

目的

微生物であるクマムシがどんな過酷な環境でも耐えられる能力を持っていることを知り、微生物にはどのような特徴があるのか気になった。調べていく中で別の微生物であるユーグレナは栄養価が高いため、食品に使われることがあることを知った。ほかに、どのように利用されているのか調べたところ燃料に使われる計画があるとのことだった。そして、ユーグレナから効率よく燃料の成分となる油脂を作り出すにはどうしたらよいか考えた。本研究ではユーグレナから油脂成分を作り出すために以下の条件で実験を行った。

材料と方法

Euglena gracilis は国立環境研究所から分与された NIES-48 株を用いた。これを、以下に示す組成の培地を用いて 25℃で培養した。

有機培地並びに無機培地

(mg/L):NH₄NO₃ (500), KH₂PO₄ (540), MgSO₄·7H₂O (250), NaCl (100), CaCl₂·2H₂O (24), FeNH₄Citrate (3), H₃BO₃ (2.86), MnCl₂·4H₂O (1.81), ZnSO₄·7H₂O (0.222), Na₂MoO₄·2H₂O (0.39), CuSO₄·5H₂O (0.079), Co(NO₃)₂·6H₂O (0.05), thiamine-HCl (vitamin B₁) (1×10⁻³), cyanocobalamin (vitamin B₁₂) (1×10⁻⁴)

この培地を無機培地とした。

この組成に、glucose (15000)を添加したものを有機培地とした。

培養条件

E. gracilis は嫌気条件で貯蔵多糖からミスチリン酸ミスチルを主とするワックスエステル（以下油脂と記載する）を蓄積する（Yamada ら 2016）。以下の条件で油脂合成を行った。

実験 I

実験 I では無機、有機と明暗条件に分けて実験を行った。

100 mL の無機培地で連続光照射(100 μmol/m²/s)下 *E. gracilis* を 2 週間培養した後、ここから 2.2 mL ずつ取りだし、4 本の 2 mL プラスチックチューブに移し蓋をした。これで嫌気条件を作り出した。2 本には 83 mM になるようにグルコースを加え有機条件とし、残りの 2 本はグルコースを加えず無機条件とした。有機条件と無機条件のプラスチックチューブ 1 本ずつをアルミホイルで覆い暗条件とし、アルミホイルで覆わない残りの 2 本を明条件とした。細胞の採取は日にちをずらして 1 日から 5 日連続的に行った。

実験 II

実験 II では前培養を有機条件とし明暗を分けて嫌気処理を行った。

100 mL の有機培地 (15 mg/mL グルコースを含む) で、*E. gracilis* を 2 週間培養した後 1.7 mL ずつ取り出し 1.5 mL プラスチックチューブに移し蓋をした。これで嫌気条件を作り出した。1 本はアルミホイルで覆い暗条件とした。実験 I と同様に 1 日から 5 日連続的に細胞を採取した。

E. gracilis に蓄積されたワックスエステルの検出方法

細胞懸濁液 200 μ L に 10 μ M BODIPY 493/503(Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boron Sigma Aldrich 社、図 1) (1mM ジメチルスルホキシド溶液を使用直前に水で 100 倍希釈したもの) を 200 μ L 混合し、5 分間暗所に静置した。その後遠心し、沈殿した細胞を蒸留水で懸濁した。これらの試料について顕微鏡(OLYMPUS B×51)で蛍光(励起波長 488 nm)を観察した。

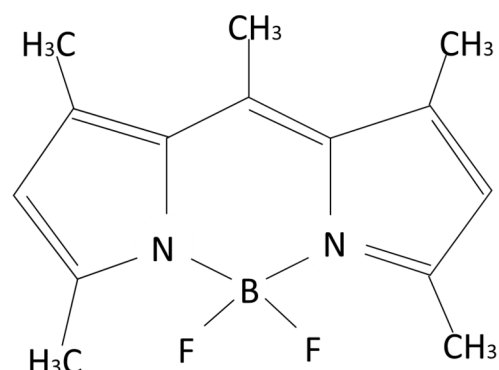


図 1 BODIPY 493/503 の構造式

結果・考察

Yamada ら (2016) によると *E. gracilis* では嫌気条件において多糖から油脂への変換がおけると記載されていた。この報告に準じて以下の実験を行った。

実験 I

染色後の顕微鏡写真を図 2 に示した。

嫌気処理を、暗条件で行った場合は 1 日程度でミドリムシがすべて死んでしまったため顕微鏡観察は行わなかった。この条件は油脂生産には適さないと判断した。

嫌気処理を光照射下で行った場合は無機培地、有機培地いずれも、3 日目の蛍光が強くなっていた。5 日目は 3 日目に比べて強い蛍光を発する細胞が少なかったことから 3 日目がピークだと考えられた。

無機培地と比べると有機培地で嫌気処理をした場合の蛍光の強度が高いため、グルコースがあることで作られる油脂の生成量は多くなると考えられる。

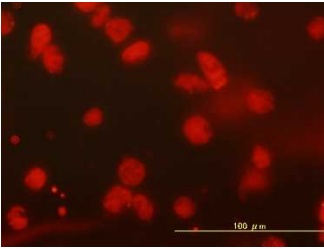
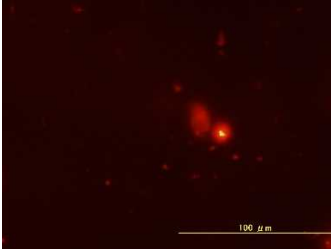
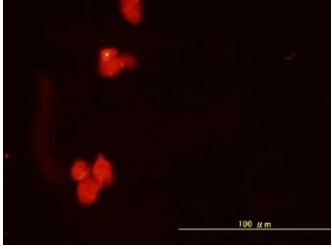
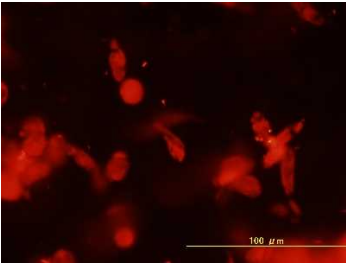
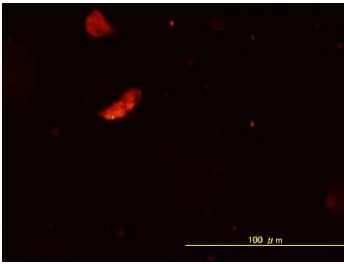
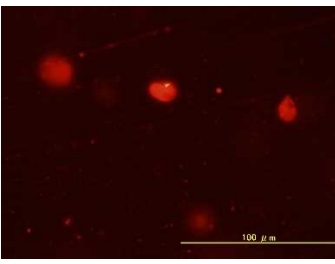
有機培養			
	1 日目	3 日目	5 日目
無機培養			
	1 日目	3 日目	5 日目

図 2 無機培地で前培養した後、有機条件、無機条件で嫌気処理を行った *E. gracilis* の染色像。無機培養で培養した *E. gracilis* をそれぞれ有機培地と無機培地に移しどちらも明条件のもと 1 日から 5 日間培養した。これらの細胞を BODIPY で染色し観察した。BODIPY で染色された *E. gracilis* は葉緑体の自家蛍光により顕微鏡では赤く見え、油は黄色く見える。

実験 II

結果を図 3 に示した。

実験 I で有機培地の油脂生成量の方が多かったため、前培養を有機培地で行えばより多くの油脂が生産されるのではないかと考えた。さらに、嫌気処理を明暗に分けて実験した。

暗条件では嫌気処理を行った試料について 5 日目の結果のみ示した。暗条件、明条件ともに前培養を無機培地で行った場合と比べて 3 日目以降も蛍光が強くなっていることから、油脂生産がピークを示すまでの日数にずれがあり、生成速度、最大生成量などに違いが出ていることが示唆された。

このことから、有機培地の方がより油脂生産が高いと考えた。明条件の方が生育が良いということが分かった。

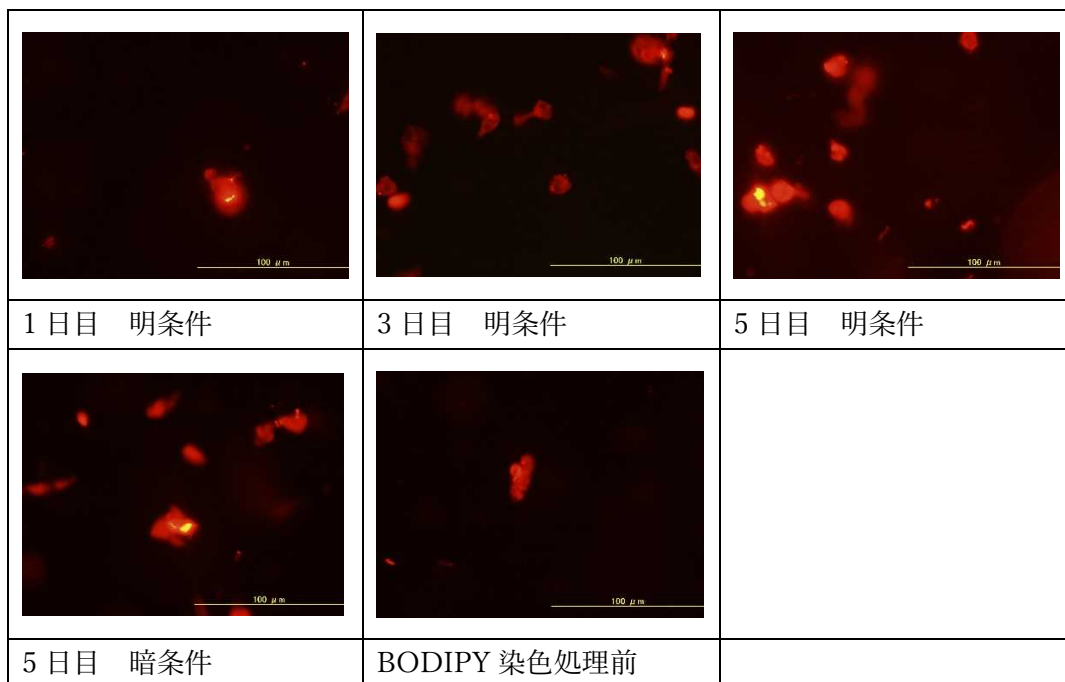


図 3 有機培地で前培養した後、明暗条件で嫌気処理を行った *E. gracilis* の染色像。*E. gracilis* を有機培養で培養した後、明暗条件で 5 日目まで処理した後、BODIPY で染色し観察した。BODIPY で染色された *E. gracilis* は顕微鏡により赤く見え、油脂は黄色く見える。

これからの課題

油脂生産のピーク日数が完全には把握できなかったため 5 日目以降の培養を進めていきたい。

油脂生産量を数値化しグラフとして示すなど定量的な表示ができなかった。これまでの実験では油脂の生産量の判断が主観的なので複数回の平均をとるか、もしくはスポットを当てる場所の選別（顕微鏡のソフトウェア上で輝度の基準を選ぶ操作）をすることでより客観的な結果を出すことができると考えられる。

前培養の時点から、嫌気処理開始時の細胞の濃度をそろえる。また、嫌気処理の日数検討なども含めた実験をすることで、初期段階の栄養、経過日数による油脂の生成量の差異があるかも明確にしていきたい。

文献

Yamada K, Suzuki H, Takeuchi T, Kazama Y, Mitra S, Abe T, Goda K, Suzuki K & Iwata O (2016) Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting. Scientific Reports 6:26327