

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：57601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870820

研究課題名(和文) 微細藻類カプセルによる廃棄性窒素の有用物質変換システム

研究課題名(英文) Removal system of ammonia nitrogen and production of useful organic materials using capsules containing Chlorella-like microalgae isolated from protozoa Paramecium bursaria

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・准教授

研究者番号：50453535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：窒素処理法の1つである生物学的処理法は、複数の微生物を使用し、設備投資と装置維持にある程度のランニングコストを要する。本研究では、上記の代替法として、微細藻類含有型の不溶性担体を用いた新規除去法の開発を目的とし、その関連する基礎研究に取り組んだ。本成果として、研究で用いた糖分泌型藻類を含有した藻類カプセルは、アンモニア性窒素含有溶液中のアンモニア濃度の有意な減少を誘導できた。また、当該藻類はカプセルに含有された状態でも、条件により糖を分泌した。さらに、アンモニア処理時に起こる当該藻類の代謝制御分析として、メタボローム解析を実施し、アンモニア処理特異的に変化する複数の生体分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Biological nitrification/denitrification process has been a standard method to remove nitrogen in waste water. The process, however, has expended considerably investment in equipment and the running cost because the process requires anoxic conditions for facultative heterotrophic bacteria. This study aimed to establish the alternative method to the conventionally-biological process. This study used Chlorella-like symbiotic algae isolated from Paramecium bursaria for removal of ammonia nitrogen. After treatment of algae encased in an alginate capsule with ammonia, the algal capsules could remove ammonia significantly. Although these algae have a unique characteristic to release photosynthetic products, these algal capsules could also release them. Furthermore, this study investigated metabolic changes of algae after treatment with ammonia using GC-MS spectrometry. Results showed that amounts of several organic components in algae changed between control and the test condition.

研究分野：環境農学

キーワード：微生物機能 微生物利用学 遺伝子発現 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

高濃度のアンモニア性窒素排水は、火力発電所・半導体工場や鉄鋼製造プロセス等の基幹産業から恒常的に排出される。アンモニア・硝酸および亜硝酸性窒素の流出は、地下水の硝酸汚染や閉鎖系水域における富栄養化の原因となる。環境保全の観点から、上記物質の排出は環境省告示の「人の健康の保護に関する環境基準」に基づき厳しく規制されている。

現在、排水中の窒素除去の方法として、生物学的窒素除去法(硝化脱窒法など)と物理化学的窒素除去法(イオン交換法や電気浸透法など)がある。排水中や排水処理液は、複数の物質の混合した複雑な組成になり易く、どの形態の窒素(アンモニア性窒素、硝酸性または亜硝酸性窒素および有機物由来の窒素)にも対応でき、比較的低コストで駆動できる生物学的処理法が広く用いられている。一方、生物学的処理法の欠点は、高濃度の排水に向かない点や反応槽が大きくなる点である。また、複数の微生物を使用し、各処理槽の温度・pH の調整に加え、無酸素状態も用意する必要があり、装置の維持にある程度のランニングコストを要する。特に、排水処理の施設用地が困難な工場や都市部では、コンパクトで迅速な処理の可能な装置が期待されている。

上記欠点を克服するため、各企業や研究機関が高濃度窒素に耐性をもつ硝化・脱窒菌の探索や処理プロセスの改良による設備の小型化などが検討されている。しかし、既存の生物学的処理法を用いる限り、飛躍的で大きな技術イノベーションには限りがある。本研究では、生物学的窒素除去法に用いられる硝化・脱窒細菌に替わる方法として、微細藻類含有型の不溶性カプセルを用いた新規窒素除去法を開発することを目的とし、関連する基礎研究に取り組むことにした。

2. 研究の目的

本研究では、アンモニウムイオンを吸収でき、また、体外に光合成由来の糖分を分泌できると報告のある原生動物ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)に共生するクロレラ様の共生藻に着目した。本手法では、当該藻類のみを不溶性の担体内に含包し、微細藻類の栄養塩としてアンモニウムイオンを消費させ、結果として排水中の窒素濃度の減少を誘導するシステムの開発を試みた。また、本研究では、当該藻類のアンモニア性窒素吸収能の人為的増幅のための基礎研究として、アンモニア処理に依存した当該藻類の代謝制御を分子レベルで解析することも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、原生動物ミドリゾウリムシ(*P. bursaria*)に共生する共生藻に着目し、当該微細藻類を宿主から単離・培養し、研究に用いた。まず初めに、当該藻類を含む多糖類性ビーズ担体(以下、藻類ビーズと記載)を作製した。当該藻類ビーズをアンモニア性窒素含有溶液に 1

週間浸漬し、当該藻類ビーズの形状観察・強度分析及び当該カプセルによるアンモニア吸収能を分析化学的に評価した。なお、形状観察はデジタルマイクロスコープ等の光学機器で行い、強度分析は材料万能試験機による物性評価を行った。また、アンモニア性窒素吸収能は、処理前後のアンモニア性窒素濃度を比色定量した。さらに、アンモニア処理後の当該藻類ビーズ安定性を評価するため、当該藻類ビーズから藻類の漏出の有無を蛍光分光光度計で評価した。

次に、当該藻類のアンモニア性窒素吸収能の人為的増幅のための基礎研究として、アンモニア処理に依存した当該藻類の代謝制御を分子レベルで解析する技術開発を行った。方法は、当該藻類ビーズに一定量のキレート剤を添加し、当該藻類ビーズから藻類由来の遺伝子(ここでは RNA)の抽出を行い、また、それらの抽出した遺伝子が更なる遺伝子実験に使用可能か PCR 法で検討した。さらに、代謝産物から代謝制御機構を推測するために、一定量の当該藻類をアンモニア処理し、処理後に物理破碎して、その破碎産物を GC-MS 分析によるメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

まず初めに、原生動物ミドリゾウリムシ由来の共生藻を含有させた多糖類性カプセルビーズは、アンモニア性窒素含有溶液中のアンモニア濃度の有意な減少を誘導できた。

廃水を想定した厳しい環境(高濃度の窒素化合物存在下)において、上記藻類ビーズを顕微鏡による形状観察及び材料万能試験機による物理強度試験から解析した。形状観察から、多糖類性ビーズ中に当該微細藻類の多数のコロニーが観察され、多糖類ビーズ内で藻類が増殖可能であった。また、材料万能試験機を用いた機械強度の測定から、藻類非含有の当該多糖類ビーズと比べ、藻類含有ビーズは若干強度の低下が測定された。これは、微細藻類が多糖類の隙間に入りコロニー状に増殖するため、物理的な空間が生じ、若干の機械強度の低下を引き起こしていると考えられる。一方、当該藻類ビーズは、手で触ると十分な弾力を示した。したがって、材料万能試験機で観測された機械強度の低下が、応用利用に問題のある程度なのかは、他の対象物との比較が必要である。

次に、当該藻類ビーズをアンモニア含有溶液で処理した処理液を蛍光分光光度計でスペクトル測定し、アンモニア処理時の当該藻類ビーズからの藻類の漏出を検討した。その結果、アンモニア含有溶液の処理液からは、藻類に特徴的なクロロフィル蛍光(蛍光波長 680 nm 付近の赤色蛍光)が観測されなかった。一方、クロロフィル分解物や加熱処理により死滅した藻類で観測される蛍光が若干観測された。以上の点から、処理液中に生きた健全な藻類が漏出してはいないが、処理液では死滅した藻類に由来するクロロフィル成分が漏出する可能性があることが示された。

当該藻類の代謝制御を分子レベルで解析す

る技術の開発として、まず初めに当該藻類ビーズからの藻類遺伝子の抽出とその後の遺伝子発現試験等への適用可能性を検討した。上述の当該藻類ビーズの機械強度と関連し、当該藻類ビーズは、ガラス粒子など物理的な衝撃に強く、ほとんど破壊できなかった。また、細胞溶解液を加えても、その効果は改善しなかった。そこで、一定量のキレート剤を添加したところ、容易に当該藻類ビーズを破壊でき、そこから取り出した藻類は PCR 法など更なる遺伝子実験に使用可能であった。しかし、アンモニア処理した試料からは、藻類ビーズの数を増やしても効率的に RNA を抽出できなかった。そのため、代謝制御を分析する網羅的な遺伝子発現解析試験 (Differential display 法など) に十分量の RNA を抽出できなかった。これは、DNA と異なり、RNA は化学的にアルカリ環境下で分解されやすいことが原因と考えられる。

抽出した遺伝子から直接的に遺伝子発現解析により代謝制御を推測することが困難であったため、遺伝子発現産物である代謝産物から代謝制御機構の推測を試みることにした。このために、一定量の当該藻類をアンモニア処理後に物理破碎し、破碎抽出物を GC-MS を用いたメタボローム解析した。その結果、アンモニア処理特異的に変化する複数の生体分子を同定した。今後、これらの同定された代謝物が、細胞内代謝のどのような代謝プロセスに関与しているのか詳しく考察することで、当該藻類でアンモニア含有溶液処理時にどのような代謝制御が生じているのかのヒントを与えることができる。

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 6 件)

1. T. Takahashi: Direct Evaluation of Endosymbiotic Status in *Paramecium bursaria* Using a Capillary Flow Cytometry., **Cytometry Part A**, vol. 85(11), pp. 911-914, 2014 (*当該研究の派生成果)(査読付)
2. 高橋利幸, 横山誠二: 微細藻類 *Chlorella* 種を用いた電気炉酸化スラグ溶出成分の影響評価, **鉄と鋼**, vol. 101(9), pp. 506-514, 2015(*当該研究の派生成果)(査読付)
3. T. Takahashi, S. Yokoyama: Bioassay of Components Eluted from Electric Arc Furnace Steel Slag Using Microalgae *Chlorella*., **ISIJ International**, vol. 56(8), pp. 1495-1503, 2016(*当該研究の派生成果)(査読付)
4. T. Takahashi: Simultaneous Evaluation of Life Cycle Dynamics between a Host *Paramecium* and the Endosymbionts of *Paramecium bursaria* Using Capillary Flow Cytometry., **Scientific Reports**, vol. 6, 31638, 2016(査読付)
5. 高橋利幸: 微細藻類含有カプセルによる廃棄性窒素の有用物質変換システム, **アグリバイオ(Agricultural Biotechnology)**, vol. 1(3), pp. 257-258, 2017(総説)

6. 角野晴彦, 青木舞, 山田剛史, 川上周司, 山口剛士, 高橋利幸, 山田真義: ICT を用いた打合せと共同実験による複数校型の PBL の開発, **土木学会論文集**, in press, 2017(*当該研究の派生成果)(査読付)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. T. Takahashi, M. Higashiguchi: Ammonia Nitrogen Removal System Using Capsules Containing Microalgae Isolated from Protozoa *Paramecium bursaria*., **The Irago Conference 2014**, 7P-28, 2014
2. 高橋利幸, 細谷夏実: 原生動物ミドリゾウリムシのオートファジー様システムによる細胞内共生藻の品質管理, **日本動物学会九州支部(第 69 回)三学会合同福岡大会**, p. 21, 2014(*当該研究の派生成果)
3. 川上周司, 山田剛史, 平石明, 角野晴彦, 山内正仁, 山田真義, 高橋利幸: 高専 豊橋技科大連携プロジェクトによる先端的バイオ技術者養成のための PBL 授業, **平成 26 年度全国高専教育フォーラム教育研究活動発表**, p. 442, 2014(*当該研究の派生成果)
4. T. Takahashi: Microcapillary flow cytometry, but not hydrodynamic focusing, to investigate symbiosis between an eukaryotic host and the eukaryotic symbionts., **BIT's 5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology 2015**, p. 376, 2015(*当該研究の派生成果)
5. T. Takahashi: Principal Component Analysis Improves Patterning Characteristics with Lower Resolution from Data Obtained using Flow Cytometry., **The Irago Conference 2015**, P12, 2015
6. 八久保真子, 高橋利幸: 外部環境が糖分泌型藻類の分泌挙動に与える影響の解析, **日本生物工学会 第 22 回九州支部宮崎大会**, p. 54, 2015(*当該研究の派生成果)
7. 八久保真子, 高橋利幸: 外部環境に依存した糖分泌型藻類の糖分泌活性と形態変化, **平成 27 年度 第 25 回九州沖縄地区高専フォーラム**, No. 21, 2016(*当該研究の派生成果)
8. 青木舞, 角野晴彦, 山田剛史, 川上周司, 山剛士, 山田真義, 山内正仁, 高橋利幸: “環境を考えられる技術者”を育成するための先端的な環境技術と ICT を用いた PBL の開発, **平成 27 年度土木学会中部支部研究発表会**, 22, 2016(*当該研究の派生成果)
9. 冬野憂介, 高橋利幸: 迅速・簡便な微生物細胞レベルでのオンサイト・センシング技術の開発, **平成 27 年度 日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会**, p. 60, 2016(*当該研究の派生成果)
10. T. Takahashi: Evaluation of Problem-Based Learning to Self-Motivation Using Customer Satisfaction Analysis., **The 10th International Symposium on Advances in Technology Education**, p. 158, 2016(*当該研究の派生成果)
11. 高橋利幸: 微細藻類を用いた電気炉酸化スラグ溶出成分の影響評価, **鉄鋼スラグ新機能フォーラム平成 27 年度第 2 回会議**, 2016

(* 当該研究の派生成果)

12. 高橋利幸: スラグへの機能付加を目的とした微生物コーティングとその評価, **社団法人日本鉄鋼協会 第172回秋季講演大会シンポジウム「スラグ新機能開発とバイオテクノロジーの融合」**, 2016(* 当該研究の派生成果)

13. 冬野憂介, 高橋利幸, 竹中克彦: キレート剤由来成分の微細藻類に対する生理活性とその化学的特性の解析, **日本化学会秋季事業 第6回CSJ化学フェスタ2016**, P1-063, 2016(* 当該研究の派生成果)

14. 渡瀬光瑠, 高橋利幸: ゲル固体化材料が微細藻類増殖に与える影響, **日本化学会秋季事業 第6回CSJ化学フェスタ2016**, P5-088, 2016(* 当該研究の派生成果)

15. Y. Fuyuno, T. Takahashi, K. Takenaka: ALGAL GROWTH EFFECTS OF ELUATE FROM A CHELATING AGENT. **STI-Gigaku 2017 International Conference of "Science of Technology Innovation" 2017**, p. 86, 2017

〔図書〕(計 2件)

1. T. Takahashi: Application of phytoplankton., *In: Corrosion Control and Surface Finishing - Environmentally Friendly Approaches.* (Eds., H. Kanematsu, D. M. Barry), **Springer Japan**, pp. 213-224, 2016(* 当該研究の派生成果)

2. T. Takahashi: Quality Assessment of Microalgae Exposed to Trace Metals Using Flow Cytometry., *In: Superfood and Functional Food - Development of Superfood and its Role in Medicine.* (Eds., N. Shiomi, V. Y. Waisundara), **In Tech Open**, pp. 29-45, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Toshiyuki_Takahashi6

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 利幸 (Toshiyuki Takahashi)

都城工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号: 5 0 4 5 3 5 3 5

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()