

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22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、本プロジェクトの目標であるオイル生産効率一桁増進の実現にむけて大きな前進となる成果を得た。特に、スクリーニング研究の結果得られた高価値炭化水素であるスクアレンを乾燥重量の20%産生する従属栄養性藻類 *Aulantiochytrium* sp (オーランチオキトリウム) の培養株については、その増殖速度の速さ (20-30℃で倍加時間が2-4時間) により、その炭化水素生産効率はボトリオコッカスの10倍以上と見積もられた。この発見に対応してスクアレンの簡便な抽出・分析法が開発された。また、培地組成条件により、スクアレンとトリグリセリドの比率が異なることも判明しており、より効率的なスクアレン合成に導く条件の検討が必要とされる。

ボトリオコッカスに関する研究も進み、大規模EST解析による炭化水素の合成経路とそれにかかわるほとんどすべての酵素反応および対応する遺伝子が同定され、炭化水素生産と細胞増殖速度が相互基底状態にあるとの仮説の構築、<sup>14</sup>Cをトレーサーとして用い光合成によるCO<sub>2</sub>固定および炭素代謝産物の合成速度が算定された。除草剤パラコート耐性株、除草剤グルホシネート耐性株が得られ、将来の屋外培養における他の微細藻類のコンタミをふせぐために重要な技術が開発された。エキネノンを大量に産生するボトリオコッカス株が選抜されたことから、エキネノンの産業利用についての検討がはじまる。安価なKAI培地の開発とソフトプラスチック製バック培養技術により、コストの大幅な軽減が実現した。10L、30L(以上屋内)、300L、500L(以上野外)規模までスケールアップし、ボトリオコッカスの良好な増殖を得て、2トンスケールの試験プラントでの実験および100～1000トンスケールでの実証プラントでの実験への道筋をつくることができた。プロジェクト終了までには100トン以上の実証スケールでのデータが得られ、それをもとにLCAがなされ、精度の高いエネルギー収支・コスト収支を算定することができるであろう。また、エネルギー収支・コスト収支からみてさらに一層の効率化を実現することを目指した水処理と藻類生産の統合に不可欠な基盤技術を開発するための研究が開始された。

## § 2. 研究実施体制

### (1) 生物グループ 1

① 研究分担グループ長: 渡邊 信 (筑波大学大学院生命環境科学研究科、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 研究グループ長: 中嶋 信美 (国立環境研究所生物圏環境研究領域、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 (筑波大学本部、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
- ・産生物の高度利用法の開発

### (4) 工学グループ 1

① 研究分担グループ長: 志甫 諒 (筑波大学生命環境科学研究科、研究員)

#### ② 研究項目

- ・試験プラントの運転
- ・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
- ・有機廃水の利用率

### (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

#### (3-1) 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

筑波大学では、沖縄県、ベトナムおよび東京湾より採取し、分離培養した従属栄養藻類ラビリンチュラ類150株のうち約70株について、それらの増殖および炭化水素産生能力を調べた結果、高価値炭化水素であるスクアレンを高濃度に産生する*Aurantiochytrium* sp. (オーランチオキトリウム) 18W-13a 株(図1)を開発することができた。本株は炭化水素スクアレンを乾燥重量当たり20%の高濃度で産生し、これまでオーランチオキトリウムを含む他の微細藻類や微生物では0.2%程度の含量でスクアレンを生産することが報告されているだけである。本株のように20%もの濃度で炭化水素スクアレンを生産するものは初めての発見である。

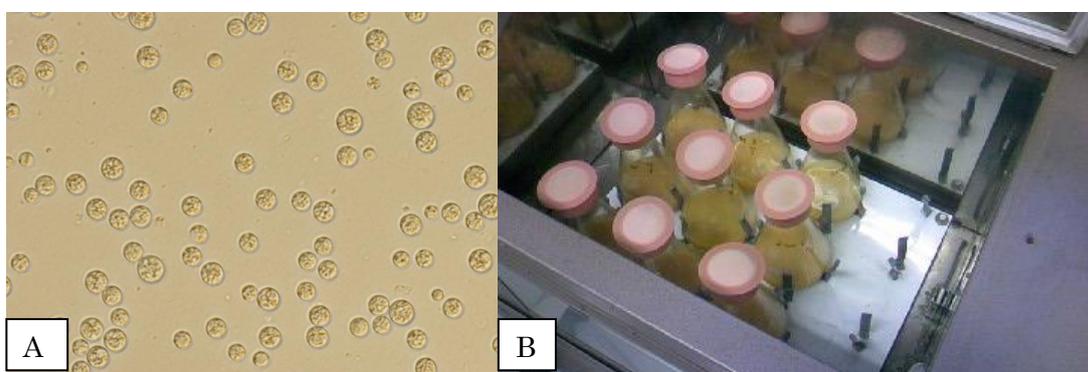


図1. 炭化水素を産生するオーランチオキトリウム18W-13a株(A)と培養の様子(B)

国立環境研究所では、沖縄県、茨城県、千葉県、青森県等のダムや湖沼、沿岸環境で95試料を採取し、増殖能とオイル生産能に優れた細胞を選別して、ボトリオコッカスを75株、他のオイル産生株を3株確立した。これらの株について、増殖特性調査を行うとともに、オイル等の化学分析用試料として16株を供与した。

##### 2) 研究基盤となる培養センターの確立と管理

筑波大学産学リエゾン共同研究センター横に設置された300Lのドーム型培養器と30Lの円筒型培養器並びに筑波大学プロジェクト棟に設置された20m<sup>2</sup>の培養庫での10L培養により、ボトリオコッカスが大量に培養され、1か月1トン規模での培養試料の提供が可能となり、要請に応じた提供をおこなった。

##### 3) 増殖・オイル生産の最適培養条件の明確化

*B. braunii* において、蓄積された炭化水素は暗条件下では分解されず、コロニー内に保持されることを証明した。さらに、炭化水素合成速度は光強度(PPFD)が  $40 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$  で飽和したが、多糖合成速度は  $100 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$  程度で飽和することを明らかにした。これらの結果と細胞増殖速度が  $40 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$  で飽和したことと併せ、*B. braunii* では炭化水素生産と細胞増殖速度が相互

基底状態にあると推測した。この結果は、炭化水素生産御制限条件の解除が細胞増殖の促進をもたらすことを示唆し、ボトリオコッカスによるオイル生産の改良のターゲットを明確にした。

*Aurantiochytrium* sp. (オーランチオキトリウム) 18W-13a 株は、温度 25°C の条件では、4 日目に増殖が飽和し、スクアレン炭化水素含量が最大になることが明らかとなった。さらに倍加時間は 10°C で約 12 時間、15°C で 6 時間、20-25°C で 4 時間、30°C で 2 時間ときわめて速い。炭化水素含量は 20% とボトリオコッカスの最大 60% と比較して 1/3 であるが、増殖速度は少なくとも 36 倍もあり、炭化水素生産効率はボトリオコッカスの少なくとも十倍以上あると見積もられた。

#### 4) 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

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、今年度確立したオイル産生培養株について、24 件のサンプル情報と地理情報、103 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

*B. braunii* において、炭素の放射性同位元素  $^{14}\text{C}$  をトレーサーとして用いて、青色、緑色、赤色の LED 単色光光源下で培養した藻細胞の光合成による  $\text{CO}_2$  固定および炭素代謝産物の合成速度を調べた。その結果、炭素固定速度は赤色培養細胞で増大したが、代謝産物の組成には違いはないことを明らかにした。また、定常状態では、固定された  $^{14}\text{C}$  の約 50% が脂質に、15% が炭化水素に転換されることを明らかにした。

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 15、517 遺伝子および 15、145 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、2つの反応を除くすべての反応について、その遺伝子が同定できた。また、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、除草剤パラコート耐性株を 37 株、除草剤グルホシネート耐性株を 17 株得た。エレクトロポレーション法を用いて、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結果、きわめて低頻度 ( $1 \times 10^{-7}$ ) かつ一過的ではあるが、遺伝子導入に成功した。

### **(3-2) 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

*Aurantiochytrium* sp. にスクアレンを高濃度で蓄積する株が開発されたことで、簡便なスクアレンの抽出・分析法の開発をおこなった。従来のスクアレン分析はガスクロマトグラフィー (GC) 分析によるものが主であるが、GC 分析では定量性に問題があることが明らかになったので、粗精製が必要で手間を要し、誘導体化反応などの熟練も必要とされる。より簡便な方法とし ODS カラムを



作成コストの削減がある。10L スケールでボトリオコッカスの増殖用の合成培地である AF-6 培地に代わり安価な KAI 培地を作成したところ、KAI 培地において AF-6 培地と同等以上の増殖を得ることができた。これにより、培地作成経費は 1/30 に減り、これに呼応して培地作成に関わるエネルギー量も減ることとなる。さらに 10L 規模でのシード培養でつかわれたナルゲン製培養ボトルに変えてソフトプラスチック製バックで培養したところ、ナルゲン製容器と同等以上の増殖を得た。これにより、シード培養コストは 1/10 に削減することができる。培養規模は 30L、300L(野外)、500L(野外) 規模までスケールアップすることができた。10L~30L の室内プラント(温度 25℃)では乾燥重量で約 4g/L のバイオマス、300L と 500L では晩秋~初冬の低温期(温度 5-20℃)の気温変動条件下にもかかわらず、乾燥重量で 1g/L 以上の増殖量を得た。これらの結果により、2 トンスケールの試験プラントでの実験および 100~1000 トンスケールでの実証プラントでの実験への道筋をつくることができた(図5)。

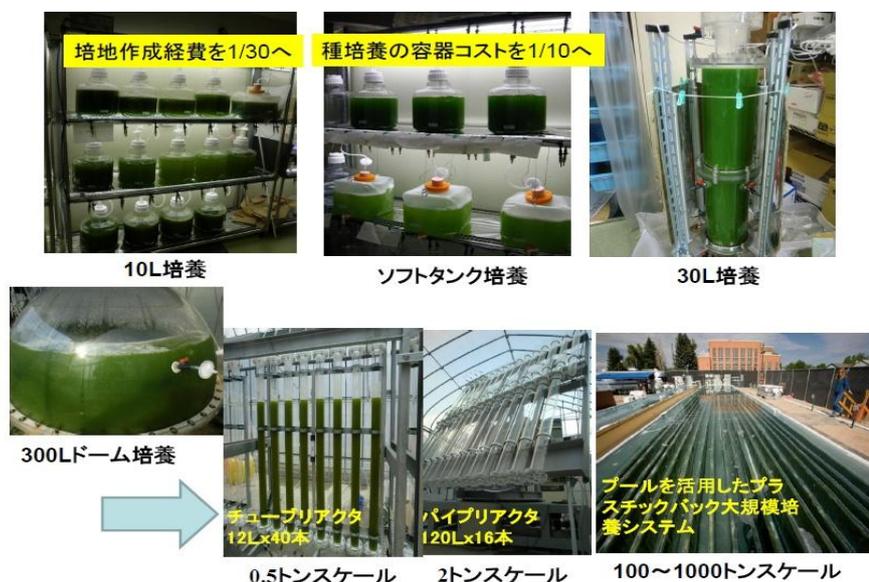


図5. さまざまなスケールでの屋内および屋外試験プラント、および将来の 100~1000 トンスケールでの実証プラントのイメージ

## 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

H22 年度は、ボトリオコッカス培養中における培地中の窒素、リンの変動について Q-TOFF Mass をつかってモニターする手法を開発した。

## 3) 外部高アルカリ池建設

筑波大学構内に設置していた小規模高アルカリ開放池でも、完全開放系の場合、外部からの異種混入が避けられないことが判明したことから、対応策として、100 ミクロン厚程度の膜体により、開放池と同等のコストと閉鎖系と同等の対異種混入バリアー性能を有する大型培養装置の設計をお

こない、ほぼ製作のめどをつけることができた。

#### 4) 有機廃水の利用性

ボトリオコッカスのバイオマス生産のために有機廃水の一次処理水と二次処理水の利用性についての基礎的研究に着手した。ボトリオコッカスは食品廃棄物処理水を 1~100% 添加した場合は増殖が完全に阻害されたが、大豆廃水の 1-2% 添加では増殖が無添加のものと同様に促進された。

#### 5) 多種類の生物群の生態的挙動解析

H21 年度の数学的なフレーム検討に基づき、H22 年度は具体的なプログラムのコーディングをおこなった。プログラム動作性能の確認をおこない、ほぼ数種類以上の藻類の混合系の振る舞いを表現できることを確認した。

## §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 23, 25-33
- 2) 渡邊 信 「藻類バイオマスエネルギー技術の課題と展望」日本機械学会誌 113 (1098):32-35
- 3) Kaya, K., Shiraishi, F., Uchida H. and Sano, T. “A novel retinoic acid analogue, 7-hydroxy retinoic acid, isolated from cyanobacteria.”, Biochimica et Biophysica Acta General Subject, (2011)
- 4) Nakazawa, A., Matsuura, H., Kose, R., Kato, S., Honda D., Inouye, I., Kaya K. and Watanabe, “M.M. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production.” Bioresource Technology 102 (accepted)
- 5) Yonezawa, N., Matsuura H, Shiho H, Kaya K. and Watanabe “M.M. Effects of soybean curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22.” Bioresource Technology 102 (accepted)

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 5 件)