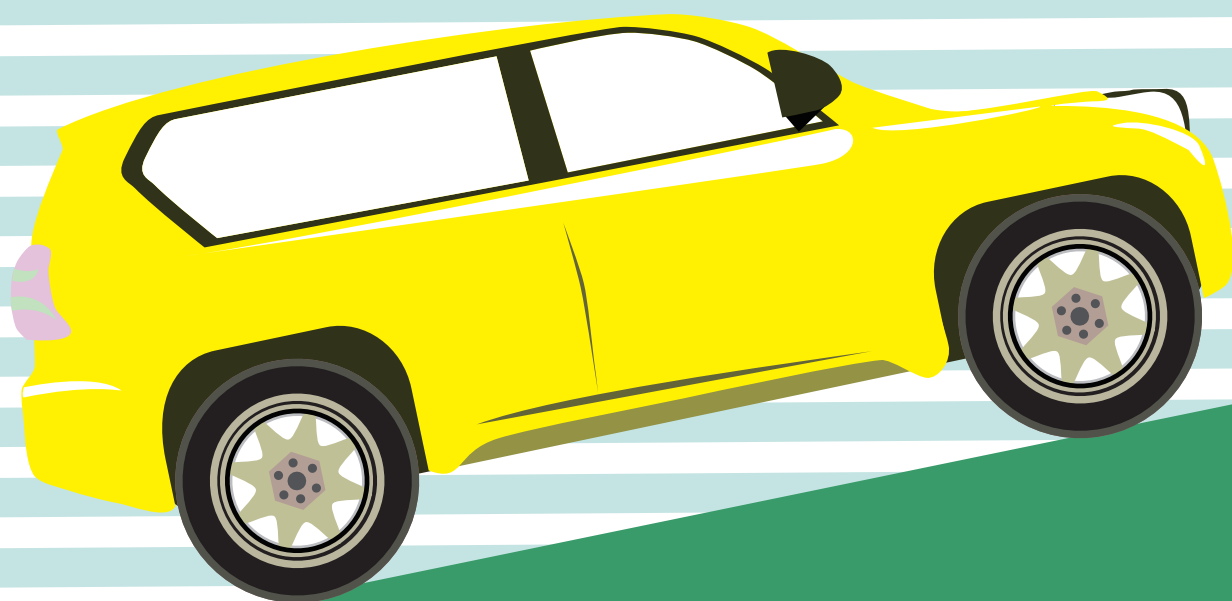
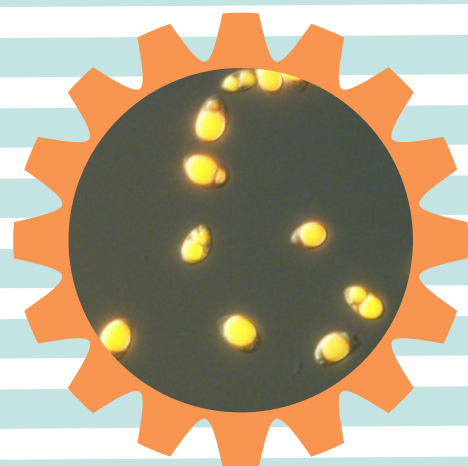


# 微細藻類バイオマス利用 シンポジウム

Symposium on Microalgal Biofuels and Bioproducts

2015年9月3日

中央大学後楽園キャンパス



主催 中央大学研究開発機構 共催 農林水産省技術会議事務局

# 微細藻類バイオマス利用シンポジウム

Symposium on Microalgal Biofuels and Bioproducts

農林水産省委託プロジェクト

「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト  
／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」成果報告会

2015年9月3日

中央大学後楽園キャンパス

主催：中央大学研究開発機構

共催：農林水産省農林水産技術会議事務局

## 会場案内

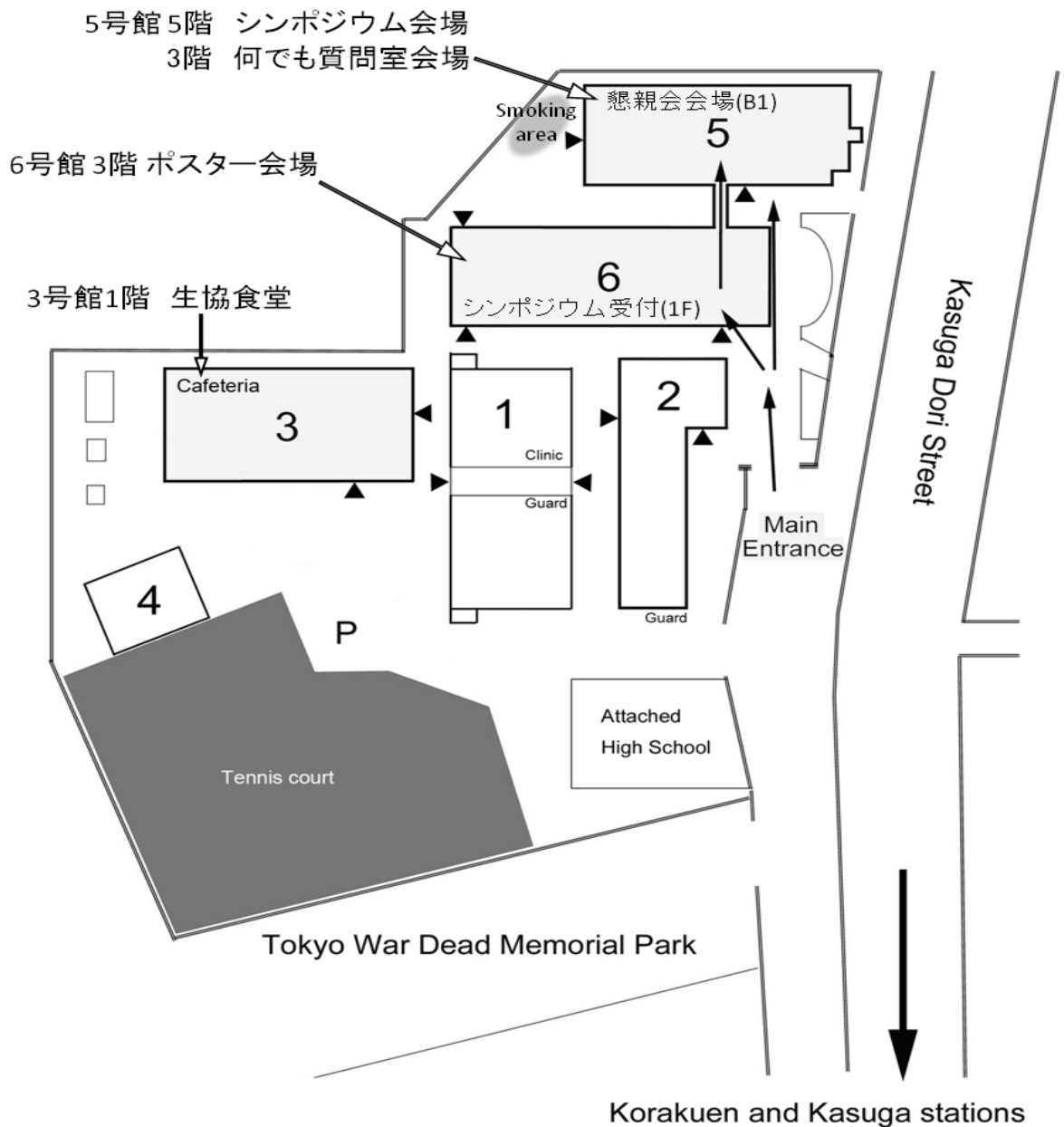
講演会場：5号館 4~5階 5534号室

ポスター会場：6号館 6301号室

同時開催「クラミドモナス研究会」のポスター会場（6302号室）も併せてご覧ください。

懇親会場：5号館地下1階 学生食堂

講演会場には、6号館のエレベーターを利用して3Fまで上がり、渡り廊下を通して5号館に移動し、階段にて5Fに上がってください。あるいは、5号館1階に入って左折、廊下奥のエレベーターで4Fに上がってください。



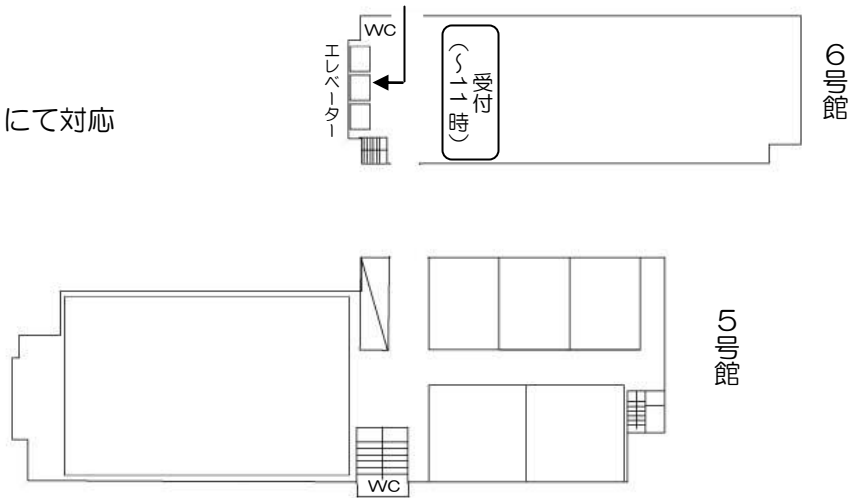
微細藻類バイオマス利用シンポジウム会場図

1F (6号館・5号館)

受付 (~11時まで)

※11時からは運営本部 (5333) にて対応

(矢印はシンポジウム会場  
までのバリアフリー経路です。)



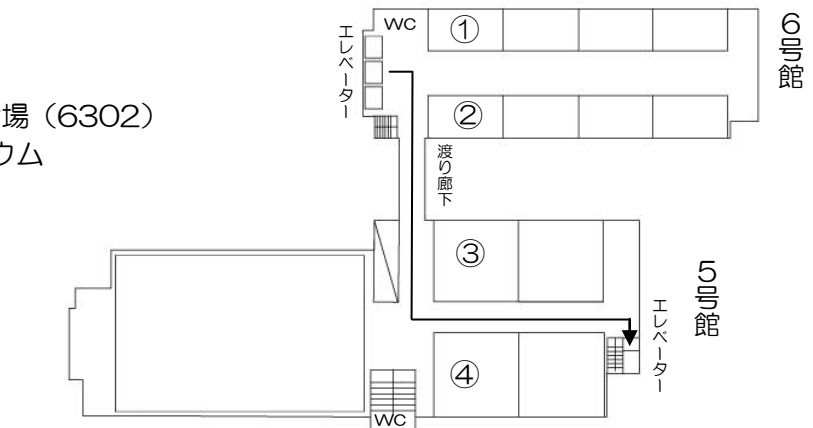
3F (6号館・5号館)

①クラミドモナス研究会 ポスター会場 (6302)

②微細藻類バイオマス利用シンポジウム  
ポスター会場 (6301)

③休憩室 なんでも質問室  
(5334)

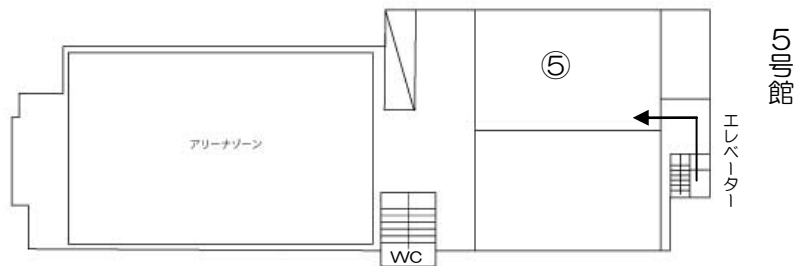
④運営本部 手荷物預り  
(5333)



4F (5号館)

⑤シンポジウム会場

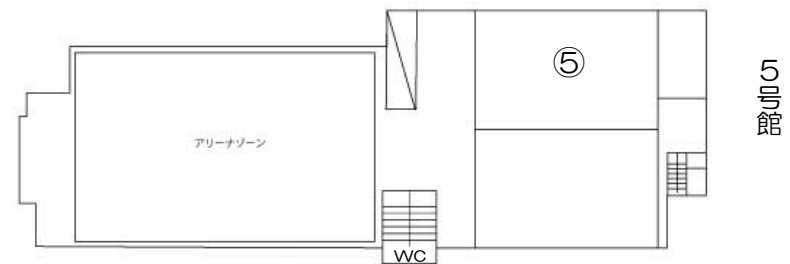
エレベーター側入り口  
(5534)



5F (5号館)

⑤シンポジウム会場階段側

階段側入り口  
(5534)



## 特別講演・口頭発表プログラム

5号館4～5階 5534号室

- 開会の辞  
司会 中央大学研究支援室 今井 文明  
10:00 ご挨拶 農林水産省農林水産技術会議事務局長 西郷 正道
- 10:10 微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発プロジェクトの概要  
.....中央大学 原山 重明
- 10:20 微細藻類バイオ燃料の製造技術開発ーデンソーの取組みー  
.....株式会社デンソー 保井 秀彦
- 10:50 寒天培地上での生育速度を指標とした油脂蓄積微細藻類株の選抜  
.....京都大学 宮下 英明
- 11:10 休憩 (5分)
- 11:15 【特別講演】 微細藻類ユーグレナを活用した燃料製造に向けた技術開発について  
.....株式会社ユーグレナ 鈴木 健吾
- 11:45 【特別講演】 高速増殖型ボツリオコッカスを使った有価物回収技術の開発  
.....株式会社IHI 金子 典充
- 12:15 昼食 (1時間15分)
- 13:30 *Pseudochoricytis ellipsoidea*におけるTAG生合成系と油滴形成  
.....お茶の水女子大学 加藤 美砂子
- 13:50 *Pseudococcomyxa*属の育種  
.....中央大学 原山 重明
- 14:20 大孔径中空糸膜を用いた*Pseudochoricytis ellipsoidea*の高濃縮・高Flux・低ファウリング回収技術の開発  
.....中央大学 山村 寛

15:00～16:20 ポスターセッション 6301号室

15:00～16:20 なんでも質問室 5334号室

「何でも質問室」では、普段なかなか質問しにくい事柄に、わかる範囲でお答えするコーナーです。例えば専門的すぎる内容をより安易な言葉で説明してもらいたい方、いまさら聞けない基礎的なことに疑問をお持ちの方、講演やポスターの内容以外の内容について質問なされたい方などがいらっしゃいましたら、休憩室を兼ねております「何でも質問室」に、ご気軽にお出で下さい。

16:30 マイクロ波照射による選択的加熱を利用した藻類からの油分抽出技術の開発

.....マイクロ波化学株式会社 木谷 径治

16:50 藻類油からの水素化バイオ燃料製造

.....出光興産株式会社 福永 哲也

17:10 休憩 (5分)

17:15 微細藻類残渣の有効利用 - 採卵鶏用飼料への用途開発 -

.....中部飼料株式会社 小草 啓輔

17:35 油脂生産微細藻類の水産飼料原料としての可能性

.....北里大学 笠井 宏朗

17:55 【特別講演】 海洋微細藻類によるグリーンオイル生産技術開発の現状と展望について

.....電源開発株式会社 松本 光史

18:25 閉会の辞

中央大学研究開発機構長 築山 修治

18:30 懇親会

# 特別講演・口頭発表 要旨

# 微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術 の開発プロジェクトの概要

原山 重明 (中央大学理工学部)

本プロジェクト (2012~2015) では、微細藻類バイオマスを利用し、農山漁村地域において燃料および飼料の製造が可能となるような技術を開発することを目指した。

本プロジェクトで実施された研究開発の第1の課題は、微細藻類の分離と品種改良である。微細藻類の新規分離と基礎的な特性把握は京都大学が担当した。分離された株の中で有望なものは、デンソーが屋内・屋外での培養試験を実施し評価した。そして、特に有望なものについては、中央大学において、育種のための研究を行った。育種のための研究と連動して、お茶ノ水女子大学において、油脂生産の代謝経路とその制御に関わる分子機構の研究を行った。

研究対象の微細藻類として、単細胞性緑藻である *Pseudochoricystis ellipsoidea* を、当初選定した。この株は、藻体乾燥重量あたり 30%以上の油脂を蓄積し、pH3.5 以下で増殖することが出来るため、原生動物や他の微細藻類の混入を最小限にした屋外培養を行うことができる利点を持っている。

第2の課題である大量培養については、既に多くの実績があるレースウェイポンド方式を採用し、培地組成の最適化から大量培養のシミュレーション技術の開発までの幅広い研究をデンソーを中心として行った。これと併せて、農家において簡便かつ安価に培養できるチューブ培養法の開発を、当初は中央大学、後半では北里大学が担当した。

第3の課題として、培養した微細藻類細胞を低コストで回収するための膜分離技術の開発を、クボタと中央大学との共同研究として行った。膜素材の中から目的に合致したものを選抜し、最適運転方法を検討した結果、従来のいかなる方法よりも低コストで微細藻類細胞の濃縮回収を行うことに成功した。

第4の課題として、マイクロ波化学の持つマイクロ波-固体触媒法技術を軸にした油脂抽出技術の開発と、抽出した油脂のメチルエステル化に取り組んだ。上記回収技術で回収した未乾燥の微細藻類細胞から、マイクロ波とマイクロ波吸収物質とを用いて油脂抽出を行うことに成功したが、使用電力量の削減が課題として残っている。一方、マイクロ波-固体触媒法技術を用いた油脂のメチルエステル化技術は実用化に至っている。

抽出した油脂を水素化し、JIS 規格に適合した水素化バイオディーゼル燃料を製造する技術開発は出光興産によって実施された。従来の水素化バイオディーゼル燃料は低温での流動性が低かったため、アルキル鎖をイソ化する触媒の開発を行い、成功した。

最後の課題は、油脂抽出されたあとの搾りかすの利用である。中部飼料によって、絞りがすが家禽の飼料として使用できるかの検討がなされ、絞りがすに含まれるキサントフィルによって、卵黄の色づきが良くなることが示された。そのため、絞りがすの価値が kg あたり 50 円程度となり、燃料油製造コストの低減に大きく貢献できることが明らかになった。また、北里大学では、絞りがすを養殖魚用飼料および種苗生産用飼料として用いる研究が行われ、従来の飼料の成績を上回る結果が得られている。前記のチューブ培養と飼料製造とを組み合わせることにより、地産地消の事業展開が可能となると思われる。

本プロジェクトの 2012 年度での研究から、京都大学が分離した *P. ellipsoidea* と近縁な緑藻である *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株が、*P. ellipsoidea* よりも優れた油脂生産性を示すことが、デンソーなどの研究などで明らかになった。実際、KJ 株の油脂生産性は、さまざまな培養条件において *P. ellipsoidea* の 2 倍であった。そこで、2013 年度以降は、上記の研究開発に



用いる微細藻類を KJ 株に変更することとした。本プロジェクトは実用化を目指したものであり、油脂生産性がより優れた株を入手できれば、速やかにそれに乗り換えるべきであるとの考えから、開発研究の大幅遅延を覚悟して、このような変更を行った。幸いにして、研究者らの努力によって、当初のスケジュールにさほどの遅れをみせることなく、研究が進捗している。

2013 年度に、本プロジェクトは行政事業レビューを受けた。その中で、バイオ燃料製造プロジェクトについては、農林水産省のみならず、経済産業省および文部科学省において類似のプロジェクトが進行していること、各省の事業内容に重複が存在することが指摘された。さらに、重複部分については、中止あるいは関係各省との調整後に再編されたプロジェクトとして開始すべきであるとの意見が出された。これに対応するため、2012 年度に開始した開発研究の内容のうち、レースウェイポンド方式による大量培養、回収技術、燃料化技術は、2014 年度以降、継続しないこととなった。

当初の研究開発計画においては、微細藻類バイオマスを用いた燃料を開発するための「ゆりかごから墓場まで」の一貫したプロセス開発を目指しており、整合性が取れていた。しかし、行政事業レビュー後においては、その中心部が抜けた、まさに間の抜けたプロジェクトとなってしまった。幸いにして、タイミング良く公募されていた NEDO プロジェクトに、本プロジェクトで中止した部分の内容を研究計画としてまとめ応募し、採択された。その後、本プロジェクトを担当する研究チームと当該 NEDO のプロジェクトを担当する研究チームとは連携し、研究開発を継続している。また行政面においても、農林水産技術会議事務局メンバーが当該 NEDO プロジェクトの推進委員会に出席し、また、本プロジェクトの推進委員会に、NEDO 担当者が出席するといった連携が実現し、縦割り行政の弊害を打破するモデルケースとなっている。このような事情から、本シンポジウムでは、本プロジェクトと当該 NEDO プロジェクトの成果とを合わせて発表することとした。

本プロジェクトは本年度を以て終了するが、このプロジェクトで得られた成果を活用するためには新たな連携体制の構築が必要である。本プロジェクトの成果がどう活用できるかの積極的なご提言を参加者より頂けたら幸いである。

# 微細藻類バイオ燃料の製造技術開発 ーデンソーの取組みー

保井 秀彦 (株デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)

HIDEHIKO\_YASUI@denso.co.jp

倉田 稔、小松 さと子、蔵野 憲秀、福田 裕章 (株デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)

(株デンソーは自動車業界に携わる企業として地球環境の維持と成長の両立を目指し、微細藻類によるバイオ燃料生産の技術開発に取り組んでいる。我々は、コンタミネーションの発生し難い酸性環境で増殖し、高い油分蓄積能力を有する微細藻株シュードコリスティスを保有している。そして、各大学や各企業間で連携を図りながら、本微細藻の油分蓄積メカニズムの解析から育種改良、培養、回収、燃料化までの一貫プロセスの開発、油分抽出した藻体残渣の飼料としての利活用などの研究開発を農林水産省および NEDO の委託事業として実施している。デンソーは、中央大学で得られた各種育種株や京都大学で取得した新規探索株などのレースウェイポンドにおける油分生産能力の評価、および、コスト低減と安定生産を目指した培養システムの開発を担当しており、その進捗について報告する。

(株デンソー基礎研究所に設置した屋外レースウェイポンドにおいてシュードコリスティス野生株の通年での油脂生産性を評価した。冬期でもオイル生産できることを確認し、年間を通じた培養評価ができた。さらに、屋外レースウェイポンドにおいて二段式培養を実施し、種藻を育てる半回分式培養槽での2ヵ月間の連続運転と本培養における油分蓄積を成功させた。しかしながら十分な油分生産性を得ることができず、コスト目標の達成に向けて油分生産性を向上させるための育種改良が必要である。微細藻の油分生産性を向上させるためには、①細胞の CO<sub>2</sub> 取込み速度を上げる、②光合成できる藻体の濃度を上げる、③固定した炭素の油分への分配を高める、④油分の分解を抑制する、という4つの育種の方向性がある。これらの特性が向上した微細藻の効果を見積もることができる「油分生産性予測システム」を構築しており、複数の変異を集積することで油分生産性を2~3倍向上できると試算している。我々のプロジェクトでは、二重特異性チロシンリン酸化制御プロテインキナーゼ (DYRK) 活性の低下した変異株に油分への炭素分配を高める効果のあることを見出しており、今回、レースウェイポンド培養においてその効果を明らかにしたので報告する。今後は、その他の特性を向上させるためのターゲット遺伝子を特定し、1つの細胞に集積する技術の開発に取り組む予定である。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」、「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

# 寒天培地上での生育速度を指標とした油脂蓄積微細藻類株の選抜

宮下 英明、神川龍馬（京都大学大学院地球環境学堂）、

井村綾子（京都大学大学院人間・環境学研究科）

miyashita.hideaki.6v@kyoto-u.ac.jp

【背景】 微細藻類燃料実用化に向けての重要な課題は生産コストの削減である。その解決策の1つとして効率的な微細藻類バイオマス生産法の開発が急務となっている。微細藻類バイオマスの生産にはこれまで、レースウェイ型野外池やフォトバイオリアクターなど様々な方法が検討されてきた。近年、布や濾紙などの担体表面上に微細藻類を塗布する培養法が高いバイオマス生産性を示すことで注目されている。実際、当研究室で行った寒天平板を担体とした表面塗布培養模擬実験でも、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株を用いて、CO<sub>2</sub> 添加をしない室内空気の通気、室温（25±3℃）、1,500 μM photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 照射（12 h day<sup>-1</sup>）におけるバイオマスの最大生産速度として 53-64 g DW m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> を得た。この培養法では、培養液への CO<sub>2</sub> 溶解プロセスが必要ないほか、形状を容易に設計することができるため光エネルギー変換効率（バイオマス生産効率）が飛躍的に向上する。このため、バイオマス生産コストの削減につながるものと期待される。一方で、この培養方法に適した油脂生産微細藻類の選抜は行われておらず、既存の微細藻類株を用いた実施例がほとんどである。本研究では、担体表面塗布培養法に適した優れた油脂蓄積微細藻類の探索を目的に、微細藻類株を自然界から分離し、寒天平板上での生育速度ならびに油脂蓄積性を指標に選抜した。

【実験の方法】 日本各地で採集した微細藻類サンプルを AF6 液体培地中で集積培養した。これを寒天平板上に塗布し、室温で培養後、7-10 日後までに出現した微細藻類コロニーを分離した。これらを 24 穴培養プレートに調製した pH 3 および pH 7 の AF6 寒天培地上に塗布し、5℃、20℃、35℃でそれぞれ培養した。クロロフィルの反射蛍光量の変化を増殖の指標として生育曲線を作成し、各株の各条件における最大比増殖速度（μ max）を算出した。*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株ならびに *Chlorella sorokiniana* U-5 株を対照として、これらの株よりも明らかに生育の遅いものを除きながら、複数回の培養実験によって上位株を選抜した。選抜された株については、窒素源欠乏培地に移したのち 2 週間後に油脂蓄積の有無を調べた。形態ならびに 18S rDNA 配列に基づく分子系統解析によって選抜株を同定した。

【結果と考察】 集積培養により得た 272 株を用いて、寒天平板上での生育速度が、対照とする 2 株よりも同等以上の株を pH 3 で 9 株、pH 7 で 58 株を選抜した。さらに、各培養条件での比増殖速度が最も速かった株として pH 3、5℃で 2 株、pH 3、35℃で 1 株、pH 7、5℃で 3 株、pH7、20℃で 2 株、pH7、35℃で 3 株を選抜した。このうち 2 株を除いて、いずれの株においても油脂蓄積が確認された。これらの株は、担体表面塗布培養法に適した株として、バイオマス生産、油脂生産に用いることが出来るものと期待される。選抜された株は、緑色植物門の微細藻類で、緑藻綱、トレボキシア藻綱 *Choricystis* クレド、トレボキシア藻綱 *Chlorella* / *Watanabea* クレドの 3 グループのいずれかに帰属した。現在、液体培地ならびに寒天平板上で至適生育条件と最大のバイオマス生産速度について評価中であり、それらのデータを含めて担体表面塗布培養法に適した優れた油脂蓄積微細藻類について議論する。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

## 【特別講演】

# 微細藻類ユーグレナを活用した燃料製造に向けた技術開発について

鈴木 健吾 (株式会社ユーグレナ)  
suzuki@euglena.jp

将来におけるエネルギーの枯渇が予想される現在、地球上の物質循環を実現させることを想定して藻類バイオマスの燃料への利用が注目されている。ユーグレナは、日本では「ミドリムシ」の和名で広く知られ、一般に湖沼、水田などの淡水に生息している水中を浮遊する微細藻類の一種である。ユーグレナは葉緑体を有し光合成を行う植物性の性質を有しながら、鞭毛や細胞収縮による運動性を有するなどの動物的な特徴をも示すことから、古典的な分類学上において植物と動物の両方の分類に属する特殊な微生物として知られる。またユーグレナの特定の種類は、溶存二酸化炭素濃度が高い環境条件に対して適応可能であるとともに、特殊な条件下でワックスエステルを合成するなど特徴的な代謝経路を有しており、それらが燃料の製造に活用できる可能性が高いと考えられてきた。

ユーグレナは、好氣的な培養条件下において光合成によりパラミロンを大量に蓄積し、その量は最大乾燥重量当たり約 50%に達する。そして、好氣的な条件下で培養したユーグレナを嫌氣的な条件に移行することで、パラミロンは細胞内で貯蔵脂質ワックスエステルへと変換される。実際にそのような過程で得られたユーグレナ由来の脂質を水素化・異性化精製した試製油は、合成ジェット燃料規格に適合しており、ドロップインフューエルとして既存のジェット燃料と混合利用可能であることが確認されている。ワックスエステルはエタノール等と比較してもエネルギー密度の高い燃料を製造できること、またトリアシルグリセリドと異なり燃料精製段階でグリセロールなどの副産物が出ないことなどが利点として挙げられる。

ワックスエステル発酵はユーグレナに特異的な代謝系であり、ワックスエステルの燃料としての有用性から、今後のユーグレナを利用した産業として燃料生産が大きな期待を受けている。燃料生産のためのユーグレナの生産効率を高めるには、ハードウェアの設計と培養設備のコントロールによるパラミロン生成・蓄積条件およびワックスエステル発酵条件の最適化などが増殖効率の向上と共に重要となる。本シンポジウムでは、ワックスエステル合成のための代謝経路を遺伝子レベルで明らかにしつつ、代謝工学に基づくパラミロンやワックスエステル生産の高効率化などを目指した燃料の製造に関わる取り組みについて、現状と将来的な構想を紹介する。

## 【特別講演】

# 高速増殖型ボツリオコッカスを使った有価物回収技術

金子 典充、松澤 克明、田中 浩、武藤 潤 (株IHI)

[norimitsu\\_kaneko@ihi.co.jp](mailto:norimitsu_kaneko@ihi.co.jp)

千田 浩隆、宮川 裕介、遠藤 政城 (株ちとせ研究所)

榎本 平 (神戸大)

### 1. 諸言

当研究開発グループでは、高速増殖能と高オイル含量を併せ持つ「高速増殖型ボツリオコッカス (Bb)」を用いた燃料生産技術を開発している。生産プロセスの投入エネルギーとコストを低減させるため、オイル生産能として増殖速度および油含有率を向上させた株をベースとし、育種による藻の浮上性の向上、将来的に有用な遺伝子組換え方法の開発を行っている。

### 2. ラボスケールの培養から屋外大量培養試験へ

IHI 横浜事業所内に設置した屋外開放池にて、高速増殖型 Bb を 2013-14 年度の期間培養した。その結果、コンタミネーションによる培養系の破綻もなく、想定通りの増殖速度で安定的に培養できることを確認した。その間、増殖速度および油含有率、藻の浮上性は維持されていた。

上記結果を反映し、2015 年度春に鹿児島市に 1500m<sup>2</sup> の屋外解放池を有する大規模培養設備を製作した。

屋外展開開始後 1 ヶ月で、1500m<sup>2</sup> の培養池を満たす規模まで、横浜での屋外培養同様、安定的に拡大培養することに成功した。現在、同設備にて国内夏季の日射量等の気象データと、増殖速度および油含有率、藻の浮上性の関係についてデータを取得している。



写真 1 屋外大規模培養の様子

### 3. 今後の開発

今後、燃料生産コストを低減させるため、単位面積当たりの生産性の向上、低コストな培養・収穫・油抽出・精製システムの開発を、国内または海外で進めていく。

## *Pseudochoricystis ellipsoidea* における TAG 生合成系と油滴形成

加藤 美砂子 (お茶の水女子大学基幹研究院、kato.misako@ocha.ac.jp)

松脇いずみ、杉井昭子、小山香梨 (お茶の水女子大学・院・ライフサイエンス)

トレボキシア藻綱に属する単細胞藻類 *Pseudochoricystis ellipsoidea* は、トリアシルグリセロール(TAG)を主成分とする油脂を、油滴と総称される構造体に高濃度に蓄積する。窒素欠乏の状態、2%のCO<sub>2</sub>を通気しながら連続明期の条件下で *P. ellipsoidea* を培養し、TAG合成を誘導した。この条件下において、*P. ellipsoidea* の増殖に伴うTAG合成能の変化と細胞内の代謝フラックスを<sup>14</sup>C-標識化合物を用いたトレーサー実験により解析した。光合成により固定された炭素からのTAG合成能は、細胞の増殖に伴い増加した。一方で、デンプン合成能は、定常期よりも対数増殖期に高いことが示された。合成されたデンプンの一部は、分解されるが、このときのグルコース分解には解糖系よりもペントース・リン酸経路が大きく関与していることが示唆された。また、TAGに結合している脂肪酸は、オレイン酸(18:1)の割合が高い。[1-<sup>14</sup>C]パルミチン酸と[1-<sup>14</sup>C]オレイン酸を与えた実験結果の比較より、TAG合成能が高い時期に積極的に[1-<sup>14</sup>C]オレイン酸が取り込まれることが判明した、このことは、TAG合成に関与するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)の基質特異性を反映していることが推定される。DGATの候補遺伝子の発現もTAG合成能の増加に伴い上昇し、TAG合成の制御DGTATが関与することを支持していた。

次に培養日数に伴う油滴の発達過程を追跡した。まず、培養日数に伴う細胞の大きさの変化を調べたところ、培養開始後4日目の細胞は大きく、その後、ほぼ一定の大きさになることがわかった。培養開始後4日目の細胞が大きい理由は、内生孢子による分裂途中の細胞が多く含まれるためである。細胞に含まれる油滴の数を計測すると、培養開始後4日目の細胞に含まれる油滴数は7-8個であり、その後、減少した。培養開始後7日目の細胞には2個程度であり、その後、10日目、13日目では増加することがわかった。油滴のサイズを計測すると、4日目の油滴は小さく、培養日数が経過するにつれ、大きな油滴も観察された。培養開始後13日以降も観察を続けると、油滴の大きさは大きくなる一方で、1μm以下の小さな油滴も増加した。13日目の最大サイズの油滴は2.15-2.25μmであったが、23日目と30日目ではそれ以上の大きさの油滴が存在した。以上の結果から、細胞内で小さな油滴が形成され、大きさを変えずに個数を増加させるのではなく、小さな油滴が結合して大きな油滴に発達することが示唆された。また、培養日数が経過した細胞において、大きな油滴の存在が認められても、常に小さな油滴が形成され、形成された油滴は大きな油滴に統合される可能性があることがわかった。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト/微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# *Pseudococcomyxa* 属の育種

原山 重明 (中央大学理工学部)

単細胞性緑藻 “*Pseudochoricystis ellipsoidea*” は、海洋バイオテクノロジー研究所の蔵野・関口らによって分離された株で、他の多くの微細藻類と同様、窒素欠乏条件下で油脂を蓄積する。さらに、pH3.5以下の培地中でも増殖できるという、他の微生物の混入・増殖を最小限にした屋外大量培養に適した形質を備えている。同じく単細胞性緑藻である *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株は京都大学の宮下らによって分離された株で、その株の油脂生産性は、上記 *P. ellipsoidea* の2倍である。KJ 株も pH3.5 以下での培養が可能である。

本プロジェクトにおいては、当初は *P. ellipsoidea* を親株として、後半は KJ 株を親株として、油脂生産に有利な形質を獲得した突然変異体、例えば低クロロフィル含有株、高油脂生産株、細胞壁脆弱株、強光耐性株、油脂分解欠損株、硝酸同化系欠損株、デンプン合成欠損株などを、古典的な突然変異分離法を用いて取得した。

突然変異体の分離と並行して、*P. ellipsoidea* および KJ 株の全ゲノム配列決定を行った。さらに、これらの株のトランスクリプトーム解析を実施し、個々の遺伝子領域を確定した。両株は類似したゲノム構造を持ち、ゲノムサイズは約 50 Mbp、遺伝子の数は約 10,000 であった。さらに、上記の突然変異体についてもゲノム配列解析を行ない、突然変異箇所を特定し、突然変異体の形質の原因遺伝子を推定した。

*P. ellipsoidea* および KJ 株いずれにおいても、窒素欠乏条件あるいは 100 mM 以上の NaCl の添加などのストレスを与えることが油脂が蓄積のシグナルとなる。このようなストレス条件下での遺伝子発現変化をトランスクリプトーム解析によって調べた。この解析から、油脂の蓄積に関与する遺伝子を推定した。

太陽光を利用した屋外培養では、夜と昼が存在する。そこで、12 h 明期と 12 h 暗期の周期を持つ培養における遺伝子発現変化も調べた。同時に明期と暗期での油脂およびデンプンの含有量の変化を調べた。この研究を通して、油脂の合成と分解およびデンプンの合成と分解に関わる遺伝子の発現制御と、それに応答した油脂およびデンプンの蓄積量の変化との関係の一端が明らかになりつつある。

先に述べたように、古典的な突然変異法を用いて、多くの有用な突然変異株を分離することに成功した。しかしながら、*P. ellipsoidea* および KJ 株には、交配によってこれらの有用突然変異を1つの株に集約する手段が存在しない。すなわち、それを実行するためには、遺伝子組換え技術を用いる必要がある。我々はゲノム編集技術の1つである TALEN を用いて、任意の遺伝子をノックアウトできることを示した。また、油脂生産の際に高発現する遺伝子3つを選び、それら3つの遺伝子を KJ 株内で更に高発現させることにより、油脂生産性が70%上昇した株を創出することにも成功した。この遺伝子組換え株の油脂生産性は、当初の親株である *P. ellipsoidea* に比べ、約 3.5 倍増加した。

遺伝子組換え体の屋外培養は、カルタヘナ法との関係で、あるいは、パブリックアクセプタンスとの関係で困難である。そこで、外来遺伝子を用いない、あるいは外来遺伝子をゲノムに残さない、セルフクロニングのシステムを *P. ellipsoidea* および KJ 株で開発した。将来は、セルフクロニングによる育種が、交配のできない微細藻類の有用な育種法になるのではないかと考えている。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」の一環として実施された。

# 低動力型膜分離回収技術の開発

鈴木 伸和、江崎 聡、佐藤 祐樹（株式会社クボタ）

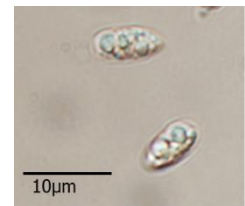
E-mail : nobukazu.suzuki@kubota.com

## 1. はじめに

従来、微細藻類の回収工程には連続遠心分離法や凝集剤を使用する浮上分離法を採用してきたが、これらの手法には過大な動力や薬剤が必要になるとともに、水の再利用や抽出残渣の飼料化に合致しにくい欠点があった。ここでは、投入エネルギーが少なく、凝集剤などの薬剤を使用しない、簡便かつ安価な膜分離回収技術の開発に取り組んだ。

## 2. 藻体回収に適した膜の選定（平成 24-25 年度 農水省委託プロジェクト）

培養液中に含まれるサブミクロンオーダーの微細粒子による膜ファウリングを抑制しながら分散性の強い 5 $\mu\text{m}$  程度の微細藻類（*Pseudochoricystis ellipsoidea* や *Pseudococcomyxa sp. KJ* 株）を効率よく回収するためには、孔径 0.5 $\mu\text{m}$  以上の粗大孔径膜（有機平膜、チューブ状セラミック膜等）が適していることを確認した。



*P. ellipsoidea* の細胞

## 3. 膜分離回収方法の開発

### 1) 1 段ろ過濃縮（平成 24-25 年度 農水省委託プロジェクト）

上述した各種候補膜を用いて、ラボ培養液を対象として濃縮試験（完全混合条件）を行い、ろ過圧力が急激に上昇することなく、藻体を濃縮できることを確認した。ただし、最終の濃縮倍率は 30 倍程度に留まった。

### 2) 2 段ろ過システム（平成 25 年度 NEDO プロジェクト）

高度濃縮を主な目的として、中央大学が選定した中空糸膜と弊社が選定したセラミック膜を組み合わせた「2 段ろ過システム」を考案した。ラボ培養液を対象とした濃縮試験で、最終 150 倍の高度濃縮が可能なことを確認した。

### 3) ろ過・沈殿システム（平成 26 年度 NEDO プロジェクト）

更なる高度化を目指して、膜ろ過と沈殿作用を組み合わせた「ろ過・沈殿システム」を新たに考案し、その基本性能を評価した。屋外レースウェイポンドの培養液を対象としたフィールド試験（中央大学と共同実施）で、ろ過と膜洗浄等の運転条件を最適化することにより、高い膜 flux を維持しつつ、最終 340 倍の高度濃縮が可能なことを確認した。



小型膜分離回収試験装置

## 4. まとめ

微細藻類の回収に適した膜を選定し、高度濃縮に向けた膜分離回収方法の検討を行い、投入エネルギーが少なく経済性に優れる「ろ過・沈殿システム」の基本的な運転方法を確立した。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

※株式会社クボタは事情により発表及びポスター掲示を行うことができなくなりましたが、予定されていた発表内容の要旨は掲載させていただきました。



# 大孔径膜を用いた *Pseudococcomyxa* sp.株の高濃縮・高 FLUX・低ファウリング回収技術の開発 1 ～2 段ろ過システム～

山村 寛、松本岳、早川准平、原山重明（中央大学理工学部）  
yamamura.10x@g.chuo-u.ac.jp

藻バイオ燃料は4段階のプロセス(培養、分離、分解・抽出、生成)を経て生産されるが、藻体を培養液から分離する際のコストが高く実用を阻む高い障壁となっている。近年、新しい固液分離プロセスとして膜ろ過法が注目されており、膜分離を利用して大量の藻培養液を高処理速度(高 Flux)かつ高濃縮できれば、安価なバイオ燃料生成プロセスを確立できるものと考えられる。一方で、膜ろ過回収プロセスを実現するためには、膜が目詰まりを起こすことで透過性能が減少する「膜ファウリング」を抑制する必要がある。しかしながら、高 Flux での膜ろ過運転と膜ファウリングはトレードオフの関係にあり、Flux の増加に伴い膜ファウリングが急激に進行することから、膜ファウリング物質を特定し、膜ファウリングの進行を抑制・減少させる運転方法・培養方法の開発が必要不可欠となる。本研究では、高 Flux(2.0 m/D 以上)での運転が可能な膜を選定すると共に、高濃縮・高 Flux・低ファウリングでの藻類回収を可能とする培養及び運転条件を明かにすることを目的として研究を実施した。

**膜の選定** 微細藻類の回収に適した膜特性として、微細藻類よりも孔径が小さく、培養液中に含まれる有機物が膜に閉塞することなく透過するような構造を有するものが望ましい。*Pseudococcomyxa* sp.株は、3 $\mu$ m から 10 $\mu$ m の範囲に分布し、回収時点における表面ゼータ電位は+7.4mV 付近を示した。また、培養液中に含まれる溶解性成分は 10nm から 20nm の分子量を持つ親水性が極めて高い有機物が占める一方で、膜ファウリングの原因となりうる高分子多糖類（バイオポリマー）は確認されなかった。これらの結果から、*Pseudococcomyxa* sp.の分離には、2 $\mu$ m 以下の分離膜を使用することで効率良く微細藻類を濃縮出来る可能性が示された。

**1 段目濃縮システム** 市販の大孔径中空糸膜（クラレ製：排除径 2.0 $\mu$ m）を使用して、藻体の濃縮・回収実験を実施した。中空糸膜での目標回収倍率 30 倍以上を Flux2.0m/d で達成すべく、微細藻類の膜面への蓄積を可視化しながらろ過と膜面洗浄の条件を最適化した。通常は、膜透過液をろ過と逆方向から流すことで膜面や細孔内に蓄積した堆積物を剥離するが、本研究では、90kPa 程度の圧縮空気をろ過液の代わりに膜の透過側から数秒間付加することで、膜面に堆積した微細藻類を完全に剥離する洗浄手法を確立した。これにより、Flux2.0m/d で倍率 30 倍まで回収することに成功した。

**2 段目濃縮システム** 中空糸膜だけでは濃縮倍率 100 倍以上を達成出来ないため、さらなる高度濃縮に向けてセラミック膜による高度濃縮を検討した。セラミック材料や製法ならびに形状や膜孔径等を様々に検討した結果、公称孔径 1.2 $\mu$ m・ $\phi$ 3-5mm のチューブ状セラミック膜を選定した。この膜を用いて、ろ過（20 分）と間欠水逆洗（0.3MPa・1.5sec.）とエアール洗浄（0.15MPa・1sec.）により、150 倍まで高濃度に濃縮しうる運転システムの開発に成功した。

**2 段ろ過システムの性能評価** 中空糸膜で 30 倍濃縮した濃縮液をセラミック膜でさらに濃縮したところ、最終 150 倍にまで高度濃縮できることを確認した。ただし、セラミック膜ろ過フラックスの上限値は 1.4m/d であり、目標フラックス 2.0m/d には未達であった。当結果から概算した回収コストは 34 円/kg-藻であり、目標コスト 30 円/kg-藻には未達であった。

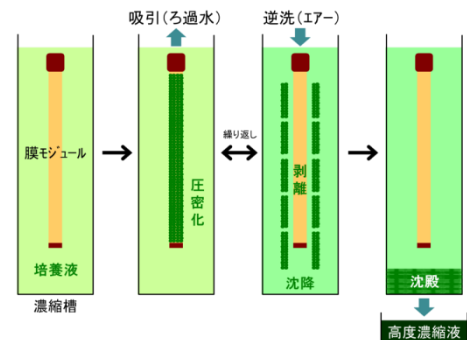
本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

# 大孔径膜を用いた *Pseudococcomyxa* sp.株の高濃縮・高 FLUX・低ファウリング回収技術の開発 2 ～ろ過・沈殿システム～

山村 寛、松本岳、早川准平、原山重明（中央大学理工学部）  
yamamura.10x@g.chuo-u.ac.jp

これまでに開発してきた2段ろ過システムでは、1段目ろ過で30倍まで濃縮した液を2段目ろ過で150倍（75g-藻/L）にまで高度濃縮できることを確認したが、概算コストは34円/kg-藻のレベルにあり、コスト目標30円/kg-藻には未達となった。この原因は、2段目ろ過の高度濃縮が難しく、目標の膜ろ過フラックス2.0m/dに対して1.4m/dに留まったことに起因している。他方、2段ろ過システムの開発に取り組む中で、逆洗時に膜表面から剥離する藻体ケーキの沈降性が、浮遊藻体と比較して著しく向上する現象を確認した。この現象を有効活用することで、2段目ろ過（セラミック膜による濃縮工程）が不要となり、回収プロセスを簡便化できるとともに、大幅なコストダウンが期待できる。本研究では、膜表面に堆積した藻体濃縮ケーキを剥離・沈降させることで藻体を回収する『ろ過・沈殿システム』の開発により、目標濃縮倍率300倍、ろ過Flux4.0m/dの達成を目指す。

**ろ過・沈殿システムの概要** 孔径 1.0  $\mu\text{m}$  の大孔径中空糸膜（クラレ製：材質 PVDF、内径 0.7 mm、外径 1.2 mm）を用いて膜本数 180 本、有効長 25 cm、膜面積 0.17  $\text{m}^2$  に調整した膜モジュールを作成し、定流量吸引ろ過条件で濃縮を行った。運転条件として、10 分間の膜ろ過毎に 90 kPa の加圧空気による逆洗を 10 秒付加することで、膜面に堆積した藻細胞を剥離、沈殿させ、500 L の培養液を 17 L まで濃縮（体積倍率換算で 100 倍濃縮）した。



**濃縮倍率** ろ過・沈殿システムにおける槽内の藻体濃度分布を調

べるために、ろ過・沈殿運転中に水深の異なる4箇所のサンプリングポートから引き抜いた結果、藻体濃度は底部と底部以外で大きく異なることが明かとなった。底部では容積倍率60倍時に300倍以上に藻体が濃縮されていたのに対し、底部以外の箇所では藻体濃縮率が2倍程度に留まった。本システムを採用することで膜近傍の藻細胞濃度を低減し、膜面への過剰な藻細胞の堆積を防ぎ、安定した膜ろ過運転が可能となった。さらには、沈殿した藻細胞は既に300倍以上に濃縮されており、底部の沈殿物を引き抜くことで高度に濃縮された培養液が容易に入手出来ることが明かになった。

**屋外実証試験** 屋内試験により最適化したろ過・沈殿システムをスケールアップし、パイロット膜ろ過装置を作成した。パイロット膜ろ過装置では逆圧洗浄後に10-30秒間の休止時間を設けた他、膜分離槽の底部をコンカル状に改造することで、ケーキ層の膜面への再吸着および沈殿したケーキ層の巻き上がりを防止した。様々に検討する中で、安定した濃縮回収には培地組成の改良および低pHの維持が重要となると共に、適正なFluxの設定が極めて重要となることが明かとなった。これまで得られた結果をまとめると、培養液のファウリングインデックス（FI）と培養液に含まれる2 $\mu\text{m}$ 以下の微小粒子濃度との間に高い正相関が存在し、微粒子が多い程ファウリングが進行することが明かとなった。ここでの関係から、FIから最適なFluxを選定する線図を作成し、簡易な測定から最適な運転条件を選択出来る手法の開発に成功した。

**ろ過・沈殿システムの性能評価** Flux3.5m/dの条件で4日間の連続濃縮運転を実施した結果、TMP50kPaに維持しつつ安定した運転を達成した。また、4バッチ共に、濃縮倍率300倍以上の藻体を回収することに成功した。当結果から概算した回収コストは24.5円/kg-藻であり、H28年度末の目標コスト25円/kg-藻を達成することが明かになった。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」およびNEDOの委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

# Development of a method for extracting oil from microalgae using microwave irradiation capable of selectively heated -Disruption effects on microalgae cells by microwave irradiation-

## マイクロ波照射による選択的加熱を利用した藻類からの 油分抽出技術の開発 -マイクロ波照射による藻体細胞に対する破碎効果-

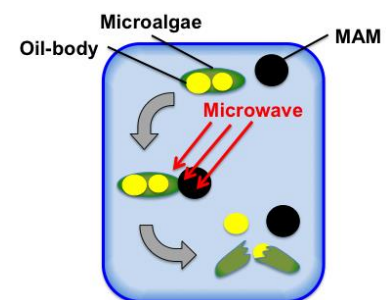
Keiji Kidani, Kentaro Yamamoto, Akinori Ishizuka, Yasunori Tsukahara, Iwao Yoshino

*Microwave Chemical Co.,Ltd*

*kkidani@mwcc.jp*

藻体保有油分の抽出・分離過程は、未だに技術的・経済的課題を解決出来る有効な方法が殆ど確立されていない。本研究課題では、マイクロ波による藻体の破壊を促進させる電磁波吸収体を開発し、油水分離を起こした状態で油脂を抽出する技術を開発することを目的としている。

本検討系に適したマイクロ波吸収体 (Microwave Absorbent Materials : MAM)を用いることにより、マイクロ波照射下において、その近傍に電界を集中させることができる。MAM 近傍にある微細藻類は、選択的にマイクロ波と相互作用し、微小領域で局所加熱等が起こるため細胞壁が破碎され油分の抽出が可能となる。また、超音波などマイクロ波との組み合わせにより相乗効果の期待できる手法を組み入れることで、より効率の良い系の構築が期待できる。これまでの検討において MAM を用いたマイクロ波照射により、120 min で藻体内に含まれる油状物質の 68 wt%を回収することを達成した。



今回の検討では、より短時間での効率的な油分抽出を達成するため、マイクロ波照射による藻体破碎効果を視覚的に確認し、定量的な評価を行った。実験は、任意の濃度に調整した供試試料に、マイクロ波を照射した後、藻体及び油分を染料により染色し、顕微鏡観察を行い、細胞を直接カウントする手法を採用した。その結果、油状物質が藻体外に放出される過程が観察され、油状物質は破碎された藻残渣に付着した状態で油滴として系内に存在している事を確認した。これら観察結果と電磁場解析ソフトによるコンピュータシミュレーションとの併用により、マイクロ波照射条件のより詳細な検討を行い、実際の実験に反映したところ、約 30 min にて十分な藻体破碎効果が得られることが分かった。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# 藻類油からの水素化バイオ燃料製造

福永 哲也、社本 潤、三好 真由

tetsuya.fukunaga@idemitsu.com

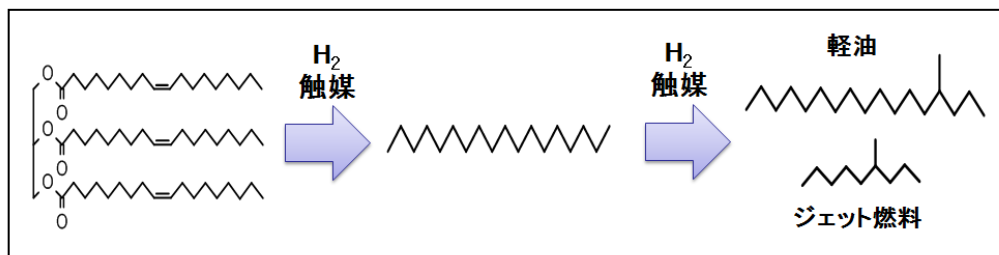
(出光興産株式会社 先進技術研究所 環境・エネルギー研究室)

## 1. 背景

石油系燃料と比較するとバイオマス燃料は生産量に限界があると言われている。従って、このバイオマス燃料のために新たな物流システムや内燃機関を造ることは経済的に大きな負担となり、結局はバイオマス燃料が普及しないということにもなりかねない。そこで、バイオマス燃料のあるべき姿は、「既存のエンジン、配管、インフラ等の改良無しで、そのまま使用できる、石油系燃料と同じ性状の燃料」と言うことができる。これが水素化バイオ燃料であり、**Drop-in Fuel** とも呼ばれる。我々は、微細藻類油から水素化バイオ燃料を製造する検討を行っている。

## 2. 検討内容

(株)デンソーより入手したシュードコリスチスの産する油(トリアシルグリセロールを主成分とする)を水素化処理した。その結果、シュード油から80%以上の非常に高い収率にて軽油留分相当のn-パラフィンを得ることができた。この燃料は酸素原子を含まず、かつ炭素-炭素の2重結合も含まない、非常に安定性に優れた燃料である。ただし低温流動性に課題があるため、更に触媒を用いて異性化することで低温流動性に優れた軽油を製造することができた。触媒や反応条件を変えることでジェット燃料の製造も現在検討中である。



一方、水素化処理触媒はバイオクルード中のアルカリ金属等により被毒するため、これを予め取り除く検討も行った。食用油の精製方法を応用し、アルカリ金属等を数 ppm 以下に低減できることを確認した。

## 謝辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト/微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発/戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業(次世代技術開発)/高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

## 微細藻類残渣の有効利用 - 家禽用飼料の開発 -

小草 啓輔、山崎 識知、浅野 朋浩  
(中部飼料(株)・研究技術部・総合研究室)  
k-kogusa@chubushiryo.co.jp

バイオ燃料の製造過程で生じる微細藻類 (*Pseudochoricystis ellipsoidea* Obi 株及び *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株) の油脂抽出残渣 (以下、残渣) には、飼料原料に値する栄養成分や有用成分が残存していると考えられる。そこで、残渣の有効利用法として家禽用飼料原料としての用途開発を行った。

まず、残渣を飼料原料として利用するにあたり、飼料安全法を含む法令等で基準値の定められた有害物質の検出状況、残渣に含まれる栄養および有用成分の含有量を把握するため分析を行った。その結果、残留農薬、カビ毒、放射性物質は検出されず、重金属も基準値以下であった。栄養成分としてはトウモロコシ相当のエネルギー価と DDGS 程度の粗たん白質があり、粗たん白質あたりのアミノ酸組成は大豆や大豆加工副産物と類似していた。また、卵黄着色効果が期待される色素のキサントフィル類をトウモロコシの 100 倍以上含むことが明らかとなった。

採卵鶏に残渣を添加率 0.7~2.7% で約 3 ヶ月間給与した結果、産卵成績や卵質に悪影響は認められず、総キサントフィル濃度を飼料の配合指標とすることで、市販色素剤 (マリーゴールド抽出物) と同等の卵黄色にコントロールすることができたため、残渣に含まれるキサントフィル類の濃度あたりの卵黄着色効果は市販色素剤と同程度であると推察された。これらのことから残渣は栄養成分と卵黄着色色素を含む家禽用飼料原料として使用することに問題ないと考えられた。

以上の結果をもとに、残渣の飼料原料価値を平成 26 年度末時の飼料原料相場を前提条件に計算したところ、本プロジェクトで利用した微細藻類の油脂抽出残渣は 30~55 円/kg 程度の価値があると評価できた。この時、キサントフィル類を考慮する卵黄色強化飼料の方が、考慮しない典型飼料より残渣の価値が高く評価された。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト/微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# 油脂生産微細藻類 *Pseudococcomyxa* の 油脂抽出残渣を利用した水産飼料開発

笠井 宏朗 (北里大学・海洋生命科学部)

猪又 幸江、明楽 秀作 (北里大学・感染制御研究機構・釜石研究所)

hkasai@kitasato-u.ac.jp

水産養殖飼料は、従来カタクチイワシ等の魚粉、魚油を主な原料としてきた。近年、主要な輸出国における資源管理や世界的な水産養殖の規模拡大に伴い、魚粉、魚油の価格は高騰しており、国内水産養殖関係業者に負担増をもたらしている。今後、相当量の排出が見込まれる油脂生産微細藻類の油脂抽出残渣は、魚粉魚油の代替原料の一つとして注目されている。

*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株 (以下、KJ 株) は、トレボキシア藻綱に属する緑藻でバイオマスの半分以上を油脂成分が占めること、屋外での大量培養が比較的容易であることから、将来バイオ燃料生産に寄与することが期待される微細藻類株である。我々は、農林水産省の「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のプロジェクト (微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発) 委託事業」において、「KJ 株の省エネ培養技術の開発」及び「油脂抽出残渣を利用した水産飼料の開発」を行ってきた。

「KJ 株の省エネ培養技術の開発」では、市販のビニールチューブ (折幅 60 cm, 厚さ 0.5 mm, ポリエチレン製) を培養槽として、低頻度の攪拌によって、培養を可能にするための方法を確立した。現在、自動攪拌装置を試作し、北里大学三陸キャンパス (岩手県大船渡市) において、長さ 10 m のビニールチューブを用いて屋外培養試験を実施している。培養槽としているビニールチューブを交換することなしに、定期的に、一定量の藻体の収穫及び新しい培地の投入を繰り返して 3 カ月間培養を継続しても、原生動物等が混入することなく培養することができた。今後、さらに長いビニールチューブを用いて、培養規模を拡大する予定である。

「油脂抽出残渣を利用した水産飼料の開発」では、収穫した藻体から有機溶媒抽出精製され燃料に変換されるトリグリセリド画分以外を KJ 株の油脂抽出残渣 (以下、KJ 残渣) として、飼育試験に供した。試験は、我が国最大の水産輸出品であり高値で取引されることから、三陸でも種苗生産へのニーズが高いマナマコを対象として実施した。マナマコは一定のサイズまで人工飼育した種苗を海域に放流し資源量を確保する。放流時のサイズが大きいほど放流後の生残率が高いため、成長速度の高い飼料が望まれる。そこで、既存の育成用飼料を対照区として KJ 残渣区の稚ナマコの成長速度を比較した。採苗後出荷サイズまでの 75 日間及びその後の 35 日間の飼育期間における稚ナマコの成長は、いずれも KJ 残渣区が既存の稚ナマコ飼料に比べて高い値を示した。また、成長や表皮の色揚げ効果を指標にした稚アユやニジマス稚魚での飼育試験においても良好な結果を得ており、KJ 残渣は水産飼料の原料として有望であることが示された。

飼料原料として必須の魚粉、魚油の価格が高止まりの傾向が続く中、省エネ低コストで種苗供給を増大できる本技術は、例えば、東日本大震災によって海洋生態系にもダメージを受けた三陸海域沿岸での水産養殖資源の回復にも貢献することが期待される。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト/微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

## 【特別講演】

# 海洋微細藻類によるグリーンオイル生産技術開発の 現状と展望について

## Perspective and Current Status of Green Oil Production Research by Marine Microalgae

松本光史<sup>1,4)</sup>、富樫秀彰<sup>2,4)</sup>、田中剛<sup>3,4)</sup>

<sup>1)</sup>電源開発株式会社、<sup>2)</sup>日揮株式会社、<sup>3)</sup>国立大学法人東京農工大学、<sup>4)</sup>NEDO

微細藻類による燃料・原料用グリーンオイル生産技術開発は、平成 20 年ごろから話題となり、国内外を含め多くの企業、研究機関が検討を進めてきた。その中で電源開発株式会社(以下、J-POWER)では、独自に構築した海洋微生物コレクション(J-POWER Culture Collection: <http://www.oceanquest.jp>)から高オイル産生海洋微細藻類の検索を進め、高オイル産生海洋性珪藻 *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 株を見出した。そこで平成 21 年度から JST- CREST 研究により、本藻を用いたグリーンオイル研究開発を進めてきた。さらに、その成果を活用する形で H25 年度から新たに NEDO 研究に採択され、低水温下でもグリーンオイル生産が可能となる耐冷性 *Mayamaea* sp. JPCC CTDA0820 株を新たに取得し、10,000L 低エネルギー型培養装置を用いて屋外環境下での年間培養を検証し、更に大量培養からオイル抽出工程を含むグリーンオイル一貫生産プロセス技術の確立、エネルギー収支、CO<sub>2</sub>削減効果などの LCA 解析などを進めてきた。

そこで今回、グリーンオイル生産技術開発の現状と展望について、これまで J-POWER が実施してきた成果を基にして、グリーンオイル生産技術開発と展望について解説したい。

# ポスター発表 要旨



## ポスター発表プログラム

### 6号館3階 6301号室

- O1. 微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発プロジェクトの概要  
原山 重明 (中央大学理工学部)
- O2. 微細藻類バイオ燃料の製造技術開発ーデンソーの取組みー  
保井 秀彦 (㈱デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)、倉田 稔、小松 さと子、蔵野 憲秀、  
福田 裕章 (㈱デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)
- O3. 寒天培地上での生育速度を指標とした油脂蓄積微細藻類株の選抜  
宮下 英明、神川龍馬 (京都大学大学院地球環境学堂)、井村綾子 (京都大学大学院人間・環境学  
研究科)
- O4. 高速増殖型ボツリオコッカスを使った有価物回収技術  
金子 典充、松澤 克明、田中 浩、武藤 潤 (㈱IHI)、千田 浩隆、宮川 裕介、遠藤 政城  
(㈱ちとせ研究所)、榎本 平 (神戸大)
- O5. *Pseudochoricytis ellipsoidea* における TAG 生合成系と油滴形成  
加藤 美砂子 (お茶の水女子大学基幹研究院)、松脇いずみ、杉井昭子、小山香梨 (お茶の水女子  
大学・院・ライフサイエンス)
- O6. 大孔径膜を用いた *Pseudococcomyxa* sp.株の高濃縮・高 FLUX・低ファウリング回収技術の開発 1  
～2 段ろ過システム～  
山村 寛、松本岳、早川准平、原山重明 (中央大学理工学部)
- O7. 大孔径膜を用いた *Pseudococcomyxa* sp.株の高濃縮・高 FLUX・低ファウリング回収技術の開発 2  
～ろ過・沈殿システム～  
山村 寛、松本岳、早川准平、原山重明 (中央大学理工学部)
- O8. Development of a method for extracting oil from microalgae using microwave irradiation capable of  
selectively heated-Disruption effects on microalgae cells by microwave irradiation-  
マイクロ波照射による選択的加熱を利用した藻類からの油分抽出技術の開発  
-マイクロ波照射による藻体細胞に対する破砕効果-  
Keiji Kidani, Kentaro Yamamoto, Akinori Ishizuka, Yasunori Tsukahara, Iwao Yoshino  
*Microwave Chemical Co.,Ltd*

- O9. 藻類油からの水素化バイオ燃料製造  
福永 哲也、社本 潤、三好 真由 (出光興産株式会社 先進技術研究所 環境・エネルギー研究室)
- O10. 微細藻類残渣の有効利用 -家禽用飼料の開発-  
小草 啓輔、山崎 識知、浅野 朋浩 (中部飼料(株)・研究技術部・総合研究室)
- O11. 油脂生産微細藻類 *Pseudococcomyxa* の油脂抽出残渣を利用した水産飼料開発  
笠井 宏朗 (北里大学・海洋生命科学部) 猪又 幸江、明楽 秀作 (北里大学・感染制御研究機構・釜石研究所)
- P1. 油分生産性を向上した 緑藻 *Pseudococcomyxa* sp.突然変異株の屋外培養評価  
倉田 稔、保井 秀彦、小松 さと子、藏野 憲秀、福田 裕章 (株デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)
- P2. 微細藻類 *Euglena gracilis* とコバラミンを生産する乳酸菌との共培養  
向田志保、谷澤靖洋、大石加寿子、有田正規 (国立遺伝学研究所生命情報研究センター)
- P3. ボトリオコッカスの細胞増産と脂質蓄積－製鋼スラグの利活用－  
野上 礼次郎、牛嶋 圭、脇坂 港\* (九州工業大学大学院 生命体工学研究科)
- P4. Milking によるバイオ燃料生産のための排出型輸送体の探索と同定  
加藤 明宏、鶴瀬 和秀 (名大・院・生命農) 高谷 信之、上坂 一馬, Chang Yajun, 小島 幸治, 前田 真一, 小俣 達男 (名大・院・生命農, JST CREST) 池田 和貴 (理研・IMS, JST CREST), 愛知 真木子 (中部大・応生, JST CREST) 井原 邦夫 (名大・遺伝子, JST CREST), 中東 憲治 (慶應大・先端研, JST CREST)
- P5. ゲノム編集技術を用いた "*Pseudochoricystis ellipsoidea*" Obi 株のデンプン合成遺伝子のノックアウトとノックアウト株の特徴付け  
高橋 啓太 (中央大学 理工学研究科 生命科学専攻) 吉満 勇也 (株式会社デンソー) 福原 いずみ、原山 重明 (中央大学研究開発機構)
- P6. *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における RNAi 法の確立  
渡邊 さゆり (中央大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻) 阿部 淳、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P7. パーティクルガン法を用いた油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の形質転換効率の改良  
阿部 淳、高木 さつき (中央大学理工学部)、今村 壮輔 (東京工業大学資源研究所) 笠井 由紀、原山 重明 (中央大学理工学部)

- P8. 油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株におけるインタクトな細胞へのエレクトロポレーション法の開発  
多々良 宏、加田 悠真 (中央大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻)、佐藤 友亮、笠井 由紀、原山 重明 (中央大学理工学部)、阿部 淳 (中央大学理工学部)
- P9. 油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における導入遺伝子発現に関する技術開発  
阿部 淳、高木 さつき、鎌倉 悠有、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P10. "*Pseudococcomyxa ellipsoidea*"における選択マーカーの繰り返し使用を可能にする遺伝的方法の開発  
塚原拓也、笠井由紀、原山重明 (中央大学理工学部)
- P11. *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株のセルフクローニングによる油脂高生産株の作成  
笠井由紀、松崎健太、池田富貴子、原山重明 (中央大学理工学部)
- P12. *Peudochoricystis ellipsoidea* におけるクロロフィル代謝経路の遺伝子発現変化  
深堀 将平 (中央大学理工学部)、井出 曜子(中央大学理工学部)、原山 重明(中央大学理工学部)
- P13. RNA-seq による TAG 合成に関わる遺伝子発現解析  
井出 曜子、岩瀬 沙紀、長谷川 流史、早川 准平、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P14. 油分生産性の高い微細藻類の創出  
井出 曜子、阿部 淳、笠井 由紀、池田 富貴子、高木 さつき、坂本 美佳、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P15. 油脂生産性緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株におけるデンブリン合成関連遺伝子の変異による油脂蓄積量増加  
早川 准平、井出 曜子、佐藤 絵衣子、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P16. 油脂生産性緑藻における暗期油脂代謝変異体の分離および解析  
早川 准平、井出 曜子、佐藤 絵衣子、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P17. 単細胞緑藻"*Peudochoricystis ellipsoidea*"の強光耐性株における強光ストレス応答の生理学的解析  
早川 准平、田中 祐樹、井出 曜子、原山 重明 (中央大学理工学部)
- P18. *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の油脂生産における光強度の影響  
畑口 沙織、早川 准平、原山 重明 (中央大学理工学部)

P19. 浸漬膜ろ過を導入した培養槽による下水処理水を用いた微細藻類培養の高効率化

本多 了(金沢大学 理工研究域)、野口 愛(金沢大学 理工研究域)、寺岡 祐大、楊 森(金沢大学 自然科学研究科)

# 油分生産性を向上した 緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. 突然変異株の屋外培養評価

倉田 稔、保井 秀彦、小松 さと子、藏野 憲秀、福田 裕章  
(株)デンソー・先端研究部・バイオ材料研究室)

[MINORU\\_KURATA@denso.co.jp](mailto:MINORU_KURATA@denso.co.jp)

食糧と競合しない微細藻類由来によるバイオ燃料の生産技術が期待されている。我々は、デンソー保有株である高油分生産藻 *Pseudococcomyxa* sp. を優占種とした培養技術開発を進めており、酸性条件下 (pH3~4) で増殖可能であることを利用した長期連続培養および海水を利用した塩ストレスによる油分生産性向上に成功している。しかし、培養プロセスの改善によるコスト低減には限界があり、微細藻由来のバイオ燃料を普及させるレベルまでコストダウンするには、微細藻の育種改良による油分生産性の向上が必須である。そのためには、①細胞当たりの CO<sub>2</sub> 取込み速度を向上させる、②光合成のできる藻体濃度を向上させる、③固定した炭素の油分への分配を高める、④油分の分解を抑制する、などの特性を改善することが有効である。我々は、各種特性がレースウェイ・ポンドでの培養における油分生産性に及ぼす影響を予測するモデルを構築し、油分生産性を改善する手段とその効果を見積もることを可能としている。

微細藻類の油分生産性は、その増殖速度と油分含量により決まる。増殖速度の改善を狙い、中央大学はクロロフィル色素の少ない変異株を単離することに成功した。緑色のクロロフィル色素が少なくなると、水中への太陽光の透過割合が増加し、より多くの微細藻類が活発な光合成を行えるようになる。実際に、屋外レースウェイ・ポンドで評価したところ、野生株に比べ藻体濃度は増加し、藻体バイオマスの生産性が向上することを確認した。更に、中央大学では油分含量の多い変異株を取得することにも成功している。これは、二重特異性チロシンリン酸化制御プロテインキナーゼ (DYRK) 活性が低下した株である。本変異株に関しても、屋外レースウェイ・ポンドにおいて培養評価を行った結果、野生株に比べ油分含量が増加し、油分生産性が向上することを確認できた。

これまでにクロロフィル色素の少ないものや、油分含量の高い変異株などを個別に取得してきたが、今後は互いに独立事象である油分生産性向上策①~④に関与する各特性の効率的な改良を目指し、油分蓄積を抑制する遺伝子群を破壊したり、油分蓄積に有効な遺伝子群をセルフクローニングで強化するなどの手段で、各特性を1つの細胞に組み込む試みを中央大学と連携して進めていく。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発) ／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」、「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発) ／高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」の一環として実施された。

## 微細藻類 *Euglena gracilis* と

### コバラミンを生産する乳酸菌との共培養

向田志保、谷澤靖洋、大石加寿子、有田正規（国立遺伝学研究所生命情報研究センター）

微細藻類 *Euglena gracilis* は動物及び植物の両方の遺伝子を有し、様々な代謝物を生産することができる。しかし、コバラミン（ビタミン B<sub>12</sub>）のみに要求性があることが先行研究により分かっている。一方、乳酸菌はアミノ酸や脂質などに厳しい栄養要求性があり、培地中に様々な成分を要する。また、これらの多くは通性嫌気性であり、好気条件下では生育しにくい。そこで、*Euglena* 及びコバラミンを生産する乳酸菌を用いて、コバラミンを欠損させた貧栄養培地（Hutner）で好氣的に共培養することで、相補的に生育に必要な栄養素を補い合い、共生可能であるかを調べた。

その結果、候補株のうち、*L. rossiae*、*Lactobacillus similis* といった多くの株において、単独で培養するよりも共培養することで、*Euglena* と乳酸菌の両者の増殖が増加することが分かった。よって、これらの乳酸菌が、コバラミンを生産し、*Euglena* に提供していることが示唆された。一方、*Euglena* はアミノ酸、不飽和脂肪酸などを乳酸菌に提供し、乳酸菌が貧栄養環境下でも、*Euglena* と共存すれば生育が可能となる可能性が示唆された。また、乳酸菌はカタラーゼを有しておらず、酸化ストレスに対する感受性が高いが、*Euglena* は、カタラーゼの代わりにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ及びアスコルビン酸再還元系を発達させており、これは、乳酸菌が好氣的な環境が生育する上で重要な要素となり得ると考えられる。加えて、*Euglena* は乳酸を資化することができるため、乳酸菌が自ら生産した乳酸により死滅するのを緩和することができる。しかし、今回の試験では、著しい pH の低下や *Euglena* による脂質生産の向上はみられなかったことから、今後は、両者の生育がより向上する条件を検討し、物質の授受など、多岐に渡って共培養による有意な効果を詳細に調べる予定である。

# Growth promotion and lipids accumulation of *Botryococcus*

## -Utilization of steelmaking slag-

### ボトリオコッカスの細胞増産と脂質蓄積 －製鋼スラグの利活用－

Reihiro Nogami, Kei Ushijima, Minato Wakisaka\*

Graduate School of Life Science and Systems Engineering,  
Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Fukuoka 808-0196, Japan.

\*Email: wakisaka@life.kyutech.ac.jp

本研究室では、バイオ燃料生産といった有用物質生産に向けて、微細藻類を速く高濃度に培養するための安価で簡便な手法として、成長促進物質を添加する培養について検討してきた。成長促進物質として、賦存量の高いアルギン酸を酵素分解したアルギン酸オリゴマーや鉄生産の副生成物である製鋼スラグについて検討している。アルギン酸オリゴマーについては、代謝物に影響を与えないが、種特異的、また短期的に増殖促進効果を示すことが知られており、ユーグレナやボトリオコッカスを対象とする我々の研究においても増殖促進する結果が得られた。一方、ほとんど全ての生物にとって鉄は必須元素であり、鉄添加による成長促進は大型海藻のみならず、微細藻類でも報告されている。また、鉄の添加はボトリオコッカスによる脂質生産に正の効果が報告されている。製鋼スラグは約 15-30 mass %の鉄 ( $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) を含んでおり、この製鋼スラグを利用した環境改善が期待されている。本研究では、バイオ燃料生産株として有望なボトリオコッカスに対して製鋼スラグを施用すると、脂質含有率を変化させずに細胞を増産できたことについて報告する。

*Botryococcus braunii* NIES-2199(以降 RaceA), *B. braunii* NIES-836(以降 RaceB)に 0.05、0.5、5g/Lの製鋼スラグを添加すると、ボトリオコッカス RaceA は添加直後から増殖が促進され、RaceB は培養中後期以降次第に増殖が促進された。また、RaceA および RaceB の対照区の増殖速度が減少した後も、全ての製鋼スラグ添加区でいずれも増殖し続けた。いずれの場合にも 5 g/L で最も増殖促進される結果が得られたが、至適濃度については更なる検討が必要である。製鋼スラグ 5 g/L の添加区では、培養 120 日目において対照区の 3 倍に増殖が促進される結果が得られた。なお、RaceA 細胞中の脂質含有量に大きな変化はなかったが、クロロフィル含有率は減少していた。製鋼スラグの添加により脂質含有率を変化させずに細胞を増産できたことから、微細藻によるバイオ燃料など有用物質生産への製鋼スラグの利活用拡大が期待される。

# Milking によるバイオ燃料生産のための

## 排出型輸送体の探索と同定

加藤 明宏, 鶴瀬 和秀 (名大・院・生命農)

高谷 信之, 上坂 一馬, Chang Yajun, 小島 幸治, 前田 真一, 小俣 達男  
(名大・院・生命農, JST CREST)

池田 和貴 (理研・IMS, JST CREST), 愛知 真木子 (中部大・応生, JST CREST)

井原 邦夫 (名大・遺伝子, JST CREST), 中東 憲治 (慶應大・先端研, JST CREST)  
katou.akihiro@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

### 背景

光合成微生物を用いたバイオ燃料生産では、TAG などの例外を除いて生産物が毒性を示す場合が多く、生産性低下の原因となっている。Milking は、生産物を継続的に細胞外に放出させて回収する生産方法で (Ramachandra et al. 2009)、生産物の毒性が緩和されて生産速度が向上し、細胞の回収にかかるエネルギーを削減でき、さらに細胞容積による制約がなくなって生産量の上限を引き上げられる、とされている。ただし、その実現には有用物質を排出するポンプが必要となる。我々は Milking による遊離脂肪酸 (FFA) の生産を目指して、FFA 排出能力をもつ輸送体の同定を試みた。

### 結果と考察

FFA が細胞内に蓄積すると、細胞は強光感受性になる (Takatani et al. 2015)。そこでこれを利用して FFA 生産株の中から強光耐性変異株を分離して、排出能力に優れた株を探索した。得られた候補株の中から RND 型排出輸送体をコードする遺伝子が高発現するものが見つかり、この遺伝子の破壊株と過剰発現株の解析から、この輸送体が FFA 排出能を有することを確認した。

RND 型輸送体はグラム陰性細菌に広く分布しており、様々な有害物質の排出に関与する。大腸菌や淋菌のように FFA 濃度の高い環境で生育する細菌では FFA の排出輸送体が同定されているが、独立栄養生物であり、貧栄養な環境に生育するシアノバクテリアから FFA 排出輸送体が同定されたのは初めてである。

### 展望

RND 型輸送体を構成する 3 つのタンパク質のうち、今回は 2 つの高発現で FFA の排出能が向上した。残りの OMP を同定して高発現できれば、更なる生産性向上が期待される。



# ゲノム編集技術を用いた "*Pseudochoricystis ellipsoidea*"

## Obi 株のデンプン合成遺伝子のノックアウトと

### ノックアウト株の特徴付け

高橋 啓太 (中央大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻)

[a10.7g7h@g.chuo-u.ac.jp](mailto:a10.7g7h@g.chuo-u.ac.jp)

吉満 勇也 (株式会社デンソー)

福原 いずみ、原山 重明 (中央大学理工学部)

真核微細藻類は光合成で獲得した有機物をデンプンやトリグリセリドという形態で貯蔵する。本研究ではデンプン合成の初発酵素 ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) の遺伝子を TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) 法によりノックアウトし、ノックアウト株におけるトリグリセリド生産の増減を調べることを目的とした。

先ず AGPase 遺伝子配列 2 ヶ所を特異的に認識する 2 種類の TALEN を設計後、それらをコードする遺伝子 (TALEN\_L、TALEN\_R) をそれぞれパーティクルガン法で、*P. ellipsoidea* 細胞に導入し、両遺伝子を持つ形質転換体を得た。その形質転換体での TALEN\_L、TALEN\_R 遺伝子の発現は real-time PCR で確認出来たが、形質転換体の AGPase 遺伝子には変異が認められなかった。しかし、形質転換体を数十世代継代培養した後、再度調べたところ、AGPase 遺伝子の TALEN target 部位に変異がある株を 3 株 (AG25、AG125、AG137) 見出すことが出来た。AG25 株は塩基の欠損によるフレームシフト変異、AG125 株は塩基の欠損、挿入によるフレームシフト変異、そして AG137 株は 1 アミノ酸の挿入であった。現在 AG25 株において脂質蓄積量は野生株の約 1.2 倍、デンプン蓄積量はほとんどゼロという結果を得ている。

今後は他の変異株の脂質・デンプン蓄積量の評価、変異株の培養条件最適化による脂質蓄積量の更なる増加、及び TALEN 法の効率化を目指している。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)」の一環として実施された。

# *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における RNAi 法の確立

渡邊 さゆり (中央大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻)

E-mail : a11.akaw@d.chuo-u.ac.jp

阿部 淳 (中央大学研究開発機構)

原山 重明 (中央大学 理工学部)

私たちは単細胞緑藻である *Pseudococcomyxa* 属に注目し、油脂生産性が更に向上した株の分離を目指している。そのための技術の1つに遺伝子ノックダウン法が挙げられる。遺伝子ノックダウン法では、標的遺伝子の機能を完全に阻害するのではなく部分抑制することが出来るので、機能を完全に失わせると増殖や生存性などの重要な機能に影響が出てしまうような標的遺伝子に対しても適用することができるという利点を持っている。

本研究では、RNA interference (RNAi) 法を用いた遺伝子ノックダウン法によって、クロロフィライド *a* からクロロフィライド *b* を合成する酵素である chlorophyllide *a* oxygenase (以下 CAO とする) 遺伝子を抑制することを試みた。CAO の活性低下によってクロロフィル *b* 含量が減少し、アンテナクロロフィル含量が減少することによって、高濃度の培養液での高量子収率が上昇することが既に知られているからである。

まず、CAO 遺伝子配列の inverted repeat を含む RNAi 発現プラスミドを作成し、パーティクルガン法により G418 耐性遺伝子を持つ別のプラスミドと共に *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に導入した結果、RNAi 発現プラスミド導入株を3株取得した。これらの導入株について、CAO 欠損株の二つの特徴的な表現型である、クロロフィル *b* 含量の減少および全クロロフィル量 (クロロフィル *a* + *b*) の減少とを調べたが、全クロロフィル量の減少およびクロロフィル *a/b* 値の増加は見られなかった。

それと並行して、CAO 遺伝子の発現量を Real Time PCR で確認した。明暗条件下で培養を行った時、野生株での CAO 遺伝子の発現は明期開始直後において最も高かったが、この時点での RNAi 発現プラスミド導入株の CAO 遺伝子の発現は、野生株の 10~50%であった。すなわち、クロロフィル量と CAO 遺伝子発現量との間に強い相関は見られなかったことから、野生株の 10%程度の CAO 遺伝子発現量でも十分な chlorophyllide *a* oxygenase 活性が得られる可能性が考えられた。今後は、より強力なプロモーターを用いた RNAi プラスミドを構築する予定である。

本研究は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)」の一環として実施された。

# パーティクルガン法を用いた 油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の形質転換効率の改良

阿部 淳、高木 さつき（中央大学理工学部）、  
今村 壮輔（東京工業大学資源研究所）  
笠井 由紀、原山 重明（中央大学理工学部）

藻類からのバイオ燃料生産を効率化する上で、遺伝子組換え技術の担う役割は大きい。しかし、軽油代替燃料生産への応用が期待される真核微細藻類への遺伝子組換えの成功例は少なく、その技術向上が急務となっている。単細胞緑藻 ”*Pseudochoricystis ellipsoidea*” 株およびそれと近縁な *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株は、パーティクルガン法により形質転換が可能な数少ない高油脂生産藻類の一つであり（Imamura et al. 2012）、この方法を用いて種々の遺伝子組換え有用株の作出が実際に可能となっている（Kasai et al. 2015）。しかしながら、形質転換効率は  $10^8$  transformants per input cell 以下と極めて低く、遺伝子組換え系の汎用化への大きな障壁であった。そこで本研究では、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に対するパーティクルガンによる形質転換効率の改善と遺伝子導入条件の最適化を試みた。

*P. ellipsoidea* 株由来の Tubulin 遺伝子プロモーターと Actin 遺伝子ターミネーターを持ち、G418 耐性遺伝子 (*nptII*) をマーカーとしたプラスミドベクターをパーティクルガン PDS-1000/He (Bio-Rad) により *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に導入した。金粒子径、撃ち込み圧力、撃ち込み回数、飛距離について検討した結果、既存の 0.6  $\mu\text{m}$  径金粒子よりも小さい 0.3  $\mu\text{m}$  径金粒子を用いた時に形質転換効率は平均 32 倍に上昇した。撃ち込み圧力 (1,100 psi/1,550 psi)、撃ち込み回数 (1 回/2 回) において大きな違いは認められなかったが、飛距離 (6 cm/9 cm) は 6 cm が至適であった。さらに、撃ち込み後の回復培地にグルコースを添加することによって、形質転換効率は 4.6 倍に上昇した。以上の条件を組み合わせた結果、初期の条件に対して平均 148 倍の形質転換効率の改善が認められ、 $3 \times 10^6$  transformants per input cell での形質転換が可能となった。

同様の結果は *P. ellipsoidea* 株に対する形質転換でも得られている。今後、本改良法によって、*P. ellipsoidea* 株および *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株への遺伝子組換え技術と有用株の作出が加速されることが期待される。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)」の一環として実施された。

# 油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における インタクトな細胞へのエレクトロポレーション法の開発

多々良 宏、加田 悠真（中央大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻）、佐藤 友亮、笠井 由紀、原山 重明、阿部 淳（中央大学理工学部）

我々は、高油脂生産藻類 "*Pseudochoricystis ellipsoidea*" 株およびそれと近縁な *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株への遺伝子組換え技術の開発を目指している。これまでに、パーティクルガン法を用いた効率的な形質転換技術を開発し（阿部他・本シンポジウム発表）、種々の遺伝子組換え有用株の作出を可能としてきた（Kasai et al. 2015）。いっぽう、エレクトロポレーション法はパーティクルガン法に比べコスト面や操作性で優れ、導入遺伝子の分断やコピー数増加が抑えられるなどメリットも多く、利用できれば強力な形質転換手法となる。しかしながら、細胞壁欠損変異株の構築や、細胞壁を酵素的に除去あるいは薄弱化したプロトプラストやスフェロプラストの調製とその再生も要求され、技術的な困難も伴っている。

本発表では、*P. ellipsoidea* 株あるいは *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に対するエレクトロポレーション法の適用について報告する。*P. ellipsoidea* に対するスフェロプラスト化は、同調細胞の利用と 14 種類の細胞壁溶解酵素に対する感受性試験により達成されたが（スフェロプラスト化率; 40-60%）、細胞壁再生に関しては成功に至らなかった。そこで、細胞壁を有するインタクトな細胞に直接エレクトロポレーションを行う方法を検討した。低電圧マルチスクエアパルス方式（Nepa21; ネッパジーン、CUY21 Vitro-EX; BEX）、及び高電圧エクスポネンシャルパルス方式（Gene Pulser Xcell; Bio-Rad）のエレクトロポレーターを用いて G418 耐性遺伝子（*nptII*）を形質転換した結果、後者のエレクトロポレーターにおいて多数の G418 耐性株を得ることに成功した。形質転換効率は、用いた  $\mu\text{g}$  DNA 量に拘わらず 8,000 V/cm 以上で最も高く、4.0  $\mu\text{g}$  の DNA を導入した時の細胞数あたりの耐性コロニー出現率は  $6.6 \times 10^{-6}$  transformants per input cell であった。この効率は、パーティクルガンにおける効率と同等かそれよりも高い。

以上、本研究により *P. ellipsoidea* 株や *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に対して直接かつ効率的なエレクトロポレーションが可能であることが明らかとなった。今後、詳細な条件検討を重ね効率を高めることによって、*P. ellipsoidea* 株および *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株のみならず、トレボキシア藻綱に属する細胞への遺伝子組換え技術の開発が加速するものと期待する。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）」の一環として実施された。

# 油脂生産緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における 導入遺伝子発現に関する技術開発

阿部 淳、高木 さつき

鎌倉 悠有、原山 重明（中央大学理工学部）

我々は、高油脂生産藻類”*Pseudochoricystis ellipsoidea*”株、およびそれと近縁な *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株への遺伝子組換え技術の開発を目指している。この組み換え技術の性能を最大限に発揮させるためには、高効率プロモーターの開発が重要となる。*P. ellipsoidea* 株と *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株のプロモーターについては、*P. ellipsoidea* 株より単離された Tubulin 遺伝子/Actin 遺伝子のプロモーター/ターミネーターの組み合わせ (Imamura et al. 2012) が、双方の株で機能することが分かっていた。しかし、その活性は弱く、また *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株においてはセルフクローニング (Kasai et al. 2015) に対応し得る内在性のプロモーターの開発も必要であった。

本研究課題では、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株において導入遺伝子発現に有効な恒常的・高発現プロモーターの開発を目指した。まず、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の RNA-seq 発現プロファイルから様々な発現レベルを示す遺伝子を 4 種類選定し、各プロモーター/ターミネーターに G418 耐性遺伝子 (*nptII*) を連結したコンストラクトを作製、形質転換と薬剤選抜を通してプロモーターの強さを推定し、最終的に Elongation Factor 1 $\alpha$  遺伝子 (*EF1A*) を選択した。次に、導入遺伝子発現の強さと変動をモニタリングするために GFP レポーターアッセイを構築し、*EF1A* プロモーター/ターミネーターの活性を GFP 蛍光により定量した。その際、mRNA の安定化に関わることが期待されるイントロン (*KJRBCS I<sup>st</sup> intron*) と、導入遺伝子の位置効果を抑制すると期待したインスレーター (*Ars Insulator*) を配した GFP 発現コンストラクトも作製し、同時に評価した。その結果、イントロンおよびインスレーターの効果は認められなかったものの、*EF1A* プロモーター/ターミネーターは前述の Tubulin/プロモーター/Actin ターミネーターに対して GFP 蛍光輝度で平均 3 倍、mRNA 量で平均 18 倍の発現量を示し、本プロモーターが *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の導入遺伝子発現に有効であることが分かった。

いっぽう、上記の実験を通して、単離された形質転換体の中で発現量が大きく異なる現象がしばしば観察された。本研究では、この問題をクリアするための一つの手法として、自己切断 2A ペプチドを GFP を用いたポリシストロニックベクターの開発も行ったので、本ポスターではその結果も合わせて発表したい。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)」の一環として実施された。

# "*Pseudococcomyxa ellipsoidea*"における 選択マーカーの繰り返し使用を可能にする遺伝的方法の開発

塚原拓也、笠井由紀、原山重明（中央大学理工学部）  
ykasai@kc.chuo-u.ac.jp

*P. ellipsoidea* を初めとした真核微細藻類の分子育種においては、複数の遺伝子を数回にわたって導入したい状況にしばしば直面する。それを実現するためには、通常、毎回異なった選択マーカーを使用する必要がある。つまり、使用できるマーカー数により遺伝子導入での回数が制限されることになる。この問題を解決するために、マーカーを繰り返し使用できる遺伝的方法を開発する必要がある。本研究では、選択マーカーとして Positive selection が可能な栄養要求性マーカーを使用し、これに Cre/loxP system を組み合わせることにより、選択マーカーを繰り返し使用可能とする遺伝的方法を確立することを目指した。

まず、*P. ellipsoide* の UMP 合成酵素遺伝子 (UMPS) の cDNA (*PeUMPS*) を、RuBisCO 小サブユニット遺伝子 (*PeRBCS*) のプロモーターとターミネーターで挟んだ発現コンストラクトを作製し、それを更に loxP 配列で挟み (*loxP-PeUMPS-loxP*)、pBlueScript II SK (+) にクローン化した (*ploxP-PeUMPS*)。このプラスミドを UMPS が欠損した *P. ellipsoidea* ウラシル要求突然変異 (Ura<sup>-</sup>) 株 19r にパーティクルボンバードメントで導入し、ウラシル要求性が回復した形質転換体 (Ura<sup>+</sup>株) を最少培地上で 436 個選抜した。PCR 法で *loxP-PeUMPS-loxP* のゲノムへの挿入を解析したところ、40 株で全長の挿入が確認できた。この内、8 株を選抜し導入遺伝子のコピー数を Southern blotting で解析したところ、5 株で *loxP-PeUMPS-loxP* がそれぞれ 1 コピー挿入されていた。

次にこれらの 5 株に Cre recombinase 遺伝子 (*cre*) を導入し、loxP 配列間の UMPS 発現コンストラクトが切り出され再度 Ura<sup>+</sup>となった形質転換体の分離を試みた。*P. ellipsoidea* 内で *cre* 遺伝子を効率よく発現させるために、コドン最適化した *cre* 遺伝子 (*KJCRE*) を zeocin (Zeo) 耐性遺伝子 *ble* と linker peptide で連結し、*P. ellipsoidea* 由来のプロモーター、ターミネーターと連結して *pble-KJCRE* を作製した。前記の Ura<sup>+</sup>形質転換体にこの *pble-KJCRE* をパーティクルボンバードメントで導入し、Zeo 耐性株を選抜した。得られた形質転換体 268 個の内、17 株で *pble-KJCRE* 発現コンストラクト全長が挿入されていた。これら 17 株を 5-FOA とウラシルを含むプレートで選抜し、5-FOA 耐性を獲得したコロニーを PCR 解析した結果、17 株中 8 株で *loxP-PeUMPS-loxP* の切り出しが確認できた。

*KJCRE* の染色体への安定的組み込みを伴わず、一過性の Cre recombinase 発現で起こる Cre/loxP 部位特異的組換えを検出するために、*KJCRE* を *P. ellipsoidea* 由来のプロモーター、ターミネーターと連結した *pKJCRE* または *pble-KJCRE* を上記 Ura<sup>+</sup>形質転換体に導入し、5-フルオロウラシル (5-FOA) とウラシルを含む培地で培養した (Ura<sup>+</sup>株は 5-FOA に耐性となる)。*pKJCRE* を導入した株では 5-FOA 耐性コロニーが 150 個、*pble-KJCRE* を導入した株では 5-FOA 耐性コロニーが 300 個得られた。PCR 解析の結果、*pble-KJCRE* を導入した場合は 300 株中 42 株、*pKJCRE* を導入した場合は 150 株中 6 株で *loxP-PeUMPS-loxP* の欠失株が確認できた。*pKJCRE* と比較して *pble-KJCRE* の Cre/loxP 部位特異的組換え効率が高かったのは核移行する Ble との fusion により、*KJCRE* の核移行効率が上昇したためと考えられる。また、*loxP-PeUMPS-loxP* が欠失した 48 株全てで *KJCRE* の組換えが起きていないことを PCR で確認した。

以上の結果より、*P. ellipsoidea* で Cre/loxP 部位特異的組換えを利用したマーカー遺伝子を繰り返し利用する方法が確立できたと結論した。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)」の一環として実施された。

# *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株のセルフクロニングによる 油脂高生産株の作成

笠井由紀、松崎健太、池田富貴子、原山重明（中央大学理工学部）  
ykasai@kc.chuo-u.ac.jp

他種の遺伝子を組換えた生物（Genetically Modified Organisms, GMO）は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（通称カルタヘナ法）」により屋外での使用規制を受ける。*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の遺伝子組換えでは、細菌由来の抗生物質耐性遺伝子を選択マーカーに利用していることから、現行のままでは、油脂生産性を改良しても屋外培養には利用できない。そこで、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の遺伝子のみを利用した遺伝子組換え、すなわちセルフクロニングシステムによる遺伝子組み換え技術の開発が必要となる。本研究ではウラシル要求性突然変異（Ura<sup>-</sup>）を選択マーカーとして Positive selection のできる宿主を開発し、セルフクロニング手法を用いて油脂高生産株の作成を目指した。

*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の Ura 株を取得するために、5-フルオロウラシル（5-FOA）を含む培地で培養して自然突然変異を誘発した。O.D.<sub>750</sub> = 12 まで増殖した細胞を 5-FOA とウラシルを含むプレートで選抜し、得られた 5-FOA 耐性コロニーを同じ条件で 2 回継代培養を繰り返して 9 株の 5-FOA 耐性 Ura 株を取得した。6 株で UMP 合成酵素遺伝子（*KJUMPS*）全長の塩基配列解析を行い、6 株全てでアミノ酸配列に影響を与える突然変異が検出された。この内の 1 株（MK15）では 9 塩基の欠失が起きていた。この Ura 株の自然復帰突然変異率が 10<sup>-7</sup> 未満であったことから、形質転換宿主として利用可能であると結論した。

*KJUMPS* cDNA を *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株由来のポリペプチド鎖伸長因子（Elongation Factor）1- $\alpha$  遺伝子（*KJEF1A*）のプロモーターおよびターミネーターで挟んだ発現コンストラクトを作製し、pBlueScript II SK (+) にクローン化した（pUT3）。pUT3 にはプラスミドを大腸菌で選抜するための抗生物質耐性遺伝子等の他生物種由来の DNA 配列を含むため、完全なセルフクロニングとは言えない。そこで、*KJEF1A* プロモーター-*KJUMPS*-*KJEF1A* ターミネーター配列部分のみを pUT3 から制限酵素で切り出し、精製した断片を Ura 株 MK15 にパーティクルボンバードメントで導入した。最少培地上でウラシル要求性が回復した形質転換体（Ura<sup>+</sup>株）が得られたことから、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株においてセルフクロニングシステムが確立できたと結論した。

次に MK15 株で *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株由来の  $\alpha$ -Glucosidase 遺伝子（*KJAGL1*）、diacylglycerol acyltransferase 遺伝子（*KJDGAT2;4*）および acyl-ACP thioesterase 遺伝子（*KJFAT1*）を同時に高発現させ、油脂高生産株を作製することを試みた。*P. ellipsoidea* で確立した選択マーカーを繰り返し使用できる遺伝的方法を *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株に適用するために、*KJUMPS* 発現コンストラクトの両端に *loxP* 配列を導入した *loxP-KJUMPS-loxP* を作製し、pBlueScript II SK (+) にクローン化した（ploxP-KJUMPS）。*KJAGL1*、*KJDGAT2;4*、*KJFAT1* をそれぞれ *KJEF1A* のプロモーターおよびターミネーターで挟んだ発現コンストラクト（pAGL1, pDGAT2;4, pFAT1）および ploxP-KJUMPS は制限酵素で切り出し、プラスミド由来配列を除去した。パーティクルボンバードメントで MK15 株に導入し、Ura<sup>+</sup>株を最少培地上で 471 個選抜した。PCR 法で *KJAGL1*、*KJDGAT2;4*、*KJFAT1* 発現コンストラクトの挿入を確認したところ、31 株で 3 遺伝子すべての発現コンストラクト全長の挿入が確認できた。今後油脂およびデンプン含有量を解析する予定である。

本研究は国立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託事業「バイオマスエネルギー技術研究開発 / 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）」の一環として実施された。

# *Pseudochoricystis ellipsoidea* における クロロフィル代謝経路の遺伝子発現変化

深堀 将平 (中央大学理工学部生命科学科)

[a12.cs5b@g.chuo-u.ac.jp](mailto:a12.cs5b@g.chuo-u.ac.jp)

井出 曜子、原山 重明 (中央大学理工学部)

本研究では *P. ellipsoidea* Obi 株とその近縁種を用いて、様々な培養条件や変異株でクロロフィル代謝経路の遺伝子発現がどのように変化しているかを調べた。

最初にクロロフィル代謝経路の遺伝子を同定するために *Arabidopsis thaliana* と *Chlamydomonas reinhardtii* のクロロフィル代謝経路の遺伝子のアミノ酸配列を得た。それらをクエリーにして BLAST 検索を行ったところ、光非依存型 Protochlorophyllide reductase (DPOR) と Magnesium-chelatase I サブユニット (CHLI2) は葉緑体ゲノムに、残りのクロロフィル代謝経路の酵素は核ゲノムにコードされていた。

次に *P. ellipsoidea* Obi 株、Obi 株の *CaO* 遺伝子に変異がありアンテナクロロフィルが減少した突然変異体 (5P 株)、5P 株を親株とした 4 系統の高油脂蓄積変異体の RNA-seq データを用いて解析を行った。5P 株では親株に比べてクロロフィル合成遺伝子 25 個中 5 個で発現の減少が見られた。4 系統の高油脂蓄積変異体のうち、タンパク質リン酸化酵素 DYRK に独立の変異がある 3 系統は、クロロフィル合成経路遺伝子発現が全体的に減少していた。

Obi 株において明暗 12 時間周期での培養では、暗期と明期でクロロフィル代謝遺伝子の発現が周期的に変化した。

また、Obi 株と近縁な *Pseudococomyxa* sp. KJ 株の窒素栄養欠乏における遺伝子発現変化を RNA-seq によって調べたところ、窒素欠乏によりクロロフィル合成遺伝子発現は減少したが、クロロフィル分解に関わる *PaO* 遺伝子の発現は増加していた。

以上、RNA-seq を用いた遺伝子発現解析から、クロロフィル代謝経路の遺伝子発現は、光条件や窒素栄養条件、DYRK の変異に応答することが分かった。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業 (次世代技術開発)／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」の一環として実施された。



# RNA-seq による TAG 合成に関わる遺伝子発現解析

井出 曜子、岩瀬 沙紀、長谷川 流史、早川 准平、原山 重明 (中央大学理工学部)  
[ideyoko@bio.chuo-u.ac.jp](mailto:ideyoko@bio.chuo-u.ac.jp)

微細藻類によるバイオ燃料の実用化のためにはさらなる油脂生産性の向上が必要であり、そのためには藻類の油脂合成・蓄積機構についての理解が必要である。単細胞性緑藻 "*Pseudochoricystis ellipsoidea*" Obi 株および、Obi 株と近縁な *Pseudococomyxa* sp. KJ 株、N1 株について解析を行った。Obi 株、KJ 株、N1 株は、窒素栄養欠乏や NaCl 添加などのストレス条件下で TAG の蓄積量が増加する。また、光合成産物であるデンプンは、窒素欠乏によって蓄積が増加した後減少するが、貯蔵脂質である TAG は増加し続ける。窒素欠乏条件下での NaCl 添加により、すべての株で TAG の増加とともにデンプンの減少が見られ、また、Obi 株では生育の増加が、KJ 株と N1 株では生育の減少が見られた。Obi 株、KJ 株、N1 株についてゲノム解析を行うと同時に、これらの条件下で RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、TAG 合成に関わる遺伝子の探索と遺伝子発現の変化を調べた。

葉緑体内でのピルビン酸から脂肪酸の合成に関わる遺伝子発現は、多くの遺伝子で窒素欠乏による発現の増加は見られず減少が見られたが、NaCl 添加によりすべての遺伝子で発現が増加した。脂肪酸から TAG を合成する経路に関わる遺伝子は、窒素欠乏による発現の増加が見られた遺伝子が多く、また NaCl 添加による発現の増加も見られた。これらの脂肪酸合成や TAG 合成に関わる遺伝子のうち、高油脂蓄積条件下で発現の増加が顕著であった遺伝子については、TAG 蓄積の増加に寄与している可能性が高いと考えられ、窒素欠乏、NaCl 添加のいずれにおいても発現の増加が見られた遺伝子について、過剰発現させることで油脂生産性の向上を目指した。

また、デンプンの合成と分解に関わる遺伝子発現の変化を調べたところ、デンプンの蓄積が減少した NaCl 添加時には、デンプンの合成に関わる遺伝子発現の減少は見られず、むしろ増加の傾向が見られた。しかし、デンプンの分解に関わる遺伝子の複数において、Obi 株、KJ 株、N1 株ともに NaCl 添加によって顕著に発現が増加していた。そのうち最も発現量が高い遺伝子の過剰発現によりデンプン分解を促進させることによって、油脂生産性の向上を目指した。

以上、3 種類の異なる微細藻類を用いて、TAG 合成に関わる代謝経路の遺伝子発現解析を行い、TAG 蓄積の増加に寄与する遺伝子の候補を選抜した。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」の一環として実施された。

## 油分生産性の高い微細藻類の創出

井出 曜子、阿部 淳、笠井 由紀、池田 富貴子、高木 さつき、坂本 美佳、  
原山 重明 (中央大学理工学部)

[ideyoko@bio.chuo-u.ac.jp](mailto:ideyoko@bio.chuo-u.ac.jp)

微細藻類によるバイオ燃料生産の実用化のためには、さらなる油脂生産性の向上が必要である。単細胞性緑藻 "*Pseudochoricystis ellipsoidea*" Obi 株と比較して、Obi 株と近縁な *Pseudococomyxa* sp. KJ 株は、窒素欠乏条件下において、約 2 倍の油脂生産性を示した。この KJ 株にさらに TAG 合成に関与する遺伝子を過剰発現させることによって、油脂生産性が増加した形質転換体を得ることを目的とした。

RNA-seq による TAG 合成に関わる遺伝子発現解析により、KJ 株で過剰発現させることで油脂生産性の増加が期待される内在性遺伝子の候補を選抜した。KJ 株内でデンプンの分解に関わる  $\alpha$ -グルコシダーゼ (AGL1)、脂肪酸の合成に関わるアシルチオエステラーゼ (FAT1)、TAG の合成に関わるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT2;4) の各遺伝子を過剰発現させるために、cDNA を KJEF1a プロモーターおよびターミネーターとそれぞれ連結して pAGL1、pFAT1 および pDGAT2;4 を作製した。KJ 株にパーティクルボンバードメント法を用いて G418 耐性遺伝子と共導入し、G418 耐性コロニーを選抜した。その中から各遺伝子の発現カセットが挿入されているコロニーを選抜し、その油脂生産性を評価した。また、これら 3 遺伝子を一つの細胞内で過剰発現させるため、pAGL1 を導入した中で最も油脂生産性が高かった形質転換体に、パーティクルボンバードメント法を用いて残り 2 つの遺伝子を Zeo 耐性遺伝子と共導入し、Zeo 耐性コロニーを選抜した。それらのコロニーから FAT1 および DGAT2;4 の両方が挿入されていた形質転換体を選抜し、その油脂生産性を評価した。

以上の結果、脂肪酸合成、TAG 合成、デンプン分解に関わるそれぞれの酵素遺伝子の過剰発現により、油脂生産性が増加した株の創出に成功した。また、それら 3 つの遺伝子を 1 つの株で過剰発現させることにより、油脂生産性が 1.7 倍に増加した株の創出に成功した。

本研究は、NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」および農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# 油脂生産性緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株におけるデンプン合成関連遺伝子の変異による油脂蓄積量増加

早川 准平、井出 曜子、佐藤 絵衣子、原山 重明（中央大学理工学部）

微細藻類が蓄積する油脂はバイオディーゼル燃料として利用可能であり、クリーンな再生可能エネルギーとして期待されている。しかしながら、商業的な利用のためには未だ生産性が低く、油脂を効率的に蓄積する藻類の育種が必要である。植物や藻類において光合成によって固定された炭素は、主に油脂またはデンプンとして貯蔵され、細胞内における両者の蓄積量はトレードオフの関係にあると考えられている。そこで、窒素欠乏条件下で油脂およびデンプンを蓄積する緑藻 *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株を用いて、デンプン含有量が有意に減少した変異株を分離することで油脂生産性の改善を試みた。

KJ 株における突然変異誘起は N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)を用いた。NTG 処理後の細胞を寒天培地上に広げ、得られた単一コロニーから細胞懸濁液を作製した。これを窒素欠乏培地で湿潤した濾紙にスポットし、連続光、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 20 時間培養した。その後、濾紙を 105°C、30 分処理し 80% EtOH を用いて脱色、ヨウ素溶液でデンプン染色を行った。青紫色の呈色が減少または消失したコロニーをデンプン合成変異株としてその後に実験に用いた。

得られた 2 つの変異株 (Sta\_A5、Sta\_8C4) は、KJ 株と比べ窒素欠乏条件下において有意にデンプン含有量が減少し、油脂含有量の増加がみられた。特に、窒素欠乏初期において顕著な油脂含有量の増加がみられた。これは、油脂合成に先行するデンプン合成が阻害されたことによって、光合成により固定された炭素の分配が油脂合成に向かったためと考えられる。

全ゲノム配列解析の結果から、Sta\_A5 および Sta\_8C4 株はいずれもデンプン合成に関与する酵素、Isoamylase 1 (ISA1) および Phosphoglucomutase 1 (PGM1) にそれぞれ変異が確認された。植物における ISA1 変異株はデンプン顆粒の形成を阻害しデンプン蓄積量の減少とともに、可溶性デンプンを蓄積する。今回得られた変異株 Sta\_A5 においても可溶性のデンプンが増加していることが確認された。一方、シロイヌナズナにおける PGM1 変異株ではデンプン欠損表現型を示すとともに油脂含有量も 40%減少しており、Sta\_8C4 と異なる。よって、デンプン合成と脂質蓄積における炭素の流れは、植物と藻類で異なることが示唆された。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」の一環として実施された。

# 油脂生産性緑藻における暗期油脂代謝変異体の 分離および解析

早川 准平、井出 曜子、佐藤 絵衣子、原山 重明（中央大学理工学部）

藻類を用いたバイオディーゼル生産には光エネルギーが不可欠である。しかしながら、太陽光を利用した屋外大量培養系においては、夜間、天候不順、増殖による培養槽内細胞密度の増加、といった光が十分に利用できない状況は避けられない。このような光合成のための光が不足した状況下では、細胞内の脂質やデンプンをはじめとする貯蔵されたエネルギーは呼吸によって消費される。そこで、油脂生産性緑藻 *Pseudococcomyxa ellipsoidea* Obi 株および *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株を用いて、暗期に油脂分解が抑制された変異株を分離することで油脂生産性の向上を目指した。

それぞれの親株から分離された暗期油脂分解低減変異株は、暗所における油脂分解が有意に抑制されており、暗所移行後 5 日間を経ても最初の含有量と比べて 9 割以上を保持していた。一方、油脂と同時に細胞内に蓄積されているデンプンの分解は野生株、変異株いずれにおいても速やかに行われた。さらに、これらの変異株の油脂代謝は完全に失われておらず、光を与えた場合、または、培地にグルコースを添加することで細胞の増殖のためのエネルギーとして消費することが示された。これらの結果より、蓄積された油脂の消費には 2 つの経路が考えられる。一つはエネルギー枯渇状況下でも脂質を分解する経路、もう一つは外部よりエネルギーが供給される状態でのみ脂質分解が起こる経路である。前者は変異株において欠損しており、暗期の細胞維持に脂質分解は必須ではないことが示唆された。後者の経路を明らかにし、増殖最終段階でこの経路を抑制することが出来れば、さらなる油脂生産性の改善が期待できる。

また、これらの変異株における全ゲノム配列解析から、共通するトリアシルグリセロール分解リパーゼ、**Sugar dependent 1 (SDP1)** の異なる箇所に変異が生じていた。このリパーゼは植物の種子において発芽の際に働く酵素で、貯蔵した油脂をエネルギーとして利用するために必要であり、**SDP1** 欠損株では発芽後の胚軸成長に影響を及ぼす。藻類においてもこの遺伝子が蓄積された油脂の分解に関与し、暗所油脂分解が抑制された原因因子と考えられる。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」および NEDO の委託研究「バイオマスエネルギー技術研究開発／戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業（次世代技術開発）／油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」の一環として実施された。

# 単細胞緑藻"*Pseudochoricystis ellipsoidea*"の強光耐性株 における強光ストレス応答の生理学的解析

早川 准平、田中 祐樹、井出 曜子、原山 重明（中央大学理工学部）

植物や藻類をはじめとする光合成生物において、CO<sub>2</sub>固定を行うために光は必要不可欠である。一方で、自身の光合成能力を超える強度の光は細胞にとってストレスとなり、その生育を阻害する（光阻害）。単細胞緑藻 *Pseudochoricystis ellipsoidea* Obi 株はその速い増殖速度や低い pH で生育可能といった屋外大量培養に適した形質を備えていることから、バイオ燃料生産株として有望ある。しかしながら、多くの光合成生物と同様に、日中の強光条件下では光阻害を受け、増殖も阻害される。そこで、ニトロゾ・グアニジンによる突然変異処理を施し、強光 (2,000 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) 条件下においても生育可能な強光耐性変異株を取得した。

得られた変異株において光阻害耐性を評価するため、強光照射後の細胞を用いて、その光合成活性（酸素発生速度）、および、パルス変調クロロフィル蛍光測定を行った。野生株では照射時間が増すに従って光合成活性の低下がみられ、1 時間照射後では開始時のおよそ 25%にまで低下した。一方、変異株では、同様の条件下で 65%の光合成活性を保っていた。さらに、強光照射 1 時間後での Fv/Fm 値についても変異株では、野生株よりも有意に高い値を示しており、光化学系の損傷が抑えられていることが示唆された。また、野生株における Fv/Fm 値の低下は、空気通気（大気 CO<sub>2</sub> 濃度）条件に比べ 1% CO<sub>2</sub> 通気条件下で有意に抑えられていた。これは、空気通気では炭酸固定反応が遅く NADPH の消費が少ないために、還元力が過剰となり、光化学系の損傷が起こることを示唆している。しかしながら、変異株では異なる CO<sub>2</sub> 濃度での Fv/Fm 値に差は見られず、光化学系にダメージを与えないように余剰なエネルギーが散逸するシステムが働いていると考えられる。

この結果は、変異株では過剰な光を安全に散逸させる Non-photochemical quenching (NPQ) が強く誘導されていることとよく一致する。Dithiothreitol (DTT) は NPQ の一つであるキサントフィルサイクルに關与する violaxanthin de-epoxidase (VDE) を不活性化する。DTT の添加により野生株の NPQ はその大部分が抑制されたが、変異株では一部しか抑制されなかった。一方、チラコイド膜の脱共役剤として働く NH<sub>4</sub>Cl を添加した場合、いずれの株においても NPQ の消失が確認された。さらに、野生株を強光に順化させることで変異株と同様の NPQ を形成することから、変異株は強光によって誘導される ΔpH 依存的な NPQ が恒常的に発現していることが示唆された。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト／微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# *Pseudococcomyxa* sp. KJ 株の油脂生産における光強度の影響

畑口 沙織、早川 准平、原山 重明 (中央大学理工学部)

*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株における光強度と光合成との関係を示す光合成曲線は得られていなかった。また、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株は窒素欠乏条件下で油脂を蓄積するが、窒素欠乏条件下での油脂合成速度と光強度との関係も調べられていなかった。そこで本研究では、窒素十分条件下における増殖速度と光強度との関係、窒素欠乏条件下における増殖速度と光強度との関係、および窒素欠乏条件下における油脂合成速度と光強度との関係を調べた。

五段階の光強度 (20, 40, 120, 360, 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の下、*Pseudococcomyxa* sp. KJ 株を 150 ml の培地が入った 200 ml のかめ瓶で培養し、窒素欠乏条件、窒素十分条件それぞれについて培養 0, 4, 6, 8, 10 日目の OD<sub>750</sub>、乾燥重量、油脂含有率を測定した。

窒素十分条件下では、20~800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の範囲の光強度で、光強度が高いほど増殖速度 (培養液量あたりの乾燥重量の生産速度) が速かった。また、油脂生産はこの条件でほとんど起こらなかった。一方、窒素欠乏条件下では、360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光強度までは、光強度が高いほど増殖速度が速かった。360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  と 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とでは、360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の方が増殖速度が速いが、その差は小さかった。また、20~800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の範囲では、光強度が高いほど油脂含有率は高いが、360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  と 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とでは、両者の差はほとんどなかった。

増殖速度と光強度との関係、および油脂合成速度と光強度との関係を、40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  における乾燥重量増加速度と油脂合成速度をそれぞれ 1 とした相対値で比較した。窒素十分条件下における乾燥重量増加速度は 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  のとき 3.8 であるのに対し、窒素欠乏条件下における油脂合成速度は 2.2 であった。このことから、窒素欠乏条件下における油脂合成は、高い光強度の光を有効に利用できていないことがわかった。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト/微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の一環として実施された。

# 浸漬膜ろ過を導入した培養槽による 下水処理水を用いた微細藻類培養の高効率化

本多 了 (金沢大学 理工研究域)

Email: rhonda@se.kanazawa-u.ac.jp

野口 愛 (金沢大学 理工研究域)

寺岡 祐大、楊 森 (金沢大学 自然科学研究科)

下水処理水は、安価で都市域において量が豊富なこと、窒素・リンだけでなく豊富な炭酸を含んでいることから微細藻類の培養基質として有望である。しかし、微細藻類の培養研究で用いられている多くの合成培地 (数百 mgN/L, 数十 mgP/L) と比べて、下水処理水の栄養塩濃度は低いため (10-20 mgN/L, 1-5 mgP/L), 微細藻類のウォッシュアウトを防ぎながら供給負荷を向上する工夫が必要となる。

本研究では、基質滞留時間 (HRT) と藻類保持時間 (SRT) を独立で制御することを可能とする、精密ろ過 (MF) 膜を浸漬した培養槽 (メンブレン・フォトバイオリアクター) (図 1) を開発し、藻類生産速度が最大となる最適運転条件を調べた。*Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* の 3 種の微細藻類株を混合して模擬下水処理水にて連続培養を行った結果、HRT=24 時間, SRT=18 日のときに容積あたり藻類生産速度が最大となった。この運転条件を培養槽とは別に固液分離を設けたプロセスで実現する場合、93%の微細藻類を培養槽に返送することが必要となり、下水処理水による微細藻類培養において、浸漬膜ろ過の導入が有効であることが示された。一方で、培養槽内のリン濃度は 0.1 mgP/L を下回ったことから、高栄養塩合成培地と同程度の生産性を得るためには、リンの供給負荷向上が必要であることが示唆された。

次に、栄養塩供給負荷のさらなる増加による藻類生産性向上効果を明らかにするために、*Chlorella vulgaris* を種株としてさらに HRT=8 時間に短縮した系で同様の連続培養を行った。その結果、リン濃度の不足は解消されたが、容積あたり藻類生産速度の向上は見られなかった。原因として、光照射量不足による濃度の限界および膜面・壁面への微細藻類の付着が影響している可能性が考えられた。Monod モデルに基づく動態解析より、栄養塩供給が制限因子となっている系では、容積あたり微細藻類生産速度 ( $X/\theta_s$ ) は基質滞留時間 ( $\theta_H$ ) に比例すること、一方、光照射量が制限因子となっている系では、容積あたり微細藻類生産速度 ( $X/\theta_s$ ) が最大となるような最適微細藻類濃度が ( $X_e$ ) 存在し、最適微細藻類濃度 ( $X_e$ ) は、光照射量と培養槽の光照射面積容積比 (Surface-volume ratio: SVR) に応じて決まることが示された。

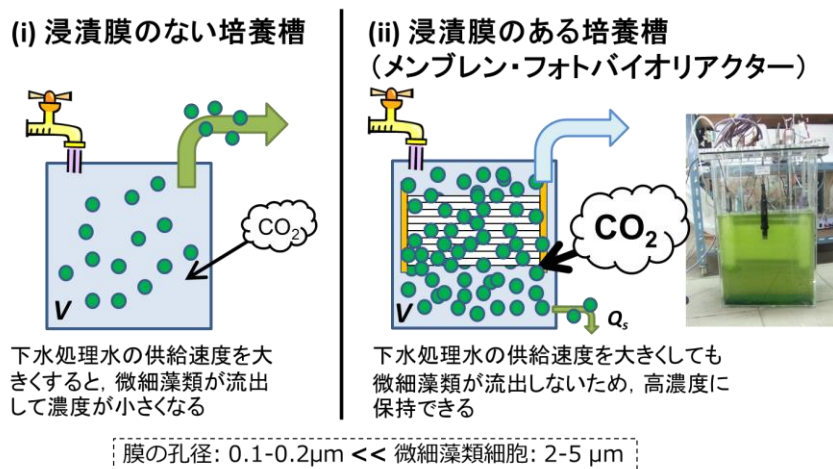


図 1 浸漬膜を導入した培養槽 (メンブレン・フォトバイオリアクター) による微細藻類培養

中央大学研究開発機構

TEL:03-3817-1600

<http://www.chuo-u.ac.jp>



