

## 緑藻 TH2-565 株の培養条件最適化

瀧澤 幸史 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

### 1. 導入

TH2-565 株は当研究室の鈴木大智氏によって秋田県男鹿市船川漁港の汽水サンプルから松花粉ベイト法により確立された緑色単細胞藻の培養株である。本株は、炭素源としてグルコース、海水 30%を含む寒天培地で増殖が確認されたことから海水へのある程度の耐性が期待される。

水産養殖業において仔魚の餌料として用いられるシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex の培養には、藻類が餌として用いられている。現在主に餌として利用されているのは、海産クロレラと俗称される *Nannochloropsis* sp. (不等毛植物門) [1]、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、淡水性クロレラ *Chlorella* sp. の 3 つであるが、欠点も指摘されている。海産クロレラは従属栄養的に培養できないため高い生産性が得られず、天候によっても品質が左右されるため、安定で効率的な培養が困難である。パン酵母は栄養的価値が低く、淡水クロレラは高コストであり、さらに両者は海水耐性がほとんどない。従ってワムシの培養条件である海水 (21%) 中において死滅し、水質汚濁とそれに起因するワムシの斃死を引き起こす。ワムシの餌料として利用できる海水耐性のあるクロレラ株が発見されれば、水質管理におけるリスク軽減につながることを期待できる。そこで、海水耐性が期待される TH2-565 株の成長条件の検討を行い産業利用の可能性を模索した。

### 2. 実験方法

#### ・培養株の維持

TH2-565 株は、50%海水 GTY 培地 (50%海水 100 mL あたりグルコース 2g、トリプトン 1g、酵母エキス 0.5g を含む) で 24°C、暗所で継代した。

#### ・分子系統解析

TH2-565 株の SSU rRNA 遺伝子断片を PCR により増幅し、DNA 配列を得た。この配列を用いてデータベースから得た近縁配列とともに ML 法により分子系統解析を行った。

#### ・培養条件の検討

増殖に最適な培養条件を探るため、本研究ではまず (1) 異なる炭素源に対する増殖特性、(2) 塩濃度に対する増殖特性、(3) 温度に対する増殖特性の調査を行なった。細胞増殖の評価は、血球計算盤を用いた細胞密度の計測を行い、同じ試験を独立に 3 回施行して平均値を求めることで行なった。

#### (1) 異なる炭素源に対する増殖特性

GTY 培地、GTY 培地のグルコースを他の炭素源 (ガラクトース、マルトース、グリセロール) へ置き換えた培地、炭素源を添加しないトリプトン-酵母エキス培地を用いた。500 mL フラスコに培地 (200 mL) を入れ、TH2-565 株 (初期濃度: 5000 cells/mL) を添加し、パスツール管による通気培養を行なった。培養温度は 24°C とし、ほぼ 48 時間ごとに細胞密度を測定した。フラスコはアルミホイルで覆い暗条件下で培養したが、細胞密度測定時のみ短時間の弱光に曝された。

#### (2) 塩濃度に対する増殖特性

GTY 培地に用いる海水の濃度を 0%、25%、50%、75%、100% にそれぞれ調製した培地 200 mL を 500 mL フラスコに入れ、TH2-565 株 (初期濃度: 5000 cells/mL) を添加し、振盪培養を行った。振盪は 100rpm、培養温度は 24°C とし、24 時間ごとに細胞密度を計測した。

#### (3) 温度に対する増殖特性

500 mL フラスコに、25%海水 GTY 培地 200 mL を入れ、TH2-565 株 (初期濃度: 5000 cells/mL) を添加し、20°C および 24°C で振盪培養を行った。振盪は 100rpm とし、24 時間ごとに細胞密度を計測した。

### 3. 結果

18S rDNA 塩基配列に基づく系統解析の結果、TH2-565 株は緑藻植物のクロレラを含むクレードに入ることを示唆された。

異なる炭素源に対する増殖特性を知るため、GTY 培地の炭素源グルコースを別の炭素源 (ガラクトース、マルトース、スクロース、フルクトース) に置き換えて培養した結果、マルトースでは細胞はほとんど増殖しなかった。また、ガラクトースよりもグルコースがより良い増殖を示した。

次に塩濃度に対する増殖特性を知るため、GTY 培地の海水の割合を 0%、25%、50%、75%、100% に変化させて培養した結果、0%、25%、50% でのみ明らかな増殖が確認され、その中で 25% 海水 GTY 培地が最も高い増殖を示した。

さらに温度に対する増殖特性においては、20°C よりも 24°C の方が良い増殖を示した。

### 4. 考察

本研究の分子系統解析により、TH2-565 株は *Chlorella* に近縁な緑藻であることが示唆された。水産養殖業で用いられるワムシの餌料用クロレラは淡水性であるが、今回、TH2-565 株は 50% 海水の培地でも増殖可能であり、0%~50% まで幅広い塩濃度で生育可能であることが示された。このことは海水に対する耐性がワムシ餌料用クロレラよりも高いことを期待させる。今後、現在のワムシ餌料用クロレラの塩耐性ととの比較が必要である。また、本研究により、資化可能な炭素源とおおまかな温度に対する増殖特性を把握できたことは、より低コストで効率の良い TH2-565 株の培養法開発へ向けた基礎データとして重要な知見となったと考える。今後、今回試験した増殖特性についてより詳細な試験を行うと共に、他の要素 (pH など) に対する増殖特性、および脂質組成などの栄養素等もあわせて、ワムシ餌料用クロレラと比較し、TH2-565 株の優位性の有無を判断する予定である。

### 4. 参考文献

[1] Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* Vol 133, Issues 3-4, 15 June 1995, Pages 295-309