

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19220

研究課題名（和文）菌類培地で藻類を育てる；未開拓バイオリソース探索の新スクリーニング

研究課題名（英文）Growing Algae in Fungal Media; New Screening for Exploration of Untapped Bioresources

研究代表者

石田 健一郎（Ishida, ken-ichiro）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：藻類バイオマス利用のための生物資源として未開拓のまま残されていた地衣共生藻について、菌類用の培地を改変した培地Yを用いて、新規有望培養株の選抜と既存有望培養株の培地の最適化を実施した。Nile-red染色により、オイルの高生産能が期待される地衣共生緑藻の培養株5株の選抜に成功した。また、既存の地衣共生緑藻有望培養株について、培地Yの成分及び濃度を調整することにより、従来培養に比べて2-3倍のバイオマス収量および乾燥細胞重量あたり40%のオイル生産を得ることに成功した。これらは地衣共生藻の新たな藻類バイオマス資源としての有用性を期待させる成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、知財としての出願が想定されるため詳細は述べられないが、地衣共生藻の一部には、特定の培地を使用することにより、藻類バイオマス生産およびオイル生産において非常に高い能力を発揮するものがあること、また廃棄物などを培地として使用できる可能性を示しており、将来的には非常に安価で環境に優しく効率よくオイル生産が可能になることを期待させるものである。さらに本研究は、地衣共生藻の一部が増殖とオイル蓄積を同時に行うなど、他の藻類には見られない非常に特異な性質を持つことを示唆しており、学術的にも興味深い知見を多数提供している点で、今後の研究に新展開をもたらす高い意義をもつと考えている。

研究成果の概要（英文）：Five cultured strains of lichen photobiont green algae with high oil production potential have been successfully selected by Nile-red staining. In addition, by adjusting the composition and concentration of medium Y, we succeeded in obtaining 2- to 3-fold higher biomass yield compared to the cultivation performed before this project began and in reaching 40% oil production per dry cell weight, using the existing promising lichen symbiotic green algal strain. These results suggest that lichen photobiont may be useful as a new algal biomass resource.

研究分野：藻類学、原生物学

キーワード：藻類バイオマス 地衣共生藻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 藻類は、持続可能な低炭素社会の構築において、様々な分野で注目され期待されるバイオマス資源の一つである。特に脂質は、DHAなどの脂肪酸から、カロテノイド色素、炭化水素など、藻類ごとに様々な脂質がつくられることが知られており、増殖がよく且つこれらの脂質を大量に生産する藻類が求められている。しかし、藻類の増殖と脂質生産は、一般にトレードオフの関係にある。つまり、藻類が活発に増殖している間は生産したエネルギーを増殖に向けるため、脂質や糖などの蓄積をあまりせず、定常期に入り増殖が抑えられると脂質や糖を細胞内に蓄積するのである。従って、藻類バイオマスを利用して脂質生産などを行う場合、増殖期と脂質生産期を分けて2段階で培養するか、ある程度妥協して増殖と脂質生産のバランスを取る必要がある。これが、本来の脂質生産能力を発揮しきれない、生産コストがあがる、培養日数がかかる、などの藻類バイオマス開発が抱える課題の一因となっている。

(2) 研究代表者らは、地衣共生藻で緑藻の一種(SMTS-200-PL-009 株とする)をこれまで藻類培養に使用されたことがない菌類用の培地(培地 Y とする)で培養すると、通常の培地での培養に比べて増殖が格段に良くなり同時に脂質を細胞内に大量に蓄積することを発見した。このことは、地衣共生藻という未開拓フロンティアに脂質生産に適した新たな有望バイオリソースが存在する可能性を示すとともに、これまで藻類培養に使用されたことのない新しい培地成分や培養法を検討することにより、細胞増殖と脂質生産を同時に向上させるなど、上記の課題を解決できる可能性を示している。培地 Y により細胞増殖と脂質生産を同時に向上させられることは新知見であり、既存の有用藻類培養株でも同様の効果があれば、現在の藻類脂質生産効率を飛躍的に向上させることも期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 未開拓フロンティアである地衣共生藻に着目し、新たな培地(培地 Y)を用いたスクリーニングを実施し、この培地のもとで脂質生産に適した培養株を新たに見出すこと、(2) 培地 Y により既存有用株の増殖および脂質生産性向上の可能性を検討すること、を目的とした。また、当初(1)の中で実施予定であった既存の有望培養株である緑藻 SMTS-200-PL-009 株についての培養条件の最適化と脂質分析は、本報告書においては3つ目の目的(3)として分けて報告させていただく。

3. 研究の方法

(1) **未開拓フロンティア地衣共生藻からの脂質高産生藻類バイオリソースの探索**: 野外に生育する様々な地衣類個体から、共生藻を単離し、独立栄養培地の一つである BBM 培地で培養・無菌化し、無菌培養株を確立した。得られた培養株を培地 Y、淡水 GTY 培地(ラビリンチュラ類等の従属栄養培地)、AF-6 培地(一般的な微細藻類用独立栄養培地)で14日間予備培養し、NiIe-red 染色により蛍光顕微鏡下での目視による脂質の生産性評価を行った。

(2) **培地 Y を用いた既存有用藻類の有用性向上試験**: 既存有用藻類(炭化水素を産生するボトリオコッカス(NIES-836 株、NIES-2199 株)、トリアシルグリセロール(TAG)産生緑藻のコッコミクサ(NIES-2252 株、NIES-2166 株、NIES-4343 株)、アスタキサンチン産生緑藻のヘマトコッカス(NIES-144 株))を対象として、まず、培地 Y と AF-6 培地を用いた予備的

な培養を 20、12 時間明期：12 時間暗期、で 30 日間実施し、通常の培養条件において培地 Y による培養でも AF-6 培地と遜色なく増殖するかどうかの確認を行った。その際、初期細胞濃度をボトリオコッカスとヘマトコッカスについては 1×10^5 cells/ml、ココミクサについては 1×10^6 cells/ml に揃え、増殖の確認は目視による培養色の変化により判断した。細胞増殖の計測は、通常独立栄養培養で培養されるボトリオコッカスとヘマトコッカスの各培養株について、培地 Y あるいは AF-6 培地を用いて、初期細胞濃度 1×10^5 cells/ml で 20、14 時間明期：10 時間暗期、30 日間振盪培養し、0、2、6、10、14、22、30 日目に培養中の細胞濃度を血球計算板を用いて計測した。

(3) 緑藻 SMTS-200-PL-009 株の培養条件最適化と脂質分析：培地の最適化を行うため、培地 Y を構成する成分のうちグルコースの濃度を 0、1、2、3、4% に調整した各培地を用いて緑藻 SMTS-200-PL-009 株を細胞初期濃度 1×10^6 cells/ml で 20、14 時間明期：10 時間暗期、14 日間振盪培養し、2 日ごとに培養中の細胞濃度を血球計算板を用いて計測した。また、グルコースを除いた培地 Y (培地 Y-Glu) の濃度を変えた増殖試験も、初期細胞濃度 5×10^6 cells/ml で 20、14 時間明期：10 時間暗期、14 日間振盪培養で実施し、2 日ごとに培養中の細胞濃度を血球計算板により計測した。脂質分析は、乾燥藻体からクロロホルム：メタノール = 2：1 で脂質を抽出してそれを総脂質とした。得られた総脂質について、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸分析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 未開拓フロンティア地衣共生藻からの脂質高産生藻類バイオリソースの探索：各地から採取した地衣 29 個体より、100 株の共生藻無菌培養株が確立された。そのうち 42 培養株について、本研究で培地 Y を用いた脂質生産性のスクリーニングを実施した結果、Nile-red 染色により脂質生産能が確認された培養株では AF-6 培地、あるいは GTY 培地でも培養より培地 Y による培養の方が脂質蓄積 (Nile-red 染色) が高い傾向があることが示唆された。その中で最も強い Nile-red 染色蛍光を示した 5 株を選抜し、有望株とした (図 1)。今後各培養株での増殖の最適化を試み、増殖と脂質生産性の両面から更なる有望株として絞り込みを行う予定である。

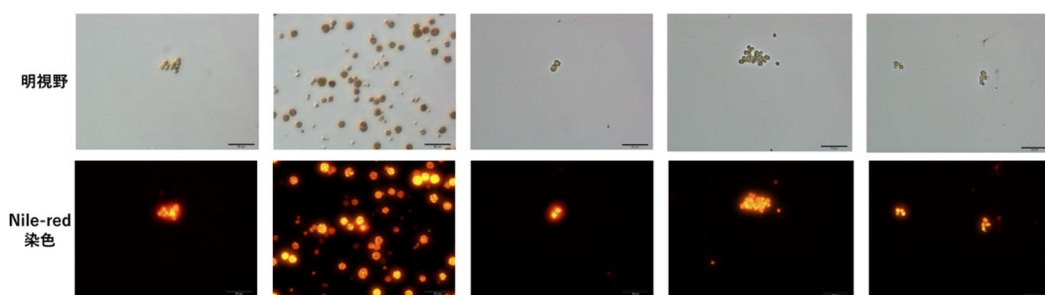


図 1：地衣共生藻の選抜された 5 培養株

(2) 培地 Y を用いた既存有用藻類の有用性向上試験：

ボトリオコッカス (NIES-836 株、NIES-2199 株)、ココミクサ (NIES-2252 株、NIES-2166 株、NIES-4343 株)、ヘマトコッカス (NIES-144 株) について、培地 Y で増殖可能かどうかをまず確認する必要があった。そこで各培養株について AF-6 培地、培地 Y それぞれを用いた予備培養を行い比較した結果、各培養株とも培地 Y において AF-6 培地よりも良好な増殖を示すことが確認された。この結果を受けて、次に通常独立栄養培養によりバイオマス生産が行われるボトリオコッカスとヘマトコッカスの培養株にしぼり、増殖実験を実施した。細

胞計数の労力を制限するため、既に混合栄養培養で良好の増殖が報告されているコッコミクサは実験から除外した。増殖実験の結果、ヘマトコッカス（NIES-144 株）では、30 日間で培地 Y を用いることにより AF-6 培地による培養に対して約 4.5 倍の細胞密度を得た。また、ポトリオコッカスでは培地 Y による培養で AF-6 培地による培養に対して、NIES-836 株で約 2 倍、NIES-2199 株で約 1.4 倍の細胞密度を得た。これらの結果は、培地 Y を既存の有用藻類に対して用いることにより、より良いバイオマス生産が得られる可能性を示しており、今後、これら有用藻類の生産性向上に向けて、培地 Y によるバイオマスおよび有用脂質生産の最適化を進める予定である。

（3）緑藻 SMTS-200-PL-009 株の培養条件最適化：

培地 Y に含まれていたグルコースの濃度が増殖にどのように影響するかを確かめるため、グルコース濃度を変えて緑藻 SMTS-200-PL-009 株の細胞増殖を比較したところ、グルコースの濃度によらず全ての実験区で細胞は同様に増殖し、増殖に対するグルコース濃度の影響はほぼないことが示された。このことは、本培養株の増殖にグルコースは必要ないことを示しており、バイオマス生産を想定した場合にグルコース添加のコストが必要ないことが明らかとなった。本培養株が何を炭素源として資化して増殖するのかは今後の調査対象である。また、培地 Y-Glu の濃度を変えた増殖試験の結果、実験した範囲では培地 Y-Glu の濃度が高いほど増殖およびバイオマス生産が促進される結果となった。本培養株の最適培地濃度を求めるためには、今後さらに高い培地濃度での試験が必要である。脂質分析の結果、総脂質量として乾燥細胞重量あたり最大 40% を脂質が占める結果を得て、そのうち 10% が脂肪酸として検出され、残りの 90% は脂肪酸以外の未同定脂質となり、本研究開始前の予備的な分析が再現された。一方で、培養によって、総脂質として乾燥細胞重量あたり 3% 程度しか得られず、未同定脂質が存在しなくなる現象も生じた。そこで、この未同定脂質の同定に向けて、安定的に未同定脂質を得るための培養条件の検討を実施した。これにより、研究期間内にこの未同定脂質の同定には至らなかった。

本研究により、地衣共生藻が新たな藻類バイオマス資源として、既存の藻類種とは異なる性質を持つ十分に有望な存在であることを示すことができ、藻類バイオマス開拓の新天地を開くことができたと考えられる。また、同時に 培地 Y の有用性も示され、この培地を工夫することによって藻類バイオマス生産のブレイクスルーとなる可能性がより高まったといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤遥奈、小野寺智香、瀧澤幸史、鈴木大智、白鳥峻志、中山剛、吉田昌樹、石田健一郎
2. 発表標題 暗所で緑化し従属栄養的に増殖する新規クロレラ様緑藻TH2-565株の明-暗間での発現遺伝子比較解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会（京都）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	出川 洋介 (Degawa Yosuke) (00311431)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	
研究分担者	鈴木 石根 (Suzuki Iwane) (10290909)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------