

論文審査の結果の要旨

氏名 竹下 毅

本論文は3章からなり、第1章では微細藻類の細胞内のデンプンとオイルを測定する簡便な方法について述べられている。デンプンは Lugol 染色により、オイルは NileRed 染色により染色され顕微鏡下でその局在を可視化することができるが、定量することは容易ではない。従来法では作業が煩雑で時間を要する問題があった。そこで細胞の染色法を応用したマイクロプレート法を開発した。ごく限られた測定範囲ではあるが、マイクロプレート法の結果は従来法と高い相関を示した。実施例では、デンプン量は従来法のアンスロン法とマイクロプレート法間で定量法間に有意差は認められなかった。一方オイル量は従来法の MTBE-MeOH-Water 法では全ての点でオイルが検出されたが、マイクロプレート法では NileRed 染色で検出可能な中性脂質が蓄積していない培養初期から中期にかけてはオイルが検出されなかった。以上のことから、本研究で開発したマイクロプレート法によるデンプン定量はすべての培養時期に対して有効であり、オイル定量はオイル期でのみ有効な方法であることを明らかにした。

第2章では強光通気培養条件下のクロレラ 6 種 8 株のデンプンとオイル蓄積について述べられている。クロレラのデンプンとオイル蓄積は窒素、リン、イオウなどの主要な栄養素の制限によって増加することが報告されている。しかし栄養制限による方法ではバイオマス生産性が低下し、実用化に有効な手段とは言えない。そこで、バイオマス生産性とオイル蓄積を両立する培養条件を検討した。クロレラ 6 種 8 株を用い、栄養制限のない培地 (TAP 培地) とイオウ欠乏培地 (dSTAP 培地) を試験した。バイオマス生産性を向上させるために強光培養系を開発し約 $600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の比較的強光な培養条件を達成した。用いたクロレラ 6 種 8 株は TAP 培地でよく増殖した。一方 dSTAP 培地では細胞増殖は大きく低下した。培養液あたりのデンプン量、オイル量は TAP 培地では先にデンプン量が最大となり、オイル量は 5 日間の培養では増加し続けた。dSTAP 培地では最大のデンプン量、オイル量は TAP 培地よりも低い値を示したが、より早い時期に最大を示すことがわかった。デンプンとオイルの蓄積動態について乾燥重量当たりの割合 (%DW) に直すと連続光 (LL) 条件で比較的明瞭にデンプンとオイルのトレードオフが *Parachlorella* の 4 株で見られた。また蓄積したオイルの脂肪酸組成について GC-MS の解析から、種や培養条件によって組成は異なり、dSTAP 培地では C20 以上の長鎖の脂肪酸の割合が増加することがわかった。最大のバイオマス生産性は *P. kessleri* NIES-2159 株を強光 LL 条件で培養した場合で、*Parachlorella* は物質生産に有望な種であることがわかった。

第3章では *P. kessleri* PK4 株の屋外培養のオイル生産増加と遺伝子変異について述べ

られている。強光培養が物質生産の生産性向上のために有効であることから、最も安価で強い光として太陽光の利用を検討した。太陽光は夏場には約 $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ にもなる。あわせて培養系もスケールアップし、150Lの屋外培養装置を使用した。また本研究では重イオンビーム育種法により得られた *P. kessleri* PK4株を実験に用いた。屋外での培養を念頭に、TAP培地に加えてSS培地を検討した。SS培地では炭素源及び窒素源として安価な尿素を含んでいる。屋内の培養では、SS培地ではTAP培地よりも吸光度とデンプン量は高いがオイルをほとんど蓄積しなかった。そこで培地全体を希釈する希釈培養法を試したところ希釈直後に急激にオイル蓄積が増大し、WTに比べてPK4株はより多くのより早くオイル蓄積を示すことがわかった。また培地全体を希釈する希釈培養法は操作が簡単なため、大量培養でも実施可能である。そこでPK4株を屋外で19日間培養し、7日目に培地の一部を捨て培地を水で希釈したところ、PK4株は最大66%DWの高いオイル蓄積を示した。これは以前の結果と比較して2倍以上高い値である。このPK4株の遺伝子変異部位についてリシーケンスにより変異箇所を特定した。2つの一塩基置換(SNPs)が特定され、1か所がアミノ酸のGlnが終止コドンに置き換わり、Endo-1,4-beta-mannanaseをコードする領域の変異であることがわかった。またもう1箇所はGlyがArgに置き換わり、ATP/ADP transpoterをコードする領域の変異であることがわかった。これらの変異がどのように表現型に影響しているかは不明だが、マンナーゼは細胞壁の成分で糖代謝の出発物質であることから、細胞壁の分解や糖に関連する代謝異常からオイル蓄積の増加につながる可能性などが考えられる。

なお、本論文第1章は武田行平、大田修平、山崎誠和、河野重行との共同研究、また本論文第2章は大田修平、山崎誠和、平田愛子、Vilem Zachleder、河野重行との共同研究、本論文第3章はIvan Ivanov、川元寛章、大田修平、山崎誠和、風間裕介、阿部知子、大島健志朗、服部正平、Katerina Bišova、Vilem Zachleder、河野重行との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。

以上 2,000 字