

群体性オイル生産藻 *Botryococcus braunii* の セルロース特異的蛍光色素によるプロトプラスト化に有効な酵素の検索

大濱研究室 1130251 中平未衣留

群体性オイル生産藻 *Botryococcus braunii* は炭化水素生産能力を持つ緑藻で、単細胞が相互に付着して直径 30~500 μm ほどの群体を形成し生育する。*Botryococcus braunii* は光合成により澱粉や糖ではなく、重油類似の炭化水素を蓄積し、その蓄積量は藻体乾燥重量の約 40%に達することが知られている。また、採掘された原油の一部には、この緑藻の生産する特徴的な炭化水素（ボトリオコッセン）が含まれるため、この緑藻が生産した炭化水素が原油の一部を占めていることが分かる。*Botryococcus braunii* が生産する炭化水素は、化石燃料に代わるエネルギー源となる可能性がある。しかし、その生育速度は遅く、*Botryococcus braunii* を実際に利用するには、培養条件の至適化による生育速度の向上と、遺伝子操作による炭化水素生産機能の向上、より炭素数の短い炭化水素を生産させることが必要である。そのためには遺伝子的手法の導入が必要であるが、その為には細胞壁のないプロトプラスト細胞が便利であるが細胞壁を除去する酵素は未だ確立されていない。

本研究では *Botryococcus braunii* を酵素処理を行い、細胞壁を取り除き、プロトプラスト化に有用な酵素をさがした。

実験方法

酵素バッファーとして 0.4M マントール 6m ℓ 、1.65M リン酸液 200 μl 、1 MD T T 50 μl 混合した液を用いた。60mg の酵素に対して 50 μl の酵素バッファーの比で加えた酵素液に、UTEX A-*r*ase 細胞を 5000 \times 5 分の遠心分離機で分離し細胞の上澄み液を捨て去り、300 μl の CHU10 バッファーを加えて再懸濁して濃縮細胞液を調整した。それを 25 $^{\circ}\text{C}$ に調節した保温機にいれ、1 時間酵素処理させるため放置した。酵素処理した細胞液 100 μl に対して冷凍保管した brithner 染色液を解凍し、3 μl を加え染色し蛍光顕微鏡で観察した。酵素処理していない細胞も brithner 染色液で染色し蛍光顕微鏡で観察し、比較した。