氏名	淺田　遼
学位の種類	博　士（　学術　）
学位記番号	博　甲　第　8872　号
学位授与年月日	平成　30年　12月　31日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Autolysis Cells Induced by Phosphate Deficiency of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 （シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803のリン酸欠乏誘導性の自己溶菌細胞に関する研究）

主査	筑波大学教授	博士（農学）	鈴木石根
副査	筑波大学教授	博士（理学）	石田健一郎
副査	筑波大学教授（連携大学院）	農学博士	中嶋信美
副査	筑波大学助教	博士（理学）	吉田昌樹

論　文　の　要　旨

近年、オイルやバイオマスの生産性の高い微細藻類を用いた有用物質や石油代替燃料の生産の試みが、注目を集めている。バイオマス由来の燃料（バイオ燃料）はカーボンニュートラルで、その消費によってCO_2が排出されると見なされないので、温室効果ガスの排出を抑制するためにもその利用の促進が期待されている。しかしながら現状では、バイオ燃料の量産化・産業化にまでは到っていない。その理由のひとつが化石燃料に比べて、バイオ燃料の価格が高いためである。微細藻類による物質生産では、細胞内で合成され蓄積された産物を、細胞を回収し破砕抽出して産物を獲得する必要があり、この工程が全体のプロセスの中で多くのエネルギーを必要とする段階だと言われている。本論文で著者は、外界からの刺激により自発的に細胞が溶菌する仕組みを導入し、それにより微細藻類による物質生産のエネルギーコストの低減を目指し、その結果を総括している。

第一章で著者は、リン酸欠乏条件下で顕著に発現が誘導されるアルカリフォスファターゼ遺伝子（*phoA*）のプロモーターの下流に、サルモネラファージ由来の溶菌酵素遺伝子を連結した人工遺伝子群を導入した株を作製した。この株は、通常のリン酸充分な培養条件では、野生型やコントロールの*phoA*欠損株と同様に生育した。一方、この株をリン酸欠乏条件に移し1日培養すると、全体の細胞のおよそ9割が細胞壁が溶解して溶菌することを見出した。野生株や*phoA*欠損株では、リン酸欠乏条件においてもそのような細胞の溶菌は見られなかった。以上のことから、この株は培地からのリン酸の除去により溶菌遺伝子群を発現し、効率よく溶菌して細胞内容物を培地中に放出することが明らかにした。著者は、この株をlysis-inducible-cell; *lic*株と名付け、以下の実験に用いた。これまでにも、Ni^{2+}のような重金属イオンの添加や特定の波長の光をシグナルとして、溶菌を誘導する株が報告されていたが、著者が開発した培地中のリン酸をシグナルとするシステムは、繰り返し培養液を利用可能であり、且つ培養には太陽光を利用できる点でこれまでの手法に比べてメリットがある。この様な自己溶菌システムを用いて物質生産を行う場合、通常の培養条件で細胞が溶菌し、細胞内に蓄積された産物を培地に放出すると、産物が培地中に希釈されてしまうため、溶菌の前に細胞を回収して細胞濃度を増加し産物の希釈を防ぐことが重要である。これまでの取り組みではこのような試みはなされていなかった。そこで、著者はその手法の開発にも取り組んだ。まず、*lic*細胞を培養し濃縮して細胞濃度を高め、培地に残存す

るリン酸を消費させ溶菌の効果を検証したが、この方法では溶菌の誘導に4日を要し溶菌の程度も僅かであった。同じ条件で野生株のアルカリホスファターゼ活性の誘導状態を調べたところ、誘導された活性は低く別の方法を見出す必要があった。そこで培養により培地中のリン酸を消費し、そのまま5時間細胞濃度の低いままリン酸欠乏条件におき、その後細胞を濃縮した場合は、野生株で顕著なアルカリホスファターゼの活性誘導が見られた。その条件で*lic*株を培養したところ、16時間後に90％以上の溶菌が認められ、細胞濃度を高めた条件で溶菌をおこさせることに成功した。以上の結果から、著者は*lic*株を用いた効率的な誘導性の自己溶菌システムを構築したと結論した。

将来、*lic*株を実用規模の培養で用いる場合には、遠心分離によらず自然沈降で細胞の回収、濃縮ができることが望ましい。第二章で著者は、この細胞の沈降性について解析し、野生型や*phoA*の欠損株には見られないユニークな性質を見出した。まず*lic*株の細胞が、培養のステージによらず、野生株などに比べて細胞半径でおよそ15-20％大きいことに気づいた。そこで細胞の比重を測定したところ、*lic*株では有意に比重が大きいことを見出した。同じ遠心分離の条件でも、*lic*株は他の細胞に比べてより速く沈降する性質を持っており、このことは細胞回収の過程で極めて有利な表現型であることを示した。最後に著者は、*lic*株を用いた連続的な培養システムを提案している。まず、*lic*株をリン酸充分な条件で、通常の細胞と同様に培養しバイオマスを蓄積する。細胞の増殖により培地中のリン酸を消費し、自発的に溶菌のフェーズに移行させる。その後沈降しやすい性質を活かして、自然沈降により細胞を沈降させ、上清の培養液を除去し残った培養液中に放出された産物を収穫する。回収した培養液は、リン酸や他の無機栄養塩を添加することで再利用が可能である。細胞の溶菌により細胞から核酸などが放出されると、核酸に含まれるリン酸が他の細胞に利用されるため全細胞が溶菌してしまうことはない。生存した細胞を再利用した培地へ植え込むことにより、培養と物質生産が再度可能である。著者の結果に示されたような自己溶菌細胞を用いた培養システムが構築できれば、細胞の回収と産物の抽出のエネルギーコストを軽減することができ、微細藻類を用いた物質生産の社会実装に貢献すると期待できる。

審　査　の　要　旨

微細藻類から産物回収の効率向上ため、著者は培地中のリン酸欠乏条件により誘導される細胞の自己溶菌システムを開発した。産物の回収を容易にするため、細胞を濃縮したのち溶菌を誘導する方法についても本論文に述べられている。また著者は、研究の過程でこの溶菌系遺伝子を導入した株が野生株に比べて有意に肥大し、細胞密度・沈降速度が増加していることも見出し、これらの性質を利用する事で細胞の回収・破砕のエネルギー投資を低減した培養方法について提案している。これらの成果は、将来の微細藻類を用いた物質生産に有益な知見を提供し、当該分野の発展に大きく貢献したと評価できる。

平成３０年１１月２１日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。