

タイトル	オイル産生藻類ユーグレナからバイオ燃料を低コストで抽出する新たな凍結融解法の提案
著者	古澤, 惇平; FURUSAWA, Jyunpei; 福士, 奈津希; FUKUSHI, Natsuki; 矢田部, 歩果; YATABE, Honoka; 高橋, 考太; TAKAHASHI, Kohta; 小山, 芳一; KOYAMA, Yoshikazu; 曾我部, 陽子; SOGABE, Yohko; 水谷, 武臣; MIZUTANI, Takeomi
引用	北海学園大学学園論集(181): 45-65
発行日	2020-03-25

オイル産生藻類ユーグレナからバイオ燃料を 低コストで抽出する新たな凍結融解法の提案

古 澤 惇 平・福 士 奈津希
矢田部 歩 果・高 橋 考 太
小 山 芳 一・曾我部 陽 子
水 谷 武 臣

要 旨

本稿は、北海学園大学工学部生命工学科の学部生が自主的に研究に興味を持ち、卒業研究とは異なる枠組みの下で取り組んできた研究活動を研究ノートとして記録したものである。研究テーマの立案、実験への取り組み、成果の取り纏めは、主に学生が中心となり、それを教職員がサポートする形で行ってきた。研究成果の他に、学生がチームとして研究を進めた際に起こった問題点とその改善策についても記述している。

近年、ユーグレナなどのオイル産生微生物が光合成によって産生するオイル（バイオ燃料）が、化石燃料の代替エネルギー源として注目されている。ただ現在提案されているオイル産生方法では、細胞からのオイル抽出過程で多くのエネルギーが必要となることや、バイオ燃料の価格が既存の化石燃料と比べ高騰してしまうことから、実用化には至っていないのが現状である。そこで本稿では、北海道の「寒冷な気候」と温泉などの「地熱資源」を活用し、オイル産生藻類であるユーグレナから安価にオイルを抽出できる可能性を有する新たな手法の概要を提案する。氷点下に達する冬季の「北海道の寒さ」を利用して夜間にユーグレナ細胞を自然凍結させ、気温の上昇する日中に「温泉地で豊富に湧出する高温の湯」を利用してそれを融解させることで、細胞を破碎しオイルの漏出を誘導する方法である（図1）。

まず本手法の妥当性を探る第一歩として、実験室内でのスモールスケールの凍結融解処理によりユーグレナ細胞の運動特性がどのような変化を起こすかを検討した。北海道の冬季の夜間最低気温は平均 -7.91°C であるので、これを基準として凍結温度および凍結時間を設定、フリーザー内でユーグレナ細胞を凍結処理した後、自然融解させ、各実験パラメータ下でのユーグレナ運動の発生率を光学顕微鏡下で観察計量することにより定量化した。その結果、短時間（10分）の凍結処理後に融解した細胞では、通常の培養時に比べユーグレナ運動の発生率が有意に上昇したの

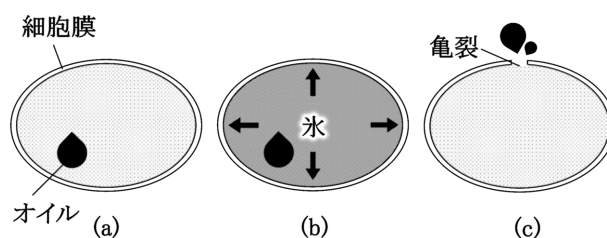


図 1. 凍結融解による細胞からのオイル抽出の予想図

(a) 凍結前の細胞, (b) 凍結中の細胞, (c) 融解後の細胞。(b) では, 凍結により細胞内部が膨張し, ゆがみが生じる。(c) では, 凍結によってできた亀裂からオイルが漏出する。

に対し, 30 分以上の凍結処理では, 凍結時間が長くなるほどユーグレナ運動の発生率が低下することがわかった。ユーグレナ運動の消滅は細胞破碎が起こる前提条件と考えられるため, 北海道の外気温で達成できる凍結温度においては, 比較的長時間の凍結処理が必要であることが示唆された。

次に我々は, ユーグレナ細胞内のオイルが凍結融解後に細胞外に漏出し, 細胞内のオイル量が減少することを証明するために, ユーグレナ体内のオイル量を半定量的に評価する手法を確立した。その手法を用いた検証の結果, ユーグレナ運動が停止する程度の実験条件の範疇では, 凍結融解とオイルの漏出に統計学的有意性は認められなかったが, 今後さらに広い凍結融解のパラメータを検討する予定である。

凍結融解による細胞内オイル量変化の分析と並行して, 細胞外オイル漏出量の増加が期待できるユーグレナ変異株の作製にも着手した。不飽和脂肪酸合成の阻害によるユーグレナ細胞膜の脆弱化を目指し, デサチュラーゼ遺伝子のゲノム編集を試みた。ユーグレナゲノム配列がいまだ解明されていない状況の中, mRNA 配列を参考にデサチュラーゼ遺伝子 $\Delta 5$ のゲノム配列をクローン化, それをもとにゲノム編集に必要なガイド RNA を作製することに成功した。今後は, ユーグレナ細胞に対しゲノム編集を行い, 細胞膜構造などの形質変化を観察したいと考えている。

A. 研究の背景・目的

近年, 地球規模で化石燃料の枯渇や大気中への CO_2 排出量の増加が問題となっている。 CO_2 の排出を抑えることができる代替エネルギー源として, 生物を使ったエネルギー産生に注目が集まっている。光合成を行う生物では, CO_2 と光エネルギーを取り込んで細胞内でオイルやグルコースなどに変換するため, これを細胞外に取り出してエネルギー源として利用することができれば, CO_2 削減効果が高い代替燃料となり得る。例えば, ユーグレナ^{*1} やクロレラ^{*2} など細胞内に葉緑体を有するオイル産生微生物は, 体内に CO_2 を取り込んで光合成を行い, バスやジェット機の燃料として利用可能なオイルを産生する。特にユーグレナは, バイオベンチャー企業の eu-

glena Co., Ltd.が大量培養法の開発に成功しており^{*3}、実用化の期待が高まっている。

バイオ燃料として注目されているユーグレナ（学名：*Euglena gracilis*）は、エクスカヴァータ/ユーグレノゾア門/ユーグレナ藻綱/ユーグレナ目に属する真核生物で^{*4}、細胞増殖に適した温度帯は27～30℃である^{*5}。細胞内に葉緑体を持つため、CO₂と光からエネルギーを作り出すことができる独立栄養生物に分類される。作り出したエネルギーの一部を細胞内にオイルとして貯蓄する。バイオ燃料の産生に適した細胞増殖性とオイル産生性を考慮すると、CO₂以外の炭素源を栄養に含む混合栄養条件下で培養した方がより生産性が高まることが明らかとなっている^{*6}。

ユーグレナは、光合成を行う植物的な側面を持つ一方で、細胞壁を持たず自らの力で移動する動物的な側面を併せ持つ。ユーグレナは、楕円体（長軸：～50 μm、短軸：～20 μm）形状をしており、長軸の片端に持つ1本の鞭毛を使って、溶液中を自由に泳ぐ（移動する）。数十 μm/秒で移動することから、光学顕微鏡下で個体の運動を観察することが可能である。近年、鞭毛を回転させながら、ユーグレナ個体が螺旋運動していることが明らかとなった^{*7}。さらに興味深いことに、自身の細胞サイズよりも少し小さな管を通過する際には、鞭毛を使った移動モードからアメーバのように形を変えて移動するモードに移行することができる^{*8}。

遺伝学的な方法を用いて、オイルを多く作るユーグレナを作り出す研究もなされている。ユーグレナは1倍体で安定に存在できる^{*9}ため、順遺伝学的な方法でオイル産生能の向上したユーグレナを作り出す方法が提案されている^{*10}。ユーグレナゲノムは、高次の繰り返し配列を多く含むため、その全配列と構成遺伝子はいまだ決定されていないが、核ゲノムのサイズは4.4Gbp程度だと推定されている^{*11}。現在、ユーグレナの核ゲノムを決定するためのプロジェクトが進行しており^{*12}、近年、ユーグレナへのゲノム編集の成功も報告されているので^{*13}、今後は、逆遺伝学的な方法でもオイルの生産性を上げることができるようになるだろう。

CO₂排出量の削減と化石燃料の代替の両問題を解決できるオイル産生微生物の活用に期待が寄せられる一方で、このエネルギー生産手法には、2つの解決すべき課題が存在する。1つ目は、オイル産生微生物細胞からのオイル抽出過程で必要となるエネルギー消費量の問題である。通常、オイル産生微生物は液体培地中で増殖するため、培養液中の微生物を何らかの方法で集菌し物理的に細胞を破碎する過程が必要となり、そこで使用する機器類を作動させるために電気エネルギーを消費する。現在の日本の電力生産の大部分は化石燃料を用いた火力発電に依存しているため、従来の方法ではCO₂排出量の削減は限定的なものになってしまう。2つ目は、オイル抽出にかかるコストである。一例として我々の大まかな試算を示すと、ユーグレナの培養液10Lから得られるオイルの熱量は約2 MJであるのに対し、その抽出過程で使用する機器を作動させるために必要となる消費エネルギーは約44 MJにもなる（この試算は、抽出過程を「濃縮脱水」「乾燥」「破碎」の3つの工程に分けて考え、それぞれの工程に必要な消費エネルギーを求めて合算した結果である。「濃縮脱水」についてはhimac社製「Hettich ROTO SILENTA630RS」を用いて、10 Lの培養液を1 Lに濃縮する際の消費エネルギーを求めた（消費電力：7200 W、稼働時間：5

分)。「乾燥」については、含水藻類の80%が水分である^{*14}ことから、0.8Lの水の気化熱を消費エネルギーとした。「破碎」についてはセイシン企業製「Sk ジェット・オー・ミル」を用いた際の消費エネルギーを求めた(消費電力:11000 W, 稼働時間:1時間)。⁹⁾。このため、電気エネルギーを可能な限り使用せず、かつ安価なオイル抽出法を考案することが求められている。

現状では、有機溶媒抽出法や水熱処理法でのオイル抽出が試みられている^{*14}。いずれの方法でも、はじめに藻類の濃縮が必要となる。これらの工程では、まず遠心分離やろ過によって培養液からオイル産生微生物を濃縮集菌する。この濃縮処理のあと、有機溶媒抽出法では脱水・乾燥の工程により細胞から水分を取り除き、乾燥物をヘキサンなどの有機溶媒に溶解させる。この溶液から有機溶媒を減圧濃縮で除くとオイルが抽出できる。一方、水熱処理法では、濃縮の後に高圧磨砕により細胞を破碎し、破碎物を高温に加熱して揮発性成分の生成を行う。しかし、前者では多くの工程を必要とするため、後者では高温高圧の維持のために、多くの電気エネルギーを消費する。

抽出過程における電気エネルギー消費を抑制させるための対策として、マイクロ波抽出法^{*15}や生活排水を用いた培養^{*16}などが研究されている。マイクロ波抽出法^{*15}は、マイクロ波加熱によるオイル抽出を特徴とする。マイクロ波照射によって細胞膜を破壊する処理を行うことで、濃縮・脱水・乾燥・溶媒除去等の過程や、高温高圧液化の過程を省くことができる。そのため従来法よりも必要なエネルギー消費が少なく済むことが最大の利点である。ただ省エネルギー化が達成できている一方で、有機溶媒抽出法と比較するとオイル回収率が低いという課題が残っている。生活排水を用いた培養^{*16}は、下水処理工程が介在することを特徴とする。この方法では、水質浄化に効果を持つオイル産生藻類を用いることで微生物の培養過程と下水の浄化処理を並行して行う。培養過程において、オイル産生微生物の増殖に必要な有機物を下水汚泥から摂取させることで下水処理にかかる負担を軽減できるのが利点である。軽減される下水処理のエネルギー消費を総合的に評価することで、全工程における投入エネルギーを相殺しようというアプローチである。しかし、この方法においてもエネルギー収支は最適化に至っておらず、さらなる向上が必要な段階である。

以上のような現状の下で、我々は次に示す事実と先行研究から着想を得て、抽出に用いるエネルギー消費を低く抑え低コストを達成できる可能性をもつオイル抽出法を考案した。本抽出法は、1) 北海道の寒冷な気候と地熱資源を利用した細胞の凍結融解破碎法であること、2) 不飽和脂肪酸合成経路の阻害による凍結融解に適したユーグレナ変異株の細胞の作出を目指すことの2点を大きな特徴としている。

これまでの先行研究により、細胞膜を形成するリン脂質(直線構造の飽和脂肪酸と、くの字に折れ曲がった構造の不飽和脂肪酸)のうち、不飽和脂肪酸が膜の流動性を生み出していることが知られている^{*17}。例えば、低温で生活する動物では、低温における膜の流動性を確保するために、細胞膜中の不飽和脂肪酸の割合が多い^{*18}ことも報告されている。高野らの論文^{*19}によると、一

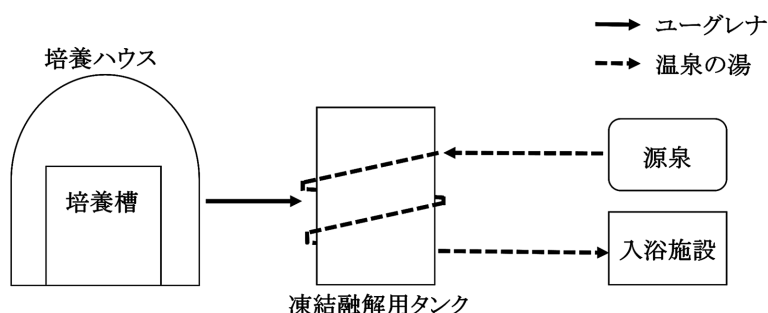


図2. 北海道の寒さと温泉熱を利用したオイル抽出事業の概念図

一般的な生物におけるそれぞれの生育温度域では、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が上手く混合した状態で細胞膜が形成されているが、0℃近傍の低温状態に移行すると、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の存在領域が分離しそれぞれが凝集した領域ができてしまう。その状況で生育温度域に戻すと、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が上手く混合した元の状態には戻らず、細胞膜の崩壊に引き続き生物個体の死滅が誘導されるモデルが提出されている。このモデルに合致する事実として、細胞に対して低温（凍結）処理と融解処理を交互に行うことで、細胞を破碎できる^{*20}ことが知られている。

低温から生育温度への急激な温度変化にともなう細胞膜の崩壊現象についての先行研究から、ユーグレナ細胞から安価にオイルを抽出する手法を考案した（図1）。ユーグレナのオイルの主成分はワックスエステルであり^{*21}、水より軽い比重をもつ。培養液中のユーグレナの細胞膜が崩壊し細胞が破碎されれば、細胞外にオイルが漏出し水面に浮かび上がることが期待できる。水面に浮かび上がったオイルを回収すれば、安価にオイルを手に入れることができる。コストの面で問題になるのは、如何にして凍結に必要な低温とその後の融解温度を低エネルギー消費で実現するかである。我々は、「北海道の寒さ」を「天然の冷凍設備」として利用する方法を考えた。北海道の冬場の気温は氷点下に達する。また、北海道には多くの温泉地が存在する。氷点下の外気と温泉熱を利用することで、低温から融解温度への急激な温度変化を実現できる。本アイデアを事業化する際の概念図を示す（図2）。

我々の研究の最終目標は、北海道の自然環境を利用して、ユーグレナなどのオイル産生藻類から安価にオイルを抽出できる事業を打ち立てることにある。本年度はそのための第一歩として、ユーグレナをオイル産生微生物のモデル系として、事業の妥当性を判断するために以下の初期実験を計画し、予備的な結果を得たので報告する。

- ①ユーグレナの凍結処理に対する細胞反応と温度変化パラメータの探索
- ②ユーグレナ細胞内のオイル量を半定量的にモニターする方法の確立
- ③凍結融解処理によるオイル抽出に適したユーグレナ変異株作製の試み

本研究の最大の特徴は、北海道の自然環境によって実現できる単純な温度変化によって細胞破碎が起こるユーグレナ変異株の作製を目指し、もって既存のオイル抽出法に存在する問題を解決しようとする点にある。本研究をベースに「環境にやさしいエネルギー産生事業」を発展させることができれば、北海道での雇用創出や地方再生に資することができるだろう。

B. 材料と方法

B0. 菌株、培地と培養条件、細胞数測定

本研究の目的は、氷点下の低温から温泉水で保持できる温度までの温度変化によって、オイル産生藻類の細胞内に存在するオイルを細胞外に漏出させる方法を構築することである。研究を始めるにあたって、国立環境研究所微生物系統保存施設からユーグレナ (*Euglena gracilis*)、ボトリオコッカス (*Botryococcus braunii*)、クロレラ (*Chlorella vulgaris*) の3種を分与していただいた。予備的な培養実験を行い、比較的増殖速度が速く培養が容易なユーグレナを対象として研究を進めることとした。

ユーグレナの培養培地には Koren Hutner 培地 (以下 KH 培地と表記)^{*22} を使用し、コニカルチューブ内で培養した。このコニカルチューブを 26℃ に保温した水槽に浮かべて静置培養し、1 週間に 1 度のペースで継代を行った。継代操作はクリーンベンチ内で行い、ユーグレナの飼育液 1 ml に対し新たな KH 培地を 29 ml の割合で混合した。

ユーグレナ細胞内の蓄積オイル量を増加させるための培養方法については、嵐田亮らの研究^{*23} を参考にした。CO₂ ガスを充満させたフラスコ内で光を照射した好気的な条件下でユーグレナを増殖させた後、窒素欠乏培地 (改変 Cramer-Myers 培地^{*23}, 以下 N 欠乏培地) でパラミロンと呼ばれるオイル前駆体を大量蓄積させ、その後嫌気状態にすることでオイルを多量に細胞内に作り出させる培養方法である。このオイル産生培養環境の構築には、ユーグレナ培養液に CO₂ ガス供給、大気供給 (酸素供給)、光照射、温度制御、攪拌、を同時に実現する必要がある、そのための簡易培養装置を自作した (図 3)。

培養液中のユーグレナの個体数の計測には、血液中の細胞数の計測などに用いられる粒子計数分析装置 (CDA-1000, Sysmex 社製) を使用した。この装置によるユーグレナの細胞数計測が可能かどうかを検討するために、ユーグレナ飼育液の希釈シリーズを作製し、希釈率と細胞数との関係をグラフ化した (図 4)。希釈率と細胞数の間には、比例関係がみられた (相関係数 = 0.9578)。同時にユーグレナの飼育原液内の細胞数を血球計測板による目視でカウントしたところ、この装置により計量された細胞数とほぼ一致した。以上のことから、粒子計数分析装置によるユーグレナ細胞数計測に定量性があることが確かめられた。以降の実験では、この装置により細胞数計量を行った。

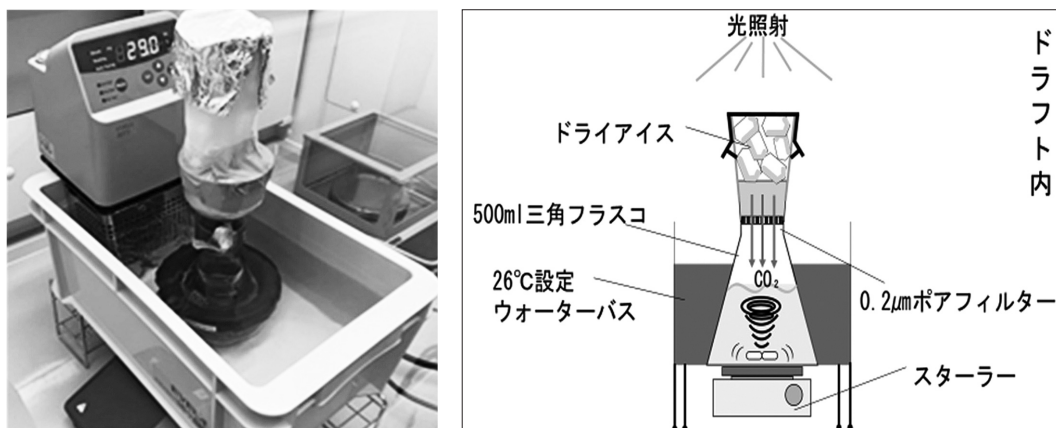


図 3. (左) 自作による CO₂ 供給可能な簡易培養装置, (右) その培養装置の模式図

ドライアイスの昇華によって生じた CO₂ は、0.2 μm のろ過滅菌フィルターを通過してフラスコ内の培養液に到達する。この装置はドラフトチャンバー内に設置しているため、ドラフトチャンバーの照明を ON にすることで、培養液に光を照射することができる。ウォーターバスの設定温度を変えることで、温度制御も可能である。スターラーで培養液の攪拌も可能である。この装置では、人力でドライアイスを充填する操作を行った。

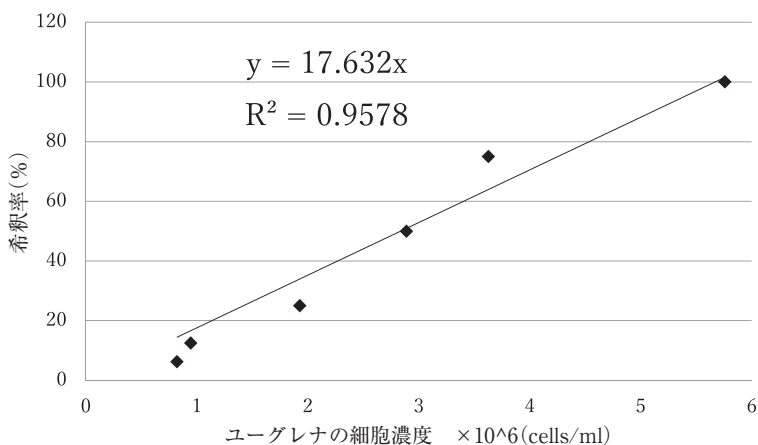


図 4. 希釈率と細胞濃度の関係

B1. ユーグレナの凍結処理に対する細胞反応と温度変化パラメータの探索

凍結処理のパラメータには、「凍結温度」と「凍結時間」の 2 つを設定した。事業化の際に北海道の寒さを利用することを想定しているため、液体窒素条件下やディープフリーザー条件下での過剰な冷却温度帯は使用せず、凍結温度には -15℃ と -30℃ の 2 条件を設定した。融解開始までの凍結時間については、0、10、30、60、120 分の 5 条件を設定した。

培養液中のユーグレナの細胞濃度を測り、細胞濃度が 1.5×10^6 cells/ml になるように希釈し、マイクロチューブに 500 μl ずつ分注した。そのチューブを各温度条件下で凍結させた後、26℃で

融解させた。ユーグレナ運動の有無については、融解後の培養液中のユーグレナ細胞を正立顕微鏡で観察し確認した。10倍の対物レンズ下で、1視野に存在するユーグレナの全個体数と1秒間定点観察した際に移動・収縮運動をした個体数を数え、ユーグレナ運動の発生率を算出した。特定の観測者による個体数計測の偏りを緩和するために、同視野での個体数計測を2人が行い、その個体数の平均値を1データとして採用した。この操作をプレパラート上の異なる3ヵ所で行い、各条件下での平均値と標準誤差を算出した。各条件下での発生率に有意な差があるかどうかの検定には Student's *t*-test を用いた。

B2. ユーグレナ細胞内のオイル量を半定量的にモニターする方法の確立

ユーグレナ細胞内のオイル量を半定量的に計量する方法として、ナイルレッド (N0659, 東京化成工業) によるオイル染色法を採用した。ナイルレッドは細胞内の脂質成分などを蛍光標識するのに広く用いられているが^{*24}, 親水性または疎水性溶媒への溶解, ナイルレッドの濃度などに依存して, 励起-蛍光特性が変化する^{*25}。例えば, 水溶液中で 470 nm での励起の場合は 500 nm から 700 nm 程にわたる広い蛍光スペクトルがみられ, 580 nm での励起の場合は 600 nm 以降に蛍光スペクトルがみられる。このようなナイルレッドの蛍光特性を考慮し, 蛍光顕微鏡 (Leica DMi8) のテキサスレッドフィルターキューブを用いて, 細胞内のオイル成分と結合したナイルレッドを観察・定量した。ナイルレッドを 0.5 mg/ml となるようにアセトンに溶解させ, このストック溶液を最終濃度 45 µg/ml で各実験に使用した。最初にナイルレッドがオイル成分を染色するかどうかを確認するため, 食用サラダ油と純水の混合液をプレパラートにし, 蛍光顕微鏡で観察した。ガラス面上に固着した油滴成分が赤色蛍光し, 油滴成分の周囲はほとんど発色していないことが確認できたので, ユーグレナ細胞を用いた実験系においても, ナイルレッドによりオイル成分の有無を評価できると考えられる。

ユーグレナ細胞の染色に際しては, 培養液をマイクロチューブに分注し, 等量のジメチルスルホキシドを加えて, 室温で 20 分放置した。その後 0.5 mg/ml ナイルレッド溶液を 1/5 量加え, 暗所で 20 分間染色した。ナイルレッド染色細胞の観察に先立ち, ナイルレッドを添加していない溶媒のみを加えたネガティブコントロールサンプルを用いてバックグラウンド設定を行い, 細胞内の自家蛍光が検出されないようにして撮影した。各細胞でのナイルレッド染色の蛍光強度は, 画像解析ソフト「ImageJ」^{*26} を用いて 1 細胞あたりの平均輝度を算出することにより定量した。オイル産生培養条件下の群と通常の培養条件下の群間で細胞の染色の平均輝度に有意差があるかどうかを検定するために, Student's *t*-test を用いた。

B3. 凍結融解処理によるオイル抽出に適したユーグレナ変異株作製の試み

ユーグレナの不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼの発現を抑制するため, この遺伝子をゲノム編集により破壊するための予備的実験を行った。ユーグレナのデサチュラーゼ遺伝子の配列情

報を取得するためゲノム情報をデータベース^{*27}から検索したが、ユーグレナのゲノム情報は未決定であった。ユーグレナの mRNA 配列情報については、部分的に明らかとなっていたので、報告されている mRNA 配列のうちで、不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼに関連する配列を検索により 10 個ピックアップした (GU812432, AF139720, DM195149, DM195212, DM195205, DM195157, DM195156, DM195155, HW062627, AY278558)。それらの部分配列をもとに、PCR で増幅されるようなプライマー (カスタムオリゴ DNA) のセットを設計し、ユーグレナゲノムをテンプレートとした PCR を行った。ユーグレナのゲノム DNA の抽出には、KAPA Express Extract Kits (KK7101, 日本ジェネティクス) を使用した。PCR による DNA 増幅には、KOD-Plus-Neo (KOD-401, TOYOBO) を用いた。10 個の候補のうち唯一得られた PCR プロダクトを DNA シークエンス解析し得られた配列をもとに、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行うためのガイド RNA を設計した。ガイド RNA 合成のために使用したプラスミド DNA は、DR274 である^{*28}。DR274 を制限酵素 DraI (R0129S, NEB) によって直線化し、T7 RNA ポリメラーゼを作用させることで、ガイド RNA を合成した。合成には ScriptMAX[®] Thermo T7 Transcription Kit (TSK-101, TOYOBO) を用いた。

今回、ユーグレナゲノムをテンプレートとした PCR で、唯一 PCR プロダクトが得られた遺伝子は、ユーグレナの不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼ遺伝子の 1 つで、 $\Delta 5$ デサチュラーゼとよばれている遺伝子 (HW062627) であった。この増幅に使用したプライマーセットは以下の配列である。

Forward : gaacgccttgatttggttgc

Reverse : tacaccagcgatacccccgtta

この $\Delta 5$ デサチュラーゼについて得られた PCR プロダクトの濃度は $0.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ だったため、シークエンス解析には適量とされる $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に希釈したものを使用した。PCR は 96°C で 1 分間処理したのち、 96°C 10 秒、 50°C 5 秒、 60°C 30 秒処理のステップを合計 25 サイクル行った。得られた PCR プロダクトを精製し、 $4 \mu\text{l}$ (20 ng 相当量) をシークエンス解析に用いた。得られた PCR プロダクトの濃度計測には NANODROP 2000c (Thermo Fisher Scientific)、シークエンス解析には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

C. 結果と考察

C1. ユーグレナの凍結処理に対する細胞反応と温度変化パラメータの探索

ユーグレナ細胞を凍結融解処理することで、細胞内部のオイル成分を細胞外に漏出させるための破碎条件を探索することを目的とした予備的実験を行った。破碎に先立つ細胞膜の崩壊を定量的に計測することは現時点では困難であるため、まず細胞死の前提条件であるユーグレナ運動の停止を計測した。凍結条件をモニターするためのパラメータには、「凍結温度」と「凍結時間」の 2 つを設定した。事業化の際に北海道の寒さを利用することを想定しているため、液体窒素条件

表1. 凍結融解によるユーグレナの生存個体数計測結果

凍結時間 (分)	凍結温度 (℃)	生存個体数	全体個体数
Control (0)	-15	12.7	51
	-30	11	48.3
10	-15	23.2	60.7
	-30	17.7	69.2
30	-15	13.7	66.5
	-30	8.2	56.8
60	-15	5.2	65.3
	-30	5	62.3
120	-15	3.7	61.7
	-30	3.2	83.2

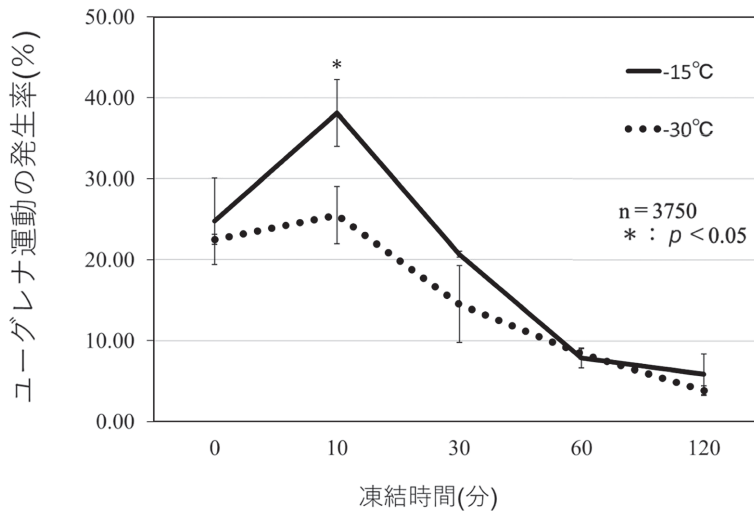


図5. 凍結によるユーグレナ運動の発生率の変化

凍結温度-15℃, -30℃それぞれについて, 凍結時間0, 10, 30, 60, 120分の5条件で凍結処理をし, 得られた計10個の試料を顕微鏡の10倍の対物レンズ下で観察した。観察時には, 1視野に存在するユーグレナの全体個体数ならびにユーグレナ運動している個体数を数えた。同視野での個体数計測を2人が行い, その個体数の平均値を1データとして採用した。このような作業をプレパラート上の異なる3か所で行い, 各条件下での平均値と標準誤差を算出した。この時に得られた平均値を用いてユーグレナ運動の発生率(運動している個体数/全体個体数×100)を算出した。各条件下で発生率を算出するために用いたサンプル数は300個体~500個体である。*は, 凍結時間10分の時点の-15℃の発生率と-30℃の発生率の比較によって得られた両側検定に対するt検定の結果。エラーバーは標準誤差を示す。

下やディープフリーザー条件下での過剰な冷却温度帯は使用せず, 凍結温度には-15もしくは-30℃の2条件を設定した。それぞれの温度条件について凍結時間0, 10, 30, 60, 120分の5条件で凍結処理を行い, 26℃で自然融解(5分)させ得られた計10個の融解試料を顕微鏡で観察し, 凍結融解によるユーグレナ運動の発生率を計測した(表1, 図5)。

凍結時間 10 分におけるユーグレナ運動の発生率は、 -15°C で約 37%、 -30°C で約 25% であり、温度により 10% 以上の差があることが確認できた。これより長く凍結した凍結時間 30 分では、 -15°C で約 20%、 -30°C で約 15% であり、発生率に 5 % 程度の差が確認できるが、その差は凍結時間 10 分の時よりも小さくなっていることがわかる。さらに長く凍結した凍結時間 60 分、120 分では、 -15°C と -30°C の間で発生率にほとんど差はみられなかった。以上のことから、ユーグレナ運動の発生率の低下は、凍結温度の違いよりも凍結時間の違いに依存して、凍結時間を長くすることで温度による効果の違いをなくすことができるとわかった。一方、凍結時間 10 分において、凍結温度 -15°C と -30°C での発生率間に有意差があるかを Student's *t*-test により検定した。凍結時間 10 分時点では、凍結温度 -15°C と -30°C でユーグレナ運動の発生率の違いに有意差があることが明らかとなった ($p=0.048$)。凍結を行わなかった比較群よりも凍結時間 10 分のサンプルの方がユーグレナ運動の発生率が高くなるという発見は、短時間凍結処理が、ユーグレナの細胞運動の活性化に影響している可能性を示唆しており、極めて興味深い知見である。

C2. ユーグレナ細胞内のオイル量を半定量的にモニターする方法の確立

現在の凍結融解実験は、実験室内のスモールスケールで行っているため、細胞外に漏出したオイルにより培養液面に油膜が形成される結果を期待する段階にない。そこで、予備的に凍結融解によりユーグレナ細胞内に存在していたオイル量の減少が確認できるかどうかを検討するため、ナイルレッドにより染色済みの細胞を蛍光顕微鏡で観察した（図 6）。蛍光画像で特に濃く染色されている部分は、オイル成分が多く存在することを示している。透過像では、蛍光染色された部分と同じ形に油脂と思われる粒状構造が確認できた。したがって、ユーグレナ細胞内のオイル成分をナイルレッド染色法により選択的に蛍光標識できていると考えられる。

次に、ユーグレナ細胞内のオイル蓄積量を増加させると、それにともないナイルレッド染色による蛍光量も増加するのかどうかを確認する実験を行った。自作した培養装置を用いてオイルを

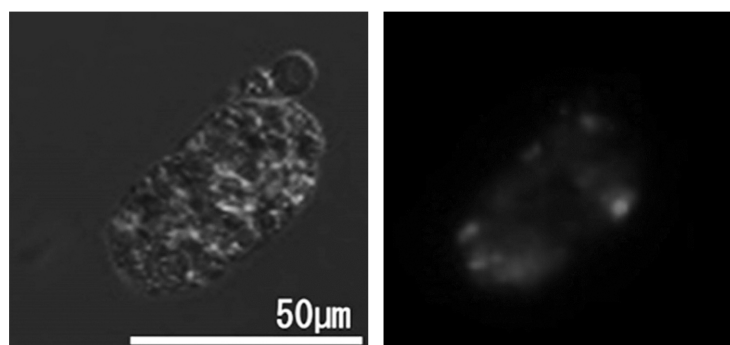


図 6. オイル部分が染色されている様子
左：透過像，右：蛍光画像

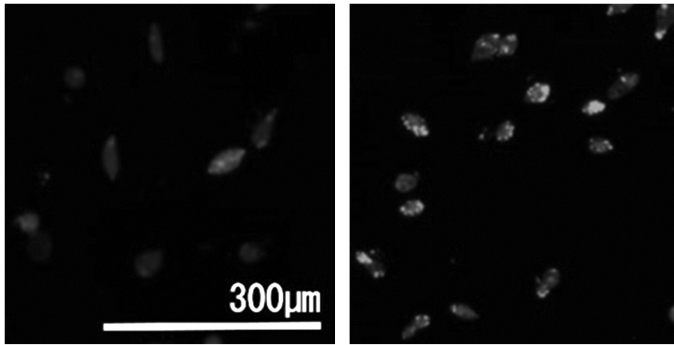


図7. オイル染色の蛍光画像
左：オイル誘導なし (KH 培地)，右：オイル誘導あり (N 欠乏培地)

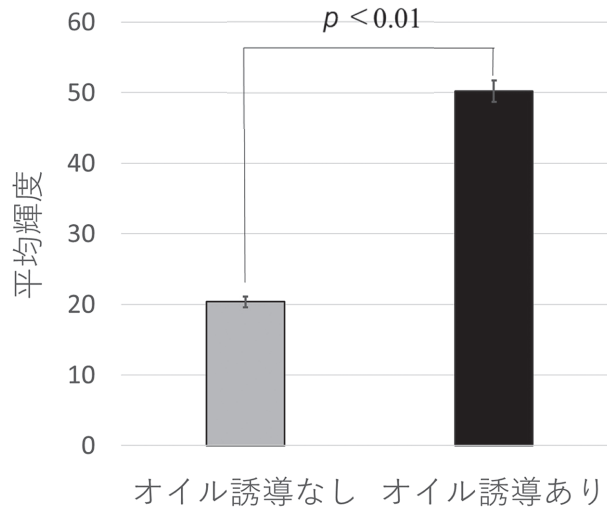


図8. オイル量のちがいによる輝度比較

大量に産生させた細胞 (N 欠乏培地で培養，以下オイル誘導ありと表記) と通常の培養条件下の細胞 (KH 培地で培養，以下オイル誘導なしと表記) それぞれをナイルレッド染色し，蛍光顕微鏡で撮影，蛍光量を比較したところ (図7)，期待通りオイル誘導ありの細胞の方に強い蛍光発色が認められた。さらに蛍光量の増加を数値的に定量するため，ランダムに撮影した50枚の写真について画像解析を行い，蛍光強度の平均輝度を求めた (図8)。Student's *t*-test により $p < 0.01$ という検定結果が得られたことから，両者に統計的に有意差があることが確認できた。したがって本染色法を用いた画像解析により，ユーグレナ細胞内のオイル量の増減を半定量的に解析できることがわかった。

そこで次に，ユーグレナを凍結融解させて，漏出により細胞内のオイル量が減少するかを確認する実験を行った。細胞運動の低下が最も顕著であった凍結温度 -30°C ，凍結時間120分で処理

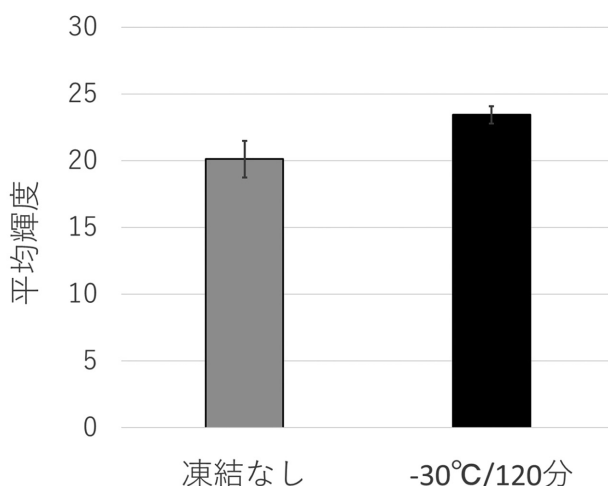


図9. 凍結融解におけるオイル量の変化
各60個体の蛍光輝度を計測し、平均値と標準誤差を算出した。

したサンプルと凍結処理を施していないサンプルとを比較し、有意にナイルレッド染色の蛍光輝度が減少するかを検討した（図9）。その結果、凍結なしのサンプルにおける平均輝度は20.1なのに対し、凍結融解ありのサンプルにおける平均輝度は23.4という結果が得られた。この結果は、この条件で凍結融解を行ってもオイル染色量が有意に減少していないことを示している。凍結融解によって細胞内のオイルが漏出することを期待した実験だったが、今回のパラメータの範囲では凍結融解処理はオイル漏出に対して効果がなかった。したがって現段階では、野生株ユーグレナを用いる場合、凍結融解に加えて遠心分離等の処理が必要になると考えられる。さらなる凍結融解処理条件の検討が必要であろう。

C3. 凍結融解処理によるオイル抽出に適したユーグレナ変異株作製の試み

今回検討した凍結融解処理の実験条件では、有意にオイルを細胞外へと漏出させることはできなかった。しかし野生株よりも細胞膜が壊れやすい特徴をもつユーグレナ変異株を作製すれば、同様の凍結融解条件でもオイル漏出が起こる細胞が得られるかもしれない。細胞膜は主に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸で構成されており、このうち不飽和脂肪酸が膜の柔軟性を担っていることが知られている。そのため細胞膜における不飽和脂肪酸の割合を減少させることができれば、細胞膜の柔軟性を失わせ凍結融解に対し脆弱な細胞を作出することができるかもしれない。

ユーグレナの各細胞内小器官における構成脂質成分を調べた研究^{*29}によると、細胞膜に多く含まれる脂質成分は、重量パーセントの大きいものから炭素数18不飽和1のオレイン酸、炭素数20不飽和4のアラキドン酸、炭素数16飽和のパルミチン酸である。したがって、構成割合の高い不飽和脂肪酸（オレイン酸やアラキドン酸）の合成に関係する酵素を阻害すると、細胞膜の不

飽和脂肪酸の割合が減少すると予想される。

脂肪酸の炭化水素鎖から水素を2つ除去する(二重結合が形成される)ことで、不飽和度合いを増やす酵素群のことをデサチュラーゼと呼ぶ。デサチュラーゼは脂肪酸のどの位置の炭素間に二重結合を形成する活性を持つかによって分類されており、例えばオレイン酸とアラキドン酸はそれぞれ $\Delta 9$ デサチュラーゼと $\Delta 5$ デサチュラーゼによって作られる^{*30}。

デサチュラーゼ遺伝子を欠損させた場合、生物個体に何が起こるかを調べた研究がいくつか報告されている。 $\Delta 5$ 、 $\Delta 9$ デサチュラーゼを欠損したマウスは個体に成長するが、野生型と比べて体脂肪率が低く、インシュリンへの感受性が高くなることが報告されており^{*31}、^{*32}、このことからデサチュラーゼは肥満効果を制御する遺伝子として注目されている。 $\Delta 9$ デサチュラーゼを欠損した出芽酵母は、パルミトレイン酸もしくはオレイン酸を含まない培地では生育できないことが知られているので^{*33}、ユーグレナのデサチュラーゼ遺伝子の欠損に成功した場合にも、培養液中に含まれる不飽和脂肪酸の割合が細胞増殖能と細胞膜の脆弱性の両面に影響を与える可能性が高く、様々な培地条件を検討することによって増殖可能かつオイル漏出能の高い培養条件を検討する必要がある。

本研究ではデサチュラーゼ遺伝子をターゲットとするゲノム編集^{*34}を行うことを目指した。しかしながら研究者人口の多いマウスや酵母などとは異なり、モデル生物ではないユーグレナのゲノム配列はいまだ決定されておらず、ゲノム編集に先立って、まずデサチュラーゼ遺伝子のゲノム配列をクローン化する必要があった。

ターゲットとするデサチュラーゼ遺伝子のゲノム配列を決定するために、データベース検索により得た関連遺伝子の配列をプライマーにしてユーグレナゲノムに対しPCRを行った。得られたPCRプロダクトのDNA配列を解析した結果(図10)、データベース上に登録されている不飽和脂肪酸合成酵素 $\Delta 5$ デサチュラーゼのmRNA配列の一部と一致していることがわかった(図10中の実線部)。シーケンス解析で得られた配列のうち、実線部が配列既知のmRNAとなるエキソン部分で、それに続く点線部が今回新たに決定できたイントロン部分であると推定される。これはユーグレナにおいて、世界で初めて細胞膜制御関連遺伝子のゲノム配列をクローン化した例である。

続いて、得られたデサチュラーゼ遺伝子をガイドRNA作製のためのプラスミド(DR274)にクローン化した後に制限酵素処理によって直線化し、T7RNAポリメラーゼを作用させることでゲノム編集に必要なガイドRNAを合成することにも成功した。本論集に寄稿した段階では、ここまでの実験にたどり着いたところであるが、今後は合成したガイドRNAと別途用意したCas9タンパク質をユーグレナに導入し、不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼ遺伝子の欠損株の樹立を進めていく。

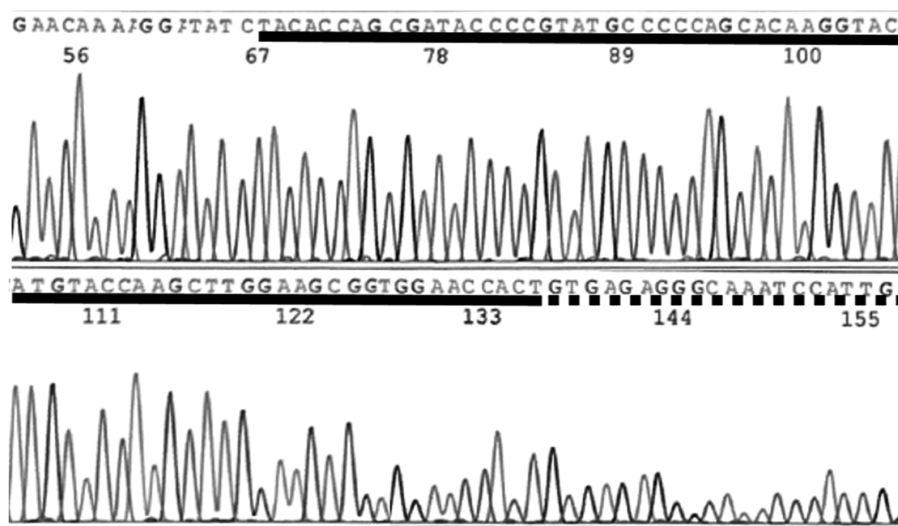


図 10. DNA シーケンス解析の結果

実線部がデータベース上に登録されている不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼに関する mRNA の配列の一部と一致している部分。このことより、実線部が配列既知の mRNA となるエキソン部分で、それに続く点線部が新たに決定できたイントロン部分であると推測される。

D. 研究の経緯と今後の課題

本研究は、北海学園大学工学部生命工学科の学部生（古澤、矢田部、福士の 3 名）が主体となって進めてきたものである。教員が主導して実験に取り組む形ではなく、“研究をやりたい学生”が集まって始動したプロジェクトである。当初目標としたのは、全国や道内の学生が参加する研究集会での発表であった。学部 2 年生の前期から開始し、学部 3 年後期までの研究期間（本稿執筆段階）であったが、学部生 3 名は、研究テーマの立案、実験の遂行、実験結果の取りまとめを体験することができた。さらに得られた実験結果は、札幌商工会議所が主催する『道内大学生による「ものづくり製品化&起業化支援事業」』で発表することができた。この期間中、本稿の共著者の小山、高橋、水谷の 3 教員は、研究テーマの立案から成果発表までの全ての過程に対し、適宜、技術指導や専門知識の教育を含めたアドバイスを与える形でサポートしてきた。技術補佐員の曾我部は、ユーグレナの飼育スペースの確保、培地の調整についてのアドバイス、DNA シーケンス解析などの技術補佐に関与した。

本研究テーマは、教員が既に取り組んでいる研究の延長線上に位置付けられるものではなく、新規に立ち上げたプロジェクトであったため、学生と教職員双方に今後検討すべき多くの課題・反省点とともに予想外のメリットももたらした。おそらく一番のメリットとしては、学生と教員が同じ目線で自由度の高い研究テーマを設定できたことである。それぞれの教員は各自の専門に基づく研究テーマを遂行しているが、それらの枠に影響されることなく、初心に帰って分野横断

的に研究テーマを自由に議論することができた。

しかし、現実的に実施が困難なテーマ（費用が膨大にかかる、マンパワーが必要、長い研究期間が必要、新たに高価な実験機材が必要、危険性が高い実験等）を除外し、北海道の特色を活かした研究という学生の提案に基づく目標を加えると、テーマの提案が飛躍的に難しくなった。普段はこのようなスタンスでテーマを考える機会がないので、教員にとっては貴重な経験となった一方で、知識がほぼゼロベースからの研究テーマとなったため、メンバーの誰もが扱ったことがない生物種の飼育をるところから取り組まなければならなかった。取り扱う実験生物についての知識を文献やインターネットから調べ、試行錯誤するところから出発したことに加え、研究期間や実施時間帯に制限があったことにも苦勞した。我々が所属する生命工学科では、学部4年の冒頭から卒業研究を開始する。この時までには、現在取り組んでいる研究を終えておくことを事前に取り決めていたので、研究の開始時からすでに残り時間を意識した活動となっていた。それに加えて、学生は講義やアルバイト等に一定の時間を費やす必要があるため、研究活動にはかなりの時間的制限がかかっていた。このような状況で試行錯誤を繰り返しつつ現在に至るため、やり残した取り組むべき実験がいまだ多く残っている。

学生3名のグループで実験を進めたことにより発生した課題は、実験の引継ぎと得られた実験データにまつわる情報共有の問題だった。3名が協力して1つの研究テーマに取り組むスタイルがゆえに、メンバー間で十分な情報共有ができずに他のメンバーに仕事を引き継いでしまう場面が幾度かみられた。例えば、多段にわたるDNAクローニングの実験をアルバイト等の理由によって途中で中断し、他のメンバーに引き継ぐ必要が出た場面である。メンバー同士が現場でサンプル等を確認しながら引き継ぐ場合は問題が起こらない。しかし、「プロトコル内のXXまでの作業をやった。冷蔵庫にサンプルがある。」などの内容をSNSかメールで伝える程度の引継ぎしかできなかった場合には、サンプルの取り間違いが発生するリスクが上昇する。1つのチューブラック内に最終産物のチューブと中間生成物のチューブが区別されずに保管されている場合は最も危ない。それらのサンプルを作製した担当者は両者の違いを区別できるが、引継ぎを受けた人は区別が困難である。実験ノートに取り組んだ実験内容を記載するだけでなく、チューブラック等の引き継ぐサンプルをスマートフォンで写真撮影し、簡単なメモ書きと共にSNS等で情報共有することを徹底させれば、引継ぎに関するトラブルを回避できるだろう。同様のことが顕微鏡で撮影した画像データの管理にも当てはまる。PCが接続された顕微鏡で画像を撮影し、場合によってはファイル名にサンプル情報を含めてから電子データとして保存する。個人で管理している研究なら、ファイル名を確認しなくても、画像を見ればサンプル情報をリマインドすることは可能なことが多いが、グループでの研究の場合はそうはいかない。他のメンバーが撮影した画像データと実験条件等の情報を正確に結びつけるには、画像データのファイル名を実験ノートに記載し、それを共有するためのマニュアルを作ることが必要であろう。本プロジェクトのような限られた時間を利用して1つの研究テーマに複数人が関わるような実験を指導する際には、サン

プルや画像データの引き継ぎに関するマニュアルやプラットフォームを事前に準備し、作業に関わる学生に徹底しておく必要があるだろう。

本研究では、凍結融解処理を行うことによって、ユーグレナ体内からオイルが漏出されることを最終的な目標とした。しかし現状では凍結融解によるオイル漏出を確認できていない。これは実験を行う際のパラメータ設定が適切ではなかったためであると考えられる。したがって実験室レベルでの今後の条件検討、効率改善のポイントとして、以下の2つが挙げられる。

① 融解温度および処理回数についての検討

オイルには粘性があるので、ユーグレナに対して凍結処理をして細胞膜にダメージを与えても、細胞内からのオイルの漏出が起こりにくいかもしれない。オイルの粘度は温度を上昇させることで低くなる。よって、融解過程で細胞を高温状態に維持することで、オイルの粘度を低下させ漏出を促進できるかもしれない。本研究は、北海道の寒冷な気候と豊富な温泉熱資源を利用して安価に凍結融解処理を行うことを事業コンセプトとしている。そのため予備実験で設定する融解温度は、温泉の一般的な源泉温度である 80℃ を上限とすることが適当であると思われる^{*35}。今後は 80℃ を上限としてさまざまな温度での融解を試みたいと考えている。また、融解処理を行う時間長に関しても再考する余地があるだろう。さらに凍結融解処理を行う回数自体を増やすことで細胞破碎の効率をあげることができるとも考えられる。凍結温度について新たなパラメータを検討することも考えられる。しかし、最終的に北海道の寒冷な気候を利用して凍結処理を行うことを考慮すると、-30℃ 以下で凍結温度を設定することは現実的ではないだろう。

② デサチュラーゼ遺伝子欠損株の作出とその細胞膜特性の解析

本論集に寄稿した時点では、ゲノム編集による不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼ遺伝子破壊のためのガイド RNA を合成することに成功した段階である。今後は、ガイド RNA と Cas9 タンパク質とを反応させガイド RNA-Cas9 複合体の構築を試みる予定である。さらに、試験管内でこのガイド RNA-Cas9 複合体と不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼ遺伝子とを反応させることで、実際に不飽和脂肪酸合成酵素デサチュラーゼ遺伝子が破壊されることを確認する実験が求められる。その後、ガイド RNA-Cas9 複合体をエレクトロポレーション法^{*12}等を用いて、ユーグレナ体内に導入し、細胞膜構造の脆弱性などの形質変化を観察することも予定している。

我々の最終的な目的である「北海道の自然環境を活用してユーグレナなどのオイル産生藻類から安価にオイルを抽出する事業」の展開を図るために、実際に事業化が可能となりそうな北海道内の温泉候補地についても調査した（表2）。候補地は、ユーグレナ培養に不可欠な日照時間の長さ、凍結処理に必要な最低気温を基準に選定を行った。日照時間については、現在バイオベンチャー企業 euglena Co., Ltd. がユーグレナ培養を行っている石垣島のものを参考とした。石

表2. 事業化に向けた温泉候補地

候補地	最低気温(℃)	日照時間/年(h)
温根湯温泉	-21.0	1840.2
知床温泉	-24.4	1774.5
阿寒湖温泉	-26.8	1704.7
cf. 東京	-4.0	2112.2
cf. 石垣島	10.4	1991.7

垣島の日照時間は2000時間弱であり、北海道では温根湯温泉や知床温泉が比較的近い日照時間となっている。また最低気温については、本実験に用いた凍結温度である-15℃と-30℃を目安にし、それらと類似する気温となる温泉地を選定した。このように、我々の事業コンセプトの展開に適した候補地も見つかっていることから、実験室レベルでの基礎実験をクリアすれば、具体的な事業化を進めることができる可能性は大いにあるものと期待している。

E. 謝 辞

本研究の推進に際して、生命工学科の各位には多岐にわたってサポートを頂き、学科の共通予備費からの実験費用の支出を承認していただいた。この場をお借りして感謝申し上げます。

F. 参 考 文 献

- (1) Inui, H., Ishikawa, T., Tamoi, M.
『Wax Ester Fermentation and Its Application for Biofuel Production.』
Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology, pp. 269-283 (2017).
- (2) Lin, J., Chen, F.
『Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects.』
Microalgae Biotechnology, pp. 1-35 (2016).
- (3) Suzuki, K.
『Large-Scale Cultivation of Euglena.』
Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology, pp. 285-293 (2017).
- (4) Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burger, G., Roger, A. J., Gray, M. W., Philippe, H., Lang, B. F.
『Toward resolving the eukaryotic tree: the phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. Rodríguez.』
Curr Biol, Volume17, Issue16, pp. 1420-1425 (2007).
- (5) Kitaya, Y., Azuma, H., Kiyota, M.
『Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, Euglena gracilis.』
Adv Space Res. Volume35, Issue9, pp. 1584-1588 (2005).
- (6) Yamane, Y., Utsunomiya, T., Watanabe, M., Sasaki, K.
『Biomass production in mixotrophic culture of Euglena gracilis under acidic condition and its growth energetics.』
Biotechnology Letters, Volume23, pp. 1223-1228 (2001).

- (7) Rossi, M., Cicconofri, G., Beran, A., Noselli, G., DeSimone, A.
『Kinematics of flagellar swimming in *Euglena gracilis*: Helical trajectories and flagellar shapes.』
PNAS, 114(50) pp. 13085–13090 (2017).
- (8) Noselli, G., Beran, A., Arroyo, M., DeSimone, A.
『Swimming *Euglena* respond to confinement with a behavioral change enabling effective crawling.』
Nat Phys, 15(5) pp. 496–502 (2019).
- (9) Coll, J. M.
『Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae.』
Spanish Journal of Agricultural Research, 4(4), pp. 316–330 (2006).
- (10) Yamada, K., Suzuki, H., Takeuchi, T., Kazama, Y., Mitra, S., Abe, T., Goda, K., Suzuki, K., Iwata, O.
『Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting.』
Sci Rep, 6, 26327 (2016).
- (11) Ebenezer, T. E., Carrington, M., Lebert, M., Kelly, S., Field, M. C.
『*Euglena gracilis* Genome and Transcriptome: Organelles, Nuclear Genome Assembly Strategies and Initial Features.』
Adv Exp Med Biol, 979, pp. 125–140 (2017).
- (12) Thankgod E, Michael L, Anna M. G. Novák Vanclová
『*Euglena* Genome Project.』
ResearchGate, <https://www.researchgate.net/project/Euglena-Genome-Project> (2017–).
- (13) Nomura, T., Inoue, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Mochida, K., Yamada, K., Iwata, O., Suzuki, K.
『Highly efficient transgene-free targeted mutagenesis and single-stranded oligodeoxynucleotide-mediated precise knock-in in the industrial microalga *Euglena gracilis* using Cas9 ribonucleoproteins.』
Plant Biotechnology Journal, Volume17, Issue11, pp. 2021–2222 (2019).
- (14) 西尾幸郎
『培養藻類の各種抽出技術』
微細藻類の大量生産・事業化に向けた培養技術, 第2章, 第9節, pp.128–137 (2013).
- (15) 木谷径治, 石塚章斤
『マイクロ波を用いた藻類からの油分抽出技術の開発』
藻類由来バイオ燃料と有用物質, pp.96–103 (2016).
- (16) 金裕史
『生活排水を用いた藻類バイオマス培養への取り組み』
藻類由来バイオ燃料と有用物質, pp.88–95 (2016).
- (17) Bruce, A., Dennis, B., Karen, H., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., Peter, W.
『Essential 細胞生物学 (原書第4版)』
南江堂, p.365 (2018).
- (18) 永田和宏
『生命の内と外』
新潮選書, p.53 (2017).
- (19) 高野光男
『非凍結状態または部分凍結状態による細胞の低温保存』
日本食品低温保存学会誌, Volume13, No2, pp.16–20 (1987).
- (20) 日経バイオテク / 日経バイオビジネス編集部

- 『凍結融解法』
日経バイオ最新用語辞典第5版, p.567 (2002).
- (21) 岩田修
『ユーグレナオイルの利用について』
藻類由来バイオ燃料と有用物, pp.161-162 (2016).
- (22) 重岡成, 田茂井政宏, 鈴木健吾, 吉田絵梨子
『ユーグレナへの遺伝子導入方法及びその形質転換体』
世界知的所有権機関国際事務局-PCT/JP20 14/055 161, pp.17-18 (2014).
- (23) 嵐田亮, Mitra, S.
『ワックスエステル高含有ユーグレナの生産方法及びワックスエステル製造方法』
世界知的所有権機関国際事務局-PCT/JP20 11/066 015, pp.4-16 (2011).
- (24) Martinez, V., Henary, M.
『Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues.』
Chemistry, 22(39), pp. 13764-13782 (2016).
- (25) Ray, A., Das, S., Chattopadhyay, N.
『Aggregation of Nile Red in Water: Prevention through Encapsulation in β -Cyclodextrin.』
ACS Omega, 4(1), pp. 15-24 (2019).
- (26) Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W.
『NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.』
Nat Methods, 9(7), pp. 5-671 (2012).
- (27) Zhu, Q., Zhang, H., Yadav, N. S.
『IMPROVEMENT OF LONG CHAIN OMEGA-3 AND OMEGA-6 POLYUNSATURATED FATTY ACID BIOSYNTHESIS BY EXPRESSION OF LYSOPHOSPHOLIPID ACYLTRANSFERASES.』
Patent: JP 2012529912-A 49 29-NOV- (2012).
- (28) Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R., Joung, J. K.
『Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system.』
Nat Biotechnol., 31(3), pp. 227-229 (2013).
- (29) 宮武和孝, 南川美幸, 中野長久, 北岡正三郎
『培養条件によるユーグレナの高度不飽和脂肪酸組成の変動について』
日本栄養・食糧学会誌, 38 巻 2 号, pp.117-122 (1985).
- (30) Nakamura, M. T., Nara, T. Y.
『Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases.』
Annu Rev Nutr., 24(1), pp. 345-376 (2004).
- (31) Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoeckl, J. P., Lan, H., Kendziora, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., Attie, A. D.
『Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity.』
Proc Natl Acad Sci U S A., 99(17), pp. 11482-11486 (2002).
- (32) Powell, D. R., Gay, J. P., Smith, M., Wilganowski, N., Harris, A., Holland, A., Reyes, M., Kirkham, L., Kirkpatrick, L. L., Zambrowicz, B., Hansen, G., Platt, K. A., van Sligtenhorst, I., Ding, Z. M., Desai, U.
『Fatty acid desaturase 1 knockout mice are lean with improved glycemic control and decreased development of atheromatous plaque.』
Diabetes Metab Syndr Obes., 9, pp. 185-199 (2016).
- (33) Muto, M., Kubota, C., Tanaka, M., Satoh, A., Matsumoto, M., Yoshino, T., Tanaka, T.

- 『Identification and functional analysis of delta-9 desaturase, a key enzyme in PUFA Synthesis, isolated from the oleaginous diatom *Fistulifera*.』
PLoS One., 8(9): e73507 (2013).
- (34) Salsman, J., Dellaire, G.
『Precision genome editing in the CRISPR era.』
Biochem Cell Biol., 95(2), pp. 187-201 (2017).
- (35) 奥村明雄, 河邊安男, 大野貴弘
『温泉熱等の利用状況の実態と有効利用に関する研究』
日本環境衛生センター所報, 第 37 号, pp.92-100 (2010).

