

**「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」研究  
領域 領域活動・評価報告書  
－平成27年度終了研究課題－**

研究総括 松永 是

1. 研究領域の概要

本研究領域は、藻類・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創出を目的とします。藻類・水圏微生物には、高い脂質・糖類蓄積能力や多様な炭化水素の産生能力、高い増殖能力を持つものがあることに着目し、これらのポテンシャルを活かした、バイオエネルギー創成のための革新的な基盤技術の創出を目指します。

具体的には、近年急速に発展したゲノミクス・プロテオミクス・メタボロミクス・細胞解析技術等を含む先端科学も活用し、藻類・水圏微生物の持つバイオエネルギーの生産等に有効な生理機能や代謝機構の解明を進めるとともに、それらを制御することによりエネルギー生産効率を向上させるための研究を対象とします。さらに、バイオエネルギー生産に付随する有用物質生産や水質浄化等に資する多様な技術の創出に関する研究も含みます。

将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を対象とします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「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」領域に設けた選考委員11名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)の他、将来のバイオエネルギー創成につながる革新的技術の実現に向けて、生物系、化学系、工学系などの幅広い分野から新たな発想で挑戦する研究を重視した。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー11名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数			
			7件	内訳	3年型	7件(0件)
対象数	56件	22件			7件	内訳

( )内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

- 1) 加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。
  - ・天尾研究者 (平成22年度採択)  
研究期間が5年で、今年度終了するため。
  - ・神田研究者 (平成22年度採択)  
ライフイベントによって研究を一時中断したため。



## 5. 研究実施期間

平成24年10月～平成28年3月(3年型)

平成23年4月～平成28年3月(5年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:7回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成28年 1月	評価会開催
平成28年 2月	研究総括による事後評価
平成28年 3月	被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1)研究課題等の研究目的の達成状況
- (2)研究実施体制及び研究費執行状況
- (3)研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4)世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)。

## 9. 評価結果

### 総論

本研究領域では、海産、淡水産の生物を用いてバイオエネルギー生産を行うための基盤技術の創出を目指す。バイオ燃料(例えばバイオディーゼル、軽油(アルカン、アルケン)、エタノール、メタン、水素等)の産生、もしくはこれらにつながる脂質、糖類等の産生に資する研究を対象とした。さらに、バイオ電池による電気エネルギーへの変換も含む。その実施体制としては、CREST とさがけの2つのタイプで行っている。本研究領域の目的を達成するためには、様々な分野の研究者の有機的な協働と共に、新進気鋭の研究者の独創的な発想を活かした挑戦的なテーマによる成果が期待される。特に、さがけ研究では、オリジナリティを大事にした研究成果を強く求めた。各自期間内に多くの成果を取りまとめ、領域研究の進展に寄与した。

特に、斉藤圭亮研究者の「藻類の光吸収制御のための理論的基盤の確立」において、論解析という手法で藻類の光エネルギー利用のしくみにせまることが出来た成果は大変画期的であり、科学技術への波及効果は大きい。また、神田英輝研究者の「乾燥・細胞壁破壊・有毒抽剤が不要な藻類からの燃料抽出技術の創出」では海外との連携がスタートした。その他、木村浩之研究者の「付加体エネルギー生産システム創成に向けた基盤技術開発」においても、地域と連携し、社会実装に向けた研究進展が期待される。

上記以外においても、優れた成果が得られているが、今後は国際共同研究や社会実装に向けた提案など、相互の研究成果を融合した新たな展開を図ると共に、特許出願戦略の策定や他の競争的研究資金の獲得に向けた提案などを精力的に進めて頂きたい。

### 1. 天尾 豊 研究者「藻類由来光合成器官の電極デバイス化とバイオ燃料変換系への展開」(5年型)

#### 評価結果

提案された研究課題を達成するためには、生物機能材料の均一性、電極材料特性の理解と改良、変換効率測定系の確立及びその複合的連続反応を正確に計測する技術開発など、多岐にわたる分野の専門的知識を吸収し、要素技術を確立することで自己のアイデアを証明することが必要となる。

まず、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナブラテンシスの培養と電極上に固定するために必要な酸素発生能を保持した光合成膜の分離・精製を行い、光電変換能、酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能を評価し、白金電極とで組んだ光電変換系の作動と光電流発生を確認した。次いで、二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオローゲンを基盤として新

規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化し、ビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加し二酸化炭素がギ酸に変換されること確認した。そこで、開発した光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極とを組み合わせた光電変換系を構築し、光照射による光電流の発生と二酸化炭素からのギ酸生成に成功した。以上のように、光合成組織をデバイス化した電極を構築し、太陽光エネルギーによる発電中に二酸化炭素を削減し、ギ酸が同時に生産可能な多機能太陽電池システムのプロトタイプを確立できた。3年間の中間評価後、研究者が独自に開発している二酸化炭素をメタノールに変換する機能を持つ脱水素酵素と電子伝達分子に関する研究を精力的にすすめ、藻類由来光合成膜との融合により世界初の水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらバイオ燃料物質を化学量論的に直接合成できる多機能性バイオ太陽電池システムの構築が達成できた点は評価できる。さらにさきがけ期間中に国際誌への積極的な投稿・掲載、国際会議での数多くの招待講演、受賞なども評価できる。加えて所属研究機関の人工光合成研究センターの所長に抜擢されたことは本さきがけでの大きな成果であると判断し、今後も本分野での飛躍が大きく期待される。

## 2. 神田 英輝 研究者「乾燥・細胞壁破壊・有毒抽剤が不要な藻類からの燃料抽出技術の創出」

### 評価結果

さきがけによる支援で独自の高圧抽出装置を作成し、様々な微細藻類や水圏微生物への液化 DME 抽出法の優位性を明らかにした。本さきがけ研究の成果が認められ、日本エネルギー学会進歩賞(学術部門)を受賞するなど、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

本研究は、微細藻類からのバイオ燃料生産におけるエネルギー収支の改善というダウンストリーム分野である。既に、複数の研究者や民間企業との国際共同研究に発展するとともに、科学技術振興機構 JST と国際協力機構 JICA の地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム SATREPS(低炭素社会)に研究代表者として採択されるなど、実用化に向けて研究はステップアップしている。さきがけ研究提案時は民間研究機関の所属で実用化を強く意識した研究提案だったこともあり、今後の研究成果の実用化を期待する。

## 3. 粟井 光一郎 研究者「ラン藻ポリケチド合成酵素を用いた脂質生産研究課題名」

### 評価結果

本さきがけ研究では、ラン藻での脂肪アルコールの合成、膜脂質の機能解析を行った。研究の当初は、20 kb 近くの遺伝子クラスターの導入に苦心するなど、思うような成果が出ていなかったが、最終的には脂肪アルコール生産株の作出に成功し、膜脂質の機能解析ではこれまでの常識を覆す成果を上げたことで、領域の進展に大きく貢献したと考えている。また、本人の得意分野である脂質解析で力を発揮することで、領域内での共同研究を積極的に進めたことも評価できる。今後は、本領域内での連携を進めることで、領域のさらなる進展に寄与すると期待している。

研究期間に発表した論文は、インパクトファクターの高い雑誌に掲載され、分野における重要性も高いことから評価できる。しかし、学会等での発表件数からすると論文数が少なく、質だけでなく量を増やす努力をすることが必要であろう。

研究者としては、本さきがけ研究が評価され所属機関でのプロモーション(特任助教から准教授)に繋がった。また、所属機関での付置研や博士課程大学院への兼任も任命されており、高く評価されていることがうかがえる。その評価は学内だけではなく学外でも高まっており、新学術領域への計画班として参画や CREST 申請での中心的役割を担うことに繋がった。さらに、さきがけ研究期間中に国内シンポジウムを 2 件開催し、国際シンポジウムも 1 件開催している。招待講演は国内 6 件、国際 2 件、また、ラン藻研究コミュニティでのプロジェクト責任者も担当するなど、研究者としての飛躍につながった。今後、この分野のトップランナーとして、研究をけん引し続けていくことを期待している。

## 4. 岩堀 健治 研究者「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」

### 評価結果

本課題研究は、藻類フェリチンの特徴を解明し、それを改良・強化することで様々な環境に存在する低濃度の有用金属を回収しようというものである。研究初期は非常に基礎的な研究であり、実験の進捗具合が少々心配されたが着実に基礎実験を積み重ね、ケイ藻由来フェリチンの数々の特徴を発見し、バイオミネラリゼーション機構の解明したことは非常に評価できる。研究費も適切に使用しており、研究を迅速に進めるため新しい装置や新しい技術の導入を率先して行っている。また、領域内で多くの研究者と共同研究をすすめ、まだ成果は途中のものが多いが、新規フェリチンの探索や性質検討、応用展開などを積極的に進めている点も今後の発展に期待できる。

本課題研究者はほとんど研究されていない藻類細胞由来の新規フェリチンの単離と特殊機能解明を進め、

藻類細胞におけるフェリチンの役割の探索、さらに多様性についても研究を広めていこうとしており、基礎科学的にも非常に興味深い研究に発展する多くの要素を持っている。

本研究で得られた基礎的知見やそれぞれの金属に対応したケイ藻由来改良フェリチンを利用することで、本研究の最終目的である「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」は実現間近であると考えられる。さらに本プロセスを改良することで発展途上国における重金属汚染浄化や温泉や都市鉱山からもナノマテリアルを作製することが可能となるはずである。今後、さらに多くの藻類由来の特殊なタンパク質の機能開発と有効利用を進めることで、有用金属資源における藻類細胞の利用と有用金属の省資源、有効活用が達成できる社会の実現に期待したい。

#### 5. 遠藤 博寿 研究者「高脂質含有円石藻 *Pleurochrysis carterae* の形質転換技術の確立と有用脂質高生産に向けた応用」

##### 評価結果

本研究は、円石藻における形質転換技術の確立を軸に有用脂質を生産する品種を確立する目的で開始された。研究を開始した当初は、円石藻を含むハプト植物門全体において、同技術が適用できる種は皆無であった。その点では本研究で *Pleurochrysis carterae* 種において技術開発に成功した成果は、科学技術の発展への貢献という意味で非常に大きく評価できる。また、後半は GREST のグループとの共同研究で全ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析といったより大規模な研究を展開し、成果を出しつつあるため、研究実施体制の管理や研究費の執行についても堅実に行っていると評価できる。

一方で、開発した技術の応用利用に関しては今後の課題であり、本研究で開発された技術が多くの研究者に利用されることを期待したい。また、本研究で研究対象とした *P. carterae* 種は円石藻の中でも屋外での長期大量培養の実績がある貴重な種である。そのため、同種の代謝改変による有用脂質形成種が確立されれば、海洋性微細藻を用いたエネルギー生産の実用化への大きな手掛かりとなることが予想され、社会・経済への波及効果も大いに期待できる。

#### 6. 柏山 祐一郎 研究者「クロロフィルの光毒性を利用した植食性原生動物の繁殖抑制農薬の開発」

##### 評価結果

本研究は、微細藻類培養の実際の現場における大きな問題である原生動物の食害について、生化学的な視点から捉えることで問題解決を目指すという非常にユニークなものである。

残念ながら期間内に代謝酵素の特定にまでは至らなかったものの、この研究の進捗状況は期間の終盤に向けて加速しており、比較的近い将来に酵素を特定し、代謝メカニズムを解明することで、将来的には有効な技術の創成に繋がるものと期待している。

また、本さがけ研究での取り組みが評価され、複数回の国際学会の招待講演や招待論文の投稿の機会などもあり、ポスドクから教授(H28年4月)へと昇任した。今後も、藻類やプロティスト研究の若手のトップランナーの一人として大いに期待している。

#### 7. 木村 浩之 研究者「付加体エネルギー生産システム創成に向けた基盤技術開発」

##### 評価結果

バイオエネルギー生産に付加体という厚い堆積層とその深部帯水層に生息する微生物群集を利用するという、ユニークで面白い研究課題であった。さがけ期間中に当初の研究計画を進めるとともに、実際のエネルギー生産の地産地消モデルの立ち上げにも尽力した。応用面でも研究を進め、社会的なインパクトは非常に高いといえる。実用化にほぼ目処がついたことは非常に評価できる。本研究プロジェクトは社会実装にまで発展する研究成果を上げており、将来的に全国的な波及も大いに期待できる。

今後、更に付加体の地下圏微生物の生物学的解析を進めれば、この一連の研究開発の深みも増し、インパクトも大きくなると期待できる。また、微生物群集のメタン生成への寄与をより具体的に解明することによって、産業応用に貢献してもらいたい。

本さがけ研究者は、さがけ期間内の研究成果が認められ、所属機関において講師から准教授へ昇任した。また、国内学会および国際学会での招待講演や新聞報道も増えるなど、本研究分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。今後の展開が大いに期待される。

#### 8. 斉藤 圭亮 研究者「藻類の光吸収制御のための理論的基盤の確立」

##### 評価結果

当初設定した研究のねらいに則して、色素の吸収帯がどうして決まっ

一はどのように伝達されているのかを明らかにするという研究目的をほぼ達成した。さらに、その先の光エネルギーを利用した水分解過程の解明にまで研究の段階を進めている。理論解析という手法で藻類の光エネルギー利用のしくみにせまることが出来た本研究の成果は大変画期的であり、科学技術への波及効果は大きい。また、研究成果をハイインパクトな学術雑誌で論文発表している点も高く評価できる。

本研究で培われた理論解析手法は応用範囲が広いので、この分野だけにとどまらず生体を対象とした分子科学に関するさまざまな分野において役立てることができ、今後、本研究成果がどのような方向に展開されるのか大いに楽しみである。

研究者として、採用時はJSTの専任研究者としての参画であったが、現在、東京大学先端科学技術研究センター講師へと昇任し、研究者としての大きな飛躍につながった。今後は、本研究分野の若手のトップランナーとしてさらなる活躍を期待している。

## 9. 塚谷 祐介 研究者「巨大光捕集器官クロロソームを利活用した生理活性物質・脂質の大量蓄積系の構築」

### 評価結果

多くの系統群の光合成細菌で見られるクロロソームについて、これまであまり研究が進んでこなかった特殊な光捕集蛋白質複合体を研究材料として、構成分子のキャラクタリゼーションなどの基礎研究を中心としながら、色素生合成系の改変等による応用を目指した研究を行った。クロロソーム蛋白質と糖脂質との相互作用や色素生合成経路について、全体像を明らかにするなどの成果を挙げた。また、特許申請など社会実装を見据えた取り組みも評価できる。今後は、これまで培った光合成細菌の研究経験を活かして植物等へ新たな研究の幅を広げるとともに、独自の技術基盤に立ったオリジナリティーある研究を展開することを期待する。

## 7. 評価者

研究総括 松永 是 東京農工大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成28年3月末現在)

石倉 正治 昭和電工株式会社 事業開発センター グリーンプロジェクト 開発グループ リーダー

井上 勲 筑波大学 名誉教授

大倉 一郎 東京工業大学 名誉教授

大竹 久夫 早稲田大学 客員教授/大阪大学 名誉教授

大森 正之 東京大学 名誉教授

嵯峨 直恒 弘前大学食料科学研究所 所長・教授

竹山 春子 早稲田大学理工学術院 教授

田畑 哲之 (公財)かずさDNA研究所 所長

民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 教授

横田 明穂 奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授/同 研究推進機構 特任教授

横山 伸也 公立鳥取環境大学環境学部 教授

### (参考)

件数はいずれも、平成28年3月末現在。

#### (1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	9	43	52
口頭	188	85	273
その他	18	3	21
合計	215	131	346

(2)特許出願件数

国内	国際	計
3	2	5

(3)受賞等

- ・齊藤 圭亮  
日本物理学会 若手奨励賞(H26.3)
- ・天尾 豊  
Outstanding achievement and contribution to ISAMR2015 Invited Presentation (H27.3)
- ・神田 英輝  
日本エネルギー学会 進歩賞(学術部門) (H27.2)

(4)招待講演

国際 24件  
国内 43件

## 別紙

「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」領域 事後評価実施  
研究課題名および研究者氏名

## (3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
神田 英輝 (兼任)	乾燥・細胞壁破壊・有毒抽出剤が不要な 藻類からの燃料抽出技術の創出 (名古屋大学)	名古屋大学大学院工学研究科 助教 (電力中央研究所 主任研究員)	40
栗井 光一郎 (兼任)	ラン藻ポリケチド合成酵素を用いた脂 質生産 (静岡大学)	静岡大学学術院理学領域生物科学 専攻 准教授 (静岡大学 特任助教)	43
岩堀 健治 (専任)	藻類由来フェリチンの機能強化による ナノマテリアル生産システムの創成 (奈良先端科学技術大学院大学)	JST さきがけ研究者 (奈良先端科学技術大学院大学 物 質創成科学研究科 研究員)	40
遠藤 博寿 (専任)	高脂質含有円石藻 <i>Pleurochrysis</i> <i>carterae</i> の形質転換技術の確立と有 用脂質高生産に向けた応用 (東京大学)	JST さきがけ研究者 (東京大学 大学院農学生命科学研 究科 特任助教)	40
柏山 祐一郎 (兼任)	クロロフィルの光毒性を利用した植食 性原生動物の繁殖抑制農薬の開発 (福井工業大学)	福井工業大学環境情報学部環境・ 食品科学科 准教授 (立命館大学 立命館グローバル・ イノベーション研究機構 ポスドク)	44
木村 浩之 (兼任)	付加体エネルギー生産システム創成 に向けた基盤技術開発 (静岡大学)	静岡大学学術院理学領域地球科学 専攻 准教授 (静岡大学 理学部 講師)	40
斉藤 圭亮 (兼任)	藻類の光吸収制御のための理論的基 盤の確立 (東京大学)	東京大学先端科学技術研究センタ ー 講師 (京都大学 生命科学系キャリアパ ス形成ユニット 特定研究員)	40
塚谷 祐介 (兼任)	巨大光捕集器官クロロソームを利活用 した生理活性物質・脂質の大量蓄積系 の構築 (東京工業大学)	東京工業大学 地球生命研究所 WPI 研究員 (立命館大学 総合科学技術研究 機構 研究員)	40

## (5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
天尾 豊 (兼任)	藻類由来光合成器官の電極デバイス 化とバイオ燃料変換系への展開 (大阪市立大学)	大阪市立大学複合先端研究機構 教授/人工光合成研究センター所 長 (大分大学工学部 准教授)	75

# 研究報告書

## 「藻類由来光合成器官の電極デバイス化とバイオ燃料変換系への展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 天尾 豊

### 1. 研究のねらい

地球環境保全のためには環境低負荷型エネルギー循環システムの構築や有害物質を有効利用するエネルギー変換システムの開発が必須であり、特に二酸化炭素の削減技術を取り入れた低炭素社会の構築が急務である。低炭素社会を築き上げていくために必要なエネルギー源として、水、木材廃棄物等に含まれるセルロースやデンプンなどの多糖類バイオマス、太陽光エネルギー、メタノールなどの低炭素燃料の利用があげられる。特に様々な機能を付与した太陽光発電システムは今後ますます重要なアイテムになっていく。また、2009年国連地球変動サミットで「日本は2020年までに1990年比で25%の温室効果ガスを削減する」と明言し、二酸化炭素も大幅に削減する技術も同時に必要となっている。本提案では、多機能性バイオ太陽電池の基盤技術確立を目指し、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナの水中での効率的な酸素発生型光合成機能に着目し、スピルリナ由来の光合成膜を固定した電極を用い、水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらメタノールを同時に生産できる光電変換系を構築する。本提案で構築されるシステムは、スピルリナの酸素発生型光合成機能による太陽光エネルギーの利用、水を原料とし、二酸化炭素を削減しながら発電し、さらに同時に低炭素燃料であるメタノールの生産を可能とする、藻類の機能をデバイス化した全く斬新かつ革新的なバイオエネルギー創成多機能型太陽電池の構築を狙ったものである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では以下の4つの研究項目に分類して最終目標達成のために要素技術を十分に検討した。

- ① 濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と光合成膜の分離精製
- ② 光合成膜固定酸化チタン電極の調製と光電変換能の評価
- ③ 電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価
- ④ 光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価

スピルリナプラテンシスの定常的な培養法を確立し、さらに電極上に固定するために必要な酸素発生能を保持した光合成膜の分離・精製に成功した。スピルリナから分離した光合成膜を酸化チタン薄膜電極上に固定化及び光電変換能、酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能について評価した。酸化電位印加状態において酸化チタン薄膜電極上の光合成膜に光照射するところで酸素が発生し、さらに白金電極とで形成される光電変換系が作動することを明らかにし、電極  $1\text{cm}^2$  あたり  $20\mu\text{A}$  程度の光電流が得られた。電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に関して、特に重要な二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオ

ローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化を達成した。二酸化炭素飽和下においてビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がギ酸に変換されることを見出した。さらに光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極とを組み合わせた光電変換系を構築したところ、光照射によって光電流(電極 1cm<sup>2</sup>あたり 55 μA 程度)が観測された。さらに光照射による発電と同時に光合成膜固定電極側から酸素が、ギ酸脱水素酵素固定電極側では二酸化炭素が還元されギ酸が化学量論的に生成することを見出した。最後に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製に着手し、ビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がメタノールに変換されることも明らかにした。

## (2) 詳細

4つの研究項目について得られた成果の詳細を以下に示す。

### ① 濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と光合成膜の分離精製

スピルリナプラテンシスの培養は以下の方法を用いた。スピルリナプラテンシス(NIES-39株)は国立環境研究所微生物系統保存施設より購入した。スピルリナプラテンシスはSOT培地を用い、光強度3000ルクスで12時間光照射・未照射繰り返し、振盪培養した。スピルリナプラテンシス由来の光合成膜は以下の方法で分離した(図1)。

スピルリナプラテンシス1gを4°Cで3分間3000gで遠心分離した。続いて0.5mlの新しく調製した培地に懸濁し-20°Cで凍結した後、氷浴上で解凍し、pH6.8に調整した溶液(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2% アスコルビン酸ナトリウム、0.2% PVP、1mM アミノヘキサン酸、1mMアミノベンザミジン)に加えた。5分間28kHzで超音波破碎した後4°Cで3分間3000gで遠心、上澄み液を採取

#### \* 光合成膜の分離・精製

スピルリナ 1g

4°C 3000g  
3分遠心分離

沈殿物

- ① 凍結
- ② 氷浴上で解凍
- ③ 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2%アスコルビン酸ナトリウム, 0.2% PVP, 1mM アミノヘキサン酸, 1mM アミノベンザミジンを含む緩衝溶液pH=6.8に懸濁
- ④ 氷浴中で28kHz 5分間で超音波破碎
- ⑤ 4°C 3000g 3分遠心分離
- ⑥ 上澄み液を4°C 75000g 30分超遠心分離

J.Q. Zhao et. Al., *Photosynthetica* 42 (3) 365-370, 2004を参考

チラコイド膜

した。最後に上澄み液を4°Cで 図 1. スピルリナプラテンシス由来光合成膜の分離法  
30分間75000gで超遠心分離

し、沈殿物として光合成膜(チラコイド膜)を得た。またジクロロインドフェノール(DCPIP)存在下で光合成膜の懸濁液に可視光照射すると酸素が発生することを確認した。

### ② 光合成膜固定酸化チタン電極の調製と光電変換能の評価

酸化チタン粉末(PM2.5)3g に対して硝酸 4ml, メタノール 13ml, 及び少量の水を加え、ホットスターラーを用いて80°Cで8時間加熱した。加熱処理後、乾燥させ粉末状にした。得られた粉末状酸化チタンを水に再分散させ、少量のポリエチレングリコール(分子量約 20,000)を加え、ホットスターラーで30分間攪拌し、次いで超音波洗浄機で30分間分散させ酸化チタンペーストを調製した。導電性ガラス基板の導電面上に調製した酸化チタンペーストを適量滴下し、

ガラス面に薄く押し広げ薄膜を作製した。ホットスターラーで2時間乾燥させた後、電気炉で50°C30分間加熱し、その後500°Cで30分間加熱焼成することによって酸化チタン薄膜電極を調製した。上記①で得られた光合成膜をリン酸塩緩衝液(pH=7.0)に懸濁し、冷蔵庫内(4°C)で酸化チタン薄膜電極を浸漬し、電極表面に光合成膜を固定した。

光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極、リン酸塩緩衝液(pH=7.0)をベースとした電解質溶液を用い、図2に示すような光電変換系を構築した。電極面積は1cm<sup>2</sup>、光源には100mWcm<sup>-2</sup>のソーラーシミュレータを用いた。

最初に酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能について評価した結果、酸化電位印加状態において酸化チタン薄膜電極上の光合成膜に光照射するところで酸素が発生することがわかった。

次に光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極として用いた光電変換系について、光照射・未照射を繰り返した光電流応答を調べた結果を図3に示す。光照射・未照射に対応して光電流が応答していることがわかった。光照射時の光電流は電極1cm<sup>2</sup>あたり20μAであった。電解質溶液中には酸化力あるいは還元力を持つ物質を添加していないことから図2に示すような水を電子媒体とした光電変換サイクルが達成できたと考えられる。

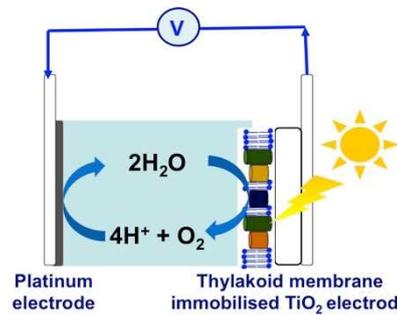


図3 光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極とした光電変換系

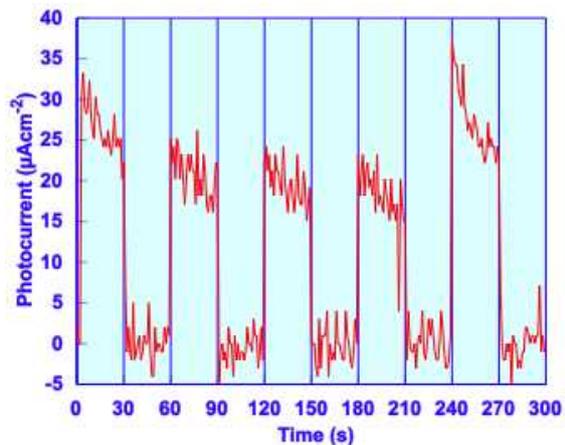
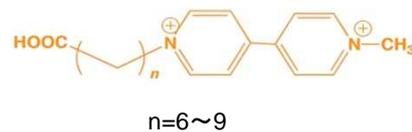


図2 光合成膜固定電極を正極、白金電極を負極とした光電変換系の光電流応答の経時変化

### ③ 電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価

電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に関して、特に重要な二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化した。具体的には右図に示すような末端にカルボキシル基を有するビオローゲン誘導体を合成し、ギ酸脱水素酵素とともに導電性ガラス電極基板上に固定した。



最初にビオローゲン誘導体のみを固定した電極の電気化学的特性を評価した。作用極にビオローゲン固定電極、対極に白金ワイヤー電極、参照極に銀塩化銀電極を用いた。第一還元電位はビオローゲン部位とメチレン鎖長とに依存せずすべての分子において-550mVであった。

次にギ酸脱水素酵素とピオローゲン誘導体を固定した電極(FDH-ピオローゲン固定電極)の電気化学的特性を評価した。作用極に FDH-ピオローゲン固定電極, 対極に白金ワイヤー電極, 参照極に銀塩化銀電極を用いた。二酸化炭素を飽和したピロリン酸ナトリウム緩衝液中で両極間にピオローゲンの第一還元電位に相当する $-550\text{mV}$  を引加し, 生成したギ酸をイオンクロマトグラフで定量した。いずれのピオローゲン誘導体を用いた場合も電圧印加時間とともにギ酸生成量が増加した。またギ酸生成量はピオローゲン誘導体のピオローゲン部位とカルボキシル基との間のメチレン鎖長に依存しており, 長くなるほどギ酸生成量が増加した。電極表面上に固定されているピオローゲン誘導体及びギ酸脱水素酵素の量を一定にしていることから電極表面とギ酸脱水素酵素との距離がギ酸生成量に影響を与えていると考えられる。

④ 光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価

最後に光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極, ピロリン酸ナトリウム緩衝液をベースとした電解質溶液を用い, 図 4 に示すような光電変換系を構築

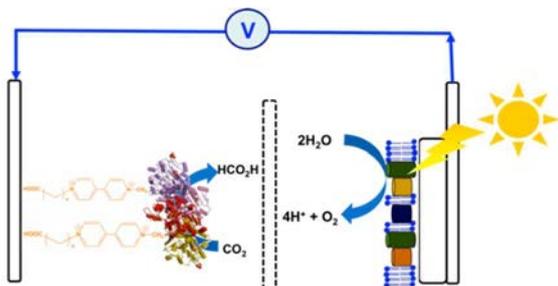


図 4 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系

した。電極面積は $1\text{cm}^2$ , 光源には $100\text{mWcm}^{-2}$ のソーラーシミュレータを用いた。光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極として用いた光電変換系について, 光照射・未照射を繰り返した光電流応答を調べた結果を図 5 に示す。光照射・未照射に対応して光電流が応答していることがわかった。光照射時の光電流は電極 $1\text{cm}^2$ あたり $55\mu\text{A}$ であった。電解質溶液中には酸化力あるいは還元力を持つ物質を添加していないことから図 4 に示すような水を電子媒体とした光電変換サイクルが達成できたと考えられる。

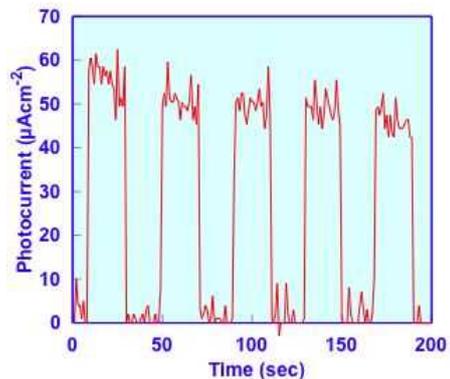


図 5 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系の光電流応答の経時変化

次に光照射による発電中の FDH-ピオローゲン固定電極側の生成物分析について検討した。光照射時間に対するギ酸生成量の経時変化を図 6 に示す。定常的に光照射すると光電流値は $55\mu\text{A}$  で一定であったが, 同時にギ酸脱水素酵素固定電極側では二酸化炭素が還元されギ酸(3時間の発電で $15\text{nmol}$ )が, 光合成膜固定電極側では $12\text{nmol}$ の酸素が発生し, ギ酸と酸素が化学量論比で生成することがわかった。

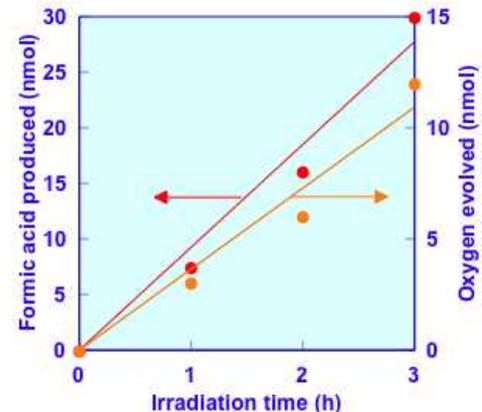


図 6 光合成膜固定電極を正極, FDH-ピオローゲン固定電極を負極とした光電変換系における酸素及びギ酸生成の経時変化

さらに, メチルピオローゲン-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製に着手

し、カーボンペーストにメチルビオローゲン-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素を混合固定し電極を作製した。この電極についてメチルビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加したところ二酸化炭素がメタノールに変換されることもわかった。

### 3. 今後の展開

5年計画の研究開始3年度までは、システムの重要要素であるスピルリナの培養の効率化、スピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極の調製と機能評価、光電変換効率向上に関する研究を進めた。同時に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に主眼を置いた研究を進めた。当初計画では要素技術の確立を3年間の目標としていたが、上述の研究成果で述べたように光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価について光照射によって発電しながら二酸化炭素が有機分子に変換可能なシステムのプロトタイプ構築に成功した。また中間評価後2年間でメタノール生成機能を持つ電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極構築を達成できた。加えてスピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極についてもさらなる安定化・効率化を目指し、電極基板上への配向性を持たせた光合成膜固定化方法を検討、さらには可視光照射下における酸素発生活性向上を達成できた。特に水と二酸化炭素を作動媒体としたギ酸やメタノール生成機能を持つ光電変換系の構築に成功し、ほぼ化学量論的な反応が進行することを明らかにした。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本研究は、多機能性バイオ太陽電池の基盤技術確立を目指し、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナの水中での効率的な酸素発生型光合成機能に着目し、スピルリナ由来の光合成膜を固定した電極を用い、水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらメタノールを同時に生産できる光電変換系を構築することを狙ったものである。当初の計画では、研究開始3年度までは、システムの重要要素であるスピルリナの培養の効率化、スピルリナ由来の光合成膜固定酸化チタン薄膜電極の調製と機能評価、光電変換効率向上に関する研究を進める。同時に電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の調製と機能評価に主眼を置いた研究を進め、後半2年を目途に水と二酸化炭素を作動媒体としたメタノール生成機能を持つ光電変換系の構築に関する研究に着手し、最終年度には最終型のデバイス構築する予定とした。

上述の研究成果のとおりスピルリナ由来の光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極による光電変換機能評価について光照射によって発電しながら二酸化炭素が有機分子に変換可能なシステムのプロトタイプ構築に成功し、加えて化学量論的に反応が進むことを明らかにしたことは大きな成果と言える。これらの成果は最終目標である水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながら二酸化炭素を還元できる光電変換系ができることを証明できたと評価できる。一方で、当初成果が不十分であった二酸化炭素をメタノールに変換する機能を持つ電子伝達分子-ギ酸・アルデヒド・アルコール脱水素酵素固定電極の構築も達成

でき、既に組み上がっているプロトタイプへの適用も達成できた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

提案された研究課題を達成するためには、生物機能材料の均一性、電極材料特性の理解と改良、変換効率測定系の確立及びその複合的連続反応を正確に計測する技術開発など、多岐にわたる分野の専門的知識を吸収し、要素技術を確立することで自己のアイデアを証明することが必要となる。

まず、濃緑色単細胞微細藻類であるスピルリナプラテンシスの培養と電極上に固定するために必要な酸素発生能を保持した光合成膜の分離・精製を行い、光電変換能、酸化電位印加状態における可視光照射による酸素発生機能を評価し、白金電極とで組んだ光電変換系の作動と光電流発生を確認した。次いで、二酸化炭素分子変換の最初の段階であるギ酸脱水素酵素が関与する反応について、ビオローゲンを基盤として新規に合成した人工補酵素の合成を進め、ギ酸脱水素酵素とともに電極基板上への固定化し、ビオローゲンの還元電位に相当する電圧を印加し二酸化炭素がギ酸に変換されること確認した。そこで、開発した光合成膜固定電極とギ酸脱水素酵素固定電極とを組み合わせた光電変換系を構築し、光照射による光電流の発生と二酸化炭素からのギ酸生成に成功した。以上のように、光合成組織をデバイス化した電極を構築し、太陽光エネルギーによる発電中に二酸化炭素を削減し、ギ酸が同時に生産可能な多機能太陽電池システムのプロトタイプを確立できた。3年間の中間評価後、研究者が独自に開発している二酸化炭素をメタノールに変換する機能を持つ脱水素酵素と電子伝達分子に関する研究を精力的にすすめ、藻類由来光合成膜との融合により世界初の水と二酸化炭素を原料とし、太陽光エネルギーで発電しながらバイオ燃料物質を化学量論的に直接合成できる多機能性バイオ太陽電池システムの構築が達成できた点は評価できる。さらにさがけ期間中に国際誌への積極的な投稿・掲載、国際会議での数多くの招待講演、受賞なども評価できる。加えて研究者が所属する研究組織内の人工光合成研究センターのセンター所長に抜擢されたことは本さがけでの大きな成果であると判断し、今後も本分野での飛躍が大きく期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yutaka Amao, Naho Shuto, "Formate dehydrogenase catalyzed CO<sub>2</sub> reduction in a chlorin-e<sub>6</sub> sensitized photochemical biofuel cell", *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2015, 19, 459-464.
2. Shusaku, Ikeyama, Yutaka Amao, "Discovery of Reduced Form of Methylviologen Activating Formate Dehydrogenase in the Catalytic Conversion of Carbon Dioxide to Formic Acid", *Chemistry Letters*, 2015, 44, 1182-1184
3. Yutaka Amao, Naho Shuto, "Formate dehydrogenase-viologen immobilized electrode for CO<sub>2</sub> conversion toward the development of artificial photosynthesis system", *Research on*

Chemical Intermediates, 2014, 40, 3267–3276.

4. Yutaka Amao, Akemi Tadokoro, Naho Shuto, Miki Nakamura, Ayumi Kuroki, “Chloroplast from Spinach adsorbed nanocrystalline TiO<sub>2</sub> electrode for photovoltaic conversion device toward artificial photosynthesis system”, Research on Chemical Intermediates, 2014, 40, 3257–3265.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際会議での招待講演

1. “Development of Artificial Leaf Device for Solar Fuel Production” アメリカ化学会 243 回 National Meeting アメリカ合衆国サンディエゴ
2. “Solar Fuel Production Based on the Bio-hybrid Artificial Photosynthesis System” 2012 OCARINA Annual International Meeting--- Launch of the Artificial Photosynthesis Research Center ---
3. “Visible-light induced conversion of CO<sub>2</sub> to chemical with sensitizer-enzyme hybrid artificial photosynthesis system” International Conference on Artificial Photosynthesis 2014 Hyogo, Japan
4. “Artificial photosynthesis devices for hydrogen production and CO<sub>2</sub> reduction” Royal Institute of Technology (KTH) Seminar, Stockholm (Sweden)
5. “Artificial Photosynthesis: Photoelectrochemical Biofuel Cell with the Carbon Dioxide Conversion Function -Combination System of Thylakoid Membrane from Microalgae Spirulina Platensis and Biocatalyst Immobilized Electrodes-“2015 INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR ADVANCED MATERIALS RESEARCH

受賞

1. Outstanding achievement and contribution to ISAMR2015 Invited Presentation 受賞

著作物

1. 天尾 豊 第11章 藻類由来光合成機能を利用したバイオ燃料変換系への展開 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望 p88–93 シーエムシー出版
2. 天尾 豊 光合成器官-触媒複合型人工光合成系を利用した光エネルギー変換技術触媒, 56, 4, 244–249, 2014

# 研究報告書

## 「乾燥・細胞壁破壊・有毒抽剤が不要な藻類からの燃料抽出技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 28 年 3 月

研究者: 神田 英輝

### 1. 研究のねらい

水生植物の微細藻類はろ過や遠心分離などで水分を除去しても、水分 80%(水分の重量 80:微細藻類の重量 20 の割合)の高含水状態にしなければならない。通常、微細藻類からバイオ燃料の原料である油脂を抽出するためには、微細藻類を乾燥したり、油脂の抽出に用いる有機溶媒(ヘキサン・メタノール・クロロホルムなど)の蒸発に 100℃以上の熱を投入しなければならない。これらの熱量が微細藻類が光合成で獲得した熱量を上回るため、微細藻類からバイオ燃料を生産するほどエネルギーを消費し、そのエネルギーが化石燃料由来の場合は、逆に二酸化炭素の排出量が増えるジレンマに陥る。

この問題を解決するために、従来の有機溶媒ではなく、水や油脂と混合し、沸点が常温よりも低く、化学的に安定で、分子構造中に窒素・硫黄・ハロゲン・金属などの環境負荷物質を含まず、毒性が低い物質を用いて、高含水状態の微細藻類から油脂を直接抽出するとともに、抽出液からこの物質を常温域の熱源で蒸発・分離させればよいと着想した。

これらの要求される性質を全て満たすと思われる物質として、ジメチルエーテル(DME)を選び出した。DME は標準沸点が-24.8℃であり、常温・常圧では気体である。DME は 20℃でも 0.51MPa に加圧すれば液体となる。DME は元々毒性が低い次世代クリーン燃料として使われてきた。液体状態ではディーゼル燃料代替、気体状態ではLPG代替として、とりわけ中華人民共和国で普及している。しかし、これまで DME は燃料として研究されてきた経緯から、抽出溶媒としては研究事例が殆ど無く、液化 DME に溶解する物質やその溶解度といった溶媒としての性質は未知である。また、DME を液化させて溶媒として用いる抽出装置自体も無い。

本研究では、液化 DME を抽出溶媒として用いて、様々な高含水の微細藻類から油脂を直接抽出できるか自作の装置を用いて検討するとともに、抽出された油脂の構成物質(元素割合・分子量分布・脂肪酸割合・高位発熱量・機能性成分)を明らかにすることを主な目的とした。また、その結果を一般的な有機溶媒抽出(ヘキサン抽出法や Bligh-Dyer 法)や、近年注目されている超臨界二酸化炭素抽出による結果とも比較検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

乾燥や細胞破壊といった前処理を施すこと無く、高含水の様々な微細藻類や水圏微生物、例えばラン藻・緑藻・ケイ藻・円石藻・ユーグレナ・ボツリオコッカス・オーランチオキトリウムから、高効率に油脂を抽出することに成功した。

特に、ケイ藻や円石藻といった無機質の被殻を有する微細藻類では、通常の有機溶媒抽出法では細胞破壊により抽出油脂の問題があったものの、細胞破壊が不要な液化 DME 抽出法を適用することにより、これら被殻の油脂への混入を防ぐことが可能になる。

細胞壁を有さないユーグレナは、抽出法に左右されず、どの抽出法でもほぼ同一性状の油脂が得られる可能性が示唆された。また、カロテノイド類などの有価物や脂肪酸も、従来法と遜色の無い収率で抽出することに成功した。

## (2) 詳細

研究テーマ A「低環境負荷溶媒DMEによる乾燥・細胞破壊が不要な湿潤抽出技術の確立」

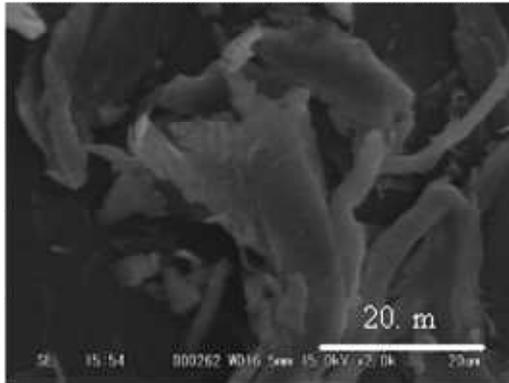
さきがけ研究では、ユーグレナ、ケイ藻スピルリナ、珪藻キートセロス、円石藻プレウロクリシス、緑藻ヘマトコッカス、真正眼点藻ナンノクロロプシス、ラビリンチュラであるオーランチオキトリウムを用いた。

何れの微細藻類や水圏微生物においても、抽出油脂は、元のサンプルに比して炭素・水素の含有量が増加し、また残渣の酸素・窒素含有量が増加した。これは、イオン液体などと異なり、蛋白質やアミノ酸を液化 DME によって抽出できないことを意味している。微細藻類の窒素含有量は 10%程度に達し、これは高等植物より著しく高い。この窒素は、培養液中の窒素肥料や、富栄養化した窒素を源にしており、更にこの窒素はアンモニア合成によって固定されたことを考えると、油脂に含まれる窒素分を燃焼して窒素ガスに戻すことは、アンモニア合成のエネルギーを無駄にすることになる。このため、油脂中の窒素含有量の低減はエネルギー収支の改善からも有効である。また、燃焼に伴い NOxも発生することになり、大気汚染防止の観点からも、窒素除去ができたことも有効である。

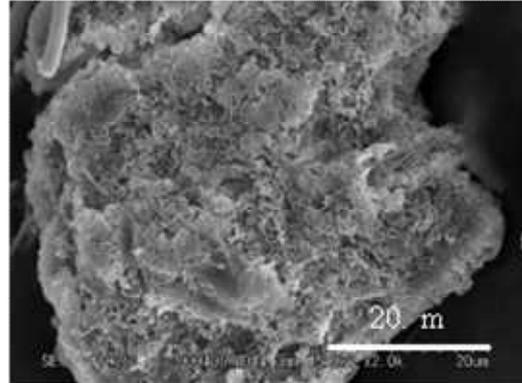
ユーグレナの場合、液化 DME 抽出法は、ユーグレナに乾燥や細胞破碎といった前処理を施していないにも拘わらず、乾燥と細胞破碎が必要な従来のヘキサン抽出法とほぼ同じ量、分子量分布、発熱量の油脂を、高含水のユーグレナから抽出することに成功した。後述の通り、他の藻類では有機溶媒抽出法とは分子量分布に違いが生じているのに対して、ユーグレナの場合には細胞壁がない特異な構造故に、極めて容易に細胞内部の全ての物質を抽出できるためだと考えられる。これは、抽出残渣が無色透明になったことから裏付けられる(論文 4)。

珪藻や円石藻はシリカや炭酸カルシウムの被殻を有しており、これが液化 DME による油脂抽出の妨げになる危険性があった。また、珪素やカルシウムが油脂中に混入する危険性もあった。液化 DME 抽出法を珪藻キートセロスと円石藻プレウロクリシスに適用すると、Bligh-Dyer 法とヘキサン抽出法(共に細胞破壊は施していない)に比べて、2倍近くの油脂を抽出することに成功した。また円石藻に対して抽出前に粉碎による細胞破壊を施すと、炭酸カルシウム被覆である円石の破片が油脂に混入する問題も明らかになった(Fig.1:孔径 1 $\mu$ m のフィルターろ過で抽出液と残渣を固液分離した場合。白く写っているのが円石。)。また、液化 DME 抽出法で得た油脂中の珪素とカルシウム濃度は従来法よりも少なく、液化 DME 抽出法において問題にならないことも判明した。

DME抽出物



ヘキサン抽出物

Fig. 1 SEM images of extracts from *P. carterae*

従属栄養微生物ラビリンチュラであるオーランチオキトリウムの場合も、微細藻類と同様に、湿潤状態から油脂を良好に抽出することに成功した(特許1・3)。

これに、後述の緑藻ヘマトコッカス、ナンノクロロプシス、ラン藻スピルリナや、さきがけ研究の準備段階で行った、ケイ藻を主とするアオコや、緑藻ポツリオコッカスブラウニーでの成功を併せると、主要なほぼ全ての種類の微細藻類について、液化DME抽出法を適用できると思われることが明らかになった。

#### 研究テーマB「液化DME抽出法による有価物・油脂抽出挙動の解明」

ラン藻スピルリナの場合でも、液化DME抽出法は、ヘキサン抽出法やBligh-Dyer法と、同じ量の油脂を、高含水のスピルリナから抽出することに成功した。また、超臨界二酸化炭素抽出法と比べると倍以上の量の油脂を抽出することにも成功した。しかし分子量分布は、液化DME抽出法が最も広がりがあり、続いてBligh-Dyer法、ヘキサン抽出法の順に分布が狭くなった。このように、弱極性の液化DMEは、無極性から極性まで様々な物質を溶解・抽出する能力があり、油脂成分の選択性の観点からは液化DMEの溶媒としての優位性は無く、抽出油脂に様々な不純物が含まれることが判明した。例えば、スピルリナに含まれる水溶性青色蛋白質フィコシアニンは抽出油脂に混入することが明らかになった。このフィコシアニンは液化DMEに不溶であることから、液化DMEに不溶な物質でも抽出される場合があることも判明した。これについては、フィコシアニンが水溶性であり、液化DMEがフィコシアニン水溶液の形で抽出した可能性がある。

赤色カロテノイドである有価物アスタキサンチンを豊富に含む緑藻ヘマトコッカスの場合、細胞壁にセルロース構造を有し、またシスト体では細胞壁が更に硬くなり、従来の有機溶媒抽出法では事前に細胞を破壊処理する重要性が高い。細胞破壊を施していない湿潤ヘマトコッカスに液化DME抽出法を適用したところ、油脂抽出量は従来の乾燥や細胞破壊を施す有機溶媒(アセトン)抽出法の約70%となった。また、細胞破壊処理を施したところ、油脂抽出量は従来法とほぼ同じとなった。アスタキサンチンの抽出挙動も油脂とほぼ同様であり、カロテノイド類に対しても、本手法を適用できることが明らかになった(論文2)(特許1・3)。大型藻類のワカメに対しても応用したところ、乾燥や細胞破壊を施さなくともフコキサンチンを抽出することに成功した(論文1)。

真正眼点藻ナンノクロプシスを用いて、微細藻類の初期含水率が液化 DME 抽出法に及ぼす影響を検討した。その結果、絶乾状態のナンノクロプシスからの油脂抽出量は、湿潤状態のナンノクロプシスからの約半分であった。また、予め液化DMEを水で飽和させ、液化DMEの水の抽出能力を失わせた状態では、抽出に要する液化DME量が約 10 倍になった。液化DME抽出法においては、水が存在することにより油脂抽出量が増大するとともに、水が抽出可能な状況で油脂の抽出速度が速くなることが明らかになった。

### 3. 今後の展開

本技術では DME を 0.5MPa(20℃)～3.5MPa(80℃)程度で液化して溶媒に用いることから社会実装するには、高圧流体のハンドリング経験が豊富な企業などに技術移転をすることが重要である。また、日本国内では、100mlを超える容器の液化ガスのハンドリングには高圧ガス保安法による規制があり、同法に許可された部品(高圧ガス保安協会の認可品)を用いるだけで、同じ装置を作成するために3～4倍の装置コストがかかる。同法の規制は日本が最も厳しく、海外では規制そのものが無い国もある。このため、早期に液化 DME 抽出法を社会実装するには、海外に大型装置を設置して試験を行うのが良いと考えている。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

ラン藻、緑藻、珪藻、円石藻、ユーグレナなど、様々な種類の微細藻類に対して、液化 DME を溶媒に用いる抽出方法を適用できることが明らかになった。液化 DME 抽出装置は部品を自ら組んで作成したオリジナルのものであり、この装置をさきがけの支援で作成したことで、様々な微細藻類に対して網羅的に、液化 DME 抽出法の適用の妥当性を確認できた。

さきがけの支援を受けて論文・口頭発表を実施できたのみならず、研究成果は日本経済新聞と朝日新聞に取り上げられた。また、複数の企業との共同研究にも発展することができた。

また、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果の点での特記事項としては、本研究成果を元に、南アフリカ共和国のダーバン工科大学と共同で、南アフリカ共和国の現地の微細藻類培養オープンポンドに液化 DME 利用型の抽出装置を設置して、現地で培養した微細藻類から油脂を抽出する社会実装を立案し、JST・JICA の SATREPS に 2015 年 6 月に研究代表として採択して頂いた。本研究では、日本の大手企業、東京農工大学の農学の専門家、名古屋大学の国際開発と経済学の専門家と共同して実施するなど、産学連携・文理融合・国際協力の点からの特徴も有する。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

さきがけによる支援で独自の高圧抽出装置を作成し、様々な微細藻類や水圏微生物への液化 DME 抽出法の優位性を明らかにした。本さきがけ研究の成果が認められ、日本エネルギー学会進歩賞(学術部門)を受賞するなど、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

本研究は、微細藻類からのバイオ燃料生産におけるエネルギー収支の改善というダウンストリーム分野である。既に、複数の研究者や民間企業との国際共同研究に発展するとともに、科学技術振興機構JSTと国際協力機構JICAの地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムSATREPS(低炭素社会)に研究代表者として採択されるなど、実用化に向けて研究はステップアップしている。さきがけ研究提案時は民間研究機関の所属で実用化を強く意識した研究提案だったこともあり、今後の研究成果の実用化を期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Hideki Kanda, Yuichi Kamo, Siti Machmudah, Wahyudiono, Motonobu Goto, Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether, <i>Marine Drugs</i> , (2014) 12, 2383-2396
2. Panatpong Boonnoun, Yuko Kurita, Yuichi Kamo, Wahyudiono, Siti Machmudah, Yuji Okita, Eiji Ohashi, Hideki Kanda, Motonobu Goto, Extraction of lipids and astaxanthin from wet <i>Haematococcus pluvialis</i> by liquefied dimethyl ether, <i>Journal of Nutrition and Food Sciences</i> , (2014), 4, art.no.305 (5pp)
3. Motonobu Goto, Hideki Kanda, Wahyudiono, Siti Machmudah, Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO2 and subcritical dimethyl ether, <i>The Journal of Supercritical Fluids</i> , (2015), 96, 245-251
4. Hideki Kanda, Peng Li, Motonobu Goto, Hisao Makino, Energy-saving lipid extraction from wet <i>Euglena gracilis</i> by the low-boiling-point solvent dimethyl ether, <i>Energies</i> , (2015), 8, 610-620

### (2)特許出願

研究期間累積件数:3件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞1件

- 1) 日本エネルギー学会 進歩賞(学術部門) 液化ジメチルエーテル抽出法による高水分炭素資源の高品位化に関する研究 (2015/2/27)

著作物4件

- 1) 藻類の培養とその事業化・高収益化に向けた最新技術

分担箇所: 第3部培養藻類の活用分野別利用技術 1節3項「微細藻類由来バイオ燃料の高効率抽出技術の開発」p.166-173 出版社: 情報機構, ISBN: 978-4-86502-025-0 (2013/6)

- 2) 藻類オイル開発研究の最前線—微細藻類由来バイオ燃料の生産技術研究—

分担箇所: 第3部未利用廃熱を利用する微細藻類バイオオイルの省エネルギー抽出技術 p.83-92 出版社: エヌ・ティー・エス, ISBN: 978-4-86469-085-0 (2013/11)

- 3) 分離技術のシーズとライセンス技術の実用化 分担箇所: 乾燥や細胞破壊が不要な微細藻類からの油脂抽出技術 p.95-101 出版社: 分離技術会, ISBN: 978-4-9908079-7

(2014/10)

- 4) 躍進する超臨界流体技術—新しいプロセスの原理とその実用化— 分担箇所: 第2章亜  
臨界ジメチルエーテル抽出技術 p.19-36 出版社: コロナ社, ISBN: 978-4-339-06635-7

(2014/11)

新聞報道 2 件

- 1) 日本経済新聞 名古屋大学: 藻から燃料を効率抽出 乾燥や粉碎不要 朝刊 14 面  
(2013/8/27)
- 2) 朝日新聞 藻からバイオ燃料 朝刊 16-17 面 (2014/1/4)

# 研究報告書

## 「ラン藻ポリケチド合成酵素を用いた脂質生産」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 栗井 光一郎

### 1. 研究のねらい

ポリケチド合成酵素は脂肪酸合成酵素と似た構造を持ち、超長鎖脂肪酸（DHA や EPA）や抗生物質など様々な代謝産物の合成に関与することが知られている。本さがけ研究では、光合成と窒素固定の両方を行うことのできる糸状性ラン藻で、窒素固定に関わる細胞であるヘテロシストを利用し、窒素欠乏条件で蓄積する糖脂質の前駆体であり、ポリケチド合成酵素によって合成される脂肪アルコールの高効率生産を目指した。

ヘテロシストでは窒素固定反応が行われるが、その反応を担う酵素（ニトロゲナーゼ）が酸素感受性であるため、細胞内を低酸素状態に保つ必要がある。そこで、ヘテロシストでは細胞外から酸素が流入しないようにバリア層を形成していることが知られている。このバリアは、超長鎖脂肪アルコールに1分子の糖が結合した糖脂質により作られる。代表的糸状性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 では炭素数 26 の脂肪アルコールにグルコースが結合した糖脂質が利用されている。本研究では、この糖を付加する酵素の遺伝子を破壊し、その株で前駆体である脂肪アルコールを蓄積させ、さらにそれを高効率で生産させるシステムの構築を目指した。

一方、膜脂質合成に関する研究も進めた。これは、脂肪アルコールの生産量を上げるためには、材料の競合する膜脂質について理解する必要があるためである。光合成生物では光合成を行うチラコイド膜が何層にも重なった複雑な構造を形成している。この膜は糖の一種であるガラクトースを持つ膜脂質（ガラクト脂質）がおよそ8割を占めている。このことから、ガラクト脂質は光合成に必須であると考えられてきた。植物のガラクト脂質を合成する酵素の遺伝子はすでに同定されていたが、ラン藻では合成経路が植物と異なることが30年以上前にわかっていたものの、その合成を担う酵素の遺伝子はわかっていなかった。そこで、ラン藻のガラクト脂質合成にかかわる遺伝子を同定し、ガラクト脂質の役割を明らかにすることを計画した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

酸素発生型光合成をおこなうバクテリアであるラン藻は、植物葉緑体と同様、チラコイド膜を用いた光合成を行っている。ラン藻には様々な形態の種が存在し、中には糸状性の形態をもち、そのうちのいくつかの細胞を窒素欠乏条件で異化細胞（ヘテロシスト）へと分化させ、窒素固定を行う種が存在する。その代表種である *Anabaena* sp. PCC 7120 のヘテロシストに特異的に存在する糖脂質(hgl)を合成する糖異性化酵素 *hglT* 遺伝子変異株を単離した。*hglT* 遺伝子破壊株では、hgl が合成されず、その前駆体である脂肪アルコールが蓄積することがわかった。また、hgl が合成されないにも関わらず、窒素固定活性を維持していることも明らか

となった。つまり、この変異株では、光合成と窒素固定活性を維持したまま脂肪アルコールを蓄積していた。さらに、ヘテロシスト形成制御因子との多重変異株を作出し、ヘテロシスト出現頻度を上げることで脂肪アルコールの収量を上げることを試みたが、大きな効果は得られなかった。一方、空気をバブリングして培養することで脂肪アルコールの収量が上がるのがわかった。これは、酸素もしくは二酸化炭素(炭素源)の影響であると考えられた。

チラコイド膜はそのおよそ 8 割をガラクト脂質が占めている。この脂質組成はラン藻から葉緑体まで保存されていることから、ガラクト脂質はチラコイド膜に必須であると考えられてきた。一方、ガラクト脂質自体は共通しているものの、その合成経路はラン藻と葉緑体で異なることが知られていた。本研究では、ラン藻のガラクト脂質合成のカギ酵素となる糖脂質異性化酵素の遺伝子を明らかにし、その遺伝子破壊株を単離した。遺伝子破壊株ではガラクト脂質が消失し、その前駆体であるグルコースを持つ脂質(グルコ脂質)が蓄積していた。この株では、光合成活性、チラコイド膜構造が維持されていたことから、ガラクト脂質は光合成やチラコイド膜構築に必須ではなく、少なくともグルコ脂質で代替できることが明らかとなった。

チラコイド膜における膜脂質の要求性はラン藻種によって異なることが知られている。そこで、単細胞性ラン藻の *Synechococcus elongates* PCC 7942 でガラクト脂質要求性を調べたところ、これまで知られている単細胞性ラン藻とは異なり、2 分子のガラクトースを持つガラクト脂質が必須であることが明らかとなった。

## (2) 詳細

### (1) ヘテロシストでの脂肪アルコール蓄積

窒素固定を行うヘテロシストは、酸素感受性のニトロゲナーゼを守るため、糖脂質のバリア層を形成する。その糖脂質の前駆体である脂肪アルコールを蓄積する株を作出するため、最終反応を担う糖転移酵素(HgIT)の遺伝子破壊株を作出した。まず遺伝子破壊株が単離できたことから、*hgIT* 遺伝子は必須遺伝子ではないことがわかった。この株を窒素欠乏条件にさらしたところ、糖脂質の代わりに脂肪アルコールが蓄積し、しかも野生株と比べ低いながらも窒素固定活性を維持していた。このことは、前駆体の脂肪アルコールでもバリア層が形成でき、その機能を担うことができることを示している。つまり、この株は光合成・窒素固定活性の双方を維持し、目的の脂肪アルコールを蓄積することがわかった。(論文1)

### (2) 脂肪アルコール生産の高効率化

脂肪アルコールを蓄積する株を単離できたことから、より効率よく目的化合物を取得する方法を検討した。ヘテロシストはおよそ 10~15 の栄養細胞あたり 1 細胞形成されることが知られている。そこで、ヘテロシスト形成を制御する因子(PatS, HetN)の遺伝子を破壊することで、ヘテロシストの出現頻度が増す株の単離を試みた。しかし、これらの制御因子の遺伝子を破壊しても数%程度しか出現頻度が上昇せず、あまり効果が見られなかった。そこで、他の制御因子である *patN* 遺伝子を破壊した株の単離を試みたところ、全ゲノムコピーで遺伝子が破壊された株を単離することができなかった。このことは、*patN* 遺伝子が必須であることを示している。しかし、近縁の *Nostoc punctiforme* では破壊株の単離が報告されていることから、培養条件によっては単離で

きると考え、培地に含まれる窒素源を変更したスクリーニングを試みている。

次に、培養条件を変えることで脂肪アルコール蓄積量を増やすことを試みた。ヘテロシストのバリア層は培地中の酸素濃度が増すことによって厚みが増す（量が増える）ことが知られている。実際、空気をバブリングすることで脂肪アルコールの収量が増えることが観察された。しかし、空気中のどの成分が収量増加に有効であったかはわかっていない。今後、バブリングした空気に含まれる気体のうち、どの成分が有効か（例えば窒素、酸素、二酸化炭素）を明らかにすることによって、脂肪アルコールが蓄積する最適条件を明らかにしたい。

### （3）光合成膜脂質の機能解析

脂肪アルコールの効率的生産を行うためには、基質が競合する膜脂質の性質を理解しておくことが重要である。ラン藻を含む光合成生物が光合成反応を行うチラコイド膜は、そのほとんどが糖脂質で構成され、ガラクトースを含むガラクト脂質がその5割以上を占めている。この脂質組成はラン藻から陸上植物まで保存されていることから、ガラクト脂質は光合成に必須であると考えられてきた。しかし、ラン藻と陸上植物では、その合成経路が異なることが知られている。これまで、ラン藻のガラクト脂質合成に関わる酵素のうち、2つの糖転移酵素の遺伝子を明らかにしていた。しかし、ラン藻に特徴的である糖脂質異性化酵素の遺伝子は不明であった。そこで、比較ゲノム解析を行った結果、目的の遺伝子を同定することに成功した。この遺伝子がコードする糖脂質異性化酵素は脂質分子中のグルコースをガラクトースに変換することで、ガラクト脂質を合成する。つまり、この遺伝子を破壊すれば、ガラクト脂質が消失し、前駆体であるグルコースの付加したグルコ脂質が蓄積するはずである。もし、ガラクト脂質が光合成に必須であればそのような株の単離はできない。ところが、糖脂質異性化酵素遺伝子破壊株の単離に成功し、その遺伝子破壊株を用いた解析から、ガラクト脂質は必須ではなく、グルコ脂質でも代替できることが明らかとなった。これは、これまでの光合成膜脂質の常識を覆す成果となった。（論文2、プレスリリース）

一方、ラン藻には多様な種が存在し、光合成膜脂質の要求性が異なることが知られている。例えば、同じ単細胞性のラン藻でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803では必須の酸性糖脂質が*Synechococcus elongates* PCC 7942では欠失可能であり、ガラクトースを2分子もつジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）が*Synechocystis* sp. PCC 6803では必須ではないことが分かっている。そこで、*Synechococcus elongates* PCC 7942でDGDG要求性を調べたところ、必須であることが明らかとなった。また、このDGDG要求性は合成経路に寄らず、ラン藻のDGDG合成酵素とは全く異なる他の生物（植物）由来のDGDG合成酵素でも相補できることを示した。（論文3）

## 3. 今後の展開

本研究では、糸状性ラン藻のヘテロシストという特殊な細胞に存在する脂質を利用することで、エネルギー化合物を生産することを試みた。また、光合成膜に必須と考えられていたガラクト脂質が必須ではないことを証明した。これらの脂質は、アセチル CoA を共通の原料としており、細胞内で競合している。光合成膜を維持しなければ光合成活性が下がり、結果としてバイオマスが減少するため、目的化合物生産の最適化に向け本研究で得られた知見をもとに脂質代謝を総

合的に理解する必要がある。

本研究で明らかとなったラン藻の糖脂質代謝情報や、培養条件の検討を元に、単離した脂肪アルコール蓄積株での効率的生産条件を明らかにしたい。さらに、この合成系を利用して他の有用化合物、例えば DHA や EPA の生産につなげたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、主に4つの研究テーマを軸に進められた。1 つ目のヘテロシストでの脂肪アルコール生産は、上記研究成果にあるとおり、概ね目標が達成されたと考えられる。今後、蓄積した脂肪アルコールの生産に必要な条件を詳細に検討することで、より効率的生産につながることを期待できる。一方、当初計画にあった栄養細胞での脂肪アルコール生産、その細胞外への排出に関する研究は、ほとんど進展が見られなかった。これは、栄養細胞で脂肪アルコール合成遺伝子クラスターを発現させるよう作成した遺伝子導入株で、脂肪アルコールの蓄積が見られなかったためである。そのため、栄養細胞で蓄積した脂肪アルコールを細胞外に排出する計画を進めることができなかった。しかし、研究計画当初は、合成した有用物質を細胞外に排出させることが肝要であると考えられてきたが、本領域での研究の進展により、排出の有無よりも蓄積量が重要であることが明らかとなってきた。さらに、上記脂肪アルコール蓄積株では、当初予想していなかった窒素固定活性が維持されており、この株を用いることで光合成と窒素固定活性を維持しつつ、目的の脂肪アルコール生産が実現したため、他のテーマに注力した。4 つ目の研究テーマである光合成膜脂質の機能解析に関しては、これまでの常識を覆す成果が得られ、プレスリリースを行うこともできた。今後は、この成果を有用物質生産へと繋げる責任があると感じている。

本領域では、さきがけ、CREST 共に油脂・脂肪酸などを生産する株の開発が進められてきたが、脂質解析を不得手とする研究者が多かったことから、脂質解析に関する領域内共同研究を多く進めることが出来た。このことは、さきがけ研究者としての貢献だけでなく、領域全体への貢献もできたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本さきがけ研究では、ラン藻での脂肪アルコールの合成、膜脂質の機能解析を行った。研究の当初は、20 kb 近くの遺伝子クラスターの導入に苦心するなど、思うような成果が出ていなかったが、最終的には脂肪アルコール生産株の作出に成功し、膜脂質の機能解析ではこれまでの常識を覆す成果を上げたことで、領域の進展に大きく貢献したと考えている。また、本人の得意分野である脂質解析で力を発揮することで、領域内での共同研究を積極的に進めたことも評価できる。今後は、本領域内での連携を進めることで、領域のさらなる進展に寄与すると期待している。

研究期間に発表した論文は、インパクトファクターの高い雑誌に掲載され、分野における重要性も高いことから評価できる。しかし、学会等での発表件数からすると論文数が少なく、質だ

けでなく量を増やす努力をすることが必要であろう。

研究者としては、本さがけ研究が評価され所属機関でのプロモーション(特任助教から准教授)に繋がった。また、所属機関での付置研や博士課程大学院への兼任も任命されており、高く評価されていることがうかがえる。その評価は学内だけではなく学外でも高まっており、新学術領域への計画班として参画やCREST申請での中心的役割を担うことに繋がった。さらに、さがけ研究期間中に国内シンポジウムを2件開催し、国際シンポジウムも1件開催している。招待講演は国内6件、国際2件、また、ラン藻研究コミュニティでのプロジェクト責任者も担当するなど、研究者としての飛躍につながった。今後、この分野のトップランナーとして、研究をけん引し続けていくことを期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Halimatul HSM, Ehira S and Awai K\*. Fatty alcohols can complement functions of heterocyst specific glycolipids in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014) 450:178–83.
2. Awai K\*, Ohta H and Sato N. Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111:13571–13575.
3. Maida E and Awai K\*. Digalactosyldiacylglycerol is essential in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, but its function does not depend on its biosynthetic pathway *Biochim Biophys Acta.* (2016) in press

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### <学会発表>

国際会議 10件(うち招待講演 2件), 国内会議 23件(うち招待講演 2件)

#### <著作物>

1. Awai K\* (2016) Thylakoid development and galactolipid synthesis in cyanobacteria. In *Lipids in Plant and Algae Development*. Nakamura Y and Li-Beisson Y eds, Springer, in press.
2. Sato N\*, Awai K (2016) Diversity in biosynthetic pathways of galactolipids in the light of endosymbiotic origin of chloroplasts. *Front. Plant Sci.* 7:117.
3. 粟井光一郎 (2015) 光合成生物におけるガラクト脂質合成経路の分布と進化. *光合成研究* 25(2) 143–150.

#### <プレスリリース>

1. 「光合成反応の場を作る膜脂質の機能を解明」(2014年9月2日)  
<http://www.shizuoka.ac.jp/news/detail.html?CN=1995>

2. 「葉緑体の脂質なくても光合成可能」(2014年9月2日)静岡新聞
3. 「光合成研究で発見 脂質置き換えでも可能」(2014年9月18日)中日新聞
4. 「光合成反応の場作る膜脂質の機能を解明」(2014年9月19日)科学新聞

# 研究報告書

## 「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 岩堀 健治

### 1. 研究のねらい

コバルト(Co), チタン(Ti), 金(Au), 白金(Pt) 等のレアメタルや貴金属は日本の産業にとって非常に重要な材料であるが、その産出地は中国、ロシア、オーストラリア、南アフリカ等に偏在しており日本ではほとんど産出しない。日本ではこれらの有用金属はほとんど輸入に頼っているため、多くの産業で国際価格の変動に大変影響を受けやすくなっている。一方、我が国における鉱山廃水、工場排水、都市鉱山、海洋中などの様々な環境中には極低濃度ではあるが大量の未利用有用金属資源が存在している。本研究は、貧鉄海洋環境という極限環境中で生育している海洋性ケイ藻類の細胞中に存在している金属蓄積タンパク質、フェリチンの低濃度金属取り込み機能に着目するとともに、そのバイオミネラリゼーション機構の解明と制御及び改良を行う事で、日本の様々な環境に存在している低濃度有用金属を選択的、効率的に回収するだけでなく、産業利用可能なバイオナノマテリアルの作製とそれを直接利用したナノ電子デバイスの作製を行うことで最終的にタンパク質の特徴を有効利用した“ナノマテリアル生産システム”の創成を目的としている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究は、2009 年に世界で初めて発見された海洋性ケイ藻由来の金属貯蔵タンパク質であるフェリチンタンパク質のバイオミネラリゼーション機構解明を詳細に行うことで、本フェリチンタンパク質の大きな特徴である極低濃度の鉄イオンをフェリチン内部空洞へ取り込み、酸化鉄ナノ粒子を作製することができる理由を解明するとともに、本フェリチンを改良・強化することで鉱山廃水や工場排水となどの非常に低濃度ではあるが有用金属が多量に存在する環境中から目的金属を効率的に回収し産業利用可能なバイオマテリアル作製を実現するものである。

本さがけ研究の遂行により、多数のケイ藻由来リコンビナントフェリチンによるナノ粒子形成試験、タンパク質立体構造解析による金属イオンの結合部位探索などの実施により、本フェリチンにおけるマイナス電荷金属イオンの取り込む経路やなぜ低濃度の金属が空洞内部に取り込まれるのかという原因を明らかにするとともに、今まで全く不明であった海洋性ケイ藻由来フェリチンの様々な性質を明らかにすることができた。

また、実際の鉱山廃水や工場排水等から低濃度有用金属を回収するために、本ケイ藻由来フェリチンをベースとして遺伝子工学的手法を中心にフェリチンの改良・強化を行った。その結果、本フェリチンにおける改良・強化に効果的なアミノ酸種、変異部位の特定が行われ、さらにフェリチン空洞内部への各種金属結合ペプチドの修飾により、それぞれの金属に特化したオーダーメイドフェリチンの作製に成功し、特に金イオン、カドミウムイオン、リン酸イオン等の回収とそのナノ粒子化に成功した(図 1)。

本研究の推進により、今まで全く不明だった藻類由来フェリチンの一つであるケイ藻由来フェリチンの様々な特徴と低濃度金属に対する挙動が明らかになるとともに、藻類細胞が保持するフェリチンタンパク質の多様性の一端も解明することができた。また、本研究成果により鉱山排水や工場排水を原料とし、バイオマテリアル生産からバイオデバイス生産を通したバイオデバイス作製まで一貫して行うナノマテリアル生産システム創成の実現に近づいた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ケイ藻由来フェリチンの発現と性質検討及び大量発現、精製法の確立」

海洋性ケイ藻由来フェリチンの全遺伝子を pET30a プラスミドに融合し、大腸菌にクローニングすることで大量発現系の構築を行った。特に IPTG 誘導剤の添加後培養温度を 37°C から 26°C に低下させることで、他のタンパク質の生産を抑えながらフェリチンタンパク質の生産量増加を達成した。さらに、フェリチンの大量精製ステップの構築も行い、今回新規に開発した 60°C 熱処理法とカラムクロマトグラフィーを併用する連続精製法により、誰でも簡単にフェリチンの精製が可能となるフェリチン簡便精製法の構築に成功した。これらの最適培養条件の検討とフェリチン簡便精製法の確立により最終的に 3 L の LB 培地を用いた培養から 300 mg 以上の精製ケイ藻由来リコンビナントフェリチン(FerA)を得ることが可能となった。

精製された FerA は種々の分析により哺乳類のウマ由来フェリチン (HsAFr)と同じく分子量約 480 kDa、外径 12 nm で直径 7 nm の内部空洞を持つ球殻状タンパク質であることが確認された。さらにウマ由来フェリチンの 10 倍以上の二価鉄イオンの取り込み活性を保持する事や 1/20 の低濃度鉄イオンも FerA 空洞内部に取り込むことが明らかになった。この原因を究明したところ FerA の空洞内部表面の結晶核形成部位や酸化活性部位と呼ばれる部位近辺に存在しているグルタミン酸 (Glu) が強い影響を与えていることが一つの大きな原因である事が明らかになった。

### 研究テーマ B「ケイ藻由来フェリチンによるナノ粒子作製と改良ウマフェリチンの構築」

研究テーマ A で得られた知見を元に、元々、低濃度鉄イオンが取り込むことができないウマ由来フェリチン (HsAFr) の核形成部位や酸化活性部位と呼ばれている部分に 1 サブユニット当たり 1~3 個の Glu を導入して作製した改良ウマフェリチンは従来の 3.5 倍以上の鉄イオンの取り込みと鉄酸化活性の増大を示した。この結果より、フェリチンの内部空洞表面の Glu 増強は正電荷を持つ鉄イオンの取り込み促進に非常に重要であることが明らかになった。また、ケイ藻由来リコンビナントフェリチン (FerA) において、種々の低濃度金属に対する取り込みと有用ナノ粒子形成について検討した結果、現在までに Fe だけではなく Co, CdSe, ZnSe, リン酸塩等のナノ粒子を低濃度の金属イオン源より作製することに成功した。さらに、FerA 変異フェリチンを用いた金属取り込み実験やフェリチンの立体構造解析などによる FerA の詳細なバイオミネラリゼーション機構解明を行い、

- (1) リン酸イオン等のマイナス電荷を持つイオンは 4 回対称チャネルから空洞内部に取り込まれる。
- (2) CdSe ナノ粒子作製時の Cd イオンはフェリチン内部に人工的に作製した Glu 残基に結合し、この部分が核形成部位となっている。

等のケイ藻由来フェリチン FerA に関する新しい特徴が解明されるとともに、詳細なバイオミネラルゼーション機構の解明に成功した。

### 研究テーマ C 「バイオミネラルゼーション機構の強化と金属回収」

ケイ藻由来フェリチンを有効活用し鉱山廃水等の混合金属溶液中から産業に有用な金属のみを回収するため Au, ZnO, SiO<sub>2</sub> 等に特異的に結合しミネラルゼーションを行う新規金属結合ペプチドの取得に成功し、その性質検討を行った。さらに廃水中から Au を回収するために FerA の空洞内部に Au 結合ペプチドを融合したオーダーメイド FerA フェリチン (FerA-dCys-Au) を作製と Au ナノ粒子形成条件の検討を行い、フェリチン空洞内に Au イオンの取り込みと Au ナノ粒子の作製に成功した。

本研究においてケイ藻由来フェリチン(FerA) における低濃度金属取り込み機構が明らかになり、鉄だけでなくその他の金属イオンも低濃度で内部に取り込み、ナノ粒子化をすることが可能となった。またプラス電荷をもつ低濃度金属イオンを回収するためには、フェリチンの核形成部位に人工的にマイナス電荷増加させると効果的である。また金属を特異的に吸収しナノ粒子を作製するためには、目的金属に特異的に結合する金属結合ペプチドをフェリチン内部に融合することが非常に有効な手段の一つになることが明らかになった。

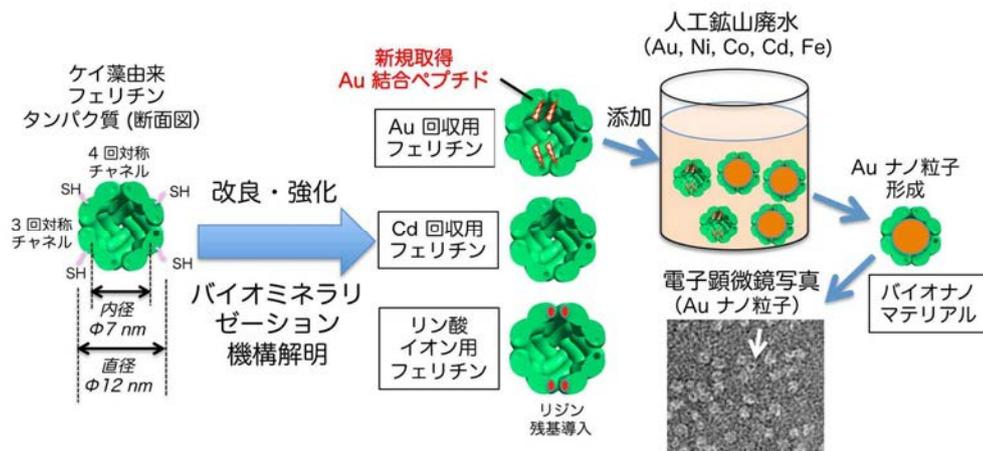


図 1,フェリチンタンパク質による有用金属回収と Au ナノ粒子作製

### 3. 今後の展開

現在までのさきがけ研究の遂行により、今まで全く不明だったケイ藻由来フェリチンの特徴と低濃度金属に対する挙動が明らかになるとともに、ほとんど解明されていない、藻類由来フェリチンの多様性の一端が解明できた。また、ケイ藻由来フェリチン (FerA) の金属取り込み機構の解明により、フェリチンの金属の取り込み速度上昇や目的金属を取り込むために利用すべき金属結合ペプチドの修飾位置や改良・強化のための重要なアミノ酸部位を理解することができた。特に、鉱山廃水や工業廃水から有用金属を回収するために Au 結合ペプチドを 4 回対称部位に修飾して作製したオーダーメイドフェリチン (FerA-dCys-Au) は Au イオンを選択的にミネラルゼーションすることが確認されており、有用金属の回収のための重要なバイオ素子として十分活用できる。

今後は、改良した FerA と世界的に研究が進んでいる金属結合ペプチドを効果的に組み

合わせる事で、実際の種々の鉱山廃水から産業利用可能な金属を効率良く回収し、バイオナノ材料作製を行う。さらに、それに連動する電子デバイス作製を行うことで、総合的なバイオ材料生産システムの創成を目指す。また、多種多様な藻類由来フェリチンの新規取得と機能開発・強化をさらに続けることで、藻類由来フェリチンの優れた機能をバイオ、化学、医療、環境等の分野において応用展開する予定である。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究では、今まで全く不明であった海洋性ケイ藻由来の金属貯蔵タンパク質であるフェリチンタンパク質について、その特徴とバイオミネラリゼーション機構を解明した。ケイ藻由来フェリチンの空洞内部表面にあるグルタミン酸残基の影響によりプラス電荷を持つイオンが空洞内部に流入しやすくなっていることや、マイナス電荷イオンは4回対称チャネルから空洞内部に流入していることなどを突き止め、今までの様々なフェリチンと比較して極低濃度の金属イオンをタンパク質内部に取り込むことができる原因とバイオミネラリゼーション機構解明に成功したことは、藻類の細胞機能やタンパク質科学の面からも非常に評価されるものである。本研究における藻類細胞由来のフェリチンの機能解析結果は藻類細胞が水陸環境中の鉄イオン等の金属の循環に重要な役割を演じていることを示唆しており、さらにフェリチンの生物における多様性の解明に繋がる知見が得られたことは非常に有意義な成果であると考えられる。

また“バイオ材料生産システムの創成”という目的を達成するために Au 結合ペプチドとケイ藻由来フェリチンの融合によって作製したオーダーメイドフェリチン (FerA-dCys-Au) は、人工混合金属中から金 (Au) イオンを選択的に還元しナノ粒子化する能力があり、本フェリチンをさらに発展させることで、鉱山廃水等の混合金属廃水から有用ナノ粒子を作製できるプロセス構築へ重要な基礎的知見が得られ、様々な分野における応用展開が約束されたと考えられる。

本研究の推進にあたり技術員 1 名を長期間雇用し、戦略的に腰をすえて時間のかかるバイオ関連の基礎的実験部分を進めた結果、藻類フェリチンに関する遺伝子工学手法、大量培養方法、大量精製方法などの構築や藻類由来フェリチンの結晶作製や構造解析等の様々な基礎研究を行うことができ、その後の研究発展や応用戦略への橋渡しのための基礎的な知見とスキルを積み上げる事ができた。さらにさがけ研究費の予算で購入した HPLC の自動分析システムや新型タンパク質精製装置 (AKTA, pure) 等の効果的な導入により本研究スピードが非常に促進され、非常に効率的、効果的に研究予算を活用することができたと思われる。また、本研究では高価な合成ペプチドを多種類、大量に利用することができたことにより、新規の Au 結合ペプチドの発見と結合機構の解明を迅速に行う事ができ、非常に効率的かつ有効に研究費の執行を行うことができた。

今後は、本さがけ研究で得られた基礎的知識と数々のオーダーメイドフェリチンを有効に利用し、実際の鉱山廃水、工業廃水や重金属汚染土壌といった環境に適応させ、様々な環境下における金属回収システムの作製を目指すことで、廃棄物を源とした有用金属回収、鉱害(公害)防止、バイオ材料作製の同時達成が可能な“藻類フェリチンによるナノマ

テリアル生産システムの創成”の完成を目指すと共に、環境に配慮したバイオマテリアル作製を行う分野、「環境バイオマテリアル分野の構築」を目指していきたい。また、廃棄物より作製したバイオナノマテリアルは、現在、応用展開を推進しているデバイス分野のみならず、バイオ、化学、医療、環境等の多くの分野に波及していくような製品作りも念頭にいれ並行して進めていく予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

本課題研究は、藻類フェリチンの特徴を解明し、それを改良・強化することで様々な環境に存在する低濃度の有用金属を回収しようというものである。研究初期は非常に基礎的な研究であり、実験の進捗具合が少々心配されたが着実に基礎実験を積み重ね、ケイ藻由来フェリチンの数々の特徴を発見し、バイオミネラリゼーション機構の解明したことは非常に評価できる。研究費も適切に使用しており、研究を迅速に進めるため新しい装置や新しい技術の導入を率先して行っている。また、領域内で多くの研究者と共同研究をすすめ、まだ成果は途中のものが多いが、新規フェリチンの探索や性質検討、応用展開などを積極的に進めている点も今後の発展に期待できる。

本課題研究者はほとんど研究されていない藻類細胞由来の新規フェリチンの単離と特殊機能解明を進め、藻類細胞におけるフェリチンの役割の探索、さらに多様性についても研究を広めていこうとしており、基礎科学的にも非常に興味深い研究に発展する多くの要素を持っている。

本研究で得られた基礎的知見やそれぞれの金属に対応したケイ藻由来改良フェリチンを利用することで、本研究の最終目的である「藻類由来フェリチンの機能強化によるナノマテリアル生産システムの創成」は実現間近であると考えられる。さらに本プロセスを改良することで発展途上国における重金属汚染浄化や温泉や都市鉱山からもナノマテリアルを作製することが可能となるはずである。今後、さらに多くの藻類由来の特殊なタンパク質の機能開発と有効利用を進めることで、有用金属資源における藻類細胞の利用と有用金属の省資源、有効活用が達成できる社会の実現に期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. <u>Kenji Iwahori</u> , Midori Yamane, Sakiko Fujita, Ichiro Iwahori,<br>“Synthesizing CdSe nanoparticles by using a low concentration of cadmium ions and the apoferritin protein cage of marine pennate diatoms”<br><i>Materials Letters</i> , 2015, <b>160</b> ,154–157 |
| 2. Koichiro Uto, kazuya Yamamoto, <u>Kenji Iwahori</u> , Takao Aoyagi, Ichiro Yamashita,,<br>“Solid-phase PEGylation of an immobilized protein cage on polyelectrolyte multilayer”<br><i>Colloids and Surfaces B-Biointerfaces</i> , 2014, <b>113</b> , 338–345              |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 岩堀健治、山下一郎

「タンパク質ナノプレートを用いた蛍光発光ナノ粒子の作製と特徴」  
バイオテクノロジーシリーズ メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回  
収, シーエムシー出版,(2015), pp.166-174

2. 岩堀健治

「生物に学ぶ・高次自己組織化を生かしたバイオナノプロセス」  
日本農芸化学会 化学と生物(2014), 52 (4) pp.233-240

3. Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita,

“Nanoparticle Synthesis: Biological Path”  
Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology,third Edition,  
CRC Press: New York,(2014), pp. 3144-3151

4. 岩堀健治、山下一郎

「バイオプレートによるナノマテリアル作製技術と電子デバイス作製」  
生物模倣技術と新材料・新製品開発への応用、(株)技術情報協会,(2014),  
pp.607-618

5. 岩堀健治

「第3章 メタルバイオテクノロジーの応用 3,3,4 バイオナノ分子材料」  
地球を救うメタルバイオテクノロジー、成山堂書店,(2014), pp.171-182

6. 岩堀健治、山下一郎

「バイオプレートを用いたナノマテリアル作製と応用展開」  
高分子, (2013), 62(2),pp73-75

# 研究報告書

## 「高脂質含有円石藻 *Pleurochrysis carterae* の形質転換技術の確立と有用脂質高生産に向けた応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 遠藤 博寿

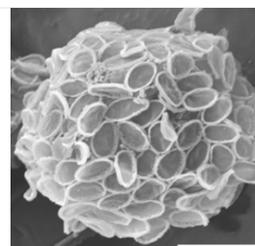
### 1. 研究のねらい

海洋微細藻円石藻(ハプト植物門)には、細胞内に油滴を形成し脂質を著しく多く貯蔵するものや、現在利用されている化石燃料のもとになった特殊な脂質を生産するものなどがあり、近年では海洋環境学のみならずバイオエネルギー研究の観点からも注目を集めている。また、円石藻は、細胞表面にココリス(円石)と呼ばれる炭酸カルシウムの微結晶をもち、このココリス形成と光合成を介して海洋の炭素循環に大きな影響を及ぼす重要な一次生産者であるという一面を持つ。さらに、近年ではココリスの光学特性の研究が進められ、新たなナノデバイス開発の観点からもその重要性が見直されている。しかしながら、これまでこの藻類においては、高度かつ先進的な研究を遂行する上で不可欠な、遺伝子導入の技術が確立されていない。そこで、本研究では、まず、同種の形質転換技術の確立を行い、その技術を軸に、脂質代謝系および炭酸カルシウムの蓄積機構の解析を目的とした。

### 2. 研究成果

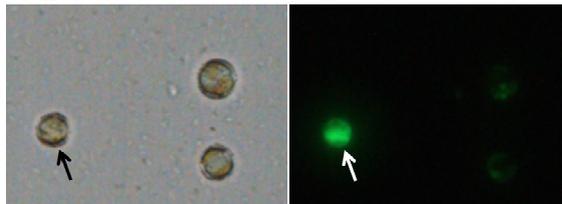
#### (1) 概要

円石藻は世界中の海に広く分布する微細藻であり、細胞表面にココリスと呼ばれる炭酸カルシウムを蓄積させ、海洋の炭素循環にも大きく寄与する生物群である。中でも研究対象種である *Pleurochrysis carterae* は、脂質の含有量が高く、屋外での長期にわたる大量培養が可能なることから、次世代のバイオエネルギーの原材料として期待されている(図1)。



〈図1 *Pleurochrysis carterae*〉

円石藻の細胞は、図1に見られるように、強固に石灰化したココリス(円石)と呼ばれる鱗片状の構造で覆われている。これまで、ハプト植物門において遺伝子導入実験の成功例が皆無である要因はこの特殊な細胞壁が外来物質の導入を妨げているためであると考え、まずこれらの細胞壁を除去し、プロトプラストを調整する方法の開発を行った。その結果、ProteinaseK および低浸透圧溶液処理により、大量のプロトプラストを短時間で調製できることを見出した。さらに、このプロトプラストは、低浸透圧溶液から通常の培地に戻すことで、数日間で再び細胞増殖期に入ることから、遺伝子導入、特に形質転換体の作出に適していると考え、さらに一過性発現系および形質転換系の開発を進めた。一過性発現系には、GFP(green fluorescent protein)および GUS(beta-glucuronidase)をマーカーとして用い、



〈図2 GFPを発現する円石藻〉

PEG(polyethylene glycol)により、その遺伝子の導入を試みた。その結果、効率はやや低いものの、両方のマーカー遺伝子の発現をタンパク質レベルで確認することに成功した(図2)。さらに、抗生物質ハイグロマイシン耐性遺伝子(*Aph7*)を用いて形質転換体の取得を試みた。一過性発現と同様、PEG を用いて発現コンストラクトを導入し、液体およびプレート培地で選抜を行った結果、約  $7/10^6$  細胞程度の効率で、形質転換体の取得に成功した。さらに、この遺伝子導入の技術を用いることにより、ココリスに含まれるタンパク質をコードする遺伝子の発現抑制に成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「*Pleurochrysis carterae* の一過性発現系の開発」

一過性発現系における発現用コンストラクトは、pBI221 をベースに、プロモーターとして *P. carterae* の FCP (*fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein*)、EF-1 (*elongation factor-1*)、CSAP-1 (*coccolith scale associated protein-1*) の上流配列、レポーターとしてコドン改変がなされた GUS (*-glucuronidase*) である PyGUS、および NOS (*nopaline synthase*) ターミネータを組み込んだものをそれぞれ作製した。これらを *P. carterae* の無処理の細胞、またはプロトプラストに、エレクトロポレーション、ポリエチレングリコール(PEG)、パーティクルガンおよび silicon carbide whisker を用いて細胞内に導入を試みた。さらに細胞を2日間培養後、藻体を回収し、RT-PCR および GUS 染色を用いて GUS 遺伝子の発現を調べた。上述の組み合わせのうち、FCP のプロモーターを含むコンストラクトを PEG でプロトプラストに導入した実験区、およびパーティクルガンを用いて無処理の細胞に導入を行った実験区において mRNA レベルでの発現が確認された。また、PEG の実験区においては、EF-1 のプロモーターを含むベクターでも微弱ながら発現が確認された。また、PEG の実験区においては、効率は低いものの、GUS 染色陽性の細胞が確認された。以上の結果により、円石藻 *P. carterae* における外来遺伝子の一過性発現系の確立が達成された。

### 研究テーマ B「*Pleurochrysis carterae* の形質転換系の確立」

形質転換系においては、発現用コンストラクトとして、pBI221 をベースに、プロモーターとして *P. carterae* の FCP (*fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein*) の上流配列、薬剤耐性遺伝子として、コドン改変がなされた *Aph7* (hygromycin 耐性遺伝子) である PyAph7、および CrRbcS (*Chlamydomonas reinhardtii RbcS*) ターミネータを組み込んだものを作製した。次に、プロトプラストを調整し、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて上記のコンストラクトを *P. carterae* 細胞内に導入した。変異株の選抜は、通常の培地で3日間培養を行った後、hygromycinB を含む液体培地において4週間、さらにプレート培地において4週間行った。次に、選抜された変異株のコロニーを非選択培地に移し、2か月間培養を行った後、RT-PCR とサザンブロット解析により、外来遺伝子の発現と遺伝子型の解析を行った。その結果、得られた10株の変異株すべてにおいて、PyApy7の発現が確認された。また、これらのうちの7株についてサザンブロット解析を行った結果、すべての株において外来遺伝子の挿入を示すシグナルが確認され、形質転換効率は  $10^6$  細胞あたり約7細胞であると算出された。以上の結果により、外来遺伝子のゲノムへの挿入、mRNA および機能を持つタンパク質の発現が確認さ

れ、円石藻 *P. carterae* における外来遺伝子の形質転換系の確立が達成された。

#### 研究テーマ C「ココリス形成に関与する遺伝子の機能解析」

円石藻による大規模な炭酸固定は海洋の炭素循環に大きな影響を及ぼすが、その分子機構の詳細は不明である。そこで、本研究では、ココリスに含まれる基質タンパク質を同定し、形質転換技術を用いて恒常的発現抑制株の作出を試みた。その結果、基質タンパク質遺伝子の発現抑制により、正常なココリス形成能を失った株の取得に成功し、ココリス形成の分子機構の一端を明らかにすることに成功した。

### 3. 今後の展開

これまでハプト植物門において遺伝子導入の成功例が皆無であった要因は、その特殊な細胞壁の構造に依るところが大きいと思われる。本研究で開発したプロトプラストの調製法は、強力な内在性プロモーターの発見とともに、他のハプト藻類への応用が期待されるものである。また、本技術は外来遺伝子の強制発現に限らず、内在性遺伝子の機能解析にも応用可能であることが示された。クラミドモナスや珪藻等、他の微細藻の例でも明らかなように、形質転換技術の開発は分子生物学的研究のみならず、生化学・生理学的研究諸分野の発展を強力に促すものである。そのため、本研究で開発された技術は、ハプト藻研究における大きな技術革新につながるものと期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

現在の海洋は、珪藻・渦鞭毛藻・円石藻という 3 種の微細藻類により優占されており、これらは海洋における主要な一次生産者である。これまで、前者の 2 類については、90 年代の後半に、すでに形質転換技術の確立が報告されている。そのため、本研究は、その後の約 20 年間なし得なかった技術開発に初めて成功したものであり、その点は高く評価できると考えている。その一方、本研究の期間内では、代謝改変による有用変異株の作出には至らなかった。しかしながら、今回開発した技術は、再実験を数多く重ね、再現性を完全に確認してから発表するものであり、今後、世界中の多くの研究者に利用されうるものであると自負している。変異株の作出と、その大量培養の実行にはまだ少し時間を要するが、それらの実現への基盤技術を開発した意味では、科学技術への波及効果は大きいであろうと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

本研究は、円石藻における形質転換技術の確立を軸に有用脂質を生産する品種を確立する目的で開始された。研究を開始した当初は、円石藻を含むハプト植物門全体において、同技術が適用できる種は皆無であった。その点では本研究で *Pleurochrysis carterae* 種において技術開発に成功した成果は、科学技術の発展への貢献という意味で非常に大きく評価できる。また、後半は GREST のグループとの共同研究で全ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析

といったより大規模な研究を展開し、成果を出しつつあるため、研究実施体制の管理や研究費の執行についても堅実に行っていると評価できる。一方で、開発した技術の応用利用に関しては今後の課題であり、本研究で開発された技術が多くの研究者に利用されることを期待したい。また、本研究で研究対象とした *P. carterae* 種は円石藻の中でも屋外での長期大量培養の実績がある貴重な種である。そのため、同種の代謝改変による有用脂質形成種が確立されれば、海洋性微細藻を用いたエネルギー生産の実用化への大きな手掛かりとなることが予想され、社会・経済への波及効果も大いに期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hirotooshi Endo, Megumi Yoshida, Toshiki Uji, Naotsune Saga, Koji Inoue & Hiromichi Nagasawa. Stable Nuclear Transformation System for the Coccolithophorid Alga *Pleurochrysis carterae*. Scientific Reports 6, Article number: 22252 (2016)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 1. 学会発表(平成 26 年度日本水産学会大会口頭発表)

「円石藻 *Pleurochrysis carterae* における形質転換技術の確立」

#### 2. プレスリリース

「脂質含有量が多い海洋性微細藻類、円石藻の形質転換に成功  
～脂質合成能力の強化によるバイオ燃料生産に期待～」(2016 年 3 月 7 日)

# 研究報告書

## 「クロロフィルの光毒性を利用した植食性原生動物の繁殖抑制農薬の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 柏山 祐一郎

### 1. 研究のねらい

藻類培養の現場では、培養地に侵入する原生動物による食害が大きな問題である。この現象は「自然の摂理だ、しょうがない」と言えばそれまでだが、実はここに、「原生生物が藻類の持つクロロフィルを無毒化する代謝を行なっている」という重要な秘密が隠れている。

光合成に不可欠な分子であるクロロフィルは、一方でその光増感作用によって強力な細胞毒性を示す一重項酸素の発生源となり(強い光毒性)、生命にとって危険な分子でもある。そこで私のさきがけ研究では、原生動物によるクロロフィルの無毒化代謝産物であると考えられた光毒性を示さない色素「シクロエノール」産生に着目した。すなわち、餌の藻類に含まれるクロロフィルの光毒性を回避する「シクロエノール代謝」の機構を解明し、さらにはその機能の阻害を目指した。これにより、屋外開放系などの藻類培地における原生動物の繁殖・食害を抑制する方法論が確立できる。また、将来的には、高効率・低コストな有用藻類生産を実現するための基盤技術の発明に繋げることが目標である。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

様々な微細藻類食原生生物について捕食に伴う色素代謝産物を分析した結果、シクロエノール代謝が真核生物のほぼ全ての系統で確認される、普遍性の高いプロセスであることが示された。さらに、光栄養性ユーグレノイドによるシクロエノール代謝を発見し、この単藻培養条件でも進行するシクロエノール代謝のプロセスを、*Euglena gracilis* Z 株の蛍光顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察、細胞分画実験、および極微量の試料に対する色素分析を組み合わせることで研究した。その結果、*E. gracilis* による自己の葉緑体分解現象に伴い、その最初期の段階でシクロエノール代謝が進行すること、シクロエノールとその誘導体が葉緑体分解後に形成される褐色の顆粒構造の中に局在して蓄積されることを突き止めた。この葉緑体分解現象を人為的に誘導する方法を確立したことで、*E. gracilis* の単藻培養系を用いた生化学的ないし分子生物学的な研究が可能になった。また、*E. gracilis* を包含する光栄養性ないし微細藻類捕食性のユーグレノゾア生物における、シクロエノール代謝の普遍性と進化的な連続性を示した。これによって、*E. gracilis* のシクロエノール代謝メカニズムの解明から、捕食生物のシクロエノール代謝メカニズムを研究する道を開いた。そこで、*E. gracilis* の分解途上の様々な段階にある(すなわちシクロエノール代謝がこの特定の段階で進行していると考えられる)葉緑体を単離し、現在、プロテオーム解析に取り組み、シクロエノール代謝関連酵素の特定を目指している。この目的のため、RNAi ノックダウン実験によって目的酵素を特定する実験系を確立することができた。今後、プロテオーム解析の結果を待ってシクロエノール代謝メカニズムの解明に繋がるタンパクの同定をおこなう。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 植食性プロティストによるクロロフィル代謝の多様性解明

クロロフィルの光毒性を利用した繁殖抑制の実現には、培地に侵入する多様な原生生物に広く共通する代謝を阻害する必要がある。そこで、様々な捕食性原生生物を微細藻類との二員系で培養し、クロロフィルの代謝産物に関して、超高速液体クロマトグラフィーによりスクリーニング解析をおこなった。その結果、シクロエノールを産生する生物は、真核生物のほとんどの系統に広範に遍在することが確かめられた。このことは、シクロエノール代謝が真核生物の祖先的な形質であることを示唆するとともに、関連する代謝酵素が多くの原生生物の間で普遍的である可能性を示唆する。また、シクロエノール代謝の重要性は、環境試料中からこの化合物が多量に見いだされる事実とも符合する。

### 研究テーマ B: 光栄養性ユーグレノイドによるシクロエノール代謝の研究

上述のスクリーニング解析を通して、微細藻類である光栄養性ユーグレノイドでは、単藻培養条件でもシクロエノールの蓄積が認められた。この発見は、二員培養系では困難が予想される生化学的ないし分子生物学的研究手法を、単藻培養系、特に研究の蓄積のある *Euglena gracilis* を対象に取り組む道を開くものであった。

そこで、まず、*E. gracilis* がシクロエノールを産生するメカニズムの理解を試みた。すなわち、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、さらには超遠心分離機を用いた細胞分画実験の結果を総合し、(1) *E. gracilis* は環境の変化に応じて葉緑体を分解し、(2) その際にクロロフィルをシクロエノールに変換して細胞内に蓄積させること、さらに(3) その詳細なプロセスを明らかにすることができた。すなわち、この葉緑体分解の過程ではオートファジーを示唆する構造は観察されず、代わりにシクロエノール代謝は葉緑体包膜内部で進行することが示された。クロロフィル蛍光の減衰が示唆するシクロエノール代謝のタイミングは、チラコイド膜の構造的な秩序崩壊とほぼ同時に起こっており、光合成関連タンパク質の分解との時間的な関連が強く示唆された。

ところで、この代謝はより祖先的な捕食性ユーグレノイドも含めたクレード全体の共有形質だと考えられる。よって、ユーグレノイドが葉緑体を獲得した進化の過程で、餌のクロロフィルを分解するためのシクロエノール代謝が自家のクロロフィルの分解に転用されたこと、さらには代謝の場所が食胞内から葉緑体内部に変化したことが示唆された。

### 研究テーマ C: *E. gracilis* を用いたプロテオームないしトランスクリプトーム解析と RNAi 実験

上述の考察を受けて、*E. gracilis* の葉緑体分解が一斉に誘導される条件を見つけ、シクロエノール代謝が進行中の「分解途上の葉緑体」を分画してプロテオーム解析を試み、この代謝に関連するタンパク質の候補を探索した。また、トランスクリプトームデータから、誘導により変化がみられる遺伝子を抽出し、その中から予想されるモチーフ ( $\alpha/\beta$ -hydrolase など) の有無、葉緑体にターゲットされる可能性を示す配列情報の有無、さらに捕食性原生生物の RNA-seq データとの相同性を考慮して、いくつかのシクロエノール代謝関連遺伝子の候補を絞り込みを試みた。現在、これら遺伝子に対して RNAi によるサイレンシング実験を行ない、シ

クロエノール代謝関連遺伝子の特定に関する実験を継続している。

### 3. 今後の展開

このように本研究プロジェクトでは、原生生物が光存在下で微細藻類を捕食することを可能にしている、クロロフィルの無毒化を行なうシクロエノール代謝の重要性の理解を進展させ、この代謝を制御することでクロロフィルの光毒性を原生生物の繁殖抑制に利用できる可能性を示した。今後は、現在複数のアプローチから進めている、鍵となる酵素を特定する研究を急ぎ、代謝メカニズムの全容を解明する。一方で、重要な酵素の機能を阻害する方法、例えばアプタマーや拮抗阻害を示すことが予測される酵素の遺伝子を藻類に組み込むなどの研究を進めていく。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

##### 研究目的の達成状況

本プロジェクトは、計画当初より3つの研究の柱から構成されていた。そのうち、最も早い段階から取り組むことのできた「クロロフィル無毒化代謝のプロセスと機能の解明」に関しては、もっとも研究が進展し、既に国際誌などへ公表できた研究成果も数多く得られた。すなわち、シクロエノール代謝が真核生物の様々な系統において見受けられる普遍性の高いものであることを示し、微細藻類の中にもこの代謝をおこなう系統を発見できた。また、いくつかの原生生物や微細藻類を材料として、シクロエノール代謝に関わる細胞のダイナミックな変化を理解することができた。ただし、シクロエノール代謝の機能的な側面の理解には不十分な点が残っており、この項目全体としての目標達成度は80%程度であると考えられる。

次に、2つめの研究の柱である「クロロフィル無毒化代謝に関わる酵素の特定」に関しては、まず、酵素の特定という最終目標まで到達することはできなかった。この研究は、未経験の研究手法の習得を必要としており、異動などによる研究体制の構築の遅れの影響を受けて、本格的な取り組みの開始まで2年以上を要してしまった。しかし、当初困難を予想していた原生生物と餌藻類の二員培養系に代わって、光栄養性のユーグレノイドの無菌単藻培養系を用いた実験の方法を見つけることができた。また、*Euglena gracilis* Z株を用いて、葉緑体の分解を人為的に誘導してシクロエノール代謝を進行させる方法を確立し、現在、これに基づいたプロテオーム解析を進めている。また、この代謝に関連する酵素遺伝子を特定するためのRNAiノックダウン実験系も確立させた。研究は途上であるが、この項目の目標達成度は50%程度と考える。

最後に、3つめの研究の柱である「具体的なプロティスト繁殖抑制技術の検討」については、残念ながら研究の着手ならびに進捗が大きく遅れている。これは一つには、この項目は、開始当初において、全2項目から得られた知見に基づいて詳細な研究デザインを立てることをもくろんでいたため、特に2項目目の研究の遅れが響いた。しかし、これらとは独立に、色素増感剤を培地に添加することによる繁殖阻害の実験や、シクロエノール代謝を拮抗的に阻害すると考えられる外来の遺伝子を利用する研究(これは1番目の項目の研究から得ら

れた知見に基づく)などを進めた。進捗の遅れもあり、この項目の目標達成度は20%程度であると考える。

#### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本プロジェクト開始当初は専任研究員であり、立命館大学内の貸しラボスペースを利用してとりあえずの研究環境を整備したが、着任半年で福井工業大学へ講師の身分で異動し、独立したラボを構えることになった。前任者からの引き継ぎのラボではなかったにもかかわらず、さきがけの研究費を受けて、さきがけ研究のための環境整備を行い、研究を効果的に進めることができた。期間を通して断続的に研究補助者を雇用することで、未経験であった学務に時間を割かれる中でも効率的に実験・研究ができた。

#### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究プロジェクトで取り上げた原生生物における食害の問題は、オープンポンドにおける大量培養の現場に関わっている研究者仲間や企業のアドバイザーなどから、重要な取り組みであることを評価していただいている。微細藻類が量産するクロロフィルの、光毒素としての側面を利用するという発想はユニークであるが故にチャレンジ性が高く、まずは期間内に決定的な成果を得るまでに至らなかったシクロエノール代謝のメカニズム解明が急務であると考えている。クロロフィルの光毒性の制御は、微細藻類食の原生生物に限らず、クロロフィルを通して光のエネルギーを利用する微細藻類や植物にも共通する問題であるため、その理解を深めることは、光合成生物を利用してクリーンエネルギー社会の実現を目指す人類にとっては重要な基盤知識であると信じている。よって、原生生物の食害問題を越えて、長い目で見ても価値のある研究を進めることができ、また、今後これをさらに発展させていく基盤を、さきがけという制度を通して確立できると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

#### (研究総括)

本研究は、微細藻類培養の実際の現場における大きな問題である原生生物の食害について、生化学的な視点から捉えることで問題解決を目指すという非常にユニークなものである。

残念ながら期間内に代謝酵素の特定にまでは至らなかったものの、この研究の進捗状況は期間の終盤に向けて加速しており、比較的近い将来に酵素を特定し、代謝メカニズムを解明することで、将来的には有効な技術の創成に繋がるものと期待している。

また、本さきがけ研究での取り組みが評価され、複数回の国際学会の招待講演や招待論文の投稿の機会などもあり、期間内にポスドクから教授(H28年4月予定)へと昇任した。今後も、藻類やプロティスト研究の若手のトップランナーの一人として大いに期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表



1. **Y. Kashiya**ma, A. Yokoyama, Y. Kinoshita, S. Shoji, H. Miyashita, T. Shiratori, H. Suga, S. Shoji, K. Ishikawa, A. Ishikawa, I. Inouye, K. Ishida, D. Fujinuma, K. Aoki, M. Kobayashi, S. Nomoto, T. Mizoguchi and H. Tamiaki: Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012) **109**, 17328–17335, (Feature Article).
2. **Y. Kashiya**ma, A. Yokoyama, T. Shiratori, I. Inouye, Y. Kinoshita, T. Mizoguchi, H. Tamiaki:  $13^2$ 、 $17^3$ -Cyclopheophorbide *b* enol as a catabolite of chlorophyll *b* in phycophagy by protists. *FRBS Letters* (2013) **587**, 2578–2583.
3. **Y. Kashiya**ma and H. Tamiaki: Risk management of organisms against the phototoxicity of chlorophylls. *Chemistry Letters* (2014) **43**, 148–156, (Highlight Review).
4. **柏山祐一郎**, 横山亜紀子, 民秋均: クロロフィルを制した者が光環境を征した? 光合成生物を「食べる」生き様の舞台裏. *光合成研究* (2015) **25**, 58–70.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表(招待講演)】

1. **Y. Kashiya**ma, A. Yokoyama and H. Tamiaki: Chlorophyll catabolism in aquatic ecosystems: Physiology, ecology, and evolution. *CER International workshop on Biogeochemical cycling and Microbial Ecology for Young Scientists*. Ohtsu, Japan, 2013. (国際招待)
2. **Y. Kashiya**ma: A chlorophyll catabolism by heterotrophic/mixotrophic protists in aquatic environments. *Ninth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments*. Kusatsu, Japan, 2013. (国際招待)
3. **柏山祐一郎**, 民秋均: クロロフィルを制したものが光環境を征した—プロティストと二次植物の進化. 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 奈良市, 2014. (招待)
4. **Y. Kashiya**ma, A. Yokoyama and H. Tamiaki:  $13^2$ 、 $17^3$ -Cyclopheophorbide enols as detoxified catabolites of chlorophylls – a widely distributed metabolism among phototrophic/heterotrophic protists. *Eighth International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines*, Istanbul, Turkey, 2014. (国際招待)
5. **柏山祐一郎**: 水圏プロティスト・微細藻類によるクロロフィルの無毒化代謝の発見. 第18回日本光生物学協会年会・奨励賞候補者招待講演, 大阪市, 2014. (招待)
6. **Y. Kashiya**ma, J. Kawahara, M. Nakazawa, T. Ishikawa, T. Tanaka, T. Yoshino, H. Tamiaki: Inhibiting growth of contaminated phycophagous protists in algal cultures by controlling the phototoxicity of chlorophylls. *2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, USA

# 研究報告書

## 「付加体エネルギー生産システム創成に向けた基盤技術開発」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 平24年10月～平成28年3月

研究者： 木村 浩之

### 1. 研究のねらい

2011年3月の東北地方太平洋沖地震による地震動と津波が原因で発生した福島第一原子力発電所の事故の影響で、日本国内の多くの原発が停止している。そして、日本のエネルギー自給率は6%まで低下した。その後、日本政府は原発を重要なベースロード電源の1つとして位置付け、2030年までに原発の電源構成比率を約20～22%まで回復させるとともに、水力を含む再生可能エネルギーの電源構成比率を22～24%とする方針を明らかにした。また、日本のエネルギー自給率を東日本大震災前の20%を上回る25%まで引き上げる計画も示した。このような背景から、近年では純国産エネルギーとして日本近海の海底下に眠るガスハイドレートに注目が集まっている。ガスハイドレートは、日本海や太平洋の水深1,000メートルの深海の海底下数百メートルの地層中に分布している。現在、ガスハイドレートを採掘するための技術開発が進められているが、深海のさらに海底下という低温・高圧条件下に存在するガスハイドレートから天然ガス(メタン)を経済的に採掘することは非常に困難である。このような日本のエネルギー事情から、新たなエネルギー生産技術の開発が求められている。

本研究課題では、西南日本の太平洋側の地域に広く分布する厚い堆積層(“付加体”と呼ばれている)に着目し、付加体の深部帯水層に由来する嫌気性地下水、メタンを主成分とする付随ガス、地下水に含まれる微生物群集を利用したメタン・水素ガス生産システムの創成に向けた基盤技術を開発する。特に、西南日本の付加体が分布する地域に構築された深度1,000メートル以上の大深度掘削井にて深部地下水、付随ガス、微生物群集を採集し、地球化学および微生物学的解析を試みる。そして、付加体の深部帯水層に生息する地下圏微生物の活性およびメタン生成メカニズムを明らかにするとともに、高性能の付加体エネルギー生産システムの構築が可能な地域を選定する。次に、付加体の深部帯水層に生息する微生物群集を対象としたメタトランスクリプトーム解析を試み、メタン・水素ガス生成の代謝パスウェイおよび微生物共生メカニズムを遺伝子の発現レベルで明らかにする。さらに、メタン生成・水素ガス生成リアクターに利用可能な有機基質の特定および微生物の培養条件の検討を行うことにより、メタン・水素ガスの生産能力向上を目指した技術開発を行う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、南西日本の太平洋側の地域に広く分布する付加体に構築された大深度掘削井にて深部帯水層に由来する地下水と付随ガスを採取した。そして、付加体の深部帯水層には高温の嫌気性地下水が存在すること、付随ガスには高い割合でメタンが含まれている

こと、付加体の深部帯水層では水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が共生することにより、堆積層中の有機物を分解してメタンが生成されていることを明らかにした。

さらに、12 リットル容量の中型嫌気培養槽を用いたバイオガス生成リアクターの開発にも着手した。付加体の嫌気性地下水を中型嫌気培養槽に採取し、酵母エキス、ペプトン、グルコースからなる混合有機基質を添加してインキュベートしたところ、短時間でメタン生成に成功した。さらに、付加体の嫌気性地下水に混合有機基質とメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加し、インキュベートしたところ、短時間で水素ガス生成を実現した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「付加体の地下圏微生物の活性およびメタン生成メカニズムの解明」

静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部の付加体が分布する地域に構築された深さ1,000メートル以上の大深度掘削井(それぞれ14カ所、6カ所、4カ所)にて、地下水および付随ガスを採取した。地上部にて、地下水の水温、pH、酸化還元電位、電気伝導率といった環境データを測定した。その結果、地下水は水温30～52℃の範囲で比較的高温であること、pHは7.2～8.9と弱アルカリ性であること、酸化還元電位は-300～-110 mVと還元的(嫌気性)であることが示された。また、付加体の深部地下水の電気伝導率は、111～5,690 mS m<sup>-1</sup>(NaCl濃度に換算した場合、0.1～3.6%)と多様性があることが明らかになった。特に、静岡県中西部および宮崎県南東部の山間部の付加体の地下水の塩濃度は低く、これらの地域の深部帯水層は天水の影響を受けていることが示された。一方、沖縄本島の付加体の地下水の塩濃度は高く、これらの地域の深部帯水層は海水の影響を受けていることが示唆された。

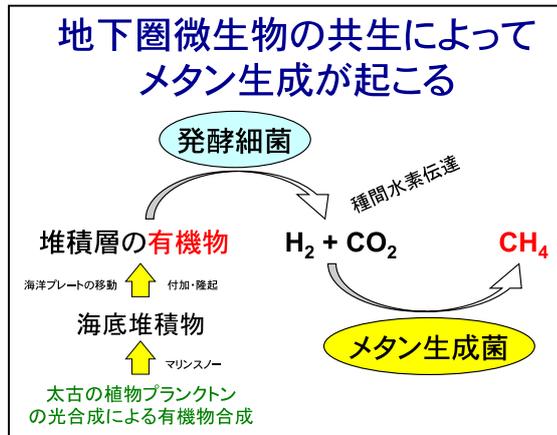
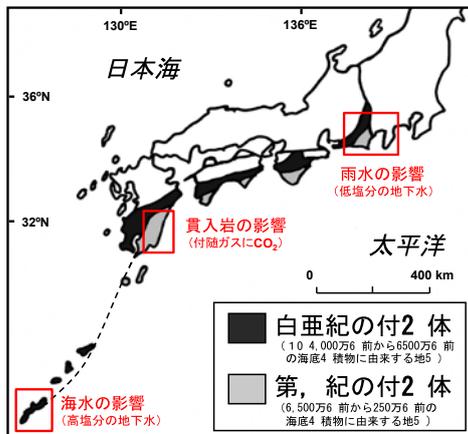
付加体の深部帯水層に由来する付随ガスの化学分析を行った結果、多くの大深度掘削井にて採取された付随ガスは、90～98%という高い割合でメタンを含んでいることが示された。一方、静岡県中西部の山間部に位置する大深度掘削井にて採取された付随ガスにおいては、50～80%の割合でメタンが含まれていることに加えて、20～50%の割合で窒素ガスが含まれていることが示された。このことは、深部帯水層中でメタン生成に加えて微生物脱窒による窒素ガス生成の可能性を示唆する結果であった。

次に、付随ガスに含まれるメタンおよび地下水に溶存する無機炭素(主に、重炭酸イオン)の炭素安定同位体比分析を行った。その結果、多くの付加体サイトにおいて微生物起源のメタンが含まれることが示された。

また、地下水に含まれる微生物群集を対象とした嫌気培養も試みた。付加体の大深度掘削井から採取した嫌気性地下水にメタン生成菌の各種栄養基質(酢酸、ギ酸、メタノール、H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>)を添加した嫌気培養を行ったところ、地下水にH<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>を添加した培養系からのみメタンが検出され、水素資化性メタン生成菌の高い活性が示された。一方、地下水に混合有機基質(酵母エキス+ペプトン+グルコース)とメタン生成菌に特異的な阻害剤(bromoethanesulfonate, 20 mM)を添加した嫌気培養においては、ほとんどのサイトにて発酵細菌が増殖し、高速での水素ガス生成が確認された。さらに、地下水に混合有機基質(酵母エキス+ペプトン+グルコース)を添加した水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌からなる微生物共生コンソーシアを対象とした嫌気培養を行ったところ、ほぼ全てのサイトにおいて高速でのメタン生成が確認された。

以上の結果より、付加体の深部帯水層では水素発生型発酵細菌と水素資化性メタン生成菌が共生することにより、堆積層中の有機物を分解してメタンが生成されていることが示された。また、このような現象は、静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部といった西南日本の太平洋側の付加体が分布する広い地域で共通して観察されたことから、付加体の深部帯水層での地下圏微生物によるメタン生成は普遍的な現象であることが示された。

以上の一連の研究結果より、西南日本の付加体の深部帯水層に生息する水素発生型発酵細菌および水素資化性メタン生成菌は非常に高い活性を有することが明らかとなった。さらに、西南日本の太平洋側の非常に広い地域において付加体エネルギー生産システムの構築が可能であることが示された。よって、高性能の付加体エネルギー生産システムの構築が可能なエリアを選定するという本研究課題の目的が達成されたといえる。



#### 研究テーマ B「付加体の地下圏微生物の代謝パスウェイおよび微生物共生の解明」

静岡県中西部、宮崎県南東部、沖縄本島南部の付加体分布域に構築された大深度掘削井より、嫌気性の地下水を採取した。2 リットルの地下水を孔径 0.22 μm のハウジングフィルターでろ過し、地下水に含まれる微生物細胞を濃縮した。次に、微生物細胞を濃縮したフィルターから Total DNA を抽出し、PCR 法を用いてバクテリアおよびアーキアに由来する 16S rRNA 遺伝子を増幅した。次に、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq を用いて、1 サンプルあたり約 3 万リードのシーケンスを決定した。16S rRNA 遺伝子を対象とした網羅解析の結果、アーキアよりもバクテリアに分類される細菌が優占することが明らかとなった。さらに、バクテリアにおいては、水素発生型発酵細菌が優占していた。また、静岡県中西部の山間部の付加体エリアから採取した低塩分の嫌気性地下水においては、脱窒細菌も数多く検出された。一方、アーキアにおいては、水素資化性メタン生成菌が優占していた。また、割合は高くはないが酢酸資化性メタン生成菌の 16S rRNA 遺伝子も検出された。

メタン生成菌の現場での活性を検証するために、メタン生成菌に特異的な補酵素 F430 の直接検出、定量を行った。静岡県中西部の付加体分布域に構築された大深度掘削井より、嫌気性地下水を採取した。10 リットルの地下水を孔径 0.22 μm の大型フィルターでろ過し、地下水に含まれる微生物細胞を濃縮した。その後、有機溶媒を用いて酵素群および補酵素群を抽出した。抽出物を生成したのち、Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) にて補酵素 F430 の構造を確認し、LC-MS-MS を用いて F430 の定量を行った。その結果、すべての

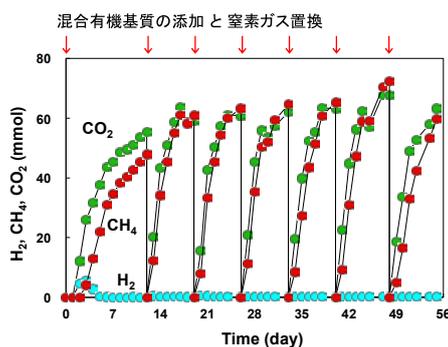
サイトからメタン生成菌に特異的な補酵素 F430 が検出された。この結果より、付加体の深部帯水層にてメタン生成菌が現在も高い活性を有し、活発なメタン生成を行っていることが示された。さきがけ期間中に当初の研究目的が、概ね達成されたといえる。

#### 研究テーマ C「付加体の地下圏微生物を利用したメタン・水素ガス生成リアクターの開発」

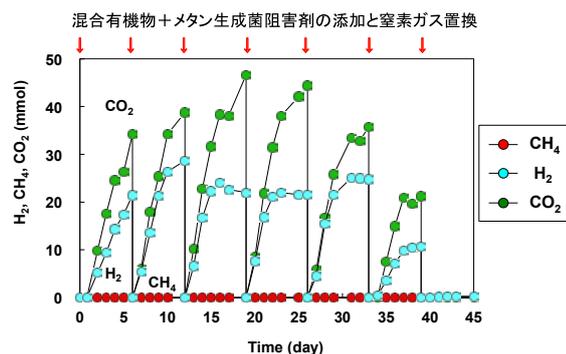
静岡県島田市の温泉施設が所有する大深度掘削井(深度 1,489メートル)より嫌気性地下水を採取し、中型嫌気培養槽へ嫌気的に注入した。地下水に含まれる付随ガスを窒素ガスで置換したのち、酵母エキス、ペプトン、グルコースからなる混合有機基質を添加した。その後、地上にて計測した地下水の水温(40°C)プラス 15°Cの温度(55°C)にてインキュベートした。24時間毎に、液相の pH と吸光度(OD<sub>600</sub>)、気相の圧力をそれぞれ測定した。また、ガスクロマトグラフを用いて、気相の水素ガス、窒素ガス、メタン、二酸化炭素の濃度を測定した。さらに、ミリガスカウンターを用いて、生成されたバイオガス量を1時間毎に測定するとともに、メタン生成速度を算出した。その結果、最終濃度 1.0%の混合有機基質を添加したメタン生成リアクターにおいて、地下水1リットルあたり17.8 mmol day<sup>-1</sup>(399 ml day<sup>-1</sup>)のメタン生成を実現した。

一方、水素ガス生成リアクターの開発においても、静岡県島田市の温泉施設が所有する大深度掘削井より嫌気性地下水を採取し、中型嫌気培養槽へ嫌気的に地下水を注入した。地下水に含まれる付随ガスを窒素ガスで置換したのち、酵母エキスとグルコースからなる混合有機基質を添加した。さらに、メタン生成菌に特異的な阻害剤(2-bromoethanesulfonate, 20 mM)も添加した。その後、55°Cにて嫌気的にインキュベートした。24時間毎に、液相の pH および吸光度(OD<sub>600</sub>)と気相の圧力を測定した。また、ガスクロマトグラフを用いて、気相の水素ガス、窒素ガス、メタン、二酸化炭素の濃度を測定した。さらに、ミリガスカウンターを用いて、生成されたバイオガス量を1時間毎に測定するとともに、水素ガス生成速度を算出した。その結果、最終濃度 0.2%の混合有機基質を添加した水素ガス生成リアクターにおいて、地下水1リットルあたり最速 23.4 mmol day<sup>-1</sup>(1,213 ml day<sup>-1</sup>)の水素ガス生成を記録した。

### メタン生成リアクター



### 水素ガス生成リアクター



付加体の嫌気性地下水とそこに含まれる微生物群集を利用したバイオガス生成リアクターの開発において、培養開始から2~3日という短時間でのメタン生成および水素ガス生成に成功した。また、有機基質とともにメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加することにより微生物群集のコントロールが可能となり、高速で水素ガスを生成する技術の開発に繋がった。一連の研究により、付加体の地下圏微生物を用いたメタン・水素ガス生成リアクターの技術開発が進み、さきがけ研究期間における研究目的は達成されたといえる。

### 3. 今後の展開

付加体は、静岡県中西部から中部、近畿、四国、九州、そして沖縄の太平洋沿岸の広い範囲に分布している。特に、東海や中部地方においては、日本有数の工業地帯と付加体の分布域が一致する。今後、電力需要の高い工場の敷地内等において付加体エネルギー生産システムを構築することにより、送電ロスのない地産地消エネルギーの生産を目指す。一方、付加体が分布する太平洋沿岸の地域は年間の日射量が多く、農業の盛んな地域でもある。この地域では、温室やビニールハウス内にてメロンやトマト、キュウリ、イチゴ、ナス、エダマメといった農作物が盛んに栽培されている。付加体エネルギー生産システムは、付加体の深部帯水層にて生成されたメタンと陸上のバイオリクターにて生成されたメタンを使ってガスエンジン発電機を作動させ、電気と熱を生産する。さらに、メタンを燃焼させた際に二酸化炭素も発生する。将来的には、西南日本の付加体が分布する地域の農業施設において、本システムを構築することにより、電気、温水、熱風、二酸化炭素を自家的に生産・供給する次世代の農業施設の開発も試みる。

近年、日本では巨大地震や大規模な水害、土砂崩れなどが発生した災害時にインフラを確保するための技術の開発が急務の研究課題となっている。付加体エネルギー生産システムは、“地下水・ガス・電気”を自家的に供給することができるエネルギー生産システムでもある。よって、災害時には、避難所や病院、広域防災拠点、空港、救援物資輸送基地、自衛隊・警察・消防の人命救助活動基地などにおいて重要な役割を担うことが期待できる。特に、付加体が分布する西南日本の太平洋側の地域は、東海・東南海・南海地震の被害想定域である。今後、地元自治体と連携して、防災分野での付加体エネルギー生産システムの高度利用を推進する。

海洋プレートが沈み込むことによって形成される付加体は、台湾、インドネシア、トルコ、ペルー、チリ、イタリア、ニュージーランド、米国アラスカ州・ワシントン州といった諸外国においてもその分布を見ることができる。今後は、付加体エネルギー生産システムおよび災害ステーションでの高度利用に関する基盤技術を海外へ移転する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

さきがけ期間中に、付加体の深部帯水層に存在するメタンの生成メカニズムについて明らかにすることができた。特に、付加体の深部帯水層において水素発生型発酵細菌と水素酸化性メタン生成菌が高い活性を有すること、これらの微生物群集が共生して堆積層中の有機物を分解してメタンを生成すること、西南日本の付加体の深部帯水層において微生物によるメタン生成は普遍的な現象であることを見出した。一連の研究成果により、南西日本の太平洋側の付加体が分布する広大な地域において、付加体エネルギー生産システムの創成が可能であることが示されるに至り、本研究課題の目的が達成されたといえる。

加えて、付加体の嫌気性の地下温水とそこに含まれる微生物群集を利用したバイオガス生成リアクターの開発においては、高効率のメタン生成および水素ガス生成に成功した。さらに、有機基質とともにメタン生成菌に特異的な阻害剤を添加することによりリアクター内の微生物相のコントロールが可能となり、高速水素ガス生成のための技術開発に繋がった。本研究成果により、付加体の地下圏微生物を用いたメタン・水素ガス生成リアクターの開発が

進み、さきがけ研究期間における研究目的は十分に達成されたといえる。

さらに、地元自治体と協力して温泉施設の大深度掘削井より湧出するメタンを利用した発電事業の立ち上げにも貢献した。特に、地元の温泉施設が改正鉱業法に基づく特定区域の指定を受けるに至ったことは特記に値する。温泉メタンガスの利活用事業の立ち上げに関する成果は社会・経済への波及効果も大きく、評価できる研究成果である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

バイオエネルギー生産に付加体という厚い堆積層とその深部帯水層に生息する微生物群集を利用するという、ユニークで面白い研究課題であった。さきがけ期間中に当初の研究計画を進めるとともに、実際のエネルギー生産の地産地消モデルの立ち上げにも尽力した。応用面でも研究を進め、社会的なインパクトは非常に高いといえる。実用化にほぼ目処がついたことは非常に評価できる。本研究プロジェクトは社会実装にまで発展する研究成果を上げており、将来的に全国的な波及も大いに期待できる。

今後、更に付加体の地下圏微生物の生物学的解析を進めれば、この一連の研究開発の深みも増し、インパクトも大きくなると期待できる。また、微生物群集のメタン生成への寄与をより具体的に解明することによって、産業応用に貢献してもらいたい。

本さきがけ研究者は、さきがけ期間内の研究成果が認められ、所属機関において講師から准教授へ昇任した。また、国内学会および国際学会での招待講演や新聞報道も増えるなど、本研究分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。今後の展開が大いに期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hiroyuki Kimura, Kousuke Mori, Toshiro Yamanaka, Jun-Ichiro Ishibashi. Growth temperatures of archaeal communities can be estimated from the guanine-plus-cytosine contents of 16S rRNA gene fragments. <i>Environmental Microbiology Reports</i> , 2013, 5, 468-474
2. Chie Katsuyama, Hiroaki Nashimoto, Kazuyo Nagaosa, Tomotaka Ishibashi, Rakeshi Kinoshita, Hideki Yoshikawa, Kazuhiro Aoki, Takahiro Asano, Toshito Sasaki, Rumi Sohrin, Daisuke Komatsu, Urumu Tsunogai, Hiroyuki Kimura, Yuichi Suwa, Kenji Kato. Occurrence and potential activity of denitrifiers and methanogens in groundwater at 140 m depth in Pliocene diatomaceous mudstone of northern Japan. <i>FEMS Microbiology Ecology</i> , 2013, 86, 532-543
3. Masanori Kaneko, Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi, Susumu Asakawa, Takeshi Watanabe, Seigo Shima, Nanako O. Ogawa, Martin Krüger, Makoto Matsushita, Hiroyuki Kimura, Naohiko Ohkouchi. Quantitative analysis of coenzyme F430 in environmental samples: a new diagnostic tool for methanogenesis and anaerobic methane oxidation. <i>Analytical Chemistry</i> , 2014, 86, 3633-3638
4. Koji Mori, Atsushi Yamazoe, Akira Hosoyama, Shoko Ohji, Nobuyuki Fujita, Jun-ichiro Ishibashi, Hiroyuki Kimura, Ken-ichiro Suzuki. <i>Thermotoga profunda</i> sp. nov., and <i>Thermotoga caldifontis</i> sp. nov., anaerobic thermophilic bacteria isolated from terrestrial hot springs. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> , 2014, 64, 2128-2136
5. Kyohei Baito, Satomi Imai, Makoto Matsushita, Miku Otani, Yu Sato, Hiroyuki Kimura. Biogas production using anaerobic groundwater containing a subterranean microbial community associated with the accretionary prism. <i>Microbial Biotechnology</i> , 2015, 8, 837-845

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 1. 主要な学会発表

- Makoto Matsushita, Hiroyuki Kimura. Microbial methane production and carbon cycle in deep aquifer associated with the accretionary prism. 9th International Symposium on Subsurface Microbiology (ISSM 2014). California, USA. 2014 年 10 月
- Hiroyuki Kimura. Microbial methane production and carbon cycle in subterranean environment associated with the accretionary prisms. 9th Japanese-French Frontiers of Science (JFFoS) Symposium. Kyoto, Japan. 2015 年 1 月
- 木村浩之、松下 慎、石川修伍. 付加体の深部地下水循環と微生物メタン生成・脱窒ポテンシャル. 日本地球惑星科学連合 2015 年大会「同位体水文学 2015」セッション、千葉市、2015 年 5 月

- Hiroyuki Kimura, Makoto Matsushita, Shugo Ishikawa. Regional variation of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub> production processes in deep aquifers associated with the accretionary prism in Southwest Japan. 14th Taiwan–Japan International Workshop on Hydrological and Geochemical Research for Earthquake Prediction. 2015 年 9 月
- 松下 慎、石川修伍、眞柄健太、平田悠一郎、木村浩之. 付加体の深部帯水層におけるメタン生成及び窒素ガス生成メカニズムの地域特性. 日本微生物生態学会第 30 回大会、土浦市、2015 年 10 月

## 2. 受賞

- 静岡大産学連携奨励賞(2014 年 4 月 14 日)

## 3. 著作物

- 木村浩之. 南西日本の地下圏微生物を利用した付加体エネルギー生産システム. クリーンエネルギー. 2013, 22, 27–32
- 木村浩之. 付加帯エネルギー生産システム ～地下圏微生物を利用した新たな創エネ技術～. 配管技術. 2013, 55, 31–36
- 木村浩之. 付加体の深部地下圏に生息する微生物群集を利用した自立分散型エネルギー生産システム. ケミカルエンジニアリング. 2013, 58, 8–13
- 木村浩之、松下 慎、梅藤恭平、今井里弥、津島一平、大谷実来、佐藤 悠. 陸上掘削による地域資源革命 ～付加体の地下圏微生物を利用したメタン・水素ガス生産～. 月刊地球. 2014, 36, 101–108
- 木村浩之. 難培養微生物研究の最新技術 III, 第 26 章 地下圏微生物によるメタン生成と分散型エネルギー生産技術への応用. 2015, シーエムシー出版

## 4. 新聞報道

- 静岡新聞朝刊 19 ページ(2013 年 1 月 18 日)
- 静岡新聞朝刊 19 ページ(2013 年 3 月 15 日)
- 静岡新聞朝刊 17 ページ(2013 年 3 月 18 日)
- 中日新聞朝刊 11 ページ(2014 年 4 月 15 日)
- 静岡新聞朝刊 7 ページ(2014 年 4 月 15 日)
- 日本経済新聞朝刊 15 ページ(2016 年 1 月 18 日)
- 静岡新聞朝刊 21 ページ(2016 年 1 月 24 日)
- 静岡新聞朝刊 21 ページ(2016 年 2 月 11 日)

# 研究報告書

## 「藻類の光吸収制御のための理論的基盤の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 齊藤 圭亮

### 1. 研究のねらい

藻類を利用したエネルギー生産においては、単一種の藻類だけが使用されるため、その種に固有の限られた波長の光だけしか利用できません。藻類にもっと広い帯域の光を吸収させ、そのエネルギーを有効に利用させることができれば、生産効率の向上が期待されます。そのためには色素や周辺の蛋白質の構造をチューニングし人為的に光吸収を制御する技術が重要です。本研究では、色素の吸収帯がどの波長にあり、それがどうして決まっていて、色素に吸収されたエネルギーは蛋白質内・蛋白質間でどのように伝達され、利用されているのかを蛋白質構造に基づいた理論解析により調べます。これにより、光吸収を制御するための残基の置換や色素改変の方向性を定めること目指します。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

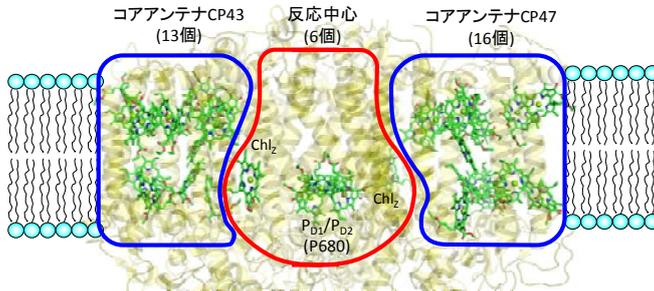
藻類や植物は太陽光を利用してエネルギーを作り出しています。そのために、光エネルギーを効率的に捉え、伝達し、利用するための様々なしくみが備わっています。本研究では蛋白質の構造に基づいた理論解析により、そのしくみの一端を分子レベルで明らかにすることに成功しました。藻類は蛋白質に含むクロロフィルなどの色素の「向き」と「かたち」を巧みに制御することで、吸収された光エネルギーを中心部に伝達し、水分解反応に利用していたのです。ここで得られた天然の藻類に対する新しい知見と、本研究で確立された理論解析法を藻類の人為的な制御へ応用することで、光合成を利用したバイオエネルギーの生産性をもっと高められる可能性があります。

#### (2) 詳細

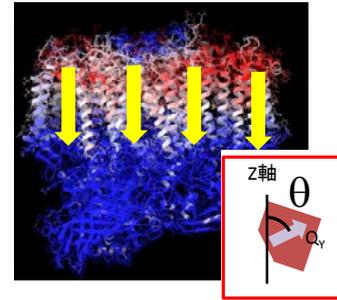
##### (A) 光化学系 II(高等植物・緑藻など)の光吸収とエネルギー伝達のしくみの解明

光合成で水分解・酸素発生を行っている光化学系 II 蛋白質では、全部で 40 個近いクロロフィル分子が埋め込まれており、これらのクロロフィル色素が協働してエネルギーを蛋白質の外側から中心部へ送っています。そのしくみを明らかにしました。それぞれの色素は、存在する場所によって膜に対する色素の「向き」を変えることによって光吸収エネルギーを調整していました。これにより、光エネルギーを蛋白質の外側から中心部へと流すしくみになっていることが分かりました。

(a) 光化学系 II の模式図



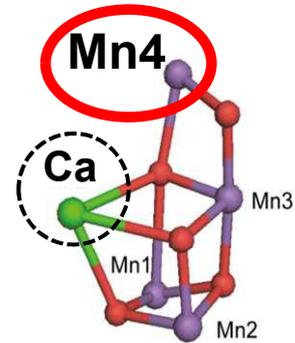
(b) 蛋白質が作る電場と色素の配向



光化学系 II に含む多数のクロロフィル色素(a)は蛋白質の作る電場と色素の配向(b)を利用して吸収波長制御を行うことで、エネルギーを中心に伝達していた。

(B) 水分解反応を実現するマンガン錯体のかたちの謎の解明

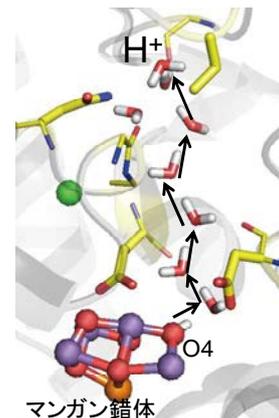
光化学系 II で中心部(反応中心)へ伝達されたエネルギーは、活性部位のマンガン錯体において、水を酸素とプロトンに分解されるために使われます。マンガン錯体は「歪んだ椅子」の形をしています。このかたちこそ水分解反応の要となっていて考えられていますが、その分子的な原因は明らかになっていませんでした。歪みの原因はマンガン錯体にカルシウム原子(Ca)が一つだけ含まれていることによるとの仮説もありました。しかし、蛋白質に対する量子化学計算を行ったところ、歪みの直接の原因は「椅子」の「台座」部位に存在する Ca ではなく、そこから離れた「背もたれ」部位に一つだけ存在するマンガン原子(Mn4)であることが明らかになりました[論文 3]。



マンガン錯体の「歪んだ椅子構造」の原因は Ca 原子ではなく Mn4 原子であった。

(C) 水分解反応におけるプロトン移動機構の解明

マンガン錯体では光のエネルギーを利用して水が酸素とプロトンに分解されます。このとき錯体上で放出されるプロトンは、後の反応を進めるために、蛋白質の外へと速やかに排出されます。このプロトンがどのようにして蛋白質の外部へと放出されるのか、プロトン放出機構とその通り道を明らかにしました。プロトンはマンガン錯体の近くから蛋白質の外へと続く「水分子の鎖」を通して排出されることが分かりました[論文 4]。この通り道は水分解の第一段階で使われると考えられ、第二段階以降ではまた別の通り道が利用されていると考えられています[論文 1, 2]。



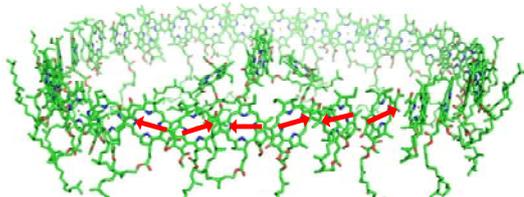
マンガン錯体で生成されたプロトン(H+)は水分子を通じて外へ排出される。

(D) LH1(紅色光合成細菌)の光吸収とエネルギー伝達

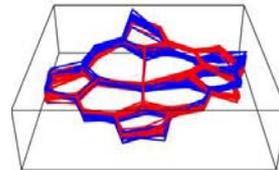
光化学系 II と共通の祖先を持つと言われる紅色光合成細菌の反応中心は、LH1 アンテナ

蛋白質に取り囲まれています。LH1も光化学系Ⅱと同様に多くのクロロフィルを持ち、光エネルギーを吸収し中心部へ伝達しています。そのしくみを光化学系Ⅱと比較しつつ調べました。光化学系Ⅱではクロロフィルの「向き」が重要でしたが、LH1について調べたところ、「向き」はすべての色素で同一であるにもかかわらず、吸収エネルギーは異なっていることがわかりました。このことから、光吸収エネルギーを決めるのに色素の「かたち」も重要な役割をしていることが明らかになりました。実際、個々の色素のかたちを解析してみるとそれぞれに異なったゆがみ方をしていました。LH1蛋白質は円環状の形をしています。中に細長い反応中心蛋白質が入っているため、よくみると楕円状にゆがんでいます。この例に端的に表れているように、LH1の中に存在する反応中心が非対称的な形をしていることが、円環状に配置されている個々の色素のかたちが異なっている原因でした。

(a) LH1における色素配置



(b) LH1に含む色素の構造の重ね合わせ



紅色光合成細菌の LH1 では、色素は対称的に配置されているためその向きはすべて同じであるが(a)、色素の形はそれぞれに異なっていた(b)。

以上のように、実際の光合成生物が利用している蛋白質は、クロロフィルなどの色素の「向き」と「かたち」を制御して、効率良く光のエネルギーを吸収・伝達し、利用していることが明らかになりました。それだけにとどまらず、そのエネルギーをどのように利用して水分解反応を行っているのか、その第一歩まで明らかにすることが出来ました。

本研究で明らかになったこれらのしくみは光合成生物の進化の過程で得られたものです。したがって、光合成生物が「生きる」ために既に最適な設定になっていると考えられます。しかし、「生きる」ことに最適化された蛋白質であっても、「バイオエネルギーを生産する」という人工的な目的に対しては、必ずしも効率が良くなっているとは限りません。蛋白質内の色素の向きやかたち、水分子の有無などを人為的に改変することにより、光合成を利用したバイオエネルギーの生産性をもっと高められる可能性があります。

### 3. 今後の展開

本研究では、光合成蛋白質が光エネルギーを効率良く吸収・伝達するために利用している戦略を分子レベルで明らかにし、藻類の光エネルギーの吸収・伝達・利用を人為的に制御するための基礎的な知見を得ることが出来ました。これらはすべて理論解析により明らかになったことです。今後は、どのような変異を行えば効率を上げられるのかを理論的に予測するだけでなく、実際の藻類に対する実証研究も、実験研究者と協力して行っていきたいと思っております。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究で当初より掲げていた目標は、色素の吸収帯がどの波長にあり、それがどうして決まっいて、色素に吸収されたエネルギーは蛋白質内・蛋白質間でどのように伝達され、利用されているのかを蛋白質構造に基づいた理論解析により調べるということです。さがけ研究費は主に理論解析を行うために必要な高速計算機とソフトウェアの購入に当てました。領域会議においてアドバイザーの先生方から助言を頂きつつ、その目標に向かって研究を行った結果、実際の光合成生物が利用している蛋白質は、クロロフィルなどの色素の「向き」と「かたち」を制御して、効率良く光のエネルギーを吸収・伝達し、利用していることを明らかにすることができました。さらに、そのエネルギーをどのように利用して水分解反応を行っているのか、全部で4段階からなる水分解反応の第一段階を明らかにすることが出来ました。このような成果を得られたことから、当初の研究目標をほぼ達成できたと言えるのではないかと考えています。今後は、本研究から得られた天然の藻類に関する知見を活かすことで、光吸収を制御するための残基の置換や色素改変の方向性を提示していきたいと考えています。これには実験研究者との協力が欠かせませんが、幸いこのさがけ領域に参画出来たおかげで、さがけだけでなくCREST領域に属する実験研究者との人脈を得ることができました。この人脈を最大限に利用し、実際の藻類で私の理論研究の成果を実証することが次の目標です。これを実現し、本さがけ研究の成果を実際の社会に還元できたらうれしく思っています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

当初設定した研究のねらいに則して、色素の吸収帯がどうして決まっいて、色素に吸収されたエネルギーはどのように伝達されているのかを明らかにするという研究目的をほぼ達成した。さらに、その先の光エネルギーを利用した水分解過程の解明にまで研究の段階を進めている。理論解析という手法で藻類の光エネルギー利用のしくみにせまることが出来た本研究の成果は大変画期的であり、科学技術への波及効果は大きい。また、研究成果をハイインパクトな学術雑誌で論文発表している点も高く評価できる。

本研究で培われた理論解析手法は応用範囲が広いため、この分野だけにとどまらず生体を対象とした分子科学に関するさまざまな分野において役立てることができ、今後、研究成果がどのような方向に展開されるのか大いに楽しみである。

研究者として、採用時はJSTの専任研究者としての参画であったが、現在、東京大学先端科学技術研究センター講師へと昇任し、研究者としての大きな飛躍につながった。今後は、本研究分野の若手のトップランナーとしてさらなる活躍を期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. K. Saito, A. W. Rutherford, H. Ishikita 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 7690-5.



- |   |
|---|
| 2. H. Ishikita, K. Saito 2013 <i>J. R. Soc. Interface</i> , 11, 20130518.     |
| 3. K. Saito, H. Ishikita 2014 <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 1837, 159-166.  |
| 4. K. Saito, A. W. Rutherford, H. Ishikita 2015 <i>Nat. Commun.</i> , 6:8488. |
|   |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞:

「日本物理学会若手奨励賞」2014年3月

プレスリリース:

1. 「光合成酸素発生反応で利用される蛋白質内のプロトン移動経路を発見」

(京都大学、2013年4月16日)

[http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news\\_data/h/h1/news6/2013/130416\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130416_1.htm)

2. 「光合成の中核をなす「歪んだ椅子」構造の謎をついに解明」

(大阪大学、2013年10月15日)

[http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/10/20131015\\_1](http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/10/20131015_1)

3. 「光合成水分解反応初期に利用される水素イオン移動経路を解明」

(東京大学、2015年10月7日)

[http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/pressrelease/pdf/271007release\\_rcast.pdf](http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/pressrelease/pdf/271007release_rcast.pdf)

主要な学会発表:

Keisuke Saito, "Mechanisms of Long-Distance Proton Transfer in Photosynthetic Protein", the Seventh Asia-Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC 7), 2016年1月、高雄、台湾、招待講演

# 研究報告書

## 「巨大光捕集器官クロロソームを利活用した生理活性物質・脂質の大量蓄積系の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 塚谷 祐介

### 1. 研究のねらい

光合成の初期過程は、太陽光を捕獲してそのエネルギーを伝達するアンテナ部と、伝達された光エネルギーから化学エネルギーへの変換を行う反応中心部に分かれる。微弱な光環境で生育する光合成微生物は、『クロロソーム』と呼ばれる特殊な集光アンテナ器官を持つ。クロロソームは、糖脂質と蛋白質から成る一重膜に覆われた小胞状オルガネラであり、その内腔の疎水的環境には蛋白質が存在せず、多量の色素分子のみが含まれており、物質生産/蓄積の場に資する(図1左)。緑色硫黄細菌のモデル生物である *Chlorobaculum tepidum* では、1つのクロロソームあたり約 200,000 分子以上のバクテリオクロロフィル-c (BChl-c) 色素のロッド状自己会合体と約 20,000 分子のカロテノイドが含まれており、微弱光環境における光捕集と高効率な光エネルギー伝達に適応している。BChl-c 色素は、蛋白質の関与が無くても *in vitro* の有機溶媒中で自己会合体を形成することが知られており、光ナノデバイスとして人工光合成等への応用が検討されている。一方で、BChl と同様に多量に含まれるカロテノイドの応用研究は行われておらず、またクロロソームが生体内でどのようにして形成されるのかについては不明のままである。本研究では、BChl とカロテノイドの生合成経路を解明・改変することで、有用色素をクロロソーム内に蓄積する細菌株を作出することを目指している。また、将来的なクロロソームの応用範囲拡大のために、クロロソームの特性および形成過程(色素や糖脂質がどのように生合成され、どのように相互作用してクロロソームに選択的にアSEMBルしてオルガネラを形成するのか)を解明することを目指している。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

クロロソームを構成する要素を大別すると、小胞膜を構成する糖脂質と Csm 蛋白質、および、内腔を埋める BChl とカロテノイドに分けられる。研究テーマ A では、Csm 蛋白質の多重欠損変異株から糖脂質を抽出し、蒸発光散乱検出器を連結した HPLC を用いて糖脂質組成を調べた。その結果、特定の Csm 蛋白質の欠損株では特定の糖脂質が増減するという関係性が見られ、それらの Csm 蛋白質-糖脂質間の相互作用がクロロソームのサイズ・形状を決定するのに重要であると示唆された。研究テーマ B では、クロロソームを構成する BChl の生合成経路を解明することができた。また、近赤外吸収素材として産業的応用が期待される BChl-b の生合成経路を明らかにすることができ、クロロソームにこの色素を蓄積する株の作製を試みている。細胞膜で生合成された色素をクロロソーム内へトランスポートすると推定される蛋白質を見出した。研究テーマ C では、緑色硫黄細菌 *C. tepidum* のカロテノイド合成経路を改変して、 $\beta$ カロテンをクロロソーム内に蓄積する株を構築することができた。各テーマの

詳細は以下に述べる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「糖脂質の凝集に関わる Csm 蛋白質」

クロロソーム小胞膜には、光合成細菌の種にもよるが、約 10 種類の蛋白質が介在する (図 1 参照; CsmA/B/C/D/E/F/H/I/J/X)。このうち、CsmA はクロロソームの基底部 (ベースプレート) を構成し、内部 BChl-*c* 会合体から反応中心側へのエネルギー移動を担っていることが知られているが、その他の Csm 蛋白質の機能は不明である。10 の Csm 蛋白質は、アミノ酸配列の情報からさらに 4 つのモチーフ・ファミリーに分けられる。また、細胞膜を構成するリン脂質とは異なり、クロロソーム小胞膜を構成する脂質組成の過半数は糖脂質である。緑色硫黄細菌 *C. tepidum* のクロロソームには大別して 2 種類の糖脂質があり、それらは単糖類のモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) と二糖類のラムノシルガラクトシルジアシルグリセロール (RGDG) である。本研究テーマでは Csm 蛋白質を一重、二重、あるいは三重に欠損した変異株の糖脂質組成を解析した。CsmA 以外の蛋白質の一重欠損株は (CsmA は欠損致死)、野生株とほとんど同じ糖脂質成分組成を示した。しかし、CsmCDH および CsmIJ 蛋白質モチーフ・ファミリー内の二重・三重欠損株では、それぞれ MGDG および RGDG の相対的な減少が測定された (Tsukatani et al., 2016)。このことは、阻害剤添加によって特定の糖脂質が合成阻害されたときの Csm 蛋白質組成解析からもサポートされた (Mizoguchi et al., 2013)。つまり、CsmCDH はモノガラクト脂質である MGDG と、CsmIJ はジガラクト脂質である RGDG と相互作用することが示唆され、その結果としてこれらの Csm 蛋白質群がクロロソーム形態形成に関わることを示唆された。

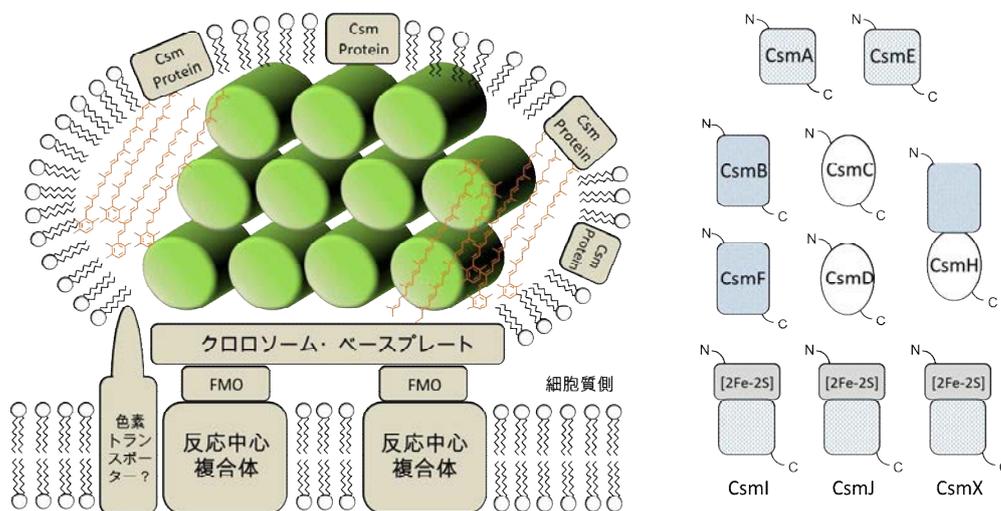


図1(左)クロロソームとその周辺蛋白質複合体の模式図。(右)Csm 蛋白質モチーフ・ファミリーの概略図。

### 研究テーマ B 「クロロソーム BChl 色素の生合成経路解明と色素輸送蛋白質の探索」

クロロソーム内腔には、細菌の種によるが、BChl-*c*、*d*、あるいは *e* の会合体が詰まっている。さらにベースプレート部には BChl-*a* が結合していると考えられている。これらの色素群は、生合成経路内でどれもクロロフィリドという中間体から分岐して合成される (図 2)。本研究テーマでは、BChl-*c/d/e* に共通して作用する C3 位水和酵素として BchFV を同定・機能解析

した(Harada et al., 2015)。酵素欠損変異株のクロロソーム解析から、C3 位のヒドロキシエチル基が、色素の自己会合体を形成する上で重要な側鎖であることが示された。BChl-e の生合成経路で働く C7 位ホルミル化酵素 BciD および C20 位メチル化酵素 BchU を同定した。また色素生合成系を改変して BChl-b を蓄積する株の作製を試みた。BChl-b は天然色素の中で最も長波長側(近赤外光領域)に吸収極大を持つため、タンデム型色素増感太陽電池や光線力学療法などへの産業利用が期待できる。ベースプレート部の BChl-a を BChl-b に変えることで、測定が難しいベースプレートの分光特性を明らかにすることも狙った。しかし、研究開始時点では BChl-b の合成経路が不明であったため、まずはこれを明らかにし、その後紅色細菌モデル生物を用いて、酵素の欠損置換によって BChl-a 生産性が BChl-b 生産性に変わること確かめた(Tsukatani et al., 2015)。現在、緑色硫黄細菌での欠損置換変異株の作製を行っているところである。

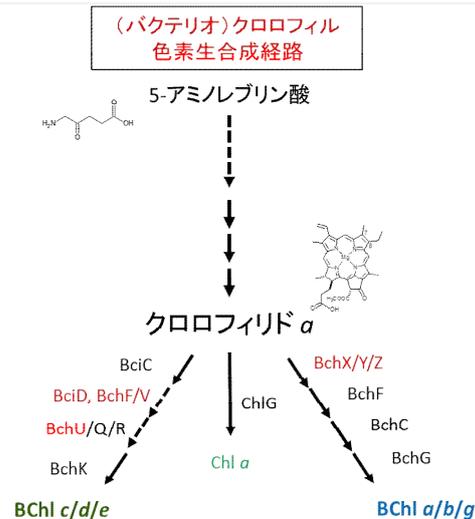


図2. 色素生合成系の概略図

クロロソーム内の色素同族体組成が、生育時間経過とともに変化すること、および生育が定常期到達後も変化することを初めて示した(Tsukatani et al., 2013)。組成変化に該当する色素合成酵素がクロロソームには局在しないことから、細胞膜で合成された色素をクロロソーム内部へトランスポートする蛋白質の存在が示唆された。クロロソーム保有光合成細菌のゲノム比較から、トランスポーター様蛋白質の候補遺伝子群を見出し、これらの蛋白質がクロロソーム近傍に局在すること、欠損させると BChl-c 会合体の吸収極大がシフトすることが分かった。さらにこれら候補蛋白質のうち1つは BChl-c と相互作用することが示唆され、色素トランスポーター蛋白質の最有力候補である。

### 研究テーマ C 「β-カロテン産生株の創出」

緑色硫黄細菌モデル生物の *C. tepidum* では、クロロソームに含まれるカロテノイドは、クロロバクテンという分子種である。*C. tepidum* のカロテノイド生合成経路は、研究開始時点で既にほとんどが同定されていたため、遺伝子工学的に生合成系を改変することで、クロロバクテンのかわりに生理活性物質として有用な βカロテンとアスタキサンチンをクロロソーム内に蓄積する変異株の作製を試みた。具体的には、不飽和化酵素 CrtU を欠損させ、近縁種の *cruB* 遺伝子を導入することでクロロバクテン生合成経路をバイパスさせて βカロテン合成株の作製には成功したが、アスタキサンチン合成株の作製には至らなかった。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A では、特定の Csm 蛋白質ファミリーと糖脂質との相互作用を見出した。今後は Csm 蛋白質の欠損/大量発現を組み合わせることで、クロロソームのサイズをより大きくすることで内部へ物質蓄積量を上げる。クロロソームというオルガネラにだけ糖脂質が集まるという

現象は、植物細胞内における葉緑体が糖脂質で構成されるという状況と似ている。つまり基礎科学への波及としては、クロロソームが糖脂質で形成される生理的意義やメカニズムが分かれば、植物葉緑体形成の理解が進み、ひいては農業面への応用に繋がる可能性がある。

研究テーマBでは、得られた色素生合成経路の知見を元に、近赤外線吸収素材として応用が期待される BChl-*b* を蓄積する緑色硫黄細菌変異株の作製を継続する。生合成された BChl 色素のクロロソームへの輸送機構は、ようやくトランスポートに関わる蛋白質の足がかりを掴んだところである。今後は、輸送機構の詳細なメカニズムや包膜形成の仕組みを明らかにしていくことで、色素以外の有用物質、特に疎水性物質をクロロソーム内腔へ蓄積させる系の構築に繋げていきたい。

研究テーマCでは、βカロテンを蓄積する緑色硫黄細菌株を作製することができた。今後は、これまで不明であったクロロソーム内でのカロテノイドの生理的意義を、得られた変異株および他のカロテノイドを生産する株を用いて解明することが期待できる。さらに、生理活性物質として有用なアスタキサンチンの生合成系改変までを目指したが研究期間内では到達できなかった。緑色硫黄細菌が嫌気培養を要するために導入したケト化酵素がうまく機能しなかったことが考えられる。近縁の嫌気性細菌から見つかったケト化酵素をβカロテン産生株へ導入して目標達成へ繋げたい。BChl-*c* を全く合成できなくした変異株クロロソームでは野生株の2倍量のカロテノイドが存在することが明らかとなったため、今後はこれら変異を組み合わせることで、有用物質の蓄積量を上げることが可能となるであろう。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究ではこれまで不明な点が多かったクロロソーム構成成分の特性を理解するだけでなく、クロロソーム形成過程のモデルを提唱することが出来た。クロロソーム小胞膜中の蛋白質と糖脂質の相互作用が明らかになったことは、今後クロロソームを物質生産へ利用するためには画期的な結果だった。クロロソームのサイズを自在に調整するという目標への道筋は付けられたであろう。また、色素生合成系に関わる未解明の酵素を次々に同定することができ、(既に合成経路が解明されていた BChl-*a*, *d* を除く) BChl-*b*, *c*, *e*, *g* の合成経路を完結することができた事は個人的に感慨深いものがあった。全ての BChl 合成系が明らかになったことで、得られた知見を元に変異導入によって光合成生物に本来持っているものとは異なる様々な色素を合成させ、生物の光利用の進化過程を実験室内で再現・検証するという新たなテーマに進展させたい。研究構想の段階では、クロロソームを構成する成分の特性や相互作用を解明するだけでなく、それらの成分が合成される時間的・空間的情報を得たいと考えていたが、研究期間のほとんどを特に未解明の色素合成経路の研究に費やしたことで実現には至らなかったことが悔やまれる点である。さきがけ研究の潤沢な資金のおかげで、これまで手を出したくても躊躇していたクロロソームの網羅的な研究によりやく着手することが出来た段階とも言える。困難ではあるが今後も正面からこの研究対象と向き合っていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

(研究総括)

多くの系統群の光合成細菌で見られるクロロソームについて、これまであまり研究が進んでこなかった特殊な光捕集蛋白質複合体を研究材料として、構成分子のキャラクタリゼーションなどの基礎研究を中心としながら、色素生合成系の改変等による応用を目指した研究を行った。クロロソーム蛋白質と糖脂質との相互作用や色素生合成経路について、全体像を明らかにするなどの成果を挙げた。また、特許申請など社会実装を見据えた取り組みも評価できる。今後は、これまで培った光合成細菌の研究経験を活かして植物等へ新たな研究の幅を広げるとともに、独自の技術基盤に立ったオリジナリティーある研究を展開することを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Harada, J., Takasaki, S., Yoshitomi, T., and Tamiaki, H. (2013) Cyclopropane-ring formation in the acyl groups of chlorosomal glycolipids is crucial for acid resistance of green bacterial antenna systems. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3689-3694.
2. Tsukatani, Y., Harada, J., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2013) Bacteriochlorophyll homolog compositions in the *bchU* mutants of green sulfur bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 2195-2201.
3. Harada, J., Teramura, M., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yamamoto, K., Tamiaki, H. (2015) Stereochemical conversion of C3-vinyl group to 1-hydroxyethyl group in bacteriochlorophyll *c* by the hydratases BchF and BchV: adaptation of green sulfur bacteria to limited-light environments. *Mol. Microbiol.* 98, 1184-1198.
4. Tsukatani, Y., Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Fujita, Y., Mizoguchi, T., and Tamiaki, H. (2015) *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways. *Sci. Rep.* 5, 9741.
5. Tsukatani, Y., Mizoguchi, T., Thweatt, J., Tank, M., Bryant, D.A., and Tamiaki, H. (2016) Glycolipid analyses in envelope protein mutants of light-harvesting chlorosomes of *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth. Res.* In press.

(2)特許出願

研究期間累積件数：国内1件、国際1件

1.

発明者：塚谷祐介、民秋均、原田二郎、藤田祐一、野亦次郎  
発明の名称：バクテリオクロロフィル *b* の大量産生方法及び産生菌  
出願人：学校法人立命館、学校法人久留米大学  
出願日：2014/02/19  
出願番号：特願 2014-030085

国際特許 PCT-JP2015- 54552 (2015/02/19)



(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際学会(招待講演)】

1. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Chlorophyllide *a* oxidoreductases, important nitrogenase-like enzymes with versatile functions. Second International Symposium on Biosynthesis of Tetrapyrroles (November 30-December 2, 2012, Shiga, Japan)
2. Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Nomata, J., Mizoguchi, T., Fujita, Y., and Tamiaki, H. Chlorophyllide *a* oxidoreductase catalyzes the formation of an ethylidene group of bacteriochlorophyll *b*. 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (June 22-28, 2014, Istanbul, Turkey)

【国内学会(招待講演)】

3. 塚谷祐介 「ニトロゲナーゼ類似酵素による光合成色素合成の多様性と応用」 蛋白研セミナー「嫌気蛋白質を対象とした構造・機能相関の現状」、大阪大学蛋白質研究所、2015年3月5日

【総説】

4. 塚谷祐介, 民秋均 (2015) 近赤外光を吸収するバクテリオクロロフィル色素の生合成経路解明と応用. 生化学 87, 234-238.
5. 塚谷祐介, 民秋均, 溝口正 (2015) 光合成細菌の脂質. 光合成研究 25, 151-159.
6. Tamiaki, H., Teramura, M., and Tsukatani, Y. (2016) Reduction processes in biosynthesis of chlorophyll molecules: chemical implication of enzymatically regio- and stereoselective hydrogenations in the late stages of their biosynthetic pathway. Bull. Chem. Soc. Jpn. 89, 161-173.