

9401 赤潮構成藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖に及ぼす塩濃度の影響  
に関する代謝生理学的研究

助成研究者：猪川 倫好 (筑波大学 生物科学系)

共同研究者：中村 良子 (筑波大学 生物科学系)

岩本 浩二 (筑波大学 生物科学系)

〔研究目的〕

*Heterosigma akashiwo* は有色植物門・ラフィド藻綱に属する単細胞鞭毛藻で、日本の沿岸で大規模に発生する赤潮の主要な構成種として知られている。本藻は、他の主要な赤潮構成藻と同様、昼間には海表面に集まり活発に光合成を行い、夜間は海底に集積し、無機窒素等の栄養塩を摂取する特徴的な日周鉛直移動習性をもち、近年赤潮発生のモデル系として注目を集めている。本研究では、赤潮鞭毛藻の特性を生理生化学的側面から解析し、赤潮発生機構の解明と赤潮被害対策の糸口を見いだすことを念頭に、汽水域から沿岸域で特に大量に発生する本藻を用いて、本藻の種々の生理活性に及ぼす塩濃度の影響を、主に光合成炭素代謝、またそれと連関する窒素代謝について焦点を絞り考察した。

〔結果及び考察〕

1. 塩濃度の細胞増殖、光合成活性に与える影響

培地中の海水のsalinityを0, 6, 12, 18, 24, 30 ‰と変化させ成長曲線を求めた。0 ‰では細胞はすぐに破裂し死滅した。増殖は細胞数の増加とクロロフィルaの増加を指標にして求めたが、どちらの場合も18 ‰の時最も良い生育を示した。この時細胞あたりのクロロフィルa量は培地のsalinityによる影響を受けてはいなかった。6, 12, 18, 24, 30 ‰のsalinityで培養した対数増殖後期の細胞について光合成酸素発生、炭酸固定能を調べたところどちらも18 ‰のsalinityで培養した標品で最大値、 $165 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl.a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $191 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg Chl.a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ を示した。生長曲線と相関した、salinityに依存する光合成酸素発生、また光合成炭酸固定能の相違が明確に認められるので、増殖のために必須な光合成系が何らかの形でsalinityによる制御を受けていることが示唆された。

2. 光合成炭素代謝と硝酸同化の同調性

12時間明：12時間暗の光条件で培養した細胞ではNR活性は暗期に移行するとともに減少し始め約3時間後には消滅した。この時NR分子の変動もこれと同調していた。また暗から明へと移行すると20-30分の誘導期を経てNR活性が出現し増加した。この時NR分子のレベルも同様に誘導、増加が認められた。連続明下の細胞ではNR活性とNR分子は存在し続けるが、連続暗下の細胞ではNR活性とNR分子は全く検出されなかった。NR活性は光強度に依存した増加を見せ光合成炭酸固定の光飽和曲線に類似していた。また光合成電子伝達系の阻害剤により誘導の阻害が見られることから、本藻では硝酸同化系は光合成が動くことによって初めて動いていることが示された。

3. 塩濃度と光合成炭素代謝、窒素代謝関連酵素活性との相関性

光合成炭素同化、及び無機窒素同化の初期過程の関連酵素の *in vitro* 活性を調べてみたが、生長曲線、あるいは光合成酸素発生、炭酸固定に見られたような18 ‰のsalinityをピークにした酵素活性の相違は認められなかった。少なくとも光合成炭素同化及び無機窒素同化系の初期過程はsalinityによる影響を受けず、salinityに依存した増殖は光合成炭素同化及び無機窒素同化系の初期過程に関わる酵素の活性の制御によって説明されるものではないと考えられ、むしろ光合成電子伝達系に主に起因することが示唆された。



9401 赤潮構成藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖に及ぼす塩濃度の影響に関する代謝生理学的研究

助成研究者：猪川 倫好 (筑波大学 生物科学系)

共同研究者：中村 良子 (筑波大学 生物科学系)

岩本 浩二 (筑波大学 生物科学系)

## 1. 研究目的

*Heterosigma akashiwo* は有色植物門・ラフィド藻綱に属する単細胞鞭毛藻で、日本の沿岸で大規模に発生する赤潮の主要な構成種として知られている。本藻は、他の主要な赤潮構成藻と同様、昼間には海表面に集まり活発に光合成を行い、夜間は海底に集積し、無機窒素等の栄養塩を摂取する特徴的な日周鉛直移動習性を持ち、近年赤潮発生のモデル系として注目を集めている。本藻はまた、細胞壁を持たず、細胞の外表面は細胞膜を粘質多糖が覆った状態にあり、浸透圧の制御機構や細胞膜におけるイオン等物質の輸送機構の解析のモデル系としても優れた実験材料としての特性を持つと考えられている。しかしながら増殖と密接に関わっていると考えられる基礎的な炭素及び窒素代謝系に関する研究はほとんど報告例がないのが現状である。

そこで本研究では、赤潮鞭毛藻の特性を生理生化学的側面から解析し、赤潮発生機構の解明と赤潮被害対策の糸口を見いだすことを念頭に、汽水域から沿岸域で特に大量に発生する本藻を用いて、本藻の種々の生理活性に及ぼす塩濃度の影響を、主に光合成炭素代謝、またそれと連関する窒素代謝について焦点を絞り考察することを目的としている。

## 2. 研究方法

### 2.1 藻株および培養条件

*Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada の細胞は500 mL扁平フラスコにて空気を通風しつつ12時間明：12時間暗の光周期で18 °Cで無菌培養した。培養中の光の照度は5000 luxで、人工海水 Jamarin S (ジャマリンラボラトリー) を用い作成した30, 24, 18, 12, 6 ‰の異なるsalinityの硝酸、リン酸塩強化PES培地(pH 8.0) (Provasoli,1968) を培地として用いた。本藻に関して報告されている培地にはAsp 6などがあるが、上述の培地が最も良い生育を与えるものである。

### 2.2 生長曲線

生長曲線は、培地中の細胞数及びクロロフィル a濃度の増加により作成した。

### 2.3 光合成酸素発生および光合成炭酸固定の測定

光合成酸素発生はハロゲンランプ( 200 W・m<sup>-2</sup> )を光源に対数増殖後期にある細胞( 1-5X10<sup>5</sup> cells/mL)を用いて酸素電極(ランクブラザーズ)で測定した。*H. akashiwo*は強い遠心によって容易に破壊されるため、CO<sub>2</sub>-freeの培地との交換は限界濾過装置(Millipore)によって行った。スピッツ試験管に5μg Chl. a/ml となるよう調整した細胞を 250 μl

入れ、CO<sub>2</sub>-free air を通気しながら200 W・m<sup>-2</sup> のハロゲンランプを照射しながら5分間前照射を行い、1 mM となるようにNaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (55.5 mCi・mmol<sup>-1</sup>)を加え10分後酢酸を加え反応を停止し、更に10分間通気を行い未固定の炭酸を除いた後、溶液の一部をガラスフィルターにスポットし放射活性を測定した。

## 2.4 藻体の抽出

種々のSalinityで培養した対数増殖後期の細胞を500 gの遠心で回収し、0.1 % (w/v) Triton X-100、10 % (w/v) グリセロール、1 mM PMSF、1mM ベンズアミジン、10 mM アミノカプロン酸を含む100 mM HEPES (pH 7.5) 緩衝液に対して懸濁しソニケーションにより細胞を破碎し、2000 g で遠心した後の上清を粗抽出液とし、種々の酵素活性の測定に用いた。イムノプロット用の試料の作成には上述の緩衝液より界面活性剤を除いたものを用いた。

## 2.5 電気泳動とイムノプロット

7.5 % のポリアクリルアミドゲルを用いSDS-PAGEを行った。プロットはMilliporeセミドライプロット装置を用いてニトロセルロース膜上に行った。一次抗体として紅藻サビノリの硝酸還元酵素に対して作成した種々のモノクローナル抗体の中で本藻の硝酸還元酵素 (NR) に対して交叉性があった、NR10 (3)を、二次抗体には Peroxidase conjugated anti-mouse IgG を用いて、ジアミノベンジジンの発色により、NR のタンパク質レベルでの変動を調べた。

## 2.6 酵素活性の測定

酵素活性測定のための試料は暗期から明期に移行したのち3時間後に収穫した。酵素活性の測定は光合成炭酸固定および無機窒素同化の初期過程に関わる酵素に限定した。RuBP カルボキシラーゼ活性はNaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> の固定によって測定した。ホスホグリコール酸ホスファターゼは生成したリン酸を比色定量し、グリコール酸オキシダーゼはジクロロフェノールインドフェノールの還元量を、リンゴ酸脱水素酵素はNADHの酸化の吸光度変化を測定し求めた。NR 活性は生成した亜硝酸を比色定量し求めた。亜硝酸還元酵素(NIR)活性は亜硝酸の減少量を比色定量し測定した。グルタミンシンターゼ (GS)活性はγ-グルタミルヒドロキサム酸の生成量を比色定量し求めた。グルタメートシンターゼ (GOGAT)活性はNADPHの酸化の吸光度変化を測定し求めた。

グリコール酸オキシダーゼ活性はNADHの酸化の吸光度変化を測定し求めた。活性は1unitを1分あたり1 μmol の生産物の生成または基質の分解を与える量とした。

## 3. 研究結果

### 3.1 塩濃度の細胞増殖に与える影響

*Heterosigma akashiwo* は扁平フラスコ中で側面より光を照射し通気することにより同調的培養が可能である。培地中の海水のsalinityを0, 6, 12, 18, 24, 30 %と変化させ成長

曲線を求めた。0 %では細胞はすぐに破裂し死滅した。増殖は細胞数の増加 (Fig. 1A) とクロロフィルa (Fig. 1B) の増加を指標にして求めたが、どちらの場合も18 %の時最も良い生育を示した (Fig. 1中では12, 24%の結果は割愛した)。この時細胞あたりのクロロフィルa量は培地のsalinityによる影響を受けてはいなかった。生長曲線の結果は *H. akashiwo* が汽水域に主に生息する微細藻種であること一致する。

### 3.2 塩濃度の光合成活性に与える影響

6, 12, 18, 24, 30 %のsalinityで培養した対数増殖後期の細胞について光合成酸素発生、炭酸固定能を調べた。光合成酸素発生は18 %のsalinityで培養した標品で最大値、165  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl.a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  が得られた (Fig. 2)。この値を100 %とした場合の相対活性は6, 12, 24, 30 %でそれぞれ 62, 91, 93.73 %であった。また光合成炭酸固定能も酸素発生の場合と同様に18 %で最大値が得られ、191  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg Chl.a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  でこれを100 %とした場合の相対活性は6, 12, 24, 30 %でそれぞれ 42, 71, 94, 85 %であった (Fig. 3)。

### 3.3 *Heterosigma akashiwo* における硝酸還元酵素の光による誘導

Fig. 1-3の結果から18 %の塩濃度で培養するのが最も適当であったので、この培養条件に限定し異なる光条件の場合の硝酸還元酵素(NR)活性とそのタンパク質レベルでの日周変動を通常の培養条件において調べた (Fig. 4)。12時間明 : 12時間暗の培養条件ではNR活性は暗期に移行するとともに減少し始め約3時間後には消滅した。この時NR分子の変動もこれと同調していた。また暗から明へと移行すると20-30分の誘導期を経て (data not shown) NR活性が出現し増加した。この時NR分子のレベルも同様に誘導、増加が認められた。12時間明 : 12時間暗の培養条件から連続明へ (Fig. 4, CL) 移行した細胞では硝酸還元酵素活性とNR分子は存在し続けるが、連続暗へと移行した場合 (Fig. 4, CD) には硝酸還元酵素活性とNR分子は全く検出されなかった。硝酸欠乏細胞 (Fig. 4, N-starved) では光による誘導が見られなかった。続いてNRの誘導に対する光強度の影響をしらべた (Fig. 5)。暗中の細胞に強度の異なる光を照射し、NR活性を求めた。活性は光強度に依存した増加を見せ、100  $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ で飽和に達した。また光合成電子伝達阻害剤 dichlorophenyl dimethyl urea (DCMU) のNRの誘導に対する影響を調べたところ、 $10^{-5}\text{M}$ 以上で著しい阻害が認められた (data not shown)。この濃度のDCMUを加えると、NR活性は光照射後も全く検出されなかった (Fig. 6)。硝酸同化の初期過程のNRの誘導に及ぼす影響を調べるために硝酸同化初期過程関連酵素の阻害剤を光照射と同時に培地に加え、3時間後の活性を測定した (Fig. 7)。用いた阻害剤はGSの阻害剤 L-methionine-S-sulfoxime (MSX)、L-methionine-S,R-sulfoxide (MSO)、そしてGOGATの阻害剤 azaserine と6-diazo-5-oxo L-norleucine (DON)、transaminaseの阻害剤 aminooxyacetate (AOA) である。Fig. 7に示されるようにAOAに著しい阻害効果が認められた。この阻害はタンパク質レベルのものであった (data not shown)。

### 3.4 塩濃度と光合成炭素代謝、窒素代謝関連酵素活性との相関性

今回の培養系では *H. akashiwo* の増殖のための無機炭素及び無機窒素同化は光が照射している間のみ起こることが3.3の実験より明らかになったので、酵素活性測定は明期の試料にのみ限定した。炭酸固定関連酵素として RuBP カルボキシラーゼ、光呼吸関連酵素としてホスホグリコール酸ホスファターゼ、グリコール酸オキシダーゼ、呼吸系の酵素としてリンゴ酸脱水素酵素を調べてみた。また硝酸同化関連酵素の硝酸関連酵素、亜硝酸還元酵素、グルタミンシンターゼ、グルタメートシンターゼの比較を行った。Table 1に示すような活性値が得られた。生長曲線に見られたような salinity に依存した活性の相違は認められなかった。

#### 4. 考察

##### 4.1 塩濃度の細胞増殖、光合成活性に与える影響

生長曲線から *H. akashiwo* の生育に最適な salinity は18 ‰であることが示された。自然界において窒素やリンの供給が赤潮発生に対して重要な要因となることは知られているが、十分な養分が供給されるだけでなく、*H. akashiwo* の増殖を制御する要因として salinity も密接に関わっていると考えられる。しかもその時生長曲線と相関した、salinity に依存する光合成酸素発生、また光合成炭酸固定能の相違が明確に認められるので、増殖のために必須な光合成系が何らかの形で salinity による制御を受けていることが示された。

##### 4.2 光合成炭素代謝と硝酸同化の同調性

今回の実験を通して *H. akashiwo* においては硝酸同化の第一段階の反応を触媒する硝酸還元酵素が完全に光の有無によって誘導分解を繰り返す酵素であることが明らかになった。しかもNRの誘導に関する光飽和曲線が既に我々が得ている本藻の光合成炭酸固定のそれと類似していること(5)、また光合成電子伝達系の阻害剤により誘導の阻害が見られることから、本藻では硝酸同化系は光合成が動くことによって初めて動いていると考えられる。海産の珪藻、渦鞭毛藻についてこ一二年硝酸還元酵素の日周変動とそのタンパク質レベルでの変動に関して報告がされたが(1, 4)、どちらも本藻のように光により完全に制御されたNRの合成分解は見られていない。さらに硝酸同化の初期過程に関わる酵素群及びトランスアミナーゼの阻害剤を用い、誘導に対する影響を見たところNRとは異なり活性に劇的な日周変化のないGS、GOGATの阻害剤は全く効果がなくむしろ、2-オキシ酸との接合点と思われる transaminase の阻害剤に阻害効果が認められた。AOAは光呼吸系の阻害剤として高等植物、微細藻類で用いられることがあるので、NRの誘導に対する光呼吸系の関与も予想される。少なくともNRの誘導には窒素代謝側よりはむしろ炭素代謝がより重要な役割を果たすことを示唆される。これらの結果増殖に必要な無機炭素、無機窒素同化系は *H. akashiwo* においては少々時間的ずれはあるものの、明期とともに同調的に動いていることが明らかになった。AOAは光呼吸系の阻害剤として高等植物、微細藻類で用いられることがあるので、NRの誘導に対する光呼吸系の関与も予想される。

#### 4.2 塩濃度と光合成炭素代謝、窒素代謝関連酵素活性との相関性

光合成炭素同化、及び無機窒素同化の初期過程の関連酵素の *in vitro* 活性を調べてみたが、生長曲線、あるいは光合成酸素発生、炭酸固定に見られたような 18 % の salinity をピークにした酵素活性の相違は認められなかった。細胞あたりのクロロフィルa量は 6 から 30 % で培養中変化がないので単位クロロフィルa当たりの値で表した今回の結果は単純に比較出来る。この結果、少なくとも光合成炭素同化及び無機窒素同化系の初期過程は salinity による影響を受けず、salinity に依存した増殖は光合成炭素同化及び無機窒素同化系の初期過程に関わる酵素の活性の制御によって説明されるものではないと考えられる。むしろ光合成電子伝達系に主に起因することが示唆される。

#### 5. 今後の課題

*H. akashiwo* では塩濃度に依存した増殖には還元力あるいはエネルギーの供給系の光合成電子伝達系が重要な一要因となることが示唆された。今回は salinity 6 % ~ 30 % (100 % 人工海水) で培養した細胞についてのみ調べたが、6 % より低い salinity で培養した細胞、また 30 % より高い salinity で培養した細胞も加え光合成電子伝達系に焦点を絞った検討が必要であろう。一方、細胞壁を持たない黄金色藻の *Pterioochromonas malhamensis* では salinity の変化により貯蔵物質である  $\beta$ -1,3 グルカンが分解され浸透圧調節物質のイソフロロリドシドが合成されることが知られている(2)。*H. akashiwo* も貯蔵物質として  $\beta$ -1,3 グルカンをもつので糖の合成系と salinity の関連性について調べる必要があると思われる。

#### 6. 参考文献

- 1) Gao, Y., Smith, G.J. and Alberte, R.S.: *Plant Physiol.* 103: 1437-1445 (1993)
- 2) Lobban, C.S. and Harrison P.J. eds. "Seaweed Ecology and Physiology" p.231, Cambridge Univ. Press, Cambridge (1994)
- 3) Nakamura, Y., Saji, H., Kondo, N. and Ikawa T.: *Plant Cell Physiol.* 35: 1185-1198 (1994)
- 4) Ramalho, C.B., Hastings, J.W. and Colepicplo, P.: *Plant Physiol.* 107: 225-231 (1995)
- 5) Takahashi, K. and Ikawa, T.: *Jpn. J. Phycol.*, 36:202-211 (1988)

Table 1. Effect of salinity on the various enzymatic activities related to the early stage of photosynthetic carbon and nitrate assimilations.

	Salinity		
	6 ‰	18 ‰	30 ‰
RuBP carboxylase	0.38 (1.10)	0.35 (1.00)	0.26 (0.76)
Phosphoglycolate phosphatase	0.17 (0.55)	0.31	0.26 (0.84)
Glycolate oxidase	0.038 (1.56)	0.025	0.015 (0.61)
Malate dehydrogenase	0.54 (1.65)	0.33	0.22 (0.67)
Nitrate reductase	0.10 (0.76)	0.14	0.14 (1.01)
Nitrite reductase	1.26 (1.19)	1.06	1.30 (1.23)
Glutamine synthetase	0.19 (1.14)	0.17	0.23 (1.37)
Glutamate synthase	0.041 (1.02)	0.04	0.043 (1.08)

All the enzymatic activities are indicated in  $1\text{U}\cdot\text{mg Chl a}^{-1}$ . The values in the parentheses are the relative activities to those of the cells grown in 18‰ salinity.



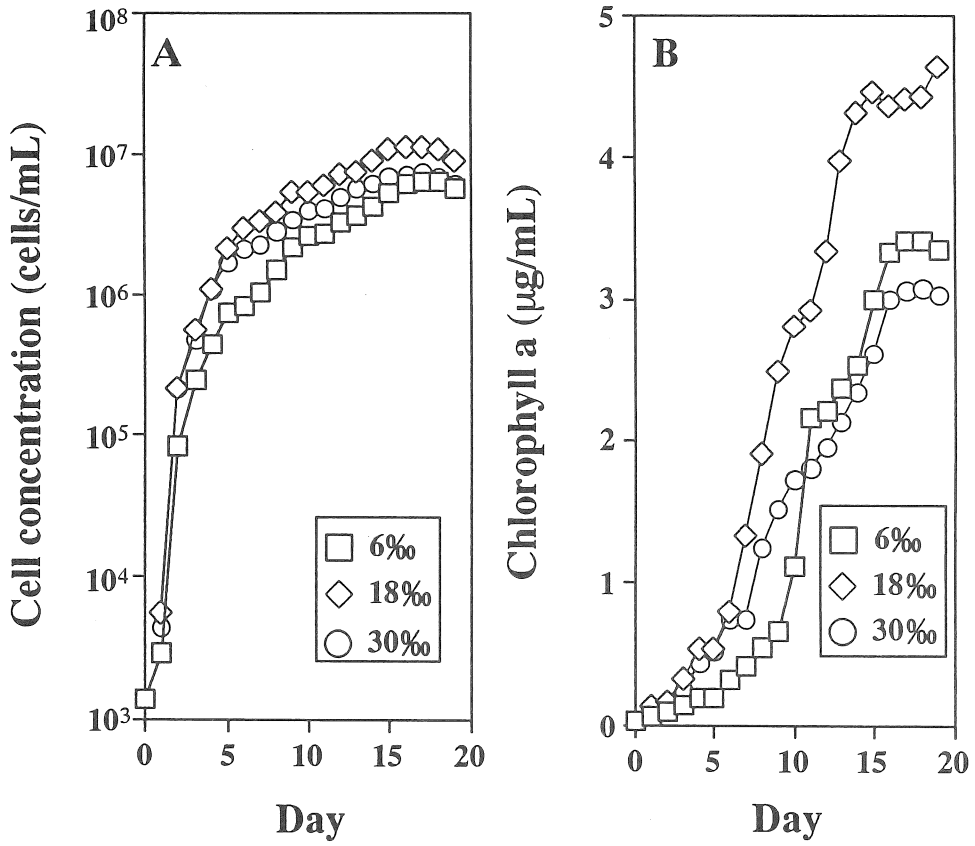


Fig 1. Effect of salinity of ESP media on the growth of the cells of *Heterosigma akashiwo*. Growth of the cells are indicated by the concentration of cell number (A) and chlorophyll a (B)

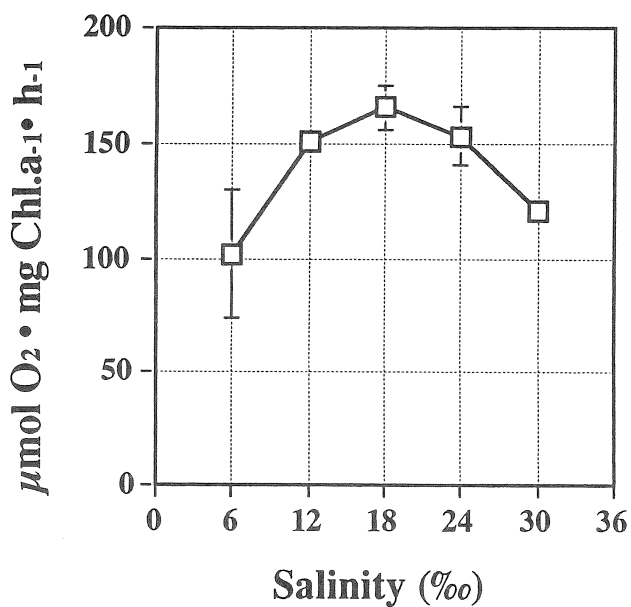


Fig 2. Effect of salinity of ESP media on the photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in *Heterosigma akashiwo*.

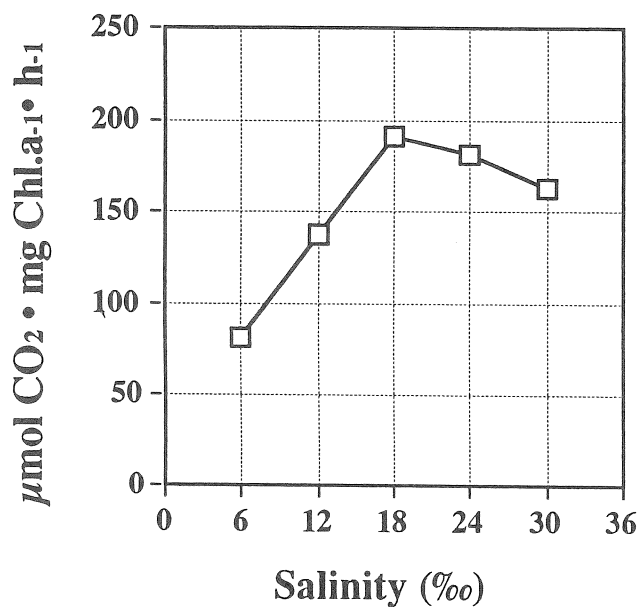
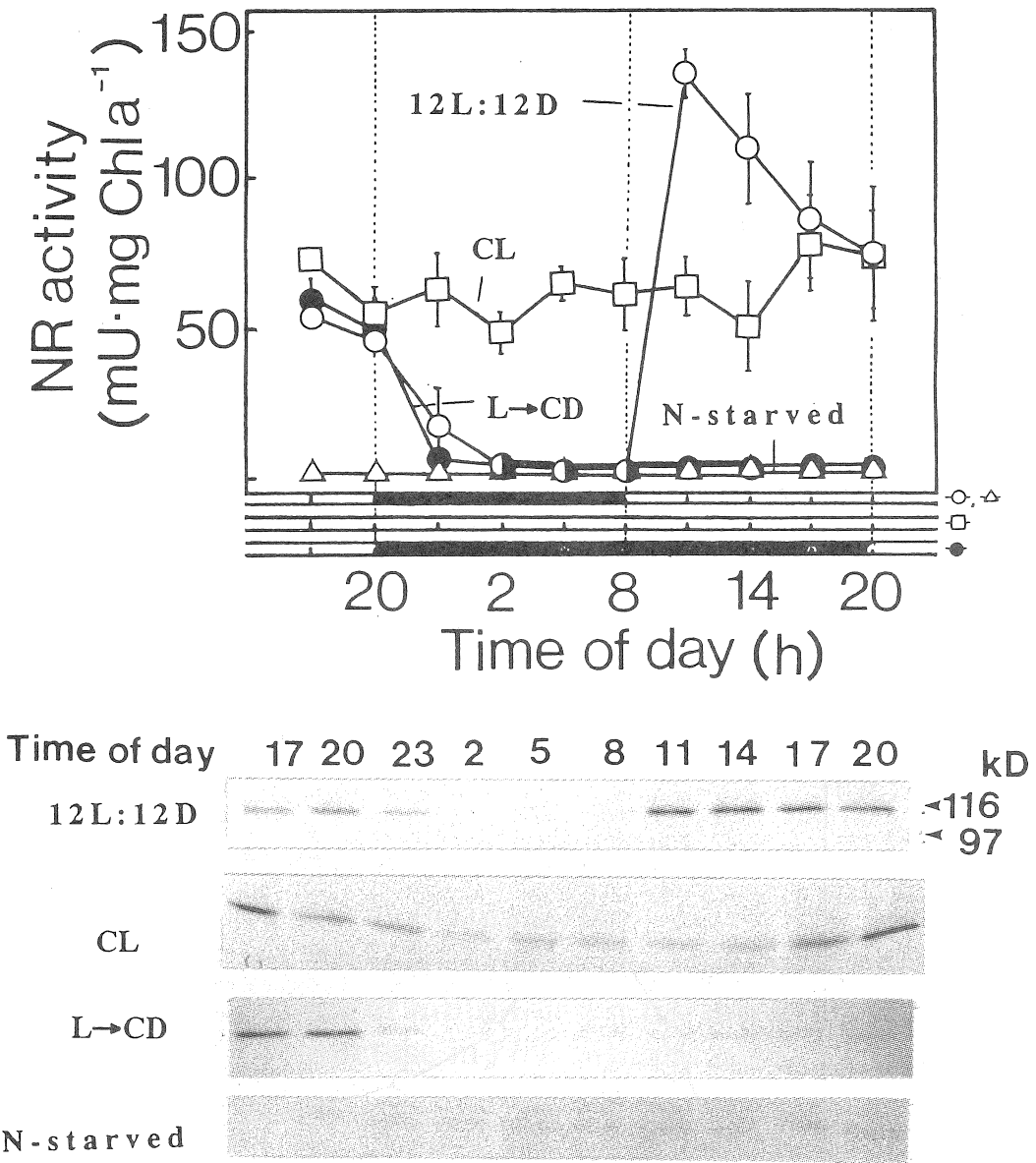


Fig 3. Effect of salinity of ESP media on the photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in *Heterosigma akashiwo*.



**Fig. 4 A** Profile of diurnal variation of nitrate reductase activity and its protein level under different light conditions in *Heterosigma akashiwo*. The standard light condition for the culture was 12 hour-light and 12 hour-dark (12L:12D). The cells grown under the standard light condition were transferred to continuous light (CL) or continuous dark (L→CD) and undertaken for the analyses. Light condition for the cells grown in a N free medium (N-starved) was the same as the standard.

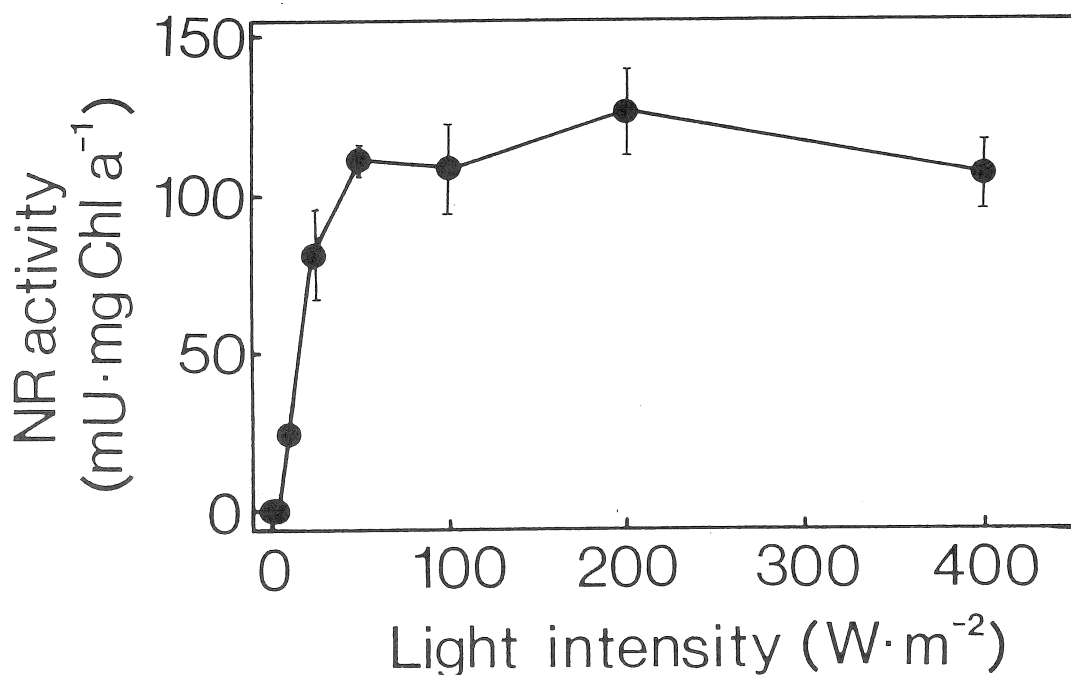


Fig. 5 Effect of light intensity on the induction of nitrate reductase in *Heterosigma akashiwo*.

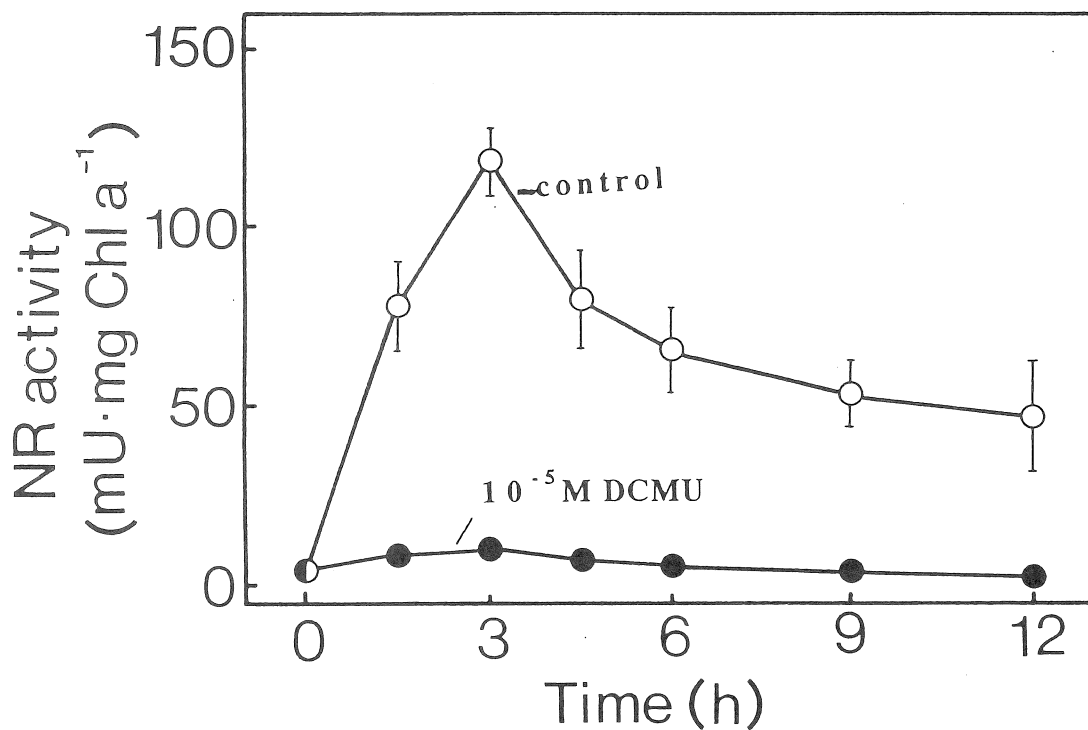
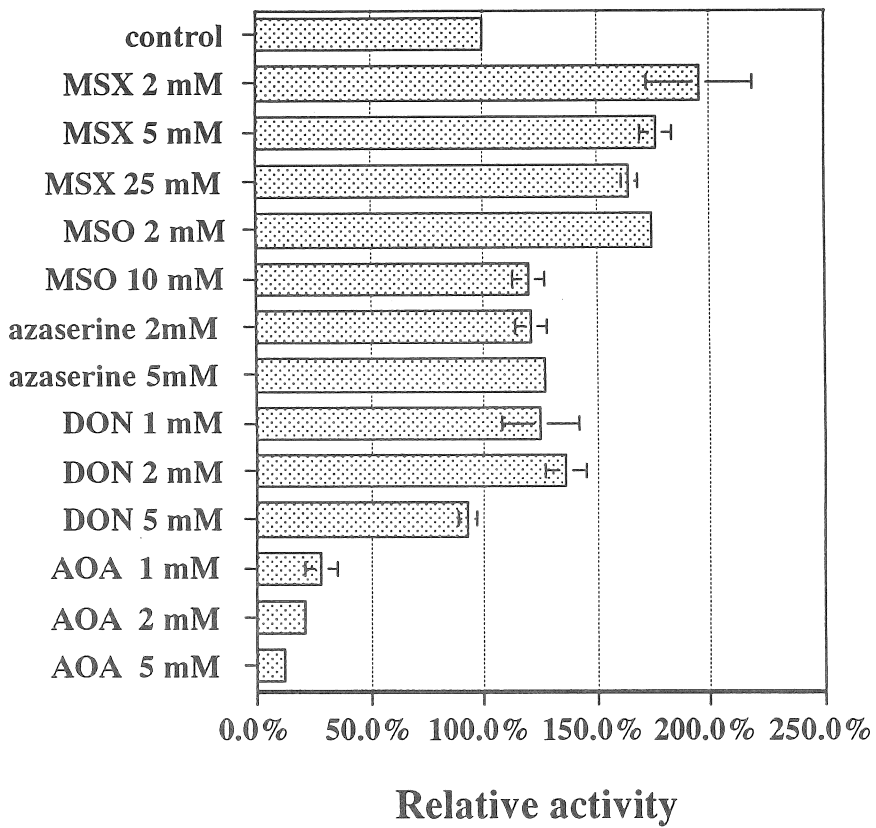


Fig. 6 Effect of DCMU on the induction of nitrate reductase in *Heterosigma akashiwo*.



**Fig. 7 Effect of inhibitors on the induction of nitrate reductase in *Heterosigma akashiwo*.**

**Physiological studies on the salinity-dependent growth of the red-tide  
flagellate *Heterosigma akashiwo*.**

**Tomoyoshi Ikawa**

**Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba**

**Summary**

The marine raphidophycean flagellate *Heterosigma akashiwo* is abundant in the temperate coastal water of Japan and known to be the dominant species in red tides. When considering the mechanisms of the occurrence of red tides, *H. akashiwo* can be a good model for the physiological studies. Moreover the laboratory-size culture of this alga is effortless compared to those of other red-tide species.

The growth was revealed to be affected with the salinity of media. The highest growth rate was given when the cells were grown in the medium with the salinity of 18 ‰. Simultaneously, the highest rates of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution and photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, 165 μmol O<sub>2</sub> • mg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 191 μmol CO<sub>2</sub> • mg Chl a<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively, were observed. Effect of salinity on the growth would partially be ascribed to its effect on photosynthesis.

The synthesis and degradation of the molecules of nitrate reductase that catalyzes the first step of nitrate assimilation were revealed to be regulated by light. Nitrate reductase was synthesized by light and completely degraded when the cells were transferred to darkness. The light intensity that was sufficient for the induction of nitrate reductase was comparable to those of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. The induction was completely inhibited by the addition of 10<sup>-5</sup>M of dichlorophenyldimethylurea (DCMU), an inhibitor of photosynthetic electron transport system. Clearly, photosynthetic carbon and nitrate assimilation pathways are synchronously operated in *H. akashiwo*.

Various enzymatic activities that compose C<sub>3</sub> photosynthetic carbon cycle and C<sub>2</sub> photorespiratory carbon cycle, TCA cycle, and nitrate assimilation pathway were not affected by alteration of salinity in culture media. Thus the effect of salinity on the growth of the cells of *H. akashiwo* would be attributed to photosynthetic electron transport system rather than any metabolic pathways that constitute early stage of photosynthetic carbon and nitrate assimilation.