

メチルセルロースを用いた運動抑制によるパラミロン高含有ユーグレナの培養条件確立

美留町 竜輝[†], 國府田 宏輔^{†*}

[†]茨城県立水戸第一高等学校 生物同好会部 〒310-0011 茨城県水戸市三の丸3-1 0-1

(2019年3月1日 受付; 2019年3月28日 受理)

Abstract

ユーグレナが生成する多糖類のパラミロンは、数百から数千分子のグルコースが β -1, 3結合でつながっている。これが三重らせん構造を形成してさらに複雑に絡み合い、円盤型の構造体として細胞内に存在する。ユーグレナは、グルコースからパラミロンをエネルギー貯蔵物質として産生する。最近、パラミロンは有用性のある物質として非常に注目されている。例えば、生分解性プラスチックの原料として用いられるだけでなく、ジェット燃料の原料であるワックスエステルの前駆体でもある。ユーグレナのパラミロン含有量は、培養条件に大きく影響を受ける。本研究では、パラミロン抽出法を確立した後に、ユーグレナにパラミロンを効率よく産生させる培養環境を比較検討した。世代時間を比較検討したところ、独立栄養培養では従属栄養培養の0.86倍の世代時間で培養できた。一方、細胞1個あたりのパラミロン量は、グルコースやスクロースなどの糖類を用いた従属栄養培養で、独立栄養培養の場合に比べて1.8~3.2倍まで増加した。さらに、ユーグレナの鞭毛運動を抑制すればエネルギーを貯蔵するのではないかと考え、2.5%メチルセルロースを含んだ高粘度の培地で培養したところ、細胞1個あたりのパラミロン量が独立栄養培養の場合に比べて4.7倍増加したことが明らかとなった。これらのことから、ユーグレナを静止期直前まで独立栄養培養した後、高粘度培地とスクロースを含む従属栄養培養を行うことで、パラミロン高含有ユーグレナを効率よく培養できると考えられる。

Introduction

ユーグレナは、ミドリムシとも呼ばれ、ユーグレナ藻類に分類される。高校の生物では、単細胞性真核生物の代表例として、発達した細胞小器官を有することが紹介されている。ユーグレナは、狭い体積で大量培養する方法が確立されているため、生産性が高く、利用しやすい⁽¹⁾。今日ではエネルギー問題や環境問題などの様々な分野で活用するための研究が活発に行われている。例えば、ユーグレナの生成するパラミロンとワックスエステルを原料にした生分解性バイオプラスチックやバイオジェット燃料の開発研究が盛んである⁽²⁾⁽³⁾⁽⁵⁾。ユーグレナから合成されたバイオディーゼル燃料を用いたバスの定期運行も進められている事例もある⁽³⁾。植物由来製品は、石油由来製品にくらべて生産過程に必要なエネルギーや排出する二酸化炭素量が少ないことから、注目を集めている。一方、サトウキビやトウモロコシを原料にしたバイオ燃料は、食糧や農耕地との競合してしまう。微生物や生体触媒を利用した生産技術では、製造に要するエネルギーに対して、節約できるエネルギーを増やすことが大きな課題となっている。

多くの植物は、光合成により糖類を効率よく貯蔵するためにデンプンを生合成する。ユーグレナはグルコースからパラミロンと呼ばれる多糖類を合成する。ユーグレナが細胞内にグルコースを取り込むと、グルコース-6-リン酸に変換し、多岐の生合成反応を経て、パラミロン粒が合成される。ユーグレナ細胞内に存在するフルクトース-6-リン酸も、グルコース-6-リン酸に

変換されることで、同様の経路によりパラミロンが合成される⁽⁴⁾。パラミロンは、数百から数千分子のグルコースが β -1, 3結合でつながり、三重らせん構造を形成している⁽¹⁾。これが複雑に絡み合い円盤状の構造体(パラミロン粒)として細胞内に存在する。パラミロンは希アルカリ、濃い酸やジメチルスルホキシドなどに溶解する。ユーグレナから抽出したパラミロン顆粒の間までは、どの β -1, 3-グルカンナーゼを用いても加水分解されない。アルカリで処理することによってパラミロン顆粒が膨潤し、その結晶構造や螺旋構造に変化があり、酵素によって分解されやすくなる⁽⁴⁾。

パラミロンは、ユーグレナがワックスエステルを生成するときの前駆体でもある⁽¹⁾⁽⁵⁾。パラミロン粒は、表面や内部に無数のミクロホールがあり難消化性である。このため、パラミロンは、体内の毒素に結合し、体外に排出してくれるデトックス効果がある。他にもコレステロールの低減や抗がん作用がみられるとの研究報告もある。このように、パラミロンは有用性のある物質であり、近年注目され、研究が進んでいる。ユーグレナのパラミロン含有率は、培養条件により0~60%以上と大きく変動する。そこで私は、ユーグレナの培養条件による増殖様式やパラミロン含有率を比較検討し、パラミロンを効率よく抽出する方法を目指すとともに、ユーグレナの糖代謝の基礎的知見を得ることを目指した。その結果、独立栄養培養に比べて従属栄養培養では、培地中にスクロースを添加した場合、細胞1個あたりのパラミロン量が3.2倍になった。驚くべきことに、メチルセルロースによってユーグレナの鞭毛運動を抑制した結果、パラミロン量は4.7倍も増加した。動かなければエネルギーが蓄積されるという

Corresponding author. e-mail address: kouda.kousuke.research@*****
***** =gmail.com

う共通性が, ヒトと単細胞生物であるユーグレナにも見いだすことができたと言える。

Results

高校のラボスケールにおけるパラミロン抽出法の確立

ユーグレナ細胞は, 生体膜を構成する脂質や, タンパク質, グルコースや無機塩類などの水溶性物質, 不可溶性の多糖類であるパラミロンを含んでいる。ユーグレナが含んでいる不可溶性の糖類はパラミロン以外に知られていない。このことに着目し, パラミロンを抽出するため, まずは超音波洗浄により細胞を破碎した後, アセトンを添加して脂質を溶解し遠心分離法により沈殿物を分離し, 脂質を除去した。沈殿物を SDS 水溶液に懸濁し, タンパク質を溶解させ遠心分離を行うことにより除タンパクを行った。この沈殿物を水に溶解し, さらに可溶性の物質を取り除く操作を用いた。実験開始時に回収したユーグレナ細胞 160mg に対して, 34 mg の残渣が回収できた。フェノール硫酸法で純度を測定した結果, 純度は 30% で, パラミロン収量は 10.2 mg, 回収したユーグレナ細胞に対する収率 6.4% だった (Table 1)。本研究では機材の都合上, 遠心分離を 4000 rpm, 8 min で行った。しかし, 一般的にはさらに高回転数である 12000 rpm, 2 min で遠心分離操作を行う。そのため, 遠心分離後に, パラミロンが上清に残っており, 上清を取り除く操作でパラミロンをロスしている可能性があると考えた。遠心分離の操作ごとに上清を回収し, 残渣と同様にフェノール硫酸法で全糖量測定を行った。水酸化ナトリウムで溶解させたパラミロンを含む糖量を測定し, 次に上清に溶解しているパラミロン以外の糖量を測定してその差をとることで上清に含まれていたパラミロン量を算出した。遠心分離の過程でロスしたパラミロン量は 0.009 mg であった (Table 2)。よって, この方法を用いることでパラミロンをほとんどロスせずに回収できることが分かった。

独立栄養培養の方が従属栄養培養よりも 0.86 倍速く増殖し, 従属栄養培養では効率的にパラミロンが細胞内に蓄積した

独立栄養培養と従属栄養培養でユーグレナの増殖やパラミロン含有量にどのような影響があるのかを調べ

るために, ユーグレナを独立栄養培養または従属栄養培養の条件下で, インキュベーター用い 15 日間培養し, 世代時間やパラミロン量を測定した。従属栄養培養では, 溶解させる糖類の種類によってどのような影響があるのかを調べるために, 4 種類の糖類(グルコース, スクロース, デンプン, デキストリン)を用いた。それらの結果を Fig. 1, Fig. 2, Table 3 に示した。デキストリンは加熱しても完全溶解しなかったため, パラミロン量を測定しなかった。独立栄養培養では世代時間が 80.0 時間で, いずれの糖を用いた従属栄養培養よりも短い時間で増殖することがわかった (Fig. 1)。

従属栄養培養では細胞 1 個あたりのパラミロン量が独立栄養培養より多くなった。特に, グルコース存在下では 4.8 ng/cell と独立栄養培養の 2 倍以上, スクロース存在下では 6.9 ng/cell と 3 倍以上のパラミロン量であった。これらのことから, 独立栄養培養の方が効率的に細胞数は増加し, 一方で, 糖を添加した従属栄養培養の方が, 細胞内に効率的にパラミロンを蓄積することが明らかとなった。

メチルセルロースを用いると細胞 1 個あたりのパラミロン量が 4.7 倍増加した

ヒトは運動をしなければ糖を蓄積する(太る)。一方で, 植物は光合成産物を多糖類として蓄積させる。これらの知見から, ユーグレナも鞭毛運動を抑制することで, エネルギーがより効率的に蓄積するのではないかと考えた。このことを調べるために, 高粘度の培養液を用い, 鞭毛運動を抑制した条件で培養を行い, 増殖様式やパラミロン含有量の比較検討を行った。高粘度培地として, グリセロールやメチルセルロースを含んだ培地を用いた。グリセロールは, 粘性の水溶性物質である。一方メチルセルロースは, アルカリセルロースをメチル化したもので, アルカリ性の木綿繊維や化学綿でできている。一般に, 高校の実験では, 運動性の高いユーグレナを観察しやすくする目的でメチルセルロースが用いられる。これらの高粘度培地中でユーグレナを 21 日間培養した。その結果を Fig. 3, Fig. 4, Table 4 に示した。グリセロールやメチルセルロースを含ませた培地では, 世代時間がそれぞれ 128.5 時間,

Table 1 高校のラボスケールにおけるパラミロン抽出の回収率

回収した細胞	抽出後の残渣	純度	パラミロン収量	細胞からの回収率	細胞あたりの収量
160 mg	34 mg	30%	10.2 mg	6.4%	0.28 ng/cell

Table 2 抽出操作中の各処理後における, 遠心分離後の上清に含まれるパラミロン量

アセトン脱脂 1 回目の処理後	アセトン脱脂 2 回目の処理後	10% SDS 除タンパク処理後	0.1% SDS 除タンパク処理後	蒸留水による 洗浄処理後	ロスの合計
0.007 mg	0.0 mg	0.0 mg	0.0 mg	0.002 mg	0.009 mg

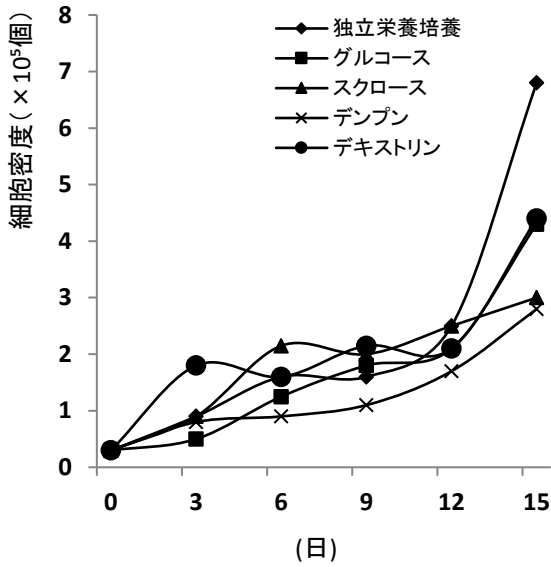


Fig. 1 培養液中に含まれる糖の違いによるユーグレナの増殖曲線の比較

ユーグレナをグラフ中に示す各種糖を含む培地中で培養した。この時の細胞密度を2日おきに測定し、継時変化を比較検討した。

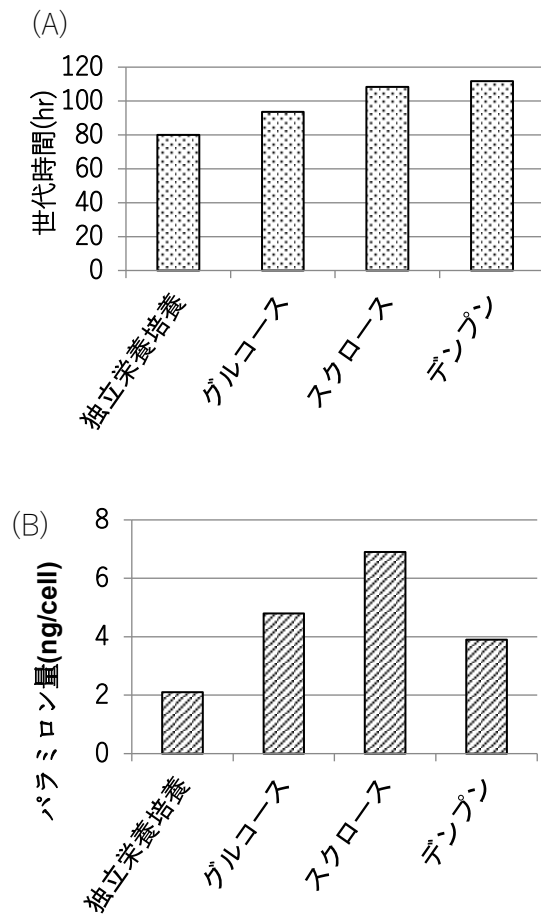


Fig. 2 溶解させた糖の種類による世代時間(A)とパラミロン量(B)の比較

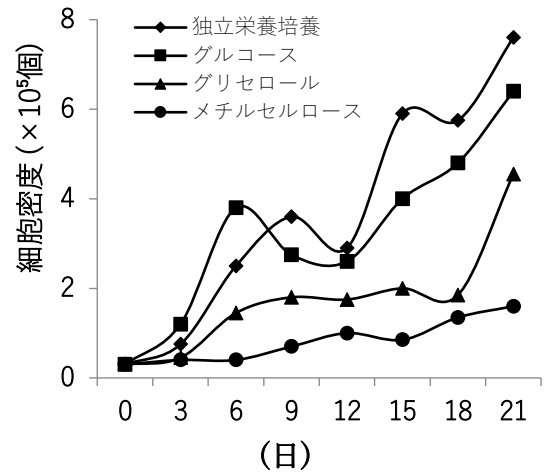


Fig. 3 高粘度培地におけるユーグレナの増殖曲線の比較

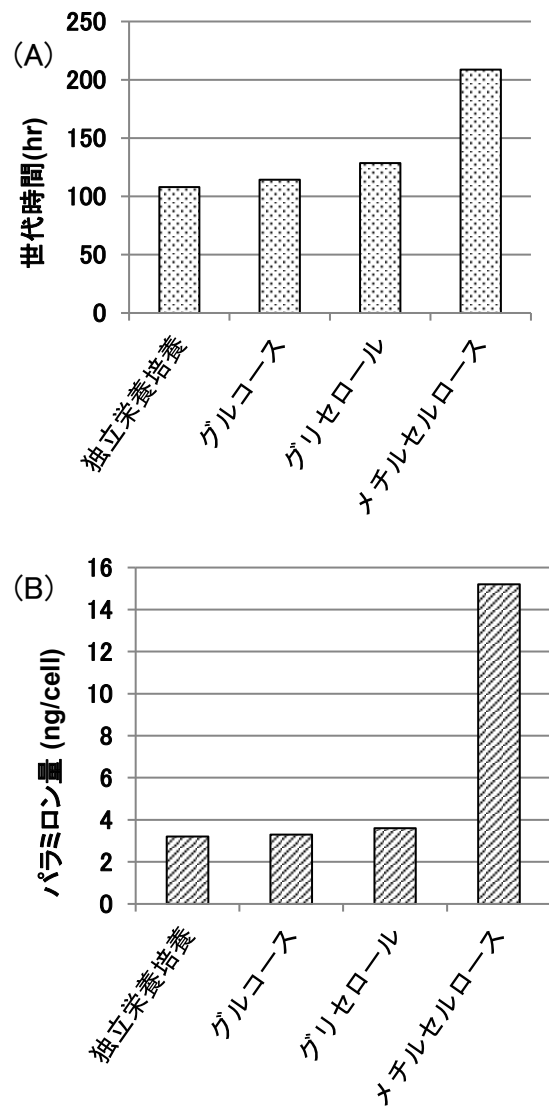


Fig. 4 高粘度培地における世代時間(A)とパラミロン量(B)の比較

Table 3 溶解させた糖の種類による比較

糖類	世代時間 (hr)	パラミロン回収率 (%)	細胞あたりのパラミロン量 (ng/cell)	回収量 (mg)
—	80.0	1.9	2.1	1.5
1.0% グルコース	93.7	2.6	4.8	2.1
1.0% スクロース	108.4	3.2	6.9	2.1
1.0% デンプン	111.7	1.6	3.9	1.1
1.0% デキストリン	92.9	N. D.	N. D.	N. D.

208.7 時間と独立栄養培養に比べて長くなった。粘性の高さが、細胞分裂の阻害要因として働いていることが示唆された。一方、メチルセルロースを含んだ培地では、驚くべきことに細胞一個あたりのパラミロン量が 15.2 ng/cell であり、独立栄養培養におけるパラミロン量 3.2 ng/cell と比べて 4.7 倍であった。このことから、メチルセルロースによって鞭毛運動が抑制されることにより、著しくパラミロンが蓄積することが示唆された。

Discussion

本研究により、独立栄養条件下ではユーグレナの世代時間が最も短いことが示された。従属栄養条件下では、グルコースだけでなく、スクロースやデンプン、デキストリンなどを含む培地いずれでも、世代時間が長くなる一方で、細胞 1 個あたりのパラミロン量が増加した。ユーグレナは、独立栄養培養条件下で増殖が

Table 4 高粘度培地を用いた培養の比較

添加物	世代時間 (hr)	パラミロン回収率 (%)	細胞あたりのパラミロン量 (ng/cell)	回収量 (mg)
—	108.1	3.8	3.2	2.4
1.0% グルコース	114.2	1.5	3.3	2.1
1.5% グリセロール	128.5	2.5	3.6	1.6
2.5% メチルセルロース	208.7	3.9	15.2	1.6

活発になると同時に、光合成によって生成されたグルコースはパラミロン合成ではなく、増殖のためのエネルギー源として利用されていることが示唆される。

スクロース存在下の培養条件におけるユーグレナの細胞 1 個あたりのパラミロン量は、グルコース存在下のパラミロン量より多かった。ユーグレナに取り込まれたスクロースは、グルコースとフルクトースに分解され、グルコースはグルコース-6-リン酸に、フルクトースはフルクトース-6-リン酸を経てグルコース-6-リン酸に変換される。グルコース-6-リン酸は、多岐の合成反応を経て、パラミロンが合成される⁽⁴⁾。ユーグレナの細胞膜に存在するグルコースまたはスクロース輸送体の数には限りがある。スクロースは、1 分子を取り入れることで 2 分子分のグルコース-6-リン酸を生成することができる。本実験では、過剰量の糖類を培地に含んでいるため、グルコースよりもスクロースの方が効率良くパラミロンを合成できたと考えられる。

また、スクロースはグルコースより低コストで、かつ手に入れやすい。今後、フルクトースを添加した培地でのユーグレナの増殖速度とパラミロン含有量を比較し、グルコースの場合と同様の結果になるかどうかを調べることで、この仮説を検証することができる。

メチルセルロース存在下の培養条件におけるユーグレナの世代時間は独立栄養条件に比べて長かった。一方で、細胞 1 個あたりのパラミロン量は独立栄養培養に比べて 4.7 倍増加した。高粘度培地によってユーグレナの鞭毛運動が阻害され、エネルギー消費が抑制されたため、エネルギーが貯蔵されたからだと考えられる。1.5% のグリセロールを含む培地では、粘度が低く、メチルセルロースのようにパラミロン量が増加しなかったことが示唆された (Table 4)。データには示していないが、培地の粘度を上げるために 2% グリセロールを含む培地でも同様の実験を行おうとしたが、浸透圧が高すぎるため、ユーグレナが生育できなかった。メチルセルロースは軟寒天培地のような繊維状物質により粘性が上昇するため、浸透圧は上昇しない。このため、培地としての利用がしやすい。本研究により、ユーグレナを静止期直前まで独立栄養培養した後、高粘度培地とスクロースを含む従属栄養培養を行うことで、パラミロン高含有ユーグレナを効率よく培養できると考えられる。糖類が含まれる場合、パラミロン合成が促進され、貯蔵することが強く示唆される。メチルセルロースによって運動性を抑制することでパラミロン貯蔵量が著しく増大することが強く示唆された。これを支持するために、軟寒天培地などでも同様の結果となるかを調べる必要があるだろう。“動かなければエネ

ルギーが蓄積される”という共通性が, ヒトと単細胞生物であるユーグレナの間に見いだされた。

Materials & Methods

ユーグレナの株

パラミロン抽出方法の確立においては, *Euglena gracilis* (株式会社科学クラブより購入) を用いた。そのほかの培養条件の検討においては, *Euglena gracilis* Z 株 (神戸大学洲崎敏伸教授より分譲していただいた) を用いた。

パラミロンの抽出

培養した *Euglena gracilis* を, 遠心分離機を用いて 2 mL チューブに回収し, 乾燥させて重量を測定した。チューブに蒸留水を 500 μ L 入れて超音波洗浄機に 30 分間かけることで細胞を破碎した。アセトンを 1500 μ L 入れて細胞を十分に攪拌し, 4000 rpm で 8 分間遠心分離をして上清を取り除いた。この操作を 2 回繰り返して行うことで脱脂した。10%SDS 水溶液 1500 μ L を入れて細胞を十分に攪拌し, 100°C のアルミブロックヒーターで 30 分間加熱し, 放冷後に 4000 rpm で 8 分間遠心分離を行い, 上清を取り除いた。0.1%SDS 水溶液 1500 μ L を入れて細胞を十分に攪拌し, 4000 rpm で 8 分間遠心分離を行い, 上清を取り除いた。これらの操作でタンパク質を取り除いた。蒸留水 500 μ L を入れて細胞を十分に攪拌し, 4000 rpm で 8 分間遠心分離をして上清を取り除くことによって残渣を洗浄し, 残渣を乾燥させて重量を測定した。

フェノール硫酸法

パラミロン抽出後の, パラミロン残渣を 1 N 水酸化ナトリウム 1 mL に溶解させた。これを 100 μ L, 新しい 2 mL チューブに移し, 5%フェノールを 400 μ L, 蒸留水 500 μ L を入れて希釈し, ボルテックスミキサーで攪拌した。これを 490 μ L, 新しい 2 mL チューブに入れて, そこに 1200 μ L の 90%硫酸を入れた。反応が安定するまで 30 分間置いたあと, 分光光度計を用いて 490 nm における吸光度を測定した。これにより, 溶液に含まれるパラミロン量を算出した。遠心分離後の上清に含まれるパラミロン量を測定するためには, 次の方法により算出した: 1 N 水酸化ナトリウム水溶液となるように, 4 N 水酸化ナトリウムを上清に添加してパラミロンを溶解させたものの糖量を測定した。また, 塩基によりパラミロンを溶解させていない上清そのものについても同様に糖量を測定した。これらの結果から, 上清に含まれる全糖量から, パラミロンが溶解していない上清 (可溶性糖量) を差し引くことで算出した。

独立栄養培養と従属栄養培養の比較

培地には, 100 mL の蒸留水, 0.86% ハイポネックス, 100 μ L のビタミン剤 (市販のアリナミン錠 1 錠を 20 mL の水に溶解したもの: 1.0 mg/mL のビタミン B1, 0.6 mg/mL のビタミン B2, 0.5 mg/mL のビタミン B6, 2.0 μ g/mL のビタミン B12) を含むものを用いた。培養は, 7000 Lux (明期/暗期 (以下 L/D とし, 単位は時間) = L / D = 14 / 10) の LED 光下で行った。これを, 次の条件下で培養した: 独立栄養培養, 1%(w/v) グルコース, 1%(w/v) スクロース, 1%(w/v) デンプン (溶性) (関東化学株式会社 鹿 1 級) (加熱による溶解), 1%(w/v) デキストリン (関東化学株式会社 鹿 1 級) (加熱)。それぞれインキュベーターを用いて 25°C で培養した。血球計算盤を用い, 2 日置きに細胞数を調べた。15 日間培養後, ユーグレナ細胞を回収し, パラミロン抽出を行った。

高粘度培地による比較

培地には, 100 mL の蒸留水, 0.86% ハイポネックス, 100 μ L のビタミン剤を含むものを用いた。培養は, 7000 Lux (L / D = 14 / 10) の LED 光下で行った。これを, 次の条件下で培養した: 独立栄養培養, 1%(w/v) グルコース, 1.5%(w/v) グリセロール, 2.5%(w/v) メチルセルロース。それぞれインキュベーターを用いて 25°C で培養した。血球計算盤を用い, 2 日置きに細胞数を調べた。21 日間培養後, ユーグレナ細胞を回収し, パラミロン抽出を行った。

References

- 1) 嵐田 亮, “光合成研究” 22, 33-38, (2012).
- 2) 産総研,
https://www.aist.go.jp/Portals/0/resource_images/aist_t_j/aistinfo/aist_today/vol13_06/vol13_06_p21.pdf
(2013 年 6 月現在).
- 3) 東洋経済 ONLINE,
<https://toyokeizai.net/articles/-/95004> (2015 年現在)
- 4) 北岡 正三朗, “ユーグレナ - 生理と生化学 - ” 学会出版センター (1989)
- 5) 上 田 巖, 嵐田 亮, 加藤 宏明, 伊藤 卓郎, “NEDO 新エネルギー成果報告会 ―バイオマスエネルギー 利用技術の実用化に向けて―” 予稿集, 92-101, (2013).
- 6) Aoen Bolige, Shin-ya Hagiwara, Yulan Zhang, Ken Goto, “Circadian G2Arrest as Related to Circadian Gating of Cell Population Growth in *Euglena*” *Plant Cell Physiol.*, (2005), 46, 931-936.

Acknowledgement

研究を行うにあたって宮崎大学 林 雅弘 准教授, 神戸大学 洲崎 敏伸 准教授に貴重なアドバイスをいただいた。また, 洲崎 敏伸 准教授には今回使用したユーグレナを分譲していただいた。