

戦略的創造研究推進事業(ALCA)
技術領域(プロジェクト名)「革新的な細胞制御法や
育種法による高効率バイオ生産の技術開発」
課題名「亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを
可能とする微細藻類の培養技術開発」

終了報告書

研究開発期間 平成28年11月～令和5年3月

研究開発代表者: 廣田 隆一
(広島大学大学院統合生命科学研究
科、准教授)

○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者：広島大学 准教授 廣田 隆一

研究開発課題名：亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発

1.研究開発の目的

微細藻類は CO₂ を直接有用物質に変換できるため、循環型社会形成に資する次世代型物質生産システムとして期待されている。しかし、実際の利用が想定される屋外での培養では、環境条件の違いやコンタミネーションなどによって実験室で発揮されていた生産性が十分に発揮されず、実用化に至らないケースがほとんどである。遺伝子組換え技術は、有用物質の生産量や宿主のロバスト性を飛躍的に高めることが可能であり、これらの課題を克服しうる有効な手段として期待される。しかし、国際的枠組みであるカルタヘナ議定書に基づいた法律により遺伝子組換え微生物の屋外利用の承認を得ることは極めて困難である。申請者らは、目的微生物の生育を亜リン酸というリン化合物に依存させる技術を開発した。亜リン酸は環境中ではほとんど検出されないため、この技術を微細藻類に適応することができれば、生物多様性に配慮した組換え微細藻類の利用を実現できる可能性がある。これにより屋外培養における目的株の高純度培養が容易になるだけでなく、微細藻類の培養に必要なコスト・エネルギーの削減、物質生産性の向上と安定化を実現し、低炭素社会の実現に貢献できると期待される。本研究開発の革新技術領域においては、淡水性藍藻をモデルとした亜リン酸依存性による封じ込めの適用、実用技術化プロジェクトにおいては、社会実装をイメージした株としてバイオポリマーを作製する海洋性藍藻を作製し、当該株へ亜リン酸依存性による封じ込めを適用することを目的とした。

2.研究開発の概要

(1)内容:革新技術領域では、原核性微細藻類の淡水性藍藻を対象に亜リン酸依存性による封じ込めの原理実証を試みた。また、本手法の適用宿主域を拡大するため、各種要素技術の適合性拡大を行うとともに、真核微細藻類への将来的な展開も視野に入れて、複数の真核微細藻類においても封じ込めの要素適用検討を実施した。一方で、実用化を視野に入れてパイロットスケール培養による性能評価を行い、実用スケール培養における課題を抽出し、その対応を行った。実用技術化プロジェクトにおいては、実用株への適用を目的とし、バイオポリマー生産海洋性藍藻を作出し、当該株へ亜リン酸依存性による封じ込めを適用する研究を実施した。

(2)成果:淡水性藍藻において亜リン酸依存性による封じ込めを適用することに成功した。また、亜リン酸資化能の付与は原核性藻類から真核性微細藻類まで幅広く適用することに成功し、リン酸輸送体の同定など、基盤的な要素技術や方法論を確立することができた。また、微細藻の捕食被害など、当初想定していなかった課題に対しても、派生テーマとして研究を実施し、解決策を見出すことができた。実用株作製においては、バイオポリマー生産と封じ込めを両立する株の作製には至らなかったが、それぞれを達成するための要素技術を確立することができた。

(3)今後の展開:亜リン酸依存性による生物学的封じ込めについては、各種微生物への適合性拡大を図るとともに、バイオセーフティ技術としての有効性を示し、カルタヘナ第一種使用に向けた開発を継続して実施する。バイオポリマー生産株の作製については、プロトタイプ株の作製を完成し、実用化に対応可能なレベルの生産量の増大をめざす。

○Report summary (English)

Principal investigator: Hiroshima University Associate Professor Ryuichi Hirota
R & D title: Development of Robust and Biologically Contained Culturing Technology for Microalgae Using Phosphite

1. Purpose of R&D

Because microalgae can directly convert CO₂ into valuable substances, they are expected to be used in bioproduction systems that can contribute to the formation of a recycling-oriented sustainable society. However, due to perturbations in environmental conditions and contamination by other microbes, it is difficult to realize the full potential of microalgal strains demonstrated under laboratory conditions in outdoor cultivation. Genetic engineering can drastically increase the production level of useful substances and the robustness of the host, and is expected to be an effective means of overcoming these problems. However, it is extremely difficult to obtain approval for the outdoor use of genetically modified microorganisms under legislation based on the Cartagena Protocol, an international framework. We developed a technology that makes the growth of host microorganisms dependent on phosphite, a rarely available phosphorus compound in the environment. By applying this system to genetically engineered microalgae, they can be used for outdoor cultivation in a biodiversity-conscious manner, to achieve high-purity cultivation of target strains and reduce the cost and energy required for cultivation, which should contribute to the realization of a low-carbon society. In the “innovative technological phase” of this project, a phosphite-dependent biocontainment strategy was applied to a freshwater cyanobacterial strain. In the “practical application phase”, we developed a marine cyanobacterial strain that produces biopolymers to which phosphite-dependent biocontainment is applied.

2. Outline of R&D

(1) Contents:

In the innovative technology phase, we demonstrated the principle of phosphite-dependent biocontainment in the freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. In addition, various elemental technologies were developed to expand the host range of this method to include eukaryotic microalgae. For the practical application of the biocontainment system, we evaluated the performance of the biocontained cyanobacterial strain using a pilot-scale photobioreactor and identified several practical issues to be resolved. In the practical application phase, we produced the biopolymer-producing marine cyanobacterium, *Synechococcus*, and applied a phosphite-dependent biocontainment strategy.

(2) Achievements:

We successfully applied phosphite-dependent biocontainment to *S. elongatus*. In addition, we have successfully introduced the phosphite oxidation pathway into various microalgal species, from prokaryotic to eukaryotic microalgae, and established fundamental technologies and methodologies, such as the identification of endogenous phosphate transporters. In addition, contamination management was conducted on at a practical culture scale, although this was not originally planned as part of the project. To create a strain for practical applications, we established several requirements to achieve biopolymer production and biocontainment, although both could not be integrated.

(3) Future developments:

We will expand the range of host microbes for the application of the phosphite-dependent biocontainment strategy and evaluate its effectiveness as a biosafety measure under Cartagena Type I Regulations. To construct a biopolymer-producing strain, we will introduce a complete metabolic pathway for biopolymer production resulting in a production level that is acceptable for practical use.