

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06924

研究課題名(和文) 微細藻の増殖特性向上に向けた熱ショック応答の応用

研究課題名(英文) Application of heat shock response for enhanced growth characteristics of microalgae

研究代表者

勝田 知尚 (KATSUDA, Tomohisa)

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50335460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CO₂を炭素源に利用する微細藻類の培養において、培養温度と照射光強度を概日周期で変化させて増殖挙動を比較検討したところ、一定に保持するときの最適温度ともはや細胞分裂が停止する温度との間で12hごとに変化させると、最適温度で一定に保持するときよりも増殖速度が1.4-2倍まで増大すること、ならびに誘導期間が1d短縮されることが確認された。この増殖性の向上は細胞周期の同調に起因し、分類学上異なる綱に属する微細藻類でも生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CO₂を利用して色素などの有用物質を生産できる微細藻類は、価格競争力のある工業生産のために、増殖性の優れた藻株や効率的な培養法が求められている。本研究によって明らかになった手法は、種々の微細藻類に対して適用可能であるとともに、培養温度や照射光強度を維持するためのエネルギー消費を削減することも期待できるため、微細藻類を利用した有用物質の生産に広く役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the photoautotrophic cultivation of microalgae, the effects of circadian variation in cultivation temperature and illuminated light intensity were investigated. The temperature variation between the optimal temperature under static condition and that as hot as the cells stop growing resulted in an increased growth rate by 1.4 - 2 times and reducing the lag phase by 1 d in comparison with those under the optimal static condition. These improvements in growth characteristics caused from synchronization of cell cycle and was found in taxonomically different class of green algae.

研究分野：バイオプロセス

キーワード：ヘマトコッカス プルビアリス クロレラ ソロキニアナ フローサイトメトリー 熱ショック応答 細胞周期 細胞同調

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微細藻類は単細胞性の藻類であり、光合成により二酸化炭素を炭素源として、増殖、ならびに有用物質生産を行うことができる。こうした微細藻類の培養は、植物と比べ、面積あたりの生産性が優れるといった特長があり、近年、アメリカ合衆国では、微細藻類由来の燃料油や健康機能性物質の工業的生産を行う事業所が多数設立され、同業組合である Algae Biomass Organization に加盟する企業は 250 社を超えるまでに隆盛している。ここで行われる工業的な微細藻類の培養は太陽光を利用して行われるため、価格競争力のある生産を行うためには、日中の限られた時間で微細藻類を速やかに増殖させる必要がある。そのため、増殖性の優れた藻株や効率的な培養法が求められている。

研究代表者らは、培養温度と照射光強度を 12 h 毎に変化させつつ、緑藻ヘマトコッカス プルビアリスの培養を行い、これまで最適とされてきた培養温度で一定に保持するよりも、一定に保持すれば増殖が抑制される高温との間で変化させる方が、増殖を促進できることを見出した。ヘマトコッカス プルビアリスの倍加時間は約 24 h であるので、12 h 毎に培養温度と照射光強度を変化させると、細胞はこれらの変化を 1 細胞周期の間に受けることとなる。ところが、細胞内の転写物レベルが 24 h 周期で変動するいわゆる概日リズムは、微細藻類では全転写物の大半がこの支配下にあり、温度によって変化しないよう、厳密に補償されていることが知られている。したがって、上述のヘマトコッカス プルビアリスの増殖促進は、培養温度や照射光強度といった微細藻類の生育に重大な影響をおよぼす因子における強いストレスが、概日リズムの制御下にある細胞周期に変調をもたらしたことが予想される。しかし現時点では、概日周期で高温ストレスにさらすことによって増殖特性を向上できることは、研究代表者らが行ったヘマトコッカス プルビアリス以外では知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、概日周期で培養温度と照射光強度を適切な範囲で変化させると、アスタキサンチンの生産に用いられているヘマトコッカス プルビアリスの増殖速度と最高細胞密度が従来の最適条件で得られるレベルよりもさらに向上するという、研究代表者らが見出した新奇な増殖挙動について、その分子メカニズムの解明を試みるとともに、これを応用して他の微細藻の増殖特性の向上を図ることにある。

3. 研究の方法

微細藻類には、国立環境研究所より入手したヘマトコッカス プルビアリス NIES-144 株のほか、Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (Florence, Italy) より分譲されたクロレラ ソロキニアナを使用した。これらの微細藻類は、CO₂ と NO₃⁻ を唯一の炭素源と窒素源とする、それぞれに適した液体培地に懸濁し、仕込み体積 200 mL の気泡塔型フォトバイオリアクターを用いて培養した。このとき、フォトバイオリアクターはガラス水槽中に置かれ、水温を 2 基の循環式恒温槽で周期的に切り替え、あるいは一定に保持して、培養温度を 20 - 45°C の範囲で制御した。一方、光照射は水槽のガラス側面に沿って積み重ねて置いた 3 本の直管型白色蛍光灯により行い、点灯数を周期的に切り替え、あるいは一定に保持して、照射光強度を 70 - 210 μmol·m⁻²·s⁻¹ の範囲で制御した。さらに、CO₂ の供給とともに培養液の攪拌のため、5 vol% CO₂ 富化空気をフォトバイオリアクターごとに 100 mL·min⁻¹ で供給した。こうした培養は同時に最大 4 条件を 1 条件あたり少なくとも 2 反復ずつとりつつ行い、さらに他日にもう 1 回繰り返して再現性を確認した。所定時間ごとに培養液を採取し、培養液単位体積あたりの細胞数(細胞数密度)、乾燥細胞重量、ならびに細胞径を測定した。また、70 vol% エタノールで固定し、蛍光色素で DNA を染色したのち、フローサイトメーターを用いて細胞周期を分析するとともに、ウェスタンブロットにより熱ショックタンパク質の発現量を分析した。

4. 研究成果

ヘマトコッカス プルビアリス、ならびに異なる綱に属するクロレラ ソロキニアナにおいて、培養温度と照射光強度を概日周期で変化させたときの増殖挙動を比較検討した。ヘマトコッカス プルビアリスにおいては、一定に保持した際の培養温度の最適条件である 20°C と細胞分裂が停止する 30.5°C の間で 12 h ごとに変化させると、20°C で一定に保持したときと比べて増殖速度が 1.4 倍まで増大すること、ならびに誘導期間が 1 d 短縮されることが確認された。一方、クロレラ ソロキニアナにおいては、一定に保持したときの最適条件は 27°C であったが、27°C と 41°C の間で 12 h ごとに変化させると、27°C で一定に保持したときと比べて約 2 倍まで増殖速度が増大した。ヘマトコッカス プルビアリスにおいて、増殖期中期である 3 - 4 d の間に細胞密度の経時変化を詳しく調べるとともに、フローサイトメーターを用

いて細胞周期を分析したところ、培養温度が 20°C から 30.5°C に上昇するとき細胞密度は倍加し、DNA 含有量が低下して、細胞周期が同調することが観察された。一方、培養温度を 20°C で一定に保持したときには、そうした明らかな変化は見られず、細胞密度は徐々に増加し、DNA 含有量にはほとんど変化が見られなかった。また、照射光強度の変化は培養温度よりも影響は弱いことも分かった。さらに、ウェスタンブロットにより分子量 4 万と 7 万の 2 種の熱ショックタンパク質の発現量を追跡したところ、培養温度を 20°C で一定に保持したときに両者の発現量が多く、20°C と 30.°C の間で変化させたときには、分子量 4 万の熱ショックタンパク質の発現量が低下することが分かった。

ヘマトコッカス プルビアリスが属する緑藻綱には微細藻類の遺伝子組換え実験でよく利用されるクラミドモナス ランハーディーなどが含まれ、一方、クロレラ ソロキニアナが属するトレボウキシア藻綱にはバイオ燃料生産が期待されるボツリオコッカス ブラウニなどが含まれる。培養温度や光強度を概日変化させることにより、種々の微細藻類において、細胞周期の同調を促し、その結果、増殖性を向上できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Revathy Sankaran, Pau Loke Show, Yee Jiun Yap, Yang Tao, Tau Chuan Ling, Katsuda Tomohisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Green technology of liquid biphasic flotation for enzyme recovery utilizing recycling surfactant and sorbitol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clean Technologies and Environmental Policy	6. 最初と最後の頁 2001 - 2012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s10098-018-1523-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Xin Jiat Lee, Pau Loke Show, Tomohisa Katsuda, Wei-Hsin Chen, Jo-Shu Chang	4. 巻 269
2. 論文標題 Surface grafting techniques on the improvement of membrane bioreactor: State-of-the-art advances	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioresource Technology	6. 最初と最後の頁 489 - 502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hui Yi Leong, Chien Wei Ooi, Chung Lim Law, Advina Lizah Julkifle, Tomohisa Katsuda, Pau Loke Show	4. 巻 209
2. 論文標題 Integration process for betacyanins extraction from peel and flesh of <i>Hylocereus polyrhizus</i> using liquid biphasic electric flotation system and antioxidant activity evaluation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Separation and Purification Technology	6. 最初と最後の頁 193 - 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.07.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 勝田 知尚, 森本 高章, 桑井 仁葵, 山地 秀樹
2. 発表標題 微細藻の細胞分裂に及ぼす培養温度・光強度の周期的制御の影響
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohisa Katsuda, Hiroyuki Yamada, Takaaki Morimoto, Hitoki Kuwai, Hideki Yamaji
2. 発表標題 Effects of the circadian control in temperature and light intensity on the cell division of green algae under a photoautotrophic condition
3. 学会等名 25th Young Asian Biological Engineering Community (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohisa Katsuda
2. 発表標題 Photoautotrophic growth of Haematococcus pluvialis under controlled temperature and light conditions
3. 学会等名 Mahidol-Kobe Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑井 仁葵, 山地 秀樹, 勝田 知尚
2. 発表標題 緑藻 <i>Chlorella sorokiniana</i> の光独立栄養培養における培養温度の影響
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本 高章, 山地 秀樹, 勝田 知尚
2. 発表標題 培養温度・光強度の周期的な変化が緑藻 <i>Haematococcus pluvialis</i> の細胞分裂に及ぼす影響
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紅林 愛夏, 森本 高章, 西村 拓海, 山地 秀樹, 勝田 知尚
2. 発表標題 エアリフト式フォトバイオリアクターの操作条件と微細藻類の光独立栄養増殖の関係
3. 学会等名 化学工学会第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 勝田 知尚, 森本 高章, 山地 秀樹
2. 発表標題 緑藻Haematococcus pluvialisにおける周期的温度変化と細胞増殖の関係
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸大学工学研究科応用化学専攻 生物プロセス工学研究室 http://www2.kobe-u.ac.jp/~katsuda/KindexJ.html
--

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