

1P-193 微細藻類への重イオンビーム照射による突然変異率の算出と凍結保存法による変異体の安定性評価

○山崎 誠和^{1,2}, 大田 修平^{1,2}, 佐藤 聖樹¹, 竹下 毅¹, 風間 祐介³, 阿部 知子^{3,4}, 河野 重行^{1,2}
(¹東大院・新領域, ²JST・CREST, ³理研・イノベ, ⁴理研・仁科)
yamazaki@ib.k.u-tokyo.ac.jp

重イオンビームは、非常に効果的にゲノム DNA の部分欠失を生じさせる変異原であり、これを利用した新しい植物などの育種法が近年開発されている。重イオンビームは、様々な生物の育種への応用も可能と考えられるが、単細胞性の微細藻類の育種に用いた例は殆どない。今回、窒素同化経路を使って微細藻類への重イオンビーム照射の影響評価系の構築を試みた。核種と線量の異なる重イオンビームを微細緑藻パラクロレラ (*Parachlorella kessleri*) に照射し、硝酸感受性株をスクリーニング、変異率の算出を行った。その結果、C イオン (25 Gray, 50 Gray) および Ar イオン (25 Gray, 50 Gray) ビームに対する硝酸感受性株の出現率が各々 0.055、0.166、0.179、0.178 であった。このことから微細藻類への重イオンビームの照射に対しては、変異率の上限があることが示唆される。パラクロレラのドラフトゲノムから硝酸還元酵素をコードする *NiR1* 遺伝子を相同性検索したところ、1 コピーのみ存在することがわかった。今後は、硝酸感受性株の中から *NiR1* に欠損株を同定、その欠失様式を比較する。さらに、凍結保存法によって長期保存した *NiR1* 欠損株と複数回継代培養したものの表現型および *NiR1* の欠失領域の安定性を調査する。

Mutation rates of the microalgae by the heavy ion beam irradiation and evaluation of stability of the mutants by cryopreservation

○Tomokazu Yamazaki^{1,2}, Shuhei Ota^{1,2}, Masaki Sato¹, Tuiyoshi Takeshita¹, Yusuke Kazama³, Tomoko Abe^{3,4}, Shigeyuki Kawano^{1,2}
(¹Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, ²CREST, JST, ³RIKEN, Innov. Ctr., ⁴RIKEN, Nishina)

Key words microalgae, mutation, heavy ion beam, cryopreservation

1P-195 培地塩濃度が *Botryococcus braunii* からの炭化水素回収に与える影響

○古橋 賢一, 佐賀 清崇, 岡田 茂, 海津 裕, 芋生 憲司
(東大院・農生科)
aimou@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

緑藻の一種である *Botryococcus braunii* は、乾燥藻体重量に対して高含有率で重油に近い炭化水素を生成する。また生成した炭化水素を細胞間マトリクスに放出し蓄積するために脂質変換及び回収のプロセスでコスト削減が期待されている。しかし炭化水素を蓄積している細胞間マトリクスが、炭化水素と抽出溶媒のヘキサンとの接触を阻んでいるため、抽出で 90% 以上の炭化水素回収率を得るには、加熱もしくは乾燥といった前処理工程が必要である。しかし、人工海水を 1/4 濃度 (全塩濃度 0.9%) に希釈した海水添加培地で培養を行うと、炭化水素回収が淡水培地と比較し容易となることが確認された。そこで本研究では海水を加えた培地での培養が、炭化水素回収率、増殖速度、藻体の物性に与える影響を調べた。

人工海水を全塩濃度 0.7%, 0.5%, 0.3% となるようそれぞれ希釈し、藻体増殖に必要であるが人工海水に含まれていない栄養塩類、微量金属に関しては改変 Chu13 培地と同濃度となるように添加した。藻体培養は各 21 日で植え継ぎを行い、計 63 日間培養した。炭化水素回収率は 0.7% 海水培地では 21 日以降、常に 90% 以上となり、0.5% 海水培地で培養した藻体においても 28 日以降 60% 以上となった。しかし改変 Chu13 培地、0.3% 海水培地においては培養期間中に 1% 以下の回収率であった。また増殖速度は海水塩濃度の上昇とともに低下した。一方で、海水を加えた 3 培地全てにおいて、コロニーサイズ的大幅な増大が確認された。このため光の透過性が向上し、高濃度または高深度での培養が可能となり、塩添加による増殖速度低下を補う可能性が示唆された。

Effects of salinity in media on the hydrocarbon recovery from *Botryococcus braunii*

○Kenichi Furuhashi, Kiyotaka Saga, Shigeru Okada, Yutaka Kaizu, Kenji Imou
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Botryococcus braunii*, microalgae, hydrocarbon

1P-194 微細藻類 *Botryococcus braunii* の細胞外マトリクスの変化が炭化水素生産・回収に与える影響

○跡部 季子, 長谷川 文生, 佐賀 清崇, 富士原 和宏, 岡田 茂, 芋生 憲司
(東大院・農生科)
atobe@bme.en.a.u-tokyo.ac.jp

【背景・目的】微細藻類 *Botryococcus braunii* (以下 *B. braunii*) は炭化水素含有量が高く、バイオ燃料資源の一つとして期待されている。本藻種の最大の特徴は、細胞同士が細胞外マトリクス (Extracellular matrix; 以下 ECM) によって繋ぎとめられたコロニーを形成し、生産される炭化水素の大部分を、細胞内ではなく ECM 部に蓄積させることである。ECM は、炭化水素関連化合物や粘質多糖類等が複雑に重合したバイオポリマーにより形成されていることから、ECM 構成成分は、照射光等の培養条件により変化し、蓄積している炭化水素の回収しやすさに影響を及ぼすと考えられる。本研究では、可視光線の短波長である紫色光 (ピーク波長が 405 nm の LED からの照射光) を点灯 / 消灯した異なる照射環境で *B. braunii* を培養し、*B. braunii* の ECM 構成成分の変化と炭化水素生産性や炭化水素回収効率との関係を明らかにすることを目的とした。

【結果】炭化水素の生産性は、紫色光を消灯した試験区の方が点灯した試験区に比べて向上した。また加熱前処理法を用いた炭化水素の溶媒回収は、低い加熱前処理温度から効率的に回収されることが明らかとなった。さらに、紫色光を消灯した試験区で ECM 構成成分である細胞外カカロテノイドの生産量が低下した。以上の結果から、ECM の構成成分の変化が炭化水素生産性や回収性の向上に影響している可能性が示唆された。

Effect of changes in extracellular matrix on hydrocarbon productivity and recovery from a microalga *Botryococcus braunii*

○Sueko Atobe, Fumio Hasegawa, Kiyotaka Saga, Kazuhiro Fujiwara, Shigeru Okada, Kenji Imou
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words microalgae, hydrocarbon, extracellular matrix

1P-196 Phototrophic cultivation of a marine microalga *Chlamydomonas orbicularis* for CO₂ fixation and biodiesel production: Effect of medium composition, nitrogen depletion, and sea salt concentration

○Shih-Hsin Ho¹, Akihito Nakanishi¹, Shimpei Aikawa², Jo-Shu Chang³, Akihiko Kondo², Tomohisa Hasunuma¹
(¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Fac. Eng., Kobe Univ., ³Dept. Chem. Eng. NCKU)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

Due to the sharp increase in global energy consumption, autotrophic growth of marine microalgae could become a feasible feedstock in both reducing CO₂ emissions and producing biodiesel. In this study, the medium composition, nitrogen depletion, and sea salt concentration were manipulated to improve CO₂ fixation and biodiesel production of *C. orbicularis*. It was found that a nitrogen-depletion condition was required for lipid accumulation, while a high sea salt concentration further enhanced lipid content but caused a decrease in cell growth. The best lipid productivity of 158.9 mg L⁻¹d⁻¹ was obtained when the sea salt concentration and nitrogen depletion time was 2% (w/v) and 3-day, respectively. This performance is superior to the results from the most of the related studies. In addition, under the nitrogen depletion condition, the microalgal lipid of *C. orbicularis* was mainly composed of C16/C18 fatty acids (accounting for around 90% of total fatty acids), which is suitable for biodiesel synthesis. Hence, this study demonstrated the potential of using *C. orbicularis* for CO₂ reduction and biodiesel production in practical applications.

Phototrophic cultivation of a marine microalga *Chlamydomonas orbicularis* for CO₂ fixation and biodiesel production: Effect of medium composition, nitrogen depletion, and sea salt concentration

○Shih-Hsin Ho¹, Akihito Nakanishi¹, Shimpei Aikawa², Jo-Shu Chang³, Akihiko Kondo², Tomohisa Hasunuma¹
(¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Fac. Eng., Kobe Univ., ³Dept. Chem. Eng. NCKU)

Key words CO₂ fixation, biodiesel production, marine microalgae, *Chlamydomonas orbicularis*