

5. 研 究 論 文

窒素固定を行う単細胞藍藻 (Cyanobacteria) の光独立栄養的な生長戦略

三井 旭 熊沢 修造 高橋 章
池本 尚人 S.Cao 荒井 孝之
マイアミ大学 海洋並びに大気科学研究所

(まえがき)

窒素固定能を持つ微生物の中で、窒素固定藍藻は細胞内で酸素を発生する光合成と酸素に対して不安定な窒素固定を行う特異的な能力を持っている。¹⁻³ これら一見矛盾した反応過程の共存は、異質細胞を持つ藍藻では光合成を行う場所(栄養細胞)と窒素固定を行う場所(異質細胞)を空間的に分離することで行われる。⁴⁻⁵ 一方、異質細胞を持たない藍藻では、これらのメカニズムを説明する幾つかの仮説が提案されているが、多くの謎を含んでいる。^{3,6-11} 単細胞 *Gloeotheca* (*Gloeocapsa*) 属の株を使い、Gallonらは光合成と窒素固定がそれぞれ昼と夜とに時間的に分離して行われるメカニズムを示した。⁹ しかし、これらの二つの背反する反応が連続的な光照射下で起こるメカニズムは未だ明らかでない。最近、当研究室で発見された空中窒素固定を行う海洋性単細胞藍藻 (*Synechococcus* spp.) を同調培養して調べた結果、窒素固定と光合成は細胞周期内の異なった時期(相)に行われる事が明らかになったのでここに報告する。昼夜のサイクルと連続的な光照射下の両方で得られた我々のデータによると、これら窒素固定能を持つ単細胞藍藻は細胞周期内でそれら二つの相(時期)を時期的に分離することで、光独立栄養的に生長出来ると云う事を示している。

(本 文)

単細胞藍藻が窒素固定条件下で光独立栄養的に生長するメカニズムを研究するため、対数的に生長する細胞が、細胞周期の中で光合成と窒素固定を行う時期を分離するか否かを実験した。ランダムに生長した株を使った研究では、細胞周期内での時期的に分離した反応は同時に検出され、よって二つの背反した反応は同時に起こる様に見える。この時期的な分離が解決のカギになる要因なら、細胞周期の出来事は、同調培養した株を使えばより明瞭に見えるはずである。しかし最近まで、同調培養の実験に利用できる適当な株がなかった。我々は海洋の光合成を行う微生物に関する広範囲な調査から、この研究に適した新しい単細胞の窒素固定を行う株 (*Synechococcus* spp. Miami BG43511と43522) ¹²⁻¹⁴ (図1)を単離した。

株43511と43522の窒素固定条件下での同調的生長は、対数的に生長している株を暗処理する事で誘導される。図1は同調培養株の細胞分裂期とそれ以後の伸長期の細胞を示している。同調的な生長は、12時間明期/12時間暗期(12L/12Dと略す)のサイクルを3回繰り返し、その後20時

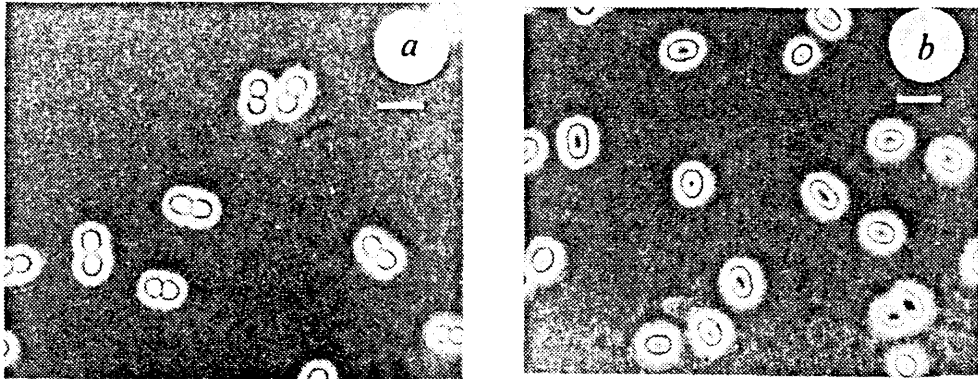


図1. 空中窒素固定能を持つ海洋性単細胞藍藻 *Synechococcus* 属 Miami BG 43511 株の位相差顕微鏡写真

(a), 細胞分裂期; (b)細胞伸長期

条 件: 好氣的窒素固定条件下での同調培養

スケール: 白線が10 μm

※細胞の大きさはMiami BG 43522 株が43511 株より僅かに小さい。

1 細胞分裂周期 (a-b-a) には次の条件で約20時間を要す: 30℃, 光強度150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pH=7.6, 4% CO_2 を添加した空気で通気。

この細胞分裂周期 (a-b-a) は, 図2cに示すごとく周期的に繰り返される。

間連続的な光照射を行った条件下で維持された(図2)。細胞数の増加は常に2倍ではないが, 細胞分裂は図に示すごとく段階的に同調して起こる(図2c, 実線)。更に, 培養の同調性は分裂中の細胞 (doubling cell) (図1a) が一定の時期(図2c, 実線)においてのみ一時的に現われることでも示される。段階的な生長の間, 酸素発生の活性(図2a, 実線)とニトロゲナーゼ活性(窒素固定の活性)(図2a, 破線)は, 交互に現れたり消えたりする。12L/12Dサイクルの間, 最大純酸素発生の活性は細胞分裂直前に現れる。その後, 酸素発生の活性はほとんどゼロ(第一と第二のL/Dサイクル), 又はゼロ以下(第三のL/Dサイクル)に減少し, 再び増加する。このような酸素発生能の変化は1細胞周期内で1サイクルの変化を示す。ニトロゲナーゼ活性の出現は, 純酸素発生の活性があるレベルまで減少した時に観察される。最大ニトロゲナーゼ活性は, 常に純酸素発生能力が最小時に起こる。

光合成的純酸素発生の活性の振動は, 培養72時間後に始めた連続光照射下でさえ観察される(図2a)。再びニトロゲナーゼ活性は, 光合成による酸素発生の活性が減衰した時期に現れ, 最大ニトロゲナーゼ活性は酸素発生能力が最小時に観察される(図2a: 特に72時間後の様相に注意)。

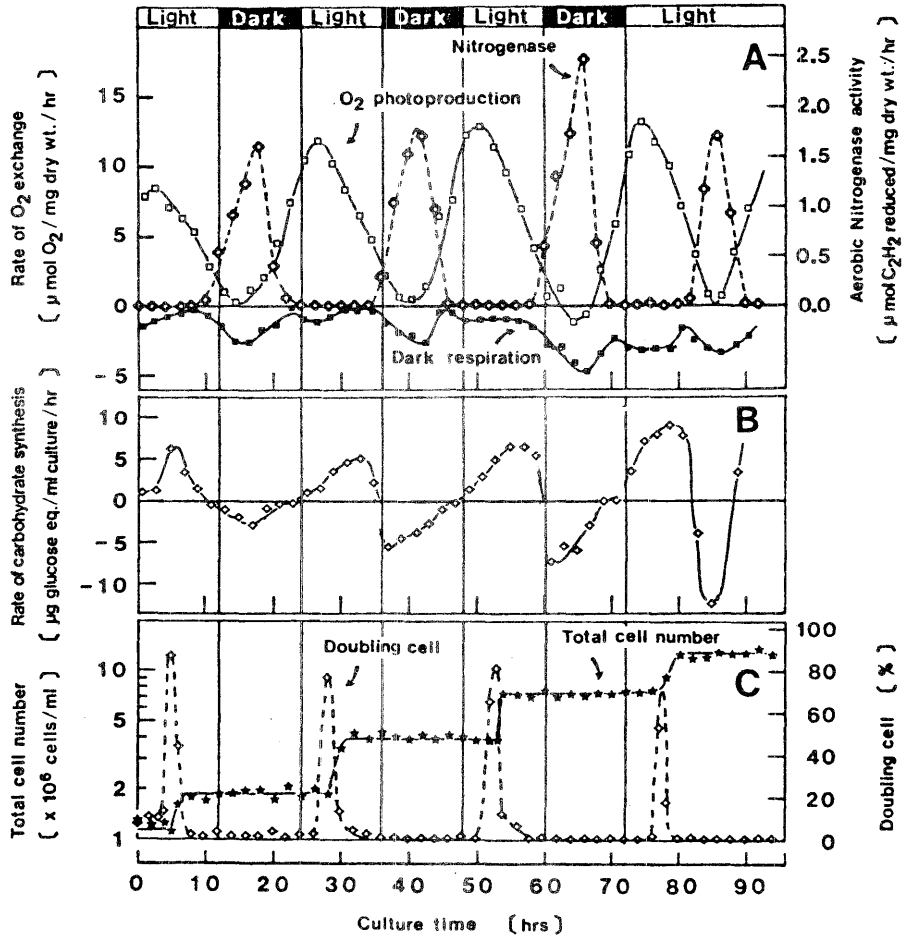


図2. (a)：光合成酸素発生，呼吸による酸素消費，アセチレン還元能力の変化
 (b)：炭水化物合成速度の変化
 (c)：細胞の総数と細胞分裂期の細胞(doubling cell)の分布の変化

上記は *Synechococcus* 属 Miami BG 43511 の同調的生長状態を示す。

※(a)において，左縦軸：酸素交換速度 { μmol 酸素 \times (mg 乾重量) $^{-1}$ \times (時間) $^{-1}$ }
 右縦軸：ニトロゲナーゼ活性 { μmol エチレン生成 \times (mg 乾重量) $^{-1}$ \times (時間) $^{-1}$ }

□：光合成酸素発生，○：ニトロゲナーゼ，■：暗呼吸を示す。

(b)において，縦 軸：炭水化物合成速度 { μg glucose 等量 \times (ml 培養株) $^{-1}$ \times (時間) $^{-1}$ }

(c)において，左縦軸：総細胞数(*)

右縦軸：細胞分裂している細胞の存在割合(%)

実験方法 BG 43511株は以前述べたと同様の空中窒素固定条件(30℃，光強度150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，毎分200mlで4% CO_2 混入空気を通気)で培養した。²⁴ 培地は窒素化合物を含まず，同調的生長を誘導するために，初期の対数的生長時点の株(ml 当り 10^6 細胞)を20時間暗処理した。この暗処理の後，図に示すごとく明期と暗期の期間の同調的生長を調べた。暗期では通気を止めたが，培養株はかくはん器で混ぜた。連続光照射は72時間後に開始した。2時間毎に酸素交換，アセチレン

還元活性、乾燥重量、炭水化物含有量と細胞数を分析した。酸素交換は以前述べた²⁵と同様の反応槽内でクラーク型電極を使用して調べた。試料 2 ml は培養管から反応槽へ何の処理も行わずに移し、平衡させるため 2 ~ 3 分間 30 °C の暗中で 4 % の CO₂ を含む空気を通気した。反応槽内での平衡後、呼吸と光合成的酸素生成の速度を暗中和明中 (光強度 2000 μmol · m⁻² · s⁻¹) でそれぞれ測定した。酸素発生に要する光強度は、この実験条件ではこの株の光飽和範囲 (光強度 1000 ~ 4000 μmol · m⁻² · s⁻¹) であった。アセチレン還元能 (10 % C₂H₂ を含む空気, 30 °C, 光強度 150 μmol · m⁻² · s⁻¹)、細胞数や乾燥重量は以前²⁴と同様に測定した。炭水化物含有量は、フェノール硫酸法²⁶で測定した。炭水化物合成速度は 2 時間毎に測定した培養株 1 ml 当りの炭水化物含有量の変化から計算した。

暗中における酸素吸収活性もまた細胞の生長中に変化する (図 2 a, 暗呼吸)。暗中で酸素吸収活性の場合、ニトロゲナーゼ活性が強い時は常に強くなっている様であるが、その変化の周期性は不明瞭である。呼吸活性は窒素固定機能の保護に要する嫌気性を維持する一つのメカニズムとして考えられてきた。¹⁵しかし図 2 a に示すごとく酸素吸収の活性の変化の規模は酸素発生の活性の変化の規模よりもはるかに小さい。更に同じ *Synechococcus* 属での他の株の呼吸は光によって抑制されてしまう事が知られている。¹⁶以上より光合成による酸素発生能力の大きな振動の起因は、たとえ明期に呼吸作用が阻害されなかったとしても単に呼吸作用からでは説明できない。

図 2 a に示す酸素発生の活性は、培養条件下ではなく酸素測定用反応槽で得られたこと (図 2 の説明文参照) に留意して欲しい。かくして酸素発生の活性の変化は、細胞の持つ光合成の潜在能力を示す定量的な指数である。これに関連して、培養条件下での光合成能の潜在的な変化は培養株中の炭水化物含有量の正味変化から洞察できる。興味あるのは、培養株の炭水化物含有量は 1.2 L / 1.2 D と連続光照射のどちらの条件下においても正味の蓄積と正味の消費を行う各相を通過することである (図 2 b)。炭水化物の消費が培養の暗期に進行する事は当然の事と考えられる¹⁷が、その消費はまた連続光照射中にも起こることが観察される。正味炭水化物消費を行う相の間は、炭水化物の消費量が明期 (図 2 b) でさえその合成率よりも高いため、その培養時期での純酸素生成はほとんど無いと結論出来る。更にほとんどのニトロゲナーゼ活性は、培養中の正味炭水化物消費を行う相 (図 2 a, b) の時のみ現れる。この様な現象は一貫して連続光照射下で少なくとも 3 細胞周期にかけて観察される。¹⁸

菌体内の炭水化物 (グリコーゲン) は、ある種の藍藻の窒素固定酸素 (ニトロゲナーゼ) への基質の究極的な供給源であると考えられている。^{13, 19-22}我々はそれ故菌体内の炭水化物が株 43511 と 43522 においても窒素固定の際に重要であるということを考えている。細胞周期内で振動する酸素発生や炭水化物合成と共に、時期を得たニトロゲナーゼ活性の出現は、空中窒素固定を行う単細胞 *Synechococcus* 属の株が細胞周期内で光合成と窒素固定を時期的に分離していることを強く示している。

異質細胞を持たない藍藻である *Oscillatoria* 属の株では、光合成による酸素発生がジクロロフェニルジメチルウレア (DCMU) により完全に阻害された場合、約 3 倍のアセチレン還元活性 (ニトロゲ

ナーゼ活性)の増加がみられている。²³この観察は、光合成による酸素生成が窒素固定を行う上でマイナスの効果を持つことを示している。しかし、以上に述べた *Synechococcus* 属の株の場合、時期的な分離が行われていれば窒素固定の相の間では光合成による酸素生成はほとんど無いかも知れない。もし我々の解釈が正しいならDCMUはアセチレン還元活性に全く影響無いはずである。図3に示すごとく、

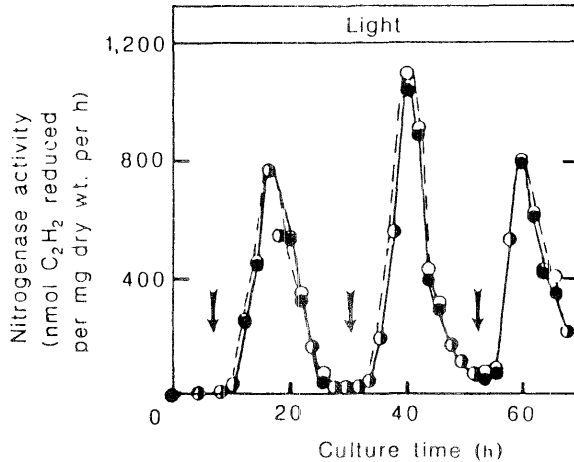


図3. 連続光照射下で同調的に生長する *Synechococcus* 属 Miami BG 43511 株のニトロゲナーゼ

活性に及ぼすDCMUの効果。

同調的生長は20時間毎に暗一明一暗を繰り返して誘導し、その後連続光照射下で70時間生長させた。試料は2時間毎に取り、アセチレン還元活性は、DCMU有り(○)と無し(●)の嫌気条件下(10% C_2H_2 を含むアルゴン、光強度 $150\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 、 $30^\circ C$)で以前と同様な方法で測定した。DCMUの最終濃度は $20\mu M$ で、これはこの株の光合成酸素発生を完全に阻害する(データには示してない)。矢印は細胞分裂が観察された時期を示す。

光照射下における3細胞分裂周期中のアセチレン還元活性は光合成酸素発生を完全に阻害する濃度のDCMUを添加しても影響を受けない。これは時期的分離説を支持するもう一つの証拠になり得る。

(謝辞は省略)

引用文献

1. Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. *A. Rev. Microbiol.* **31**, 225-274 (1977).
2. Stewart, W. D. P. *A. Rev. Microbiol.* **34**, 497-536 (1980).
3. Gallon, J. R. *Trends biochem. Sci.* **6**, 19-23 (1981).
4. Haselkorn, R. *A. Rev. Plant Physiol.* **29**, 319-344 (1978).
5. Fay, P. in *Recent Advances in Biological Nitrogen Fixation* (ed. Subba Rao, N. S.) 121-165 (Arnold, London, 1980).
6. Fay, P., Kumar, H. D. & Fogg, G. E. *J. gen. Microbiol.* **35**, 351-360 (1964).
7. Gallon, J. R., LaRue, T. A. & Kurz, W. G. W. *Can. J. Microbiol.* **20**, 1633-1637 (1974).
8. Weare, N. M. & Benemann, J. R. *J. Bact.* **119**, 258-265 (1974).
9. Mullineaux, P. M., Gallon, J. R. & Chaplin, A. E. *FEMS Microbiol. Lett.* **10**, 245-247 (1981).

10. Kallas, T. *et al* in *Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function* (eds Papageorgiou, G. C. & Packer, L.) 281-302 (Elsevier, New York, 1983).
11. Stal, L. J. & Krumbein, W. E. *Archs Microbiol* **143**, 67-71 (1985).
12. Mitsui, A. in *Proc. 5th Int. Ocean Dev. Conf.* **1**(B1), 29-52 (Seino, Tokyo, 1978).
13. Mitsui, A. *et al* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **413**, 514-530 (1983).
14. Mitsui, A. *et al* in *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (ed. Ghose, T. K.) 119-155 (United India, New Delhi, 1985).
15. Gallon, J. R. & Hamadi, A. F. *J. gen. Microbiol* **130**, 495-503 (1984).
16. Sandmann, G. & Malkin, R. *Archs biochem. Biophys.* **234**, 105-111 (1984).
17. Smith, A. J. in *The Biology of Cyanobacteria* (eds Carr, N. G. & Whitton, B. A.) 47-85 (University of California Press, Berkeley, 1982).
18. Mitsui, A., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S. & Arai, T. *5th Int. Symp. Photosynth. Prokaryotes, Abstr.* 63 (Grindelwald, Switzerland, 1985).
19. Mullineaux, P. M., Chaplin, A. E. & Gallon, J. R. *J. gen. Microbiol* **120**, 227-232 (1980).
20. Kumazawa, S. & Mitsui, A. *Int. J. Hydrogen Energy* **6**, 339-348 (1981).
21. Ernst, A. & Böger, P. *J. gen. Microbiol* **131**, 3147-3153 (1985).
22. Chaplin, A. E. & Gallon, J. R. *5th Int. Symp. Photosynth. Prokaryotes Abstr.* 253 (Grindelwald, Switzerland, 1985).
23. Stal, L. J. & Krumbein, W. E. *Archs Microbiol* **143**, 72-76 (1985).
24. León, C., Kumazawa, S. & Mitsui, A. *Curr. Microbiol* **13**, 149-153 (1986).
25. Kumazawa, S. & Mitsui, A. *Appl. environ. Microbiol* **50**, 287-291 (1985).
26. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. *Analyt. Chem.* **28**, 350-356 (1956).

あとがき (追記)

この論文は藍藻の窒素固定に関するものであるが水素生産という面でも強い関連があるのでその概略について述べる。

窒素固定能を持つ単細胞藍藻 *Synechococcus* Miami BG 43511 は水素発生という面で他の微生物では見られないユニークな特性を持っている (Mitsui *et al.* 1983, 1985)。例えば、ランダムに生長した *Synechococcus* Miami BG 43511 を使った実験では光照射下で水素と酸素が 2 : 1 の割合で長期間 (3日~5日) にわたり発生する事が観察されている (図4)。即ち、この株は光エネルギーを使って $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$ という反応を行っていると考えられる。

藍藻による水素発生の一つの様式として、ニトロゲナーゼ (窒素固定を行う酵素) 活性を持つ藍藻を例えばアルゴンの様な気相中で光照射すればニトロゲナーゼ依存の水素発生が観察される。しかし、この酵素 (ニトロゲナーゼ) は微量の酸素が存在しただけでも活性が失われると考えられるため、このニトロゲナーゼ活性を持つ単細胞藍藻がどの様な機構で水素と酸素を持続的に発生するか (ニトロゲナーゼ活性の維持) については謎であった。

今回紹介された我々の論文では水素発生という面からは論議されていないが、そこで述べられた同調培養実験の結果はランダムに生長した株を使って観察された水素と酸素の発生が 2 : 1 の割合で持続的に行われるという現象の解明の大きな鍵となると考えられる。従って、同調培養法で得られた生

Synechococcus Sp. Miami BG 043511

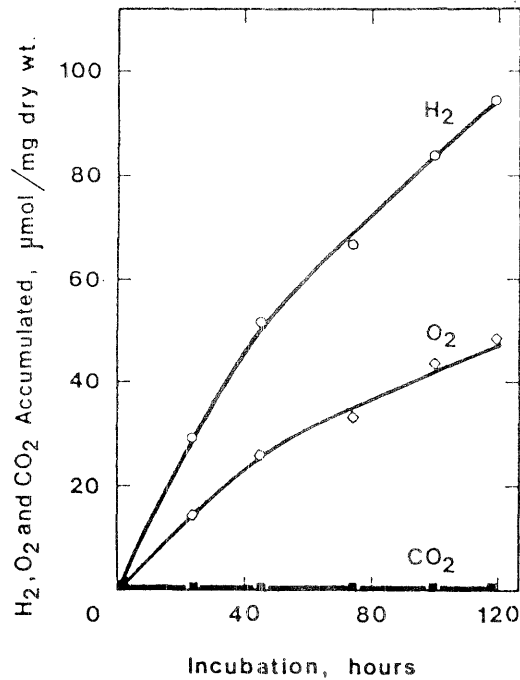


図4. 単細胞藍藻 *Synechococcus* sp. Miami BG 43511 のランダムに生長した株による水素と酸素の同時発生 (Mitsui et al. 1985 より引用)。

理的に均一な細胞を使って水素発生の機構について調べる事により、その機構がより良く解明出来るものと思われる。また、水素発生の詳細な機構の解明はその水素発生成能を更に強化する上で有益であると考えられる。

Mitsui, A., E. J. Philips, S. Kumazawa, K. J. Reddy, S. Ramachandran, T. Matsunaga, L. Haynes and H. Ikemoto (1983). Progress in research toward outdoor biological hydrogen production using solar energy, sea water and marine photosynthetic microorganisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 413:514-530.

Mitsui, A., S. Kumazawa, E. J. Philips, K. J. Reddy, K. Gill, B. R. Renuka, T. Kusumi, G. Reyes-Vasques, K. Miyazawa, L. Haynes, H. Ikemoto, E. Duerr, C. B. Leon, D. Rosner, R. SESCO and E. Moffat (1985). Mass cultivation of algae and photosynthetic bacteria: Concepts and application. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, (T. K. Ghose, ed.), International Union of Pure and Applied Chemistry and Indian National Science Academy, United India Press, New Delhi, pp. 119-155.