

氏名（本籍）	谷中（中平）有香	（千葉県）
学位の種類	博士（理学）	
学位記番号	博甲第6924号	
学位授与年月日	平成26年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	生命環境科学研究科	
学位論文題目	緑藻 <i>Botryococcus braunii</i> 突然変異系統の作製及び開放系培養への検証	
主査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士 中嶋 信美
副査	筑波大学教授	博士（農学）鈴木 石根
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（農学）玉置 雅紀
副査	筑波大学准教授	博士（農学）三浦 謙治

## 論文の要旨

近年、石油資源が枯渇する懸念から次世代エネルギーとしてバイオ燃料の研究が盛んになり、さらに食糧生産と競合しないバイオ燃料の生産技術が模索されてきた。廃棄物を利用したバイオ燃料は、採算性が悪く実用化の見通しが立っていない。光合成を行う微細藻類は光合成効率やオイル生産性の高さからバイオ燃料の有効な資源として期待されている。藻類によるバイオ燃料の生産は食糧と競合しない上に、細胞が単純な構造のために成長するまでのコストは少なく、基本的に水と光があれば場所を選ばずに培養可能という利点がある。高効率でオイル生産する藻類を用いれば、わずかな面積でも需要分を上回るオイル生産が可能である。

代表的なオイル産生藻類のうち*Botryococcus braunii*（以下*B. braunii*）は次世代バイオ燃料として注目されている。*B. braunii*のオイル含有率（乾燥重量あたりのオイル重量の割合）は7から75%と高い。他の藻類と異なる点は、(1) ガソリンへの転換が可能な炭化水素を生産できる（藻類のほとんどは脂肪酸由来トリアシルグリセロール）、(2) 細胞外マトリクスへオイルを分泌している、以上2点である。*B. braunii*は群体性緑藻で、世界各地の淡水から汽水域に生育する。時折野外で大量発生（ブルーム）が起こるが、実験室内では再現できていない。*B. braunii*が生産するオイルの化学構造は主としてテルペノイドであり、そのままでもディーゼル燃料として使用できる。触媒変換によりガソリン、ケロシン（ジェット燃料）、プラスチック原料へ利用可能である。

現段階で、*B. braunii*オイルの生産コストは非常に高く、産業実用化のためには1/10程度に生産コストを低減させる必要がある。コスト削減に必須な大量培養系はスケールアップの観点から閉鎖系よりも開放系が望ましい。しかしながら、*B. braunii*の成長が極めて遅く、開放系培養では混入した他の藻類が先に増殖することから、*B. braunii*の開放系培養はこれまで成功していない。本研究では*B. braunii*の開放系培養を可能にすることを目的として、除草剤耐性の*B. braunii*突然変異体を単離した。また、得られた変異体から優良系統を選抜して開放系培養を検証した。

本研究では変異誘発剤EMSによる*B. braunii*の突然変異系統作製法を確立した。*B. braunii*の野生株2種（BOT-88-2株、BOT-22株）を用いて変異誘発処理をおこない、除草剤メチルピオロゲン（MV）およびグルホシネートで選抜することによって、変異系統を獲得した。

獲得した除草剤耐性系統を比較して、比増殖速度（ $\mu$ ）やオイル含有率（%）が優良な系統として、BOT-88-2株からは除草剤MV耐性*mvr2-10*系統、およびBOT-22株からグルホシネート耐性*gfr35*系統と*gfr101*系統を選抜した。開放系培養（5L）は、優良系統の*mvr2-10*系統を用いて、除草剤MVについて濃度を0・50・100

μMに設定し、検証した。乾燥重量・クロロフィル量・濁度の経時変化は除草剤MVを添加しない水槽では7日目以降激増し、MVを50 μMや100 μM添加した水槽では緩やかに増加した。これはMVを添加しない培養では除草剤の選択圧が無いために*B. braunii*以外の藻類が急速に増殖した結果であり、一方MVを50 μMや100 μM添加した水槽内では除草剤処理により他の藻類の増殖が抑制されつつ*B. braunii*が徐々に増殖した結果と想定された。水槽内の生物種を確認したところ、MVを添加しない条件では*B. braunii*は増加せず主にイカダモやクロレラが顕著に増加していた。一方、MVを50 μM添加した培養では14日目以降にイカダモやクロレラが増加していた。またMVを100 μM添加した培養では28日目まで他の藻類の増殖は少なく、*B. braunii*が占有していた。しかしながら、35日目以降になると他の藻類の増殖がはじまった。以上の結果からMVを100 μM添加した条件では一定期間、他の藻類の増殖抑制が可能であることが判明した。なお、MVを50 μMおよび100 μM添加した水槽において除草剤濃度は一定に維持されていたことから、培養後期には除草剤耐性のある他の藻類が出現したと推測される。開放系培養での各採取日における全オイル含有率をヘキサン法で計測したところ、MVを100 μM添加したときではどれも50 %前後と高く、MVを添加しない、もしくは50 μM添加したときは20~40 %程度へ低下した。MVを添加しない、もしくは50 μM添加したときのオイル含有率の低下は、オイル含有率の低いイカダモやクロレラが増殖した影響と考えられる。細胞外オイル含量の測定をおこなったところ、MVを100 μM添加したときの28日目が最も多く、全オイル含量と同程度であったことから、この時点で生産されたオイルのほとんどは*B. braunii*由来の炭化水素であると考えられる。MVを100 μM添加した培養条件での乾燥重量は22.8倍（28日間）になった。過去の報告例では最高13.5倍（予測）であった。また、本研究でのオイル含有率（51.3 %）は培養前より低下しなかった。以上のように本研究は世界ではじめて*B. braunii*の突然変異体の選抜に成功しただけで無く、先行研究を上回る効率で*B. braunii*を開放系で培養することに成功した。

## 審 査 の 要 旨

炭化水素オイルを生産する緑藻*B. braunii*は将来の石油枯渇に対応できうるバイオ燃料として期待されているが、増殖が極めて遅いため混入する他の藻類の成長が上回り、現時点では大量培養に必須な開放系培養が困難で産業的に生産されていない。よって効率的な開放系培養を実現させるために、本論文では除草剤による選抜手法を採用し、*B. braunii*の除草剤耐性系統を確立し、解決を目指した。これまでに*B. braunii*の変異株を確立した例はなく、本論文が世界初である。また、本論文の除草剤耐性系統の確立により*B. braunii*の開放系培養が一定期間可能となり、生産するオイルのほとんどが炭化水素オイルであることが実証された。以上の結果は、*B. braunii*を用いた開放系大量培養による、バイオ燃料生産の実用化に向けて大きな一歩であり、学位論文として十分な研究成果を挙げている。

平成26年1月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。