



調節物質としてジメチルスルフォニオプロピオネート (DMSP) を合成する。細胞が破壊され, DMSP が細胞外に放出され海水と反応すると, 揮発性のジメチルスルフィド (DMS) に変化し, DMS およびその酸化物は大気中で雲の凝集核となることで, 雲の形成を促進し, 雨をもたらすことが知られている (Fig. 1)。このように, 円石藻は地球環境に与える影響が大きく, 現在, 海洋における円石藻の増殖の制御要因の解明が地球環境保全のための重要な研究課題となっている<sup>2), 3)</sup>。

我々は, 円石藻が生育の必須微量元素として Se を要求する一方, 高濃度の Se は強い毒性を示すことを既に見出し<sup>4), 5)</sup>, そのことから, Se が円石藻の重要な増殖制御要因であり, 海洋におけるブルーム形成及び消失の主要因の一つとなっているものと推測した。そこで, 円石藻細胞内の Se の定量を行い, 円石藻細胞における Se 濃縮の有無や, 増殖過程における Se 含有量の変動を明らかにすることを主目的とし, さらに, Se 欠乏が他の細胞内元素に与える影響を調べるために, PIXE による円石藻 *Emiliania huxleyi* の細胞内元素組成の測定を行った。2001 年度における解析により, *E. huxleyi* が高濃度に Se を濃縮し, そのほかに Al, Fe, Mn および P 等も高効率に濃縮することが明らかになった。2002 年度はこのような元素濃縮能が円石藻に特有のものであるのか, あるいは微細藻類一般に見られる特徴であるのかを確認するために, 3 種の微細藻類を同様の生育条件で培養した際の細胞内元素含量を比較し, 藻種の違いによる細胞内元素組成の違いと特徴を明らかにした。

## 2 材料および方法

### 2.1 微細藻類の培養

実験材料として, 円石藻 *Emiliania huxleyi* (NIES873) と石灰化能を持たないハプト藻 *Isochrysis galbana* (UTEX LB2307), および緑藻 *Dunaliella tertiolecta* (CSIRO Marine Laboratory, Hobart, Tasmania, Australia) を使用した。*E. huxleyi* 株の保存培養には, 富化栄養塩として ESM 添加培地および終濃度 10 nM の亜セレン酸ナトリウムを補強した天然海水培地を用いた<sup>4), 5)</sup>。100 mL 容三角フラスコ中に 50 mL の培地を入れ, 温度を 20 °C および光強度を 20 ~ 30  $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  に保ち, 16 時間明期/8 時間暗期の明暗サイクル下で保存培養を行った。継代後 1 週間経過した細胞懸濁液 1 mL を 10 nM の亜セレン酸ナトリウムを含む 50 mL の人工海水 Marine Art SF-1 (千寿製薬, 大阪) に ESM 添加培地を加えた微量栄養素富化培地 (MA-ESM)<sup>4), 5)</sup> に摂取した。一週間培養後, 全量を 450 mL の MA-ESM を入れた中型扁平培養瓶に添加し, 蛍光灯による約 100  $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の連続光照射下でフィルター (ミニザルト HY, 0.2  $\mu\text{m}$  pore, 26 mm, Sartorius, Germany) を濾過した通常大気を 150 ~ 200 mL/min の速度で通気し, 直線増殖期である約 140 時間目まで培養した。細胞増殖量の判定には細胞懸濁液の濁度を用い, UV-2200 分光光度計 (島津) を用い, 波長 750 nm の吸光度 ( $\text{OD}_{750}$ ) を測定することにより測定した。細胞体積の測定にはヘマトクリット管を用い, Packed cell volume (PCV) を測定した<sup>6)</sup>。

### 2.2 PIXE 分析

細胞懸濁液を  $\text{OD}_{750} \times \text{液量 (mL)} = 20$  となるように採取し, 50 mL 容サンプルチューブ (No.352098, FALCON 社) に入れ, 1/2000 容の 20% Tween 20 (最終濃度 0.01%) を添加した。スイングローター遠心機 [R=60 (minimum), 107 (intermediate), 155 mm (maximum), TOMY 社] を用いて, 3,000 rpm [4,500  $\times g$  (maximum)] で 10 分間遠心分離し, 細胞を回収した。更に, 0.01% Tween 20 を含む 3% NaCl 溶液 (50 mL) に細胞を再懸濁し, 再度遠心分離することにより, 残存した培地成分を除去した。細胞画分 (ペレット) を真空デシケーター中に 2 ~ 3 日間放置して完全に乾燥した後, 70  $\mu\text{L}$  の濃硝酸 (精密分析用, 和光純薬), と 2  $\mu\text{L}$  の In 標準液 (1 mg/mL, 原子吸光分析用, 和光純薬) を滴下し, 1 時間放置することで細胞を溶解した。得られた細胞溶解液の全量を硝酸灰化用テフロン製容器に移し, 電子レンジによる加熱 (200 W, 2 分間) を 2 回行った。室温に一時間放置して冷却した後, スイングローター遠心機を用いてテフロン容器を

数秒間遠心した。得られた試料溶液のうち 5  $\mu$ L を 4  $\mu$ m 厚のポリプロピレン製バックリングフィルム上に滴下し、室温で一晩乾燥したものを測定試料とした<sup>7)</sup>。

PIXE 分析は日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターにて行った。測定試料に小型サイクロトロンからの陽子ビーム (6 mm ) を真空チャンバー内で試料に照射し、これにより発生した特性 X 線を低エネルギー用と高エネルギー用の 2 台の Si (Li) 半導体検出器により同時に測定して、スペクトルを得た。高エネルギー用検出器には、X 線吸収体として 500  $\mu$ m Mylar フィルムが装着された。プロトンの加速エネルギーは 2.9 MeV で、スペクトルを収得した際のビーム電流値は 30 ~ 60 nA、照射電荷量は 20 ~ 60  $\mu$ C であった。データの解析は PIXE 専用スペクトル解析プログラム “SAPIX” を用いて行った<sup>8)</sup>。元素番号が 10 (Na) より小さい元素は PIXE では検出できない。また、Na と Cl は細胞収穫の際に使用した洗浄溶液に含まれるため解析対象から除外した。また、培地中に添加した元素のうち、Co は Fe-K のピークが大きかったため解析できなかった。

培養はそれぞれの藻種について 3 回ずつ行い、各培養につき 8 試料を調製し、PIXE 解析に供した。解析には相対誤差が 30% 以下の測定値の平均値を用いた。ただし、全ての種において検出回数が 12 回以下であった元素については記述から除外した。

### 3 結果および考察

10 nM の亜セレン酸ナトリウムを含む MA-ESM で培養した *E. huxleyi*, *I. galbana* および *D. tertiolecta* の細胞画分に含まれる元素量を PIXE で定量した (Fig. 2, Table 1)。微細藻類の細胞画分から、培地中に添加した 24 元素のうち、12 元素が検出された。K, S, P および Mg は細胞内含量が多く、0.1 ~ 10 mg/mL-PCV に達した。これらの元素の細胞内含量について、大きな種間差は認められなかった。Ca, Fe, Al, Br および Mn は 1 ~ 100  $\mu$ g/mL-PCV 含まれ、Sr, Mo および Se は 0.1 ~ 1  $\mu$ g/mL-PCV 含まれていた。各元素が細胞内に均一に存在すると仮定し、細胞内元素濃度と培地中の初期濃度との比から濃縮率を計算し、Table 1 に示した。Al, Fe, P および Mn は 3 種の藻類全てにおいて濃縮率が高く、Al, Fe および P の濃縮率はそれぞれ約 26,000 ~ 48,000、1,300 ~ 1,500 および 900 ~ 1,800 であった。

Table 1 Content of elements in the culture medium (MA-ESM) and the concentration factor of elements in three algal species. Cells were harvested at the linear growth phase after about 140-h culture.

Element	Content in the medium ( $\mu$ g/mL)	The concentration factor		
		<i>E. huxleyi</i>	<i>I. galbana</i>	<i>D. tertiolecta</i>
Mg	1200	0.158 $\pm$ 0.0407	0.140 $\pm$ 0.0287	0.159 $\pm$ 0.0320
S	835	3.19 $\pm$ 0.452	2.82 $\pm$ 0.403	1.12 $\pm$ 0.189
Ca	382	25.0 $\pm$ 18.1	0.434 $\pm$ 0.120	0.206 $\pm$ 0.0852
K	362	8.60 $\pm$ 1.99	10.6 $\pm$ 1.52	5.97 $\pm$ 1.02
Br	60.4	0.321 $\pm$ 0.182	0.345 $\pm$ 0.270	0.229 $\pm$ 0.226
Sr	7.19	6.58 $\pm$ 4.69	0.289 $\pm$ 0.0816	0.100 $\pm$ 0.0276
P	0.889	1750 $\pm$ 842	965 $\pm$ 353	878 $\pm$ 261
I	0.0535	N. D.	N. D.	N. D.
Mn	0.0414	1510 $\pm$ 725	185 $\pm$ 22.2	144 $\pm$ 18.1
Fe	0.0354	1400 $\pm$ 549	1510 $\pm$ 965	1320 $\pm$ 208
Mo	0.0109	185* $\pm$ 67.1	N. D.	N. D.
Al	0.000894	47500 $\pm$ 16800	26300* $\pm$ 8500	41300* $\pm$ 18000
Se	0.000790	2030 $\pm$ 779	371* $\pm$ 73.9	416* $\pm$ 30.7
W	0.000111	N. D.	N. D.	N. D.

Value after  $\pm$  means a standard deviation (n = 24). The data detected in fewer than 12 samples are shown with \*. N. D. = not detected.

これに対し, Ca, Mn, Sr および Se は *E. huxleyi* に特異的に多く含まれた (Fig. 2)。 *E. huxleyi* の細胞に含まれた多量の Ca は炭酸カルシウムを主成分としたココリスの形成によるものであると考えられる。 Sr 含量も同様に *E. huxleyi* で極端に高いが, Sr は Ca のアナログとしてココリス中に含まれることが既に報告されている<sup>9)</sup> ことから, ここで見られた高い Sr 含量もココリス中に蓄積されたものによるものと考えられる。

*E. huxleyi* に特異的な Mn の濃縮はこれまでに報告が無く, その理由は不明であるが, 2001 年度の PIXE 解析により *E. huxleyi* の細胞内 Mn 含量は Se 欠乏により増加することが既に明らかになっている<sup>10)</sup> ことから, 円石藻において Mn は Se と密接に関連した重要な機能を担っているものと考えられる。他の生物において, Mn は様々な代謝経路の必須元素として知られている。例えば, 酸素発生型光合成には光化学系 活性中心のテトラ Mn クラスターが必要である<sup>11)</sup> ことから, 円石藻が特殊な光化学系を有し, Se と共に光化学反応に参与する可能性が考えられる。また, Mn は Mn-スーパーオキシドジスムターゼ, Mn-カタラーゼおよびアルギナーゼ等, 多くの酵素の活性に必須であることが知られている<sup>11)</sup>。 Mn-スーパーオキシドジスムターゼや Mn-カタラーゼは抗酸化系に働く酵素である上に, Mn はリン酸や酪酸およびリンゴ酸等の中間代謝産物の様な陰イオンと結合することにより, 無機的にも抗酸化剤として働くことが明らかになっている<sup>12)</sup>。一方, Se も多くの生物において, 無機態およびグルタチオンペルオキシダーゼ等の必須因子として抗酸化作用を有する<sup>13)</sup> ことから, 円石藻細胞内において Se と Mn が共に抗酸化作用を有し, Se 欠乏により低下した抗酸化活性を補完するために Mn 濃度が増加する可能性も考えられる。

*E. huxleyi* の細胞内 Se 含量は初期培地中濃度の 2,030 倍にあたる 1.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -PCV に達したが, 他二種の細胞における Se 含量は定量解析が困難なほど微量であった (Fig. 2, Table 1)。陸上植物では, 高濃度の Se は S のアナログとしてタンパク質中の S と無作為に置換するため, ジスルフィド結合形成の阻害による立体構造障害を引き起こし, タンパク質の機能を阻害すると考えられている<sup>14)</sup>。そのため, マメ科ゲンゲ属植物 *Astragalus* 等の Se を高濃度に濃縮する一部の陸上植物では, Se-methyl-selenocysteine として Se を蓄積することにより, Se のタンパク質中への無作為な挿入を回避していることが明らかになっている<sup>15)</sup>。 *E. huxleyi* が高濃度に Se を濃縮するためには何らかの毒性回避機構が必須となるため, *Astragalus* と同様の蓄積機構, もしくはそれとは別の新たな Se 濃縮機構を有している可能性が考えられる。

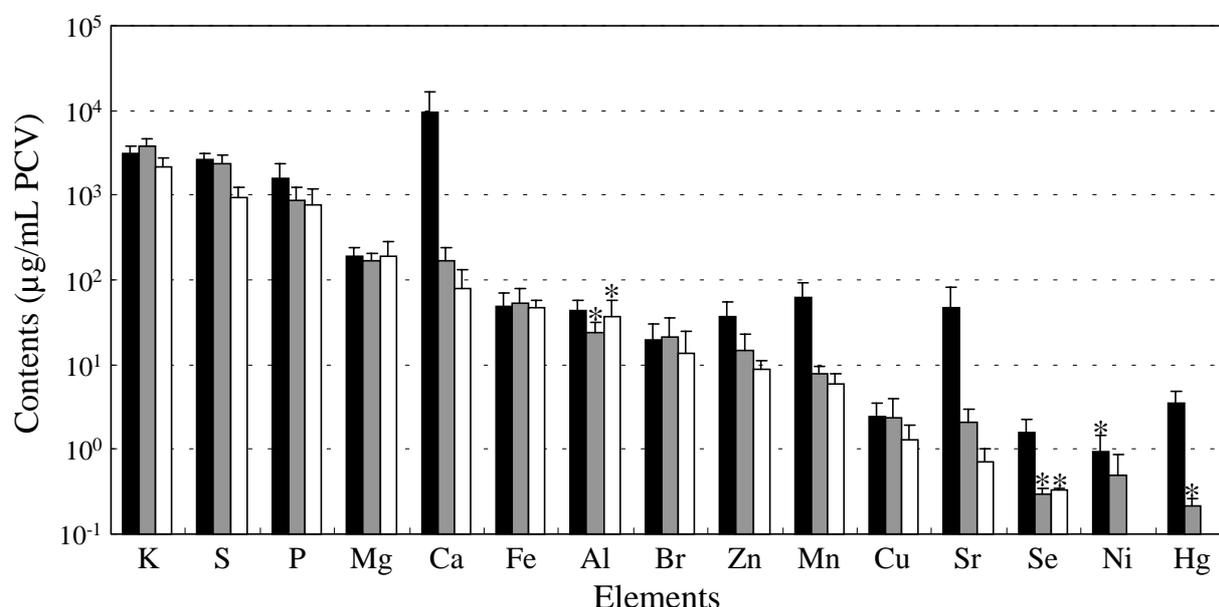


Fig. 2 Content of elements in three algal species grown in MA-ESM containing 10 nM selenite. Cells were harvested at the linear growth phase. Twenty four samples from three individual cultures were analyzed by PIXE. The error bars represent standard deviations. The data detected in fewer than 12 samples are shown with \*. Black bar, *Emiliana huxleyi*. Gray bar, *Isochrysis galbana*. White bar, *Dunaliella tertiolecta*.

培地中に添加した元素の他, Zn, Cu, Ni および Hg が三種の微細藻類のいずれの細胞内においても検出された (Fig. 2)。また, Si, Ti, V, Cr, As, Nb および Pb も検出されたが, 相対誤差が大きく, 定量値を示すには至らなかった。実験培地として用いた人工海水培地への天然海水培地の持ち越しが 1/500 程度であることから, これらの元素は培養株保存培養に用いた天然海水培地中から細胞に吸収, 濃縮され, 実験培養中も細胞内に保持されていたものと考えられる。

#### 4 おわりに

2001 年度の PIXE 解析により円石藻 *E. huxleyi* の高い Se 濃縮能が示唆されていたが, 2002 年度において他種の微細藻類のそれと比較することにより, これが *E. huxleyi* に特異的な現象であることを明確に示すことができた。また, *E. huxleyi* は Se のみならず, Mn も高濃度に濃縮することを明らかにすることができた。これらの元素は海洋中における円石藻の増殖において重要な機能を有していることが考えられ, また, 濃縮能が円石藻に特異的であることから, 外洋におけるブルーム形成等にもこれらの元素が深く関与する可能性が考えられる。今後, それらの元素について濃縮機構および生理機能を解析することにより, 海洋における円石藻増殖の新たな制御要因が明らかになるものと期待できる。

#### 謝辞

本研究は (社) 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター, 岩手医科大学サイクロトロンセンターおよび筑波大学アイソトープセンターにおける共同利用研究として実施された。また, 本研究は財団法人日本科学協会より笹川科学研究助成 (助成対象者; 小幡年弘, 研究番号 12-384M (平成 12 年度) 13-381MK (平成 13 年度)) および日本アイソトープ協会滝沢研究所研究助成 (平成 14 年度) を受けました。関係各位に深く感謝します。

#### 参考文献

- 1) Heimdal, B.R. (1993) Modern coccolithophorids. In: Tomas, C.R. (ed), Marine Phytoplankton-A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. pp. 147-247, Academic press, Sandiego.
- 2) 白岩善博 (2000) 円石藻における光合成と石灰化. 月刊海洋. 32: 412-417
- 3) 白岩善博 (2001) 光合成生物による石灰化と地球 CO<sub>2</sub> 環境. 日本結晶成長学会誌. 28: 53-60
- 4) Danbara, A. and Shiraiwa, Y. (1999) The requirement of selenium for the growth of marine coccolithophorids, *Emiliana huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica* and *Helladosphaera* sp. (Prymnesiophyceae). *Plant Cell Physiol.* 40: 762-766
- 5) 檀原明子, 白岩善博 (1999) 円石藻 *Emiliana huxleyi* のセレン要求性と生育培地の選択. 日本海水学会誌. 53: 476-484
- 6) Sekino, K. and Shiraiwa, Y. (1994) Accumulation and utilization of dissolved inorganic carbon by a marine unicellular coccolithophorid, *Emiliana huxleyi*. *Plant Cell Physiol.* 35: 353-361
- 7) ニツ川章二. (2000) Bio-PIXE その理論と応用 第 2 章 生物試料定量分析のための試料調製 (1) 生体試料のための電子レンジを用いた硝酸湿式灰化法. *RADIOISOTOPES.* 49: 447-450
- 8) Sera, K., Yanagisawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitoh, Y., Suzuki, S. and Orihara, H. (1992) Bio-PIXE at Takizawa Facility (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron). *Int. J. PIXE* 2: 325-330
- 9) Stoll, H. M., Rosenthal, Y. and Falkowski, P. (2002) Climate proxies from Sr/Ca of coccolith calcite:

- Calibrations from continuous culture of *Emiliana huxleyi*. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 66: 927-936
- 10) 小幡年弘, 世良耕一郎, ニツ川章二, 白岩善博 (2002) セレン欠乏により誘導される円石藻細胞内の元素含量の変動. *NMCC 共同利用研究成果報文集*. 9: 137-143
  - 11) Jakubovics, N. S. and Jenkinson, H. F. (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology*. 147: 1709-1718
  - 12) Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M. and Foster, S. J. (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen? *Trends Microbiol.* 10: 496-501
  - 13) 岩本浩二, 白岩善博 (2001) 海洋生物における微量元素セレンの生理機能. *バイオサイエンスとインダストリー*. 59: 22-25
  - 14) Terry, N., Zayed, A. M., Souza, M. P. and Tarun. A. S. (2000) Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 401-432
  - 15) Neuhierl, B. and Böck, A. (1996) On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulation plants: purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisculatus*. *Eur. J. Biochem.* 239: 235-238