

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19153

研究課題名（和文）原生生物の捕食圧下におけるバクテリア巨大化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Characterization of the bacterial elongation mechanism under grazing pressure by protists

研究代表者

廣田 隆一（Hirota, Ryuichi）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：90452614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者らが発見した「原生生物の捕食圧下における藍藻の細胞形態変化」という新規現象について、二種類の捕食者-被食者モデルを用いて解析を行い、細胞伸長メカニズム、および微生物生存戦略における意義の解明を試みた。淡水性、海洋性藍藻のいずれにおいても捕食者と共培養することで、形態を変化させた変異株が出現した。これら複数の伸長変異株を単離し、ゲノムリシーケンスにより変異点を同定した。その結果、細胞形態形成や細胞壁構成に関わるタンパク質をコードする遺伝子に変異が生じていることを明らかにした。また、これらの単離株を用いた捕食者との共培養実験から、変異株は捕食抵抗性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

商業利用を指向した微細藻類の屋外大規模培養では、捕食性微生物のコンタミネーションは不可避であり、実用化における大きな障壁となっている。本研究では、藍藻の形態を大きく変化させることで捕食被害を低減する手法を開発し、得られた株は実際に捕食抵抗性を有することが示された。これにより微細藻類の社会実装がより現実味を帯びてくる可能性がある。また、本研究で構築した藍藻-捕食者共培養システムは、藍藻の細胞形態形成因子の抽出、および微生物生存に関わる現象を解析することができる実験系である。現在、これまでに報告のない遺伝子が複数同定されており、細胞形態形成に関わる新たな因子が発見される可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We previously discovered that several cyanobacteria can drastically change morphological structure under predation pressure from protozoa. In this study, we used two predator-prey models, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 with golden algae and *Synechococcus* sp. PCC 7002 with marine ciliates, to elucidate the cell elongation mechanisms and their significance in microbial survival strategies. Co-cultivation with predators induced the emergence of morphological variants in both freshwater and marine cyanobacteria. Furthermore, co-cultivation experiments using the isolated elongated mutant strains revealed that the morphological variants exhibited resistance to predation. Multiple elongated mutants were isolated, and genome sequencing analysis identified their mutation points in the genes responsible for cell division and cell-wall degradation. As a result, it was found that mutations occurred in genes coding for proteins involved in cell morphology formation and cell wall composition.

研究分野：応用微生物学

キーワード：藍藻 捕食 細胞形態 原生生物 微生物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

微細藻類による物質生産は、光合成によってCO<sub>2</sub>を固定して有用物質に変換できることから持続可能な物質生産プロセスとして期待されている。微細藻類の産業利用は一般に大規模スケールで培養されることが想定されており、特に運転管理とコストの面からオープンポンドという屋外開放型での培養が望まれる。しかしながら、大規模培養では培地や装置の滅菌は事実上不可能であり、また開放培養においては環境微生物のコンタミネーションは不可避である。近年様々な有用微細藻類が開発され、実用化を前提とした実証試験が行われるようになってきたが、原生生物による藻体の捕食が深刻な被害をもたらすことが、複数の実証プラントから報告され、その実状が認識されつつある。

## 2. 研究の目的

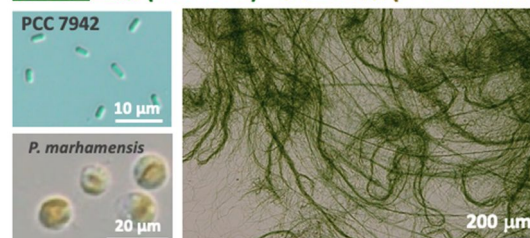
*Poterochromonas* 属の黄金色藻は土壌・水圏に広く存在し、世界各地の微細藻類パイロット試験において、壊滅的な被害を与える捕食性原生生物として報告されている。申請者は、*Poterochromonas* による捕食被害が起きた藍藻のパイロット培養で、そのまま培養を続けると形態が異常に変化した藍藻細胞が出現し、捕食を免れて増殖する現象を見出した。捕食被害が発生した培養液から単離した *Poterochromonas malhamensis* と *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を共培養したところ、細胞長数μm 程度の細胞が、mm オーダーにまで劇的に伸長する現象を再現良く確認した(特願 2021-148599)。さらに、同様の方法論で海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 と繊毛虫 *Uronema marinum* を共培養したところ、捕食被害を受けながらも一部の PCC 7002 が同様に伸長し、培養系を優占化することが確認された(図1)。すなわち、藍藻は自身を巨大化させて捕食から免れ、生存する能力を有していると考えられる。この様に単細胞性藍藻の形態が捕食者との相互作用により糸状化すると報告はこれまでされておらず、微生物生態学的観点からも非常に興味深い現象である。本研究では、藍藻が細胞形態を伸長させるメカニズムを解明するとともに伸長細胞の生理的な変化を調べた。さらにこの形態変化を積極的に利用し、捕食に耐えうる培養技術としての利用を試みた。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 藍藻-捕食者共培養モデルにおける細胞形態変化の解析

前述のように2種類の藍藻-捕食者共培養モデル(淡水:PCC 7942-*Poterochromonas*, 海水:PCC 7002-*Uronema*)において、伸長細胞が出現する実験系を確立している。この条件において、藍藻がいつ、どの時点で形態変化を起こすかを調べた。培養経過と共に、藍藻細胞数とサイズ分布、および捕食者数の変化を経時的に観察した。被食者(藍藻)は濁度およびクロロフィル量、捕食者は血球計数盤とセルカウンターを用いて計数した。得られたデータから捕食者の摂餌速度(clearance rate)を算出し、伸長変異株の出現頻度や細胞形態変化を調べた。PCC 7942, 7002 いずれの伸長株も、共培養系で出現した形態変異株を単一化して解析するために、シングルコロニーアイソレーションによって単離を行った。形態変異株が含まれる培養液を10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> 倍希釈してBG-11もしくはMA2プレートにスプレッドし、光照射棚で約2週間培養し、コ

淡水性藍藻 (PCC 7942) + 黄金色藻 (*P. malhamensis*)



海水性藍藻 (PCC 7002) + 繊毛虫 (*U. marinum*)

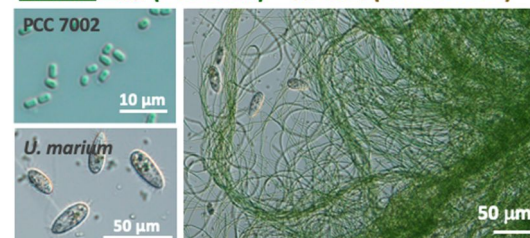


図1.原生生物の捕食圧下における藍藻の形態変化。PCC 7942と黄金色藻(上),PCC 7002と繊毛虫(下)の共培養試験の顕微鏡写真。上下のパネルでそれぞれ左上が藍藻野生株,左下が原生生物(捕食者),右側が形態変化を引き起こして糸状化した藍藻の写真を示す。黄金色藻はフォトバイオリクター(後述)から、繊毛虫は広島県の瀬戸内海から単離した。

コロニーを得た。得られたコロニーを液体培地 200  $\mu\text{L}$  を加えた 96 well プレートに植菌し、約 2 日間培養した後、顕微鏡で観察を行い、細胞形態に変化が見られるものを形態変異株として取得した。PCC 7942, 7002 いずれも複数バッチから伸長株をそれぞれ 3 種類以上取得し、株の性状解析を行った。

### 3-2 . 伸長細胞と遺伝子変異の因果関係の解明

独立した実験系から複数の変異株を取得し、ゲノムリシーケンス解析により、変異に関与する遺伝子の同定を行った。捕食者との共培養によって出現した形態変異株について、培養を行い、増殖した菌体をペレットにし、Blood & Cell Culture DNA Midi Kit(QIAGEN, 13323)を用いて DNA を抽出してサンプルとした。次世代シーケンサー(Illumina MiSEQ)による全ゲノム解析を行った。シーケンスの結果は、配列情報マルチ解析ソフトウェア Geneious を用いて解析した。

### 3-3 . 伸長細胞の捕食抵抗性の検証

伸長細胞は捕食者の細胞サイズよりも大きくなっていることから、物理的な大きさによって捕食に対する抵抗性を獲得していると考えられる。そこで、単離した伸長細胞と捕食者を様々な条件で共培養し、どの程度捕食被害に耐えて増殖することができるか、定量的な評価を行った。200 mL 容三角フラスコに 50 mL の培地を添加し、藍藻細胞 (PCC 7942, PCC 7002) および捕食者を一定数の比率で植菌した。その後、30  $^\circ\text{C}$ 、約 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$  で光を照射し、巡回培養で一定期間培養を行った。経時的にサンプリング、顕微鏡観察を行い、顕微鏡用イメージングソフトウェア cellSens (Olympus) の簡易計測(測長)の機能を用いて細胞長の計測を行った。

## 4 . 研究成果

### 4-1. 藍藻-捕食者共培養モデルにおける細胞形態変化の解析 (PCC 7942)

単離した *Poterioochromonas* との共培養系を構築し、実験室培養条件でも形態異常を示す藍藻株が発生するかを調べた。藍藻に対して *Poterioochromonas* の細胞数が多い場合は、藍藻が形態

変化を誘導する前に捕食され尽くす可能性があるため、藍藻と *Poterioochromonas* の細胞数比を 200:1、300:1 と変化させて共培養を行った。その結果、培養 7 日後あたりから *Poterioochromonas* 添加系において、10  $\mu\text{m}$  以上の藍藻伸長株が出現し、最大で 1 mm を超える細胞もみられた。培養が進むにつれて伸長株が占める割合が大きくなっていったが、細胞のサイズが長いもの、短いものが混在していたため、次にその分布を調べた。野生株と *Poterioochromonas* の共培養において経時的に細胞長の変化を計数し、藍藻の細胞長およびその割合の推移を調べた。*Poterioochromonas* 非添加の培養系では、時間が経過するにつれて 10-50  $\mu\text{m}$  クラスの細胞の割合が高くなったが、50  $\mu\text{m}$  以上の細胞は出現しなかった。一方、*Poterioochromonas* 添加系では培養時間が経過するにつれて、長い細胞の割合が大きくなった。最終的に 50  $\mu\text{m}$  以上の細胞が占める割合は、添加系 (300:1) で 8

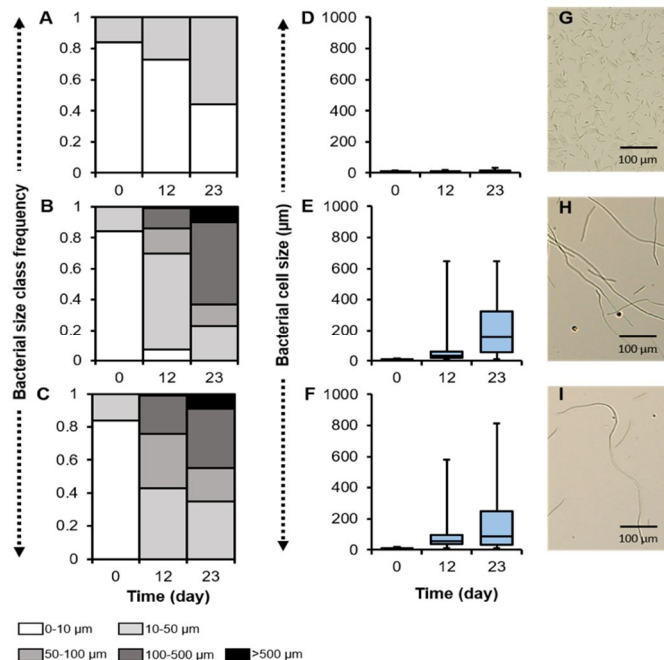


図 2 . 野生株と *Poterioochromonas* の共培養における細胞長別の割合および細胞長の分布

(A,D,G)*Poterioochromonas* 非添加系、(B,E,H)300:1 *Poterioochromonas* 添加系、(C,F,I)200:1 *Poterioochromonas* 添加系。棒グラフは細胞長を 5 つのクラスに分け、その割合を表している。顕微鏡写真は day12 での細胞の様子。

割、添加系 (200:1) で約 7 割にまで及んだ。

#### 4-2. 藍藻-捕食者共培養モデルにおける細胞形態変化の解析 (PCC 7002)

単離した 2 種類の繊毛虫 (*Uronema marinum*, *Methanophrys sinensis*) と海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 を共培養し、淡水性藍藻の場合と同様に形態変異株が出現するのかを調べた。捕食者を加えた系では、捕食圧によって培養初期に増殖が大きく抑制された。しかしその後、培養経過約 8 日から徐々に増殖が見られた。培養経過による PCC 7002 の細胞長の変化を図 3 に示した。捕食者を加えた系では増殖に伴い、伸長した細胞が出現し増加していく様子が確認された。特に *Uronema* を加えた系では 1 mm 近くまで伸長した細胞が確認され、*Metanophrys* との共培養系では 10~15  $\mu\text{m}$  に伸長した細胞が確認された。

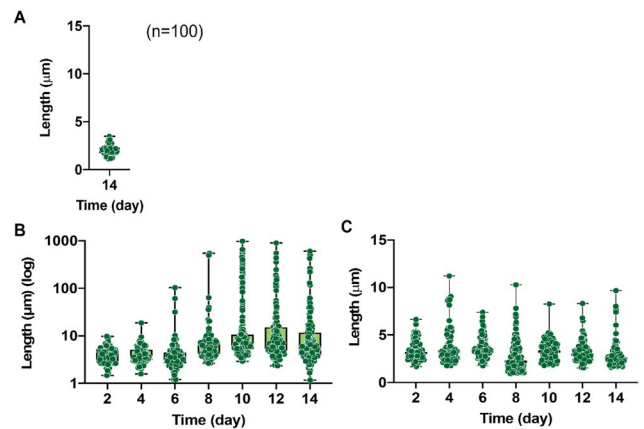


図 3. 海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 と捕食者の共培養における PCC 7002 の細胞長の変化 (A)捕食者非添加系、(B)*Uronema* との共培養系 (縦軸は対数表記)、(C)*Metanophrys* との共培養系。箱ひげ図はデータのばらつきを表しており、上下のバーは最大値、最小値、プロットはデータの分布を表している。

#### 4-3. 伸長細胞と遺伝子変異の因果関係の解明

次に伸長細胞が形態変化した要因を明らかにするため、伸長変異株の全ゲノムシーケンスを行った。PCC 7942 においては、伸長株 E4 は細胞分裂関連遺伝子 *ftn2* で一塩基置換 (SNV) が生じ、460 番目のバリンがグリシンに置換していた。伸長株 E5 では、細胞分裂関連遺伝子 *ftsZ* で SNV が生じ、320 番目のフェニルアラニンがロイシンへの置換等が見出された。バクテリアでは、細胞分裂に関与するタンパク質が divisome と呼ばれる集合体を形成することが知られており、FtsZ は細胞周縁に沿って環状に集積することで Z-ring を形成し、そこにくびれが生じて細胞分裂が起こる。つまり、FtsZ によって細胞分裂の位置が決定する。Ftn2 はシアノバクテリアに固有のタンパク質で、細胞分裂の際に Z-ring に集合して FtsZ の安定性を高めるといわれている。このような遺伝子に変異が生じることで、細胞形態に異常が生じたと考えられる。

一方、PCC 7002 においては、大きく分けて細胞が数珠つなぎ状に連なって糸状化したタイプの変異株 (Chain-forming mutant) と、ひとつの細胞がいびつな形状を呈した変異株 (Distorted mutant) が生じた。前者ではほとんどが細胞壁の溶解にかかわる *spo11D* の遺伝子変異であり、遺伝子上の様々な場所で塩基置換や挿入・欠損変異を引き起こし、フレームシフトしていることが確認された。対して、Distorted mutant では細胞分裂関連遺伝子である *ftsQ* や細胞壁のペプチドグリカン合成に関わる遺伝子に高頻度で変異が生じていた。また、細胞形態との関連で予測ができない遺伝子にも変異が見出された。このように、形態変異株における遺伝子変異は、細胞分裂装置タンパク質や細胞壁分解酵素の遺伝子に変異が多く見られ、これらの機能不全によって細胞形態が変化したことが強く示唆された。現在、これら遺伝子の遺伝子破壊および変異株・破壊株における遺伝子相補実験によって、直接的な影響の検証を行っている。

#### 4-4. 伸長細胞の培養工学的利点に関する検討

PCC 7942 由来の亜リン酸依存性変異株 (RH714) を親株とした伸長変異株 (E16, Ftn2 変異株) と *Poterochromonas* の共培養を行った際の培養液の  $\text{OD}_{750}$  の推移を図 4 に示す。*Poterochromonas* 非添加系において、伸長株の増殖は野生株に若干劣るものの良好な増殖が見られた。次に、*Poterochromonas* 添加系において、野生株の  $\text{OD}_{750}$  は培養開始からほぼ横ばいであったのに対し、伸長株では  $\text{OD}_{750}$  の増加を示した。このことから、伸長株は *Poterochromonas* 存在下において、捕食抵抗性があることが示された。

次に、同様の実験を PCC 7002 の伸長変異株を用いて行った。捕食者としては *U. marinum* を用い、PCC 7002 変異株は Chain-forming 型と Distorted 型の二種類で共培養実験を実施した。また、伸長株培養液濁度の計測が安定しなかったため、培養終了時の乾燥菌体重量で細胞増殖を比較した。細胞増殖に関しては、捕食者が無い場合、Chain-forming 型変異株 (Yoshi-1) では野生株と比較してほぼ同等であり、Distorted 型変異株 (4A4, 4C1) では若干劣る程度に留まった (図 5 左)。捕食者を添加した場合、野生株では著しく増殖が抑えられたが、伸長変異株では良好に増殖し、特に Yoshi-1 では乾燥菌体重量はほとんど減少することがなかった (図 5 右)。

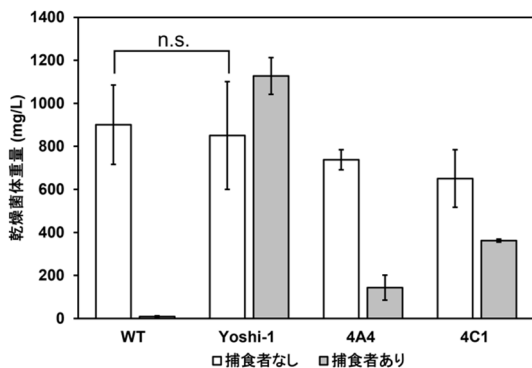


図 5 . 海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 と捕食者の共培養

捕食者 (*Uronema marinum*) と PCC 7002 共培養系における細胞増殖 (培養後乾燥菌体重量: 左) と培養液経時変化の写真。

## まとめ

本研究では、申請者らが発見した「原生生物の捕食圧下における藍藻の細胞形態変化」という新規現象について、二種類の捕食者-被食者モデルを用いて解析を行い、細胞伸長メカニズム、および微生物生存戦略における意義の解明を試みた。淡水性藍藻 *S. elongatus* PCC 7942、海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 のいずれにおいても捕食者と共培養することで、形態を変化させた変異株が出現し、さらにこれらの単離株を用いた共培養実験から、形態変異株は捕食抵抗性を示すことが明らかとなった。このメカニズムを積極的に利用することで、微細藻類実用培養における捕食被害の抑制が可能になると期待される。またその他、物質生産能の向上、細胞回収の簡易化など期待される培養工学的なメリットも期待される。今後継続してこれらの検討を行って行く予定である。

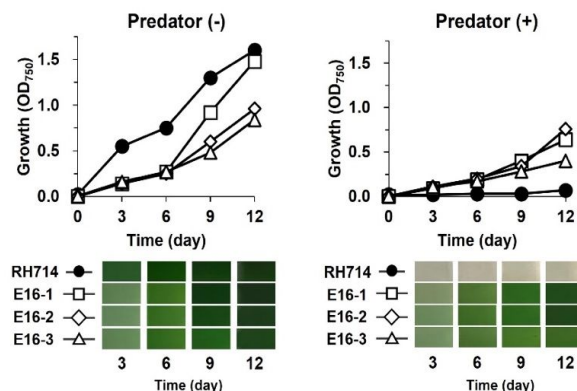
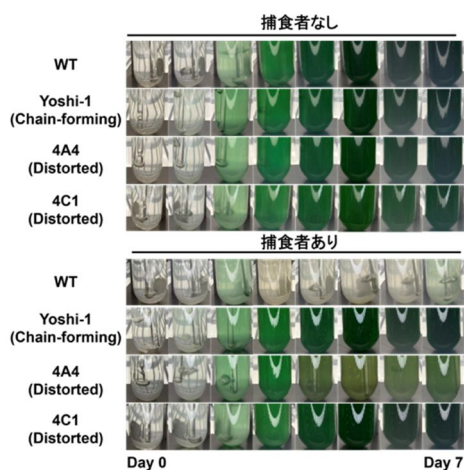


図 4 . 淡水性藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と捕食者の共培養

捕食者 (*Poterioochromonas*) 非添加系 (左) と添加系 (右) における OD750 値の変化と培養液の写真



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Toda Narumi, Inoue-Kashino Natsuko, Fujita Hazaya, Yoshida Ryosuke, Nimura-Matsune Kaori, Watanabe Satoru, Kuroda Akio, Kashino Yasuhiro, Hirota Ryuichi	4. 巻 137
2. 論文標題 Cell morphology engineering enhances grazing resistance of <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 for non-sterile large-scale cultivation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 245 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2024.01.001	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 亮介、渡辺 智、石田 丈典、池田 丈、舟橋 久景、黒田 章夫、廣田 隆一
2. 発表標題 原生生物の捕食圧下における海洋性藍藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002の形態変化メカニズムの解析
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣田隆一、戸田成美、吉田亮介、黒田章夫
2. 発表標題 捕食性原生生物との共培養における桿菌型藍藻の形態変化
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田成美、吉田亮介、渡辺智、黒田章夫、廣田隆一
2. 発表標題 原生生物の捕食圧下における藍藻の細胞形態変化の解析(1):海洋性藍藻 <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942の場合
3. 学会等名 藍藻の分子生物学会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 亮介, 戸田成美, 渡辺智, 黒田章夫, 廣田隆一
2. 発表標題 原生生物の捕食圧下における藍藻の細胞形態変化の解析(2): 海洋性藍藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 の場合
3. 学会等名 藍藻の分子生物学会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田 成美, 吉田 亮介, 渡辺 智, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一
2. 発表標題 捕食圧下における藍藻の形態変化の解析とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 百川 直輝, 村上 博紀, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 黒田 章夫, 廣田 隆一
2. 発表標題 亜リン酸依存性による生物学的封じ込めが宿主の増殖に及ぼす影響の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣田隆一
2. 発表標題 カルタヘナ法第一種使用のための生物学的封じ込め技術の開発と実用的課題
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 藍藻の変異体およびその製造方法	発明者 国立大学法人広島大 学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-158914	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------