

E 低温性プランクトン藻類光合成の光環境に対する応答

理学部生物科学科 鈴木祥弘

I 序論

海洋の主要な一次生産者である微細藻類の CO_2 同化・光合成は、海洋の生態系に重要であるばかりでなく、大気 CO_2 の海洋への吸収を促進する点で人類にとっても重要である。中でも北極や南極の周辺の海洋では、これまでに考えられていたよりも高い CO_2 吸収が見積もられており、これに微細藻類の光合成が深く関与していることが明らかになってきた。極域海洋の多くは海氷に覆われている。微細藻類の生活する海水下の光強度は海氷による反射と吸収により海氷直下でも海氷上の僅か数%であり、海氷の吸収特性から光質は青色が卓越することが知られている。また、水温は海水の氷点 -1.8°C 前後になる。微細藻類はこのような青色弱光と低温という特徴的な環境下でも、一定の光合成速度を維持し一次生産を行うことが知られている。

この研究は海水下の微細藻類が光合成速度を維持し一次生産を行うために、特徴的な環境にどのように対応しているかを明らかにすることを目的としている。そのため、海氷域の一つである北海道サロマ湖において海水下の水中の光環境の特性を詳細に測定した。この結果に基づいて、青色発光ダイオード（青色 LED）と低温培養装置を用いて実験室内に海氷下面の環境を再現し、海氷下面に大增殖していた海氷藻類の増殖応答とそれを支える光合成の色素系の応答を調べた。

II 材料と方法

海氷藻類群集棲息現場の環境の測定

海氷藻類群集が棲息する現場海域の光環境を明らかにするために、太陽光の海氷通過前（海氷上面）と通過後（海氷下面）の光合成有効放射（PAR）波長域全体（400~700 nm）の光量子流量密度（光強度）を 2002 年 3 月 13 日（晴天）と 3 月 14 日（曇天）に北海道サロマ湖栄浦の沖合 1500 m の地点で測定した。波長域全部の光強度は 1 分毎に終日測定し、データロガー（LI-1400、LI-COR）に記録した。さらに、PAR 波長域の各波長の光強度を光ファイバー分光器（USB2000、Ocean Optics, Inc.）を用いて 0.3 nm 毎に測定した。この期間海氷下面の温度は $-0\sim-1^\circ\text{C}$ で一定であった。

珪藻種の単離と同定

環境測定を行った地点の海氷下面より海氷藻類群集を採取し、そこから数種を単離した。海氷藻類群集を含む氷片に 10 倍体積の濾過海水（ 0°C ）を加え、塩濃度が変化しないように海水を融解した。そこに含まれる海氷藻類群集を口径 10 μm のナイロン膜を用いて濃縮した。実体顕微鏡下で、細管を用いて試料から優占種の単コロニーを回収し（藻類学、有賀祐勝ほか編、2000、講談社）、1/4F 培地（栄養塩強化培地）（Guillard, 1975）各 1.0 ml を分注した多穴皿（Nunc マルチディッシュ、Nalge Nunc International）に移し、 0°C 、50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （以降 μE と表す）、昼光色蛍光灯（FL40-D、National、Japan）連続光下で培養した。増殖したコロニーの一部をさらに 1/4F 培地 10 ml を入れた培養用試験管に移して培養を続け、安定して増殖を続けたものを単離培養株とした。単離培養株の一部を加酸分解処理（Ma, J.C.W. and Jeffrey, L.M., 1978）し、得られた被殻を走査型電子顕微鏡（JSM-T20、JEOL）で観察し同定した。その結果、単離培養株は *Thalassiosira nordenskioeldii* Cleve と *Detonula confervacea* (Cleve.) Gran の 2 種に分類された。

異なる光強度に対する海水珪藻単離培養株の増殖速度の応答

単離培養株 *T. nordenskioeldii* を 1/4F 培地中で、異なる光強度の連続光 (10~400 μE)、0℃ で培養した。光源には現場の光スペクトルに比較的近い青色 LED (E1L51-3B、豊田合成) を用いた。培養用試験管は卓上型低温恒温水槽 (CB-15、アズワン株式会社) からの冷水流で冷却し、温度を $0.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保った。微生物の混入を防ぎながら十分な通気を確保するためにキャップに通気性フィルター (サン・バイオフィルター、SIBATA) を使用した。300 cells/ml の密度で植え継ぎ、上記の各条件で培養し、24 時間毎に十分に攪拌し、単離培養株を含む培地 1 ml を採集した。この試料を 1% グルタルアルデヒド (Glutaraldehyde, SIGMA-ALDRICH) で固定し、細胞分裂を停止させた後、4℃ で保存した。光学顕微鏡 (CH-2、OLYMPUS) とプランクトン計数板 (MPC-200、MATSUNAMI GLASS IND., LTD.) を用いて細胞数を計測した。1 つの試料について 400 細胞以上の計数を独立に 3 回行った。

異なる光強度に対する海水珪藻単離培養株の光合成色素の応答

異なる光強度で培養した単離培養株 (*T. nordenskioeldii*) の対数増殖期にある細胞をガラスファイバーフィルター (GF/F Whatman) で濾過して集めた。そこから光合成色素 (クロロフィル及びカロチノイド) を 100% N,N-ジメチルホルムアミドで抽出し、その吸収スペクトルを測定し、異なる光強度で培養した細胞間の違いを比較した。さらに、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて各色素を分離し、その相対量を求めた (Kashino *et al.*, 1998)。対数増殖期にある細胞を口径 0.2 μm のポリカーボネイトフィルター上に集め、100% メタノール (和光純薬) 中で、暗所、4℃、5 分間静置して色素を抽出した。抽出液を口径 0.20 μm のタンパク低吸着親水性フィルター (マイレクス-LG、MILLIPORE) で濾過し、藻体などの粒状物質を除き HPLC に供した。移動層に逆相カラム μ -Bondapak C₁₈ (8 mm×100 mm) を使用し、100% メタノールで溶出した。フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (SPD-M10Avp、SHIMADZU) を用い、440 nm における吸光度の変化を指標にして色素の溶出を検出し、同時に溶出物の吸光スペクトル (400~700 nm) を記録した。

III 結果と考察

海水藻類群集棲息現場の光環境

快晴 (2002 年 3 月 13 日) のサロマ湖海水上面の光強度は、日の出後時間とともに上昇し、太陽が南中する 11 時 27 分には 1287 μE に達したが、その後、太陽の下降とともに低下した。海水を通過した後の海水下面の光強度も太陽の上昇とともに上昇し、太陽の南中時に 71.5 μE に達し、その後下降した。曇天の (2002 年 3 月 14 日) サロマ湖でも、海水上面と海水下面で、光強度は日の出後時間とともに上昇し、太陽の南中時 (11 時 22 分) に、それぞれ、1427 μE と 104.4 μE に達し、その後、光強度は太陽の下降とともに低下したが、その途中で雲の移動による光強度の数分間隔の変動が認められた。海水を通過して海水下面に到達する光の最大強度は、快晴の日では海水上面の最大光強度の 5.6%、曇りの日では 7.3% であり、現場の海水に棲息する珪藻群集は海水上面の光強度の 10% 以下の弱い光強度に曝されていることが分かった。

海水下面と水深 4 m の海水中で、PAR 波長域の各波長の光量子流量密度を測定し (2002 年 3 月 13 日、快晴)、地表面 (神奈川大学湘南ひらつかキャンパス、2001 年 10 月 5 日、快晴) で測定した光量子流量密度波長分布と比較した。太陽光の地表面での光量子流量密度は青色域 (450~500 nm) で最大になり、長波長域 (500~700 nm) ではほぼ同じ光強度であった。サロマ湖の

厚さ 40 cm の海水の下面では青色域と赤色域 (650~700 nm) の光が減衰し、黄・燈色域 (580~650 nm) の光が相対的に多くなっている。水の持つ物理的特性により、海水は赤色域の光を強く吸収する。これに加え、海水中の藻類群集により青色域の光が吸収されていたと考えられる。海水中の植物微細藻類の濃度は海水中に比べ無視できるほど低かった。水深 4 m の海水中では、水による赤色光の減衰は顕著であり、685.5 nm より長波長側では光量子が検出されなかった。これらの結果は、サロマ湖海水下面では海水の吸収が小さい 480 nm 近傍の青色光が卓越しており、この光をさらに微細藻類が吸収することで、黄・燈色域 (580~650 nm) の光が卓越していたと考えられる。

異なる光強度に対する海水珪藻の増殖速度の応答

低温培養器と青色 LED を使用して培養光源を作り青色光の卓越するサロマ湖海水下面の光環境を再現した。これを用いて異なる光強度 (10~400 μ E) の連続光照射下、0℃で珪藻単離培養株 *T. nordenskiöldii* と *D. confervacea* を培養した。10 μ E、20 μ E、50 μ E、100 μ E、200 μ E、400 μ E の青色光照射下で培養した *T. nordenskiöldii* の増殖速度は、それぞれ、0.69、0.84、0.89、0.92、0.30、0.24 (分裂/日) で、*D. confervacea* の増殖速度は、それぞれの 0.92、1.20、1.29、1.11、0.38、0.06 (分裂/日) であった。この実験に用いた 10~400 μ E までの培養光強度では、いずれの珪藻単離培養株についても 20~100 μ E の範囲で相対的に高い増殖速度を示しており、20 μ E 未満と 200 μ E 以上の培養光強度では増殖速度が低下することが示された。このことから *T. nordenskiöldii* と *D. confervacea* は、現場海水下面の日中のほとんどの時間の光強度で相対的に高い増殖速度を示し、現場光強度に非常に良く対応していることがわかった。

異なる光強度に対する海水珪藻の光合成色素の応答

異なる光強度に対する増殖速度の応答を調べた結果にもとづいて、10 μ E、100 μ E、400 μ E の光照射をそれぞれ弱光 (増殖不十分)、適光 (増殖最大)、強光 (増殖阻害) として選び、これらの光強度で培養した細胞から光合成色素を 100%メタノールで抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分離、同定し、それぞれの色素の相対量を求めた。珪藻種 *T. nordenskiöldii* は、光合成系の色素として 6 種類の色素、Chlorophyll a、Chlorophyll c、Fucoxanthin、Diadinoxanthin、Diatoxanthin、 β -Carotene を持っていた。弱光下では、Chlorophyll a、Chlorophyll c、Fucoxanthin の量を増加していた。これは青色光で光捕集を効率的に行うために、青色光に吸収を持つ色素を増加したためと考えられる。逆に、強光下では Diadinoxanthin、Diatoxanthin の量が増加していた。これらの色素は高等植物のキサントフィルサイクルを構成する色素に対応すると考えられており、強光下では過剰な光エネルギーを熱として放出する機能を果たすと推定されている。強光で増加したこれらの光合成補助色素 (Diadinoxanthin と Diatoxanthin) は、Fucoxanthin と類似した吸収スペクトルを持ちながら、全くことなる機能を持ち強光で増加したと考えられる。

IV 結論

海水下面に棲息する珪藻群集は、青色光が卓越する弱光 (~100 μ E) と低温 (-1.8℃) という特殊な環境下で生育していることがわかった。

現場海水下面の環境を擬似的に再現した環境 (青色 LED 光源、0℃) を実験室内に設置して、現場海水下面より単離した珪藻種 *T. nordenskiöldii* と *D. confervacea* の異なる光強度 (10~400 μ E) に対する増殖速度 (分裂/日) を調べたところ、両種は現場海水下面の光強度 (100 μ E)

に対応し、そこで最適な増殖速度を示していることがわかった。単離培養株 *T. nordenskioeldii* は、6 種類の光合成色素、Chlorophyll *a*、Chlorophyll *c*、Fucoxanthin、Diadinoxanthin、Diatoxanthin、 β -Carotene を持っており、異なる光強度に応答してそれぞれの量を変え、棲息環境に対応して効率のよい光合成を行う機構を持っていた。カロチノイドである Fucoxanthin と Diadinoxanthin、Diatoxanthin は、類似した吸収スペクトルを持ちながら、一方は集光に他方は過剰光エネルギーの放出に寄与している可能性も示唆された。

本研究では珪藻を異なる光強度の連続光照射下でのみ培養したが、実際の海水下面の現場環境では、日の出から徐々に光強度が上昇し、太陽の南中時に最大光強度になり、その後、日の入りまで徐々に光強度が減少していくというように光強度は常に変動している。今後の研究では、実際の海水下面の現場環境の光環境の日変化と同じように光強度を連続的に変化させたときの珪藻の応答の解析が課題である。