

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

Studies on starch and lipids accumulation by laboratory and large scale outdoor cultures in the *Chlorella* species

(クロレラのデンプンとオイル蓄積に関する実験室と屋外大量培養による研究)

氏名 竹下 毅

## 序論

デンプンとオイルは、3-ホスホグリセロールリン酸(3PG)やグリセロールアルデヒド-3-リン酸(GAP)から生合成され、細胞内のエネルギー貯蔵の役割を果たす。クロレラではデンプンとオイルは培養齢にしたがって先にデンプンが蓄積し次にオイルが蓄積する。両者にはトレードオフがあり、デンプンが減るとオイルが蓄積する(Mizuno et al. 2013)。バイオ燃料生産を目的とした研究の中で、微細藻類にストレスを与えると、細胞にオイルが蓄積されることはよく知られている。ストレスには N、S、P などの栄養塩制限、温度や光強度などの環境要因などがあり、これらを制御することでデンプンやオイルの蓄積を制御することが可能となる。そのためにはデンプンとオイルのトレードオフや蓄積のメカニズムを明らかにする必要がある。

本研究では、クロレラの中から6種8株を選び、培地、光条件、培養規模についてデンプンとオイルの蓄積について解析した。顕微鏡による形態観察、GC-MSによる脂肪酸組成分析、今回新規に開発した簡便な定量法を用いてデンプン量とオイル量を経時的に解析した。また、クロレラのなかでも特に物質生産性に優れたパラクロレラ(*Parachlorella kessleri*)とその重イオンビーム照射変異株 PK4 を用いて屋外大量培養を実施し、PK4 株についてはリシーケンスによる変異解析によって変異箇所を特定を試みた。

## 結果と考察

### 1. 微細藻類細胞のデンプンとオイルの簡便な測定法

クロレラの細胞を継時的に顕微鏡観察し、デンプンとオイルがいつ蓄積し、またそれらは細胞内にどのように局在するかを観察した。

TAP 培地で前培養した *P. kessleri* を用い、植え継ぎ直後(0日目)、指数増殖期(6日目)、定常期(18日目)の細胞のオイルとデンプンを NileRed 染色と Lugol 染色とで顕微鏡観察した。培養0日目の細胞ではよく発達したカップ状の葉緑体が細胞の多くの部分を占め、細胞内にはデンプンもオイルの蓄積も見られなかった(図1A-D)。培養6日目の細胞では、4つの内生胞子をもった増殖中の大きな母細胞と母細胞壁から遊離した小さな娘細胞がともに観察できた。いずれの細胞でもカップ状の葉緑体が発達していた。オイルは蓄積していないが、Lugol 染色により多量のデンプン粒の蓄積が両方の細胞で観察できた(Fig.1 E-H)。培養18日目の細胞では、細胞径が1-3 μmの比較的小さい細胞のみとなっていた。葉

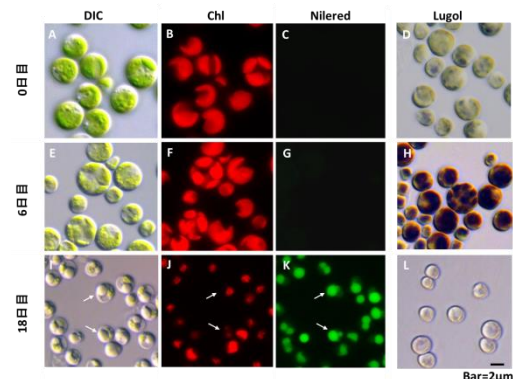


図1 継時的な顕微鏡観察。A-D: 培養0日目、E-H: 培養6日目、I-L: 培養18日目の細胞のノマルスキー像(DIC)、クロロフィルの自家蛍光像(Chl)、NileRed染色像、Lugol染色像。DIC、Chl、NileRedは同一視野、Lugol染色は別視野である。培養0日目、6日目、18日目はそれぞれゼロ期、デンプン期、オイル期に当たる。矢印は油滴を示す。

緑体は縮退し、油滴が観察された (図 1 矢印)。NileRed 染色ではこの油滴に強いシグナルが観察され、細胞にオイルが蓄積されていることがわかった。一方、Lugol 染色では細胞はほとんど染色されず、デンプンの蓄積はほとんどみられなかった (Fig.1 I-L)。このようにクロレラは培養齢に従って、ほとんど何も蓄積していない時期 (ゼロ期) からデンプンを蓄積する時期 (デンプン期) を経てオイルを蓄積する時期 (オイル期) へとシフトすることがわかった。

この顕微鏡観察の結果から、デンプン期とオイル期の細胞をそれぞれ Lugol 染色と NileRed 染色し、プレートリーダーと組み合わせてデンプンとオイルを簡便に測定する方法を開発した。濃度範囲は限られるが、迅速に定量できることがわかった。

## 2. 比較的強光かつ通気培養条件下のクロレラ 6 種 8 株のデンプンとオイル蓄積

高いバイオマス生産性を達成するために、強光通気培養を検討した。LED 電球、冷陰極管照明 (CCFL)、白色蛍光灯を組み合わせた光源で  $600 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の強光を作り、Air  $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} + 2\text{-}3\% \text{ CO}_2$  の通気条件で培養した。光は明暗光条件 (LD) と連続光条件 (LL) 条件の 2 種類、培地には TAP オイル蓄積誘導の効果があるイオウを欠乏させた培地 (dSTAP) の 2 種類を用いた。実験にはクロレラの 6 種 8 株を用いた。TAP 培地の強光下の増殖は良好で、いずれの株でも細胞数は 5 日目までに定常期に達した。一方イオウ欠乏では指数増殖期の増殖力が低く、TAP 培地では初期の 25-70 倍の細胞増殖がみられたが、dSTAP 培地では初期の 1.4-3.2 倍にしか細胞増殖しなかった。

TAP 培地では最大のデンプン蓄積は 4-5 日目で見られ、最大に達した後は減少傾向を示した (図 2A)。オイル量の変化は、3 日目以降に急激に増加し、培養 5 日目で最大となった (図 2B)。TAP 培地の LL 条件ではデンプン、オイル共に LD 条件より高い値を示し、*P. kessleri* NIES-2152 株は LD 条件に対し LL 条件では 2.15 倍のオイル蓄積を示した。一方 dSTAP 培地で、TAP 培地の時と比較して最大となるデンプン量とオイル量を示す培養齢は早くなったが、総量は低下した (図 2C, D)。

デンプンとオイルの蓄積について培養条件別に乾燥重量当りに占める割合で示した (図 3)。クロレラでは種または培養条件に依存して様々なデンプンとオイルの蓄積動態が観察され、パラクロレラではデンプンとオイルのトレードオフが比較的明瞭に示される条件もあった。

6 種 8 株のクロレラのバイオマス生産性のうち、最も高かったのは TAP 培地の LL 条件の *P. kessleri* NIES-2159 株だった ( $1.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Day}^{-1}$ )。dSTAP 培地ではバイオマスは著しく低下した。また、蓄積したオイルの脂肪酸組成を調査したところ、構成する脂肪酸は炭素数 16 と

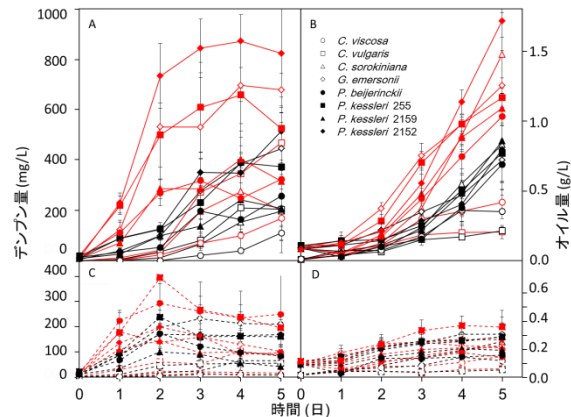


図 2. クロレラ 6 種 8 株のデンプンとオイルの経時観察。(a) TAP 培地のデンプン含量 (mg/L)、(b) TAP 培地のオイル含量 (g/L)、(c) dSTAP 培地のデンプン含量 (mg/L)、(d) dSTAP 培地のオイル含量 (g/L)。デンプン量の増加はオイル量の増加よりも早く最大に到達した。一方でオイル量はデンプン量の減少が始まった後に最大に到達した。

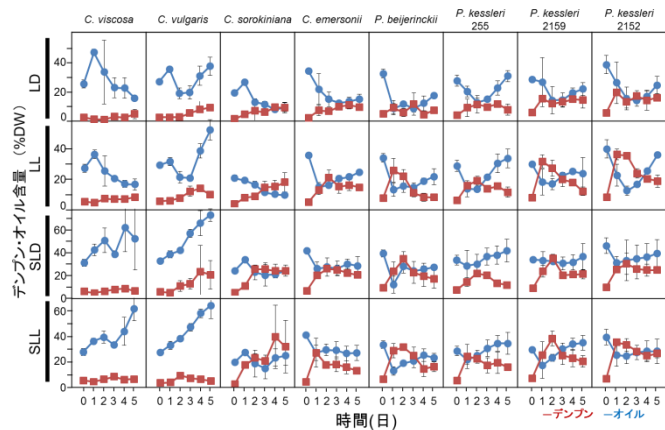


図 3. クロレラ 6 種 8 株の乾燥重量当たりのデンプンとオイル含量の経時観察。蓄積したデンプンとオイルについて乾燥重量当たりの割合で示した。デンプンとオイル種や培養条件によって様々な蓄積動態を示した。

炭素数 18 で不飽和度は 0 から 3 が見られたが、中でも C16:0、C18:1、C18:2、C18:3 が 70% 以上を占めていた。これらのことから、強光下でクロレラはよく増殖し、高いバイオマス生産性を示すことがわかった。

### 3. 屋外培養に有効な培地希釈法によるオイル増産と *P. kessleri* PK4 株の欠損部位

微細藻類の培養に用いられる培地は様々な種類があり、それぞれ特徴がある。TAP 培地では酢酸を用い炭素源を補強しているが、SS 培地では尿素を用い窒素源を補強している点で異なっている。そこで、*P. kessleri* の WT 株と窒素飢餓条件で高いオイル蓄積を示す PK4 株を TAP 培地と SS 培地で培養して違いを比較した。8 日間の培養の結果、WT 株と PK4 株は TAP 培地では培養 6 日目には増殖が止まり定常期に達し、SS 培地では培養 8 日目まで増殖を続けた (図 4 A)。デンプン量は TAP 培地では培養 6 日目には増加が止まったが、SS 培地では増加し続けた (図 4 B)。一方でオイル量は TAP 培地では培養 4 日目から急激に増加したが、SS 培地ではほとんど増加しなかった (図 4 C)。そこで増殖の良い SS 培地に対し、希釈培養法によるオイルの蓄積誘導を検討した。希釈培養法は、培地の一部を捨て、同量の水で希釈する方法で、デンプンやオイル蓄積誘導法として報告されている方法である (Brányiková et al. 2011)。培養 4 日目で培地を希釈 (4 倍、5 倍、10 倍希釈) した結果、吸光度とデンプンは WT 株も PK4 株も一旦低下した後で回復し、増殖を続けた。(図 5 A,B)。オイル量は希釈後に急激に増加し (図 5 C)、オイル蓄積の増加は WT 株よりも PK4 株でより顕著にみられた。

最も安価に利用可能な強光は太陽光であるが、太陽光下でもオイル蓄積が誘導されるかは不明である。太陽光下で大量培養する際には、培地の希釈により高いオイル蓄積の誘導が報告されている (Přibyl et al. 2012; Li et al., 2013)。一方で、窒素欠乏条件で野生株よりも高いオイル蓄積を示す、重イオンビーム照射して得られた欠変異株である PK4 株が単離されている (Ota et al. 2013)。そこでこれらを組み合わせ、太陽光下の希釈法培養によるオイル蓄積誘導について検討した。培養にはチェコ共和国 Třeboň にある 150L の薄層光バイオリアクター (T-PBR) を使用した (49°0'21.546"N, 14°46'21.538"E)。培養 7 日目に培地を希釈し、オイル蓄積の誘導を試みた。その結果、培養 9 日目からオイルが増加し始め、最大 66%DW のオイル蓄積を示した (図 6)。

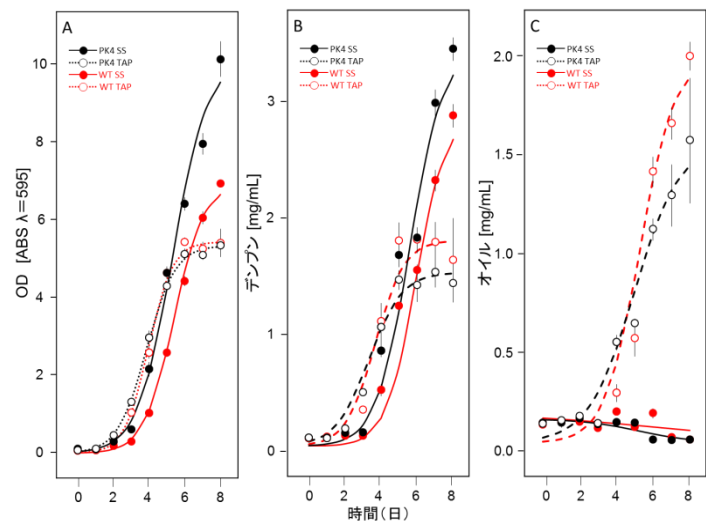


図 4. TAP 培地と SS 培地における吸光度、デンプン量、オイル量の経時変化。●PK4 株 SS 培地、○PK4 株 TAP 培地、●WT 株 SS 培地、○WT 株 TAP 培地。WT 株と PK4 株を TAP 培地と SS 培地で培養した時の経時的な吸光度、デンプン量、オイル量を測定した。A 吸光度、B デンプン量、C オイル量。TAP 培地では培養 6 日目に吸光度とデンプン量の増加が止まったが SS 培地では増加し続けた。一方オイル量は TAP 培地では高いオイル蓄積を示したが、SS 培地ではオイルは蓄積しなかった。

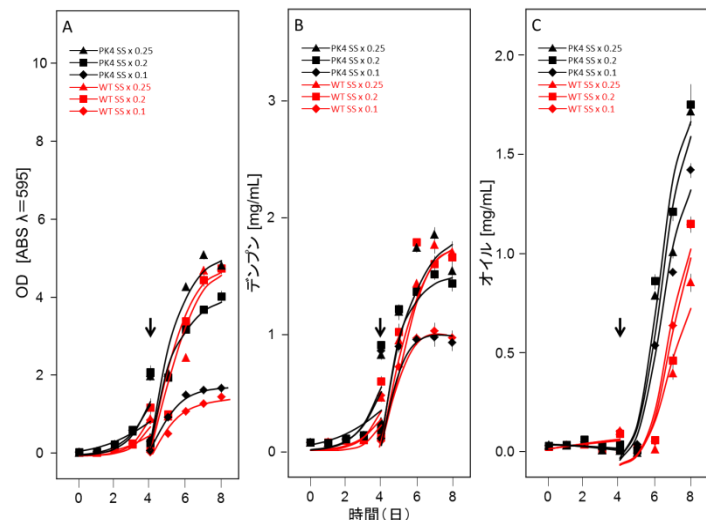


図 5. 希釈した SS 培地における吸光度、デンプン量、オイル量の経時変化。▲4 倍希釈 (x0.25)、■5 倍希釈 (x0.2)、◆10 倍希釈 (x0.1) -PK4 株、-WT 株。WT 株と PK4 株を培養 4 日目に希釈した SS 培地で培養した時の経時的な吸光度、デンプン量、オイル量を測定した。A 吸光度、B デンプン量、C オイル量。

これは先行研究で報告された野生株のオイル蓄積量の2倍を超える値である。

用いたPK4株について、リシーケンスによる欠失遺伝子の解析を行ったところ、2か所の一塩基置換(SNPs)が確認された。うち1か所は1,4-beta-mannanaseをコードしており、糖代謝への影響が考えられる。オイル蓄積に影響があるかは不明だが、糖代謝はデンプンの合成と密接に関連しており、デンプンとオイルのトレードオフを介してオイル蓄積にも何らかの影響があるかもしれない。

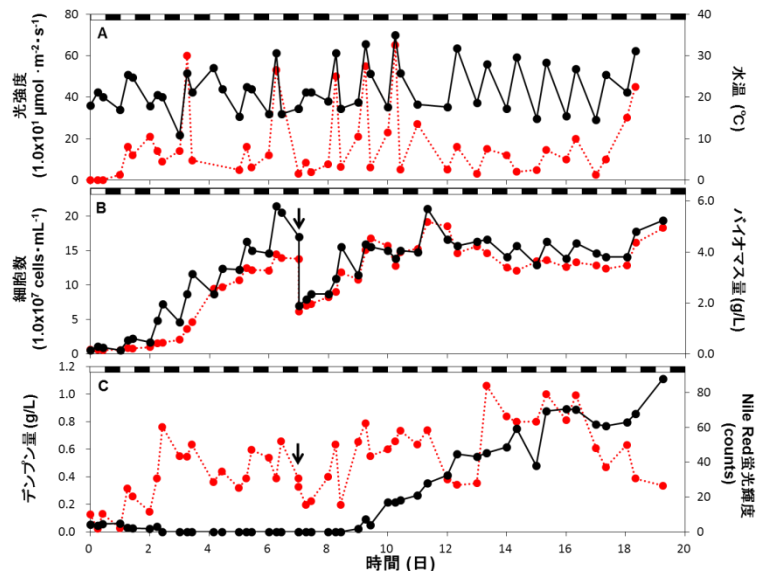


図 6. 屋外大量培養系における、A 光強度 (破線)、水温 (実線)、B 細胞数 (破線)、乾燥重量 (実線)、C デンプン量 (破線)、オイル量 (実線) の経時変化。図中の7日目 (↓) で培地を希釈した。培地希釈後、細胞数と乾燥重量は回復し、オイル蓄積が培養9日目から始まっていることが確認できる。

## 結論

1. 経時的な顕微鏡観察からデンプンとオイルのトレードオフが示された。それらの細胞の染色性をマイクロプレートリーダーで測定することでデンプンとオイルを簡便に定量できることを示した。
2. 高光強度下のデンプンとオイルのトレードオフは多くの種や株でも見られ、クロレラ6種8株中5株では特に明瞭に観察された。また、TAP培地では高いバイオマス生産性と高いオイル蓄積を示したが、dSTAP培地ではオイル蓄積は高いがバイオマスが少なく総量は低下した。
3. 炭素源を含むTAP培地に替え、窒素源を補強するSS培地で培養したところ、そのままではオイルの蓄積がみられず、希釈法により培地を希釈することでオイル蓄積を誘導できた。誘導後にはデンプンとオイルのトレードオフがみられた。
4. PK4株を用いた屋外の大量培養では、希釈培養法によりオイル蓄積を誘導可能で、66%DWを達成した。このPK4株の変異箇所の1つは1,4-beta-mannanaseをコードする領域であることがわかった。糖代謝、デンプン蓄積を介してオイル蓄積にも影響している可能性がある。

## 発表論文

- Takeshita, T.**, Takeda, K., Ota, S., Yamazaki, T., and Kawano, S. (2015) A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. *Cytologia*. 80, 475-481
- Yamazaki, T., Yamashita, Y., Ota, S., **Takeshita, T.**, Y. Kazama, Y., Abe, T., and Kawano, S. (2014) Characterization of isolates derived from heavy-ion-beam irradiated cells in the unicellular green alga *Parachlorella kessleri*. *RIKEN Accel. Prog.* 47, 301.
- Takeshita, T.**, Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., and Kawano, S. (2014) Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresour. Technol.* 158, 127-134.
- Ota, S., Matsuda, T., **Takeshita, T.**, Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano, S. (2013) Effect of heavy-ion beam irradiation on the survival and growth rates in *Parachlorella kessleri*, *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 46, 266.
- Ota, S., Matsuda, T., **Takeshita, T.**, Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., and Kawano, S. (2013) Phenotypic spectrum of *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta) mutants produced by heavy-ion irradiation. *Bioresour. Technol.* 149, 432-438.
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., **Takeshita, T.**, Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., and Kawano, S. (2013), Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresour. Technol.* 129, 150-155

