

9220 好塩藻による大気中CO<sub>2</sub>濃度低減化システムの開発とカルボニックアンヒドラーゼの耐塩性特性の解析

助成研究者:白岩 善博(新潟大学 理学部)

【研究目的】 温室効果ガスによる地球温暖化が問題となり、その元凶の一つとされる大気中CO<sub>2</sub>の濃度増加を防止する方策の検討が求められている。藻類の石灰化が高CO<sub>2</sub>濃度環境であった太古において大気中のCO<sub>2</sub>をCaCO<sub>3</sub>として固定し、その濃度を著しく低減させたことを考えると、それら石灰藻による生物学的なCO<sub>2</sub>の固定促進は現在でも有力な方法の一つであると思われる。しかし、現在の大気中のCO<sub>2</sub>濃度レベルにおいては、海産の微細石灰藻類である円石藻や海産の大型藻類などの石灰化機構を利用してその濃度の低減化を目指す場合、解明すべき基礎的な生物現象や解決すべき多くの問題点が残されている。

本研究では、実験室レベルではあるが、その解決に不可欠な効率的な生物学的CO<sub>2</sub>固定法の開発のための基礎的知見の集積を目指している。特に、CO<sub>2</sub>固定を行なう円石藻の光合成および生育の生理学的特性および微細藻類のCO<sub>2</sub>固定促進に重要な機能を持つ酵素カルボニックアンヒドラーゼ(CA)の生理生化学的特性に関する研究を広範囲な塩濃度条件下で生育できるドナリエラを用いて行った。これは、CAを有しないか、低い活性しか有しない円石藻にCAを導入しその機能の向上を目指す場合、Cl<sup>-</sup>により阻害される通常のCAでは利用できないと思われることによるものである。

## 【研究の成果】

1 円石藻(ハプト植物門)の生育および光合成の特性に関して、その至適pHは8-8.5、至適温度は25℃であった。また、閉鎖系の培養系における生育は、明暗サイクル(明:暗=16:8h)の方が連続光照射条件に比べ有利であった。これは円石藻のO<sub>2</sub>に対する感受性が非常に高いことに起因することが明らかとなった。

2 *Dunaliella tertiolecta*の細胞外CAの耐塩性特性の解析に関して、

1) *D. tertiolecta*の細胞外CAは0.5M NaClにより促進され、NaNO<sub>3</sub>により阻害された。これはCl<sup>-</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の効果によるものであった。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>には影響されず、Ca<sup>++</sup>には促進効果が見られた。一方、細胞内CAおよび淡水産藻類のCAはCl<sup>-</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>により強く阻害された。

2) *D. tertiolecta*の細胞外CAの耐塩性は、培養時の塩濃度により変化した。

3) 高い塩濃度(5-18%)下でも生育できる*D. salina*, *D. viridis* および *D. parva*では細胞内CAがmajorで高い活性を有し、細胞外CAはminorであった。

4) Cl<sup>-</sup>による活性化は、酵素分子の構造変化による可能性が示唆された。



9220 好塩藻による大気中CO<sub>2</sub>濃度低減化システムの開発とカルボニックアンヒドラーゼの耐塩性特性の解析

助成研究者：白岩 善博(新潟大学 理学部)

〔研究目的〕 温室効果ガスによる地球温暖化が問題となり、その元凶の一つとされる大気中CO<sub>2</sub>の濃度増加を防止する方策の検討が求められている。藻類の石灰化が高CO<sub>2</sub>濃度環境であった太古において大気中のCO<sub>2</sub>をCaCO<sub>3</sub>として固定し、その濃度を著しく低減させたことを考えると、それら石灰藻による生物学的なCO<sub>2</sub>の固定促進は現在でも有力な方法の一つであると思われる。しかしながら、現在の大気中のCO<sub>2</sub>濃度レベルにおいては、海産の微細石灰藻類である円石藻や海産の大型藻類などの石灰化機構を利用しその濃度の低減化を目指す場合、解明すべき基礎的な生物現象や解決すべき多くの問題点が残されている。

本研究では、実験室レベルではあるが、その解決に不可欠な効率的な生物学的CO<sub>2</sub>固定法の開発のための基礎的知見の集積を目指している。特に、CO<sub>2</sub>固定を行なう円石藻の光合成および生育の生理学的特性および微細藻類のCO<sub>2</sub>固定促進に重要な機能を持つ酵素カルボニックアンヒドラーゼ(CA)の生理生化学的特性に関する研究を広範囲な塩濃度条件下で生育できる海産性単細胞緑藻ドナリエラを用いて行った。これは、CAを有しないか、低い活性しか有しない円石藻にCAを導入してその機能の向上を目指す場合、Cl<sup>-</sup>により阻害される通常のCAでは利用できないと思われることによるものである。

## 〔研究方法〕

1 光合成によりCO<sub>2</sub>固定を行ないCaCO<sub>3</sub>生成を行わせる藻類として、3種の海産性単細胞石灰藻である円石藻(ハプト植物門)、*Emiliania huxleyii*, *Gephyrocapsa oceania*および*Umbilicosphaera var. foliosa*を用いた。生育の至適条件の決定は、光照射下における藻細胞容積およびクロロフィル量の経時変化を基に生育曲線を作成し、定法により生育速度定数を求め、各条件での値を比較し決定した。光合成の至適条件は、クラーク型酸素電極を用いて光合成酸素発生速度を測定し、その値を比較して決定した。

2 酵素カルボニックアンヒドラーゼ(CA)の耐塩性特性の研究のために、4種の耐塩藻*Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella parva*, *Dunaliella salina*および*Dunaliella viridis*を用いた。藻種および実験目的に応じて培地中に含むNaCl濃度を変化させて培養した。まず、3%CO<sub>2</sub>を富化した空気中で前培養した後、更に通常の空気中で48時間培養し収穫した。10 mMのTris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> buffer (pH 8.3)に懸濁し、ソニケーター(本研究での申請設備)で細胞を破壊した。細胞表面に局在する細胞外CA活性の測定には破碎

前の細胞懸濁液を用い、全活性は破碎液を用いて測定した。そして、全活性から細胞外の活性を差し引いたものを細胞内CA活性とした。

## [研究結果]

### 1. 円石藻の生育および光合成特性

#### 1.1 円石藻の培養系

円石藻の代表的な種である *Emiliania* の通気培養系を確立した (data not shown)。その生育曲線から求めた対数増殖期の生育速度定数 ( $Kg/day=0.38$ ) は、静置培養系のそれ ( $0.48$ ) と比較すると20%程低い程度であったが、数倍長い生育の誘導期 (induction phase for growth) を示すことを明らかにした。大量培養系の確立、種々の培養条件の調節および比較的長い対数増殖期の維持には通気培養系が有利であるが、円石藻の基本的な生育特性を調べるには、より簡便で早い対数増殖期を得ることのできる静置培養系を用いることとした。

#### 1.2 生育の至適条件

生育の至適pHは8-8.5、至適温度は24-25℃であった。また、通気性のシリコンゴム栓を通して拡散のみにより外部との気相交換が可能な半ば閉鎖された培養系 (100ml用の三角コルベン) における生育は、明暗サイクル (明:暗=16:8h) の方が連続光照射条件に比べ有利であった (Table-1)。その1明暗サイクルにおける培養液中の酸素濃度の変化を調べると、最も高くなる明期の1時期で気相濃度に換算して35%  $O_2$  と平衡状態となる程の濃度にまで上昇することが明らかとなった (data not shown)。また、暗期には呼吸作用により酸素濃度は低下した。この酸素濃度の日変化は増殖が見られる場合に継続して観察された。

光合成特性を調べた結果、この変化は円石藻の  $O_2$  に対する感受性が非常に高いことに起因することを明らかにした (Fig.-1)。

#### 1.3 円石藻の光合成特性

光合成の至適pHは8.0、至適温度は25℃であり、生育のそれと同様であった (Table-1)。特徴的なことは、通常の空気レベルの酸素濃度において、酸素濃度0%条件と比較して61%も光合成が阻害され、35%  $O_2$  以上では完全に光合成が阻害されることである (Fig.-1)。Fig.-1に示すように、他の単細胞緑藻と比較するとその効果が非常に顕著であることが明らかとなった。

### 2. ドナリエラのカルボニックアンヒドラーゼ (CA) の特性

#### 2.1 種々のドナリエラのCA

数種の *Dunaliella* のうち *D. tertiolecta* 以外の *D. salina*, *D. viridis* および *D. parva* は細胞内CAがmajorで非常に高い活性を有するが、細胞外CAはminorであった

(Table-2)。また、高い塩濃度で生育する種ほど高いCA活性を有していたが、その違いは細胞内CA活性によるものであり、*D. parva*を除けばほぼ同じ細胞内CA活性を有することが明らかとなった。更に、細胞外CAはNaClにより殆ど影響を受けないかむしろ数倍程度促進されたのに対し、*D. tertiolecta*以外の細胞内CAは著しく阻害された(Table-2)。これらの結果は、Fig.-2においてより顕著に示されている。

## 2.2 *D. tertiolecta*の細胞外CA活性の塩耐性特性の解析

### 2.2.1 種々の塩濃度の影響

*D. tertiolecta*の細胞外CA活性は酵素活性測定時に加えられた3%NaClによって3倍程度促進された(Table-2, Fig.-2)。また、培養時のNaCl濃度を上昇させた場合、最終的に得られる酵素活性が増大した(data not shown)。これが、合成される酵素分子の量的変化によるものか、質的变化によるものかは不明である。

0.5M NaCl濃度で培養した*D. tertiolecta*の細胞外CAは同濃度のNaClにより促進され、 $\text{NaNO}_3$ により阻害された。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 等の陽イオンには影響されなかったため、 $\text{Cl}^-$ および $\text{NO}_3^-$ による影響であることが明らかとなった(Table-3)。但し、 $\text{Ca}^{++}$ には促進効果が見られた。

*D. tertiolecta*および*D. viridis*共に細胞内CAは淡水産藻類のCA(data not shown)と同様に $\text{Cl}^-$ および $\text{NO}_3^-$ により強く阻害された(Table-3)。

### 2.2.2 $\text{Cl}^-$ による活性化機構の解析

*D. tertiolecta*の細胞外CA活性は、CA阻害剤アセタゾルアミド(AZA)およびエトキシゾルアミド(EZA)の濃度が低濃度の場合には $\text{Cl}^-$ によって活性化されたが、高濃度の場合にはむしろ阻害された(Fig.-4, Fig.-5)。

## [考察]

### 1 円石藻の生育および光合成特性

いずれの種においても、数種の単細胞緑藻に比べて光合成の酸素感受性が高く、21% $\text{O}_2$ 濃度(通常の空気条件)下では0%濃度下でのそれと比較して60-80%の光合成が阻害され、30-35% $\text{O}_2$ 濃度下では光合成が完全に阻害された。これは、これら円石藻が大量に繁茂した中生代白亜期の $\text{CO}_2/\text{O}_2$ 濃度比が現在よりもかなり大きく、その条件に適応した光合成 $\text{CO}_2$ 固定系を現在も有していることを意味するものと考えられる。

本研究により得られた結果より、円石藻の培養に必要な基礎的知見を得ることができた(Table-1)が、特に、高い光合成活性を得、それに基づき高い生育活性を得るためには酸素濃度のコントロールが重要であることが明らかとなった。

### 2 ドナリエラCAの耐塩性特性

ドナリエラのCAの局在性および塩に対する感受性には種特異性があり、また同一種内

においてもその局在部位により酵素の塩感受性に違いのあることが明らかとなった。これまで、CAに関する研究は動物、高等植物および淡水性の藻類を中心に行われており、 $Cl^-$ はむしろ阻害効果を持つことが示されてきた。今回、ドナリエラのCAに対する種類の塩の影響を明らかにしたことにより、その酵素分子が従来知られていたものと異なる可能性が示された。この原因を明らかにすることは、藻類の光合成の研究に重要な知見を提供すると共に、酵素分子の塩耐性機構の解析にも多くの知見を与えるものと思われる。

*Dunaliella tertiolecta* のCAに対する活性阻害剤(AZAおよびEZA)の影響を調べたところ、細胞外CAの方がより低濃度で阻害され易く、それら阻害剤に対する感受性が高いことが示された(data not shown)。その理由としては、1)細胞内外のCAが分子レベルで異なっている、2)細胞外CAは、 $Cl^-$ が存在しない状態では阻害剤の影響を受けやすくなっている等のことが考えられる。

しかし、それら阻害剤とNaClが共に存在すると、AZAおよびEZA両方の場合において、 $10^{-8}M$ を境にして、阻害剤の濃度がそれより低いとNaClによる活性化が見られ、それより高濃度になるとNaCl濃度の上昇と同時に阻害剤による阻害効果が増大した(Fig.-4)。したがって、これら阻害剤と $Cl^-$ は競争的な関係にはなく、細胞内外のCAの阻害剤に対する感受性の違いは、それらの分子レベルでのあるいは存在様式の違いによると考えられる。

以上の結果と、CAについて既に明らかにな事柄を合わせて、 $Cl^-$ によるCAの活性化のしくみを推定した(Fig.-5)。すなわち、 $Cl^-$ によるCAの活性化は、その活性部位への直接的作用ではなく、酵素分子の構造変化によるものであり、この構造変化により、基質である $CO_2$ あるいは $HCO_3^-$ と活性部位にある亜鉛原子との結合がより容易になるものと推定される。しかし、この構造変化は、同時に亜鉛原子をキレートする阻害剤との結合をも容易にするために、NaClの濃度上昇と同時に阻害効果も増大したものと考えられる。

#### [今後の課題]

今回明らかになった二つの成果、すなわち円石藻の生育および光合成特性を総合して、 $CO_2$ 固定効率の高い円石藻の培養系を確立し、気相中の $CO_2$ 濃度を効率的に低下させるのに最適なバイオリアクターの稼働条件を決定する必要がある。

このとき、*Dunaliella tertiolecta* から抽出した耐塩性の細胞外CAを用いて、円石藻の $CO_2$ 固定速度に及ぼすそのCAの影響について、速度論的な解析を行ない、より効果的な条件を見いだす必要がある。また、CA活性化のためには $Cl^-$ および $Ca^{++}$ の存在が必要であるが、 $Ca^{++}$ はまた円石藻による $CaCO_3$ の形成にも重要である。

更に、上記の耐塩性CAの利用系の確立に加えて、*Dunaliella tertiolecta* の細胞外CAの塩耐性特性の解析に関して、生化学的な解析を行い、その分子特性を明らかにし、

$\text{Cl}^-$ による促進効果の分子メカニズムを解析する必要がある。更に、 $\text{Cl}^-$ に対して感受性の高い細胞内CAの分子特性をも明らかにして、細胞外のそれと比較することにより耐塩性機構を解析することが重要である。

Table-1 Characteristics of growth and photosynthesis in marine unicellular calcareous alga *Emiliana huxleyii*

Factor	Characteristics of	
	Photosynthesis	Growth
Optimum pH	8.0	8.0 - 8.5
optimum temperature	25°C	24 - 25°C
Optimum Light/Dark condition	-	16 h/8 h (Continuous illumination is suppressive.)
Sensitivity to O <sub>2</sub>	high	high
% inhibition at 21% O <sub>2</sub>	61	-
O <sub>2</sub> concentration (%) suppress completely	> 35	> 35



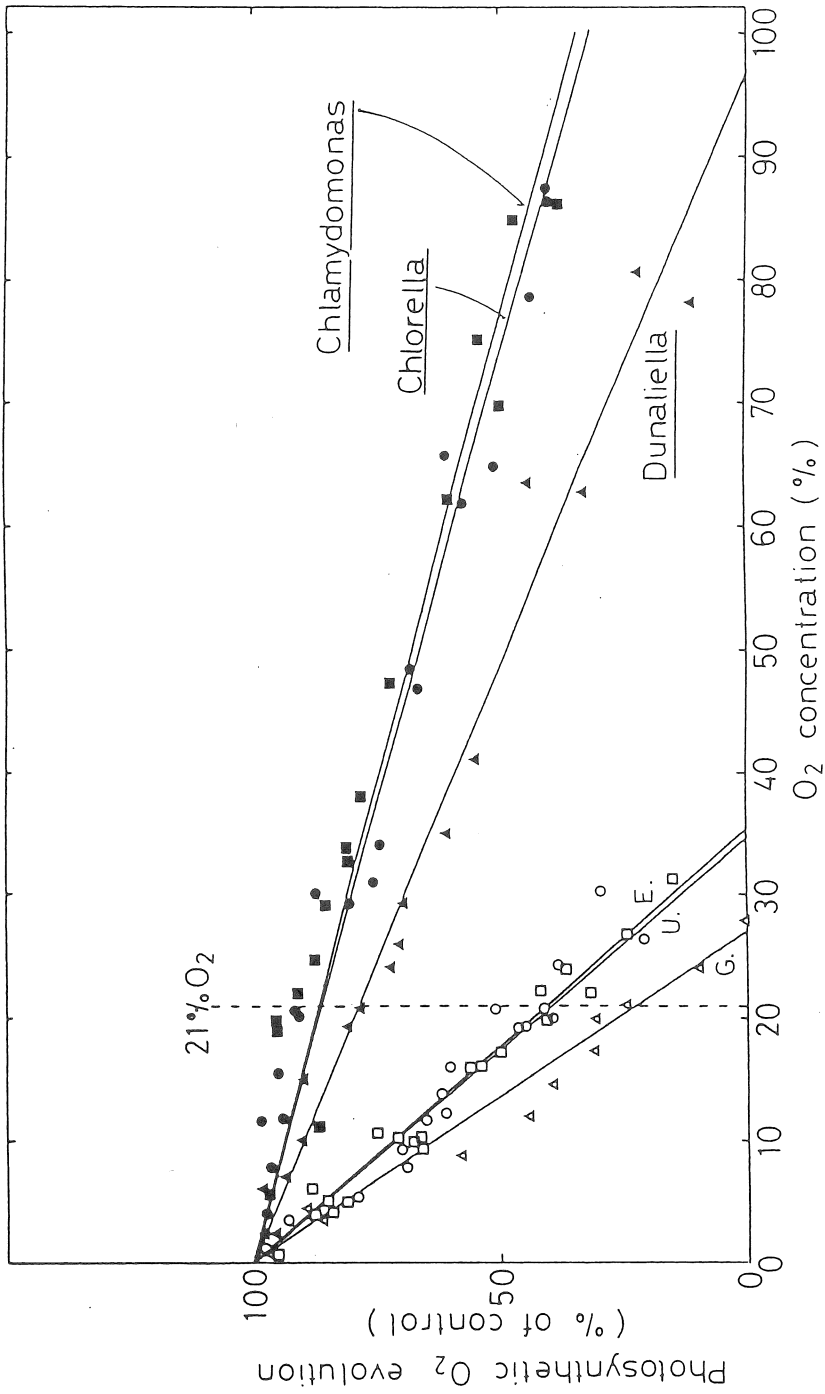


Fig.-1 Relationship between the rate of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution and O<sub>2</sub> concentration in the medium in various microalgae.

Table-2 Carbonic anhydrase (CA) activity measured without or with 3% NaCl in *Dunaliella* species adapted to air for 24 h.

In the absence of NaCl CA activity was measured in the buffer containing 0.6 M (final concentration) sorbitol in order to keep isotonic osmotic pressure for measuring external CA activity located on the cell surface of intact cells.

Internal CA activity was calculated by the equation, Total CA (CA activity in cell homogenate) - External CA.

Sample	Fraction of CA	CA activity (units·mg <sup>-1</sup> Chl) measured		A/B (%)
		without NaCl (A)	with 3% NaCl (B)	
<i>D. tertiolecta</i> grown with 1% NaCl	Total	12.0	18.0	150
	External	3.0	10.0	333
	Internal	9.0	8.0	89
<i>D. parva</i> grown with 6% NaCl	Total	15.0	1.0	6.7
	External	0.5	0.7	140
	Internal	14.0	0.3	21.4
<i>D. salina</i> grown with 6% NaCl	Total	78.0	21.0	26.9
	External	19.0	17.0	89.4
	Internal	59.0	4.0	6.8
<i>D. viridis</i> grown with 17% NaCl	Total	155.0	15.0	9.7
	External	10.0	13.0	130
	Internal	145.0	2.0	1.4

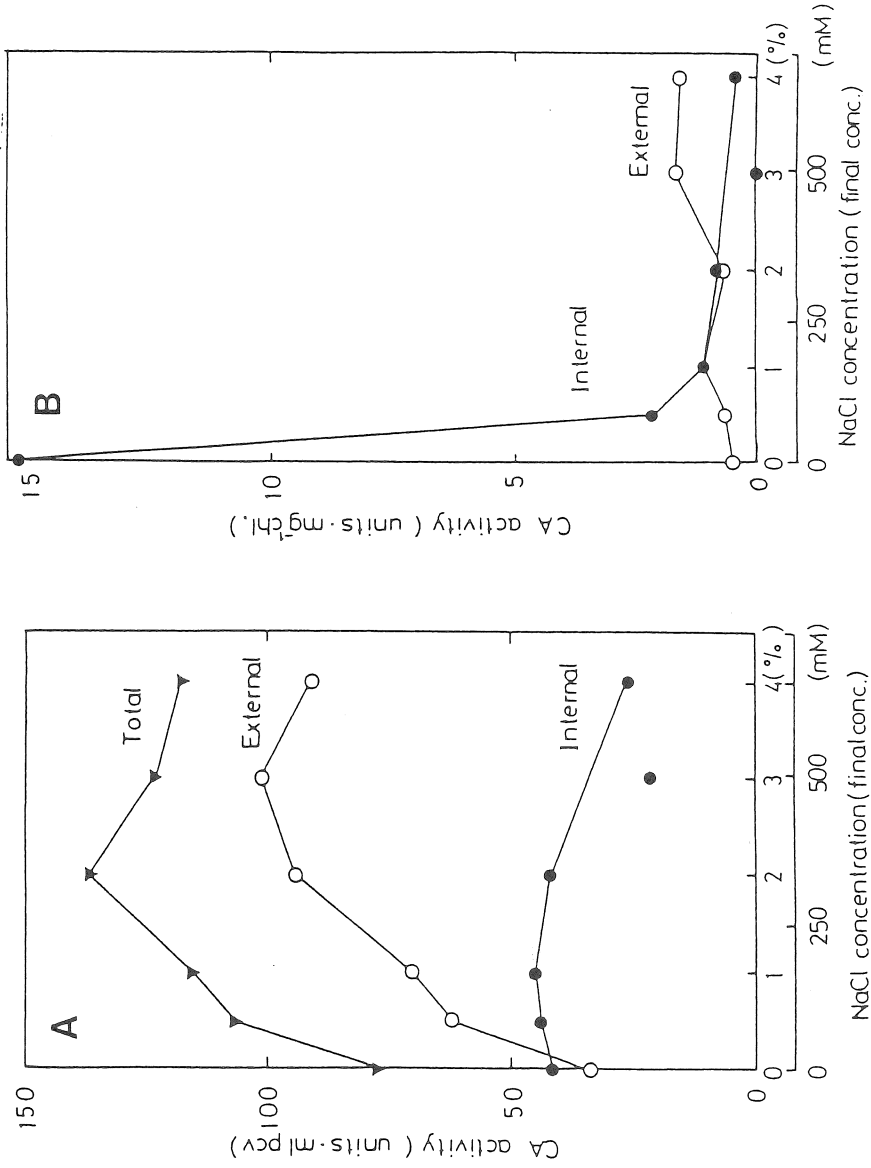


Fig.-2 Effect of NaCl concentration on the activity of carbonic anhydrase (CA) in *Dunaliella tertiolecta* (A) and *Dunaliella viridis* (B).

Table-3 Effect of various ions at a concentration of 0.5 M on carbonic anhydrase (CA) activity in *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella viridis*.

Cation	CA activity with			
	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
A) External CA of <i>D. tertiolecta</i>				
Na <sup>+</sup>	++	-	-	+
K <sup>+</sup>	+	-	n.d.	-
Li <sup>+</sup>	++	n.d.	n.d.	+
Ca <sup>2+</sup>	++	+/-	+	n.d.
Mg <sup>2+</sup>	++	n.d.	n.d.	+
B) Internal CA of <i>D. tertiolecta</i>				
Na <sup>+</sup>	-			
Ca <sup>2+</sup>	+/-			
C) Internal CA of <i>D. viridis</i>				
Na <sup>+</sup>	-	--	n.d.	-
K <sup>+</sup>	-	--	n.d.	+/-
Li <sup>+</sup>	-	n.d.	n.d.	--
Ca <sup>2+</sup>	-	--	+	n.d.
Mg <sup>2+</sup>	-	n.d.	n.d.	+/-

++, strongly stimulated; +, stimulated; +/-, not affected; -, inhibited; --, strongly inhibited; n.d., not determined.

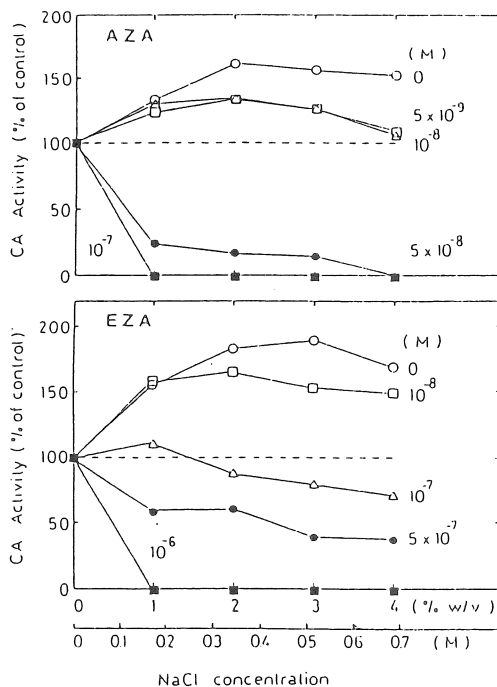
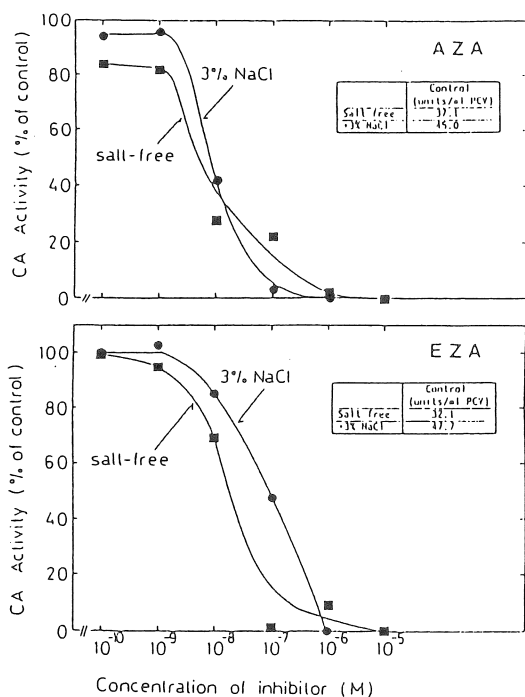


Fig.-3 (left) Dose-response curve of external CA activity of *Dunaliella tertiolecta* to acetazolamide (AZA) and ethoxzolamide (EZA), inhibitors of carbonic anhydrase (CA) .

Fig.-4 (right) Effect of NaCl concentration on the activity of external carbonic anhydrase (CA) of *Dunaliella tertiolecta* in the absence or presence of various concentration of CA inhibitors, acetazolamide (AZA) and ethoxzolamide (EZA).

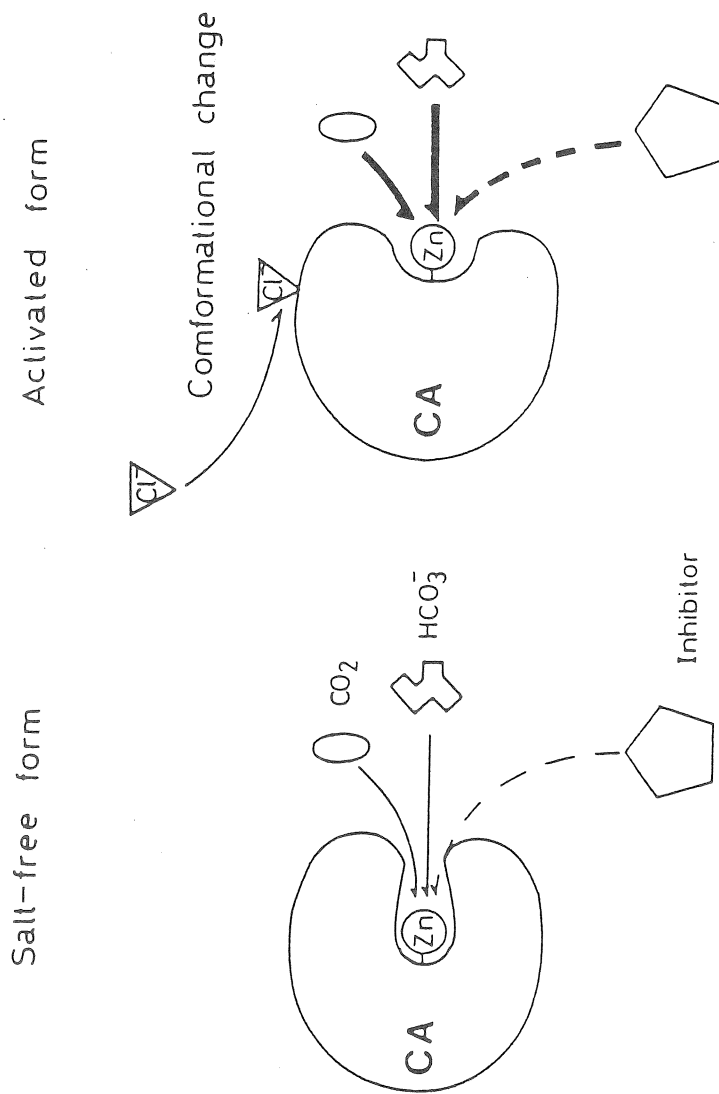


Fig.-5 A tentative model for the mechanism of the activation of carbonic anhydrase (CA) activity by  $\text{Cl}^-$ .

Thick straight and dotted arrows indicate stimulation and suppression of binding, respectively.

Basic studies on the system for decreasing atmospheric CO<sub>2</sub> by means of calcaerous and halophilic algae and analysis of the properties of halotolerant carbonic anhydrase

YOSHIHIRO SHIRAIWA

Department of Biology, Faculty of Science, Niigata University

### Summary

A laboratory-size-model-system for increasing biological fixation of atmospheric CO<sub>2</sub> by marine algae was planned to develop. The principle of the method is increasing CaCO<sub>3</sub> deposition by unicellular calcaerous algae which have no or less carbonic anhydrase (CA) activity by means of a halotolerant carbonic anhydrase of *Dunaliella* cells. Necessary basic data on the calcaerous algae and the CA were accumulated in this study.

1) Optimum pH and temperature for photosynthesis and growth of coccolithophorids were 8-8.5 and 25°C, respectively.

2) The rate of algal growth was strongly affected by O<sub>2</sub> because of its high sensitivity of photosynthesis to O<sub>2</sub>.

3) *Dunaliella tertiolecta* was found to have both intra- and extra-cellular CAs. At the same concentration of NaCl used in the culture medium (0.5 M), the extracellular CA was activated, while the intracellular one was slightly inhibited. The enhancement was the effect of Cl<sup>-</sup>, but not Na<sup>+</sup>. This enhancement is in a marked contrast to the other CAs, such as in fresh water algae, which are sensitive to Cl<sup>-</sup>.

4) The other *Dunaliella* species which are able to grow at higher salinity, such as *D. salina*, *D. viridis* and *D. parva*, had mainly internal CA which is sensitive to NaCl.

5) Activation of the CA activity by Cl<sup>-</sup> was suggested to be due to a conformational change of enzyme structure.