クロレラの脂質生産と光環境条件

伊吹　楓　　角谷　環子　　巽　理紗　　寺井　実奈　　中嶋　実生
兵庫県立神戸高等学校　総合理学科２年

クロレラ NIES641 株を用いて、日長条件と細胞内脂質量の関係を個体数と共に調べた。この結果、明暗の切り替えがあることで脂質生産効率が高まるということが分かった。また、脂質量比較方法として、オイルレッド O 液（コスモ・バイオ株式会社製）を用いた脂質染色・抽出実験を検討し、クロレラにおける細胞内脂質量の比較方法が確立した

1　序論

近年、温室効果ガスの削減をはじめとして、環境保全意識が高まり持続可能な社会を目指す風潮がある。そんな中、一部の微細藻類から作るバイオ燃料は、従来の植物性バイオ燃料に比べ生産効率が高いことに加え、食品との競合もないため次世代のバイオ燃料原料として期待されている。微細藻類は、別名植物プランクトンで、単細胞を単位生命体とする植物である。私たちは、光合成能力に優れ、微細藻類の中でも培養が比較的容易で手に入れやすいクロレラを使用し、その脂質生産に適した条件を見つけたいと考えた。クロレラの脂質生産に適した条件はクロレラに何らかのストレスをあたえることであり、現時点で、窒素源、硫黄源、鉄源、リン源を欠乏させること、200 ㎛光量子束密度以上の光を照射して培養すること、赤い光だけで培養することが知られている。そこで、私たちは日長条件の違いによってクロレラの脂質生産量がどのように変化するのか、クロレラの増殖と共に調べた。

2　クロレラについて

・種類　クロレラ NIES641 株（国立環境研究所より分譲）

・培養方法

培養は、C 培地を入れた三角フラスコにクロレラを入れ、人工気象機(幅 515mm、奥行き 460mm)内で一定の環境条件の下で行った。温度は 26℃に保ち、40W の直管蛍光灯を人工気象機の側面 2 面に各 1 本ずつ、10 時間点灯、14 時間消灯(以下 10L:14D と示す）させて培養した。培養に使用した C 培地は国立環境研究所に指定された組成で作成した。(表 1)

▼表１

C培地

Ca(NO3)2・4H2O	15mg
KNO3	10mg
β −Na2glycerophosphate・5H2O	5mg
MgSO4・7H2O	4mg
Vitamin B12	0.01μ g
Biotin	0.01μ g
Thiamin HCl	1μ g
PIV metals	0.3mL
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	50mg
Distilled water	99.7mL

pH 7.5

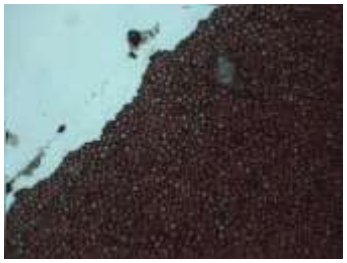
PIV metals

Na2EDTA・2H2O	100mg
FeCl3・6H2O	19.6mg
MnCl2・4H2O	3.6mg
ZnCl2	1.04mg
CoCl2・6H2O	0.4mg
Na2MoO4・2H2O	0.25mg
Distilled water	100mL

3 オイルレッドＯ液を用いた脂質染色・抽出

・脂質量比較の原理

オイルレッドＯ液は脂質を赤色に染める染色液であり、この色素の相対的な量は 540nm における吸光度(以下 ABS と示す)で示される。よって、540nm における ABS からクロレラの細胞内脂質量を比較することができる。



▲図１
染色された細胞内脂質

▲図２
細胞内脂質が抽出されない状態

・脂質染色・抽出の方法について

コスモ・バイオ株式会社製のリピッドアッセイキット(オイルレッドＯ液と抽出液、固定液)を用いてクロレラ(10L:14D)を染色し、クロレラの染色した細胞内脂質の抽出を試みた。

(1) クロレラ液が入ったチューブを遠心分離(3000×2 回)にかけ、各チューブに 12ml のリン酸緩衝生理食塩水(PBS 溶液)を加えもう一度遠心分離する。
(2) 各チューブに固定液 12ml を加え室温で一晩固定する。
(3) 固定液とクロレラが入ったチューブを遠心分離にかけ固定液を除去後、精製水 12ml を加え洗浄する。
(4) 調整したオイルレッドＯ液を 12ml 加え、室温で 15 分静置する。
(5) 遠心分離を行い、オイルレッドＯ液を除去し、精製水で 3 回洗う。
(6) シャーレに移し替え、乾燥させる。
(7) 抽出液を 12ml ずつ加え、30～120 分静置し色素を溶出させる。
(8) 分光光度計で、色素を溶出させた溶液の 540nm における ABS を測る。

(6)の操作後に電子光学顕微鏡(2500 倍)で観察を行った結果、クロレラの細胞内の脂質が染色されていることは確認できた(図 1 の黒い部分)。しかし、細胞外に抽出されず、細胞内に赤い塊のまま残っていた。(図 2)

染色された細胞内脂質が細胞外に抽出されなかった理由は、オイルレッドＯ液は、本来、動物細胞の脂質を染色、抽出するものであり、クロレラの場合、細胞壁があるためだと考えられる。そこで、染色された細胞内脂質が細胞壁を通過できるように、下記の**操作(a)～(c)**を(6)と(7)の間に追加することにした。また、(6)の操作で乾燥により細胞が塊となっていたため、精製水を少し残すことにした。

操作(a)　細胞壁の成分セルロースを分解する酵素セルラーゼを加える。

クロレラを入れたマイクロチューブにセルラーゼ１ml を加え、約 3 分間減圧する。ウォーターバスを 30℃に保ち 5 分ごとにクロレラの入ったマイクロチューブを振りながら 30 分温める。遠心分離してセルラーゼを取り除き蒸留水で洗浄後、シャーレまたは乳鉢に移す。

操作(b)　乳棒と乳鉢でクロレラをすりつぶす。

クロレラと少量の蒸留水を乳鉢に入れ乳棒で強めに 2 分間すりつぶす。

操作(c)　抽出液を極性の低いヘキサンに変える。

色素の抽出に最適な方法を確立するため、**操作(a)～(c)**を組み合わせて脂質染色・抽出実験を行った結果が表 2 である。(10Ｌ:14Ｄのクロレラを使用)

▼表 2

(a)セルラーゼ	●	●		●	●		
(b)すりつぶし	●		●	●		●	
(c)ヘキサン				●	●	●	●
色素の抽出	○	×	○	×	×	×	×

表 2 の結果より、ヘキサンは抽出液として機能しない。これは、ヘキサンのみでは、クロレラとヘキサンが触れ合うことができなかったためである。セルラーゼ処理をしても抽出に影響はなく、セルラーゼ自体は、イソプロパノールの働きを阻害しないといえる。セルラーゼだけでは、細胞壁が弱くなっただけで、細胞壁を完全に破壊することはできない。そのため、すりつぶす処理がないと抽出は不可能であるといえる。

以上から、**操作(a)**のすりつぶす操作と抽出液にイソプロパノールを使用することが色素抽出に必要であると分かった。

4　実験方法

光の条件設定は次の仮説(ⅰ)～(ⅲ)に基づき、①～⑤の日長条件で人工気象機内 26℃に保ち、約 2 週間培養した。なお、③の 10L:14D は、クロレラの培養に適した条件（国立環境研究所のウェブサイトより）である。

仮説(ⅰ)　光を当てる時間が長いほどクロレラはよく増殖する。

仮説(ⅱ)　光を当てない時間にクロレラは脂質を生産する。

仮説(ⅲ)　光を当てる、当てないという環境の変化によるストレスでクロレラの脂質生産は活発になる。

・日長条件

①24 時間消灯(0L:24D)

②1 時間点灯、23 時間消灯(1L:23D)

③10 時間点灯、14 時間消灯(10L:14D)

④23 時間点灯、1 時間消灯(23L:1D)

⑤24 時間点灯(24L:0D)

①～⑤の日長条件で培養後、オイルレッド O 液による脂質染色・抽出方法(6)と(7)の間に次の**操作(a)**と**操作(b)**を加える。その後、分光光度計で 540nm における ABS を測る。

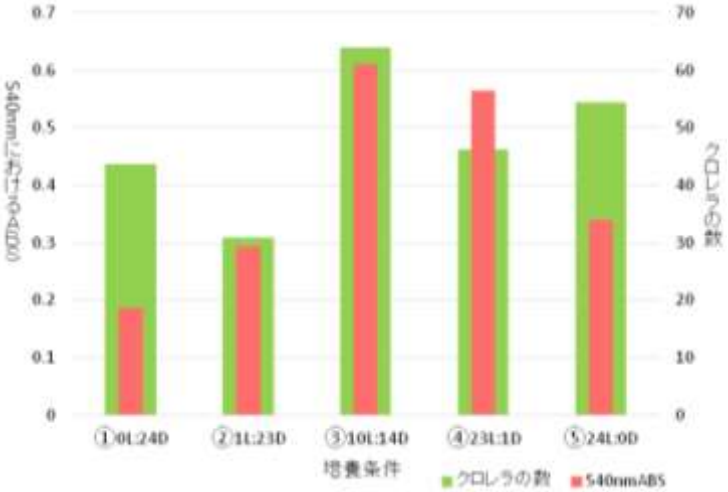
・クロレラの数え方

倍率 2500 倍の電子光学顕微鏡で無作為に 10 ヵ所選択し、視野内(234μm×175μm)にあるクロレラを数えて平均を求める。

5　実験結果

①～⑤全ての抽出液に赤色がつき細胞内脂質が抽出されたことが確認できた。

図 3 は、①～⑤の日長条件で培養したクロレラの個体数と、染色された細胞内脂質の 540nm における ABS を示したグラフである。



▲図 3

6　考察

・①と②を比較すると、①の方が個体数は多いが、②の方が ABS が高い。よって、②の方がより効率よく脂質を生産しているといえる。

・①と④を比較すると、個体数はほぼ同じであるが、④の方が ABS が高い。よって、明暗の切り替えが脂質生産を促進しているといえる。

・②と⑤を比較すると、個体数に大きな差がある。ABS の差は個体数の差によるものと考えられる。また、この個体数差は光照射時間が増殖に影響を

与えたものといえる。

・③と④を比較すると、③の方が個体数が多く、その差は小さくない。ABS も③の方が高いが 0.046 と僅差である。個体数の計測は、サンプル総量に対しごく少量で行っていたので、③と④の個体数の差はサンプル全体では非常に大きくなる。全てのクロレラが個体あたり同量の脂質を生産したと仮定すると、ABS は③の方が高いが、これは一個体の脂質生産効率によるものではなく、個体数によってできた差と考えられる。

・④と⑤を比較すると、⑤の方が個体数は多いが、④の方が ABS が高いため、④の方がより効率よく脂質を生産しているといえる。

・②と④を比較すると、②から④への個体数の増加量に対し、ABS の変化量が著しく大きいので、同じ明⇔暗の切り替えでも、光の照射時間が長い方が脂質の生産効率が良いと考えられる。

総合的に見ると、①と②、④と⑤、①と③と⑤の比較により、以下のことが分かる。

・明⇔暗の切り替えがクロレラにとってストレスとなり、そのストレスが一個体のクロレラの脂質生産を促進し、脂質生産効率を高めた。

・明⇔暗の切り替えで、光の照射時間が長い方が脂質生産が促進されている。

・光の照射時間を長くすると、個体数が多くなり、そのために生産された総脂質量が多くなった。

7　謝辞

この研究においてお世話になった、大阪工業大学研究支援センターの川野満弘教授・河野准教授、京都大学大学院宮下英明教授、コスモ・バイオ株式会社様、国立環境研究所様、そしてご指導頂いた先生方にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

8　参考文献

●松田尚広,竹下毅,太田修平,山崎誠和,風間祐介,阿部知子,平田愛子,河野重行.(2014)「微細藻類への重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株の作出」,『生物工学会誌』92(11),pp602-606.

●岩渕雅明.(1998)「バイオ技術によるエネルギーの生産」,『燃料協会誌』67(11),pp910-919,燃料協会.

●河崎利夫,堀士郎,鬼頭俊而,森次益三.(1969)「クロレラの培養並びに無機養分要求性について」http://core.ac.uk/download/files/493/12556321.pdf

●河野重行.「微細藻類の倍数化と重イオンビーム照射によるバイオ燃料増産株作出に関する新技術開発」http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei23/pdf/pdf27/27-003.pdf

●電力中央研究所.「微生物による CO2 固定 7.螺旋状チューブラーリアクターデザインの有用性の検討」http://criepi.denken.or.jp/jp/kenkikaku/report/download/jAxjyH98cdHDXEHhzRaaf8hqAjhX512c/report.pdf

●(2010)「Algae Research in Full Bloom at NREL」http://www.nrel.gov/features/20101102_algae.html

●佐藤淳史.(2014)「Regulation of Lipid Accumulation in Green Algae https://www.toyaku.ac.jp/cms/wp-content/themes/toyaku/pdf/thesis2014_03_20_sato02.pdf

●国立環境研究所　微生物系統保存施設　培地リスト http://mcc.nies.go.jp/02medium.html