

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 Development of countermeasures against predation damage in the practical cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942
(淡水性藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の実用培養における捕食被害低減技術の開発)

広島大学大学院統合生命科学研究科

生物工学プログラム

学生番号 D215809

氏 名 戸田 成美

第 1 章：緒言・序論

現在人類はエネルギー危機や環境問題、食糧危機といった地球規模の課題を抱えており、持続可能な社会を構築するための技術開発が求められている。微細藻類を用いたバイオプロダクションは、①光合成により CO₂ を固定する、②必要な水が農業より少ない、③農耕地と競合しない、④植物よりも単位面積および期間あたりの生産性が高い、という特徴をもつ。さらに、遺伝子組換え技術の発展により、様々な物質を生産する株を構築することが可能となっており、幅広い分野における利用が期待されている。しかし実用規模での培養は、実験室条件と比べて生産性が大きく低下する場合がほとんどであり、開発された微細藻類株の多くが産業利用されていない。その原因のひとつとして、雑菌のコンタミネーションによる生産性の低下が挙げられる。コンタミネーションの形態には、栄養競合型、捕食型など数種類あるが、特に捕食性原生生物の混入による藻類バイオマスの減少は、生産プロセスに壊滅的な被害をもたらす。また、屋内の培養槽でも装置の規模が大型化すると、装置や培養液の十分な滅菌が難しく、頻繁にコンタミネーションが発生する。これまでさまざまな種類の捕食性原生生物による被害が確認されており、有効な対策が求められている。現在報告されている対策には、超音波処理や薬剤添加などの手法があるが、コストや手間、対象とする微生物種の制約などの課題がある。また、いずれも対処療法的な手法であり、培養中は継続的に対策を講じる必要がある。そこで、より安価で容易に適用でき、且つ、根本的な捕食対策方法の開発が求められている。

第 2 章：高濃度亜リン酸を用いた藍藻培養での *Poterioochromonas* による捕食被害の低減 (参考論文 1)

屋外培養で起こる藍藻の捕食被害を実験室培養で再現するため、川や池などから採水した環境水に必要な栄養源を添加し、藍藻(*Synechococcus elongatus* PCC 7942)の培養を行った。その結果、多くの環境水において捕食による藍藻細胞数の減少が観測され、通常は緑色である培養液が茶色や透明に変化した。これら培養液中では、捕食性原生生物として知られる *Poterioochromonas* が増殖し藍藻を捕食したことによって藍藻細胞数が減少していたことが明らかになった。

我々は以前から PCC 7942 を遺伝子工学的に改変して亜リン酸依存的に増殖する株を開発し、リン酸源を競合する雑菌に対して増殖優位性を発揮することを明らかにしていた。また亜リン酸には真菌に対する増殖抑制効果も知られていることから、本章では、捕食性原生生物の混入による捕食被害に対して亜リン酸が有効かを調べた。亜リン酸資化能を付与した藍藻株と *Poterioochromonas* の共培養実験を行い、2.0 mM までの低濃度の亜リン酸添加では増殖抑制効果がみられなかったが、濃度を 10, 20 mM まで増加させると、*Poterioochromonas* による捕食被害が減少することが明らかになった。環境水を用いた藍藻培養においても亜リン酸による捕食被害低減効果が確認されたが、採水地によっては亜リン酸条件でも捕食被害が起こる場合があった。その培養液の真核微生物菌叢を解析した結果、高濃度亜リン酸条件では *Poterioochromonas* とは別種の捕食性原生生物 *Paraphysomonas* が優占していることが明らかになった。このことから *Paraphysomonas* は亜リン酸への感受性が低く、亜リン酸添加系でも捕食被害をもたらしたと考えられた。以上の結果より、本手法は微細藻類培養で頻出す

る捕食性原生生物 *Poterioochromonas* による捕食被害に対して効果を示すことが明らかになった。

第3章：捕食圧下において出現した藍藻形態異常株の解析とその利用（参考論文2）

当研究室で作製した亜リン酸依存性藍藻株（RH714）の大量培養における課題を抽出するため、100 L フォトバイオリアクター（PBR）を用いたパイロット培養が行われた（培養は未滅菌の BG11 亜リン酸培地を使用し、実験室内環境で行った）。その結果、意図せず藍藻細胞数が激減し培養が完遂できないという現象が複数回観測された。これら培養液から *Poterioochromonas* が検出されたことから、培養系に混入した *Poterioochromonas* が藍藻を捕食したことが原因だと考えられた。しかしながら、継続して藍藻を培養すると、興味深いことに、野生株の数十倍から数百倍長くなった藍藻細胞が出現した。この伸長した細胞は、単離後も安定して表現型を維持し、*Poterioochromonas* との共培養系においても捕食耐性を示すことが分かった。100 L PBR を用いて非無菌条件下で RH714 伸長株を培養した結果、藍藻細胞数の減少を抑制することが可能であった。この結果から大型培養においても、伸長形態の付与により藍藻の捕食耐性を高めることができる可能性が示唆された。

第4章：藍藻形態異常株の形態変化メカニズムの解明とその利用

前章で単離された藍藻伸長株には、ひとつの細胞が長くなった filamentous 型と複数細胞が数珠状に連なった chain-forming 型の2種類の形態が見られたが、いずれの株も継代を重ねた後も安定して伸長形態を示した。そこで次世代シーケンス解析を用いて伸長株のゲノムを調べたところ、filamentous 型伸長株では細胞分裂関連遺伝子として知られる *ftsZ* や *ftn2* に、chain-forming 型伸長株では細胞壁分解に関わるタンパク質として知られる SpoIID や Amidase をコードする遺伝子にそれぞれ変異が生じていることが明らかになった。細胞分裂関連遺伝子の変異によって藍藻細胞が伸長することは既に報告されており、単離された filamentous 型伸長株でも同様の現象が生じたと考えられた。しかし細胞壁分解に関わる遺伝子の変異と藍藻細胞形態との関連性は未知であったため、先述の2つの細胞壁分解に関わる遺伝子の破壊株を作製した。得られた破壊株は、いずれも単離株と同様の chain-forming 型伸長形態を示したことから、当該遺伝子の変異が、捕食圧下で単離された藍藻の伸長形態の原因であることが明らかになった。

第5章：総括

本研究では複数のアプローチによる藍藻培養での捕食被害低減技術を開発した。環境水を用いた藍藻培養や 100 L PBR を用いた藍藻培養において *Poterioochromonas* が主要な藍藻捕食者として検出されたが、第2章では高濃度亜リン酸条件で *Poterioochromonas* の増殖が抑制され、藍藻への捕食被害が低減することが分かった。しかし、環境水には亜リン酸に耐性を示す捕食性原生生物の存在も確認されたことから、これらへの対応も必要な場合があると考えられた。第3、4章では *Poterioochromonas* 存在下で藍藻の形態変化が起こることを見出し、この現象を積極的に活用することで捕食被害を受けずに長期間の培養を完遂できる細胞株を作出した。伸長形態の原因を調べるため伸長株のゲノムを解析したところ、複数の遺伝子変異が検出され、見出された遺伝子変異が細胞分裂や細胞壁分解に関連していたことや、作製した遺伝子破壊株の形態から、当該遺伝子変異が伸長形態の原因であることが明らかになった。今後は藍藻伸長株の沈殿しやすさを利用した菌体回収の簡便化や、伸長形態による物質生産能の変化など、捕食耐性以外の異なる観点からも伸長形態を利用することが期待される。

参考論文（学位要件論文）

- [1] Toda N, Murakami H, Kanbara A, Kuroda A, Hirota R. Phosphite reduces the predation impact of *Poterioochromonas malhamensis* on cyanobacterial culture. *Plants*. 2021; 10(7):1361.
- [2] Toda N, Inoue-Kashino N, Fujita H, Yoshida R, Nimura-Matsune K, Watanabe S, Kuroda A, Kashino Y, Hirota R. Cell morphology engineering enhances grazing resistance of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for non-sterile large-scale cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* (Accepted, 5 January 2024)