

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：超効率バイオ燃料の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

「バイオプロダクトを高効率に生産する細胞のスクリーニング法の開発」

研究開発機関名：

国立大学法人九州大学

研究開発責任者

星野 友

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本研究機関は、研究開発責任者である星野 友のもと、プロジェクト 8 与那嶺チームの「バイオプロダクトを高効率に生産する細胞のスクリーニング法の開発」を担当する。

バイオ燃料を生産するミドリムシ、ユーグレナを重水含有培地で培養し、高速ラマンイメージング法を用いて、高い光合成活性を持ち、高効率に脂質を貯蔵する細胞の選抜手法を確立する。さらに、上記の手法を各藻類・細菌・動物細胞に適用する事で、高効率生産株を獲得する方法論を一般化する。特に、医薬品や診断試薬として使用される抗体タンパク質を、高効率に生産する動物細胞をモデルケースとして検討する。また、ImPACT で得られる研究成果の応用先の中の 1 つとして高効率に CO₂ を固定化する藻類を宇宙閉鎖空間での物質循環サイクルに活用することを目指し、国際宇宙ステーションの日本実験棟『きぼう』での藻類培養の準備をする。具体的な計画は、以下である。

A. 藻類代謝の経時追跡法の開発

重水中で培養したユーグレナおよびクラミドモナスのラマン観察を行う。具体的には、ユーグレナを用いた重水素取り込み実験を準備的に行い、培地中の重水含有量をどこまで増やす事が可能であるか確かめる。また、どの程度の割合の重水培地で、どの位の時間で培養すれば、ラマン分光法で検出可能な量の重水素を取り込ませる事ができるかを、顕微レーザーラマン分光装置を用いて調査する。また、プロジェクト 8 の山野チームおよび蓮沼チームで用いる藻類、クラミドモナスに関しても同様の検討を行う。

B. 高効率タンパク質生産細胞の検出法開発

CHO 細胞の増殖に対する重水の影響観察を行う。プロジェクト 8、渡会チームと協力し、A. と同様に、重水培地で培養した場合の、CHO 細胞の増殖に対する影響を観察する。また、CHO 細胞は細胞外に抗体を分泌するため、培養液上清から抗体タンパク質を回収し、重水素化が行われているかを、ラマン分光法、NMR、IR を用いて定量する。重水のみからでは重水素標識が難しい場合は、D 化グルコースの使用も考慮する。

C. 宇宙空間で用いる藻類培養装置の開発

ImPACT で得られる研究成果の応用先の中の 1 つとして、国際宇宙ステーション内で実験を行うことを目指し、培養装置のプロトタイプを作製し、地上にて藻類の培養が可能であることを示す。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

A. 藻類代謝の経時追跡法の開発

ユーグレナを用いた重水素取り込み実験は、準備的実験であるラマン分光法での重水素検出が順調に進んだ。詳細を検討した結果、最適な培地中の重水含有量や、培養時間の条件を見出すことができた。当初の予定よりも順調に進んだため、前倒しで、二酸化炭素の安定同位体についても検討を進めることとした。クラミドモナスに関する検討はまだ行っていないが、上記手法がそのまま適用可能であると考えられる。

B. 高効率タンパク質生産細胞の検出法開発

重水培地で培養した際の、CHO 細胞増殖に対する影響を検討した。また、CHO 細胞のタンパク質が重水素化されているかを定量した。重水のみからでは重水素標識が難しいことが分かったため、重水素化グルコースの使用も行った。

C. 宇宙空間で用いる藻類培養装置の開発

培養装置のプロトタイプ（1号機）を作製し（光・二酸化炭素の供給機構、攪拌機能、濁度測定機構を搭載している）、実際に藻類（スピルリナ、クラミドモナス）を、通常培地にて培養することができた。

2-2 成果

A. 藻類代謝の経時追跡法の開発

これまでに、光合成を行う緑藻類であるユーグレナをモデルとして用い、重水存在下での増殖に対する影響、および重水素取込み量の定量を検討した。その結果、培地中の重水含有量を 20 vol%まで増やしても、増殖に影響を与えずに、ラマン分光法で検出可能な量の重水素を光合成代謝によって取り込ませる事ができた。また、100%の $^{13}\text{CO}_2$ 二酸化炭素を用いてユーグレナを培養し、プロジェクト3鈴木チームの SRS 装置によるラマンイメージングを行った結果、パラミロンへの ^{13}C 局在化を画像化できた。

B. 高効率タンパク質生産細胞の検出法開発

これまでに、CHO 細胞の分泌するタンパク質の生産量を見積もる方法として、重水素を用いた標識を検討した。具体的には、PJ8 渡会チームと連携し、重水比率 50 vol%の培地中、重水素化グルコースを基質に用いて CHO 細胞を培養した。その結果、僅かではあるが（C-D 比率：4%）分泌タンパク質が重水素化されたことがラマン測定から確かめられた。

C. 宇宙空間で用いる藻類培養装置の開発

フライト移行審査に向けて、当該年度末に JAXA による進捗報告会が行われた。総評として、進捗状況は適切であり、引き続き実現可能性の検討をしてよい、とのコメントを得た。

2-3 新たな課題など

A. 藻類代謝の経時追跡法の開発

培地中の重水含有量は、20 vol%まで増やしても増殖に影響を与えずに、ラマン分光法で検出可能であったが、それ以上の濃度になると細胞増殖に遅れが見られ、細胞毒性を示すことが示唆された。今後は、細胞毒性を示しにくい、安定同位体の二酸化炭素を用いたラベリングを検討してゆく。

B. 高効率タンパク質生産細胞の検出法開発

重水と重水素化グルコースを用いた場合、タンパク質の重水素化効率が低いことが分かった（C-D 比率：4%）。この原因として、重水素化グルコースが同化ではなく、呼吸の代謝に消費され、二酸化炭素・重水へと分解された可能性が考えられる。今後は、より直接的にタンパク質に代謝される、重水素化アミノ酸の使用を検討する。

C. 宇宙空間で用いる藻類培養装置の開発

フライト移行審査に向けて、より詳細に実現可能な計画の作成するよう指摘を受けた。また、藻類の培養中に生成する酸素が、培養器内に蓄積する現象が見られたため、脱気機構の付与が必要であり、今後検討する。

3. アウトリーチ活動報告

ImPACT 情報発信会 グリーンイノベーションに関するトピック紹介
「ミドリムシを用いた火星等での長期滞在に向けた物質循環技術の開発」
平成 28 年 8 月 30 日