

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04845

研究課題名(和文) 微細藻類のゲル封入培養法の構築と脂質蓄積促進のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of microalgal culture in hydrogel for production of biofuel

研究代表者

吉富 徹 (YOSHITOMI, Toru)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主任研究員

研究者番号：20585799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、持続可能な資源として、微細藻類がもつ脂質・炭化水素生産に期待が集まっている。そこで、微細藻類の大規模な培養技術が試験的に試みられているものの、微細藻類の大量培養を行った場合、約十マイクロメートルの小さな藻類細胞の回収が困難であるだけでなく、微生物のコンタミネーションにより培養に失敗するといった問題がある。そこで申請者は、微細藻類をハイドロゲル内に封入することで、回収やコンタミネーションの問題を解決するだけでなく、藻類オイルの生産性を上げることでできる特殊な環境を構築できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微細藻類細胞を利用可能な資源とすべくハイドロゲル培養法を開発し、微細藻類に与える影響を調査した。持続可能な社会を実現するために注目を集めている微細藻類の問題に着目し、それをハイドロゲル培養という工学的アプローチを使った解決を試みた。

研究成果の概要(英文)：Microalgae-derived biofuels have attracted much attention as industrial and sustainable routes for energy supplies. In this study, *Chlamydomonas debaryana* NIES-2212, which massively accumulates triacylglycerol in the stationary phase without applying external stress, was encapsulated in a Ca²⁺-alginate gel and was cultured under photoautotrophic growth conditions. The growth of the encapsulated cells in the gel resulted in spherical palmelloid colonies. Curiously, the gel encapsulation promoted cell proliferation, and the encapsulated cells reached the stationary phase earlier than that of the free-living cells. These results point to the importance of the micro-niche of microalgae for oil production.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：微細藻類 ハイドロゲル 藻類オイル トリアシルグリセロール 脂質蓄積

1. 研究開始当初の背景

近年、持続可能な社会実現に向け、地球温暖化ガス削減など環境保全の動きが活発化している。例えば、フランス、イギリスや中国は、将来的にガソリン車を廃止し、電気自動車にシフトするといった動きがある。しかしながら、電気自動車を動かすためにも発電は必要になり、これまで日本は主に火力発電を行ってきた。近年、地熱や太陽光などの再生可能エネルギーが注目を集めるが、これらの再生可能エネルギーが将来、現在の火力発電分を担うことは難しい。そこで近年、バイオマスを利用した技術開発に注目を集める。例えば、JXTG エネルギー (JX エネルギーと東燃ゼネラルが経営統合した会社) は、パームヤシの殻を使った火力発電所を北海道室蘭市に建設している (室蘭バイオマス発電)。これは、世界の環境問題を意識したカーボンニュートラルな火力発電である。バイオマス発電はこれまで培った火力発電の技術を転用できるため、これからバイオマス発電技術の開発が必要であると考えられる。しかしながら、パームヤシの殻は、インドネシアなどからの輸入品であるためコストがかかる。そこで、微細藻類に着目した。バイオマス燃料として耕作面積当たりの油生産効率が最も高いのは微細藻類である。微細藻類は海洋や淡水中に生息するミクロンサイズの微生物で、細胞内に脂質を蓄積したり、また細胞外に炭化水素を分泌する。この油生産能力は陸上生物よりも高く、乾燥重量の 70% が脂質であるケースもあり、次世代のバイオ燃料として期待されている。また油を抽出せずにそのまま燃やすバイオマス発電も可能であることから、大規模な培養システムの構築が必要である。近年、国内外で微細藻類の大規模培養が試験的に行われている。しかしながら、藻類細胞の大規模培養には様々な問題がある。

問題点 ミクロンサイズの微細藻類細胞の回収 (従来法では、沈殿剤と遠心を併用して微細藻類を回収)

問題点 藻類を培養するための広大な土地と高価な培養設備 (従来法では、大型のオープンポンドを使用するため、設備や培地の費用がかかる。)

問題点 野外環境での異種微生物のコンタミネーションによる培養系の破壊 (従来法では、異種微生物が生きられない高塩濃度培地などを使用するが、藻類の種類が限定される。)

問題点 通常の培地中での低い脂質蓄積効率 (近年ゲノム編集などにより、高い脂質蓄積性を有する種類を開発しようとしているが、非常に難しく、また増殖能が落ちる等の問題がある。)

このような問題を抱えているため、実用化は非常に難しいという厳しい意見もある。そこで、本研究では、ハイドロゲルを用いた新しい野外大規模培養法の構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、高分子ゲルに微細藻類細胞を封入する培養法に着目した。微細藻類を高分子ゲルに封入することで、回収が容易になるだけでなく、外部からの微生物の侵入や周辺環境への飛散を防ぐことができる。

まずハイドロゲルを用いた微細藻類培養法の戦略を下記する (図 1 参照)。

(1) ゲル封入による回収効率の向上

従来の大規模培養では、約十マイクロメートルサイズの微細藻類を大きなプールの中から回収するために凝集剤で濃縮した後、遠心を行って回収している。しかしながら、手間とコストがかかる。数 mm ~ 数 cm サイズのハイドロゲル内に微細藻類を封入することによって、網などで回収が可能になる (問題点の解決)。

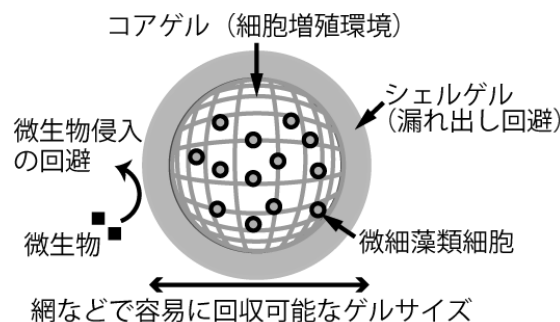


図 1. 微細藻類のゲル封入培養法

(2) ゲルからの微細藻類の漏れ出し抑制

ゲル内に微細藻類を封入することで、湖、海洋などの地域で養殖することが可能になる (問題点の解決)。これによりオープンポンドを設置するための土地や設備も必要なく、また培地のコストもかからない。しかしながら、ゲルからの漏れ出しにより、微細藻類が自然環境に漏出してしまえば、環境の悪化につながる。そこで、ゲルをコア-シェル型などの形状にする等工学アプローチにより工夫することにより、細胞漏出の問題を回避する。

(3) コンタミネーションによる培養失敗のリスクを回避 (問題点の解決)

野外培養では、成長速度が遅い微細藻類は、他の微生物との生存競争に負けてしまう。ゲル中に封入することにより、ゲルネットワーク内に微生物が侵入できないため安定した増殖が可能に

なる。

(4) ゲル封入による脂質の蓄積効率の向上 (問題点の解決)

生物は、外部の環境によって、機能や細胞内代謝経路を変え、環境に適応しようとする。実際に、微細藻類はストレスを感じるとバイオディーゼルの原料となる脂質を細胞内に蓄積する性質があることが報告されている(Cho. et al., Scientific Reports 2016, 6, 32860)。この性質を利用し、ハイドロゲルの材料や構造を最適化することによって、脂質蓄積効率が向上させると仮説を立てた。

3. 研究の方法

褐藻由来のアルギン酸ナトリウムと *Chlamydomonas debaryana* の混合溶液を塩化カルシウム溶液に滴下し、アルギン酸ゲルビーズ内に *C. debaryana* を封入した。光独立条件下で培養し、エチレンジアミン四酢酸を用いてゲルを溶解することにより細胞を回収し、細胞数、乾燥重量、クロロフィル量、タンパク質量を測定した。細胞内に蓄積した脂質を中性脂質染色試薬であるニフツ化ホウ素ジピロメテン(BODIPY)を用いて染色し、蛍光顕微鏡観察を行った。さらに細胞内脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによる脂質の分離後、細胞内に蓄積した TAG の定量を行った。また電子顕微鏡観察を用いて、ゲル内の細胞の状態を観察した。さらに、リアルタイム PCR などを用いて、細胞内の遺伝子の変化についても検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、アルギン酸ゲルに微細藻類 *C. debaryana* を封入したところ、培養開始後、ゲルが透明な状態からだんだんとクロロフィル由来の緑色に変化することを確認した。またゲル内では、球状の細胞凝集体を形成し、バイオ燃料として使用可能な脂質の蓄積が高まることを見出した(図 2-4)。このメカニズムを解明するため、*C. debaryana* の遺伝子解析を世界で初めて行い、高分子ゲル封入によって、アシルトランスフェラーゼの遺伝子 DGAT1 と DGTT3 の発現が高まることによって、脂質の蓄積を促進していることを明らかにした。これらの結果から、微細藻類細胞のハイドロゲル封入は、回収やコンタミネーションの問題を解決するだけでなく、藻類オイルの生産性を上げることのできる特殊な環境を構築できることを示した。

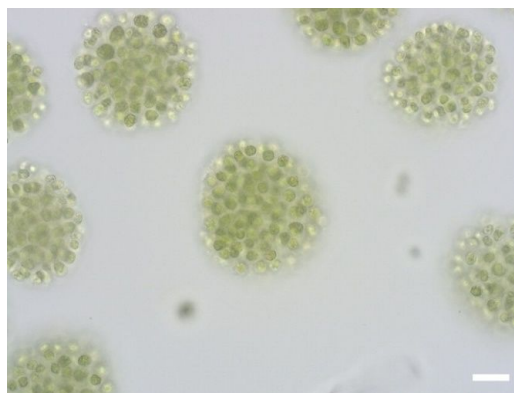


図 2. ゲル内に封入された微細藻類細胞凝集体の様子。Scale bar = 20 μm .

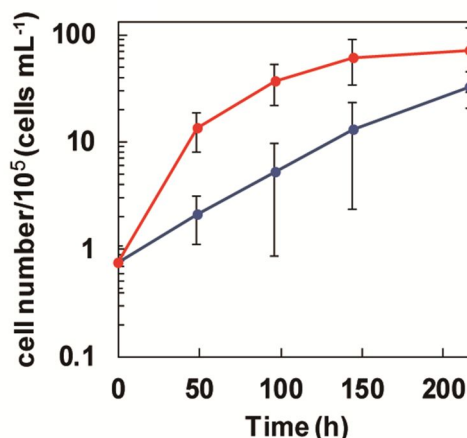


図 3. アルギン酸ゲル内に封入された際の細胞数の経時変化(赤)と通常培養した際の細胞数の経時変化(青)

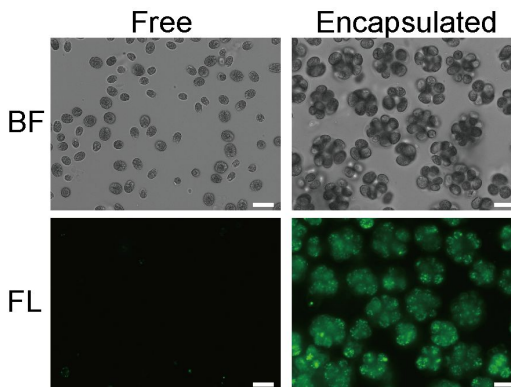


図 4. 微細藻類内での脂質の蓄積
明視野画像(BF)と蛍光画像(FL)。BODIPYを用いて細胞内の脂質を染色した(FL 図中の緑色)。スケールバー:20 μm 。培養 4 日後、EDTA を用いてゲルを溶解すると、約 30 個程度の細胞からなる凝集体が得られる(右上図)。この凝集体は、細胞内にバイオディーゼルの原料となる油を大量に蓄積している(右下図)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Sato, Toru Yoshitomi, Natsumi Mori-Moriyama	4. 巻 61
2. 論文標題 Characterization and Biosynthesis of Lipids in Paulinella micropora MYN1: Evidence for Efficient Integration of Chromatophores into Cellular Lipid Metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol .	6. 最初と最後の頁 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa011	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 -
1. 著者名 Toru Yoshitomi, Naoya Shimada, Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume, and Keitaro Yoshimoto	4. 巻 128
2. 論文標題 Polyethyleneimine-induced astaxanthin accumulation in the green alga Haematococcus pluvialis by increased oxidative stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.06.002.	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 -
1. 著者名 Toru Yoshitomi, Saeko Kaminaga, Naoki Sato, Masakazu Toyoshima, Takashi Moriyama, and Keitaro Yoshimoto	4. 巻 61
2. 論文標題 Formation of Spherical Palmelloid Colony with Enhanced Lipid Accumulation by Gel Encapsulation of Chlamydomonas debaryana NIES-2212.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol .	6. 最初と最後の頁 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz188.	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 -
1. 著者名 Toru Yoshitomi, Haruka Karita, Natsumi Mori-Moriyama Naoki Sato, Keitaro Yoshimoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced cytotoxicity of polyethyleneimine by covalent modification of antioxidant and its application to microalgal transformation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Technol Adv Mater .	6. 最初と最後の頁 864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2021.1978273.	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toru Yoshitomi, Haruka Karita, Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題 Improvement of Microalgal Transfection by ROS-scavenging polycation
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富 徹、苅田 遥、吉本 敬太郎
2. 発表標題 活性酸素消去剤含有ポリイオンコンプレックスによる微細藻類細胞の形質転換効率の向上
3. 学会等名 第14回ナノバイオメディカル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Yoshitomi, Naoya Shimada, Kazutoshi Iijima, Mineo Hashizume, and Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題 Polyethyleneimine-induced astaxanthin accumulation in green alga Haematococcus by increased oxidative stress
3. 学会等名 2nd GLowing Polymer Symposium in KANTO
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru YOSHITOMI, Saeko KAMINAGA, Keitaro YOSHIMOTO
2. 発表標題 Spherical aggregation of microalgae with acceleration of cell growth and lipid accumulation by encapsulation in hydrogels
3. 学会等名 255th ACS National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Toru Yoshitomi, Saeko Kaminaga, Masakazu Toyoshima, Takashi Moriyama, Yasuhiro Mazaki, Naoki Sato, Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題	Hydrogel Encapsulation Triggers Formation of Palmelloid Colonies and Promotes Lipid Production of Chlamydomonas debaryana NIES-2212
3. 学会等名	The 23rd International Symposium on Plant Lipids (ISPL2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Saeko Kaminaga, Toru Yoshitomi, Masakazu Toyoshima, Takashi Moriyama, Yasuhiro Mazaki, Naoki Sato, Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題	Acceleration of Cell Growth and Lipid Accumulation in Palmelloid Colonies of Chlamydomonas debaryana NIES-2212 Encapsulated in Alginate Gel
3. 学会等名	The 23rd International Symposium on Plant Lipids (ISPL2018) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Toru Yoshitomi, Saeko Kaminaga, Masakazu Toyoshima, Takashi Moriyama, Naoki Sato and Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題	Multicellular formation and improvement of biofuel production by gel encapsulation of microalgae
3. 学会等名	第67回高分子討論会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	神永紗英子, 吉富徹, 佐藤直樹, 豊島正和, 森山崇, 吉本敬太郎
2. 発表標題	アルギン酸ゲル封入培養法による微細藻類の パルメロイドコロニー形成と増殖・脂質蓄積の促進
3. 学会等名	第13回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 神永紗英子, 吉富徹, 佐藤直樹, 豊島正和, 森山崇, 吉本敬太郎
2. 発表標題 アルギン酸ゲル封入培養法による微細藻類 <i>Chlamydomonas debaryana</i> NIES-2212 のバルメロイドコロニー形成と増殖・脂質蓄積の促進
3. 学会等名 第31回植物脂質シンポジウム@高知
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Yoshitomi and Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題 Accelerated Cell Growth and Lipid Accumulation of Microalgal Aggregates Encapsulated in Polymeric Hydrogel
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Yoshitomi, Saeko Kaminaga, Masakazu Toyoshima, Takashi Moriyama, Naoki Sato and Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題 Multicellular formation and improvement of biofuel production by gel encapsulation of microalgae
3. 学会等名 1st GLowing Polymer Symposium in KANTO
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉富徹, 青木啓太, 由井宏治, 吉本敬太郎
2. 発表標題 セルロース誘導体の分解と吸収によるクラミドモナスの脂質蓄積
3. 学会等名 日本藻類学会第43回京都大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 苅田遥、吉富徹、佐藤直樹、吉本敬太郎
2. 発表標題 活性酸素消去能を有するポリカチオンを用いた微細藻類細胞の高効率な形質転換
3. 学会等名 日本藻類学会第43回京都大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神永紗英子, 吉富徹, 佐藤直樹, 豊島正和, 森山崇, 吉本敬太郎
2. 発表標題 アルギン酸ゲル封入培養法による緑藻 <i>Chlamydomonas debaryana</i> の パルメロイド形成と増殖・脂質蓄積の促進
3. 学会等名 日本藻類学会第43回京都大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富徹, 神永紗英子, 佐藤直樹, 豊島正和, 森山崇, 吉本敬太郎
2. 発表標題 アルギン酸ゲル封入培養法による微細藻類 <i>Chlamydomonas debaryana</i> NIES-2212 の細胞凝集体形成と増殖・トリアシルグリセロール蓄積の促進
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Yoshitomi, Haruka Karita, Natsumi Mori-Moriyama Naoki Sato, Keitaro Yoshimoto
2. 発表標題 Reduced cytotoxicity of polyethyleneimine by covalent modification of antioxidant and its application for microalgal transformation
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------