

マリンバイオミネラルリゼーション

— 海洋微生物による酸化鉄・水素・石灰の生産 —

東京農工大学工学部物質生物工学科
教授 松永 是

海洋バイオテクノロジー

1) これまでの経緯

国内での経緯

海洋生物や生態系を対象とした総合バイオ技術マリンバイオテクノロジーが、新しい世代のバイオテクノロジーとして登場したのは1987年頃である。海洋バイオテクノロジーに本格的に取り組む気運が学界に高まり、水産、理学、農学、薬学、工学などの各分野から代表的な研究者が集まり、マリンバイオテクノロジー研究会が1988年発足した。

通産省では、大プロのテーマとして1988年高機能化学製品等製造法（海洋生物活用）を取り上げ、海洋バイオテクノロジー研究所をスタートさせた。1990年には、清水と釜石に鉄工業海洋利用技術センターを建設、24社の参加企業が集中して海洋バイオテクノロジーの研究を行うようになった。

海外での経緯

伝統あるウッズホール、スクリプス両海洋研究所やマイアミ大学、ハワイ大学の海洋学部を中心に海洋生物の研究が続けられてきた。1988年頃からメリーランド大学やカリフォルニア大学サンタバーバラ校で、マリンバイオテクノロジーセンターが設立され、トランスジェニックフィッシュなどの海洋生物の遺伝子レベルでの研究に力が入れている。欧州ではフランスが最も海洋生物の研究が活発で、IFRMER、CNRSが中心となり、研究に取り組んでいる。また、日本と同様、マリンバイオテクノロジーの研究会が組織されている。この他、オーストラリア、カナダなどもマリンバイオテクノロジーの研究が行われている。国際会議・国際学術誌

このような中で、1989年の9月に第1回のマリンバイオテクノロジーの国際会議が東京で開催された。引き続き1991年には、米国のボルチモアで第2回の国際会議が行われた。第3回は、1994年にノルウェーで開かれる予定である。また、国際学術誌Journal of Marine Biotechnologyも、1992年の12月に第1号が、Springer Verlag社から発行される。従来 of 学問分野が、国際会議や国際学術誌いずれも欧米のイニシアティブのもとに進められてきたのに対し、海洋バイオテクノロジーは国際会議、国際学術誌とともに我が国が世界でイニシアティブをとり、進めてきた。

海洋バイオテクノロジーのこれまでの研究成果

これまでの海洋バイオテクノロジーの成果としては次のようなものがある。

<魚介類>

魚介類関連では、染色体操作が行われた。メスの魚ばかり作り出す雌性発生技術や、魚の大型化や耐塩性の付与ができる二倍体や三倍体の作製が可能になった。また、サケ、マグロ、ブリ、タイ、ウナギなどの脳下垂体から成長ホルモンが分離され、構造決定およびその遺伝子の大腸菌でのクローニングが行われ、大腸菌に成長ホルモンを生産させることができるようになった。

<藻類>

大型藻類関連では、ノリやコンブでプロトプラストが作成され、細胞融合が行われた。マコンブ、ジャイアントケルプ、ホンダワラなどを育て、メタン、肥料、飼料、アルギン酸などの生産も行われた。微細藻類関連では、宿主-ベクター系の確立や遺伝子のクローニングがなされた。また、微細藻類により、γ-リノレン酸やEPA（エイコサペンタエン酸）などの有用脂肪酸、フィコシアニン、β-カロチンなどの色素の生産が行われてきた。固定化微細藻類による水素、アンモニア、グルタミン酸生産などの研究も行われた。

<微生物>

微生物関連では、共生微生物の研究で多くの成果が得られた。例えば、フグの毒として有名なテトロドトキシンがVibrio属やAlteromonas属などの海洋細菌により産生されることが明らかになった。プロテアーゼインヒビター、抗菌物質、植物ホルモンを作る海洋微生物も報告された。光合成細菌のベクター系の確立や水素生産などの研究もある。海洋バイオテクノロジーの主要技術をまとめて表に示す。

2)ここ1～2年の動き

地球環境問題と海洋バイオテクノロジー

最近の海洋バイオテクノロジーの大きな動きの特徴は、地球環境問題への展開である。化石燃料の利用や森林の伐採に伴う、大気中のCO₂濃度の上昇は、いわゆる温室効果(Greenhouse effect)を引き起こし、地球温暖化の原因となるといわれている。フロンによりオゾン層破壊も進んでいる。また、酸性雨や流出原油により汚染も各地で起こっている。重金属により汚染、都市ゴミの増大、河川や海洋の環境破壊なども数多くの問題を引き起こしている。海洋は地球の表面の7割を占め、炭素や窒素循環において重要な場となっている。このため、地球環境問題における海洋バイオテクノロジーの役割は極めて重大である。

海洋微細藻類によるCO₂固定

化石燃料の燃焼に伴い排出されるCO₂の低減化処理法としては、液化または固化による海洋投棄、化学処理、生物処理などがある。生物処理は、植物、大型藻類、微細藻類によるCO₂固定がある。単位面積当たりのCO₂固定能力を比べた場合、微細藻類が最も効率がよいと言われている。特に、海洋微細藻類は、太陽エネルギーと海水のみで、CO₂を固定し、生育することができるために注目されている。海洋バイオテクノロジー研究所の宮地、小玉らは火力発電所などで直接排

出される約20%のCO₂を含むガスを気相としても、非常に早い生育を示す *Chlorococcum littorale* の分離に成功した。高CO₂濃度で生育できる微細藻類の研究は、電中研、三菱重工・関西電力グループ、東大先端研グループでも行われている。

筆者らと小野田セメント、東京学芸大岡崎のグループは、石灰藻 *Emililiana huxley* を用いてバイオソーラーリアクターによるCO₂固定について検討を行った。このとき、固定されたCO₂の37%はCaCO₃になり、残りは藻体有機成分となることが明らかになった。しかも、光合成と石灰化が同時に起こるために、pHの低下が起こらなかった。サンゴ礁などでいわれている、石灰化に伴うpHの低下と溶存CO₂の大気への放出は、光合成が十分行われていれば問題にならないということが示唆された。また、写真に示すように *E. huxley* などの石灰藻は藻体外にきれいに型の整った石灰の結晶を作る。これらは、酸素固定の担体、濾過、セラミックセンサ素子などにも応用できることが示された。関西電力、新潟大の白石ら、海洋バイオテクノロジー研究所の宮地らも、*E. huxley*、*Pleurochrysis carterae* を用いてCO₂固定と石灰化の研究を行っている。

この他、CO₂固定に関与するカーボニックアンヒドラーゼ、RuBPカルボキシラーゼ、PEPカルボキシラーゼなどの酵素の単離や遺伝子クローニング、光ファイバーや太陽光集光装置を用いたバイオソーラーリアクターの研究も進んでいる。

石油分解

アラスカ沖や、ベルシャ湾における原油流出により、海洋における石油分解に急に関心が高まった。特に、米国では、流出原油のバイオレメディエーション（生物的修復）のための多くの研究がここ数年間なされている。Exxonのグループは数種類の石油分解菌と栄養物を同時に散布して原油の分解を行っている。石油分解菌によって、多くの脂肪族炭化水素や芳香族炭化水素は分解されるが、分岐鎖脂肪族炭化水素、置換芳香族炭化水素、含窒素・含硫炭化水素などは難分解性成分として残る。今後は、これらの分解と原油分解の正確なモニタリングやシュミレーションが重要な課題となろう。

深海生物の探索

数千メートルの海底は、高圧で特異な環境を形成している。熱水鉱床のまわりには、100℃以上の高温でも生育できる生物が存在している。これまで、深海生物の研究は米国とフランスが中心で行ってきた。近年、有人潜水調査船しんかい6500が建造され、海洋科学技術センターの堀越らのグループが深海微生物のスクリーニングを行っている。深海微生物によるプロテアーゼや制限酵素の産生を報告している。

海洋生物の新機能

海洋生物の有する耐塩、耐圧などの様々な機能が注目されている。筆者らは回遊魚の地磁気を感知する機能に着目し、そのセンサとなる磁気微粒子をカツオの脳から抽出することに成功した。実際に、磁気微粒子の生成を確認したことにより、mRNAなどの回収も可能になった。すでに、磁性細菌から磁気微粒子生成遺伝

子の単離が行われており、これらを用いたハイブリダイゼーションにより、回遊魚の磁気微粒子生成遺伝子の分離が行われている。

その他

魚介類の分野では、メダカやゼブラフィッシュに成長ホルモンやルシフェラーゼ遺伝子を直接導入するトランスジェニックフィッシュの技術が急速に高まった。カナダのトロント大学のHewらは抗凍結遺伝子をサケに導入することに成功した。日水の井上らは、マイクロインジェクションやエレクトロポレーションをトランスジェニックフィッシュの作製に用いた。

貝類の生物付着は、発電所の取水パイプや船底で大きな問題となっている。これらの付着防止技術の研究にも、近年関心が高まっている。従来のトリブチルスズや塩素に代わる、環境汚染を引き起こさない付着防止剤の開発や汚染塗料の開発が行われている。海洋バイオテクノロジー研究所では、ムラサキガイやフジツボ付着阻害物質を海洋微生物から分離している。静大の伊奈らは植物成分から汚染防止物質を得ている。筆者らと、大機ゴム・九州電力のグループは、ゴムやプラスチックにグラファイトカーボンを含有させ、発電所の配管内に取り付け、約1Vの電位をかけることにより防汚に成功した。すでに1年間の長期運転を2度終了し、現在実用化を検討している。

3)今後の見所

以上、主な最近の海洋バイオテクノロジーの研究成果を述べてきた。ここには、述べるができなかったが、共生微生物、海洋新素材、養殖、レセプター、酵素、生理活性物質などの分野でも、目ざましい結果が得られている。今後、海洋バイオテクノロジーの研究は、地球環境問題の関連とますます深くなるであろう。また、海の生物の歴史は37億年と言われているが、陸上の生物の歴史は3億年にすぎない。この間の生物進化のカギは、海洋生物にあり、16s rRNAの遺伝子解析などによる解明が期待される。また、生物の多様性を明らかにすることも必要であろう。このような基礎研究のもとに、新たな海洋バイオテクノロジーの応用の道が開けるだろう。海洋バイオテクノロジーの研究は時間と労力を要するが、我々の興味をますます引きつける多くのテーマがある。今後の研究の進展に期待したい。

藻類培養によるCO₂固定

大気中のCO₂濃度の増加による、地球環境への影響が問題になっている。藻類は太古から、CO₂固定に大きな役割を果たしてきた。特に、微細藻類は単位面積当たりの生育速度も早く、CO₂固定能も高いためその応用が期待されている。この微細藻類の能力をさらに発揮させるために、光分散型ファイバーを用いるバイオソーラーリアクターを用いて、藍藻*Synechococcus* sp.の高密度培養によるCO₂固定を行った。さらに、円石藻*Emiliania huxleyi*を用いてコッコリス超微粒子の生産を行い、CO₂をCaCO₃の形で固定することを試みた。

1. はじめに

地球が誕生した45億年前の原始大気は97%ものCO₂を含有し、その分圧は30気圧にも達していた¹⁾。当時は酸素もなく、オゾン層も存在しなかった。このため、太陽光中の紫外線が地表に降り注ぎ、陸上は生物が生存できる環境ではなかった。約27億年前、藻類の一種である藍藻が出現し、酸素発生型光合成が始まった。その藻類が発生した酸素が蓄積し、地球にオゾン層が形成された。陸上に生物が登場したのは、約4億年前である。

化石燃料の燃焼によるCO₂の大気中への放出が地球環境温暖化の原因とされている。CO₂の生物固定は陸上植物、藻類により行われているが、大気中のCO₂濃度の増加を制御するためには、CO₂の生物固定の役割はきわめて重要である。特に、藻類は地球の歴史でも、CO₂固定に大きな役割を果たしてきた。また、地球の7割を占める海での炭素循環も藻類が担ってきた。ここでは、藻類のCO₂の固定について、その機構や応用について解説する。

2. 藻類とは

酸素発生型の光合成を行う生物のうち、維管束植物とコケ植物以外のものをまとめて藻類と呼んでいる。藻類には、コンブ、ワカメ、ノリなどの大型藻類から、クロレラ、スピルリナなどの微細藻類までである。図1に藻類の系統樹を示す。これらは藻類の光合成色素、貯蔵多糖、チラコイド膜構造などをもとに分類したものである。ここに挙げたほとんどの藻類は海産である²⁾。

3. 藻類によるCO₂固定の機構

一般に藻類のCO₂固定の機構はC₃型植物と同様である³⁾。図2に藻類によるCO₂固定の模式図を示す。空気中のCO₂は中性付近では、主にHCO₃⁻となって溶け込む。藻類細胞は、HCO₃⁻およびCO₂の形で無機炭素を取り込む。細胞内に入った無機炭素を固定する酵素は、Rubisco (リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ)である。RubiscoはHCO₃⁻は利用せず、CO₂のみを基質とする。藻類にはカーボニックアンヒドラーゼと呼ばれるHCO₃⁻をCO₂へ変換する

酵素もある。藻類の細胞質や細胞膜に存在するカーボニックアンヒドラーゼは水中の HCO_3^- を CO_2 に変換して、細胞への CO_2 供給を速めている。固定された CO_2 はカルビン回路を経て、デンプンやショ糖として藻体内に貯蔵される。この他、無機炭素の固定に関与する酵素としては、PEPカルボキシラーゼ（ホスホエタノールピルビン酸カルボキシラーゼ）がある。PEPカルボキシラーゼは、 HCO_3^- の形で無機炭素を取り込み、ホスホエタノールピルビン酸からオキサロ酢酸を生成する。藻類のPEPカルボキシラーゼの活性は高いが、 C_4 植物のように無機炭素を濃縮して、 CO_2 をRubiscoに供給する働きはないとされている。

近年、Rubiscoやカーボニックアンヒドラーゼの分子生物学的な研究の進展が著しい。Rubiscoの遺伝子は、陸上生物では大小2つのサブユニットが葉緑体と核に別々にコードされているのに対し、藻類では、いずれも葉緑体ゲノム上に存在した。カーボニックアンヒドラーゼは大小2つずつのサブユニットからなり、低 CO_2 濃度条件下で転写・翻訳され、活性発現する。

4. バイオソーラーリアクターを用いる藻類による CO_2 固定

藻類は海や湖などに存在して、 CO_2 固定を行っている。その中でも、藍藻や緑藻などの微細藻類は、太陽エネルギー、水とわずかな無機栄養源から極めて高い効率で CO_2 固定を行い、生育することができる。例えば、米ならば $1.2 \text{ g/m}^2/\text{day}$ のバイオマスが得られるのに対し、ある種の藍藻や緑藻などの微細藻類は、 $100 \text{ g/m}^2/\text{day}$ の生産が可能である。現在、実際の商業生産に用いられている微細藻類としては、クロレラ、スピルリナ、ドナリエラなどがある。培養方法は、ほとんどが粗放的な屋外培養方式であった。微細藻類を用いて CO_2 固定をより効率的に行うためには、その光合成能を十分に引き出すことのできる培養システムが必要となる。

微細藻類は CO_2 固定および生育をコントロールする要因としては、光、 CO_2 、窒素・リン・鉄などの無機栄養源の供給がある。これらの供給が、律速にならないようにすることにより、微細藻類が持つ CO_2 固定能力を発揮させることができる。例えば、光供給について考えると、 $8 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ の濃度で藍藻Synechococcus sp.を培養し、まわりから $1000 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ の光照射を行うと、表面から5cmで光強度は3%に、10cmではほとんど光が当たらないということが明らかになった。微細藻類の CO_2 固定および生育を最大にするためには、培養槽や池内にできるだけ均一に、大量の光を供給する必要がある。このような光供給の問題点を解決するために、いろいろのタイプの光合成培養装置が開発された⁴⁾。

筆者らは、図3のような光分散型ファイバーを用いるバイオソーラーリアクターを用いて、藍藻Synechococcus sp.の高密度培養による CO_2 固定を行った。2Lのバイオソーラーリアクターには、外径1mmの光分散型ファイバーが1mm間隔配置されているため、光供給が制限にならないようになっている。この他 CO_2 供給、培地の NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 Fe^{3+} の濃度を十分になるようにした。その結果、 CO_2 固定

量は12時間で2.2g/l、藻体収量は1.0g/lと最大となった。これまでの通常の培養と比較すると約30倍の値である⁵⁾。

一般に、海洋での微細藻類の生育量は約0.1gC/m²/dayといわれている。鉄が十分にあると、約3gC/m²/day、窒素、リンなどの栄養が十分に加えられると72gC/m²/dayまで上昇する。さらに、ここで述べたように光ファイバーを用いて十分に光を供給すると生育量は4320gC/m²/dayに達することが明らかになった。

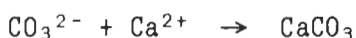
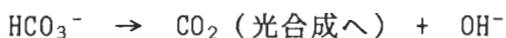
以上のように高効率で得られた藻体の利用方法としては、タンパク源や油脂としての利用がある。また、藻体から抽出される有用物質としては、フィコビリタンパク、β-カロチン、不定胚成熟促進物質^{7,8)}、エイコサペンタエン酸(EPA)、γ-リノレン酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)、アラキドン酸、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、チロシナーゼ活性阻害物質などがある。

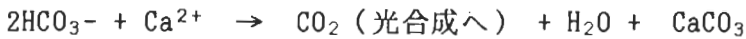
光合成による効率的なCO₂固定方法の1つとしては、光合成産物をそのまま細胞外に分泌させることがあげられる。細胞分裂、生長などの細胞構築は、必要最小限に抑制し、CO₂を目的の物質に変換し、細胞外に生成する。このため、藻体からの有用物質の抽出操作等が不要になる。微細藻類が細胞外に生産する有用物質としては、グルタチオン、グリコール酸、硫酸多糖、アンモニア、水素などが報告されている。前述の光分散型ファイバーを用いたバイオソーラーリアクターによる *Synechococcus* sp.によるグルタミン酸の藻体外生産を行ったところ、10g/g·cell/dayのグルタミン酸生産量が得られた。CO₂からグルタミン酸への変換効率は最高28%であった。これは、通常の培養の約15倍の生産速度であった⁶⁾。

5. 藻類による石灰化

藻類の中で炭酸カルシウムを形成するもの総称して石灰藻と呼んでいる。ハプト藻のゲフィロカプサ属、エミリアニア属、プレウロクリシス属、ヒメノモナス属、オクロスフェラ属、およびコックスフェラなどのプレート状の炭酸カルシウム粒子を形成する分類群を総称して、円石藻と呼んでいる。円石藻類は、カットに示すような形状の整った炭酸カルシウムからなる殻を表面に付着している。このような化石は中世代ジュラ紀(約2億年前)以降に堆積した地層に豊富に含まれ、石灰質堆積物の形成に重要な役割を演じてきたことを示している。最近、海洋における円石藻の大発生が人工衛星から確認され、1~2カ月間で形成される炭酸カルシウムは数万トンにも及ぶことが報告されている。

円石藻は光合成と石灰化の両方でCO₂を固定するために、効率的なCO₂の固定を行う藻類として期待される。しかも、炭酸カルシウムとして固定されたCO₂は、有機物のように再び完全に消費されてCO₂に戻ることはない。





海水中の HCO_3^- は CO_2 となり、光合成に用いられる。このとき生じた OH^- はもう一分子の HCO_3^- と反応して、 CO_3^{2-} が生成する。海水中の CO_3^{2-} 濃度が増し、 Ca^{2+} 濃度との積が CaCO_3 の溶解度積を越せば、 CaCO_3 が形成され沈澱する⁷⁾。

筆者らは、円石藻*Emiliania huxleyi*および*Pleurochrysis carterae*を用いて、 CO_2 固定およびコッコリス微粒子の生産を行った。*E. huxleyi*の場合、固定された CO_2 の37%が CaCO_3 となり、残りの63%はバイオマスとして有機物となった。*P. carterae*の場合は、17%だけ CaCO_3 として固定された。前述のバイオソーラーリアクターを用い、太陽光集光装置を用いて集光した太陽光を光ファイバーで伝送して、*E. huxleyi*により CO_2 を固定し、同時にコッコリス超微粒子の生産を行った。

*E. huxleyi*により生産されるコッコリスは、直径1~3 μm の超微粒子で、表面積も1gと非常に大きい。このため、酵素やタンパク質の固定化担体、濾過用材料、セラミックセンサの素子として利用できることが示された⁸⁾。

6. おわりに

微細藻類による CO_2 固定と石灰化を中心に藻類の CO_2 固定について述べた。今後、さらに微細藻類による CO_2 固定を実際のプロセスに用いるためには、 CO_2 固定能力に優れた微細藻類の探索、機能の改善が必要である。さらに、微細藻類の機能を解明し、その能力を最大限に発揮させなくてはならない。また、 CO_2 固定を主目的とする以上、培養システムの運転をできるだけ低エネルギーで効率的に行う必要がある。同時に、実際の海洋を利用するシステムも考案していかなければならないだろう。

参考文献

- 1) 大森, 須賀, 後藤編 海洋生物の石灰化と系統進化, 東海大学出版 (1988)
- 2) 藤田善彦, 大城 香, ラン藻という生きもの, 東大出版会 (1989)
- 3) 宮地重遠編, 現代植物生理学 I 光合成, 朝倉書店 (1992)
- 4) Yuan-Kuu Lee, Trends in Biotechnol. July 186-189 (1986)
- 5) Takano, H., Takeyama, H., Nakamura, N., Sode, K., Burgess, J.G., Manabe, E., Morio, H. and Matsunaga, T. Appl. Biochem. Biotechnol. 34/35, 449-458 (1992)
- 6) Matsunaga, T., Takeyama, H., Sudo, H., Oyama, N., Ariura, S., Takano, H., Manabe, H., Hirano, M., Burgess, J.G., Sode, K. and Nakamura, N. Appl. Biochem. Biotechnol. 28/29, 157-167 (1991)
- 7) 岡崎 恵視, 繊維と工業, 46(7), 292 (1990)
- 8) 松永 是, 高野博幸, 化学と工業, 43(8), 648 (1992)