

微細藻類 *Euglena gracilis* 新規株 EOD-1の従属栄養培養

Heterotrophic Cultivation of *Euglena gracilis* Novel Strain EOD-1.



赤司 昭*
Akira Akashi
医学博士



竹崎 潤**
Jun Takezaki



濱田武志**
Takeshi Hamada

当社は、筑波大学との共同研究において *Euglena* を単離した。本分離株は、形態的特徴、および 18S rRNA 遺伝子塩基配列より *Euglena gracilis* と同定された。Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析の結果から、本株は新規株であると結論し、EOD-1株と命名した。本株は、グルコースを炭素源とする従属栄養培養において *E. gracilis* Z 株 (NIES-48) の2倍以上のバイオマス生産性を示した。以上の結果から、本株は有価物生産に適した株と考える。

We isolated a *Euglena* from the wetland in Japan under a cooperative research with University of Tsukuba. This strain was identified as *Euglena gracilis* by morphological characteristics and 18S rRNA gene sequence analysis. As a result of Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis, we concluded it is a new strain and named it EOD-1. Biomass productivity of this strain was twice as much of that of *E. gracilis* Z strain (NIES-48) under heterotrophic cultivation. These results indicate that *E. gracilis* EOD-1 has a high potential for the production of valuables.

Key Words :

微 細 藻 類
ミ ド リ ム シ
ユーグレナ グラシリス
従 属 栄 養 培 養
RAPD

Microalgae
Euglena
Euglena gracilis
Heterotrophic Cultivation
Randomly Amplified Polymorphic DNA

【セールスポイント】

- ・自然界より新規な *Euglena gracilis* 株を分離し、EOD-1株と命名した。
- ・本株は、研究開発に多用されている *E. gracilis* Z 株 (NIES-48) の約2倍のバイオマス生産性を有することから、より安価なバイオマス生産が可能になり、産業化に貢献できると考える。

まえがき

近年の省エネルギーや循環調和型社会への転換指向が後押しとなり、微生物機能を産業に活用する機運が高まっている。種々の微生物の中でも微細藻類は、光独立栄養（光合成）条件で培養でき二酸化炭素削減にも貢献できること、食糧と競合しないこと、単位面積当たりの生産量が植物より高いことな

どの理由から注目が集まっている。とくに近年、微細藻類を用いた第三世代のバイオ燃料に係る研究開発が世界中で激化している。

本報告では、微細藻類について概説するとともに、当社で取組んでいるユーグレナを活用した有価物生産のための基礎検討の成果の一部について報告する。

1. 微細藻類とは

藻類とは、酸素発生型光合成を行う生物のうち、主に地上に生息するコケ植物、シダ植物、種子植物を除いた生物を総称したものある¹⁾。これらの中にはいわゆる海藻類（コンブやワカメなどの大型の多細胞生物）からクロレラやミドリムシ（ユーグレナ）などの微細なものまで種々のものが含まれる。とくに、後者のように顕微鏡サイズ（おおむね1 μm ~100 μm 程度）の微小な藻類を微細藻類と称する。

赤潮やアオコなどの原因が微細藻類（プランクトン）が原因で起きることはよく知られておりネガティブなイメージが強いが、図1に示すように様々な分野への適用が可能であり、われわれの生活の役に立っているものも多数ある。すなわち、前述のバイオ燃料、肥料、化成品のような単価が比較的安価なコモディティ製品から、健康食品や医薬品のような高付加価値製品まであらゆる用途に適用可能な優れたバイオマス資源である。例えば、ユーグレナ、クロレラやスピルリナは健康食品として、また、へ

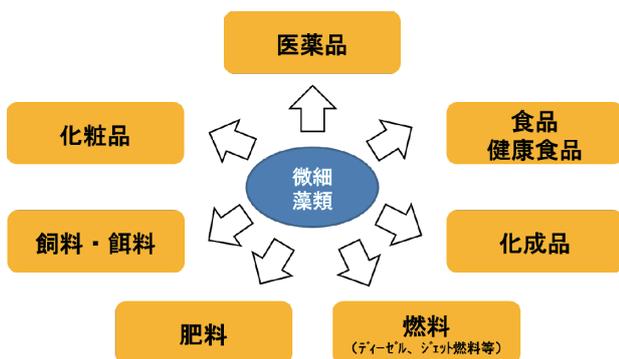


図1 微細藻類の産業への寄与

マトコッカスが生産する赤色素アスタキサンチンは、非常に強い抗酸化活性を有することから健康食品や化粧品原料として利用されている（表1）。

2. ユーグレナ（ミドリムシ）とは

2.1 ユーグレナの基本性状^{2), 3)}

ユーグレナ属に含まれる種は、数十以上もあるといわれているが、それらの多くが紡錘形である（写真1）。*E. gracilis* の場合、細胞の大きさは長辺が約50 μm、幅が約10 μm であるが、細胞の一端には、2本の鞭毛が生えており、活発に遊泳する。また、ユーグレナ細胞は、その表面がペリクルと呼ばれるらせん状の多数の条溝を持つ柔らかい膜に覆われていることから、伸び縮みしたりくねったりする独特

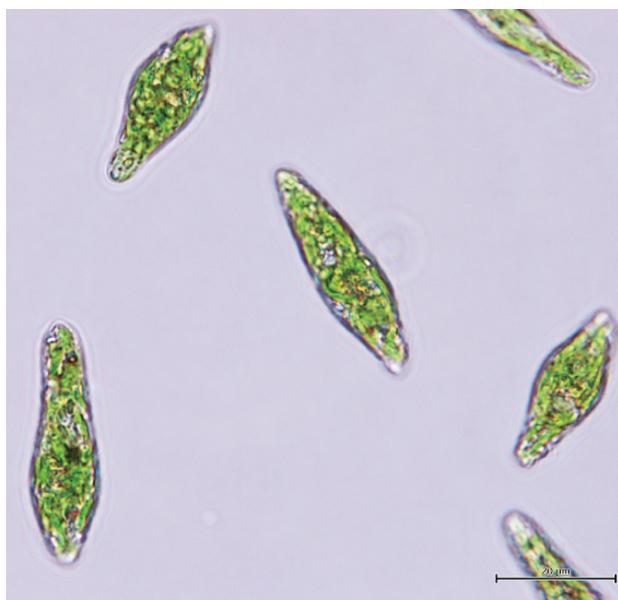


写真1 光独立栄養（光合成）条件下で培養した *Euglena gracilis* Z 株（NIES-48）の光学顕微鏡像

表1 微細藻類の主な製品例

微細藻類	成分	製品例
<i>Euglena gracilis</i> (ミドリムシ)	バイオマス バイオマス抽出物	健康食品 化粧品
<i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>)	バイオマス 色素（フィコシアニン）	健康食品 食用色素
<i>Chlorella</i>	バイオマス 熱水抽出物（クロレラエキス）	健康食品 ドリンク等
<i>Dunaliella</i>	バイオマス カロテノイド	健康食品 食品添加物
<i>Haematococcus</i>	アスタキサンチン	化粧品, 健康食品
<i>Nannochloropsis</i>	EPA	水産飼料, 健康食品

表2 ユーグレナの特長

No	特 長
1	増殖速度が速くかつ細胞が大きいため、短時間で大量のバイオマスが得られる。
2	沈降性が良いため、重力沈降による回収も可能である。
3	殻が柔らかい（固い細胞壁がない）ため、有価物の抽出が比較的容易である。
4	従属栄養条件でも光合成条件でも培養可能である。つまり、目的に合わせて培養条件が選択できる。
5	ユーグレナが生産する脂質の1種であるワックスエステルは、ジェット燃料に適する。
6	ユーグレナが生産するパラミロン（ β -1,3-グルカン）は、化成品、化粧品や健康食品等の素材として有望である。
7	ユーグレナ自体の栄養価が高く、食品や飼料などの素材として有望である。
8	低いpHで増殖できるので、雑菌のコンタミネーションのリスクを低減できる。
9	ユーグレナ自身が雑菌のコンタミネーションに強い。

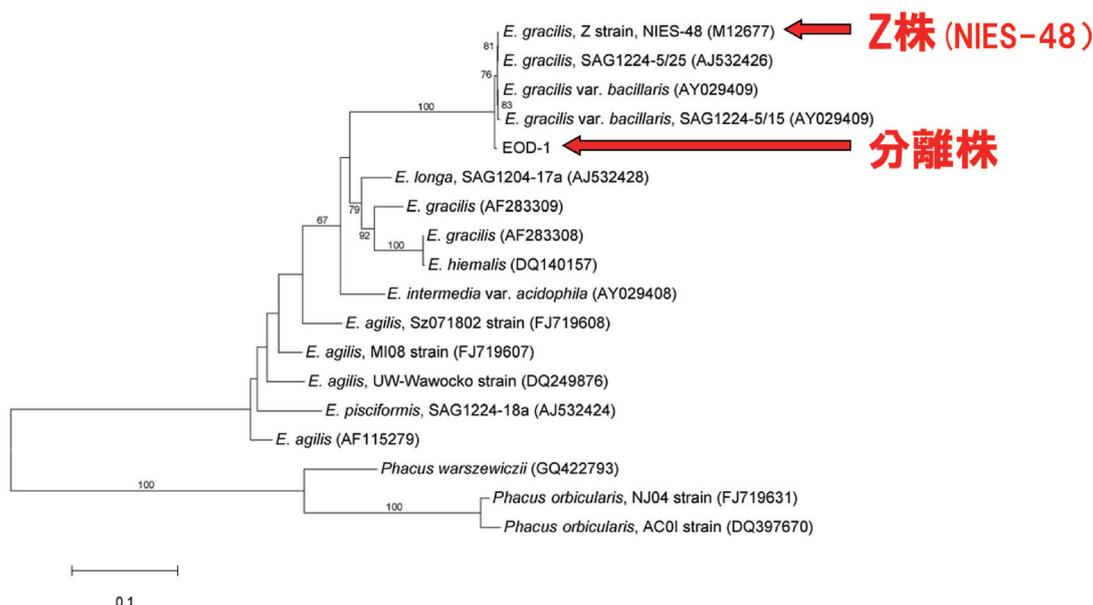


図2 18S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹解析

の運動（ユーグレナ運動あるいは、すじりもじり運動という）を行うことができる。

ユーグレナは、水田、池、湖沼など様々な淡水域に生息し、小学校の理科の教科書にも記載されているわれわれになじみの深い微細藻類である。

2.2 なぜユーグレナに着目したのか

なぜ当社は、多種多様な微細藻類の中からユーグレナに着目したのか。その理由を表2に示す。とくに、増殖速度が速くかつ細胞が大きいため短時間で大量のバイオマスが得られる点、および、細胞からの有価物の抽出が比較的楽に行い得る点は、微生物を用いた有価物生産の際大きな利点となる。また、屋外においてオープンポンドを用いて培養することを想定した場合、様々な微生物のコンタミネーション（汚染）が考えられるので、コンタミネーションのリスクを軽減できる培養方法を採用できる点や細菌などのコンタミネーションそのものに強い点もア

ドバンテージになり得る。

さらに、ユーグレナは、含硫アミノ酸を多く含み高いアミノ酸価を持つこと、ビタミンB群、Eやカロテン、高度不飽和脂肪酸など多種類の栄養素を含むことから健康食品原料として活用されている。また、貯蔵多糖としてパラミロン（ β -1,3-グルカン）を大量に蓄積するが²⁾、本物質は化成品（バイオプラスチック）^{4), 5)}や医薬品^{6), 7)}などの原料としての応用が期待されている。また、パラミロンを生産したユーグレナを嫌気（もしくは、微好気）条件に移行すると、ワックスエステル発酵によりパラミロンからワックスエステルを生産する⁸⁾。ユーグレナが生産するワックスエステルは、炭素数14のミリスチン酸とミリスチルアルコールからなる炭素数28のミリスチルミリスチレートの主成分としており、ジェット燃料としての活用が期待できる。

以上のように、ユーグレナは、有価物生産のため

のバイオマスとして優れたものであるといえる。

3. 単離したユーグレナの同定と解析

前述のように、ユーグレナには数十種類もの種が存在するといわれている。そこで、われわれが単離したユーグレナがどの種に相当するのかを18S rRNA 遺伝子の塩基配列を基に推定した。本株からDNA を抽出し、PCR 法により増幅した18S rRNA 遺伝子の塩基配列とデータベース上に登録されている既知のユーグレナの18S rRNA 遺伝子の塩基配列とホモロジー検索を行った。その結果、われわれが単離したユーグレナの18S rRNA 遺伝子の塩基配列は *E. gracilis* と99.5%一致しており、*E. gracilis* Z株や *E. gracilis* var. *bacillaris* ときわめて近縁のユーグレナであることが明らかとなった (図2)。

そこで、本ユーグレナと既存の *E. gracilis* との差異を明らかにする (つまり、既存の *E. gracilis* 株に帰属するのか、新しい株と考えられるのか) 目的で、植物や動物 (家畜) などの品種の識別 (鑑別) や微生物の株の識別などに利用されている Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)⁹⁾ 解析を実施した。図3に RAPD 解析の結果 (DNA の電気泳動パターン) を示す。DNA (図の白いバンド) パターンが異なれば、同じ種に分類されたユーグレナでも系統 (株) が異なることを意味する。種が異なる NIES-253 (*Euglena clara* Skuja), NIES-286 (*Euglena mutabilis* Schmitz) および NIES-2149 (*Euglena viridis* Ehrenberg) と DNA パターンが異なるのはもちろんのこと、同じ種である NIES-47, 48 および 49 とも DNA パターンが異なっていた。したがって、われわれが分離した *E. gracilis* は既存の株とは異なる

新規株であると結論し、EOD-1と命名した。参考までにEOD-1を光独立栄養 (光合成) 条件で培養した光学顕微鏡像を写真2に示す。

4. 従属栄養条件による *E. gracilis* EOD-1の培養

4.1 ユーグレナの培養方法と当社の培養方針

ユーグレナの培養方法には大別して3つの方法がある。一つ目は二酸化炭素を炭素源、光 (太陽光など) をエネルギー源とする光独立栄養 (いわゆる光合成) 培養法、二つ目は炭素源としてグルコースなどの有機性炭素を利用して暗所・好気条件下で培養

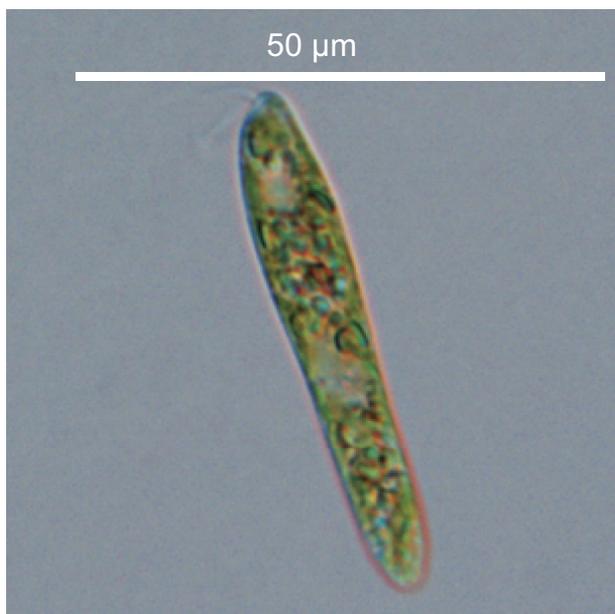


写真2 光独立栄養 (光合成) 条件で培養した *Euglena gracilis* EOD-1の光学顕微鏡像

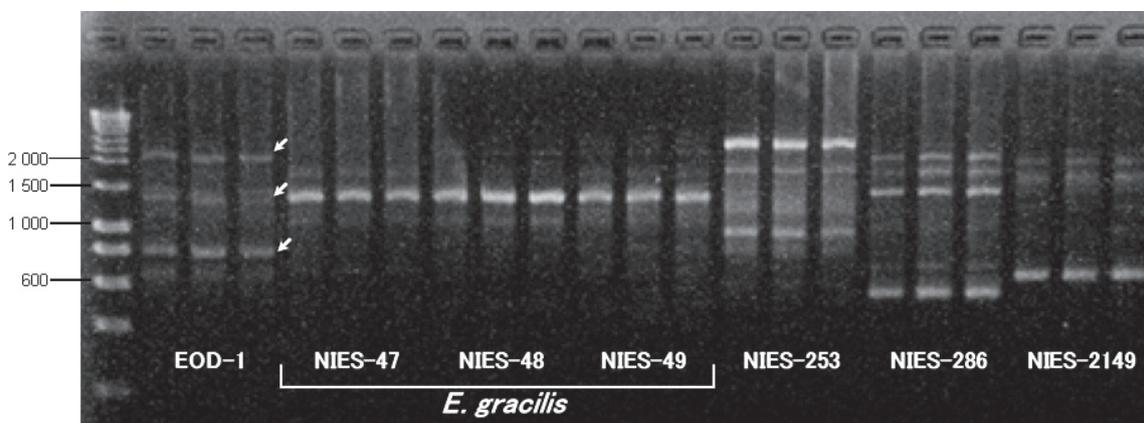


図3 *Euglena gracilis* EOD-1と他の *E. gracilis* 株、および別種である NIES-253 (*Euglena clara* Skuja), NIES-286 (*Euglena mutabilis* Schmitz), NIES-2149 (*Euglena viridis* Ehrenberg) との RAPD 結果の比較
矢印は、EOD-1の RAPD 解析の DNA バンドを示す。

表3 ユーグレナを光独立栄養（光合成）と従属栄養条件で培養した時のバイオマス生産性の比較

	バイオマス生産性	
	容積あたり (g-dry biomass /L/d)	面積あたり (g-dry biomass/m ² /d)
従属栄養培養	≥2	≥10 000*
光独立栄養培養（光合成）	≤0.2	≤40**

する従属栄養培養法，三つ目はそれらの中間に位置づけられる光従属栄養培養法である。

光合成法と従属栄養法におけるバイオマス生産性を比較すると（表3），圧倒的に従属栄養法の方が高いことがわかる。すなわち，光合成法での培地1 L当たりのバイオマス生産性はわずか0.2 g/d程度であるのに対し，従属栄養培養の場合その10倍にあたる2 g/d以上のバイオマス生産性が期待できる。また，単位面積当たりの生産性を比較すると，光独立栄養培養法の場合，光照射が効率よく行われるためには培養池の水深を浅くする（通常，20 cm程度）必要があるため，両者の差はさらに拡大する。従属栄養培養法は光独立栄養培養法の250倍以上のバイオマス生産性が期待できる（光独立栄養培養における培養池の水深を20 cm，従属栄養培養における培養槽の水深を5 mとした場合）。さらに，工業規模で光独立栄養培養を行う場合，屋外で解放系のポンドを用いて培養する方法が一般的である。したがって，気候の変動（水温や日照量・時間）や細菌や捕食性微生物のコンタミネーションなどの影響を受けやすく，生産性や品質が安定しないなどの欠点がある（いわば農業生産に相当）。一方，従属栄養培養の場合，閉鎖系リアクタ（培養槽）を用い滅菌条件下で培養されるため，一定品質のバイオマスを高い生産性で安定に生産可能である（いわば工業生産に相当）。

以上の比較検討結果より，当社では *E. gracilis* EOD-1の培養法として，従属栄養培養法を採用することとした。

4.2 *E. gracilis* EOD-1の培養成績¹⁰⁾

4.2.1 *E. gracilis* EOD-1とZ株（NIES-48）の増殖性の比較

E. gracilis の中で研究開発に多用されているZ株（国立環境研究所に保存されているNIES-48）との増殖性（バイオマス生産性）を比較するため以下の実験を実施した。

AF-6培地¹¹⁾に25 g/Lのグルコース（以下，Glc

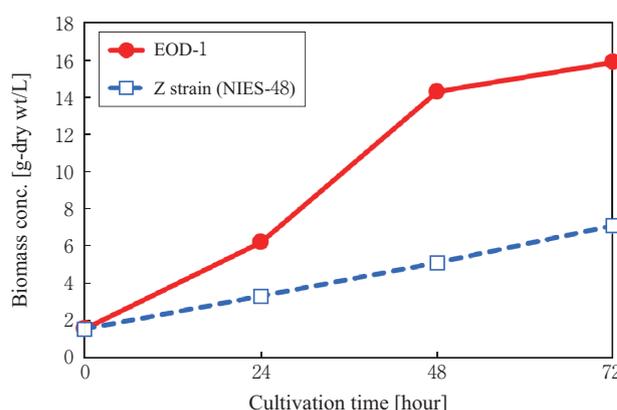


図4 *Euglena gracilis* EOD-1とZ株（NIES-48）の増殖性の比較

と省略）と2.5 g/Lの酵母エキス（以下，YEと省略）を添加した培地を用いて，暗所，27℃の条件で振とう培養を行い，両株の増殖性を比較した。

図4に両株の増殖曲線を示す。EOD-1は，培養開始2日目にバイオマス濃度がほぼ最大の約14.5 g/Lになったが，Z株は立ち上がりが遅く2日目で約4.5 g/L，3日目で約7 g/Lであった。培養2日目の時点での両株のバイオマス生産性 [(2日目のバイオマス濃度 - 初発バイオマス濃度) / 培養日数] は，EOD-1が約6.4 g/L/dであったのに対し，Z株は1.8 g/L/dであり，両者で2倍以上の差があった。

以上の結果から明らかなように，EOD-1は，Z株（NIES-48）に比べ2倍以上のバイオマス生産性を有する優れた株であり，有価物の生産に適したユーグレナであると言える。

4.2.2 *E. gracilis* EOD-1の増殖に及ぼすGlc濃度とYE濃度の影響

図5にGlcを10~25 g/L，YEをそれぞれ1.0~5.0 g/L含む培地で72時間培養した時の培地1 L当たりの乾燥バイオマス濃度（棒グラフ），およびGlcのバイオマスへの転換率（第1式）を示す。

グルコースのバイオマスへの転換率（%）

$$= \frac{72\text{時間目のバイオマス濃度} - \text{初発バイオマス濃度}}{\text{初発Glc濃度} - 72\text{時間目のGlc濃度}} \times 100 \quad \dots \text{第1式}$$

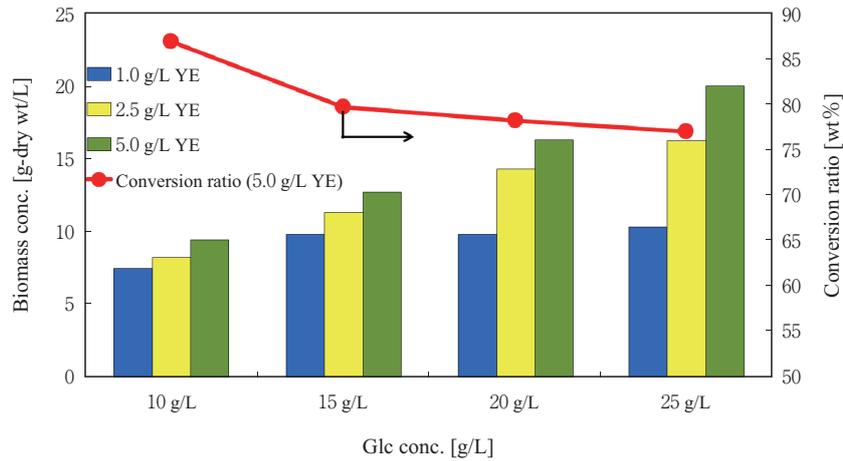


図5 *Euglena gracilis* EOD-1のバイオマス生産量およびバイオマス転換率
棒グラフは、各 Glc 濃度と YE 濃度条件下で72時間培養した時のバイオマス濃度を示す。
折れ線は、YE 5g/L と各 Glc 濃度で72時間培養した時のグルコースのバイオマス転換率を示す。

72時間後の乾燥バイオマス濃度は、Glc 濃度に比例して増加した。また、YE 濃度に比例してバイオマス濃度も増加すること、とくに Glc 濃度が高い (20 g/L と 25 g/L の Glc を含む) 培地の場合、YE のバイオマス増殖に及ぼす影響が顕著に表れた。YE は様々な微生物 (細菌や酵母など) の増殖を促進することが知られており、本株においてもその効果は顕著に観察された。

本株を 25 g/L の Glc とそれぞれの YE を含む培地で72時間培養した場合の Glc のバイオマスへの転換率は (図5の折れ線グラフ)、培地に含まれる Glc 濃度に反比例し、Glc 濃度が増加するにしたがって転換率は減少した。もっとも転換率が低かった Glc 25 g/L を含む培地でも転換率は77%と非常に高く、本株は効率よく Glc をバイオマスに転換していることがわかる。クロレラも従属栄養条件でのバイオマス生産性に優れた微細藻類であるが、そのバイオマス転換率はおおむね45~70%であり、われわれの EOD-1がいかにバイオマス転換率に優れた微細藻類であるかがうかがえる。

4.2.3 パラミロンの生産量

前述のように、ユーグレナが生産する β -1, 3-グルカン はパラミロンと称され、バイオプラスチック、健康食品や医薬品などへの適用が期待される有価物である。

そこで、本株の従属栄養培養条件におけるパラミロン生産能力について調査した。図6に示すように、バイオマス濃度の増加に伴い、パラミロン濃度も上昇した。培養48時間目の乾燥パラミロン濃度は

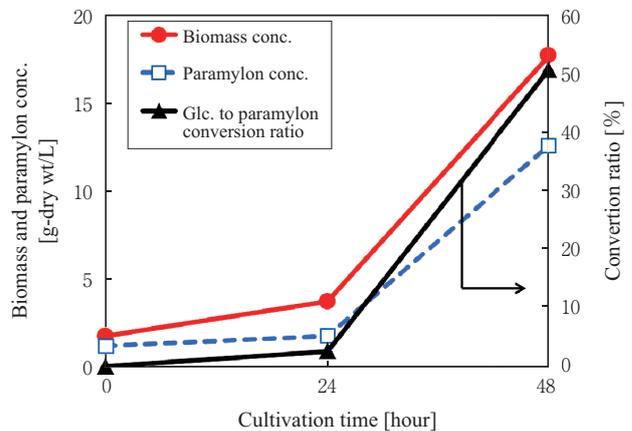


図6 バイオマス濃度、パラミロン濃度およびグルコースのパラミロンへの転換率の経時変化



写真3 従属栄養条件で培養した *Euglena gracilis* EOD-1 の光学顕微鏡像細胞内に観察される白い顆粒がパラミロン。

12.6 g/L であり, パラミロン含有率は71 %であった。また, Glc のパラミロン転換率は約50 %と高く, 本株が効率よく Glc をパラミロンに転換できることが分かった。写真3に, 48時間培養した本株の光学顕微鏡像を示す。光独立栄養(光合成)条件で培養した本株(写真2)に比べ, 細胞の形状がふっくらしており, 細胞内に多量のパラミロン粒子(白い顆粒状のもの)を蓄積していることがわかる。

以上の結果から明らかなように, EOD-1はバイオマス生産性だけでなくパラミロン生産性にも優れた能力の高いユーグレナであるといえる。

む す び

当社は, 今回の成果を基に培地成分や培養方法をブラッシュアップし, より安価で効率の良い培養方法をラボレベルで確立している。さらに, 当社技術研究所内に1 m³の培養槽を設置し, ラボスケールと同等のバイオマス生産性を再現できることを確認している。

また, 培養したバイオマスの濃縮・乾燥設備も整備し, キログラム単位の乾燥バイオマスを複数の企業に提供し, 食品などへの適用検討を実施中である。開発をさらに加速し, 早期の実用化につなげる所存である。

[参考文献]

- 1) 藻類ハンドブック. 2012, 渡邊 信監修, 藻類ハンドブック, 株式会社エヌ・ティー・エス
- 2) 北岡正三郎編. 1989, ユーグレナ 生理と生化学, 学会出版センター
- 3) Y. Chisti, 2007 *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
- 4) M. Shibakami, G. Tsubouchi, M. Nakamura and M. Hayashi, 2013 *Carbohydrate Polymers*, 93: 499-505.
- 5) M. Shibakami, G. Tsubouchi and M. Hayashi, 2014 *Carbohydrate Polymers*, 105: 90-96.
- 6) A. Sugiyama, S. Hata, K. Suzuki, E. Yoshida, R. Nakano, S. Mitra, R. Arashida, Y. Asayama, Y. Yabuta and T. Takauchi, 2010 *J. Vet. Med. Sci* 72: 755-763.
- 7) N. Koizumi, H. Sakagami, A. Utsumi, S. Fujinaga, M. Takeda, K. Asano, I. Sugawara, S. Ichikawa, H. Konado, S. Mori, K. Miyatake, Y. Nakano, H. Nakashima, T. Murakami, N. Miyano and N. Yamamoto, 1993 *Antiviral Research*, 21: 1-14.
- 8) H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka, 1982 *FEBS Letter*, 150: 89-93.
- 9) J. Welsh and M. McClelland, 1990 *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- 10) 赤司 昭, 竹崎 潤, 濱田武志, 出村幹英, 河地正伸, 渡邊 信, 2014年度日本農芸化学会大会
- 11) 国立研究開発法人国立環境研究所 微生物系統保存施設ホームページ <http://mcc.nies.go.jp/02medium.html;jsessionid=5142B6DE620A25D30154E0FED778DAE7>
- 12) F. Bumbak, S. Cook, V. Zachleder, S. Hauser and K. Kovar, 2011 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91: 31-46.