

主論文の要約

論文題目 **Development of Single Cell Culture Systems for Cyanobacteria and its Application to Screening of their Valuable Mutants**
(藍藻の変異株スクリーニングに向けた液中孤立培養技術の構築とその応用)

氏名 新井 小百合

論文内容の要約

微生物によるバイオ燃料生産は、エネルギー消費が急速に増加している中で化石燃料枯渇という問題に立ち向かうために重要な戦略の一つである。これまで第1世代バイオ燃料として主にエタノールが使用されてきた。しかし、これらはトウモロコシやさとうきびを原料とするため、食料と競合してしまい、耕地に限られ人口が増加する地球にとって望ましくはない。そこで廃木材や稲わらなどのリグノセルロースバイオマス为原料として使用する第2世代バイオ燃料が期待されたが、廃木材や稲わら全体を利用することが難しく、まだ研究段階である。そのような背景の中、最近では第3世代バイオ燃料としてCO₂为原料として利用可能な藻類によるバイオ燃料生産が注目されるようになった。藻類を利用する利点としては、耕地以外の場所でもCO₂と光があれば増殖が可能で高価な原料が必要ないこと、廃CO₂の固定化によって空気の清浄化に貢献できることなどが挙げられる。

藻類の一種である藍藻は、遺伝子改変技術の進歩により、エタノール、イソプロパノール、イソブタノール、脂肪酸などバイオ燃料の生産に研究レベルで成功してきた。エタノールはエネルギー密度がガソリンの30%未満と低いため、長鎖アルコールや脂肪酸エステルがバイオ燃料として望まれ、近年ではそれらの生産報告例が増加している。しかし、産業化には藍藻による生産性向上が不可欠であり、メタボロミクスなどのオミクス解析技術と合成生物学を用いた新たな代謝経路の構築に加え、生産物に耐性を有する株やCO₂固定能が高く増殖が速い株など物質高生産が期待できる有用変異株のスクリーニングが求められている。

微生物変異株のスクリーニングには 1 細胞単離と各細胞の特性評価が欠かせない。ノーベル賞受賞者 Sydney Brenner が言った “Just ‘toothpicks and logic’ were enough for screening” のように、固体培地上でのコロニー単離というプロセスが必須であり、その後にマイクロプレートで各々を培養し、増殖評価や生産物検出のための酵素反応アッセイを行うことが主流であった。しかし、この方法では、多くの変異株候補から目的の表現型をもつ変異株を単離することに多くの時間を要した。

そこで、ハイスループットに変異株単離が可能な技術として、マイクロ流体技術を用いた液滴による単離法がこれまでに多く開発されてきた。液滴ベースの方法は 1 細胞をコンパートメント化でき、クロスコンタミネーションを避けることが可能であり、フローサイトメトリーを組み合わせることで膨大な数の液滴についてアッセイできる。また、この方法で物質高生産株をスクリーニングするため、酵素反応による蛍光検出の他、細胞内で実際に生産できる量を蛍光タンパク質発現で評価可能な転写制御因子やリボスイッチを利用したバイオセンサーが開発・利用されてきた。このように蛍光強度評価を指標とした変異株スクリーニング技術はハイスループット化が進んできた。

一方、このようなフローサイトメトリーを組み合わせた液滴ベースのスクリーニングでは、各液滴を固定したまま培養・観察することができないため、1 細胞からの増殖を経時的に追って評価することが難しい。そのため、転写制御因子やリボスイッチで生産量を抗生物質耐性シグナルに変換するバイオセンサー株や生産物に耐性を有する株など、増殖評価を指標とした変異株スクリーニングの効率化には適していない。そこで、1 細胞からの増殖を追うことができる培養・単離システムの開発が求められる。*Escherichia coli* や *Saccharomyces cerevisiae* では既に 1 細胞からの増殖を経時的にモニタリングできる培養法が報告されている。1 細胞が入ったチャンバーがアレイ状に並んだチップ上で増殖の様子を観察する方法や PDMS で作製した溝に 1 細胞をトラップして線状の溝内で連なって増殖する様子を観察する方法が例である。

しかし、藍藻においてはこのような単離培養法がほとんど報告されていない。特に藍藻は倍加時間が長く、乾燥の影響により寒天上でのコロニー形成率が低く、液体中での単離培養が望まれる。マイクロ流体技術を利用した液滴作製・培養・フローサイトメトリーによる選別を行った報告が近年出てきたが、1 細胞からの増殖をモニタリングできる培養手法の開発とその利用は未だない。今後、増殖評価ベースで高増殖能・物質耐性能などを有する株のスクリーニングを展開していくためには、液体中で効率的に単離培養し、増殖を経時的に追うことができる方法の開発が必要である。さらに、倍加時間が 7-12 h と増殖が決して速くはない藍藻には、数日間から 1 週間程度の長期培養が可能な方法の開発が求められる。

以上の理由から、本論文では、藍藻の一種でバイオ燃料生産に成功した報告がある *Synechococcus elongatus* PCC7942 をモデルとし、液体培地中で 1 細胞ごとに孤立させ、

長時間経時的に増殖を追うことができる培養法の構築を目指した。さらに構築した培養法を用いて、実際にアルコール生産性の向上が期待できるアルコール耐性株の取得を試みた。本論文では、背景を記述した第 1 章に引き続き、高撥水性スライドガラスを利用した液滴培養法の開発 (第 2 章)、さらに効率的な単離培養と長期間の増殖評価を目指し、磁性微粒子と磁力を利用した同一液中での孤立培養が可能な細胞アレイ培養法の開発 (第 3 章)、またその細胞アレイ培養法を用いたアルコール耐性株のスクリーニング (第 4 章) を行った。最後に第 5 章では総括を行った。以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 2 章では、1 細胞増殖を経時観察可能な液滴培養法の構築を目的とし、細胞毒性の低いオイルの選択と高撥水性スライドガラスを用いて作製した液滴中での増殖評価を行った。オイルとして細胞毒性が低いドデカンを選択し、ドデカンを重層した試験管培養において細胞増殖が促進されることを見出した。このことから、CO₂ 溶解度が高いドデカンにより CO₂ が濃縮され、培地中への供給が促進されることが示唆された。また、ドデカンを用いた液滴培養での比増殖速度は試験管培養の約 1.4 倍高いこと、液滴中での 1 細胞からの培養効率が固体培養法と比較して高いことを示した。さらに、1 cell/droplet からの 4 日間培養で培地中抗生物質の有無による増殖差が確認できた。以上の結果より、ドデカンと高撥水性スライドガラスを用いた液滴培養は、従来の固体培養法に比べて高い孤立培養効率で 1 細胞からの増殖評価が可能であり、変異株スクリーニングへの応用が期待できることを示唆した。

第 3 章では、より長時間の培養とハイスループット性・利便性の向上をめざし、同一液体培地中で細胞を孤立させる細胞アレイ培養法を構築した。まず、藍藻表面の糖鎖を認識して付着可能なタンパク質であるレクチンを探索し、そのレクチンを磁性微粒子 (MCL, Magnetite Cationic Liposome) に修飾した。作製した LCA (*Lens culinaris* 由来のマンノース特異的なレクチン) 修飾 MCL を細胞表面に付着させることで細胞を磁気ラベル化した後、ネオジム磁石上においた 6400 本のピラーを有する鉄製剣山状デバイス (ピラー幅 : 100 μm × 100 μm、ピラー間隔 : 150 μm) を用いて磁力でアレイ状に 1 細胞ずつパターンニングした。増殖した細胞が同じピラー状の LCA 修飾 MCL に付着していくことで 1 細胞からのコロニー状増殖を液体培地中で経時的に観察することに成功し、形成するコロニーの大きさによって増殖を評価した。細胞アレイ培養法では 2 ml の同一液体培地中であり、CO₂ 溶解による pH コントロールの難しさや乾燥という問題を解決できるため、7 日間の培養と増殖評価が可能で、さらに固体培養法では 4.8% であったコロニー形成率を 78.4% まで向上させることができた。また、細胞アレイ培養で形成したコロニーをガラスキャピラリーでピックアップし、その後に分離培養することにも 80% という高確率で成功した。細胞アレイ培養法では、1600 cells/cm² で孤立培養することができる上に、7 日間の培養と増殖評価が可能であったことから、液滴培養法 (第 2 章) の 45 cells/cm²、4 日間の培養と比較して、

利便性を向上させることができた。以上の結果から、細胞アレイ培養法では液体培地中でのハイスループットな 1 細胞単離培養が可能であり、増殖評価ベースの変異株スクリーニングに貢献できるツールであることが示唆された。

第 4 章では、生産の報告例があるバイオアルコールの一種、イソプロパノール (IPA) に耐性を有する株のスクリーニングを目的とし、第 3 章で開発した細胞アレイ培養法を用いた IPA 耐性株の取得を試みた。まず、*S. elongatus* PCC7942 に対して UV-C 照射によるランダム変異を誘発し、試験管培養で IPA 5 g/L 存在下における IPA 耐性株の濃縮培養を行った。その後再度 UV-C 照射と IPA 10 g/L 存在下での濃縮培養を行い、その条件で増殖した IPA 耐性を有する細胞集団の中から増殖が速い変異株を探索するために細胞アレイ培養法を利用した結果、IPA 耐性株 SY1043 を取得した。SY1043 は最大 30 g/L IPA 存在下でも増殖が可能 (野生株では 3 g/L まで増殖可能) であることがわかった。また、SY1043 は IPA による細胞膜のダメージを受けにくいために活性酸素種の発生を抑えることができ、IPA 耐性をもつことが示唆された。さらに、バイオアルコールとして期待されるエタノール、イソブタノール、1-ブタノール、ペンタノールに対しても高い耐性をもつことが明らかになった。以上の結果から、UV-C ランダム変異誘発と細胞アレイ培養法を組み合わせる方法で取得した SY1043 が様々なアルコール生産のための最適なホストになり得ることが示唆された。

以上のように、本論文では *S. elongatus* PCC7942 の液中孤立培養法として、ドデカンを用いた液滴培養法 (第 2 章) および細胞アレイ培養法 (第 3 章) を開発し、また、ランダム変異誘発と細胞アレイ培養法を併用することで様々なアルコールに高い耐性を有する変異株を取得した (第 4 章)。本論文で開発された液中孤立培養技術はこれまでにない利便性があり、従来法の問題点を解決できる可能性を秘めているため、今後、藍藻をはじめとし、固体培養法で単離培養の効率が低い多くの微生物スクリーニングに応用され、新たな機能性微生物の探索ツールとなることを願っている。また、この耐性株がバイオアルコール生産性の向上や藍藻におけるアルコール耐性機構の解明につながることも期待している。