

高温耐性緑藻 *Desmodesmus* sp. の単離とその成長特性

佐々木 洋¹・石川(石渡) 由紀²・臼井 利典³・野坂 裕一⁴

Isolation and the growth characteristics of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp.

Hiroshi SASAKI¹, Yuki ISHIKAWA-ISHIWATA², Toshinori USUI³, Yuichi NOSAKA⁴

¹ Department of Biological Engineering, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, 1 Shinmito, Minamisakai, Ishinomaki 986-8580

² Global and Local Environment Co-creation Institute, Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo-cho, Mito, Ibaraki 310-8512

³ Okinawa Innovation Center, Cell Medica Co., Ltd, 12-73 Susaki, Uruma-shi, Okinawa 904-2234

⁴ Department of Marine Biology and Sciences, Faculty of Biological Sciences, Tokai University, 5-1-1 Minamisawa, Minami-ku, Sapporo, Hokkaido 005-0825

Abstract

We successfully isolated thermo-tolerant green algae *Desmodesmus* sp. and investigated their growth characteristics. The experiment was conducted under $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24h illuminated, nutrient-enriched condition. The temperature range was from 20–40°C and the size distribution was investigated under each temperature. It is confirmed that *Desmodesmus* sp. can be survived under extremely high temperature, 40°C, and size distribution under the highest temperature was 1.9 times larger than those under 20–35°C. We discussed the reason for the larger size distribution under the highest temperature.

1. 背景

近年の高まる気候変動への適応策の一つとして、微細藻類を原料としたバイオディーゼル燃料(BDF)の生成が試みられているが、微細藻類の大量培養を季節変化の激しい日本で実現するためには、一年間を通じた安定供給が課題である。石巻専修大学佐々木研究室では、これまでに屋内培養施設にて、微細藻類の大量培養を試みてきたが、夏季において屋内施設の気温は35°Cを超えてしまう。これまで有望株として真正眼点藻綱の *Nannochloropsis* sp. などが用いられてきたが、夏季の高温下では死滅してしまうという問題があった。微細藻類の中でも、緑藻綱の中に高温耐性を保持する種が存在することが知られており⁽¹⁾、さらに窒素制限下において高脂質生産速度を示すため、BDFの実用化のため注目されてきた^(2,3)。緑藻綱のうち、*Desmodesmus* sp. は脂質生産速度が高く、さらに50°Cといった高温環境下でも1日で

あれば生存が可能であることが知られている⁽⁴⁾。しかし、(4)で報告された高温耐性を調べる実験方法は、28°C下で培養した後、40–50°Cの高温下に一日さらし、その時の死亡率を調べるという手法が用いられている。本学の屋内施設では、夏季には常に高温状態となるため、わずかな期間の高温に耐性を有するかではなく、各温度下で定期的に培養が可能かどうかを明らかにする必要がある。さらに、高温耐性のあるこの種は、通常入手が困難であるため、環境試料中から単離する必要がある。したがって本研究では、高温下においても増殖可能な *Desmodesmus* sp. を環境試料中から単離し、高温下における成長特性について明らかにすることを目的とした。また、成長特性と温度の関係について考察するために、各温度下において、培養日数ごとにサイズ分布を明らかにした。

2. 材料および方法

¹石巻専修大学理工学部生物科学科

²茨城大学地球・地域共生研究機構 助教

³セルメディカ(株)沖縄イノベーションセンター 研究員

⁴東海大学生物学部海洋生物学科 助教

2.1. 微細藻類の単離と培養

環境試料中から微細藻類の単離と培養を行った。2016年7月、水温が38℃の小型水槽中より試料を採取し、滅菌済み寒天培地に流し込み、35℃の恒温槽で培養した。形成されたコロニーを滅菌した針で新たな液体培地に植え継ぎ、35℃で数日間培養した後、滅菌済み寒天培地に植え継ぐという作業を数回繰り返すことで単離を行った。

単離された藻類は、群体の両端細胞から針状突起が伸びていることから *Desmodesmus* sp. であると特定した。さらにその遺伝子型より、*Desmodesmus* sp. であることが確認された。

2.2. 成長速度及び生物量の推定

20–40℃までの5℃間隔の温度に設定したインキュベーター(日本医科器械製作所、TG-180-5L)を使用し、Guillard f/2 培地、光強度110 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 下で24時間連続光下において前培養を行った。各温度下において、実験開始時の細胞密度が約 $1.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となるように植え継ぎ、250 mLの滅菌済みアクリルボトルにおいて培養実験を行った。試料は1日に1回採取した。培養終了時に乾燥重量、脂質重量及び脂肪酸組成の測定を行った。

細胞数の計数には血球計算板を用いた。通常の比増殖速度は単体で存在する細胞を1個体とみなして推定するか、連鎖群体を1個体とみなして推定するかのどちらかにより求められる。*Desmodesmus* sp. の場合、群体を形成する細胞数は 2^n で表され ($n = 0-5$)、4–8細胞で1群体を形成する場合が多く知られている。*Desmodesmus* sp. は、連鎖群体を形成する場合でも2細胞、4細胞、6細胞で1連鎖群体を形成する場合や、連鎖群体を形成する個体と形成しない個体が混在していた(図1)。この場合、1連鎖群体を1個体として計数してしまうと、比増殖速度の推定に誤差が生じてしまう可能性がある。そのため本研究では、連鎖群体を形成する個々の細胞も1細胞とみなし ($n = 0-3$ のとき $2^n = 1, 2, 4, 6$ となり、これを細胞個数とした)、細胞個数より比増殖速度を(5)に基づいて推定した。細胞体積の計測は、全ての温度下において各培養日数ごとに50個体ずつ計測を行った。さらに、全体の細胞のうち、連

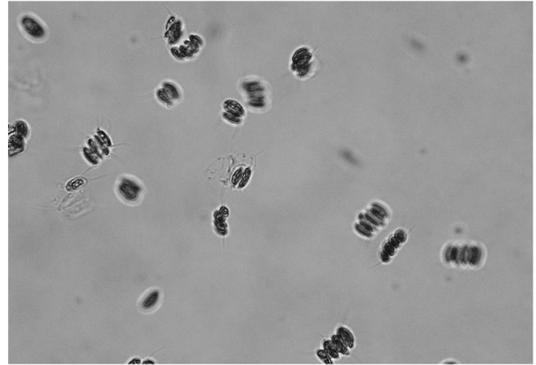


図1. *Desmodesmus* sp. F18 (30℃)

鎖細胞を形成している細胞の割合も求めた。

細胞体積の計測は、デジタルカメラ(Nikon, DS-Filc)を備え付けた顕微鏡(Nikon, ECLIPSE 80i)を使用して試料を撮影し、画像解析ソフトウェア(ImageJ64, ver.1.48)にて個々の細胞の直径や幅を測定することにより行った。個々の細胞は楕円形であるとみなし、以下の式より細胞体積を求めた；

$$V = \frac{ab^2\pi}{6}$$

ここで、 V は細胞体積 (μm^3)、 a は細胞長径 (μm)、 b は細胞短径 (μm) である。求めた V より、細胞が球状と仮定した時の推定直径 (Estimated spherical diameter: ESD, μm) を求めた。各温度下、各成長段階で ESD を求め、20–35℃までの ESD の最大値および最小値から階級値を求め、ヒストグラムを作成した。40℃では ESD の幅が20–35℃までのそれと大きく異なるため、40℃での ESD の最大値および最小値から階級値を求め、ヒストグラムを作成した。階級の幅は、スタージェスの公式 ($1 + \log_2 n$; n はサンプル数) により決定した。

3. 結果と考察

Desmodesmus sp. は20–35℃までの温度域では安定期に達するまでの日数が短く、4–6日間で $2.6-4.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ に達した。一方40℃まで生存することが可能であることが明らかとなった。さらに各温度下での培養日数ごとのサイズ分布をみると、20℃から35℃までではサイズの幅が狭く、階級は $6.23 \mu\text{m}$ までの間で幅が決められた

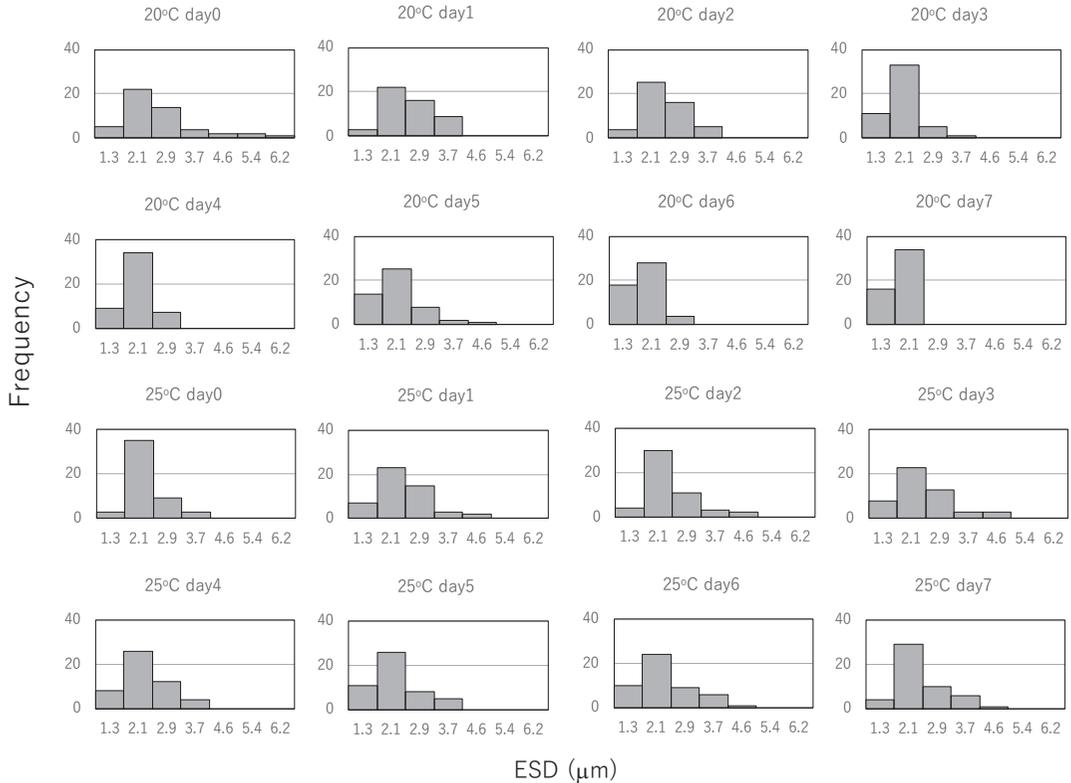


図 2.1. *Desmodesmus* sp. の培養日数ごとのサイズ分布 (20–25°C)

のに対し (図 2.1–2.2)、40°C では階級は 10.2 μm までと、細胞サイズが 1.9 倍大きくなった (図 2.3)。

細胞サイズと温度との関係について考察するために、緑藻綱における細胞周期について考察していく。通常の植物プランクトンにおける細胞分裂は 2 分裂であり、G1 期から S 期、G2 期を経て、M 期で細胞分裂を行うことが知られている⁽⁶⁾。ここで、G1 期において細胞が分裂するのに十分な大きさまで成長し、コミットメントポイント (CP) で次の DNA 合成への準備ができていないか確認が行われる⁽⁷⁾。CP に達すると、G1 期に戻ることにはできないことが知られている⁽⁸⁾。連鎖細胞を形成する緑藻綱の *Scenedesmus quadricauda* では、G1 期で母細胞が娘連鎖細胞を形成するのに十分な大きさまで成長し、CP に達した後、一つの母細胞の中で S 期や G2 期の細胞周期と同時に G1 期の細胞周期が重なり、母細胞内で 2ⁿ 個の娘細胞を形成する準備を始める⁽⁹⁾。このため、母

細胞にとって環境が成長に適した状態である場合、1 つの母細胞から一度に 4 つや 6 つの連鎖細胞が形成される⁽¹⁰⁾。連鎖細胞は形成しないが、同じく緑藻綱である *Chlorella ellipsoidea* の温度と細胞サイズの関係について調べた研究では、9 から 25°C の範囲において、温度が下がって成長が細胞に適さない温度になると、細胞サイズが大きくなり、各々の細胞周期は細胞によって激しく異なることも示された⁽¹¹⁾。そしてこの結果は他の緑藻綱においても同様の傾向を示すことが報告されている⁽¹²⁾。本研究において、40°C の高温下で細胞サイズがそれ以外の温度のそれと比較して 1.9 倍大きくなったことは、細胞にとって成長に適さない温度であるために、G1 期の状態にとどまり、細胞分裂に進むことなく細胞が大きくなるためであると考えられる。通常、細胞内である一定の大きさに達すると細胞周期が CP に入るが、ここである一定の大きさを決定するのは、タンパク含量や RNA 含量ではなく、光合成により生成

高温耐性緑藻 *Desmodesmus* sp. の単離とその成長特性

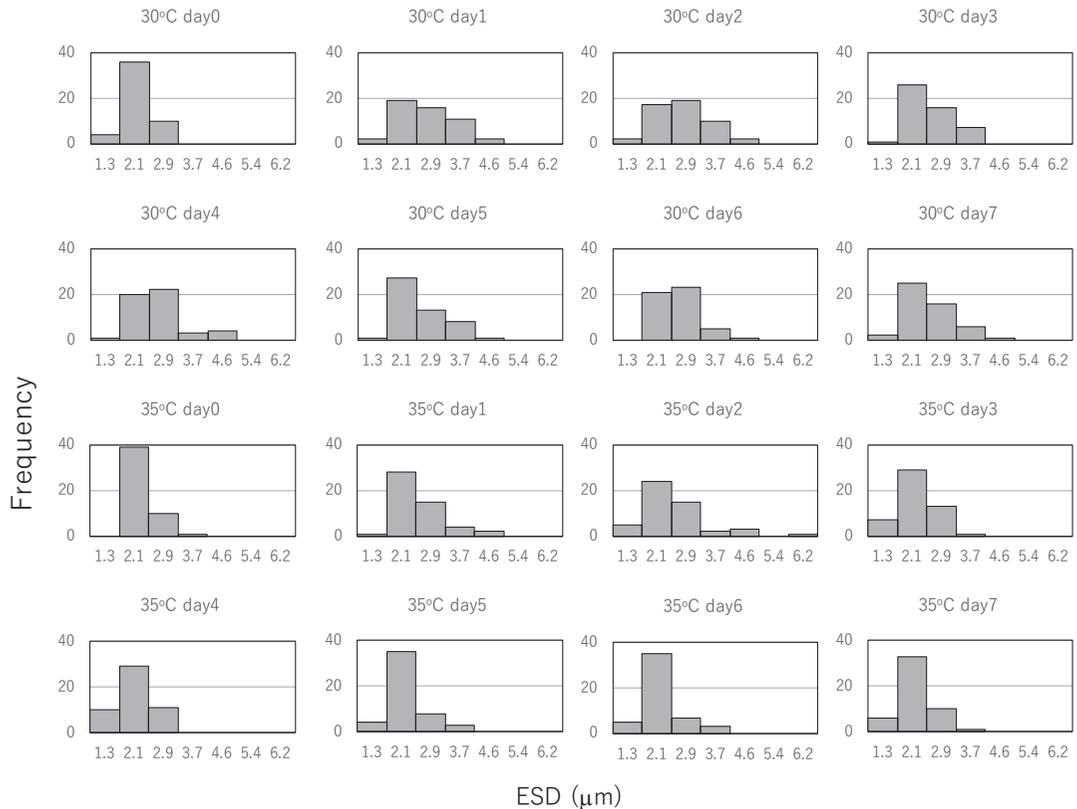


図 2.2. *Desmodesmus* sp. の培養日数ごとのサイズ分布 (30-35°C)

される糖であると考えられている⁽¹³⁾。光合成は通常多くの酵素反応により行われるが、高温のために酵素反応が起こりにくくなり、糖の生成が最適温度と比較して行われにくくなるために、細胞周期がCPに到達せず、細胞サイズが大きくなるものと考察される。20-35°Cの温度域では4-6日で安定期に達したのに対して、40°Cではその倍以上の13日を要したことは、40°Cでは酵素反応が起こりにくくなり、細胞周期がCPに到達せずに分裂しない細胞が増加したことを反映していると考えられる。

本研究において、*Desmodesmus* sp. を環境試料中から単離培養することに成功し、40°Cという高温下においても生存が可能であることが明らかとなった。本研究で示された細胞の成長特性は、基礎的な知見として、日本におけるバイオ燃料生成のための一助となるだろう。

4. 引用文献

- (1) Sonmez, C., Elcin, E., Akin, D., Oktem, H A., and Yucel, M. (2016): Evaluation of novel thermo-resistant *Micractinium* and *Scenedesmus* sp. for efficient biomass and lipid production under different temperature and nutrient regimes. *Bioresour. Technol.* 211: 422-428.
- (2) Bohnenberger, J. E., and Crossetti, L. O. (2014): Influence of temperature and nutrient content on lipid production in freshwater microalgae cultures. *An. Acad. Bras. Ciên.* 86: 1239-1248.
- (3) Ho, S.-H., Chang, J.-S., Lai, Y.-Y., and Chen, C.-N. N. (2014): Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. *Bioresour. Technol.* 156: 108-116.
- (4) Pan, Y.-Y., Wang, S.-T., Chuang, L.-T. Chang, Y.-W., and Chen, C.-N. (2011): Isolation of ther-

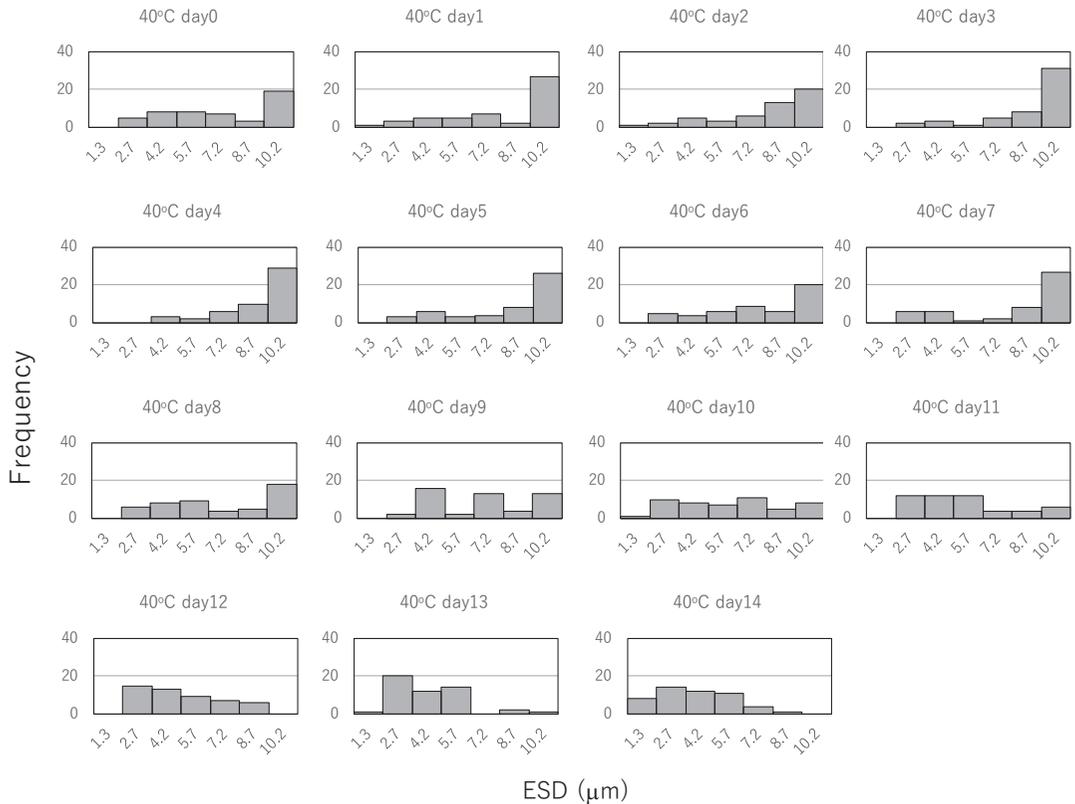


図 2.3. *Desmodesmus* sp. の培養日数ごとのサイズ分布 (40°C)

mo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresour. Technol.*, 102: 10510–10517.

(5) Guillard, R. R. L. (1973): Division rates. In: Stein (ed), *Handbook of phycological methods*, V. 1, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 289–312.

(6) Howard, A. and Pelc, S. R. (1953): Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, 6: 261–273.

(7) John, P. C. L. (1984): Control of the cell division cycle in *Chlamydomonas*. *Microbiol Sci.* 1: 96–101.

(8) Moberg, S., Knutsen, G., and Goksoyr, J. (1968): The point of no return concept in cell division. The effects of some metabolic inhibitors on synchronized *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.* 21: 390–400.

(9) Zachleder, V., Schläfli, O., and Boschetti, A. (1997): Growth-controlled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 33: 673–681.

(10) Bišová, K. and Zachleder, V. (2014): Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *J Exp. Bot.* 65: 2585–2602.

(11) Morimura, Y. (1959): Synchronous culture of *Chlorella*. I. Kinetic analysis of the life cycle of *Chlorella ellipsoidea* as affected by changes of temperature and light intensity. *Plant Cell Physiol.* 1: 49–62.

(12) Donnan, L. and John, P. C. L. (1983): Cell cycle control by timer and sizer in *Chlamydomonas*. *Nature.* 304: 630–633.

(13) Viová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., and Čížková, M. (2011): *Chlamydomonas*

高温耐性緑藻 *Desmodesmus* sp. の単離とその成長特性

reinhardtii: duration of its cell cycle and phases at 599-608.
growth rates affected by temperature. Planta. 234: