

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06326

研究課題名(和文)環境水浄化型のバイオマス生産藻類工場ユニットの開発～低炭素社会実現に向けて

研究課題名(英文) Development of environmental water clarification-type algal cultivation unit for biomass production Towards the realization of a low-carbon society

研究代表者

藤原 祥子 (Fujiwara, Shoko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30266895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CO₂問題の解決のため、光合成によるCO₂固定の利用、特に生育が速く食糧生産と競合しない微細藻類によるバイオマス燃料の生産が注目されている。本研究では、固相表面連続培養系を用いたバイオマス生産ユニットの特性評価と開発をクロレラを用いて行った。固相上での光合成速度を正確に評価するためにIRGAでの測定法を確立した。光合成特性とRNA-seqの解析から、細胞は固相上に移動後すぐにストレスを受けるが、光合成装置と代謝の流れの適応により24時間以内に高い光合成活性を回復できることが示唆された。またバイオマス生産について屋内と屋外で比較し、無機排水からのリン回収用の可搬型固相表面連続培養装置を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物葉で広く用いられているIRGAでCO₂固定速度測定法を確立し、固相上での光合成速度を迅速かつ正確に評価することが可能になった。また、光合成特性とRNA-seqの解析から、固相表面培養で維持される高い光合成活性の分子基盤を明らかにすることができた。さらに、無機排水からのリン回収用の可搬型固相表面連続培養装置を開発した。エタノール製造工場由来の無機排水や池の水からも短時間で大部分のリンを除去することができ、細胞の生育も維持される培養装置を作製することができた。

研究成果の概要(英文)：CO₂ fixation by microalgae has recently attracted much attention to solve the CO₂ problem, because they can grow faster and do not compete with agriculture. In this study, evaluation and development of an algal cell-attached solid surface culture system were performed, using *Chlorella*. To precisely assess the photosynthetic rate on the solid surface, we established a method for measuring the CO₂ fixation rate with IRGA. PAM analysis and transcriptomic analysis by RNA-Seq suggested that cells transferred to a solid surface become stressed immediately after transfer but can recover their high photosynthetic activity through adaptation of photosynthetic machinery and metabolic flow as well as induction of general stress response mechanisms within 24 h. Furthermore, biomass production was compared between indoor and outdoor, and a portable tubular system containing an algal cell-attached solid surface for phosphorous recovery was developed.

研究分野：植物生理学

キーワード：微細藻類 CO₂固定 培養装置 環境水浄化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 微細藻類は、現在 CO₂ の固定、燃料、食糧、医薬品、化粧品などへの利用のため大量培養が期待されている。微細藻類の大量培養装置としては、現在主に開放系の open pond 型、閉鎖系の flat panel 型、tubular 型の液体培養系が用いられており、精力的に研究開発が行われてきたが、いずれのシステムも施設面積当たりの生産量は依然として低く、社会的ニーズに見合う生産量とコスト、という大きな壁の克服にまだ成功できていない。世界全体の CO₂ 排出量(年間約 400 億トン)を考えると、培養システムは水平方向に大型化するばかりではなく、垂直方向にも大型化し面積当たり的高密度化を図る必要がある。培養プラントの設置場所としては、現在のところ水資源が豊富で、かつ通年の日射量が十分な液体培養に適した低緯度地域に限られており、プラントの乱立がこれらの地域の生態系に与える影響が懸念されている。低緯度地域を除く、例えば日本の温帯以北で、通年培養が可能な実用的装置はまだ確立されていない。

(2) 当研究室では、藻類のもつ付着性を利用した培養方法として固相表面連続培養系(Solid Surface Continuous Culture System, SSCC)を構築した。これは、綿の布を固相として使用し、上から培地を流し、布上で増殖した細胞と流出した細胞を回収する培養方法である。この培養系の利点としては、①液体培養系と同等の速い生育速度、②固相を縦に配置したユニットの積み上げによる設置面積当たりの収量の増加が挙げられる。

2. 研究の目的

(1) SSCC が液体培養系と同等の速い生育速度を示すしくみを、生理学および分子生物学的に明らかにする。

(2) SSCC の培養条件の最適化を行うことにより、施設面積当たりの生産率が高い培養ユニットの開発を行う。合わせて、環境水の浄化をしつつ培養を行う系を構築する。

3. 研究の方法

(1) SSCC が液体培養系と同等の速い生育速度を示すしくみを明らかにするため、クロレラ(*Parachlorella kessleri*)を用いて、細胞を固相から液相に移した場合の光合成特性および遺伝子発現の経時変化を調べた。光合成速度は IRGA で確立した方法により、光合成特性は PAM 蛍光法により、遺伝子発現は RNA-Seq により解析を行った。また、RNA-Seq 解析により代謝の流れの変化を予測し、タンパク質等バイオマス成分の評価を行った。

(2) 屋外での SSCC によるバイオマス生産量を、屋内と比較した。屋内では光強度 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、30 °C で、屋外では建物の影になる場所で温度コントロールをせず太陽光(関節光)のみで、2% CO₂ を通気しながらクロレラの固相表面培養を行った。また、屋外での光条件を最適化するため、93 cm × 93 cm の布を 5 枚 10 cm 間隔で並べた場合の光の減衰度を調べた。

(2) SSCC による環境水の浄化としては、池の水および工場排水を用いて主にリン、窒素そしてリンと同族のヒ素の回収・除去を行った。リン・ヒ素の測定は、マラカイトグリーンを用いた比色法により、窒素の測定は分光法により行った。細胞としては幅広いリン濃度で生育可能なクロレラを用いるとともに、これまで報告してきたシネココッカスの特異性の異なるリン酸/ヒ素トランスポーターの変異株と野生株を用いた。

4. 研究成果

(1) 固相上での光合成速度を迅速かつ正確に評価するために、植物葉で広く用いられている IRGA で測定法を確立し、様々な条件でのクロレラの光合成速度を検討した。その結果、高密度になると CO₂ と光が律速となるが、CO₂ の方がより強い律速要因であることが明らかになった。支持体をグラスファイバーフィルターからタオルに変えて比較したところ、高密度での光合成速度は改善できたが低密度での速度は低かった。蛍光顕微鏡や SEM での観察により、タオルでは細胞の分布は三次元的に広がっており CO₂ の透過性は改善されたが光律速となっていると考えられた。

(2) 固相上でも液体中と同様の活発な生育が見られることに着目し、その基盤となる遺伝子発現調節メカニズムを明らかにするために、光合成特性および液体培養から固相に移した後の細胞のトランスクリプトームの経時変化を調べた。

光合成については、12 時間後には細胞当たりのクロロフィル(Chl)含有量および Chl a/b 比は、減少したが 24 時間後までには回復したことから、強光や乾燥ストレスなどにより活性中心や LHC が分解されるがその後回復している可能性が考えられた。そこで PSII の電子伝達特性を

PAM 蛍光法で調べたところ、PSII 自体はダメージを受けないが、下流の電子伝達の阻害により余剰エネルギーの熱放散が促進され、PSII の実効量子収率が低下すること、しかしその後回復することが示された。

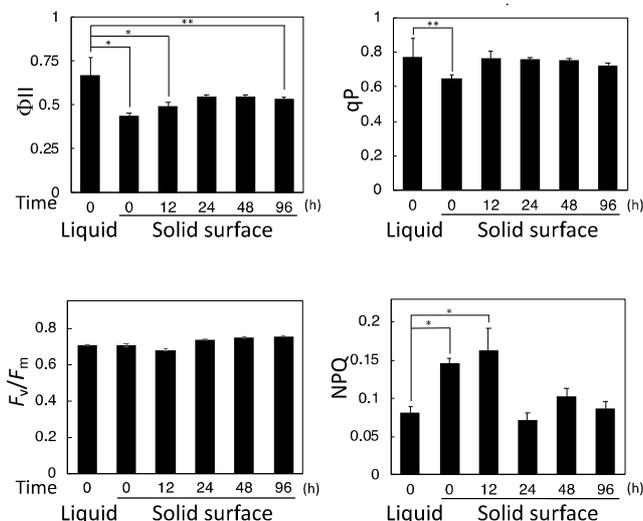


図1 液中から固相上に移したクロレラ細胞の光化学系エネルギー分配パラメータの経時変化。エラーバーは平均値+標準偏差(n=3)を示す。液相での値との有意差はDunnettの多重検定によって評価された(*P<0.1, **P<0.05)。

トランスクリプトームについては、固相に移す前の液体培養および固相に移動後12時間、24時間の細胞のRNA-seqを基にGO解析、KEGGパスウェイ解析を行ったところ、CO₂同化からアミノ酸合成への主要な代謝経路と翻訳装置およびHSP70Bなどのprotein foldingに関わるストレスレスポンスタンパク質が、移動後12時間で一過的にアップレギュレートされていることが示された。また、チラコイドでの光合成反応過程については、フェレドキシン、PGR5、ATP合成酵素がアップレギュレーションされていたことから、PSI循環型電子伝達が光阻害を緩和し還元力の生成を抑制しているが、ATP合成は高く保たれている可能性が示された。得られているクロロフィル含量およびPSIIの実効量子収量は一過的に低下するが、その後24時間以内に回復することと合わせて考えると、固相状に移された細胞は移動後すぐにストレスを受けるが、光合成装置と代謝の流れの適応により24時間以内に高い光合成活性を回復できることが示唆された。

(3) バイオマス生産について屋内と屋外で比較したところ、屋外の光強度は晴れた日の1/10程度で十分で建物の影になる場所でも可能であるが、間接光だけでは不十分であること、東京の場合10月以降は光強度と気温が低下し生産量が低下することが分かり、適切な光強度と温度の維持が重要であることが示された。

(4) 環境水の浄化をしつつ培養を行う系の検討を行い、無機排水からのリン回収のための可搬型固相表面培養装置を開発した。まず、培地を用いて条件を検討したところ、リン欠乏条件下においたクロレラ細胞ではリン十分細胞の場合の約70倍の速度でリン酸を取り込み、固相表面の細胞密度が20 g dry cell weight (DCW)・m⁻²以下の場合にはDCW当たりで液体培養とほぼ同じ速度でリン酸を取り込めること、固相面積当たりでは6 mg P・m⁻²・min⁻¹の速度でリン酸を除去できることが示された。固相に保持された液体の体積は約1.5L・m⁻²であり、リン酸取り込み速度が飽和した固相表面の細胞密度は13g DCW・L⁻¹と見積もられたことから、固相表面培養系は高いリン取り込み活性を維持しながら液体培養(0.5-6g DCW・L⁻¹未満)よりも高い細胞密度で細胞を培養できることが示され、固相表面積当たりのリン取り込み速度を液体培養の池面積当たりのリン取り込み速度よりも高くできる可能性が示唆された。次に、この装置を用いて実際の排水からのリンの除去を検討したところ、エタノール製造工場由来の無機排水(4 mg・L⁻¹)からも池の水(0.06 mg・L⁻¹)からも24時間以内に大部分のリンを除去することができ、細胞の生育も維持されることが明らかとなった。このことから、液体培養よりも容易にリン欠乏細胞を調製することのできるこの固相表面培養系では、バイオマス生産と排水処理の二元的活用が期待できることが示された。

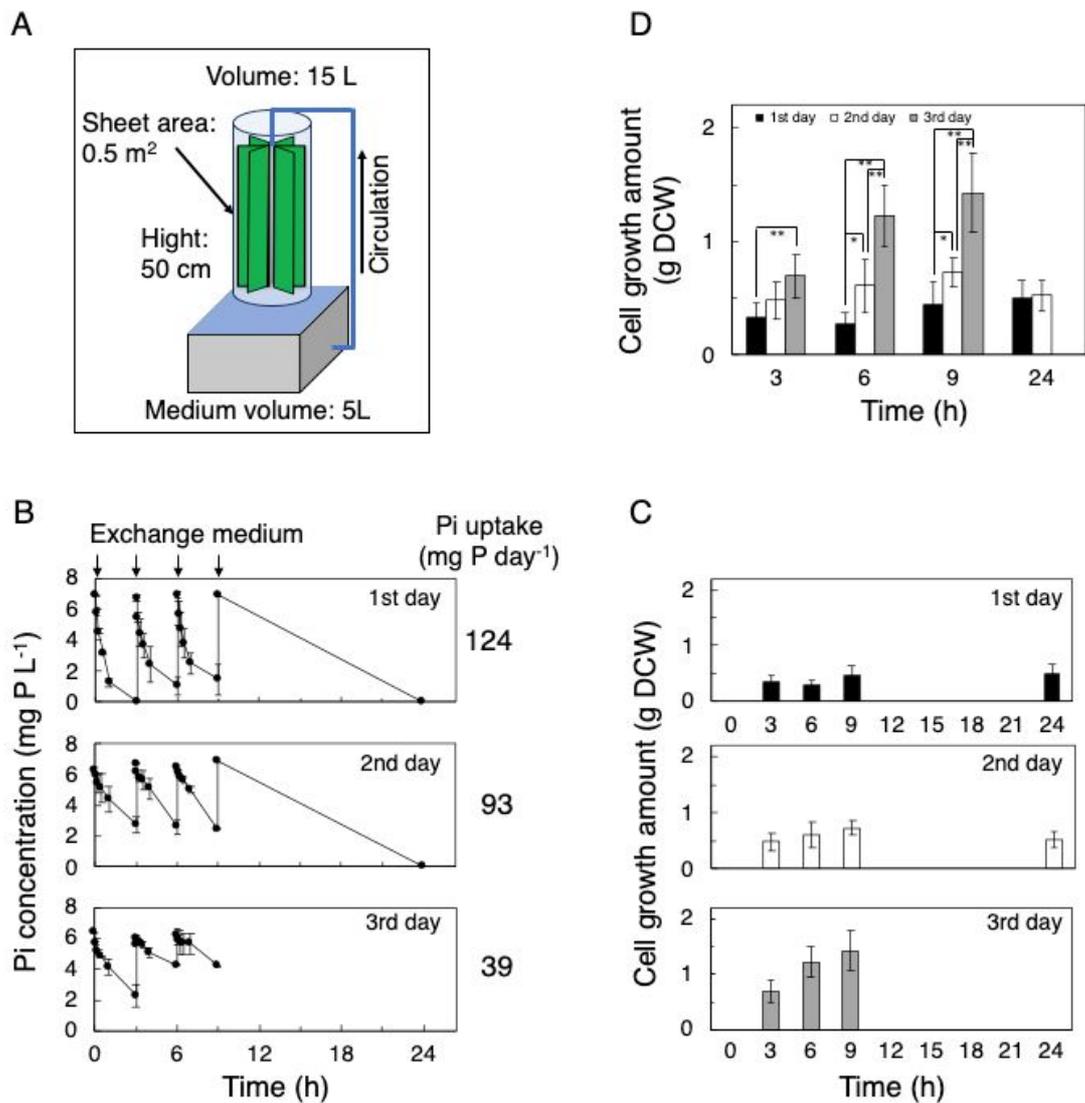


図2 P 欠乏クロレラ細胞を付着させた固相を放射状に配置した可搬型円筒装置によるリン酸の除去。A: 装置の模式図。12枚の固相支持体(各40cm²)をアクリル管内に放射状に配置した。B: この系で処理した培地中のリン酸濃度の経時変化。培地は1日あたり3時間ごとに3回および15時間後に1回交換した。C, D: 細胞の増殖。培地交換直前に固相表面から回収した細胞量の経時変化。エラーバーは平均値+標準偏差(n=3)を示す。日毎の細胞増殖量の有意差はStudentのt検定によって評価した(*P<0.1, **P<0.05)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyachi Hiroki, Okada Katsuhiko, Fujiwara Shoko, Tsuzuki Mikio	4. 巻 46
2. 論文標題 Characterization of CO2 fixation on algal biofilms with an infrared gas analyzer and importance of a space-rich structure on the surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 101814 ~ 101814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2020.101814	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 Okada Katsuhiko, Fujiwara Shoko, Tsuzuki Mikio	4. 巻 66
2. 論文標題 Energy conservation in photosynthetic microorganisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.02.002	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 Hiyoshi Tatsunori, Oyanagi Kenta, Niki Takuma, Fujiwara Shoko, Sato Norihiro	4. 巻 540
2. 論文標題 Requirement of the exopolyphosphatase gene for cellular acclimation to phosphorus starvation in a cyanobacterium, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 16 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.095	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 Miyachi Hiroki, Harada Kohei, Suzuki Yoshino, Okada Katsuhiko, Aoki Motohide, Umemura Tomonari, Fujiwara Shoko, Tsuzuki Mikio	4. 巻 58
2. 論文標題 Development of an algal cell-attached solid surface culture system for simultaneous wastewater treatment and biomass production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102394 ~ 102394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2021.102394	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 Oishi Yutaro, Otaki Rie, Iijima Yukari, Kumagai Eri, Aoki Motohide, Tsuzuki Mikio, Fujiwara Shoko, Sato Norihiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine-dependent lipid remodeling in a green alga, <i>Chlorella kessleri</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02927-z	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 Maeno Toshiki, Yamakawa Yuki, Takiyasu Yohei, Miyauchi Hiroki, Nakamura Yasunori, Ono Masami, Ozaki Noriaki, Utsumi Yoshinori, Cenci Ugo, Colleoni Christophe, Ball Steven, Tsuzuki Mikio, Fujiwara Shoko	4. 巻 13
2. 論文標題 One of the isoamylase isoforms, CMI294C, is required for semi-amylopectin synthesis in the rhodophyte <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 967165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.967165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aburai Nobuhiro, Kawashima Naritaka, Morita Rei, Miyauchi Hiroki, Okada Katsuhiko, Sato Norihiro, Fujiwara Shoko, Fujii Katsuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Biomass and Lipid Production in the Aerial Microalga <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> KGU-D001 in the Liquid and Aerial Phases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioEnergy Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.967165	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 Miyauchi Hiroki, Ishikawa Tomoharu, Hirakawa Yutaro, Sudou Ayumu, Okada Katsuhiko, Hijikata Atsushi, Sato Norihiro, Tsuzuki Mikio, Fujiwara Shoko	4. 巻 14
2. 論文標題 Cellular response of <i>Parachlorella kessleri</i> to a solid surface culture environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1175080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1175080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inukai Mayuka, Kobayashi Naoya, Endo Hirotoishi, Asakawa Koki, Amano Keisuke, Yasuda Yuki, Cenci Ugo, Colleoni Christophe, Ball Steven, Fujiwara Shoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Kre6 (yeast 1,6-β-D-glucanase) homolog, PhTGS, is essential for β-D-glucan synthesis in the haptophyte <i>Pleurochrysis haptoneofera</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1259587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2023.1259587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aburai Nobuhiro, Morita Rei, Miyauchi Hiroki, Okada Katsuhiko, Sato Norihiro, Fujiwara Shoko, Fujii Katsuhiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Acclimation of the Aerial Microalga <i>Coccomyxa subellipsoidea</i> KGU-D001 to Water Stress in the Aerial Phase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioEnergy Research	6. 最初と最後の頁 622 ~ 633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12155-023-10651-1	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 都筑幹夫, 岡田克彦, 藤原祥子	4. 巻 27
2. 論文標題 微細藻類による二酸化炭素固定、その能力と条件	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 東京薬科大学研究紀要	6. 最初と最後の頁 37〜44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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13件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮内啓喜, 原田康平, 岡田克彦, 都筑幹夫, 藤原祥子
2. 発表標題 固相上クロレラバイオフィルムの光合成およびリン吸収特性
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯島裕加里, 大石裕太郎, 大滝理恵, 藤原祥子, 佐藤典裕
2. 発表標題 緑藻クロレラにおける核の発現ベクター構築
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山川宥紀, 藤原祥子, 中村保典, 小野雅美, 尾崎紀昭, 宮内啓喜, 前野俊樹
2. 発表標題 原始紅藻 <i>Cyanidioshyzon merolae</i> のイソアミラーゼ変異株の解析
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoko Fujiwara
2. 発表標題 Mysterious cell covering formation in the coccolithophorids
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮内啓喜, 石川禎治, 岡田克彦, 藤原祥子, 都筑幹夫
2. 発表標題 固相表面上培養におけるトレボウクシア藻綱 <i>Parachlorella</i> 細胞の光合成特性および環境応答
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川禎治, 宮内啓喜, 岡田克彦, 藤原祥子, 都筑幹夫
2. 発表標題 Parachlorella細胞の固相表面培養における光合成特性および環境応答
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮内啓喜, 石川禎治, 須藤歩, 岡田克彦, 藤原祥子, 都筑幹夫
2. 発表標題 トレボウクシア藻綱Parachlorellaの固相表面上での光合成特性および環境応答
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤美鞠, 飯島裕加里, 大滝理恵, 藤原祥子, 佐藤典裕
2. 発表標題 クロレラの混合ストレス誘導性の油脂蓄積を支える代謝基盤・エネルギー代謝と炭素代謝遺伝子発現の制御
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島裕加里, 大石裕太郎, 藤原祥子, 佐藤典裕
2. 発表標題 ヒ素ストレス条件下でのエネルギー代謝と脂質代謝の制御
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川宥紀, 宮内啓喜, 前野俊樹, 中村保典, 小野雅美, 尾崎紀昭, 藤原祥子
2. 発表標題 原始紅藻Cyanidioschyzon merolaeのイソアミラーゼ変異株の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本昇吾, 犬飼菜由加, 鈴木重勝, 藤原祥子
2. 発表標題 円石藻 Pleurochrysis における石灰化関連タンパク質ConC12の解析
3. 学会等名 第17回バイオミネラルリゼーションワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川禎治, 平川悠太郎, 宮内啓喜, 岡田克彦, 佐藤典裕, 藤原祥子
2. 発表標題 担持体に付着させたParachlorella細胞の環境応答
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平川悠太郎, 石川禎治, 宮内啓喜, 岡田克彦, 土方敦司, 佐藤典裕, 都筑幹夫, 藤原祥子
2. 発表標題 固相表面培養におけるParachlorella細胞の環境応答
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023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	岡田 克彦 (Okada Katsuhiko) (40301551)	東京薬科大学・生命科学部・助教 (32659)	
研究 分担者	佐藤 典裕 (Sato Norihiro) (50266897)	東京薬科大学・生命科学部・准教授 (32659)	

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