

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

張 敬国, 西島敏隆, 深見公雄

(1995年10月23日受付)

Production of Vitamin B₁₂ Binder by *Heterosigma akashiwo* and Some of Its Properties

Jingguo Zhang,^{*1} Toshitaka Nishijima,^{*1} and Kimio Fukami^{*1}

The influence of vitamin B₁₂ concentration in the medium on the production of vitamin B₁₂ binder by *H. akashiwo* was evaluated, and some of the chemical properties of the B₁₂ binder and its effect on the growth of B₁₂-requiring phytoplankton were determined.

H. akashiwo produced B₁₂ binder and most of it was secreted into the culture medium. The amount of B₁₂ binder secreted was dependent on the B₁₂ concentration in the media for both pre- and test-cultures; the lower B₁₂ concentration increased the secretion of B₁₂ binder. The production rate of B₁₂ binder was highest during the middle exponential growth phase when the alga was incubated at B₁₂ concentrations of 2~20 ng/l; their production rates ranged from 0.11 to 0.21 fg B₁₂/cell/day. The dissociation constant of bound B₁₂, the complex of free B₁₂ and B₁₂ binder secreted by *H. akashiwo*, was 52.8 ng/l (association constant = $2.57 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). Binding activity of B₁₂ binder was stable at pH 8~9 and temperatures of 4~50°C, but labile under ultraviolet irradiation. The B₁₂ binder inhibited the growth of B₁₂-requiring phytoplankton including *H. akashiwo* itself and the effect of B₁₂ binder was found to be non-specific.

The present study suggests that the B₁₂ binder secreted by *H. akashiwo* could inhibit the growth of B₁₂-requiring phytoplankton after blooms of *H. akashiwo* in natural seawater.

キーワード: *Heterosigma akashiwo*, ビタミン B₁₂, ビタミン B₁₂ 結合物質, 結合態 B₁₂, 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 B₁₂ (以下 B₁₂ と略す) を必須に要求し、海水中の遊離態 B₁₂ 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 B₁₂ と特異的に結合し、これを不活性化して B₁₂ 要求性微生物による利用を妨げる物質、ビタミン B₁₂ 結合物質 (vitamin B₁₂ 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^{1,2)} こと、さらに内湾の海水中には溶存態全 B₁₂ のうち、相当量が不活性な結合態 B₁₂ として存在することが明らかにされた。³⁾ したがって、海水中の B₁₂ 結合物質は、B₁₂ の存在形態を制御し赤潮原因種を含む B₁₂ 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。⁴⁾

本研究では海水中の B₁₂ 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、後者は南海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 ASP₂NTA を用いて、水温 20°C、照度 64~96 μE/m²·sec, 14:10 の明暗サイクルで行った。

全 B₁₂、遊離態 B₁₂ および結合態 B₁₂ の測定 試料水に過剰の遊離態 B₁₂ を添加して 20°C で 1 時間培養し、存在する B₁₂ 結合物質を全て結合態 B₁₂ とした後、蛋白質被覆活性炭 (PCC) を加えて遊離態 B₁₂ を吸着除去した。残存した結合態 B₁₂ を加熱分解して B₁₂ を遊離さ

*1 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。³⁾ 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。⁵⁾

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 μ (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}Co) を使用した (比活性 = 11.49 GBq/ μM)。

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²⁾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⁶⁾。

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

B_{12} 結合物質の結合能および結合態 B_{12} の安定性に及ぼす温度, 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 (要素, 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_2NTA 培地) を加えて, 栄養物質濃度が ASP_2NTA の組成を下回らないようにした。また, 対照試験 (Control) には ASP_2NTA 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

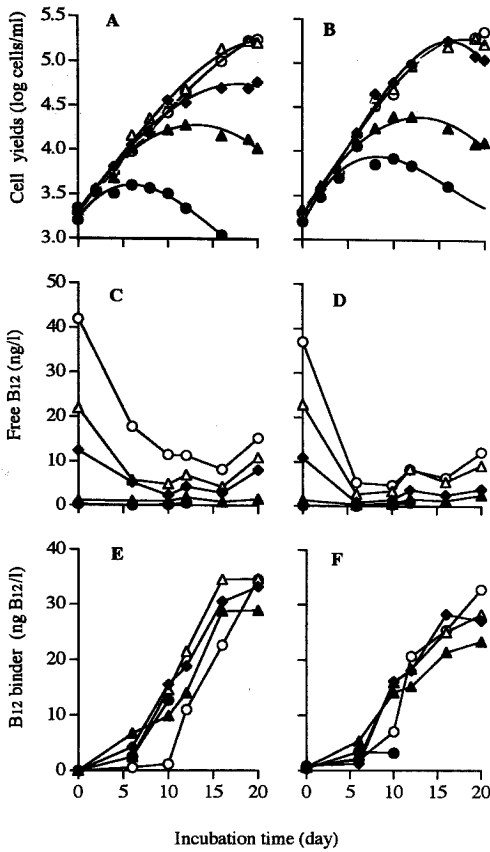


Fig. 1. Influence of B₁₂ concentration in culture medium on the growth of *H. akashiwo* (A-B), their utilization of free B₁₂ (C-D) and secretion of B₁₂ binder (E-F), comparing the effect of pre-incubation of cells at 0 ng/l of B₁₂ starvation (A, C and E) and at 20 ng/l of B₁₂ (B, D and F).

●— 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 B₁₂ 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 B₁₂ 量は細胞密度の増加に対応して減少し、B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 濃度がわずかに増加する傾向がみられ、死細胞からの B₁₂ 溶出が示唆された。一方、培地中に分泌・蓄積された B₁₂ 結合物質量は *H. akashiwo* の増殖とともに増加し、活発な B₁₂ 摂取が見られた培養開始 6 日目までは比較的

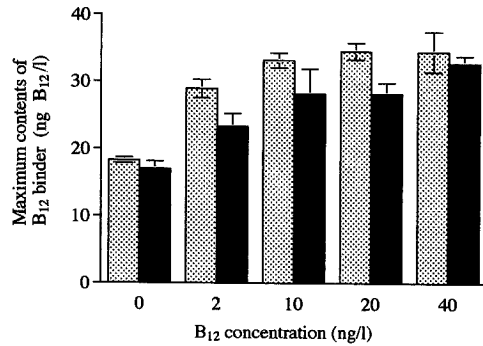


Fig. 2. Influence of B₁₂ concentration on the secretion of B₁₂ binder by *H. akashiwo* after pre-incubation of *H. akashiwo* cells in 0 ng/l (▨) and 20 ng/l (■) of B₁₂. Vertical bars indicate standard deviations.

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 B₁₂ 結合物質の最大含量と培養時の B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質の最大含量は、17~34.7 ng B₁₂/l の範囲であり、試験培養時の B₁₂ 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 B₁₂ 濃度によって異なり、いずれの試験培養 B₁₂ 濃度でも、20 ng/l で前培養した場合に比べて、B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ 濃度によって相当異なることがわかった。すなわち、B₁₂ 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 B₁₂ 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、B₁₂ 欠如で前培養した場合は試験培養時の B₁₂ 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 B₁₂ 化合物** *H. akashiwo* を B₁₂ 欠如の培地で飢餓培養後、これを種々の B₁₂ 濃度の試験培地で培養した。得られた細胞内の B₁₂ 結合物質および B₁₂ 含量と培地中の B₁₂ 濃度との関係を Table 2 に示す。これから、B₁₂ 結合物質含量は 3.1~15.5 × 10⁻³ fg B₁₂/cell (fg = 10⁻¹⁵ 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 B₁₂ 含量は 6.5~368 × 10⁻³ fg/cell で、培地中の B₁₂ 濃

Table 1. Effects of B₁₂ concentration on the growth of *H. akashiwo* and their B₁₂ binder production

Growth phase	B ₁₂ concentration in medium (ng/l)	Incubation time (day)	Specific growth rate (1/day)		B ₁₂ binder production rate (fg B ₁₂ /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 B₁₂ concentration in the pre-incubation medium.**Table 2.** Contents of B₁₂ binder and total vitamin B₁₂ in the cells of *H. akashiwo*

Growth phase	B ₁₂ binder ($\times 10^{-3}$ fg B ₁₂ /cell)				Total B ₁₂ ($\times 10^{-3}$ fg/cell)			
	2* ¹	10* ¹	20* ¹	40* ¹	2* ¹	10* ¹	20* ¹	40* ¹
Early logarithmic	—	15.5	9.5	10.4	—	127	162	368
Middle logarithmic	6.0* ²	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

*¹ Vitamin B₁₂ concentration in the pre-incubation medium.*² Early logarithmic growth phase is included.**Table 3.** Production of vitamin B₁₂ binder by *H. akashiwo* cultured in different B₁₂ concentration

Growth phase	B ₁₂ concentration in medium (ng/l)	Incubation time (day)	Total B ₁₂ binder (ng B ₁₂ /l)	B ₁₂ binder sereted		B ₁₂ binder in cells	
				(ng B ₁₂ /l)	(%) * ¹	(ng B ₁₂ /l)	(%) * ¹
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
	40	16	23.4	22.6	97	0.8	3
Stationary	2	12	—	14.0	—	—	—
	10	20	—	33.2	—	—	—
	20	20	—	34.7	—	—	—
	40	20	—	34.6	—	—	—

* Percentage of B₁₂ binder to total B₁₂ binder concentration.

度が高くなるほど細胞内の B₁₂ 保持量が多くなる傾向が見られた。また、細胞内の B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質含量は B₁₂ 含量に比べて概して低かった。

これら細胞内 B₁₂ 結合物質含量を基に、本藻が細胞の内外に生産した B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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。

B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質が、B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質によって増殖が抑制され、培養液への遊離態 B₁₂ の補強によって抑制が回復した。B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質は自分自身を含めて、B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質による遊離態 B₁₂ の不活性化によるものと推察された。

B₁₂ 結合物質の B₁₂ 結合能および結合態 B₁₂ の安定性 *H. akashiwo* が生産した B₁₂ 結合物質の B₁₂ 結合能、およびこれらと B₁₂ が結合した結合態 B₁₂ 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、B₁₂ 結合物質の B₁₂ 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 B₁₂ 結合能は約 50% 以上消失した。一方、結合態 B₁₂ 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 B₁₂ 結合能および結合態 B₁₂ 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。

B₁₂ 結合物質の解離定数 *H. akashiwo* が生産した B₁₂ 結合物質と遊離態 B₁₂ に結合した結合態 B₁₂ の解離

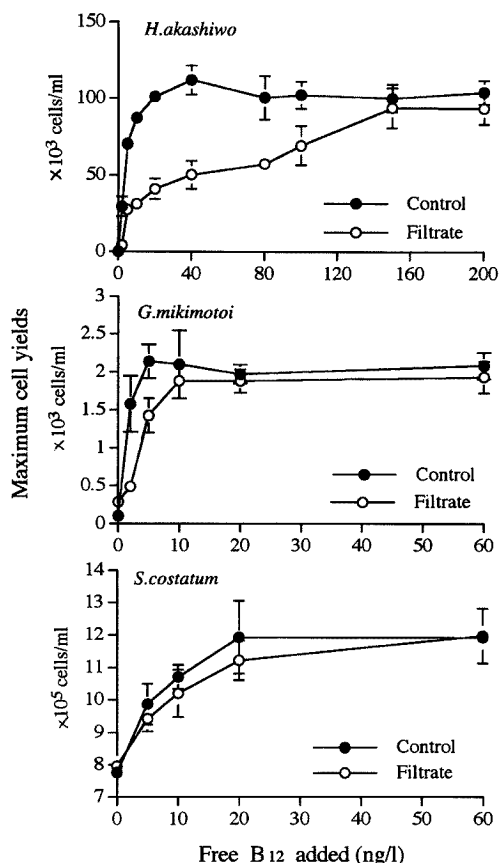


Fig. 3. Growth inhibition of three species of phytoplankton by B₁₂ binder secreted by *H. akashiwo* and their growth recovery after the addition of free B₁₂. Vertical bars indicate standard deviations.

●— Control, ○— Filtrate

曲線を Fig. 5 に示す。これから B₁₂ 結合物質の解離定数は 52.8 ng/l (結合定数 $2.57 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) と算定され、これに相当する遊離態 B₁₂ 濃度では全 B₁₂ 結合物質量の半量が結合態 B₁₂ (残りは遊離型の B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質の生理学的役割について、B₁₂ 結合物質は B₁₂ の摂取に関与する糖蛋白質であり、^{7,8)} 細胞外へ分泌される B₁₂ 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。⁹⁾ 本実験の結果によれば、*H. akashiwo* による B₁₂ 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

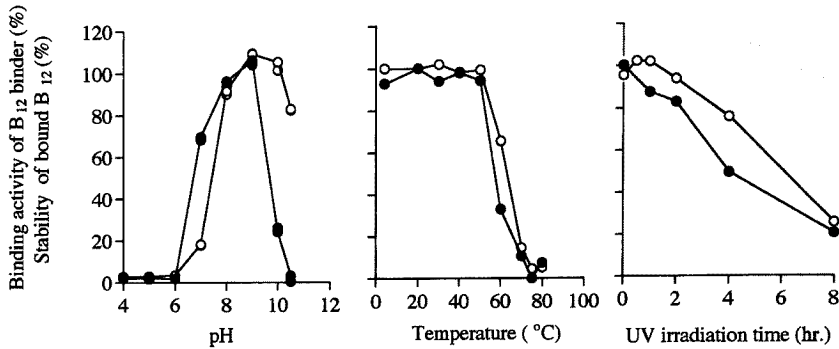


Fig. 4. Effect of pH, temperature and time of ultraviolet irradiation on the binding activity of B₁₂ binder and the stability of bound B₁₂ secreted by *H. akashiwo*.

●— Binding activity of B₁₂ binder, ○— Stability of bound B₁₂

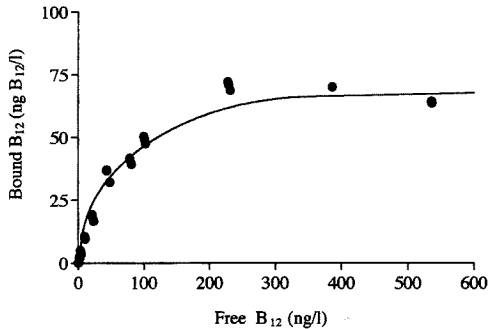


Fig. 5. Dissociation curve of B₁₂ binder secreted by *H. akashiwo*.

($K_d=52.8$ ng/l, $B_{max}=72.1$ ng B₁₂/l)

数増殖期中期に B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質は指数増殖期の前期に多く、B₁₂ 欠乏によってその含有量が増大したが、これは B₁₂ 欠乏時にも B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質の細胞外分泌速度は 0.01~0.21 fg B₁₂/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 fM/10⁶ cells·day (0.017 fg B₁₂/cell·day に相当)²⁾ と報告され、*H. akashiwo* の場合とはほぼ一致している。一方、*H. akashiwo* は定常期までに 14~34.7 ng B₁₂/l の B₁₂ 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 B₁₂/l に相当)¹⁰⁾ よりかなり少ない。また、Davies and Leftley²⁾ によれば、海産種 *Mantoniella squamata*, *Dunaliella primolecta*, *Phaeodactylum tricornutum* および *P. lutheri* の B₁₂ 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 B₁₂/l である。²⁾ 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、B₁₂ 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。³⁾ これらのことから、B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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。¹⁾ これらのことから、植物プランクトンが生産する B₁₂ 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 B₁₂ 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)²⁾ の範囲にあり、本藻の B₁₂ 結合物質も他種由来のそれと同様、

²⁾ 10⁶ 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。

³⁾ 張敏国・西島敏隆・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。

B₁₂ と高い親和性を有することがわかった。さらに、本藻の B₁₂ 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 B₁₂ の豊富な環境では、10⁵ cells/ml 程度まで増殖する過程で約 23~35 ng B₁₂/l の B₁₂ 結合物質を細胞外へ分泌する (Table 3)。多くの B₁₂ 要求種の B₁₂ 要求量は 10~20 ng/l とされる¹¹⁾ので、現場海水中に 10 ng/l の遊離態 B₁₂ が存在する場合、*H. akashiwo* の最大 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ が有意に減少し、その結果 B₁₂ 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 B₁₂ 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。³⁾本研究の結果は、遊離態 B₁₂ を不活性化する B₁₂ 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 B₁₂ 結合物質は自然海水中の B₁₂ を不活性化し、B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂-binder and other algal inhibitors. *J. Phycol.*, **15**, 391-398 (1979).
- 2) A. G. Davies and J. W. Leftley: Vitamin B₁₂ 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: 浦ノ内湾海中におけるビタミン B₁₂ 結合物質の分布と季節的消長. 日本誌, **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 B₁₂. *Int. J. Biochem.*, **1**, 561-574 (1970).
- 8) 伊勢川裕二: ビタミン B₁₂, 「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 B₁₂. バイオサイエンスとインダストリー, **47**, 389-394 (1989).