

「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」
平成 21 年度採択研究代表者

H23 年度
実績報告

田中 剛

東京農工大学大学院工学研究院・准教授

海洋微細藻類の高層化培養によるバイオディーゼル生産

§ 1. 研究実施体制

(1) 「微細藻類分子育種」グループ

① 研究代表者: 田中 剛 (東京農工大学大学院工学研究院、准教授)

② 研究項目

- ・ *Fistulifera* 属の全ゲノム解析
- ・ 遺伝子組み換え系の確立・最適化
- ・ トリグリセリド合成代謝経路の解析

(2) 「高層化培養」グループ

① 主たる共同研究者: 佐藤 朗 (ヤマハ発動機(株) 技術本部・研究開発統括部、主査 (事業推進統括部・新規事業推進部・ライフサイエンス部、主務))

② 研究項目

- ・ 中規模リアクタでの培養条件の最適化

(3) 「LCA・プロセス」グループ

① 主たる共同研究者: 松本 光史 (電源開発(株) 若松研究所、主任研究員)

② 研究項目

- ・ 屋外大型培養槽による培養実証実験
- ・ LCA評価

(4) 「計算機解析」グループ

① 主たる共同研究者: 藤渕 航 ((独)産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター、研究チーム長)

② 研究項目

- ・ 遺伝子ネットワーク解析

・代謝パスウェイ解析

§ 2. 研究実施内容

研究概要

本研究は、バイオディーゼル燃料の原料となるトリグリセリドを高含有する海洋微細藻類 *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株の全ゲノム解析及びトリグリセリド生産関連酵素、転写基本因子、転写調節因子、共役経路を統合的に理解し、バイオディーゼル生産の理論限界を把握することを大目的とする。同時に、遺伝子組み換え系を確立し、同株を海洋微細藻類におけるバイオディーゼル生産標準株として世界的に発信する。さらに、ライフサイクルアセスメント(LCA)を実施し、実用化レベルでのバイオディーゼル製造プロセスの構築を行う。また、高層化培養システムを利用して、均質かつ安定供給可能なバイオディーゼル生産システムの構築を目指す。

平成 23 年度では、RNA-seq データより、トリグリセリド蓄積時に有意に発現する 3 種類の転写因子候補遺伝子を特定した。また、遺伝子組換えにより、脂肪酸合成関連遺伝子の変異株 3 種を取得した。中規模リアクタ(10 ~ 50 L)を用いた培養条件の最適化により、これまでの最高値となる 8 g dry weight /L を達成した。一方で、200 L スケールの屋外培養槽を用いた培養実証実験を行い、エネルギー収支比(EPR)の評価を行った。また、投入エネルギーに自然エネルギーを活用し、藻体収量及びオイル含有量を向上することができれば、少なくとも ERP を 1.1 以上達成可能なことが示唆された。

本年度研究実施内容

一 遺伝子ネットワーク解析

計算機解析グループと微細藻類分子育種グループでは、全ゲノムの構造解析及び mRNA の網羅的解析に着手した。既報の紅藻 *G. sulphuraria* を参照モデルとして遺伝子予測プログラム AUGUSTUS を実行し、19,859 個の遺伝子を推定した。この数は、上記 *P. tricornutum* (10,402 遺伝子)と *T. pseudonana* (11,776 遺伝子)の約 2 倍であることを確認した。また、トリグリセリド蓄積時に特異的に発現している遺伝子群の特定を目的として、栄養条件と培養時間の違いに基づく 10 回の RNA-seq データより、統計学的手法によって、トリグリセリド蓄積時に有意に発現する遺伝子の推定を行った。その結果、既報の転写因子ホモログは発現していなかったが、推定した遺伝子群には 3 種類の転写因子候補遺伝子が含まれていたことから、JPCC DA0580 株におけるトリグリセリド産生・蓄積にはこれらの転写因子による遺伝子発現制御が関与している可能性が高いことが示唆された。

一代謝パスウェイ解析

推定遺伝子について比較ゲノム解析を行ったところタンパク質ファミリー数は 2,870 であり、分裂酵母 *S. cerevisiae* (2,910 ファミリー)に近いことが分かった。さらに、系統比較から、1) JPCC DA0580 ゲノムは多くのタンパク質ファミリーを他の生物種と共有している、2) 既報ゲノムの遺伝子アノテーション情報を活用できる、ことを確認した。脂肪酸関連酵素に特化した HMM プロファイルを独自作成し、72 個の合成酵素遺伝子を網羅推定した。さらに推定した遺

伝子から代謝経路多価不飽和脂肪酸合成経路とトリグリセリド合成経路を再構築した。その結果、1) 本ゲノムには植物由来の脂肪酸不飽和化酵素をもっており、独自に多価不飽和脂肪酸が合成可能であることと、2) 既知の油滴生成関連タンパク質が存在していないこと、が明らかになった。

一 遺伝子組み換え系の確立・最適化

昨年度までにバイオディーゼル燃料生産性の向上や遺伝子の機能解析を目的として、パーティクルガン法による遺伝子組換え技術の確立を行った。パーティクルガン法の条件検討により得られた形質転換体をサザンブロットにより評価した結果、導入遺伝子がゲノム中に挿入されていることが示された。本評価により、当該株に対して遺伝子導入が可能であり、ゲノム中に外来遺伝子の挿入が達成されていることが確認された。さらに、トリグリセリドの高品質化に向けた遺伝子組換え体を作成し、脂肪酸合成関連遺伝子の変異株 3 種を取得した。

一 中規模リアクタでの培養条件の最適化

前年度までの研究成果である 1 L 培養規模での最適培養条件を用いて、本年度はまず 10 L 培養規模でのリアクタ幅(ライトパス)の検討を行った。その結果、ライトパス 4、8 及び 12 cm のリアクタにおいて、それぞれ、1.1、0.7 及び 0.5 g dry weight /L/day の生育速度が得られた。4 及び 8 cm ライトパスのリアクタではそれぞれ培養 3 日および 5 日後に 4 g dry weight /L 以上の細胞密度に到達した。また、これら 4 及び 8 cm リアクタでは、培地中の硝酸がそれぞれ培養 5 日及び 8 日後には検出限界以下まで消費され、細胞内でのオイルの蓄積が観察された。そこで次に、最適化の最終段階として、ライトパス 4 cm のリアクタ(50 L スケール)において藻体およびオイル生産性の評価を行った。

その結果、本藻は 50 L スケールにおいても、培地中窒素が枯渇する培養開始後 4 日目までは約 1 g dry weight /L/day の速度で生育し、培養 14 日目に 8.2 g dry weight /L の細胞密度に達した(図1)。その時のオイル含量(ヘキササン抽出画分)は乾燥重量の 50%であった。以上から、本年度においては、本藻の生産性について、50%という高いオイル含量を有する藻体を、8 g dry weight /L を超える細胞密度で、14 日間で生産可能であることが実生産予見性のあるスケールにおいて実証された。

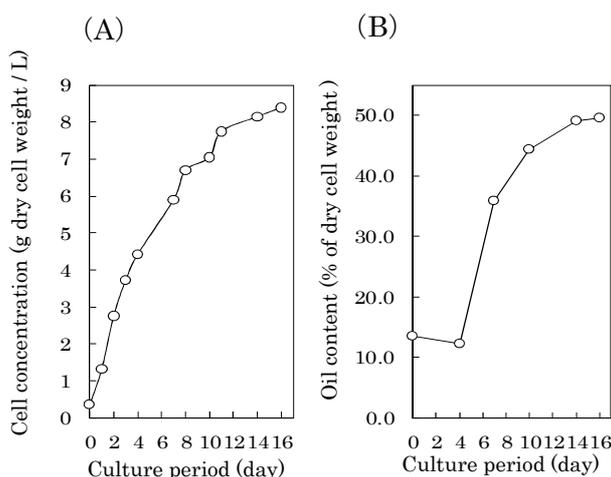


図1 50 Lスケールにおける最適化条件下での JPCC DA0580 株の生産性評価
(A) JPCC DA0580 株の生育曲線
(B) 培養経過に伴う細胞内オイル含量の増加量

一 屋外大型培養槽による培養実証実験

LCA・プロセスグループでは、屋外での JPCC DA0580 株のバイオマス生産性評価に向けて、電源開発株式会社若松研究所内において 200 L スケールのレースウェイ型及びカラム型のリアクタを用いて年間(4 月～11 月)を通じた屋外培養を実施した。さらに、屋外培養リアクタにおける当該株を用いたバイオマス生産性を EPR により評価した。総バイオマス量とオイル含量より獲得可能なエネルギーを算出し、投入電力量に対する EPR を算出した。現在得られている培養結果を表1に示す。藻体生産については両リアクタで、1 週間培養当たり 0.3g(乾物)/L 程度得られることが確認された。また、JPCC DA0580 株は 4 月～11 月にかけて屋外培養できることが確認された。さらに、両リアクタを用いて反復回分培養を実施し、1 ヶ月間安定的に藻体生産、オイル生産が行えることも確認した。

藻体内のオイル含量はカラム型リアクタを用いることで 30.3%とレースウェイ型リアクタの 11.3%に比べて高いことが示された。一方で、EPR による評価ではレースウェイ型リアクタが 0.05 であり、カラム型リアクタの EPR 0.01 に比べ高いことが示された。攪拌及び通気方法の違いにより、投入エネルギー量と獲得エネルギー量の比に差が生じている。今後、屋内高密度培養にて使用した最適化培地(改変 271 培地)を屋外培養に用い、バイオマス量とオイル含量の増加や、太陽光発電などの自然エネルギーを培養時の投入エネルギーとして利用することにより、少なくとも EPR = 1.0 以上を達成できるものと見込まれる。

以上のことから、本年度ではレースウェイ型、カラム型培養装置による屋外での JPCC DA0580 株の屋外で安定的に連続な培養が行なえることを確認した。次年度は培養時投入エネルギーとして自然エネルギー投入を組み込み、エネルギー収支の改善、更なる藻体生産・オイル生産性向上を図る予定である。

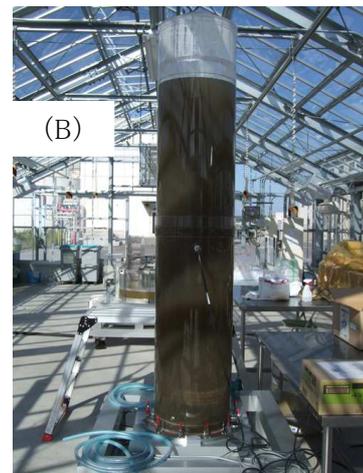
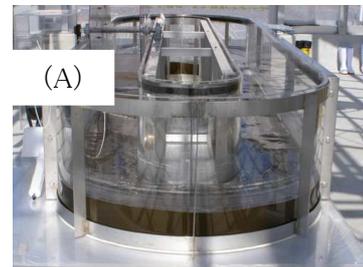


図2 屋外培養槽(200 L)
A: レースウェイ型培養槽
B: カラム型培養層

表1 各リアクタを用いた屋外培養による生産性比較

| | バイオマス 生産量 (g/L) | オイル含量 (%) | 藻体生産性 (g/m ² /day) | 藻体生産性 (g/L/day) | 投入電力量 (kwh) | EPR |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|----------------------------------|--------------------|----------------|------|
| レースウェイ型(平均*) (H23.8.29-9.10) | 0.3 | 11.3 | 8.2 | 0.07 | 1.9 | 0.05 |
| カラム型 (H23.10.12-10.19) | 0.3 | 30.3 | 7.0 | 0.05 | 15.5 | 0.01 |
| オープンポンド | 0.1 | 5-10 | - | - | - | - |

(*Run 3-5の平均)

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Sachiyo Aburatani; “Application of Structure Equation Modeling for inferring a serial transcriptional regulation in yeast”, *Gene Regulation and Systems Biology*, vol.5, pp.75-88, 2011, (DOI: 10.4137/GRSB.S7569)