

オーランチオキトリウム属を活用した バイオリファイナリーによる有用脂質生産

渡邊 研志・秋 庸裕*

環境保全と資源・エネルギーリサイクルを両立するサステナブル技術として、海洋大型藻類や火力発電排ガスを原料としたバイオリファイナリーにより、高度不飽和脂肪酸やカロテノイド、炭化水素などの幅広い産業分野への応用をめざした有用脂質生産システムの構築を進めている。筆者らは、油糧微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) 属の有機酸資化性を活用した二段階発酵とゲノム育種による高機能化を統合して生産性の向上をめざしており、その概要を紹介する。

はじめに

世界的な人口やエネルギー消費量の急増を受けて、地球環境の保全と限りある天然資源の有効活用を実現する技術の確立が要請されている。特に重要視されているのが、石油や石炭などの化石資源に代わる再生可能エネルギーであり、太陽光発電の効率向上や設備の低廉化が推進されるとともに、風力やバイオマスを利用した発電技術も改良が施されている。しかし、国内でのエネルギー需要に対する再生可能エネルギーの供給比率は現時点で1割強に留まり、今後の普及を期待しつつも、当面は化石資源に頼らざるを得ない¹⁾。したがって、再生可能エネルギーの改良や開発を継続して推進するとともに、火力発電で排出されるCO₂の有効利用・貯留技術 (Carbon dioxide capture, utilization and storage; CCUS)、すなわち、カーボンリサイクル技術を確立することが、「持続可能な開発目標 (Sustainable development goals; SDGs)」の達成にも寄与する喫緊の課題といえる。実際、火力発電の高効率化システムとして石炭ガス化燃料電池複合発電技術 (Integrated coal gasification fuel cell combined cycle; IGFC) が実証段階を迎えており、分離・回収されるCO₂を再利用する各種技術を組み合わせた革新的低炭素火力発電の実用化を待つ状況にある。

筆者らは、微生物触媒を利用したバイオリファイナリー技術によってこれらの問題の解決に取り組んでいる。バイオリファイナリーは、農作物の非可食部分や間伐材などの未利用バイオマスあるいは食品製造残渣や下水汚泥などの廃棄物系バイオマスを原料として、主に微

生物の物質変換能力を利用してバイオ燃料や化学品を生産する技術である。廃棄物処理に要する費用や環境負荷を低減しながら、有用物質へと再生する一石二鳥の技術であり、メタンやエタノールの発酵生産系がすでに実用化されている。後述の通り、バイオリファイナリーの原料としては大型藻類や火力発電排出ガスも利用可能である。また、生産物としては健康食品や水畜産飼料、コスメ製品、医薬品などの素材となる高付加価値品も視野に入る。このような拡張性は、触媒である微生物の代謝性能に依存する。変換効率の向上に向けては、薬剤処理やゲノム編集などの遺伝子組換え技術による代謝系の改変が有効だが、まずは原料に対する資化性や目的物質の生産性が高い野生株を獲得することが肝要である。

筆者らは以前から、海洋に広く分布する油糧微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の顕著な脂質生産性に着目して、その応用開発を進めてきた。ラビリンチュラはクロミスタ界の不等毛藻に属し、光合成能を持たない従属栄養型の真核単細胞微生物である。高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の供給源として注目されるとともに、海洋生態系における一次生産者としての役割を含めて環境生物学的にも興味深い。筆者らはさらに、アスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドやスクアレンを含むイソプレノイド炭化水素を共生生産する新種株を見いだした^{2,3)}。それらの分子系統分類、組成脂質の酵素化学的改変、食品廃棄物を原料とした利用法や形質転換法の確立などを通じて、オーランチオキトリウム属の脂質代謝系の理解と生産効率の向上を試みてきた⁴⁻⁸⁾。暗所にて高密度培養が可能な優位性から、各種有用脂質の生産効率は、それらを各々生産する光合成藻類と比較しても見劣りはしない。ラビリンチュラのDHAはすでにサプリメントや水産飼料として実用化されているが、他の脂質分子を含めた、さらなる市場および用途の拡大に向けては、より一層の低コスト化が必要となる。このような背景から、大型藻類を新たな原料としたバイオリファイナリーによる有用脂質生産系の開発を手がけることにした。

*著者紹介 広島大学 大学院統合生命科学研究所 生物工学プログラム (教授) E-mail: aki@hiroshima-u.ac.jp

大型海藻糖質からのカロテノイド生産

持続可能な低炭素社会の実現に向けて、エネルギーや有用物質の原料となるバイオマスの利用技術の開発が近年、益々活発になってきた。まず、とうもろこしなどの可食バイオマスが食糧との競合で価格高騰が問題となったため、草本類が次なるターゲットとされたが、セルロースやリグニンなど不溶性繊維の分解と可溶化の低コスト化が未だ課題である。これら陸上植物と比較して水産バイオマスは利用形態の自由度に加えて、生産性、賦存量や炭素貯蔵量が高いことから注目されるようになった。特に大型藻類は海に囲まれた我が国にとって潤沢に得られる天然資源であり、有効活用が望まれる。

筆者らを含む研究グループは、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」において、CREST事業「海洋微生物発酵制御を基盤とした大型藻類の完全資源化基盤技術の開発」を推進してきた。大型藻類を完全資源化する発酵生産システムの構築をめざして、海水塩濃度の条件に馴化した海洋汚泥菌叢によるメタン発酵技術を中心に、藻体原料の水熱処理による可溶化技術や発酵残渣からの希少元素の回収技術など要素技術を確認した(図1)。筆者らは、これらのエネルギー生産プロセスをオーランチオキトリウムによる高付加価値脂質生産によって経済的に支援するとともに、当微生物の新たな利用法の開発を試みた。

褐藻マンニトールの原料化 褐藻は紅藻や緑藻に比べて海洋における賦存量が圧倒的に多い。コンブやワカメ、ホンダワラがその代表例であり、ラビリンチュラと同じくクロミスタに属する不等毛藻だが多細胞体である。光合成での受光波長の関係で比較的深い位置に生息するため、栽培や収穫には工夫が必要となるものの、生

産速度が速く、経済性の担保が期待できる。そこで、褐藻に含まれる主な糖質成分であるマンニトールやアルギン酸について、オーランチオキトリウム属株の資化性を調べたが、利用できないことが分かった。グルコースやガラクトース、フルクトースなどの単糖は資化可能なので、褐藻糖質をそれら単糖に変換する前処理技術が必要となる。水熱処理による低分子化は別途試行中であり、酵素処理はコスト的に不利であることから、微生物変換の可否を検討することにした。

近海から単離した微生物や海藻糖質に対する資化性が報告あるいは予想された系統保存株を褐藻糖質で培養して得た上清を炭素源として、オーランチオキトリウム属株の増殖性を調べた。その結果、マンニトールをフルクトースに変換して細胞外に遊離する好気性酢酸菌グルコノバクター(*Gluconobacter*)属が候補として得られた⁹⁾。そのペリプラズム画分に局在するソルビトール脱水素酵素による変換反応で、細胞への取り込み量以上に生成したフルクトースが培地中に遊離したと考えられた。また本菌は、オーランチオキトリウム属の至適濃度である2%以上の海水塩存在下で生育が停止した。以上のことから、コンブから水抽出されるマンニトールを主たる炭素源として、グルコノバクター属菌によるフルクトースへの変換反応の後、海水塩の添加による制菌とオーランチオキトリウム属株の接種により、フルクトースから有用脂質を生産する二段階発酵システムが成立した(図2)。海藻バイオマスとオーランチオキトリウム属をつなぐ発酵生産系はこれが最初の例である。食品や化粧品素材として需要が高いアスタキサンチンについて、褐藻原料からの生産効率と市場価格を参照して、メタン発酵系の物質収支と合算したところ、エネルギーと経済性の収支を両方同時にプラスにしようる原料分配比が明らかとなり、その実用性を示すことができた。

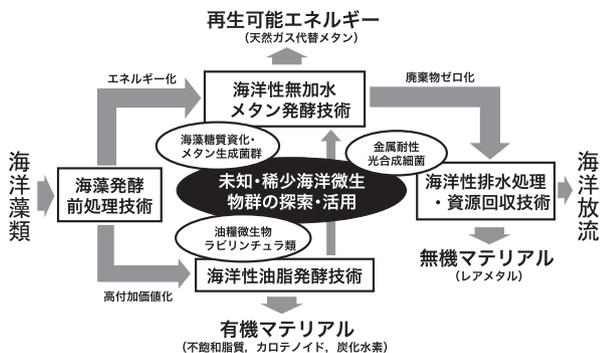


図1. 海洋微生物発酵制御を基盤とした大型藻類の完全資源化基盤技術の開発¹⁵⁾

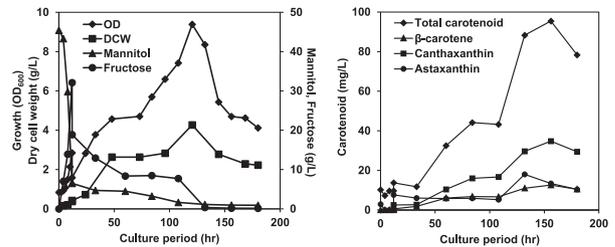


図2. 二段階培養による海藻糖質からのカロテノイド生産¹⁵⁾。グルコノバクター属NBRC14819株を10 g/Lポリペプトン、5 g/L酵母エキス、pH 6.0を含むコンブ抽出液3 L (100 g/L乾燥昆布からの水抽出、遠心上清)で28 °C、12時間培養した後、2%人工海水3 Lを加え、オーランチオキトリウム属KH105株を接種して培養を継続した。

アルギン酸の利用とその応用展開 マンニトールの

場合と同様の戦略で、アルギン酸資化性の海藻付着微生物や系統保存株とオーランチオキトリウム属を組み合わせた共培養の系を検討したが、いずれも増殖速度や脂質生産性が不十分であった。一方、本事業の共同研究者らにより、アルギン酸原料でのメタン発酵でその分解過程に関わるジスゴノモナス (*Dysgonomonas*) 属株が海洋底泥の菌叢から単離された¹⁰⁾。その培養上清を含む培地でオーランチオキトリウム属株が増殖し、アルギン酸を原料とした脂質生産が可能であることが実証された。ジスゴノモナス属は海洋における一次分解者との報告もあり、この組合せで生態系の一部が再現できている可能性もあるが、両微生物間で授受される物質は不明であった。そこで、ジスゴノモナス属株の主な生成物である各種有機酸に対するオーランチオキトリウム属株の資化性を調べたところ、特定の株において酢酸やクエン酸が一定の濃度およびpHの範囲内で有効な炭素源となりうることが分かった(図3)。

コンブなどの褐藻ではマンニトールとアルギン酸で固形分の60%以上を占めるため、海洋でもっとも貯存量が高い糖質の新規利用法を開発したともいえる。しかし、対糖収率などの生産効率には未だ改善の余地がある。そこで、糖質代謝や脂質生合成の各経路を至適化する個別戦略とオミクス技術の適用による俯瞰的攻略の両面から検討しているところである。このようにして海藻糖質の利用技術開発で得られた知見と経験は、次項で述べるカーボンリサイクル技術への展開に活かされた。

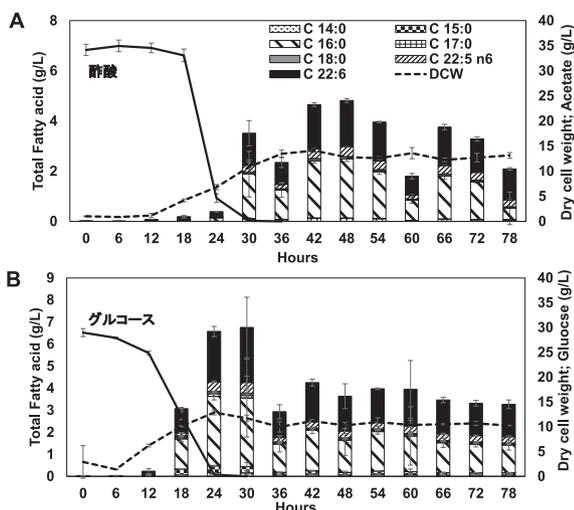


図3. 酢酸を炭素源としたオーランチオキトリウム属による油脂生産¹⁵⁾。オーランチオキトリウム属SR21株を30 g/L酢酸(A)またはグルコース(B)、6 g/Lポリペプトン、2 g/L酵母エキス、20 g/L人工海水塩(pH 6.5)を含む培地で28℃、150 rpmにて培養した。

火力発電排出ガスからの油脂生産

石炭火力発電の高効率化に向けて、燃料電池と融合したIGFCなどの新技術が実証レベルで検討中だが、分離・回収されたCO₂の再利用については各種技術の比較検討が始まったところである。微細藻類による有用物質生産は有望な技術の一つであり、炭素固定に必要なエネルギー源となる太陽光が十分に利用できる環境では有力な候補となる。現状ではエネルギー変換効率を格段に向上させて増殖速度を上げる必要があるが、細胞密度と照射効率の両立が難題である。

筆者らは、従属栄養微生物であるオーランチオキトリウム属の有機酸に対する優れた資化性を活用すべく、CO₂を還元固定化して酢酸を遊離生成するホモ酢酸菌と組み合わせた二段階発酵システムを検討している^{11,12)}。ホモ酢酸菌は、メタン発酵系において基質生体高分子の分解過程でCO₂から酢酸を合成してメタン菌に供給する役割を果たす。CO₂からWood-Ljungdahl経路を経て生成するアセチルCoAは細胞構築に利用されるとともに、一部は分解されてATPとして生体エネルギーを得る。このとき、酢酸を細胞外に排出することからアセトゲンとも呼ばれている。アセトバクテリウム (*Acetobacterium*) 属、モレラ (*Moorella*) 属やクロストリジウム (*Clostridium*) 属などが分類される嫌気性微生物の一群である。

CO₂を主たる炭素源として嫌気条件下でアセトバクテリウム属株を培養し、得られた酢酸含有培養液をそのまま第二段発酵の培地としてオーランチオキトリウム属株を接種したところ、顕著な細胞増殖と脂肪酸生産が認められた(図4)。培養前のアセトバクテリウム用培地に酢酸標品を同等濃度となるように添加した合成培地でオー

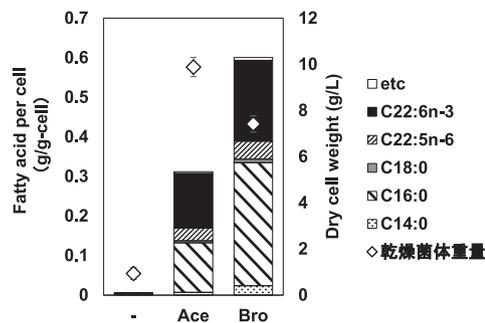


図4. 二段階培養によるCO₂からの脂肪酸生産¹⁵⁾。ホモ酢酸菌 *Acetobacterium woodii* DSM1030の培養用培地(-)、同培地に30 g/L酢酸を添加した培地(Ace)および、同培地でのCO₂存在下での培養後の回収液(Bro、29.3 g/L酢酸を含む)にそれぞれ *Aurantiochytium limacinum* SR21株を接種して、28℃、250 rpmにて48時間培養した。

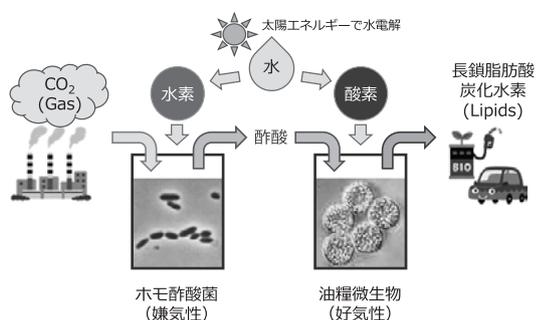


図5. カーボンリサイクルを実現する Gas-to-Lipids バイオプロセス¹⁵⁾

ランチオキトリウム属株を培養した場合と比較すると、一段目で消費された窒素源の減少分だけ細胞増殖量は低かったが、細胞あたりの脂肪酸含有率は約2倍となった。この結果は、オーランチオキトリウム属株の増殖と脂質生産を阻害する物質をアセトバクテリウム属株が生産しないことを示している。

現在、各段階の培養特性を詳細に解析しつつ、連続あるいは半連続培養系を連結した高効率 Gas-to-Lipids バイオプロセスを構築しているところである（図5）。この技術の主な課題は、ホモ酢酸菌によるCO₂の還元固定化に要する水素の供給コストである。この点は、微生物触媒の代わりに合成触媒によってCO₂と水素からオレフィンを生成する人工光合成と同様で、再生可能エネルギーによる水素の安定供給が待たれる。

ゲノム育種による生産脂質の改変

発酵原料の多様化とともに、生産物の多様化や多量化にも取り組んでいる。オーランチオキトリウム属が生産する高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの高付加価値脂質のさらなる生産性改善に向けて、関連遺伝子への変異導入や人為的改変による特定成分の増産や組成改質が多数報告されている。

筆者らは、食品用途にも応用可能な突然変異誘発法により、アスタキサンチンやカンタキサンチンを主成分とする抗酸化性カロテノイドの高生産株を育種した¹³⁾。オーランチオキトリウム属株の遊走子を変異誘発剤ニトロソグアニジンで処理し、寒天培地上でカロテノイドに由来する赤橙色をより強く呈するコロニーを単離した。一例としては、0.3 mg/L程度のβ-カロテンのみを生産する野生株を変異誘発処理して、総カロテノイド生産量がそれぞれ22 mg/Lおよび43 mg/Lの変異株RH-7AとRH-7A-7を得た。β-カロテンからアスタキサンチンに至る生合成経路上の5種類のカロテノイドがいずれも顕著に増産していたことから、遺伝子変異はβ-カロテンの合成に関わ

る酵素CrtI_{BY}の活性あるいは発現調節部位やその基質供給に関与する遺伝子に導入されたと考えられた。さらに変異株のメタボローム解析において酸化ストレス応答関連因子の変動が見られたため、鉄イオンを添加して酸化ストレスを誘導したところ、抗酸化活性が特に高いアスタキサンチンの含有率が顕著に増加した。

遺伝子変異をピンポイントで導入するならば、部位特異的に作用する人工ヌクレアーゼを利用するゲノム編集技術がより適している。なかでもCRISPR-Cas9システムが簡便であり、Cas9ヌクレアーゼとそれを標的部位に誘導するguide RNAとの複合体を細胞に移入すれば、得られた変異体に外因性遺伝子が残存しない限り、薬剤変異と同様に遺伝子組換え食品ではないと見なされる。筆者らは、育種標的のゲノムワイドなスクリーニングを目的として、オーランチオキトリウム属へのCRISPR-Cas9システムの適用を試みた。β-カロテン合成酵素CrtI_{BY}を標的として、その失活によってカロテノイドが合成されず、コロニーの赤橙色が白色になることを変異導入の指標とした¹⁴⁾。単離した候補株のDNA塩基配列を解析したところ、標的部位においてCRISPR-Cas9による改変の形跡が認められた。さらに、任意の遺伝子を標的とした迅速な機能解析手法が確立できたので、脂質分解酵素系の失活による有用脂質の増産など、ゲノム育種による実用株の樹立に向けて研究を続けている。

おわりに

複数の微生物を組み合わせた物質変換システムにより、未利用資源としては海洋大型藻類を、また、産業廃棄物としては火力発電排出CO₂をそれぞれカロテノイドや脂肪酸に作り変える技術について進捗を紹介した。二段階発酵は清酒醸造にも使われる古典的な技術だが、異なる代謝特性を示す微生物の組合せによって原料と生産物の選択肢を柔軟に増やせる点が魅力である。本稿で述べた例だけでなく、たとえば、グルコノバクター属菌には基質特異性が異なる多様な酸化還元酵素が細胞膜に局在しているため、マンニトールの他にも多彩な原料が利用可能である。また、ホモ酢酸菌の属種によっては草本類リグノセルロースが資化可能であるなど、きわめて多様なバイオマスを原料化できる。したがって、酢酸を介したオーランチオキトリウム属との複合発酵系では、高付加価値品だけでなく、将来的には化学品素材や燃料を生産するバイオリファイナリー技術として、さらに多角的に展開していくことが期待される

謝 辞

本研究を行うにあたり、広島大学大学院統合生命科学研究科・中島田豊教授、岡村好子教授、田島誉久助教、山本卓教授、同先進理工系科学研究科・松村幸彦教授、長瀬産業株式会社・松山恵介氏、出光興産株式会社・黛新造氏、福永哲也氏、伊藤真治氏、中国電力株式会社・沢田健氏、角田祐介氏ならびに各研究グループ諸氏の多大なる支援を得ており、各位に深く感謝致します。

文 献

- 1) 経済産業省資源エネルギー庁. 平成30年度エネルギーに関する年次報告 (2019).
- 2) Aki, T. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 789 (2003).

- 3) Li, Q. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4267 (2009).
- 4) Huang, J. *et al.*: *Mar. Biotechnol.*, **5**, 450 (2003).
- 5) Huang, J. *et al.*: *J. Oleo Sci.*, **51**, 447 (2002).
- 6) Iwasaka, H. *et al.*: *J. Oleo Sci.*, **62**, 729 (2013).
- 7) Yamasaki, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 200 (2007).
- 8) 小埜和久ら：特許第4796787号 (2006).
- 9) Arafiles, K. H. W. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 9207 (2014).
- 10) Kita, A. *et al.*: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **65**, 3570 (2015).
- 11) 秋 庸裕ら：特願2017-250129 (2017).
- 12) Perez, C. M. T. *et al.*: *J. Oleo Sci.*, **68**, 541 (2019).
- 13) Watanabe, K. *et al.*: *J. Oleo Sci.*, **67**, 571 (2018).
- 14) 北堀智希ら：第71回日本生物工学会大会トピックス集, p. 6 (2019).
- 15) 渡邊研志, 秋 庸裕: オレオサイエンス, 20, 119 (2020).