

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：57601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658280

研究課題名(和文)糖分泌型藻類を利用したエネルギー創生

研究課題名(英文)An approach to make biofuels with microalgae secreting photosynthetic products

研究代表者

高橋 利幸 (Takahashi, Toshiyuki)

都城工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：50453535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：非食料資源を原料とする次世代バイオ燃料の候補として、草木などとともに注目されているのが微細藻類である。本研究では、一部の原生動物や腔腸動物に共生する共生藻に着目した。当該藻類は、自身の体外に糖類を分泌する特性を持ち、当該藻類を用いた糖やエネルギー生成システムの構築を検討した。その結果、当該藻類の糖分泌を人為的に誘導し、得られた糖を用いてエタノール生成が可能であった。しかし、実用化には、当該藻類による糖分泌条件の最適化が必要である。また、遺伝子工学技術を通じた人為的制御による糖分泌活性の制御や上昇が可能かどうか検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Microalgae, non-competitive biomaterials with any food market, are expected as next generation biomass to make biofuels. To develop a new method to make biofuels, Chlorella-like algae isolated from Paramecium bursaria was used as microalgae in this study. The algae can secrete their photosynthetic products outwardly. Thus, the photosynthetic products released from the algae can be used for making biofuels. Results showed that artificial operations including adjustment of pH and aqueous CO₂ concentration could significantly control secretion of photosynthetic products from the algae. In addition, yeast could convert the secreted carbohydrates into ethanol functioning as biofuels. However, it is important for a practical standpoint of this system using the algae to optimize the algal activity to secrete photosynthetic carbohydrates. It has to be also investigated whether the up-regulation of the algal activity to secrete carbohydrates is artificially induced through gene technologies.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス 細胞機能 生体機能利用 生物・生体工学 二酸化炭素排出削減

1. 研究開始当初の背景

エネルギー問題は、国際社会が抱える中・長期的課題の中で最も重要な課題の一つである。また、地球温暖化の懸念から、CO₂ 量の削減・CO₂ の固定化およびその有効利用も重要な課題である。これらの背景から、植物の光合成に基づくバイオ燃料は、代替エネルギーとしてエネルギー問題の解決策に期待されるのみならず、地球温暖化など環境保全の観点からも有効な手法として注目されている。

既存のバイオ燃料（例えば第一世代バイオエタノールなど）は、トウモロコシやサトウキビなどの食料を原料（バイオマス）としてエタノールを生成している（図1）。しかし、食料のエネルギー用途への転換は、食料品市場に影響を及ぼすという問題がある。そこで、次世代バイオ燃料のバイオマスとして、食料品市場を刺激しない非食資源からのバイオ燃料の生成が重要課題となっている。これら非食資源として、草木などセルロース基盤のバイオマスとともに注目を集めているのが微細藻類である。

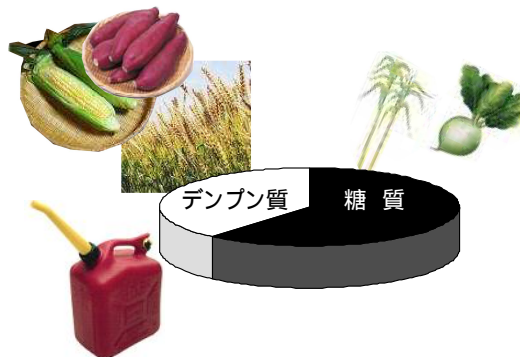


図1：第一世代バイオエタノールの内訳
（高橋&長崎，環境技術，2011から転載）

藻類は、古典的実験材料として、生理・生態が研究されてきた。しかし、近年の分子解析では、主要研究対象が哺乳動物や高等植物に移行し、藻類は若干軽視されてきた。藻類は、高等植物にはない独特な生理的特徴（糖や炭化水素の分泌を含む）を有する。本研究では、原生動物ミドリゾウリムシ（*Paramecium bursaria*）、腔腸動物グリーンヒドラやサンゴの細胞内に共生する共生藻に着目した。当該藻類は、自身の体外に光合成産物を分泌できる。そこで、当該藻類を用いて、従来のバイオ燃料のように、バイオマスである共生藻を破碎することなく（=資源としてバイオマスを減らさず）、永続的なバイオ燃料の生成を実現できるか、また、それら糖分泌型藻類を利用した新たな糖およびエネルギー創生システムを構築できるか検討を行うこととした。

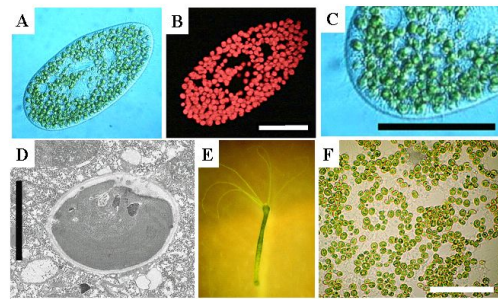


図2：原生動物ミドリゾウリムシ (A-C) や腔腸動物グリーンヒドラ (E) とそれらの共生藻 (D: ミドリゾウリムシの共生藻, F: グリーンヒドラの共生藻)
（高橋&長崎，環境技術，2011から転載）

2. 研究の目的

微細藻類は、食料供給と競合しないバイオ燃料の新規バイオマスとして注目されている。特に微細藻類として、体外に光合成産物を分泌できる特殊な藻類（原生動物ミドリゾウリムシや腔腸動物サンゴなどに共生する共生藻）に着目した。本研究では、当該藻類が培養液中に分泌した糖の効率的利用法の開発を目的とした。また、糖分泌機構を分子レベルで解明し、糖分泌量の増幅など人為的制御の可能性も検討した。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* システムにおける糖分泌条件の最適化

本来、共生藻は、それぞれの宿主細胞内に共生し、相利共生の代替として宿主細胞側に相当する自身の細胞外に糖を分泌する。一方、ある種の共生藻は、宿主外でも人工培養でき（Nishihara et al., *Protoplasma*, 1998）、糖分泌活性も維持できるが（Ziesenisz et al., *Planta*, 1981）バイオ燃料への利用を想定するとその糖分泌活性の最適化を必要とする。そこで、培養条件（pH、溶存二酸化炭酸濃度など）を変化させ、それらの条件下における培養上清への分泌糖量をフェノール硫酸法で定量し、*in vitro* 培養における共生藻の糖分泌条件の最適化を検討した。

(2) 分泌糖を用いたエタノール生成

共生藻は、pH に関して中性付近よりも若干酸性の条件下で糖を分泌する。そのため、当該藻類から得られる分泌糖は酸性溶液中に存在する。当該分泌糖液をそのままアルコール発酵に適用する場合、アルコール発酵を行う酵母菌が上記分泌糖液中で生存できるか、次いで、上記溶液中でアルコール発酵が可能かどうか検討を行った。は、分泌糖液の組成を人工的に調整・再現し、当該酸性溶液中で酵母を培養し、濁度測定から酵母の細胞増殖の程度を測定した。では、ニクロム酸法により、当該糖液中でアルコール発酵によるエタノール生成を定性的に評価した。なお、ここでは、上記の人工的に調整し

た糖液の条件に加え、実際に当該藻類から得られた分泌糖液（pH を中性に再調整した条件と未調整の条件）も実験に用いた。

(3) 共生藻の糖分泌関連因子の探索

当該共生藻を含む多くの原生生物は、利用可能な遺伝子・タンパク質のデータベース等が未整備の状態である。また、当該藻類の糖分泌に関わる分子機構の詳細も不明である。一方、糖分泌に直接関与する分子の同定やその制御は、遺伝子組換え技術を通じた分泌糖量の人為的制御の可能性を生み出す。そこで、本研究では、当該藻類の糖分泌機構に関する基礎研究の一環として、糖分泌条件（酸性培養条件）および非分泌条件下（中性培養条件）におけるタンパク質発現の変化を二次元電気泳動法で比較検討した。

4. 研究成果

本研究では、バイオ燃料に用いる微細藻類バイオマスとして体外に光合成産物を分泌できる共生藻に着目した。特に、当該藻類は、アルコール発酵を行う酵母菌が直接利用できる種類の糖を分泌できる。したがって、デンプンなどの多糖類を基にしたバイオエタノール生成と比較して、アルコール発酵の前処理として糖化処理を必要とせず、さらに、共生藻を破碎する必要がないため、共生藻をバイオマスとしてリサイクルすることが期待できる。本研究期間を通して、以下の(1)~(3)の結果を得た。

(1) 本研究では、当該藻類による糖分泌活性の最適化を目的として、種々の培養条件における糖分泌特性を反応速度論的に解析した(図3)。その結果、溶存二酸化炭素濃度に対して、糖分泌活性はミカエリス・メンテン型の反応を示した。一方、当該藻類を培養時の光条件も分泌量の収量に影響を及ぼすことが予備的に確認されている。特に、明暗サイクル(12時間明期:12時間暗期)での培養では、分泌量が3日程度で一定に収束する傾向があったのに対して、恒常明期の条件では明暗サイクルの時よりも糖分泌活性の若干の向上を確認しており、今後も最適化のための検討を要する。

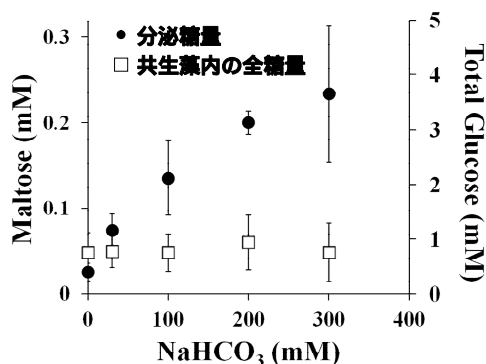


図3：炭酸源濃度による糖分泌量の変化

(2) 当該藻類から得られる分泌糖は酸性溶液中に存在する。そこで、当該分泌糖液をそのままアルコール発酵に適用できるかどうか検討した。なお、今回は分泌糖を想定して、藻類培地に分泌糖成分(今回はマルトース)を添加した試料を調整し、酵母培養液に直接添加した。その結果、酸の影響で若干の酵母菌の増殖阻害が確認されたが、再度のpH調整の有無に関わらず、酵母菌によるアルコール発酵を通じたエタノールの生成を定性的に確認できた(図4)。したがって、当該藻類から得られる分泌糖液は、アルコール発酵の系に導入できることが分かった。しかしながら、当該藻類が培養上清に分泌する糖濃度は、十分に高いとはいえず、さらなる糖分泌条件の最適化や糖液の濃縮などが現状では必要である。

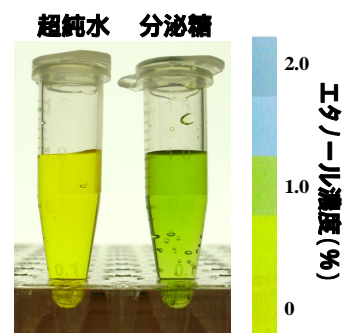


図4：分泌糖からのエタノール生成

(3) 当該藻類は、ヒト、大腸菌やその他のモデル生物と異なり、遺伝子情報が十分に整備されていない。今回、糖分泌に関与する因子の探索を目的として、糖分泌活性の違いにおけるタンパク質発現の変化を二次元電気泳動法で比較検討した。その結果、条件の違いによる複数の特異的タンパク質が確認された。今後、アミノ酸配列の解析などにより、それらのタンパク質の実体を明らかにする必要がある。

本研究期間を通して、当該藻類を用いて、人工制御可能な *in vitro* 系で糖分泌を誘導し、さらに得られた糖を用いてエタノール生成が可能であることが分かった。しかし、その有用性を確立するには、当該藻類による糖分泌条件のこれまで以上の最適化と炭素源の供給までを含めたシステムの構築が必要である。また、遺伝子工学技術を活用した人為的制御による糖分泌活性の制御や上昇が可能かどうかも検討する必要がある、今後の研究を通して明らかにしたい。

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)

[雑誌論文](計 2件)

高橋 利幸、長崎 歩、糖分泌型藻類を

利用したエネルギー創生技術の開発研究、
環境技術 (Journal of Environmental
Conservation Engineering) 査読有、40
巻、2011、662 - 665

Ayumi Nagasaki, Toshiyuki Takahashi,
Symbiotic Algae Secreting
Photosynthates as a New Biomaterial
for Bioenergy, Proceedings of
Asia-Pacific Interdisciplinary
Research Conference 2011, 査読有,
2011, 61

[学会発表](計 7件)

高橋 利幸、糖分泌型藻類を用いた廃棄
性窒素除去システムの開発および当該廃
水由来の有用物質の合成、第2回ネイチ
ャー・インダストリー・アワード~若手
研究者からの発信~、2013年11月20日、
大阪

渡瀬 光瑠、東口 モモ子、高橋 利幸、
糖分泌型藻類を用いたアンモニア性窒素
除去システムの開発、日本化学会秋季事
業 第3回CSJ化学フェスタ2013、2013
年10月21 - 23日、船堀

長崎 歩、高橋 利幸、共生藻を用いた
バイオエタノール生成システムの構築、
第22回九州沖縄地区高専フォーラム
持続可能社会・九州 地方の未来をデザ
インする、2012年12月8日、都城

東口 モモ子、山下 利沙、高橋 利幸、
糖分泌型藻類を用いた新規アンモニア性
窒素除去法、第22回九州沖縄地区高専フ
ォーラム 持続可能社会・九州 地方の
未来をデザインする、2012年12月8
日、都城

Ayumi Nagasaki, Toshiyuki Takahashi,
Symbiotic Algae Secreting
Photosynthates as a New Biomaterial
for Bioenergy, Asia-Pacific
Interdisciplinary Research Conference
2011, 2011年11月17 - 18日,
Toyohashi (Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 利幸 (TAKAHASHI, Toshiyuki)
独立行政法人国立高等専門学校機構 都
城工業高等専門学校・物質工学科・講師
研究者番号: 50453535