

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. 研究実施の概要

本研究では、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(平成 21 年度まで *Navicula* 属、平成 22 年度に正式な属名を同定)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ことを目的とする。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。平成 21 年度では、JPCC DA0580 株のゲノム DNA の全長のシーケンスを完了した。一方、珪藻での遺伝子発現用ベクターを構築し、一過性の外来遺伝子の発現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た。

平成 22 年度は、全ゲノム DNA 配列及び近縁種との比較ゲノム解析によりトリグリセリド生産に関して特徴のある遺伝子の絞込みを行うと共に、クロロプラストゲノム DNA の解析を完了した。また、パーティクルガンを用いた遺伝子導入による形質転換においては安定株の作出に成功した。さらに中規模リアクタを用いた培養条件の最適化を行い、プロジェクト目標値である 4.0 g dry weight/L/week を上回る生産性が達成された。一方で、屋外閉鎖型培養装置を用いた屋外培養試験を行った結果、当該株の耐強光阻害性及び高温耐性が示された。また、バイオディーゼル生産の効率化において課題とされる藻体回収及びオイル抽出過程の革新的な技術として、連続プロセスの適応が可能な藻体回収、及び 2 層溶媒添加による湿藻体からのオイルの抽出技術を確立した。

### §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. *Fistulifera* 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)

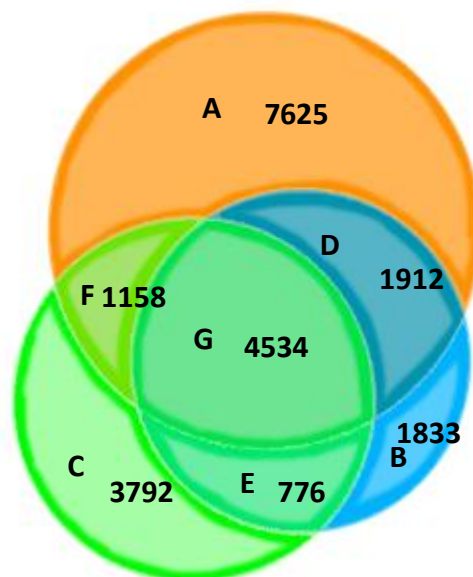
②研究項目

1. 屋外大型培養槽による培養実証実験
2. 細胞回収及びオイル抽出方法の検討

### §3. 研究実施内容

#### *Fistulifera* 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

珪藻 *Fistulifera* 属 JPCC DA0580 株(以下、JPCC DA0580 株)の全長のシーケンス(解析総塩基数:1.24 Gbp)を基にトリグリセリド生産に関わる遺伝子群のアノテーションを完了した。現在、遺伝子組換えの候補遺伝子である *elongase* や *desaturase* の機能解析を行っている。光合成を担う葉緑体については、サンガー法によるシーケンシングを併用し、完全長ゲノムDNAを解読した(1)。上記データを基に、珪藻ゲノム情報データベースを構築した。また、比較ゲノム解析により、脂質輸送及び小胞体構成に関与する遺伝子群において JPCC DA0580 株に特徴的な遺伝子が予測された(図1中 A)。現在、得られたドラフトシーケンス及び cDNA のシーケンス解析から遺伝子マッピング、代謝経路の詳細解析に着手している。



- A: *Fistulifera* 属で独自性の高い遺伝子
- B: *P. tricornutum*で独自性の高い遺伝子
- C: *T. pseudonana*で独自性の高い遺伝子

図1 近縁種間との比較ゲノム解析による遺伝子の相同性を示したベン図

#### 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マーカー遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子)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、マーカー遺伝子の upstream に、*P-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)、PRSV-LTR (ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモーター)、及び *Fistulifera* 属由来の 3 種のプロモーターをそれぞれ導入した 6 種類のベクターを構築した。これまでに、*Fistulifera* 属由来のプロモーターを用いた場合に最も高い形質転換効率が得られ、6ヶ月以上導入遺伝子を保持した安定株の作出を達成した(表 1)。

#### chemical mutant の取得

アルキル化剤(NTG、EMS)を用いた JPCC DA0580 株の変異株の取得を行い、変異株の取得条件を評価した。現在までに同条件下で約 4000 株の藻体を獲得している。生育速度、最終菌体到達濃度、光合成活性の評価を行うと伴に、イメージングサイトメーターを用いたハイスループットな変異株の選出方法の確立を進めている。

表1 各プロモーターを用いたJPCC DA0580株の遺伝子組換え効率

珪藻種	プロモーター	遺伝子組み換え体 ( $\sqrt{5 \times 10^7}$ cells)	References
<i>Fistulifera</i> sp. JPCC DA0580	fcpB	0.7	This study
	RSV	1	This study
	CaMV	4	This study
	<i>Fistulifera</i> 属由来A	11.5	This study
	<i>Fistulifera</i> 属由来B	5.5	This study
	<i>Fistulifera</i> 属由来C	8.5	This study
<i>Navicula saprophila</i>	acc	3	Dunahay et al. (1995)

### 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数Lの中規模で調べ、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内で改変271培地を用い、最適化条件である25°C、光強度500  $\mu\text{mol photons cm}^{-2} \text{s}^{-1}$  (白色蛍光灯)、pH 7.0、0.75%塩濃度、2% CO<sub>2</sub>を含む空気を培地1リッターに対して0.7L/minの流速で通気して培養を行った。前年度に行なった培養では4.5 g dry weight/L/weekであったのに対し、47%増加の6.7 g dry weight/L/weekまでの培養を達成した(図2)。その他、培養時の光照射時間を8~24時間に变化させた結果、24時間の1/3である8時間にした場合においても、バイオマス量は約半分程度であり、屋外培養に置いても高い生産性を示すことが示唆された。以上の結果より、各培養条件の最適化を行なうことにより、先行数値の約14倍のバイオマス生産性を達成するとともに、本プロジェクトのバイオマス量の目標値である4.0 g dry weight /L/weekを超える生産性を中規模培養で実現可能であることが示された。

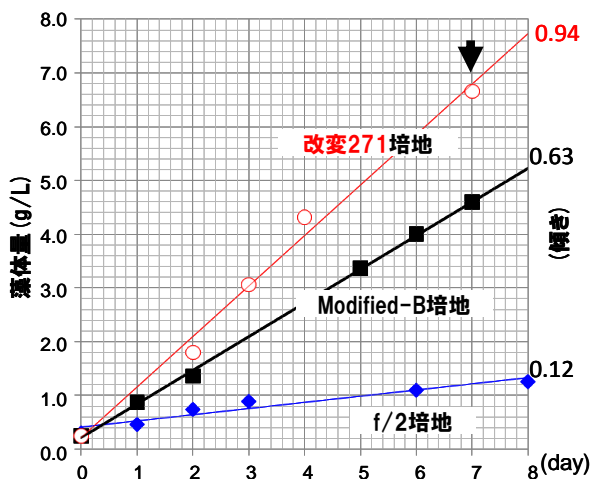


図2 最適化条件下におけるJPCC DA0580株のバイオマス生産量。矢印で示された箇所が培養7日目における測定結果。

### 屋外大型培養槽による培養実証実験

電源開発株式会社若松研究所内において、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、昨年度に設計した培養温室(図3)、及び500 Lクラスの粗放型培養槽(レースウェイ型培養槽)(図4A)を用いた培養実証実験に着手した。まず、屋外における培養特性を評価することを目的とし、6月及び7月に無滅菌屋外閉鎖型パネルリア

クタ(16 L)及び無滅菌培地を用いた培養を行なった(図4 B)。その結果、6月時の実験では藻体収量:0.3 g dry weight/L、オイル含有量:46%であり、同リアクタを用いた屋内連続光(300  $\mu\text{mol photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )下の培養結果である藻体収量:0.3 g dry weight/L、オイル含有量:44 %、と同等の生育が示された。また、6月時の培養では水温が40 °Cを超える日が2日間存在したことから、JPCC DA0580株は屋外環境下の強光及び高水温耐性を有することが示された。パネルリアクタの受光面積から、藻体が受ける日照量は約7.9 MJであり、入射エネルギーの1.7%がバイオマスに変換されたことが示唆された。



図3 北九州市若松区に設置された屋外培養温室の概観

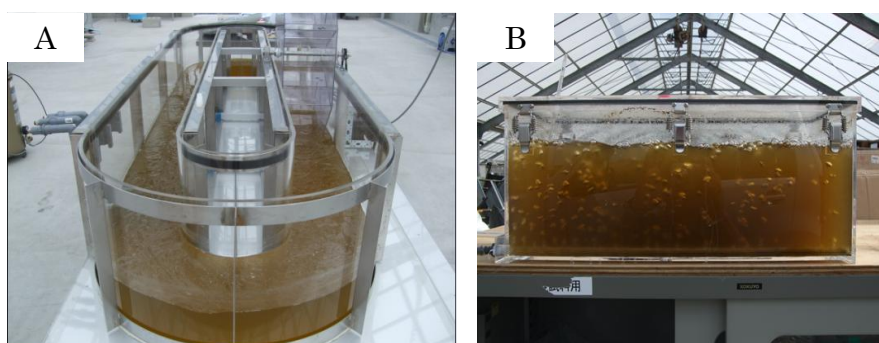


図4 屋外培養槽 A:レースウェイ型培養槽(500 L)、B:パネルリアクタ(20 L)

#### 細胞回収及びオイル抽出方法の検討

バイオディーゼル燃料生産における各プロセスの効率化を目指し、特に多くの投入エネルギー量を必要とする細胞回収及び藻体からのオイル抽出方法の検討を行なった。微細藻類の回収プロセスでは、低エネルギー化、スケールアップ、連続処理が可能な方法であることを選定条件とした結果、凝集剤による細胞回収が可能であることが示された。また、オイル抽出プロセスにおける検討では、未乾燥藻体からのオイル抽出が可能であり、スケールアップ、連続処理に優れる方法としてヘキサン/メタノール2層溶媒を用いた抽出方法の検討を行なった。従来法の乾燥藻体に対しヘキサンを加え破碎することにより抽出可能なオイル量を100%とした場合、未乾燥藻体に2層溶媒を添加し、攪拌することで抽出可能なオイル量は96%であり、同程度の抽出効率であることが示された。乾燥させるための投入エネルギーを省くことの出来る方法として優位であることが示唆された。今後は、各方法の条件検討を進め、バイオでディーゼル生産プロセスの最適化を目指す。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

- (1) T. Tanaka, Y. Fukuda, T. Yoshino, Y. Maeda, M. Muto, M. Matsumoto, S. Mayama & T. Matsunaga; “High-throughput pyrosequencing of the chloroplast genome of a highly neutral-lipid-producing marine pennate diatom, *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580” *Photosynthesis Research*. *Photosynthesis Research*, 2011, (DOI: 10.1007/s11120-011-9622-8)