

研究成果

<p>サブテーマ名: 餌料用プランクトン培養・保存技術開発と品種改良 小テーマ名: ナンノクロロプシス変異株の培養</p>
<p>サブテーマリーダー 長崎大学大学院生産科学研究科・海洋生命科学講座 教授 萩原篤志 研究従事者 長崎大学大学院生産科学研究科・資源利用学講座 教授 藤田雄二 長崎市水産部水産センター伊東恒雄・里 修・古場正巳・永田裕徳 クロレラ工業株式会社 丸山 功</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>研究の概要 海産魚等の種苗生産において、ワムシ類は魚類等の初期餌料として必要不可欠である。そのワムシ類の増殖には、真正眼点藻 <i>Nannochloropsis oculata</i> (ナンノクロロプシス、以下ナンノと略記) が餌とされ、ナンノは魚類等の稚仔に必須である高度不飽和脂肪酸(PUFA、炭素数が18以上で不飽和二重結合二つ以上)の供給源として重要であるとされている。ワムシ類の餌とされるナンノについては、培養による安定的な供給と栄養的な質に関する問題の解決が求められている。本研究では、既存のナンノ株について、化学変異原処理による変異株の誘導を行い、脂肪酸合成関連酵素の阻害剤に対する抵抗性を指標に変異株の選抜・分離を行う。分離した変異株については、脂質の脂肪酸組成及び異なる温度における増殖率などからワムシの餌料として従来株より優れているか検討する。</p> <p>研究の独自性・新規性 海産魚等の種苗生産施設においては、餌料動物プランクトンの餌料として或いは魚介類の初期餌料として用いるために珪藻、ハプト藻、真正眼点藻、プラシノ藻などの植物プランクトンが培養されている。それら植物プランクトンについては温度、照度、培養液組成等の培養条件による成育に対する影響などは比較的良好に研究されている。ナンノは夏季の高温期に大量培養がしばしば困難であり、また成育段階によってのPUFA含量が減少するなどの問題が指摘されているが、変異株を誘導するなどの手法によるPUFA含量が高く、高温・低温でもよく成育する株などの作成に関する研究はほとんどない。</p> <p>研究の目標(各フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に。)</p> <p>フェーズ1: 外国及び国内からのナンノ株について、成育特性から試験する野生(WT)株を選出し、WT株を化学変異原で処理した後、脂肪酸合成関連酵素の阻害剤に対する抵抗性を指標に変異株を選抜・分離する。</p> <p>フェーズ2: WT株と変異株の全脂質の脂肪酸組成を比較すると共に、10～35℃における増殖率を比較する。これらの株からDNAを抽出し、PCR増産物に多型が検出されることを確認する。WT株と変異株を含めて、脂肪酸合成に関連する酵素活性との関係を検討する。</p> <p>フェーズ3: 大量培養(40-60トン水槽)によるWT株と変異株の増殖率とEPA含有量を比較する。</p>
<p>研究の進め方及び進捗状況(目標と対比して)</p> <p>ナンノのWT株を化学変異原で処理した後、脂肪酸合成関連酵素の阻害剤に対する抵抗性を指標に変異株は選抜剤耐性(成育、酵素活性)及びDNA多型によって変異株であること、また異なる温度における増殖率が高いことが確認された。このような研究の進捗状況は研究目標のフェーズ1及び2に十分に対応している。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容: ナンノのWT株を化学変異原エチルメタンスルホン酸、メチル-ニトロ尿素で処理した後、セルレニン、キザロフォフに対する抵抗性を指標として変異株を分離した。セルレニン抵抗性の1株とキザロフォフ抵抗性の1株の計2株を大量培養して得られた藻体における高度不飽和脂肪酸(C18:2、C20:4n-6、C20:5n-3の合計)量は、WT株に比べ、それぞれ29%及び19%増加した。変異株では海産魚等の稚仔に必須であるPUFAのうち特に重要視されているエイコサペンタエン酸(C20:5n-3)含量も高かった。これらの変異株は、WT株と比較して、15～31℃での増殖率が高かった。また、変異株を含むナンノ株の細胞からDNAを抽出し、PCR増産物に検出されるDNA多型からWT株、変異株の株間を識別する方法として、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法の適用が可能であることを明らかにした。これら変異株の分子レベルでの特性評価により、定常状態mRNA転写レベルの葉緑体局在性 12不飽和化酵素遺伝子及びステアロイルACP不飽和化酵素遺伝子是对照的な転写産物プロフィールを示すことが明らかになった。</p>
<p>特許件数: 1 論文数: 2 口頭発表件数: 3</p>

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比:

魚介類の種苗生産において用いられる微細藻類のうち、珪藻の一種 (*Phaeodactylum tricornutu*) において変異原で処理することによってPUFA含量の多い変異株が誘導されている。しかし、この場合には、親株を変異原処理した後、生残した細胞から生じたコロニーの選抜に本法のように脂肪酸合成関連酵素の阻害剤に対する抵抗性を指標にする方法を導入せず、無作為に選抜された変異株である。魚介類の種苗生産において上記の珪藻よりも一般的に広く用いられているナンノではPUFA含量の高い変異株の誘導・選抜はこれまで例がない。

2 実用化に向けた波及効果:

PUFA含量が高く、やや高温や低温でも増殖する変異株の誘導・選抜によって、魚介類の種苗生産において必須であるワムシの餌としてナンノを年間を通じて安定的に供給することができるようになり、水産動物の種苗生産の発展に寄与する。

残された課題と対応方針について

長崎市水産センターの施設において、WT株と変異株の計2株の大量培養を2回実施した。しかし、2回の培養において1トン水槽における培養の途中で気象異変(高温、降雨、台風)などの影響でナンノが死滅した。大量培養が順調に進行しなかったために、産業レベルの大量培養における増殖率とPUFA含量に関するデータは得られていない。変異株の産業レベルの大量培養における増殖率とPUFA含量に関するデータは必須であり、継続して実施の予定。市水産センターでは、培養条件により高PUFA含有L型ワムシが得られており、今後も継続して研究する。

	JST負担分(千円)							地域負担分(千円)							合計
	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	H13	H14	H15	H16	H17	H18	小計	
人件費	0	0	1,783	5,432	0	0	7,215	0	0	0	0	720	2,700	3,420	10,635
設備費	0	3,161	4,218	2,391	0	0	9,770	0	0	0	0	0	0	0	9,770
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	21	322	317	500	250	1,410	0	0	1,000	0	1,000	1,000	3,000	4,410
旅費	0	0	38	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	38
その他	0	0	65	0	0	0	65	0	0	0	0	0	0	0	65
小計	0	3,182	6,426	8,140	500	250	18,498	0	0	1,000	0	1,720	3,700	6,420	24,918

代表的な設備名と仕様[既存(事業開始前)の設備含む]

JST負担による設備: DNA/RNA測定装置、ハイブリオープン、高速冷却遠心機、
バイオクリーンベンチ、倒立型リサーチ顕微鏡
地域負担による設備: クロレラ培養水槽他設備一式

複数の研究課題に共通した経費については按分する。