

塩化物イオンが *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育に及ぼす影響の解析

進藤 雅史 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

[背景・目的]

Aurantiochytrium 18W-13a 株は、スクアレン等の炭化水素を生成し大量に細胞内に貯め込む性質を有することから、バイオ燃料生産への利用が期待されている[1]。*Aurantiochytrium* 18W-13a 株は、本来汽水域に生息するため幅広い塩濃度環境で生育できるが、完全な淡水では増殖することができないことが知られている[2]。これまでに当研究室の福田らによって、海水中の塩化物イオンが細胞の生育に必要であると明らかになっているが、*Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育になぜ塩化物イオンが必要であるのか、そのメカニズムは依然不明である。そこで私は、塩化物イオンが *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の生育におけるどの段階にどのような形で影響しているのかを解明するため、塩化物イオン欠乏状態の *Aurantiochytrium* 18W-13a 株に糖代謝の中間産物を添加した際の呼吸活性の変化を観察することで糖代謝との関連性の確認を試みた。

[実験内容]

・ *Aurantiochytrium* 18W-13a 株の培養

Aurantiochytrium 18W-13a 株の培養は GTY 培地 50 mL (Glucose 1 g, Bacto Tryptone 0.5 g, Bacto Yeast Extract. 0.25 g, H₂O 25 mL, 人工海水 25 mL) を培地として使用した。三角フラスコに分注した GTY 培地に接種し 20°C、70 rpm で振盪しながら 3 日間前培養した株を実験に用いた。細胞濁度は 24 時間毎に 660 nm の散乱を分光光度計で測定した。各サンプルは GTY で 20 倍に希釈して測定に供した。

・ 培地中糖濃度の測定

人工海水の代わりに NaCl、グルタミン酸 Na (Glu-Na)、リシン・HCl (Lys-HCl)、ソルビトールをそれぞれ 0.3 M 加えた 4 種の GTY 培地を用いて培養を行い、細胞濁度を測るとともに、フェノール硫酸法[3]によって培地中の糖濃度の減少量を計測した。

・ 呼吸活性の測定

酸素電極を用いて、塩化物イオンの有無・炭素源の有無の条件を変えた条件における呼吸活性を測定した。塩化物イオンを含まない培地へ継代した後、解糖系～TCA 回路における中間産物 (Glucose 100 mM, Fructose 100 mM, Glycerol 100 mM, Sodium acetate 10 mM, Sodium citrate 10 mM) を添加し呼吸活性が回復するかどうかを観察した。細胞濃度は OD₆₆₀=0.1 に希釈し、測定時の温度は 20°C に保った。

・ 塩化物イオン以外のハロゲン化物イオンについて

その他、NaCl の代わりに NaBr と NaI をそれぞれ 0.3 M ずつ加えた GTY 培地にて 5 日間培養を行い、24 時間毎に 660nm の波長の光の散乱を分光光度計で測定した。

[結果・考察]

塩化物イオンを含む培地 (NaCl, Lys-HCl) において培養 72 時間後にそれぞれ OD₆₆₀ が 13.1 と 10.1 に達し、糖濃度は 26.7, 25.6

g/L から 1.9, 6.1 g/L まで減少した (Fig.1 a, b)。一方、塩化物イオンを含まない培地 (Glu-Na, ソルビトール) における培養 72 時間後の細胞濁度はそれぞれ OD₆₆₀ が 1.38, 1.28 で、細胞増殖が正常に行われておらず、また培地中の糖濃度は培養 72 時間後にそれぞれ 18.4, 21.9 g/L であり、ほぼ減少していなかった (Fig.1 c, d)。この結果から塩化物イオンが解糖系から TCA 回路の糖代謝に関与している可能性を予想した。

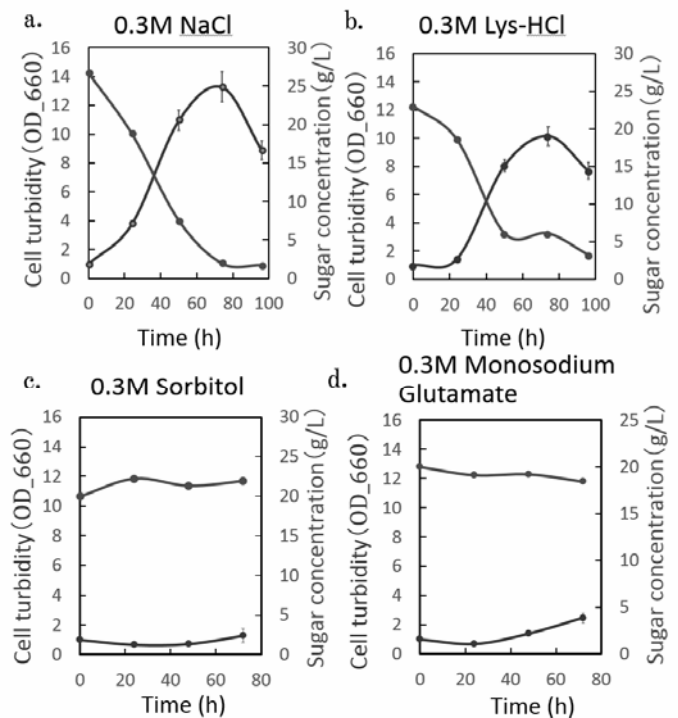


Fig.1 *Aurantiochytrium* 18W-13a株の細胞濁度と培地中糖濃度

そこで、塩化物イオンと糖代謝の関係を調査するために呼吸活性の測定を行った。塩化物イオンを含まない培地へ継代し、解糖系から TCA 回路における中間産物 (Glucose, Glycerol, Fructose, 酢酸, クエン酸) をそれぞれ添加し、呼吸活性を測定した。その結果、前培養 (GTY 培地) から塩化物イオンを含まないソルビトール培地へ継代すると呼吸活性が著しく低下することを確認したが、中間産物の添加による呼吸活性の回復は見られなかった。また培養実験において、NaCl ではなく NaI, NaBr を含む培地での培養を行ったところ正常な細胞増殖が見られたことから、塩化物イオン特異的な効果ではなくハロゲン化物イオンの必要性を見出した。今後は呼吸を測る以外の方法でのアプローチを検討していきたい。発表会にて詳細を報告する。

[参考文献]

- [1] Watanabe et al.: (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2246-2248
- [2] Nagano et al.: (2009) *J. Oleo Sci.*, 58, 623-628
- [3] Dubois M. et al.: (1956). *Anal. Chem.*, 28, 350