

「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」
平成20年度採択研究代表者

渡邊 信

筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授

オイル産生緑藻類 *Botryococcus* (ボトリオコッカス) 高アルカリ株の 高度利用技術

§ 1. 研究実施の概要

平成 21 年度は、昨年度に構築した研究基盤にもとづき、今後の研究発展のために不可欠な基礎的知見の確保および基盤技術の確立にむけて研究を実施した。主な成果は下記のとおりである。

1)平成 20 年度にひきつづきボトリオコッカスを含めてオイル産生機能をもつ多くの野生株の収集、分離し、オイル産生藻類培養株の多様性を高めた。2)研究基盤となる培養センターで藻類試料の提供がおこなわれた。補正予算により培養センターの規模が拡大された。3)増殖・オイル生産最適条件サーベイシステム等を持ちいて、ボトリオコッカス培養株の増殖とオイル生産を最適化する光条件を明らかにした。また、鉄、有機物がボトリオコッカスの増殖を促進した。4) 昨年度作成したデータベースに藻類株のサンプル情報と地理情報、株情報とその特性情報を入力した。5)EST 解析結果からオイル合成経路とそのメジャーとなる反応系について解析した。オイル産生物の特性情報について、21 のデータ項目を設定して、情報の登録作業を進めた。6)品種改良を目指した変異源処理、遺伝子導入系開発を実施した。7) 超臨界法により炭化水素オイルを効率的に抽出する方法を確立した。8) つくば市内の応用光学研究所筑波研究室に開放系培養装置、および筑波大学構内の実験予定地において閉鎖系培養装置を設置し、各実験場所において、100～500 リットルクラスの大量培養をおこなった。

以上のように生物、化学および工学的研究のいずれにおいても当初の計画通りに研究が進捗している。

§ 2. 研究実施体制

(1) 生物学グループ1

① 研究分担グループ長: 渡邊 信 (筑波大学、教授)

② 研究項目

- ・有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価
- ・研究基盤となる培養センターの確立と管理
- ・増殖・オイル生産の最適培養条件の明確化
- ・増殖・オイル生産を制御する内的因子の探索と作用機序の解明
- ・野生株の品種改良

(2) 生物グループ2

① 研究分担グループ長: 中嶋 信美 (国立環境研究所、室長)

② 研究項目

- ・有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価
- ・ボトリオコッカス等オイル産生藻類・従属栄養性原生生物に関する特性情報のデータベース化
- ・野生株の品種改良

(3) 化学グループ

① 研究分担グループ長: 彼谷 邦光 (筑波大学、特任教授)

② 研究項目

- ・オイルの抽出・精製法の開発
- ・産生物の物理・化学的特性把握

(4) 工学グループ1

① 研究分担グループ長: 藤岡 知夫 (財団法人応用光学研究所、理事長)

② 研究項目

- ・閉鎖系、解放系それぞれにつき小規模実験施設建設
- ・pH、粘度、分子分析、溶液内藻類量測定器などのオンラインモニター系の設置
- ・外部高アルカリ池建設

(5) 工学グループ2

① 研究分担グループ長: 堀岡 一彦 (東京工業大学、教授)

② 研究項目

- ・多種類の生物群の生態的挙動解析

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. 最適増殖・オイル生産に導く培養基盤技術と高度品種改良技術の開発

(1) 有用機能をもつボトリオコッカス等新規野生株の分離培養及び特性評価

沖縄県、長崎県、茨城県、北海道等のダムや湖沼、沿岸環境で73の試料を採取し、塩や重炭酸を含む選択培養条件下で培養を行い、増殖した細胞のオイルの有無、生産量をナイルレッド蛍光染色で確認することで、増殖能とオイル生産能に優れた細胞を選別した。選別細胞をマイクロペット法で分離することにより、今年度はボトリオコッカスを19株、その他のオイル産生株を14株確立した(図1)。これらの株について、増殖特性調査を行うとともに、炭化水素の化学分析用に大量培養を行い、これまでにGOD-1株(図1-A)とGOD-10株(図1-C)について化学分析を終了した。



図 1. 選択培養試料から培養株として確立されたオイル生産微細藻株。A. 火山灰添加条件下で選抜された単細胞性緑藻株、B. 0.35%海水条件下で選抜された単細胞性緑藻株、C. 20mM NaHCO₃条件下で選抜されたクロロゴニウム近縁緑藻株。

また、前年度及び本年度に沖縄県のマングローブ域の海水等より分離した高度不飽和脂肪酸を産生する従属栄養原生物約160株について、オイル産生をナイルレッド染色、増殖ポテンシャルを平板プレートによる最大コロニーサイズ測定によりアッセイした。顕著なオイル産生と高い増殖ポテンシャルを持つ株を選抜し、これらについて12日間の液体培養を行い、メタノール・クロロホルム抽出を行ったオイルを定量することにより、乾重量当り~30%のオイル含有量を示す株を複数取得した。最大オイル生産量を示す株はいずれも平板培養下でオレンジ色を呈しかつ大きなコロニーサイズに成長するという顕著な特徴を示した。これらの知見を統合し、1) 平板培養による色彩変異・増殖・ナイルレッド染色による三重チェック、2) 液体培養による乾重量当たりのオイル含有量アッセイによる二次選抜、の二段階からなるスクリーニングシステムを開発した。

(2) 研究基盤となる培養センターの確立と管理

H20年度と同様に筑波大学産学リエゾン共同研究センターに設置された7.5m²の培養庫で培養試料の提供をおこなった。

(3) 増殖・オイル生産の最適培養条件の明確化

白色蛍光灯光源、青(波長470nm)、緑(波長530nm)および赤(波長627nm)のLED光源をつかって、ボトリオコッカスの光合成活性と増殖速度を調べた結果、250mol m⁻² s⁻¹の白色光(太陽光)で培養し、夜間は緑色補助光を照射することで、ボトリオコッカスの増殖と炭化水素生産効率が最適になることが判明した。また、クエン酸鉄とグルコースの添加はボトリオコッカスの増殖を促進することを明らかにした。

(4) オイル産生藻類・従属栄養性原生物に関する特性情報のデータベース化

オイル産生生物の有効利用と情報の共有化を目的として、昨年度作成したデータベースに 13 件のサンプル情報と地理情報、33 株の株情報とその特性情報を登録した。

(5) 増殖・オイル生産を制御する内的因子の探索と作用機序の解明

ボトリオコッカスの増殖時に発現している遺伝子の塩基配列を網羅的に調べ、BOT22, BOT88-2についてそれぞれ20000 遺伝子の配列を明らかにした。これらの遺伝子の中から炭化水素や脂肪酸合成に関わっている遺伝子を選抜し、代謝地図上にマッピングした。その結果、有効に動いている経路、メジャーに働いている経路が明らかになった。

(6) 野生株の品種改良

ボトリオコッカスに EMS による変異源処理をおこない、除草剤耐性株の候補を 5 株選抜した。アグロバクテリウム法を用いて、発色タンパク質遺伝子 (GFP や GUS) を導入する実験をおこなった。カナマイシン耐性でかつ GUS 染色されるコロニーを数個得た。

2. オイル等産生物の高度利用技術の開発

(1) オイルの抽出・精製法の開発

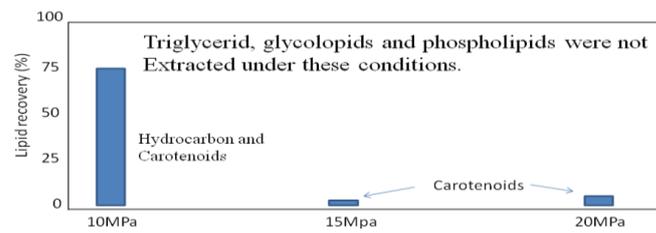
培養液からのボトリオコッカスの分離法の検討

培養液からボトリオコッカスを分離する方法として、プランクトンネット捕集、遠心分離などを試みたが、ボトリオコッカスの細胞サイズが小さく、比重が軽いため、効率よく捕集することができなかった。そこで、塩化第二鉄 (FeCl_3) を凝集剤として添加し、ボトリオコッカスを凝集沈殿させ、プランクトンネットまたは遠心分離を用いることで効率よく捕集する方法を開発した。しかし、粘質多糖が多量に分泌された場合は凝集剤の効果が十分でなくなり、細胞の濃縮が困難になる。培養条件によって細胞の濃縮法を変更する必要がある。

オイルの抽出法の検討

オイルの抽出法として n-ヘキサン抽出や圧搾法が行われてきたが、環境に配慮したグリーンケミストリー (Green Chemistry) 思想の普及により、有機溶媒の使用を控えることが一般化してきていること、ボトリオコッカスの炭化水素は食用油より粘度が高く、圧搾法には適さないことなどから、新たな抽出法として超臨界流体抽出法を検討した。超臨界流体としては水または二酸化炭素が用いられている。温度 200°C、15MPa の亜臨界水を用いたが、オイルの抽出は不十分であり、細胞残渣の炭化が認められた。一方、温度 60°C、10MPa で二酸化炭素を超臨界流体としたところ、炭化水素の全てと少量のカロチン色素が抽出された。さらに圧力を 15 および 20MPa と上昇させたが、カロチン色素が抽出されたのみで、クロロフィル色素は抽出されなかった。極性有機溶媒による抽出とことなり、二酸化炭素による超臨界流体で選択的な分画抽出が可能であることを明らかにした。さらに、モディファイヤー (Modifier) としてメタノールを添加することにより、トリグリセリドやリン脂質や糖脂質の抽出さらにクロロフィルの抽出も可能であることを明らかにした。また、抽出残渣に炭化などに変化がなく、残渣中の成分の利用も可能であることも二酸化炭素を用いた超臨界流体抽出の利点と考えられた。

Lipids Extraction from *Botryococcus braunii* by SCF (CO₂)



Residues after the SCF (CO₂) extraction (A) and chloroform/methanol (2:1, v/v) extraction (B)

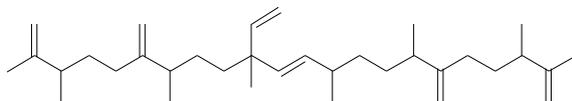
図2. 超臨界法による炭化水素の抽出

(2) 産生物の物理・化学的特性把握

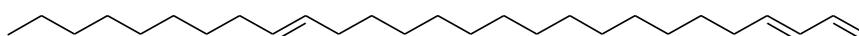
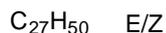
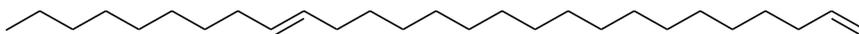
昨年度に炭化水素含量、増殖速度から選抜したボトリオコッカス 3 株 (BOT22、144、88-2) の主要炭化水素は BOT22: C₃₄H₅₈ (トリテルペン、純度 90%)、BOT88-2: C₂₇H₅₀ (直鎖で 3 個の二重結合、45%)、C₂₇H₅₂ (直鎖で 2 個の二重結合、55%)、BOT144: C₃₄H₅₈ (トリテルペン、純度 96%) であり、炭化水素含量はいずれの株も乾燥藻体当り 20-50% の範囲にあった。化学構造は以下に示した。

BOT22 の場合、培養条件の違いによって炭化水素含量が変動したが、主要炭化水素の構造は変わらないことを明らかにした。

BOT22 (Race B) Botryococcene ($C_{34}H_{58}$, MW 466)



BOT 88-2 (Race A)



BOT 70, 144 (Race B) $C_{34}H_{56}$, mw 466

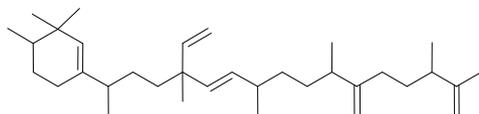


図3. ボトリオコッカスの各株の炭化水素の構造

また、ボトリオコッカスの炭化水素画分に新規化合物と思われる未知物質の存在が 1H -NMR で確認された。今後、本化合物の構造解析および生理活性探索を行うことを予定している。その他、トリグリセリドを産生する微細藻類や従属栄養性原生生物の成分分析も行う予定である。

3. 試験プラント・デモプラントによる工業化技術開発

(1) 閉鎖系、解放系それぞれにつき小規模実験施設建設

筑波大学構内および、応用光学研究所筑波研究室内に、閉鎖系、および開放系の培養施設を稼働させ予備試験を行った。これらの予備試験で特記すべきは、これまで、10 リットルほどの培養液を $120^{\circ}C$ で約十分ほどの過熱をしなければなかなか得られなかった無菌培養液を、ほぼ常温で、1 立米/h ほどの割合で連続的に得る事ができるようになり、これにより、1 立米クラスの無菌培養試験に目途がついたといえる。



図4. 屋外閉鎖系培養装置(左)と室内開放系培養装置(右)

(2) pH、粘度、分子分析、溶液内藻類量測定器などのオンラインモニター系の設置

この課題については、屋外閉鎖系リアクターとオンラインモニター系の最適化にむけた設計をおこなった。

(3) 外部高アルカリ池建設

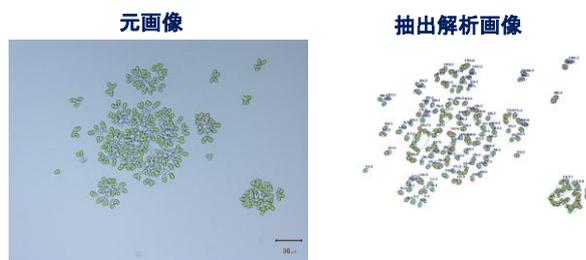
外部高アルカリ池は小規模ながら高アルカリ状態の池の外部環境での変化、pH 濃度の時間的、空間的変化の経年変化を実験的に明確にする目的で設置する施設で、このデータは将来の開放系大規模プラントのためには基礎的知見となるが、データ収集に長時間を要するため平成 22 年度も継続観察を行う予定である。

(4) 多種類の生物群の生態的挙動解析

藻類生態系のモデリング、成長影響因子と制御因子の検討、およびシミュレーションのための基礎方程式の検討を行った。基本的な連立微分方程式を導出するとともに、成長率、環境容量、成長飽和の条件、他種類微生物との競合、擾乱に対する当該微生物の成長過程の頑健さなどを予測するための因子として、ミネラル成分濃度と循環量、炭酸ガスと酸素濃度、pH 値、液温度、光量、などについて検討した。また、微生物群の成長過程を定量的に観測するためには、微生物個体の形状変化や個体群の集群などの影響を規格化して成長過程を観測する必要がある。ガウス分布平均、背景削除、二値化、楕円近似などの基本概念に基づいた画像処理プログラムを開発した(図5)。

培養実験定量化のための 画像解析ソフトの概念

基本概念： ガウス分布平均、背景削除、二値化、楕円近似



培養実験の定量化と自動化によるモデリングと収率のスケーリング

図5. 培養実験定量化のための画像解析ソフトの概

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Tanoi, T., Kawachi, M. and Watanabe, “M.M. Effects of Carbon Source on Growth and Morphology of *Botryococcus braunii*.” *J. Appl. Phycology* 22 accepted (2010)

2. 渡邊 信, “藻類バイオマスエネルギー技術の課題と展望” 日本機会学会誌 2010年5月小特集号 印刷中 (2010)

(4-2) 知財出願

- ① 平成 21 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)