

## 赤潮発生機作の解明とその対策に関する基礎生物学的研究

Basic studies on red tide growth and counterplans against its pollution

- 代表研究者 筑波大学生物科学系教授 藤 伊 正  
Prof. Institute of Biological Sciences, The Univ. of Tsukuba  
Tadashi FUJII
- 協同研究者 筑波大学生物科学系教授 猪 川 倫 好  
Prof. Institute of Biological Sciences, The Univ. of Tsukuba  
Tomoyoshi IKAWA
- 筑波大学生物科学系教授 千 原 光 雄  
Prof. Institute of Biological Sciences, The Univ. of Tsukuba  
Mistuo CHIHARA
- 筑波大学生物科学系助教授 原 慶 明  
Assoc. Prof. Institute of Biological Sciences,  
The Univ. of Tsukuba  
Yoshiaki HARA

The main results of the researches supported by the grant in the third year are summarized as follows:

(a) Effect of nitrogen starvation on photosynthetic carbon metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)

The distribution patterns of  $^{14}\text{C}$  during photosynthetic  $^{14}\text{CO}_2$  fixation were studied in nitrogen-enriched and -limited cells of the marine raphidophycean flagellate *Heterosigma akashiwo*. In addition, pulse-chase experiments were conducted under light and dark conditions.

In nitrogen-enriched cells, about 45% of the total fixed  $^{14}\text{C}$  was incorporated into 80% methanol-soluble  $\beta$ -1,3-glucans, which gradually increased during the chase in the light but decreased rapidly in the dark. In nitrogen-starved cells, on the other hand, 40% of the fixed  $^{14}\text{C}$  in mannitol attained a maximum stationary level (below 7%) in cells from both groups after 2 minutes of photosynthesis. These results suggest that the main storage product of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation in both nutrient conditions may not be mannitol, but the 80% methanol soluble  $\beta$ -1,3-glucans.

The nitrogen starvation leads to the activation of catabolic metabolism or dark respiration and to the depression of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation.

(b) The characteristics of photosynthesis and carbon metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)

The characteristics of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation were studied in the marine raphidophycean flagellate *Heterosigma akashiwo*. The rate of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation was saturated about  $150 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  and was not inhibited by higher light intensities at least up to  $500 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ .

Maximum rate of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation was about  $300 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mg Chl. a}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ . The rate was saturated at about 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  and half-saturation for  $\text{NaHCO}_3$  was about 0.1 mM. Time course of  $^{14}\text{C}$ -incorporation into photosynthetic products showed that 3-phosphoglycerate was the initial product, and 80% methanol-soluble  $\beta$ -1,3-glucans were the main reserve products of photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation. Pattern of dark  $^{14}\text{CO}_2$  fixation after preillumination also suggests that photosynthetic  $\text{CO}_2$  fixation in the alga may be carried out by the reductive pentose phosphate cycle ( $\text{C}_3$  cycle).

The effect of oxygen on the rate of photosynthetic  $^{14}\text{CO}_2$  fixation was also studied. The higher

rate was obtained under 2%  $^{14}\text{C}$ .

The rate under 100%  $\text{O}_2$  was 30% lower than that under 2%  $\text{O}_2$ . Under 100%  $\text{O}_2$  relatively low levels of intermediates of photorespiratory pathway such as glycolate, serine and glycine were accumulated.

These results indicate that *H. akashiwo* has high photosynthetic activity even under the conditions of high light, low  $\text{CO}_2$ , and high  $\text{O}_2$  concentrations.

(c) Presence of a  $\text{Na}^+$  activated ATPase in plasma membrane of the marine Raphidophycean *Heterosigma akashiwo*

Highly purified plasma membranes were isolated from *Heterosigma akashiwo* cells, a marine Raphidophycean unicellular biflagellate, by the silica microbead method, and the ATPase activity of the membranes was characterized. The ionic requirements and spectrum of effective inhibitors enable us to identify a novel  $\text{Na}^+$ -activated ATPase in the plasma membrane of this organism. Furthermore, we detected two phosphorylated intermediate forms of ATPases, with molecular weights of 150 kDa and 95 kDa as judged by acid SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of extracts of isolated plasma membrane.

The 150 kDa intermediate was phosphorylated in the presence of both  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$ , which the 95 kDa intermediate was phosphorylated in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  alone. Both were dephosphorylated in the presence of monovalent cations. These results indicate that the former intermediate was a  $\text{Na}^+$ -activated ATPase, similar to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase from animals, and the latter was similar to  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase from higher plants.

(d) Effects of *n*-alkylamines on the motility and viability of *Heterosigma akashiwo* cells

The cytotoxic effects of positively charged liposomes and their components on *Heterosigma akashiwo* cells were investigated.

Positively charged liposomes reduced cell motility and eventually caused cytolysis. Negatively charged and non-charged liposomes had little effect on cell motility and cell viability. Damage was also induced by a single application of some *n*-alkylamines. Among *n*-alkylamines tested, laurylamine ( $\text{C}_{12}$ ) was most effective in reducing motility and causing cytolysis of cells. The extent of the deleterious effects increased with increasing concentrations of laurylamine and with the duration of treatment. The extent of damage to cells by laurylamine changed periodically during the cell cycle. The effects of laurylamine began to increase at the fourth hour of the light period and began to decrease at the first hour of the dark period, under condition of 12 hours of light and 12 hours of darkness. Lauric and myristic acids, which each have a carboxyl group in place of the amino group of the corresponding alkylamines, laurylamine and myristylamine had little effect on the cells.

---

## 研究目的

赤潮は単なるプランクトンの異常増殖というだけでなく、社会活動の所産が沿岸水域に必要以上の負荷を与え、それが水域の自浄能力を越え、水質の富栄養化・汚染をもたらした結果といえる。

本研究は我が国だけでなく、世界的に赤潮として大規模な発生をすることが知られている鞭毛藻、*Heterosigma akashiwo* を材料として、この藻の増殖特性および行動習性を生理・生化学的・形態学的側面から追求し、その生活環を総合的に把握し、赤潮発生のメカニズムを探求するとともに生物学の基礎的研究の新たな実験系としての確立を目的とした。特に、助成3年目を迎えた本年度

は過去2年間の研究を総括し、今後の課題を抽出することも目的とした。

## 研究経過および研究成果

(A) 赤潮形成時に見られる急激な増殖の機構や同調的な細胞分裂、核分裂、日周鉛直移動習性など、明暗周期に関連した現象の機構解明の基礎的知見を得るため、この藻の光合成特性ならびに環境条件特に光および窒素源の供給量の変化に伴う光合成炭素代謝の変動などについて検討した。

ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* における光合成炭素代謝特性

海産ラフィド藻 *H. akashiwo* の光合成炭素固定活性は、最大約、 $300 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{Chl. a}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$

で他の近縁の藻類に比べ非常に高い活性を持つことが示された。また、この活性は  $500 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  以上の強光下でも阻害されず、無機炭素に対し比較的高い親和性を持つこと ( $K_{m_{app}}(\text{HCOO}^-) = 0,1 \text{ mM}$ ) が明らかにされた。光合成  $^{14}\text{CO}_2$  固定産物の経時的変化の解析から、光合成炭酸固定は炭素還元回路 ( $\text{C}_3$ ) によって行われ、主要な貯蔵産物として 80% メタノール可溶性の  $\beta$ -1,3-グルカンを生成することが示された。また、光合成炭酸固定に対する酸素の影響を調べたところ、本藻が昼間、海表面付近で活発な光合成を行うことによりもたらされると推定される低炭酸、高酸素環境下でも、十分高い光合成活性を保つ上で、非常に有利であると考えられる。

#### ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の光合成炭素代謝に及ぼす窒素欠乏の影響

海産ラフィド藻 *H. akashiwo* は、窒素源を除いて培養すると、硝酸塩を十分に与えて培養した細胞に比べ光合成炭酸固定速度が約 20% 低下する。 $^{14}\text{CO}_2$  固定産物の分析結果から、この低下は主として 80% メタノール可溶性  $\beta$ -1,3-グルカンへの取り込みの低下によることが明らかになった。さらに、5 分間光合成  $^{14}\text{CO}_2$  固定させた後  $\text{NaHCO}_3$  を加え、明および暗条件下で  $^{14}\text{C}$  化合物の変動を追跡した結果、硝酸塩を十分に与えて培養した細胞では、明条件下で追跡中  $\beta$ -1,3-グルカンへの  $^{14}\text{C}$  の取り込みが増加し、暗条件下では  $\beta$ -1,3-グルカンの  $^{14}\text{C}$  が減少し、脂質、アミノ酸、80% メタノール不溶性画分などへ  $^{14}\text{C}$  が移動した。しかし、窒素欠乏細胞では、明条件下でも  $\beta$ -1,3-グルカンの  $^{14}\text{C}$  は急激に減少するなど、暗条件下と同様に異化的代謝が活発に進行していることが示唆された。このことは窒素欠乏状態の進行に伴い呼吸活性が上昇することからも明らかにされた。以上の結果から、*H. akashiwo* において窒素欠乏状態は光合成炭素代謝の制御に重要な役割をもつことが明らかになった。

また、硝酸還元酵素 (NaR) に始まる一連の窒素代謝関連酵素 6 種について、光周期に伴う活性変化を調べた結果、NaR 活性の消長が鉛直移動の日周性と強い相関関係にあることが示されてお

り、現在アミノ酸代謝との相関について検討を行っている。

(B) 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* は植物細胞でありながら細胞壁をもたない。このことは、本藻が植物細胞の膜機能の研究に適した材料であることを示している。本研究ではこの藻のイオン吸収にかかわる膜タンパク質の同定とその特性について検討した。

#### 海産ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の細胞膜 ATPase の同定

細胞膜の単離、正に荷電させ直径 10~20  $\mu\text{m}$  のシリカマイクロビーズを細胞に吸着させ、ポリアクリル酸で電荷を中和した後、細胞を破碎し、遠心によりビーズの結合した膜画分を得た。 $^{14}\text{C}$ -Isouthionyl acetimidate で細胞膜表面をラベルし、上述した方法で得た膜画分におけるラベル量と各種オルガネラのマーカー酵素活性を測定したところビーズ法により細胞が高純度で単離されたことがわかった。

細胞膜 ATPase の特性：細胞膜画分の ATPase 活性に対する 2 価カチオンの効果は、 $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  であり、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下での一価カチオンの効果は、 $\text{Na}^+$  が最も高く、この ATPase が、動物の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の性質に類似していることが示された。この活性には、 $\text{Na}^+$  が必須であり、 $\text{Na}^+$  と他の一価カチオン両者の存在によってその活性がさらに増加した。 $\text{K}^+$  と  $\text{Na}^+$  を除く他の一価カチオンどうしの組合せでは、活性の増加はほとんど見られなかった。 $\text{K}^+$  と  $\text{Na}^+$  の至適濃度は、それぞれ 100 mM であった。至適温度および pH は、それぞれ 37°C と 8.0 であり、動物の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase に近い値を示した。この ATPase 活性は、バナジン酸により約 80% 阻害され、DCCD により 30% 阻害される。しかし、動物の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の特異的阻害剤ウアバインによっては、全く阻害されなかった。以上のことから *H. akashiwo* 細胞の細胞膜に存在する ATPase 従来植物および動物の細胞膜で知られている ATPase とは性質の異なる新しいタイプの ATPase であることが示唆された。

ATPase の同定： $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を基質とし、酸性

条件下で安定となる中間体を  $^{32}\text{P}$  で放射ラベルし、pH 2.4 の安定な条件下で酸性 SDS-PAGE にかけて、オートラジオグラフィーによって標識された中間体分子を同定した。Mg $^{2+}$ , Na $^{+}$  存在下で標識された中間体は、約 150 kD のタンパク質のみで、このリン酸化は、K $^{+}$  や cold の ATP の添加により激減した。さらに、cold のヌクレオチドの添加による脱リンは、ATP によって最も促進された。

Mg $^{2+}$  単独の存在下では、95 kD のタンパク質分子のみがリン酸化され、一価カチオンの添加により脱リン酸化された。以上のことから、*H. akashiwo* の細胞膜には 2 種の ATPase が存在し 150 kD のタンパク質は、動物細胞で報告されている Na $^{+}$ , K $^{+}$ -ATPase と酵素反応において相同であるが、中間体の分子量、ウアバイン非感受性など、際だった特徴をもつ新しいタイプの Na $^{+}$ , K $^{+}$ -ATPase であり、95 kD のものは、他の動物でみられる H $^{+}$ , K $^{+}$ -ATPase に近い性質を持つものと考えられた。現在、これらの ATPase の遺伝子をクローニングし、検討を進めている。

#### *Heterosigma akashiwo* 細胞膜に存在する NO $_3^-$ 誘導タンパクについて

植物は一般に N 源として NO $_3^-$  あるいは NH $_4^+$  を利用するが、いままでこれらイオンを細胞に取り込む機構についての詳細はわかっていない。

赤潮構成藻 *Heterosigma akashiwo* は N 源として NO $_3^-$ , NH $_4^+$  いずれをも利用して生育することができる。我々は NO $_3^-$  存在下でのみ、この藻体の細胞膜画分に出現する分子量 26 K のタンパク質を確認した。

細胞を NO $_3^-$  存在下で生育させ、出現してくる 26 K タンパク質を得、ポリクローナル抗体を作成した。培地中の N 源を NO $_3^-$  から NH $_4^+$  または、NH $_4^+$  から NO $_3^-$  と変化させ、SDS-PAGE, Western blotting により 26 K タンパク質の消長を調べた。このタンパク質は NO $_3^-$  存在下では細胞膜画分に特徴的かつ大量に存在するが、培地中の N 源を NH $_4^+$  に換えると、15-20 日後に減少する。一方、NH $_4^+$  から NO $_3^-$  に換えると、6-9 時間後に出現し、NO $_3^-$  誘導タンパク質であることが示唆

された。また、NH $_4^+$  存在下で生育させた場合にも、細胞密度が高くなり NH $_4^+$  濃度が低くなると誘導されることがわかった。このことは 26 K タンパク質が NO $_3^-$  誘導ではなく NH $_4^+$  で発現阻害のかかっているタンパク質であることを示しており、ラン藻で知られる NO $_3^-$  transporter と類似していることを示している。

(C) 赤潮発生の防除は社会的に重要な課題であることに着目し、本研究の一環として、その方策の検討を試みた。

#### 赤潮防除の一案—*n*-alkylamine による細胞破壊

*Heterosigma akashiwo* を含む数種の赤潮鞭毛藻は、明確な細胞壁構造を持たない細胞であることが知られている。本研究ではこの特性を利用して細胞を破壊させる方法について検討した。

正の電荷を持つリポゾームと融合した赤血球が、膜の脂質組成の変化により破壊されることが報告されている。我々は lecithin を成分とし、正の電荷を与えるため stearylamine を、負の電荷を与えるために dicetylphosphate を加えてリポゾームを作成し、*H. akashiwo* の培養液中に懸濁した。正の電荷を持つリポゾームを加えた場合にのみ、*H. akashiwo* 細胞は急速に運動性を失い、やがて破壊した。負の電荷を持つリポゾーム、lecithin だけからなる電荷を持たないリポゾームを添加した場合には運動性および生存率とともに変化は観察されなかった。この現象を定量化するために、*H. akashiwo* 細胞が明期に上昇運動を行うことを利用し、処理後、培養液上層部に存在する細胞数を計数して生存率とした。

正電荷リポゾームで引き起こされる運動性の低下、細胞破壊は stearylamine を単独で培養液中に添加した場合にも観察され、これらの現象は stearylamine が直接細胞に作用した結果であることが示唆された。

stearylamine を含む *n*-alkylamine の *H. akashiwo* 細胞に対する効果は炭素数 12 の laurylamine が最も強く 0.5  $\mu\text{M}$  で処理した場合、培養液上層部の細胞数は 20 分で 50% 以下となりやがて破壊した。

細胞表面は負に帯電しているために正の電荷を持つ *n*-alkylamine は容易に膜に結合し取り込まれるものと考えられる。細胞膜で laurylamine がどのような作用を持つかは今のところ不明だが、1) 膜表面の電荷を中和し、膜電位に依存した諸現象を阻害する。2) 脂質または機能タンパクと電気的あるいは化学的に結合し、その機能に変化をきたす、などの可能性が考えられる。いずれにしても赤潮藻が明瞭に海面近くに上昇する時を利用し、低濃度の laurylamine を処理して赤潮発生を防除できる可能性が示されたといえる。今後、laurylamine の他の生物に与える影響などを検討する必要がある。

#### 今後の課題と発展

3年間の助成期間中に赤潮鞭毛 *Heterosigma akashiwo* の分類学的位置を確立し、細胞および葉緑体の分裂特性、炭素代謝・窒素代謝の全容とその特性、日周的行動習性などを明らかにし、また、本藻が細胞膜を持たない特性を利用して、植物で始めて  $\text{Na}^+$ -activated ATPase の存在を示し、 $\text{NO}_3^-$  transporter の研究にも着手した。また、赤潮防除の一策についても考察した。現在の進歩した生物化学的手法によりこれらの問題も数年のうちにかんがりの解決を見ることができると

う。本藻は動物性、植物性両者を合わせ持つ細胞であるとも考えられ、生物学特に膜機能の研究実験系として優れたものであることも示すことができた。この系で得られる事実を素材として他の生物の機能解明にどこまで利用し得るかが今後の課題である。現在、この観点から他の藻類との類似を研究中であり、発展の見通しは明るい。

#### 発表論文

- 1) Takahashi, K. and T. Ikawa: The characteristics of photosynthesis and carbon metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *The Japanese Journal of Phycology*, XXXVI, No. 3, 202-211 (1988).
- 2) Takahashi, K. and T. Ikawa: Effect of nitrogen starvation on photosynthetic carbon metabolism in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *The Japanese Journal of Phycology*, XXXVI, No. 3, 212-220 (1988).
- 3) Wada, M., S. Satoh, K. Kasamo and T. Fujii: Presence of a  $\text{Na}^+$ -activated ATPase in the plasma membrane of the marine Raphidophycean *Heterosigma akashiwo*, *Plant Cell Physiol.* 30(6), 923-928 (1989).
- 4) Miyagi, N., E. Satoh and T. Fujii: Effect of *n*-alkylamines on the motility and viability of *Heterosigma akashiwo* Cells, *Plant Cell Physiol.*, 30(5), 637-642 (1989).