

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21651035

研究課題名（和文） 日本の年間消費原油を4ヵ月で生産する重油生産藻類ボツリオコッカスの培養技術の開発

研究課題名（英文） Development of a new strain of Botryococcus braunii with high growth rate and high productivity of hydrocarbon

研究代表者

榎本 平（Enomoto Taira）

神戸大学 人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：00127622

研究成果の概要（和文）：西日本各地のダム湖から野生の重油生産藻類ボツリオコッカス（*Botryococcus braunii*, Bb）を採取し、液体培養法と寒天培養法を組み合わせることで育種法によって約1年5ヵ月間増殖力の優れたBb株の選別を行った。その結果、これまでには考えられなかった分裂速度（Doubling Time, DT）≒2.5日を持つ新規のBb株を分離することに成功した。またこの株は、最適培養温度=29～30℃という比較的高温で生育する新規のBb株であることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to isolate a new strain of *Botryococcus braunii* with high growth rate and high productivity of hydrocarbon, we collected wild *Botryococcus braunii* from lakes of western part of Japan, and tried to select high capacity of growth and hydrocarbon productivity. As a result, We have developed a new type of *Botryococcus braunii* strain which have the ability of high growth rate and highly productive capacity of Hydrocarbon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	0	2,500,000
2010年度	500,000	0	500,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	150,000	3,650,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：ボツリオコッカス、重油生産藻類、炭化水素、榎本藻、CO2削減、rbcS遺伝子、光合成、藻類燃料

1. 研究開始当初の背景

世界的な石油枯渇の始まりと世界的なCO2削減が求められる時代に入った時であり、新しい地球環境に優しい、かつ持続可能なエネルギー開発は急務であった。特に日本はエネルギー貧国として新たなエネルギー資源の開発が急がれる。

2. 研究の目的

日本各地のダム湖に生息する重油生産藻

ボツリオコッカス *Botryococcus braunii* から生産性、増殖能力の卓越した新品種を開発すること、その遺伝子を明らかにすること

3. 研究の方法

増殖の非常に遅い野生のボツリオコッカスを大量に集め、寒天培養法で培養を繰り返し、こうすることで増殖速度の速い亜株が誕生し続ける。この中から、優れて増殖

能力の高い株を選択していく、ことで品種改良を行い、最終的にDT=3.0日を超える株を開発する。

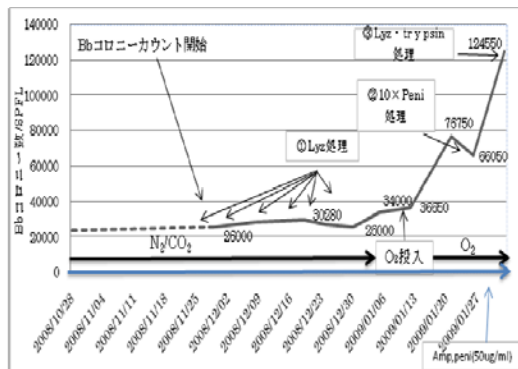
4. 研究成果

(1) 無酸素条件下培養による淡水藻類群からの *Botryococcus braunii* の選択的分離

OAmix (other algae mixture) の多くは極めて増殖速度が速く(3回分裂/dayのものもある)、これには大量の酸素消費が伴う。したがって培地気層の酸素を断つことでOAmixの増殖抑制や死滅が期待される。この考察に基づいて「窒素 N₂=95~98%・CO₂=2~5%」の無酸素条件下でBbを含むOAmixを培養したところ(図1)、大部分を占めていたOAmixが10日以降徐々に減り始めたが、Bb数は無酸素下でも変化なかった。また、雑菌については複数回に渡る高濃度の酵素と抗生物質で処理し除去を行った。その結果、一か月後にはBbのみをほぼ純化することに成功した。この時点で培地気層に酸素を投入したところ、Bbは劇的に増加を始めた。一方他のOAmixは増殖して来なかった。

この方法を用いて、野生から採集した藻類の中から選択的にボトリオコッカスを集め、増やすことが可能になり、増殖や重油生産能力の点で様々な形質をもつボトリオコッカスを単離・クローン化すること

図1



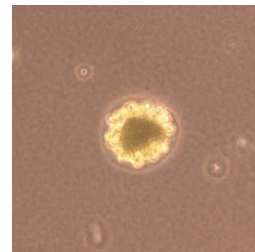
が可能になった。

(2) 重油生産藻類 *Botryococcus braunii* 細胞塊からの単一 Bb 細胞放出法の開発

本研究では重油を生成・分泌する藻類「*Botryococcus braunii* (Bb)」のバイオマスエネルギーとしての利用を目的に単一 Bb 細胞分離法の開発を行った。ダムで採取した Bb サンプルには重油生産型 (Hydrocarbon-Bb:HC-Bb) と重油非生産型 (Non hydrocarbon-Bb:NonHC-Bb) の両方が含まれており、さらに Bb と非常に似た形態を持っている“Bb モドキ” Other

Algae (OAmix) なども含まれている。従って顕微鏡下での形態観察からだけでは見分けが付きにくいので、本研究ではダムなどから回収したサンプルから one-step で HC-Bb を同定する方法の開発を目的とした。この方法が確立できれば、自然界からの“重油生産株の分離”作業が非常に簡便になると考えられる。Bb 塊の中で個々の細胞 (single cell) は cell-cup と cell-cap と呼ばれる特徴的な構造体の細胞壁中に納まっていて花弁状の配列をしている。この特徴的な形態から何らかの物理的あるいは化学的処理によって single cell を放出させ、Bb 細胞を同定することで Bb コロニーの迅速・簡便な同定・分離を試みた。その結果、図2に示すようにグリセリン処理をしたものには花弁状に出てきた Bb の single cell を確認することができた。

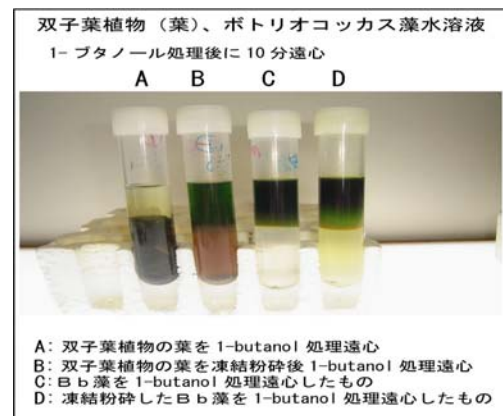
図2



(3) 重油生産藻 *Botryococcus braunii* の葉緑体クロロフィルの簡便・迅速な定量法

ボトリオコッカスの増殖の定量化を乾燥重量を主な指標として行ってきた。しかし、この乾燥重量法は、藻の回収そして乾燥、乾燥重量測定と煩雑で、混入雑菌の量や藻分泌固形物により正確な増殖量が表現できないことが大きな欠点である。これを克服するため、さまざまな処理法を試みて来た。その結果、図3に示すように他の藻類や植物では不可能だが、ボトリオコッカス藻類にのみ適用できる非常に簡便・迅速なクロロフィル抽出・定量法を開発した。

図3

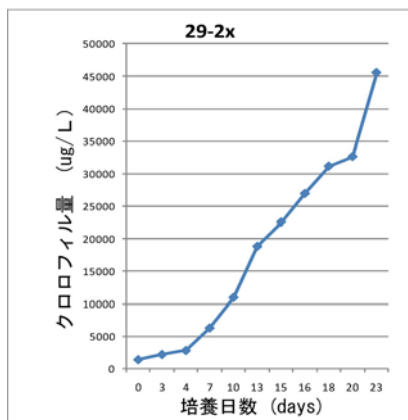


この方法は、1-ブタノールでボトリオコッカスを 20~30 分処理するだけで、図に示すようにボトリオコッカスのみで選択的に葉緑体クロロフィルの 1-ブタノール層への抽出が起こる。したがって、このクロロフィル量を定量することで、ボトリオコッカスの増殖程度を簡便に測定することが可能になった。

実際に、この方法でボトリオコッカスの成長を測定した結果を図 4 に示す。このように非常に簡便な「クロロフィルの 1-ブタノール抽出」法の確立によって、ボトリオコッカスの増殖アッセイが容易になった。

図 4

クロロフィル量に基づく増殖曲線
(ボトリオコッカス Nor223 株)



(4) 重油生産藻類 *Botryococcus braunii* からの高生存率な細胞単離・培養法の開発と単一細胞からの遺伝子 PCR 検出

我々は、遺伝子組み換えによって増殖速度、重油生産性の制御可能株を開発しようという試みも行っている。改良 Bb 株の開発のために、『生存率・増殖率の高い単一 Bb 細胞培養法の開発』、『単一あるいは数個の細胞レベルでの細胞 PCR 法の開発』について取り組んだ。図 5 はグリセリン処理法によって single Bb cell を放出させたものである。Bb の細胞塊コロニーを中心に、放射状に single Bb cell が放出している。

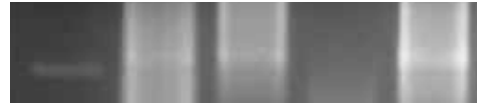
図 5



これから 1 個の細胞を採取し、PCR 法によって single cell での遺伝子検出を試み

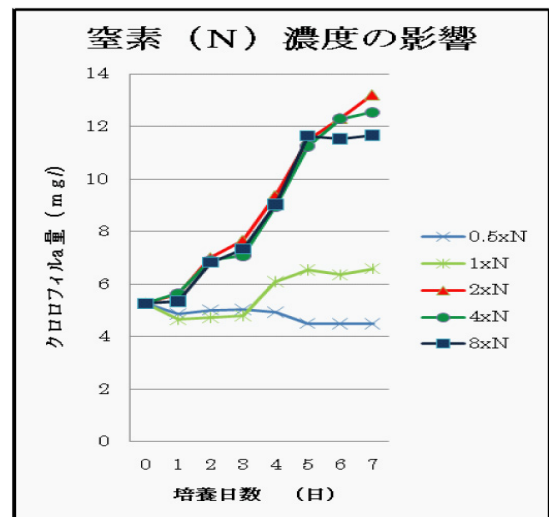
た。図 6 に示すように 1 個の細胞からでもターゲット遺伝子 rRNA 遺伝子が検出できた。

図 6



(1) 新規ボトリオコッカス株の育種: 今回の研究で育種に成功したボトリオコッカス株は、通称“榎本藻”と呼ばれている新品種のボトリオコッカスで、図 7 のように、DT≒2.6 日という高い増殖能力を示す株である。この株は、乾燥重量の 50%以上の重油生産能力をもつ。

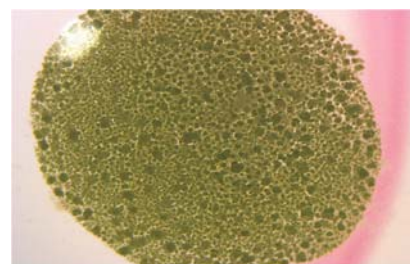
図 7



(5) 新規な高増殖性重油 (藻原油) 産生 *Botryococcus braunii* の分離とその増殖及び重油生産特性

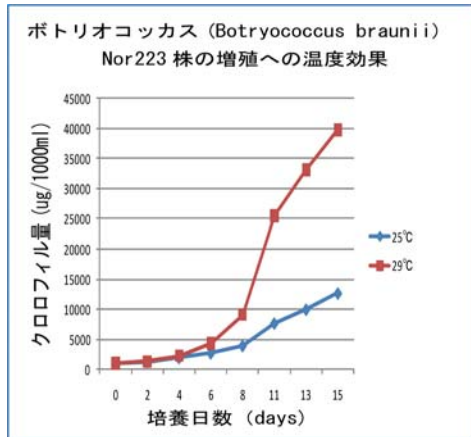
西日本各地の池・湖・ダム湖から藻類を採取し、Bb 用に開発した液体培地 (特許申請手続き中) で 7~30 日程度培養した後アガロース寒天培地上でさらに 1~2 週間培養し、いくつかの評価基準をもとに最も大きなコロニーを形成した Bb 塊コロニーを選び出し、藻原油生産を確認した後さらに寒天培養を約 7 カ月間継代しながら、高増殖性・高生産性の新規ボトリオコッカス株のクローニングを行った。

図 8



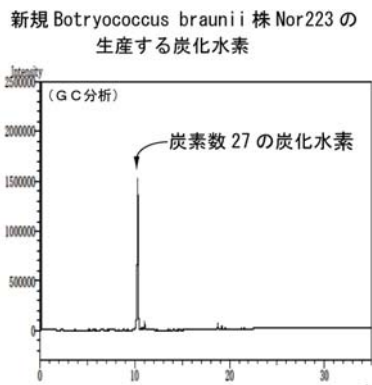
クローン化したボトリオコッカスの増殖への温度の影響を調べたところ、図9に示すように、従来言われている 25℃培養より明らかに高温である 29℃で最も高い増殖能力を示した。

図9



このボトリオコッカスを Nor223 と命名し、重油生産などの解析を行った。図10はこのボトリオコッカスの生産する炭化水素(Hydrocarbon, おもにA重油である)をガスクロマトグラフ(GC)で分析した結果である。

図10



炭素数約 27 と思われる炭化水素が主要な単一ピークとして観察された。このピークをさらに詳しく分析するために、GCMS 分析を行った結果を次に示す。

(5) GC 分析での主な炭化水素ピークの分析結果

表のピーク 17~26 は図10の単一ピークの相当する。したがって、図10の炭素数 27 と思われた炭化水素(重油)は、炭素数 30~34 からなる炭化水素と判明した。表に示すように、炭素数 C30~34 の炭化水素(重油)を大量に生産しており、良質なオイル=炭化水素(重油)の生産が期待できる。

マスクロマトグラム分析

主成分部分

ピーク No.	分子量	化学式	成分名
17	410	C30H50	二重結合を含み、
18	452	C33H56	メチル基などの
19	466	C34H58	アルキル基を6
19-2	452	C34H56	個以上もつ直鎖
20	466	C34H58	炭化水素
21	438	C32H54	
22	466	C34H58	
23	466	C34H58	
24	452	C33H56	
25	438	C32H54	
26	410	C30H50	スクワレン

(3) 新規に分離した Botryococcus braunii の野外培養

将来の野外での培養やプラント化のための野外での 200L 培養を試みた(図)

図3 新規 Bb 株の野外培養



この野外培養で、重要な幾つかの問題点が明らかになるなど、将来の野外大量培養に向けて、重要な知見が多く得られた、

以上、野生からのボトリオコッカスの単離に始まり、高増殖性・高重油生産性の株の確立まで、ほぼ3年で成し遂げることができた。

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2件)

①赤堀たか子、榎本 平、油が豊富で繁殖力に優れた藻の培養に成功、環境ビジネス、査読無、2012年5月号2012, 126-127

②榎本 平、藻類から重油が出来る！日本をオイル輸出国にする可能性を秘めた“榎本藻”、エコネーション、査読無、17巻、2011、11、

〔学会発表〕(計2件)

①榎本 ゆう子、吉沼春香、神谷麻梨、金安奨太郎、岡 翔太、池畑 太、飯田規之、榎本 平、新規 *Botryococcus braunii* Nor223 株の増殖とオイル(炭化水素)生産に対する無機イオン濃度と光照射の影響、第20回日本エネルギー学会講演要旨集、2011、p132-133、

②榎本 平、吉沼春香、神谷麻梨、金安奨太郎、岡 翔太、池畑 太、飯田規之、榎本 ゆう子、新規に分離した *Botryococcus braunii* の生産する炭化水素の分析、第20回日本エネルギー学会講演要旨集、2011、p134-135、

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 平 (ENOMOTO TAIRA)
神戸大学 人間発達環境学研究科・教授
研究者番号：00127622

(2) 研究分担者

なし