

微細藻類によるバイオリファイナリー

蓮沼 誠久・藍川 晋平・和泉 自泰・近藤 昭彦*

藻類、特に微細藻類を利用したバイオ燃料の生産に対する関心が急速に高まっている^{1,2)}。微細藻類の生育に必要なものは光、水、CO₂とわずかな量のミネラル成分だけであり、細胞分裂で増殖する個体の倍加速度は、陸生生物と比べてはるかに速いため、同じ量のバイオマスを得るために必要な生産面積が陸生のバイオマスよりも少なく済む。また、陸生バイオマスの場合はどうしても耕地面積の限界や利用できる水資源の枯渇が大きな問題となるのに対し、水生、特に海洋バイオマスを利用できれば、水資源や耕作における食糧との競合が避けられることから理想的である。さらに、通年の収穫が可能な藻類からのバイオエネルギー生産は安定的なエネルギー供給を可能にすることが期待できる。アメリカエネルギー省 (DOE) は1996年に、20年以上にわたって藻類からの燃料生産を支援することを決定し、実用化を視野に入れた実証研究の試みを開始している。また、DOEはアメリカ農務省 (USDA) と19の統合型バイオリファイナリープロジェクトを選定し、パイロット規模、実証規模および商業規模の施設の建設、促進に5億6,400万ドルを拠出すると発表したが、その中で、池で藻類を養殖する統合型の藻類バイオリファイナリーを実証する計画を発表し、ジェット燃料やディーゼルなどを代替するグリーン燃料を生産することを予定している。我が国でも、ここ2、3年で微細藻類によるバイオ燃料生産の可能性に対する関心が急速に高まっており、将来的なバイオマス資源としてとして期待がかかっている。そこで、本稿では微細藻類によるバイオリファイナリー研究の現状と課題について紹介したい。

微細藻類のバイオリファイナリー

近年、CO₂排出削減、環境への負荷低減の観点から、微生物を用いたバイオプロセスで液体燃料や汎用化学品を生産するバイオリファイナリーの構築が進められている^{3,4)}が、微生物発酵の場合、糖質の供給が開発のボトルネックの一つになっている。その点、微細藻類は光エネルギーを利用してCO₂を油脂、炭水化物、有用物質に変換できるため(図1)、培養液への糖質の供給が不要

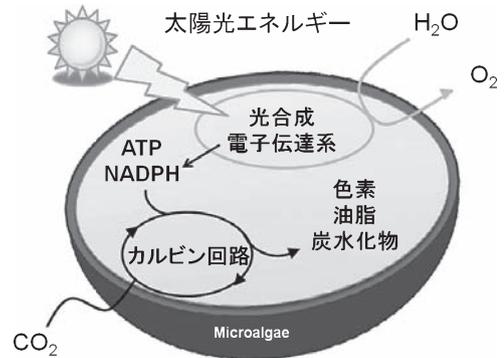


図1. 微細藻類による物質生産

表1. 微細藻類を材料とした主要な物質生産の現状

| 微細藻 | 生産物質あるいは用途 |
|---------------------------------|-------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 健康食品, 化粧品 |
| <i>Dunaliella salina</i> | βカロテン, 養殖用飼料, 健康食品, 化粧品 |
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | 養殖用飼料 |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 健康食品 |
| <i>Arthrospira platensis</i> | 健康食品 |
| <i>Cryptocodinium cohnii</i> | DHA |

であり、かつCO₂削減が可能である。このような性質から微細藻類はバイオ由来の化学製品を供給する究極のバイオマス資源となる得る可能性を秘めている。

微細藻類を用いたバイオリファイナリーには大きく2つの流れがあり、微細藻類による物質生産と微細藻類を微生物発酵の糖質として利用する方法である。前者が主流であり、表1に示したように、緑藻 *Dunaliella salina* や *Haematococcus pluvialis* を用いて、β-カロテンやアスタキサンチンなどが生産されている⁵⁾。微細藻類から生産され得るバイオ燃料は水素、バイオディーゼル、バイオエタノールなどがある。これまでに培養条件(光、温度、栄養条件、CO₂濃度など)の制御や遺伝子組換え技術により、微細藻の細胞内代謝を変動させ、目的有用物質の生産能力を活性化する研究が精力的に進められてきた。水素生産はニトロゲナーゼ方式とヒドロゲナーゼ方式に

*著者紹介 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻(教授) E-mail: akondo@kobe-u.ac.jp

大別され、主にラン藻を用いて研究が進められている。実用化に向けて両方式とも課題があり、ニトロゲナーゼ方式は強光下で変換効率が低下するため、変換効率の向上、ヒドロゲナーゼ方式では酸素存在下での水素生産が困難であるため、酸素発生型光合成と水素生産の2段階生産プロセスの確立が必要である⁶⁾。また、バイオディーゼル生産はさまざまな微細藻類で原料となる油脂生産量の評価が行われ、緑藻 *Neochloris oleabundans* や真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata* では約 130 mg/l/d の生産量が報告されている⁷⁾。緑藻 *Botryococcus braunii* は重油相当（炭素鎖数30以上）の直鎖状炭化水素をはじめとする種々のオイルを乾燥重量の70%近く生産するが、増殖速度が遅く、生産量向上のためには増殖能の強化が課題となっている^{7,8)}。また近年は、炭化水素を蓄積する新たな微細藻類が発見されつつあり、今後に向けて新たな進展があると期待される。バイオアルコール生産は緑藻による嫌気かつ暗条件下での *autofermentation*⁹⁾ やラン藻を宿主とした遺伝子組換え技術による生産が報告されており、後者によりエタノールやイソブタノールがそれぞれ約 110 mg/l/d と 70 mg/l/d 生産されている^{10,11)}。

筆者らの研究グループでは微細藻類を糖質源としてとらえ、微細藻類を起点としたバイオリファイナリー技術の確立を目指している。ラン藻 *Spirulina (Arthrospira) platensis* は 1) 光合成産物としてグリコーゲンを生産すること、2) 他の微細藻類に比べ高いバイオマス生産速度を保持していること、3) 野外における大量培養技術が確立されていることからグリコーゲンの細胞工場として有用である。これまでに筆者らは培養条件の検討によるグリコーゲン生産能の向上およびアミラーゼ発現酵母による *A. platensis* のグリコーゲンを炭素源としたエタノール生産に成功しており、現在更なるエタノール生産効率の向上を目指して、研究を進めている。

しかしながら、微細藻類を利用して効率的に物質生産を行うためには、まだまだ多くの課題があり、プロセス全体の低コスト化が必要となる。たとえば、藻類の大規模培養、高密度大量培養方法や効率的な分離・回収方法、目的物質の抽出方法の確立が必要である。また、光変換効率や増殖速度の向上、目的物質の生産能力の向上を目指し、藻類の代謝能力を目的に合わせてコントロールすることも大きな課題の一つである。筆者らはこの課題を解決する研究手法としてシステムバイオロジー解析が強力なツールと成り得ると考えている。

微細藻類のシステムバイオロジー解析

近年、ヒトの健康や医療への応用を目的として哺乳類を中心にオミクス解析が精力的に実施されている。オミクス解析はDNA塩基配列の網羅的解析（ゲノミクス）、転写産物の網羅的解析（トランスクリプトミクス）、タンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）、代謝物の網羅的解析（メタボロミクス）からなり、網羅的測定により予期せぬ大発見をもたらすことから仮説発見型研究アプローチと言える。微細藻類のバイオリファイナリー研究においては、標的代謝物の生産能力を活性化することが目的となるため、代謝系生合成遺伝子の発現解析やタンパク質（酵素）、代謝物の網羅的解析は重要な意味を持つ。

微細藻類のゲノミクスは1996年のラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム配列決定（生物種の中で4番目）¹²⁾ を皮切りに、代表的なモデル種のゲノムが次々と決定された。その後、2007年に淡水性真核光合成微生物のモデルとして緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の全ゲノム配列が決定され¹³⁾、さらに2010年には食用として商業生産されているラン藻 *A. platensis* NIES-39 の全塩基配列が決定された¹⁴⁾。トランスクリプトミクスやプロテオミクス、メタボロミクスの手法を用いた藻類研究の実施例は動物や高等植物、酵母などと比べると格段に少ないのが現状である¹⁵⁾が、ゲノム配列が明らかになった微細藻については、培養時系列の発現変動やストレス応答など、ある実験条件で発現が有意に増減する遺伝子群が選抜されつつあり^{16,17)}、プロテオミクスについては、タンパク質の発現量の光応答や酸化ストレス応答が解析され、環境の変化に応じて発現量を変化させるタンパク質の同定が進められている¹⁸⁾。一方で、微細藻のメタボロミクスに関する報告はそれほど多くはない。メタボロミクスの大きな特徴は、その一般性である。代謝経路は、多くの場合、種間で互換性を有するため、ゲノム情報が利用できない藻類にも適用可能な点で有用である。これまでの微細藻オミクス解析はモデル微細藻を対象とした研究が主体であったが、バイオリファイナリー化の観点からは、増殖能や物質生産能力の高い商業生産株を対象とすることも重要であり、メタボロミクスをツールとした解析はきわめて有効である。実際筆者らは、キャピラリー電気泳動質量分析と高速液体クロマトグラフィー質量分析を用いて *A. platensis* 抽出物から解糖系、カルビン回路、TCA回路、アミノ酸生合成経路、光合成色素などを網羅した100種の代謝物の定量に成功しており、ま

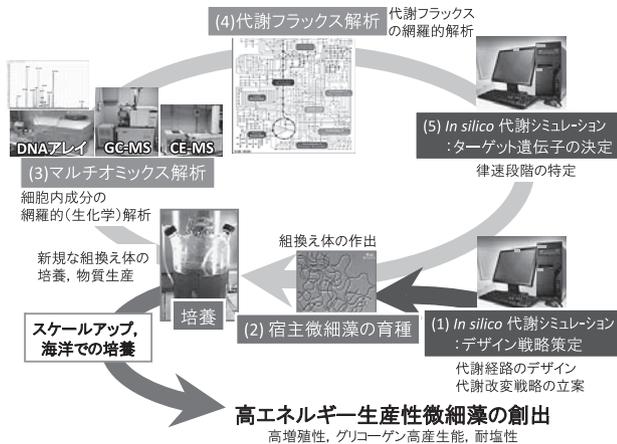


図2. システムバイオロジー解析に立脚した微細藻類育種戦略

た外的環境を変化させることでグリコーゲンや中間代謝物蓄積量の著しい変化を観測できている。一方、目的物質を高生産するためには、代謝物の蓄積量だけではなく、反応速度論的な情報も重要となる。たとえば、アミノ酸や核酸のように、それ自体が重要な代謝産物であると同時に他の代謝物の基質となるような分子の場合、蓄積量の増減だけではその代謝物が関わる経路が活性化したかどうかを判断することは難しい。つまり、代謝経路の活性化度を直接的に知るためには動的な代謝の流れ、すなわち代謝フラックスを観測する必要がある。代謝フラックス解析は生体試料に安定同位体基質を取り込ませ、質量分析計などを用いてその標識率を観測していく手法であるが、当該研究の場合、カルビン回路からグリコーゲンへの糖新生経路が重要となることから $^{13}\text{C}_2$ を安定同位体基質として選定することが望ましい¹⁹⁾。各環境条件や遺伝子改変を行った株の代謝中間体のターンオーバーが観測できればグリコーゲン合成代謝律速点を決定できると考えられる。以上のように、細胞機能を人間の望ましい方向へ改変させるためには、遺伝子発現、代謝物濃度、代謝フラックス分布などの情報を統合的に解析する、つまり細胞をシステムとして理解する視点が求められている。そこで、筆者らはシステムバイオロジー解析に基づいた合理的な代謝改変戦略を立案し、そして実用微細藻に適用することにより海水環境下で高性能（高増殖能、高光合成能、高デンプン生産能、高耐塩性能）を示す、微細藻・セルファクトリーを創製することを目指している（図2）。

最後に

地球全体で生産されるバイオマスの量は莫大なものであり、毎年生産されるバイオマスは世界の年間エネルギー消費量の約10倍のエネルギーに相当する。その中で、水圏における一次生産は地球全体の約38%を占めていると言われており、藻類の有効利用には大きな期待が寄せられている。一方で、藻類由来エネルギー生産の実用化のためには、光変換効率や増殖速度の向上、クロアズドおよびオープンポンド型を組み合わせたバイオリアクターシステムの最適化による産性能の飛躍的な向上、微細藻類の効率的な分離・回収、高密度大量培養方法、効率的なバイオディーゼルの藻類からの分離回収方法など、今後の検討課題も多い。しかしながら、いずれにしても藻類からのバイオエネルギー生産は、次世代の安定的なエネルギー供給を可能にすることが期待でき、今後の研究開発の加速が望まれる。

文 献

- 1) Rosenberg, J. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 430 (2008).
- 2) Sheehan, J. *et al.*: *Nature*, **27**, 1128 (2009).
- 3) Ragauskas, A. *et al.*: *Science*, **311**, 484 (2006).
- 4) Wackett, L. *et al.*: *Curr. Opin. Chemical. Biol.*, **12**, 187 (2008).
- 5) Spolaore, P. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 87 (2006).
- 6) 増川 一, 櫻井英博: *生物の科学*, **60**, p.46 (2006).
- 7) Chen, C. Y. *et al.*: *Bioresource Tech.*, **102**, 71 (2011).
- 8) 藏野憲秀ら: *デンソーテクニカルレビュー*, **14**, p.59 (2009).
- 9) Hirano, A. *et al.*: *Energy*, **22**, 137 (1997).
- 10) Atsumi, S. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 1177 (2009).
- 11) Dexter, J. *et al.*: *Energy Environ. Sci.*, **2**, 857 (2009).
- 12) Mizuno, T. *et al.*: *DNA Res.*, **3**, 407 (1996).
- 13) Merchant, S. S. *et al.*: *Science*, **318**, 245 (2007).
- 14) Fujiwara, T. *et al.*: *DNA Res.*, **17**, 485 (2010).
- 15) Jammers, A. *et al.*: *Aquat. Toxicol.*, **92**, 114 (2009).
- 16) Murata, N. *et al.*: *J. Exp. Bot.*, **57**, 235 (2006).
- 17) Singh, A. *et al.*: *BMC Syst. Biol.*, **4**, 105 (2010).
- 18) Rajalahti, T. *et al.*: *J. Proteome Res.*, **6**, 2420 (2007).
- 19) Hasunuma, T. *et al.*: *J. Exp. Bot.*, **61**, 1041 (2010).