

好温性ラン藻イデュアイミドリ (*Mastigocladus laminosus*-MS*) の特性—その環境科学的意義—

落合 英夫・沢 嘉弘・加藤 崇・金山 一美

Hideo OCHIAI, Yoshihiro SAWA, Takashi KATO and
 Kazumi KANAYAMA

Characteristics of a Strain of Thermophilic Blue-Green
 Algae, *Mastigocladus laminosus*-MS*—Significance
 from the Viewpoint of Environmental Science—

結 言

われわれは植物性プランクトン、緑藻類、ラン藻類の増殖因子等について検討している過程において、好温性ラン藻の一種イデュアイミドリ (*Mastigocladus laminosus*-MS) が、生菌のままで光還元活性を示し、また exogenous な ADP の存在下において光リン酸化的に生成した ATP を培地中に分泌蓄積するという極めて特異的な性質を示すことを見出した。このような性質が他の藻類について報告された例はなく、したがってこのような特性の発見は湖沼における植物プランクトン相互間の生理生態系の考察に関して新たな問題を提起することになるかもしれない。以下にこのラン藻イデュアイミドリ-MS の光化学特性について報告し、とりわけその環境科学的意義について考察を試みたい。なおこの研究の一部は文部省特別研究「環境科学」R-12 (課題番号 403071) の科学研究費によった。

実験材料と方法

好温性ラン藻イデュアイミドリ (*Mastigocladus laminosus*-MS) は松江温泉の泉源近くより単離された。表 1 は松江温泉水の成分表である。ホウ酸含量が高い

略号 DPIP, 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール
 DCMU, [3(3'4'-ジクロロフェニル)]-1, 1-ジメチル尿素
 PMS, 5-メチルフェナジニウム, メチル硫酸塩
 NBT, ニトロブルーテトラゾリウム

* MS は松江温泉より単離された一菌株であることを示す。

** 生物化学研究室

(50 ppm 以上) ことはこの泉水の特徴である。なおこの資料は島根県衛生公害研究所より提供されたものである。泉源における泉温は 75.7°C, pH 8.04, 比重 1.0014, 蒸発残留物 208 ppm, 含ホウ酸フッ素石コウ一食塩泉 (低張緩和性高温泉) と表示されている。

Table 1. Analytical Data of Matsue Hot Spring Water*

Anions		Cations	
Cl ⁻	553.8	K ⁺	13.78
SO ₄ ⁻⁻	732.8	Na ⁺	507.3
HCO ₃ ⁻	70.85	Ca ⁺⁺	127.8
CO ₃ ⁻⁻	0.210	Mg ⁺⁺	3.917
HSiO ₃ ⁻	1.260	Fe ⁺⁺	0.100
SiO ₃ ⁻⁻	0.000	Acid Contents (ppm)	
AsO ₂ ⁻	0.013	H ₂ SiO ₃	61.09
BO ₂ ⁻	3.135	HBO ₂	53.49
F ⁻	4.823	HAsO ₂	0.217

* Analyzed by the Sanitary Institute of Shimane Prefecture on the 17th of Dec. in 1971.

採取されたラン藻はこの松江温泉水を基本培地とし、泉水 1 l あたりに KNO₃ 1g, K₂HPO₄ 0.02g, MgSO₄ · 7H₂O 0.025g, FeSO₄ 0.005g を添加し, KH₂PO₄ で pH 8.0 に調整した培養液中に藻体を懸濁し, 培養温度 47 ± 2°C, ルミグリーン (三菱蛍光灯 FL-20SPG) 2000ルクスの連続的光照射, 毎分 1.5 l の通気条件下に

おくことによって容易に増殖させることができる¹⁾。このさい培地中に雑菌の混入は全く認められない。これは培養が高温下であること、本質的に autotrophic であり培地中に栄養源となる有機物質を含まぬこと、および非生理的な高濃度のホウ酸の存在下で進められるため²⁾と考えられる。一方人工培地として例えば Gerloff-Fitzgerald-Skoog 培地あるいは Fitzgerald 改変培地³⁾に少量のホウ酸を加えたものを用いて、本ラン藻を培養することもできるが、増殖程度は温泉水培地の場合より低くなる傾向がある⁴⁾。

ラン藻の同定は顕微鏡による形態学的な観察および色素分析の結果に基づいて行なわれた。このラン藻は幅 1~2 μ m、長さ数 μ m の細胞がフィラメント状に連なっており、ところどころに分枝構造が見られることがある⁵⁾。用いた実験条件下ではヘテロシストに相当するものは観察されなかった。色素分析の結果、主要な脂溶性色素としてはクロロフィル a (クロロフィル b は含まれない)、 β -カロチンが含まれ、水溶性色素タンパク質としてフィコシアニンが含まれている。このラン藻のフィコシアニンは、生菌懸濁液を激しく攪拌することによって溶出してくる性質がある⁶⁾。

ラン藻の活性測定にさいしては、まず培養液をナイロン布で濾過して、布上に集菌したラン藻藻体を蒸留水にて水洗しつつ、やわらかい絵筆でほぐしてから、一旦遠心操作により洗浄集菌し、これを反応液に加えて懸濁液とした。上記のように本ラン藻は生菌のまま光還元活性、光リン酸化活性を測定することができる。光還元活性の測定はいずれも 40°C、20,000ルクスで行なった。

光化学系 I (PS-I) 活性測定¹⁾

PS-I 活性は Epel and Neumann らの方法に準じ生菌懸濁液を用いて測定した。反応液の組成は以下の通りである。リン酸緩衝液 (pH 8.0) 380 μ mol, アスコルビン酸ナトリウム 50 μ mol, DPIP 2.5 μ mol, メチルピオローゲン 1 μ mol, DCMU 30 nmol, NaN₃ 10 μ mol、および約 40 μ g のクロロフィルに相当する生菌懸濁液 1.2 ml, 全量 10 ml。これを暗所で 10 分間ブレインキューベーションし、さらに 1 分間暗所で空気を吹込んだ反応混合液に照射を行ない、反応液中の溶存酸素の減少を YSI 溶存酸素計により追跡定量した⁷⁾。

光化学系 II (PS-II) 活性測定¹⁾

PS-II 活性の測定は Katoh and San Pietro らの方法に準じた。反応液の組成は次の通りである。リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 μ mol, DPIP 0.5 μ mol および上記のラン藻懸濁液 0.5 ml, 全量 5.0 ml。この反応混合

液を暗所にて 10 分間ブレインキューベーション後一定時間照射した。照射後、遠心操作にて菌体を除去し、その上澄液について DPIP の光還元に基づく 610 nm の吸光度の減少を定量した。このさいアルミフォイルで完全に遮光した同じ反応混合液を同時に併行させ比較標準試料とした。

光リン酸化活性測定⁹⁾

光リン酸化反応の基本反応システムは以下の通りである。トリス緩衝液 (pH 8.0) 150 μ mol, MgCl₂ 30 μ mol, KH₂PO₄ 30 μ mol, ADP 6 μ mol, PMS 40 nmol および約 10 μ g のクロロフィルに相当する生菌懸濁液を加えて全量 3.0 ml。上記混合液を暗所、45°C にて 10 分間ブレインキューベーションした後、同温下で 10 分間 65,000ルクスの照射を行なった。反応後遠心分離機にて菌体を沈澱除去し、その上澄液について生成した ATP を 2 種類の方法により定量した。

(その 1) : Asada らの方法に準じ基本反応液に 1 μ Ci の ³²Pi を加えて反応後、生成した ATP を未反応リン酸と分離抽出し、ATP 中にとりこまれた ³²P の放射活性をチェレンコフ発光法により Aloka 液体シンチレーションカウンター LSC-602 を用いて計測した。このさいブランクとして、ADP を含まぬものおよび/または照射のみ行なわないものを併行させた。

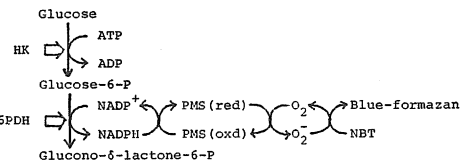


Fig. 1. Principle of ATP Determination with HK and G-6-PDH

(その 2) : この方法は図 1 に示すように酵素法に基づくものである。すなわち生成した ATP は、ヘキソキナーゼおよびグルコース-6-リン酸脱水素酵素の存在下で NADPH に転換され、この NADPH は PMS、溶存酸素の存在下で自発的に O₂⁻ に導かれる。O₂⁻ は直ちに NBT を還元し、ここで生じた還元型 NBT すなわちブルーフォルマザンの量をトリトン X-100 の存在下、560 nm の吸光度測定によって求めた。この方法では放射性 ³²P を用いる煩雑さを避けることができるだけでなく、NADPH による定量法より感度が約 2 倍も高く、かつ迅速な ATP 定量に適している。ただし実験においては既知の ATP 標準試料を同時に併行し、必要に応じて補正を行なった。反応システムは表 2 の通り

Table 2. Assay System of ATP Determination with Hexokinase and G-6-PDH

Tris-HCl buffer (pH 7.5)	108 μ mol
MgCl ₂	20 μ mol
NADP	1 μ mol
PMS	0.2 μ mol
NBT	0.1 μ mol
Glucose	150 μ mol
Triton X-100	0.15 %
hexokinase	1.80 U/ml
G-6-PDH	462 mU/ml
Sample	
Total 3.0 ml	

である。反応時間は室温で10分間である。なお（その1）、（その2）の方法は何れも完全に比例関係にある。

クロロフィルの定量ではまず生菌をテフロンホモジナイザーで摩砕後、80%アセトンで処理し、Mackinney¹¹⁾の方法により吸光度測定を行なって求めた。

実験結果と考察

表3にイデユアイミドリ-MS 生菌の光化学活性を示す。

Table 3. Photosystem Activity of the Thermophilic Blue-Green Algae in Intact Cells

Reaction	Specific Activity*
PS-I	446
PS-II	332
" (+DCMU 3 μ M)	0
NADP ⁺ Reduction (H ₂ O→NADP ⁺)	0

* electron, μ equivalent/mgChl.per hr

表よりこのラン藻生菌が、高等植物の葉緑体標品と同じ程度の光還元活性を有していることがわかる。PS-II活性が3 μ MのDCMUの共存下で完全に押えられることもホウレン草の葉緑体標品の場合と全く同じである。なお表に記したように常法により測定した結果、生菌でのNADP⁺還元活性は全く見出されなかった。

このようにラン藻が生菌状態でexogenousに与えられた電子受容体—このさいにはメチルピオローゲンおよびDPIP—を光生化学的に還元することができるという事実は、当然、自然環境下においてもこのような形で

環境物質の還元が行なわれうることを示唆するものであろう。このような性質は現在までに報告された例がなく、ちなみに生物化学研究室にて保存していたラン藻*Plectonema* sp. および *Anacystis* sp. さらに緑藻 *Chlorella* について調べた結果、生菌状態ではPS-I、PS-II活性は何れも検出されなかった。

したがってこの好温性ラン藻イデユアイミドリ-MSは、極めて特殊な細胞壁、細胞膜構造を有しているものと考えられる。このことはこのラン藻が、現代生化学の中心課題の一つとなっている「膜透過」の研究のための一つの恰好な実験材料となりうることを示唆する。しかしいずれにしても、このような膜機能をもった藻類、植物プランクトン類は他にも存在する可能性は十分考えられ、それらが環境物質の光生化学的酸化還元に関与するということもありうるからには、今後このような観点からの調査研究も必要であろう。

Table 4. Photophosphorylation Activity of the Intact Blue-Green Algal Cells

System	Specific Activity*	Relative Activity
Complete	37.6	100
-ADP	0	0
-PMS	13.2	35
-Light	0	0

μ mol ATP formed/mgChl.per hr

表4はイデユアイミドリ-MS 生菌の光リン酸化活性の測定結果である。

表より exogenous な ADP の存在しない時および光照射のない時には、全く ATP 生成は認められないことがわかる。光化学系 I における循環的電子運搬体 PMS を除去すると ATP 生成は約3分の1に低下する。このことはこの ATP 生成が主として循環的光リン酸化反応に依存するものであることを示すものである。

表5の結果はこのことを確認したものである。

Table 5. Effect of DCMU on ATP Accumulation

	ATP Accumulation S. A ^{a)} (%)		PS-II ^{b)}
Control	32.6	100	332
+DCMU (10 μ M)	26.5	81.3	0

a) μ mol ATP formed/mgChl.per hr

b) electron, μ equivalent/mgChl.per hr

反応系に 10 μM の DCMU を添加した場合には、ラン藻の PS-II 活性は完全に消失するが、ATP 生成能は80%近く保存されている。すなわち少なくとも PMS 存在下では PS-I を中心とした循環的光リン酸化反応が主反応である。ところでラン藻細胞における光電子伝達系の詳細は、正確にはなお不明な点も多いが、現在のところ、高等植物のものに類似していると考えられている。さらにラン藻細胞内のチラコイドにおいては光電子伝達系と呼吸電子伝達系とが交錯しているとも言われている¹²⁾。このような機構がこのイデユアイミドリ-MS 細胞においても存在しているとすれば、DCMU の存在下で PS-I に供給される電子の供与体として多種類の細胞内還元性物質—例えば呼吸系より生成される NADH など—を考慮することができよう。

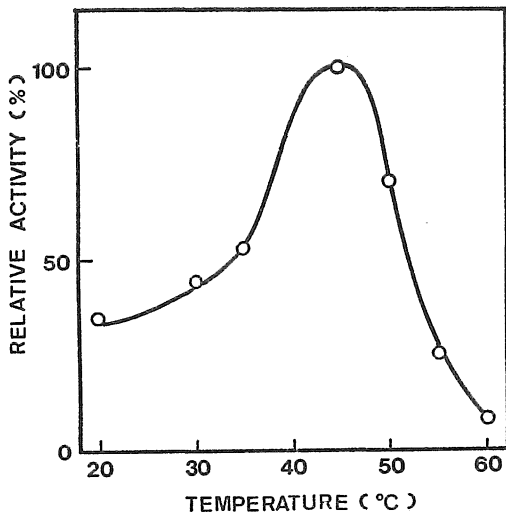


Fig. 2. ATP Accumulation by the Intact Cells at Various Temperature.

図2は反応温度との関係を調べたものである。生菌の培養温度は47°Cであるが ATP 生成もやはり45°C附近が最適であることを示している。この高温側での ATP 収量の低下傾向はこのラン藻の PS-I の耐熱性プロフィールよりもむしろ PS-II のそれと相似している。しかしこの実験結果を、表4、表5の結果と共に考察すると、循環的光リン酸化系のうち ATP アーゼ系機能の耐熱性プロフィールが PS-II のそれに近いことを示唆しているものであろう。

表6は ATP 生成に対する各種緩衝液の効果を調べたものである¹³⁾。

いずれの場合も緩衝液濃度は 50 mM, pH 7.5, プレインキューベーション時間10分、そして光照射時間10分で

Table 6. Effects of Various Buffer Reagents on ATP Accumulation

Buffer	Specific Activity*	Relative Values
None (medium)	53.5	1.00
Tris-HCl	78.6	1.47
Tricine-NaOH	103.0	1.93
Tris-malate-NaOH	141.5	2.64
K-Phosphate	72.6	1.36
Borate	161.4	3.02

* μmol ATP formed/mgChl. per hr. Each buffers were used at 50 mM (pH 7.5). The reaction mixture was preincubated for 10 min in the dark before 10-min illumination.

の測定結果である。全く緩衝液を含まない培地のみでの生成率を1として他の緩衝液効果を比較表示している。有機性、無機性を問わず緩衝作用物質の共存によって、ATP 蓄積能が上昇することは興味深い。とりわけホウ酸緩衝液の存在によって ATP 分泌能が異常に高まる事実は注目に値する。これらの結果は緩衝作用物質によって、イデユアイミドリ-MS の膜透過系が影響をうけたためと考察される²⁾。この点に関しては目下検討中である。いずれにしても細胞外のいわゆる環境物質によって、このように ATP 生成機構、そして分泌機構が大きく影響されるということは、その菌体自身の生育・増殖に対してのみならず、共存する他種の藻類、植物プランクトン類の生理生態にも大きな影響を与えることになりうると考察される。

以上のように今回われわれは、好温性ラン藻イデユアイミドリ-MS について、このものが生菌の状態で環境物質を光生化学的に還元しうること、また exogenous な ADP の存在下で光リン酸化的に ATP を生成し、これを細胞外に分泌蓄積する性質のあることを認めた。この種の性質は前例のない特殊なものであるとはいえないながらも、決してイデユアイミドリ-MS にも限られたものではないであろうし、また分泌しうる物質も決して ATP のみに限られたものではないであろう。いずれにしても環境物質のこのような形での酸化還元反応、リン酸化反応等がおこるといことは、自然環境条件下、とりわけいろいろな種類の藻類、プランクトン類の共存状態での生態系の推移、異常増殖の動的因子などを考えていく上で、見逃すことのできない問題点として認識しておかねばならないであろうし、このような観点からの今後の幅広い調査研究が待たれるゆえんである。

松江温泉源より採取された好温性ラン藻イデユアイミドリ-MS は生菌の状態、光化学系 I, 光化学系 II の活性を示す。すなわち細胞外の電子受容体を光生化学的に還元する性質を有する。またこのラン藻は exogenous に与えられた ADP を光リン酸化的に ATP として細胞外に分泌する性質を有している。しかもこの性質は培地中に存在する緩衝作用物質の種類によって、大きく影響されるということが認められた。これらの現象はラン藻 *Plectonema* sp., *Anacystis* sp. および緑藻 *Chlorella* では観察されなかったけれども、さらに他種の藻類、植物プランクトン類の中には、イデユアイミドリ-MS と同様な性質を持つものもあることが予想され、したがって自然条件下でも積極的な環境物質の光生化学的酸化還元反応、リン酸化反応などが起されていることも考慮しなければならないであろう。すなわちイデユアイミドリ-MS で見出された特性は環境動態の諸因子の一つとして認識されなければならないと思われる。

参 考 文 献

1. OCHIAI, H., SHIBATA, H., SAWA, Y., and KATO, T. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77** : 2442-2444, 1980.
2. 高井康雄・早瀬達朗・熊沢喜久雄 : 植物栄養土壌肥料大事典 養賢堂 東京 : 123-125, 1976.
3. 田宮 博・渡辺 篤 : 藻類実験法 南江堂 東京 : 85-86, 1965.
4. 落合英夫・清家弘規 : 未発表
5. FOGG, G. E., STEWART, W. D. P., FAY, P. and WALSBY, A. E. : The Blue-Green Algae Academic Press, London : 278-280, 1973.
6. 橋ノ口賢二・林 伸一・落合英夫 : 日本農芸化学会 関西・西日本支部合同大会報告, 農化 N199-200, 1978.
7. EPEL, B. L. and NEUMANN, J. : Biochim. Biophys. Acta, **325** : 520-529, 1973.
8. KATO, S. and SAN PIETRO, A. : Arch. Biochem. Biophys., **118** : 488-496, 1967.
9. SAWA, Y., KANAYAMA, K. and OCHIAI, H. : Agric. Biol. Chem., **44** : 1967-1969, 1980.
10. ASADA, K., TAKAHASHI, M. and URANO, M. : Anal. Biochem., **48** : 311-315, 1972.
11. MACKINNEY, G. : J. Biol. Chem., **140** : 315-322, 1941.
12. 藤田善彦 : 光合成の機作 (蛋白質 核酸 酵素 別冊 第21号) 共立出版 東京 : 214-224, 1979.
13. 沢 嘉弘・金山一美・落合英夫 : 日本農芸化学会 昭和55年度大会 講演要旨集 : 384-385, 1980.

Summary

A strain of thermophilic blue-green algae isolated from Matsue hot springs, *Mastigocladus laminosus*-MS, exhibited both photosystem I and photosystem II activities in its intact state: Electron acceptors such as methyl viologen or 2, 6-dichlorophenol indophenol were photo-biochemically reduced by the intact algal cells. Moreover, these algal cells accumulate photosynthetic ATP in the culture medium in the presence of exogenous ADP plus orthophosphate, unique circumstances as compared to the general experience with blue-green algae such as *Plectonema* sp. and *Anacystis* sp. or green algae as *Chlorella* sp. Such an ATP synthesis was remarkably affected by some buffer reagents.

These results suggest that photo-biochemical reduction or phosphorylation of surrounding substances by intact organisms should be noted as a possible factor of environmental dynamics.