「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

H24 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、准教授)

②研究項目

1. トリグリセリド合成関連遺伝子の探索
2. 他属種における生産性との比較

(2)「高層化培養」グループ

①主たる共同研究者:佐藤 朗(ヤマハ発動機株式会社、主査／グループリーダー)

②研究項目

1. 中規模リアクタでの培養条件の最適化
2. ディーゼルエンジンを用いた実証実験
3. 長期培養システムの実証

(3)「LCA・プロセス」グループ

①主たる共同研究者:松本 光史(電源開発株式会社、主任研究員)

②研究項目

1. オイル抽出プロセスの検討
2. 大規模培養の検証、LCA評価

(4)「計算機解析」グループ

①主たる共同研究者:油谷 幸代(産業技術総合研究所、主任研究員)

②研究項目

1. 遺伝子ネットワーク解析
2. 代謝パスウェイ解析

(5)「エンジン実証」グループ

①主たる共同研究者:吉田 幸司(日本大学、教授)

②研究項目

1. エンジン実証試験

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3－1)に対応する)

研究概要

本研究では、海洋珪藻 *Fistulifera* 属によるトリグリセリドの生産性向上や高品質なバイオディーゼル燃料生産に向けた基盤技術として、全ゲノム情報の解読、及び遺伝子組み換え系を確立し、海洋微細藻類のバイオディーゼル燃料生産株として世界の標準株にすることを目指す。さらに、当該株を用いたオイル生産技術の実用化に向けて、オイル生産性の理論限界値を導出するとともに、屋外培養におけるバイオディーゼル燃料製造プロセスの最適化を目的とする。

平成 24 年度では、「微細藻類分子育種グループ」及び「計算機解析グループ」が連携し、*Fistulifera* 属のオミクスデータを基に微細藻類によるトリグリセリド合成経路を含む代謝マップの構築を行った。この代謝マップを基に、オイル生産性の向上に寄与すると考えられる遺伝子を選出し、その遺伝子組み換え体の作出を行った。具体的には、脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子発現抑制株やグリセロールキナーゼ遺伝子の強発現株などの変異株の作出を行った。その結果、グリセロールキナーゼ遺伝子を強発現した株を利用することで、オイル生産性を向上できることが明らかとなった。「高層化培養グループ」では、屋内閉鎖型リアクタとして中規模の 500 L スケールの培養を実施し、7.2 g/L の高密度培養技術を確立した。一方で「LCA・プロセスグループ」の屋外培養においては、培地組成、培養条件の最適化を行い、レースウェイ型培養装置で H23 年度成果と比較して 1.3 倍、カラム型培養装置で 2 倍の生産性向上が示された。これらの結果を基に、7 ha、170 kL の大規模培養を行った際の投入エネルギーを試算した結果、現状の培養システムにおいて、少なくとも EPR = 1 以上に向上できると推定された。

・**トリグリセリド合成関連遺伝子の探索**

前年度までに *Fistulifera* 属への遺伝子組み換え技術を確立した。本年度はバイオディーゼル燃料の生産性向上を目指し、各種遺伝子組み換え体の作出を行った。これまでに構築した遺伝子組み換え体（ノックインまたはノックダウン株）は、脂肪酸不飽和化遺伝子 5 株、グリセロールキナーゼ遺伝子 2 株、油滴局在性タンパク質を発現する遺伝子 5 株、の計 12 株である。また、遺伝子組み換えの候補遺伝子は、現在までに 33 個となっている(Table)。

Table　オイル生産性向上に向けた形質転換体作出状況

タンパク質の種類	解析手法	標的遺伝子数	得られた形質転換体
Knock-down（発現抑制）			
脂肪酸不飽和化	ゲノム	5	5
脂肪酸鎖長制御	ゲノム	6	0
転写因子	トランスクリプトーム	3	0
糖合成	トランスクリプトーム	2	0
Knock-in（強発現）			
グリセロールキナーゼ	ゲノム	2	2
脂質合成関連1	ゲノム	2	2
脂質分解関連(内在性)	ゲノム	2	0
脂質分解関連(外来性)	ゲノム	2	0
転写因子	トランスクリプトーム	3	0
油滴局在(内在性)	プロテオーム	5	5
油滴局在(外来性)	プロテオーム	1	1
	計	**33**	**14**

（脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のノックダウン株）

バイオディーゼル燃料に適した脂肪酸のみからなるトリグリセリドの生産を目指し、高度不飽和脂肪酸の生合成を抑制した遺伝子組み換え体の作出を行った。ターゲット遺伝子として、脂肪酸不飽和化の酵素であるデサチュラーゼ遺伝子 5 種類を選出し、それぞれの発現抑制を試みた。当該株のゲノム情報により RISC 及び Dicer 遺伝子を有することが分かったため、RNAi 技術によるノックダウン法を採用した。標的遺伝子のアンチセンス鎖を発現するベクターを設計し、形質転換を行った。現在までに候補遺伝子 2 ついずれからも形質転換体が得られ、遺伝子の発現抑制が確認されている。今後、得られた組み換え体の脂肪酸組成解析を進める予定である。本研究結果は、オイル高生産微細藻類では初めての遺伝子発現抑制に成功した例となる。

（グリセロールキナーゼ遺伝子のノックイン株）

バイオディーゼル燃料精製時に副産物として生成されるグリセロールの再利用を目指し、グリセロール資化能を向上した組み換え体の作出を行った。本研究では、グリセロール代謝の第一段階であるグリセロールのリン酸化を担う酵素、グリセロールキナーゼを標的とした。*Fistulifera*

属が保持するグリセロールキナーゼ遺伝子（2 種類）の発現ベクターを構築し、その遺伝子組み換え体を構築した。その結果、最終藻体到達濃度が 20%向上した株の作出に成功し、グリセロールキナーゼ遺伝子の導入によりオイル生産性が向上できることが示された。

・中規模リアクタでの培養条件の最適化

前年度に用いたリアクタ（ライトパス 4 cm、50 L スケール）に続き、本年度ではライトパス 8 cm（100 L スケール）での生育およびオイル誘導について検討した。ライトパス 8 cm では細胞密度、およびオイル蓄積量のいずれも 4 cm リアクタに比べて低く、リアクタ 1 台当たりの培養容積は2倍になるものの、オイル生産性の面での有効性は見出されなかった。以上より、中規模リアクタの最適ライトパスを 4 cm と最終的に決定し、本課題を達成した。

・ディーゼルエンジンを用いた実証実験

微細藻類からのトリグリセリド含有量の高いオイルの抽出方法と BDF 化を小規模で検討した。その結果、乾燥藻体 1,113 g から 423 g のトリグリセリド高含有オイルが得られた（オイル収率 38%）。得られたオイルについて BDF 化を進めたところ、FAME 生成率 98.4%のエステル交換がなされた。モノ、ジ、トリグリセリド残存分はそれぞれ 1.0、0.1、0.5%、また、水分は 357 ppm、酸価は 0.56 であった。生成した BDF は珪藻由来の色素のため黒色を呈していたが、精製を行い除去できることが示された。現在までに、約 40 kg の乾燥藻体から 13 kg 程度のトリグリセリド高含有オイルが得られており、ディーゼルエンジンを用いた実証試験に向け BDF 化および精製が進行中である。

・長期培養システムの実証

中規模リアクタでの培養条件に基づいて、ライトパスを 4 cm とし、最終培養スケールとして、500 L スケールでの実証試験を行った。培地濃度の最適化により、12 日間培養で 7.2 g/L、オイル含量 50%を達成した。また、96 台の 500 L リアクタをフル稼働した時の年間オイル生産性を試算した結果、最大で藻体生産量：10.3 トン、オイル生産量：5 トンであった。

・オイル抽出プロセスの検討

微細藻類からのオイル抽出プロセスの検討は、エネルギー収支の観点から重要な課題である。特に、細胞破砕プロセスや藻体の乾燥プロセスを省略できれば、エネルギー投入量を小さくすることが可能である。 これまでに、細胞破砕をしていない湿藻体をバイオマスとして用い、アルコール/ヘキサンの二相溶媒を用いたオイル抽出法を提案してきた。これは、下層にあるアルコール相に藻体を留めながら、上層のヘキサン相へオイル画分を移行させることでオイル抽出する方法である。そのため、下層のアルコール相を抜き取ることで藻体残渣の除去ができる点に特徴がある(**図 1**)。そこで本年度は、二相溶媒抽出法を用いて、*Fistulifera* 属のオイル抽出条件を検討し、回収工程とオイル抽出工程を含めたマテリアルバランスを試算した。湿藻体に

対する溶媒量、抽出時間などの条件検討を行った結果、藻体重量に対し、6 倍のアルコールを添加し、加えたアルコール量の 3 倍のヘキサンを用いることで乾燥藻体を用いた時と同等のオイル回収効率が実現できることが分かった。一方で、*Chlorella* 属などの緑藻やシアノバクテリアでは二相溶媒抽出の効果が見られないことから、本法は珪藻バイオマスに特化した抽出法であることが示唆された。

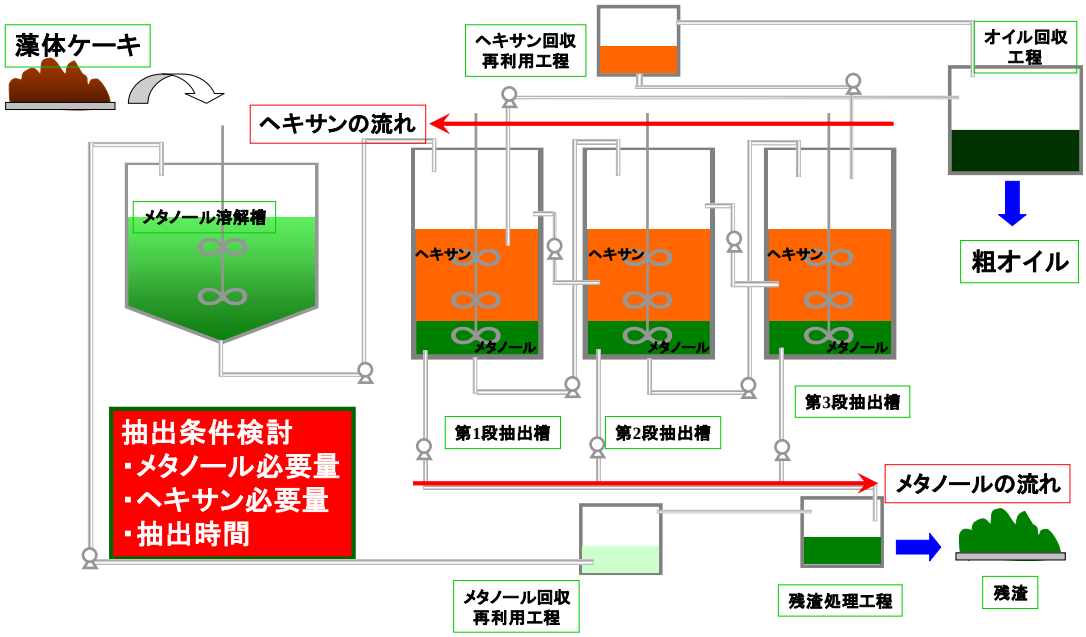

図1. オイル抽出行程

・大規模培養の検証、LCA 評価

昨年度までに 200 L レースウェイ型培養装置を中心に屋外培養試験を実施し、*Fistulifera* 属が安定に屋外培養が可能な株であることを確認した。本年度は、200 L カラム型培養装置を用いた培養試験を中心に、H23 年度成果の再現性確認と培養条件の改善による藻体生産性、オイル生産性、投入エネルギーの削減法を検討した。その結果、レースウェイ型、カラム型培養装置による培養試験結果を通じて、H23 年度と同様に冬季を除いた 4 月～9 月において安定的に屋外培養が可能であった。培地成分、藻体回収時期などの最適化を進めた結果、レースウェイ型培養装置において前年度比 1.3 倍、カラム型培養装置において 2 倍のバイオマス生産性の向上を達成した。これらの結果を基に、7 ha、170 kL の大規模培養を行った際の投入エネルギーを試算し、予想される EPR を算出した。その結果、現状の培養システムを用いた場合、藻体濃度を 1 g/L、オイル含量を 40%まで向上できれば、EPR が 1 以上に向上できると試算された。

・遺伝子ネットワーク解析

Fistsulifera 属のトリグリセリド蓄積は、栄養条件(窒素源枯渇)に応答する。この条件下で発現

量が変化している遺伝子群を同定し、同定した遺伝子間の関連性を推定する事によって、*Fistsulifera* 属で行われているトリグリセリド合成・蓄積を制御する因子を特定することが期待できる。そこで高精度に測定された遺伝子発現データ(下記、代謝パスウェイ解析に記述)から、遺伝子間のネットワークを推定する手法の開発を行った。*Fistsulifera* 属における低窒素応答機構には、転写因子をはじめとする遺伝子以外の細胞内因子も考慮する必要があるため、因子分析と構造方程式モデリング(SEM)を組み合わせたネットワークモデリング手法を開発した。この手法により遺伝子情報のみを含んだ遺伝子発現データから、タンパク質など遺伝子以外の細胞内因子の影響を考慮した遺伝子発現ネットワークの概要を推定することが可能になった。

・代謝パスウェイ解析

Fistsulifera 属はゲノム解読がすでに為されている珪藻 2 種と系統的に独立していることが明らかとなっている。そのため既報の珪藻種の遺伝子情報に基づく相同性検索から *Fistsulifera* 属特有の遺伝子を予測することは困難である。代謝経路に適切な遺伝子をマッピングするためには、*Fistsulifera* 属が持つ遺伝子予測の高精度化が必須である。そこで、*Fistsulifera* 属に由来する 99 個の完全長 cDNA を遺伝子モデルとし、遺伝子予測プログラムを最適化した。これを用いることで *Fistsulifera* 属から得られた塩基配列情報から高精度な遺伝子予測を行った。その結果、新たな遺伝子の発見や、エキソン領域予測の高精度化などが達成された。ここで得られた遺伝子情報を元に遺伝子発現データの再計算を行い、オイル蓄積過程に活性化される代謝パスウェイの解析を行ったところ、脂肪酸合成経路に加え、糖の異化経路や脂肪酸の分解経路が活性化することが明らかとなった。

・エンジン実証試験

得られた BDF の燃料性状は、JIS 規格 JIS K 2390 自動車燃料－混合用脂肪酸メチルエステル（FAME）の規定に対して、残留する水分は規定を満たし、モノ、トリグリセライド残存量及び酸化が規定値よりも若干高いのみであり、BDF として実用化が可能である。これまでにエンジン実証試験に用いるための小型空冷単気筒直噴ディーゼルエンジン(排気量 219 cc)のセットアップが完了している。これを用いて、正味熱効率、排気ガス温度、燃焼室壁面温度及び排気ガス成分（一酸化炭素、全炭化水素、窒素酸化物、二酸化炭素、酸素）を測定し、BDF と軽油との性能比較を行う予定である。また、BDF としての実用性を考慮し、JIS K 2390 規定と同様に軽油に BDF を 5 wt%混合した実用実験も行う予定である。

§3. 成果発表等

（3－1） 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Masaki Muto, Yorikane Fukuda, Michiko Nemoto, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka; “Establishment of a genetic transformation system for the marine pennate diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 - a high triglyceride producer”, Marine Biotechnolgy, Vol.15, No.1, pp.48-55, 2012 (DOI:10.1007/s10126-012-9457-0).

2. Jean-Francois Pessiot, Pui Shan Wong, Toru Maruyama, Ryoko Morioka, Sachiyo Aburatani, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi; “The impact of collapsing data on microarray analysis and DILI prediction”, Systems Biomedicine (in press).

3. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, and Wataru Fujibuchi; “Pairwise ranking component analysis”, Knowledge and Information Systems, Vol.33, No.1, pp.1-29, 2012 (DOI:10.1007/s10115-012-0574-x).

4. Sachiyo Aburatani, Wataru Fujibuchi; “Inference of specific gene regulation by environmental chemicals in human embryonic stem cells”, Journal of molecular biology research, Vol. 2, No.1, pp.54-64, 2012 (DOI: 10.5539/jmbr.v2n1p54)

5. Sachiyo Aburatani; “Network inference of pal-1 lineage-specific regulation in the *C. elegans* Embryo by Structural Equation Modeling”, Bioinformation, Vol.8, No.14, pp.652-657, 2012 (DOI: 10.6026/97320630008652)

6. Akira Satoh, Kyonosuke Ichii, Mitsufumi Matsumoto, Chihiro Kubota, Michiko Nemoto, Masayoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka; “A process design and productivity evaluation for oil production by indoor mass cultivation of a marine diatom”, Fistulifera sp. JPCC DA0580.”, Bioresource technology (accepted)

7. Jean-Francois Pessiot, Pui Shan Wong, Toru Maruyama, Ryoko Morioka, Sachiyo Aburatani, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi; “The impact of collapsing data on microarray analysis and DILI prediction”, Proceedings of Critical Assessment of Massive Data Analysis 2012, pp. 21-25, 2012 (DOI:未付与)

8. Sachiyo Aburatani, Wataru Fujibuchi; “Application of structural equation modeling for inferring toxicity-dependent regulation in human embryonic stem cells”, Proceeding of Global

Health 2012, pp.27-32, 2012 (DOI:未付与)

（3－2） 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数（国内 3 件）

② CREST 研究期間累積件数（国内 3 件）