

スーパーオキシドが *Microcystis aeruginosa* の鉄摂取に与える影響

東北大学 学生会員 ○佐々木 史織
東北大学 学生会員 伊藤 紘晃
東北大学 正会員 藤井 学 大村 達夫

1. はじめに

鉄は、海洋性藻類などの一次生産者が窒素固定や光合成を行うために必要不可欠な必須微量元素である。近年、生物に関わる利用可能な鉄の供給量変化が、水生植物の生長に影響を与えている事例が報告されている¹⁾。一般に、溶存酸素が十分存在する環境において、陸域から供給される鉄は酸化状態である第二鉄種で存在し、その多くがフミン物質などの自然有機物質(NOM)と錯体を形成している。しかし、多くの藻類は、フミン物質のような巨大分子(>1,000~100,000 Da)に配位している鉄を直接取り込むことができない。そこで、藻類は還元作用により溶解性の第一鉄種に変換し、鉄を摂取するといった戦略をとる。その一つとして、ある種の海洋性藻類は、自ら還元剤としてスーパーオキシド($O_2^{\cdot -}$)を生成することが示唆されている。海洋性藻類について、鉄摂取の際に $O_2^{\cdot -}$ が関与している事実は認められているものの、淡水性藻類についての知見はない。本研究では、*Microcystis aeruginosa* を対象とし、自らが産生する $O_2^{\cdot -}$ の生成速度と鉄の形態が増殖速度に与える影響を調べた。

2. 実験方法

2.1 $O_2^{\cdot -}$ 濃度の測定

$O_2^{\cdot -}$ 濃度は、Felume ケミルミネッセンス装置を用いて、MCLA の発光量を測定することで決定した。*M. aeruginosa* 細胞を MA 培養液中からメンブレンフィルター(Millipore, 0.45 μm , 直径 25mm)上に回収し、そのフィルターに 2mM $NaHCO_3$ と 15 μM diethylenetriaminepentaacetate (DTPA)を含む溶液($NaHCO_3$ /DTPA 溶液)を通水させ、蠕動ポンプにより、試料と MCLA 試薬を同時にスパイラルフローセル内へ送り込み、-1200V で光量子倍増管 (PMT, Hamamatsu) によりシグナルを検出した。個体あたりの $O_2^{\cdot -}$ 生成速度は次式より算出した²⁾。

$$k_{\text{prod}} = \frac{[O_2^{\cdot -}]_{ss} (\text{mol/L}) \times \text{flowrate} (\text{L/h})}{\text{number of cells} (\text{cell})} \quad (1)$$

ここで、 k_{prod} ($\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) は $O_2^{\cdot -}$ 生成速度定数を表す。通水速度は 1.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ である。*M.*

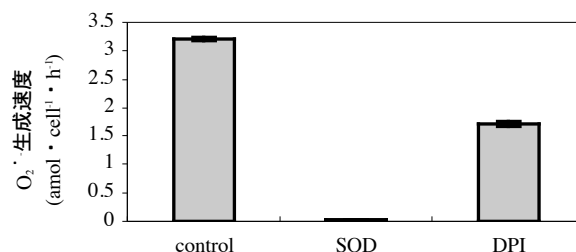


Fig.1 *M. aeruginosa* による $O_2^{\cdot -}$ 生成の有無

aeruginosa による $O_2^{\cdot -}$ の生成を確認するために、5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ superoxide dismutase(SOD), または、15 μM diphenyl eneiodonium chloride(DPI)を $NaHCO_3$ /DTPA 溶液に加え、シグナルが減少するかを確認した。SOD は $O_2^{\cdot -}$ の不均化反応を促進させ、 $O_2^{\cdot -}$ を特異的に消去させる酵素であり、DPI は、藻類の NADPH 活性に起因する $O_2^{\cdot -}$ 生成能を低下させることが知られている³⁾。

2.2 個体数の測定

細胞数の測定は、血球計測版を使い顕微鏡で細胞個体数 ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1}$) を測定した。また、吸光度計により OD660 やクロロフィル-a の測定を行い、個体数との関係を調べた。

2.3 培地中の $O_2^{\cdot -}$ 濃度の違いによる $O_2^{\cdot -}$ 生成速度

$O_2^{\cdot -}$ 濃度を变化させた環境中で *M. aeruginosa* を培養し、*M. aeruginosa* に与える $O_2^{\cdot -}$ の影響を調べた。 $FeCl_3$ 濃度を 1850nM で培養した *M. aeruginosa* に Table1 に示したそれぞれの試薬を添加後、さらに 1 日培養し、 $O_2^{\cdot -}$ 生成速度と増殖速度を測定した。SOD は、 $O_2^{\cdot -}$ を消去させる働きがある。また、Xanthine(X)は Xanthine oxidase(XO)により参加されることで、 $O_2^{\cdot -}$ を生成する。

Table 1 MA 培地に添加した試薬

No.	添加試薬 (最終濃度)
1	添加試薬なし
2	Xanthine(134 μM)
3	Xanthine((134 μM)+XO(1unit/l))
4	SOD(10mg/l)

3. 結果と考察

3.1 $O_2^{\cdot -}$ 生成の有無

SOD や DPI を加えた $NaHCO_3$ /DTPA 溶液を通

水したとき、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度が減少した(Fig.1)。このことより、*M. aeruginosa* により $\text{O}_2^{\cdot -}$ が生成されていることが確認できた。今回の実験で用いた *M. aeruginosa* の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度は $3.2\sim 49\text{amol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。一方、海洋性藻類で調べられている $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度は、 $0.85\text{fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\sim 4\text{pmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ という値が報告されている¹⁾。今回測定された $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度は、海洋性藻類に比べて約 2 オーダー低い値であった。このような $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度の違いは、細胞の大きさや利用可能な鉄濃度、また、細胞に必要な鉄の要求性の違いによるものと推測される⁴⁾。

3.2 鉄濃度変化による増殖速度

FeCl_3 濃度をそれぞれ 1850nM, 185nM, 18.5nM にした培地での増殖速度と $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度を測定した。増殖速度 (day^{-1}) は(2)式から算出した。

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot t \quad (2)$$

ここで、 t は時間(day), N は t 日後の個体数, N_0 は初期の個体数である。この結果、培地中の鉄濃度が低いほど増殖速度が低かった。栄養が十分にある環境中においても、鉄が制限されると *M. aeruginosa* の増殖が抑制されることが確認できた(Fig.2)。

3.3 培地中の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度変化による $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度と増殖速度

SOD を添加すると、培地中の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度は減少する。Fig.3 と Fig.4 における結果を見ると、SOD の添加により増殖速度と $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度は共に減少した。増殖速度の低下は、鉄の還元作用を持った $\text{O}_2^{\cdot -}$ の濃度が減少することにより、利用可能な鉄が少ない環境下になり増殖速度も低下したためと考えられる。Fig.4 では、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度の低下が確認できた。

Xanthine は、XO と反応して $\text{O}_2^{\cdot -}$ を発生させ、培地中の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度を増加させる。Fig.3 において増殖速度が増加したことは、Xanthine と XO を培地に添加した時、発生した $\text{O}_2^{\cdot -}$ が Fe(III) を還元し、 Fe(II) 濃度が増えたことにより増殖速度が増加したためと推測できる。一方で、Xanthine と XO の投入は $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度を低下させた(Fig. 4)。これは、培地中で $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度が増加したことにより、自らの $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成を抑制したためと説明できる。以上のことより、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度の増加に伴い、増殖速度も増加する関係があり、*M. aeruginosa* の鉄摂取に $\text{O}_2^{\cdot -}$ が関わっていることが示唆された。

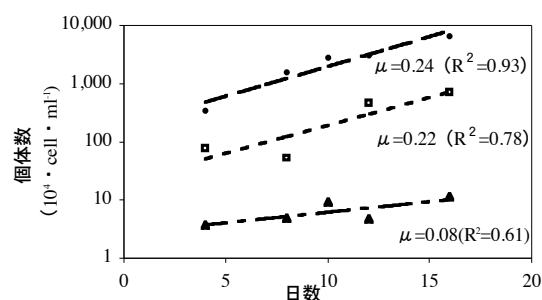


Fig2. *M. aeruginosa* の比増殖速度。Fe(III)の濃度を 1850nM(○), 185nM(□), 18.5nM(△)で示した。

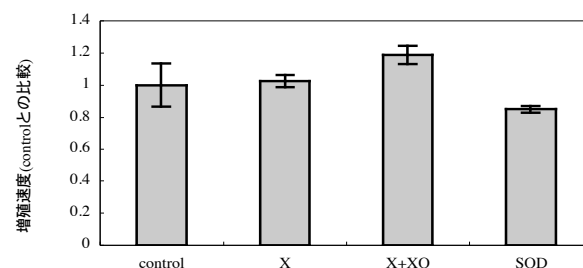


Fig.3 培地中の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度の違いによる増殖速度(Control 比較)

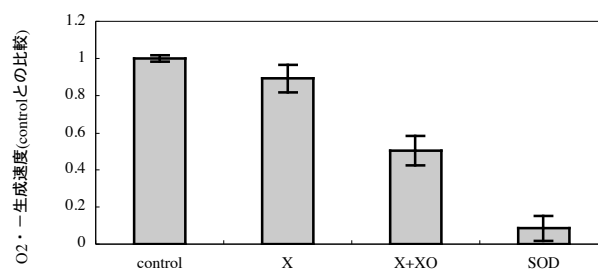


Fig.4 培地中の $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度の違いによる $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成速度(Control 比較)

4. おわりに

本研究では、*M. aeruginosa* によって $\text{O}_2^{\cdot -}$ が生成されていることが確認できた。さらに、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 濃度の上昇と増殖速度の上昇には関係が見られた。以上のことより $\text{O}_2^{\cdot -}$ が、*M. aeruginosa* の増殖に影響を及ぼしていることが示唆された。

5. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費特別研究員奨励費(04725)によって行われたことを報告する。

参考文献

- 1) Albert et al. *Marine pollution Bulletin* 51 428-437
- 2) Garg et al. *J. Phycol.* **43**, 2007, 973-991.
- 3) Kim et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1524**, 2000, 220-227.
- 4) Marshall et al. *Marine Biology*, **147**, 2005, 533-540