

微細藻類への重イオンビーム照射による バイオ燃料増産株の作出

松田 尚大¹・竹下 毅¹・大田 修平^{1,2}・山崎 誠和^{1,2}
風間 裕介³・阿部 知子³・平田 愛子¹・河野 重行^{1,2*}

太陽光、風力、波力・潮力、流水・潮汐、地熱、バイオマスといった再生可能エネルギーが注目されている。自然の力で定常的もしくは反復的に補充されるエネルギーが、発電、給湯、冷暖房、輸送、燃料などのエネルギー需要全般にわたって利用され、化石燃料や原子力に頼り切った世界の産業構造そのものを変革することが期待されている。なかでも藻類や水圏微生物を利用したバイオエネルギー生産のための基盤技術が注目されている¹⁾。水圏には、脂質や糖類の蓄積能力が高く、多様性に富み、高い増殖能力をもった微細藻類が多い。

微細藻類と育種戦略

微細藻類は顕微鏡サイズの藻で、その多くは植物と同様に太陽光を利用し、二酸化炭素 (CO₂) を固定して炭水化物を合成する。微細藻類によるバイオ燃料は、植物由来のバイオ燃料に比べて、桁違いに生産効率が高く、またトウモロコシなどのように食品利用との競合もないため、次世代のバイオ燃料として注目されている。

バイオ燃料の実用化には、自然の微細藻類をそのまま使うのではなく、穀類や園芸作物と同じように大量生産が可能な株の育種が必要である。微細藻類には、これまで育種という発想はなく、ゲノムもほとんど解読されていない。本研究では、重イオンビームを微細藻類に照射して²⁾、数や形態に関する自動計測した定量的データをもとに選抜を実施する³⁾。戦略は三つで、(1) 10%程度の増産ではなく10倍以上の増産をめざし、重イオンビーム照射によって誘導される、DNA欠失とゲノム改変を利用した微細藻類の先端的な育種法を開発する。(2) バイオイメージングとオーミクスを積極的に導入することで、藻類学を革新し、先端育種で得られた優良株の増殖と代謝を増強する新規の有用遺伝子を探索するとともに、DNAの欠失とゲノムの改変がいかんにしてそのような有用遺伝子を生み出しうるのかそのメカニズムを明らかにする。(3) 微細藻類の市場を新たに開拓し、生産性の増大、コストダウン、安定供給などでブレイクスルーをもたらす、短期的にはバイオマスや有用物質による市

場開拓を進め、中・長期的視野でバイオ燃料の実用化と増産に貢献する。

2008年に米国で発表された「グリーン・ニューディール」は、信用危機・気候変動・原油価格高騰の三大危機を解決するための政策で、折からの世界金融危機（リーマンショック）などへの対応のため世界各国でこれに沿った政策が推進されていた。しかし、米国は、シェールガスが実用化できたことから、化石燃料への依存を再び深めようとしており、CO₂の排出削減などは喫緊の政策課題ではなくなりつつある。この状況に対抗して、低炭素社会実現への流れを復活させるには、再生可能エネルギーの技術や事業モデルの革新が是非とも必要だろう。

藻類バイオ市場の経済規模を調査すると、バイオ燃料は世界規模で1,280～11,050億円と予測され、期待の高さが強く感じられる。一方、日本では、海苔、昆布、ワカメといった伝統の食品の市場規模が5,900億円と意外に大きいことに気づかされる。また、クロレラやアスタキサンチンといった健康食品や医薬品も目立ち、これにフコダイン、ユーグレナ、スピルリナ、フコキサンチンなどがこれに続いており、微細藻類の市場規模の拡大が実感できる。

クロレラの物質生産

クロレラは、比較的タンパク質含量が高いため、第二次大戦後すぐに、未来の食料資源の一つとして培養や研究が盛んに行われた。大量培養ができるようになった1960年代以降は、健康食品として販売されており知名度は高い。クロレラは、トレボキシア藻綱に属する鞭毛をもたない単細胞緑藻類のクロレラ属の総称で、直径2-10 μmのほぼ球形で、そのほとんどが培養可能なので各企業がそれぞれに特徴的な種を培養している。

本研究で用いたのは、*Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. lobophora*と*Parachlorella kessleri*の主に4種のクロレラで、いずれもデンプンとオイル（そのほとんどがトリグリセリドからなる中性脂肪）をよく貯

* 著者紹介 ¹ 東京大学 大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 (教授) E-mail: kawano@k.u-tokyo.ac.jp
² JST・CREST ³ 理化学研究所・仁科加速器研究センター

める。たとえば、*C. sorokiniana*を電子顕微鏡3D^{4,5)}で観察すると、葉緑体にはデンプン、細胞質にはオイルが蓄積されており、一つの細胞にデンプンとオイルが共存していることがわかる(図1)。また、*P. kessleri*はグルコサミンを多く含む電子密度の低い細胞壁を特徴としており、大形で増殖性はもとより物質の生産性にも優れている⁶⁾。

*P. kessleri*を屋外のバイオリアクターで培養し、培地から硫黄を除去すると(硫黄欠乏, S欠), その時から細胞当たりのデンプン量が一気に増加する。微細藻類は培地から窒素を除去すると(窒素欠乏, N欠), オイルなどの貯蔵物質を合成することはよく知られている。ただ、タンパク質合成には窒素源から合成されたアミノ酸が必要で、N欠はアミノ酸合成やタンパク質合成などが関連するバイオマス生産に直接影響する。一方、タンパク質合成に関わる含硫アミノ酸はメチオニンとシステインだけなので、S欠はN欠に比べるとバイオマスに与える影響は比較的少ない。4種のクロレラをS欠にしてデンプンを測定すると、デンプンの蓄積量は一気に増加し、増加したデンプン量はいずれの種においてもその後必ず減少することがわかった⁷⁾。

*C. sorokiniana*の電子顕微鏡写真を見ると、陰のある黒っぽい不定形の粒がたくさんある。これが電子顕微鏡3Dのように色づけしていない電子顕微鏡のコントラストで見たデンプンで、葉緑体がたくさんデンプンを蓄積しているのがわかる。また、細胞周縁部に電子密度が比較的低いので白っぽい丸い部分が見えるが、これは電子顕微鏡で見たオイルドロップで、クロレラはデンプン

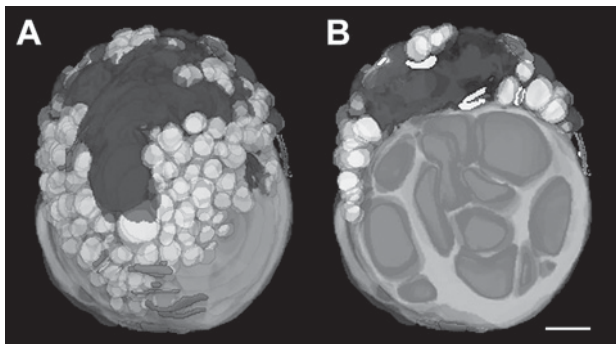


図1. クロレラの電子顕微鏡3D. S欠誘導した*C. sorokiniana*を電子顕微鏡用に包埋して、30~50枚の超薄切片に切り分け、その電子顕微鏡観察像を3次元立体構築(電子顕微鏡3D)した^{4,5)}。Aは細胞壁を除いた外観、Bそれを半分に割って内部が見えるようにした。Aの上部を覆う顆粒状のものがオイルドロップで、Bの下2/3で見られる不定形の顆粒がデンプン粒である。デンプンとオイルが一つの細胞に共存している。バーは1 μm 。

を蓄積すると同時にオイルも蓄積していることがわかる(図2)。

クロレラを含め緑藻の仲間は葉緑体の中にピレノイドをもっている。ピレノイドには暗反応でCO₂を固定するリブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)が大量に含まれており、その周辺にはデンプンが蓄積して鞘(まぶさ)のようにになっている。これをデンプン鞘と呼ぶ。通常、葉緑体に含まれるデンプンはこのデンプン鞘1個ぐらいであるが、S欠にすると葉緑体に大量のデンプンが蓄積されるようになる。S欠が進むと細胞周辺部にオイルが貯まるようになり、デンプン粒が壊れてオイルに変換しているのがわかる。電子顕微鏡でオイルドロップをうまく固定するのはなかなか難しい。光学顕微鏡ではナイルレッド(Nile Red)という蛍光色素が容易にオイルを染めるので最近をよく使われている。3週間も培養するとS欠のみオイルが溜まり黄色いナイルレッドの蛍光が見えるようになる。

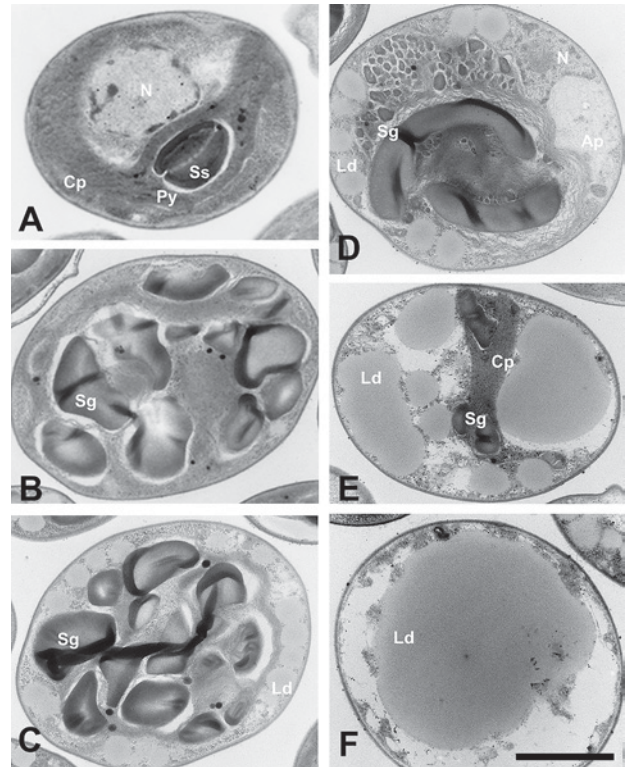


図2. クロレラのS欠誘導によるデンプン蓄積からオイル蓄積への変換⁷⁾。A ピレノイド周辺のデンプン鞘が発達した通常培地のクロレラ、B, C 誘導された多量のデンプン、D-F デンプン粒が分解し最終的には巨大なオイルドロップに変換される。N核、Ss デンプン鞘、Cp 葉緑体、Py ピレノイド、Sg デンプン粒、Ld 脂肪体(オイルドロップ)、Ap オートファゴソーム、バーは2 μm 。

S欠誘導した際のオイル量を定量すると、乾燥重量の40～50%ぐらいになる。蓄積されたオイルの脂肪酸組成については、種によってあまり大きく変動することはない。ただ、*P. kessleri*だけは、S欠誘導するとかなり飽和脂肪酸量が増える。ディーゼルオイルに転換するときには、不飽和よりも飽和のほうが安定して有利だといわれている。

クロレラはまずデンプンを葉緑体内に貯める。培地が劣化してくるとデンプンはオイルに転換され細胞質に蓄積される。この転換はS欠などの栄養塩欠乏によっても促進される。この変換機構をうまく使えばオイルの収量も上げることができる⁸⁾。

重イオンビーム照射

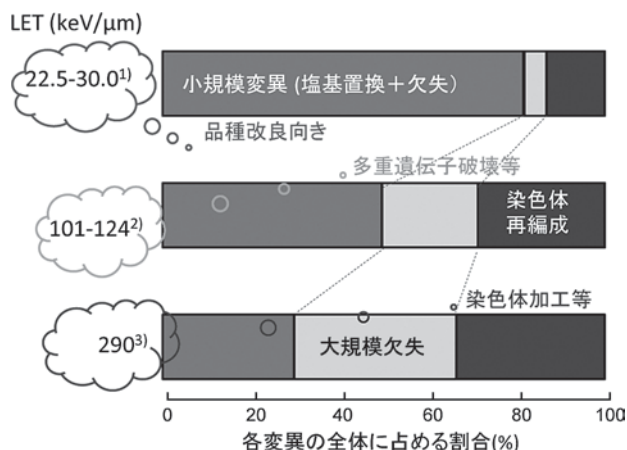
S欠誘導によるクロレラのオイル生産は確かに魅力的ではあるが、これだけでバイオ燃料増産を果たすのは難しい。そこで注目したのが理化学研究所（理研）・仁科加速器研究センターの重イオン加速器施設である²⁾。このセンターのRIビームファクトリー（RIBF）で発生させた重イオンビームは、DNA二本鎖を切断する新しい高エネルギー変異原であり、大気中で生物材料に照射できる。RIBFは、核物理学の研究を目的に建設された。重イオンビームとして大量の安定原子核を標的にぶつけて、自然界には安定に存在しない短寿命原子核（RI）を作り出し、その質量や寿命などの物理量を実験的に決定するため、大強度ビームが必要であった。そこで、大強度ビームの生成に有利なサイクロトロンと呼ばれる加速器を複数用いて多段階加速し、世界最大強度の重イオンビームを発生させることに成功しており、水素からウランに至る全元素を光速の70%まで加速できる。理研は、最初のサイクロトロンを製作した仁科芳雄主任研究員の時代より、伝統的に応用研究にも力を入れており、現在RI製造と重イオンビーム育種技術開発はセンターの業務課題として優先されている。

高等植物の育種に関しては多くの実績を上げていて枚挙にいとまがない。1998年に照射した植物材料から2001年秋に新色ダリア品種が試験販売され、2002年春には不稔化バーベナ品種が世界初の重イオンビーム育種の成果として市販されている。品種改良ユーザー会には国内164団体が加盟している。また、国際的にも注目を集めており、韓国、オーストラリア、南アフリカなどと共同研究を実施している。重イオンビーム育種技術により育種年限を短縮して新品種を育成できる経済効果は大きく、さらに“日本ブランド”の新品種を紹介できることはこの分野におけるわが国のリーダーシップを確固た

るものとしている。淡い黄色の花を咲かせる「仁科蔵王」と四季咲きのサクラ「仁科乙女」と名付けられた新種のサクラの開発にも成功している。最近では吟醸酒用の酵母の開発にも成功しており、3つの埼玉県の酒造会社が生産した清酒は統一銘柄「仁科誉」として、理研PB商品として販売している。

筆者らの経験でも、きわめて高い効率で雌雄異株植物ヒロハノマンテマの両性花突然変異体を単離できた。ヒロハノマンテマは開花期には1m近くになるので多くの個体を選抜するのは困難だったが、種子に重イオンビーム照射して、畑に710個体植えたところ、そのうち4個体が望む両性花突然変異体だった⁹⁾。

重イオンビームは細胞核を通過するときに、DNA二本鎖を切断する。植物細胞は自らが持つ修復機能によりDNA鎖をつなぎ直すが、塩基が短くなるDNA欠失型の変異の出現率が高いとされる。重イオンビームは生体に与えるエネルギー（線エネルギー付与、LET）が十分大きいので、一粒でも確実にDNAを切断することができる。このため重イオンビーム照射された種子や花粉の稔性へのダメージが少なく済むと考えられている。重イオンビームは、イオンの種類（核種）や速度を選択することでLETを変えることができる。生体に与える影響の物理要因は、イオン粒子数とLETである。照射線量はLETと飛来するイオン粒子数の積に比例するため、LETが大きくなると照射線量が同じでも飛来する粒子数が少なくなる。そのため、DNAに当たる確率が減り変異率は低下するが、DNAに当たると大きなダメージを与えると考えられる。最近では、LETを選ぶことで欠



1) Kazama et al. 2011; 2) Shikazono et al. 2005; 3) Hirano et al. 2012

図3. LETが変異特性に与える影響^{10,11)}。シロイヌナズナ種子にさまざまなLETのビームを照射し、変異体に生じた突然変異の種類と規模を解析した。LETが大きいほど大規模な変異が生じやすいことがわかった。

失の大きさを数bpから数百kbpまで任意に調整ができるようになっている(図3)^{10,11)}。

オイル増産株の作出

*P. kessleri*に炭素、ネオン、アルゴンの重イオンビームを照射し、それぞれの線種で生存曲線を作成すると、炭素と比較して、ネオン、特にアルゴンは生存への影響が大きい。γ線やX線による突然変異体の単離は一般的には致死率95%ぐらいのところから突然変異体を拾うが、重イオンビームの場合は逆に生存率80~90%ぐらいのほうがいいことが経験的にわかっている。こうして単離された突然変異体には、たとえば、80~90 kb程度の三つの大きな欠失が起こっており、ゲノム全体では染色体の大規模な再構築が起こっている¹¹⁾。大規模な再構築では重複が起こることも期待される。遺伝子重複は進化の原動力とも考えられており、重複が起こらないことには新しい遺伝子や形質はなかなか獲得できない。通常、突然変異の多くはロス・オブ・ファンクションで、何かの遺伝子が機能を失うことを意味しているが、重複をとともなうゲノム再編が起これば、新しい機能や形質の付与が期待できる。

重イオンビーム照射でバイオ燃料増産株を作出できるか以下のようなパイロット実験を行った¹²⁾。重イオンビームを照射した*P. kessleri*の細胞懸濁液から約100株

を単離し、増殖速度、細胞直径、乾燥重量、クロロフィル量を基準として優良株をスクリーニングし、野生株とは異なる7株を単離した。この7株でデンプン量とオイル量の変化を経時的に観察した。野生株は、培養初期にデンプンを蓄積し、培養を継続するとデンプンの蓄積量が減少し、代わりに培養後期にはオイルが蓄積される。変異株には、培養初期からオイル蓄積が見られるものがあり、その量が野生株の1.5~2倍となるような株(11A5株, 1W15株, C300-15株, PK4株)も存在した。

11A5株は、培養初期からオイルを蓄積し、培養期間を通じて、乾燥重量当たりで野生株の1.5~2倍、細胞当たりでは野生株の実に3倍にもなっていた。11A5株をナイルレッドで蛍光染色すると、細胞内の中性脂質蓄積の指標となる蛍光スポットが培養初期から観察された。PK4株は、培養期間を通じて、デンプンの減少が止まらず、オイルを蓄積し続けることがわかった。こうした株を用いて、N欠やS欠といった栄養塩飢餓の影響を調べるため、野生株でもっともオイルを蓄積する窒素(N)濃度、硫黄(S)濃度を最適化した。野生株と変異株では栄養塩に対する応答の違いが見られた。栄養塩が及ぼす影響を調べた結果、窒素濃度を0.2倍に希釈した場合、培養液当たりでデンプン量が1.5倍、オイル量が6.4倍となり、有用物質の増産に有効であることがわかった(図4)。

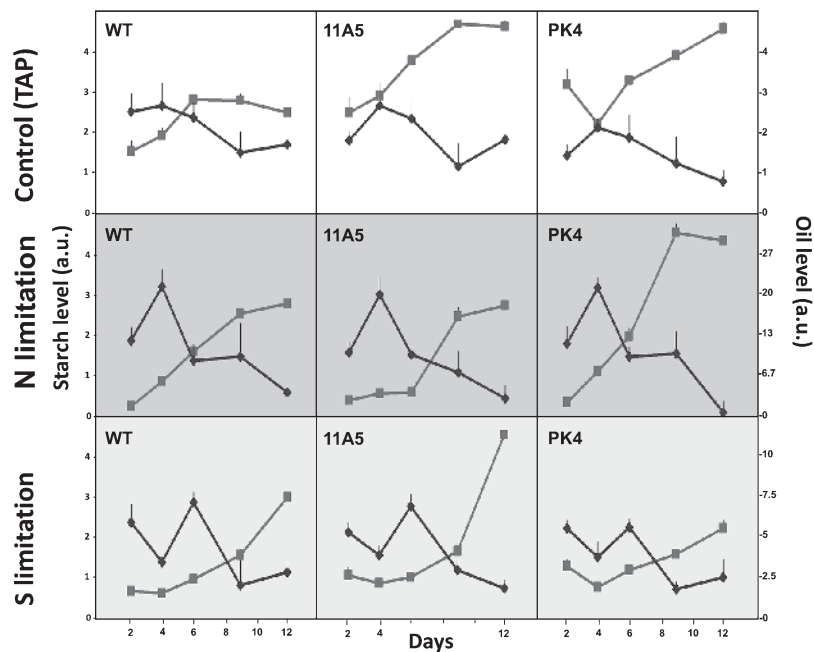


図4. 重イオンビーム照射で作出した代表的な変異株(11A5, PK4)のデンプン蓄積(◆)とオイル蓄積(■)¹²⁾。上段から通常培地(TAP)のコントロール、N欠培地、S欠培地の順となっている。11A5やPK4のオイル蓄積はコントロールも含め際限がなくなる傾向がある。

重イオン照射した株の中には増殖速度や細胞サイズといった量的な変異だけでなく興味深い表現型を示すものもある。ボトリオコッカス (*Botryococcus braunii*) がオイル生産株として有望視される理由は、高いオイル含量に加え細胞外にオイルを分泌することがあげられる。S欠誘導するとクロレラもボトリオコッカスなみにオイルを蓄積するが、クロレラにはオイルを細胞外に分泌する性質はない。顕微鏡を用いて重イオン照射株をスクリーニングしたところ、S欠誘導しなくてもオイルを蓄積する株に加え、検鏡するためにカバーガラスをかけるだけでオイルを細胞外に出すものなどが単離されている。

クロレラとバイオ燃料の将来性

C. vulgaris, *C. sorokiniana*, *C. viscosa*, *C. emersonii*, *P. kessleri*, *P. beijeinckii* といった代表的クロレラ計6種8株について、強光条件下 ($600 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) でバイオマス生産性を調査したところ、乾燥重量で $1.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ というきわめて高い値が達成できた¹³⁾。これは現在までに論文発表されているクロレラのバイオマス生産性では歴代3位に相当する。強光条件下で屋内培養を実施するのは経済的に難しいが、屋外で自然光をうまく使えばこれも解決できるだろう。8月後半から9月にかけて屋外半開放系のバイオリアクターで実施したPK4株の150リットル規模の培養実験では、7日で細胞数は約25倍に増殖し定常期に達している。乾燥重量当たりのオイル蓄積量は66%に達している。

クロレラオイルはまだ実用化されていないが、クロレラをある種の燃料サイクルに組み込むことが試みられている。チェコ共和国ではクロレラは以前から飼料として

も利用されているが、屋外で培養したクロレラを牛舎にポンプアップし、他の飼料とともにそのまま牛に給餌し、その尿尿をバイオガスステーションに供給し、他の原料とともにメタン発酵させる試みがある。バイオガスステーションがあるのは住民8,500人の小さな自治体だが、3基の大形発酵槽で住民の年間の電気使用量の30%と給湯の33%を賄えるとされている¹⁴⁾。クロレラがこのシステムに貢献するのは極わずかだろうし、直接燃料になるわけでもないが、バイオ燃料サイクルに一役買えることの証明にはなる。これは間接的ではあるが「バイオ燃料」の一部として、市民が享受する初めてのクロレラとなるかも知れない。

文 献

- 1) 河野重行：重イオンビーム照射とバイオ燃料増産株作出に関する新技術，p. 51，エヌ・ティー・エス (2013)。
- 2) 仁科加速器研究センター：<http://www.rarf.riken.go.jp/index.html>
- 3) Ohnuki, S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1917 (2013).
- 4) Wayama, M. *et al.*: *PLoS ONE*, **8**, e53618 (2013).
- 5) Ota, S. *et al.*: *Cytologia*, **79**, 287 (2014).
- 6) Li, X. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 97 (2013).
- 7) Mizuno, Y. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **129**, 150 (2013).
- 8) Fernandes, B. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **144**, 268 (2013).
- 9) Koizumi, A. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **51**, 282 (2010).
- 10) Kazama, Y. *et al.*: *BMC Plant Biol.*, **11**, 161 (2011).
- 11) Hirano, H. *et al.*: *Mutat. Res.*, **735**, 19 (2012).
- 12) Ota, S. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **149**, 432 (2013).
- 13) Takeshita, T. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **158**, 127 (2014).
- 14) Biogas Plant in Trebon: <http://www.coach-bioenergy.eu/en/cbe-offers-services/best-practice-network/279-bp-trebon.html>