

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24403

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2018～2020

課題番号：18KK0413

研究課題名（和文）酵母 - 微細藻複合代謝ネットワークの解明・深化と革新的有用物質生産技術の開発

研究課題名（英文）Value-added chemicals production by co-cultivation of yeast and microalgae

研究代表者

山田 亮祐（Yamada, Ryosuke）

大阪府立大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：40608626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：近年、石油資源の枯渇や地球温暖化等の環境問題を背景として、緑藻を用い、CO₂からバイオマス資源や有用物質を生産する技術が注目されている。本研究では、緑藻および大腸菌を共培養し緑藻の増殖能を向上させることを目指した。緑藻および大腸菌を共培養することで、緑藻の増殖能を1.9倍向上させることに成功した。また、共培養時には、以下の理由により、緑藻の増殖能が向上することを明らかにした。1) 大腸菌がO₂を消費する 2) 大腸菌がCO₂を生成する 3) 大腸菌が緑藻が利用しやすい形態の窒素源を生成する

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CO₂が希薄な条件下において、緑藻および大腸菌を共培養することで、緑藻の増殖能が向上すること、およびその原因を明らかにした。緑藻および大腸菌は、全ゲノムが解読されている、遺伝子組換えが容易である、遺伝子組換えにより種々の有用物質を生産可能である等の特徴を有する。従って、本研究成果は、緑藻および大腸菌を用い、希薄なCO₂から、種々の有用物質を高効率に生産する技術へと発展させることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Against the background of environmental problems such as depletion of oil resources and global warming, the technology to produce biomass resources and useful chemicals from CO₂ using algae has been attracting attention. In this study, we aimed to improve the growth capacity of algae by co-culturing algae and *E. coli*. By co-culturing algae and *E. coli*, we succeeded in increasing the growth capacity of algae by 1.9 times. It was also found that the growth of algae was enhanced during co-culture for the following reasons: 1) *E. coli* consumes O₂, 2) *E. coli* produces CO₂, and 3) *E. coli* produces a form of nitrogen source that is readily available to algae.

研究分野：生物化学工学

キーワード：緑藻 微細藻類 大腸菌 酵母 共培養 代謝

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

近年、石油資源の枯渇や地球温暖化等の環境問題を背景として、緑藻を用い、CO₂からバイオマス資源や有用物質を生産する技術が注目されている。しかし、緑藻は、他の微生物と比較して、増殖能が低く、低コストかつ高効率な培養技術が確立されていない。従って、緑藻を用いた高効率な物質生産のために、増殖能の向上が求められている。

既往の研究で、独立栄養微生物である緑藻と従属栄養微生物である酵母や細菌との共培養により、緑藻の増殖能が向上することが報告されている¹⁾。しかし、緑藻と他の微生物との共培養において、最適な微生物の組合せ、共培養による遺伝子発現の変化、2種の微生物間で授受される代謝物等は不明である。共培養における、2種の微生物間の相互作用をより詳しく調べることで、高い増殖能を達成する共培養方法を確立し、緑藻を用いた高効率な物質生産を実現することが期待できる。

緑藻の中でも、*Chlamydomonas reinhardtii* は、全ゲノムが解読されている、遺伝子組換えが可能であるなどの特徴を有する。また、大腸菌 *Escherichia coli* は、遺伝子組換えが極めて容易である、比較的少ない栄養条件下でも生育可能であるなどの特徴を有する。したがって、これら2種の微生物の、共培養における相互作用を解明できれば、緑藻を用いた種々の有用物質の高効率生産の実現に向けた大きな進展になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、緑藻 *C. reinhardtii* および大腸菌 *E. coli* を共培養し、*C. reinhardtii* の増殖能を向上させることを試みた。また、単独培養時と共培養時において、*C. reinhardtii* の遺伝子発現や代謝物に及ぼす影響を比較し、共培養における *C. reinhardtii* の増殖能の変化に寄与する要因の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 使用した微生物および培地

C. reinhardtii は NIES-2238 株を用い、*E. coli* は BL21(DE3) 株を用いた。*C. reinhardtii* の単独培養および共培養には BG11²⁾ + 5 g/L Yeast extract 培地を使用した。*E. coli* の単独培養には LB 培地 (10 g/L Tryptone, 5 g/L Yeast extract, 5 g/L NaCl) を使用した。

(2) *C. reinhardtii* および *E. coli* の培養

培養は、250 mL 容フラスコに入った 50 mL の培地に、初期菌体量が 0.03 g-dry cell/L となるように植菌し、30、120 rpm、60 μmol photons/m²/s で行った。

(3) 細胞数の測定

細胞数は、血球計算盤および光学顕微鏡を用いて測定した。

(4) クロロフィルの測定

細胞をメタノールに懸濁し、65°C で保温することにより、細胞内のクロロフィルを抽出した。上清の Abs₆₆₅ および Abs₆₅₀ を測定し、式 (1) からクロロフィル a (Chl a) を算出した³⁾。

$$\text{Chl a [mg/L]} = 16.5 \times \text{Abs}_{665} - 8.3 \times \text{Abs}_{650} \quad (1)$$

(5) 遺伝子転写量の測定

細胞から全 RNA を抽出し、逆転写反応を行うことによって cDNA を取得した。取得した cDNA をテンプレートとして用い、Real-time PCR 法により、遺伝子の転写量を測定した。また、内在性コントロール遺伝子として、*C. reinhardtii* の *IDA5* 遺伝子を用いた。

(6) 全無機炭素・全有機炭素の測定

培養液上清の全炭素 (TC) および全無機炭素 (TIC) を、全有機体炭素計 (Shimadzu) を用いて測定した。また、TC から TIC を減ずることで、全有機炭素 (TOC) を算出した。

(7) 全窒素の測定

培養液上清中の全窒素 (TN) を紫外線吸光度法⁴⁾により、測定した。

(8) デンプンの測定

細胞内のデンプンは、Starch assay kit (Sigma) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) *C. reinhardtii* と *E. coli* との共培養

C. reinhardtii と *E. coli* との共培養において、*C. reinhardtii* の細胞数は、培養 14 日目に単独培養時と比較して、約 1.9 倍に向上した (Fig. 1)。 *E. coli* の

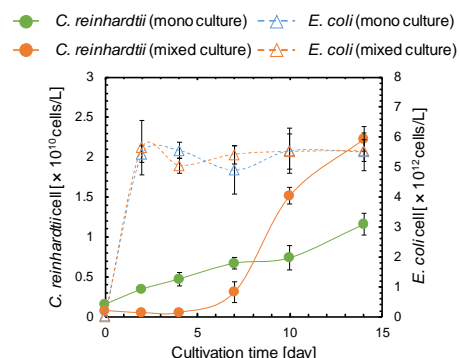


Fig. 1 *C. reinhardtii* と *E. coli* の細胞数の経時変化

細胞数は、単独培養時も共培養時も同様の傾向を示した。

また、Chl a の生成量は、14 日目に単独培養時と比較して、約 2.2 倍に向上した (Fig. 2)。

(2) *C. reinhardtii* と *E. coli* との共培養による遺伝子転写量への影響

C. reinhardtii と *E. coli* との共培養による *C. reinhardtii* の増殖能向上に寄与した遺伝子を特定するため、培養 14 日目の、単独培養時に対する、共培養時の相対遺伝子転写量を測定した (Fig. 3)。

共培養により、*C. reinhardtii* の、低 CO₂ 濃度下で発現誘導される二酸化炭素濃縮機構に関わる遺伝子 (HLA3, CCP1, CAH3, CAH6)、および酸化ストレスに関わる遺伝子 (GSTS1) の転写量が減少した。一方で、窒素同化に関わる遺伝子 (GLN1, GDH1) の転写量が増加した。これらの遺伝子転写量の変化は、*E. coli* による、O₂ の消費、CO₂ の生成、および *C. reinhardtii* が利用しやすい窒素源の生成が原因であると考えられる。これらの *E. coli* による作用が *C. reinhardtii* の増殖能向上に寄与したと考えられる。

共培養により、*C. reinhardtii* の光合成の明反応に関わる遺伝子 (LHCBM6, psbA) および暗反応に関わる遺伝子 (RbcS1, GAP3, SEBP1, PRK1) の転写量が減少した。一方で、光エネルギーを吸収する役割を持つクロロフィルの生成に関わる遺伝子 (GSA) の転写量は増加した。これは Fig. 2 の結果とも一致する。共培養においては、*E. coli* の存在により光が遮蔽され、光合成が抑制されたため、クロロフィルの生成を促進することで、*C. reinhardtii* が必要な光エネルギーを相補したと考えられる (Fig. 2)。

転写量を測定した遺伝子の中で、最も転写量が増加したのは、デンプン生成に関わる遺伝子 STA2 であった。既往の研究において、STA2 は、窒素欠乏下で、発現量が向上することが報告されている⁵⁾。

(3) 全無機炭素・全有機炭素の経時変化

単独培養および共培養における、培地中の全無機炭素および全有機炭素を測定した (Fig. 4, Fig. 5)。

E. coli の単独培養および共培養において、TIC は、培養 2 日後に急激に増加した後、緩やかに減少した。一方で、TOC は培養 2 日後に減少した後、10 日後まではほぼ一定であった。以上より、*E. coli* が培地中の有機炭素を消費し、無機炭素を *C. reinhardtii* に供給することで、*C. reinhardtii* の無機炭素の利用が促進され、共培養における *C. reinhardtii* の増殖能向上に寄与したと考えられる。

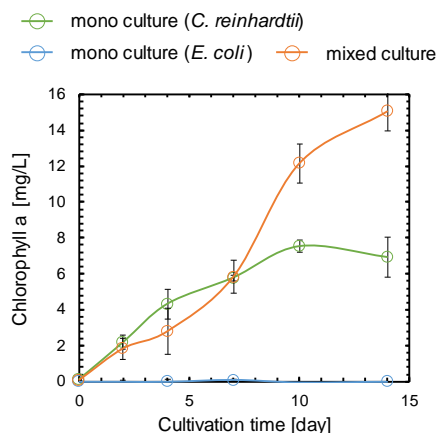


Fig. 2 クロロフィル a の経時変化

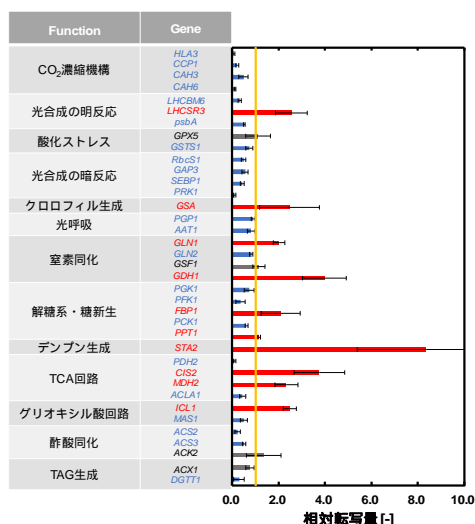


Fig. 3 *C. reinhardtii* 遺伝子転写量

発現量が向上することが報告されている

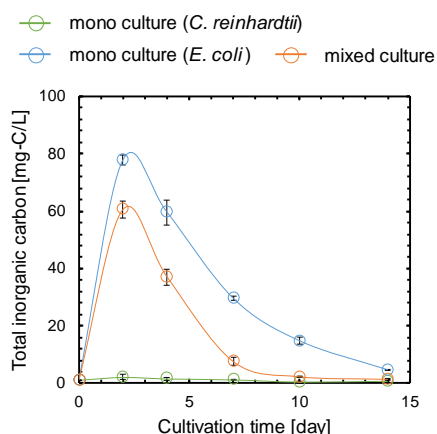


Fig. 4 TIC の経時変化

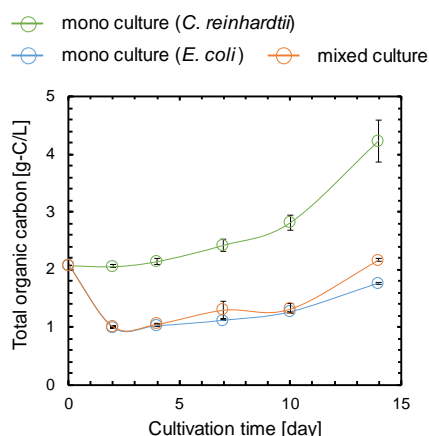


Fig. 5 TOC の経時変化

(4) 全窒素の経時変化

共培養において、*E. coli* の存在による *C. reinhardtii* の窒素利用への影響を調べるため、培地上清中の TN の経時変化を測定した (Fig. 6)。

C. reinhardtii の単独培養では、TN は、培養 7 日後までにほとんど変化がなかった。一方で、*E. coli* の単独培養では、TN は、培養 4 日後まで減少し、それ以降 10 日後まではほぼ一定となった。また、共培養では、TN は、培養 10 日後まで緩やかに減少した。

既往の研究において、タンパク質等の有機窒素化合物を細菌が分解し、藻類が容易に利用可能なアンモニウム塩等の形態に変換する可能性があることが報告されている⁶⁾。したがって、本研究において、*E. coli* が培地中の有機窒素化合物を分解することで、*C. reinhardtii* による窒素利用が促進され、共培養における *C. reinhardtii* の増殖能向上に寄与したと考えられる。

(5) 細胞内デンプン量

共培養において、*E. coli* の存在による *C. reinhardtii* の代謝物への影響を調べるため、単独培養および共培養における、培養 14 日目の細胞内に蓄積されたデンプン量を測定した (Fig. 7)。

共培養において、*C. reinhardtii* の細胞内デンプン量は、単独培養時と比較して、約 2.5 倍に向上した。これは、遺伝子転写量の測定において、共培養により、デンプン生成に関わる遺伝子 *STA2* の転写量が増加していたことと一致する。

(6) まとめ

本研究では、*C. reinhardtii* と *E. coli* を共培養することで、*C. reinhardtii* の増殖能を向上させることに成功した。また、単独培養時と共培養時において、*C. reinhardtii* の遺伝子発現や代謝物に及ぼす影響を比較した。その結果、*E. coli* による O_2 の消費、 CO_2 の生成、および *C. reinhardtii* が利用しやすい形態の窒素源の生成が、共培養における *C. reinhardtii* の増殖能向上に寄与したことを明らかにした。さらに、共培養により、*C. reinhardtii* の細胞内のデンプン量が増加することを明らかにした。

<引用文献>

- 1) Higgins, B.T. *et al.*; *PLoS One*, 9:e96807 (2014).
- 2) Stanier, R.Y. *et al.*; *Bacteriol. Rev.*, 35, 171-205 (1971).
- 3) Grimme, L.H. *et al.*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 1617-1623 (1972).
- 4) JIS K 0102 45.2 工場排水試験方法 (1986).
- 5) Richard, T. *et al.*; *Algal Res.*, 31, 122-137 (2018).
- 6) Yan, Z. *et al.*; *Energy Environ. Sci.*, 6, 3765-3779 (2013).

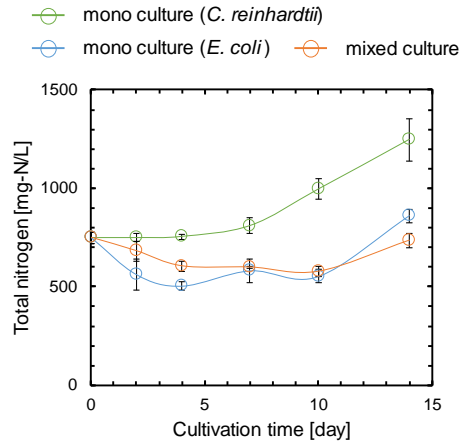


Fig. 6 TN の経時変化

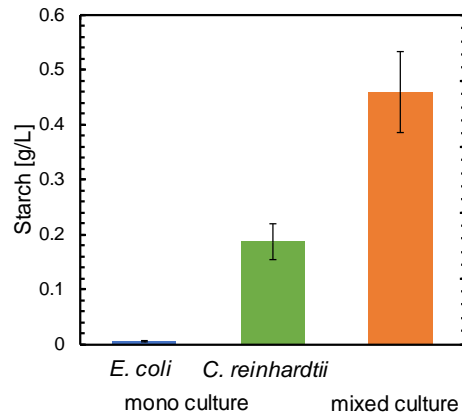


Fig. 7 培養 14 日目の細胞内デンプン量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 R. Mitsui, R. Yamada, H. Ogino	4. 巻 35
2. 論文標題 CRISPR system in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and its application in the bioproduction of useful chemicals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-019-2688-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Mitsui, R. Nishikawa, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino	4. 巻 117
2. 論文標題 Construction of yeast producing patchouliol by global metabolic engineering strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1348-1356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.27284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 R. Yamada, Y. Kumata, R. Mitsui, T. Matsumoto, H. Ogino	4. 巻 37
2. 論文標題 Improvement of lactic acid tolerance by cocktail -integration strategy and identification of the transcription factor PDR3 responsible for lactic acid tolerance in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11274-020-02977-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Mizobata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, S. Yoshihara, H. Tokumoto, H. Ogino	4. 巻 131
2. 論文標題 Improvement of 2,3-butanediol tolerance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by using a novel mutagenesis strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 283-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, S. Yoshihara, H. Tokumoto, H. Ogino	4. 巻 104
2. 論文標題 Construction of lactic acid-tolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient D-lactic acid production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 9147-9158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10906-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Construction and analysis of engineered D-lactic acid tolerant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Mizobata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Improvement of 2,3-butandiol tolerance in yeast by a novel mutagenesis strategy
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kumata, R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Improvement of lactic acid tolerance in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by optimizing the expression of transcription factors
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Yamada, R. Nishikawa, R. Mitsui, T. Matsumoto, H. Ogino
2. 発表標題 Modulation of the mevalonate pathway in yeast for efficient patchoulol production by global metabolic engineering
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三ツ井良輔, 山田亮祐, 松本拓也, 吉原静恵, 徳本勇人, 荻野博康
2. 発表標題 ゲノム進化法によって創製した熱耐性酵母の遺伝子発現量解析
3. 学会等名 極限環境生物学会2020年度 (第21回)年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝端明日香, 三ツ井良輔, 山田亮祐, 松本拓也, 吉原静恵, 徳本勇人, 荻野博康
2. 発表標題 点変異・構造変異同時導入による2,3-ブタンジオール耐性酵母の創製
3. 学会等名 極限環境生物学会2020年度 (第21回)年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪府立大学 化学工学課程/化学工学分野 反応工学グループ
<http://www2.chemeng.osakafu-u.ac.jp/group4/indexj/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ハンカマー ベン (Hankamer Ben)	The University of Queensland ・ Institute for Molecular Bioscience ・ Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	クイーンズランド大学			