

マイクロ流路チップ・セルソーターによる高脂質生産微細藻株の探索

井上瑛子¹・大田修平^{2*}・松崎令^{2,3}・岡田昌樹¹・河地正伸²¹ 日本大学生産工学部 (〒 275-8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1)² 国立研究開発法人国立環境研究所 (〒 305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)³ 筑波大学生命環境系 (〒 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

Akiko Inoue¹, Shuhei Ota^{2*}, Ryo Matsuzaki^{2,3}, Masaki Okada¹ and Masanobu Kawachi²: Exploration of high oil-producing microalgae strains using a microfluidic chip cell sorter. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 68: 143-152, November 10, 2020

Microalgae continue to attract attention as a renewable energy resource with favorable characteristics. However, there are many barriers related to technology and industrialization, leading to a high cost of algae-derived biofuels. One solution is to establish new algal strains with high oil productivity from field samples; however, the conventional methods, such as capillary isolation, seem to be time-consuming and labor-intensive. In this study, we optimized the flow cytometer-based sorting of high oil-producing cells from field samples. Here, a new type of cell sorter, "On-chip Sort", which employs a microfluidic chip, was used with Nile Red staining, a fluorescent dye for neutral lipids. Field samples collected at Nanbu Dam at Tokunoshima Island, Kagoshima Prefecture, Japan, were used in the optimization procedure for isolating high oil-producing algae. The newly established isolates were identified by cell morphology and 18S ribosomal DNA sequences. We compared the biomass and oil productivity of the newly established strains with reference strains of the National Institute for Environmental Studies. This study shows that the target strains can be efficiently isolated by using Nile Red fluorescence intensity as an indicator.

Key Index Words: cell sorting, flow cytometry, On-chip Sort, lipid-producing algae, Nile Red

¹College of Industrial Technology, Nihon University, Narashino, Chiba 275-8575, Japan

²Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

³Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

*Author for correspondence: ota.shuhei@nies.go.jp

緒言

化石燃料の枯渇や二酸化炭素排出削減などを背景として、微細藻類は有用な特性をもつ再生可能資源として注目されている。しかしながら、微細藻類から脂質を生産する理論的、技術的側面、そして工業化にはまだ多くの障壁があり、藻類バイオ燃料の低コスト化を阻んでいる (Davis *et al.* 2011, Su *et al.* 2017)。この問題の解決手段として、培養法の工夫をはじめ、遺伝子改変技術や育種などの多岐にわたるアプローチを用いて、より高効率に藻類バイオマスを回収する方法が模索されている (Georgianna & Mayfield 2012, Vítová *et al.* 2015, 宮下ら 2017)。

有益な形質をもつ微細藻類株を野外から新規に探索することは、藻類バイオマス研究全盛期にあってもなお、基礎技術として重要である。しかしながら、新規株を確立するためには、野外調査・粗培養処理・分離・培養・評価（・分類学的位置の推定）など、何段階ものステップが必要である。ガラス管を細くしたキャピラリーによる藻類分離法は、従来から用いられている手法の一つである (Andersen & Kawachi 2005)。この方法は顕微鏡下で表現型を確認しながら作業できるため、多様な藻類の分離を主目的とする分類学的研究では利点も多いが、ある程度熟練を要する。一方、高脂質生産株の単離など、ターゲットとする表現型が予めわかっている場合は、その性質に狙いを定めてセルソーター（ソーティング機能を備えたフローサイトメーター）で分離を行うほうが効率がよい。

一般的なセルソーターの細胞分離には液滴荷電方式が採用されているが、この方法による分離では使用できるシース液が限られている。一方、マイクロ流路チップ・セルソーターである On-chip Sort (オンチップ・バイオテクノロジー) は、空気圧を利用したパルスフロー方式により標的細胞を回収リザーバーにソーティングするため、細胞懸濁液やシース液に任意の培地やバッファーが使用でき、液滴荷電方式と比較して細胞へのダメージが少ないとされる (武田ら 2011, 小林・鈴木 2018)。また、サンプル流路のデッドボリュームが 0.01 μL 以下であり、少量のサンプルを解析可能である。On-chip Sort によるソーティングは滅菌した使い捨てのマイクロ流路チップ内で完結しており、クリーンベンチ内でも運用できるため、コンタミネーションのリスクも少ない。このような長所をもつため、医学分野を中心に On-chip Sort を用いた研究例が多数報告されている (Watanabe *et al.* 2014, 松井ら 2018, Hasegawa *et al.* 2019)。また、細菌を含む液滴を On-chip Sort で選択的に選別する方法も開発されている (Ota *et al.* 2019)。なお、マイクロ流路デバイスを使用した藻類学分野における研究例としては、単細胞性の *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard や群体性の *Botryococcus braunii* Kützing の脂質生産性をハイスループットで評価する方法 (Kim *et al.* 2016) や、バラスト水に含まれる海産微生物の識別法 (Maw *et al.* 2018) などがある。

本研究では、On-chip Sort を用いた高脂質生産性微細藻類

の探索手法について報告する。これまで、従来のフローサイトメトリー (FCM) による培養株や変異体のソーティングを目的とした研究のほか (de la Jara *et al.* 2003, Doan & Obbard 2011, Manandhar-Shrestha & Hildebrand 2013, Velmurugan *et al.* 2013), 最近では野外海水試料からの有用株の分離事例も報告された (Katayama *et al.* 2019)。本研究では、マイクロ流路によるセルソーター On-Chip Sort を利用して、野外淡水試料から高脂質生産性株を確立することを目的とした。さらに、分離した培養株の増殖能や脂質生産に関する性能評価、並びにその系統的位置を調査した。

材料と方法

染色条件の検討

国立環境研究所微生物系統保存施設 (MCC-NIES) に保存されている *Parachlorella kessleri* (Fott & Nováková) Krienitz, E. Hegewald, Hepperle, V. Huss, T. Rohr & M. Wolf NIES-2152 株を代表的な脂質蓄積藻類として選び、Nile Red 染色条件を調べた。本研究では細胞内の脂質量をマイクロプレートリーダー法で推定した。マイクロプレートリーダーで測定した Nile Red 蛍光値と重量法で測定した実際の脂質量には線形性が確認されている (Takeshita *et al.* 2015)。Nile Red ストック溶液は、Nile Red (東京化成工業) をジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解して調製した。*P. kessleri* NIES-2152 株を明暗周期 12:12 時間、光量子束密度 $\sim 30 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、 20°C の条件で培養し、Tris-Acetate-Phosphate (TAP) 培地 (Gorman & Levine 1965) または窒素 (N) 量を 1/10 量に制限した TAP 培地 (N 制限 TAP 培地) で 9 日間培養した。その後、培養株を 96 ウェルマイクロプレート (lumox multiwell 96, ザルスタット) に $200 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注し、Nile Red の最終濃度が 0.001 mM , 0.005 mM , 0.01 mM , および 0.1 mM となるように染色した。Nile Red を添加後、微量ピペッターでピペッティングし、室温で 10 分間インキュベートした後、再びピペッターでピペッティングした。染色サンプルをプレートリーダー (SpectraMax M2e, モレキュラー・デバイスジャパン) にて蛍光値 (励起波長 522 nm , cutoff $< 550 \text{ nm}$, 蛍光波長 590 nm) を測定した。得られた値の平均をとり ($n=3$, テクニカルレプリケート), サンプル 1 mL あたりの蛍光値 [Nile Red fluorescence intensity per milliliter (NRF/mL)] を算出した。なお、遊離の Nile Red (蛍光波長 650 nm 付近) とトリグリセリド内の Nile Red (蛍光波長 590 nm 付近) とでは、観察される蛍光波長が異なることから、本研究ではすべての実験で Nile Red 染色後の洗浄工程を省略した。

次に、Nile Red が細胞増殖に与える影響を調べた。上記の条件で培養した *P. kessleri* NIES-2152 株と *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss NIES-2169 株を 3 mL ずつそれぞれ 50 mL 遠沈管に分注した。実験区の培養株には 0.1 mM Nile Red ストック溶液を $150 \mu\text{L}$ 添加し、また対照区として DMSO を $150 \mu\text{L}$ 添加した。攪拌後に室温で 10 分間インキュベートし、遠心分離 ($1,400 \text{ g}$, 2 min) を行い、上清



Fig. 1. Photograph of the sampling point at Nanbu Dam (Tokunoshima Island, Kagoshima, Japan).

を捨てた後、細胞を 30 mL の TAP 培地で懸濁し、培養用フラスコ (25 cm^2 ダブルシールキャップ, AGC テクノグラス, Iwaki) に移した。14 日間培養し、測定時にそれぞれのサンプルから $200 \mu\text{L}$ /ウェル分取し、プレートリーダーにて吸光度 (600 nm) を測定した。得られた値の平均値 ($n=3$, テクニカルレプリケート) をプロットし、増殖曲線を得た。

野外試料の予備培養

本研究では、2019 年 8 月 13 日に鹿児島県徳之島の南部ダム (27.790429°N , 128.946855°E) において採水した野外試料を使用した (Fig. 1)。採水試料をよく攪拌して、直ちに 10 mL の AF-6 培地 (Kato 1982) の入ったねじ口試験管に $500 \mu\text{L}$ の採水試料を添加し、一部を観察用に 48 ウェルプレートに分注した後に、光量子束密度 $\sim 30 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期 12:12 時間、 20°C の条件の下、予備培養処理を行った。

On-chip Sort での細胞分離

予備培養処理開始後 11 日目に、試料を倒立顕微鏡で観察し、複数種の *Chlorella* 様細胞の増殖を確認した。そこで試験管で継代培養した予備培養試料から 3 mL を分取し、窒素量を通常の 1/10 に制限した C 培地 (Ichimura 1971) (N 制限 C 培地) が 27 mL 入った培養用フラスコに植え替えた。光量子束密度 $\sim 30 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期 12:12 時間、 20°C の条件下で培養し、培養 5 日目のサンプルをサンプリングチューブに 1 mL 分取した。実験には、明期に入ってから 9~10 時間後の細胞を用いた。分取サンプルに 1 mM Nile Red を $5 \mu\text{L}$ 添加し、タッピングにより攪拌した。室温で 10 分間インキュベートした後、サンプルをマイクロ流路チップにローディングし、マイクロ流路チップ・セルソーター (On-chip Sort, オンチップ・バイオテクノロジーズ) により測定した。

On-chip Sort を用いた解析において、Nile Red 蛍光は FL3 (検出波長 $591.5/43 \text{ nm}$)、クロロフィル自家蛍光は FL6 (検出波長 $775/46 \text{ nm}$) を使用して測定した。FL3 と FL6 の感度パラメーター (コントロール電圧) はそれぞれ 0.55 および 0.45 ,

送液圧力は Main Push : 1.5 kPa, Main Pull : -0.6 kPa に設定した。C 培地に最終濃度が 1 × になるように Through Path Plus 40 × (オンチップ・バイオテクノロジーズ) を添加したシース液を使用した。フローサイトメトリーの結果は、解析ソフトウェア (OnchipFlow ver. 1.7.9.0.) により二次元ドットプロットまたはヒストグラムを表示させ、Nile Red 蛍光値 (NR) とクロロフィル蛍光値 (Chl) が共に高いゲート、Nile Red 蛍光値が高くクロロフィル蛍光値が低いゲート、Nile Red 蛍光値が低くクロロフィル蛍光値が高いゲートからそれぞれ細胞を分離した。本実験では On-chip Sort の解析ソフトウェア (OnchipFlow ver. 1.7.9.0.) の仕様により、四角形ゲートを目的の領域に設定してソーティングした。ゲート内に複数の種が混在している可能性を考慮して、分離した細胞は直ちに 48 ウェルプレートを用いた希釈培養処理を施した。希釈培養は C 培地で、1/4 ~ 1/4⁸ の 8 段階の希釈率を設定して、予備培養と同じ培養条件下で実施した。光学顕微鏡下で単藻であることを確認できたウェル内のサンプルから確立した培養株をそれぞれ NIES-4411 株, NIES-4412 株, NIES-4413 株として MCC-NIES に寄託した。

新規株と NIES 株の性能評価

C 培地または N 制限 C 培地を 36 mL ずつ分注したシリコセン付きの三角フラスコ (200 mL Pyrex, Iwaki) に新規確立株 (NIES-4411, NIES-4412, NIES-4413) を 4 mL ずつ植え替え、三角フラスコを光量子束密度 ~70 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12:12 時間, 20°C の条件の下, 75 min^{-1} で振盪させながら培養した。32 日間培養し、測定時に 200 μL を 96 ウェルマイクロプレートに分取してプレートリーダーにて吸光度 (600 nm) を測定し、平均値 ($n=3$, テクニカルレプリケート) をプロットすることで増殖曲線を得た。また、吸光度の測定後、各ウェルに 1 mM Nile Red を 1 μL 加え、ピペッターで 5 回攪拌し、室温で 10 分インキュベートした後、再びピペッターで 5 回攪拌してから蛍光値をプレートリーダーで測定した。得られた値の平均をとり ($n=3$, テクニカルレプリケート), 1 mL あたりの蛍光値 (NRF/mL) をグラフに示し、比較を行った。

新規株の性能比較のため、MCC-NIES 保存株についても同様の測定を行った。*Chlorella* およびそれに近縁な 4 株 (*P. kessleri* NIES-2152 株, *C. sorokiniana* NIES-2169 株, *Chlorella vulgaris* Beijerinck NIES-2170 株, および *Micractinium inermum* Hoshina & Y. Fujiwara NIES-2171 株) (Fig. 2) を代表株として選び、C 培地または N 制限 C 培地を 36 mL ずつ分注した 2 種類のシリコセン付きの三角フラスコ (250 mL Pyrex, Iwaki) に 4 mL ずつ植え替え、新規株と同じ条件で培養した。22 日間培養し、測定時に 200 μL を 96 ウェルマイクロプレートに分取し、プレートリーダーにて吸光度 (600 nm) を測定し、平均値 ($n=3$, テクニカルレプリケート) をプロットすることで増殖曲線を得た。また、同じく吸光度の測定後、各ウェルに 1 mM Nile Red を 1 μL 加え、ピペッター

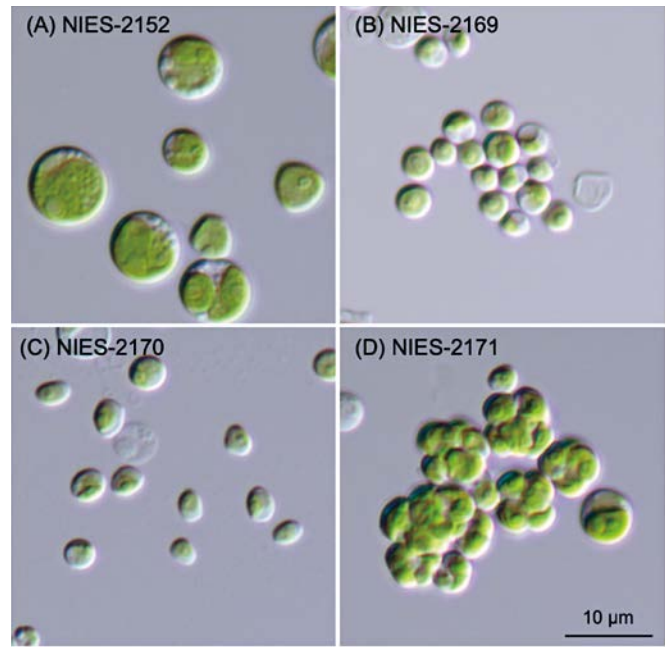


Fig. 2. Light micrographs of MCC-NIES strains, shown at the same magnification throughout. (A) *Parachlorella kessleri* NIES-2152, (B) *Chlorella sorokiniana* NIES-2169, (C) *Chlorella vulgaris* NIES-2170, and (D) *Micractinium inermum* NIES-2171.

にて 5 回攪拌し、室温で 10 分インキュベートした後、再び微量ピペッターにて 5 回攪拌してから蛍光値をプレートリーダーで測定した。得られた値の平均をとり ($n=3$, テクニカルレプリケート), 比較を行った。

顕微鏡観察

分離株と既存株の細胞形態を確認するため、光学顕微鏡観察を行った。光量子束密度 ~30 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12:12 時間, 20°C の条件の下, C 培地で培養した 7 日培養齢の細胞を観察に用いた。Nikon ECLIPSE Ni-U 正立顕微鏡 (ニコンインステック) に微分干渉プリズムを用い、対物レンズは CFI プランフルオール 60XC により観察した。DS-Fi3 デジタルカメラ (ニコンインステック) により画像を取得した。

On-chip Sort による新規株の FCM 解析

新規株 (NIES-4411, NIES-4412, NIES-4413) からそれぞれ 3 mL を分取して N 制限 C 培地 27 mL の入った角フラスコに植え替え、光量子束密度 ~30 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 明暗周期 12:12 時間, 20°C の条件で培養した。培養 5 日目のサンプルを 1.5 mL サンプリグチューブに 1 mL 分注し、上記の条件で Nile Red により染色して On-chip Sort により解析した。

新規培養株の分子解析

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法とダイレクトシーケンス法を用いて、新規株の 18S ribosomal DNA (rDNA) の塩基配列を決定した。NIES-4411 株および NIES-4412 株については、細胞を含む培養液を直接 PCR 反応液に加えて PCR

Table 1. Primers used for amplifications and sequencing of 18S rDNA.

Designation	Position*	Sequence (5'-3')
FA**	1-21	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT
FC***	458-478	GGGAGGTAGTGACAIAAATA
RD**	570-550****	GCTGGCACCAGACTTGCCCTC
FE**	1,112-1,132	GGGAGTATGGTCGCAAGGCTG
RF**	1,202-1,182****	CCCGTGTGAGTCAAATTAAG
RB**	1,799-1,774****	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC

*Coordinate numbers from the *Chlorella vulgaris* 18S rDNA (Huss & Sogin 1990).

**Sourced from Nakazawa & Nozaki (2004).

***Sourced from Nakada *et al.* (2007).

****Reverse primer.

を実施した。NIES-4413 株の PCR はこの方法では成功しなかったため、Fawley & Fawley (2004) の手法に従って抽出・精製した DNA を PCR に供した。PCR は KOD One PCR Master Mix -Blue- (東洋紡) を用いて、付属のプロトコールに準拠して実施した [使用プライマー: FA および RB (Table 1)]。電気泳動による確認後、PCR 産物を FastGene Gel/PCR エクストラクションキット (日本ジェネティクス) により精製し、BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いたシーケンス反応に供した。シーケンス反応は付属のプロトコールに従って実施し、上記のプライマー (FA および RB) に加えて FC, RD, FE, および RF (Table 1) も使用した。シーケンス反応産物を BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製し、3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた配列のアセンブリには GeneStudio 2.2.0 (<http://genestudio.com/>) を用いた。続いて、米国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) が提供する Basic Local Alignment Search Tool サービス (BLAST) を利用して、各培養株の 18S rDNA 配列を GenBank に登録されている塩基配列データと照合した。エクソン領域のみを用いた相同性検索において上位にエンターリーした配列の系統分類学的情報に基づき、培養株の系統的位置を推定した。

結果

4 段階の Nile Red 希釈濃度 (0.001 mM, 0.005 mM, 0.01 mM および 0.1 mM) により *P. kessleri* NIES-2152 株を染色し、蛍光値を比較したところ、N 制限 TAP 培地 (脂質蓄積誘導条件) かつ Nile Red の最終濃度が 0.01 mM の時、最高値を示した (Fig. 3A)。一方、脂質蓄積誘導・非誘導条件で比較すると、0.01 mM 濃度以下でも Nile Red 蛍光の差は明瞭に観測された (Fig. 3A)。本研究では Nile Red の生体細胞へ与える影響や、バックグラウンド蛍光を考慮し、0.01 mM より一段階濃度の低い 0.005 mM をワーキング濃度として以降の実験を行った。

On-chip Sort によるソーティングを実施する前に、Nile Red

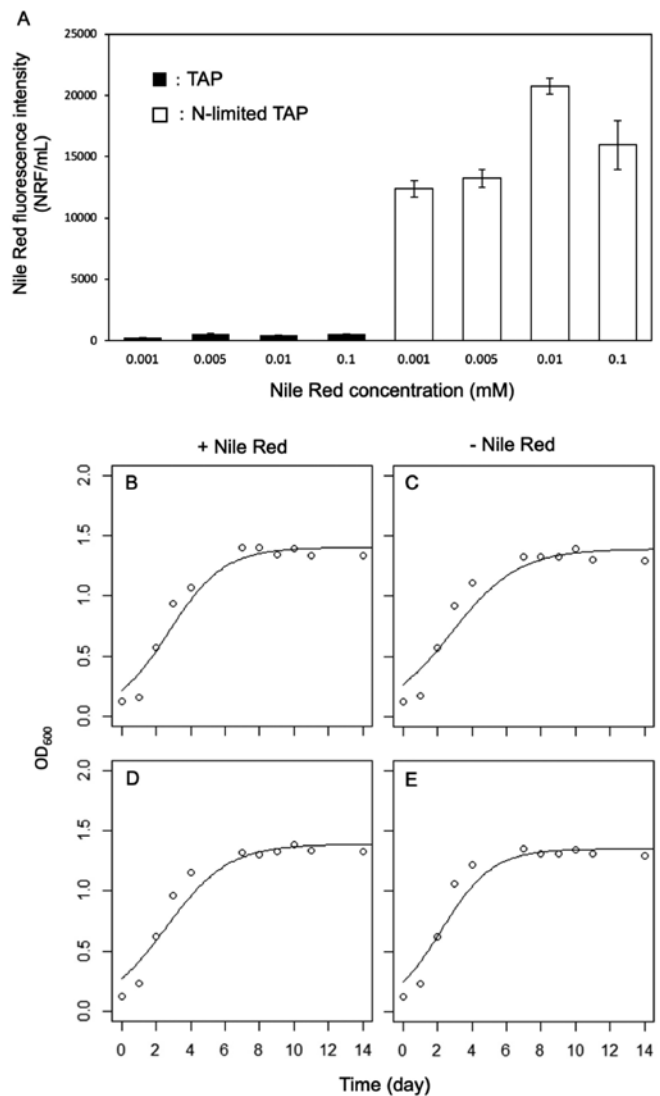


Fig. 3. Comparison of different concentrations of Nile Red and their effects on living cells. (A) Nile Red fluorescence intensity was compared under nitrogen-limited and non-limited conditions. Values are means of three independent experiments ($n=3$), and error bars indicate standard deviation. (B-E) The growth curves of stained NIES-2152 (B), unstained NIES-2152 (C), stained NIES-2169 (D), and unstained NIES-2169 (E).

染色が生体細胞に与える影響を調べた。実験には *P. kessleri* NIES-2152 株と *C. sorokiniana* NIES-2169 株を代表株として用いた。0.005 mM Nile Red で染色した細胞を 2 週間培養し、その期間の吸光度を測定して増殖曲線を得た。染色細胞と非染色細胞を比較したところ、染色細胞において増殖の阻害は認められず、対照区と同様の増殖を示した (Fig. 3B-E)。この結果から、Nile Red による生体細胞への影響はほとんどないと考えられた。

上記の染色条件にもとづき、野外試料中から高脂質生産細胞の分離を試みた。Nile Red 染色した野外試料を On-chip Sort により解析し、表現型の異なる 3 つのソーティングゲートから分離した。本実験では、Nile Red 輝度が比較的高い部

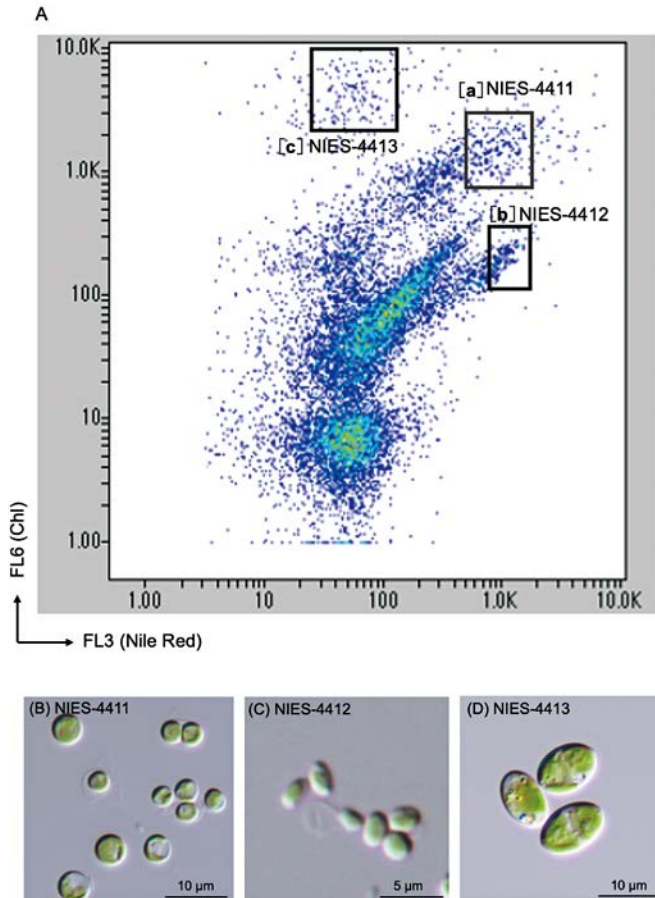


Fig. 4. Flow cytometry dot plots of field samples and light micrographs of the newly isolated strains. (A) A typical sorting dot plot. The black frame indicates the sorting gate of interest from which each strain was isolated. [a] NIES-4411, [b] NIES-4412, [c] NIES-4413. (B–D) Light micrographs of strains NIES-4411 (B), NIES-4412 (C), and NIES-4413 (D).

分から2箇所、あるいはクロロフィル蛍光値の高い部分から1箇所選んだ (Fig. 4A)。ソーティングサンプルを希釈培養したところ、全ての分離試料から単藻株を確立することができた。Nile Red 蛍光値とクロロフィル蛍光値が共に高いゲート [a] からは、直径約 5 μm の緑色球状細胞である NIES-4411 株、Nile Red 蛍光値が高くクロロフィル蛍光値が低いゲート [b] からは、長径約 3 μm の楕円状の緑色細胞である NIES-4412 株、Nile Red 蛍光値が低くクロロフィル蛍光値が高いゲート [c] からは、長径約 10 μm の楕円状の緑色細胞である NIES-4413 株が得られた (Fig. 4B–D)。

新規株の系統的位置を推定するため、NIES-4411 株、NIES-4412 株および NIES-4413 株からそれぞれ決定した 1,705 塩基対、1,369 塩基対および 1,734 塩基対の 18S rDNA エクソン配列を用いて、BLAST による相同性検索を実施した。その結果、3 株はいずれも広義の緑藻であることがわかり、NIES-4411 株は *Mychonastes* 属 (緑藻綱, ヨコワミドロ目)、NIES-4412 株は *Choricystis* 属 (トレボウクシア藻綱, 所属目不明)、NIES-4413 株はオオキスティス科 (トレボウクシア藻

Table 2. Top three BLASTn hits of newly isolated strains based on 18S rDNA (excluding introns).

Strain/Query length	Description of top three BLASTn hits	% of identical matches	Query coverage	Accession number
NIES-4411/1,705 bp	<i>Mychonastes racemosus</i> CCAP 222/52*	99.94%	97%	GQ477051.1
	<i>Mychonastes racemosus</i> CCAP 222/35	99.94%	97%	GQ477043.1
	<i>Mychonastes timauensis</i> CCAP 205/2**	99.94%	97%	GQ477055.1
NIES-4412/1,369 bp	<i>Choricystis</i> sp. AS-29***	99.56%	100%	AY195972.1
	<i>Choricystis</i> sp. NIES-2342***	99.30%	94%	AB488587.1
	<i>Choricystis</i> sp. AS 5-1***	99.20%	100%	AY195970.1
NIES-4413/1,734 bp	<i>Oocystis</i> sp. CAUP H1110****	99.17%	97%	KY038331.1
	<i>Oocystis marssonii</i> UPMC-A0084	98.50%	96%	MT039383.1
	" <i>Chlorella</i> " sp. NIES-3912****	98.13%	98%	LC129522.1

Each BLASTn result was sorted by % of identical matches. Sequences from uncultured / environmental samples were excluded.

* Authentic strain of *Mychonastes racemosus* (Krienitz *et al.* 2011).

** Authentic strain of *Mychonastes timauensis* (Krienitz *et al.* 2011).

*** For phylogenetic position within the genus *Choricystis*, see Kulakova *et al.* (2020).

**** For phylogenetic position within the family Oocystaceae, see Štenclová *et al.* (2017).

綱, クロレラ目) の培養株と、それぞれ近縁であることが示唆された (Table 2)。

性能評価の結果、新規に確立した3株の中では、NIES-4411 株が最も Nile Red 蛍光値が高く、かつ、バイオマス生産性も比較的高かった (最大 OD₆₀₀ = 1.35) (Fig. 5A)。本株は17日目から定常期に入り、定常期における Nile Red 蛍光値はおおよそ 5,300–8,600 NRF/mL で推移した。NIES-4412 株は C 培地においてバイオマス生産性が高く (最大 OD₆₀₀ = 1.65)、N 制限・非制限培地のどちらにおいても Nile Red 蛍光値は11日目以降 1,400–2,700 NRF/mL で推移した (Fig. 5B, D)。一方、NIES-4413 株は培養齢11日目で定常期に達し、窒素源の有無に関わらず増殖曲線に大きな変化はなかった (Fig. 5C, D)。Nile Red 蛍光値は C 培地のほうが高く、6,000–8,000 NRF/mL で推移した (Fig. 5C)。N 制限・非制限培地間で最大バイオマス (最大 OD₆₀₀) を比較すると、NIES-4411 株と NIES-4412 株はともに N 制限条件下においてバイオマス (OD₆₀₀) の収量が低く、それぞれ 20%、44% であった。一方、NIES-4413 株では通常培養においてもバイオマス収量は、N 制限培養によるものの 1.1 倍程度に留まった (Fig. 5D)。

新規確立株の Nile Red 蛍光値とバイオマス生産性を比較するため、NIES 株の中から選んだ *Chlorella* およびそれに近縁な代表的な株 (*P. kessleri* NIES-2152 株, *C. sorokiniana* NIES-2169 株, *C. vulgaris* NIES-2170 株, および *M. inermum* NIES-2171 株) に対し、新規株と同様に性能比較を行った。今回調査した4株は全て、期待された通り C 培地においてバイオマス生産性が高かった (Fig. 6)。Nile Red 蛍

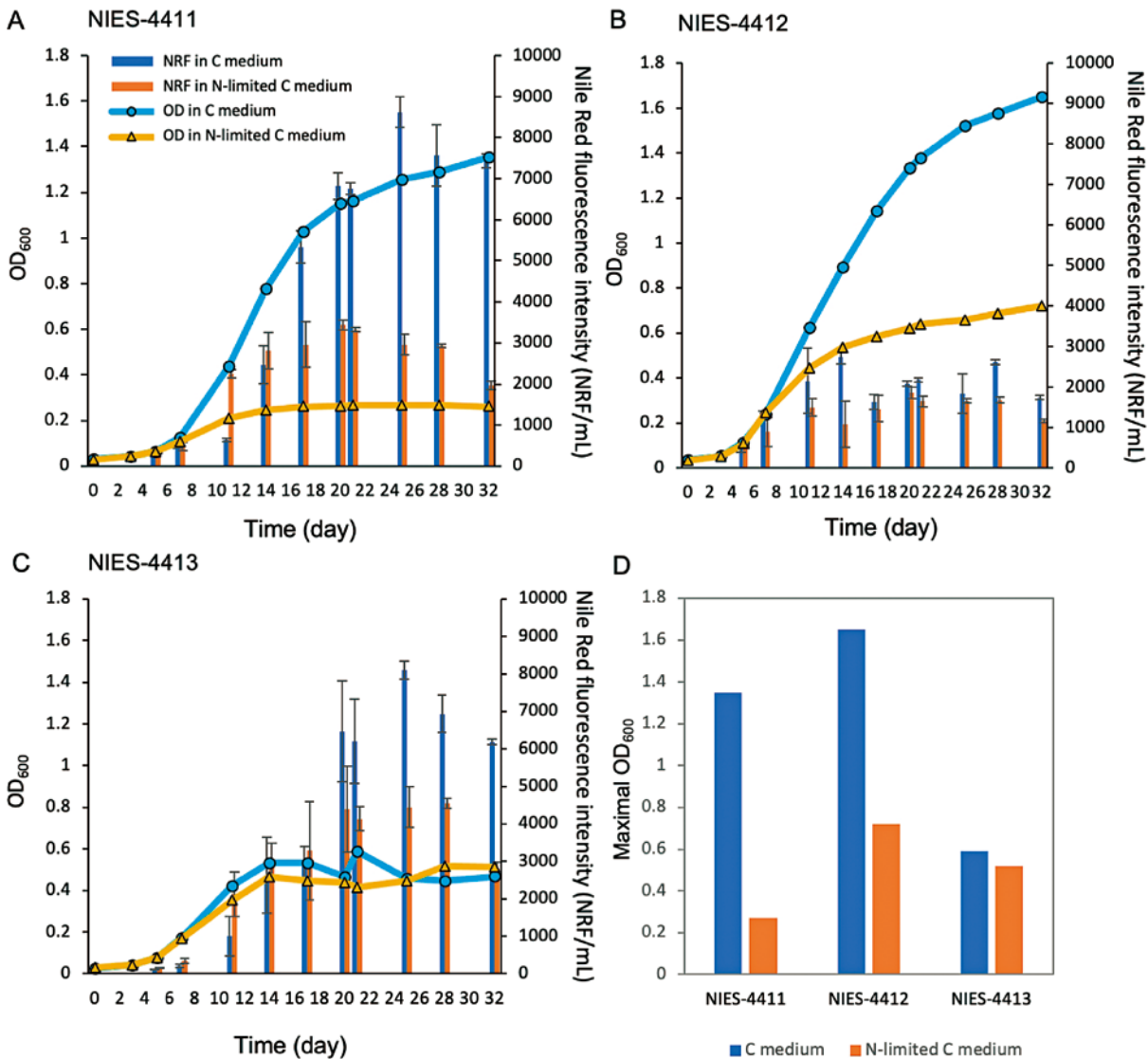


Fig. 5. Time-course analysis of absorbance (OD_{600}) and Nile Red fluorescence values in the newly isolated strains. Bar graphs show the Nile Red fluorescence intensity (NRF/mL) values and line graphs show the mean absorbance (OD_{600}) of the culture. Values in the bars represent means of three independent experiments ($n=3$), and error bars represent standard deviation. (A) NIES-4411, (B) NIES-4412, and (C) NIES-4413. (D) Maximal OD_{600} of the three strains from the data shown in Figs 5A–C.

光値に関しては、*C. sorokiniana* NIES-2169 株が定常期以降において C 培地による培養で高かったが、それ以外の 3 株は N 制限培地のほうが高い傾向を示した (Fig. 6A, E–G)。 *P. kessleri* NIES-2152 株の最大 Nile Red 蛍光値は N 制限培地の 22 日目において最高値 57,989 NRF/mL を示した (Fig. 6A)。この値は新規株の中で最も Nile Red 蛍光値が高かった NIES-4411 株と比較しても、約 6.7 倍を示した。それ以外の 3 株の Nile Red 蛍光値はいずれも 10,000 未満であった (Fig. 6E–G)。

分離時の表現型が培養株の状態でも維持されているのかを確認するため、新規株 3 株を分離時と同一条件で培養し、On-chip Sort により同一条件でフローサイトメトリー解析を行った。その結果、クロロフィル蛍光に関しては、NIES-4411 と NIES-4412 の両株は分離時のクロロフィル量と同様の傾向を示した (NIES-4411 > NIES-4412) (Fig. 7A)。しかし、

NIES-4413 株では、クロロフィルの蛍光が高い集団と低い集団が認められ、結果として 2 つの集団を構成していた (Fig. 7A)。蛍光に加えて前方散乱光による細胞サイズを確認したところ、NIES-4411 と NIES-4412 は単一の集団が示されたのに対し、NIES-4413 株は細胞サイズの異なる 2 集団が存在していることがわかった (Fig. 7B)。NIES-4413 株におけるクロロフィル蛍光値の低い集団 (Fig. 7A 破線内) は、細胞サイズの小さい集団と対応していた (Fig. 7B 矢印)。また、Nile Red の蛍光値が 100 a.u. 以上の細胞の割合を調べたところ、NIES-4411 株は N 制限 C 培地の場合 51.7%、C 培地の場合 31.5% であり、NIES-4412 株は N 制限 C 培地の場合 52.2%、C 培地の場合 26.1% であった。いずれも N 制限培地による培養のほうが、Nile Red 蛍光値の高い細胞の割合が多かった (Fig. 7A)。一方、NIES-4413 に関しては、N 制限 C 培地の場合

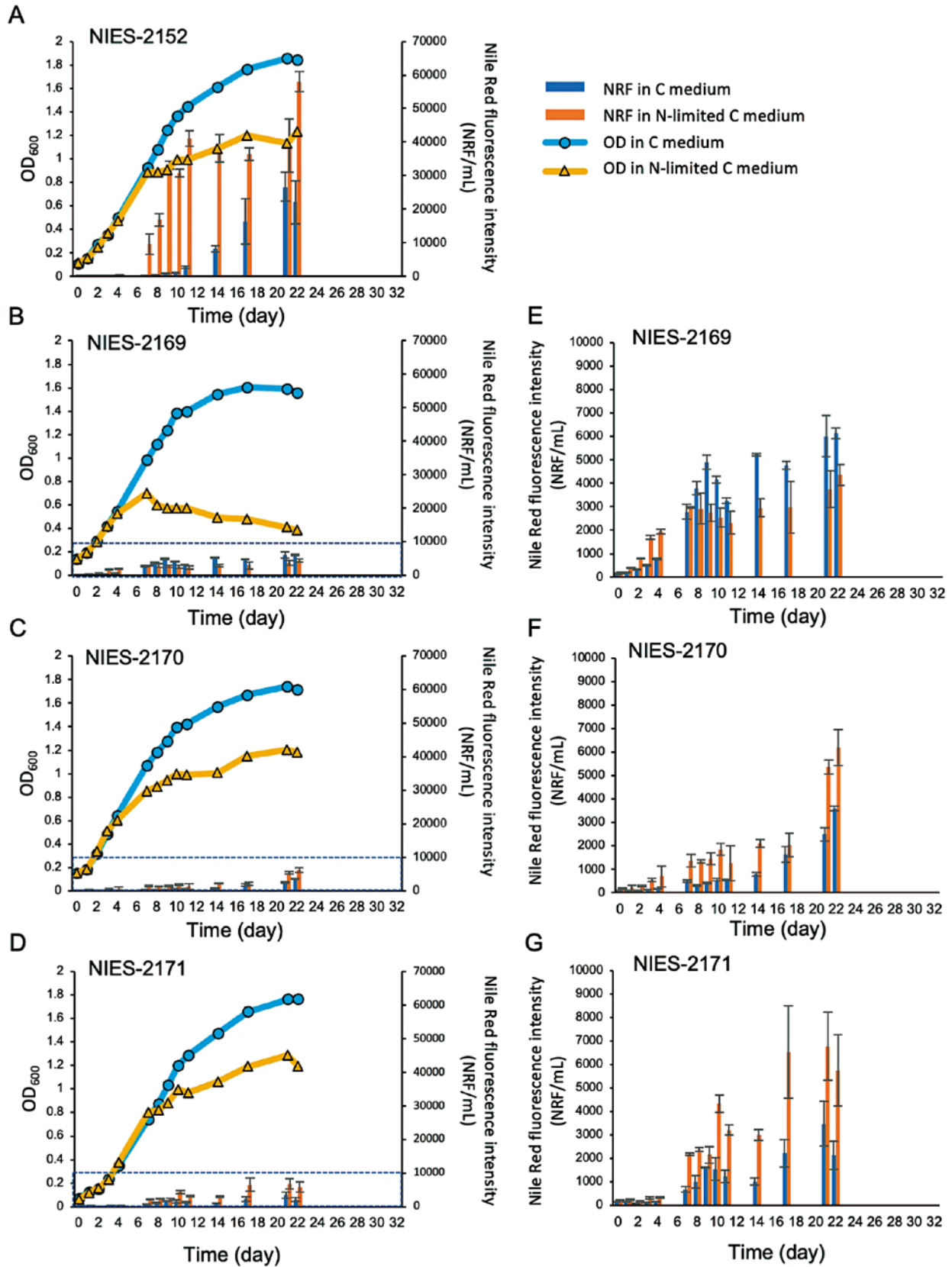


Fig. 6. Time-course analysis of absorbance (OD_{600}) and Nile Red fluorescence values in MCC-NIES strains. Bar graphs show the Nile Red fluorescence intensity (NRF/mL) and line graphs show the mean absorbance (OD_{600}) of the culture. Values in the bars represent means of three independent experiments ($n=3$), and error bars represent standard deviation. (A) *Parachlorella kessleri* NIES-2152, (B, E) *Chlorella sorokiniana* NIES-2169, (C, F) *Chlorella vulgaris* NIES-2170, and (D, G) *Micractinium inermum* NIES-2171. The graphs in E, F, and G are enlarged within the dashed boxes in B, C, and D, respectively.

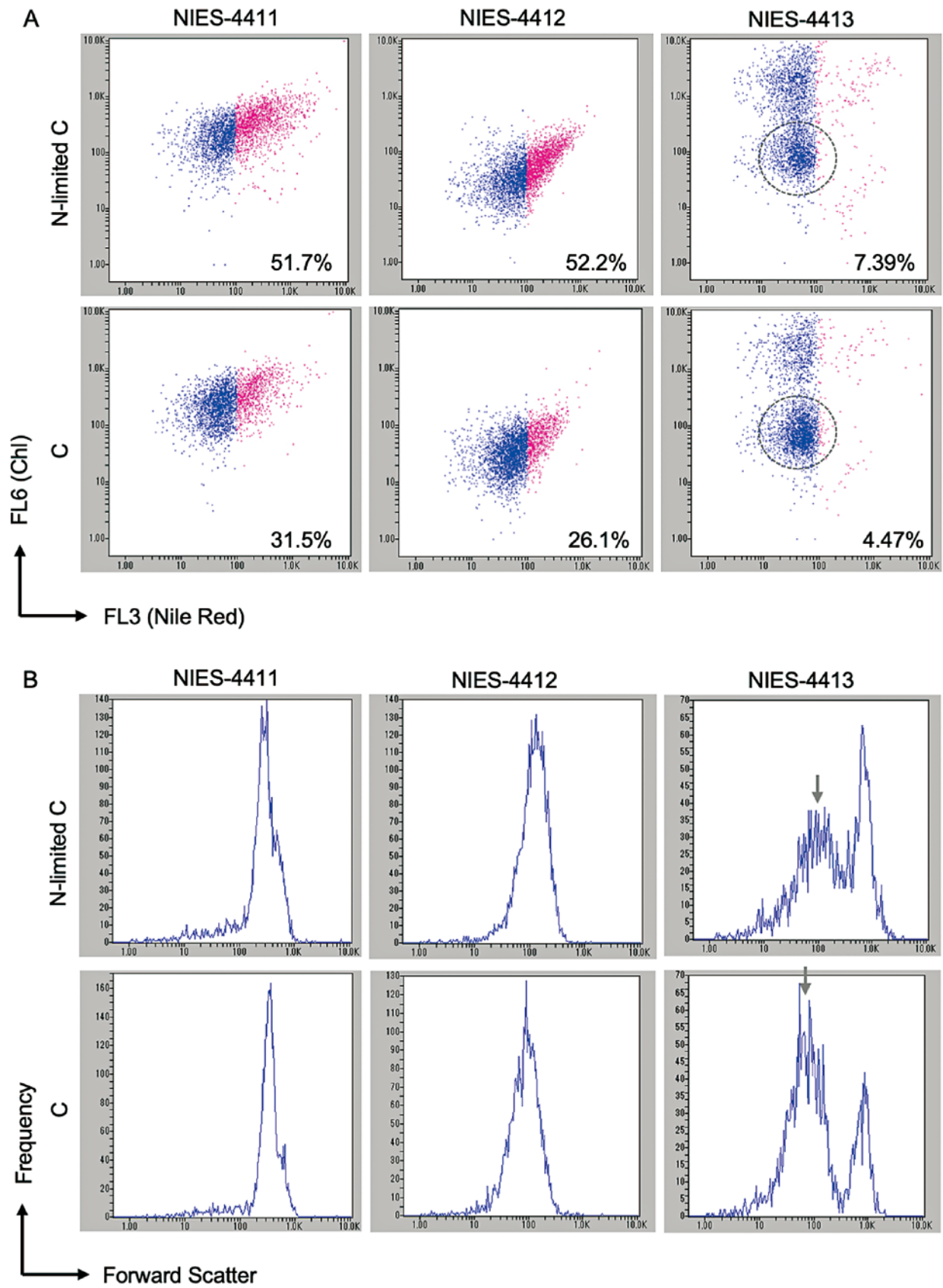


Fig. 7. Flow cytometry dot plots and histograms of newly isolated strains. (A) Pink pseudo-colored dots showing FL3 filter thresholds (Nile Red fluorescence) above 100 arbitrary units (a.u.) are considered as oil-accumulating cells. Numbers indicate the percentage of cells with fluorescence levels above 100 a.u. to all cells analyzed. (B) Histograms of forward scatter (relative units) showing cell size. The arrows indicate the corresponding populations within the dashed circle of the N-limited C or C medium, respectively.

7.39%, C 培地の場合 4.47% であり, 分離時の形質である低い Nile Red 蛍光を維持していた。

考察

本研究では, 野外から高脂質生産藻類細胞を分離することを目的に実験を行った。本研究と同様の方法論による研究として, 従来の FCM を用いて野外サンプルから海産微細藻類の高脂質生産株を Nile Red によってスクリーニングした研究が報告されている (Katayama *et al.* 2019)。本研究では, 野外淡水サンプルを対象とし, マイクロ流路チップ・セルソーターを利用した高脂質生産微細藻類株の確立および新規株の性能評価について報告する。

本研究で用いた藻類では, Nile Red およびキャリア (溶媒) である DMSO が増殖に与える影響はみられなかった (Fig. 3B–E)。緑藻 *C. reinhardtii* では, BODIPY 染色時は分離後 ~79% の細胞が順調に生育したのに対し, Nile Red 染色では生育がみられなかったことが報告されている (Velmurugan *et al.* 2013)。この実験では Nile Red のキャリアにグリセロールを使っており, 本実験の条件とは異なるが, 真正眼点藻 *Nannochloropsis* sp. ではグリセロールをキャリアとした Nile Red 染色でも生育が確認されている (Doan & Obbard 2011)。多様な藻類から有用な形質をもつ微細藻類を分離する観点から考えると, 今後はアセトン, DMSO, グリセロールといった複数のキャリアの検討も必要であろう。

培養株の表現型の確認において, NIES-4413 ではクロロフィルの蛍光と細胞サイズが異なる 2 集団が認められた (Fig. 7B)。この結果により, 本株中に複数の分類群が混入している可能性も考えられた。しかしながら, 本研究の光学顕微鏡観察および分子データにより, 本株は単藻株であることが確認された (Fig. 4D, Table 2)。本株が所属すると推定されるオオキスティス科の栄養細胞は, 無性生殖時に自生胞子嚢を形成することが報告されている (Štenclová *et al.* 2017)。従って, FCM により観察された 2 集団は, 栄養細胞 (クロロフィル蛍光値小・細胞サイズ小) と自生胞子嚢 (クロロフィル蛍光値大・細胞サイズ大) に対応していると推定した。栄養細胞と自生胞子嚢間で Nile Red 蛍光値に大きな差がみられなかった理由としては, 栄養細胞と自生胞子嚢の脂質総量がほぼ同じである可能性が考えられた。

NIES-4411 株はバイオマス生産能と Nile Red 蛍光値で推定される脂質生産能がともに高かった。本株はゲート [a] から分離され, 分離時に期待された性質を備えた株を単離できた。既存株と比較したところ, NIES-4411 株のバイオマス生産能は, 高い増殖性能をもつことで知られる *C. sorokiniana* (Lammers *et al.* 2017) に匹敵した。一方, ゲート [b] から分離した NIES-4412 株は, バイオマス生産性では NIES-4411 株に類似していたが, Nile Red 蛍光値に関しては NIES-4411 株の 1/3 程度であった。この結果は, NIES-4412 株は分離時において, 野外試料中に共存していたほかの生物との相互作用により脂質生産に関する代謝が活性化されていた可能性な

ど, 外部環境の違いによる要因が示唆された。ゲート [c] から分離された NIES-4413 株は, バイオマス生産性は低かったが, Nile Red 蛍光値で推定される脂質生産能に関しては最大約 8,000 NRF/mL を示した (Fig. 5C)。Nile Red 蛍光強度を指標にしたソーティングにおいて, Nile Red 蛍光強度の高いゲートから分離した株は, 株化した後も 1 細胞あたりの Nile Red 蛍光強度が高いことが示唆された。ただし, 培養液あたり (NRF/mL) で比較した場合, 野生集団内の表現型と培養株の表現型の乖離も認められた。今後, 意図した形質をもつ株をより正確にソーティングできるよう, 広範な分類群を用いて分離時の培養年齢やゲーティングの最適化を検討する必要がある。

藻類由来脂質の生産にかかるコストを低減する取り組みは多いが, 様々な課題が山積している (Scott *et al.* 2010, Vassilev & Vassileva 2016)。通常, 藻類において脂質生産を誘導する場合には栄養塩制限培地を使うが, このような条件では脂肪酸系の脂質生産性が増大する代わりに藻類の生育が著しく阻害される二律背反的な性質 (トレードオフ) が知られている (Mairet *et al.* 2011, Adams *et al.* 2013, Mizuno *et al.* 2013)。コスト削減には, 脂質生産性とバイオマス生産性に関する二律背反の性質を変えることが必須であり, そのための取り組みとして, 分子生物学的・ゲノム科学的アプローチによる研究が行われ, 近年, 多くの知見が蓄積されつつある。例えば, *C. reinhardtii* のリン欠乏応答性糖脂質合成遺伝子プロモーターと油脂合成遺伝子を結合して *Nannochloropsis oceanica* S. Suda & Miyashita に導入することで, 生育を維持しつつ脂質の蓄積を増強できることが報告されている (Iwai *et al.* 2015)。一方で, 藻類の進化系統的な多様性に着目したアプローチとして, 今後も自然界からバイオマスや脂質生産性の点でより優れた性質をもつ系統を探索することも必要であろう。緒言でも言及したように, フローサイトメトリーを利用した微細藻類の分離方法は, 近年, 徐々に用いられるようになってきており, その有効性が注目されている。本研究で分離された新規株の中には, バイオマス生産性に関して既存の NIES 株に匹敵する株も見つかっており, 本手法の有効性を改めて確認することができた。今後は培養条件, 分離条件, 染色条件の更なる検討や, より広範な分類群を対象として研究を進めることで, より効率的かつ多様な有用微細藻類の分離が可能になることが期待される。

謝辞

本研究を行うに当たり, 国立環境研究所微生物系統保存施設の森史氏, 石本美和氏, 湯本康盛氏には株の分譲と寄託でサポートいただいた。また, 国立環境研究所環境ゲノム科学研究推進室の中嶋信美室長にはゲノム解析器機の使用においてサポートしていただいた。上記の皆様へ深く感謝の意を表す。本研究の一部は, JST 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム (OPERA) および AMED の課題番号 JP19km0210117 の支援によって実施された。

引用文献

- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L. & Bugbee, B. 2013. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour. Technol.* 131: 188–194.
- Andersen, R. A. & Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. In: Andersen, R. A. (ed.) *Algal Culturing Techniques*. pp. 83–100. Elsevier Academic Press, London.
- Davis, R., Aden, A. & Pienkos, P. T. 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Appl. Energy*. 88: 3524–3531.
- de la Jara, A., Mendoza, H., Martel, A., Molina, C., Nordström, L., de la Rosa, V. & Díaz, R. 2003. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii*. *J. Appl. Phycol.* 15: 433–438.
- Doan, T.-T. Y. & Obbard, J. P. 2011. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* 23: 895–901.
- Fawley, M. W. & Fawley, K. P. 2004. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *J. Phycol.* 40: 223–225.
- Georgianna, D. R. & Mayfield, S. P. 2012. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488: 329–335.
- Gorman, D. S. & Levine, R. P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54: 1665–1669.
- Hasegawa, N., Nakamura, I. T., Ueno, T. *et al.* 2019. Detection of circulating sarcoma tumor cells using a microfluidic chip-type cell sorter. *Sci. Rep.* 9: 20047.
- Huss, V. A. R. & Sogin, M. L. 1990. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J. Mol. Evol.* 31: 432–442.
- Ichimura, T. 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In: Nishizawa, K. (ed.) *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*. pp. 208–214. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Iwai, M., Hori, K., Sasaki-Sekimoto, Y., Shimojima, M. & Ohta, H. 2015. Manipulation of oil synthesis in *Nannochloropsis* strain NIES-2145 with a phosphorus starvation-inducible promoter from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Microbiol.* 6: 912.
- Lammers, P. J., Huesemann, M., Boeing, W. *et al.* 2017. Review of the cultivation program within the National Alliance for Advanced Biofuels and Bioproducts. *Algal Res.* 22: 166–186.
- Katayama, T., Kishi, M., Takahashi, K., Furuya, K., Wahid, M. E. A., Khatoon, H. & Kasan, N. A. 2019. Isolation of lipid-rich marine microalgae by flow cytometric screening with Nile Red staining. *Aquac. Int.* 27: 509–518.
- Kim, H. T., Guzman, A. R., Thapa, H. R., Devarenne, T. P. & Han, A. 2016. A droplet microfluidics platform for rapid microalgal growth and oil production analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 113: 1691–1701.
- Krienitz, L., Bock, C., Dadheech, P. K. & Pröschold, T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia* 50: 89–106.
- 小林雅之・鈴木宏明 2018. マイクロ流路チップを用いた細胞解析・操作技術. *精密工学会誌* 84: 883–886.
- Kato, S. 1982. Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrh. (Euglenophyceae). *Jpn. J. Phycol.* 30: 63–67.
- Kulakova, N. V., Kashin, S. A. & Bukin, Y. S. 2020. The genetic diversity and phylogeny of green microalgae in the genus *Choricystis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) in Lake Baikal. *Limnology* 21: 15–24.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T. & Sciandra, A. 2011. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresour. Technol.* 102: 142–149.
- Manandhar-Shrestha, K. & Hildebrand, M. 2013. Development of flow cytometric procedures for the efficient isolation of improved lipid accumulation mutants in a *Chlorella* sp. microalga. *J. Appl. Phycol.* 25: 1643–1651.
- Maw, M. M., Pan, X., Peng, Z., Wang, Y., Zhao, L., Dai, B. & Wang, J. 2018. A changeable lab-on-a-chip detector for marine nonindigenous microorganisms in ship's ballast water. *Micromachines* 9: 20.
- 松井祐輝・直江道夫・太田実香ら 2018. 血中循環腎癌細胞回収について On-chip Sort® と ClearCell FX® システムとの比較検討. *昭和学術雑誌* 78: 142–148.
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K. *et al.* 2013. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresour. Technol.* 129: 150–155.
- 宮下英明・荒谷彰吾・井村綾子・沈元・石井健一郎・神川龍馬 2017. 次世代微細藻類バイオマス生産法とそれに適した微細藻類の収集・選抜. *日本エネルギー学会機関誌えねるみくす* 96: 40–49.
- Nakada, T., Suda, S. & Nozaki, H. 2007. A taxonomic study of *Hafniomonas* (Chlorophyceae) based on a comparative examination of cultured material. *J. Phycol.* 43: 397–411.
- Nakazawa, A. & Nozaki, H. 2004. Phylogenetic analysis of the tetrasporalean genus *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Jpn. Bot.* 79: 255–261.
- Ota, Y., Saito, K., Takagi, T., Matsukura, S., Morita, M., Tsuneda, S. & Noda, N. 2019. Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort) as a high-throughput screening method for environmental bacteria with various growth rates. *PLoS One* 14: e0214533.
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J. & Smith, A. G. 2010. Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 277–286.
- Štenclová, L., Fučíková, K., Kaštokský, J. & Pažoutová, M. 2017. Molecular and morphological delimitation and generic classification of the family Oocystaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 53: 1263–1282.
- Su, Y., Song, K., Zhang, P., Su, Y., Cheng, J. & Chen, X. 2017. Progress of microalgal biofuel's commercialization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 74: 402–411.
- 武田一男・藤村裕・神間史恵 2011. 使い捨てマイクロ流路チップによりコンタミネーションフリーかつバイオセーフティー計測に適した新しい小型フローサイトメーターの開発. *サイトメトリーリサーチ* 21: 43–50.
- Takeshita, T., Takeda, K., Ota, S., Yamazaki, T. & Kawano, S. 2015. A simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. *Cytologia* 80: 475–481.
- Vassilev, S. V. & Vassileva, C. G. 2016. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. *Fuel* 181: 1–33.
- Velmurugan, N., Sung, M., Yim, S. S., Park, M. S., Yang, J. W. & Jeong, K. J. 2013. Evaluation of intracellular lipid bodies in *Chlamydomonas reinhardtii* strains by flow cytometry. *Bioresour. Technol.* 138: 30–37.
- Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S. & Zachleder, V. 2015. Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* 33: 1204–1218.
- Watanabe, M., Serizawa, M., Sawada, T. *et al.* 2014. A novel flow cytometry-based cell capture platform for the detection, capture and molecular characterization of rare tumor cells in blood. *J. Transl. Med.* 12: 143.

(Received June 24, 2020; Accepted August 12, 2020)