

戦略的創造研究推進事業(ALCA)
技術領域(プロジェクト名)「生物資源の制御による
バイオマス・有用成分の増産」

課題名「珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネ
ルギー革命」

終了報告書

研究開発期間 平成23年10月～平成31年 3月

研究開発代表者: 菓子野 康浩
(公立大学法人兵庫県立大学大学院
生命理学研究科、准教授)

○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者： 兵庫県立大学 准教授・菓子野 康浩

研究開発課題名： 珪藻のフィジオロミクスに基づく褐色のエネルギー革命

1.研究開発の目的

微細藻の中でも珪藻に着目し、生産性を向上させる、あるいは、本来産生しない有用物質を産生させるための遺伝子組換え技術開発から、大量培養、有用物質の製品化までのプロセスを一貫して開発し、微細藻の光合成でCO₂を有用物質に変換するシステム作りを目指す。

2.研究開発の概要

(1)内容： 兵庫県立大Gと京大伊福Gが、本研究開発の基幹情報となるツノケイソウのゲノム解析、および遺伝子改変の標的探索のために光合成に関わる生理生化学的解析を進めた。そして、京大伊福Gが形質転換技術の開発に取り組んだ。この技術と京大福澤Gが進めていた微細藻類によるリシノール酸生合成付与の取り組みを融合させた。京大福澤Gはさらに、珪藻のCO₂濃縮機能(CCM)を遺伝子改変により強化するために、珪藻のCCMの探索と機能解析を行った。パナックGは、野生株珪藻が産生する有用物質の利用法の開拓を進めた。組換え藻類の社会実装に向けて、兵庫県立大G、玉川大G、京大伊福Gとで大量培養の仕組みの開拓にも取り組んだ。

(2)成果： 独自に構築したツノケイソウのゲノムデータベースが、独特の光捕集系を結合した珪藻の二つの光化学系の構造解明に繋がり、*Nature*姉妹紙2誌に掲載された。また、ゲノムデータベースは、ツノケイソウのCCMの機能解明の進展に貢献した。形質転換技術開発のため、藻類では初めての多重パルスエレクトロポレーション法を採用して、効率の高い藻類のための形質転換技術確立して国内および米国特許を取得した。そして、ツノケイソウの高発現遺伝子を特定し、その遺伝子発現を制御するプロモータ部位のDNA配列を利用することにより、ツノケイソウのための高効率形質転換技術確立することができた。これは、大量培養が可能な実用藻類では国際的にも初めての実用的な形質転換技術となり、特許を取得した。この形質転換技術と麦角菌由来のリシノール酸合成酵素遺伝子により、ツノケイソウにリシノール酸生合成能を付与させ、さらに、二重形質転換技術を開発して別の遺伝子を追加で組み込んで、リシノール酸の産生量を向上させることに成功した。その他にも特許出願したイソプレネン合成株を作出した。これらは、我々が開発した形質転換技術が、珪藻の光合成を利用してCO₂を有用物質に変換するプラットフォームとして機能することを実証するものである。

ツノケイソウは、野生株のままでもCO₂を各種の有用物質に変換することができるので、その利用方法の開拓を進め、化粧品原料として供給可能な認証を得て、実際に珪藻から抽出したフコキサンチン含有した化粧品が市販に至った。一方、微細藻類の大量培養技術が充分ではないことから、微細藻類の増殖特性を理解した上で培養環境を管理することにより、約5トンの未滅菌の汚水を培地として、濁度約1という高密度培養を自然光下で実現することに成功した。そして、大量培養後に高コストの細胞回収操作をせずにフコキサンチンの70%以上を2%以下の体積中に濃縮可能となるマイクロバブル処理の技術を開発し、特許出願を行った。

(3)今後の展開： 高付加価値物質産生能付与株を用いて、密閉系での培養により、二酸化炭素を有用物質に変換する。そして、「製品評価技術基盤機構(NITE)」によるカルタヘナ法第一種使用等における生物多様性影響評価手法の検討に協力するとともに、生物学的封じ込め株作出により、低コスト培養による低炭素化技術として利用可能な状態にすることができる。並行して野生株を用いて野外での粗放的大量培養の高密度安定培養系を確立し、CO₂を有用物質に変換するプラットフォーム化する基盤とする。現状では、野生株での燃料化はコスト的に困難なので、栽培漁業の餌料として活用することにより、CO₂排出抑制に寄与することが出来る。そして、これらの本格的な社会実装により、約3,000tCO₂/ha/年の削減効果が期待される。

○Report summary (English)

Principal investigator: University of Hyogo, Associate Professor, Yasuhiro Kashino
R & D title: Generation of Diatom Factory through Physiologomics toward a Novel Energy Source

1. Purpose of R & D

Diatoms possess infinite potential as a biofactory to convert CO₂ into valuable materials such as lipid and fucoxanthin using energy derived from solar light. In this research project, we will bring out their potential by 1) developing a powerful molecular-biology tool specifically for diatom, 2) manipulating light harvesting system of shade-adapted diatoms to ensure rapid growth under ambient light at the surface of earth, and 3) clarifying and manipulating the metabolic pathway of lipid to drastically increase lipid productivity. The generated diatom strain will become a useful platform to produce biofuel as well as other valuable materials by consuming vast atmospheric CO₂ using solar energy.

2. Outline of R & D

(1) Contents: A marine diatom, *Chaetoceros gracilis* was chosen for the key species of our project. Genome analysis of *C. gracilis* was performed to build a genome database as a core information center. Based on genome information, development of transformation method for *C. gracilis*, functional analysis of carbon concentration mechanisms, biochemical and physiological analysis of photosynthesis were performed. Using newly developed transformation method, several transformants were manipulated to convert CO₂ into valuable materials such as ricinoleic acid or isoprenoid. Looking ahead to the establishment of transformants, large scale cultivation system was developed toward the stable and high-density growth of diatom.

(2) Achievements: Our newly established genome database of *C. gracilis* contributed the analysis of photosystems I and II associating light-harvesting pigment protein complex unique to diatom to be published in *Nature Plants* and *Nature Communications*. Based on the genome information and gene expression analyses, 10 promoters of highly-expressing genes were found and they were used to develop transformation vectors for *C. gracilis*. In combination with our newly developed multi-pulse electroporation method, highly efficient transformation method was established to obtain two independent patents. Applying the transformation method, transformants to produce ricinoleic acid or isoprenoid was obtained showing that our method is truly useful platform to obtain transformants for the conversion of CO₂ into valuable materials using solar light energy. Further, we have established gene editing method and trying to obtain biological containment strain.

In addition to the molecular-engineering progress, using wild-type diatom, usage of high-value materials was developed. Extract from the same genus diatom, *C. calcitrans* containing fucoxanthin obtained a name of Chaetoceros Calcitrans Extract from an American cosmetics organization and it is now contained in 9 products on store from 8 companies. Large scale cultivation of *C. gracilis* using non-sterilized sewage-water achieved high density of cells reaching OD ~0.9 under the solar light. A unique low-cost extraction/concentration method for high-value materials was also developed using micro-bubble treatment to achieve the yield of ~70% for fucoxanthin into ~2% of original volume.

(3) Future developments: Transformants that are able to convert CO₂ into valuable materials will be cultivated in a large scale to contribute the decrease the atmospheric CO₂ concentration although it will be performed at the early stage in physically closed photobioreactors. In the future, the transformed diatom as well as wild-type diatom will contribute the reduction of atmospheric CO₂ of ~3,000tCO₂/ha/year.