



九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：2209089R

BL番号：BL09

(様式第5号)

シンクロトロン光照射を利用した微生物の有用株取得 (実験4)
Acquisition of useful micro-organisms strains by using the mutagenesis method
by synchrotron irradiation (Study 4).

木村圭・吉田和宏・中島菜々子・前田伊央莉
Kei Kimura, Kazuhiro Yoshida, Nanako Nakashima, Iori Maeda

佐賀大学農学部
Faculty of Agriculture, Saga University

- ※1 先端創生利用(長期タイプ)課題は、実施課題名の末尾に期を表す(I)、(II)、(III)を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開(論文(査読付)の発表又は研究センターの研究成果公報で公表)が必要です(トライアル利用を除く)。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください(各実験参加機関より1人以上)。

1. 概要 (注: 結論を含めて下さい)

珪藻類は赤潮や環境浄化等に関与する重要な海洋微生物である。過去の知見では、様々な突然変異誘発法によって、微生物の有用物質高生産変異株が取得されてきたが、変異原としてシンクロトロン光を用いて有用微生物株に変異を導入した実例は少なかった。我々は、これまでにシンクロトロン光の照射によって有用形質を持つ酵母株や紅麹菌、珪藻の取得に成功してきた。今回は、珪藻を実験対象に、シンクロトロン光による変異誘発によって、DNAウイルス抵抗性珪藻株の取得を試みた。まず、これまでの研究で確立した、微生物に適した吸収線量の照射による、珪藻の死滅率を確認した。つづいて、珪藻のDNAウイルス抵抗性能獲得株の選抜を行った。しかしながら、本研究ではDNAウイルス抵抗性珪藻の取得には成功しなかった。同じ珪藻株では、複数のRNAウイルス抵抗性株取得に成功していることから、DNAウイルス抵抗性能獲得は、RNAウイルスのそれに比べて複雑であり、困難である可能性が考えられた。

(English)

Diatoms are important marine microorganisms involved in red tide and environmental purification. In the past, various mutagenesis methods have been used to produce mutant strains of microorganisms with high production of useful substances, but there have been few examples of mutagenesis using synchrotron radiation as a mutagen to introduce mutations into useful strains. We have succeeded in obtaining yeast strains, red yeast fungi, and diatoms with useful traits by synchrotron radiation. In this study, we tried to obtain DNA virus-resistant diatom strains by mutagenesis using synchrotron radiation. First, we checked the death rate of diatoms by irradiation at an absorption dose suitable for microorganisms, which we have established in our previous studies. Then, we selected strains of diatoms that had acquired DNA virus resistance. However, we did not succeed in obtaining DNA virus-resistant diatoms in this study. Since several RNA virus-resistant strains were successfully obtained from the same diatom strain, it is possible that the acquisition of DNA virus resistance is more complex and difficult than that of RNA viruses.

2. 背景と目的

本研究は、令和元年度以降、継続的に実施してきた研究「シンクロtron光照射を利用した微生物の有用株取得」の継続実験である。

佐賀大学農学部応用微生物学研究室、藻類・ベントス学研究室では清酒酵母、麹菌、乳酸菌、微細藻類など様々な微生物を対象に研究を行なっている。これらの微生物は産業・工業分野において広く利用されており、また水圏環境分野ではその機能を解明する研究が行われている。酒類や発酵食品など、食品に微生物が関与する製品の場合、消費者が食品に対して求める良好な香味、あるいは機能性は、微生物が産生する物質に起因することが多い。そのため、有用な特徴を有する微生物の探索は、食品分野での産業利用に直結する。また水圏環境分野では、微細藻類などの微生物が環境浄化等にも関与しており、これらの機能解明、有用株作出も注目を浴びている。

我々は、有用微生物の取得のために、自然界からの微生物を分離し、分離株の育種を行っている。微生物の育種改良法には、選抜育種、遺伝子組換え技術、変異処理技術等があるが、食品に利用される微生物の育種改良には、変異処理技術を用いる例が多く見られる。微生物に対する変異処理では、エチルメタンスルホン酸 (EMS) やニトロソグアニジン (NTG) 等の化学薬品変異剤の利用、紫外線 (UV) の照射等が一般的であり、他にイオンビーム照射による変異誘発も散見される。しかしながら、シンクロtron光の照射による変異誘発事例の報告は非常に少なく、またシンクロtron光照射による変異誘発機構も十分に解明されていない。一方で、シンクロtron光照射は、既存の変異処理技術とは異なる手法であるため、変異の起こり方が他の手法と異なり、特有の変異株を取得できる利点も期待できる。

これまでの研究から、清酒酵母を用いたシンクロtron光による有用性変異株取得例はあるが⁽¹⁾、微細藻類の珪藻類においてはまだ論文としての報告例はない。そこで本実験では、微細藻の珪藻を対象として、シンクロtron光照射により有用な特徴を有する珪藻の取得を目指す実験を実施する。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

実験材料

本実験に供する微生物株は、以下のものを用いた。

<珪藻> 有明海産 *Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10株

シンクロtron光照射の条件

変異誘発の為のシンクロtron光照射では、入射エネルギーを一定に保ちつつ、光の照射強度をフィルター (アルミ厚) により調整することで、照射エネルギーを変えて実験を行った (表1)。(条件 (アルミ厚等) は、九州シンクロtron光研究センターのスタッフと相談により決定した、過去の実験条件を採用した。)

珪藻 Cten2-10 株細胞 (約 2.0×10^6 cells/mL) を Modified SWM-3 培地に懸濁し、この液を 5ml ずつポリスチレン製プラスチック試験管内に入れ、キャップをした密閉状態で可動式作業台に粘着テープで固定し、各条件で照射を行なった。実験終了後、試料は佐賀大学農学部の研究室へ速やかに持ち帰り、以下の作業を行なった。

表1. プラスチック試験管内の懸濁液試料に対する照射条件

吸収線量 (Gy)	0	5	20	50	100	300
アルミ厚 (mm)	照射なし	1.70	0.92	0.52	0.30	none

シンクロトロン光照射後の培養（死滅率測定と変異処理手法の確立）

珪藻2-10株細胞にシンクロトロン光を照射後、各照射条件の試料をModified SWM-3培地で1/10ずつ段階的に希釈し、96穴培養プレート内に各希釈段階の液を100uLずつ分注して、7日間20°C100umol m⁻¹ S⁻¹の光（12:12=L:D）条件で培養した。培養後、96穴培養プレートで増殖細胞が確認できたwellを確認し、各条件で生育可能な希釈段階から計算によって照射直後の生残細胞数を求めた（限界希釈法）。照射した試料と照射していない試料の生残細胞数を比較することで、各吸収線量での死滅率を求めた。

シンクロトロン光照射後の培養（有用株の選抜）

＜ウイルス抵抗性珪藻株の選抜＞

珪藻*Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10株は、珪藻ウイルスのCten DNA virus type-IIを接種する事で、約1週間後に完全に死滅することがわかっている。

100 Gy, 300 Gyの線量のシンクロトロン光照射後のCten2-10株を滅菌フラスコ内に集め（約500 mL）、珪藻ウイルスのCtenDNA virus type-IIを5 ml摂取し、48穴培養プレート10枚（各ウェルに1 mL）に分注して2週間培養した。生残したコロニーをウイルス抵抗性能獲得候補株として分離し、さらに、形質が安定するまで継代することで、ウイルス抵抗性能獲得株の分離を試みることにした。

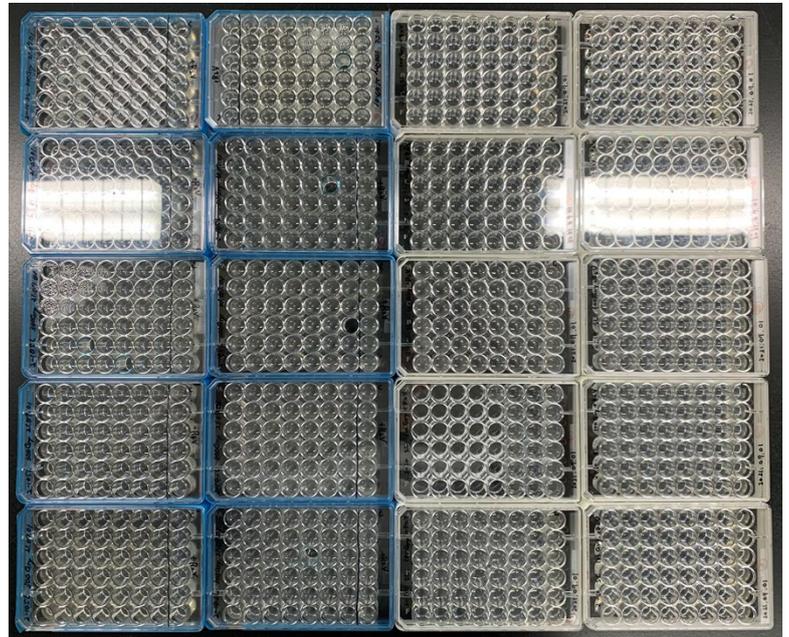


図1：プレートによるウイルス抵抗性珪藻株の分離の例

4. 実験結果と考察

吸収線量毎の死滅率

＜珪藻 Cten2-6 株、2-10 株の死滅率＞

珪藻 2-10 株について、シンクロトロン光照射を行った結果、図2に示すように、吸収線量が大きいほど、死滅率が高くなることを確認した。これはこれまでの結果と同様である。前々回、前回、今回の実験結果において、300 Gy 以上で安定して95%以上の死滅率があり、再現性があることが分かった。一方で、100 Gy における死滅率は今回が84%程度であり、前々回の40%台、前回の80%台と実験によって変動があった。これは、毎回変化する培養条件や照射実験条件の微妙な違いが影響していると考えられる。いずれにせよ、数回の繰り返し実験により、本珪藻の変異誘発実験で

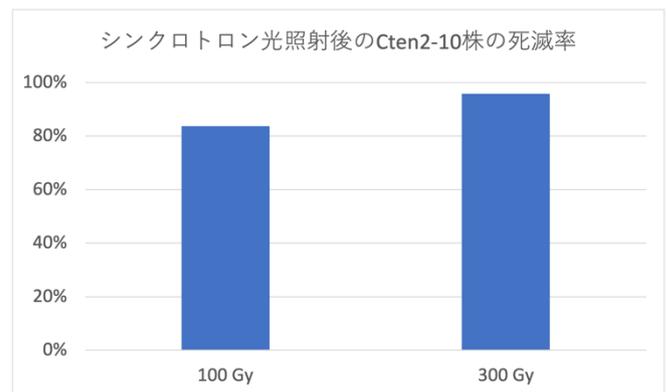


図2：Cten2-10株の各吸収線量における死滅率

は、高効率で変異を起こす300 Gyと、それよりは弱い条件となる100 Gyで、安定的に変異誘発実験が可能であることを確認しており、今後も本珪藻ではこの条件で実験を行うことが良いと考えられる。

シンクロトロン光照射による有用株のスクリーニング

シンクロトロン光照射後の珪藻 Cten2-10 株に、珪藻ウイルス CtenDNA virus type-II を接種し、2 週間以上培養した結果、48 穴培養プレートのウェル中に、ウイルス感染から生残してくるコロニーは確認されなかった。前回の実験では、約 4 億細胞の珪藻 Cten2-10 株にシンクロトロン光を照射し、その後、珪藻ウイルス CtenRNA virus type-II を接種することで、5 株のウイルス抵抗性クローンを取得している。今回は、約 9 億細胞の珪藻にシンクロトロン光を照射し、DNA ウイルス抵抗性株取得を試みたが、1 株も抵抗性株を取得できなかった。このことから、DNA ウイルス感染に関連する遺伝子群は、RNA ウイルスのそれに比べ複雑であり、DNA ウイルス抵抗性株の取得が、RNA ウイルスに比べて困難である可能性が考えられる。

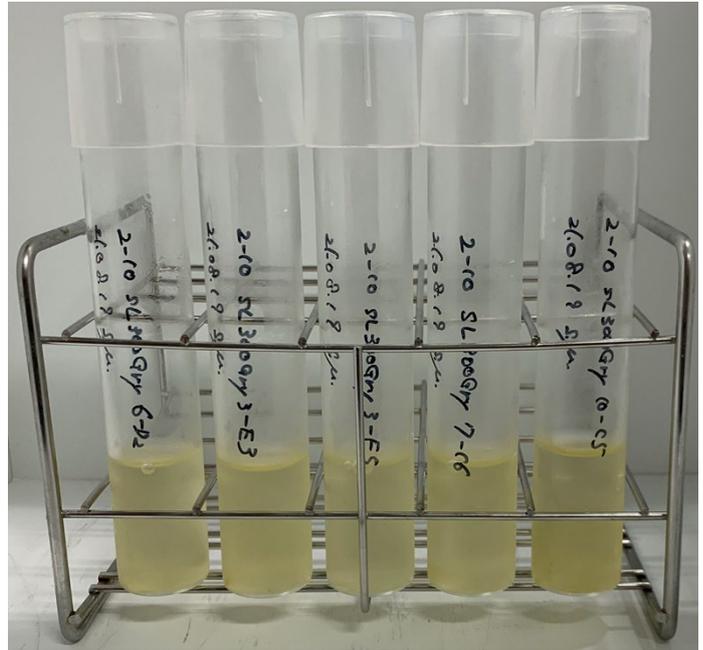


図 3：分離したウイルス抵抗性能獲得株

ところで、以前の実験では、実験中にバクテリアの増殖が確認され、珪藻株の増殖が不安定になることが確認された。これは煩雑な実験を実施する過程を簡略化するために、無菌系での実験を実施しなかった事により、バクテリアが混入したものと推察されていた。バクテリアの混入により、ウイルス感染性には変化が生じることが報告されていることから²⁾、この事態を避けるため、前回、今回の実験では、培養、照射、選抜培養の全ての過程で無菌を維持することに努めた。結果的に、シンクロトロン光照射後にバクテリアの大規模な混入は確認されておらず、厳密な無菌環境下で実験を実施することは、珪藻のウイルス抵抗性株取得の上で重要な要件であると考えられる。

5. 今後の課題

珪藻ウイルス CtenDNA virus type-II の取得の再挑戦と性状解析

今回のシンクロトロン光照射では、CtenDNA virus type-II に対する抵抗性を示す Cten2-10 株の選抜に成功しなかった。一方で、同手法で Cten RNA virus type-II に対する抵抗性株は取得できていることから、今後も同手法を用いて、CtenDNA virus type-II に対する抵抗性珪藻の取得に挑戦したい。

また、Cten RNA virus type-II に対する抵抗性株 (Cten 2-10-SL-R2VR シリーズ株) については、その後の研究により、5 株のウイルス抵抗性無菌株の確立につながっており、さらにゲノムの比較解析も実施している (図 4)。また、この解析による、ウイルス抵抗性に関与する遺伝子の特定には至っていないが、変異株取得から遺伝子の特定への道筋を示すことには成功している。今後、CtenDNA virus type-II に対する抵抗性珪藻の取得に成功した時は、この研究と同様にゲノム比較解析を実施し、ウイルス抵抗性に関与する遺伝子の特定に挑戦する計画である。

Mutants	Number of mutation	Single nucleotide substitution	Indels	Insertion	Deletion	Rate of single nucleotide substitutions(%)	Rate of Indels(%)
2-10R2VR_SL-6	312,410	277,200	35,210	18,070	17,140	88.7	11.3
2-10R2VR_SL-12	317,120	281,600	35,520	18,220	17,300	88.8	11.2
2-10R2VR_SL-19	266,360	236,100	30,260	15,410	14,850	88.6	11.4
2-10R2VR_SL-20	264,900	234,700	30,200	15,410	14,790	88.6	11.4
2-10R2VR_SL-21	268,050	237,300	30,750	15,700	15,050	88.5	11.5

図 4：Cten RNA virus type-II 抵抗性珪藻株のゲノム比較の結果

6. 参考文献

- (1) Baba, S., et al. (2021) Breeding sake yeast and identification of mutation patterns by synchrotron light irradiation. *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 265-270.
- (2) Kimura K, Tomaru Y (2014) Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. *Aquat Microb Ecol.* 73:69-80.

7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

現在、投稿中の論文等はないが、研究成果が得られれば速やかに論文にて公表する予定である。

8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を2~3)

珪藻、珪藻ウイルス、ウイルス抵抗性株

9. 研究成果公開について (注: ※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末(2021年3月31日)となります。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期: 2025年 3月 予定)