

緑藻 *Botryococcus braunii*

突然変異系統の作製

及び

開放系培養への検証

2014 年 1 月

谷中（中平）有香

緑藻 *Botryococcus braunii*

突然変異系統の作製

及び

開放系培養への検証

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生命共存科学専攻

博士（理学）学位論文

谷中（中平）有香

目 次

図目次	iii
表目次	v
略語	vi
概要	1
1. 序論	4
2. <i>Botryococcus braunii</i> 除草剤耐性系統の確立	
(BOT-88-2 株および BOT-22 株由来)	12
2.1. 緒言	12
2.2. 材料と方法	14
2.2.1. 供試藻類と培養	14
2.2.2. EMS 変異処理	15
2.2.3. 変異体のスクリーニング	15
2.2.4. 比増殖速度の測定	15
2.2.5. オイル含有率の測定	16
2.3. 結果	17
2.3.1. EMS 変異処理条件の検討	17
2.3.2. 除草剤耐性系統の確立	17
2.3.3. 除草剤耐性系統の評価	17
2.3.4. 除草剤耐性系統 <i>mvr2-10</i> (BOT-22 株由来) への 除草剤負荷テスト	19
2.4. 考察	20
3. <i>Botryococcus braunii</i> 除草剤耐性系統による開放系培養への検討	22
3.1. 緒言	22
3.2. 材料と方法	24

3.2.1. 供試藻類と無菌培養	24
3.2.2. 開放系培養	24
3.2.3. オイル含有率の測定	24
3.2.4. クロロフィル量の測定	25
3.2.5. 生物種の計測	25
3.2.6. HPLC による除草剤 MV 濃度の測定	26
3.3. 結果	27
3.3.1. 除草剤耐性系統 <i>mvr2-10</i> (BOT-88-2 由来)開放系培養の検証	27
3.3.2. 野生株 (BOT-88-2) での開放系培養の検証	30
3.4. 考察	32
4. 総合考察	36
5. 引用文献	39
6. 図表	45
6.1. 図	47
6.2. 表	69
7. 謝辞	75

図目次

図 1	石油ピークと枯渇	47
図 2	<i>B. braunii</i> 細胞観察像	48
図 3	<i>B. braunii</i> の細胞分裂とコロニー形成過程の模式図	49
図 4	<i>B. braunii</i> のオイル生合成経路	50
図 5	1% EMS 処理による生存率	51
図 6	除草剤耐性系統のスクリーニング	52
図 7-1	BOT-88-2 株(Race A)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と 乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤処理条件）	53
図 7-2	BOT-88-2 株(Race A)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と 乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤非添加）	54
図 8-1	BOT-22 株(Race B)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と 乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤処理）	55
図 8-2	BOT-22 株(Race B)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と 乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤非添加）	56
図 9	メチルビオロゲン耐性 <i>mvr2-10</i> 系統（BOT-88-2 株由来）の 除草剤濃度影響評価	57
図 10	前培養および本培養の様子	58
図 11	<i>mvr2-10</i> 系統（BOT-88-2 株由来）開放系培養テストで 水槽内外に設置した温度・照度ロガーの測定値	59
図 12	開放系培養水槽の除草剤 MV 濃度変化	60
図 13	<i>mvr2-10</i> 系統（BOT-88-2 株由来）開放系培養水槽の週ごとの 濁度(OD ₆₆₀) , 乾燥重量, クロロフィル量変化	61

図 14	<i>mvr2-10</i> 系統 (BOT-88-2 株由来) 開放系培養水槽の 週ごとの種構成変化	62
図 15	BOT-88-2 株(Race A)開放系培養水槽の週ごとの種構成変化	64
図 16	<i>mvr2-10</i> 系統 (BOT-88-2 株由来) 開放系培養水槽の オイル含有率・オイル含量変化	65
図 17	ヘプタン法による細胞外オイル抽出法の検証	66
図 18	開放系培養でのオイル含有率比較 (ヘキサン・ヘプタン)	67
図 19	開放系培養でのオイル含量 (細胞外オイル含量を含む)	68

表目次

表 1	各種作物・微細藻類のオイル産生能の比較.....	69
表 2	光独立栄養型微細藻類各種のオイル含有率およびオイル種類.....	70
表 3	<i>B. braunii</i> 各系統が生産する炭化水素の特徴内訳	71
表 4	<i>mvr2-10</i> 系統 (BOT-88-2 株由来) 開放系培養での 水槽内外の平均・最高・最低温度	72
表 5	<i>mvr2-10</i> 系統 (BOT-88-2 株由来) 開放系培養での 初日および 28 日目の乾燥重量とオイル含有率変化.....	73
表 6	先行研究と本研究 (<i>mvr2-10</i> 系統開放系培養) との比較.....	74

略 語

am ³	atto (= 10 ⁻¹⁸) cubic meter
Ave.	average
<i>B. braunii</i>	<i>Botryococcus braunii</i>
cDNA	complementaly deoxyribonucleic acid
CO ₂	carbon dioxide
conc.	concentration
EMS	ethyl methanesulfonate
EN	European norm
EPA	eicosapentaenoic acid
FAMEs	fatty acid metyl esters
GF	glufosinate
GM	genetic modified
DHA	docosahexaenoic acid
g	gram
<i>gfr</i>	glufosinate resistance
ha	hectare (= 10,000 cm ²)
HPLC	high performance liquid chromatography
IEA	International energy agency
LMO	living modified organism
mg	milligram (= 0.001 g)
MV	methyl-viologen
<i>mvr</i>	methyl-viologen resistance
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PUFA	polyunsaturated fatty acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SE	standard error

SEM	scanning electron microscope
t	ton (= 1,000 kg)
TAG	triacylglycerol
Temp	temperature

概 要

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つつあるが、農作物を原料とした場合、食料価格の高騰を引き起こすことから、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。これまでに廃棄物を利用したバイオ燃料の研究がなされたが、どれも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用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と見込まれている。

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百分率）は 7 から 75 % であり高いオイル産生能力を有するものがある。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の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。細胞の形態はくさび状、倒卵、楕円形で、コロニーの大きさは 30 μm から 500 μm 程度である。細胞の色調は緑から赤で増殖は著しく遅い。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、産業としての実用化のためには 1/10 程度に生産コストを低減させる必要があり、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* の成長は極めて遅く、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（エチルメタンスルホン酸）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、除草剤メチルビオロゲン（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（BOT-88-2 株：MV 耐性 29 系統，グルホシネート耐性 16 系統。BOT-22 株：MV 耐性 21 系統，グルホシネート耐性 44 系統。突然変異系統取得率 $1\sim 2 \times 10^{-8}$ ）。

獲得した除草剤耐性系統のうち、比増殖速度 (μ) が早くかつオイル含有率 (%) の多い優良系統として、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。次に優良系統の *mvr2-10* 系統を用いて、除草剤 MV (0, 50, 100 μ M) を添加し、開放系培養 (5L) にて培養を行い、各 3 点ずつ試行し検証した。その結果、乾燥重量、クロロフィル量、濁度は除草剤 MV 非添加区では 7 日目以降急激に増加したのに対し、MV 50 μ M, 100 μ M 処理区では緩やかに増加した。これは MV 非添加区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、一方 MV 処理区では除草剤により他の藻類の増殖が抑制され、*B. braunii* が徐々に増殖したのではないかと推定された。水槽内の生物種を確認したところ、MV 非添加区では *B. braunii* の増加は、主にイカダモやクロレラが顕著に増加していた。一方、MV 50 μ M 処理区では 14 日目以降にイカダモやクロレラの増加が顕著であった。また MV 処理区では 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認められた。MV 100 μ M 処理区における種別体積比を調べたところ、*B. braunii* の割合が 28 日目で 9 割、35 日目で 6 割、42 日目で 5 割程度であった。以上の結果から MV 100 μ M 処理区では一定期間、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 50 μ M および 100 μ M 処理区において除草剤濃度は一定に維

持されていたことから、本培養の後期に除草剤耐性を持つ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 100 μ M 処理区では 50 %前後と高く維持されていたのに対し、MV 非添加区、および 50 μ M 処理区では 20~40 %程度であった（前培養では 51.9 %）。MV 非添加区、または 50 μ M 処理区のオイル含有率の低下は、オイル含有率の低いイカダモ（オイル含有率 約 10 %）やクロレラ（オイル含有率 28 ~32 %）が増殖した影響と考えられる。*B. braunii* の細胞外分泌オイルは炭化水素である。細胞外オイル含量の測定をおこなったところ、MV 100 μ M 処理区の 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が *B. braunii* 由来の炭化水素であると考えられる。MV 100 μ M 処理区での乾燥重量は 28 日間で 22.8 倍になった。過去の報告例では最高 13.5 倍であった。また、本研究でオイル含有率は 51.3 %で、培養前の 51.9 %と比較して低下していなかった。従って、本研究で作成した除草剤耐性変異体を用いての開放系培養の効率は過去の研究を上回る結果を示していた。さらに開放系培養では困難だった *B. braunii* の優占培養を 28 日間可能にした。

本研究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、オイル生産の実用化に向けて大きな一歩であるといえる。

1. 序論

我々の生活に欠かせない石油は、近い将来は枯渇するといわれている。石油および液化ガスの生産量は 2006 年にピークを迎えた可能性が高いと IEA（国際エネルギー機関）により報告され、その後は減少すると予測されている（Hubbert 1956, Brandt 2010）。さらにピーク後は、特に発展途上国で増大する需要量とのギャップが急激に広がり危機的状況に陥り、2035 年には予測されている石油需要量の半分程度しか生産できないと見込まれる（図 1）。この予測に基づき、石油資源の枯渇への懸念およびガソリン価格の高騰からエネルギーの供給源は再生可能エネルギーへ転換されつつある。代表的な再生可能エネルギーとして、風力、水力、地熱、太陽光、バイオマス資源が挙げられる。なお、エネルギー密度が高い原子力発電は、1987 年のチェルノブイリや 2011 年の福島に代表される原子力発電所事故や廃棄物処理の問題から、今後は規模が縮小され、別のエネルギーへ代替されると推測される。現在までに太陽光など、再生可能エネルギーの開発により一定量の電力補完は可能になったが、再生可能な液体もしくは気体燃料の供給は未整備である。ジェット機の航行には運搬や取扱が容易な液体燃料が望まれており、太陽光等は電力を供給するので燃料とはならず、液体燃料を生産できる再生可能エネルギーはバイオマス由来しかなく、対応したバイオマス資源の開発が期待されている(Ndimba *et al.* 2013)。

次世代エネルギーとしてバイオ燃料の研究が近年盛んになっているが、農作物を原料としたバイオ燃料の生産は、食糧供給とトレードオフの関係になるために食糧生産と競合しないバイオ燃料生産の確立が模索されている。食糧生産と競合しないバイオ燃料として、これまでに廃棄予定である廃材木、稲藁、トウモロコシの葉茎、サトウキビの搾りかすなどのバイオマス資源によるバイオエタノールの生産が検討されているが、市場へ商品として供給できるまで実用化される（産業実用化）にはほど遠い。廃棄予定のバイオマス資源をバイオエタノール化させるには植物の頑強な細胞壁の構成成分、特にセルロース、を分解して糖を得る必要があり、セルロースの分解プロセスの効率が低く、処理コストが嵩むので、産業実用化はされていない。セルロースを分解する手法は大きく分けて 2 つあり、

1 つは硫酸等を用いた酸糖化法で、もう 1 つはセルラーゼを用いた酵素糖化法である。酸糖化法は処理時間が短くてコストはかからないが、すぐに過分解が起こり糖の収量が低下し、さらに過分解物が酵母などの発酵を阻害する欠点がある。よって適切に反応を制御する技術が必要となる。また酸廃液を中和する処理のコストがかかる上に、酸によって装置が腐食されるのでその対応が必要である。一方、酵素による処理は長時間で、高コストである。しかしながら、高压や熱水による分解等で前処理した時間短縮化や従来よりも効率の良いセルラーゼの単離および利用により、将来は改善される可能性がある。

藻類は安価で生産可能であることが想定されている。その理由として、①藻類は食糧（主食）に使用されないために価格高騰の懸念はない、②藻類は陸上植物に比べて単純な構造であるため成長するまでのコストは少ない、という点があげられる。藻類は基本的に水と光があれば、場所を選ばずに大量培養が可能である。ただし、どの地域でも水の入手は容易であるとは言い難く、よって淡水で生育する藻類を培養する場所は限られてしまう。藻類のうち、特に微細藻類はボディサイズが微小で成体までの成長期間が短いため、維管束植物と比較して高効率な燃料生産性が期待される。現在までにスピルリナ、クロレラ、ユーグレナが開放系で大量培養され、栄養サプリメントなど産業利用されている。また、藻類のうち光独立栄養の種は二酸化炭素排出削減にも貢献可能である。高効率でオイルを生産する藻類を用いれば、わずかな耕作面積でも現在の石油需要を満たすと見込まれている。例えば、オイル含有率（乾燥重量あたりのオイル重量の割合）70 %の藻類ならば、36 Mha（地球上の耕作面積の 1.8 %相当）だけで世界の石油需要を満たすことが可能だと推定されている（Chisti 2007; 渡邊 2010, 表 1）。しかしながら過去に藻類でのバイオ燃料の生産が模索されたが、たびたび頓挫している。例として我が国では 1993 年から 2000 年度まで実施された経済産業省主導のニューサンシャイン計画が挙げられる。当時の原油価格は低く推移しており（1999 年 WTI 原油価格 19.17 USD/バレル）、高いコストをかけてまで藻類でオイル生産する必要がないために、研究が打ち切りになった。一方で、現在は原油価格が高騰したこと（2012 年 WTI 原油価格 94.14 USD/バレル）、また、藻

類においてオイル生産性の高い種類が見つかったため、藻類によるバイオ燃料生産の採算がとれる見通しがあったため (Haag 2007) , 藻類オイル生産は再び着目されるようになった。

藻類オイル生産に適していると考えられる代表的な藻類は以下の通りである。
なお、どの種においてもオイル生産としての産業実用化は確立されていない。

- ① *Nannochloropsis* (オイル含有率 31~68 %) は不等毛植物門、真正眼点藻綱に属する単細胞藻類である。ほとんどが海産である。この藻類が生産している脂質のうちトリアシルグリセロール (TAG) は 10 % から 20 % で、その他はガラクト脂質やリン脂質である (Hodgson *et al.* 1991)。また TAG の構成成分である脂肪酸のうち多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のエイコサペンタエン酸 (EPA ; 20:5 n-3) を多量に生産する特徴がある。
- ② *Neochloris* (オイル含有率 35~54 %) は緑色植物門、緑藻綱に属する。蓄積する脂質の約 80 % が TAG で、他はリン脂質、糖脂質などである (Tornabene *et al.* 1983) 。
- ③ *Phaeodactylum* (オイル含有率 20~30 %) 不等毛植物門、珪藻綱に属する単細胞藻類である。熱帯から極地、海水から陸水と多様な環境に生育する。また PUFA である EPA を生産する生物として注目されている。*P. tricornuum* の生産する全脂肪酸のうち約 30% が EPA である (Domergue *et al.* 2002) 。
- ④ *Dunaliella* は緑色植物門、緑藻綱に属する単細胞性藻類である。*D. salina* (シオヒゲムシ) は死海など高塩濃度環境に生息することで知られ、細胞壁を持たない特徴がある。主にカロテノイドの生産に利用され、その製品は化粧品や健康食品として市場に供給されている。オイルを生産するのであれば同属他種の *D. tertiolecta* (オイル含有率 23 %) が適している。産生するオイルは TAG である。*D. tertiolecta* は極端な好塩性ではないが、海水より低い濃度で生育する。すでに確立している *D. salina* の工業的大量培養法を転用しての生産が期待されている。
- ⑤ *Botryococcus braunii* (オイル含有率 7~75 %) に関しては後述する。

- ⑥ *Chlorella* (オイル含有率 28~32 %) は緑色植物門、トレボウクシア藻綱に属する。産生するオイルは TAG である。自生孢子により無性的に増殖を繰り返す。クロレラは健康補助食品として市場へ供給されている。
- ⑦ *Pseudochoricystis ellipsoidea* (オイル含有率 10 %) は日本の温泉地から単離された緑色単細胞藻類で、正式な記載はされていない。形態的に *Choricystis* 属に類似するがピレノイドを欠く葉緑体を有するという分類学的特徴が一致していないので、別属と扱っている (渡邊 2012)。TAG を蓄積するが少量の炭化水素オイルも含有する (渡邊 2010)。
- ⑧ *Euglena* はユーグレナ植物門の葉緑体を持つ鞭毛虫で、和名ミドリムシで知られ、鞭毛を有し運動性がある。葉緑体があるので光合成をするが、有機物も利用して成長する。エネルギー貯蔵物質として β -1-3 グルカンの多糖類パラミロンと $C_{20}\sim C_{23}$ の高級脂肪酸と $C_{12}\sim C_{18}$ の高級アルコールから成るワックスエステルを蓄積し、パラミロンは嫌気・暗条件下でワックスエステルに転化される。*Euglena* の産業的な大量培養法はすでに確立されていて、栄養サプリメント等で市場に供給されている。
- ⑨ オーランチオキトリウム (*Auranchytrium* ; オイル含有率 50~77 %) はストラメノパイル・ラビリンチュラ類に属する海洋性真核微生物で、葉緑体を備えない従属栄養生物である。そのため培養には炭素源や窒素源となる有機物を添加する必要がある。ラビリンチュラ類は PUFA を高濃度で蓄積することが知られている。オーランチオキトリウムの多くは脂肪酸を生産するが、例外的に炭化水素の一種であるスクアレノ ($C_{30}H_{50}$) を乾燥重量あたり 20 %蓄積する培養株が報告されている (渡邊 2010; Kaya *et al.* 2011)。なお、炭化水素を乾燥重量あたり 20 %以上生産する藻類はこれまでに *B. braunii* しか報告されていない。オーランチオキトリウムのオイル含有率 (%) は低い成長は早いため *B. braunii* よりも生産性が上回ると見込まれており、今後の産業利用が期待されているが、従属栄養のため培養には適度な栄養源を供給しなければならず、光独立栄養の藻類と比較すると低コストでの培養には課題が残る。

多くの藻類が生産する TAG はメタノールを触媒にしてメチルエステル化され、脂肪酸メチルエステル (FAMES) となり、バイオディーゼル燃料として使用される。問題は、TAG をメチルエステル化するには手間がかかり、その分のコストが嵩むという点である。また、藻類由来のオイルに多く存在する 4 箇所以上の二重結合をもつ EPA や DHA などの不飽和脂肪酸は酸化されやすい性質があり、そのままではバイオディーゼル燃料としての利用が制限される。藻類由来のオイルが酸化されやすい性質は維管束植物が生産するオイルであるリノール酸やリレイン酸とは異なる。さらに FAMES をバイオディーゼル燃料として普及させるには諸外国の基準を考慮しなければならず、例えば欧州バイオディーゼル基準 (EN 14213/14214; <http://www.biofueltesting.com/specifications.asp>) では 4 箇所以上の二重結合をもつ不飽和脂肪酸の混入は 1 % までと制限されており、さらに化学構造を変換する必要がある。また、この基準をクリアしたとしても、運輸燃料として FAMES を使用するには、内燃機関の腐食、NO_x の発生、低温凝固など、解決すべき課題が多い (渡邊 2012)。

本研究で扱う緑藻 *Botryococcus braunii* Kützinger は産業化が大いに期待されている藻類である。オイル産生微細藻類のほとんどは脂肪酸由来の TAG を細胞内に蓄積するのに対し、*B. braunii* はガソリンやジェット燃料 (ケロシン) などへ転換可能な長鎖炭化水素オイルを細胞外マトリクスに分泌し、オイル産生緑藻の中では比較的高い割合のオイル含有率 (乾燥重量あたりのオイル重量割合) で 75 % を有するものがある (Metzger and Largeau 2005; Chisti 2007, 表 2)。さらに通常のオイル産生藻類は細胞内に蓄積するのに対し *B. braunii* は細胞外にオイルを分泌するので、オイル回収コストの大幅な低減が期待されている。*B. braunii* は緑色植物門、トレボウクシア藻綱のコリシステイス系統群に属する (Senousy *et al.* 2004)。世界各地の淡水から汽水域に生育する群体性藻類で、30 μm から 500 μm 程度の大きさのブドウの房状をしたコロニーを形成し、色調は緑から赤である。また、細胞の形態はくさび状、倒卵、楕円形であり、2 種類の細胞壁 : Apical cap (細胞上部を覆う ; 透明で脆く薄い組織) と Cell cup (細胞

基部を覆う;頑強で厚い組織)により細胞は覆われている(図2;Tanoi *et al.* 2013)。*B. braunii*の細胞は細胞壁内で長軸方向に二分裂し、娘細胞がApical capを押しつけて外側へ突き出していくことを繰り返すため、扇状などのコロニーを形成すると予想されている(図3;Tanoi *et al.* 2013)。*B. braunii*を含めたコリシステイス系統群の有性生殖は知られておらず(渡邊 2012)、*B. braunii*は無性生殖のみで増殖している可能性がある。細胞外に分泌するオイルを細胞間隙に蓄積する。また、大量の粘性細胞外多糖を分泌する(Allard and Casadevall 1990)。増殖は他の藻類と比較して著しく遅く、報告されている倍加時間は7日である(Chirac *et al.* 1985)。野外で*B. braunii*は時折ブルームといわれる大量発生する現象が知られているが、実験室内ではいまだに再現されていない。したがって、この現象を解明出来れば、本種の大量生産への足がかりとなりえる。*B. braunii*は生産する炭化水素の炭素数により3タイプ(Race A, B, L)もしくは4タイプ(Race A, B, L, S)に分類され(表3)、この炭化水素による分類は18S rRNA系統樹とおおよそ一致している(Kawachi *et al.* 2012)。Race AやRace Sは脂肪酸由来のオイルを、Race BやRace Lはテルペノイド由来炭化水素オイルを生産する(Metzger *et al.* 1985, 1990; Huang and Poulter 1989; Kawachi *et al.* 2012)。炭化水素合成の系統ごとの仔細は以下のとおりである。Race Aでは葉緑体でパルミチン酸(C₁₆)やオレイン酸(C₁₈)といった脂肪酸まで合成されたのちに、小胞体へ移行し、脂肪酸に炭素が2つずつ縮合されることにより炭化水素の伸長が起こり、最終的には直鎖状の長い炭化水素アルカジエンやアルカトリエンが生成する(Metzger and Largeau 2005)。Race BではRace Aとは異なる合成経路で、C₃₀のトリテルペノイド、特に*B. braunii*特有の炭化水素ボトリオコッセンを生産する(Metzger and Largeau 2005)。このボトリオコッセンは触媒ゼオライトを用いたクラッキング処理によりガソリン(C₅~C₈)やジェット燃料ケロシン(C₁₂~C₁₅)など炭素数を少なくさせる変換が可能である(Hillen *et al.* 1982)。触媒の作用によって反応時間は数秒程度と極めて短くなり、この高効率な手法を用いればコストはかからず、実際の石油精製の現場ですでに用いられている。Race Bでの炭化水素合成はRace Aでみられる脂肪酸由来ではなく、まったく別

なテルペノイドの経路により行われ、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸よりイソプレノイド (C_5) が合成され、さらに伸長を繰り返してトリテルペノイド (C_{30}) が生成される。イソプレノイド生合成経路としてヒトなど真核生物やバクテリアの多くの種で存在するメバロン酸経路が知られているが、車軸藻綱を除いた緑藻のグループでは MEP 経路 (非メバロン酸経路) しか報告されていない (Schwender *et al.* 2001)。陸上植物や車軸藻綱ではメバロン酸経路と MEP 経路とも存在し、葉緑体内では MEP 経路が、サイトゾルではメバロン酸経路が使用されている (Lichtenthaler 1999; Schwender *et al.* 2001)。 *B. braunii* のイソプレノイド合成経路は2経路のうち MEP 経路しか存在しないのかが不明であったが、 *B. braunii* の3株 (BOT-88-2, BOT-22, BOT-70) による EST 解析により MEP 経路関連遺伝子由来の cDNA しか検出できなかったこと (Ioki *et al.* 2012abc; Baba *et al.* 2012)、および同位体を用いた代謝研究 (Sato *et al.* 2003; Ishimatsu *et al.* 2012) により *B. braunii* のイソプレノイドは MEP 経路由来であることが判明した (図4)。Race B に特異的な炭化水素ボトリオコッセンを合成する酵素の実体は最近になり解明された (Okada *et al.* 2004; Niehaus *et al.* 2011)。ボトリオコッセンの化学構造はスクアレンに類似しているためにスクアレン合成酵素 (BSS) 酵素に類似することが示唆されていた。EST 配列の探索等でスクアレン合成酵素の cDNA と塩基配列が類似する遺伝子が3種の存在することが判明した。さらにこれらの酵素単独ではボトリオコッセンの合成が不可能で、2つの酵素 (SSL-1, SSL-3) を組み合わせてボトリオコッセンの合成が可能となることが判明した (Niehaus *et al.* 2011)。 *B. braunii* には、Race A と Race B の他に Race L と Race S が存在する。Race L に属する株は少数のためにオイルの合成経路に関してはほとんど解析されていないが、クロロフィルの構成成分フィトール、あるいはリコペンやカロテン由来のテトラテルペノイド (C_{40}) であるリコパジエンを合成している (Metzger and Casadevall 1987)。また最近同定された Race S は、Race A に類似の炭化水素を生成するが炭素数が異なることにより別系統にされたグループである (Kawachi *et al.* 2012)。Race S は C_{18} から C_{20} のエポキシ-*n*-アルカンや飽和 *n*-アルカンを蓄積している。

B. braunii の生産する炭化水素オイルの生産を産業実用化するためには、コストは低くかつ信頼できる培養システムの確立が必須である。開放系培養は最も安価に生産できる培養法である。しかしながら開放系培養は *B. braunii* の欠点である成長の遅さのため、成長速度の早い緑藻やシアノバクテリア等が混入・増殖し、*B. braunii* の増殖は抑制されて培養不良に陥る (Sheehan *et al.* 1998) ため不適である。本研究では *B. braunii* の開放系培養を実現させる方法を模索した。他の藻類の成長を抑制し、*B. braunii* の成長を妨げない手段として、*B. braunii* を育成させるための選択圧を与える必要があり、その選択圧として遺伝子組換え (GM) 作物で利用されている除草剤の使用を検討した。除草剤は農業において不要な雑草の成長を阻害する化学物質であり、除草剤の使用により雑草の成長を抑制するが、除草剤耐性 GM 作物のみが生育する。除草剤の標的はイネ科など維管束植物を想定しているが、葉緑体を備えた微細藻類は維管束植物と共通する機構が多いために除草剤に対して高感受性である (Deng *et al.* 2012)。よって本研究では除草剤存在下における *B. braunii* の開放系培養の適用可能性について検証を行った。具体的には除草剤耐性系統 *B. braunii* を EMS 処理により作製し、除草剤の投与により開放系培養で競合相手 (シアノバクテリアや緑藻類等) の成長を抑制し、除草剤耐性 *B. braunii* のみ増殖させることを目指した。検討した事案は、①除草剤耐性系統の作製、②除草剤耐性系統の開放系培養、である。*B. braunii* 変異系統の確立は未報告であるために、①については本研究で実験手法の最適化をおこなった。続いて除草剤耐性系統を確立し、さらに有望な系統を選抜した。選抜した系統を用いて他の藻類の侵入が容易な開放系培養を実施し、*B. braunii* を優占させた培養が可能であるかを検証し、産業実用化について検討した。

2. *Botryococcus braunii* 除草剤耐性系統の確立 (BOT-88-2 株および BOT-22 株由来)

2.1. 緒言

本研究の前半では *B. braunii* の突然変異導入手法を確立し、除草剤耐性系統の確立を目指した。*B. braunii* 由来の炭化水素生産の産業実用化を目指すには、生産コストを減少させる必要がある。最も効果的なコスト削減方法の 1 つは、屋外での開放系で *B. braunii* のみを増殖させる大量培養系システムにすることである。しかしながら屋外開放系で *B. braunii* を培養すると、*B. braunii* 以外の緑藻やシアノバクテリアが増殖し、*B. braunii* のみの培養はうまくいかないことが報告されている (Sheehan *et al.* 1998)。この原因として *B. braunii* の成長が極端に遅いためであると報告されていて、したがって競合する種の増殖を抑制し、*B. braunii* によるオイル生産コストを可能限り減少させる手法を構築する必要があった。対応策として競合相手のシアノバクテリアや緑藻の増殖を抑制させるのに除草剤を使用した培養法を検討した。除草剤は *B. braunii* を含めた緑藻に影響を及ぼすが、除草剤に耐性のある *B. braunii* は正常に増殖可能であると想定した。藻類を含めた各種生物への遺伝子導入法は確立されているが、*B. braunii* への遺伝子導入法は未確立である。よって突然変異処理後に除草剤で変異系統を選抜する手法で、除草剤耐性系統の確立を目指した。

B. braunii での突然変異系統はこれまでに報告されていないため、本研究で最適条件を検証し、実際に変異系統を確立した。変異誘発には EMS (エチルメタンスルホン酸) を使用し、スクリーニングに使用した除草剤は、①メチルビオロゲン (MV, 商品名パラコート), ②グルホシネート (商品名バスタ[®]) の 2 種である。EMS は植物や酵母、線虫などでの化学的変異誘発によく利用される揮発性の突然変異誘起剤であり、DNA の塩基置換を引き起こす作用がある。EMS による最適な変異挿入が起こる条件として致死率 50 % に設定し、処理時間を検討した。メチルビオロゲン (MV) はピリジニウム系除草剤に分類され、作用機序は細胞内に入り NADPH などから電子を奪って活性酸素ラジカルを生成する (Suntres 2002)。そのためにヒトを含め動物への毒性が高いことが知られてい

る。また、MV は活性酸素による生物影響の研究に汎用され、知見は豊富にある。グルホシネートはアミノ酸系除草剤に分類され、作用機序はグルタミン合成酵素の作用を阻害するため、塗布された植物は体内にアンモニアが蓄積して枯死する (Hoerlein 1994)。

EMS 処理した *B. braunii* 変異細胞を除草剤 2 種で選抜し、耐性系統を確立した。また確立した系統について、成長およびオイル産生能力でさらに有用な系統を選抜した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 供試藻類と培養

本研究で使用した緑藻 *Botryococcus braunii* の野生株 BOT-88-2 (Race A), および BOT-22 (Race B) は, 国立環境研究所 生物・生態系環境センター 生物資源保存研究推進室長 河地正伸 博士より提供頂いた。*B. braunii* の培養は 24 時間連続光下, $80\text{--}90\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 25°C で維持された培養チャンバー内で実施した。*B. braunii* の育成培地は主に AF6 培地 (Kasai *et al.* 2004) で, 場合により Chu 培地を改良した BOT 培地 (Chu 1943; Tenaud *et al.* 1989; Ioki *et al.* 2012d) を使用した。なお, AF6 培地は BOT-22 株由来変異系統の評価に, BOT 培地は BOT-88-2 株由来変異系統の評価に使用した。

培地の組成は以下のとおりである。

AF6 培地 : $14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaNO}_3$, $2.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NH}_4\text{NO}_3$, $3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_2\text{HPO}_4$, $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCO}_3$, $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Fe citrate nH}_2\text{O}$, $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{citric acid}$, $0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Biotin}$, $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Thiamin HCl}$, $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Vitamin B}_6$, $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Vitamin B}_{12}$, $98\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{FeCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $18\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $11\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1.25\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MES}$ (pH 6.6)。

BOT 培地 : $0.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KNO}_3$, $0.04\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{K}_2\text{HPO}_4$, $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.054\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.01\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Fe citrate}\cdot\text{nH}_2\text{O}$, $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{citric acid monohydrate}$, $18.1\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $2.22\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.5\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.8\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (pH 7)。

液体培養は滅菌したガラス製試験管, またはガラス製三角フラスコ (0.2 L~1 L) 内で静置した状態で実施した。三角フラスコでの培養では $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターでろ過した空気を常時バブリングした。固形培地は各培地にアガロースを 1.5 %添

加して作製した。除草剤耐性系統の選抜や培養はメチルビオロゲン（ナカライテスク社，京都，日本）50 μM および 100 μM ，グルホシネート（バスタ；バイエルクロップサイエンス社，東京，日本）40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を含む培地により行った。

2.2.2. EMS 変異処理

50 mL チューブに対数増殖期の *B. braunii* 細胞を 40 mL 採取し，3,000 rpm で 10 分遠心し，上清を廃棄して沈殿物を新しい培地で洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。続いて，最終濃度 1 %になるように EMS（ナカライテスク社，京都，日本）を添加し，最適な処理時間を検討した（0.5，1，2，4，12，24 時間）。EMS 処理後の細胞を新しい培地で洗浄し，3,000 rpm で 10 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返した。回収した細胞に新しい培地を添加し，1 週間静置した（培養条件は 2.2.1 を参照）。EMS 処理後の細胞をスライドガラスに展開し，蛍光顕微鏡（BH-2；オリンパス，東京，日本）で観察し，生存率は生細胞数を全細胞数で除することにより算出した（ $n = 5$ ）。細胞の生死は蛍光顕微鏡下でクロフィルの自家蛍光により赤に発色したものを生細胞，緑色に発色したものを死細胞として判定した。

2.2.3. 変異体のスクリーニング

EMS 変異処理は 2.2.2. と同様に行った。EMS 処理は最適である 4 時間で実施した。EMS 処理後に細胞を洗浄し，新しい培地へ移し，1 週間静置した。その後，除草剤 MV 100 μM もしくはグルホシネート 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を含む固形培地に変異源で処理した *B. braunii* を 1 mL ずつ塗布し，培養チャンバー内で育成した。2 ヶ月から 6 ヶ月後に出現するコロニーは，除草剤耐性の有無を確認するために新たな除草剤を含有する固形培地へ滅菌した白金耳を用いて植え継いだ。

2.2.4. 比増殖速度の測定

確立した変異系統を評価するために，*B. braunii* が対数増殖期の状態になった元の培地から 1/10 量である 1 mL を新しい培地 9 mL へ植え継ぎ，その濁度変化

を測定した。滅菌して密封した 10 mL 培地入り試験管で *B. braunii* を 80–90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot 25^\circ\text{C}$ の光条件で育成した。測定したのは 660nm での濁度 (OD_{660}) であり、濁度測定には分光光度計 (Spectronic 20A ; 島津製作所, 京都, 日本) を使用した。測定時期は対数増殖期に入った期間とした。なお, OD_{660} とバイオマス重量には正の相関関係があることが示されている (Shimamura *et al.* 2012)。指標となる比増殖速度 (Specific growth rates; μ , day^{-1}) は以下の式より算出した。

$$\mu = \ln (\text{OD}_{t_2} / \text{OD}_{t_1}) / (t_2 - t_1)$$

[t_1 と t_2 は時間 (日数), OD_{t_1} と OD_{t_2} は t_1 および t_2 時の OD_{660}]

2.2.5. オイル含有率の測定

AF6 もしくは BOT 培地 2 mL を予め重量を測定したガラス繊維ろ紙 (Whatman GC/F; GE ヘルスケア・ジャパン, 東京, 日本) で濾過^{ろか}し、一晚凍結乾燥を行った。凍結乾燥直後に重量を測定し、増加量を乾燥重量 (バイオマス重量) とした。その後、ろ紙上の細胞をヘキサン (*n*-hexane) 3 mL を入れたガラス製チューブ内に一晚浸漬しオイルを溶出させた。ガラス製チューブにヘキサンと等量の滅菌ミリ Q 水を混合し、重量を測定しておいた別の容器に上層を分取し、酸化防止用に N_2 ガスを充填しながらヘキサンを蒸発させた。容器の重量を測定し、増加分をオイル重量とした。

なお、オイルの量に関連する用語を以下のように定義する。

- ・ オイル含有率 (%) は、オイル重量を乾燥重量 (バイオマス重量) で割った百分率
- ・ オイル含量 (mg L^{-1}) は、培養液 1L あたりのオイル重量

2.3. 結果

2.3.1. EMS 変異処理条件の検討

EMS 処理は *B. braunii* 野生株の BOT-88-2 (Race A) および BOT-22 (Race B) で実施した。EMS で処理した細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、生死の判別をおこなった。各処理時間 (0.5, 1, 2, 4, 12, 24 時間) での生存率を算出した (図 5, $n = 5$)。両株の細胞とも処理後 2 時間までは生存率 70 %程度を維持していたが、処理時間をさらに長くすると急激に低下した。生存率 50 %前後となるのは両株とも 4 時間であった。

2.3.2. 除草剤耐性系統の確立

2.3.1.で確立した条件に基づいて、細胞 (BOT-88-2 および BOT-22) を生存率 50 %前後となる EMS 処理を 4 時間で実施し、続いて除草剤で選抜した。

除草剤 MV 耐性もしくはグルホシネートを含む固形培地を用意し、EMS 処理済みの野生株細胞 (プレート 1 枚につき $10^6 \sim 10^7$ 細胞) を添加して育成した。除草剤耐性のある *B. braunii* のコロニーは 2 ヶ月から 6 ヶ月で出現した。さらに単離した *B. braunii* のコロニーを新しい除草剤入りの固形培地へ塗り広げ、育成した (図 6)。この操作を 3 回繰り返して、除草剤耐性系統を確立した。塗り広げたコロニーが実験に使用可能までに成長する期間は約 1 年であった。

2013 年 11 月現在までに獲得することができた除草剤耐性系統は、BOT-88-2 (Race A) 由来の MV 耐性は 29 系統で、グルホシネート耐性は 16 系統であった。BOT-22 (Race B) 由来の MV 耐性は 21 系統で、グルホシネート耐性は 44 系統であった。また獲得した耐性系統を細胞数で除した、突然変異系統の取得率は $1 \sim 2 \times 10^{-8}$ であった。

2.3.3. 除草剤耐性系統の評価

2.3.1.で確立した除草剤耐性系統を 2 回に分けて評価した。1 回目は比増殖速度によって、BOT-88-2 株から上位 8 系統を、BOT-22 株から上位 10 系統を選抜した ($n = 1$)。2 回目は比増殖速度が早くかつオイル含有率 (%) の高い優良系統

を選抜した ($n = 3$)。有意差は、除草剤を入れないで培養した野生株の比増殖速度を基準にして、 t 検定で検証した。

1 回目で選抜した系統は以下のとおりである。BOT-88-2 株 (Race A) の MV 耐性系統は *mvr1-37*, *mvr13*, *mvr2-10*, *mvr2-13*, *mvr13* で、グルホシネート耐性は *gfr2-1*, *gfr2-2*, *gfr2-3* である。BOT-22 株 (Race B) の MV 耐性系統は *mvr01*, *mvr09*, *mvr10*, *mvr15* で、グルホシネート耐性は *gfr01*, *gfr13*, *gfr29*, *gfr34*, *gfr35*, *gfr101* である。

続いて 2 回目の選抜を実施した (図 7-1, 図 8-1)。除草剤を投与した野生株 (MV-control および GF-control) は死滅し比増殖速度 (Specific growth rates: μ , day^{-1}) はマイナス値であった。すべての除草剤耐性系統は正常に増殖した。しかしながら、ほとんどの系統で非添加区の野生株と比較して若干もしくは大幅に比増殖速度 (μ) やオイル含有率 (%) が低下し、有意差があった。

BOT-88-2 株 (Race A) 変異系統の中で比増殖速度 (μ) が最も速いのは除草剤 MV 耐性 *mvr2-10* 系統 ($\mu = 0.0317$, オイル含有率 32.1 %), 続いて *mvr13* 系統 ($\mu = 0.0278$, オイル含有率 23.7 %) で、それらは非添加区の野生株 ($\mu = 0.0353$, オイル含有率 39.9 %) と比較して有意差はなかった。オイル含有率 (%) で最も高い *mvr1-37* 系統 ($\mu = 0.0105$, オイル含有率 36.9 %) は、変異系統内で比増殖速度が最も遅く有意差がある ($P < 0.01$) ので却下した。オイル含有率で 2 番目に高い *mvr2-10* 系統は有意差がある ($P < 0.05$) が、比増殖速度は変異系統内で最も早いので MV 耐性系統として次章の開放系での培養実験に用いた。BOT-22 株 (Race B) 変異系統では比増殖速度およびオイル含有率ともに野生株 ($\mu = 0.0547$, オイル含有率 33.5 %) と比較して有意差がない上位 2 系統, *gfr35* ($\mu = 0.0434$, オイル含有率 26.1 %) および *gfr101* ($\mu = 0.0374$, オイル含有率 28.4 %) を選抜した。以上より, BOT-88-2 株から除草剤 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。

なお除草剤を投与しない条件で、非添加区の野生株 BOT-88-2 ($\mu = 0.0477$, オイル含有率 26.6 %) および BOT-22 ($\mu = 0.0480$, オイル含有率 36.1 %) と比増殖速度 (μ) もしくはオイル含有率 (%) で有意差があったのは、わずか 3 系

統であった（図 7-2, 図 8-2）。BOT-88-2 株由来の変異系統で有意差があったのは *gfi2-2* 系統 ($\mu = 0.0304$, $P < 0.05$) と *gfi2-3* 系統 ($\mu = 0.0276$, $P < 0.05$) で, BOT-22 株由来の変異系統で有意差があったのは *mvr10* 系統（オイル含有率 30.0 %, $P < 0.05$ ）のみであった。

2.3.4. 除草剤耐性系統 *mvr2-10* (BOT-22 株由来) への除草剤負荷テスト

選抜した除草剤 MV 耐性系統 *mvr2-10* (BOT-22 株由来) への除草剤投入濃度を変えた負荷テストを実施した（図 9）。負荷テストは液体試験管培養 ($n = 3$) で, 除草剤 MV 濃度は 0, 50, 100, 200, 400, 800 μM で, 対数増殖期の 56 日間での比増殖速度 (μ) によって評価した。各濃度での μ 平均値は, 0.0289, 0.0206, 0.0160, 0.0116, 0.0051, -0.0004 であった。非添加区の野生株と比較したところ各濃度とも有意差はみられなかった。なお, MV を 800 μM 添加して培養した *B. braunii* の細胞は死滅した。

2.4. 考察

B. braunii の EMS 変異手法は本研究で初めて確立したため、他の生物の事例と比較して処理が最適に行われたかどうかを検証した。EMS 1% (0.092 M) での最適な処理時間は、*B. braunii* の 2 野生株とも生存率が 50 % になった 4 時間とした。他の生物での EMS 変異処理の例は、EMS 0.046 M を 15 分間処理した緑藻のクラミドモナスがあり、その生存率は 50 % 程度であった (Flynn *et al.* 2002)。クラミドモナスと比較すると *B. braunii* への EMS の処理は濃度が 2 倍で、さらに処理時間は長く 16 倍と過酷な条件であった。*B. braunii* は独自の頑強な構造物を備え、細胞基部は細胞壁と細胞外分泌物からなる Cell cup で覆われている (図 2, 図 3)。したがって物質を通過させにくいと推定される。そのために細胞まで EMS が浸透しづらいため、長時間の EMS 処理が必要であったと想定される。また、この処理条件によって *B. braunii* では除草剤耐性のある変異体を 110 系統も確立できたことから、クラミドモナスにとっては過酷であった EMS 処理の条件は、*B. braunii* に対しては適切であったと考えられる。

次に確立した系統において、EMS による変異挿入でオイル生産が低下しなかったかどうかを検証した。EMS はランダムに DNA 上の複数箇所に変異を起こすので、オイル合成に関連する遺伝子等を損傷し、オイル合成の低下を引き起こす懸念があった。したがって比増殖速度のみで選抜した耐性系統に対して、さらに比増殖速度とオイル含有率で選抜を実施した。その時に除草剤処理区の変異系統でオイル含有率 (%) が有意に低下したのは 18 系統のうち 11 系統であった (図 7-1B, 図 8-1B)。しかしながら除草剤非添加区では、1 系統を除く全ての変異系統のオイル含有率は野生株と同程度で低下しなかった (図 8-2B)。一方、比増殖速度は除草剤処理区では低下する系統があり (図 7-1A, 図 8-1A)、除草剤非添加区では低下しなかった。したがって、変異系統で除草剤処理区でのオイル含有率や比増殖速度が低下した現象は除草剤の影響によるもので、EMS で引き起こされた変異挿入による影響ではなかったと考えられる。確立した変異系統は除草剤耐性ではあるが、除草剤濃度が高くなると成長阻害が起こる事 (図 9) から、除草剤による影響はある程度あり、そのためにオイル合成能力が低下したと推定さ

れる。

活性酸素ラジカルを生じる作用がある除草剤MVに耐性があるならば活性酸素の除去に関連する遺伝子の発現が上昇すると予想される。その候補遺伝子として Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Ascorbate peroxidase, Catalase, ABC transporter 等が挙げられる。維管束植物では染色体上の変異位置を同定するのに戻し交雑法が用いられるが、*B. braunii* は有性生殖が確認されておらず生活環は解明されていないため、戻し交雑法での変異位置同定ができない。また整備されたゲノム情報は存在しないので網羅的なゲノム解析による変異の推定は難しい。以上より、本研究で選抜した除草剤耐性系統の変異が DNA 上のどの位置に起きているかは現状では確認できない。なお、現在までに *B. braunii* のゲノム解読はいくつかの株で進行中であり、その断片的な配列情報と、トランスクリプトーム解析での cDNA 配列情報が利用可能 (Baba *et al.* 2012; Ioki *et al.* 2012bc; Molnár *et al.* 2012) である。これらのデータを利用して、前述の候補遺伝子の発現量について検討中である。

耐性系統は、比増殖速度とオイル含有率を比べてどちらも劣っていない上位を選抜した (図 7-1, 図 8-1) が、別な手法での選抜を検証した。非添加区の野生株の比増殖速度とオイル含有率を基準として、各変異系統の相対値を算出し、変異系統の比増殖速度とオイル含有率を掛け合わせて評価した。その場合の上位は BOT-88-2 株 (Race A) 由来では 1 位 *mvr2-10* (0.72), 2 位 *mvr13* (0.47) であり, BOT-22 (Race B) 由来では 1 位 *gfr35* (0.86), 2 位 *gfr101* (0.84) であった。またオイル含有率は最も高いが比増殖速度は有意差があるほど遅いために棄却した BOT-88-2 株由来の *mvr1-37* 系統は 0.28 で 6 位となり、この手法でも棄却された。よって、別な手法で変異系統を選抜しても同様な結果となった。

以上まとめると、EMS 変異によって除草剤耐性系統を確立し、比増殖速度 (μ) とオイル含有率 (%) より優秀な *mvr2-10* 系統 (BOT-88-2 株由来), *gfr35* および *gfr101* 系統 (BOT-22 株由来) を選抜した。次章ではそのうちの *mvr2-10* 系統を用いて開放系培養を検証した。

3. *Botryococcus braunii* 除草剤耐性系統による開放系培養への検討

3.1. 緒言

産業実用化を目指した藻類の大量培養を試みる場合、閉鎖系培養においては機材のコストが高く、それを避けるために開放系培養が望まれているが、*B. braunii* のような成長がとても遅い種は不向きである (De Boer *et al.* 2012)。 *B. braunii* を開放系で培養すると、速く増殖する他の緑藻やシアノバクテリアに占有され、*B. braunii* が増殖しにくい状態となる (Sheehan *et al.* 1998)。開放系培養の特徴は、異物や他の生物の混入が容易、操作は閉鎖系と比較して簡便、低コストで培養可能、スケールアップが容易という点である。一方、閉鎖系培養の特徴は、他の生物の侵入の心配はないが無菌操作をする手間がかかる上に専用の機材を必要とする。よってコストは高くなり、さらに無菌的なスケールアップは容量が大きくなるほど実現が難しい。安定した価格での市場へのオイル供給を目指すために、*B. braunii* の培養はコスト削減を追求する必要がある、大量培養が容易になる開放系培養が望まれているため、本研究では除草剤耐性のある *B. braunii* を使用することで問題解決を目指した。

B. braunii を開放系で培養した先行研究として、Rao ら (2012)のレースウェイポンド形式や円形池形式での培養の成果がある。*B. braunii* LB572 株をレースウェイポンド形式 (80 L) で培養した結果では 18 日間で乾燥重量が 9 倍に増加していた。別株の NIES-836 株や 40 L での円形池培養 (25 日間) では乾燥重量が 4 から 7 倍程度増加していた。また閉鎖系における *B. braunii* の大スケール培養も報告されている (Bazaes *et al.* 2012, Shimamura *et al.* 2012)。Bazaes ら (2012) は LB572 株を用いて 350 L で 5 倍 (30 日間), 1,000 L で 4.4 倍 (30 日間) という結果で、Shimamura ら (2012) は BOT-22 株を用いて 10 L で 4.7 倍 (28 日間), 300 L で 2 倍 (33 日間) もしくは 1.9 倍 (16 日間) という結果であった。また、BOT-22 株で閉鎖系培養 (0.3 L) を検証したが、28 日間で 180 倍であった (データ割愛)。したがって、閉鎖系培養で実施すれば他の生物の混入の心配はなく *B. braunii* が優占状態である培養が可能だと想定されたが、実際の乾燥重量の増加率は極めて低かった。

前章で確立した BOT-88-2 株 (Race A) 由来の除草剤耐性系統 *mvr2-10* を, 本章において開放系培養での生産能力を評価した。開放系水槽内の除草剤 MV 濃度は 0 μM と 50 μM , さらに 100 μM の設定を加えた。開放系培養での乾燥重量, オイル含量, 種構成の推移をモニタリングすることにより, 野外から混入するイカダモやクロレラなど競合する種と共存下での除草剤耐性系統 *mvr2-10* の増殖能力を検証し, 最適な培養条件やオイル回収の時期を検討した。また, 各条件での全オイル含量および炭化水素オイルに相当する細胞外オイル含量を分別して評価した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 供試藻類と無菌培養

B. braunii およびその培養条件は 2.2.1. のとおりである。イカダモ (*Scenedesmus dimorphus*; NIES-119) は国立環境研究所 NIES コレクションより分譲された。イカダモの培養には C 培地 (Ichimura 1971) を使用した。C 培地の組成は以下のとおりである。Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 0.15 g · L⁻¹, KNO₃ 0.1 g · L⁻¹, Na₂-glycerophosphate · 5H₂O 50 mg · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 40 mg · L⁻¹, Vitamin B₁₂ 0.1 µg · L⁻¹, Biotin 0.1 µg · L⁻¹, Thiamine HCl 10 µg · L⁻¹, Tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.5g · L⁻¹, Na₂EDTA · 2H₂O 3 mg · L⁻¹, FeCl₃ · 6H₂O 0.59 mg · L⁻¹, MnCl₂ · 4H₂O 0.11 mg · L⁻¹, ZnSO₄ · 7H₂O 60 µg · L⁻¹, CoCl₂ · 6H₂O 40 µg · L⁻¹, Na₂MoO₄ · 2H₂O 10 µg · L⁻¹ (pH 7.5)。

3.2.2. 開放系培養

BOT-88-2 株由来 *mvr2-10* 系統の開放系培養の流れを図 10 に示した。野生株 BOT-88-2 の培養も同様に行った。ただし、*mvr2-10* 系統の開放系培養は除草剤を添加しない 3 水槽のみで実施した。開放系培養の水槽から週 1 回でサンプルを回収した。場所は国立環境研究所の屋外に設置した温室内である。温室内では日中は自然光下で、朝 7 時から夜 7 時まで照明を併用した。また、冬期 (11~4 月) は温室内を 22°C 以上になるよう加温した。閉鎖系の培養はガラス製三角フラスコで、開放系本培養はガラス製水槽 (20 cm × 20 cm × 20 cm) で実施した。なお本培養の水槽上蓋は 1/4 程度開放してあり、微生物等の異物の侵入は容易であった。また水槽へは常時フィルター濾過した空気を注入した。本培養では各水槽内と水槽外に温度・照度ロガー (UA-002-08; Onset 社, MA, USA) を設置し、1 時間ごとに計測した。閉鎖系から開放系培養へ至るまでの植え継ぎは濁度 OD₆₆₀ 値が 0.1 を超えてから実施した。

3.2.3. オイル含有率の測定

ヘキサン (*n*-hexane) 法による全オイル抽出は 2.2.5. と同じ方法を用いた。細

胞外オイルのみを抽出するためにヘプタン (*n*-heptane) 法 (Moheimani *et al.* 2012) を用いた。藻類を含む培地 2 mL をあらかじめ重量を測定したガラス繊維ろ紙 (Whatman GC/F; GE ヘルスケア・ジャパン) で濾過し、一晩凍結乾燥処理を実施した。凍結乾燥直後に重量を測定し、増加した重量を乾燥重量 (バイオマス重量) とした。その後、ろ紙上の細胞をヘプタンが 3 mL 入ったガラス製チューブ内に 20 分間浸した。ガラス製チューブにヘプタンと等量の滅菌ミリ Q 水を注入し、攪拌した。上層のヘプタンを別容器 (重量測定済) に移し、酸化防止用に N₂ ガスを充填しながら蒸発させた。容器の重量を測定し、算出した増加分をオイル重量とした。

3.2.4. クロロフィル量の測定

藻類を含む培地 1 mL を予め重量を測定したガラス繊維ろ紙 (Whatman GC/F; GE ヘルスケア・ジャパン) で濾過し、その後一晩凍結乾燥処理を行った。その後、ろ紙上の細胞を 90 %メタノールが入った 3 mL が入ったねじ蓋付き試験管内に浸し、70°Cのウォーターバスで試験管を 1 時間震盪した。溶出液の吸光度 (650 nm, 665 nm) を分光光度計で測定し、クロロフィル量を以下の式 (Grimme and Boardman, 1972) により算出した。なお、溶出液の吸光度は 750 nm での吸光度 (Abs₇₅₀) を差し引いて補正した。

$$\cdot \text{クロロフィル } a+b \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 4 \times \text{Abs}_{665} + 25.5 \times \text{Abs}_{650}$$

3.2.5. 生物種の計測

藻類を培養した水槽から 1 週間おきに回収した培地 10 mL に対し、ルゴール液 (ヨウ化カリウム 100 g · L⁻¹, 酢酸 100 mL · L⁻¹) 100 μL を添加し固定した。固定した標本は 4°Cの暗所で保存した。固定した標本を顕微鏡で観察する時は細胞培養用シャーレに展開して種ごとに個体数をカウントした。観察対象から長さを算出し (n ≥ 10), その平均値から各生物種の体積 (楕円体) を以下の通りに算出した。 *B. braunii* 326.6 am³ · cell⁻¹, *Scenedesmus* sp. (イカダモ) 58.3 am³ · cell⁻¹, *Chlorella* sp. (クロレラ) 44.6 am³ · cell⁻¹, *Colpoda* sp. (繊毛虫) 5392.6 am³ ·

cell⁻¹, *Closterium* sp. (ミカヅキモ) 179.7 am³·cell⁻¹。

3.2.6. HPLC による除草剤 MV 濃度の測定

水槽内の除草剤 MV 濃度を 2～5 日おきに HPLC で確認した。開放系培養に使用した培養液を孔径 5.0 μm のシリンジフィルターで濾過した。濾液に含まれる MV の濃度測定には HPLC 装置（島津製作所，京都，日本；LC-10AT vp Pump, SPD-10AV vp UV/vis Detector）を使用した。HPLC の移動相は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7）・150 mM 塩化ナトリウム溶液で，一定濃度で送流した（1 mL·min⁻¹）。カラムは Asahipak ES-502C（島津ジーエルシー社，東京，日本），カラムオープン温度を 30℃とした。MV は波長 288 nm で検出した。MV 各標準液（12.5, 25, 50, 100, 200 μM, n = 1）でのピーク（高さ）の測定値から検量線を作成し，サンプル（n = 1）のピーク値から濃度を算出した。

3.3. 結果

3.3.1. 除草剤耐性系統 *mvr2-10*(BOT-88-2 由来)開放系培養の検証

除草剤 MV 耐性系統 *mvr2-10* (BOT-88-2 株由来) を用い、開放系培養で優占的な培養が可能かどうかを検証した。温室内の閉鎖系培養では、実験室内と同様に他の生物の混入はない密封状態で実施しており、成長悪化などの異常状態は観察されなかった。開放系培養は 2013 年 3 月 27 日から 2013 年 5 月 8 日にかけて 42 日間実施した。水槽内の温度は平均 24.4℃, 最高 37.5℃, 最低 12.3℃であり、水槽外の温度は平均 26.1℃, 最高 54.5℃, 最低 7.3℃であった (図 11, 表 4)。なお予備実験にて水温 40℃までは *B. braunii* の生育に影響しないことが判明しているため、開放系培養に支障はない条件になっていたと推察された。水槽内の除草剤 MV 50 μM もしくは 100 μM 処理区では、培養日数が経過するにつれ、除草剤濃度が低下する傾向がみられた (図 12)。除草剤 MV 濃度が設定値を下回った場合は、すぐに除草剤を追加したので、本培養中の除草剤濃度は設定値である 50 μM もしくは 100 μM 以上を維持していた。

開放系培養の水槽では微生物など他の生物の侵入が容易なため、濁度 (OD₆₆₀), 乾燥重量, クロロフィル量を併用してモニタリングした (図 13)。

MV を添加していない水槽内の濁度は、0 日目では 0.002, 7 日目では 0.010, 14 日目では 0.114, 21 日目で 0.347 となりピークを迎えたがその後はやや減少し、0.172 から 0.346 の間で推移した。MV 50 μM 処理区の濁度は、0 日目では 0.001, 14 日目では 0.019, 21 日目では 0.066, 28 日目では 0.055, 42 日目では 0.125 と低下はみられず徐々に増加していた。MV 100 μM 処理区の濁度は、0 日目では 0.002, 14 日目では 0.015, 21 日目では 0.030, 28 日目では 0.033, 42 日目では 0.062 と MV 50 μM 処理区より下回る数値だったが、徐々に増加していた。

MV 非添加区の 1L あたりの乾燥重量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) は、0 日目では 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 7 日目では 14.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 14 日目では 51.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 21 日目で 128.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であるが、その後は減少し、28 日目から 42 日目では 71.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ から 84.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の間を推移していた。MV 50 μM 処理区の 1L あたりの乾燥重量は、0 日目では 2.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 14 日目では 24.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 21 日目では 30.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 28 日目では

37.0 mg·L⁻¹, 42 日目では 51.0 mg·L⁻¹ と徐々に増加した。MV 100 μM 処理区の 1L あたりの乾燥重量は, 0 日目では 1.3 mg·L⁻¹, 14 日目では 25.7 mg·L⁻¹, 21 日目では 19.7 mg·L⁻¹, 28 日目では 30.3 mg·L⁻¹, 42 日目では 40.3 mg·L⁻¹ と, MV 50 μM 処理区と比較して重量は少ないが, 徐々に増加していた。

MV 非添加区の 1L あたりのクロロフィル量(mg·L⁻¹)は, 0 日目では 0.076 mg·L⁻¹, 7 日目では 0.114 mg·L⁻¹, 14 日目では 0.362 mg·L⁻¹, 21 日目で 0.629 mg·L⁻¹, 28 日目では 0.470 mg·L⁻¹, 35 日目では 0.746 mg·L⁻¹, 42 日目では 0.589 mg·L⁻¹ で, 21 日目にピークを迎え, 減少後に再び増加した。MV 50 μM 処理区の 1L あたりのクロロフィル量は, 0 日目では 0.148 mg·L⁻¹, 14 日目では 0.079 mg·L⁻¹, 21 日目では 0.315 mg·L⁻¹, 28 日目では 0.224 mg·L⁻¹, 42 日目では 0.543 mg·L⁻¹ と, 減少した時期はあるが全般的には増加傾向にあった。MV 100 μM 処理区の 1L あたりのクロロフィル量は, 0 日目では 0.125 mg·L⁻¹, 14 日目では 0.182 mg·L⁻¹, 21 日目では 0.224 mg·L⁻¹, 28 日目では 0.210 mg·L⁻¹, 42 日目では 0.335 mg·L⁻¹ と増加傾向にあった。

開放系水槽で最初に投与した *B. braunii* 以外に, 繊毛虫・イカダモ・クロレラを確認することができた。これら生物種について個体数, 個体数比, 体積比を算出した (図 14)。MV 非添加区において *B. braunii* の占める割合は, 培養 28 日目で体積比 38.7 %と最大であった。一方, MV 50 μM 処理区の水槽内で *B. braunii* の占める割合は, 培養 7 日目では個体数比, 体積比ともに 100.0 %, 14 日目では体積比で 83.0 %であったが, それ以降はイカダモやクロレラが優勢になり, *B. braunii* の体積比は 28 日目で 41.2 %, 42 日目で 29.2 %になった。MV 100 μM 処理区での各生物種の占める割合は, 培養初日は混入したクロレラが多数を占めるが, 7 日目以降は *B. braunii* が体積比で 9 割以上維持され, 28 日目では 94.2 %であった。しかしながら, それ以降での *B. braunii* の占める割合は急激に減少し, 35 日目で 63.2 %, 42 日目で 53.5 %まで低下した。

開放系培養でのオイル含有率 (%) およびオイル含量 (mg·L⁻¹) を図 16 に示した。測定は培養開始後 14, 21, 28, 35, 42 日目で, 0, 7 日目はサンプルのオイル重量が少なすぎて計測値が不安定であったために省略した。オイル含有率の

全体的な推移は、MV 100 μM 処理区で 50 %前後と高く、MV 非添加区、もしくは 50 μM 処理区は 20 %から 40 %程度と低かった。なお、前培養終了後のオイル含有率は 51.9 %であった。MV 非添加区では 20 %から 30 %程度で、前培養と比較すると半分程度であった。MV 50 μM 処理区の最高オイル含有率は 14 日目の 42 %で、その後は減少傾向であった。MV 100 μM 処理区は培養前と同程度の 50 %前後と高い割合のまま 42 日目まで維持されていた。ところで、オイル含有率 (%) が高い条件とオイル含量 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) が多い条件は一致しない。というのは、オイル含有率は低い乾燥重量が多い MV 非添加区では、オイル含量 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) も多かったからである。MV 非添加区でのオイル含量の最高値は $36.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (35 日目)であった。また MV 50 μM 処理区でのオイル含量の最高値は $26.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (42 日目) で、MV 100 μM 処理区でのオイル含量の最高値は $29.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (28 日目) であった。

ヘプタン抽出法 (Moheimami *et al.* 2012) を用いて細胞外に分泌したオイルのみの回収が可能かどうかを検討した (図 17)。細胞にダメージを与えずにオイル回収が可能であるヘプタン法は、*B. braunii* が細胞外に分泌する炭化水素オイルの抽出に使用できると推定される。そこで、ヘプタン抽出法の有効性を確かめるためにオイルを細胞外に分泌する *B. braunii* とオイルを細胞内に蓄積するイカダモを用いて、ヘキサン抽出法と比較をおこなった。*B. braunii* のオイル含有率はヘキサン抽出法で 41.6 %、ヘプタン抽出法で 40.0 %とほぼ同じ割合であった。一方、細胞内にオイルを蓄積するイカダモのオイル含有率は、ヘキサン抽出法で 9.4 %、ヘプタン抽出法で 0.1 %と、大きく異なっていた。したがって、ヘプタン法では細胞外オイルのみ抽出できると考えられた。

次に、開放系培養のサンプルをヘキサン法とヘプタン法で抽出した (図 18)。除草剤濃度別に 28 日目および 42 日目のオイル含有率 (%) を算出した。MV 非添加区のヘプタン法でのオイル含有率は、ヘキサン法と比較して、1/3 から 1/4 程度に低下した。一方 MV 100 μM 処理区の 28 日目ではヘキサン法で 51.3 %、ヘプタン法で 57.2 %と同程度であったのに対し、42 日目ではヘキサン法で 48.4 %、ヘプタン法で 25.9 %と 1/2 程度に低下していた。

ヘプタン法を用いて開放系培養での細胞外オイル含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)を算出した(図 19)。除草剤濃度別の 28 日目および 42 日目の結果を比較したところ、全オイル含量が最も高いのは MV 非添加区で培養した 42 日目で $32.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、そのうちの細胞外オイル含量は $9.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (28.8 %) であった。MV $100 \mu\text{M}$ 処理区の全オイル含量は 28 日目 $29.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ・42 日目 $28.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と同程度であったが、そのうちの細胞外オイル含量は 28 日目で $29.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (100.0 %)・42 日目で $15.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (53.3 %) であり細胞外オイル含量の割合は 1/2 に低下していた。細胞外オイル含量が最も多かったのは MV $100 \mu\text{M}$ 処理区の 28 日目であり、全オイル含量が最も多かった MV 非添加区 35 日目の $36.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (図 16B) と比較すると 8 割程度のオイル生産性があった。

開放系培養の乾燥重量およびオイル含有率 (%) の初日と 28 日目の変化を比較した(表 5)。除草剤濃度別にみると乾燥重量の変化は MV 非添加区で 48.9 倍、MV $50 \mu\text{M}$ 処理区で 13.5 倍、MV $100 \mu\text{M}$ 処理区で 22.8 倍であった。またそれぞれの日あたりに生産する乾燥重量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) は $2.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。オイル含有率は MV 非添加区、もしくは $50 \mu\text{M}$ 処理区では 20 % 程度低下したが、MV $100 \mu\text{M}$ 処理区では 28 日目まで低下せず 51.3 % であった。

3.3.2. 野生株 (BOT-88-2) での開放系培養の検証

除草剤耐性系統より増殖が早い野生株 BOT-88-2 (Race A) の開放系培養を 2 月から 3 月にかけて 28 日間実施し、種ごとの個体数を計測した(図 15)。*B. braunii* は培養 14 日目まで若干増加しているものの、競合する種であるイカダモ、クロレラ、繊毛虫、ミカヅキモが急激に増殖し、その結果として *B. braunii* の体積で占める割合は 28 日目で 23 % 程度に低下した。この割合は *mvr2-10* 系統による開放系培養での結果 38.7 % (MV を添加しないときの 28 日目 ; 図 14) よりも下回っていた。

3.4. 考察

本研究は *B. braunii* に除草剤耐性能を付加させた変異系統を用いることにより、これまでに困難であった開放系培養を成功させる事を主目的にしている。除草剤 MV 耐性の *B. braunii* 変異系統 *mvr2-10* を開放系で培養し、水槽内の濁度 (OD_{660})、乾燥重量、クロロフィル量の変化 (図 13) や実際的水槽内における生物種の推移 (図 14) より *B. braunii* が優占的に増殖できたかを判断した。

開放系培養では耐性のある藻類が存在する懸念があり、予備試験として MV 50 μ M 処理区で検証したところ、他の藻類が増殖した (データ割愛)。MV 100 μ M 処理区 *mvr2-10* 系統の閉鎖系培養で比増殖速度を比較したところ、50 μ M 処理区より 3/4 に減少した (図 9)。以上より、耐性系統は確実に増殖し、他の藻類への増殖抑制に効果がある、MV 100 μ M 処理区は検討する価値があると判断した。

従来の野生株 BOT-88-2 での MV を添加しない開放系培養では、培養 14 日目まで *B. braunii* の個体数が増加していた (図 15)。よって、この時点までの生育は問題なく、その後の減少はイカダモ、クロレラ、繊毛虫、ミカヅキモによって *B. braunii* の増殖は抑制されたと推定した。除草剤耐性 *mvr2-10* 系統の MV 非添加区の結果は、従来の開放系培養 (図 15) と同様に、水槽内の濁度、乾燥重量、クロロフィル量の増加がみられた。MV 処理区での除草剤耐性 *mvr2-10* 系統の増加は横ばいであったが、イカダモやクロレラが急激に増加していた。さらに *B. braunii* 由来の濁度・乾燥重量・クロロフィル量は多くても 28 日目の種別体積比より 4 割程度 (図 14C) と推定された。以上の結果から除草剤を添加せずに培養した時の濁度、乾燥重量、クロロフィル量の急激な増加は、イカダモやクロレラが急速に増殖したことに由来すると考えられた。

次に MV 処理区の開放系培養で他の藻類の成長を抑制できたのかについて検証した。Ioki ら (2012d) は MV 50 μ M 処理区ではイカダモやクロレラの増殖を抑制できたと述べている。MV 50 μ M 処理区の結果では、7 日目まではイカダモやクロレラが増殖せず個体数や体積比において *B. braunii* は 9 割以上で優占させて培養させることができた。しかしながら、14 日目以降はイカダモやクロレラが出現し、その割合は急激に増加した。一方、MV 100 μ M 処理区の結果では、28

日目まではイカダモやクロレラが増殖せず体積比において *B. braunii* は 9 割以上で優占させることができた。しかしながら、35 日目以降はイカダモやクロレラは急激な増加が認められた。さらに Ioki ら (2012d) が 14 日間で除草剤の影響を検討したカルチャーコレクション由来のイカダモ (*Scenedesmus dimorphus* NIES-119) で、MV 50 μ M 処理区の実験を 13 日間から 1 ヶ月間閉鎖系で行ったが、耐性のあるイカダモは出現しなかった (データ割愛)。しかしながら、クロレラ増殖時の倍加時間は早い株で 2.5 から 3 時間であり (渡邊 2012)、イカダモ (NIES-119) の倍加時間は 1.0 日であり (データ割愛)、*B. braunii* の倍加時間約 7 日以上かかる (Chirac *et al.* 1985)。よって、イカダモやクロレラの世代交代は *B. braunii* に比べてとても早く、世代交代のサイクルが早ければ突然変異が起こる確率も高くなり、さらに除草剤耐性となる変異も起こりえる。以上から、野外で生息しているイカダモやクロレラへ除草剤を添加した事により偶発的に耐性を備えた可能性があり、これらが開放系培養に混入し、除草剤処理区で急激に増加したと推定される。

本研究により、除草剤処理区でもイカダモやクロレラが増加するのが明らかになった。よって、それらの増殖影響によるオイル含有率の低下を検証した。まず、各種のオイル含有率を、イカダモは約 10 % (図 17)、クロレラで 28 % から 32 % (Chisti 2007; 渡邊 2010, 表 2) であり、*B. braunii* は前培養での終了時の 51.9 % とし、開放系培養での種別体積比とオイル含有率の相関性は高いとみなした。MV 非添加区では *B. braunii* の占める割合は体積比で多くても 40 % 程度で、その他として初期は繊毛虫が多かったが、その後はイカダモ、続いてクロレラが増加した。オイル含有率は 14 日目で 19.9 % から 42 日目で 32.4 % へ増加する傾向がみられた。このことは優占種がイカダモからクロレラへ移行したことを支持するものであった。一方、MV 50 μ M 処理区では *B. braunii* の体積比で占める割合は 7 日目では 100 % で、その後は 28 日目では 40 %、42 日目では 30 % まで低下するが、一方でイカダモが 14 日目以降出現して増加し、続いてクロレラが 21 日目以降出現して増加する。この MV 50 μ M 処理区でのオイル含有率は 14 日目では 42.9 %、35 日目では 24.5 % と低下する傾向にあり、これは種別構成

比より優占種が *B. braunii* からイカダモやクロレラへ推移するのとは一致していた (図 14C)。また, MV 100 μM 処理区では *B. braunii* が 28 日目まで体積比 90 % 以上を占めたのとは一致してオイル含有率は全体的に高く, 14 日目から 42 日目まで *B. braunii* 由来と考えられる 50 %前後で推移していた。以上より, オイル含有率 (図 16A) は, イカダモやクロレラが増加するほど低下し, 水槽内で *B. braunii* が占める割合が高くなるほど多い傾向であることが示された。ただし MV 100 μM 処理区において *B. braunii* の占める割合は 35 日目以降で低下し 42 日目では体積比で 50 %まで低下したが, オイル含有率ではその低下は反映されていなかった。このことにより, 開放系培養での種別体積比とオイル含有率は相関すると考えていたが, 厳密ではない可能性がある。

本研究は産業実用化を視野に入れていることから, 藻類のうち炭化水素オイルを多く生産する *B. braunii* が優占的に培養される条件を求められる。よって, 開放系培養の各条件でのオイル量のうち炭化水素オイル含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) を把握する必要がある。オイル含量は *B. braunii* の生産する炭化水素や他の藻類の生産する TAG を含め, すべての脂質を合算したものである。乾燥重量で割ったオイル含有率 (%) とは異なり, 乾燥重量で割らないオイル含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) は乾燥重量の多さがかなり影響し, そのために乾燥重量でもオイル含量でも最大であった MV 非添加区 (図 13, 図 16) が, 炭化水素オイル含量でも最大である可能性がある。本研究ではヘプタン法を用いて *B. braunii* の炭化水素オイルに相当する細胞外分泌オイルの測定を検討した。実際に細胞外にオイルを分泌する *B. braunii* と細胞内にオイルを蓄積するイカダモをヘキサン法とヘプタン法で比較した (図 17)。ヘキサン法では *B. braunii* とイカダモのどちらからもオイルを抽出できた。しかしながら, ヘプタン法では *B. braunii* からはヘキサン法と同じ割合でオイル抽出できたが, イカダモからはまったく抽出できなかった。この相違は細胞外オイルの存在によると考えられ, ヘプタン法によって細胞外オイルのみの抽出が可能であると言える。このヘプタン法を用いて開放系培養を行った株について検証した結果, 細胞外オイル含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) が多いのは, 除草剤非添加区よりも MV 50 μM もしくは 100 μM 処理区が多く, 特に *B. braunii* が種別体積比で 9 割占めた,

MV 100 μ M 処理区の 28 日目が最大であった (図 14C, 図 19)。また, 最も多いオイル含量であった MV 非添加区 35 日目と比較して, MV 100 μ M 処理区 28 日目の細胞外オイル含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) は 80 %程度の生産であった。*B. braunii* の細胞外オイルは炭化水素オイルとみなされることから, MV 100 μ M 処理区 28 日目のオイルのほぼすべてが炭化水素オイルと推測された (図 19)。この状態は, 余分な TAG を除去する手間が少なくなるために産業化を想定するなら望ましい。以上より, 炭化水素オイルを最も多く, かつ高い純度での生産を目指すなら, MV 100 μ M 処理区で 28 日目に回収するのが最適であることが判明した。

最も優れた培養条件である MV 100 μ M 処理区 28 日目での乾燥重量やオイル含有率 (%) を先行研究と比較した。*B. braunii* の LB572 株や NIES-836 株で開放系培養をおこなった Rao ら (2012) の報告によると, 乾燥重量の変化は 18 日間で 9.0 倍 (28 日予測 13.5 倍) であった。一方, 本研究の結果は 28 日間培養して乾燥重量は 22.8 倍になり, Rao ら (2012) の結果をはるかに上回っていた。また Rao ら (2012) は水槽内の他の生物種を確認していないが, 本研究では種別体積比で 90 %以上 *B. braunii* が占めている事を確認しており (図 14C), 生産するオイルのほとんどが *B. braunii* 由来の炭化水素オイルと推定された (図 19)。また閉鎖系での *B. braunii* の大量培養に取り組んだ研究がいくつか報告されているが, 他の藻類が混入しないという利点があるにも関わらず *B. braunii* の生産性は低かった。これまでの閉鎖系培養で最も成功した例は, 350 L フラットパネル形式で培養した LB 572 株で, 乾燥重量の増加は 5 倍 (30 日間) であった (Bazaes *et al.* 2012)。閉鎖系培養は容量に制限はあるが, *B. braunii* のみを増殖させることを目的とするならば開放系培養より生産性が高いと想定された。しかしながら, 乾燥重量の増加率を比較すると, 開放系培養の本研究よりはるかに劣る結果であった。先行研究での閉鎖系培養の生産性が劣るのは生育が不良であったと推定されるが, その理由は定かではない。考えられる理由の一つは水温が高かったことである。*B. braunii* は高温 (BOT-22 株で 43°C 以上) にさらされると死滅する事が判明している (データ割愛) ので, 高温になり生育が阻害された可能性があった。本研究の開放系培養は水温が高くなる夏期を避けて実施したが, 先行研究で

は水温に関して留意しなかった可能性があった。先行研究での閉鎖系培養の屋外水槽は効率よく光量を収集する事を目的として設計されているため、水温が高くなりやすい欠点があった。コストの削減を考慮すると電気による冷却法は使えず、現時点では構造を変更する事で対処するしかない。今後は培養槽を改良する事により生産性が向上すると期待される。

以上より、本研究は開放系培養テストで成功した世界で初めての例であり、さらに閉鎖系培養よりも乾燥重量の増加率が良好であった本研究の手法は、産業実用化に適していると言える。

4. 総合考察

本研究では突然変異処理によって *B. braunii* の除草剤耐性系統を単離し、一部の変異系統を用いて *B. braunii* が優占的に増加する開放系培養を目指し、世界で初めて成功した。ここでは、*B. braunii* によるオイル生産が産業として実用化可能かについて考察する。

本研究では大量培養でのオイル生産能を検討した。第3章での開放系培養の結果を用いてスケールアップ時の生産を算出した。 $25 \times 10 \times 0.5$ m サイズのプールでの培養 (125,000 L) を想定すると、前培養である閉鎖系培養は 1 m^3 サイズ (1,000 L) で 25 個分 (25,000 L) を用意する必要がある。この閉鎖系培養の 1,000 L は実行可能な大きさであり、*B. braunii* での培養においても報告されている (Bazaes *et al.* 2012)。開放系培養開始時の乾燥重量濃度を $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、オイル含有率を 51.9 % とし、オイル含有率は一定のままで 28 日後に全オイルを回収したと想定すると、28 日後の乾燥重量は 285.0 kg でそのうちオイル重量は 146.3 kg と算出される。さらにスケールアップして、1 ha での生産を想定すると、1 サイクル (28 日間) でのオイル生産量は 5.85 t となり、さらに 1 年間 (12 サイクル) では 70.2 t と見込まれる。油糧作物の年間オイル生産量はナタネで約 $1 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ 、アブラヤシで約 $4 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ であり、*B. braunii* によるオイル生産の試算ははるかに上回る結果である。*B. braunii* を産業実用化した場合の試算では、コストを考慮すると 1 年間あたり $118.4 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ の生産量で、オイル価格は 130 円 $\cdot \text{L}^{-1}$ になると見込まれている (渡邊 2012)。したがって今後は生産性を上げる手段を考える必要がある。

二酸化炭素 (CO_2) を *B. braunii* へ投与することにより乾燥重量が増大する事が判明している。 CO_2 を投与しない培養と比較して、2 % CO_2 を投与した培養では乾燥重量は 25 日間で約 2 倍へ増大した (Rao *et al.* 2007; Ge *et al.* 2011)。これは二酸化炭素削減にも貢献が可能であるために都合が良い。本研究での開放系培養では、施設の都合でポンベを使用できなかったために CO_2 を水槽へ供給できなかったが、適切な CO_2 濃度で培養したならば生産性がさらに向上することが見込まれる。開放系培養での CO_2 の供給は今後の最適培養の検討項目に加え、改善

される傾向ならば工場や火力発電所等で排出される CO₂ を利用した培養を模索したい。

コンタミネーションに起因する炭化水素オイル以外のオイル混入は処理や分別する際にかかりの手間がかかる理由から、生産コストを削減するためには高純度の *B. braunii* 由来炭化水素の生産を目指す必要がある。本研究では除草剤 MV の濃度を 50 μ M から 100 μ M へ上げて、コンタミネーションの原因であるイカダモやクロレラに代表される除草剤に耐性のある他の藻類の出現抑制を試みた。MV 処理は一定期間では効果があったものの、最終的には他の藻類の出現を抑制できなかった。本研究の結論ではイカダモやクロレラが増加する前の 28 日目に培養を終了させる事により *B. braunii* の開放系培養は成功したとしたが、産業実用化の検討を目指すのであれば、前培養の残査によってキャリーオーバーして培養初期から除草剤耐性のある他の藻類が混入するのを防ぐ必要がある。本研究の培養初期に混入した他の藻類は翌週には駆除された事から除草剤耐性ではないと考えられ、本研究では除草剤耐性のある他の藻類のキャリーオーバーを懸念する必要は無かったが、産業実用化して運用されることを考慮すると、培養終了後に使用した培養槽から除草剤耐性のある他の藻類を完全に駆除しなければならず、施設が大型になるほど完全な駆除は難しいと想定される。その打開策として、MV 以外の除草剤に耐性がある系統を開発する事で乗り切れると判断している。すでに本研究では除草剤グルホシネートでの耐性系統を開発しており、別種類の除草剤での耐性系統も本研究の手法を利用すれば開発は可能である。*B. braunii* の開放系培養において複数の除草剤とそれに対応した耐性系統をローテーションさせることにより、除草剤耐性の他の藻類のキャリーオーバーによるコンタミネーションを防げると推定される。

本研究では遺伝子組換えではなく変異誘発剤による除草剤耐性系統を開発した。遺伝子組換え技術は農業分野において促進利用されており、コスト削減に効果的な方法として除草剤に耐性のある GM 作物が開発され、広く利用されている (ISAAA 2009)。藻類でも遺伝子組換え利用が提案されている (Apt and Behrens 1999; Beer *et al.* 2009; Radakovits *et al.* 2010) が、多くの藻類では遺伝子組換

え手法は確立されていない。*B. braunii*においても遺伝子組換え法は確立されていないため、本研究では化学変異源処理による突然変異法を採用したが、この手法で開発した変異体はLMO (Living Modified Organism) に該当せず、カルタヘナ法 (遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律) の規制にかかわらず、結果としては利便性があり有用であった。よって化学変異源処理による突然変異体は煩雑な申請や許可等の手間が省け、簡便に産業的に取り扱える。本研究で開発した変異系統はカルタヘナ法に規制されずに使用可能であるため、ある程度の拡散が予想される開放系培養には都合が良く、大量培養による産業的なオイル生産が大いに期待される。

以上をまとめると、開放系培養で *B. braunii* が優占的に増殖した報告はこれまでになく、本研究は一定期間ながらも成功した世界で初めての例であり、産業的な大量培養への足がかりとなる研究と言える。しかしながら、産業実用化するには改善の余地がまだある。我々の生活には欠かせない石油資源の枯渇は、そう遠くない未来に起こりえる重大な危機である。石油の可採年数には限りがあり、いずれ利用できなくなるのは明らかである。石油に依存し、消費し続ける人類の文明には持続可能性はないと言える。今後も石油を使用し続けるのならば、枯渇する前の限られた年数の間に、我々人類は何らかの策を講じておかなければならないだろう。本研究は、微力ではあるが、石油資源の枯渇への対策として努力した一例であると言える。将来においては石油の代替品として *B. braunii* の生産する炭化水素オイルが普及し、過大な石油需要に対処できている事を期待する。

5. 引用文献

Allard B, Casadevall E (1990) Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 29: 1875–1878

Apt KE, Behrens PW (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* 35: 215–226

Baba M, Ioki M, Nakajima N, Shiraiwa Y, Watanabe MM. (2012) Transcriptome analysis of an oil-rich race A strain of *Botryococcus braunii* (BOT-88-2) by *de novo* assembly of pyrosequencing cDNA reads. *Bioresour Technol* 109: 282–286

Bazaes J, Sepulveda C, cién FG, Morales J, Gonzales L, Rivas M, Riquelme C (2012) Outdoor pilot-scale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. *J Appl Phycol* 24: 1353–1360

Beer LL, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC (2009) Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* 20: 264–271

Brandt AR (2010) Review of mathematical models of future oil supply: Historical overview and synthesizing critique. *Energy* 35: 3958–3974

Chirac C, Casadevall E, Largeau C, Metzger P (1985) Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. *J Phycol* 21: 380–387

Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25: 294–306

Chu SP (1943) The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Part II. The influence of the concentration of inorganic nitrogen and phosphate phosphorus. *J Ecol* 31: 109–148

De Boer K, Moheimani NR, Borowitzka MA, Bahri PA (2012) Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *J Appl Phycol* 24: 1681–1698

Deng L, Sensemana SA, Gentry TJ, Zuberera DA, Weiss TL, Devarenne TP, Camargo ER (2012) Effect of selected herbicides on growth and hydrocarbon content of *Botryococcus braunii* (Race B). *Ind Crops Prod* 39: 154–161

Domergue F, Lerchl J, Zähringer U, Heinz E (2002) Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur J Biochem* 269: 4105–4113

Flynn T, Ghirardi ML, Seibert M (2002) Accumulation of O₂-tolerant phenotypes in H₂-producing strains of *Chlamydomonas reinhardtii* by sequential applications of chemical mutagenesis and selection. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1421–1430

Ge Y, Liu J, Tian G (2011) Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresour Technol* 102: 130–134

Grimme LH, Boardman NK (1972) Photochemical activation of a particle

fraction P1 obtained from the green alga *Chlorella fusca*. Biochem Biophys Res Comm 49: 1617–1623

Haag AL (2007) Algae bloom again. Nature 447: 520–521

Hillen LW, Pollard G, Wake LV, White N (1982) Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. Biotech Bioeng 24: 193–205

Hodgson PA, Henderson RJ, Sargent JR, Leftley JW (1991) Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture. J Appl Phycol 3: 169–181

Hoerlein G (1994) Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. Rev Environ Contam Toxicol 138: 73–145

Huang Z, Poulter CD (1989) Tetramethylsqualene, a triterpene from *Botryococcus braunii* var. *Showa*. Phytochemistry 28: 1467–1470

Hubbert MK (1956) Nuclear energy and the fossil fuels. In Meeting of the Southern District, Division of production, American Petroleum Institute, San Antonio, Texas. Shell Development Company. Publication No. 95

Ichimura T (1971) Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium, University of Tokyo Press, Tokyo, pp 208–214

ISAAA (International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications), 2009. *ISAAA Brief* 41. <http://www.isaaa.org/>. Accessed 23 July 2011

Ioki M, Baba M, Bidadhi H, Suzuki I, Shiraiwa Y, Watanabe MM, Nakajima N (2012a) Modes of hydrocarbon oil biosynthesis revealed by comparative gene expression analysis for race A and race B strains of *Botryococcus braunii*. *Bioresour Technol* 109: 271–276

Ioki M, Baba M, Nakajima N, Shiraiwa Y, Watanabe MM (2012b) Transcriptome analysis of an oil-rich race B strain of *Botryococcus braunii* (BOT-22) by *de novo* assembly of pyrosequencing cDNA reads. *Bioresour Technol* 109: 292–296

Ioki M, Baba M, Nakajima N, Shiraiwa Y, Watanabe MM (2012c) Transcriptome analysis of an oil-rich race B strain of *Botryococcus braunii* (BOT-70) by *de novo* assembly of 5'-end sequences of full-length cDNA clones. *Bioresour Technol* 109: 277–281

Ioki M, Ohkoshi M, Nakajima N, Nakahira-Yanaka Y, Watanabe MM (2012d) Isolation of herbicide-resistant mutants of *Botryococcus braunii*. *Bioresour Technol* 109: 300–303

Ishimatsu A, Matsuura H, Sano T, Kaya K, Watanabe MM (2012) Biosynthesis of isoprene units in the C₃₄ botryococcene molecule produced by *Botryococcus braunii* strain Bot-22. *Procedia Env Sci* 15: 56–65

Kasai F, Kawachi M, Erata M, Watanabe MM (2004) NIES Collection list of strains, 7th edn. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan. pp 49. http://mcc.nies.go.jp/02download_e.html. Accessed 30 Jan 2014

Kawachi M, Tanoi T, Demura M, Kaya K, Watanabe MM (2012) Relationship between hydrocarbons and molecular phylogeny of *Botryococcus braunii*. *Algal Res* 1: 114–119

Kaya K, Nakazawa A, Matsuura H, Honda D, Inouye I, Watanabe MM (2011) Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 2246–2248

Kojima E, Zhang K (1999) Growth and Hydrocarbon Production of Microalga *Botryococcus braunii* in Bubble Column Photobioreactors. *J Biosci Bioeng* 87: 811–815

Lichtenthaler HK (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 47–65

Metzger P, Berkaloﬀ C, Couté A, Casadevall E. (1985) Alkadiene and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 24: 2305–2312

Metzger P, Casadevall E (1987) Lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon from new strains of the green alga *Botryococcus braunii*. *Tetrahedron letters* 28: 3931–3934

Metzger P, Allard B, Casadevall E, Berkaloﬀ C, Couté A (1990) Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. J phycol 26: 258–266

Metzger P, Largeau C (2005) *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Appl Microbiol Biotechnol 66: 486–496

Moheimani NR, Cord-Ruwisch R, Raes E, Borowitzka MA (2013) Non-destructive oil extraction from *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). J Appl Phycol 25: 1653–1661

Molnár I, Lopez D, Wisecaver JH, Devarenne TP, Weiss TL, Pellegrini M, Hackett JD (2012) Bio-crude transcriptomics: gene discovery and metabolic network reconstruction for the biosynthesis of the terpenome of the hydrocarbon oil-producing green alga, *Botryococcus braunii* race B (Showa). BMC Genomics 13: 576

Ndimba BK, Ndimba RJ, Johnson TS, Waditee-Sirisattha R, Baba M, Sirisattha S, Shiraiwa Y, Agrawal GK, Rakwal R (2013) Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. J Proteomics 93: 234–44

Niehaus TD, Okada S, Devarenne TP, Watt DS, Sviripa V, Chappell J (2011) Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 12260–12265

Okada S, Devarenne TP, Murakami M, Abe H, Chappell J (2004) Characterization of botryococcene synthase enzyme activity a squalene

synthase-like activity from the green microalga *Botryococcus braunii*, race B. Arch Biochem Biophys 422: 110–118

Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC (2010) Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. Eukaryotic Cell 9: 486–501

Rao AR, Sarada R, Ravishankar GA (2007) Influence of CO₂ on Growth and Hydrocarbon Production in *Botryococcus braunii*. J Microbiol Biotechnol 17: 414–419

Rao AR, Ravishankar GA, Sarada R (2012) Cultivation of green alga *Botryococcus braunii* in raceway, circular ponds under outdoor conditions and its growth, hydrocarbon production. Bioresour Technol 123: 528–533

Sato Y, Ito Y, Okada S, Murakami M, Abe H (2003) Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcenes and tetramethylsqualene in the B race of *Botryococcus braunii* via the non-mevalonate pathway. Tetrahedron Lett 44: 7035–7037

Schwender J, Gemünden C, Lichtenthaler HK (2001) Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. Planta 212: 416–423

Senousy HH, Beakes GW, Hack E (2004) Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). J Appl Phycol 40: 412–423.

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P (1998) A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from algae. <http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf>. Accessed 30 Jan 2014

Shimamura R, Watanabe S, Sakakura Y, Shiho M, Kaya K, Watanabe MM (2012) Development of *Botryococcus* seed culture system for future mass culture. *Procedia Env Sci* 15: 80–89

Suntres ZE (2002) Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*. 180: 65–77

Tanoi T, Kawachi M, Watanabe MM (2013) Iron and glucose effects on the morphology of *Botryococcus braunii* with assumption on the colony formation variability. *J Appl Phycol* (in press.)

Tenaud M, Ohmori M, Miyachi S (1989) Inorganic carbon and acetate assimilation in *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *J Phycol* 25: 662–667

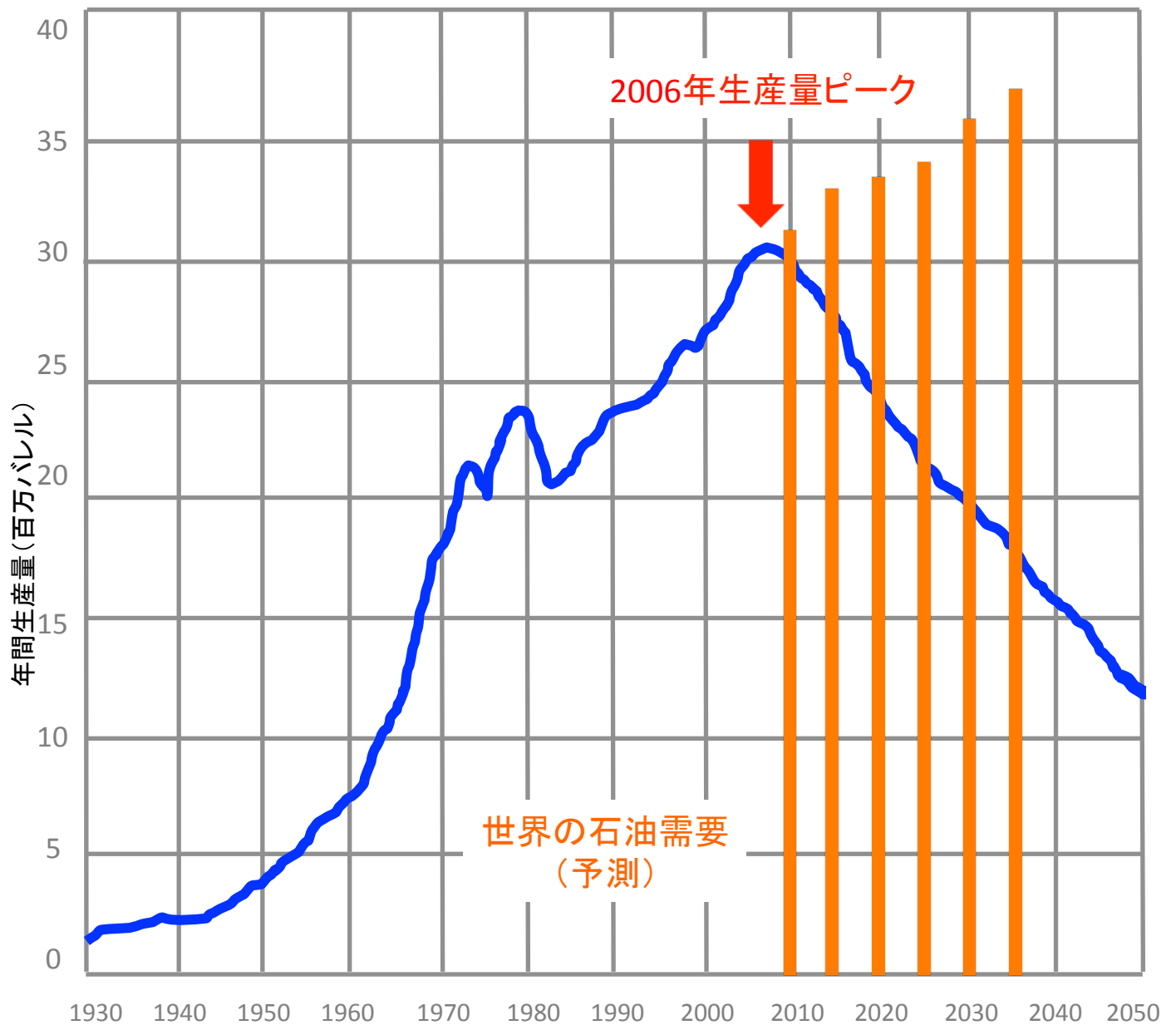
Tornabene TG, Holzer G, Lien S, Burris N (1983) Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Technol* 5: 435–440.

渡邊信 編集 (2010) 「新しいエネルギー 藻類バイオマス」, みみずく舎, 東京

渡邊信 監修 (2012) 「藻類ハンドブック」, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京

6. 図表

6.1. 図



<http://www.oilcrisis.com/campbell/images/2004Scenario.jpg>

石油連盟「今日の石油需要2012」より改変

図1 石油ピークと枯渇

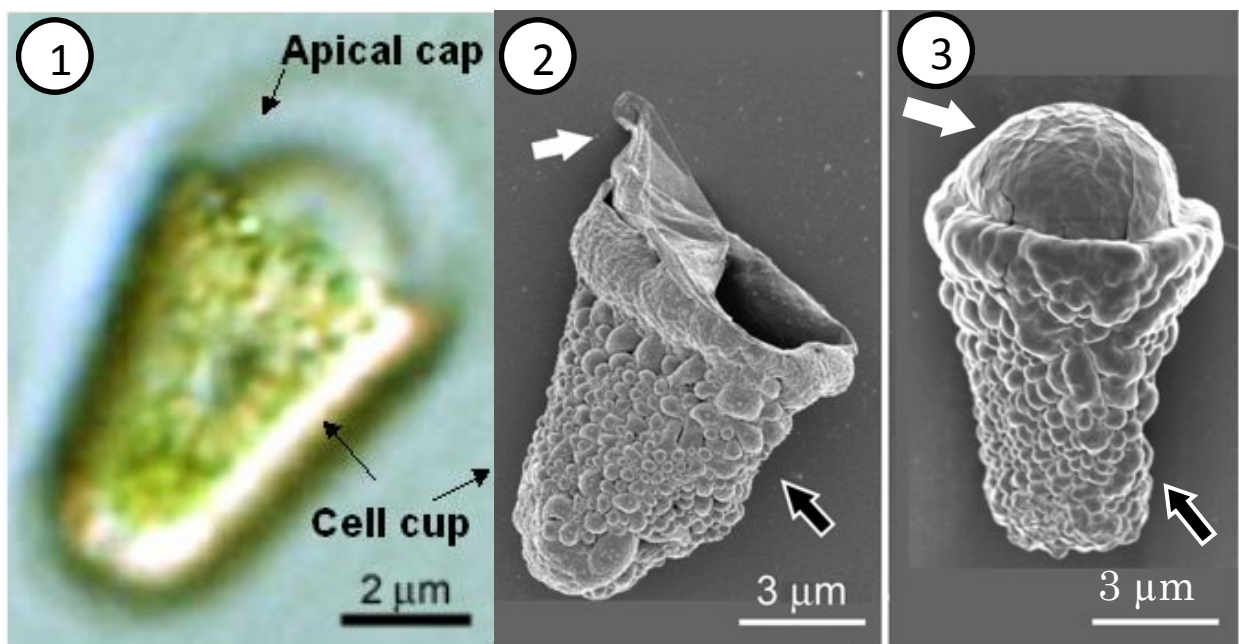
石油・液化ガスの世界生産量の推移（青線；2004年時点でのシナリオ予測）。棒グラフ（橙）は世界の石油需要予測量を示す。

A



スケールバーは10 μm

B

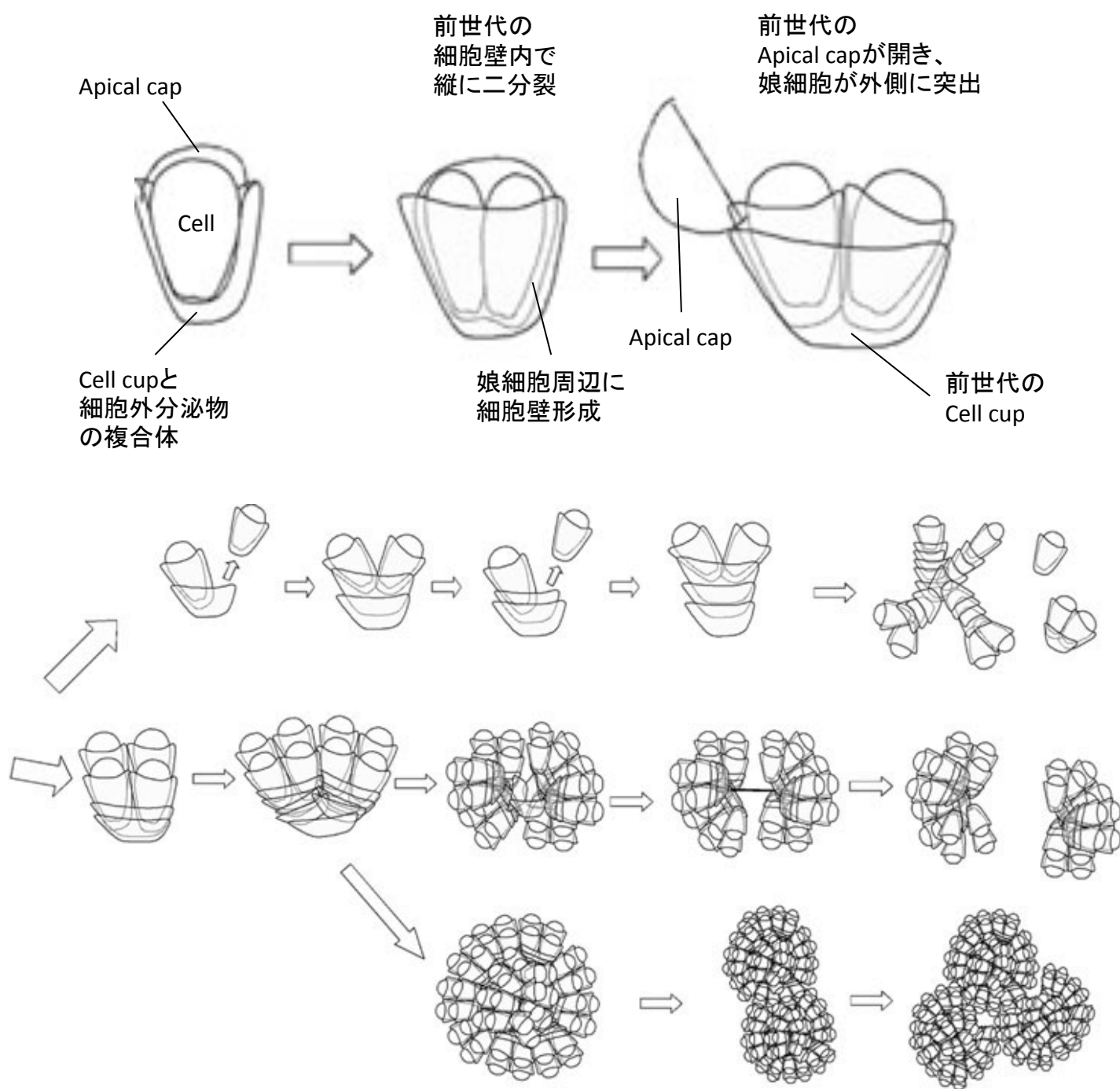


(Tanoi *et al.* 2013, modified)

図2 *B. braunii* 細胞観察像

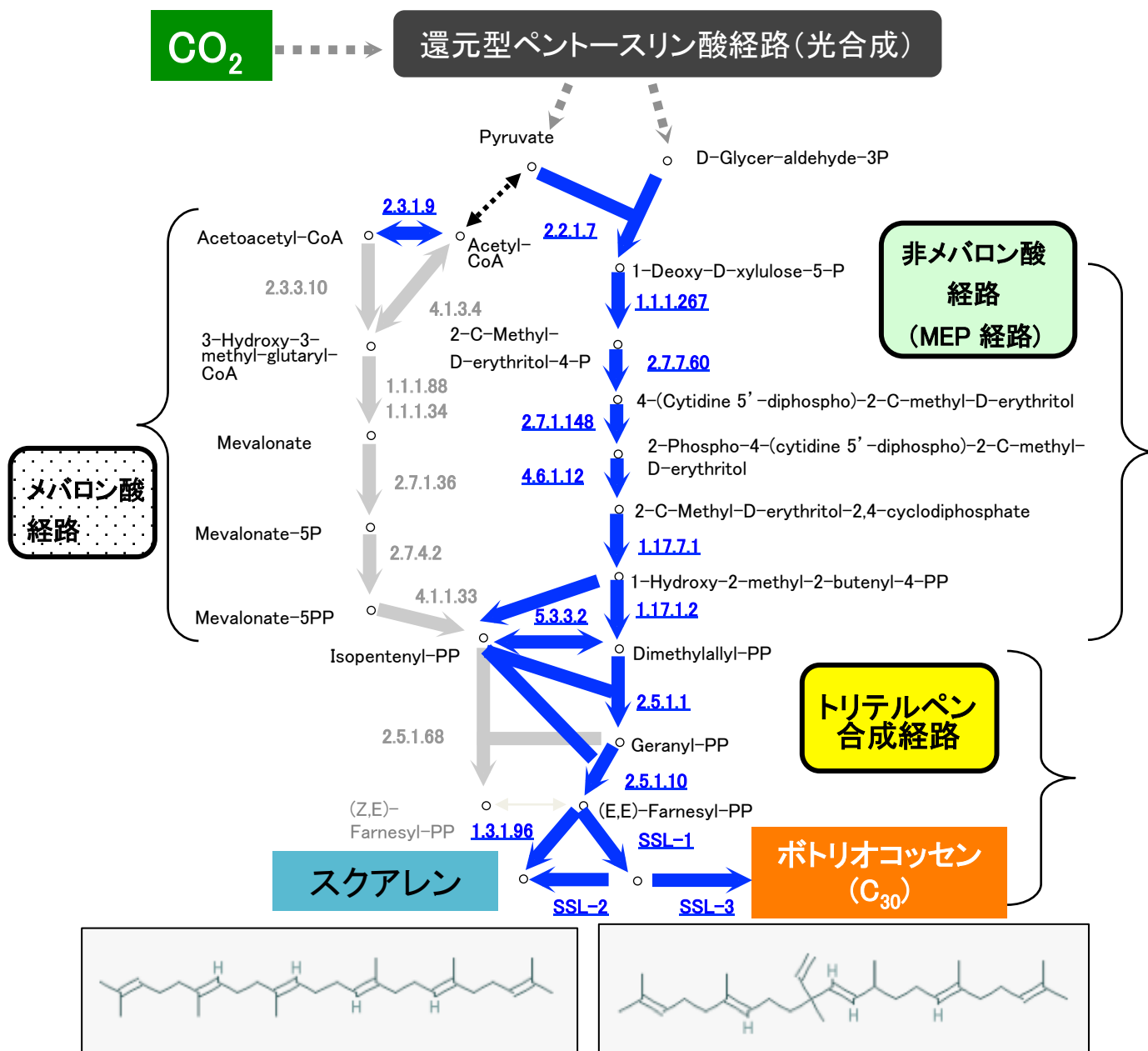
(A) 微分干渉顕微鏡画像。A-①; *B. braunii*のコロニー, A-②; オイル染色試薬ナイルレッドを投与した細胞 (明視野), A-③; ナイルレッドを投与した細胞 (蛍光下) (赤はクロロフィルの自家蛍光, 黄はオイルを示す)。

(B) 単細胞の様子。B-①;微分干渉顕微鏡画像, B-②・③;細胞壁のSEM観察画像 (白矢印はApical cap, 黒矢印はCell cup)。



(Tanoi *et al.*, 2013, modified)

図3 *B. braunii*の細胞分裂とコロニー形成過程の模式図



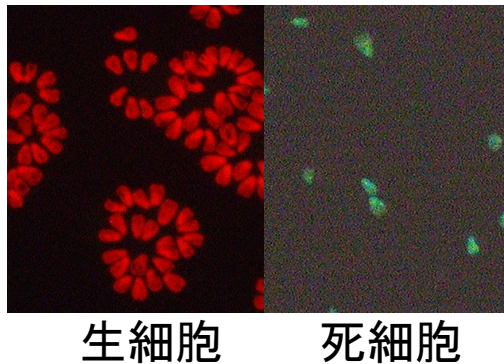
(筑波大学大学院 生命環境系 五百城幹英 研究員より提供された図を改変)

図4 *B. braunii*のオイル生合成経路

CO₂ から還元型ペントースリン酸経路、非メバロン酸経路、トリテルペン合成経路を経てスクアレンやボトリオコッセンが合成される。色付き矢印はトランスクリプトーム解析等で酵素遺伝子の存在が示唆された反応を表す。

(Ioki *et al.* 2012abc, Baba *et al.* 2012, Niehaus *et al.* 2011)

A



B

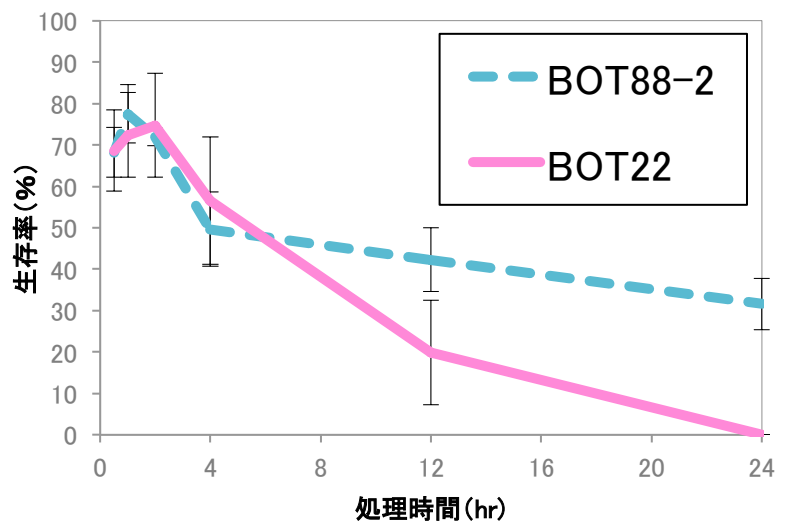
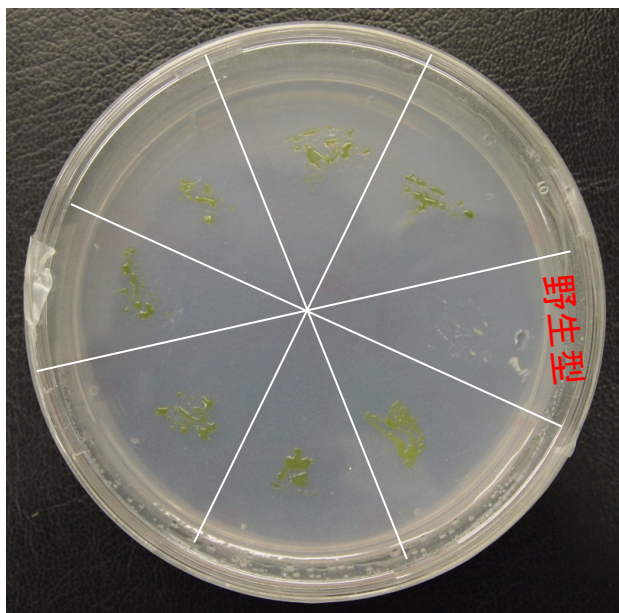


図5 1% EMS処理による *B. braunii* の生存率

(A) 蛍光顕微鏡下での生死判別 (*B. braunii* BOT-22株)。蛍光下では生細胞はクロロフィルの自家発色で赤に、死細胞を緑に発色する。

(B) EMS処理による *B. braunii* の生存率の経時変化。生存率は生細胞数を全細胞数で割ることにより算出した。生存率の算出はBOT-88-2株 (Race A) およびBOT-22株 (Race B) で実施した。両株とも生存率50%程度になるのはEMS処理後4時間であった。(Bar = SD, n = 5)

A



B

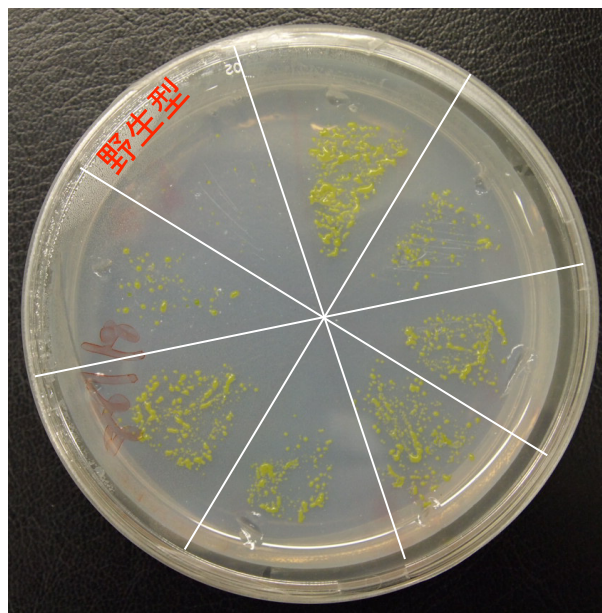


図6 除草剤耐性系統のスクリーニング

B. braunii BOT-22株をEMS処理後，除草剤含有プレート（A; グルホシネート $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，B; MV $50 \mu\text{M}$ ）上に出現した除草剤耐性コロニーを新しい固形プレート培地に植継ぐことによりスクリーニングを行った。コントロール（野生株）はA，Bとも死滅した。

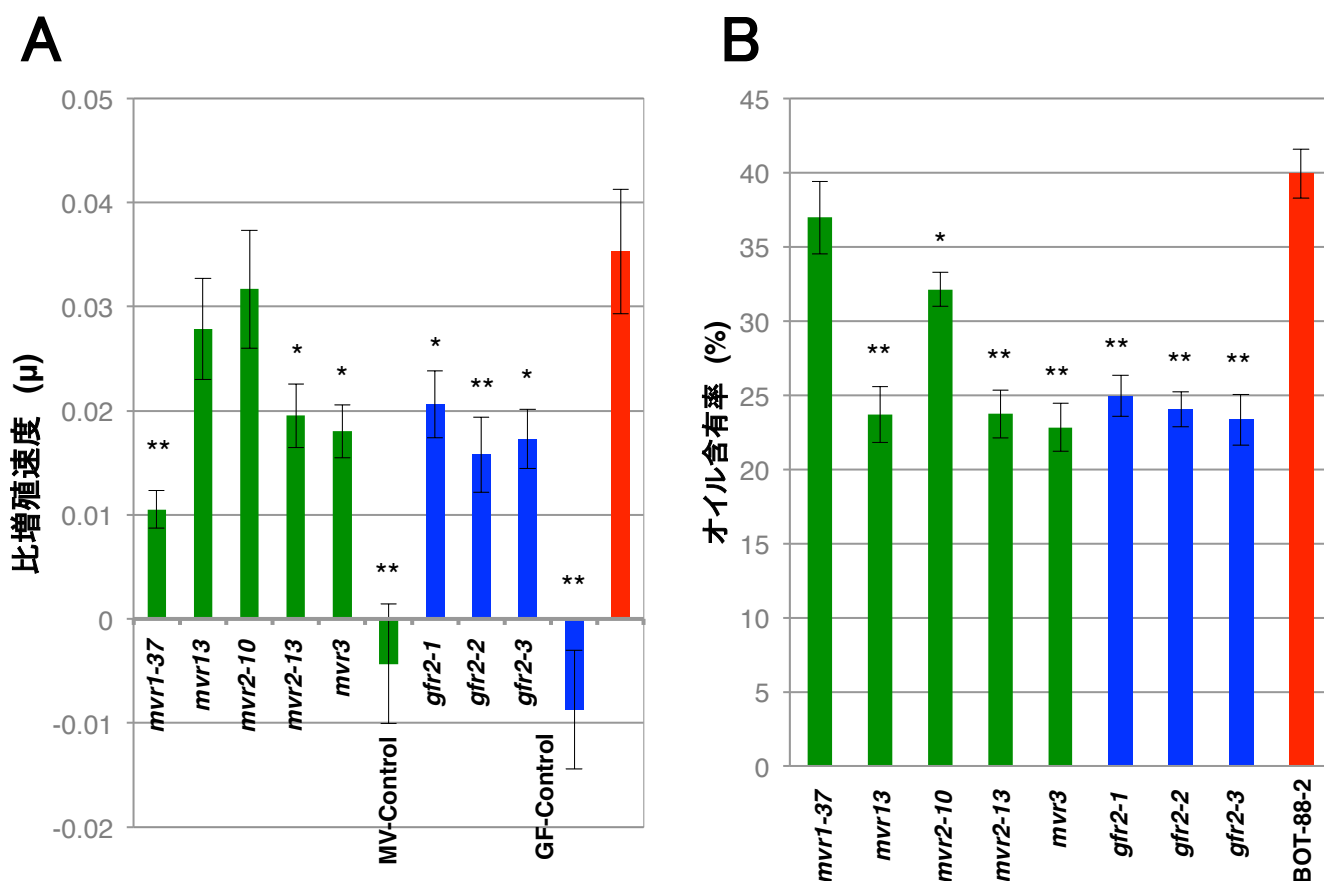


図7-1 BOT-88-2株(Race A)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤処理条件）

(A)比増殖速度 (μ)。(B) 乾燥重あたりのオイル含有率 (%)。

*mvr*はメチルビオロゲン(MV)耐性系統, *gfr*はグルホシネート耐性系統。MV-controlはMV投与した野生株, GF-controlはグルホシネート投与した野生株。棒グラフの色分けは緑: MV投与, 青: グリホシネート投与, 赤: 除草剤なし (野生株)。細胞は試験管内 (AF6, 10mL)で生育させ, 25°C, 36日間, 80-90 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の恒明条件で培養した。

有意差はコントロール (赤) を基準に *t*検定で検証した[$P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)] (Bar = SE, n = 5)。

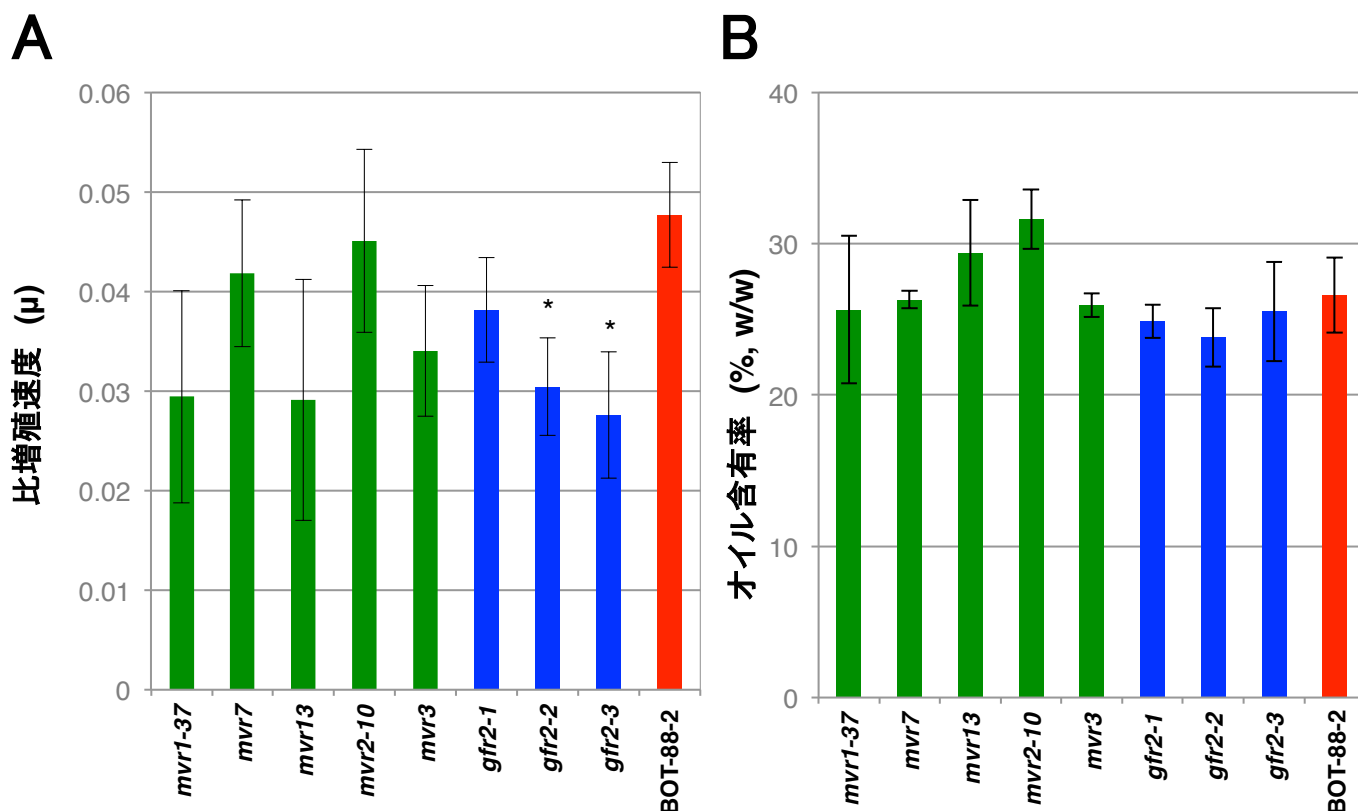


図7-2 BOT-88-2株(Race A)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤非添加）

(A)比増殖速度 (μ)。 (B) 乾燥重量あたりのオイル含有率 (%)。棒グラフの色分けは、緑；*mvr*はメチルビオロゲン(MV)耐性系統，青；*gfr*はグルホシネート耐性系統，赤；BOT-88-2（野生株）。細胞は試験管内（AF6, 10 mL）で生育させ，25 °C，49日間，80 - 90 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の恒明条件で除草剤を投与しないで培養した。有意差はコントロール（赤）を基準に*t*検定で検証した[$P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)] (Bar = SE, $n = 5$)。

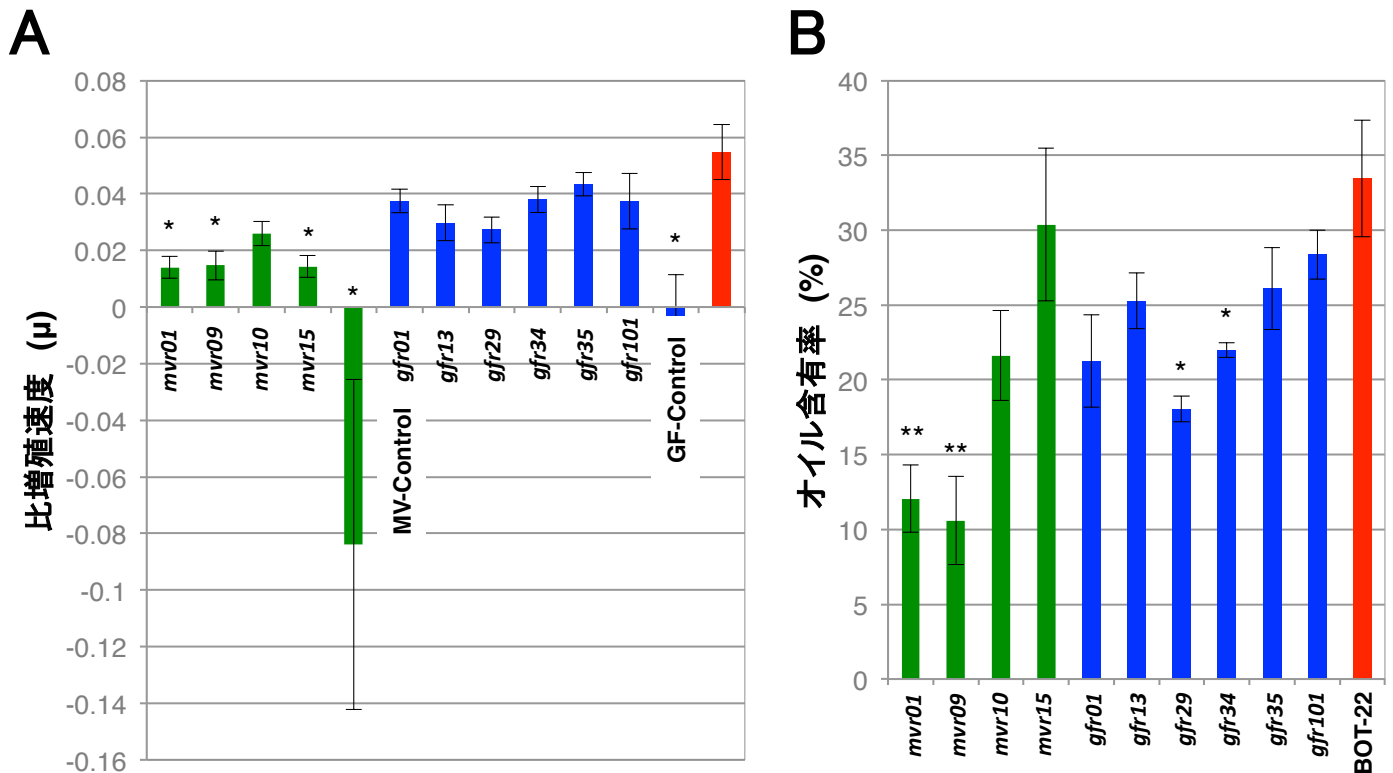


図8-1 BOT-22株(Race B)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤処理）

(A)比増殖速度 (μ)。(B)乾燥重量あたりのオイル含有率 (%)。

*mvr*はメチルビオロゲン(MV)耐性系統, *gfr*はグルホシネート耐性系統。MV-controlはMV投与した野生株, GF-controlはグルホシネート投与した野生株。棒グラフの色分けは緑: MV投与, 青: グルホシネート投与, 赤: 除草剤なし (野生株)。

細胞は試験管内 (AF6, 10 mL) で生育させ, 25 °C、21日間, 80-90 μmol photons · m⁻² · s⁻¹の恒明条件で培養した。

有意差はコントロール (赤) を基準に *t*検定で検証した [*P* < 0.05 (*), *P* < 0.01 (**)] (Bar = SE, n = 5)。

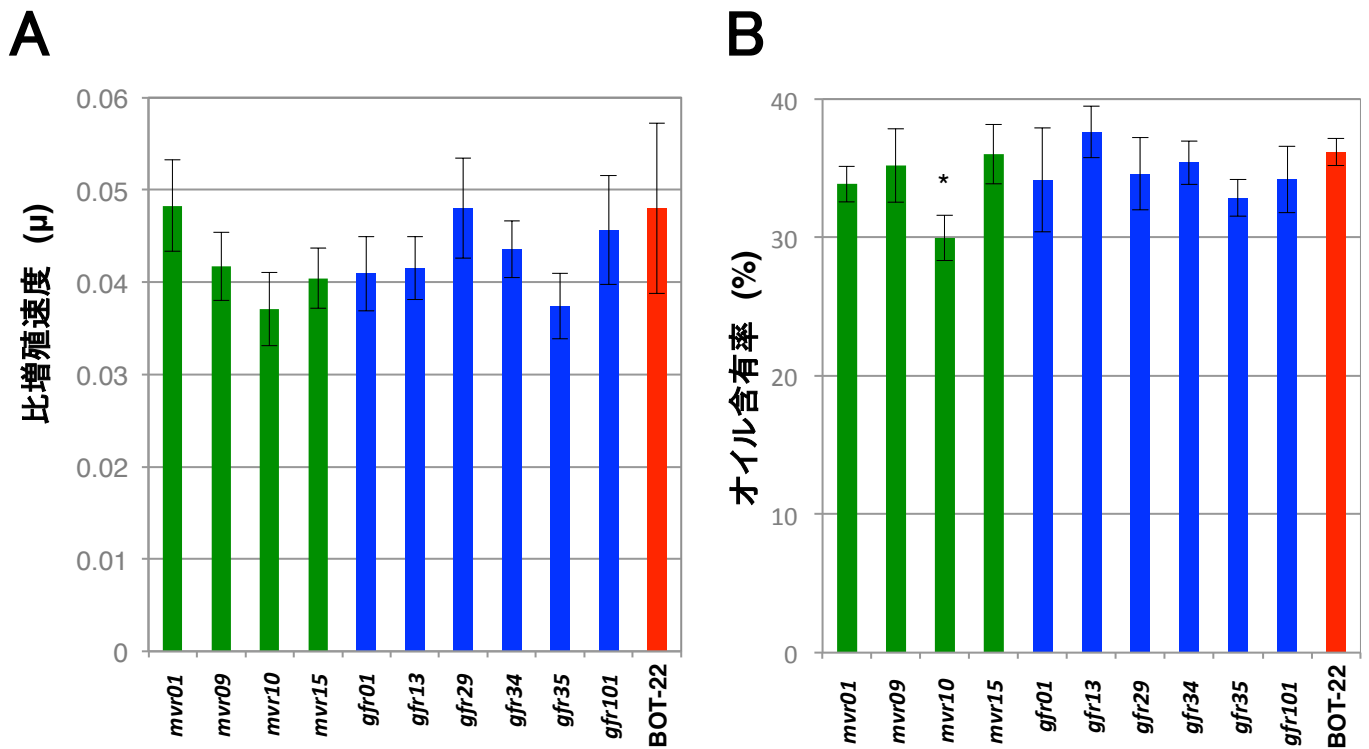


図8-2 BOT-22株(Race B)に由来する除草剤耐性系統の比増殖速度と乾燥重量あたりのオイル含有率（除草剤非添加）

(A)比増殖速度 (μ)。 (B) 乾燥重量あたりのオイル含有率 (%)。

棒グラフの色分けは、緑；*mvr*はメチルビオロゲン(MV)耐性系統，青；*gfr*はグルホシネート耐性系統，赤；BOT-22（野生株）。

細胞は試験管内（AF6，10 mL）で生育させ，25 °C，42日間，80-90 μmol photons · m⁻² · s⁻¹の恒明条件で除草剤を投与しないで培養した。

有意差はコントロール（赤）を基準に*t*検定で検証した[$P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**)] (Bar = SE, n = 5)。

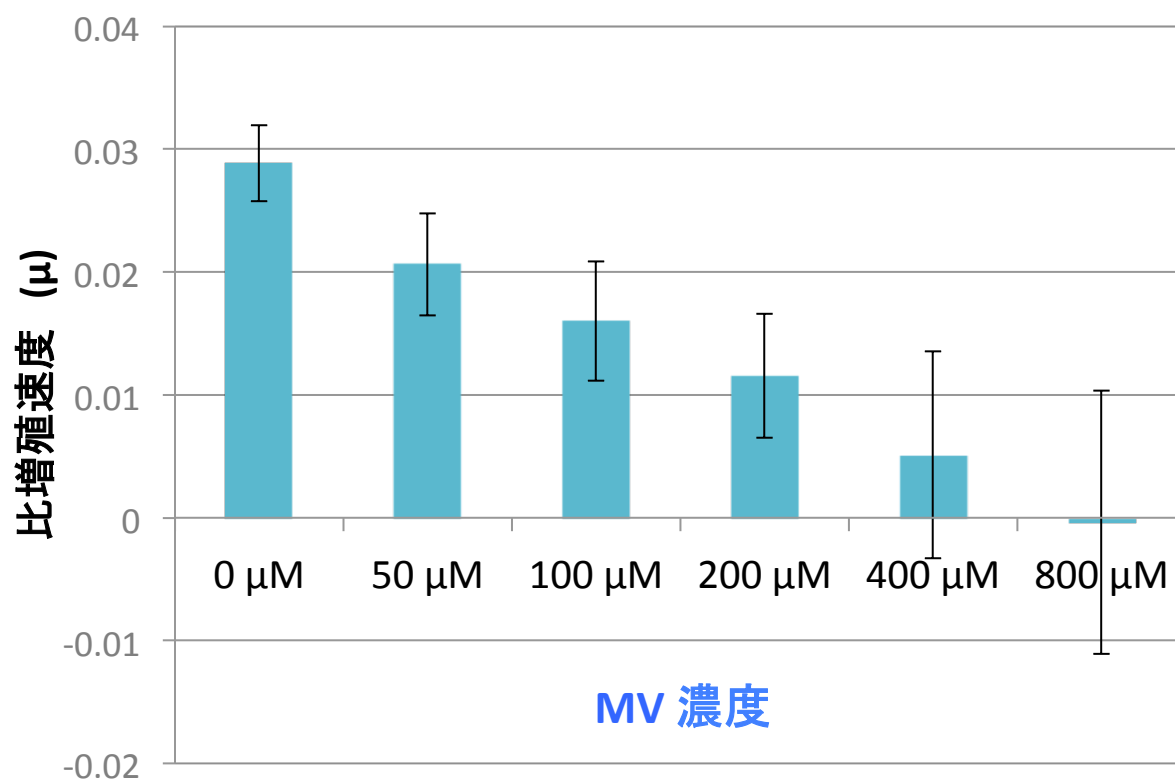
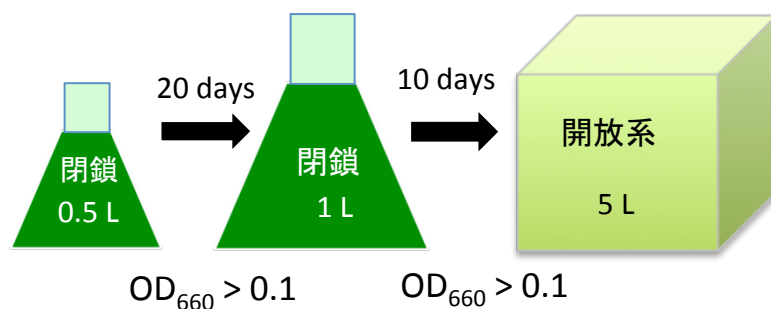


図9 メチルビオロゲン耐性*mvr2-10*系統 (BOT-88-2株由来) の除草剤濃度影響評価

各除草剤濃度 (MV 0, 50, 100, 200, 400, 800 μM) での比増殖速度(μ)。細胞は試験管内 (AF6, 10 mL) で生育させ、25 °C、56日間、80 - 90 μmol photons · m⁻² · s⁻¹の恒明条件で培養した。(Bar = SE, n = 3)。

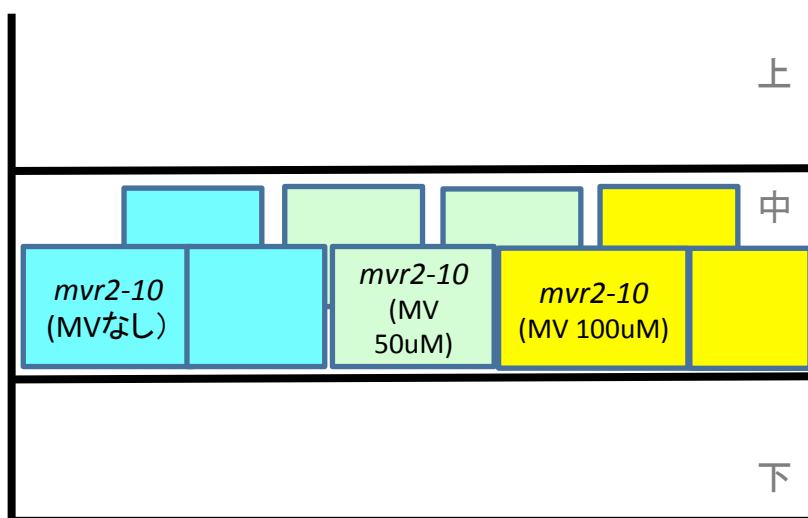
A



B



C



D



水槽内 温度・照度ロガー

図10 前培養および本培養の様子

国立環境研究所温室内で実施した。

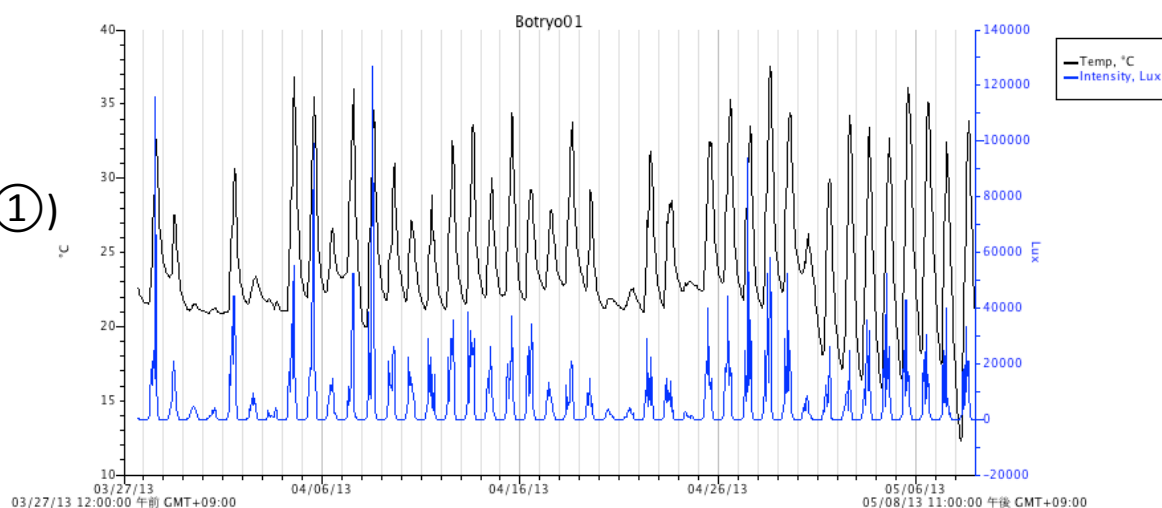
(A) 前培養（閉鎖系）から本培養（開放系）までの過程。完全密封した閉鎖系（0.5 L）で培養し、約20日後に次の閉鎖系（1 L）へ植継いだ。続いて約10日後に開放系（5 L）へ植継いだ。

(B) 閉鎖系0.5 L培養の様子。密封した培養器内にフィルター濾過した空気を注入している。

(C) 温室内設置の棚上配置。水槽（開放系）は中段に並べ、除草剤各濃度（MV 0, 50, 100 μ M）3水槽ずつ用意した。

(D) 開放系培養（5 L）水槽の様子。上蓋は1/4開放された状態。水深5 cmに温度・照度ロガーを設置した。培養槽はバブリングにより攪拌した。

水槽1
(MV 0 μ M-①)



水槽10
(水槽外)

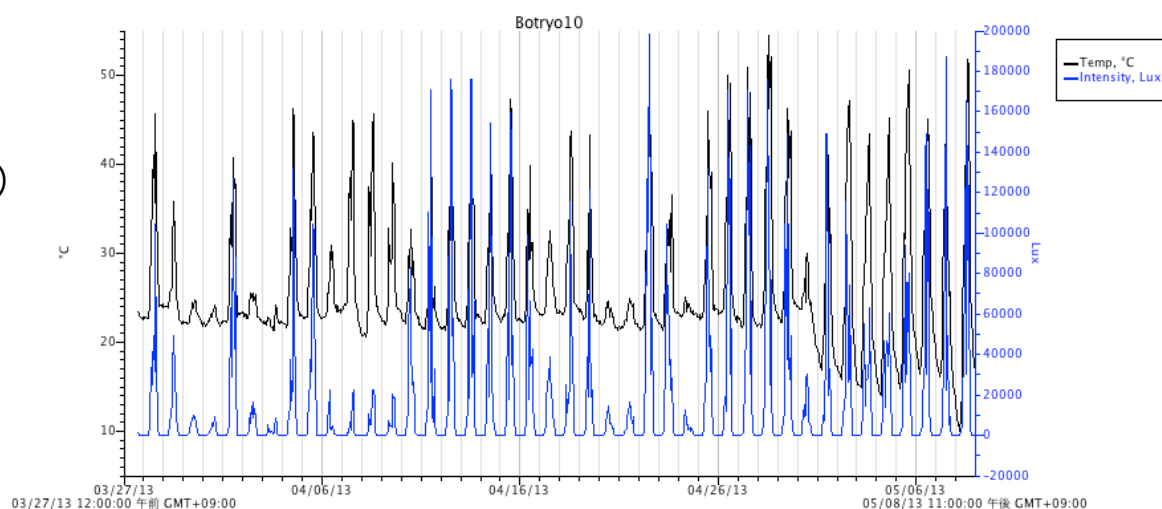


図11 *mvr2-10*系統 (BOT-88-2株由来) 開放系培養テストで水槽内外に設置した温度・照度ロガーの測定値

水槽内の代表データとして水槽1 (MV 0 μ M-①) を、水槽外 (温室内) として水槽10を掲載した。

黒線は温度 (°C) , 青線は照度 (lux) 。
培養期間は2013年3月27日から5月8日までの42日間で毎時00分に測定した (温度データのまとめは表4に掲載) 。

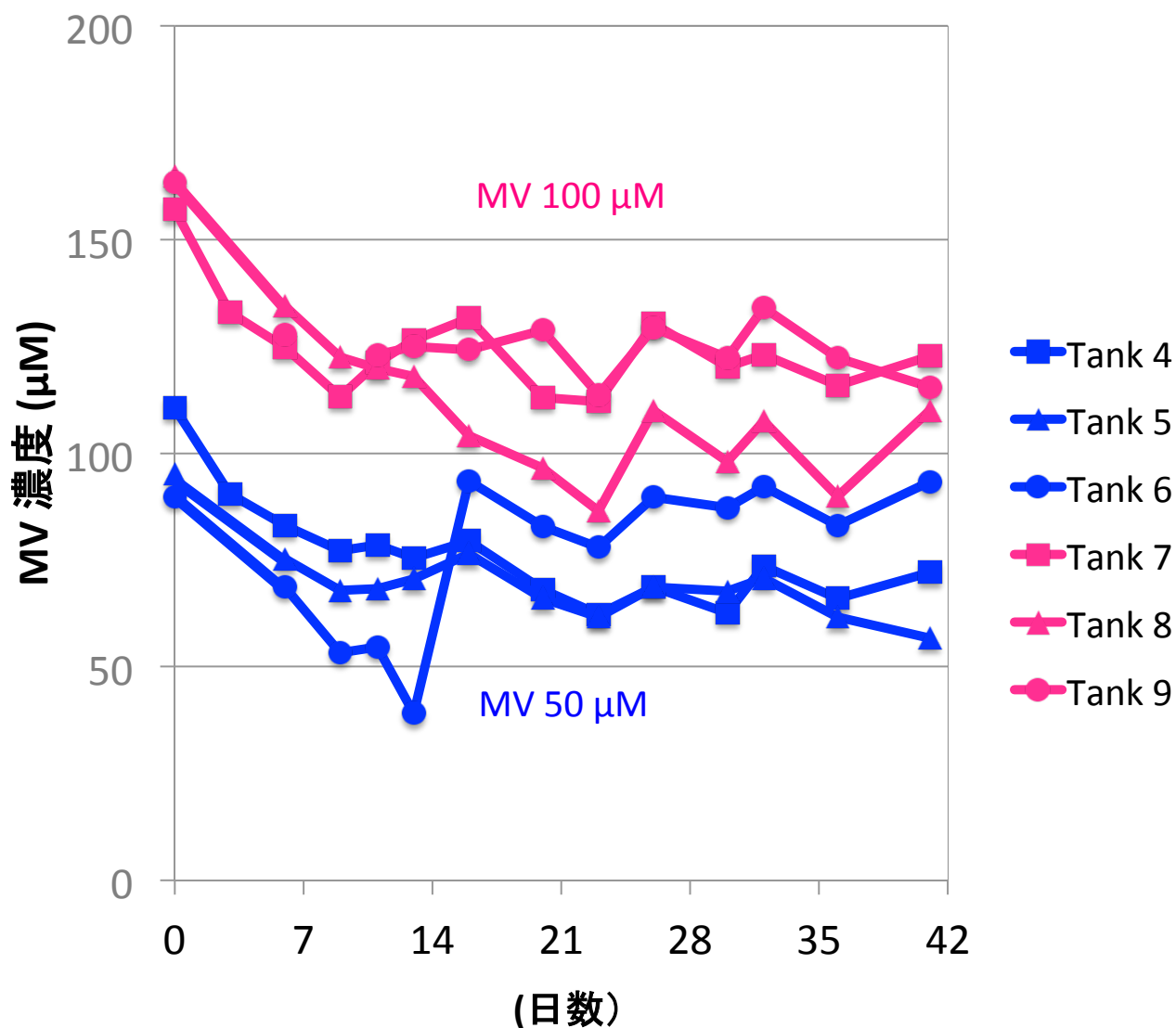


図12 開放系培養水槽の除草剤MV濃度変化

*mvr2-10*系統（BOT-88-2株由来）開放系培養水槽から週2回程度サンプリングし、HPLCで濃度測定し、水槽内の除草剤MV濃度が一定になるよう維持した。

なお濃度設定値は、水槽（Tank）4～6でMV 50 μ M，水槽7～8でMV 100 μ Mである。MV 0 μ M水槽1～3は未測定である。

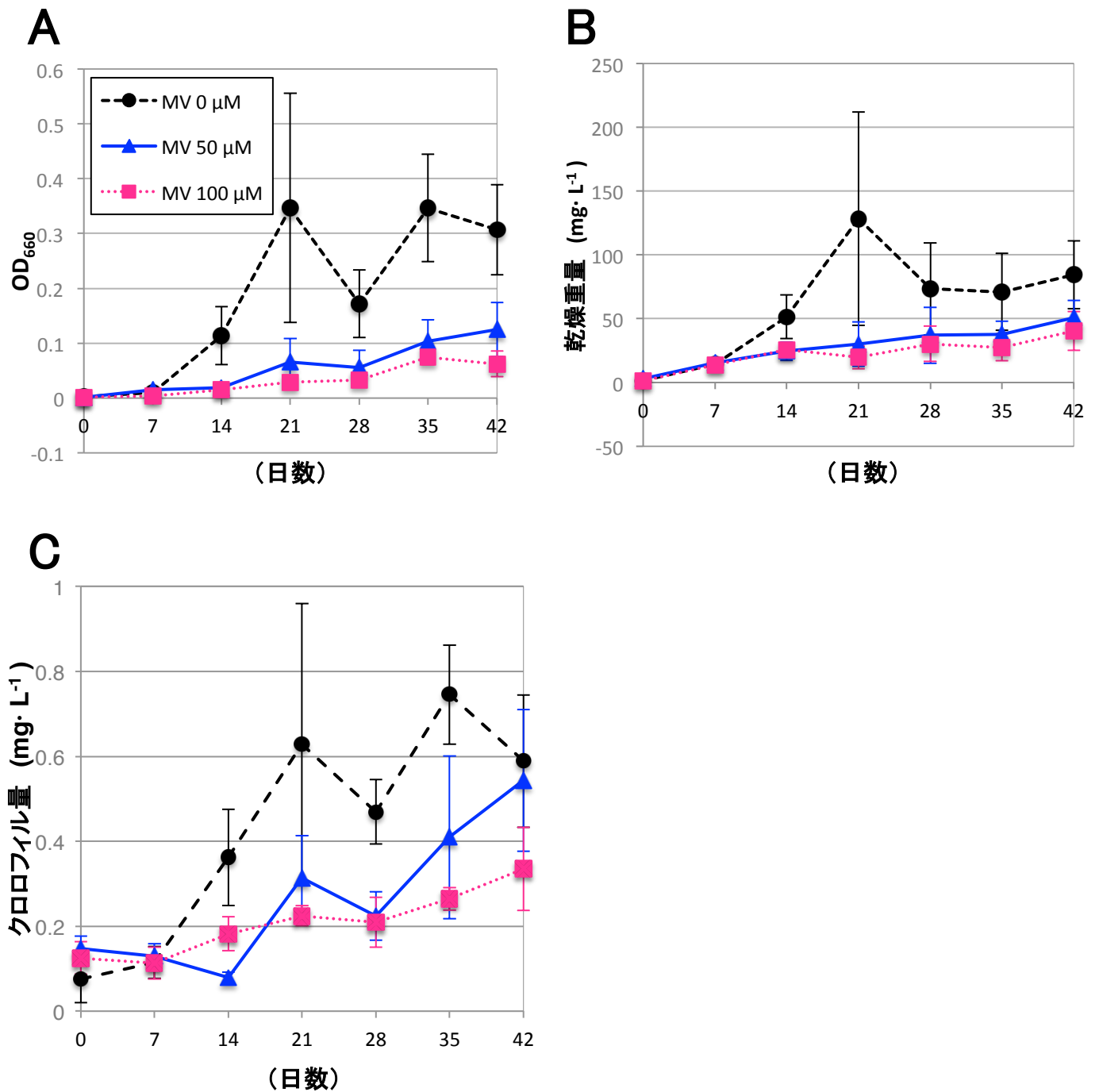
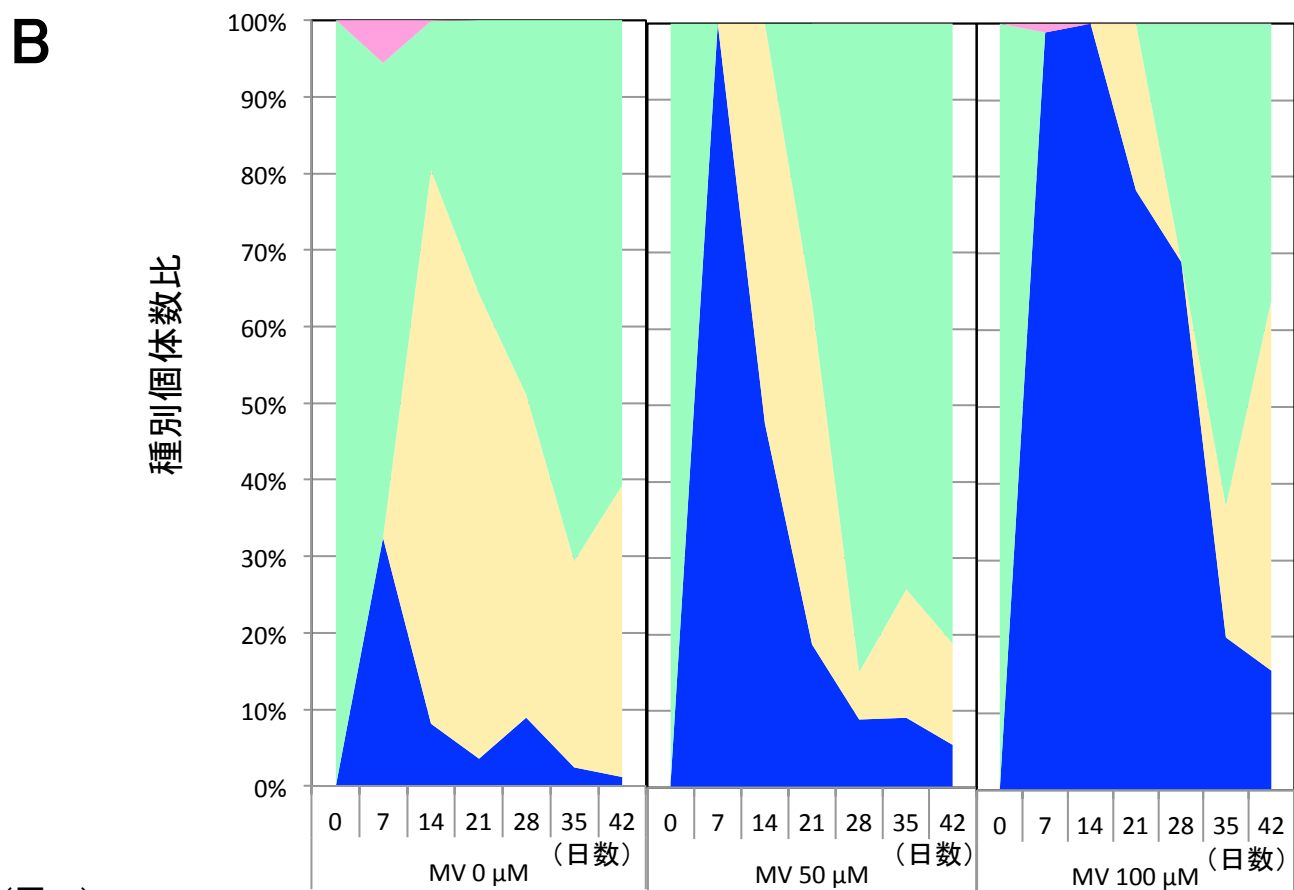
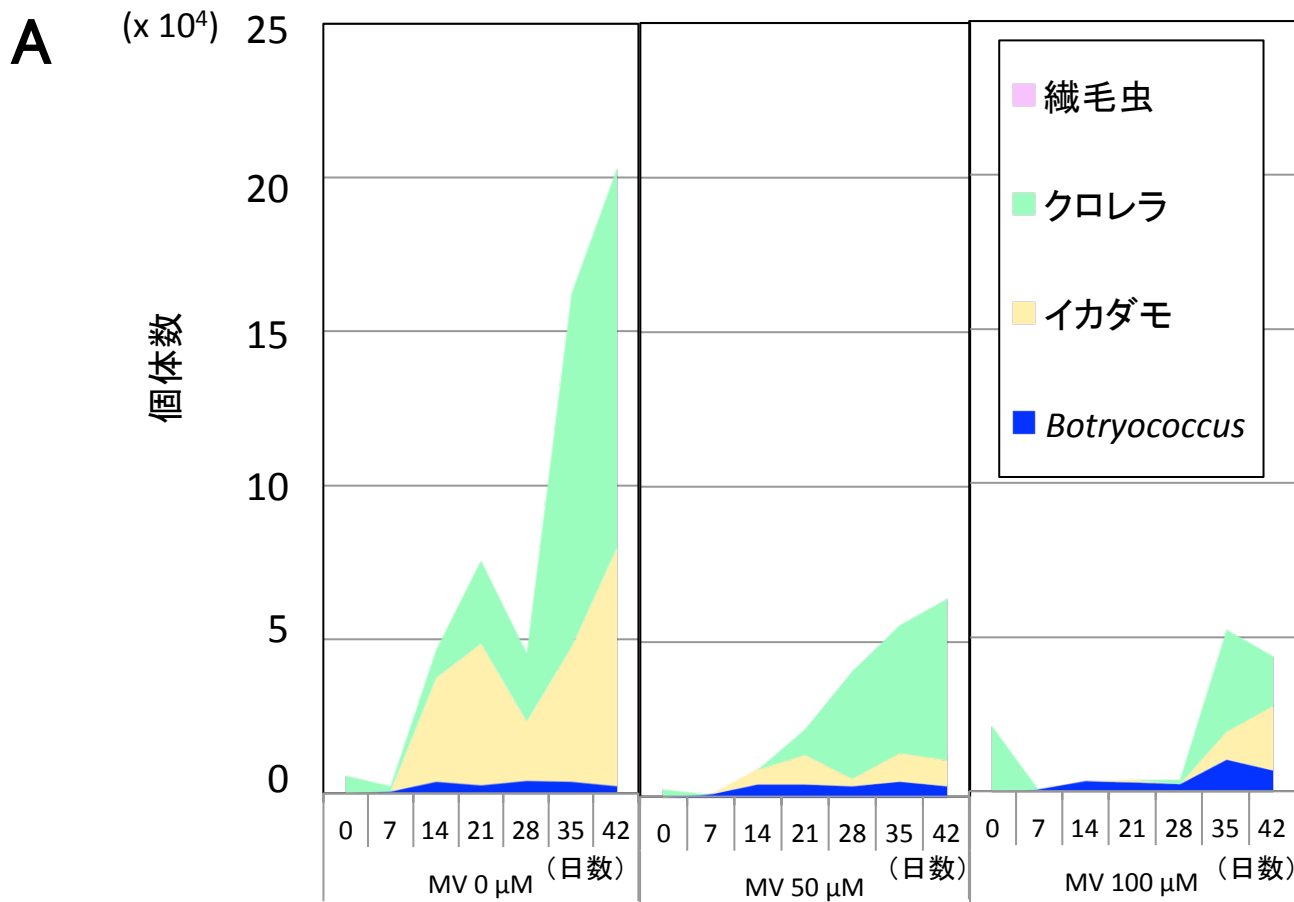


図13 *mvr2-10*系統 (BOT-88-2株由来) 開放系培養水槽の週ごとの濁度(OD₆₆₀) , 乾燥重量, クロロフィル量変化

MV 0 μM水槽のサンプルは黒・破線, 50 μMは青・実線, 100 μMはピンク・点線で表示した。42日間実施, Bar = SE, n = 3。



(図14)

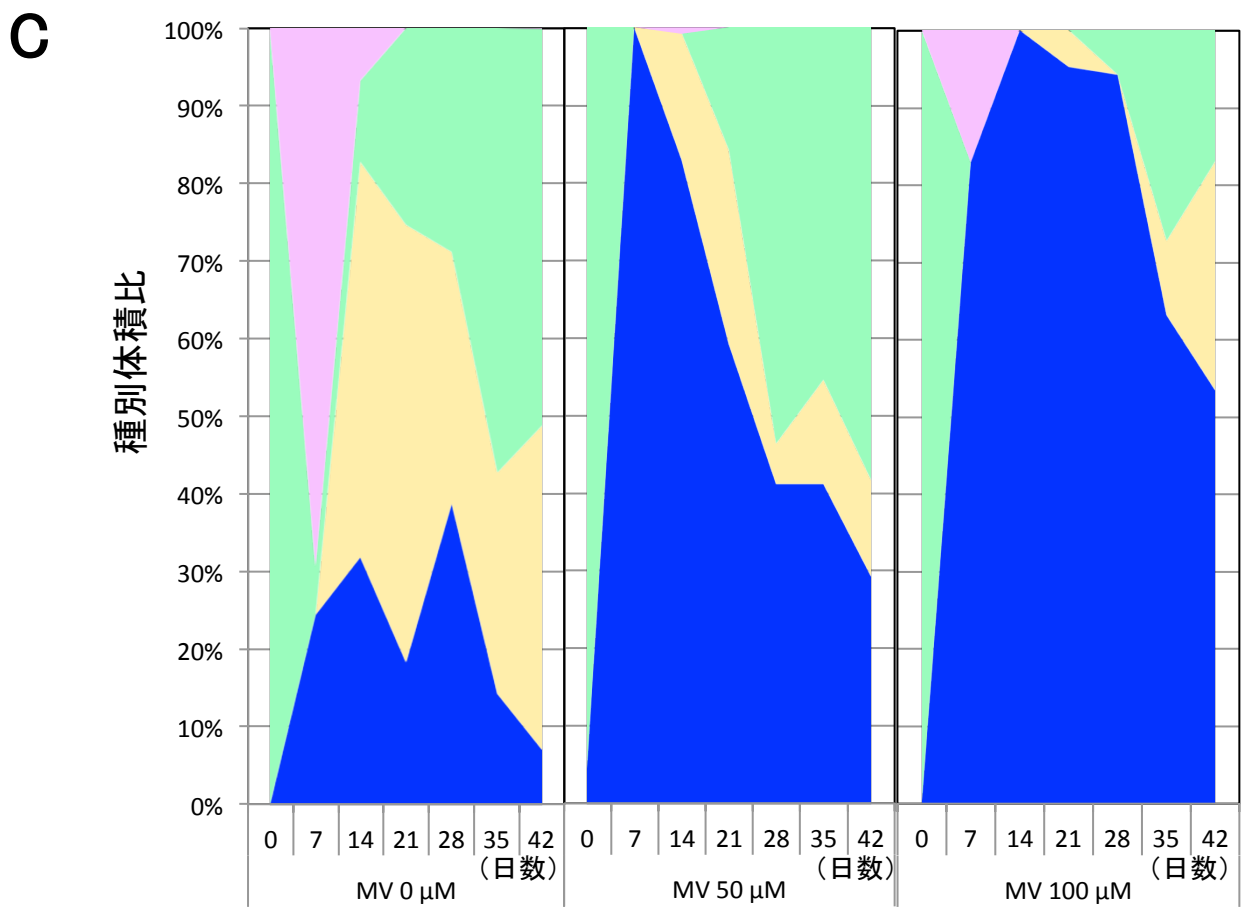


図14 *mvr2-10*系統 (BOT-88-2株由来) 開放系培養水槽の週ごとの種構成変化

除草剤濃度別に週ごとに顕微鏡下でカウントした。

*B. braunii*は青，イカダモは薄黄，クロレラは緑，繊毛虫はピンクで表示。

(A) 種別累積個体数， (B) 種別個体数比 (%)， (C) 種別体積比 (%)。(42日間， $n = 3$)

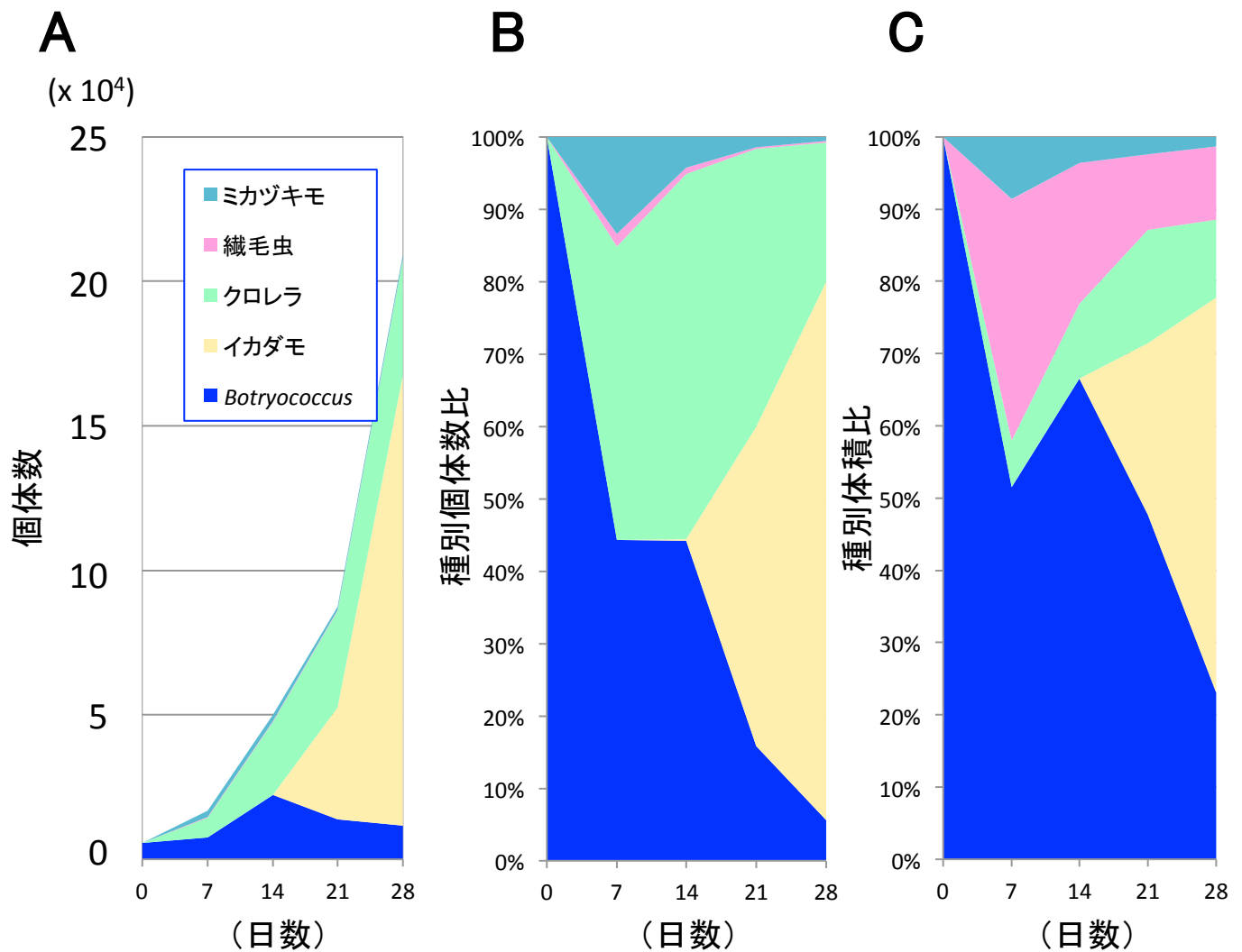


図15 BOT-88-2株(Race A)開放系培養水槽の週ごとの種構成変化

水槽内に除草剤は含まれていない。

*B. braunii*は青、イカダモは薄黄、クロレラは緑、織毛虫はピンク、ミカヅキモは薄青で表示した。

(A) 種別累積個体数, (B) 種別個体数比 (%), (C) 種別体積比 (%)。 (n = 3, 28日間)

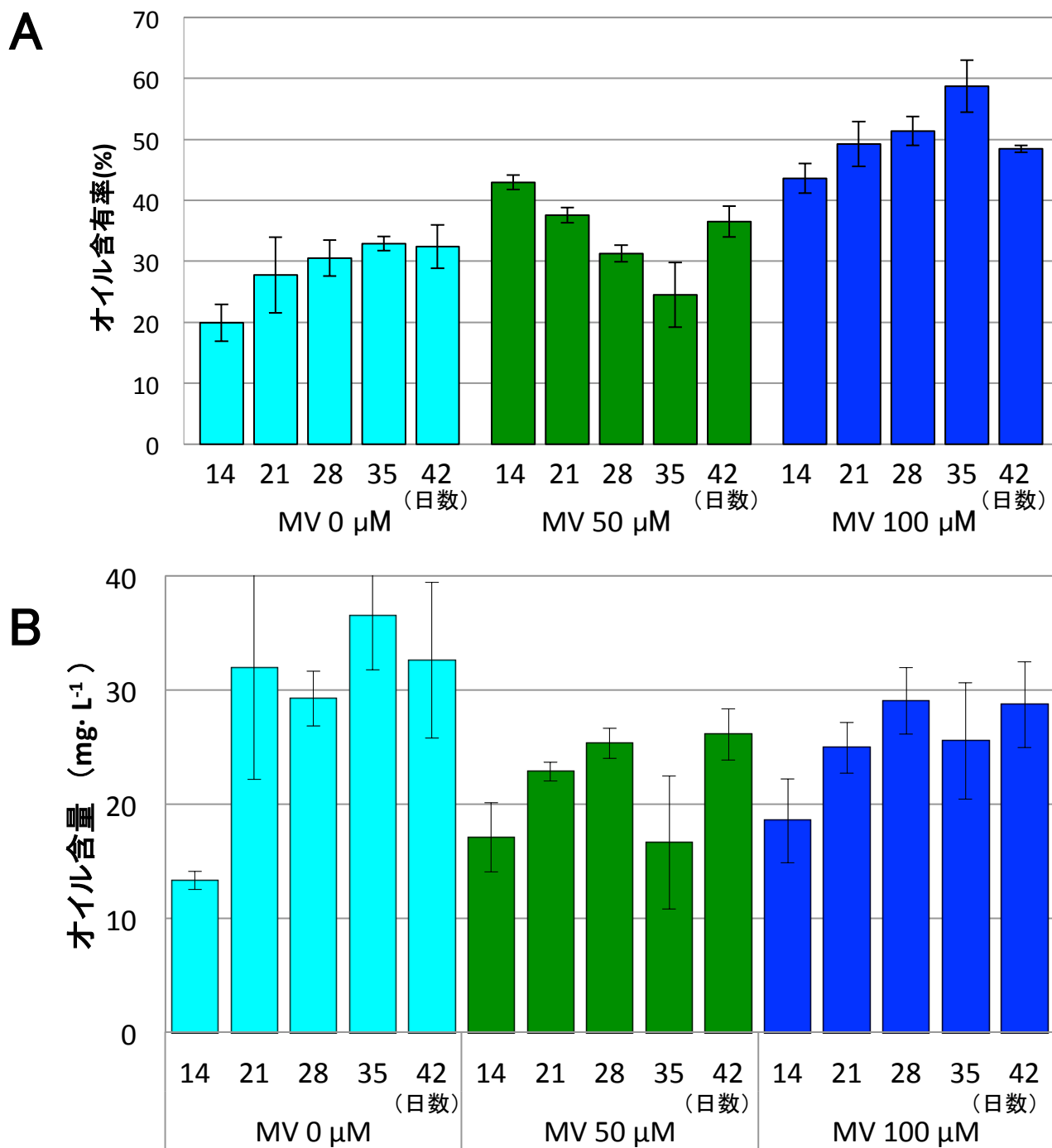


図16 *mvr2-10*系統 (BOT-88-2株由来) 開放系培養水槽のオイル含有率・オイル含量変化

14～42日目まで7日おきにサンプルを回収し、測定した。

(A) オイル含有率 (%) (オイル重量／乾燥重量) , (B) オイル含量(mg·L⁻¹)。

(Bar = SE, n = 3)

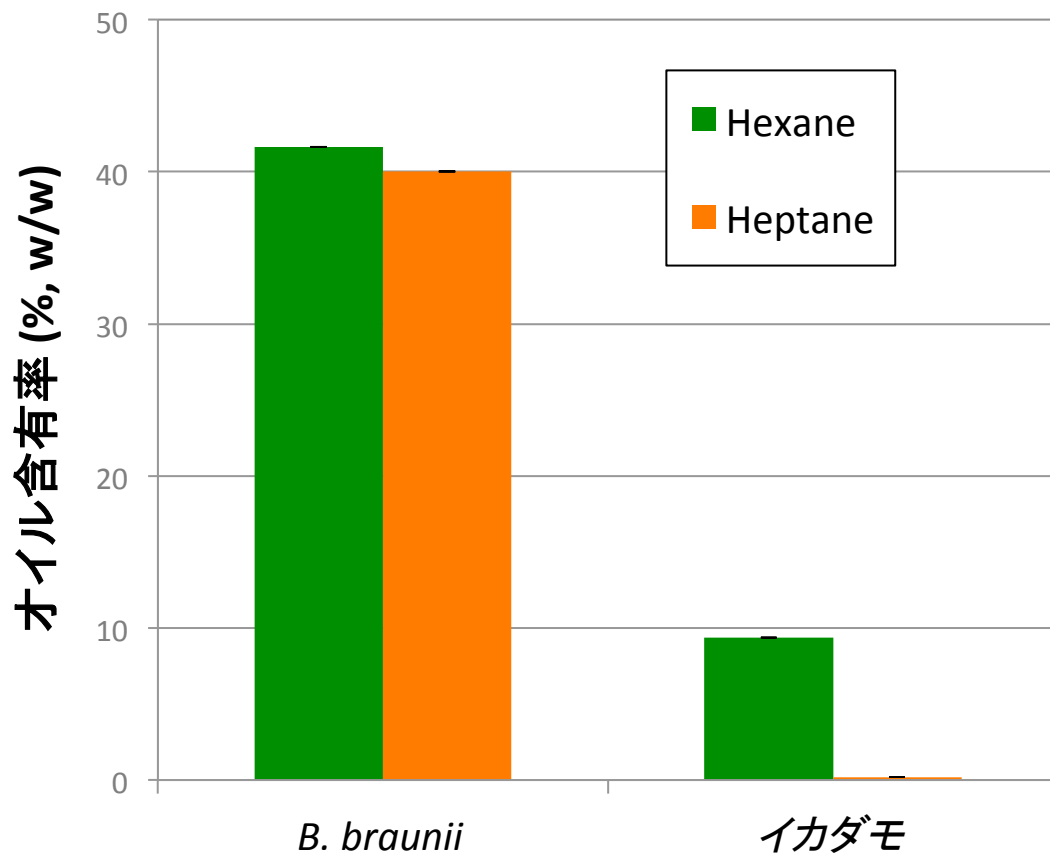


図17 ヘプタン法による細胞外オイル抽出法の検証

無菌培養の*B. braunii* (BOT-22株) およびイカダモ (NIES-119株) を n -ヘキサンおよび n -ヘプタンでオイル抽出し、オイル含有率を算出した。(Bar = SE, $n = 3$)

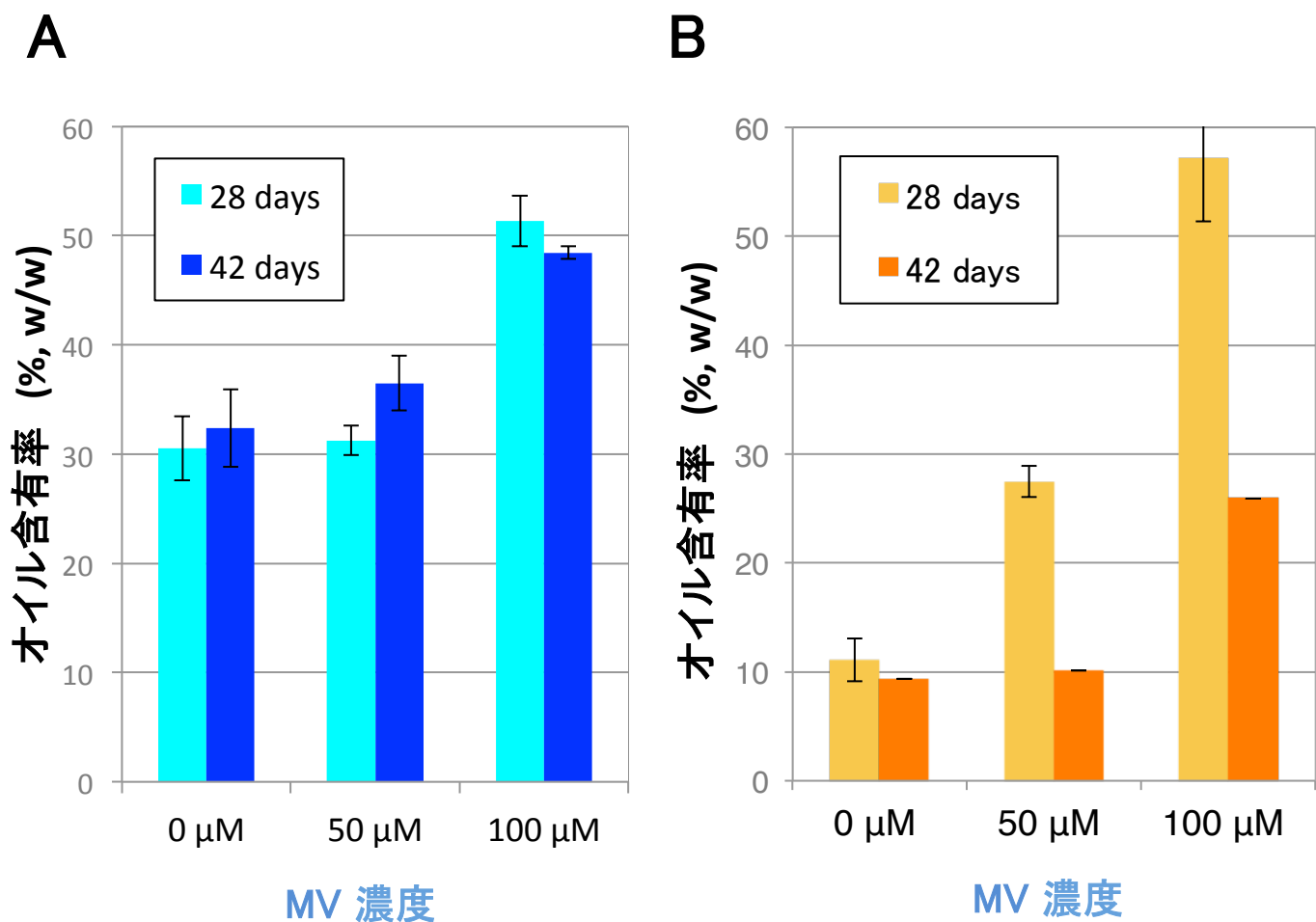


図18 開放系培養でのオイル含有率比較（ヘキサン，ヘプタン）

除草剤メチルビオロゲン各濃度（MV 0, 50, 100 μM）の28および48日目サンプルのオイル含有率。

(A)従来のヘキサン使用でのオイル含有率（全オイルに相当）(B)ヘプタン使用でのオイル含有率（細胞外オイルに相当）（Bar = SE, n = 3）

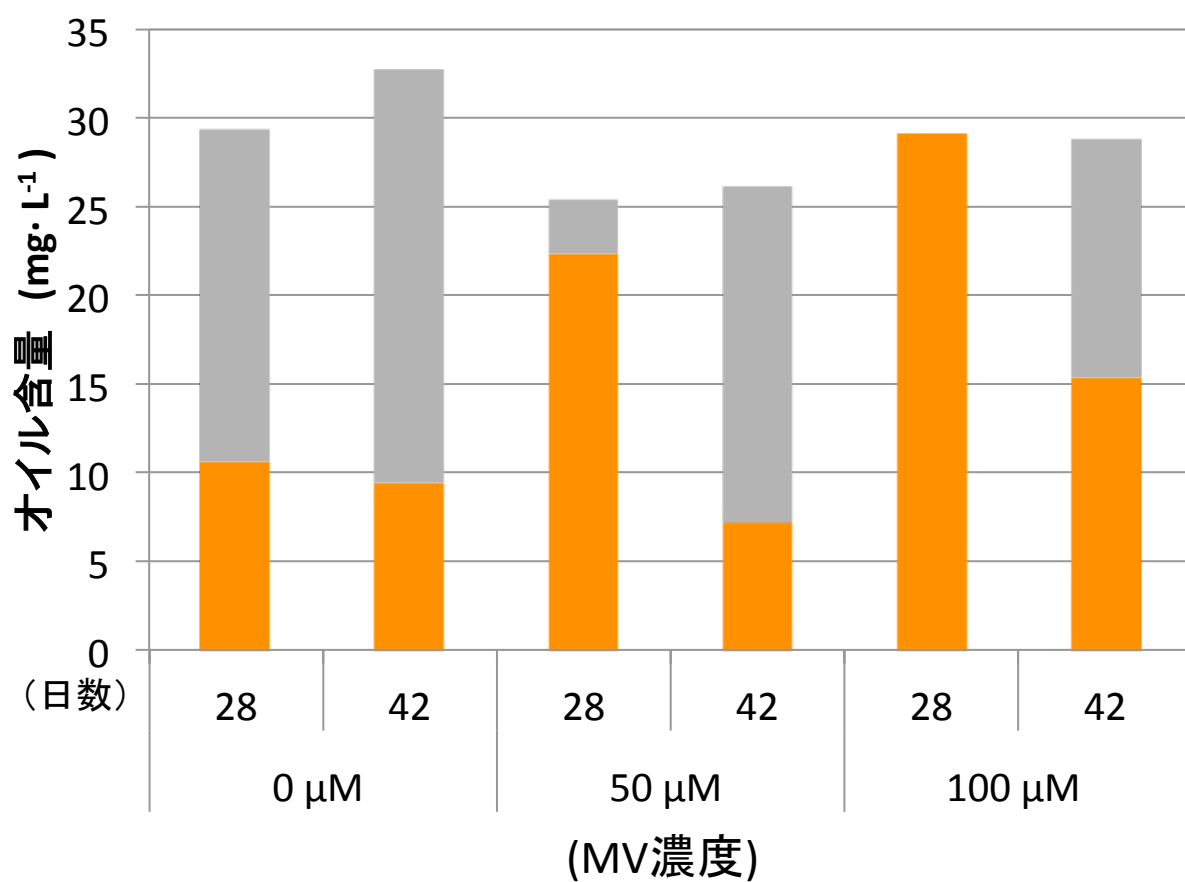


図19 開放系培養でのオイル含量（細胞外オイル含量を含む）

除草剤メチルビオロゲン（MV）各濃度（MV 0, 50, 100 μM）の28日および48日目サンプルのオイル含量。橙色は細胞外オイル含量を表す。

6. 図表

6.2. 表

表1 各種作物・微細藻類のオイル産生能の比較

作物・藻類	オイル 産生量 (L・ha ⁻¹ ・yr. ⁻¹)	世界の 石油需要を 満たすのに 必要な面積 (M ha)	地球上の 耕作面積に 対する割合 (%)
Corn トウモロコシ	172	28,343	1,430.0
Cotton 綿実	325	15,002	756.9
Soybeans ダイズ	446	10,932	551.6
Rapeseed ナタネ	1,190	4,097	206.7
Jatoropha ヤトロファ	1,892	2,577	130.0
Coconut ココナッツ	2,689	1,813	91.4
Oil Palm アブラヤシ	5,950	819	41.3
Micro Algae 微細藻類① (オイル含有率70%)	136,900	36	1.8
Micro Algae 微細藻類② (オイル含有率30%)	58,700	83	4.2

(Watanabe *et al.* 2010; Chisti, 2007, modified)

表2 光独立栄養型微細藻類各種のオイル含有率およびオイル種類

微細藻類の種類	オイル含有率 (%, dry wt)	オイルの種類
<i>Botryococcus braunii</i>	7–75	炭化水素
<i>Chlorella</i> sp.	28–32	トリアシルグリセロール
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	20	トリアシルグリセロール
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37	トリアシルグリセロール
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	トリアシルグリセロール
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33	トリアシルグリセロール
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35	トリアシルグリセロール
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68	トリアシルグリセロール
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54	トリアシルグリセロール
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47	トリアシルグリセロール
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30	トリアシルグリセロール
<i>Pseudochoricystis ellipsoidea</i>	10	トリアシルグリセロール
<i>Tetraselmis suecia</i>	15–23	トリアシルグリセロール

(Watanabe *et al.*, 2010; Chisti, 2007, modified)

表3 *B. braunii* 各系統が生産する炭化水素の特徴内訳

なお、当研究室で使用しているBOT-88-2株はRace A, BOT-22株はRace Bである。

	Race A	Race B	Race L	Race S
炭化水素 合成由来	脂肪酸	テルペノイド (MEP 経路)	フィトール (クロロフィル) リコペン カロテン	脂肪酸
主要 炭化水素	アルカジエン アルカトリエン	トリテルペノイド (ボトリオコッセン、 メチル化スクアレノ)	リコパジエン	エポキシ- <i>n</i> -アルカン 飽和- <i>n</i> -アルカン
炭素数	23-33 (奇数)	30-37	40	18, 20

(Kawachi *et al.* 2012を参照して表を作成)

表4 *mvr2*-10系統（BOT-88-2株由来）開放系培養（図4参照）での水槽内外の平均・最高・最低温度

水槽内は水槽1～9，水槽外は水槽10のデータから算出した。培養期間は2013年3月27日から5月8日までの42日間。

	温度(°C)	
	水槽内	水槽外
平均	24.4 ± 2.4	26.1 ± 4.2
最高	37.5	54.5
最低	12.3	7.3
	n=9	n=1

表5 *mvr2*-10系統 (BOT-88-2株由来) 開放系培養での初日および28日目の乾燥重量とオイル含有率変化

初日は2013年3月27日, 28日目は同年4月24日。n = 3 (SE)。

MV濃度	乾燥重量 (mg·L ⁻¹)		増加率(倍)	1日あたりの乾燥重量 [mg·L ⁻¹ ·day ⁻¹]
	0 day	28 days		
0 μM	1.5 ± 1.5	73.3 ± 36.2	48.9	2.6
50 μM	2.8 ± 2.9	37.0 ± 21.9	13.5	1.2
100 μM	1.3 ± 1.6	30.3 ± 13.9	22.8	1.0

MV濃度	オイル含有率(%)		オイル含有率 変化(%)
	0 day	28 days	
0 μM	51.9 ± 1.6	30.5 ± 2.9	-21.4
50 μM	51.9 ± 1.6	31.3 ± 1.4	-20.6
100 μM	51.9 ± 1.6	51.3 ± 2.3	-0.5

表6 先行研究と本研究（*mvr2-10*系統開放系培養）との比較

	容量	株	経過日数	乾燥重量			脂質
	形態		day	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	増加率 (倍)	増加率 (28日予測)	%
Rao <i>et al.</i> (2012)	80L	LB572	18	0.2 → 1.8	9.0	13.5	24.0
	レースウェイ	NIES-836	25	0.2 → 1.0	5.0	5.5	27.0
	40L	LB572	18	0.2 → 1.4	7.0	10.4	19.0
	オープンポンド	NIES-836	25	0.2 → 0.8	4.0	4.4	22.0
本研究	5L 水槽	<i>mvr 2-10</i> (BOT88-2)	28	0.001 → 0.030	22.8	22.8	Ave. 51.3

(筑波大学大学院 生命環境系 出村幹英 助教より提供された表を改変)

7. 謝辞

はじめに本研究の実施や本論文を含めた論文執筆にあたり、指導教員として多大なるご指導を賜りました国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 室長 中嶋信美 博士(筑波大学大学院 生命環境科学研究科 連携大学院教授) に厚く御礼申し上げます。

また本研究を遂行するにあたり、多大かつ有益なアドバイスをご教授していただいた国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 主任研究員 玉置雅紀 博士(筑波大学大学院 生命環境科学研究科 連携大学院准教授) に厚く御礼申し上げます。

筑波大学大学院生命環境科学研究科生命共存科学専攻一貫制博士課程への編入学相談に快く乗っていただき、藻類オイル研究の第一人者であり、中嶋博士をご紹介していただいた筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊信 教授には心から感謝しております。

博士課程の審査を通して、筑波大学大学院 生命環境科学研究科 鈴木石根 教授から多大なアドバイスを頂き、論文を完成するにあたり大変助かりました。厚く御礼申し上げます。

Botryococcus braunii を研究するにあたり具体的な実験アドバイスや英語論文執筆のノウハウをご教授していただいた筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 研究員 五百城幹英 博士には本当にお世話になり、感謝しております。

開放系培養における水槽内での生物種の分別やカウントについての確かつ有益なアドバイスを授けていただいた筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 助教 出村幹英 博士に厚く御礼申し上げます。

B. braunii の培養や物質量の測定にあたり様々な方のアドバイスをいただきました。特に筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 研究員 松浦裕志 博士、筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 研究員 中澤敦 様、および筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 研究員 米澤夏岐 様に感謝しております。おかげさまで無事に培養でき、研究を

遂行させる事ができました。ありがとうございます。

B. braunii 研究の先人として多大なるアドバイスをいただいた筑波大学大学院 生命環境科学研究科 渡邊・彼谷研究室 助教 田辺雄彦 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 白岩研究室 博士研究員 馬場将人 博士に感謝の意を表したいと思います。

植物生理学セミナーにて筑波大学大学院 生命環境科学研究科 教授 鎌田博 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 教授 佐藤忍 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 准教授 三浦謙治 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 准教授 小野道之 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 講師 岩井宏暁 博士, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 助教 古川純博士, および国際基督教大学大学院 アーツ・サイエンス研究科 教授 溝口剛 博士, それから植物生理学セミナー参加学生の方々には議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました。ありがとうございました。

筑波大学大学院入学前からの既知で研究や実験手法等をご教授していただき叱咤激励して頂いた皆様に感謝しております。特に専門のシアノバクテリアを含めた藻類研究の興味深さをご教授していただいた中央大学 理工学部 教授 大森正之 博士, シアノバクテリア研究手法を懇切丁寧にご指導していただいた大学共同研究機関法人 情報・システム研究機構ライフサイエンス統合データベースセンター 特任准教授 岡本忍 博士, 研究相談に乗っていただいた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 GMO 検知解析ユニット ユニット長 橘田和美 博士, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 GMO 検知解析ユニット 主任研究員 高畠令王奈 博士, 並びに独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 GMO 検知解析ユニット 研究員 真野潤一 博士に厚く御礼申し上げます。また, かつての仕事仲間である独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 GMO 検知解析ユニットの皆様には度重なる激励をいただき感謝しております。

専門外に関わらず快く研究相談を引き受けていただいた国立環境研究所 生

物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 主任研究員 川嶋貴治 博士，開放系培養やそのデータ測定に多大なアドバイスをご教授していただいた 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 主任研究員 矢部徹 博士，試薬や器具を快く融通していただいた福井大学 教育地域科学部 講師 西沢徹 博士，多忙なさなか研究進捗を気にかけていただいた 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 特別研究員 有田康一 博士に心から感謝しております。ありがとうございました。また，国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 月曜セミナー参加の皆様には多大なアドバイスをして頂き，感謝しております。

少々反対しつつも進学を許してくれた夫，それからいつも笑顔で応援してくれた幼い娘をはじめとして，家族・親戚・友人の皆様からの応援にはとても助けられました。本当にありがとうございました。

最後に公私にわたり大変お世話になりました国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 生態遺伝情報解析研究室 関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

(注・転属先が不明な方に関しては，旧所属で明記しております。ご了承ください。)

2014年1月 著者