

淡水性および汽水性クロレラにおける 光合成活性の日周変化について

落合英夫[※]・田辺英彦[※]・中村英之[※]

Hideo OCHIAI, Hidehiko TANABE and Hideyuki NAKAMURA
Circadian Rhythms in Photosynthetic Activities of
a Limno Chlorella and a Hyphalmyro Chlorella

緒 言

自然環境条件下での藻類による光合成パターンの日周変化とそれに影響を与える因子の解析を進める目的で、宍道湖および中海より採取した淡水性および汽水性クロレラを用い、12時間ごとの明暗サイクルの下での培養によって示される光合成活性の変動パターンを調べた。光合成反応は一般に明反応（光還元反応）と暗反応（炭酸固定反応）に分けられるが、今回はこの両者について測定し、その相関性についても検討した。なおこの研究の一部は文部省特別研究「環境科学」A-1（課題番号203524）の科学研究費による。

実験材料と方法

供試クロレラは 1ℓ 容量の北東型フラスコにて表1の培養液を用い、温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ にて培養した。なお汽水性クロレラの培養液としてはこれに NaCl 10g を加えたものを用いた。光照射は植物栽培用ルミグリーン蛍光灯（三菱 FL-20SPG）6500 lux を12時間ごとの明暗サイクルにて行った。一般にクロレラの増殖のためには炭酸ガスを5%程度添加した空気を通気した方がよいとされている¹⁾が、今回は自然条件下での観測に近づけるという目的のために炭酸ガスの添加は行わず 900 ml/min/ 培養液 1ℓ で昼夜継続して通気した。

クロレラ菌体中のクロロフィルの定量には培養液 25 ml 中のクロレラを遠心して集菌し洗浄後、セルミル（MS 製パイブローゲン、0.5 mm ビーズ 34g 使用）にて80%アセトン 10ml とともに2分間破砕処理を行い濾過した。濾取したガラスビーズは80%アセトンで洗

Table 1. Culture Medium for a Strain of
Limno Chlorella

KNO ₃	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
MgSO ₄	0.25 g
FeSO ₄	0.05 g
Modified P ₁	1 ml
D. W.	1 liter (pH 4.8)

淨し、先の濾液とこの洗浄液を定容してから吸光度を測定し、MACKINNEY の式²⁾よりクロロフィル量を求めた。本法は従来の方法に比べて抽出効率、再現性、定量性において優れている。なお光還元活性、炭酸固定能の測定にはいずれも定常期に達した直後のクロレラを試料として用いた。

クロレラの光還元活性は 2.5ml のクロレラ生菌培養液に 25°C にて、電子受容体の添加なしで3分間 50,000 lux の光照射を行った際の酸素発生量を YSI 54ARC型溶存酸素計にて測定した。炭酸固定能の測定はクロレラ培養液をクロロフィル濃度が $5 \mu\text{g}$ 以下になるように希釈調整し、その 2ml に最終濃度 0.01M の炭酸水素ナトリウム（1 μCi の¹⁴C-NaHCO₃を含む）を加え、5分間 25°C にて 30,000 lux の光照射をした。これを直ちにミリポアフィルター HAWP 024 で濾過し、蒸留水 10ml で洗浄後乾燥してバイアルにとりこれにシンチゾル 5ml を加えて、Aloka LSC-602 液体シンチレーションカウンターにて測定した³⁾。なおブランクとしては試料をアルミホイルで包装遮光し、同時に併行したものを用いた。¹⁴C についての計数効率は88%であった。

実験結果

※ 生物化学研究室

図1は用いた淡水性、汽水性クロレラの成長曲線を示す。明暗サイクルの条件下では連続照射の場合と異なり淡水性、汽水性クロレラとも自ずと同調性を示すことがわかる。例えば汽水性クロレラの場合には、用いた実験条件下で種菌接種後5日目から8日目にかけて明確な第1回目のプラトーを生じ、その後第2回目の増殖を経て11日目より第2のプラトーに達している。淡水性クロレラの成長曲線に於ても本質的に同様なパターンが示されている。この事は自然環境下にあるクロレラも基本的には同様な生態を呈している事を暗示するものである。

自然環境下にあると同様に1日、24時間内において12時間ごとの明暗サイクルがくり返された場合には、興味あることにクロレラの光還元活性(酸素発生)は典型的な日周リズムを呈する。すなわち図2に示されたように淡水性クロレラの場合において比活性は、明サイクルが始まってから約2時間目までに急速に最高レベルに達し(約500 μ moles 酸素発生/mg クロロフィル/時間)、5時間目したがってちょうど正午に相当する時刻までに低下して午后は定常状態を呈する。光照射12時間すなわち夕ぐれに相当する時刻には活性は、更に低下して暗期に入ると同時に最低レベルに達し(約200 μ moles/mg クロロフィル/時間)この状態は次の明期まで続く。またこれに関連して炭酸固定能について調べた結果を図3に示している。最大活性が光照射3時間目に現われる点を除けば炭酸固定能も図2と非常によく似たパターンを示すことがわかる。これらの実験においては供試クロレラの濃度によって比活性の絶対値には多少の変動があるが、一般に稀釈が進むに従ってパターンはより鋭い日周リズムを示すことが認められている。自然条件下でのクロレラ濃度は実験に用いた濃度よりさらに低いことが考えられるので宍道湖における淡水性クロレラの光合成量も典型的な日周リズムを示しているものと考察される。

一方汽水性クロレラの光還元活性は図4ではクロレラ濃度が高いためか大きな特色を示していないが、しかし光照射時には高く暗期には低下していることが認められる。一方炭酸固定活性は図5に示される様に光照射6時間目まで大きく増大して、その後極端に低下してゆく。これらのパターンは淡水性クロレラと大きく相違する点である。

考 察

上述の様に淡水性および汽水性クロレラは実験室内の明暗サイクル条件下で、明反応である光還元活性(酸素発生)および暗反応である炭酸固定活性において、それ

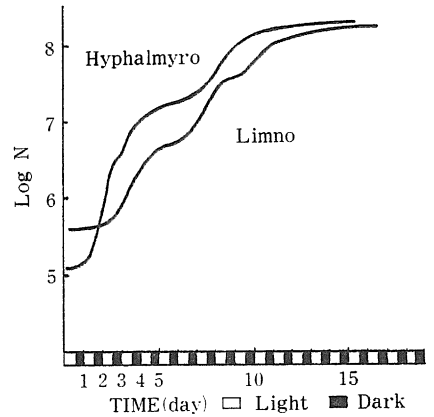


Fig. 1. Growth curves of a limno chlorella and a hyphalmyro chlorella

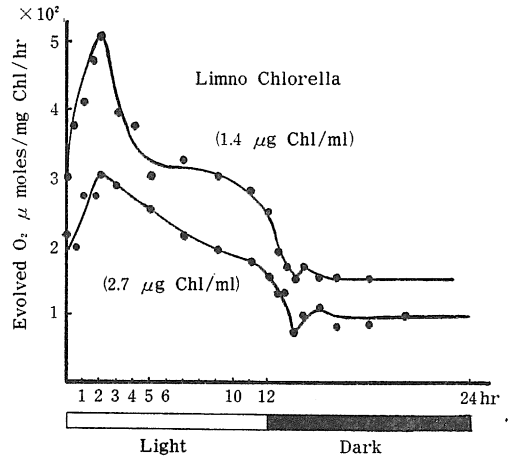


Fig. 2. Photoreductive activity of a strain of limno chlorella during day-night cycle

ぞれ明瞭な日周リズムを示すことが認められた。このようなパターンは昼と夜の明暗サイクルを持つ自然環境下にあるクロレラを初め広く光合成藻類に共通した現象と考察されることができよう。ちなみに一般に湖水現地における光合成量が午前中に高く、午后に低下するという測定結果や観察はこの事を裏づけるものであろう。このような湖水における測定に関しては現在までに月単位での光合成量の変動パターンの観察は多くなされて⁴⁾いる。一方時間単位における光合成活性の日周リズムについて調べられた報告の数は意外と少なく、その生理的意義に関する考察はさらに少ない。最近岡田らはオオハネモより単離した細胞抽出物の光合成活性(酸素発生)が12時間ごとの日周リズムを示すことを見出し、この際光合成リズ

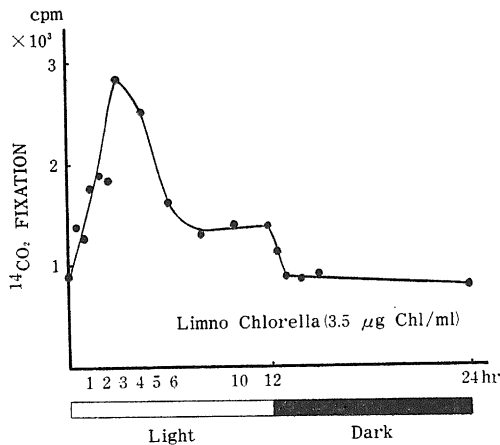


Fig. 3. CO₂-Fixation activity of a strain of limno chlorella during day-night cycle

ムは完全に葉緑体内在性の原因に支配されるものであって、他の細胞内器官の影響はうけないと考察し報告している。⁷⁾

光合成は前述の様に明反応と暗反応に分けられるが、生体内では両者は緊密な調節の下に活性の制御が行われているものである。我々の実験からもとくに淡水性クロレラにおいてその相関性が非常に高いことが示された。この意味でこの種の淡水性クロレラは日周リズムの生化学的研究を進めるにあたっての興味ある研究材料となりうるものであろう。明反応に対する光エネルギーの調節点については現在なお詳らかでない点が多いが、暗反応に関しては例えば光照射によって葉緑体内部に還元性物質の濃度が高まり、また Mg⁺⁺ や H⁺ のイオン濃度が変動することによって、炭酸固定に関与する多くの酵素の活性が抑制あるいは促進されることが知られている。⁸⁾ また最近 SINENSKY は培地中に 0.5% のグルコースを与えた場合、明所でのクロレラの光還元活性は 72% に低下するのに対し炭酸固定能は 21% にまで低下することを認めている。⁹⁾ またここで見られたように淡水性クロレラと比較して汽水性クロレラの光合成活性のリズムに対して NaCl のイオン強度は、どの様な作用機作で影響を与えているのであろうか。この様に日周リズムの生因には単に光のみではなく他の多くの環境因子も関与しているのであろうが、これらの因子がどの様な機構でどの様な影響を与えるのかを知ることは、単に生化学的研究課題であるだけでなく、藻類の増殖、異常増殖の機構を解明する手段の一つとして、今後の重要な環境科学的研究課題でもあろう。

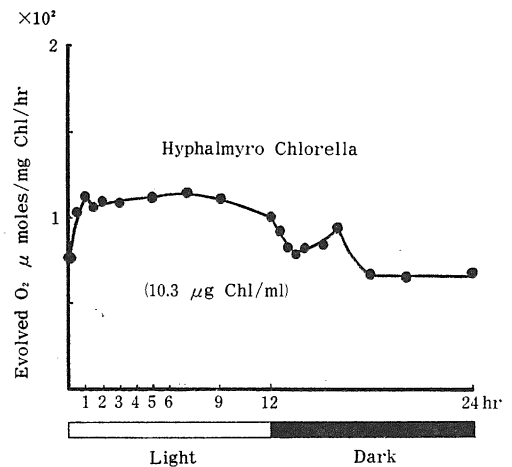


Fig. 4. Photoreductive activity of a strain of hyphalmyro chlorella during day-night cycle

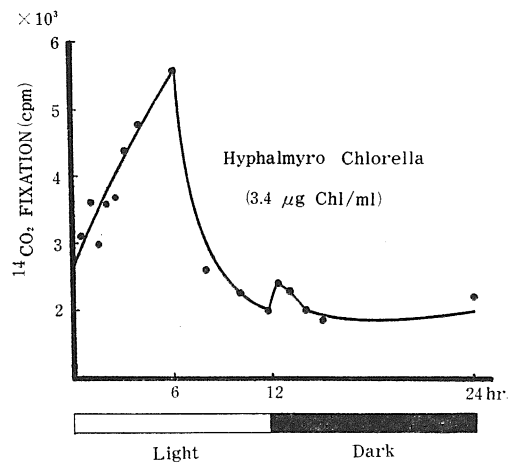


Fig. 5. CO₂-Fixation activity of a strain of hyphalmyro chlorella during day-night cycle

要 約

1. 淡水性、汽水性クロレラともその光還元活性（明反応）は明サイクルが始まってから約 1～2 時間目までに急速に増大して最高となり、その後一旦低下して定常状態を経るが時期に入ると再び急速な活性低下を示す。淡水性では最高値は最低値の 3 倍であり、汽水性での最高値は最低値の 2 倍であった。
2. 淡水性クロレラの炭酸固定能は光照射開始後 3 時間に、暗期での値の約 3 倍に増大するが 6 時間目までにその約 1/2 にまで低下して定常状態を示す。さらに暗期に入ると同時に再び急速に低下して最大活性時の 1/3 となる。

そしてこの低活性状態は次の明期まで維持される。

3. 汽水性クロレラは光照射開始後6時間目までに連続的な活性上昇を示すがその後急速に活性は低下する。明期の最大活性が暗期での活性の約3倍であることは淡水性クロレラの場合と同様である。
4. 以上の結果からクロレラでは1日の明暗サイクル条件下においては光照射後の初期(午前中)に急速な光合成能力の高まりがあり、その後午后に低下するという明確な日周的代謝リズムが存在することが明らかにされた。

参 考 文 献

1. 田宮 博・渡辺 篤：藻類実験法 南江堂 東京 46-67, 1965.
2. MACKINNEY, G. : J. Biol. Chem. **140** : 315-322, 1941.
3. 草間慶一：トレーサー実験法上(山川民夫編 生化学実験講座6) 東京化学同人 東京：125-140, 1977.
4. 有賀祐勝：水界植物群落の物質生産Ⅱ—植物プランクトン—(生態学講座 8) 共立出版 東京 39-63, 1973.
5. SWEENEY, B. M. : TUFFLI, C. F. Jr and RUBIN, R. H. : J. Gen. Physiol. **50** : 647-659 1967.
6. SCHWEIGER, E., WALLRAFF, H. G. and SCHWEIGER, H. G. : Science **146** : 658-659 1964.
7. OKADA, M., INOUE, M. and IKEDA, T. : Plant & Cell Physiol. **19** : 197-202 1978.
8. 柴田和雄：物質代謝とその調節Ⅰ(佐藤 了, 西塚 泰美編 岩波講座 現代生物科学5) 岩波書店 東京：126-134, 1974.
9. SINENSKY, M. : J. Bacteriol. **129** : 516-524 1977.

Summary

Two strains of chlorella were isolated from Lake Shinji (limno) and Nakanoumi (hyphalmyro), respectively, and cultivated under the laboratory condition (temp. 25°C, aeration of 900 ml/min/l and 6500 lux illumination). Changes in the photoreductive activities of both strains were investigated to elucidate the phase of photosynthetic amount in the limno and hyphalmyro areas. The both strains showed specific circadian rhythms in the photoreductive activities under the regime of light-dark cycle (12 hr each). In 2 hr after the illumination, the activity of the limno chlorella was rapidly enhanced to a maximum value (about 500 μ moles O₂ evolved/mg chl/hr) and decreased with continuous illumination for 4 hr (corresponding to noon). In the afternoon the photoreductive activity was maintained at a level as much as 300 μ moles O₂ evolved/mg chl/hr. At early night the activity decreased further downhill by a level as much as 200 μ moles O₂ evolution. The activity of the chlorella was kept at the low level at night.

The activities of CO₂-fixation of both strains were also investigated. It is noteworthy that the both chlorella showed specific circadian rhythms in the CO₂-fixation, similar to the circadian rhythms in the photoreductive activities. The CO₂-fixation activity of a limno chlorella was rapidly enhanced to a maximum value in 3 hr after the illumination and then decreased with continuous illumination in 6 hr. In the afternoon the CO₂-fixation activity was maintained at a steady level. On light-off, the activity decreased further downhill by a level of about one third of the maximum value. During the darkness the activity was kept at a constant low level.

In a hyphalmyro chlorella, the maximum value of the activity was observed at 6 hr after the light-on, and then the activity decreased rapidly by the low level which was maintained during the night.