

[招待論文]

循環型社会に向けた微細藻類の ポテンシャル

Potential of Microalgae in Sustainable Society

伊藤 卓朗

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任助教 / さきがけ、JST

Takuro Ito

Project Research Associate, Graduate School of Media and Governance, Keio University/
PRESTO, JST

仲田 崇志

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任講師

Takashi Nakada

Project Assistant Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

Abstract: 栄養欠乏などのストレスにより中性脂質を蓄積するオイル産生藻類は、単位面積当たりのバイオマス生産量が大きく、次世代バイオ燃料の原料として期待されている。実用化に向けては安定生産とコスト削減はもちろんのこと、土地や水、培地成分などの長期にわたる持続的利用が求められる。本稿では、休耕田を再利用した藻類の培養に向けた研究と、代謝改変による高生産株を得るための大規模な代謝解析について紹介する。

Oil-rich algae are potentially promising as a next-generation biofuel feedstock. These algae have high biomass productivity per unit culture area, and accumulate a large amount of neutral lipids under stress conditions such as nutrient deficiency. From a perspective of practical applications, it is important to increase production stability, to decrease cost, and to realize sustainable utilization of culture area, wastewater, and fertilizer. We describe parts of our approaches; reuse of fallow paddy fields for algal cultivation and large-scale metabolic analyses for metabolic engineering.

Keywords: オイル産生藻類、循環型社会、バイオ燃料、野外培養、代謝解析

oil-rich algae, sustainable society, biofuel, outdoor culture, metabolomics

1 想定される循環型社会

京都議定書（気候変動に関する国際連合枠組条約における「気候変動に関する国際連合枠組条約の京都議定書」）が発効された2005年以降、石油をはじめとする化石燃料に変わる持続的利用可能な燃料やエネルギーの探索が盛んになった。これは、地中から掘り起こした化石燃料の燃焼により大気中の二酸化炭素濃度が上がり、地球温暖化や将来の健康被害の要因になると予測されたためである。また、石油と天然ガスの可採年数（現状で経済的に利用継続可能な年数）は50年余りの有限資源であり、熱量あたりの価格は2004年ごろから長期的上昇傾向にある（経済産業省, 2014）。一方、大気中の二酸化炭素を光合成により固定して作られる植物バイオマスは、燃焼しても地球規模での二酸化炭素濃度は変わらないカーボンニュートラルで持続的に利用可能な素材とされている。当初、利用技術が確立していたサトウキビやトウモロコシなどの糖質から作られるバイオエタノールとナタネやアブラヤシなどの脂質から作られるバイオディーゼルが、それぞれガソリンと軽油の代替燃料として利用が促進された。しかし、これら食用作物を原料とするバイオ燃料は、生産拡大にともない、食糧価格の高騰や耕作地開発による森林伐採、栽培肥料からの温室効果ガス発生など、弊害や持続性に関する問題点が指摘され、バイオ燃料の評価基準を見直す提案がなされた(Melillo *et al.*, 2009)。これに対し、微細藻類は、食糧と競合しない、培養装置のプラント化に適する、陸上植物に比べて単位面積あたりの二酸化炭素吸収量及びオイル産生量が格段に多い、などの理由から第二世代の軽油代替バイオ燃料の原料として期待されている(Schenk *et al.*, 2008)。

主要な農業肥料であるリンも、近年、石油と同様に限りある資源として認識されるようになってきた(大竹, 2012)。微細藻類の培養においてもリンは必須な元素であり、培養コストに占める割合も大きい。現在はリン鉱石から作られた農業肥料や社会により二次的に濃縮された下水などが全て海に排出されている。今後、微細藻類を用いて超大規模に持続的利用可能な燃料生産を行うためには、炭素のみならず、全ての元素において循環を維持する事が必要となる。現在の経済性試算においては、こうした長期的持続性が価値として組み込まれることは稀であるが、生態系が担っている循環作用の経済性

を試算する研究が進められており (Costanza *et al.*, 1997)、今後、微細藻類の利用も含め、元素循環への要求が高まると考えている。

2 微細藻類の紹介

循環型社会を実現するためには、何らかの形で植物の光合成を活用することは必然であるとして、微細藻類を活用する理由については説明を要するだろう。そもそも藻類とは原始的な植物の総称であった。より正確を期すのであれば、酸素発生型の光合成を行う生物の内、陸上植物 (陸上に生える植物という意味ではなく、コケ植物と維管束植物を合わせた分類群) を除いたものが藻類とされている。従って酸素を発生しない光合成細菌や水生の維管束植物は藻類には含まれない。そして藻類の中で、観察に拡大鏡や顕微鏡を要するものを微細藻類と呼んでいる。大型藻類と微細藻類の線引きは明確に定義されたものではなく、糸状藻類のように長さが 10 cm を超えるものや、直径 1 mm 程度に達する群体性藻類も微細藻類に含まれている。また二次的に光合成能を失った生物も藻類に含まれることが多い。

藻類はしばしば、シアノバクテリア (藍藻類)、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、ミドリムシ藻類、クロララクニオン藻類、黄色藻類、渦鞭毛藻類、ハプト藻類、クリプト藻類、の 10 グループに分けられ、いずれのグループも微細藻類を含んでいる (実際にはほとんどが微細藻類である)。この内シアノバクテリアは原核生物であり、真正細菌の一群であることが知られている。他の藻類は全て真核生物で、細胞内に色素体 (広義の葉緑体。緑色でないこともある) を持っている。色素体は独自の DNA を持つことなどから、細胞内共生した別の藻類に由来すると考えられている。中でも緑藻類、紅藻類、灰色藻類の 3 群の色素体はシアノバクテリアの細胞内共生に由来し、これらの藻類は一次共生藻類と呼ばれる。この他に、一次共生藻類を取り込んだ二次共生藻類や、二次共生藻類を取り込んで色素体にした藻類も知られている。二次共生藻類には、緑藻に由来する色素体を持つミドリムシ藻類とクロララクニオン藻類、そして紅藻や紅藻を取り込んだ二次共生藻類に由来する色素体を持つ黄色藻類、渦鞭毛藻類、ハプト藻類、クリプト藻類が知られている。なお、緑藻類、紅藻類、灰色藻類の色素体は単一の一次共生に由来すると考えられているが、

二次共生の回数については諸説ある(井上, 2007)。

さて、陸上植物を始めとする大型の植物は、非光合成の組織を随所に持っている。根や樹木の幹などはわかりやすい例であろう。これらの非光合成組織は、植物の背を高くして他種との競争を有利にするため、あるいは土壤中の水を回収するため、など光合成反応の効率には直接関係ない目的で機能している。従って、他種との競争を排除し十分な水と光を与えた条件では、非光合成組織の存在は光エネルギーの変換効率を下げるものとなる。一方で単細胞性藻類などの微細藻類はほぼ全身が光合成機関として働くため、培養条件さえ整えてやれば、理論的には大型植物よりも高い効率で光エネルギーを有機物に変換することができるものと考えられる。そこで微細藻類をバイオ燃料の原料として利用しようという考えが検討されている(志甫, 2012; 小柳津, 2013 など)。

微細藻類をバイオ燃料の原料として想定する場合には、藻類の蓄積する脂質を原料として軽油相当のオイルを精製することを目指している。あらゆる藻類は脂質を合成する能力を有しているが、細胞内に多量の脂質を蓄積する種(ここではオイル産生藻類と呼ぶ)は限られている。また淡水と海水を始めとする環境の違いによっても生息する藻類種は異なっているため、目的に応じてバイオ燃料生産に適した藻類は変わってくるだろう。現在も新たな藻類培養株の開発は続けられており、様々な藻類がバイオ燃料の原料として提案されている。

淡水産藻類の中では様々な緑藻類やミドリムシ藻類が有望なオイル産生藻類として挙げられている。緑藻類からは様々なオイル産生藻類が知られており、例えばクロレラ(*Chlorella*)を始めとする微小なクロレラ目の藻類(直径 5 μm 程度のものなど)、体外に重油相当の炭化水素を分泌するボツリオコックス(*Botryococcus*)、水田など身近な環境で見られる不動性のイカダモ(*Scenedesmus*)の仲間や、遊走性のコナミドリムシ(*Chlamydomonas*)の仲間、などが着目されている(河地・田野井, 2010; 中沢, 2010; 渡邊, 2010; 河地, 2012)。ミドリムシ藻類の一部の種も脂質を蓄積するとして注目されている(田辺, 2012)。

海産藻類としては黄色藻類に属する微小種のナンノクロロプシス

(*Nannochloropsis*)、極めて種多様性が高く、珪酸質の殻をもった珪藻類、緑藻類の一種で塩湖などで見つかるシオヒゲムシ (*Dunaliella*) の仲間、などが注目されている (田辺, 2010; 中山, 2010; 平川, 2010; 渡邊, 2010)。また以前は菌類に分類されていたヤブレツボカビ類 (*thraustochytrids*) も高度に脂質を貯めることが知られている (本多, 2010; 中沢・本多, 2012)。一説にはヤブレツボカビ類も二次的に色素体を失った藻類の仲間と言われるが、光合成を行わないことから二酸化炭素の固定に直接貢献することはなく、炭素循環の観点では藻類として同列に扱うことはできない。

3 単離と野外培養

すでに様々なオイル産生藻類が報告されているとは言え、微細藻類の多様性はまだ十分に解明されておらず、オイル産生藻類の探索も引き続き行う価値がある。我々は特に水田を中心とした淡水環境から新規のオイル産生藻類株の単離を進めている。これは我が国においては水田環境が最も身近な淡水環境であり、休耕田など既存の土地を活用できると考えたためである。

微細藻類の単離は水試料と土壌試料から行った。水試料には藻類の栄養細胞が含まれているのに対して、土壌試料には主に休眠細胞が含まれていることが期待される。そこで土壌試料から単離を行う場合には、一度乾燥させた土壌を一定期間水に浸し、発芽増殖した栄養細胞を標的とする。栄養細胞の単離にはピペット洗浄法と平板分離法を用いた (仲田, 2015)。ピペット洗浄法では低倍率の顕微鏡下で、細胞径より若干太めに作製したマイクロピペットを用いて目的の細胞を直接採取する。この方法は特徴的な藻類を狙って採取することや、種類を選んで採取することには向いているが、径 10 μm 以下の不動細胞など判別しづらい藻類の採取には適さない。一方で平板分離法では寒天培地上で育つあらゆる藻類を単離できるが、試料中に稀な藻類の単離は難しい。

これまでに北は山形から南は沖縄まで、様々な地域の試料から藻類を単離し、脂質の蓄積を調べた。脂質蓄積の調査は窒素栄養欠乏培地で 1 週間程度培養した試料を対象とした。細胞は 0.66 mg/mL のナイルレッドで染色し、油滴が染色された細胞を蛍光顕微鏡下で確認した (図 1)。顕著な油滴の形成

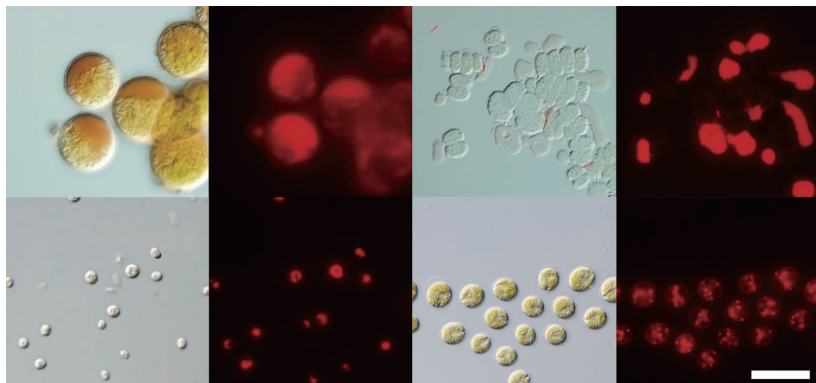


図1 ナイルレッド染色した慶應義塾大学鶴岡藻類コレクション(TKAC)の培養株4株の細胞

(左上: *Follicularia* の一種、右上: イカダモ類の一種 [細胞を潰して、体外に出た油を染色した]、左下: クロレラ目の一種、右下: コナミドリムシ類の一種)。それぞれ左が明視野像、右が同視野の蛍光像。赤色の蛍光が油滴を表す。倍率は全て同じで、右下のスケールは20 μm 。

が認められた株は慶應義塾大学鶴岡藻類コレクション (Tsuruoka, Keio, Algae Collection: TKAC) として管理している。2015年2月現在で66株のオイル産生藻類を維持している。

TKACの全株について18S rRNAの配列を決定した結果、緑藻綱51株、トレボウクシア藻綱14株、ミドリムシ藻綱1株が区別された。この中には、既に近縁種がオイル産生藻類として着目されている、クロレラの仲間や、イカダモ、コナミドリムシ、ミドリムシの仲間が含まれていたが、あまり注目されてこなかったクロロコッカム (*Chlorococcum*) の一群や、ナウトコッカス (*Nautococcus*) の近縁種、フォリクラリア (*Follicularia*) の一種なども含まれており、オイル産生藻類としての可能性を評価していく必要がある。またクロレラの仲間やコナミドリムシの仲間においても、分子系統樹上で既知の近縁種を持たない株が複数株得られており、新種や培養株が確立されていない種である可能性が高い。これらの藻類についても既知の藻類とは異なる培養特性やオイル産生性を有することが期待されよう。

藻類の大量培養法については様々な方法が試みられているが、大きく開放

系と閉鎖系に分けられる。いずれの方法でも大量培養の例が知られているが、開放系の大量培養は比較的安価で構築できる一方で異種混入や水分の蒸発などにより効率が悪くなり、閉鎖系の大量培養は設備費や維持費が高額になる一方で培養条件を制御できる、などそれぞれの長所短所が指摘されている(志甫, 2010a, b; 渡邊, 2012)。また大量培養を実施する地域・環境によっても開放系と閉鎖系の適性は異なるだろう。

国内での大量培養を考えた場合にも様々な選択肢が考えられるが、減反政策の結果増加した休耕田や耕作放棄地を活用し、農業の枠組みの中で大量培養を行うことも一つの可能性であろう。そのためには設備投資が少額で済み、参入がしやすい開放系や比較的単純な閉鎖系を用いることが望ましい。課題としては、効率的な培養法そのものの開発に加えて、他の藻類の混入や捕食者への対策、藻類株の漏出の防止などが挙げられる。

異種の混入への対策としては、特定の藻類以外は増殖が困難な環境を作り出す方法が考えられる。例えば淡水藻類の多くは高塩濃度の環境では増殖できないため、海産ないし好塩性のオイル産生藻類と高濃度の塩分を添加した培地を用いれば、淡水藻類や淡水動物プランクトンの混入はほぼ防止できる。同様に他の微生物が増殖しにくい高温などの環境と高温耐性などストレス耐性のあるオイル産生藻類の組合せを用いることは有効であろう。他の微生物の抑制には農薬のような化学物質を用いる方法もあり得る。この場合は、オイル産生藻類の培養株から耐性変異体を開発する必要がある。

一方で漏出への対策はこれまであまり議論されていないように思われる。しかし耐性変異体や場合によっては遺伝子改変株の使用も考えられる。また通常の野生株であっても外来の藻類を環境中に流出させることは、生態系保護の観点から望ましくない。対策としてはもともと現地で採集された野生株を用いる方法と、周辺環境での増殖が困難な培養株を使用する方法が考えられる。異種混入対策と併せて、陸域で海産藻類を培養する方法も有効であろう。前者の方法は品種改良などを行わないことになる一方で、現地環境に適合した藻類を利用できる利点もある。後者の方法ならば品種改良を行った有用株を持ち込むことができるが、漏出の防止に不安が残ることは否めない。

我々は山形県における野外培養を想定して、山形市内の休耕田や耕作放棄

地からオイル産生藻類の単離を試みた。得られた 21 株のオイル産生藻類 (全て上述の TKAC に含まれている) には、クロレラ類、イカダモ類、コナミドリムシ類が含まれており、国内の他県から採取された藻類群の多くが含まれていた。特に、他の TKAC 株と全く同一の種も複数見つかっており、分離方法を工夫すれば目的のオイル産生藻類の近縁種を現地で分離することも可能と思われる。

なお単細胞性緑藻類の多くは汎世界的に分布すると見られ、国外で報告された複数の種が日本からも採取され、これらが遺伝子レベルでも同一種と認められることが確認されている。例えばオイル産生藻類の一種であるコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) は北米大陸東部にのみ分布すると言われていたが (Pröschold *et al.*, 2005)、日本にも同一種が分布し、潜在的に北米の株と交雑可能であることが示されている (Nakada *et al.*, 2010 ; Nakada *et al.*, 2014)。

4 有用物質生産と代謝解析

多くの微細藻類は、生育環境が至適条件から大きく変化すると、細胞にストレスがかかり、形態変化や増殖の停止とともに、脂質を油滴として蓄積することが知られている (Hu *et al.*, 2008)。しかし、環境ストレスと脂質蓄積を結ぶ分子機構は明らかとなっていない。また、油滴として蓄積されるアシル基の炭素鎖長や不飽和度は生物種や生育環境により異なるため、この制御も品質管理の観点から重要である。生産性向上に資する生物学的アプローチとしては、代謝改変による高オイル産生藻類の作出があげられる (Rosenberg *et al.*, 2008)。炭素固定を行う光合成から貯蔵物質であるオイルの蓄積までの広範囲な代謝をオイル生産に最適化するためには、細胞全体を俯瞰した代謝の流れ (図 2) を明らかにする必要があるが、藻類の代謝は未知の部分が非常に多い。

近年、質量分析計 (MS) を用いた分析技術の発達により、数百から数千の代謝物質を一斉に比較定量するメタボローム解析が可能になった。真核微細藻類においては、モデル緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の通常培地、および、鉄、窒素、硫黄、リン、それぞれの欠乏培地における約 80 代謝物質のプロファイル比較が報告された (Bölling and Fiehn, 2005)。しかし、この研究で

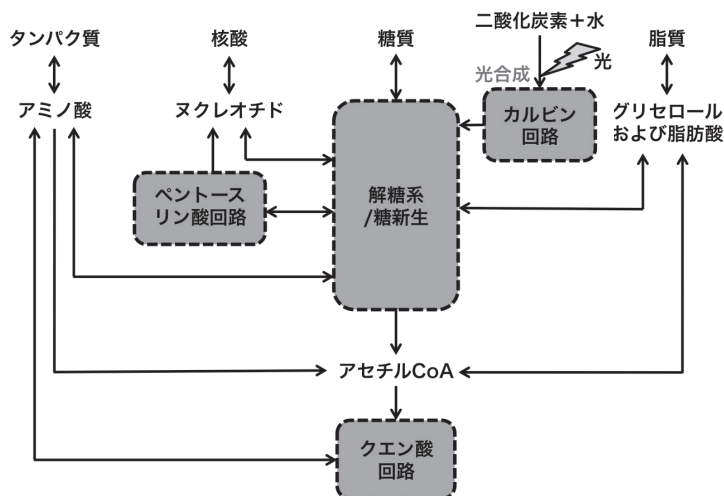


図2 藻類の代謝の簡略図

は、膜や貯蔵脂質の主成分となるトリアシルグリセロール (TAG) は分析対象となっていなかった。そこで筆者らは、炭素代謝変化を俯瞰する事を目的に、キャピラリー電気泳動-MS と液体クロマトグラフィー-MS を用いてオイル産生藻類 “*Pseudochoricystis ellipsoidea*” (学名が正式に発表されていないため引用符で囲んだ仮称で示す) から一次代謝物質とグリセロ脂質、色素などを含む 300 以上の物質を検出し、富栄養下と窒素栄養欠乏下での細胞あたりの代謝物質量を比較した (Ito *et al.*, 2013a)。その結果、減少した物質の多くは窒素を含むアミノ酸代謝やプリンーピリミジン代謝などに関わる物質であった。“*P. ellipsoidea*” におけるアミノ酸は、培地中の硝酸と光合成由来の炭素骨格から生合成されるが、窒素栄養欠乏下では培地から窒素源を獲得できないためアミノ酸を合成できなくなり、窒素を含む物質が減少したと考えられる。また、解糖系に関わる物質のいくつかは窒素栄養欠乏下において増加しており、TAG やデンプンの蓄積に関連して解糖系の活性が変化している可能性がある。さらに、グリセロ脂質の中で特に検出量の多かった TAG と糖脂質のモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) について分子種ごとの増減を比較したところ、不飽和度が低い (1-2) TAG の増加が顕著であった。し

かし、一部の不飽和度の高い TAG 分子種にも優位な増加がみられた。一方、MGDG においては不飽和度の高い MGDG が大幅に減少していた。グリセロ脂質のアシル基は膜脂質となった後に不飽和化が進むと言われていることから、不飽和度の高い TAG には MGDG などの膜脂質から転用されたアシル基が含まれている可能性がある。しかし、アシル基の転用に関する知見は少なく、今後、さらなる検証が必要である。

通常のメタボローム解析では、代謝物質質量の変化から代謝変化を予測するに留まるが、質量の異なる安定同位体により標識された化合物を細胞内に取り込ませて経時的に同位体メタボローム解析を行う事で、代謝による物質の流れについて議論ができるようになる。蓮沼らは安定同位体二酸化炭素 ($^{13}\text{CO}_2$) を用いて、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の葉における光合成炭素固定の周辺代謝を解析し、糖リン酸経路上の律速反応を予測した (Hasunuma *et al.*, 2010)。筆者らは、“*P. ellipsoidea*” に $^{13}\text{CO}_2$ を与えて培養し、上述の代謝物質を経時的に解析し、中心代謝物質やアミノ酸、プリン、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、色素など代謝の広範囲に渡る 78 物質において ^{13}C への十分な置換を検出した (Ito *et al.*, 2013b)。この置換率を階層的クラスター分析により 4 つに分類し、予想される代謝経路に重ね合わせたところ、グリシンとクエン酸、リンゴ酸は予想される順番と矛盾する事がわかった。今後、オルガネラ局在や異なる代謝経路の存在等を解析することにより新しい知見を得られる可能性がある。脂質においては、グリセロ脂質の構成要素でもある脂肪酸の置換速度が遅いことから、成熟したグリセロ脂質から脱離していると推測される。本手法は、局所的な代謝流束の解析には適さないが、俯瞰的に代謝分配を調査するのに有効だと考えている。

筆者らは、最近、タービドスタット (濁度一定) にしながら明暗と細胞周期を同調する事が可能な、再現性の極めて高い培養システムを構築した (図 3)。これにより、分析に多数の細胞が必要であるメタボローム解析においても、細胞周期の揃った極めて均質な細胞集団として扱うことが可能になり、より詳細な代謝物質質量の変化を優位に検出できるようになった。今後、これら知見を基に、大規模に代謝制御機構の解明を進め、代謝をデザインする事で有用物質の生産に適した株の開発を進めたい。



微細藻類は、分類学的にも生理・生化学的にも非常に大きな多様性を持ち、水中や土壌中のみならず、岩や氷の表面など、世界中のありとあらゆる環境に存在している。また、生物界には最大 20 万種程度の代謝物質が存在すると予測されている (Fiehn *et al.*, 2001)。しかしその多くは、未知のままである。筆者らは、これまでの経験をもとに、必要に応じて新たな有用微細藻類の探索を行いながら、未利用資源を用いた低コスト培養システムの開発、代謝解析による培養条件や代謝改変の検討などを通じて、物質循環型社会の構築を目指している。

参考文献

- 井上 勲『藻類 30 億年の自然史 第2版 藻類から見る生物進化・地球・環境』東海大学出版会、2007 年、xxx+646pp。
- 大竹 久夫「リンリファイナリー技術」『生物工学』vol. 90、2012 年、pp. 465-469。
- 小柳津 広志「液体燃料」倉橋 みどり・小柳津 広志編『応用微細藻類学：食料からエネルギーまで』成山堂書店、2013 年、pp.106-108。
- 河地 正伸『*Botryococcus*』渡邊 信監修『藻類ハンドブック』エヌ・ティー・エス、2012 年、pp.502-506。
- 河地 正伸・田野井 孝子「*Botryococcus braunii*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.128-136。
- 経済産業省資源エネルギー庁「エネルギー基本計画の背景にある諸情勢」『平成 25 年度エネルギーに関する年次報告（エネルギー白書 2014）PDF 版』2014 年、pp.8-38。
<<http://www.enecho.meti.go.jp/about/whitepaper/2014pdf/>>
- 志甫 諒 (2010a)「フォトバイオリアクター」渡邊信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.174-178。
- 志甫 諒 (2010b)「開放系システム」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎 2010 年、pp.178-184。
- 志甫 諒「バイオマスエネルギーの現況・動向と藻類バイオマス」渡邊 信監修『藻類ハンドブック』エヌ・ティー・エス、2012 年、pp.478-489。
- 田辺 雄彦「*Dunaliella*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.143-145。
- 田辺 雄彦「*Euglena*」渡邊 信監修『藻類ハンドブック』エヌ・ティー・エス、2012 年、pp.513-515。
- 中沢 敦「*Chlorella*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.150-153。
- 中沢 敦・本多大輔「*thraustochytrids*」渡邊 信監修『藻類ハンドブック』エヌ・ティー・エス、2012 年、pp.510-512。
- 仲田 崇志「淡水微細藻類の採集と培養株の確立」『分類』vol.15、2015 年、pp.57-65。
- 中山 剛「*Nannochloropsis*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.136-139。
- 平川 泰久「*Phaeodactylum*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp. 140-143。
- 本多 大輔「*Aurantiochytrium limacinum*」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.145-150。
- 渡邊 信「総論—微細藻類のオイル含有量—」渡邊 信編集『新しいエネルギー 藻類バイオマス』みみずく舎、2010 年、pp.126-128。
- 渡邊 信「大量培養—開放系培養と閉鎖系培養」渡邊 信監修『藻類ハンドブック』エヌ・ティー・エス、2012 年、pp. 345-353。
- Bölling C. & Fiehn O., “Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation.” *Plant Physiol.* vol. 139, 2005, pp.1995-2005.
- Costanza R., d’Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O’Neill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P. & van den Belt M., “The value of the world’s ecosystem services and natural capital.” *Nature*, vol. 387, 1997, pp.253-260.
- Fiehn O., Kloska S. & Altmann T., “Integrated studies on plant biology using

- multiparallel techniques.” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, 2001, pp.82-86.
- Hasunuma T., Harada K., Miyazawa S.-I., Kondo A., Fukusaki E. & Miyake C., “Metabolic turnover analysis by a combination of in vivo ^{13}C -labelling from $^{13}\text{CO}_2$ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C3 photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves.” *J. Exp. Bot.*, vol. 61, 2010, pp. 1041-1051.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. & Darzins A., “Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.” *Plant J.*, vol. 54, 2008, pp.621-639.
- Ito T., Tanaka M., Shinkawa H., Nakada T., Ano Y., Kurano N., Soga T. & Tomita M., (2013a) “Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxioephycean alga in nitrogen-deficient conditions.” *Metabolomics*, vol. 9, 2013, pp.178-187.
- Ito T., Sugimoto M., Toya Y., Ano Y., Kurano N., Soga T. & Tomita M., (2013b) “Time-resolved metabolomics of a novel trebouxioephycean alga using $^{13}\text{CO}_2$ feeding.” *J. Biosci. Bioeng.* vol. 116, 2013, pp.408-415.
- Melillo J.M., Reilly J.M., Kicklighter D.W., Gurgel A.C., Cronin T.W., Paltsev S., Felzer B.S., Wang X., Sokolov A.P. & Schlosser C.A., “Indirect Emissions from Biofuels: How Important?” *Science*, vol. 326, 2009, pp.1397-1399.
- Nakada, T., Shinkawa, H., Ito, T. & Tomita, M., “Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan.” *J. Plant Res.*, vol. 123, 2010, pp.67-78.
- Nakada, T., Tsuchida, Y., Arakawa, K., Ito, T. & Tomita, M., “Hybridization between Japanese and North American *Chlamydomonas reinhardtii* (Volvocales, Chlorophyceae).” *Phycol. Res.*, vol. 62, 2014, pp.232-236.
- Pröschold, T., Harris, E.H. & Coleman, A.W., “Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Genetics*, vol. 170, 2005, pp.1601-1610.
- Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L. & Betenbaugh M.J., “A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution.” *Curr. Opin. Biotechnol.* vol. 19, 2008, pp.430-436.
- Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C., Kruse O. & Hankamer B., “Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production.” *Bioenerg. Res.*, vol. 1, 2008, pp.20-43.

〔受付日 2015. 3. 20〕