

近藤 昭彦

神戸大学大学院工学研究科・教授

## 海洋性藻類からのバイオエタノール生産技術の開発

### §1. 研究実施の概要

#### 1. 研究のねらい

食用として商業生産されているスピルリナ *Spirulina platensis* およびその海産種 *Spirulina subsalsa* に加え、微細藻の一種である高耐塩性シネココッカス属種, *Synechococcus* sp. WH8102 株を対象として, 海水を用いた半閉鎖系培養施設での大量培養系の確立を目指す。また, システムバイオロジーに基づく改変微細藻の創出を達成するため, 当該株における安定した形質転換技術を確立するとともに, 光合成機能(①光捕集能, ②光エネルギーから化学エネルギー(ATP)への変換能, ③物質代謝能)や耐塩機構を強化することで, 環境変化に適応できるロバスタな性質を持ち, 増殖速度と CO<sub>2</sub> 固定速度が速く, かつバイオプロダクト高生産能を有する新規微細藻を創製することを目的とする。さらに, 細胞表層工学技術を利用して, 微細藻デンプン分解酵素を細胞表層に提示したアーミング酵母を作出し, アーミング酵母を用いた藻類デンプンからの糖化・発酵プロセスを確立することにより, 高収率かつ低コストなエタノール生産システムを構築することを目的とする。

#### 2. 研究の概要と進捗状況, 今後の見通し

本年度は, スピルリナ *Spirulina platensis* NIES-39 の高増殖および高密度培養に向けて, 低コストで閉鎖的または半閉鎖的に効率よく培養できる手法を検討し, 神戸大学内海域センターマリンサイトの屋外水槽を利用して透明ポリプロピレン容器による培養実験を行った。その結果, 自然光・水面環境における閉鎖的培養で実験室環境と同程度の細胞成長を示すことを確認した。また, 連続培養装置の考案を視野に入れて, より効率的な藻体回収方法を検討し, 凝集剤を用いた前処理の後, フィルターろ過する方法, ナイロンメッシュ斜面上でろ過を行う方法などにより効率的に回収できることを確認した。今後は, 浮遊性シアノバクテリアである *S. platensis* NIES-39 の培養条件の検討をさらに進めるとともに, 培養空間の効率的な利用に向けて, 付着性シアノバクテリアで, かつ光合成に利用する光波長帯が異なる *S. subsalsa* などの効率的な育成をめざして, 至適培養条件の検討を行う。

また、システムバイオロジーに基づく改変微細藻の創出を達成するために、*S. platensis* の細胞内代謝物質を網羅的に定量することが可能な代謝プロファイリングシステムを整備し、解糖系、カルビン回路、アミノ酸生合成経路、光合成色素生合成経路などの代謝プロファイルを一望することが可能となった。また、*Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノムスケール代謝モデルを構築し、実験的に得られた代謝フラックスとの高い相関を得ることに成功し、*S. platensis* のゲノムスケール代謝モデル構築に着手している。また、常温常圧プラズマによる新規ゲノム迅速変異導入技術を検討し、増殖速度、糖含有量、凝集能力等を指標に優良変異体のスクリーニングを実施し、正変異体を得た。今後、変異体の特性解析を進める予定である。さらに、 $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼを細胞表層に提示させた形質転換酵母を用いることでスピルリナ粉体から直接エタノールを生産させることに成功した。今後は、培養工学的・代謝工学的アプローチによる微細藻のグリコーゲン生産能向上を目指し、グリコーゲン高生産株からのエタノール生産システムの開発に取り組む。

## §2. 研究実施体制

### (1) 「近藤昭彦」グループ

①研究分担グループ長:近藤 昭彦(神戸大学大学院工学研究科, 教授)

②研究項目

- ・藻類のシステムバイオロジー解析
- ・微細藻類からの効率的バイオエタノール生産

### (2) 「清水浩」グループ

①研究分担グループ長:清水 浩(大阪大学大学院情報科学研究科, 教授)

②研究項目

- ・藻類のシステムバイオロジー解析と代謝モデリング

### (3) 「邢新会」グループ

①研究分担グループ長:邢 新会(清華大学化工系, 教授)

②研究項目

- ・有用微細藻選抜に資する微細藻類新規ゲノム改変技術の開発

### (4) 「川井浩史」グループ

①研究分担グループ長:川井 浩史(神戸大学自然科学先端融合研究環内海域環境教育研究センター, 教授)

②研究項目

- ・海水環境における高増殖・高密度培養の技術開発
- ・形質転換技術の開発

**(5) 「三宅親弘」グループ**

①研究分担グループ長:三宅 親弘(神戸大学大学院農学研究科, 准教授)

②研究項目

- ・酸素への電子伝達反応の制御
- ・光化学系 I での循環的電子伝達反応の制御

**(6) 「秋本誠志」グループ**

①研究分担グループ長:秋本 誠志(神戸大学自然科学系先端融合研究環分子フォトサイエンス研究センター, 准教授)

②研究項目

- ・微細藻の光エネルギー捕集機能の評価と強化

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### (1) 近藤グループ(神戸大学)

##### 研究目的・方法

微細藻に含まれる代謝中間物質を網羅的に解析するシステムを構築し、野生株、変異バンク株、遺伝子組換え株を代謝レベルでプロファイリングするとともに、安定同位体炭素  $^{13}\text{C}$  を用いて代謝中間体を  $^{13}\text{C}$  標識することにより代謝ターンオーバーを実測することにより、物質生産を律速する代謝反応の特定を目指す。本年度は、微細藻中の代謝プロファイリングシステムを拡充し、水溶性代謝中間物質(糖、糖リン酸、有機酸、アミノ酸、補酵素等)および光合成色素化合物の一斉分析を可能にするとともに、ハイスループットな解析が可能なデータ解析システムを構築する。また、安定同位体である  $^{13}\text{C}$  を用いて細胞内代謝物質を  $^{13}\text{C}$  標識する手法の確立と、 $^{13}\text{C}$  標識率の経時測定により代謝ターンオーバーを定量化するシステムの構築を目指す。

また、微細藻が産生した多糖類(グリコーゲンなど)からのエタノール生産技術の開発を目標とし、微細藻由来グリコーゲンの分解に最適な酵素を選出し、当該酵素を酵母細胞表層に提示発現させることにより、糖化同時発酵によるバイオエタノール生産システムの確立を目指す。本年度は、 $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを細胞表層に提示した遺伝子組換え酵母を作出し、スピルリナ由来グリコーゲンからのエタノール生産を実施する。また、*S. platensis* の培養条件を検討し、藻体のグリコーゲン生産能を評価する。

##### 結論

#### 1) 藻類のシステムバイオロジー解析

*S. platensis* の代謝中間物質の正確な内生量を実測するために、細胞のクエンチング(代謝反応停止)や脱塩方法を検討し、微細藻の代謝プロファイリングに適したサンプル前処理法を確立した。また、水溶性代謝中間物質と光合成色素を網羅的に測定するためにキャピラリー電気泳動/質量分析系(CE/TOFMS)、および超高速液体クロマトグラフィー/質量分析系(UPLC/QTOFMS)を構築した。本分析システムを用いて、*S. platensis* 抽出物から解糖系、カルビン回路、TCA 回路、アミノ酸生合成経路、光合成色素など 100 種の代謝物の定量に成功し、昨年度と比べて網羅性を伴った代謝プロファイリングが可能となった。また、窒素欠乏による外的環境を変化させることでグリコーゲンの著しい増加(4.5 倍)および中間代謝物の著しい変動を観測し、それらの知見からグリコーゲン蓄積量増大への関与が示唆される数種の代謝経路を絞り込んだ。さらに、それらの代謝経路における律速段階を特定するために、 $^{13}\text{CO}_2$  を用いた代謝中間体のターンオーバー測定に着手した。

#### 2) 微細藻類からの効率的バイオエタノール生産

水系サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、グリコーゲン定量をハイスループット化し(40 サンプル/day)、さらに *S. platensis* が産生するグリコーゲンの分子構造を解析できる分析系を開発した。

*S. platensis* 磨砕粉末 150 g/L を炭素源として、7.5 g/L のエタノール生産に成功している。本年度は更なる生産量向上のために、培養条件の最適化により *S. platensis* のグリコーゲン生産能を向上させた。特に培養光強度を 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  から 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に増加させることにより、グリコーゲン生産速度を 0.02 g/L/day から約 8 倍の 0.16 g/L/day に向上させた。

## (2) 清水グループ(大阪大学)

### 研究目的・方法

海洋藻類の有用物質生産宿主としての性能を高度化するためには「オミクスを高度に活用した合理的生産プロセスの探索」が必要である。ゲノムや細胞内の代謝物質の量の情報などをもとに現状の細胞の特徴を把握するとともに、変化を与えることによってそのような改変が行えるかを予測し、また、実際に改変を行った結果を予測と照らし合わせることで、現状の細胞の状態を捉え直し、さらなる改良を加えるための基盤とすることが望まれる。本研究においては、微細藻の  $\text{CO}_2$  固定能を変化させるなどといった遺伝子ネットワークに変動を与えた際に、どのように代謝が変化し、有用物質生産能が変化するかを予測するシステムと実際にどのように変化したのかを評価するシステムの構築を目指すこととする。これらのシンセティックバイオエンジニアリングを用いて有用物質生産の能力を飛躍的に高める株を構築することを目的とする。

### 結論

本年度においては、昨年度原形を構築した微細藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のゲノムスケール代謝モデルについて、データベースおよび文献の詳細情報を導入し精度の向上を行った。光合成を含む中枢代謝経路、アミノ酸合成経路、核酸合成経路などを含む 463 の代謝物質と 526 代謝反応を持つ代謝モデルを構築した。このゲノムスケール代謝モデルを用いた代謝シミュレーションの結果を検証するために、 $^{13}\text{C}$  標識基質を用いた代謝フラックス解析の文献値との対応を解析した。その結果、今回構成したモデルによるシミュレーション結果は、データが存在する従属栄養増殖条件(グルコースを炭素源とする条件)と混合栄養増殖条件(光合成による  $\text{CO}_2$  固定とグルコースの双方を炭素源とする条件)の 2 条件において、実験的に得られたフラックス(Yang *et al.*, *Metab eng.* 2002)と比較的良好な相関を示すことが見出された。

微細藻類のシミュレーションを行うゲノムスケール代謝モデルの構築が可能であることが確認されたので、本研究プロジェクトの中心的微細藻類である海洋性微細藻類 *Spirulina platensis* NIES-39 についてゲノム情報をもとに、モデルの構築を行っている。現在 432 反応を含むモデルのプロトタイプが構築されてきている。ゲノム情報の比較解析により *Synechocystis* sp. PCC6803 および *Spirulina platensis* NIES-39 のゲノムの差異を含んだモデルが作成されつつある。

また、*Synechocystis* sp. PCC6803 の培養を行って代謝産物を抽出、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による計測方法を確立し、 $^{13}\text{C}$  標識化合物を取りこませた際の代謝物質中の  $^{13}\text{C}$  濃縮度に対して代謝状態に依存した差異が現れることを捉えることに成功した。また、中枢代謝経

路を表現するための中枢代謝経路の代謝分子の原子マッピングアルゴリズムの開発をおこなっている。キャピラリー電気泳動質量分析計(CE/MS)を用いた *Synechocystis* sp. PCC6803 のメタボロミクスデータを取得した。神戸大近藤グループにより取得された *Spirulina platensis* NIES-39 のメタボロミクスデータとあわせて比較解析を行い、両方のゲノムスケールモデルの妥当性を確認するとともに細胞の代謝状態を議論するための方法の確立を行っている。

### (3) 邢グループ(清華大学)

#### 研究目的・方法

新規ゲノム迅速変異—常圧常温プラズマ(ARTP)を用いて微細藻類新規ゲノム改変技術を開発するのがこの研究の目的である。

#### 結論

本年度は ARTP の操作条件と微細藻遺伝子変異操作条件の確立と同時に、変異体のスクリーニング方法を検討した。主要な結果を以下にまとめた。

#### 1) ARTP のプラズマの分光特性

アルゴンをワーキングガスとした ARTP で分光光学スペクトル(optical emission spectra, OES)と電子励起温度の特性を研究した。ARTP は  $\alpha$  と  $\gamma$  の形態放電では RF(Radio frequency) パワーインプットが増加すると電子励起温度が高くなった。 $\gamma$  形態の放電の場合、電子励起温度が相対的に低いが、ガス流量が上がると、プラズマの相対放射強度も増加した。 $\alpha$  形態の放電の場合、ガス流量が高くなると電子励起温度も増加したが、プラズマの相対放射強度の変化パターンが複雑になった。

#### 2) 保護シリンダーと底板が ARTP の放射特性に及ぼす影響

アルゴンガスを用いた ARTP 発生条件下で、固体保護シリンダーと底板による ArI695.5 nm の放射強度の空間分布への影響について調べた。固体保護シリンダーと底板がプラズマ温度と化学的活性スピシスの空間分布に顕著な影響を与えた。ガスの流速と RF パワーインプットが上がると、ArI695.5 nm の放射強度が増加したが、同じ条件で固体保護シリンダーがプラズマ発生領域周りの空気の巻き込みを抑えるため、ArI695.5 nm の放射強度の空間分布に顕著に影響を及ぼした。これらの研究結果は ARTP による微藻類変異操作条件の設定の参考値とした。

#### 3) *Spirulina platensis* の ARTP による変異と変異体スクリーニング方法の確立

予備実験結果では、固体培地を用いたコロニー形成方法は *S. platensis* の変異体を選択することが難しいことが判明した。そこで、マイクロプレートを用いて、ARTP による *S. platensis* の変異体の選択とスクリーニング方法を検討した。図1に示すように、96 ウェルプレートと 48 ウェルプレートを組み合わせて、マイクロプレートリーダーによって *S. platensis* 変異体の迅速スクリーニングを行った(図1)。

#### 4) He ガスを用いた ARTP による *Spirulina platensis* の変異特性

He ガスをワーキングガスとした ARTP によって *S. Platensis* の変異操作を行い、62 個 *S.*

*Spirulina platensis* の変異体をスクリーニングした。変異体の増殖速度, 糖含有量と凝集能力を調べた。62 個突然変異体の中で 16.1%が野生株より増殖速度が 20.0%以上, 32.3%の変異体が糖含有量が 20.0%以上増加し, 12.9%の変異体の凝集能力が野生株の 100.0%以上上昇した(図 2, 3, 4)。野生株の増殖速度より 20.0%以上上昇した変異率は正変異率と定義され, ARTP による *S. platensis* 正変異率は 26.1%に達した。

### 5) He との混合ガスを用いた ARTP による *Spirulina platensis* の変異操作

He ガスを主要なガスとして, 別のガスと混合したガスを用いた ARTP で *S. platensis* の変異を行った。He と N<sub>2</sub> (He:N<sub>2</sub>=99:1) の混合ガスおよび He と Ar (He:Ar=99:1) の混合ガスをそれぞれ用いた ARTP によって *S. platensis* を変異処理した結果, 42 個 *S. platensis* の変異体をスクリーニングできた。これらの混合ガスを用いた ARTP による変異体の増殖速度分布は He のみの ARTP で得られた変異体と異なった傾向を示した。He と Ar の混合ガスを用いた ARTP で処理した細胞の回復には長い時間を要した。

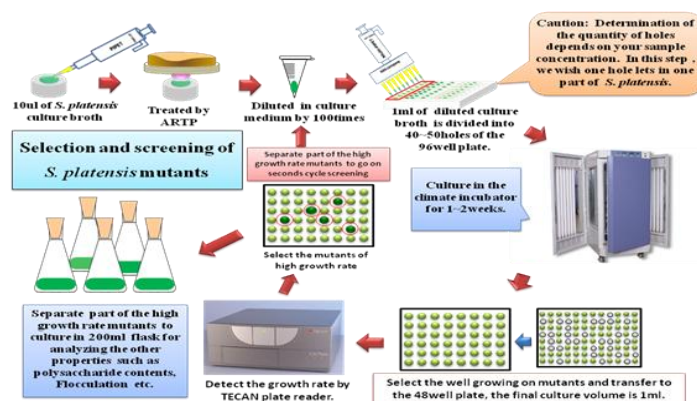


図 1. Experimental protocol of selecting and purifying *S. platensis* mutants.

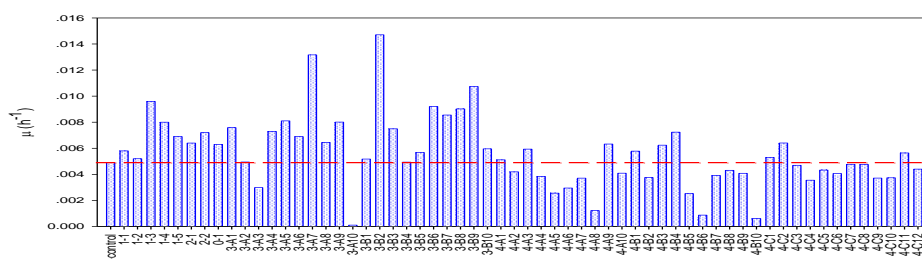


図 2. Specific growth rate of 62 mutants treated by the helium ARTP.

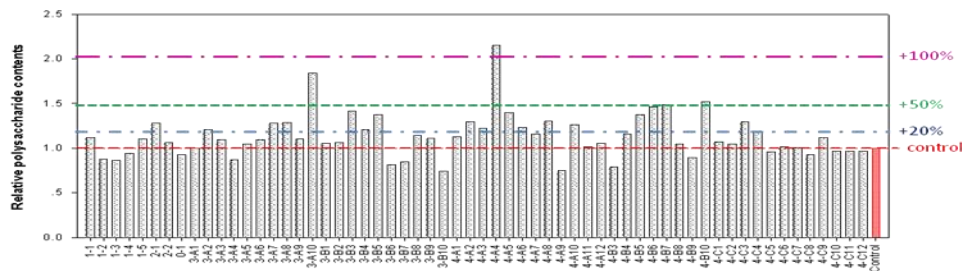


図 3. Polysaccharide contents of 62 mutants treated by the helium ARTP.

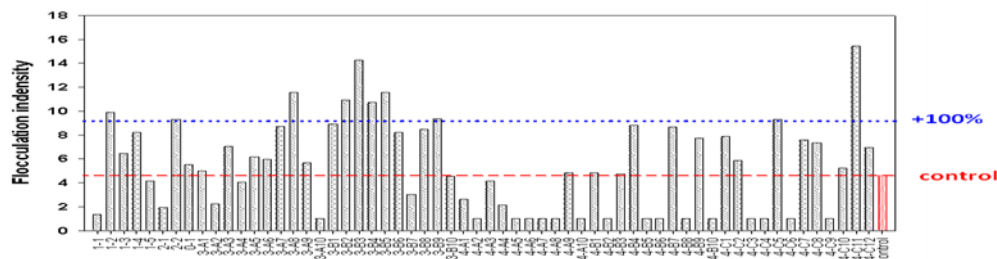


図 4. Flocculation intensity of the 62 mutants treated by the helium ARTP

#### (4) 川井グループ(神戸大学)

##### 1) 海水環境下での高増殖および高密度培養技術の開発

###### 研究目的・方法

海水環境下における *Spirulina platensis* NIES-39 の高増殖・高密度培養に向けて、閉鎖的または半閉鎖的に低コストで効率よく培養できる手法を検討する。また、連続培養装置の考案を視野に入れて、効率的な藻体回収方法を検討する。また、培養空間の効率的な利用に向けて浮遊性シアノバクテリアである *S. platensis* NIES-39 に加えて、付着性シアノバクテリアで、かつ光合成色素系が異なる *S. subsalsa* NIES-527 などの育成を考え、至適培養条件の検討を行う。

2010 年 7 月から 9 月にかけて、神戸大学内海域環境教育研究センターマリンサイトの屋外水槽を用いて自然光・水面環境下での培養実験を行った。培養容器として容量 10 L (外寸 20×20×20cm)の透明ポリプロピレン容器 9 個を塩ビ管による筏に固定し、屋外水槽に浮かべた。各容器には異なる濃度の SOT 培地(濃度 1/1, 1/2, 1/4) 8 L と実験室で予備培養した *Spirulina platensis* を入れ、電動エアープンプにより連続曝気を行った。また、自記型水温計を水槽に設置し、水温を連続測定した。増殖した藻体の回収には、前処理として凝集剤 PGα21Ca(日本ポリグル:ポリグルタミン酸架橋物とカルシウム化合物などを原料とする凝集剤)を添加し、沈殿した藻体の凝集塊をろ過して回収し、また上清部分の培養液を再利用した。また、2010 年 9 月 11 月にかけてより深い水深が得られる容量 20L (外寸 27×27×27cm)の容器を用いて同様の培養実験を行った。回収には凝集剤による前処理は行わず、ナイロンメッシュ(目開き 32 μm)を斜面に設置し、培養を斜面上部から連続的に流下させる方法で行った。

*Spirulina subsalsa* NIES-527 は、系統保存されている株は無菌化されていないが、無菌化



すると成長が見られなくなることから、その生育に必須なバクテリアの存在が考えられる。そこで、*S. subsalsa* NIES-527 の生育に関わるバクテリアを、単離同定し、*S. subsalsa* NIES-527 との二員培養系を確立する。また、無菌状態で生育できる新たな *S. subsalsa* 株の探索を行い、得られた株について好適な培養温度・光強度を明らかにする。

## 結論

10 L 容器を用いた *S. platensis* NIES-39 の培養では、培養期間中の水温は 24.0°C–35.0°C (平均 29.6°C) であった。期間中に増殖した藻体の回収を 2 回行い、細胞濁度は最大(OD<sub>750</sub>)=1.4 であった。これは同じ容器を用いた実験室環境下と同等の細胞濁度であり、屋外環境においても少なくとも実験室環境と同等程度の成長を示すことを確認した。また SOT 培地の濃度が 1/2, 1/4 になってもその生育速度には顕著な影響は認められなかった。凝集剤を用いた藻体の回収では、0.8 g/L の凝集剤で藻体を十分に沈殿することができ、細胞を容易に回収するとともに、培養液の再利用が可能であることが示された。培養期間中の藻体バイオマス量は、1 回目の回収では 4.6 gDW/m<sup>2</sup>day, 2 回目の回収では 5.7 gDW/m<sup>2</sup>day であった。

20 L 容器を用いた培養では、培養期間中の水温は 12.0°C–24.0°C (平均 18.6°C) であった。斜面に設置したナイロンメッシュを用いた藻体の回収でも、短時間で効率的に回収することができた。培養期間全体の藻体バイオマス生産は 2.0 gDW/m<sup>2</sup>day であった。

*Spirulina subsalsa* NIES-527 の培養液中から混生するバクテリアを 12 株単離した。16S rDNA 領域の DNA 塩基配列の結果から、これらのバクテリアは *Pseudomonas*, *Erythrobacter*, *Paracoccus* に属するものであることが明らかになった。現在、単離したバクテリアと *S. subsalsa* NIES-527 の二員培養を行い、*Spirulina subsalsa* NIES-527 の生育に関与するバクテリアの決定を行っている。一方、兵庫県淡路市の岩屋港から新規の *S. subsalsa* を単離し、無菌化してその成長特性(光強度, 温度)について検討を行っている。

## 2) 形質転換技術の開発

### 研究目的・方法

システムバイオロジーに基づく改変微細藻の創出にむけて、*S. platensis* NIES-39 株における安定した形質転換技術を確立することを目的とする。

シアノバクテリアの多くは制限酵素をもっており、これが外来 DNA による形質転換を阻んでいると考えられる。このためシアノバクテリアの形質転換では、その制限酵素に対抗する DNA メチラーゼを組み込んだ大腸菌が用いられている。2010 年に解読された *S. platensis* NIES-39 のゲノム情報から推定された制限酵素とそれに対抗する DNA メチラーゼは 8 個あった。そこでこれら 8 個の DNA メチラーゼを導入したプラスミドと形質転換コンストラクトを導入したプラスミドを大腸菌 JM109 内で共存させ、そのプラスミド DNA を用いてエレクトロポレーション法またはプロトプラスト-PEG 法により *S. platensis* NIES-39 へ遺伝子導入し、相同組換えによる遺伝子変異株の作製を行った。

## 結論

まず、遺伝子変異株の作製に用いるセレクションマーカーの検討を行い、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシンなどの抗生物質が有効であることを確認した。次に、形質転換コンストラクトと DNA メチラーゼコンストラクトの作製のためのプラスミドの検討を行った。バクテリアにはプラスミド不和合性という現象があり、同一種の複製起点を持つプラスミドは細胞内で共存できない。そこで、複製起点の異なるプラスミドの索出を行い、得られた 3 個のプラスミドに DNA メチラーゼと形質転換のためのコンストラクトの導入を試みた。形質転換のために、*rbcL* 遺伝子のプロモーター領域を含む約 1.5 kb の領域と Green Fluorescent Protein (GFP) をコードする遺伝子を融合した DNA 断片を作製した。この DNA 断片を上述の 3 つのプラスミドへの導入し、一部についてはスペクチノマイシン・ストレプトマイシン耐性遺伝子、7 個の DNA メチラーゼを導入した。次いでこれらのプラスミド DNA を *S. platensis* NIES-39 へエレクトロポレーション法またはプロトプラスト-PEG 法により導入した。その結果、成長速度は遅いものの導入した抗生物質耐性を獲得したと考えられる株が得られたが、その株から抽出した DNA を用い PCR によって行った確認では、目的の DNA 断片の増幅は確認できていない。このため抗生物質のセレクションから生き残った野生株が増殖した可能性もあるため、再度実験を行っている。

## (5) 三宅グループ(神戸大学)

### 研究目的・方法

物質生産増強を目的とした代謝経路改変において、エネルギーのトレード・オフを制御することを目的とする。具体的には、炭素代謝での物質変換に関わるエネルギー化合物 ATP の供給能の増強を目標とする。そこでは、光合成生物の生命維持(成長維持)に要求される ATP 量の確保を保証し、物質生産のための代謝経路への、余剰の ATP を生み出すための ATP 産生系の強化・制御を行う。本年度は、以下の 2 項目に取り組んだ。

## 結論

### 1) 酸素への電子伝達反応の制御

(a) ラン藻における WWC 活性評価を目的に、クロロフィル蛍光解析による光化学系 II 量子収率、P700 光吸収解析による光化学系 I の量子収率、および光合成での O<sub>2</sub> 発生能の同時測定系を構築した。その結果、WWC は、光合成能の光飽和とともに、その活性が増加する性質をもつことを明らかにした。

(b) WWC の機能強化、つまり O<sub>2</sub> 還元強化を目的に、この反応を律速する酵素、O<sub>2</sub> 還元を触媒する酵素 NADH-O<sub>2</sub> oxidoreductase (NOR) の過剰発現株の作成を行い、現在、過剰発現株での WWC 活性評価をおこなっている。

### 2) 光化学系 I での循環的電子伝達反応(CEF-PSI)の制御

(a) WWC と同様に、CEF-PSI 活性評価系を構築し、その活性が光強度に依存せず、一定の値を保つ性質をもつことを明らかにした。

(b) CEF-PSI 機能強化を目的に、この反応を律速する電子伝達タンパク質フェレドキシン(Fd)の

過剰発現株の作成を行い、現在解析中である。

## (6) 秋本グループ(神戸大学)

### 研究目的・方法

微細藻をパルスレーザーで光励起した後、微細藻の光化学系を構成する各色素(フィコビルン系色素、クロロフィル系色素)から発せられる蛍光の強度変化を時間の関数として観測することにより、エネルギー移動・電子移動などの光合成初期過程について検討を行い、大量培養に向けての問題点を明らかにし、改善を試みることを目的とする。

### 結論

#### 1) 微細藻の光エネルギー捕集能力

本年度は昨年度に引き続き、藍藻 *Spirulina platensis*, 藍藻 *Spirulina subsalsa*, 藍藻 *Synechococcus* sp. PCC7942, 藍藻 *Synechococcus* sp. PCC73109, 藍藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 について、フィコビリゾーム内エネルギー移動, フィコビルン・クロロフィル間エネルギー移動, クロロフィル間エネルギー移動を解析した。*Synechococcus* の色素系と比較し *Spirulina* の色素系は光化学系 I と光化学系 II との間でエネルギーを分配する能力に優れていること, *S. platensis* には励起状態寿命の長い低エネルギークロロフィルを有すること, 等がわかった。

クロロフィル *b* を持つ特異な藍藻 *Prochloron* やジビニルクロロフィルを持つ特異な藍藻 *Prochlorococcus* (論文 3)の光合成初期過程について解析を行い、藍藻の色素系にクロロフィル *a* とは異なるクロロフィルを導入することの利点および問題点を検討している。また、紅藻のエネルギー移動過程を解析することにより、光化学系 I-光化学系 II 間のエネルギー分配と含有フィコビルン量との相関を検討した(論文 4)。現在、藍藻 *Spirulina platensis* の色素系に適応し、解積を検討している。

#### 2) 微細藻の光エネルギー捕集の環境適応

種々の培養光条件(強度や波長を変化)で培養した藍藻 *S. platensis* におけるエネルギー移動過程の測定が進行中であり、光エネルギー捕集能力と細胞増殖・グリコーゲン生産との相関を検討している。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. He-Ping Li, Li-Yan Wang, Guo Li, Pei-Si Le, Hong-Xin Zhao, Xin-Hui Xing, Cheng-Yu Bao, “Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge plasma jet”, *Plasma Processes and Polymers*, 8(3), 2011:224-229

2. Lihua Jin, Mingyue Fang, Chong Zhang, Peixia Jiang, Nan Ge, Heping Li, Xinhui, Xing, Chengyu Bao, “Rapid Mutation of the Oleaginous Yeast by Atmospheric and Room Temperature Plasmas and the Characteristics of the Mutants”, *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 461-467

3. M. Mimuro, A. Murakami, T. Tomo, T. Tsuchiya, K. Watabe, M. Yokono, S. Akimoto, “Molecular environments of divinyl chlorophylls in *Prochlorococcus* and *Synechocystis*: differences in fluorescence properties with chlorophyll replacement”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 471–481, 2011. (DOI:10.1016/j.bbabi.2011.02.011)

4. M. Yokono, A. Murakami, S. Akimoto, “Excitation energy transfer between Photosystem II and Photosystem I in red algae: Larger amounts of phycobilisome enhance spillover”, *Biochim. Biophys. Acta*, (accepted)

#### (4-2) 知財出願

① 平成 22 年度特許出願内訳(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)