

CRISPR/Cas9 を用いた単細胞性緑藻コッコミクサの ゲノム編集に成功

～ 産業用微細藻のゲノム編集が本格化へ ～

学校法人 中央大学

平成30年12月12日(水)にプレスリリースをさせていただきました標記につきまして、「概要」の一部に誤りがありましたので、お詫びして訂正申し上げます。

- (誤) 農林水産省の委託業務「地域資源を活用した再生可能エネルギーの生産・利用のためのプロジェクト：微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」
- (正) 農林水産省の委託業務「地域資源を活用した再生可能エネルギー等の利活用技術の開発：微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」

(以下、訂正後)

概 要

近年、微細藻を利用したバイオ燃料の生産が注目を集めています。単細胞性緑藻コッコミクサは、微細藻のなかでも増殖が早く、細胞内に多くの油脂を蓄積できる点で、バイオ燃料生産に適しています。学校法人中央大学と株式会社デンソーの共同研究グループは、「Cas9/gRNA 複合体の細胞内への直接導入」という新しいゲノム編集方法を用いた単細胞性緑藻コッコミクサのゲノム編集に成功しました。このゲノム編集技術を用いることにより、屋外の培養槽外での増殖が制限される品種や油脂生産性が1.7倍に上昇した品種の作製にも成功しています。このように、この技術開発により、今後も地球温暖化の緩和に貢献できるさまざまな品種の創製が期待されます。

本成果は、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務「バイオマスエネルギー技術研究開発 戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業(次世代技術開発)：油分生産性の優れた微細藻類の育種・改良技術の研究開発」および「高油脂生産微細藻類の大規模培養と回収および燃料化に関する研究開発」と、農林水産省の委託業務「地域資源を活用した再生可能エネルギー等の利活用技術の開発：微細藻類を利用した石油代替燃料等の製造技術の開発」の結果得られたものです。

本研究成果は2018年12月11日に、国際学術誌(Biotechnology for Biofuels)のオンライン版に掲載されました(<https://rdcu.be/bdbNV>)。

【研究者】 吉満 勇也 (株)デンソー マテリアル研究部 研究員
阿部 淳 中央大学研究開発機構 機構助教
原山 重明 中央大学研究開発機構 機構教授

【発表(雑誌・学会)】 国際学術誌(Biotechnology for Biofuels)のオンライン版
論文タイトル Cas9-guide RNA ribonucleoprotein-induced genome editing
in the industrial green alga *Coccomyxa* sp. strain KJ

【研究内容】

1. 背景

2015年に締結されたパリ協定では、産業革命前からの世界の平均気温の上昇を2°C以下に抑えることを目指しており、この目標達成のために各国は、今後数十年にわたりCO₂排出量を削減する計画を提出しています(例えば日本は2030年までに2005年比25%減)。輸送部門でのCO₂排出量はCO₂全排出量の約4分の1を占める一方で、輸送部門でのエネルギー需要は、次の半世紀、増加し続けることが予想されています。そのため、液体燃料を使わない電気自動車(EV)や燃料電池自動車(FCV)への転換が進められています。一方、人員および貨物の長距離輸送についてはエネルギー密度の高い液体燃料の需要が続くため、バイオ燃料の早期開発が急務となっています。

微細藻類は、バイオ燃料の最も有望な原料と考えられていますが、その製造コストは現状1リットル当たり1000円以上とも試算され、商業生産に至っていません。そのため、微細藻類の油脂生産能力の向上に向けた育種研究が各国で展開されています。その1つがゲノム編集技術の応用です。現在までに、4属5種の微細藻類でゲノム編集が行われています[緑藻クラミドモナス属(*Chlamydomonas reinhardtii*)、珪藻フェオダクチラム属(*Phaeodactylum tricornutum*)、珪藻タラシオシラ属(*Thalassiosira pseudonana*)、真正眼点藻ナンノクロプシス属(*Nannochloropsis oceanica*と*Nannochloropsis gaditana*)]。しかしこれらの微細藻類は、タラシオシラ属を除けば、油脂をあまり蓄積しないあるいは増殖が遅い等の理由でバイオ燃料生産には適していないと考えられます。

京都大学宮下英明教授等によって分離された単細胞性緑藻コッコミクサ(*Coccomyxa* sp. KJ株)は、最少培地中で良好な増殖を示し(比増殖速度>1 day⁻¹)、細胞内に油脂を60%以上蓄積するなどの優れた形質を持っています。(株)デンソーは、この株の大規模屋外培養を数年間にわたり実施しています。しかしバイオ燃料の商業生産のためには、この株の油脂生産性の更なる向上が望まれます。

2. 研究内容と成果

そこで、学校法人中央大学と(株)デンソーの共同研究において、突然変異誘起物質を用いた古典的な育種法、遺伝子組換え技術を用いた育種法、TALENを用いたゲノム編集等を駆使して、コ

ココミクサの油脂生産性の向上を実現してきました。しかし、古典的な育種は時間・手間がかかります。また外来遺伝子の導入を伴う遺伝子組換え体の屋外培養を行うためには通称「カルタヘナ法」の審査が必要です。近年、外来遺伝子を細胞に導入することなくゲノム編集が行える方法（Cas9/gRNA 複合体の細胞内への直接導入）が開発されました（図参照）。我々は、この方法を用いて、ココミクサの遺伝子編集に成功しました。

「ゲノム編集は誰にでもできる簡単な技術」という風説が流布していますが、ゲノム編集技術を容易にさまざまな生物に適用できるわけではありません。特に微細藻類には厚い細胞壁を持つものが多く、Cas9/gRNA 複合体の細胞内への直接導入が困難でした。我々は、この複合体のココミクサ細胞内への導入を最適化することによって、この株のゲノム編集に成功しました。

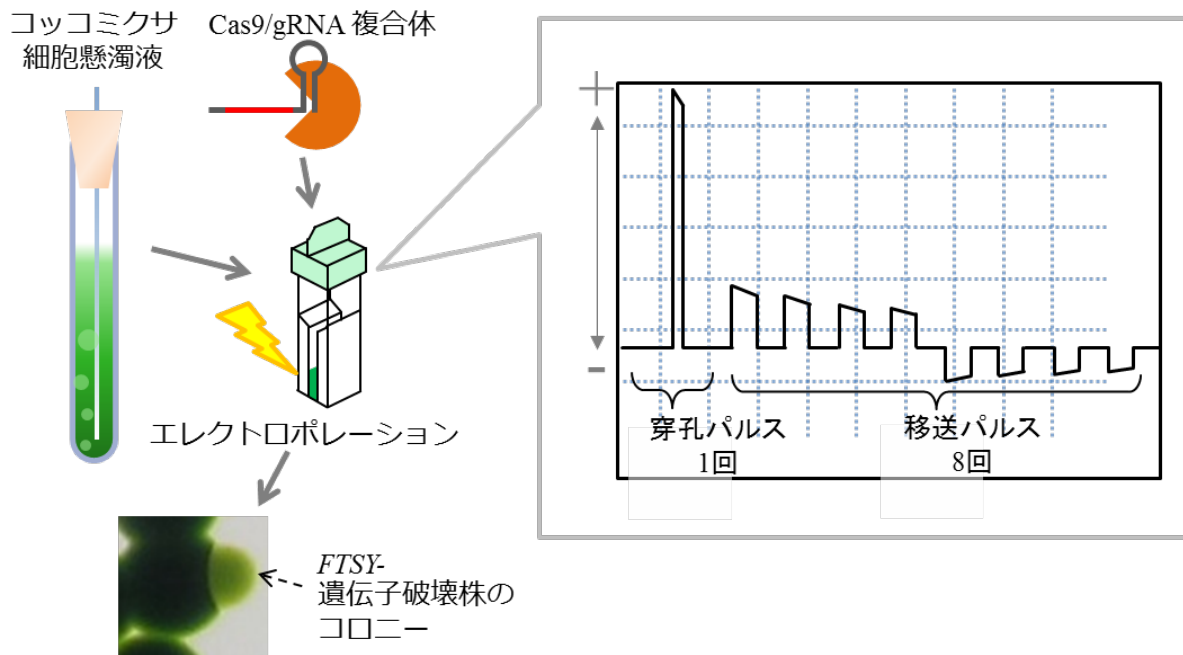


図 本研究の概略

- ・ **Cas9/gRNA 複合体**：gRNA は、ゲノム中の特定の塩基配列を認識する RNA です。変異を導入したい遺伝子（ターゲット遺伝子）の塩基配列に応じて、人工的に作製します。Cas9 は、gRNA と結合し、gRNA が認識した DNA 配列を切断する酵素です。Cas9 と gRNA との複合体を細胞内に導入することにより、ターゲット遺伝子の特定の部位で DNA を切断することができます。DNA が切断されると、細胞内にある DNA 修復酵素が切断部位を再結合しますが、その際、高い頻度で修復ミス（元の DNA 配列に修復できずに、変異等が起こること）が起こります。これが最もシンプルな形でのゲノム編集です。
- ・ **ココミクサ**：クロレラに近縁の単細胞性緑藻で、増殖が早く、油脂を細胞内に 60%以上蓄積します。緑藻は一般に厚い細胞壁に覆われており、gRNA などの核酸、Cas9 等のタンパク質を外部から細胞内に導入させるのが困難です。
- ・ **エレクトロポレーション**：エレクトロポレーションは細胞膜および細胞壁に孔をあけ、物質（本研究の場合は Cas9/gRNA 複合体）を細胞内に導入する方法です。本研究では、細胞膜および細胞壁に孔をあける高い電圧パルス（穿孔パルス）を 1 回と、電荷を持つ

Cas9/gRNA 複合体を細胞内に移動させる弱い低い電圧パルス（移動パルス）を 8 回与えました。

- ・ **ターゲット遺伝子**：本研究では、*FTSY*という、細胞内クロロフィル含量を決める遺伝子の破壊を行いました。ココミクサは寒天培地上で増殖させるとコロニーと呼ばれる細胞集団を作りますが、そのコロニーの 1 つの色が薄く、*FTSY*遺伝子が破壊されたことを示しています。このクローンでは、実際、*FTSY*遺伝子に変異していました。

本研究成果は 2018 年 12 月に、国際学術誌（*Biotechnology for Biofuels*）のオンライン版に掲載されます。

吉満勇也（デンソー）、阿部淳、原山重明（中央大学） Cas9-guide RNA ribonucleoprotein-induced genome editing in the industrial green alga *Coccomyxa* sp. strain KJ

3. 今後の展開

この技術開発によって、望ましい形質を持つココミクサを取得することが容易になりました。例えば 3 つの遺伝子に変異を導入することによって、油脂生産性が 1.7 倍に上昇しました。また、屋外の培養槽から飛散した場合、自然環境中での増殖が著しく制限される、野生株よりも「安心」な株の作製にも成功しました。この技術を駆使することによって、地球温暖化の緩和に貢献できる微細藻類の創製にこれからも取り組んで参ります。

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

原山 重明（ハラヤマ シゲアキ） 中央大学研究開発機構 機構教授

TEL： 03-3817-7360

E-mail: harayama◎bio.chuo-u.ac.jp （◎を@にかえて送信してください）

<広報に関すること>

中央大学 研究支援室

TEL 03-3817-1603, FAX 03-3817-1677

E-mail: k-shien◎tamajs.chuo-u.ac.jp （◎を@にかえて送信してください）