

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22612003

研究課題名（和文）オイル産生藻によるバイオ燃料創出 ～紫外線によるオイル産生藻の脂質生産向上法～

研究課題名（英文）Biofuel creation by oil-producing microalgae ～Improvement method in lipid production of oil-producing microalgae by UVR～

研究代表者

大井 信明 (OHI NOBUAKI)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：70367192

研究成果の概要（和文）：地球温暖化・エネルギー問題が叫ばれている中、光合成により CO₂ を固定し、オイル生産を行う海産微細藻が注目されている。これは他の植物バイオマスに比べ生産量が格段に高く、食糧と競合せず、豊富な海水で培養できる利点がある。一部の微細藻はストレス条件化でオイルを蓄積し、その量は種によって異なる。初年度にオイル産生量が多い藻の選抜を行い、バイオ燃料として有望な海産株を見出した。2 年目には光酸化ストレスによるオイル蓄積を引き起こす環境条件を明らかにした。3 年目には光酸化ストレスによるオイル産生メカニズムの解明をおこなうため、海産藻に特化したメタボロミクス解析特に脂質メタボロミクス解析手法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Oceanic oil-producing microalgae has been focused for solution of global warming and energy problems. Microalgae are highly biofuel producer than plant biomass, no competition with food and growing ocean water. A part of microalgae accumulate oil by stress conditions and its oil-contents are variety by species. We had conducted screening of highly oil-producing marine microalgae and discovered potentiality strains as biofuel. We have developed the metabolomics and lipidomics analysis method for oceanic microalgae to elucidate mechanisms of oil-accumulation by photooxidation stress to improve oil-production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：藻類生理生態学

科研費の分科・細目：時限, バイオマスエネルギー

キーワード：脂質, 植物, 水産学, 生理学, 海洋利用

1. 研究開始当初の背景

球温暖化は大気中の二酸化炭素の上昇によって引き起こされ、その主な原因は化石燃料の大量消費であることは周知の事実である。また、多くの研究者は現在の化石燃料の消費

量が続けば、50 年で枯渇すると報告しており、代替エネルギーの開発は緊急の課題である。現在、多くの再生可能エネルギーが研究されているが、バイオ燃料は貯蔵運搬が容易で、化石燃料用向けに作られた既存の設備を利用

できるなど、多くの利点がある。

地球上の約70%を占める海洋に生息する海産性微細藻は、地球上の全光合成の約50%を担い、二酸化炭素固定を行っている。日本を除く海外では、米国を中心に微細藻による次世代エネルギーの研究が精力的に進められており、そのために政府や企業が莫大な研究費を投入している。

微細藻類が次世代エネルギーとして注目されている理由は、

- 1) 石油と異なり、カーボンニュートラルな原料である。
- 2) 陸上植物と比べて、単位面積あたりの二酸化炭素吸収量及びオイル産生量が格段に高い。
- 3) 工場から排出する二酸化炭素を効率よく利用できる。
- 4) 農業に適さない荒れ地でも生育可能で、食糧と耕作地が競合しない。
- 5) 収穫期が限られた作物と違い、年中安定して収穫できる。
- 6) 地球上に存在する膨大な海水で培養できる。

などが上げられる。また同じ自然エネルギーの利用であっても、風力発電や太陽光発電などが電力のみを生み出すのに対し、植物である微細藻類は、主に太陽光と二酸化炭素・水・無機物からさまざまな有機物（脂質・炭水化物・タンパク質など）を同時に産生可能である。

これらの物質は燃料だけでなく、繊維やプラスチックなど様々な素材の原料となりうるため、微細藻類は石油と同等の汎用性を持った代替資源と見なすことができる。

第一次オイルショック以降の1980年から今日に至るまで、アメリカ政府は微細藻によるバイオ燃料創出プロジェクトに研究費を計上している。実験室レベルの研究の流れとしては、

- 1) オイル産生藻の収集・スクリーニング・生理特性調査、
- 2) 脂質生産の生化学・生理学的観点からの解明、
- 3) 藻類の突然変異による脂質生産増産のための遺伝子工学的研究

の順に進められてきている。

微細藻はストレスにより脂質が蓄積されることが知られているが、その一つに紫外線による酸化ストレスにより脂質蓄積があげられる。

また微細藻を利用して、効率的に物質生産を行うためには、微細藻の代謝能力を目的に合わせて制御することが大きな課題の一つである。現在、淡水産藻類や海洋性の珪藻などを用いて、その有用物質の生産能力を向上させるため、代謝生成遺伝子の発現解析(トランスクリプトミクス)やタンパク質(プロテオミクス)、代謝産物(メタボロミクス・リピドミクス)の網羅的解析が行われている。しかし、海産微細藻類のリピドミクスに関する知見はないに等しい現状である。

メタボロミクスにおける代謝物の検出には質量分析 (Mass Spectrometry, MS) が頻用され、分子量及び構造情報を得ることができるとともに、高感度の定量が可能である。これまでに、ガスクロマトグラフィー (GC) / MS やキャピラリー電気泳動 (CE) / MS により、解糖系、トリカルボン酸 (TCA) サイクルなどの生体内の中心代謝経路に関わる親水性の低分子代謝物を対象としたメタボロミクスが盛んに行われている (田口 2010)。

一方で、脂質に関しても、近年の研究でエネルギー源や生体膜の構成成分であるだけでなく、生理活性シグナル分子として生理現象に関わっていることが明らかになったことから、メタボロミクスのターゲット分子として注目されるようになり、脂質メタボロミクス、リピドミクスとして、脂質に特化したメタボロミクスが最近、医学系の分野で特に積極的に進められている(馬場 2012)。

微細藻類の脂質メタボロームに関する研究は極最近、淡水性のモデル微細藻類 *Chlamydomonas* を用いた GC/MS による炭化水素種の網羅的測定 (Barupal *et al.* 2010) や、LC/MS によるリン脂質及び糖脂質種の網羅的測定 (Lu *et al.* 2011) が報告されている。またオイル産生藻類とし注目されている *Botryococcus* (Barupal *et al.* 2010) や *Pseudochoricystis* (Ito *et al.* 2012) においても同様の報告がなされている。また、海洋性微細藻においては珪藻 *Stephanodiscus* でのみ報告 (Xu *et al.* 2010) が行われている状況で、それ以外の知見は得られていない。

2. 研究の目的

一部の微細藻はストレス条件化でオイルを蓄積し、その量は種によって異なる。オイル産生量が多い藻をスクリーニングしてバイオ燃料として有望な株を発見する。また、光酸化ストレス (特に紫外線) がオイル蓄積を引き起こすメカニズムをメタボロミクスの手法で明らかにし、オイル産生量を向上させるた

めの手がかりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

① 脂質生産量の高いオイル産生微細藻を世界のカルチャーセンターから購入する。同時にオイル産生微細藻として知られる有用種を海岸から単離・同定する。それらの脂質生産量、脂質組成、機能性物質の比較を行い、有用株のスクリーニングを行う。

② スクリーニングされたオイル産生有用株の紫外線UV-B (280-320 nm) による光保護・光合成阻害・DNA 損傷に起因した各代謝産物特に脂質量をLC-MS 及びCE-MS を用いて調べ、紫外線による脂質生産機構を解明する。

③ 脂質メタボロミクス手法

脂質は水に不溶性な生体成分の総称であり、基本的には疎水性が高いとされるが、リン酸基や糖など、極性の高い分子種の結合により、幅広い極性を持つ。これに加えて、脂肪酸の鎖長や不飽和度だけが異なる多数の構造類縁体が存在すること、構造異性体が存在することなどから、脂質の分析には高度な分離分析技術が必要である。また、データ解析においても脂肪酸の組み合わせや結合位置が異なるが同じ m/z を示す異性体、いわゆる同重体が多数存在するため、成分の同定には独特の解析が必要である。このような状況が脂質メタボロミクスを実施しようとしたときの大きなハードルとなり、脂質におけるメタボロミクス研究が遅れてきた理由の一つである。

メタボロミクスは網羅的な代謝物の解析を目的としているが、実際には一回の分析で必要とするすべての代謝物の情報が得られるというわけではない。解析対象を脂質に限ったとしても多数の分子種が存在し、それぞれの含有量も大きく異なることから、目的に応じた分析方法の使い分けが重要である。我々はダイレクトインフュージョン(ショットガン)MS 法により、特定の脂質クラスに解析対象を絞りその中で網羅性を追求した。リン脂質においてはコリン基やセリン基など特有の極性基を有することから、それらの部分構造を持つものを特異的に検出するプリカーサーイオンスキャンやニュートラルロススキャンを用いて、特定の脂質クラスの分子群を選択的にかつ包括的に分析することができる。プリカーサーイオンスキャンは、結合脂肪酸の解析にも有用である。本法は目的とする脂質のプロファイルの取得が可能なることから、LC などの分離手法を用いなくても良い簡便さ、ス

ループットの面から頻用されている (Ejsing *et al.* 2006)。

脂質メタボロミクスにおける多成分を対象とした一斉分析から得られたデータには、類似構造の成分が多数混在するため、成分の同定にはかなりのスキルと膨大な時間を要する。脂質においては、結合脂肪酸の組み合わせが異なることにより多様化しているものの種類(クラス)が20種程に限られていることから、入手可能な脂質標準品を用いて同定に必要な基礎的なフラグメント情報を取得し、データベースを構築することが可能である。実際に生体資料を分析することによって、そのデータを脂肪酸鎖長や不飽和結合の数などの分子種を形成する種々の要素から生じる多様性を理論的に構築したデータと照合しつつ、データベースを拡張することにより、標準品の入手できない脂質の同定も可能なデータベースが構築できる。MS データからの自動ピッキング技術と、蓄積、開発されてきたデータベースと検索アルゴリズムを合体させることにより、質量分析による脂質測定データから脂質代謝物を自動同定するための LipidView という検索ツールが開発されている。脂質の質量分析の生データを読み込み、適切な脂質ピークを選択する波形解析モジュール、脂質の仮想構造から、そのプリカーサーイオンとそこから生じるプロダクトイオンデータ群を保持する脂質データベース、抽出した脂質ピークと脂質データベースを使用し、サンプル内に存在する脂質を同定するモジュールで構成されている。MS1、ニュートラルロスキャン、プリカーサーイオンスキャンの各スペクトルの同定結果を集計し、最も確からしい脂質を検索することが可能である。現在、脂肪酸、アシルグリセロール、リン脂質、糖脂質など約25,000以上の分子が格納された理論データベースが構築されている (Zhou *et al.* 2011)。

4. 研究成果

一部の微細藻はストレス条件化でオイルを蓄積し、その量は種によって異なる。初年度にオイル産生量が多い藻のスクリーニングを行い、バイオ燃料として有望な海産株を見出した。

2年目には光酸化ストレス(特に紫外線)によるオイル蓄積を引き起こす環境条件を明らかにした。また、新たに構築したメタボローム解析システムを用いて、海産オイル産生微細藻抽出物から、カルビン・ベンソン回路から糖合成及び脂質合成に至るまでの代謝物の内、電気泳動型-飛行時間型質量分析計

(CE-TOF/MS)により、オイル産生藻の解糖系、カルビン回路、TCAサイクル、アミノ酸生合成経路の55代謝物以上の分析に成功している。

最終年度は高速液体クロマトグラフィー-イオントラップ3連四重極型質量分析計(LC-Ion Trap Tandem MS/MSⁿ)を用いて、海産微細藻類の脂質生合成経路上の200以上の脂質分子種の網羅的解析に成功し、海産微細藻脂質メタボロミクス解析の技術基盤の確立を行った。

至適条件下で海産微細藻を培養、 $10^7 - 10^8$ 細胞を低温下(微量代謝物の消失を防ぐため)でメタノール (- 80°C) : クロロホルム (- 40°C) : 水 = 1: 2: 0.8 で抽出した。キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE - TOF / MS) を用いて、*E. huxleyi* 抽出水溶性画分からカルビン回路・解糖系・TCA サイクル・アミノ酸生合成経路を網羅した 55 種類の代謝物の定性に成功した。さらに、*E. huxleyi* 抽出油溶性画分からイオントラップ型質量分析計 (Ion Trap MS/MSⁿ) によるショットガンリピドミクス解析により $10^7 - 10^8$ 細胞の一度の測定から、遊離脂肪酸 (FFA)・Fatty acyl-CoA・アルケノン (Alkenone) ・リン脂質 [Phosphatidylcholine (PC) ・ Phosphatidylethanolamine (PE) ・ Phosphatidic acid (PA) ・ Phosphatidylglycerol (PG) ・ Phosphatidylinositols (PI) ・ Phosphatidylserine (PS)] ・ 糖脂質 [Monogalatosyldiglyceride (MGDG) ・ Digalactosyldiglyceride (DGDG) ・ Sulfoquinovosyl diacylglycerols (SQDG)] ・ ジアシルグリセロール (DAG) ・ トリアシルグリセリロール (TAG) 等の 15 主要脂質、200 脂質以上の分子種が脂質データベースより検出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大井 信明, 新家 弘也, 鈴木 石根, 白岩 善博 「海洋植物プランクトンの脂質メタボローム解析」日本海洋学会春季大会, 品川, 3月 21-24 日, 2013
- ② OHI, Nobuaki, Hiroya ARAIE, Iwane SUZUKI, Yoshihiro SHIRAIWA “Lipidome profiling of ultra-long chain oil producing microalgae” 7th Metabolome Symposium, Tsuruoka, Yamagata, October 11th, 2012.

③ 五十嵐 和也 「日本の未来の資源～海産性微細藻を用いたオイル生産～」第 1 回高校生バイオサミット in 鶴岡, 山形, 8 月 11-12 日, 2011

④ Ohi, Nobuaki, Takuro Ito, Arashida Ryo, Junko Fujikura, Kazuya Igarashi, Tomoyoshi Soga and Masaru Tomita “Metabolome profiling of microalgae *Euglena gracilis* producing bio-jet fuel feedstock” 1st International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts, St. Louis, USA, July 17-20, 2011

⑤ Ohi, Nobuaki, Takuro Ito, Tomoyoshi Soga and Masaru Tomita “Evaluating the usefulness of marine oil-producing microalgae for bio-fuel creation” Microalgal Biotechnology – Food・Environment・Energy -, Tokyo, May 31, 2010

[図書] (計 1 件)

① 大井 信明, 新川 はるか, 田中 美穂, 井内 仁志, 広川 まりん, 富田 勝 (2010) 「微細藻利用による二酸化炭素からの軽油生産技術」杉本 裕 監修, 二酸化炭素の有効利用技術、サイエンス&テクノロジー、東京、pp. 288-308

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 信明 (OHI NOBUAKI)
筑波大学・生命環境系・研究員
研究者番号 : 70367192

(2) 研究分担者

仲田 崇志 (NAKADA TAKASHI)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教
研究者番号 : 10548994
2011-2012 年度まで

伊藤 卓朗 (ITO TAKURO)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・研究員
研究者番号 : 10548994
2011-2012 年度まで

(2) 連携研究者 2011-2012 年度まで

佐藤 暖 (SATO DAN)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教
研究者番号 : 50468477
2011-2012 年度まで