

奨励金No.1489

微細藻共培養系による革新的 C1 化学プラットフォーム

山田 亮祐
大阪公立大学 准教授

Production of chemicals from C1 compounds by co-culture of microalgae and yeast

Ryosuke Yamada,
Osaka Metropolitan University, Associate Professor



緑藻による生物学的 CO₂ 固定化における効率の向上が求められている。本研究では、緑藻と酵母の共培養系において高い増殖能をもつ緑藻変異株を作製することを目指した。緑藻と酵母の共培養系に対して UV 照射による突然変異導入を行うことで、共培養系において高い増殖能をもつ緑藻変異株 mt8 を作製することに成功した。さらに、全遺伝子発現解析により、突然変異導入後に共培養時の緑藻増殖能が向上した原因の一端を解明した。

There is a need to improve the efficiency of biological CO₂ fixation by green algae. In this study, we aimed to construct a mutant strain of green algae with high growth ability in a co-culture system of green algae and yeast. By introducing mutations into a green algae by UV irradiation, we succeeded in construction of a mutant strain of green algae mt8, which has high growth ability in a co-culture system. Furthermore, through transcriptome analysis, we clarified part of the reason why green algae growth ability improved during co-culture after mutagenesis.

1. 研究内容

1.1. 研究背景

地球温暖化などの種々の環境問題を背景に、C1 化合物である CO₂ の固定化が求められている。緑藻などの光合成を行う独立栄養微生物は、CO₂ をデンプンなどの有機炭素に変換することが可能であり、そのデンプンは様々な有用化合物の原料となることから、有望な CO₂ 固定化法として期待されている。しかし、CO₂ が希薄な条件下では緑藻の CO₂ 固定化効率が低く、効率的に CO₂ を固定化するためには高濃度 CO₂ の通気が必要となる。既往の研究において、緑藻を、呼吸により CO₂ を生成する酵母と共培養することで、CO₂ が希薄な大気雰囲気下において緑藻の増殖能および CO₂ 固定化効率が向上することが報告されている¹⁾。私達はこれまでに、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を共培養すること

で、*C. reinhardtii* の増殖能が向上することを見出した²⁾。*C. reinhardtii* と *S. cerevisiae* は共に安全な微生物であり、産業規模での培養も行われていることから、この共培養系は CO₂ 生物学的固定法としての利用が期待できる。しかし、この共培養系を利用した CO₂ 固定化の実用化に向けては、さらに緑藻の増殖能や CO₂ 固定化効率を向上させることが課題である。

微生物の特定の機能を向上させる手法の 1 つに、突然変異導入によるゲノム DNA の改変が挙げられる。突然変異導入は非常に応用範囲の広い有用な手法であり、その中で最も一般的な技術の 1 つが UV 照射による突然変異導入法である。この手法により緑藻の脂質含有量や増殖能が向上した変異体が作製された³⁾。しかし、共培養系における緑藻の増殖能向上に突然変異導入が利用された例は知られていない。

本研究では、*C. reinhardtii* と *S. cerevisiae* の共培養系に対して UV 照射により突然変異導入を行うことで、共培養系において高い増殖能をもつ *C. reinhardtii* 変異株を作製することを目指した。また、全遺伝子発現解析を行い、突然変異導入により共培養時に *C. reinhardtii* の増殖能が向上した原因を考察した。

1.2. 緑藻変異株の作製・評価

UV 照射による突然変異導入後に濃い緑色のコロニーを形成した緑藻変異株を8株単離した (mt1-mt8)。緑藻変異株 mt1-mt8 を酵母と7日間共培養した時に特に高い増殖を示した変異株は mt2、mt4、mt8 であった。そこで、mt2、mt4、mt8 の共培養時における緑藻細胞濃度およびクロロフィル濃度の経時変化を Fig. 1a および 1b に示す。Fig. 1a より、mt8 を酵母と共培養した際に、培養7日後の緑藻細胞濃度は最も高い値である 152×10^5 cells/mL を示し、これは緑藻野生株と酵母を共培養した時の値 (93×10^5 cells/mL) の 1.63 倍であった。Fig. 1b より、mt8 と酵母を共培養した時に培養7日後のクロロフィル濃度は $12.6 \mu\text{g/mL}$ を示し、これは緑藻野生株と酵母を共培養した時の値 ($11.4 \mu\text{g/mL}$) の 1.11 倍であった。

1.3. 緑藻変異株共培養時の全遺伝子発現解析

突然変異導入により、緑藻と酵母の共培養時に緑藻の増殖能が向上した原因を明らかにするため、酵母との共培養時に最も高い増殖能を示した mt8 および緑藻野生株を酵母と共培養した。そして、緑藻細胞および酵母細胞から全 RNA を抽出して、全遺伝子発現解析を行った。各遺伝子の p-value と fold change を算出して発現変動遺伝子を同定し、緑藻の各遺伝子の p-value と fold change を示す Volcano プロットを作製した (Fig. 2)。緑藻変異株 mt8 は、野生株と比較して 102 個の遺伝子の発現量が増加し、114 個の遺伝子の発現量が減少したことが確認された。

さらに、発現変動遺伝子の中で有意に多く観測される遺伝子機能を見出すために、緑藻の発現量増加遺伝子と発現量減少遺伝子に対して遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行った。発現量増加遺伝子および発現量減少遺伝子に関して、 $-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$ の値が上位であった 20 個の GO をそれぞれ Fig. 3a および Fig. 3b に示す。Fig. 3a に示すように、緑藻変異株の発現量増加遺伝子は、主に光化学系や集光性の機能に関連していた。従って、突然変異導入により緑藻細胞濃度が向上したことは、光化学系に関連する遺伝子の

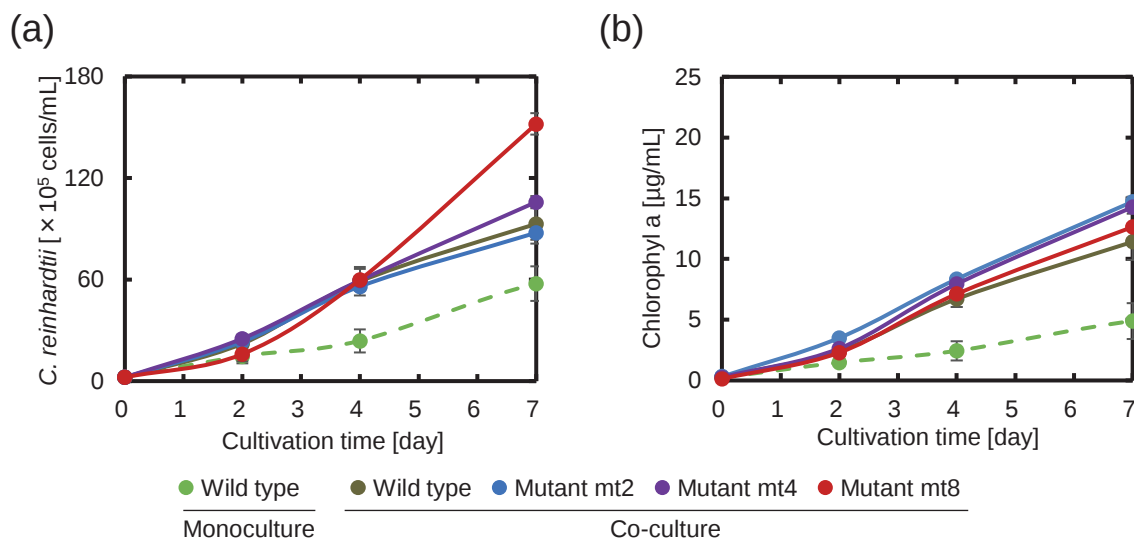


Fig. 1 緑藻細胞濃度とクロロフィル濃度の経時変化

発現量増加による光合成の活性化が要因の 1 つとして考えられる。緑藻の細胞質量のうち約 50% を炭素が占めているため、共培養により緑藻細胞濃度が向上したことは、固定化した CO_2 量が増加したことを示唆していると考えられる。また、緑藻に対する突然変異導入により緑藻細胞濃度だけでなく酵母細胞濃度も向上した。酵母細胞が増加すると細胞により光が遮蔽されるため、緑藻細胞が利用できる光エネルギーが低下する。そこで、緑藻は集光性に関連する遺伝子の発現量を増加させてクロロフィル生成を促すことで、必要な光エネルギーを相補した可能性が考えられる。

Fig. 3b に示すように、緑藻変異株の発現量減少遺伝子は、主にリボソームに関連していた。ストレス条件下で、緑藻はリボソームの生合成を抑制して細胞修復にエネルギーを利用する。緑藻に対する突然変異導入により、緑藻 1 細胞あたりの酵母細胞の数は減少した。さらに、前述の通り、緑藻による光合成の活性化が示唆されている。従っ

て、緑藻変異株 mt8 と酵母の共培養時には、培養液中の O_2 量が突然変異導入前よりも多くなっており、緑藻の酸化ストレスが増大していた可能性がある。そのため、mt8 はエネルギーをリボソームの生合成よりも細胞保護に利用していた可能性が考えられる。

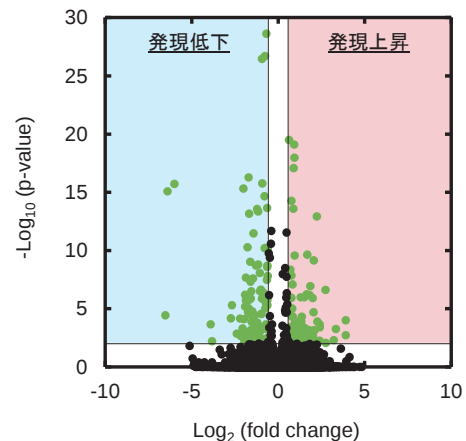


Fig. 2 緑藻変異株遺伝子の Volcano プロット

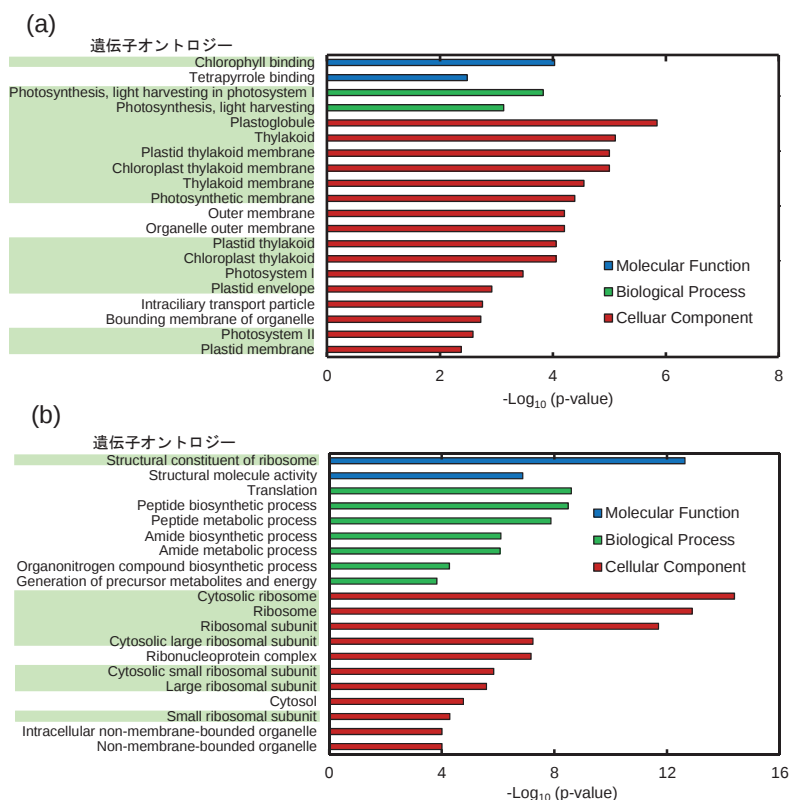


Fig. 3 緑藻発現変動遺伝子に対する GO エンリッチメント解析

1.4. 結言

C. reinhardtii と *S. cerevisiae* の共培養系に対して UV 照射による突然変異導入を行うことで、共培養系において高い増殖能をもつ *C. reinhardtii* 変異株 mt8 を作製することに成功した。私達の知る限り、本研究は、突然変異導入により、酵母との共培養系において緑藻の増殖能を向上させた初めての研究である。さらに、全遺伝子発現解析により、突然変異導入後に共培養時の緑藻増殖能が向上した原因の一端を解明した。緑藻と酵母の共培養は、大気中の希薄な CO₂ を固定化できる優れた特徴を有するため、今後もこのような共培養系による、CO₂ 固定化効率の向上に関する様々な研究が進展することが期待される。

1.5. 参考文献

- 1) Wang R et al. (2015) J Chem Technol Biotechnol 91:1387.
- 2) Karitani Y et al. (2024) Biotechnol Lett 46:431.
- 3) Liu S et al. (2015) Appl Biochem Biotechnol 175:3507.

2. 発表（研究成果の発表）

論文発表

1. Karitani Y, Yamada R, Matsumoto T, Ogino H (2024) Improvement of cell growth in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* through co-cultivation with yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett 46:431.
2. Karitani Y, Yamada R, Matsumoto T, Ogino H (2024) UV mutagenesis improves growth potential of green algae in a green algae-yeast co-culture system. Arch Microbiol 206:61.

学会発表

3. 井上義文、山田亮祐、松本拓也、荻野博康、*Komagataella phaffii* によるメタノールからの D-乳酸生産を目指した D-LDH 発現の検討、化

学工学会第 89 年会（堺、2024）

4. 仮谷柚希乃、山田亮祐、松本拓也、荻野博康、変異導入による緑藻・酵母共培養系における緑藻増殖能の向上、日本微生物生態学会第 36 回浜松大会（浜松、2024）
5. 井上義文、仮谷柚希乃、山田亮祐、松本拓也、荻野博康、D-乳酸生産メチロトロフ酵母と緑藻との共培養による D-乳酸生産性向上、日本微生物生態学会第 36 回浜松大会（浜松、2024）