

生分解性フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp.への
高塩耐性誘導の試み

高知工科大学大学院

環境システムコース

1045004 田中宣秀

生分解性フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp.への高塩耐性誘導の試み

高知工科大学大学院
環境システムコース
1045004 田中 宣秀

【 要旨 】

プラスチック製品は軽量で強固、耐久性・透明性があり、水・ガス・電気を通さないなどの特性のためオールマイティーの如く使用されてきた。しかしその特性が近年深刻な問題を引き起こしている。産業廃棄物として排出されたプラスチックのゴミ公害、不完全な焼却処分によるダイオキシンの発生そして可塑剤などの化学物質による環境ホルモン問題などがあげられる。またプラスチックは化石資源である石油から製造される。石油が枯渇の危機を迎えつつある現代において代替素材の開発が急がれている。

このような時代背景のもと、従来のプラスチックが持つ特性を損なわず、自然界での物質循環に取り込まれ、微生物による分解を受けるよう設計された生分解性プラスチックの開発が行われてきた。その結果 オキシ酸系化合物やデンプン、セルロースそしてキトサンなどの生物由来高分子による生分解性プラスチックが試作され、その一部はすでに製品化されている。しかしながら近未来に起こりうるであろう世界的な人口爆発やそれに伴う食料危機を考慮するとデンプンのような食料は食料として利用すべきであろう。

そこで新規の生分解性プラスチック原料として着目した微細藻類は太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機栄養塩、CO₂そして水のみで生育する。また微細藻類には細胞外被に寒天状の多糖を分泌する種が多く見られる。そこでこれらの微細藻類を基材とした生分解性プラスチックの開発に着手した。その結果海産ハプト藻の *Phaeocystis* sp.と廃パルプを混合して乾燥後、加熱加圧することでフィルム様シートとすることに成功しつつある。

フィルム様シート原料藻の *Phaeocystis* sp.を効率的に大量培養するためには天日開放培養が効果的である。この場合他の微生物が混入しても生育できないような環境下で生育可能な変異株を作り出す必要がある。*Phaeocystis* sp.は海産の単細胞藻であるのでこれに更に高い塩耐性を導入することで他の微生物を排除した天日開放培養が可能となると考えた。高塩耐性の誘導法にはコリン酸化酵素遺伝子や *bbc1* 遺伝子などの遺伝子導入が挙げられる。しかしこれらの遺伝子を導入した変異株が既存の生態系に及ぼす影響を考慮して変異を誘導した高塩耐性株の取得を検討した。高塩濃度海水での馴化、紫外線照射そして

変異原物質の Ethyl methanesulfonate (EMS ; メタンサルホン酸エチル)、Methyl methanesulfonate (MMS ; メタンサルホン酸メチル) そして *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG ; ニトロソグアニジン) を使用した高塩耐性誘導の結果 1.5 倍海水までの生育が確認できた。

【 緒言 】

プラスチックは「高分子物質を主原料として人工的に有用な形状に成型された固体である。ただし、繊維、ゴム、塗料、接着剤などは除外される。」と JIS K 6900 で 定義されている。

プラスチックの歴史は 1935 年塩化ビニルの発見に端を発する。その後ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリカーボネート、アクリル樹脂そしてメラミン樹脂など多くのプラスチック材料が開発されて従来の天然素材に置き換わり日常生活を便利なものにした。プラスチックはいまや日常生活に欠かすことのできない材料の 1 つとなった。天然材料は風化や微生物による分解を受け易い。しかしプラスチック製品は天然材料とは異なり化学的に極めて安定な化合物と言える。その優れた安定性のため劣化はするものの自然界で微生物に分解されにくく物質循環されない。

国内で排出される一般廃棄物の約 15%がプラスチックであり、産業廃棄物として排出されるプラスチックと合わせると実に年間 900 万 t にのぼる。廃棄プラスチックのうち約 10%は再利用されるが残りの約 90%は埋め立てや焼却されている。しかし埋め立て跡地は地盤が安定せず再開発が困難であり、プラスチックを焼却する際に生じる高温による焼却炉の損傷、不完全な燃焼によるダイオキシンの発生、また燃焼時に発生する CO₂ による地球温暖化の促進などの問題が発生している。石油化学産業の発展に伴い高品質のプラスチックが全世界で年間約 1.5 億 t 生産され、国内で生産されるプラスチック材料は 1,000 万 t を超える。全世界で生産される年間約 1.5 億 t のプラスチックを全量焼却するとポリエチレン換算で約 4.7 億 t の CO₂ が発生する。しかし焼却する際に石油由来の燃料を使用するため実際は 10-15 億 t の CO₂ が発生することとなる。それだけではない、製造過程で添加される可塑剤などの化学物質による生物のホルモン代謝異常、いわゆる環境ホルモンも問題視されている。

このような問題を解決するため従来のプラスチックが持つ特性を損なわず、自然界での物質循環に取り込まれ、微生物による分解を受けるように設計された生分解性プラスチックの開発が行われてきた。現在試作されている生分解性プラスチックの多くは オキシ酸系化合物やデンプン、セルロース、キトサン、プルランそしてカードランなどの各種多糖類が原料であり、一部が製品化されている。しかし生物から高純度のプラスチック原料を調製せねばならずエネルギーコストが高い製品となってしまう。またジャガイモ、トウモロコシ、デンプンなどは近未来に起こりうる人口爆発や食料危機を考慮して食料・家畜飼料として使用すべきである。

新規の生分解性プラスチック原材料を(1)食料として利用されていない、(2)

安価である、(3)大量に生産できる、という条件で検討した。その結果光合成微生物である微細藻類に着目した。

微細藻類は太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機塩、CO₂、水のみで増殖する。微細藻類には細胞表面に寒天状の多糖を分泌する種が数多く見られる。この細胞周辺に外被として多糖を分泌する微細藻類を利用して藻体を含んだまま生分解性プラスチック様の基材の開発に着手した。その結果、沖縄沿岸部で採取された海産ハプト藻 *Phaeocystis* sp.と廃パルプを混合して乾燥、加熱加圧することでフィルム様シートの作製に成功しつつある。



Figure 1 *Phaeocystis* sp.の顕微鏡写真

(×600、外被多糖(矢印)を見やすくするために墨汁を入れて撮影した)

そこで *Phaeocystis* sp.を大量に培養する手法を模索した。一般に微生物を大量培養するための培養装置は密閉タンクと天日開放池に大別できる。

密閉タンクによる培養は酵母やバクテリアなどで行われている。一般にこれらは従属栄養生物である。殺菌したタンク内に生育に必要な有機物をいれてpH、温度、必要とあれば通気をおこない至適条件を人工的に作りだして大量培養を行う。

天日開放池による培養は微細藻類で行われている。一部を除き微細藻類は光独立栄養である。先にも述べたが太陽光をエネルギー源として光合成により少量の無機塩、CO₂、水のみで増殖する。世界各地で行われている藻類の商業的大量培養施設をみると大半が天日開放池である。天日開放池を用いる利点として(1)設営が容易、(2)設営コストが低い、(3)拡張が容易、(4)太陽光が光源などが挙げられる。またこのような培養施設を建設するには(1)一年を通しての日照時間が長い、(2)降雨日数が少ない、(3)広大な敷地を有する沿岸地域が望ましい。これらの条件に適した地域はイスラエル、西オーストラリア、バハ・カルフォルニアそしてハワイなどがあり、単細胞緑藻 *Dunaliella* や藍藻

Spirulina などの商業的培養施設が稼働している。

しかしながら天日開放池での培養では他の微生物による汚染、コンタミネーションが容易に発生するためその防止策を講じる必要がある。*Dunaliella* や *Spirulina* などの有価藻類のみを効率的に増殖させるためには至適 pH の調整や CO₂ ガスの吹き込みを行い常に優勢を保たせている。しかし完全にコンタミネーションを防ぐことができないのが現状である。

そこで *Phaeocystis* sp. を他の生物が生育不可能な環境でも生育できるように改良することで問題を解決することとした。そのような環境としては熱水、強酸性、強アルカリ性、飽和食塩水、高濃度環境汚染物質そして超高压などが挙げられる。*Phaeocystis* sp. は海産性単細胞藻類であるため高濃度海水中での順応性を誘導するのが最善と思われる。

また先に述べた天日開放池で商業培養を行っている地域は淡水の確保が難しく多くの海水淡水化プラントが稼働している。これらの施設から排出される廃濃厚海水は生態系に影響を及ぼさぬよう通常濃度の海水と混合されて海に戻されている。この廃濃厚海水を利用すれば高濃度海水環境を作り出すのに要する費用やエネルギーコストを節約することが可能となるであろう。

以上のことから生分解性プラスチック様フィルム原料藻 *Phaeocystis* sp. への高塩耐性の誘導を試みた。

【 材料 】

採取

ハプト藻 *Phaeocystis* はハプト植物綱プリムネシウム属に属する。今回研究に用いた *Phaeocystis* sp.は沖縄県糸満市米須海岸でプランクトンネットを使用して採取された。

培養

Phaeocystis sp.は 500ml バッフル付マイヤーフラスコに Provasoli's ES-enrichment Seawater medium (PES ; Provasoli の栄養塩強化海水培地 : 7 ページ参照) を 300ml 加えて初期濃度 10^5 cells/ml で接種しレシプロシェーカー (TB-98, 高崎科学器械) にて回転数 120rpm で終日振盪培養した。培養条件は特に記載がないかぎり次の通りである ; 光源に白色蛍光灯を使用、照度は 3,000lx、室温は 25 ℃、明期 16 時間 : 暗期 8 時間で人工的に昼夜を設定した。

Provasoli's ES-enrichment Seawater stock solution
 (PESs ; Provasoli の栄養塩強化海水)

NaNO ₃	350m g
-グリセロリン酸ナトリウム	50m g
Vitamin B ₁₂	10 μ g
チアミン塩酸塩	500 μ g
ビオチン	5 μ g
トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	500m g
Fe (as EDTA; 1:1 molar) *	25m l
P- metals **	25m l
純水	50m l

* Fe (as EDTA; 1:1 molar)

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	70.2m g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	66 m g
純水	100 m l

** P- metals

H ₃ BO ₃	114 m g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	4.9 m g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.9 m g
ZnCl ₂	1 m g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.41m g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 m g
純水	100 m l

人工海水 980m l に PESs20m l を加えて 1N HCl にて pH7.8 に調整する

【 操作と結果 】

細胞濃度の測定

細胞濃度を計測する手法としては血球計算盤でのカウント、Packed cell volume (PCV ; 細胞容積測定) Optical density (OD ; 濁度) などがある。しかし今回のように検体数が膨大で検体あたりの絶対量が少量な場合、血球計算盤によるカウントでは時間がかかり PCV はある程度の細胞濃度がなければ測定できない。そこでマイクロプレートリーダーを用いて OD を測定した。

方法は次の通りである ; 対数期にある *Phaeocystis* sp. を細胞濃度が 10^5 - 10^8 cells/ml となるように希釈調整する。各濃度の *Phaeocystis* sp. を 96well マイクロプレートに $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注する。30 分間放置して *Phaeocystis* sp. を完全に沈降させた後マイクロプレートリーダー (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad) で吸光度を測定した (Flow diagram 1)。

Flow diagram 1 マイクロプレートリーダーによる細胞濃度の測定

対数期にある *Phaeocystis* sp.

細胞濃度が 10^5 - 10^8 cells/ml となるように希釈調整する

96well マイクロプレートに $100 \mu\text{l/well}$ ずつ分注する

30 分間放置する

マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する

マイクロプレートリーダーの測定原理は単色光フィルターを用いた分光光度計と同じである。使用した機器 (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad) では測定波長を校正するためリファレンス波長を同時に設定しなければならない。今回用いた単色光フィルターは 340nm、405nm、415nm、450nm、570nm そして 655nm の 6 種類である。測定波長とリファレンス波長の組み合わせは 6×5 通りとなる。

すべての組み合わせで測定した結果、測定波長 $\lambda_M=450\text{nm}$ 、リファレンス波長 $\lambda_R=415\text{nm}$ のとき (1) 式で表される関係が導かれた。

$$\text{細胞濃度 (} \times 10^5 \text{ cells/ml)} = 169.1 \times (A_S - A_0) \quad (1)$$

このとき、 A_S =*Phaeocystis* sp. の吸光度、 A_0 =ブランクの吸光度である。

以降の実験操作において特に記載がないかぎり細胞濃度は(1)式にて算出した。

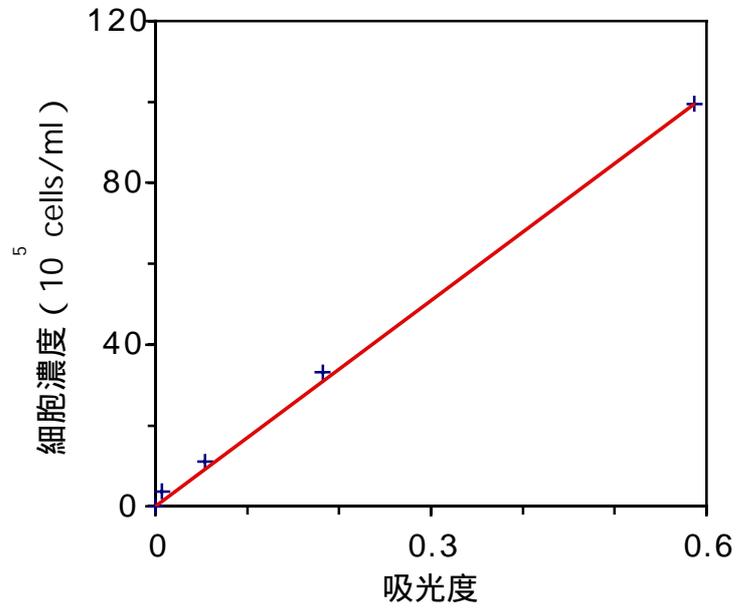


Figure 2 *Phaeocystis* sp.の細胞濃度と吸光度の相関性

高塩耐性の誘導

高塩耐性を誘導する手法としては遺伝子組み替え、例えばコリン酸化酵素遺伝子や *bbc1* 遺伝子などの導入を挙げることができる。これらの遺伝子は *Phaeocystis* sp. に存在するという報告はなされていない。仮にこれらの遺伝子を導入しても発現する確率は非常に低い。また高塩耐性遺伝子を導入された *Phaeocystis* sp. 変異株が既存の生態系に及ぼす影響も無視できない。

そこで高塩濃度海水への馴化、紫外線照射、変異原物質などで突然変異をおこし高塩耐性を誘導することとした。

1. 高塩濃度海水への馴化による高塩耐性の誘導

高塩濃度海水への馴化は PES に含まれる無機塩・ビタミン類および海水の塩分量を通常の 1.5-3 倍まで高めたものを使用した。

方法は次の通りである；対数期にある *Phaeocystis* sp. を遠心（8,000 × g、3 分）古い培地を取り除き新鮮な PES-3PES に再懸濁する。吸光度が 0.1 となるよう希釈調整後、50ml マイヤーフラスコで振盪培養した。培養期間は 2 週間で細胞濃度測定と細胞の状態観察を行った（Flow diagram 2）

結果を Figure 3a-f に示す。マイクロプレートの周縁部で測定結果に大きなばらつきが見られた。おそらく中心部よりも乾燥速度が早いため測定値にばらつきが生じたものと推測される。そこでマイクロプレート周縁部の測定値を棄却した残り 60 サンプルで標準偏差を求めた。

1.5PES と 2PES で良好な結果が得られた。2.1PES は僅かだが増殖が見られたが、2.2PES 以上の高塩濃度では増殖しなかった。同時に顕微鏡で細胞の状態と長径を計測した（Table 1）。1.5PES で培養した *Phaeocystis* sp. の細胞は張りがあり葉緑体も大きくはっきりとしている。しかし塩濃度が高まるにつれて葉緑体の退色・減退が観察された。2.3PES 以上では収縮した細胞が至る所で観察され良好な細胞の割合が激減した。2.9PES 以上ではすべての細胞で葉緑体の完全な退色・減退と細胞の収縮が観察された。

Flow diagram 2 高塩濃度海水への馴化による高塩耐性の誘導

対数期にある *Phaeocystis* sp.

遠心 (8,000 × g, 3 分)

培地

藻体

PES-3PES を加える

吸光度が 0.1 となるように再懸濁する

50ml マイヤーフラスコで振盪培養する

Table 1 高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp. の細胞長径 (μ m)

1.5 PES	5.8 ± 0.57	(n=100)
2 PES	4.7 ± 0.58	(n=100)
2.1 PES	4.1 ± 0.45	(n=100)
2.2 PES	4.0 ± 0.42	(n=100)
2.3 PES	3.9 ± 0.41	(n=100)
2.4 PES	3.6 ± 0.36	(n=100)
2.5 PES	3.3 ± 0.21	(n=100)
2.6 PES	3.2 ± 0.18	(n=100)
2.7 PES	3.1 ± 0.16	(n=100)
2.8 PES	3.1 ± 0.23	(n=100)
2.9 PES	3.1 ± 0.17	(n=100)
3 PES	3.2 ± 0.13	(n=100)

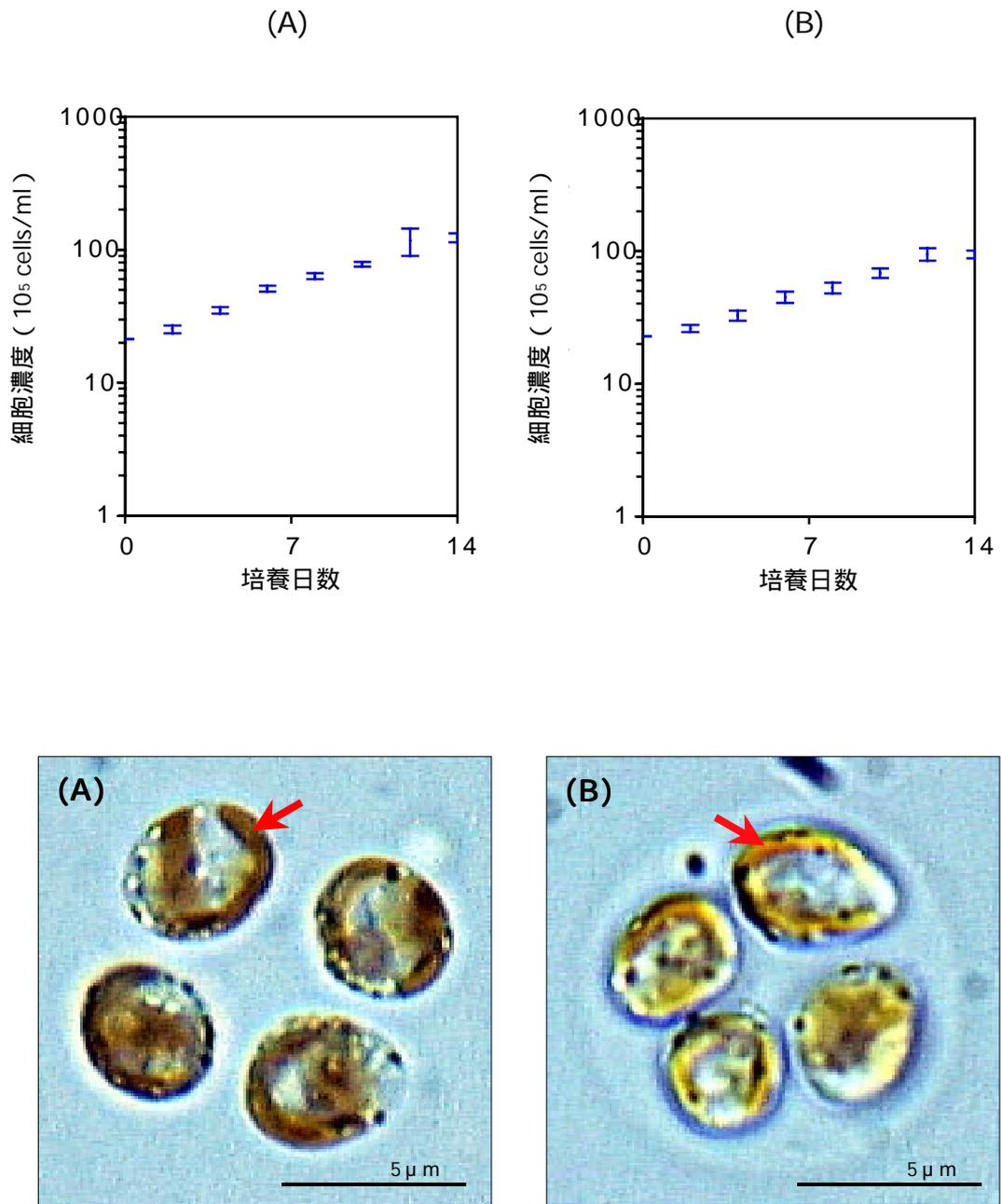


Figure 3a 高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp. の
 増殖曲線と細胞の様子 (A): 1.5PES (B): 2PES
 ($\times 1,000$ 、図中の矢印は葉緑体)

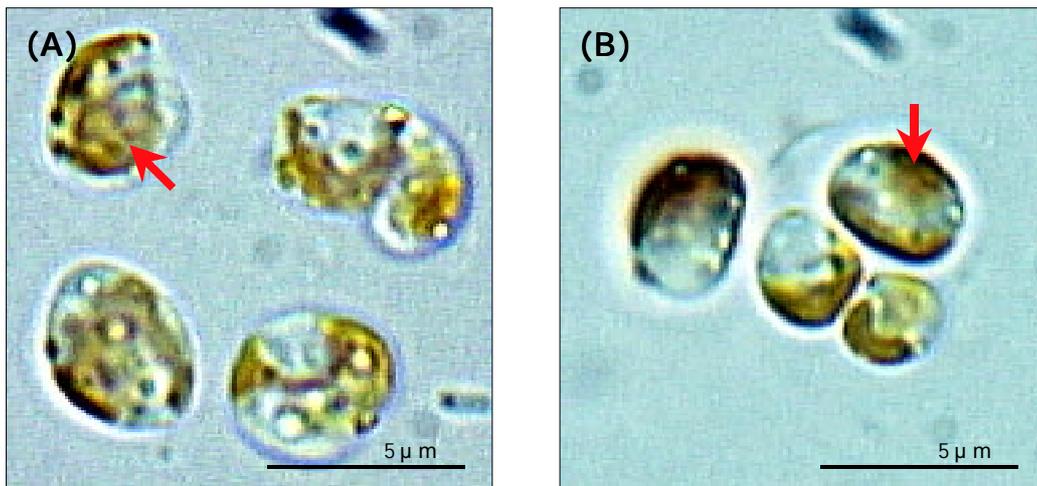
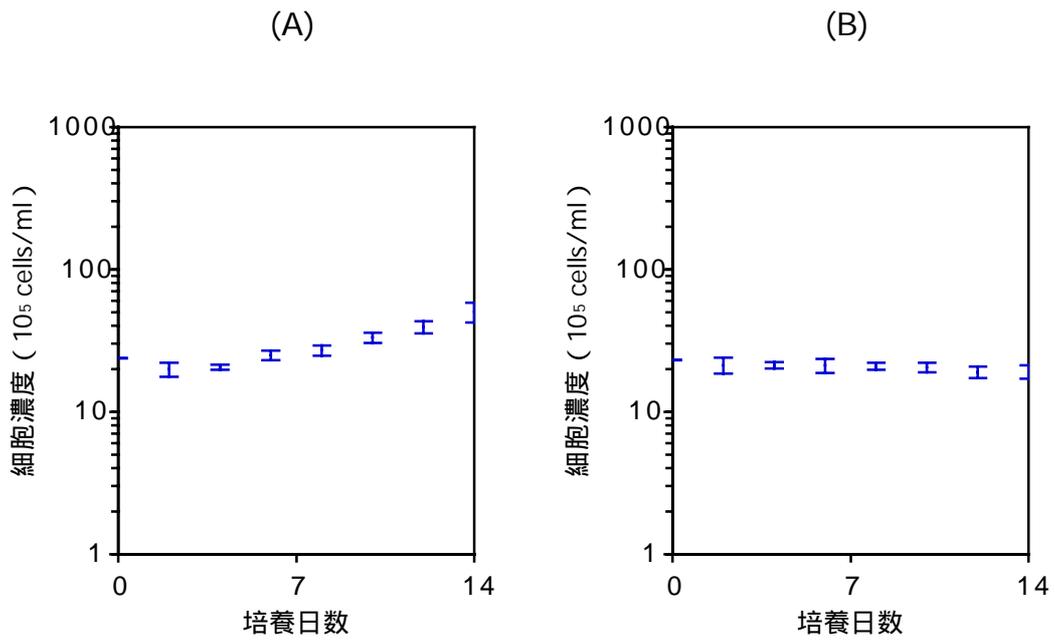


Figure 3b 高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp. の
 増殖曲線と細胞の様子 (A): 2.1PES (B): 2.2PES
 (×1,000、図中の矢印は葉緑体)

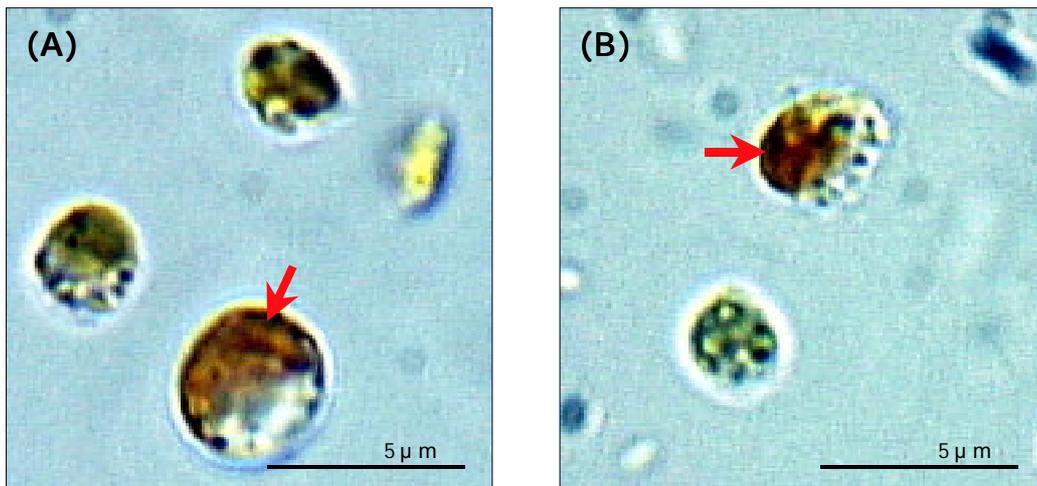
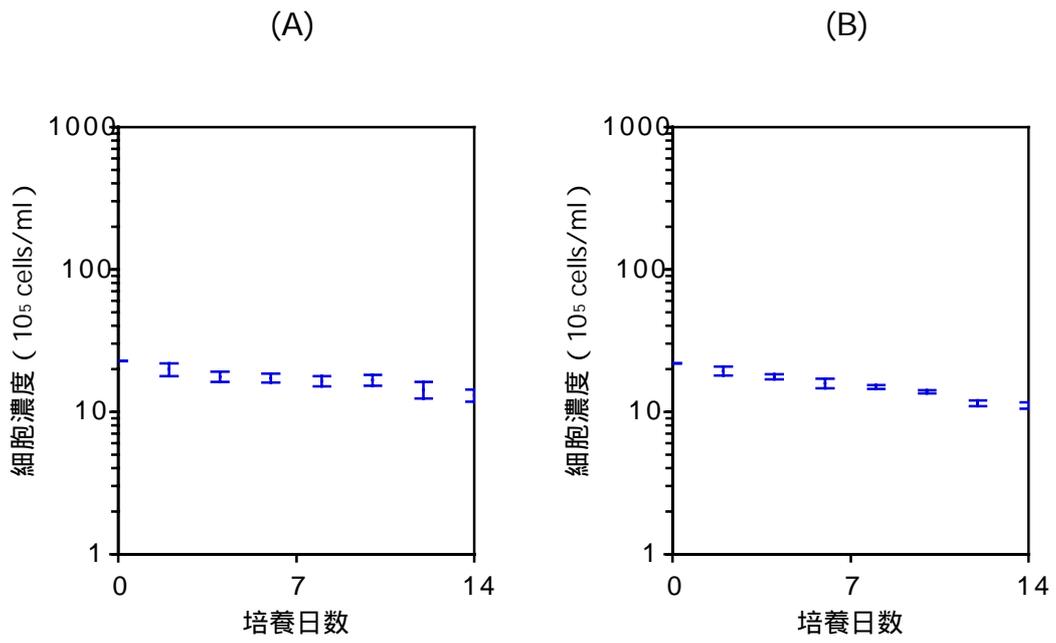


Figure 3c 高塩濃度海水で馴化した *Phaeocystis* sp. の
 増殖曲線と細胞の様子 (A): 2.3PES (B): 2.4PES
 (×1,000、図中の矢印は葉緑体)

