

平成 22 年 7 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19201014

研究課題名（和文） 炭化水素産生藻類による石油代替資源の開発に関する基盤技術研究

研究課題名（英文） Basic studies on development of alternative fuels using hydrocarbon-producing algae.

研究代表者

渡邊 信 (WATANABE MAKOTO M.)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10132870

研究成果の概要（和文）：

本研究は将来の *Botryococcus* を用いた石油代替資源開発に資するため、*Botryococcus* 炭化水素生産代謝経路の生合成経路やその調節機構並びに大量増殖機構に関わる生物学的・化学的研究を行った。その結果、1) 鉄成分が細胞やコロニーの形状、そしてオイル生産に与える影響が大きいこと、2) *Botryococcus* の 63 株の生産する主要炭化水素は直鎖アルケン型 (race A)、トリテルペン型 (race B)、テトラテルペン型 (Race L) および上記 3 つの型のいずれにも属さない種々の構造のものが含まれるマルチ型タイプに分類されたこと、3) BOT-70 は MEP 経路を使ってテルペノイドを合成していること、4) 炭化水素合成時には SAM サイクルが活性化されていること、5) *B. braunii* の大量発生には亜熱帯地域の夏季の成層形成・日照が重要であり、また窒素分濃度の高い水域には *B. braunii* はほとんど出現しないこと、6) 細胞増殖が飽和する以上の光エネルギー ( $40 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) が光合成生産を介して炭化水素生産等の物質生産に振り分けられていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Biological and chemical studies related to synthetic pathway and regulatory mechanisms of hydrocarbons and outbreak of the *Botryococcus* bloom in natural environments were investigated to obtain the knowledges essential for the development of alternative resource of petroleum. It was suggested that : 1) cell and colony shapes and oil production were greatly influenced by iron compounds, 2) The elucidated structures of hydrocarbons produced by 63 strains of *Botryococcus* could be classified n-alkene (Race A, 6%), triterpene (Race B, 59%), tetraterpene (Race L, 5%) and others (30%), 3) the strain BOT-70 synthesized the terpenoid oils by MEP pathway, 4) the SAM cycle was activated to supply SAM to synthesize botryococcene, 5) irradiation, thermal stratification and concentration of nitrogen sources are important factors for predominancy of *Botryococcus* and 6) excess energy above  $40 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  was used for the production of hydrocarbons instead of that of cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
平成 19 年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
平成 20 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
平成 21 年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総 計	34,500,000	10,350,000	44,850,000

研究分野： 環境藻類学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術

キーワード：*Botryococcus braunii*、炭化水素、キャラクターライゼーション、培養株多型解析、炭化水素合成分子機構、炭化水素蓄積量変動要因、遺伝子発現解析、大量発生機構解明

### 1. 研究開始当初の背景

中国やインドの経済発展により、原油の消費量が近い将来爆発的に増大し、石油資源が枯渇する懸念があり、先進国においては再生産可能な代替エネルギーへの転換を迅速に進める必要がある。石油の代替エネルギーとして植物由来の油脂やデンプンを利用する技術はすでに工業化されているが、原料となる油脂やデンプンを作る植物の生産性を向上させることは、ほぼ上限にきており、これをさらに上積みするには莫大な研究費を投資する必要がある。一方、*Botryococcus* は生重量の50%以上にあたる炭化水素を細胞外に放出する唯一の淡水産微細緑藻で、古くからオイルシェールを形成し、かつては燃料として利用されていた。放出される炭化水素はこの藻類が光合成により固定した大気中の二酸化炭素に由来しており、再生産可能な代替エネルギー源の一つとなる可能性を秘めている。従って、耕地面積の少ない日本において石油に変わるエネルギーを生産するには、水をためておくだけで増殖する淡水産藻類は重要な選択肢のひとつとなる。しかしながら、*Botryococcus* は唯一、細胞外に大量の炭化水素を分泌する藻類であるにも関わらず、その炭化水素生合成機構、分泌機構、炭化水素生産を高めるための培養条件等についてほとんど研究がなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は *Botryococcus* 炭化水素生産代謝経路の生合成経路やその調節機構並びに大量増殖機構を明らかにし、将来の *Botryococcus* を用いた石油代替資源開発に資するため、下記に示した課題を解決していくことを目的とした。

(1) *Botryococcus* の増殖と炭化水素生産に係わる基礎生物学情報の取得と整備  
*Botryococcus* の遺伝的多様性、ゲノム情報、炭化水素の化学特性、炭化水素合成・分泌に関する基礎生物学情報を取得し、増殖・炭化水素生産の優れた培養株の探索・取得を行い、各培養株において産生する炭化水素分子種の情報を調べ、培養株及びそれぞれの株の炭化水素種の情報を提供する体制を構築する。また、炭化水素生産時に発現している遺伝子の解析と遺伝子導入技術の開発、炭化水素産生・分泌機構を解明し、炭化水素合成と分泌

の増産に資する分子生物学的基盤を確立する。

(2) 大量発生機構及び炭化水素蓄積量変動機構の解明

野外での大量発生要因並びに炭化水素蓄積量変動機構を調べ、効率的な増殖と炭化水素生産に導く条件を抽出し、野外開放系での大量増殖技術開発に対して科学的知見を提供する。

### 3. 研究の方法

まず、目的に示した(1) *Botryococcus* の増殖と炭化水素生産に係わる基礎生物学情報の取得と整備については、以下に示す方法により研究を推進した。

#### ① *Botryococcus* 培養株の特性評価と多型解析

本研究では *Botryococcus* 培養株を対象として、培養特性やコロニーの多型と形成過程について、調査、解析を行うことで、*Botryococcus* の増殖と炭化水素生産に関わる基礎生物学的情報を取得する。

②炭化水素のキャラクターライゼーション  
*Botryococcus* が産生する炭化水素の分子種を多くの培養株で解析し、分子構造を明らかにする。培養株を分子種系統に分類し、テーマ間で共有する基礎的知見を提供する。

③ *Botryococcus* の炭化水素生産時に発現している遺伝子の解析

既に明らかにした約3000個のESTライブラリーより炭化水素生産に関わっていると思われる38個の遺伝子について、培養の各ステージにおける発現パターンを明らかにする。また、取得したESTクローンをマクロアレイ化し、他のテーマと共同し炭化水素生産が著しく変化する条件において、どのような遺伝子の発現に変化が起きるのかを網羅的に解析する。4)の成果とあわせて、炭化水素代謝制御の鍵となる遺伝子を推定する。

#### ④ 炭化水素合成・分泌の分子機構の解明

これまでの知見から、*Botryococcus* の炭化水素は、脂肪酸合成系を経由して合成される経路(Race A)と、テルペノイド合成系を経由して合成される経路(RaceB, RaceL)のどちらかに由来すると考えられている。本研究は、新規に単離した株の炭化水素の生合成経路を明らかにし、その中で、炭化水素合成の律速段階となる反応を推定する。炭化水素分泌が盛んな系統と分泌しない系統について細胞壁や細胞膜を構成するタンパク質比較して、分

泌が盛んな系統に特徴的なタンパク質を同定する。3)の成果とあわせて、炭化水素合成の律速反応を触媒する酵素遺伝子並びに炭化水素分泌に係わるタンパク遺伝子を同定する。

また、(2)の大量発生機構及び炭化水素蓄積量変動機構の解明については、以下に示す方法により研究を推進した。野外での大量発生要因並びに炭化水素蓄積量変動機構を調べ、効率的な増殖と炭化水素生産に導く条件を抽出し、野外開放系での大量増殖技術開発に対して科学的知見を提供する。以下個別課題の目標を示す。

#### ⑤自然湖沼での大量発生要因の解明

*Botryococcus* は、自然湖沼で大量に発生しブルームを形成することが、タイ、イスラエル、オーストラリアで報告されており、また、日本でも沖縄県の池でブルームを形成していることが判明している。ブルーム形成のメカニズムの解明は、屋外開放系での大量培養技術開発を目指すうえで重要知見を与える。しかしながら、どのような環境条件において増殖し、ブルーム形成にいたるのか、不明である。沖縄県の池をフィールドとして、培養増殖実験を踏まえて本種のブルーム発生をもたらす要因を解明する。

#### ⑥炭化水素蓄積量変動要因の解明

*Botryococcus*によるエネルギー生産を実現させる上で達成しなければならない基礎的研究要素の一つに、炭化水素蓄積量の人為的増大が挙げられる。屋外大量培養を想定すると、周期的な温度変化、日射量の変化が毎日繰り返されるので、温度変化、光量、光質変化と炭化水素蓄積の量的把握が必要である。また、そこで得られた知見に基づいて炭化水素蓄積を加速させることが可能になる。そこで、本研究では屋外培養時に起こりうる物理的条件変動に注目し、蓄積量変動要因の解明と蓄積量増大の方法論を確立する

## 4. 研究成果

### (1) コロニー形成機構と培地中鉄濃度が及ぼす影響

群体性緑藻 *Botryococcus* の無菌株を用いて、培地中の鉄濃度およびグルコースの添加が細胞形状や増殖、そしてコロニーのサイズや形状に及ぼす影響について調査した。この無菌株では、鉄制限条件で、増殖が低下し(図1)、コロニーからの細胞の離脱、単細胞性の細胞や小さなコロニーの割合の増加、そして枝状構造が顕著な独特なコロニーが観察されるなどの変化が認められた。鉄制限条件下での細胞の変化としては、細胞形状が円錐状に変形し、細胞内のオイル顆粒が縮小して、オ

イル分泌量が低下するのが観察された。鉄成分が細胞やコロニーの形状、そしてオイル生産に与える影響の大きいことが示された。異なる培養条件下に置かれたコロニーサイズの経時的な変化および走査型電子顕微鏡による微細構造の観察結果に基づいて、ボトリオコッカスのコロニー形成過程とコロニーの形成に影響する要素について考察した。

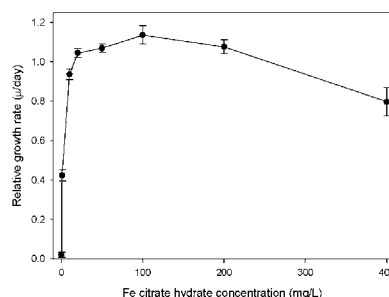


図1. クエン酸鉄の増殖に及ぼす影響

### (2) 炭化水素のキャラクタライゼーション

緑藻 *Botryococcus* BOT-63株の生産する炭化水素の分子構造を明らかにするために数ミリグラムの凍結乾燥試料の炭化水素画分をGC/CI-MS, GC/EI-MSを用い、て予備分析を行い、平面構造を推定した。また、純度の高いものは<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C-NMRで構造を解析した。BOT-63株の生産する主要炭化水素は直鎖アルケン型(race A)、トリテルペン型(race B)、テトラテルペン型(Race L)および上記3つの型のいずれにも属さず、種々の構造のものが含まれるマルチ型タイプに分類された(表1)。マルチ型の中にはエポキシアルカンや直鎖飽和アルカンの構造を持つものが含まれていた。

表1. *B. braunii* が産生する炭化水素の種類

Race	Number of strains	Percent (%)
A	4	6
B	37	59
L	3	5
others	19	30
Total	63	100

### (3) *Botryococcus* の炭化水素生産時に発現している遺伝子の解析

*B. braunii* のオイル生産時の EST 解析をおこなった。対数増殖期の *B. braunii* 培養株 (BOT-70) より total RNA を抽出し、オリゴキャップ法で全長鎖 cDNA ライブラリーを作製した。CDNA ライブラリーからランダムに 11,904 個のコロニーをとり、ベクターに挿入された cDNA の塩基配列を決定した。その結果、独立した 1,868 個の cDNA を得た。これらの塩基配列を Blast X を用いてホモロジー検索を行い、アノテーション作業をおこなった。アノテーションされた配列の 46% が代謝に関連するものであった。また、脂質代謝および合成に関連する遺伝子のうち 12% はテルペノイド合成関連遺伝子であった。これらの中にメバロン酸経路の酵素遺伝子は見つからなかった。一方、MEP 経路については 7 反応中 3 反応について酵素遺伝子がみつかった。IPP からは 4 つの反応を経てトリテルペンが合成されるが、これら全ての反応について酵素遺伝子が見つかった。以上の結果、BOT-70 は MEP 経路を使ってテルペノイドを合成していると推定された (図 2)。

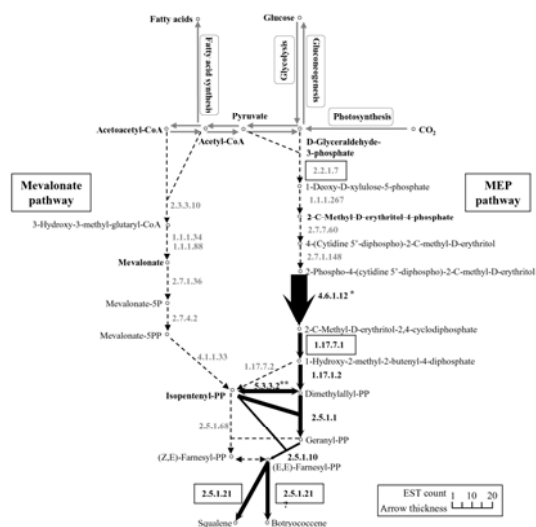


図 2. ボトリオコッセン合成関連酵素遺伝子の探索。考えられるボトリオコッセン合成経路の反応を黒い矢印で示した。本研究により候補遺伝子が見つかった酵素反応は黒い実線で、候補遺伝子が見つからなかった酵素反応は黒い点線で示した。候補遺伝子が見つかった酵素反応については、相当する EST カウント (リード数) を黒い実線の太さで示した。遺伝子が見つかった酵素の EC 番号は黒字で、遺伝子が見つからなかった酵素の EC 番号は灰色で矢印の横に記載した。次世代シーケンサーを用いた解析により候補遺伝子が見つかった酵素の EC 番号は四角で囲った。N 末端に葉緑体移行シグナルが存在していた酵素は\*、分泌シグナルが存在していた酵素は\*\*で示した。

(4) 炭化水素合成・分泌の分子機構の解明：特にテルペノイド系炭化水素の生合成に関与

RaceB の炭化水素を合成すると考えられる BOT-70 株の、炭化水素合成に関与する遺伝子群の解析を行うために、炭化水素合成能の高い時期を  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 、 $[\text{2-}^{14}\text{C}]$  pyruvic acid、 $\text{L-}[\text{methyl}^{14}\text{C}]\text{-methionine}$  を投与したトレーサー実験によって測定した。その結果、炭化水素合成能は対数増殖期初期に高く、増殖に伴い低下した。 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  および  $\text{L-}[\text{methyl}^{14}\text{C}]\text{-methionine}$  を与えた時に、培養開始後 15 日目で急激な炭化水素合成能の低下がみられたが、 $[\text{2-}^{14}\text{C}]$  pyruvic acid を与えた場合は培養開始後 5 日目の活性の 80% を保持していた。RaceB に特異的に発現している遺伝子を探索するために、RaceA の炭化水素を合成する SI-30 株とで発現量に差のある 30 個の遺伝子を単離した。その中には、炭化水素のメチル化に関与する *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) の再生を行う *S*-Adenosyl homocysteine hydrolase の遺伝子が含まれており、炭化水素合成時には SAM サイクルが活性化されていることが示唆された (図 3)。

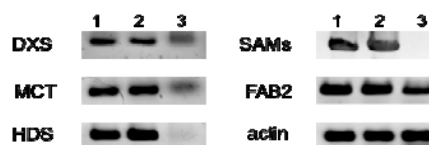


図 3. BOT-70 株と SI-30 株で炭化水素合成に関与すると推定される遺伝子の発現。レーン 1 は BOT-70 株の培養開始後 5 日目、レーン 2 は BOT-70 株の 15 日目、レーン 3 は SI-30 株の 5 日目である。

(5) 自然湖沼での大量発生要因の解明

*B. braunii* はしばしば野外で大量に発生する。このメカニズムを解明することは、野外開放系での大量培養技術の開発のために重要である。本種が大量に発生するダムでの分布調査から、*B. braunii* は主に水温躍層が発達する 6～8 月に大量発生し、水深 1～2.5m に集積していた。本種が大量に発生するダム A, B に比べて、発生しないダム C, D では  $\text{TN}$  と  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$  の濃度は有意に高いことがわかった (図 4)。

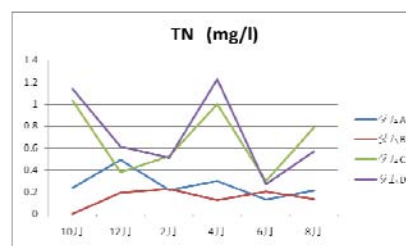


図 4. ダム A, B (発生域), C, D (非発生域) における TN の季節的変動

以上のことから、*B. braunii* の大量発生には亜熱帯地域の夏季の成層形成・日照が重要であり、また窒素分濃度の高い水域には*B. braunii*はほとんど出現しないことが示唆された。

(6) *Botryococcus braunii* の増殖、光合成および炭化水素生産能の向上に関する最適化条件の検討

*Botryococcus braunii* BOT144 株を用いて、種々の光条件における光合成速度と増殖速度を比較した。すなわち、増殖速度が飽和する 40  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  以上の光強度において炭化水素生産量が明瞭に増大した (図 5)。本結果は、細胞増殖が飽和する以上の光エネルギーが光合成生産を介して炭化水素生産等の物質生産に振り分けられていることを強く示唆するものである。この結果は、増殖の最大化が炭化水素収量の最大化にはつながらない可能性を示しており、炭化水素収量に関する条件検討が別途必要であることを示した。本研究は、光質の制御により代謝系を調節し、生産性を向上させるための最適化条件を明らかにした。

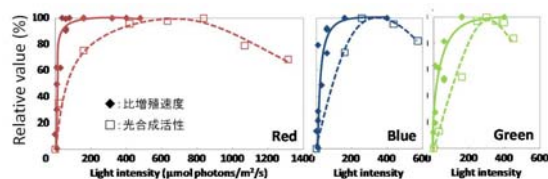


図 5. 種々の単色光における *B. braunii* の増殖および光合成活性—光強度曲線の比較

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tanoi, T., Kawachi, M. and Watanabe, M.M. (2010) Effects of Carbon Source on Growth and Morphology of *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycology* 22: in press. 査読有
- ② 渡邊 信 (2010) 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 巻 1098 号: 32-35 査読有
- ③ 彼谷邦光 (2010) 微細藻類オイルの化学 日本微生物資源学会誌 26:1-10 査読有
- ④ 渡邊 信 (2009) 藻類によるバイオ燃料生産の展望 環境技術 38 巻:160-164 査読有

[学会発表] (計 31 件)

- ① 新津 里佳, 池上 有希子, 金指 真菜, 加藤 毅, 田野井 孝子, 河地 正伸, 加藤 美砂子 緑藻 *Botryococcus braunii* におけるテルペノイド系炭化水素の生合成に関与する遺伝子群の解析 第 51 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18 日-21 日
- ② 渡邊 信 微細藻類による大規模石油生産の展望 応用物理学会「エネルギー環境研究会企画シンポジウム 人工光合成を中心とした自然エネルギー利用の実現に向けて」 東海大湘南キャンパス 2010 年 3 月 19 日
- ③ 菊田 芙美江、坂本幸平、馬場将人、鈴木 石根、渡邊 信、白岩 善博 緑藻 *Botryococcus braunii* の炭化水素生産能の向上に関する最適化条件の検討 日本藻類学会第 34 回大会、つくば、2010 年 3 月 20 日
- ④ 五百城 幹英・馬場 将人・田野井 孝子、河地 正伸、黛 裕介、鈴木 石根、白岩 善博、彼谷 邦光、渡邊 信、中嶋 信美、国内産オイル産生緑藻類 *Botryococcus braunii* の EST 解析. 第 51 回日本植物生理学会年会、熊本、2010 年 3 月 18 日-21 日
- ⑤ Kaya, K. A prospect of utilization of algal lipids for fuel oil, The third Asian Symposium on Plant Lipids. (Nov. 28<sup>th</sup>, 2009 at Yokohama)
- ⑥ Shiraiwa, Y., Kaya, K. and Watanabe, M.M. Fixation of CO<sub>2</sub> and Production of Biomass, Biofuel and Biominerals by Microalgae, The International Algae Congress 'Performance and potential of phototrophic Aquaculture-Microalgae, Cyanobacteria and Microcrops', Hamburg, Germany, Dec. 1-2, 2009 (招待講演)
- ⑦ Suzuki, I. and Watanabe, M.M. (Univ. Tsukuba) *Botryococcus* Potential for biofuel production, Algae World Asia 2009, Bangkok, 29 Sep-1 Oct. 2009 (招待講演)
- ⑧ 五百城 幹英、田野井 孝子、河地 正伸・黛 裕介、玉置 雅紀、渡邊 信・中嶋 信美、EST Analysis of Oil-producing Green Algae *Botryococcus braunii*. Plant Biology 2009; Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, ハワイ, 2009 年 7 月 18 日-22

- 日
- ⑨ 渡邊 信 藻類を利用した持続的環境保全、新資源生物変換研究会シンポジウム、東京、2009年12月21日（招待講演）

- ⑩ Makoto M. Watanabe, Utilization of algae for liquid fuel production, 4<sup>th</sup> Asia Pacific Phycology Forum, Nov.11-14, 2008, Wellington, New Zealand

他 21 件

〔図書〕（計 1 件）

- 1) 渡邊 信、藻類バイオマスの高度利用技術、触媒年鑑（2009）644 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

- ①名称：新規なアステイカカウリス・エキセントリカス菌株、それを用いた微細藻類の培養法、及び炭化水素の製造法

発明者：渡邊 信、河地正伸、田野井孝子、森下敏之

権利者：渡邊 信、河地正伸、田野井孝子、（株）デンソー

種類：

番号：Ⓔ2009-106934

出願年月日：Ⓔ2009. 4. 24

国内外の別：国内

- ②名称：油脂製造システム及び油脂製造方法

発明者：山下邦彦、渡邊 信、井上 勲、坂倉良男

権利者：旭化成エンジニアリング（株）、筑波大学

種類：

番号：Ⓔ2009-096201

出願年月日：Ⓔ2009. 4. 10

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 信 (WATANABE MAKOTO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10132870

### (2) 研究分担者

中嶋信美 (NAKAJIMA NOBUYOSHI)

国立環境研究所・生物圏環境研究領域・室長

研究者番号：20212087

河地正伸 (KAWACHI MASANOBU)

国立環境研究所・生物圏環境研究領域・主任研究員

研究者番号：80311322

彼谷邦光 (KAYA KUNIMITSU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・特任教授

研究者番号：40124341

加藤美砂子 (KATO MISAKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：60272738

宮下英明 (MIYASHITA HIDEAKI)

京都大学・人間・環境学研究科・准教授

研究者番号：50323746

白岩善博 (SHIRAIWA YOSHIHIRO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40126420