

## 微細藻類の油脂蓄積量と Triglyceride lipase 遺伝子発現に関する研究

日大生産工(院) ○渡邊歩

日大生産工 小森谷友絵 吉野悟 古川茂樹

### 1. 緒言

微細藻類によって産出される Triacylglycerol(以後油脂)は、バイオディーゼルの原料として着目されている。油脂は、微細藻類を窒素、リン、光などによりストレスを与えた環境下で培養することにより多量に蓄積される。しかしながら微細藻類油脂からのバイオディーゼルの生産コストは800~1000円/L<sup>1)</sup>と高価であり、産業での利用にはまだ至っていない。その原因は、微細藻類の増殖と油脂の蓄積が正の相関をとらないため、微細藻類内で油脂の蓄積を維持することが難しいためと考えられる。

本研究では、油脂分解酵素 Triglyceride lipase の働きに着目した。Triglyceride lipase は Triacylglycerol を Diacylglycerol と Free fatty acid に加水分解する。(Fig. 1)そのため油脂蓄積量向上には Triglyceride lipase の働きの抑制、または、発現量を低下させることが求められる。そのためここでは、知見の少ない Triglyceride lipase の発現に着目し、窒素濃度、光強度などによるストレス下で培養したときの微細藻類 *Microchloropsis gaditana* の油脂蓄積量と Triglyceride lipase RNA 量の関連性を調べた。

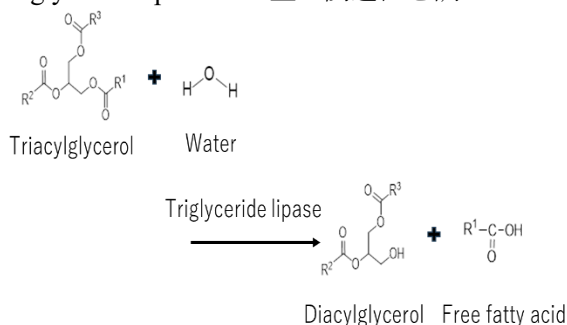


Fig. 1 Triglyceride lipaseによる加水分解

※R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup>: 炭化水素基

### 2. 実験方法

#### 2.1 前培養

微細藻類 *Microchloropsis gaditana*(NIES-2587)は F/2 培地を用いて培養し、その後 14 °C, 9000 rpm で遠心分離を 15 分間行いペレットとして得た。次に藻類ペレットは滅菌水で懸濁させた後、紫外可視分光光度計 UV-

1800(SHIMADZU)を用い 720 nm で濁度測定を行い濃度調整することで藻類懸濁液を調製し、実験培養に用いた。

#### 2.2 実験培養

2.1 の方法で準備した *Microchloropsis gaditana* を窒素源(NaNO<sub>3</sub>)濃度 0, 75, 150 mg/L に調整した培養液で 5~7 日間実験培養した。培養は、20, 50 μmol photons · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> で光照射し、2% CO<sub>2</sub>エアレーション下で行った。また、一定時間ごとに培養液をサンプリングし、サンプル中に含まれる油脂蓄積量と Triglyceride lipase RNA 量を測定した。また、波長 720 nm における濁度を測定し微細藻類の増殖の指標とした。

#### 2.3 リアルタイム PCR による Triglyceride lipase RNA 量の測定

微細藻類の RNA を Nucleo Spin RNA (TaKaRa)を用いて抽出した。その後 ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて RT-PCR を行い、抽出した RNA から cDNA を得た。その cDNA を THUNDERBIRD™ Next SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)を用いてリアルタイム PCR を行い、検出された蛍光値から培養初日の RNA 量を 1 とした時の相対 Triglyceride lipase RNA 量を求めた。

#### 2.4 標準添加法による油脂蓄積量の測定<sup>2)</sup>

微細藻類のサンプリング液を 14 °C, 9000 rpm で 15 分間遠心分離し、そのペレットを凍結乾燥させた。凍結乾燥物を 20 mL の F/2 培地で懸濁させ、5 本の 5 mL ポリプロピレンチューブに 1.98 mL ずつ分注した。次に最終容量が 2 mL となるようにイソプロパノールとトリオレイン標準溶液を添加量を変化させて加えた。その後親油性蛍光物質 Nile red を 20 μL 加え暗所で 1 分間転倒混和させ、室温、暗所で 5 分間静置させた。静置後分光蛍光光度計 (日本分光)を用いて蛍光測定を行った。測定された蛍光値を用いて乾燥菌体重量 1 g あたりの油脂蓄積量を算出した。

Studies on Triacylglycerol Accumulation and  
Triglyceride Lipase Gene Expression in Microalgae

Ayumu Watanabe, Tomoe Komoriya, Satoru Yosino and Sigeki Furukawa

### 3. 結果及び考察

微細藻類 *Microchloropsis gaditana* を  $\text{NaNO}_3$  濃度の異なる培地 (0, 75, 150 mg/L) を用いて光強度  $20 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  にて 5 日間培養した。その時の油脂蓄積量を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より  $\text{NaNO}_3$  濃度 150 mg/L のとき、最も油脂が増加し、5 日目において乾燥菌体重量当たりの油脂蓄積量は  $1.41 \text{ mg/g-dry cell}$  となり、0 日目からの油脂増加量は  $1.34 \text{ mg/g-dry cell}$  であった。次に光強度を  $50 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  とし、 $\text{NaNO}_3$  濃度の異なる培地 (0, 75, 150 mg/L) で 7 日間培養した。その時の油脂蓄積量を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より  $\text{NaNO}_3$  濃度 0 mg/L のとき、7 日目において乾燥菌体重量当たりの油脂蓄積量は  $5.13 \text{ mg/g-dry cell}$  となり、0 日目からの油脂増加量は  $4.40 \text{ mg/g-dry cell}$  であった。以上の結果より、窒素飢餓、かつ、強光という 2 つのストレス環境下において、油脂は多く蓄積された。

次に、 $\text{NaNO}_3$  濃度 0 mg/L、光強度  $50 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$  で培養した時の油脂蓄積量と Triglyceride lipase 量を Fig. 4 に示す。2 日目において Triglyceride lipase RNA 量が上昇したとき、油脂蓄積量が減少していることが分かる。このことより、Triglyceride lipase RNA 量の変動が油脂蓄積量に影響を与える可能性があることが分かる。

### 4. 結言

リアルタイム PCR, 蛍光測定を行った結果窒素飢餓、かつ、強光条件下の時最も油脂蓄積が促すことが分かった。また Triglyceride lipase RNA 量の変動が油脂蓄積量に影響を与えることが示唆された。

今後は 12 時間おきにサンプリングを行い、より詳しい Triglyceride lipase RNA 量と油脂蓄積量の関連性を調べていく。

### 参考文献

- 1) 平嶋紀子ほか, 早稲田社会科学総合研究別冊「2011 年度学生論文集」2011
- 2) Elena Bertozzini. et al., Journal of Microbiological Methods, 2011, vol.87, pp.17-23.

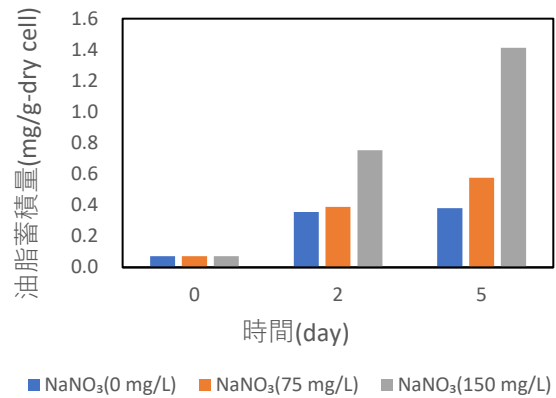


Fig. 2 光強度  $20 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  における油脂蓄積量の推移

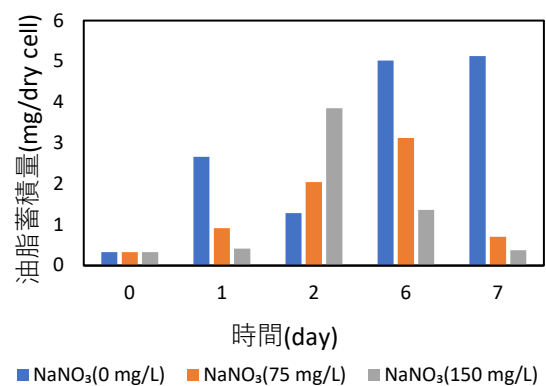


Fig. 3 光強度  $50 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  における油脂蓄積量の推移

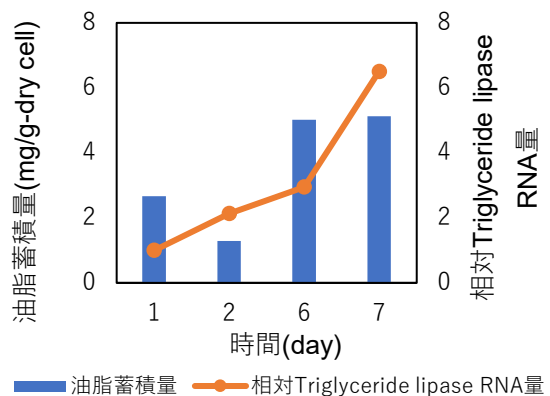


Fig. 4 油脂蓄積量と相対 Triglyceride lipase RNA 量の関係