

# Heterosigma akashiwoによるビタミンB12結合物質の生産 とそのB12結合物質の性質

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	624
掲載ページ	p. 647-653
発行年月	1996年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## *Heterosigma akashiwo* によるビタミン B<sub>12</sub> 結合物質の生産と その B<sub>12</sub> 結合物質の性質

張 敬国, 西島敏隆, 深見公雄

(1995年10月23日受付)

Production of Vitamin B<sub>12</sub> Binder by *Heterosigma akashiwo* and Some of Its Properties

Jingguo Zhang,\*<sup>1</sup> Toshitaka Nishijima,\*<sup>1</sup> and Kimio Fukami\*<sup>1</sup>

The influence of vitamin B<sub>12</sub> concentration in the medium on the production of vitamin B<sub>12</sub> binder by *H. akashiwo* was evaluated, and some of the chemical properties of the B<sub>12</sub> binder and its effect on the growth of B<sub>12</sub>-requiring phytoplankton were determined.

*H. akashiwo* produced B<sub>12</sub> binder and most of it was secreted into the culture medium. The amount of B<sub>12</sub> binder secreted was dependent on the B<sub>12</sub> concentration in the media for both pre- and test-cultures; the lower B<sub>12</sub> concentration increased the secretion of B<sub>12</sub> binder. The production rate of B<sub>12</sub> binder was highest during the middle exponential growth phase when the alga was incubated at B<sub>12</sub> concentrations of 2~20 ng/l; their production rates ranged from 0.11 to 0.21 fg B<sub>12</sub>/cell/day. The dissociation constant of bound B<sub>12</sub>, the complex of free B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> binder secreted by *H. akashiwo*, was 52.8 ng/l (association constant =  $2.57 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ). Binding activity of B<sub>12</sub> binder was stable at pH 8~9 and temperatures of 4~50°C, but labile under ultraviolet irradiation. The B<sub>12</sub> binder inhibited the growth of B<sub>12</sub>-requiring phytoplankton including *H. akashiwo* itself and the effect of B<sub>12</sub> binder was found to be non-specific.

The present study suggests that the B<sub>12</sub> binder secreted by *H. akashiwo* could inhibit the growth of B<sub>12</sub>-requiring phytoplankton after blooms of *H. akashiwo* in natural seawater.

キーワード: *Heterosigma akashiwo*, ビタミン B<sub>12</sub>, ビタミン B<sub>12</sub> 結合物質, 結合態 B<sub>12</sub>, 解離定数

多くの植物プランクトンは微量栄養物質として、ビタミン B<sub>12</sub> (以下 B<sub>12</sub> と略す) を必須に要求し、海水中の遊離態 B<sub>12</sub> は一次生産を制御する因子の一つと考えられている。一方、海水中の遊離態 B<sub>12</sub> と特異的に結合し、これを不活性化して B<sub>12</sub> 要求性微生物による利用を妨げる物質、ビタミン B<sub>12</sub> 結合物質 (vitamin B<sub>12</sub> binder) がある種の植物プランクトンの培養液中に検出される<sup>1,2)</sup>こと、さらに内湾の海水中には溶存態全 B<sub>12</sub>のうち、相当量が不活性化結合態 B<sub>12</sub> として存在することが明らかにされた。<sup>3)</sup>したがって、海水中の B<sub>12</sub> 結合物質は、B<sub>12</sub> の存在形態を制御し赤潮原因種を含む B<sub>12</sub> 要求性プランクトンの選択的増殖阻害や非要求性プランクトンとの種間競争に重大な影響を与えていることが考えられる。<sup>4)</sup>

本研究では海水中の B<sub>12</sub> 結合物質の生態学的役割を解明するため、植物プランクトンによる結合物質生産に関する特性とともに、それら結合物質の生物・化学的性質

を明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

供試藻および培養条件 試験には *Heterosigma akashiwo* (HADA) HADA の NIES-6 株, *Skeletonema costatum* (GREVILLE) CLEVE の NIES-324 株および *Gymnodinium mikimotoi* MIYAKE et KOMINAMI ex ODA の ax-2 株の、いずれも無菌クローン株を使用した。前 2 者は国立環境研究所から、後者は南西海区水産研究所山口峰生博士から譲受した。培養は、いずれも完全人工培養液 ASP<sub>2</sub>N<sub>2</sub>A を用いて、水温 20°C、照度 64~96 μE/m<sup>2</sup>·sec, 14 : 10 の明暗サイクルで行った。

全 B<sub>12</sub>、遊離態 B<sub>12</sub> および結合態 B<sub>12</sub> の測定 試料水に過剰の遊離態 B<sub>12</sub> を添加して 20°C で 1 時間培養し、存在する B<sub>12</sub> 結合物質を全て結合態 B<sub>12</sub> とした後、蛋白質被覆活性炭 (PCC) を加えて遊離態 B<sub>12</sub> を吸着除去した。残存した結合態 B<sub>12</sub> を加熱分解して B<sub>12</sub> を遊離さ

\*<sup>1</sup> 高知大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan).

せ, これを *Euglena gracilis* z 株によるバイオアッセイ法によって測定した。<sup>3)</sup> 結合物質の量はこれと結合する  $B_{12}$  の量で表した。また, 遊離態  $B_{12}$  未添加の試料について, バイオアッセイ法により  $B_{12}$  量を測定し, これを遊離態および結合態  $B_{12}$  の合計量 (全  $B_{12}$  量) とした。細胞内の  $B_{12}$  結合物質および全  $B_{12}$  (遊離態および結合態  $B_{12}$  の合計量) の含量は,  $B_{12}$  欠如培地で前培養した試験藻体を異なる  $B_{12}$  濃度の培地に接種して培養後, 増殖の各段階から収集した細胞をリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.8) 中で超音波処理し, 上澄液について上記と同様の方法によって測定した。

**H. akashiwo** による  $B_{12}$  結合物質の生産試験  $B_{12}$  欠如および  $B_{12}$  濃度 20 ng/l の培地で前培養した *H. akashiwo* を, 0, 2, 10, 20, および 40 ng/l の  $B_{12}$  を含む培地で培養し, 細胞内および培養液中の  $B_{12}$  化合物含量を経時的に測定した。また培養液の少量を界線入りスライドグラスに取り, 顕微鏡下で細胞数を計数した。 $B_{12}$  結合物質の分泌速度,  $P$  (ng  $B_{12}$ /cell·day) は以下の式に従って算定した。<sup>5)</sup>

植物プランクトンの増殖量は, 初めの細胞数を  $N_0$  (cells/ml),  $t$  日後の細胞数を  $N$  (cells/ml), 比増殖速度を  $\mu$  (1/day) とすると,

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

と表すことができる。そこで, プランクトンによって生産された  $t$  日後の  $B_{12}$  結合物質濃度を  $Y$  (ng  $B_{12}$ /l), 初めに存在した  $B_{12}$  結合物質濃度を  $Y_0$  (ng  $B_{12}$ /l), 1 藻細胞, 単位時間当たりの  $B_{12}$  結合物質の分泌速度を  $P$  (ng  $B_{12}$ /cell·day) とすると

$$dY/dt = PN = PN_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

となる。これを積分して,  $t=0$  の時  $Y=Y_0$  を代入すると, (3)式が得られる。

$$Y = PN_0 (e^{\mu t} - 1) / \mu + Y_0 \quad (3)$$

これに(1)式を代入して

$$Y = P(N - N_0) / \mu + Y_0 \quad (4)$$

従って, 1 藻細胞, 単位時間当たりの  $B_{12}$  結合物質の分泌速度  $P$  は

$$P = \mu (Y - Y_0) / (N - N_0) \quad (5)$$

で求めることができる。

**$B_{12}$  結合物質の調製** *H. akashiwo* を  $B_{12}$  濃度 2 ng/l の培地で 10~12 日間培養し, 分画分子量 10,000 の限外濾過膜を用いて, 培養濾液中の遊離態  $B_{12}$  の除去と  $B_{12}$  結合物質の濃縮を行った。その一部に  $^{57}\text{Co}-B_{12}$  を添加してその結合能を確認した。 $^{57}\text{Co}-B_{12}$  には Amercham 社製の Cyanocobalamin ( $^{57}\text{Co}$ ) を使用した (比活性 = 11.49 GBq/ $\mu\text{M}$ )。

**結合態  $B_{12}$  の解離定数の測定** 上記の  $B_{12}$  結合物質の一定量に  $^{57}\text{Co}-B_{12}$  を 0~600 ng/l になるように添加し,

20°C で 1 時間放置後, 遊離態  $B_{12}$  およびこれらと平衡状態にある結合態  $B_{12}$  の量を測定した。遊離態  $B_{12}$  量は *Euglena* バイオアッセイ法により, 結合態  $B_{12}$  量は蛋白質被覆活性炭 (PCC) 処理後その放射能を計数して求め, 解離定数は以下のように算定した。

遊離態  $B_{12}$  と  $B_{12}$  結合物質との結合は, Michaelis-Menten 型の式<sup>2)</sup>で表される。

$$B = B_{\max} \frac{F}{K_d + F} \quad (6)$$

ここで,  $F$  は遊離態  $B_{12}$ ,  $B$  は結合態  $B_{12}$  の量,  $B_{\max}$  は  $B_{12}$  結合物質の総量,  $K_d$  は結合態  $B_{12}$  の解離定数, すなわち  $B_{\max}$  の 1/2 を与える遊離態  $B_{12}$  濃度を表す。これを变形して得られる双曲線から  $K_d$  を求めた<sup>6)</sup>。

$$(F + K_d) \cdot (B - B_{\max}) = -K_d \cdot B_{\max} \quad (7)$$

**$B_{12}$  結合物質の結合能および結合態  $B_{12}$  の安定性** 及ぼす温度, pH および紫外線の影響  $B_{12}$  結合物質の結合能は, 上記によって調製した  $B_{12}$  結合物質を各種の温度, pH および紫外線に曝露し, これに  $^{57}\text{Co}-B_{12}$  を添加して得られた結合態  $B_{12}$  の放射能を測定して, 同時に測定した温度 20°C, pH 8.0 および紫外線に曝露しなかった試料の放射能に対する百分率で表した。結合態  $B_{12}$  の安定性は,  $B_{12}$  結合物質にあらかじめ  $^{57}\text{Co}-B_{12}$  を結合させ, これを同様の条件に曝露して, 結合態  $B_{12}$  の放射能を測定し, 上記と同様に百分率で表した。温度の試験では 4~80°C で 10 分間, pH の試験では pH 4~10.5 で 10 分間 (45°C), 紫外線の試験では 100~150  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  の強度で 0~8 時間, それぞれ曝露した。

**$B_{12}$  結合物質の藻類に対する増殖抑制効果**  $B_{12}$  濃度 10 ng/l で 12 日間培養した *H. akashiwo* の培養濾液 (Filtrate) 7.5 ml に 2.0 ml の栄養物質補強液 (窒素, リン, 炭酸塩濃度を 5 倍に, ビタミン混合液 S3 および微量金属混合液 P II の濃度を 2 倍に強化し,  $B_{12}$  を除いた ASP<sub>2</sub>NTA 培地) を加えて, 栄養物質濃度が ASP<sub>2</sub>NTA の組成を下回らないようにした。また, 対照試験 (Control) には ASP<sub>2</sub>NTA 培地を使用した。さらに培養濾液および対照試験用培地に各種濃度の  $B_{12}$  溶液 0.5 ml を添加し, これらに  $B_{12}$  欠如培地で飢餓培養した本藻, *S. costatum* および *G. mikimotoi* を接種して培養し, 増殖量を経時的に測定した。

## 結 果

**H. akashiwo** による  $B_{12}$  結合物質の分泌 *H. akashiwo* を異なる  $B_{12}$  濃度で前培養した藻体をさらに種々の  $B_{12}$  濃度で培養し, 得られた増殖量, 培地中に残存する  $B_{12}$  量および細胞外へ分泌された  $B_{12}$  結合物質量の経時変化を Fig. 1 に示す。まず, *H. akashiwo* の最大増殖収量は前培養および試験培養時の  $B_{12}$  濃度に依存した

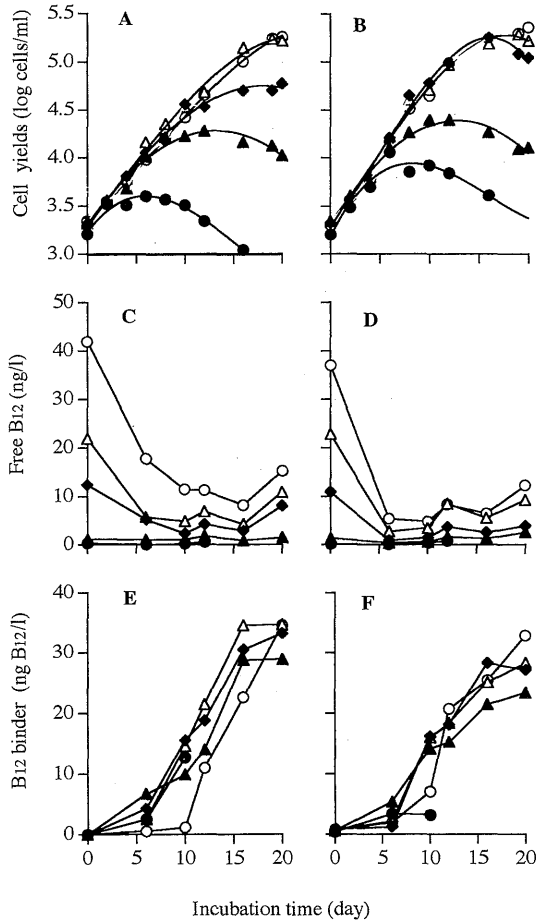


Fig. 1. Influence of B<sub>12</sub> concentration in culture medium on the growth of *H. akashiwo* (A-B), their utilization of free B<sub>12</sub> (C-D) and secretion of B<sub>12</sub> binder (E-F), comparing the effect of pre-incubation of cells at 0 ng/l of B<sub>12</sub> starvation (A, C and E) and at 20 ng/l of B<sub>12</sub> (B, D and F).

—●— 0 ng/l, —▲— 2 ng/l, —◆— 10 ng/l,  
—△— 20 ng/l, —○— 40 ng/l

が、いずれの場合も試験培養時の B<sub>12</sub> 濃度 20 ng/l 以上で増殖量が飽和した。

培養液中に残存する B<sub>12</sub> 量は細胞密度の増加に対応して減少し、B<sub>12</sub> 濃度 10 ng/l 以上の培養では、指数増殖期前期に相当する培養開始後から 6 日目までに急激に減少し、藻体による B<sub>12</sub> 摂取がこの期間に活発に起こることがわかった。また、定常期頃には培養液中の B<sub>12</sub> 濃度がわずかに増加する傾向がみられ、死細胞からの B<sub>12</sub> 溶出が示唆された。一方、培地中に分泌・蓄積された B<sub>12</sub> 結合物質量は *H. akashiwo* の増殖とともに増加し、活発な B<sub>12</sub> 摂取が見られた培養開始 6 日目までは比較的

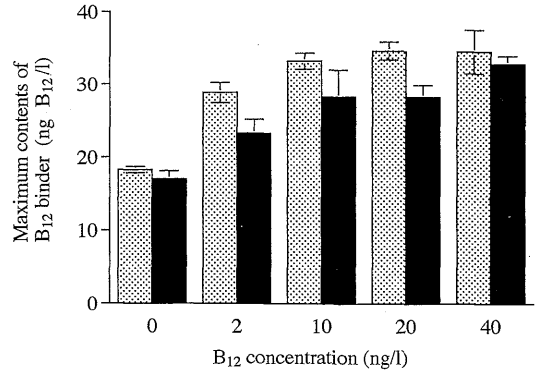


Fig. 2. Influence of B<sub>12</sub> concentration on the secretion of B<sub>12</sub> binder by *H. akashiwo* after pre-incubation of *H. akashiwo* cells in 0 ng/l (▨) and 20 ng/l (■) of B<sub>12</sub>. Vertical bars indicate standard deviations.

少なかったが、それ以降で顕著に増大し、定常期で最大となった。

これらの結果から得られた、培養液中に分泌された B<sub>12</sub> 結合物質の最大含量と培養時の B<sub>12</sub> 濃度との関係を Fig. 2 に示す。これから、細胞外へ分泌された B<sub>12</sub> 結合物質の最大含量は、17~34.7 ng B<sub>12</sub>/l の範囲であり、試験培養時の B<sub>12</sub> 濃度が高いほど多くなる傾向が見られた。また、分泌量は前培養時の B<sub>12</sub> 濃度によって異なり、いずれの試験培養 B<sub>12</sub> 濃度でも、20 ng/l で前培養した場合に比べて、B<sub>12</sub> 欠如で飢餓前培養した場合の方が明らかに多かった。

次に、B<sub>12</sub> 結合物質の一細胞あたりの分泌速度は Table 1 に示すとおり、プランクトンの増殖段階および前培養・試験培養の B<sub>12</sub> 濃度によって相当異なることがわかった。すなわち、B<sub>12</sub> 結合物質の分泌速度は指数増殖期の前期より、中期に大きく、指数増殖期全期間に亘って前培養を 20 ng/l で行った場合より飢餓前培養した場合に大きかった。さらに 20 ng/l で前培養した場合には試験培養時の B<sub>12</sub> 濃度の差によって分泌速度に大きな差違が認められなかったが、B<sub>12</sub> 欠如で前培養した場合は試験培養時の B<sub>12</sub> 濃度が低いほど分泌速度が顕著に増大した。

**H. akashiwo の細胞内 B<sub>12</sub> 化合物** *H. akashiwo* を B<sub>12</sub> 欠如の培地で飢餓培養後、これを種々の B<sub>12</sub> 濃度の試験培地で培養した。得られた細胞内の B<sub>12</sub> 結合物質および B<sub>12</sub> 含量と培地中の B<sub>12</sub> 濃度との関係を Table 2 に示す。これから、B<sub>12</sub> 結合物質含量は 3.1~15.5 × 10<sup>-3</sup> fg B<sub>12</sub>/cell (fg = 10<sup>-15</sup> g) の範囲であり、同一濃度の培養では指数増殖期の初期に高かった。一方、細胞内の B<sub>12</sub> 含量は 6.5~368 × 10<sup>-3</sup> fg/cell で、培地中の B<sub>12</sub> 濃

**Table 1.** Effects of B<sub>12</sub> concentration on the growth of *H. akashiwo* and their B<sub>12</sub> binder production

Growth phase	B <sub>12</sub> concentration in medium (ng/l)	Incubation time (day)	Specific growth rate (1/day)		B <sub>12</sub> binder production rate (fg B <sub>12</sub> /cell·day)	
			0 ng/l*	20 ng/l*	0 ng/l*	20 ng/l*
Early logarithmic	10	0-6	0.29	0.31	0.13	0.03
	20	0-6	0.32	0.32	0.06	0.03
	40	0-6	0.32	0.33	0.02	0.03
Middle logarithmic	2	0-6	0.14	0.17	0.21	0.14
	10	6-10	0.29	0.37	0.13	0.11
	20	6-10	0.21	0.31	0.13	0.12
Late logarithmic	40	6-10	0.17	0.28	0.01	0.05
	2	6-10	0.04	0.15	0.06	0.12
	10	10-16	0.06	0.12	0.06	0.01
	20	10-16	0.24	0.18	0.05	0.01
	40	10-16	0.22	0.23	0.06	0.02

\* Vitamin B<sub>12</sub> concentration in the pre-incubation medium.

**Table 2.** Contents of B<sub>12</sub> binder and total vitamin B<sub>12</sub> in the cells of *H. akashiwo*

Growth phase	B <sub>12</sub> binder ( $\times 10^{-3}$ fg B <sub>12</sub> /cell)				Total B <sub>12</sub> ( $\times 10^{-3}$ fg/cell)			
	2* <sup>1</sup>	10* <sup>1</sup>	20* <sup>1</sup>	40* <sup>1</sup>	2* <sup>1</sup>	10* <sup>1</sup>	20* <sup>1</sup>	40* <sup>1</sup>
Early logarithmic	—	15.5	9.5	10.4	—	127	162	368
Middle logarithmic	6.0* <sup>2</sup>	3.5	3.1	3.3	23.3	23	48	198
Late logarithmic	11.0	3.5	4.4	7.6	6.5	11	8.6	3.5

\*<sup>1</sup> Vitamin B<sub>12</sub> concentration in the pre-incubation medium.

\*<sup>2</sup> Early logarithmic growth phase is included.

**Table 3.** Production of vitamin B<sub>12</sub> binder by *H. akashiwo* cultured in different B<sub>12</sub> concentration

Growth phase	B <sub>12</sub> concentration in medium (ng/l)	Incubation time (day)	Total B <sub>12</sub> binder (ng B <sub>12</sub> /l)	B <sub>12</sub> binder sereted		B <sub>12</sub> binder in cells	
				(ng B <sub>12</sub> /l)	(%) <sup>*1</sup>	(ng B <sub>12</sub> /l)	(%) <sup>*1</sup>
Early logarithmic	10	6	4.4	4.2	96	0.2	4
	20	6	2.6	2.5	95	0.1	5
	40	6	0.6	0.5	84	0.1	16
Middle logarithmic	2	6	6.8	6.7	99	0.1	1
	10	10	15.6	15.5	99	0.1	1
	40	10	1.2	1.2	93	0.1	7
Late logarithmic	2	10	10.1	9.9	98	0.2	2
	10	16	30.7	30.5	99	0.2	1
	20	16	35.2	34.6	98	0.6	2
Stationary	40	16	23.4	22.6	97	0.8	3
	2	12	—	14.0	—	—	—
	10	20	—	33.2	—	—	—
	20	20	—	34.7	—	—	—
	40	20	—	34.6	—	—	—

\* Percentage of B<sub>12</sub> binder to total B<sub>12</sub> binder concentration.

度が高くなるほど細胞内の B<sub>12</sub> 保持量が多くなる傾向が見られた。また、細胞内の B<sub>12</sub> 含量は指数増殖期前期に最も高く、指数増殖期中・後期はこれより減少した。これら細胞内の B<sub>12</sub> 結合物質含量は B<sub>12</sub> 含量に比べて概して低かった。

これら細胞内 B<sub>12</sub> 結合物質含量を基に、本藻が細胞の内外に生産した B<sub>12</sub> 結合物質の総量とそれらに対する分泌量・細胞内含量の割合を Table 3 に示す。これから細胞内の B<sub>12</sub> 結合物質の全生産量に対する割合は 1~16% であり、20 および 40 ng/l の培養初期で細胞内に保持される割合が高くなったが、細胞外への分泌量に比べてごくわずかであり、生産された B<sub>12</sub> 結合物質の大部分は、細胞外に分泌されることが明らかになった。

B<sub>12</sub> 結合物質による赤潮プランクトンの増殖抑制 H. akashiwo が細胞外に分泌した B<sub>12</sub> 結合物質が、B<sub>12</sub> を必須に要求する赤潮プランクトン、H. akashiwo, G. mikimotoi および S. costatum の増殖に影響を与えるか否かを試験した。試験結果は Fig. 3 に示すとおり、いずれのプランクトンも H. akashiwo が生産した B<sub>12</sub> 結合物質によって増殖が抑制され、培養液への遊離態 B<sub>12</sub> の補強によって抑制が回復した。B<sub>12</sub> 結合物質を含まない対照試験から、H. akashiwo, G. mikimotoi および S. costatum は、その増殖量が飽和するためには、それぞれ約 20, 5 および 20 ng/l 程度の遊離態 B<sub>12</sub> を必要とする と算定されるが、H. akashiwo の培養濾液を用いた場合、これらプランクトンの増殖量を飽和させるにはそれぞれ約 150 ng/l, 20 ng/l および 60 ng/l の遊離態 B<sub>12</sub> の補強を要することがわかった。これらの結果から、H. akashiwo が生産した B<sub>12</sub> 結合物質は自分自身を含めて、B<sub>12</sub> 要求種の増殖を抑制し、その抑制効果に種特異性が認められず、増殖抑制は B<sub>12</sub> 結合物質による遊離態 B<sub>12</sub> の不活性化によるものと推察された。

B<sub>12</sub> 結合物質の B<sub>12</sub> 結合能および結合態 B<sub>12</sub> の安定性 H. akashiwo が生産した B<sub>12</sub> 結合物質の B<sub>12</sub> 結合能、およびこれらと B<sub>12</sub> が結合した結合態 B<sub>12</sub> の安定性に及ぼす温度、pH および紫外線の影響を試験した。その結果は Fig. 4 に示す。これに見るとおり、B<sub>12</sub> 結合物質の B<sub>12</sub> 結合能は pH 8~9、水温 4~50°C で変化しなかったが、pH 4~6 および 10 以上、水温 60°C 以上で、いずれも B<sub>12</sub> 結合能は約 50% 以上消失した。一方、結合態 B<sub>12</sub> は pH 8~10、水温 50°C 以下ではほとんど分解されなかったが、pH 4~6、水温 70°C 以上で 80% 以上分解されることがわかった。さらに B<sub>12</sub> 結合能および結合態 B<sub>12</sub> は共に紫外線に対して不安定であり、8 時間の紫外線照射によって約 80% 消失または分解した。

B<sub>12</sub> 結合物質の解離定数 H. akashiwo が生産した B<sub>12</sub> 結合物質と遊離態 B<sub>12</sub> に結合した結合態 B<sub>12</sub> の解離

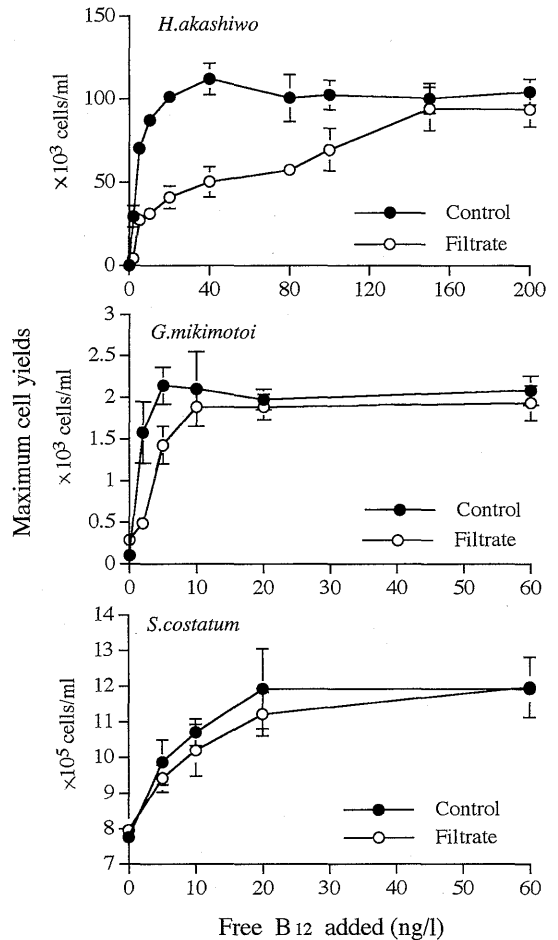


Fig. 3. Growth inhibition of three species of phytoplankton by B<sub>12</sub> binder secreted by H. akashiwo and their growth recovery after the addition of free B<sub>12</sub>. Vertical bars indicate standard deviations.

●—● Control, ○—○ Filtrate

曲線を Fig. 5 に示す。これから B<sub>12</sub> 結合物質の解離定数は 52.8 ng/l (結合定数  $2.57 \times 10^{10} M^{-1}$ ) と算定され、これに相当する遊離態 B<sub>12</sub> 濃度では全 B<sub>12</sub> 結合物質量の半量が結合態 B<sub>12</sub> (残りは遊離型の B<sub>12</sub> 結合物質) として存在することを示している。

### 考 察

植物プランクトンが生産する B<sub>12</sub> 結合物質の生理学的役割について、B<sub>12</sub> 結合物質は B<sub>12</sub> の摂取に関与する糖蛋白質であり、<sup>7,8)</sup> 細胞外へ分泌される B<sub>12</sub> 結合物質は、これが過剰生産されたものと推察されている。<sup>9)</sup> 本実験の結果によれば、H. akashiwo による B<sub>12</sub> 摂取は指数増殖期前期に集中して起こり、これと対応してその後の指

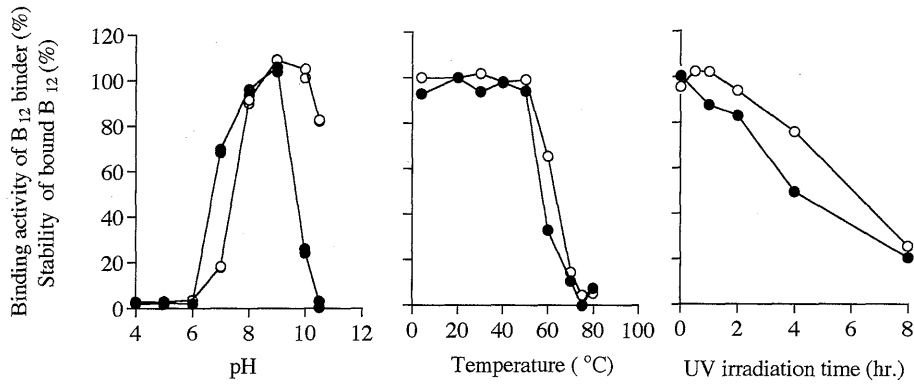


Fig. 4. Effect of pH, temperature and time of ultraviolet irradiation on the binding activity of B<sub>12</sub> binder and the stability of bound B<sub>12</sub> secreted by *H. akashiwo*.

—●— Binding activity of B<sub>12</sub> binder, —○— Stability of bound B<sub>12</sub>

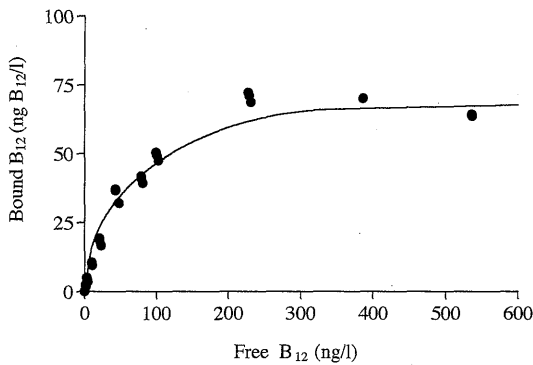


Fig. 5. Dissociation curve of B<sub>12</sub> binder secreted by *H. akashiwo*.

( $K_d=52.8$  ng/l,  $B_{max}=72.1$  ng B<sub>12</sub>/l)

数増殖期中期に B<sub>12</sub> 結合物質の細胞外への分泌速度が最も大きくなった。一方、細胞内の B<sub>12</sub> 結合物質は指数増殖期の前期に多く、B<sub>12</sub> 欠乏によってその含有量が增大したが、これは B<sub>12</sub> 欠乏時にも B<sub>12</sub> 摂取を維持しようとする機構の一つと考えられる。

本研究で得られた *H. akashiwo* の B<sub>12</sub> 結合物質の細胞外分泌速度は 0.01~0.21 fg B<sub>12</sub>/cell/day であった。これを他の植物プランクトンの分泌速度と比較すると、海産植物プランクトン *Pavlova lutheri* では、12.5 f M/10<sup>6</sup> cells·day (0.017 fg B<sub>12</sub>/cell·day に相当)<sup>2)</sup> と報告され、*H. akashiwo* の場合とほぼ一致している。一方、*H. akashiwo* は定常期までに 14~34.7 ng B<sub>12</sub>/l の B<sub>12</sub> 結合物質を細胞外へ分泌したが (Table 3)、この分泌量は淡水産植物プランクトン *E. gracilis* の 0.18 pM/ml (244

ng B<sub>12</sub>/l に相当)<sup>10)</sup> よりかなり少ない。また、Davies and Leftley<sup>2)</sup>によれば、海産種 *Mantoniella squamata*, *Dunaliella primolecta*, *Phaeodactylum tricornutum* および *P. lutheri* の B<sub>12</sub> 結合物質の細胞外分泌量はそれぞれ 22.9~44.8, 76.6~92.8, 39~135 および 32.3~320 ng B<sub>12</sub>/l である。<sup>2)</sup> 分泌量測定時の植物プランクトンの培養期間にそれぞれ差があり、厳密な比較は困難であるが、これから、*H. akashiwo* の分泌量は *M. squamata* とほぼ同等であり、他の 3 種に比べてやや少ない。さらに、B<sub>12</sub> 要求種の *S. costatum* および *G. mikimotoi* では生産した結合物質の殆どを細胞内に保持することが知られている。<sup>3)</sup> これらのことから、B<sub>12</sub> 結合物質の細胞外への分泌量は種によって相当異なることがわかった。

本研究の結果、*H. akashiwo* は生産した B<sub>12</sub> 結合物質の大部分を細胞外へ分泌し、その結合物質は自分自身および B<sub>12</sub> を必須に要求するプランクトン *S. costatum* および *G. mikimotoi* の増殖を抑制し、3 種の増殖に対する抑制効果に種特異性は認められなかった。また、Pintner and Altmeyer は 16 種の海産植物プランクトンが生産した B<sub>12</sub> 結合物質は 7 種の試験藻の増殖を阻害し、異なる種が生産した B<sub>12</sub> 結合物質の増殖抑制効果に、種特異性が認められなかったことを報告している。<sup>1)</sup> これらのことから、植物プランクトンが生産する B<sub>12</sub> 結合物質による増殖抑制効果には、種特異性がないものと推察される。

*H. akashiwo* が細胞外に分泌した B<sub>12</sub> 結合物質の解離定数 52.8 ng/l は、他の海産プランクトンで得られている解離定数、0.94~45.3 pM (1.2~61 ng/l)<sup>2)</sup> の範囲にあり、本藻の B<sub>12</sub> 結合物質も他種由来のそれと同様、

<sup>2)</sup> 10<sup>6</sup> cells あたりで表示されている分泌量を、測定時の増殖密度 (cells/ml) から換算した。

<sup>3)</sup> 張敬国・西島敬隆・深見公雄：平成 7 年日本水産学会春季大会講演要旨集，1995，p. 324。

B<sub>12</sub> と高い親和性を有することがわかった。さらに、本藻の B<sub>12</sub> 結合物質は通常の海水の水温・pH 域では安定であるものの、太陽光線に相当する紫外線によって分解され、海水の表面付近ではその影響は無視できないと思われる。

*H. akashiwo* は B<sub>12</sub> の豊富な環境では、10<sup>5</sup> cells/ml 程度まで増殖する過程で約23~35 ng B<sub>12</sub>/l の B<sub>12</sub> 結合物質を細胞外へ分泌する (Table 3)。多くの B<sub>12</sub> 要求種の B<sub>12</sub> 要求量は 10~20 ng/l とされる<sup>11)</sup>ので、現場海水中に 10 ng/l の遊離態 B<sub>12</sub> が存在する場合、*H. akashiwo* の最大 B<sub>12</sub> 結合物質分泌量 (35 ng/l)、およびその解離定数を用いて計算すると、約 37% の B<sub>12</sub> が不活性化されると算定される。したがって、本藻が大増殖した後は、遊離態 B<sub>12</sub> が有意に減少し、その結果 B<sub>12</sub> を必須に要求するプランクトンの増殖が抑制されることが考えられる。

富栄養化した内湾域では、全 B<sub>12</sub> のうちかなりの部分が微生物が直接利用できない結合態として存在することが知られている。<sup>3)</sup>本研究の結果は、遊離態 B<sub>12</sub> を不活性化する B<sub>12</sub> 結合物質の起源として植物プランクトンが重要な位置を占めることを示し、これら B<sub>12</sub> 結合物質は自然海水中の B<sub>12</sub> を不活性化し、B<sub>12</sub> を要求する植物プランクトンの増殖を抑制するとともに、B<sub>12</sub> 要求種と非要求種の種間競争にも影響を与えているものと推察される。

## 参考文献

- 1) I. J. Pintner and V. L. Altmeyer: Vitamin B<sub>12</sub>-binder and other algal inhibitors. *J. Phycol.*, **15**, 391-398 (1979).
- 2) A. G. Davies and J. W. Leftley: Vitamin B<sub>12</sub> binding by microalgal ectocrines: dissociation constant of the vitamin-binder complex determined using an ultrafiltration technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **21**, 267-273 (1985).
- 3) 西島敏隆・張敬国・深見公雄: 浦ノ内湾海水中におけるビタミン B<sub>12</sub> 結合物質の分布と季節的消長. 日水誌, **61**, 762-768 (1995).
- 4) A. F. Carlucci and P. M. Bowes: Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *J. Phycol.*, **6**, 393-400 (1970).
- 5) 西島敏隆: 沿岸海域における B 群ビタミンの動態に関する研究—赤潮発生に関連して. 高知大学農学部紀要, **43**, 1-151 (1985).
- 6) 高河原 勇: 活性測定法, 「蛋白質・酵素の基礎実験法」(堀尾武一ら編) 第 1 版, 南江堂, 東京, 1981, pp 387-388.
- 7) K. W. Daisley: The occurrence and nature of *Euglena gracilis* proteins that bind vitamin B<sub>12</sub>. *Int. J. Biochem.*, **1**, 561-574 (1970).
- 8) 伊勢川裕二: ビタミン B<sub>12</sub>, 「ユーグレナ 生理と生化学」(北岡正三朗編), 第 1 版, 学会出版センター, 東京, 1989, pp 138-144.
- 9) L. Provasoli and A. F. Carlucci: Vitamins and growth regulators. in "Algal physiology and biochemistry" (ed. by W. D. P. Stewart), Oxford, London, 1974, pp 741-787.
- 10) F. Watanabe, Y. Nakano, H. Ochi, and S. Kitaoka: Purification, some protein and possible physiological role of an extracellular cobalamin binding protein from *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1385-1389 (1988).
- 11) 西島敏隆: 赤潮発生とビタミン B<sub>12</sub>. バイオサイエンスとインダストリー, **47**, 389-394 (1989).