



Title	Identification and Overexpression of Genes in Escherichia coli that Enhances the Growth of Chlorella sorokiniana under Co-cultivation
Author(s)	Yi Tong, Cheah
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105407
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (CHEAH YI TONG)	
Title	Identification and Overexpression of Genes in <i>Escherichia coli</i> that Enhances the Growth of <i>Chlorella sorokiniana</i> under Co-cultivation (共培養下で <i>Chlorella sorokiniana</i> の生育を促進する大腸菌遺伝子の同定と過剰発現)
<u>Abstract of Thesis</u> Chapter 1: Introduction Monoculture of microalgae often suffer from low cell density and high contamination risk, driving renewed interest in bacterial co-cultivation to boost biomass. Yet most studies overlook the metabolic crosstalk. Therefore, this research investigates bacterial roles and streamlined genomes in cross-kingdom signaling. Chapter 2: KEIO knockout collection reveals metabolomic crosstalk in <i>Chlorella sorokiniana</i>-<i>Escherichia coli</i> co-cultures An <i>Escherichia coli</i> single gene knockout mutant library was used to systematically screen for genes involved in the interdependence of <i>Chlorella sorokiniana</i> and <i>E. coli</i> . 31 potential algal growth-promoting and 56 growth-inhibiting genes out of 3,985 genes were identified that enhanced and diminished the production of algal chlorophyll- <i>a</i> content, respectively. KEGG mapping of these growth-regulating genes suggested a metabolic symbiosis involving bacteria-derived cobalamin, biotin, riboflavin, and 2,3-butanediol. Chapter 3: Impacts of riboflavin-overproducing engineered <i>Escherichia coli</i> towards <i>Chlorella sorokiniana</i> growth in optimized co-cultivation approach The <i>E. coli</i> <i>zwf</i> and <i>fbp</i> genes were co-expressed in <i>E. coli</i> BL21(DE3) via pETDuet-1, resulting in an increased riboflavin level in 100% bacterial medium supernatant. Its 10-days-long co-cultivation with <i>C. sorokiniana</i> has enhanced the algal specific growth rate, cell size, pigment productivity, extracellular carbohydrate productivity, and lipid productivity by at least 2-fold. Riboflavin's effect peaked during the first two days, followed by cell adaptation (D2-D4), slower division (D4-D10), and metabolite accumulation (D6-D10). Chapter 4: Elevated biomass and lipid productivity in <i>Chlorella sorokiniana</i> co-cultured with vitamins-overproducing <i>Escherichia coli</i> The engineered <i>E. coli</i> strain, RS04, overexpressing riboflavin, cobalamin, and biotin biosynthesis-related genes enhanced the algal growth by at least 5 times within 7 days. The synergistic effects were encouraging when the co-culture managed to give high microalgal-to-bacterial ratio of 6.2, which was 5-fold higher than the control. Co-cultures yielded a wider variety of fatty acids, with C16-C18 more than 56%, while perfectly met all the international criteria of biodiesel properties. Chapter 5: Conclusion and future perspectives In summary, genome-wide high-throughput screening identified interactive bacterial metabolites in the algal, enabling validation via metabolic engineering techniques. It enables the establishment of a synergistic effect study, where engineered bacteria enhanced algal growth under various cultivation setups. <u>List of Publications:</u> C. Y. Tong , H. Tomita, K. Miyazaki, C. J. C. Derek, K. Honda, KEIO knockout collection reveals metabolomic crosstalk in <i>Chlorella</i> spp.- <i>Escherichia coli</i> co-cultures. <i>Journal of Phycology</i> , 61, 443-462, 2025. C. Y. Tong , H. Tomita, K. Miyazaki, C. J. C. Derek, K. Honda, Impacts of riboflavin-overproducing engineered <i>Escherichia coli</i> towards <i>Chlorella sorokiniana</i> growth in co-cultivation approach. <i>Algal Research</i> , 86, 103938, 2025.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (CHEAH YI TONG)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	本田 孝祐
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	清水 浩

論文審査の結果の要旨

本論文の第1章では、光合成独立栄養生物の1グループである微細藻類について、CO₂を原料とした低炭素型の有用物質生産プラットフォームとしての展望と、その技術的課題について述べている。微細藻類を用いた物質生産の課題として、細胞の増殖速度の遅さとそれに伴う目的物質の生産速度の低さを取り上げ、その解決策の一つとして、従属栄養性の細菌との共培養による微細藻類の増殖促進をはかった研究事例が紹介されている。細菌との共培養による微細藻類の増殖促進は数多くの研究報告がなされている一方で、その分子メカニズムについては、十分な理解がなされていない。こうした背景のもと、本論文では共生パートナーである細菌の遺伝子、特に微細藻類の増殖促進に関わると考えられる代謝物の生合成遺伝子の同定に焦点を当てた研究が展開された旨が記されている。

第2章では、大腸菌1遺伝子ノックアウト株ライブラリーであるKeioコレクションを用いた網羅的遺伝子探索研究を実施している。この結果、藻類のクロロフィルa含有量を増減させうる31個の藻類成長促進遺伝子と56個の成長抑制遺伝子を見出している。また、これらの遺伝子が大腸菌代謝経路上にマッピングし、大腸菌由来のコバラミン、ビオチン、リボフラビン、2,3-ブタンジオールの高生産に伴う微細藻類の増殖促進の可能性を示している。

第3章では、2章で同定された4種の細菌由来代謝物のうち、リボフラビンに注目し、同物質の生産能を高めた代謝改変大腸菌株の作出と同株による微細藻類増殖促進効果の検証に取り組んでいる。まず大腸菌の *zwf*、*fbp* 遺伝子の過剰発現により、培養液中のリボフラビン濃度を約2倍に向上させている。ついで同大腸菌とクロレラ属藻類 (*Chlorella sorokiniana*) との共培養により、対照群と比較して、*C. sorokiniana* の比増殖速度、細胞サイズ、色素生産性、細胞外炭水化物生産性、および脂質生産性が、少なくとも2倍に向上することを示している。

第4章では、リボフラビンに加え、コバラミン、ビオチンの生産力価を高めた大腸菌代謝改変株を作成し、同株と *C. sorokiniana* の共培養による増殖促進効果を検証した。得られた代謝改変大腸菌株は、7日間の共培養で *C. sorokiniana* の増殖を5倍以上に高めることが明らかにしている。また同共培養系において、リボフラビン、コバラミン、ビオチンの3つのビタミン分子が *C. sorokiniana* に取り込まれるタイムプロファイルを明らかにしている。

第5章は、本博士論文研究で示された細菌との共培養および同細菌の代謝改変による微細藻類の増殖促進効果とその分子メカニズムについて総括がなされるとともに、微細藻類由来の有用物質の一つである脂質についてバイオディーゼル生産に焦点をあてて議論が行われている。

以上のように、本論文は大腸菌1遺伝子破壊株を用いた網羅的スクリーニングにより、微細藻類の増殖促進に効果的な遺伝子を同定することで細菌・微細藻類の共培養系におけるケミカルクロストークの一端を明らかにしたものである。一連の成果は、微細藻類による有用物質生産の増産に向けたアプローチの一つとして期待される細菌共培養システムの有効性に科学的根拠を与えるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。