

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
研究課題「高バイオマス生産に向けた
高温・酸性耐性藻類の創出」

研究終了報告書
[1 年追加支援期間分]

研究期間 平成29年4月～平成30年3月

研究代表者：宮城島 進也
(情報・システム研究機構
国立遺伝学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

野外環境で単独培養を行うための藻類株選定は、培養実施環境に類似した場所から単離された藻類株のうち、環境変動に比較的高い耐性を持つことを条件に行われる。しかしながら、もっとも多くの株が単離され、整備されてきた、中性・中温環境には、多種多様な藻類、非光合成生物が混在して生息している。従って、これらの藻類株を用いて野外培養を試みても、他の生物が混入し増殖するため、優占的に培養させることは困難である。

このような理由から、これまでの藻類における野外大量培養の成功例は、高塩濃度耐性を有する種(緑藻ドナリエラ等)、高 pH を好む種(藍藻スピルリナ等)などに限られてきた。しかしながら、これらを含む多くの藻類は強固な細胞壁を有するため、内容物抽出のための細胞破碎に比較的高いコストがかかる。また現在のところ形質転換等が行えない。一方で、数種の真核藻類において形質転換系が開発されてきたが、導入遺伝子がサイレンシングを受けることにより遺伝子産物を高発現できないなどの問題が起きている。

一方で我々は、高温酸性(30-60°C、pH 0.5-5.0)において唯一優占増殖する真核生物、単細胞紅藻シアニジウム類を用いた基礎研究を世界に先駆けて進めてきた。シアニジウム類は、他の生物が容易には成育できない酸性環境で比較的速く、高密度まで増殖するため、屋外培養に適していると考えられる。我々は、シアニジウム類の一種であるシゾンのゲノムを真核藻類として初めて100%解読した。さらに本CREST研究により、シゾンのセルフクローニングを含めた遺伝的改変法を開発した。本系においては、導入遺伝子が安定的に発現することも明らかとなった。また、シゾンが非常に高濃度の抗酸化ビタミン類及び、骨粗鬆症予防・治療に効果のあるビタミン K を含むことも明らかとなった(特願 2017-228396)。従って、今後シゾンを高機能サプリメント等として利用できる可能性が高まった。

以上のシゾンの性質と開発結果を踏まえ、1 年追加支援期間では、シゾンの高機能飼料、サプリメントとしての利用価値を高めるために、セルフクローニングによる GABA 及びビタミン E 合成能強化株の作成を行った(特願 2017-228396)。さらに、シゾンの防疫飼料としての利用法の開発を目指し、細胞内容物をシゾン細胞内に保持させた状態でマウス飼料と混合しマウスが摂食する飼料の作成を行った。

また今後の名古屋議定書 ABS 対応のため、本研究の過程で発見した日本産のシゾン様藻類における遺伝的改変法を確立した(特願 2017-228394)。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 本研究により、前年度世界で初めて発見した日本産シゾン様藻類(細胞壁無し、二分裂により増殖)が、日本産シアニジウムの一種(強固な細胞壁有り、4つの内生孢子形成により増殖)が減数分裂することによって生じることを発見した。さらに二倍体より一倍体を生じさせ、一倍体のみを安定的に増殖させる方法、一倍体の掛け合わせのより二倍体を生じさせる方法も開発した(特願 2017-228394)。本藻類を用いることで、掛け合わせ等による藻類育種、遺伝的改変の効率化、順遺伝学による遺伝学的解析が可能であり、真核藻類として最も有用なモデル生物として利用可能なことが示された。
2. 主に本 CREST 研究によって開発されたシゾンの各種遺伝的改変法、代謝改変法、これらの他の真核藻類に比べた有用性などを含め、シゾンの基本的な扱い方、観察法などシゾンの研究法と研究例を取りまとめた世界初のシゾンの教科書(全12 章)を執筆した。2018 年に Springer 社により出版された。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. シゾンがすでに商品化されている種々の微細藻類に比べて極めて高濃度の抗酸化ビタミン類、骨粗鬆症の予防・治療に用いられるビタミン K を含むため、サプリメント等としての利用が有望となった。しかしながら内容物を細胞内に閉じ込めたまま細胞を乾燥させることが難しい

のが現状である。本年度の研究により、シゾン細胞を乾燥させずに固化することに成功し、既存の配合飼料と混合することでマウスに摂食させることに成功した。本方法を用いることでシゾンを用いたサプリメント、機能性飼料の開発に繋がると考えられる。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 育種技術グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
宮城島 進也	国立遺伝学研究所細胞 遺伝研究系	教授	H23.10～
廣岡 俊亮	同上	特任研究員	H24.4～
藤原 崇之	同上	助教	H25.4～
大林 龍胆	同上	遺伝研博士研究	H28.4～

研究項目

- ・セルフクローニングによるシズン GABA 及びビタミン E の増量
- ・シズンの導入遺伝子大量発現系の構築
- ・シズンの細胞内容物封入法の開発
- ・シズンの飼料・食品としての各種安全性試験(第三者機関による)

② 動物実験グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
大松 勉	東京農工大学農学部附 属国際家畜感染症防疫 研究教育センター	講師	H29.2～
大村 美紀	同上	技能補佐員	H29.2～

研究項目

- ・シズン摂取後のマウス消化管におけるシズンの動態解析
- ・シズン含有餌(細胞内容物封入処理済み)に対するマウスの摂食行動調査
- ・シズン含有餌摂取後(細胞内容物封入処理済み)のマウス消化管におけるシズンの動態解析

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 セルフクローニングによるシズンビタミン類の増量 (育種技術グループ・宮城島)

(1) 研究実施内容及び成果

本実施項目の目的と位置づけ

昨年度までの研究により、シズンのセルフクローニングを含めた遺伝的改変法が開発された。本系においては、導入遺伝子が安定的に発現することも明らかとなった。またシズンが非常に高濃度の抗酸化ビタミン類及び、骨粗鬆症予防・治療に効果のあるビタミン K を含むことも明らかとなった。シズンの機能性飼料、サプリメントとしての利用価値を高めるために、今年度は、セルフクローニングにより GABA 及びビタミン E 含量の増加を目指した。

実施内容

a) セルフクローニングによるシズン GABA 及びビタミン E の増量

得られた成果

a) セルフクローニングによるシズン GABA 及びビタミン E の増量

GABA の増量を目的として、グルタミン酸デカルボキシラーゼの過剰発現株、ビタミン E の増量を目的として、ホモゲンチジン酸フィチルトランスフェラーゼ及びトコトリエノールサイクラー

ぜの過剰発現株をセルフクローニングにより作成し、それぞれの株により目的の酵素(群)が過剰発現されていることも確認された。さらに、それぞれの株でビタミンの含有量が増加していることも確認された(特願 2017-228396)。

3. 2 シゾンの機能性飼料としての利用(育種技術グループ・宮城島)(動物実験グループ・大松)

(1)研究実施内容及び成果

本実施項目の目的と位置づけ

昨年度までの研究により、単細胞紅藻シゾンへの遺伝子導入系が開発され、さらに導入遺伝子が安定的に発現することも明らかとなった。またシゾン細胞が高濃度のビタミン類を含有することから機能性飼料、サプリメントとしての利用が期待される。ほとんどの微細藻類は強固な細胞壁を有するため、そのまま動物に摂食させても細胞内容物が消化管内で放出されない。そのため、飼料または機能性食品として利用する場合は、細胞壁の破碎処理等が必要となっている。一方でシゾンは細胞壁を有さないため、細胞を無処理で摂食させた場合においても、その細胞内容物が消化管内で放出され消化管内で吸収されることが期待される。そこで、(a) マウスが摂食するシゾン含有飼料の開発を作成し、(b) シゾン細胞の消化管内における挙動を調査した。(c) さらにシゾンの飼料・食品としての各種安全性の調査も進めた。

実施内容

- a) シゾン含有飼料の開発(育種技術グループ、動物実験グループ)
- b) シゾン細胞のマウス消化管内における挙動の調査(動物実験グループ)
- c) シゾンの飼料・食品としての各種安全性試験(育種技術グループ)

得られた成果

- a) シゾン含有飼料の開発(育種技術グループ、動物実験グループ)
シゾン細胞とマウス用飼料を混合し固化させる事に成功し、本飼料をマウスが摂食することも確認出来た。
- b) シゾン細胞のマウス消化管内における挙動の調査(動物実験グループ)
(a)で作成した飼料をマウスに摂食させ、マウス消化管内におけるシゾンの挙動を追跡した。その結果、予想通り、ほぼ全ての細胞内容物が消化管内において細胞から放出されることが確認された。
- c) シゾンの飼料・食品としての各種安全性試験(育種技術グループ)
シゾンを大量培養し、現在第三者機関による安全性試験を進めた。急性毒性試験、umuテスト(変異原性試験)、Amesテスト(復帰突然変異試験)、Rec-assay(致死感受性試験)、アレルギー試験、ミクロシチン確認試験においてシゾンの安全性が示された。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表(国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 1 件)

1. Hirooka, S., Hirose, Y., Kanasaki, Y., Higuchi, S., Fujiwara, T., Onuma, R., Era, A., Ohbayashi, R., Uzuka, A., Nozaki, H., Yoshikawa, H., and Miyagishima, S. (2017) Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 114, E8304-E8313.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Kuroiwa, T., Matsunaga, S., Miyagishima, S. eds. (2017) Cyanidioschyzon merolae: A new model eukaryote for cell and organelle biology. Springer, in press

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演(国内会議 2 件)

1. 宮城島 進也、宿主真核細胞と細胞内共生オルガネラの協調増殖機構、日本進化学会、京都市、2017 年 8 月 24 日

2. 宮城島 進也、高温・酸性耐性紅藻シゾンの遺伝的改変法の開発とその産業利用に向けた試み、第40回バイオマスイノベーション研究会、大阪府、2017年6月30日

② 口頭発表 (国内会議3件)

1. 宮城島進也(遺伝研)、恵良厚子(遺伝研)、廣岡俊亮(遺伝研)、藤原崇之(遺伝研)、真核藻類における細胞周期進行とエネルギー変換の時間分業、日本植物学会、野田市、2017年9月8日
2. 藤原崇之(遺伝研)、廣岡俊亮(遺伝研)、大林龍胆(遺伝研)、宮城島進也(遺伝研)、真核藻類の日リズムと細胞周期進行における遺伝子発現変動の網羅的解析、日本植物学会、野田市、2017年9月8日
3. 廣岡俊亮(遺伝研)、広瀬侑(豊橋技科大)、兼崎友(東農大)、樋口澄男(野尻湖水草復元研)、藤原崇之(遺伝研)、大沼亮(遺伝研)、恵良厚子(遺伝研)、大林龍胆(遺伝研)、宇塚明洋(遺伝研)、野崎久義(東京大)、吉川博文(東農大)、宮城島進也(遺伝研)、比較ゲノム解析による好酸性緑藻の酸性環境への適応機構の解明、日本植物学会、野田市、2017年9月8日

(4)知財出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称:「新規微細藻類、及びその使用」
発明者:宮城島 進也、廣岡 俊亮
出願人:国立研究開発法人科学技術振興機構
出願日:2017.11.28
出願番号:特願 2017-228394
2. 発明の名称:「栄養成分組成物、及び栄養成分の製造方法」
発明者:宮城島 進也、廣岡 俊亮
出願人:国立研究開発法人科学技術振興機構
出願日:2017.11.28
出願番号:特願 2017-228396

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 日本植物形態学会平瀬賞(以下のCREST成果論文に対する論文賞)、2017年9月7日、Sumiya, N., Fujiwara, T., Era, A. and Miyagishima, S. (2016) Chloroplast division checkpoint in eukaryotic algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E7629-E7638

②マスコミ(新聞・TV等)報道

遺伝学研究所プレスリリース(2017年9月12日予定)、藻類の酸性環境への適応戦略-強酸性環境に生息する藻類のゲノム情報を解読-、以下の論文内容についてのプレスリリース、Hirooka, S., Hirose, Y., Kanasaki, Y., Higuchi, S., Fujiwara, T., Onuma, R., Era, A., Ohbayashi, R., Uzuka, A., Nozaki, H., Yoshikawa, H., and Miyagishima, S. (2017) Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, in press

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

主にCREST研究によって開発されたシゾンの各種遺伝的改変法、代謝改変などを含め、シゾンの基本的な扱い方、観察法などシゾンの研究法と研究例を取りまとめた世界初のシゾンの教科書(全12章)を取りまとめた。本教科書は2018年初めにSpringer社から出版された。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2017年4月8日	国立遺伝学研究所一般公開(研究室担当分)	国立遺伝学研究所	500名	一般公開において藻類の研究法および利用法について紹介

§ 6 最後に

単細胞紅藻シズン¹⁾の遺伝子改変技術の開発について、開始当初の想定よりも大幅に研究が進み、少なくとも基礎研究のためには、今や最も扱いやすい真核藻類研究系となった。現在、海外を含め多数の研究者から問い合わせが相次いでいるところである。チーム型研究のおかげで、複数の研究室から様々な技術開発アイデアが生まれたことがその要因として大きかったと感じている。また、研究総括、技術参事、アドバイザーの先生方の助言により、今後のシアニジウム類の有用飼料、サプリメント等としての利用の道も見え始めた。特に、研究を一年追加支援課題としてご支援頂けたのは、大変ありがたく、追加期間中に、遺伝研知財室、JST 知財部門、CREST 領域関係の方々の連携協力により知財戦略の方針も見えてきた。本研究の成果を産業界に受け渡すべく、今後、より社会実装に向けた研究が進められると確信している。