

9322 好塩藻による大気CO₂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環境問題となり、その元凶の一つとされる大気中CO₂濃度の増加を低減することが求められている。藻類の石灰化機構を利用する生物学的CO₂固定は、有効な方法の一つであるが、藻類による海洋中での石灰化促進が、直ちに大気中のCO₂濃度の低減に効果的に働くとは限らず、現在の地球大気環境下における有効性を判断するためには、石灰藻の光合成及び石灰化によるCO₂固定機構をよく理解した上でその可能性を検討する必要がある。本研究では、海産性単細胞石灰藻である円石藻の光合成及び石灰化によるCO₂固定の速度論的解析を行い、円石藻のCO₂固定および生育が液相(海水)と気相間のCO₂収支に与える影響について解析した。

【研究成果】

1. 円石藻*Emiliania huxleyi*の懸濁液に通常の空気を連続して通気(100 ml/min)し、0.03%CO₂を供給した場合、光合成及び石灰化によるCO₂固定により、培養液中の溶存CO₂濃度はcell-free系のそれよりもかなり低く保たれることを明らかにした。

2. 円石藻に¹⁴C-NaHCO₃を与え光合成を行わせた場合、¹⁴Cはまず細胞内の溶存無機炭素(DIC)プールに取り込まれ、光合成産物の生成およびCaCO₃の生成へと利用されることを明らかにした。

3. 円石藻*Emiliania huxleyi*において、細胞外DICが低下した場合、既に形成したCaCO₃を無機炭素源として再利用することを見い出した。

4. 開放系において¹⁴C-NaHCO₃を与え光合成を行わせた場合、好塩性の単細胞緑藻*Dunaliella tertiolecta*が細胞外基質を約96%まで利用したのに対し、円石藻*Emiliania huxleyi*の場合、約80%に留まった。しかし、*Dunaliella*では培地から気相への¹⁴CO₂の放出が、*Emiliania*と比較して非常に大きいことを明らかにした。

以上の結果は、円石藻が石灰化機構を持つことにより、海洋中の溶存無機炭素の気相への拡散を減少させ、海水におけるCO₂保持能力を高めていることを示しており、その固定能の増大が気相のCO₂濃度減少を促進することを示唆する。一方、石灰化機構を有しない*Dunaliella*は、高い耐塩性のカルボニックアンヒドラーゼ活性を有することにより、低濃度のCO₂を溶存する海水中でのCO₂固定能力は大きいことが示された。従って、両者を共存させることにより、効率の良いCO₂固定を行うことができるものと考えられる。

9322 好塩藻による大気CO₂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環境問題となり、その元凶の一つとされる大気中CO₂濃度の増加を低減することが求められている。藻類の石灰化機構を利用する生物学的CO₂固定は、有効な方法の一つであると考えられている¹⁾が、その利用のためには未だ解明すべき基礎的な生物機能や問題点が多く残されている。

円石藻は海産の単細胞藻類で、細胞表面にココリスと呼ばれる多数の円板状の石灰(CaCO₃)の殻を持つことが大きな特徴である。生物分類学的には、クロロフィル a および c を有する植物群である黄色植物界中のハプト植物門に属し、現在、細胞形態およびココリスの形状を主な指標とした分類では約70属、約200種が知られている。代表的な種は球形で、その直径は約5-10μmである。外洋性の円石藻は時に大規模な繁殖(ブルーム)を引き起こし、北大西洋におけるブルームではその範囲が7,200km²以上にも及び、7.2 x 10⁴トンもの炭酸カルシウムが生成されたとの報告がある²⁾。また、これらの藻類は、白亜期において大量のCaCO₃を生成し、石灰岩の形成に主要な役割を演じたことが明かとなっている。

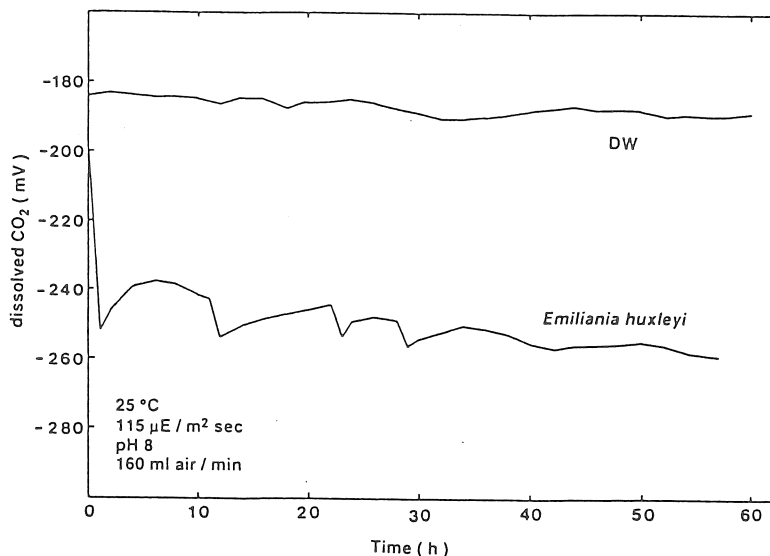


Fig. 1 Changes in the concentration of CO₂ dissolved in cell suspensions of *Emiliana huxleyi* which had been grown in ordinary air.

しかし、藻類による海洋中での石灰化促進が、直ちに大気中のCO₂濃度の低減に効果的に働くとは限らない。たとえば、既に大量に石灰質が存在する海洋において石灰藻やサンゴによる石灰化を促進させた場合、 $\text{Ca}^{++} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ の反応に基づき、逆に海水中における溶存CO₂濃度が増大し、それが大気中へ放出されるため、結果的にそれが大気中CO₂濃度を上昇させることになるとの考えもある³⁾。円石藻が現在の地球大気環境下でも有効なCO₂吸収及び固定源として機能し得るかを判断するためには不明の点が多く残されている円石藻の光合成及び石灰化によるCO₂固定機構を解明し、よく理解した上でその可能性を検討する必要がある。また、海水中でのCO₂固定速度に比べ、大気から海水へのCO₂の溶存速度およびCO₂とHCO₃⁻との平衡反応速度が遅く、藻類の光合成により消費された分のCO₂を大気から直ちにかつ十分には補給できない可能性がある。ただし、大気から海水へのCO₂の溶存速度及び海水中におけるCO₂からHCO₃⁻への平衡反応速度を促進することができれば、藻類の石灰化反応により減少した分のCO₂は直ちに大気から供給され得ることになり、結果的に大気中CO₂濃度の低減が効果的にもたらされるものと期待される。

本研究では、海産性単細胞石灰藻である円石藻の光合成及び石灰化によるCO₂固定の速度論的解析を行い、円石藻のCO₂固定および生育が液相（海水）と気相間のCO₂収支に与える影響について解析した。

[材料と方法]

本研究で用いられた海産性の単細胞石灰藻（円石藻）*Emiliania huxleyi*は、井上勲博士（筑波大学生物科学系）より分株された。また、単細胞緑藻*Dunaliella tertiolecta*は、Arun Goyal博士（ミシガン州立大学、USA）より入手した。

藻の培養は、天然海水をESM栄養塩で補強した培地（ESM液体培地）を使用し、扁平型培養びん中で蛍光灯による両面連続照射下で通常の空気を通気して行った。このとき、培養液中の二酸化炭素濃度（溶存CO₂濃度）を、CO₂電極（東亜電波工業）を用いて測定したところ、円石藻の光合成により、空気と平衡状態にある水の溶存CO₂濃度（10 μM）よりも低い値に保たれていた（Fig. 1）。

CO₂利用機構の解析は、シリコンオイル層遠心濾過法を用いて行った。¹⁴C CO₂およびH¹⁴CO₃⁻を基質とする溶存無機炭素（DIC）固定反応の後、シリコンオイル層遠心濾過法を用いて細胞を反応液から分離し、更に細胞を分離し、光合成産物、細胞内に蓄積するDIC、CaCO₃結晶等の各画分に取り込まれた放射エネルギーを測定し、その生成速度を求めた（Fig. 2）。測定条件として、温度を25°C、光強度を350 μE・m⁻²・sec⁻¹、そしてpHを8.0に保った。

細胞体積 packed cell volume (PCV)の測定は微細藻類用ヘマトクリットを用いて行った。また、クロロフィルの測定は細胞を完全に破碎した後、90%アセトンで抽出し、

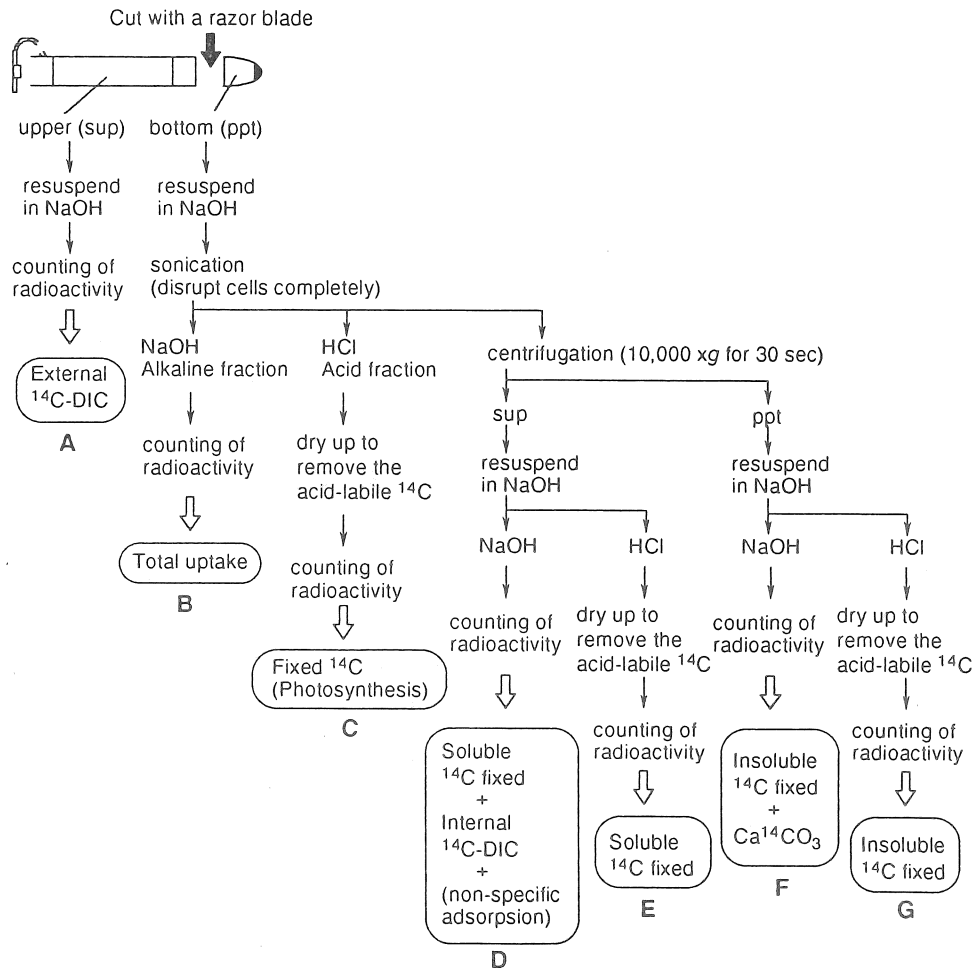


Fig. 2 Fractionation procedure for the determination of the radioactivities incorporated into various fractions.

Fraction A; Determination of DIC remained in the reaction medium.

Fraction B; Determination of total amount of ^{14}C -DIC transported into cells.

Fraction C; Determination of the photosynthetic acid-stable products.

Fraction D; Determination of ^{14}C incorporated into soluble products and internal DIC.

Fraction E; Determination of incorporated into soluble, acid-stable products.

Fraction F; Determination of ^{14}C incorporated into insoluble products included $\text{Ca}^{14}\text{CO}_3$.

Fraction G; Determination of incorporated into insoluble, acid-stable products.

The amount of internal DIC (IIC) was estimated as the difference between the Fraction D and Fraction E, and this value was corrected by subtracting the amount of ^{14}C -DIC that adsorbed non-specifically to the cells. The amount of $\text{Ca}^{14}\text{CO}_3$ was calculated by subtracting the Fraction G from the Fraction F.

Jeffreyの方法により求めた。通常、*Emiliana huxleyi*を4日間通気培養した場合、1 ml PCVの細胞当り約1 mgのクロロフィルが含まれていた。

[研究結果および考察]

1. 細胞外基質濃度 (EIC) に対する光合成の ^{14}C 固定速度、細胞内溶存無機炭素プール(IIC)への ^{14}C -取り込みおよびその濃縮率、炭酸カルシウム形成量および細胞外溶存無機炭素の利用量と利用率の関係

光合成産物への ^{14}C 固定速度、IICプールへの ^{14}C -取り込み量およびEICの利用量 (EIC used) は、EICの濃度上昇に依存して直線的に増加し (Fig. 3A, B and D) 炭酸カルシウム形成量は、EICの濃度上昇に依存して飽和曲線を描くように増加することが示された (Fig. 3C)。これに対し、細胞内への溶存無機炭素の濃縮率を表わすIIC/EICおよびEICの利用率 (% use) は、EICの濃度上昇とは無関係にほぼ一定であることが示され、濃縮率に関しては、13-15倍といった他のラン藻や緑藻に比べると非常に低い濃縮率となり、使われた基質量が全体の5%程度であることが示された。また、20分間における光合成産物への ^{14}C 固定 (Rate (nmol (μl SIS) $^{-1}$ min $^{-1}$) \times 20 min) と炭酸カルシウムへの ^{14}C 固定 (nmol (μl SIS) $^{-1}$) の量比は、およそ20 : 1となった。

2. *Emiliana huxleyi*における光合成、IICおよび炭酸カルシウムへの ^{14}C 取り込みの経時変化

シリコンオイル層遠心分離法三角コルベんに細胞懸濁液を一定量入れ $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を与え、外気とのガス交換が可能な開放系における非脱灰細胞および脱灰細胞の細胞内のそれぞれの部位への ^{14}C -取り込みの経時変化をみた。基質濃度は、 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ として46.4 μM (ただし、 CO_2 -free処理をしていないためbuffer中には約2 mMの非放射性の NaHCO_3 が存在する) とした。

非脱灰細胞、脱灰細胞の経時変化は光照射および暗黒下において各々ほぼ同じであった。光照射下において、IICプールへの ^{14}C -取り込み、細胞における全 ^{14}C -取り込みは約10時間目まで直線的に増加し、以降は一定となった。EICの減少も10時間目まで停止し、以後一定となり、細胞外からの ^{14}C -DICの吸収と細胞からの ^{14}C 放出が平衡に達したことを示す (Fig. 4 E)。一方、光合成産物への ^{14}C 固定は、14時間目まで増加し、その後一定となり、既に固定された $\text{Ca}^{14}\text{CO}_3$ もしくはIICからの光合成産物への ^{14}C の移動を示唆する (Fig. 4 A, B and D)。

細胞内IICへの濃縮率は、10時間で、培地中の濃度に対し約400倍の濃縮率を示したが、光合成へ再利用されうる形態で存在してはいないことが示された。

炭酸カルシウムへの ^{14}C -取り込みは3時間程度のlagを示した後10時間目まで急激に増大し、それ以降急速に減少した。この結果は、一旦生成された $\text{Ca}^{14}\text{CO}_3$ から、他の画

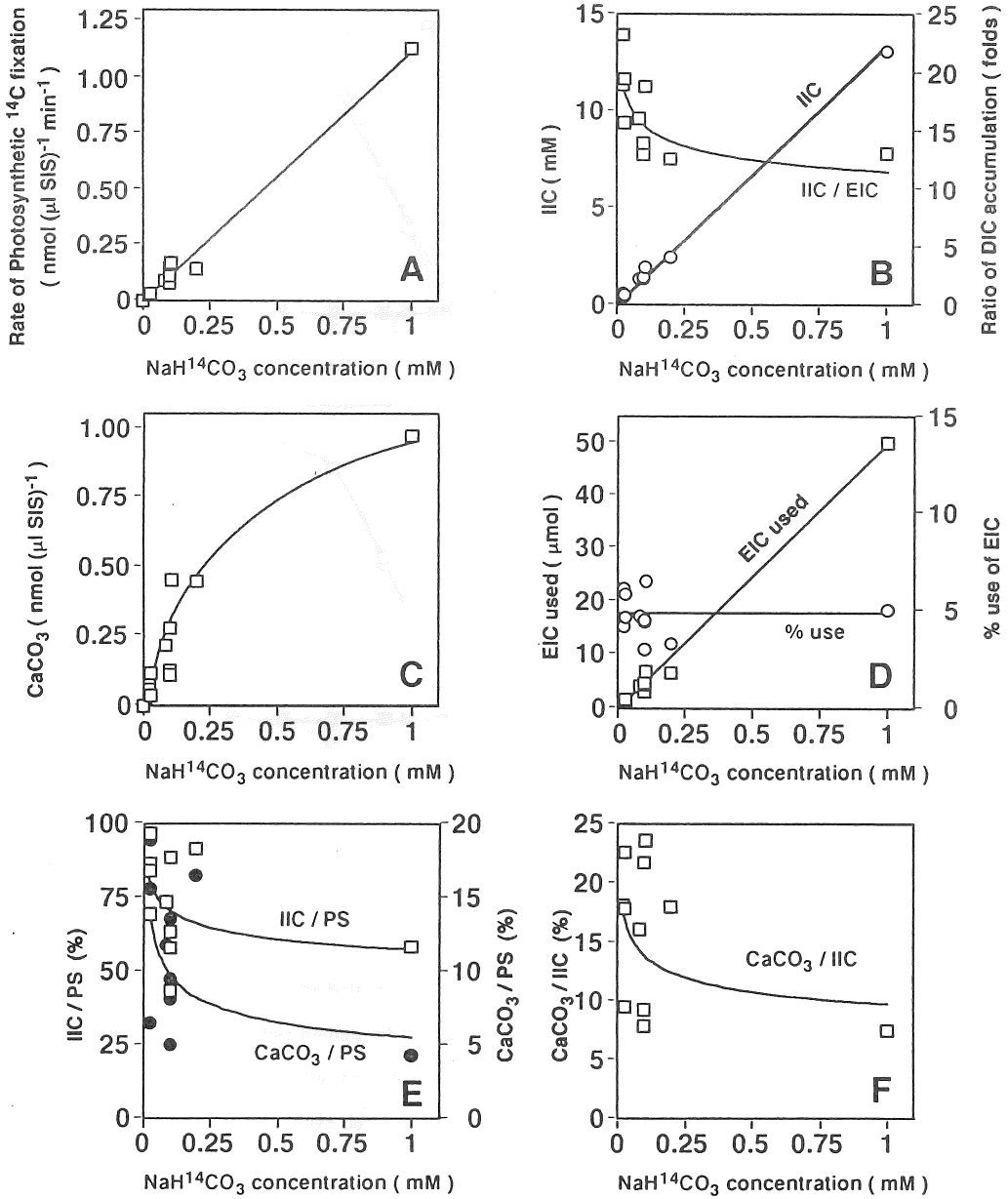


Fig. 3 Dependence of the rates of photosynthetic fixation of ^{14}C (A), accumulation of IIC (B), production of CaCO_3 (C), utilization of EIC (D) and ratio IIC : PS, CaCO_3 : PS (E) and CaCO_3 : IIC (F) after 20 min of photosynthesis on the external concentration of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$.

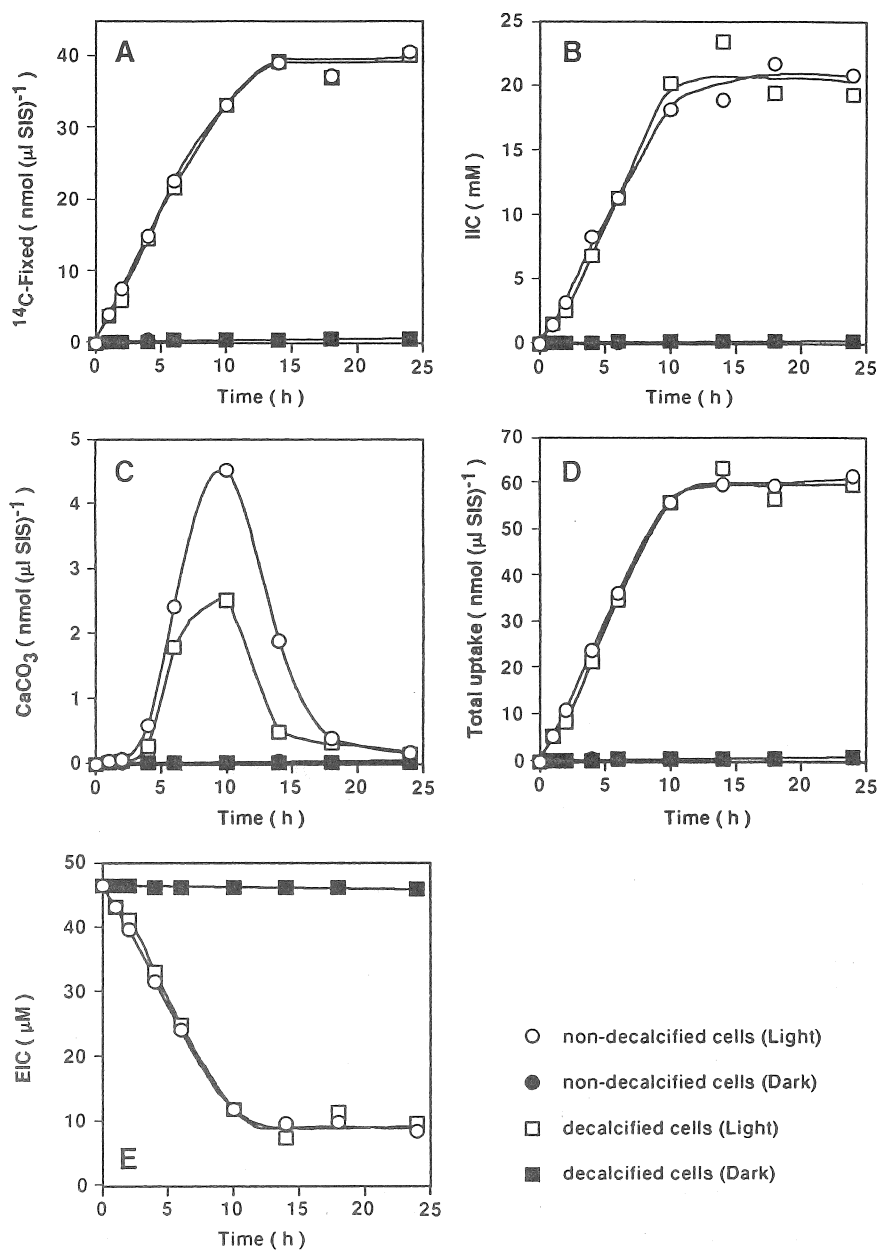


Fig. 4 Long-term (24 h) experiments on the incorporation of ^{14}C -DIC into acid-stable products (A), accumulation of IIC (B), production of CaCO_3 (C), total uptake (D) and change in EIC (I) in the light or in the dark in the intact cells and decalcified cells of *Emiliana huxleyi*.

The values of y-axis in each time were corrected by the values of the total radioactivity at the same time because of the changes in total radioactivity during 24 h (see Fig. 28).

分(光合成産物)への ^{14}C の転移、あるいは反応液中への溶出の可能性が考えられる。以上の現象は、炭酸カルシウムへの ^{14}C -取り込み量に差はあるものの他の画分については、非脱灰細胞、脱灰細胞の両者においてほぼ同様の ^{14}C 取り込みパターンが見られた (Fig. 4 C)。

一方、暗黒下における ^{14}C -取り込みは、光合成、IIC、炭酸カルシウムにおいて若干あったものの光照射下と比較して非常に低かった。また、EICの減少もわずかで、*Emiliana huxleyi*による継続的な ^{14}C -DIC利用は、光依存であることを示している。この結果は、暗黒下における短時間のIICおよび炭酸カルシウムへの ^{14}C -取り込み (Fig. 3) は、光照射下で生成された、炭酸カルシウム形成に不可欠な物質のリザーバーの存在があれば、その蓄積分の利用に限り、呼吸エネルギーの供給のみで石灰化過程が進行することを示唆する。

従って、*Emiliana huxleyi*による石灰化過程は光依存と光非依存の反応が連結した複合反応であり、細胞の生育を伴う長時間の培養においてはIICプール形成や炭酸カルシウム形成は、光依存性すなわち、光合成依存性の過程と考えられる。

3. *Dunaliella tertiolecta* と *Emiliana huxleyi*による ^{14}C -DIC固定の経時変化

海産性単細胞藻類*Dunaliella tertiolecta* (low- CO_2 cells ; 通常の空気条件下で生育したもので、光合成における CO_2 に対する親和性が高いが、石灰化は行わない)と円石藻*Emiliana huxleyi*の細胞懸濁液を通気性のシリコン栓をした三角コルベんに一定量入れ、基質として $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を与えた。この測定系は、開放系で外気とのガス交換が可能であった。

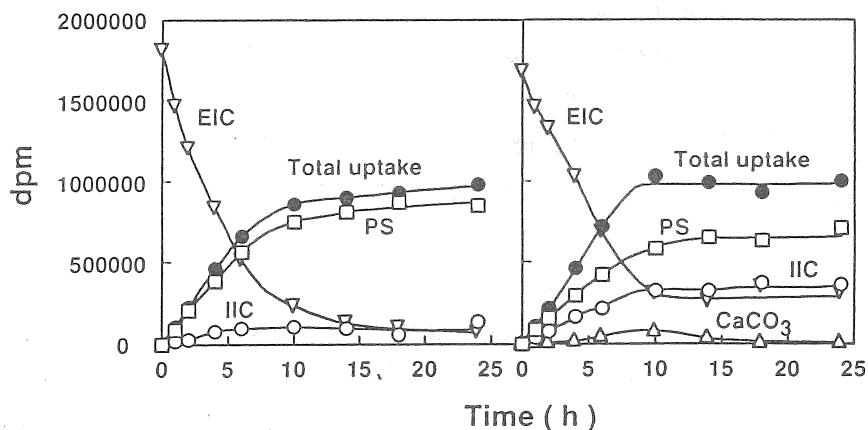


Fig. 5 Time courses of the incorporation of ^{14}C -DIC into acid-stable products of photosynthesis (PS), DIC accumulated internally (IIC), production of CaCO_3 and total uptake during photosynthesis in air-grown *Dunaliella tertiolecta* (left) and *Emiliana huxleyi* (right).

全¹⁴C-取り込み量は両種においてほぼ同様の経時変化を示し、6時間目までの全¹⁴C-取り込み速度は、*Dunaliella tertiolecta*では、 $128 \times 10^6 \text{ dpm} \cdot (\text{mg Chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ に対し、*Emiliana huxleyi*では、 $142 \times 10^6 \text{ dpm} \cdot (\text{mg Chl})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ で、その速度は1 : 1.1であった。また、最終的（24時間後）な全¹⁴C-取り込み量は、 $989.4 \times 10^3 \text{ dpm}$ と $1,008.3 \times 10^3 \text{ dpm}$ であり、両者においてほぼ同じであった（Fig. 5）。しかし、各画分への¹⁴Cの分布には大きな違いがあり、*Dunaliella tertiolecta*においては、全¹⁴C-取り込み量（24時間）の86.3%が光合成産物への固定であり、IICは、13.7%（24時間後）であった。一方、*Emiliana huxleyi*による全¹⁴C固定量（24時間）は、光合成産物、IICおよびCaCO₃において各々65.7%、34.0%および0.3%であった。また、定常状態における光合成速度は*Dunaliella tertiolecta*の方が1.4倍大きかった。

両者の比較において特徴的なことは、*Emiliana huxleyi*におけるIICへの蓄積が*Dunaliella tertiolecta*に比べて大きかった（2.5倍）こと、EIC取り込み停止後、CaCO₃が減少したにもかかわらず、IICは一定に保たれた点である。IICの細胞内存在形態は現在不明であり、その解析が不可欠である。

24時間の光合成反応後に残存する¹⁴Chl（EIC+細胞からの分泌物）の与えた¹⁴Chlに対する割合は、*Dunaliella tertiolecta*では、3.8%、*Emiliana huxleyi*では、18.5%であり、約5倍の相違がみられた。

4. *Dunaliella tertiolecta*の¹⁴C-DICの取り込みパターンに及ぼす明暗の影響

シリコンオイル層遠心分離法を用いて、開放系での光照射下と暗黒下での¹⁴C-取り込みの経時変化を24時間のスケールで測定した。基質としては、約2 mMの非放射性的NaHCO₃の存在下で、50.2 μMのH¹⁴CO₃を与えた。光照射下では、全画分への¹⁴C-取り込みが見られたが、暗黒下においては、光合成¹⁴C固定もIICへの¹⁴C蓄積もほとんど認められなかった（Fig. 6）。暗黒下における¹⁴C-取り込み量は最大でも光照射下の1%以下（24時間で0.087%）であった。これは、IICへの蓄積機構が光依存性または、光合成依存性であることを示唆している。しかし、暗黒下においては、細胞内への¹⁴C-取り込みが極く僅かしか見られなかったにもかかわらず、細胞外溶存無機炭素が著しく減少した（Fig. 6 Dark）。これは、液相から気相への¹⁴Cの放出を表わしており、呼吸によって生じたCO₂が液相の¹⁴Cを気相へ追い出したこと、および気相-液相間の同位体交換によりもたらされたものと考えられる。ただし、*Dunaliella*の暗呼吸速度は光合成速度の1/10程度であり¹⁴C損失のほとんどが液相から気相への放出によるものと推測しているが、cell-free系での液相から気相への放出（自然置換量）と比較すると、明らかにcellの存在が放出量を増大させていることが示された。

5. 液相-気相間の $^{14}\text{C-CO}_2$ の移動 (収支)

この実験系は藻類を用いて大気中 (気相) の CO_2 を固定させる場合、自然界 (明暗のある環境) でのさまざまな藻類における炭素収支を知る上での1つのモデル実験システムとして重要であると考えられる (Fig. 7).

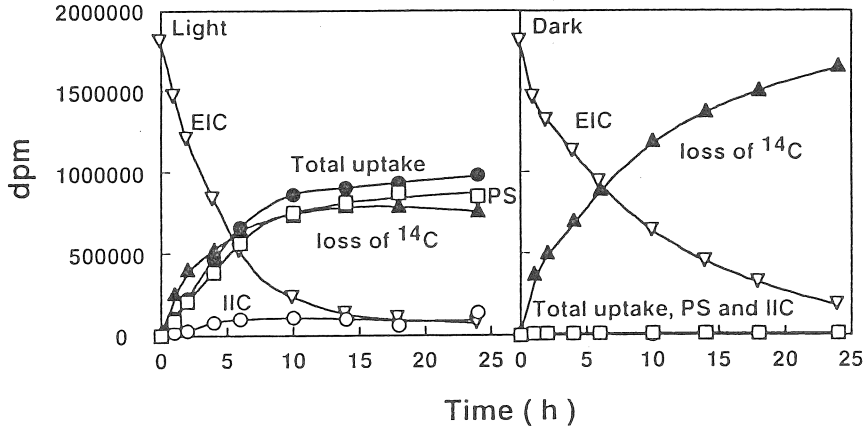


Fig. 6 Time courses of the incorporation of $^{14}\text{C-DIC}$ into PS and IIC, and total uptake by the cells of *Dunaliella tertiolecta* and the loss of ^{14}C into gas phase in the light (left) and dark (right).

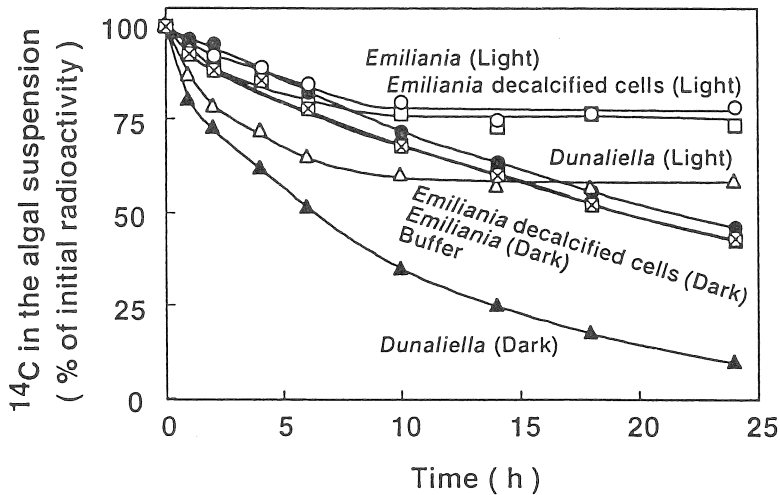


Fig. 7 Time courses of ^{14}C -radioactivity remained in the algal suspension of *Dunaliella tertiolecta* (triangles) and the intact cells (circles) and protoplasts (squares) of *Emiliana huxleyi* during culture in the light (open symbols) or in the dark (closed symbols).

コントロールとしてcell-freeの系を設定し、非生物状態における炭素の置換量を測定した。 ^{14}C - NaHCO_3 を加えて反応を開始し、細胞による全 ^{14}C -取り込み量+medium中に溶存する ^{14}C 量(EIC)の経時変化を調べ、その ^{14}C 量の変化量を開始時のそれに対する割合とし表わした(Fig. 7)。

両種とも、気相への ^{14}C の放出は、cell-free系および暗条件下に置けるより小さかった。また、暗黒下におけるそれは、光照射条件より大きく、*Emiliania huxleyi*ではcell-free系におけるとほぼ同じ量が放出した。一方、*Dunaliella tertiolecta*においては24時間の暗黒下において90%以上もの炭素を液相と気相の間で交換することを示した。更に、*Emiliania*は*Dunaliella*に比べ、 ^{14}C -DICの放出が非常に小さく、DICをmediumに保持する能力が高いことが示された。この結果は、円石藻による気相の CO_2 の固定が、他の非石灰藻よりも有効であることを示唆する。

[今後の課題]

本研究で明らかになった円石藻の CO_2 の固定特性は、海洋でのこの藻類による CO_2 の固定が他の非石灰化の藻類よりも有効であることを示している。したがって、モデル実験系を拡大し、気相を含めた系において、気相への CO_2 の放出速度及び液相への溶け込み速度を同時測定し、本研究の結果の確認を行う必要がある。更に、モデル実験系の規模を量的にも拡大し、円石藻による気相の CO_2 の固定の有効性を確認し、その固定速度の制御についても調べる必要がある。

[文献]

- 1) Sundquist, E.T.: Science 259: 934-941 (1993)
- 2) Heimdal, C. R. : In; "Marine Phytoplankton" (Thomas, C. R., ed.) pp.147-247, Academic Press, San Diego (1993)
- 3) Westbroek, P. , J. E. van Hinte, G-J Brunner, M. Veldhuis, C. Brownlee, R. Harris and B. R. Heimdal: In: "The Global *Emiliania* Modelling Initiative" (Westbroek, P. et al., eds) pp. 6-14, BESD-V, GEM (1992)

Basic studies on the system for decreasing atmospheric CO₂ by means of calcareous and halophilic algae and analysis of the properties of halotolerant carbonic anhydrase

Yoshihiro Shiraiwa

Department of Biology, Faculty of Science, Hiigata University

summary

Basic characteristics on the kinetic analysis of ¹⁴C₂ fixation by a marine unicellular coccolithophorid, *Emiliana huxleyi* was performed using a silicone-oil-layer-centrifugation technique.

1. When air containing 0.03% CO₂ was bubbled into the suspension of *Emiliana huxleyi* with a rate of 100 ml/min, the concentration of CO₂ dissolved in the medium (DIC) was kept constant at the level much lower than that in the medium without the algae.

2. ¹⁴C-DIC was incorporated into an internal pool once, and then used for the photosynthetic fixation and the calcification. However, the concentrating activity, namely ratio of the concentration of internal DIC to external DIC, was much lower than that of unicellular green algae and cyanobacteria.

3. CaCO₃ in coccoliths was re-utilized for photosynthetic CO₂ fixation by *Emiliana huxleyi* when the concentration of external DIC was decreased by the algal utilization.

4. When ¹⁴C-DIC was added into the algal suspension in an open-system, ¹⁴C release into air-space during algal growth in *Emiliana* was about a half of that in *Dunaliella* which has halotolerant carbonic anhydrase. The release of ¹⁴C was much more in the dark in both algae.

These results suggest that calcareous algae like coccolithophorids play an important role for keeping DIC in the ocean and also absorbing atmospheric CO₂ and the ability is bigger than non-calcifying algae like *Dunaliella* especially under light/dark regimes.