

「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

田中 剛

東京農工大学大学院共生科学技術研究院・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. 研究実施の概要

本研究では、バイオディーゼル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 *Navicula* 属 JPCC DA0580 株の全ゲノム解析、遺伝子組み換え系を確立することで、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。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。本年度は、JPCC DA0580 株のゲノム DNA に対して高速 DNA シークエンス解析を行い、全長のシークエンスを完了した。一方で、珪藻での遺伝子発現用ベクターを構築し、パーティクルガン法による遺伝子導入が可能であることを確認した。また、回分培養条件の検討を行った結果、本研究実施前の先行実績値に対し、約 10 倍のバイオマス生産性を達成し、本研究プロジェクトの目標値を回分培養では実現可能であることを示した。今後は、次年度に設置する屋外培養施設での実証実験に着手する。さらに、DNA シークエンスデータを基にトリグリセリド生産と関連因子の同定及び共役経路を解析し、バイオディーゼル生産機構の統合的な把握を行うとともに、遺伝子組み換え系を利用したトリグリセリド高生産株の作出を開始する。

### § 2. 研究実施体制

#### (1) 微細藻類分子育種グループ

- ① 研究分担グループ長: 田中 剛 (東京農工大学、准教授)
- ② 研究項目

1. *Navicula* 属の全ゲノム解析
2. 遺伝子組み換え系の確立・最適化
3. chemical mutant の取得
4. トリグリセリド合成関連遺伝子の探索

(2) 高層化培養グループ

①研究分担グループ長:佐藤 朗 (ヤマハ発動機株式会社、主務)

②研究項目

1. 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研究分担グループ長:松本 光史 (電源開発株式会社、主任研究員)

②研究項目

1. リアクタの設計 (粗放型屋外培養槽及び培養室設計)
2. 新規微細藻類遺伝子資源の探索

### § 3. 研究実施内容

#### *Navicula* 属の全ゲノム解析／トリグリセリド合成関連遺伝子の探索

IMK 培地中で培養した珪藻 *Navicula* 属 JPCC DA0580 株(以下、JPCC DA0580 株)( $1.4 \times 10^{10}$  cells)から核酸抽出後、塩化セシウム密度勾配遠心法により DNA 精製を行った。得られた核ゲノム、ミトコンドリアゲノム及び葉緑体ゲノムを Genome Sequencer FLX System により解析し、全長のシーケンスを完了した(解析総塩基数:1.24 Gbp)。アセンブリの結果、総コンティグ数:約 4000、Scaffold 数:約 300 となり、全ゲノムサイズが約 50 Mbp(GC 含量:46 %)であると推定された。既報の珪藻全ゲノム解析の結果、*Phaeodactylum tricornutum* では 27.4 Mbp、*Thalassiosira pseudonana* では 32.4 Mbp(Nature (2008) 456,239)であることから、本株のゲノムサイズが著しく大きいことが分かった。今後は得られたドラフトシーケンスから遺伝子マッピング、代謝経路の解析を進める予定である。

#### 遺伝子組み換え系の確立・最適化

JPCC DA0580 株への遺伝子導入法としてパーティクルガン法を採用し、形質転換評価用のプラスミドベクターを構築した。安定形質転換株の取得のために pSP73(Promega 社)に対して、マーカー遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子または GFP 遺伝子)、*fcpAt* 遺伝子(フコキサンチン-クロロフィル a/c 結合タンパク質ターミネーター)を導入した。JPCC DA0580 株において活性をもつプロモーターを選択するために、マーカー遺伝子上流に、*fcpBp*(*P. tricornutum* のフコキサンチン-クロロフィル a/c 結合タンパク質プロモーター)、CaMV 35S (カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター)または *PRSV-LTR* (ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモーター)をそれぞれ導入した 3 種類のベクターを構築した。これまでに、金コロイドサイズ: 0.6  $\mu\text{m}$ 、圧力: 1,500psi の条件下、*fcpBp* プロモーターを用いた場合に GFP 遺伝子の導入／発現が確認されている。

## chemical mutant の取得

光合成効率の向上した chemical mutant の取得に向けて、アルキル化剤(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、エチルメタンスルホン酸(EMS))を用いた JPCC DA0580 株の変異株の取得を行った。様々な濃度のアルキル化剤を藻体懸濁液に添加し、インキュベーションした後、f/2 寒天培地で培養を行い、変異株の取得条件を評価した。EMS においては 2~3%、30 分、NTG においては 20~30  $\mu\text{g/ml}$ 、30 分処理することで、コロニー形成率が 10% 以下となり、十分なアルキル化剤の曝露条件であることが示唆された。現在までに同条件下でコロニー形成した約 200 種の藻体について、生育速度、最終菌体到達濃度、光合成活性の評価を行う予定である。

## 中規模リアクタでの培養条件の最適化

次年度以降の大量培養に先立ち、JPCC DA0580 株の基本的な生育特性をリッター規模で調べ、培養条件の最適化を図ることを目的とした。f/2 培地を用いた寒天培地上に生育した本株の一部を 100 ml の f/2 液体培地に接種し、前培養を行った。対数増殖期にある前培養液を収穫し、乾燥重量を測定後、数百 ml から 1 リッター規模の成育試験に供した。生育試験には扁平培養瓶を用い、25°C、光強度  $300 \mu\text{mol photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (白色蛍光灯)、2%  $\text{CO}_2$  を含む空気を培地 1 リッターに対して 0.7 L/min の流速で通気して培養を行った。培地組成の影響について調べた結果を図 1 に示す。本生育試験では、先行研究において用いられている f/2 培地、本研究で f/2 培地を基に改変した改変 f 培地、及び、当該機関において他の微細藻類株の培養に実績のある改変 271 培地、の 3 種類

を比較した。f/2 培地を用いた場合の 1 週間後の細胞密度は約 1.2 g dry weight/L であり、先行研究における 0.46 g dry weight/L に比べ 2.6 倍程度高い細胞濃度が得られた。改変 f 培地および改変 271 培地ではそれぞれ 2.7 および 4.6 g dry weight/L の細胞密度が得られた。この他、培養温度については 25°C が最適温度であること、また、培地 pH については pH7 以上で良好な増殖が得られることなどを見出した。以上の結果より、改変 271 培地を用いて先行数値の約 10 倍のバイオマス生産性を達成した。今後、他の培養条件( $\text{CO}_2$  濃度、明暗周期)の影響、オイル誘導条件などについても調べていく予定である。

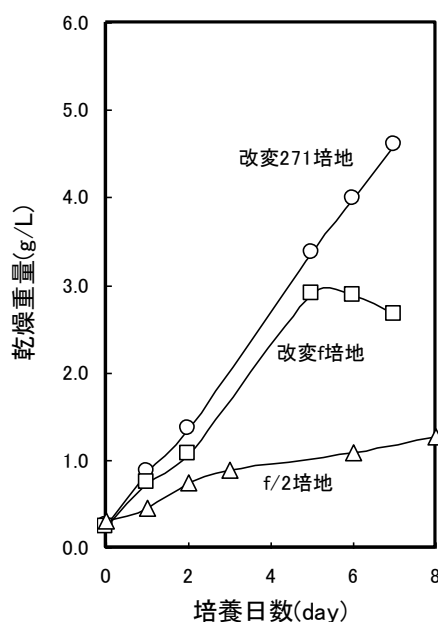
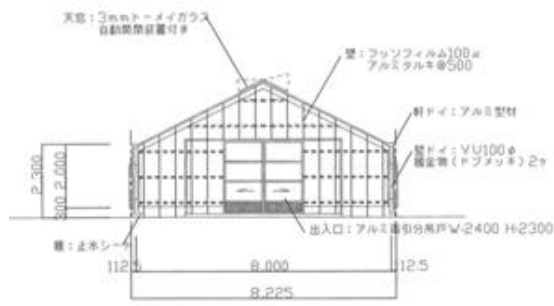


図 1 JPCC DA0580 株の生育 (バイオマス生産性) に及ぼす培地の影響

## リアクタの設計(粗放型屋外培養槽及び培養室設計)

次年度からの屋外での JPCC DA0580 株の培養特性評価(オイル生産性、バイオマス生産性など)に向けて、培養温室(図2)、及び 350L クラスの粗放型培養槽(レースウェイ型培養槽) (図3)を設計した。これらの培養施設は、平成 22 年度に北九州市若松区内 電源開発株式会社若松研究所内に設置する予定である。



1. 建屋面積: 約130m<sup>2</sup>  
寸法: 高さ4.3m、幅8.225m、長さ15.75m
2. 建屋仕様  
鉄骨アルミ  
天井: 網目ガラス  
外壁: ビニール  
床面: コンクリート  
天窓稼動式  
温調20℃以上

図 2 屋外培養温室概要

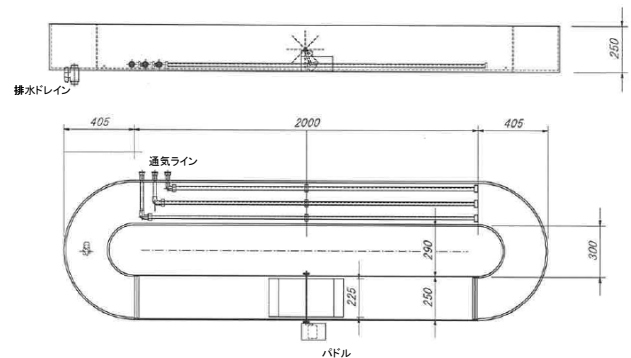


図 3 粗放型培養槽(レースウェイ型培養槽)の設計

## 新規微細藻類遺伝子資源の探索

電源開発株式会社が保有する海洋微生物のカルチャーコレクションのうち、未試験であった約 900 株の微細藻類を対象に、中性脂質を高生産する株の獲得を試みた。試験した株の内、約 4 種の微細藻類において、藻体内に顕著な中性脂質蓄積が確認された。各藻体のオイル含量を評価した結果、JPCC DA0580 株の 60%(weight/dry cell weight)と同等以上の生産性を有する株は見いだされなかった。これまで見いだされている 2 種を含めて、合計 6 種の中性脂質高生産株が得られたことになり、今後、これら微細藻類から中性脂質合成に関わる遺伝子の選抜、スクリーニングを行う予定である。