酸をグルセルアルデヒド 3 リン酸とジヒドロキシルリン酸に分解する酵素) は IAA 添加により約 1.5 倍上昇している結果を得ており、IAA が海藻の代謝変動へ影響を及ぼしていることが示唆された。

< 引用文献 >

Nair S. Yokoya, Eurico C. Oliveira, Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters, J. Appl. Phycol. 4: 1992, 339-345

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroataka Kakita, Naoki Yanaoka, Hideki Obika	4. 巻 32
2. 論文標題 Suitable unialgal strains of Gracilariopsis chorda and Gracilaria vermiculophylla for hemagglutinin production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 2397-2406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hiroataka Kakita, Tomoki Taniyama, Ryouta Otoizumi, Hideki Obika
2. 発表標題 Dissolved nitrogen uptake of two red algae, Gracilariopsis chorda and Gracilaria bloegettii
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2020 (WET2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣田浩孝、有本清也、音泉良太、小比賀秀樹
2. 発表標題 紅藻類オゴノリ科海藻の栄養塩吸収量及び成長に及ぼす水温とインドール3酢酸の影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷山友規、神山英行、團昭紀、垣田浩孝
2. 発表標題 緑藻類海藻スジアオノリの成長と成熟に対する水温および光強度の影響
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣田浩孝、小比賀秀樹
2. 発表標題 栄養塩と生活史がオゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学大会2021大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷山友規、團昭紀、垣田浩孝
2. 発表標題 緑藻類スジアオノリのβ-カロテン含有量と水温によるその変動
3. 学会等名 日本農芸化学大会2021大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平賀捷悟、川又澄人、四ツ倉典滋、垣田浩孝
2. 発表標題 ウロン酸組成、タンパク質含量、アルギン酸関連酵素活性のコンブ部位比較
3. 学会等名 日本農芸化学大会2021大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotaka Kakita, Hideki Obika, Yoshio Okuyama, Yoshiaki Takahashi
2. 発表標題 The evaluation of a red alga, Gracilariaopsis chorda as a biofilter
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (WET2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 垣田浩孝、小比賀秀樹
2. 発表標題 紅藻類オゴノリ科大型海藻のタンパク質含有量へのインドール3酢酸の影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平賀捷悟、山田将也、関憧平、四ツ倉典滋、垣田浩孝
2. 発表標題 コンブ部位によるアルギン酸含有量とタンパク質含有量の変動
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有本清也、高崎隆平、垣田浩孝
2. 発表標題 5種類の褐藻類大型海藻抽出液のヒアルロニダーゼ阻害活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣田浩孝、有本清也、音泉良太、三澤彩香
2. 発表標題 オゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす培養水温の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirotaka Kakita, Seiya Arimoto, Hideki Obika
2. 発表標題 Effects of temperature and nitrogen chemical form on growth and hemagglutinin of the two red algae <i>Gracilaria blodgettii</i> and <i>Gracilariopsis chorda</i> from Japan
3. 学会等名 The 7th International Society for Applied Phycology Congress (ISAP2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotaka Kakita, Naoki Yanaoka, Hideki Obika
2. 発表標題 Effects of indole-3-acetic acid on proteins, carbohydrates and growth of the red alga, <i>Gracilariopsis chorda</i> from Japan
3. 学会等名 The 7th International Society for Applied Phycology Congress (ISAP2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotaka Kakita, Shouhei Seki, Hideki Obika
2. 発表標題 Rapid and sensitive analysis of uronic acids derived from edible seaweeds
3. 学会等名 The 7th International Society for Applied Phycology Congress (ISAP2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotaka Kakita, Tomoki Taniyama, Akinori Dan
2. 発表標題 Effects of light intensity on the growth and β -carotene biosynthesis of the green alga, <i>Ulva prolifera</i>
3. 学会等名 3rd Seaweed for Health Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroataka Kakita, Seiya Arimoto, Hideki Obika
2. 発表標題 Anti-allergic ingredients in the alcohol extracts derived from five kinds of brown algae in Japan
3. 学会等名 3rd Seaweed for Health Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroataka Kakita, Naoki Yanaoka, Chiaki Takashi, Ayaka Misawa, Hideki Obika
2. 発表標題 The effects of water temperature on growth and nitrogen uptake of a red alga, <i>Gracilaria blodgettii</i> in Japan
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference Online 2021 (WET2021-online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣田浩孝、高橋蘭、井口亮、鈴木淳
2. 発表標題 サンゴ粘液中の海藻忌避物質の探索
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣田浩孝、柳岡直樹、寺田竜太
2. 発表標題 鹿児島産オゴノリ科オゴノリとオゴノリ科ツルシラムの赤血球凝集活性画分の抽出と特徴付け
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣田浩孝、有本清也、田中守
2. 発表標題 褐藻類ノコギリモクの抗アレルギー活性
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学文理学部化学科ホームページ http://dep.chs.nihon-u.ac.jp/chemistry/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------