

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380151

研究課題名(和文)抗腫瘍物質を産生する共生型渦鞭毛藻の環境応答解明およびその高速大量培養法の開発

研究課題名(英文) Determination of optimum conditions for growing symbiotic dinoflagellates, Amphidinium species, and development of methods for its rapid mass culture

研究代表者

北宅 善昭 (Kitaya, Yoshiaki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：60169886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：培養環境条件が渦鞭毛藻の細胞増殖速度に及ぼす影響について、目的に応じて水滴(容量0.003 mL)、中型培養器(容量70-300 mL)、および大型培養器(容量1-2 L)を用いた培養実験系で調査した。細胞増殖速度を最大にする環境条件の組み合わせは、温度：26℃、PPFD：0.05-0.07 mmol m⁻² s⁻¹、O₂濃度：3-5%、CO₂濃度：0.1%、NaHCO₃ 2.5 mmolであった。既存の標準培地への栄養塩の添加は、増殖促進に効果的であった。また中型あるいは培大型培養器での培養における最適な水深は10 mm以下であった。

研究成果の概要(英文)：Symbiotic dinoflagellates, Amphidinium species, are expected to be pharmaceutically useful microalgae, because they produce antitumor macrolides. A microalgae production system with a large number of cells at a high density has been developed to produce macrolide compounds efficiently. In this study, effects of culture conditions on the cellular multiplication of dinoflagellates were investigated to determine the optimum culture conditions for obtaining high yield of the microalgae. The maximum specific growth rate was obtained at a temperature of 26°C, PPFDs of 0.05-0.07 mmol m⁻² s⁻¹, photoperiod of 12 h d⁻¹, O₂ concentration of 5% and CO₂ concentration of 0.1%. The results demonstrate that Amphidinium species could efficiently multiply under the condition with relatively low light intensities and low O₂ concentrations with additional inorganic nutrients. The optimal depth of culture solution was 10 mm.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：生物環境調節 生物生産システム 渦鞭毛藻 培養

1. 研究開始当初の背景

単離された共生型の海産渦鞭毛藻（単細胞微細藻）を高速で大量に培養できる条件を解明して、その渦鞭毛藻の産生する抗腫瘍性マクロリド化合物を大量生産するための培養システムを確立することを目標として、基礎研究を行った。

海産微細藻類の代謝産物は、貝毒や魚毒など海洋毒成分として注目されてきたが、医薬資源となり得る有用化合物も多く含まれる。最近ではこれらの微細藻類代謝産物を有効利用しようという試みが多く見られる。例えば、ヒラムシ（扁形動物）から単離された共生渦鞭毛藻（図1）から抗腫瘍性マクロリド化合物が抽出され、その化学構造が解明されている。これらの化合物は、既存の抗がん剤とは異なった化学構造を持っているため、新しい作用機序をもった副作用の少ない抗がん剤として期待されている（Tsuda et al., 2008）。しかし、共生型渦鞭毛藻の大量培養が難しいこと、従って既存の培養システムでのマクロリド化合物の生産性が極めて低いことから、十分な化合物量の確保が困難であり、動物実験さえも行えない状況にある。

これまで微細藻の化学成分の有効利用については、単細胞緑藻クロレラの有効成分の利用が実用化されているに留まっている。共生型海産渦鞭毛藻が産生する有用化学成分の探索は、国内外の研究者により検討されているが、その有用化学成分の評価および有効利用の試みは、藻の大量培養の困難さゆえの供試サンプル供給不足のために、これまでのところ進展していないのが現状である。特に単離した共生型渦鞭毛藻の増殖速度は極端に小さく、通常の微細藻類培養システムおよび培養環境条件では、共生型渦鞭毛藻の増殖速度は、赤潮の原因となる浮遊性渦鞭毛藻や、珪藻、クロレラ、スピルリナの約 1/10、ミドリムシの約 1/20 に過ぎない。

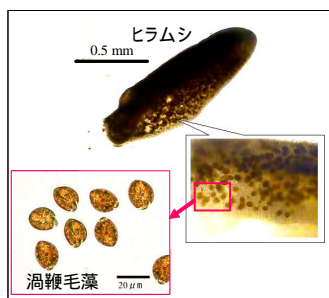


図1. ヒラムシと共生型渦鞭毛藻

2. 研究の目的

本研究では、未利用海洋微細藻の産生する有用化学物質の評価および有効利用研究に供する十分量の試験材料を生産するため、温度、光強度、光、O₂濃度、CO₂濃度、培地成分濃度などの培養環境条件の影響、さらにそれらの組み合わせによる複合影響を解明することにより、共生型海産渦鞭毛藻の大量高速培養条件を求め、その渦鞭毛藻を大量生産できる培養システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 水滴培地を用いた実験(実験1) 完全密閉型培養器内の水滴中で微細藻細胞を培養した。水滴は PES 培地であり、1個の水滴の体積を約 3 μL とした。培養器内の濾紙を湿らせることによって、渦鞭毛藻を含む水滴からの水の蒸発を防いだ。あらかじめ、O₂ および CO₂ 濃度を調節した密閉箱内で培養器を閉鎖することにより、培養器内の O₂ および CO₂ 濃度を調節した。培養器内ガス収支の算定結果から、実験期間中の培養器内ガス組成の変化は無視できた。温度を調節できる水槽内に培養器を設置した。光源には蛍光灯（FL20SS EX-N/18、松下電器産業）を用い、連続照射した。遮光フィルタを用いて、水滴に入射する光合成有効光量子束(PPF)を調節した(PPFD: 60~120 mol m⁻² s⁻¹)。光学顕微鏡を用い、渦鞭毛藻細胞を含む水滴中の細胞数を毎日測定した。細胞数の経時変化から、関係式 $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (T_2 - T_1)$ を用いて比増殖速度 μ を算定した。ここで、N₁、N₂ はそれぞれ時間 T₁、T₂ における渦鞭毛藻細胞数である。

従来の微細藻培養実験系では、一般にガス環境を調節しやすいフラスコ等を用いて、容量数百 mL から数 L の培地で培養するので、条件を組み合わせた実験を科学的に行うには、多くの時間、労力、環境調節された空間を要する。本研究では、独自開発の水滴培養実験系を用いて、藻類細胞の光合成を促進する環境条件の絞り込みを行い、その条件の中から、増殖を促進する最適環境条件を求めた。水滴培養実験では、1水滴が1反復試験となり、また増殖速度の評価では1培養試験の期間が1週間以内であるので、多くの環境条件の組み合わせを短時間、小空間、省労力で行えるのが大きな特色である。

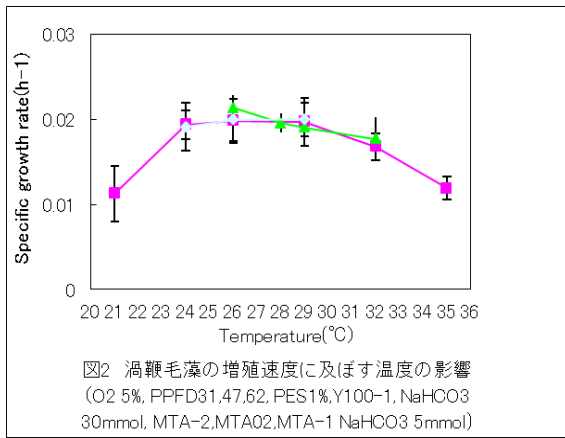
(2) 中型培養器(容量 70-300 mL)を用いた実験(実験2) 透明な扁平フラスコ(最大容量 70 mL)およびカルチャーボトル(最大容量 300 mL)を用い培養を行い、カウンティグチャンバーを用いて細胞数を計測し、毎日各処理区の細胞数を計数し、細胞密度を算定した。

ビルケルチェルク型のカウンティグチェンバーを用いて顕微鏡下で細胞数を計数した。細胞数の経時変化から、細胞の比増殖速度を算定した。

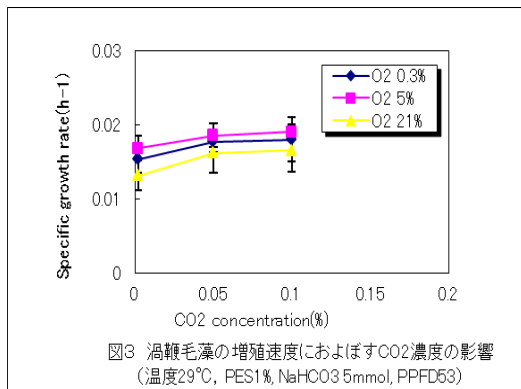
(3) 大型培養器(容量 2L)を用いた実験(実験3) 大型装置(最大容量 2L)を用いて渦鞭毛藻を培養し、比増殖速度におよぼす環境条件の影響を調べた。比増殖速度を算定方法は、実験2と同様であった。

4. 研究成果

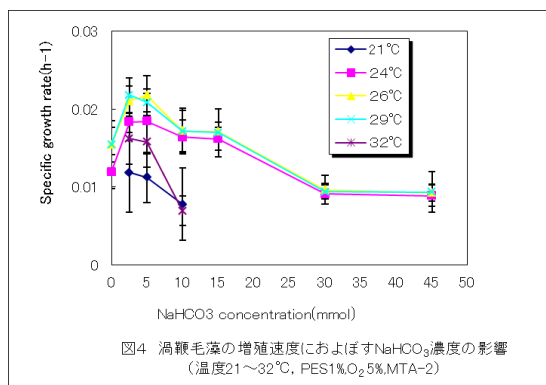
(1) 温度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響(実験1): いずれの NaHCO₃ 濃度においても、温度 26 °C のとき、藻類の増殖速度は最も大きかった(図2)。低温(21 °C)および高温(35 °C)では、増殖速度はそれぞれ約 1/2 まで低下した(図2)。



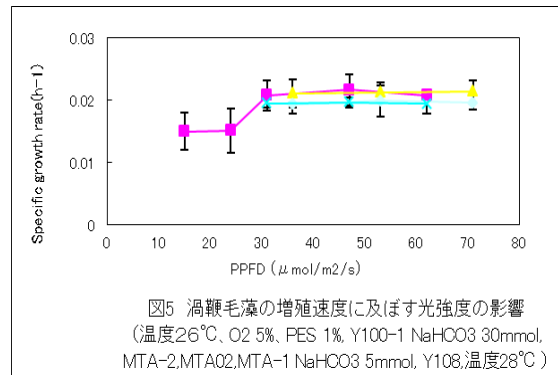
(2) O₂, CO₂ 濃度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): いずれの O₂ 濃度 (0.3、5、21%) においても、増殖速度は CO₂ 濃度の増加にともない増加した。O₂ 濃度 5% において増殖速度は最大となった (図 3)。



(3) NaHCO₃ 濃度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): いずれの温度においても、比増殖速度は NaHCO₃ 2.5 mmol で最大となった (図 4)。

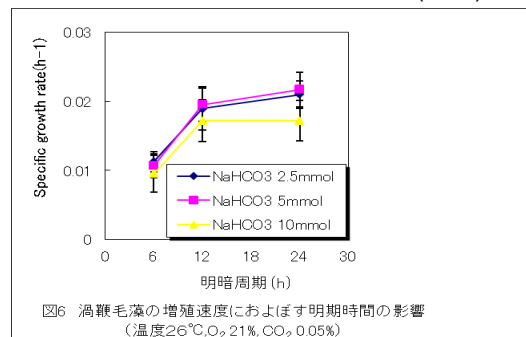


(4) 光強度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): PPFD (15 ~ 31) の範囲では、光強度の増加により、比増殖速度は増加したが、PPFD31 以上になると、光強度の増加ともなう増殖速度の増加は見られなかった (図 5)。

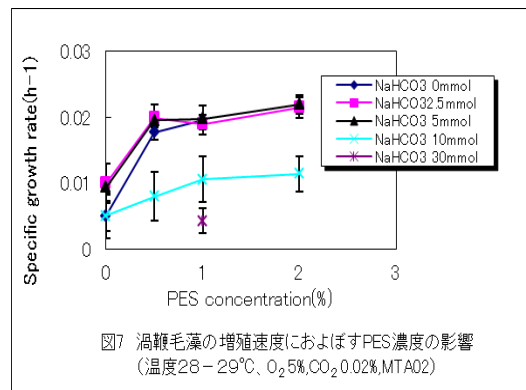


(5) 海水塩分濃度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): 増殖速度は、天然海水と人工海水においても、海水塩分濃度 1% の場合、最も低かったが、塩分濃度の増加ともなう増殖速度は増加したが、2% 以上になると、その増加は緩やかになった。また、いずれの塩分濃度においても、増殖速度は海水の種類 (天然海水、人工海水) の影響は見られなかった。

(6) 光照射時間が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): いずれの NaHCO₃ 濃度においても、藻類の増殖速度はいずれも明期時間の増加にともない増加したが、とくに 6 h から 12 h になると、大きく増加した (図 6)。

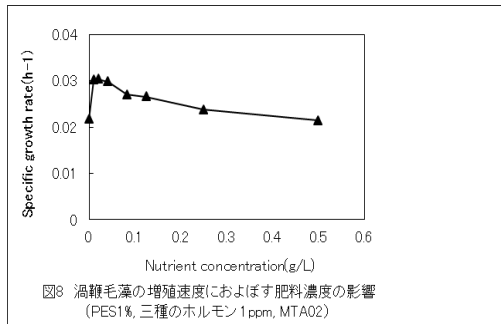


(7) PES 濃度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): 比増殖速度はいずれの NaHCO₃ 濃度の場合でも、PES 濃度の増加にともない増加し、1% でほぼ一定値となった (図 7)。

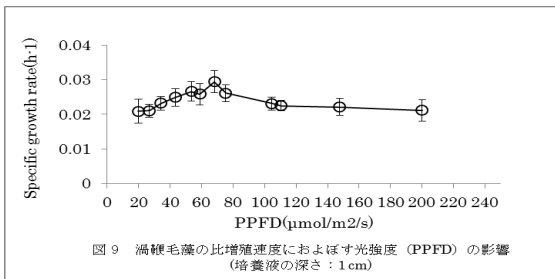


(8) 無機肥料成分の添加が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響 (実験 1): 藻類の比増殖速度は無機肥料濃度が 0 から 0.02 g/L に増加すると増加したが、0.02 g/L 以上では比増殖速

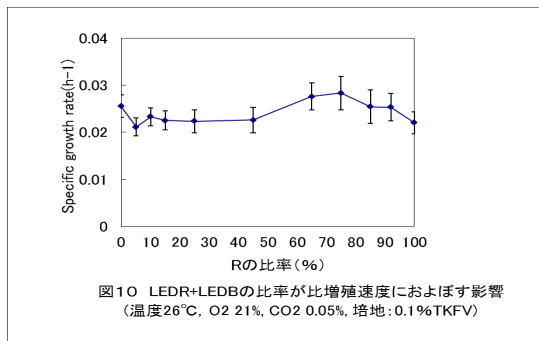
度は低下した(図 8)。



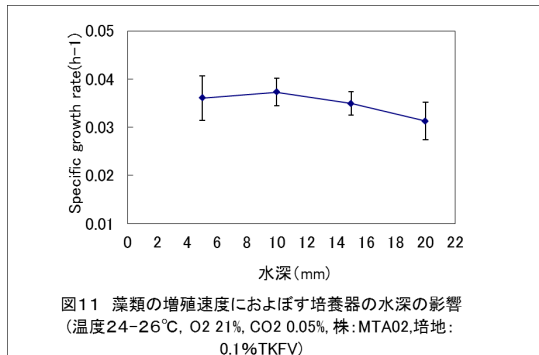
(9) 中型培養器実験における光強度が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響(実験 2): 比増殖速度は PPFD75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ において最大値 ($\mu = 0.0294$) を示した。水滴実験(実験 1)に比べて、比増殖速度を最大にする PPFD が高くなったのは、水深の増加による光強度の減衰が原因である(図 9)。



(10) 光質が渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響(実験 2): 赤色と青色の比(8:2)において、比増殖速度は最大となった(図 10)。



(11) 培養液の深さが渦鞭毛藻の増殖におよぼす影響(実験 2): 深さ 10 mm 以下において比増殖速度は大きくなった(図 11)。



(12) 大型培養器(容量 2 L)での最適培養条件(実験 3): 多段式大型培養器を用いた培養実験でも温度、光強度、照明時間、培地組成、光質などの最適条件は、実験 2 と同様であり、比増殖速度は最大 (0.038 h^{-1}) となった。

以上の結果から、渦鞭毛藻の培養条件としては、比較的弱光条件で O₂ 濃度が低い方が適しており、また無機塩類の添加により、より高い増殖速度が得られることが明らかとなった。

共生型渦鞭毛藻は、ホスト動物のヒラムシや、クラゲ、サンゴの生存に大きく影響するので、その環境応答の知見は、創薬のみならず、海洋生態系の保全にも寄与する。特に水温上昇によりサンゴから鞭毛藻が消失する白化現象の直接的要因の解明およびその対策に寄与する可能性が高い。

本研究の基礎知見を基に、微細藻類の大量高速培養技術が確立できれば、医薬原料の大量供給への活用のみならず、水産養殖向けの高機能性餌料、食品原料用途や工業品用途など、幅広い利用が可能となり、社会経済の活性化への寄与が期待される。また本研究で確立した水滴培養実験系による培養条件の探索、その結果を用いた培養環境制御への展開の手法は、今後、CO₂ 固定能力、油脂産生能力、レアメタル蓄積能力などに優れた多種の有用微細藻類の大量高速培養法の開発に応用できる

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Khanh, N., Kitaya, Y., Xiao, L., Endo, R., Shibuya, T., Selection of microalgae suitable for culturing with digestate from methane fermentation, Environmental Technology, 査読有, Vol.34, 2013, pp. 2039-2045

〔学会発表〕(計 3 件)

Khanh, N., Kitaya, Y., Xiao, L., Endo, R., Shibuya, T., Culture of microalgae with digested sludge from methane fermentation, Annual Conference of Eco-Engineering, June 28, 2014, Numazu, Japan.

Kitaya, Y., Xiao, L., Effects of O₂ and CO₂ concentrations on cellular multiplication and net photosynthetic rates of dinoflagellates, Amphidinium species, 8th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology and 1st Conference on Coastal Biotechnology, July 9, 2012, Adelaide, Australia.

Khanh, N., Kitaya, Y., Xiao, L., Endo,

R., Shibuya, T., An effective utilization of digested sludge from methane fermentation with food and agricultural wastes for microalgae culture, 8th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology and 1st Conference on Coastal Biotechnology July 11, 2012 Adelaide, Australia.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北宅 善昭 (KITAYA Yoshiaki)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：60169866

(2) 研究分担者

遠藤 良輔 (ENDO Ryosuke)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：10409146