

生物工学 Web シンポジウム 2020

講演要旨集

会期：2020年9月2日（水）・9月3日（木）

受賞講演：生物工学賞・生物工学功績賞・生物工学技術賞
生物工学奨励賞（江田賞・斎藤賞・照井賞）

シンポジウム：WS1～WS13



公益社団法人日本生物工学会

TEL. 06-6876-2731 FAX. 06-6879-2034

E-mail: info@sbj.or.jp

<https://www.sbj.or.jp>

有用微生物酵素の探索とバイオプロセス開発への応用研究

木野 邦器*

早稲田大学 先進理工学部 応用化学科

Search for useful microbial enzymes and applied research for bioprocess development

Kuniki Kino*

Department of Applied Chemistry,
School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

*kkino@waseda.jp

The material conversion process using various functions of microorganisms is energy saving, excellent in environmental harmony, and enables reaction and precise synthesis which are difficult with chemical catalysts. Therefore, there are strong expectations for the development of innovative bio-processes for the realization of sustainable society. Recently, the progress of biotechnology has been remarkable, with the utilization of genome information and the development of high-speed and high-accurate analysis equipment, and the development of methods for searching useful functions of microorganisms and their application technologies has been actively promoted. Based on this background, we have conducted research on useful enzymes and their functional modification, as well as research on the development of efficient bio-processes for the production of useful substances.

1. はじめに

生存戦略に基づいて備わった微生物の特有の機能は、それを微生物に求めて裏切られることのないほど多種多様であり、これまでに開発されたバイオプロセスは、そのごく一部の機能やシステムを利用しているにすぎない。目的の生理活性を有する微生物や酵素は、巧みな技術を構築して自然界から取得するのが最も魅力的で効果を期待できるが、多大な労力と時間とコストがかかる。一方、ゲノム解析技術も画期的な発展を遂げ、その解析情報に基づく目的酵素遺伝子の探索も可能になり、ゲノム編集や遺伝子改変技術によってさらに効率的に機能を向上させることもできるようになってきた。

そこで、我々は従来法に加えてゲノム情報を利用する方法も駆使しながら、新たな有用酵素の探索とそれらを利用した効率的な物質生産プロセスの開発研究を行ってきた。

2. 微生物や酵素の特性に学ぶ新規酵素の探索と有用物質生産プロセスの開発

工業的に有用な酸化酵素である P450 酸化酵素はゲノム解析株からはその配列情報に基づいて容易に探索が可能であり、ライブラリー化することができる。酵素と同様基質

特異性も多様であるが、一酸素原子が付加される反応であることに着目して、高精度質量分析器を用いて酵素の基質特異性を決定する方法を開発した。P450 酵素の機能改変や補酵素非依存的酸化酵素を利用した新規生合成経路構築によるバニリン生産にも成功した。アミノ酸を位置立体選択的に酸化する新規 2-オキシグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼも酵素の反応特性とゲノム情報を駆使して多数見出しており、*cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン生産は菌体反応系による効率的生産法として工業化を達成した。また、無保護のアミノ酸から ATP 依存的にジペプチドを合成するアミノ酸リガーゼを数多く発見した。それら酵素やその改変酵素を用いて、動脈弛緩による血圧降下や塩味増強効果を有するジペプチドを発見する他、抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドの菌体反応系による ATP 無添加系での効率的生産法を開発した。さらに、微生物の産生するペプチド性抗生物質を産生する微生物から世界で初めてトリペプチドやテトラペプチドなどのオリゴペプチド合成酵素を発見した。また、非リボソーム型ペプチド合成酵素を構成するアデニル化ドメインを利用した任意のペプチド合成法を開発した。これは、アミド結合形成反応を触媒する新規な化学酵素的合成法であり、多様なアミド化合物の合成を可能にした。その他、D-, L-アミノ酸が任意に結合したジペプチドの合成をはじめ、脂肪酸やケト酸、フェルラ酸を母体とする多様なアミド化合物合成も可能となった。

3. まとめ

無限の可能性を有するバイオによって描かれる大きな夢は、その実現に向けた独創的な発想と巧みな戦略によって、新たな機能を有する酵素の発見や酵素反応システムの開発、さらにはそれら代謝系を有する次世代型産業微生物の開発に繋がると考えている。効率的なバイオプロセスの高度活用が来るバイオエコノミー社会に貢献するであろう。

4. 文献

1. Furuya, T., and Kino, K.: Genome mining approach for the discovery of novel cytochrome P450 biocatalysts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 991–1002 (2010).
2. Furuya, T., Miura, M., and Kino, K.: A Coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase cascade for the efficient synthesis of vanillin, *ChemBioChem.*, 15, 2248–2254 (2014).
3. Hara, R., and Kino, K.: Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 4771–4779 (2020).
4. Kino, K., Arai, T., and Tateiwa, D.: A novel L-amino acid ligase from *B. subtilis* NBRC3134 catalyzed oligopeptide synthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 129–134 (2010).
5. Suzuki, S., Hara, R., and Kino, K.: Production of aminoacyl prolines using the adenylation domain of NRPS with class III polyphosphate kinase 2-mediated ATP regeneration, *J. Biosci. Bioeng.*, 125, 644–648 (2018).
6. Hara, R., Hirai, K., Suzuki, S., and Kino, K.: A chemoenzymatic process for amide bond formation by an adenylation enzyme-mediated mechanism, *Scientific Rep.*, 8:2950 (2018).
7. Kano, S., Suzuki, S., Hara, R., and Kino, K.: Synthesis of D-amino acid-containing dipeptides using the adenylation domains of NRPS, *Appl. Environ. Microbiol.*, 85: e00120-19 (2019).

生物化学工学分野における動物細胞工学に関する研究

大政健史^{1*}

¹大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

Biochemical engineering in mammalian cell technology

Takeshi Omasa^{1*}

¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University,

*omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Biochemical Engineering is concerned with conducting biological processes on an industrial scale, providing the link between biology and chemical engineering. Biochemical engineering was developing with the microbial production process, however, recently with mammalian cell culture process and technology for a growing market of the therapeutic protein. Mammalian cell lines are important host cells for the industrial production of biologics owing to their capacity for correct folding, assembly, and post-translational modification. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most dependable host cells for the industrial production of therapeutic antibodies. Growing demand for therapeutic proteins promotes the development of technologies for high quality and productivity in CHO production systems including cell engineering and cell culture engineering. Nowadays, among the therapeutic antibodies launched in the commercial markets, CHO cells produce about more than 50% of these. However, the rational design for cell and cell culture engineering has not been established well. I focused on CHO cell engineering, including cell cycle-engineering, control of post-translational modification, product aggregation during the cell culture process, and stability of CHO cell chromosome for the recent 30 years. In this presentation, I will introduce and discuss the recent developments of the mammalian cell process for the production of biologics.

1. はじめに

今でこそ当たり前前に用いられている動物細胞培養技術であるが、細胞培養の黎明期においては、生体外において細胞を培養するということが、特別な技術として取り扱われていた。生物化学工学は、化学工学の概念を生物プロセスに展開し、産業応用するための学問と位置付けられるが、動物細胞を対象とした生物プロセスの生物化学工学的研究は比較的新しく、1980年代の半ばから本格的に研究が開始された。

2. 生物化学工学分野における動物細胞工学

生物化学工学分野における動物細胞工学は、細胞を生産の媒介として利用する手段と、細胞そのものが生産物として利用する手段に大別できる。ここでは、前者の手段を用いてバイオ医薬品（バイオリジックス）を生産するプロセスを主として取り上げる。バイオ医薬品の特徴は、その高機能性と薬効の高さもさることながら、その生産の難しさに

も特徴がある。バイオ医薬品の製造プロセスの多くは生物（微生物、動物細胞等）を利用する手段が用いられており、生物そのものの不確実性や、生産物が持つ本質的な不均一性などを解決し、Rational なデザインを実現していくことが真に求められている。高等真核生物は、複雑な分子も生産可能であるが、生産に用いる工業用生物が複雑であればあるほど、その生物自身を自在に操り、さらにこれを統括する工学的体系も高度なものが求められる。講演者が初めて細胞培養技術に触れたのは、30年以上前になるが、当時の技術は、まだ職人芸的なものであり、工学的に体系化された領域ではなかった。本領域に、微生物で培われた生物化学「工学」の考え方が導入され、微生物の完全混合槽での深部培養（攪拌培養）としての取り扱いが動物細胞培養において応用され、体系化されることで、現在の産業応用が実現されてきていると言える。

特に近年著しい抗体医薬等は、その複雑な構造や糖鎖などの翻訳後修飾のため、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に代表される動物細胞培養株が用いられている。CHO 細胞は、バイオ医薬品生産において、大腸菌に次いで用いられる宿主であるが、これまで生産技術においては、CHO 細胞自身は「ブラックボックス化」として取り扱われてきた。そこで、講演者は特に生物化学工学的見地から、CHO 細胞とその産業応用に焦点を絞り様々な研究を行ってきた。具体的には、CHO 細胞を用いたプロセスを対象にし、高生産性細胞の効率的な取得方法、細胞周期チェックポイントエンジニアリングによる生産細胞構築法、蛋白質の品質管理機構として翻訳後プロセスに着目したセルエンジニアリングなどの研究開発を行ってきた。また、生産された生産物の品質制御としての糖鎖制御や凝集性制御、細胞内における抗体生産プロセスボトルネック解消を目指した細胞内抗体解析、さらには CHO 細胞自身の染色体の解析を通して、世界初の遺伝子増幅 CHO 細胞由来染色体 BAC ライブラリーの構築、その応用としての不安定性の解析や染色体数の細胞の性質に及ぼす影響の検討、CHO 細胞そのもの持つ不均一性、多様性の解明とそれを通じた産業応用についても精力的に研究を進めている。また、研究と連動する形で、日本生物工学会における動物細胞の産業応用分野の確立と活性化についての研究部会活動、関連研究分野を含めた産官学連携研究としての AMED 研究開発プロジェクト等を主導している。

3. まとめ：受賞講演にあたって

現在示されている第五期科学技術基本計画においても、我が国は個別の製品や要素技術で強みを持つものの、それらを組み合わせ、統合したシステムとしてデザインする力が十分ではなく、その強みを生かし切れていないとも指摘されている。将来にむけて新たな価値を創造し、次世代の産業を創造していくためには、先進的な要素技術のみならず、生物化学工学的見地から統合的な研究開発が必要であり、今後も本分野における研究開発や、人材育成を通して、世界へ発信し続けたいと考えている。本講演では、生物化学工学分野における動物細胞工学、培養からセルエンジニアリングまでを、自身の研究を振り返りながら、特にバイオ医薬品生産における分野について総括したい。

無細胞タンパク質合成系を利用した 迅速抗体スクリーニング技術開発とその実用化

加藤晃代^{1*}, 中野秀雄², 兒島孝明², 永井里美^{1**}

¹iBody 株式会社, ²名古屋大学

(*現, 名古屋大学, 日本マイクロバイオファーマ株式会社, **元 iBody 株式会社)

Development of robust and rapid monoclonal antibody screening technology using cell-free protein synthesis

Teruyo Ojima-Kato^{1*}, Hideo Nakano², Takaaki Kojima², Satomi Nagai^{1**}.

¹iBody Inc., ²Nagoya University

*teruyo.ojima@gmail.com

Abstract. Monoclonal antibodies (mAbs) are essential tools for therapeutics, diagnostics, and researches. It's still difficult to rapidly find out appropriate mAbs from appropriate animal sources. Here we introduce a unique technology which allows rapid discovery and evaluation of mAbs by combining DNA amplification from single B cells from various animals in a tube using cell-free protein synthesis system. In this platform named Ecobody technology, B cell isolation from blood or spleen to mAb synthesis and evaluation can be seamlessly performed in vitro because neither time-consuming transformation nor cultivation of living cells are necessary. It can also be applied to rabbits and humans known to have high affinity mAbs. We expect that this platform will accelerate acquisition of high affinity rabbit mAbs and large-scale analysis of mAbs from human individuals.

1. はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、ある特定のエピトープを認識し結合する単一の抗体クローンであり、医薬品・検査診断薬・研究用試薬・センサー等としての利用が拡大している。そのため、目的抗原に対して高い親和性および特異性を有する mAb をより低コストかつ迅速に取得し、さらに得られた mAb を低コストで大量生産するための技術開発は、ライフサイエンス産業の発展に必須である。従来用いられている mAb 探索技術はマウスハイブリドーマ法が主流であるが、細胞融合による不死化や培養工程が必須であり、迅速化や様々な動物種への適用が困難であった。

2. 大腸菌無細胞タンパク質合成系を利用した抗体探索

我々は、動物の末梢血や脾臓から得られるシングル B 細胞を材料として、1 細胞の逆転写反応と PCR、および大腸菌無細胞タンパク質合成系による試験管内 mAb 合成を組み合わせた、迅速かつ低コストな mAb 探索プラットフォームを開発した[1]。Ecobody 技術と名付けた本技術においては、B 細胞の単離から mAb 評価までが全て *in vitro* で行われ、生細胞の形質転換や培養が不要であるため、最短 2 日間という迅速さで抗体評価を行えることが最大の特徴である。また、高親和性な mAb を有していることの知られるウサギや、ヒトにも適用できる [2]。

mAb は 2 本の H 鎖と 2 本の L 鎖から成る、約 150 kDa の複雑かつ巨大なタンパク質分子であり、クローンによっては複数の分子間および分子内ジスルフィド結合を有するため、動物細胞以外による生産が難しい部類とされる。その問題を克服するために、筆者らは、試験管内で mAb を大量に合成することを可能とする「N 末端 SKIK ペプチドタグ」およびロイシンジッパーを融合した抗体断片である「Zipbody」を開発した[3, 4]。この 2 つの技術を利用することにより、機能する抗体分子を試験管内で作製し評価することが可能となった。

3. まとめ

2020 年は、COVID-19 の流行により、良くも悪くも抗体が注目される年となった。本技術では、これまでマウスから取得できなかった、低分子化合物やペプチドに対する親和性の高いウサギ抗体の取得や、ヒト個人の有する病原体に対する中和抗体や、自己免疫疾患・がん等に関与する抗体を多数取得・解析することが容易になると期待される。今後、医療機関や製薬企業との連携により、本技術が診断・予防・治療法開発等に役立つことができれば本望である。

4. 文献

1. Ojima-Kato T., Nagai S., Nakano H.: Ecobody technology: rapid monoclonal antibody screening method from single B cells using cell-free protein synthesis for antigen-binding fragment formation. *Sci. Rep.* 7, 13979 (2017).
2. Ojima-Kato, T., Morishita, S., Uchida, Y., Nagai, T., Kojima, T., Nakano H.: Rapid Generation of Monoclonal Antibodies from Single B cells by Ecobody technology *Antibodies* 7, 3 (2018).
3. Ojima-Kato T., Nagai S. Nakano H.: An N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 540-546 (2017).
4. Ojima-Kato T., Fukui K., Yamamoto H., Miyake S., Hirakawa Y., Yamasaki T., Kojima T. Nakano H.: 'Zipbody' leucine zipper-fused Fab in *E. coli* *in vitro* and *in vivo* expression systems. *Protein Eng. Des. Sel.* 29, 149-157 (2016).

機能性バイオ素材の普及・拡大に資する応用微生物学的な基礎研究

森田友岳*

産業技術総合研究所 機能化学研究部門

Applied microbiological basic research for the development of functional bio-chemicals and -materials

Tomotake Morita*

Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

*morita-tomotake@aist.go.jp

Biosurfactants (BSs) produced by various microorganisms show unique properties compared to their chemically synthesized surfactants. Among them, glycolipid types are the most promising as functional bio-based materials because of high productivity from renewable resources and versatile biochemical properties. Mannosylerythritol lipids (MELs) are the glycolipid BSs abundantly produced by various basidiomycetous yeast strains such as *Pseudozyma*, and show not only excellent interfacial properties but also versatile biochemical actions. We have considerably expanded the structural and functional variety of MELs by advanced microbial screening methods, identified the genes responsible for MEL biosynthesis, and analyzed their genetic characteristics.

1. はじめに

バイオサーファクタント（BS）は、微生物がバイオマスから生産する環境適応型の界面活性剤であることはもちろん、多様な生理機能を発揮する機能性バイオ素材として、幅広い産業での利用が期待されてきたが、製造コストが高く、構造・機能のラインアップも限られていたことから応用技術の開発も困難で、実用化は進んでいなかった。そこで、我々は BS 製造技術および利用技術の高度化を目指して、BS 生産菌のスクリーニングおよび遺伝子組換えによる育種・改良を進めてきた。特に、担子菌酵母が生産するマンノシルエリスリトールリピッド（MEL）は、新たな生産菌の発見による生産効率の向上と培養による構造制御に成功したことで、系統的な物性・機能解析が可能になり、化粧品への応用が達成された後、現在も利用が広がっている。

2. BS 生産菌のスクリーニングと解析

BS 生産菌のほとんど酵母であり、植物油を原料とすることで生産量は 100g/L 以上に達する。一方、商業利用のために、生産効率のさらなる向上はもちろん、構造・

機能の拡充が課題となっていた。従来、BS 生産菌のスクリーニングは、原料油の乳化を指標とした方法が用いられていたが得られる生産菌の種類が限られていた。そこで、培養液の表面張力に着目し、培養液を疎水フィルム上に滴下するだけで、水滴の大きさから BS 生産量を判断し、短時間で大量処理が可能な手法を構築した。この方法によってスクリーニング効率は飛躍的に向上し、短期間で多数の BS 生産菌を取得することが可能になった。その結果、MEL 生産菌のほとんどが *Pseudozyma* 属に分類される担子菌系酵母であり、葉面に集中して常在することが明らかになった。さらに我々は、分類系統と MEL 同族体の生産パターンに関連があることを突き止めた[1]。

3. BS 生産酵母の育種・改良

Pseudozyma 属はクロホ菌科に属する非病原性の担子菌酵母であるが、遺伝子組換え技術は全く手つかずの状態であったため、我々は、遺伝子導入といった基盤技術開発から研究を開始し、遺伝子発現や破壊による機能解析、次世代シーケンサーによるゲノム解析、トランスクリプトーム解析へと研究を展開してきた[2]。その結果、MEL 生合成遺伝子のクラスターを同定し、また *Pseudozyma* 属の微生物としての特徴や周辺代謝経路と MEL 生合成の関連が明らかになりつつある[3]。さらに最近は、テラーメイド MEL の製造に向けて研究を進めており、MEL 生産菌の更なる育種・改良が期待されている。

4. まとめ

近年、海外でも BS 生産の研究が活発化しており、EU では、SL を中心に商業利用を目指した研究報告が増加してきている。今後、バイオエコノミーや SDGs に代表されるように、環境に対する意識の高まりから、持続可能社会の実現に向けた取り組みは世界規模でさらに加速すると予想される。界面活性剤はプラスチックに次ぐ重要な化学品であり、本研究の成果が、バイオ素材・材料の開発による持続可能社会に向けた基盤技術の一つとして貢献できれば幸いである。

5. 文献

1. **Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T. and Kitamoto, D.:** Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. *J. Biosci. Bioeng.*, 105, 493-502 (2008).
2. **Morita, T., Koike, H., Hagiwara, H., Ito, E., Machida, M., Sato, S., Habe, H. and Kitamoto, D.:** Genome and transcriptome analysis of the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* producing extracellular glycolipids, mannosylerythritol lipids. *PLoS One*, 9, e86490 (2014).
3. **Wada, K., Koike, H., Fujii, T. and Morita, T.:** Targeted transcriptomic study of the implication of central metabolic pathways in mannosylerythritol lipids biosynthesis in *Pseudozyma antarctica* T-34. *PLoS One*, 15, e0227295 (2020)

微細加工デバイスを用いた 培養骨格筋細胞の機能発現と評価に関する研究

清水一憲*

名古屋大学 大学院工学研究科 生命分子工学専攻

Study on functional expression and evaluation of cultured skeletal muscle cells using microfabricated devices

Kazunori Shimizu*

Department of Biomolecular Engineering, Nagoya University

*shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

This paper presents the technologies using microfabricated devices for inducing functional expression of cultured skeletal muscle cells and for evaluating the expressed functions. The technologies were developed by controlling microenvironment of skeletal muscle cells and by establishing cell culture processes on the microfabricated devices.

1. はじめに

骨格筋は動力・代謝・分泌器官として大きな役割を果たしているため、機能不全は全身に影響し、場合によっては死に至る。その要因は、難治性筋疾患や加齢・不動などによる筋萎縮、糖尿病、肥満など多岐にわたる。超高齢社会ではこうした疾患の患者数増大が深刻であり、骨格筋機能不全を改善するための医薬品が求められている。一般に医薬品開発プロセスでは、培養細胞を用いた病態解析や候補化合物の薬効評価が行われるが、従来の培養皿を使った平面培養法ではヒトの生理応答を正確に再現・評価することが難しいため、医薬品開発の成功率が非常に低い。特に骨格筋細胞は、細胞融合し、アクチンチューターとして機能するというユニークな特徴をもつ細胞であるため (Fig.1)、従来の平面培養法では不可能な解析や評価が多く、新たな技術が必要とされている。

私は生物化学工学的視点で、培養骨格筋細胞の周囲環境をマイクロに制御し、微細加工デバイス上での培養プロセスを構築することで、培養骨格筋細胞の「機能発現を誘導する技術」、「発現機能の評価する技術」の研究開発を行った。

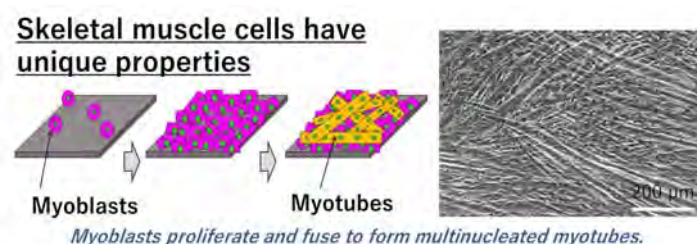


Fig.1 Traditional cell culture process for skeletal muscle cells
Left) Proliferation and differentiation. Right) Picture of myotubes overlaid on each other

2. 機能発現を誘導する技術

生体筋組織内の筋管細胞はすべて同じ方向に揃っている。一方、通常の平面培養では様々な長さの筋管細胞がランダムな方向を向き、重なり合っている (Fig.1)。私は、研磨技術で作製したマイクロサイズのライン状凹凸をもつ表面上で筋芽細胞を分化誘導すると筋管細胞の配向を制御できることを見出した⁽¹⁾。また、通常の培養法では細胞同士が重なるために困難であった、筋管細胞のシングルセル解析を実現するための培養・回収技術を開発した。フォトリソグラフィ技術で作製したステンシルマスクを使用して幅 50 μm 程度に制御した領域で筋芽細胞を分化培養することで、筋管細胞を一本だけ分化誘導できることを見出した⁽²⁾。さらに細胞への刺激負荷を時空間制御できる新たな培養法として期待されているマイクロ流体デバイス技術を骨格筋組織培養に応用し、収縮機能を発現する直径 50 μm 程度の筋組織をマイクロ流路内に構築することに成功した⁽³⁾。

3. 発現機能を評価する技術

骨格筋機能不全の多くは筋力低下を引き起こす。このため病態解析や候補化合物の薬効評価では、培養骨格筋細胞の筋力を指標とすることが重要であると考えられるが、従来の平面培養法では培養骨格筋細胞の筋力を測定することができない。私は微細加工デバイスや組織工学技術を駆使し、培養筋細胞・組織の収縮力を評価する技術を複数開発した⁽⁴⁻⁶⁾。開発した技術を用いて、最近、ダイレクトリプログラミング技術で誘導したヒト筋芽細胞で作製した三次元筋組織が筋力を発生することを見出した⁽⁷⁾。

4. まとめと今後の展望

開発してきた技術は、骨格筋の疾患創薬研究や基礎研究に有用な手法となる。さらに最近では、開発技術を運動神経細胞との共培養技術へと展開している⁽⁸⁾。生体内と同じ機構で培養骨格筋細胞の機能発現を誘導することで、本来の特性をさらに引き出すことができること、筋単独では成しえなかった評価が可能になることなどが期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方にお世話になりました。ご指導いただいた先生方、共同研究者の方々、学生諸氏など、すべての関係の皆様にご心より感謝申し上げます。

6. 文献

1. Shimizu, K. *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 103, 631-638 (2009). 2. Shimizu, K. *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 109, 174-178 (2010). 3. Shimizu, K. *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 119, 212-216 (2015). 4. Shimizu, K. *et al.*, *Biomed Microdev*, 12, 247-252 (2010). 5. Fujita, H. *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 106, 482-489 (2010). 6. Shimizu, K. *et al.*, *Bioengineering*, 4, 56 (2017). 7. Shimizu, K. *et al.*, *J Biosci Bioeng*, 129, 632-637 (2019). 8. Yamaoka, N. *et al.*, *BioChip J*, 13, 127-132 (2019).

有機酸高生産清酒酵母の遺伝子解析とその応用

根来宏明*

月桂冠株式会社 総合研究所

Genetic analysis of high malate-producing sake yeasts and its applications

Hiroaki Negoro*

Gekkeikan Sake Co. Ltd., Research Institute

*negoro@gekkeikan.co.jp

Abstract. Malate in sake is an important component for taste that produced by yeast during alcoholic fermentation. Various methods for breeding high-malate-producing strains have been developed. Here, two high-malate-producing strains were isolated, and the mutated genes responsible for the high-malate-producing phenotype were determined in each strains by comparative genome analysis. One was a missense mutation in *VID24* gene, which caused the accumulation of cytosolic malate dehydrogenase. The other was a nonsense mutation in *PEX22* gene, which led to the mislocalization of peroxisomal malate dehydrogenase to cytoplasm. Furthermore, novel method was developed for selecting homozygous *VID24* mutation from heterozygous genotype in diploid sake yeast without genetic modification. The method allows us to control malate levels in sake.

1. はじめに

リンゴ酸は清酒に含まれる主要な有機酸の一つである。リンゴ酸は爽やかな酸味を持つため、様々な高生産酵母の育種法が開発されてきた。高生産となるメカニズムがいくつか報告されているが、原因となる変異遺伝子については特定されていなかった。そこで、取得したリンゴ酸高生産酵母について、変異遺伝子の同定と解析を試みた。

2. 糖新生制御遺伝子の変異

きょうかい酵母 K-901 を親株として、リンゴ酸高生産酵母 K-901H を取得した。ゲノムシーケンスによる変異解析から、K-901H は *VID24* 遺伝子に変異を持つことでリンゴ酸高生産となることを見出した¹⁾。Vid24 は GID 複合体の構成因子であり、グルコースに応答して糖新生酵素を分解する役割を持つ。リンゴ酸高生産となるメカニズムを解析した結果、Vid24 機能欠損のため細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼが蓄積することでリンゴ酸高生産となっていた (Fig. 1)。更に、GID 複合体を構成する他のサブユニットの

影響をターゲットプロテオームにより検証すると、これら構成因子のうち *VID30*, *RMD5*, *VID28*, *GID8*, *FYV10* を欠損した場合でも *VID24* の欠損と同様にリンゴ酸生産能が上昇し、その作用として解糖系およびエタノール生成に関与するタンパク質群がそれぞれ亢進、抑制されていた²⁾。以上より、*GID* 複合体は清酒醸造でのリンゴ酸生成に関与しており、細胞内の中心代謝にも影響を与えていることが明らかになった。

3. *VID24* 変異の育種への応用

二倍体である K-901H の *VID24* 変異はヘテロ接合型であり、遺伝子操作を用いた検証によりリンゴ酸高生産の形質は不完全優性であると判明した。そこで、薬剤感受性やリンゴ酸生産能などの表現型を利用してスクリーニング系を構築した結果、K-901H の *VID24* ホモ変異株を非遺伝子組換えにより取得できた。得られた株は K-901H より高いリンゴ酸生産能を示し、狙い通りリンゴ酸生産能をさらに増強することができた³⁾。

4. ペルオキシソーム制御因子の変異

きょうかい酵母 K-701 を親株として、リンゴ酸高生産酵母 F-701H を取得した。ゲノムシーケンスによる変異解析を行った結果、F-701H では *PEX22* 遺伝子に変異を持つことでリンゴ酸高生産となることを見出した。*Pex22* はペルオキシソームの恒常性維持に関与するタンパク質の一つである。解析を進めた結果、*PEX22* 変異株ではペルオキシソーム局在型リンゴ酸デヒドロゲナーゼがペルオキシソームへ輸送されなくなり、細胞質へ局在が変化することでリンゴ酸高生産となったことが分かった (Fig. 1)⁴⁾。

5. おわりに

リンゴ酸高生産の機構は単一ではなく、菌株によって異なる遺伝子変異とメカニズムが影響しているという興味深い結果となった。これらの知見を元に酵母の有機酸生成を狙い通り制御することで、清酒の品質向上や多様化に貢献していきたい。

6. 文献

1. Negoro, H., Kotaka, A., Matsumura, K., Tsutsumi, H., and Hata, Y.: Enhancement of malate-production and increase in sensitivity to dimethyl succinate by mutation of the *VID24* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 1121, 665-671 (2016).
2. Negoro, H., Matsumura, K., Matsuda, F., Shimizu, H., Hata, Y., and Ishida, H.: Effects of mutations of *GID* protein-coding genes on malate production and enzyme expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 4971-4983 (2020).
3. Negoro, H., Kotaka, A., Matsumura, K., Tsutsumi, H., Sahara, H., and Hata, Y.: Breeding of high malate-producing diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *VID24* gene, *J. Inst., Brew.*, 122, 605-611 (2016)
4. Negoro, H., Sakamoto, M., Kotaka, A., Matsumura, K., and Hata, Y.: Mutation in the peroxin-coding gene *PEX22* contributing to high malate production in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, 125, 211-217 (2018).

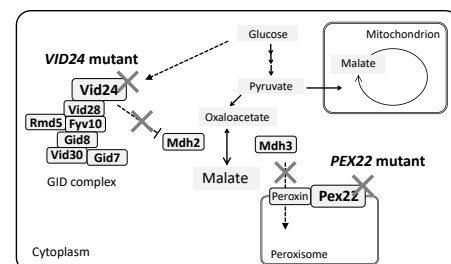


Fig. 1 The mechanisms for enhancing malate-production in *VID24* or *PEX22* mutants.

講演番号：WS1-A01

バイオ戦略の挑戦（バイオ戦略 2020）と学会への期待

服部 正

元・内閣府政策統括官（科学技術・イノベーション担当）

参事官付（バイオ戦略担当）参事官補佐

（現・文部科学省高等教育局専門教育課企画官）

The challenge of the Bioeconomy strategy (the Bioeconomy strategy 2020) and expectation to the Society for biotechnology

Masashi Hattori

Former deputy director for the Bioeconomy strategy, CSTI secretariat

Director, Technical Education Division, Higher Education, MEXT

mhatto@mext.go.jp

1. はじめに

- ・ 本年6月、バイオ戦略2019の第1回目の更新版となる「バイオ戦略2020（基盤的施策）」が政府の統合イノベーション戦略推進会議において決定された。
- ・ 本講演では、背景、位置づけ、狙い及び内容について概説するとともに、日本生物工学会への期待について述べる。

2. 本文

- ・ 今般、バイオ戦略の策定に当たっては、新型コロナウイルス感染症による影響、バイオエコノミーをめぐる内外動向が勘案された。
- ・ バイオ戦略2020は、昨年度末に公表する予定であった市場領域ロードマップについては同感染症の影響を踏まえた検討を継続の上、遅滞なく推進する必要がある施策については予定通り打ち出すこととし、2段階に分けて策定されることとなった。
- ・ 今般6月に策定したバイオ戦略2020（基盤的施策）は、当面の対応として、①直ちに取り組むべき感染症拡大の収束に向けた研究開発等への対応、②収束後の迅速な経済回復を見据え、バイオ戦略2019に沿って遅滞なく取り組むべき基盤的施策（データ関連、バイオコミュニティ形成関連等、制度整備関連等、司令塔機能の強化）について提示した。
- ・ 一方、同感染症への今後の対応、経済減速等の情勢の変化を勘案した市場領域ロードマップの策定、これを踏まえた施策を盛り込んだ戦略については、本年の冬を目

途にバイオ戦略2020（市場領域施策確定版）を策定し、対応を行うこととした。

- ・ 戦略の方向性としては、新型コロナウイルス感染症による影響は極めて大きいですが、強靱なサプライチェーンの構築、デジタルトランスフォーメーションの促進など今後とらなければいけない戦略の方向性は何ら変わらず、むしろ今般の危機によりこれまで対応をしてこなかった我々の弱さが浮き彫りになったと捉え、これまでの基本方針である①市場領域設定・バックキャスト・継続的なコミット、②バイオとデジタルの融合、③国際拠点化・地域ネットワーク化・投資促進、④国際戦略の強化、⑤倫理的・法的・社会的問題への対応を維持した上で、同感染症による影響を踏まえ、以下2つの視点を交え検討を進めることとした。
 - 新型コロナウイルス感染症の影響によるグローバルな流通の短期的減少、経済安全保障を考慮し、当面は国内生産の回帰・強化を重視する一方、中長期的な海外市場の獲得を見据え、グローバルなサプライチェーン構築のためにできることは着実に推進
 - エネルギー、資源等の確保を考慮した自立化、分散化を図るため、国内外のバイオマス量の把握に努め、経済性と弾力性とのバランスをとったネットワーク化を推進
- ・ 今後、戦略の基本方針にある「バイオとデジタルの融合」、「国際拠点化・地域ネットワーク化・投資促進」について、産学を巻き込んだ具体的な取組が開始されるが、取組の推進に当たり、日本生物工学会に期待することを述べたい。

3. まとめ

新型コロナウイルス感染症対応及び感染症収束後の経済発展に向けて、我が国の国際競争力の維持、投資促進の観点から、成長セクターであるバイオ分野の重要性はますます高まっている。バイオ戦略は、バイオエコノミー拡大のための戦略であり、その実現に向けては、産業界、アカデミア、地方自治体、国が連携した取組が不可欠である。引き続き、戦略の検討への積極的な参画をお願いするとともに、戦略に基づく取組への参画、投資をお願いしたい。

4. 文献

1. 統合イノベーション戦略推進会議: バイオ戦略2020（基盤的施策）（2020）.
2. 統合イノベーション戦略推進会議: バイオ戦略2019（2019）.
3. 森幸子, 服部正: バイオ戦略2019について, 2019 VOL.77 NO.5, バイオサイエンスとインダストリー（B & I）（2019）.

講演番号：WS1-A02

バイオエコノミー社会の実現に向けて

保田 友晶

経済産業省 生物化学産業課

Realize advanced Bioeconomy society

Tomohiro Yasuda

Ministry of Economy, Trade and Industry, Biochemical Industry Division

E-mail : yasuda-tomoaki@meti.go.jp

1. 講演要旨

昨今、化石資源に頼らない炭素循環型の社会システムを指す「バイオエコノミー」という概念が国際的に提唱され、「バイオこそ、デジタルの次の革新技術」と言われている。バイオエコノミーの創出には、幅広い分野での「バイオテクノロジー」の推進が大きな鍵となる。

近年のバイオ×デジタルの技術革新により、世界各国で、バイオテクノロジーを創薬基盤や再生医療用途などの医療・ヘルスケア産業にとどまらず、ものづくり産業や食品産業など幅広い産業と融合しイノベーションを起こす機運が高まっている。そのさなか、我が国は、医薬品をはじめとして圧倒的な研究開発資金を投入する米国や中国、国際規格等の仕組みで攻める欧米などに押されているのが現状である。世界的なゲームチェンジの転換点にある現在、我が国が勝ち抜いていくためには、関係者の不断の努力が肝要となる。

この時勢を受け、政府でも関係省庁や産業界との連携の下、我が国のバイオエコノミー実現に向け、幅広い分野のバイオテクノロジーを推進する「バイオ戦略 2020」を策定するに至った。

本講演では、「ホワイトバイオ」「バイオ医薬品」「再生医療」といった、バイオエコノミー社会実現に向けた経済産業省の取り組みを紹介する。

講演番号：WS1-A03

産業界による市場領域ロードマップの策定について

坂元 雄二

日本バイオ産業人会議（JABEX）事務局

Shaping the market domain roadmaps by private sector

Yuji Sakamoto

Japan Association of Bioindustries Executives (JABEX)

Jabex2@jba.or.jp

1. はじめに

日本バイオ産業人会議（以下、JABEX）は、行政、アカデミアなどと連携して、バイオ産業の振興やバイオエコノミー社会への移行を推進している。我が国のバイオエコノミー戦略である「バイオ戦略」では、2030年に目指すべき4つの社会像とその実現に必要な9つの市場領域を設定している（図1）。市場領域は政府が作成するロードマップにより推進することになっているが、政府ロードマップの策定に産業界として積極的に関与するため、自主的な会合を組織し産業界によるロードマップを策定した。本稿では、産業界によるロードマップ策定の経緯、活動、内容等を概説する。

図1 バイオ戦略2019で設定された4つの社会像と9つの市場領域*



※；9つの市場領域のうち、①②④⑦⑧（経産省生物化学産業化）、⑤（経産省ヘルスクエア産業課）、⑥（内閣官房健康・医療戦略室）でJABEXが事務局となり自主会合による産業界のロードマップを策定した。

2. 産業界によるロードマップ作成の経緯

9つの市場領域のうち、経済産業省生物化学産業課が取りまとめる5つの市場領域では、同課と協議し、ものづくり企業15社による自主会合を政府ロードマップ策定のためのサブタスクフォースとして位置づけた。市場領域⑤は、取りまとめ省庁である経済産業省ヘルスケア産業課と協議し、製薬、食品などの18社が参加する自主会合で策定したロードマップを、同課が推進する次世代ヘルスケア産業協議会新事業創出ワーキンググループでの議論を経て同課に提出した。市場領域⑥は、取りまとめ省庁である内閣官房健康・医療戦略室との協議により、4つの業界団体をリーダー団体、サブリーダー団体とし、製薬企業や医薬品製造企業など計12社が参加する自主会合にて策定した。

3. ロードマップの概要

産業界が策定したロードマップは、政府の書式に準じて作成し、取組課題毎に2030年に目指すべき姿や2030年までのロードマップがステージゲートとともに記載されている。生物機能を利用したものづくり産業が関連する市場領域①②④⑦⑧を例に、その概要を説明する。

2025年まで；産官学でAIやロボットを活用した合成生物学やバイオファウンドリに関する協調プラットフォームを構築し活用している。バイオ由来素材・製品のデータ駆動型評価手法を確立し、国際協調を見据えた規定・標準化戦略を推進している。原料調達では、地域バイオコミュニティなどでの自治体やアカデミアとの協業により、バイオマス（一次原料）の安定供給を確保している。

2030年まで；グローバルバイオコミュニティを中心に、デジタルを活用した合成生物学プラットフォームが本格的に運用され、バイオファウンドリや分析・測定・実験システムの開発体制が構築されている。サプライチェーンや表示、標準、公共調達などの規制・制度が整備されている。明確な海外市場獲得戦略とニーズ分析のもと、データを活用した開発により、持続可能な社会に対応した製品・サービスが一定の市場を獲得している。循環型資源によるサーキュラーエコノミーの実現を目指し、バイオマス（一次原料）とともに一次原料から加工された二次原料の安定的生産技術も開発され、また資源調達・原料選定データベースも運用され、付加価値を高めるアップサイクルによる持続可能なものづくりが実現している。

同様に、市場領域⑤、市場領域⑥においても産業界によるロードマップを策定した。

（産業界によるロードマップは非公開だが、簡易版ロードマップを公開予定）

4. さいごに

今般のコロナ禍を受け、政府ロードマップの公開は遅れているが、本来、ロードマップはバイオ戦略をローリングしていく重要な手段である。今般の状況に対応した政府のロードマップが公開され、産学官で推進する体制が整うことに期待したい。

講演番号：WS1-A04

社会を豊かにするためのバイオ事業

藤田 朋宏

株式会社ちとせ研究所 代表取締役 最高経営責任者

内閣官房バイオ戦略有識者

京都大学特任教授

Bio business to enrich the society

Dr. Tomohiro FUJITA

Representative director and CEO of Chitose Laboratory Corp.

a member of Strategy Council in CABINET SECRETARIAT

Program-Specific Professor in Kyoto University

fujita@chitose-bio.com

1. 本文

私の生業

私の生業は、社会から事業、事業から技術と、志を繋ぐことにある。これまでのバイオ産業では一般的に、事業は科学領域における発見を起点につくるものだと考えられてきた。しかし実際は、まず初めにあるべき社会像を定義し、その社会に必要な事業を考え、その事業を進める為に必要な技術を選定・開発していくケースの方が多い。それにも関わらず、この流れの重要性は軽視されている。だからこそ、私の生業は、社会起点の一貫した流れでバイオ社会をつくり上げていくよう訴え続けることにある。

そして、私は現在、1000年後の人類から見た21世紀初頭の人類が何をしておくべきかという視点で会社経営をしていく中で、バイオ社会に必要な事業を立ち上げ、その事業に必要な先端のバイオ技術を開発する活動を行っている。それと同時に、世界で勝てる日本のバイオ社会構築に向けて、産官学連携の新たな構造を具現化すべく、産官学それぞれの立場からバイオ産業へ働きかけている。

バイオ戦略の意義

バイオ戦略を考えるにあたり、まず、日本としてつくりたい「バイオの社会像」を定義し、そこから逆算した働きかけが、今の国に求められている。バイオ領域の新たな社会像を実現するような、世界規模で戦えるバイオ産業を興す

ためには、1つのテーマに対して3桁億円の資金が必要なのに対し、現在の日本ではバイオの新規プロジェクトに大きなお金が流れる仕組みが存在しない。そこで、日本の公的資金及び民間資金の規模を鑑みた上で、総花的な働きかけではなく、バイオ社会の実現に国が継続的にコミットする領域を明示する必要がある。これにより、日本が世界に勝てるようなバイオの主領域への莫大な投資を呼び込むといった大きな資金の流れを生み出すことが可能となる。この流れづくりが、日本のバイオ戦略に求められていることである。

社会における資金の動き方の変化

従来の民間企業では、それぞれが積み上げてきた利益や融資からくる資金を用いて、自社でリスクを背負って研究開発を進めてきたが、近年、映画製作の際に各企業の連合で制作委員会が設置される等、そのリスクとリターンの部分だけをプロジェクト毎に切り出す流れが加速している。この結果、技術研究に流れる資金が以前の100倍近くに増加した。その好例として、代替肉の開発が挙げられる。代替肉開発に取り組むインポッシブルフーズは、2009年に創業して現在、総額約420億円の資金を調達しており、企業価値は2019年時点で約2,200億円となっている。これは、代替肉開発の技術や企業の売上、利益に対してお金が集まっているのではなく、「代替肉を提供する」といった社会課題のソリューションに対してお金が集まっているのである。こういった流れが今後世界的に益々加速する中、日本は既に遅れをとってしまっているが、創薬分野等で徐々に資金の流れが変わりつつある。

民間企業におけるこれからの研究開発

これまで述べてきた通り、社会における資金の動き方はプロジェクト毎にリスクとリターンの部分のみ切り出す形に変化しており、バイオ戦略では、そういったプロジェクトへの投資の呼び水となるよう、国が継続的にコミットする領域を明示し、バイオ社会の構築に向けた大きな資金の流れをつくらねばならない。その上で、民間企業は、バイオ戦略策定に伴って国から拠出される助成金に頼るのではなく、バイオ戦略によってつくられる潮流にのって、自社の営利活動により得られる資金から研究活動を進めるべきである。

2. まとめ

バイオ戦略では、国としてつくりたい社会像を定義し、そこから逆算した働きかけとして国が継続的にコミットする領域を明示する必要がある。それにより、バイオ産業への莫大な投資が加速される流れをつくり、世界的にも競争力のあるバイオ産業の構築に貢献すべきである。そして、プロジェクト毎にリスクとリターンが切り出される形で資金が流れるといった社会の変化に伴い、民間企業は、バイオ戦略がつくりあげた流れを活かして、助成金に頼らない研究開発を促進すべきである。

講演番号：WS2-A01

ボトムアップ配列設計ペプチドによるナノポアの構築

川野竜司

東京農工大学 工学研究院 生命機能科学部門

Construction of the Nanopore with De Novo Designed Peptides

Ryuji Kawano

Department of Biotechnology and Life Science,
Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT)

*Email: rjkawano@cc.tuat.ac.jp

Abstract. Artificial cell membranes have emerged as a biomimetic tool in such areas as membrane protein study, synthetic biology, and drug discovery. Planar lipid bilayers are used for functional studies of ion channels and nanopore sensing. The stability of lipid bilayers and the reproducibility of bilayer formation are important, and it remains challenging. To address these issues, we have used microfabrication and microfluidic technologies that have a major advantage: easy to handle lipid molecules or solution at the micron scale using microfluidics. Applying these advantages, we propose a stable and reproducible preparation procedure for the planar lipid bilayers using the “droplet contact method”, and they are applying to measure pore-forming peptides with de novo design and nanopore sensing.

1.要旨

細胞膜は脂質二分子膜を基本構造とし、コレステロールなどの脂質以外の膜成分および膜タンパク質から構成されている。この脂質膜は細胞内外の物質・情報・エネルギーのやりとりを担うだけでなく、細胞内器官にも存在し小胞輸送やオートファジーなどでも重要な役割を果たしている。また両親媒性の脂質分子が二重に並んで作る膜構造は原核生物から真核生物まで全ての生物に保存されており、またウイルスのエンベロープも脂質二分子膜である。このように脂質膜は幅広い生物において利用されており、空間を区切るコンパートメントとしての役割だけではなく、膜タンパク質やその他の膜構成成分と協働して複雑な生化学反応を担う場として機能している。

これまで我々はこの脂質二分子膜を人工的に構築する研究に取り組んできた。人工の脂質二分子膜には、その形状により球体膜と平面膜に分けられる。球体膜は vesicle や liposome とも呼ばれ、小胞体のような脂質二分子膜のカプセルである。一方で、平面膜は平面基板の表面に形成する supported 膜、膜の上下が水相になっている suspended 膜がある。supported 膜は基板上に作製することから、原子間力顕微鏡のような観察系で脂質膜、膜タンパク質の観察ができる。suspended 膜は膜の両側に電極を配線可能なことから主にイオンチャネルなどの電気生理計測に用いられる。この suspended 膜は水相中で自己支持が必要な事から、その形成が難しく、また二分子膜形成後の安定性が極めて低かった。そこで我々はマイクロ流体・微細加工技術を用いて安定で再現性の高い平面脂質二分子膜の作製に取り組んできた。その結果、マイクロデバイス中で脂質単分

子膜に覆われたマイクロドロップレット同士を接触させる「液滴接触法 (Droplet contact method)」を開発し、複数の平面膜を同時形成して計測するシステムを提案してきた。^{1,2} この安定に形成した脂質膜にナノポアタンパクを再構成し、電気生理学的手法による一分子ナノポア計測にも取り組んでいる。³⁻⁶

ナノポア計測はナノスケールのコールターカウンター法と捉えることができ、一分子がナノサイズの孔を通過する際の抵抗変化を電流変化として観測する。この時、通過する分子の分子サイズや置換基の種類により通過の様式が変化し、それを読み取ることでラベル不要かつ電氣的な一分子計測が可能である。ナノポア計測の最も重要な応用として、DNA シーケンスがあげられる。理論的には一分子の DNA がナノポアを通過する際、ATGC それぞれの塩基に由来する電流が観測でき、それを読み取ることで迅速・安価なシーケンシングを達成できると考えられてきた。10 年以上の研究開発の結果、Oxford Nanopore Technology 社から 2015 年ナノポアシーケンサとして市販された。この販売されたナノポアシーケンサは実際にアミロイドを輸送するナノポア形成タンパク質が用いられており、USB 接続可能な小型駆体、8kbp のロングリードが可能、シーケンス価格は約 10 万円、といったようにバイオ材料を用いた製品で従来品にはない性能を発揮することができた。⁷ しかしながら、ナノポア計測ではポアのサイズと標的分子のサイズ適合性が非常に重要になるにもかかわらず、天然に存在するナノポアタンパク質のバリエーションは限られている。半導体微細加工技術を駆使してナノサイズのポアを作る研究も進んできてはいるが、半導体技術よりも天然のポアの方がはるかに再現良く均質なポアができる。そこで我々は人工的にアミノ酸を配列設計して、望みのサイズや機能を持ったナノポアを作製することに取り組んでいる。本講演ではこれらの最近の成果について紹介したい。

2. 文献

- 1 Kawano, R., Tsuji, Y., Sato, K., Osaki, T., Kamiya, K., Hirano, M., Ide, T., Miki, N. & Takeuchi, S. Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels. *Sci. Rep.* **3**, (2013).
- 2 Kamiya, K., Kawano, R., Osaki, T., Akiyoshi, K. & Takeuchi, S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nat. Chem.* **8**, 881-889, (2016).
- 3 Shoji, K., Kawano, R. & White, R. J. Spatially Resolved Chemical Detection with a Nanoneedle-Probe-Supported Biological Nanopore (vol 13, pg 2606, 2019). *ACS Nano* **13**, 9694-9694, (2019).
- 4 Kawano, R. Nanopore Decoding of Oligonucleotides in DNA Computing. *Biotechnol. J.* **13**, 1800091, (2018).
- 5 Watanabe, H., Gubbiotti, A., Chinappi, M., Takai, N., Tanaka, K., Tsumoto, K. & Kawano, R. Analysis of Pore Formation and Protein Translocation Using Large Biological Nanopores. *Anal. Chem.* **89**, 11269-11277, (2017).
- 6 Kawano, R., Osaki, T., Sasaki, H., Takinoue, M., Yoshizawa, S. & Takeuchi, S. Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8474-8477, (2011).
- 7 Van der Verren, S. E., Van Gerven, N., Jonckheere, W., Hambley, R., Singh, P., Kilgour, J., Jordan, M., Wallace, E. J., Jayasinghe, L. & Remaut, H. A dual-constriction biological nanopore resolves homonucleotide sequences with high fidelity. *Nat. Biotechnol.*, (2020).

講演番号：WS2-A02

セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築

横林 洋平*

沖縄科学技術大学院大学 核酸化学・工学ユニット

Engineering Synthetic Riboswitches in Cell-Free Systems

Yohei Yokobayashi^{1*}

Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit,

Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University

*yohei.yokobayashi@oist.jp

Cell-free translation systems (CFTS) allow protein expression from DNA templates without the numerous restrictions inherent in live biological cells. CFTS is increasingly being used to construct complex “cell-free systems” in which multiple genes and purified proteins are added to implement genetic circuits and metabolic pathways, sometimes encapsulated in microcompartments (e.g. liposomes) to form artificial cells. For such cell-free systems to sense and respond to dynamic chemical environments inside and outside the system, gene switches that can detect specific chemical signals and respond by regulating protein expression are necessary. We developed a novel riboswitch that respond to histamine by activating protein expression by >30-fold in PURE system. The riboswitch was used to control gene expression in liposomes to construct histamine-responsive artificial cells. These results demonstrate the utility of riboswitches for interfacing cell-free systems with the chemical environment.

1. はじめに

近年無細胞翻訳系（cell-free translation system, CFTS）を基盤とした、ボトムアップ的合成生物学の研究が盛んになってきている。CFTS を単なるタンパク質大量生産のために使うのではなく、複数の遺伝子や精製タンパク質を組み合わせ、高度な機能を示す遺伝子回路や代謝回路を構築したり、それらをリボソームなどの微小区画に内包した人工細胞モデルが作られている。このような「セルフリーシステム」は、従来の生細胞を用いた合成生物学と比較して、その構成要素が格段に明確であり、構成要素の濃度や種類の精密な調整も可能である。したがって、分子レベルから「細胞を創る」ことを目指す基礎研究はもちろん、バイオセンサー、ドラッグデリバリー、無細胞代謝工学などの応用を志向した研究のプラットフォームとして発展しつつある。

セルフリーシステムの高度な機能を実現するためには、生細胞を用いた合成生物学と

同様に、様々な「部品」(パーツ)が必要となる。中でも、天然、人工を問わず、望みの化合物を検出し、任意の遺伝子の発現を制御する「遺伝子スイッチ」は、セルフリーシステムが内部および外部の化学環境に応答するために不可欠である。しかし、これまでセルフリーシステムにおける遺伝子スイッチとしては、大腸菌で使われている転写因子を含む発現誘導系を転用したものがほとんどで、新規の化合物に応答する遺伝子スイッチを、セルフリーシステムで利用するために構築した例はほとんどない。

2. ヒスタミン応答リボスイッチとセルフリーシステムにおける応用

今回我々は、炎症マーカーや神経伝達物質の一つである、ヒスタミンに応答する人工リボスイッチを構築し、セルフリーシステムにおいて解析・応用した¹⁾。まず、ヒスタミンに選択的に結合する RNA アプタマーを SELEX 法により取得した。次にそのアプタマーを用いて、PURE system²⁾でヒスタミンに応答し、翻訳を活性化する人工リボスイッチを設計した。最後に大阪大学の松浦グループがこのリボスイッチを PURE system と共にリポソームに内包し、ヒスタミンに応答して任意のタンパク質を発現する人工細胞モデルを作成した(Fig. 1)。人工細胞においては、脂質二重膜上にナノポアを形成する α -ヘモリシンを発現させ、ヒスタミン投与時にリポソーム内の低分子化合物を放出したり、ホスホリパーゼを発現させて自己破壊を誘導することができた。このように、人工リボスイッチにより、望みの化学シグナルに応答するセルフリーシステムを構築できることを実証した。

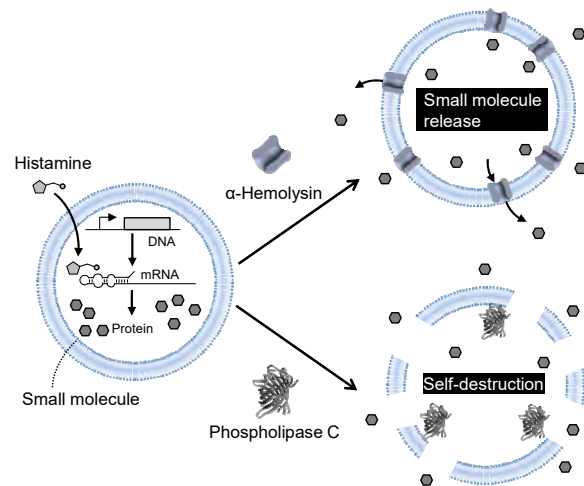


Fig. 1. Artificial cells encapsulating PURE system and histamine riboswitch controlled genes. Histamine triggers expression of α -hemolysin resulting in selective release of small molecular cargo (top), or phospholipase C which digests the phospholipid bilayer resulting in self-destruction (bottom).

3. まとめ

人工細胞を含めたセルフリーシステムは、今後学術的もしくは産業的に意義のあるシステムの構築に移行していくと考えられる。そのためには目的に応じて、多種多様な化学シグナルとセルフリーシステムを繋ぐインターフェースがますます重要となる。分子認識素子として長年の実績がある核酸アプタマーに基づく人工リボスイッチには、セルフリーシステムを「実世界」と繋ぐ役割を期待できる。

4. 文献

1. Dwidar, M., Seike, Y., Kobori, S., Whitaker, C., Matsuura, T., and Yokobayashi, Y.: Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.*, 141, 11103-11114 (2019).
2. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y. Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T.: Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, 19, 751-755 (2001).

講演番号：WS2-A03

光応答性局在分子システムによる細胞操作

吉井達之^{1,2*}, 築地真也^{1,3}

¹名古屋工業大学 工学研究科, ²JST さきがけ,

Controlling cell signaling using light-responsive chemicals

Tatsuyuki Yoshii^{1,2} *, Shinya Tsukiji¹

¹Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

²PRESTO, JST

*tyoshii@nitech.ac.jp

Abstract Methods for controlling protein activities in living cells with high spatiotemporal resolution are crucial for molecular cell biology. Here we report a new system for light-induced protein translocation using a synthetic small molecule and an engineered protein tag. We designed and synthesized a molecule named m^{Dc}TMP^{NVOC} which contains a photo-caged protein ligand (TMP^{NVOC}) and a plasma membrane (PM)-targeting myristoyl-^{Dc}Cys (m^{Dc}) motif. *Escherichia coli* dihydrofolate reductase (DHFR) which specifically binds to trimethoprim (TMP) was used as a protein-tag. Hela cells expressing DHFR were used for model experiments. In the presence of m^{Dc}TMP^{NVOC}, translocation of the DHFR to the plasma membrane was observed upon illumination of 405 nm light. The protein translocation system named caged-SLIPT was applied to light-induced activation of molecular processes in living cells by tagging DHFR to various signaling proteins. The spatially confined translocation of Tiam1 induced lamellipodial formation in NIH3T3 cells. Activation of MAPK signaling by PM-translocation of Raf1 promoted the neurite outgrowth in PC12 cells. Furthermore, the caged-SLIPT system was also applicable to multi-color imaging of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) formation and activation of endogenous Akt by PM-translocation of PI3K. The small molecule used in the caged-SLIPT system can be tuned by modular assembly of each component. Thus, the system has a great potential to control many proteins in living cells as desired.

1. はじめに

さまざまな分子が存在する動物細胞内で、任意のタンパク質の局在や活性をコントロールする技術は、これらの分子の働きに関する時空間的な情報を得るために有用である。また、細胞の分化誘導技術などへの応用も期待される。光は時空間的な操作性に優れるため、CRY2 や PhyB といった光受容タンパク質を用いたオプトジェネティクスツールが盛んに開発されている。一方で、光ケージド化合物など、光に応答して構造変化を起こす有機化合物は1原子レベルでの設計が可能であり、発色団の性能を合理的に調節できるという有用性がある。にもかかわらず、オプトジェネティクスと比べると細胞内シグナル伝達の制御に用いられることは少ない。これは、光によって起こる有機化合物の反応や構造変化を細胞内タンパク質の活性の変化へと繋げるための原理・機構が限られているためである。我々は、細胞内タンパク質の局在に着目し、これを光によって操作するシステムの開発に取り組んでいる。本発表では、その詳細について紹介する。

2. 光応答性局在分子システムの開発

我々はこれまでに、細胞内のタンパク質を小分子化合物の添加によって操作する技術 (SLIPT system) を開発している^{1,2}。この SLIPT システムにおいては、大腸菌由来の

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をタグとして用い、そのリガンドであるトリメトプリム (TMP) と、細胞膜局在化モチーフである myristoyl-^DCys (m^Dc) とをリンカーを介してつないだ化合物を局在性リガンドとして用いる。これを応用し、光によって細胞内のタンパク質の局在を操作することを目指した。具体的には、光分解性の保護基である NVOC 基で TMP のアミノ基を保護し、光によって活性化される小分子リガンド TMP^{NVOC} を作製した。これと細胞膜局在化モチーフである m^Dc とをリンカーを介して繋いだ化合物 (m^DcTMP^{NVOC}) を合成した。蛍光タンパクを融合した DHFR を発現する細胞に m^DcTMP^{NVOC} を作用させ、405 nm の光を照射すると、細胞質に局在していた DHFR が細胞膜へと局在移行することが共焦点レーザー走査顕微鏡による観察で明らかとなった。一方で、過剰量の TMP が存在する条件下で同様の操作を行った場合、この局在移行は起こらなかった。したがって、光によって NVOC 基が脱離し、TMP と DHFR の相互作用が誘起され、細胞膜への局在化が起こったと考えられる。我々はこの光誘導型の局在制御システムを caged-SLIPT と名付けた。

次に我々は、caged-SLIPT を利用して細胞内シグナル伝達の操作を試みた。具体的には、Rac などの GTPase を活性化する Tiam1 を DHFR に融合したキメラタンパク質を NIH3T3 細胞に発現させ、m^DcTMP^{NVOC} を作用させた。この細胞に 405 nm の光を照射すると、Tiam1 は細胞膜へと局在した。それに伴い、葉状仮足の形成が見られた。同様に、PC12 細胞において cRaf を細胞膜へと局在移行させると、神経突起の伸長がみられた。さらに、光刺激と多色蛍光イメージングを組み合わせることで、PI3K の光局在移行誘導と、それに後続する PIP₃ 産生、Akt の活性化という複数の分子プロセスを単一細胞で同時にモニタリングすることも可能であった。このように、caged-SLIPT によって、DHFR をタグとして融合したさまざまなタンパク質の局在と細胞膜上でのシグナル伝達を操作できることが明らかとなった。

3. まとめ

以上のように、小分子化合物とタンパク質タグを用いたアプローチによって動物細胞内のタンパク質の局在を光照射によって操作することのできる caged-SLIPT を開発した。caged-SLIPT では、有機合成によってボトムアップに分子を組み上げるため、リガンド、光応答性分子、局在化モチーフをモジュール的に変更することができる。近年では、長波長で応答するケージド化合物やフォトクロミック分子が開発されている。これらの化合物を本技術に取り入れることにより、より低侵襲な操作や可逆的な操作が可能になると期待される。また、我々はさまざまな局在化モチーフを見出しており、これらを用いることで細胞膜以外の細胞内小器官へのターゲティングにも取り組んでいる。

文献

1. Nakamura, A. Oki, C. Sawada, S. Yoshii, T. Kuwata, K. Rudd, A. K. Devaraj, N. K. Noma, K. Tsukiji, S.: Designer palmitoylation motif-based self-localizing ligand for sustained control of protein localization in living cells and *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chemical Biology*, 15, 837–843 (2020).
2. Nakamura, A. Oki, C. Kato, K. Fujinuma, S. Maryu, G. Yoshii, T. Kuwata, K. Matsuda, M. Kazuhiro Aoki, K. Tsukiji, S.: Engineering orthogonal, plasma membrane-specific SLIPT systems for multiplexed chemical control of signaling pathways in living single cells. *ACS Chemical Biology*, 15, 1004–1015 (2020)

講演番号：WS2-A04

光駆動タンパク質ロドプシンの分子機能エンジニアリング

井上 圭一^{1*}

¹東京大学 物性研究所

Molecular Functional Engineering of Light-driven Protein Rhodopsins

Keiichi Inoue^{1*}

¹The Institute for Solid State Physics, The University of Tokyo

*inoue@issp.u-tokyo.ac.jp

Abstract. Microbial rhodopsins are the heptahelical transmembrane photoreceptive proteins having retinal chromophore and widely present in diverse microorganisms. They show various biological functions such as light-driven ion pumps, light-gated cation and anion channels, light-regulated enzymes. Recently, we discovered a new type of rhodopsin which functions as light-driven outward Na⁺ pump from marine bacteria. Furthermore, based on the insights obtained by structural and spectroscopic studies, we artificially constructed light-driven K⁺ and Cs⁺ pumps. We also developed a method to red-shift systematically the absorption of the retinal chromophore which would be useful for optogenetic applications.

1. はじめに

微生物ロドプシンは細菌や古細菌のほか、真菌類や真核藻類など、主に単細胞微生物に存在する、レチナルを発色団とする7回膜貫通型の光受容型膜タンパク質である。近年は巨大ウイルスなどにも微生物ロドプシンの存在が見出され、自然界において極めて広範に用いられていることが明らかとなっている。一方、微生物ロドプシンはその機能においても、幅広い多様性を持つことが知られている。1971年に初めて報告された微生物ロドプシンであるバクテリオロドプシン（BR）は細胞膜中で光駆動型の外向きH⁺ポンプとしてはたらき、ATP合成のためのプロトン駆動力（Proton Motive Force, PMF）を光で作りに出す役割を持つことが知られている。その後様々な生物種から多くの微生物ロドプシンが発見され、外向きH⁺ポンプ以外に、内向きCl⁻ポンプ、外向きNa⁺ポンプ、光開閉式陽イオンチャネル、陰イオンチャネル、光制御型ヒスチジinkinナーゼ、グアニニルシクラーゼ、ホスホジエステラーゼなど、極めて多様な機能が微生物ロドプシンによって達成されていることが明らかとなってきている。そして近年では生体の光操作技術であるオプトジェネティクス（光遺伝学）における、中心的な分子ツールとして注目されている。講演では最近我々が行った自然界の新奇な機能を持つ微生物ロドプシン研究と、それをもとにした新規分子機能エンジニアリング研究について紹介する。

2. イオン輸送型ロドプシンの発見・構築

2013年, 我々は東京湾に棲息する海洋性細菌の *Krokinobacter eikastus* ゲノムより, 過去に類似のものがない, 新奇な配列を持つロドプシン (*Krokinobacter rhodopsin 2*, KR2) の遺伝子があることを見出した. そしてその機能を調べたところ, 光駆動型の

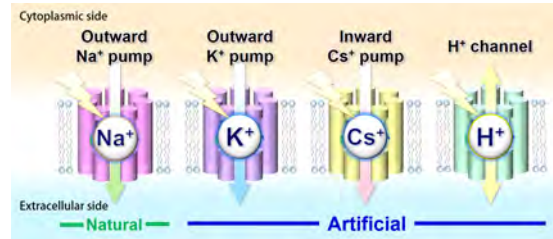


Fig. 1. Examples of ion-transporting rhodopsins discovered and identified in our

外向き Na^+ ポンプであることが明らかとなった[1]. 外向き Na^+ ポンプとしてはたらくロドプシンは, この KR2 が初めてであったが, 分光計測および結晶構造解析によって, 光を照射すると細胞質側から Na^+ が発色団のレチナールに結合し, そのまま細胞外へ輸送されるメカニズムが明らかとなった[2]. この結果をもとにイオン取込み時に, 輸送できるイオンサイズを決定している Selective Filter としてはたらくと考えられるアミノ酸の変異を行ったところ, 自然界のロドプシンでは困難な K^+ や Cs^+ といったイオン半径の大きい陽イオンの輸送が可能なポンプの構築に成功した (Fig. 1) [2,3].

3. 微生物ロドプシンの吸収波長制御

近年, 微生物ロドプシンがオプトジェネティクス分野で幅広く用いられているが, その中で脳組織などによって励起に用いる可視光が散乱され, 体深部の操作が困難になるという問題が指摘されている. これを解決するには, ロドプシンの持つレチナールの吸収波長を長波長化することが求められるが, 最近我々はレチナール周辺のアミノ酸を変異することで KR2 など多くの微生物ロドプシンの吸収を最大 40 nm 長波長化できることを見出した[4]. また量子化学計算から, この吸収波長制御にはレチナール周辺のアミノ酸の側鎖の極性の制御が重要であることも示唆された.

4. まとめ

ロドプシンは7回膜貫通型構造から多様な機能を実現する, 他の分子系にはない特長を持っているが, 分子構造とメカニズムを詳細に調べ, 多くの知見を統合することで, 自然界にはない新規・高性能の分子の構築が可能となる. 今後さらに多様で, オプトジェネティクスなどの応用に資するロドプシンの実現が強く期待される.

5. 文献

1. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., H., Kogure, K. and Kandori, H.*: A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat. Commun.*, 4, 1678 (2013).
2. Kato, H. E., Inoue, K., other 19 authors, Kandori, H.* and Nureki, O.*: Structural basis for Na^+ transport mechanism by a light-driven Na^+ pump. *Nature*, 521, 48-53 (2015).
3. Konno, M., Kato, Y., Kato, H. E., Inoue, K., Nureki, O. and Kandori, H.*: Mutant of a light-driven sodium ion pump can transport cesium ions. *J. Phys. Chem. Lett.*, 7, 51-55 (2015).
4. Inoue, K., Marín, M. d. C., Tomida, S., Nakamura, R., Nakajima, N., Olivucci, M. and Kandori, H.*: Red-shifting mutation of light-driven sodium pump rhodopsin. *Nat. Commun.*, 10, 1993 (2019).

講演番号：WS2-A05

再構成システムの質的・量的最適化にむけた数理モデル構築

油谷 幸代

産業技術総合研究所 生体システムビッグデータ解析 OIL

Mathematical Modelling for Re-construction System Optimization

Sachiyo Aburatani

Computational Bio-Big Data Open Innovation Lab., AIST

*s.aburatani@aist.go.jp

In the bioproduction and biotechnology fields, expanding the ability of organisms is a fascinating theme, and numerous empirical approaches have been developed. Recently, systematic and synthetic approaches have been applied to this important theme for controlling the cell systems. Although the metabolic reactions for generating the target chemical compounds have been extensively studied, the regulation mechanism of this specific system has remained unexplained, and we are far from complete control of the system. Inference of regulatory network model is one of the useful approaches to understand the control systems in living cells. To obtain the better insights into the regulatory system models, I developed statistical approach, based on Structural Equation Modelling (SEM) in combination with graph optimization algorithms by Modification Index Scores. In my approach, I assumed the initial model as a star like model with the regulations between each explanatory variable and an objective variable. By my optimization algorithm, the reconstructed regulatory model could be the most suitable structure with the measured data. From the inferred regulatory model, we can obtain the information about important factors to regulate the cell system. Now, I apply and improve this method to optimize the re-construction systems. I'll show you the details about my methods and issues to be developed.

1. はじめに

システムズバイオロジーの目標の一つに、システム工学的な考えを生物にも適用し、ある生命現象を一つのシステムとして理解し、制御することが挙げられる[1]。システムズバイオロジーの一分野である代謝工学では、代謝経路を構成する酵素の反応速度モデルなどに基づいた帰納的アプローチによるシステムの最適化が試みられてきた[2]。しかしながら、多くの生体分子の挙動が複雑に交絡した代謝反応を完全に制御するためには、システムを構成している全ての構成因子の挙動を明らかにする必要がある、これが現状で代謝反応を制御することが困難な原因の一つである。

この解決法として、代謝反応経路に依存しないシステム制御モデルを構築する事が挙げられる。目的をターゲット物質の量的制御という点に特化した場合、化学反応を基盤とし既存知識で構築された代謝反応に拘る必要はない。生体細胞内で実際にターゲット物質の生産量に寄与する因子群を抽出し、抽出された因子群で構成されたシステム制御モデルを構築することで、実際にターゲット物質の制御に必要な因子が明らかになると期待される。このシステム制御モデルの構築手法として、これまで遺伝子発現制御ネットワークなどを構築するために開発してきた数理モデリング手法が適用可能である。

2. 生体細胞制御のための数理モデリング

システム制御モデルを構築する方法の一つとして、構造方程式モデリング (SEM: Structural Equation Modelling) がある。SEM は 1970 年代に確立された理論であり、本来は最初に推定されたモデル構造が計測されたデータとどれだけ適合しているかを評価する技術であった[3]。これを生物学データに適用するために初期モデル構築技術の開発[4]と計測データに最も適合するモデルを構築するための最適化技術の開発[5]を行ってきた。開発した技術の有効性を検証するため、酵母等の様々なモデル系において制御ネットワークモデルを構築してきた[4, 5]。また、近年では実際に宿主細胞における物質生産機能を制御するために、本技術を適用し、実験による検証によってその有効性を確認した[5]。本シンポジウムでは、これまでに開発してきたモデリング手法の技術や実際のデータへの適用例を紹介する。

3. まとめ

再構成システムは、システムを構成する因子が限定的であり、システム制御モデル構築上で最も大きな課題である「システム構成因子の正確な抽出」が解決済である。しかしながら、再構成システムでは複数の階層の因子を同時に制御する必要があり、そのデータ形式は数値データから質的データまでが想定される。再構成システムの機能を最適化するためには、これら異なった形式のデータを一律に扱うための技術開発が必至であると考えており、今後もこれらの課題を解決するための研究を進めていく予定である。

4. 文献

1. Kitano, H.: Computational systems biology. *Nature*, 420(6912), 206-210 (2002).
2. Alam, M.T., Medema, M.H., Takano, E., Breitling R.: Comparative genome-scale metabolic modeling of actinomycetes: the topology of essential core metabolism. *FEBS Lett.*, 585(14), 2389-2394 (2011).
3. Bollen, K.A.: *Structural Equations with Latent Variables*. John Wiley & Sons, New York (1989).
4. Aburatani, S.: Application of structure equation modeling for inferring a serial transcriptional regulation in yeast. *GRSB.*, 5, 75-88 (2011)
5. Aburatani, S., Shida, Y., Ogasawara, W., Yamazaki, H. and Takaku, H.: Application of Structural Equation Modelling for Oil Accumulation System Control in Oleaginous yeast. *J. Phys. Conf. Ser.*, 1391, 1-9 (2019)

講演番号：WS3-B01

植物スマートセルインダストリーを実現するゲノム編集技術

刑部敬史

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

Genome editing technology for the plant smart cell industry

Keishi Osakabe

Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

*kosakabe@tokushima-u.ac.jp

Abstract

Genome editing tools, such as ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas systems, have been currently well-established as efficient biotechnological tools as rapid and reliable target-specific mutagenesis systems for a wide range of species. However, most of the basic patents for genome editing have been developed and intellectualized in Europe and the United States. Therefore, it has been strongly desired to develop novel genome editing tools that contribute to the activation of the Japanese biotechnological industry.

We developed a novel genome editing system from metagenome data. There are diverse systems composed of CRISPR RNAs (crRNAs) and CRISPR-associated (Cas) protein modules, and few of them have been established for genome editing technologies. Here, we analyzed essential features of Cas effector proteins from one of uncharacterized CRISPR type-I systems and developed a genome editing tool by using this system, named as TiD. According to the *in silico*, *in vitro* and *in vivo* analyses, we found that the TiD system utilized 35-36 base-length guide RNA (gRNA) for target recognition sequence and 37 base-length crRNA scaffold sequence; the protospacer adjacent motif for TiD was determined 3-base sequences located upstream of the target sequence; TiD required 5 Cas protein modules for the function of genome editing activity. In addition, the engineered gRNA with TiD crRNA scaffold and Cas genes were able to generate mutations at the target gene of the tomato genome. The TiD-generated tomato mutant plants exhibited apparent gene knockout phenotypes. TiD was also able to generate site-specific mutations at the target gene of the human genome. Our findings indicate that the TiD is the novel effector module pathway in CRISPR, and can be repurposed for genome engineering for eukaryotes.

講演番号：WS3-B02

ストリゴラクトン生合成と作物生産への応用

若林孝俊^{1,2*}, 水谷正治¹, 杉本幸裕^{1,2}

¹神戸大学大学院 農学研究科, ²JST/JICA SATREPS

Elucidation of strigolactone biosynthesis and its application to crop production

Takatoshi Wakabayashi^{1,2*}, Masaharu Mizutani¹, Yukihiro Sugimoto^{1,2}

¹Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, ²JST/JICA SATREPS

*wakabayashi@people.kobe-u.ac.jp

Abstract. Strigolactones (SLs) are carotenoid-derived plant specialized metabolites. SLs, first identified as germination stimulants for root parasitic weeds, act as root-derived rhizosphere signaling molecules for arbuscular mycorrhizal fungi, and as endogenous phytohormones regulating shoot branching. We recently found that cytochrome P450 CYP722C is a key enzyme that catalyzes the reaction of BC-ring closure leading to canonical SLs. VuCYP722C in cowpea (*Vigna unguiculata*) and SlCYP722C in tomato (*Solanum lycopersicum*) catalyze the direct conversion of carlactonoic acid (CLA) to orobanchol. GaCYP722C in cotton (*Gossypium arboreum*) catalyzes the conversion of CLA to 5DS. By knocking out the *SlCYP722C* gene in tomato, orobanchol was undetectable in the root exudates. The root exudates of *SlCYP722C*-knockout tomato plants reduced the induction of germination of seeds of root parasitic weeds, whereas the knockout plants did not show the prominent phenotypes of the SL-deficient mutant, such as increased shoot branching. These findings enhance our understanding of the diverse functions of SLs in plants and suggest the potential to generate crops with greater resistance to infection by noxious root parasitic weeds.

1. はじめに

ストリゴラクトン (SL) は、ストライガに代表されるハマウツボ科根寄生雑草の発芽刺激物質として同定された一連の構造類縁体の総称である。SL は根寄生雑草の発芽刺激物質としてだけでなく、多くの陸上植物と共生するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する共生シグナルとして、あるいは植物の枝分かれを抑制する内生の植物ホルモンとして機能することが知られている。近年、SL 生合成の重要な中間体やそれらの生合成遺伝子が発見され、SL 生合成への理解は急速に進展している。本発表では、新たな SL 生合成遺伝子として発見した *CYP722C* について紹介し、さらに生合成研究から見えてきた根寄生雑草に対する防除戦略の可能性について議論する。

2. 典型的 SL 生合成に関与する酵素 CYP722C の発見と根寄生雑草防除への応用

SL 生合成中間体である carlactone (CL) はシトクロム P450 である CYP711A/MAX1 に

より carlactonoic acid (CLA) に変換される。ABC 環を有する典型的 SL に属する orobanchol はイネにおいて、CYP711A ホモログの働きにより CL から CLA, 4-deoxyorobanchol (4DO) を経て生合成されることが知られている。一方、いくつかの双子葉植物では CLA が 4DO を経由せず直接 orobanchol へ変換される経路が示唆されていた。この CLA を直接 orobanchol へと変換する酵素としてササゲ (*Vigna unguiculata*) の VuCYP722C とトマト (*Solanum lycopersicum*) の SlCYP722C を発見した[1]。CYP722C サブファミリーは双子葉植物に広く保存されており、orobanchol とは C 環の立体が逆向きの strigol-type SL を生産する植物のゲノム中にも存在する。そこで strigol-type の 5-deoxystrigol (5DS) を生産するワタ (*Gossypium arboreum*) の GaCYP722C の機能解析を行ったところ、GaCYP722C は CLA から 5DS への変換を触媒した[2]。したがって、CYP722C サブファミリーは、双子葉植物における典型的 SL 生合成の鍵酵素であると考えられる。

トマトにおいて SlCYP722C を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集でノックアウトすると、ノックアウト体の根浸出液中では orobanchol が検出限界以下となり、代わって SlCYP722C の基質である CLA が蓄積した[1]。この SL プロファイルの変化は根寄生雑草種子に対する発芽刺激活性にも反映されており、典型的 SL が欠損しているノックアウト体根浸出液の発芽刺激活性は野生型と比較して大幅に低下した。一方で、トマト地上部の枝分かかれは、ノックアウト体と野生型の間で顕著な違いは認められなかった[1]。根寄生雑草の発芽抑制は作物の抵抗性付与につながることから、CYP722C サブファミリーの触媒によって典型的 SL が生合成される植物では、この遺伝子を欠損させることで、健全な生長を維持したまま根寄生雑草に対する抵抗性を付与できる可能性が高い。すなわち、作物に典型的 SL を作らせないというアプローチは、新たな根寄生雑草の防除戦略となる可能性を秘めている。

3. まとめ

CYP722C は典型的 SL 生合成のための鍵酵素であり、この酵素遺伝子を欠損させることで、根寄生雑草の発芽を抑制出来ることを示した。発芽抑制による根寄生雑草に対する抵抗性付与という手法は様々な植物に応用可能であると考えられ、今後、実際に抵抗性がどれほど付与されるか、作物としての形質に影響が出ないかなど、根寄生雑草の新たな防除戦略としての有効性を実証していきたい。

4. 文献

1. Wakabayashi, T., Hamana, M., Mori, A., Akiyama, R., Ueno, K., Osakabe, K., Osakabe, Y., Suzuki, H., Takikawa, H., Mizutani, M., Sugimoto, Y.: Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Science Advances*, 5, eaax9067 (2019)
2. Wakabayashi, T., Shida, K., Kitano, Y., Takikawa, H., Mizutani, M., Sugimoto, Y.: CYP722C from *Gossypium arboreum* catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystrigol, *Planta*, 251, 97 (2020)

講演番号：WS3-B03

**安全・安心の医用タンパク質を迅速・安価に患者様へ：
タバコ一過性発現系による再生医療等製品原料の開発・製造**

結城 雅之^{1*}, 吉中 喬慈¹, 長谷川 敏美¹, 山田 憶人¹, 大川 昭一郎¹,

高山 英士², 田中 裕之², 渡邊 理紗², 宮内 美穂²,

三沢 悟², 竹本 浩², 川端 潤²

¹株式会社 UniBio, ²三菱ケミカル株式会社

**Delivering safe and inexpensive medical-use proteins to patients fast:
development and manufacture of regenerative medicine materials
through the tobacco transient protein expression system**

Masayuki Yuki^{1*}, Kyoji Yoshinaka¹, Toshimi Hasegawa¹, Okuto Yamada¹,

Shoichiro Ookawa¹, Hidehito Takayama², Hiroyuki Tanaka², Risa Watanabe²,

Miho Miyauchi², Satoru Misawa², Yutaka Takemoto², Hiroshi Kawabata²

¹UniBio Corporation, ²Mitsubishi Chemical Corporation

*連絡先の E-mail アドレス : masayuki@unibio-jp.com

Recent advances in molecular biology has allowed mankind to manufacture biopharmaceuticals from plant protein expression systems. In particular, plant transient protein expression system allows one to inoculate normal plant and express target proteins within one to two weeks. Compared to other protein expression systems, plant expression system (1) is able to express complex proteins due to its posttranslational modification mechanisms such as chaperone, glycosylation, and protease activities, (2) is very safe due to low risk of animal pathogens, (3) costs less to produce proteins due to use of conventional agricultural processes, and (4) takes less time to develop and market proteins, which several North American companies such as Medicago, iBio, and KBP are exploiting to develop SARS-CoV-2 vaccine candidates.

We developed human epidermal growth factor (EGF), and we are currently marketing it as a cosmetic ingredient. We constructed a tobacco mosaic virus (TMV)-based EGF expression vector based on GENEWARE® technology, transcribed the vector to mRNA *in vitro*, inoculated the mRNA to *Nicotiana benthamiana* plant, harvested the plant and isolated the target protein. The target protein was identified as EGF through MALDI TOF/MS and cell proliferation assay.

We are planning to reposition our plant-made EGF as a regenerative medicine material.

We developed human activin A as a regenerative medicine material. We constructed an expression vector for the precursor pro-activin A based on magnICON vector. Then we agro-infiltrated the vector onto *Nicotiana benthamiana* plant, harvested the plant and isolated the target protein. Finally, we cleaved off the pro-region with a protease to obtain active activin A.

1. はじめに

モノクローナル抗体、ワクチン、細胞増殖因子、サイトカインなどタンパク質ベースのバイオ医薬品などの高付加価値原料は従来から大腸菌、哺乳細胞、酵母、及び昆虫細胞で製造されてきた。古来、植物は生薬や漢方薬の一次原料として使用されてきたが、近年の分子生物学の進歩により、植物によるバイオ医薬品の生産が注目されている。植物による外来タンパク質生産には組換え植物による系及び植物への一過性発現系が主に用いられている。これらの外来タンパク質発現・生産システムは他の発現系と比して、①真核生物としてのシャペロン、糖鎖修飾、ペプチド切断等の翻訳後修飾機能により複雑なタンパク質の発現が可能である、②ヒトとの共通病原体の混入のリスクが極めて低い安全な発現系である、そして③慣行農法の延長線上の生産が可能なので従来型医薬品工場の1/10程度までの設備投資抑制及び容易なスケールアップが可能である。加えて、④とりわけ一過性発現系では開発から上市までの期間を劇的に短縮できる。

植物バイオによる開発期間短縮の例としてワクチン開発がある。鶏卵によるインフルエンザワクチンはウイルス変異に対する迅速対応が困難なことが知られているが、現在は加 Medicago 社にて植物一過性発現系によりインフルエンザワクチンが開発されており、臨床試験中である。エボラ熱パンデミック発生の際には、抗エボラウイルス抗体の核酸塩基配列が判明してから米 KBP 社にて1年以内に ZMapp®を開発して60ロット以上の安定供給を実現し、米国食品医薬品局 (FDA) から人体への緊急臨床使用許可を得ることが出来た。COVID-19 感染症の病原体 SARS-CoV-2 に対するワクチン開発についても、中国・武漢における2019年12月の発生から3~4か月で北米の植物バイオ企業3社(加 Medicago 社、米 iBio 社、米 KBP 社)がワクチン候補開発成功を謳っており、Medicago 社は臨床試験準備中である。

哺乳細胞由来の医薬品からの病原体汚染の排除は薬害エイズ事件や薬害 C 型肝炎事件以来の長年の課題であった。ゴーシェ病に対する酵素補充療法用の医薬品として哺乳細胞からグルコセレブロシダーゼを発現させて製造していた工場にウイルス汚染が発見されて工場閉鎖に追い込まれたことがある。そこでイスラエルの Protalix 社がニンジン細胞からグルコセレブロシダーゼを発現させ、人畜共通病原体の汚染のリスクの無い医薬品の製品化に成功した。

2. 再生医療等製品原料の市場規模

再生医療周辺産業の国内市場は2030年度に約一兆円、その内培地・血清・試薬等

の消耗品市場は約 2000 億円と見込まれている。医薬品医療機器総合機構（PMDA）は「生物由来原料基準」に基づいて再生医療に使用する原料が動物由来である場合、健康な原料動物までの厳格なトレーサビリティを要求している。又、細胞工学によって製造される再生医療等製品の製造工程は投入前の各原料及び工程にて病原体の否定試験を行う必要があり、不合格品はそこまで費やした原価に関わらず廃棄処分となる。我々は再生医療等製品原料製造の上で、このように安全性において大きな優位性を持つ植物タンパク質一過性発現系を用いて、再生医療等製品原料としての細胞増殖因子を開発した。

3. 上皮細胞成長因子（epidermal growth factor=EGF）の開発

我々は植物一過性発現系を用いて、上皮細胞成長因子（epidermal growth factor = EGF）を化粧品原料として製造・販売している。タバコモザイクウイルス（TMV）系ベクター「GENEWARE®」に EGF 発現遺伝子を組み込み、*in vitro* で転写した感染性 mRNA を直接ベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）天然株に接種し、2 週間後に地上部を収穫し、目的タンパク質を抽出・精製した [1]。こうして出来たタンパク質は質量分析で EGF としての物性を持つことが確認できており、WHO 標準品と遜色ない生理活性を持っている。本品を再生医療等製品原料としての用途に供すべく準備中である。

4. アクチビン A（activin A）の開発

我々は再生医療等原料として activin A を試作製造した。前駆体である pro-activin A の遺伝子を magnICON vector に組み込み、アグロバクテリウム菌を介してベンサミアナタバコ天然株に接種し、1 週間後に地上部を収穫し、目的タンパク質を抽出した。粗精製後に pro 領域を酵素切断し、更に精製して活性型 activin A を得た。市販品と遜色ない生理活性を確認している [2]。

5. まとめ

こうして我々には安全な再生医療等製品原料を安定供給できる準備が整いつつある。移植用細胞組織が製造後の感染性物質否定検査で不合格になる前の最上流である原料の時点で安全で、安心してご使用頂ける原料のみで患者移植用細胞を製造できる環境を整えていきたい。

6. 文献

1. ヒト上皮細胞増殖因子の製造方法 日本特許公報 第 6302415 号
2. MODIFIED ACTIVIN A, World Intellectual Property Organization (WIPO), WO/2020/100993

講演番号：WS3-B04

園芸作物リンドウにおけるゲノム編集技術の適用と展望

西原昌宏^{1*}, 高橋重一¹, 渡辺藍子¹, 吉田千春¹, 後藤史奈¹, 根本圭一郎¹, 阿部陽¹

小田島雅², 佐々木忍², 小澤傑², 内藤善美²

¹ (公財) 岩手生物工学研究センター, ² 岩手県農業研究センター

Applications and perspectives of genome editing in Japanese cultivated gentians

Masahiro Nishihara^{1*}, Shigekazu Takahashi¹, Aiko Watanabe¹, Chiharu Yoshida¹,
Fumina Goto¹, Keiichiro Nemoto¹, Akira Abe¹, Masashi Odashima², Shinobu Sasaki²,
Suguru Ozawa², Zenbi Naito²

¹Iwate Biotechnology Research Center, ²Iwate Agricultural Research Center

*mnishiha@ibrc.or.jp

Abstract

Japanese cultivated gentian is one of the most important horticultural plants in Iwate Prefecture in Japan. For more than 40 years, conventional breeding is being exclusively performed to produce novel elite cultivars, but it takes great effort because gentians are perennial plants with strong inbreeding depression. Moreover, limitation of genetic resources in nature hampers the effective breeding. Therefore, we have been attempted to produce elite gentian cultivars via biotechnological approaches such as ion beam irradiation and genome editing. We have confirmed that both methods are workable in gentian, but the latter is a more direct approach to produce desirable mutants targeted for specific genes. Here, we summarized recent results of CRISPR/Cas9-mediated genome editing in Japanese cultivated gentians. Perspectives of genome editing in gentian will be also presented.

1. はじめに

日本の園芸リンドウは、在来種のエゾリンドウ (*Gentiana triflora*) とササリンドウ (*G. scabra*) を利用して、育種されたものである。古くは様々な山採りの個体から集団選抜育種により品種改良が行われてきたが、近年では自然の育種資源も枯渇気味であり、特に、有用な形質を有する突然変異体を探索し、利用するのが困難となっている。そこで、我々はリンドウの遺伝資源の拡充を目指してバイオテク手法を活用した研究を進めており、現在、重イオンビーム法やゲノム編集技術による突然変異体の育成を行っている。前者は、作出した変異系統の実用化が即可能な技術であり、花色、花型等の変異

体が得られており、一部は品種育成に向けての特性評価を進めている。また、後者のゲノム編集技術については、近年、各作物への適用が進んでおり、我々も現在最も広く用いられている CRISPR/Cas9 システムについてリンドウでの検討を進めてきた。

2. リンドウへの CRISPR/Cas9 技術の適用

これまでベクターコンストラクトの検討、感染・選抜手法の至適化等により、アグロバクテリウム法を用いて 30 以上の遺伝子について編集体の獲得を試みた。それらには花色、越冬、開花、耐病性等の様々な遺伝子が含まれており、実際に、当代で両アリルに編集が入った個体を得られ、表現型が確認できることが示されている。ただし、ターゲットとした遺伝子による効率の違いが認められ、全く編集体を得られないもの、片アリルのみ編集されるものなど様々であった。特に、植物の発生分化に影響が大きいと考えられる遺伝子(*FT*、*COPI* など)をターゲットとした場合、変異が入りにくく、編集効率が下がる傾向が認められた。現在、農林水産省の農林水産研究推進事業により、花持ちや花型に関わる遺伝子について編集システムの育成を進めており、*NAC* 遺伝子や *AGAMOUS* 遺伝子の編集体も獲得している。今後、表現型の確認を行い、花持ちが良く、省力栽培に適したリンドウ育種素材の作出を行う予定である。

また、得られた花色編集体(*DFR*、*F3H*等)に野生株の花粉を交配したところ、外来遺伝子(*Cas9*、*CaMV35Spro*)が検出されないヌルセグリガントの作出に成功した。現在は PCR による検出のみの結果であるが、今後、NGS 解析等を活用することにより、ゲノム編集ツール(T-DNA)が本当にゲノムから除去されているかの確認を進め、ゲノム編集システムを実用化するために必要な基礎情報を蓄積していく予定である。

3. まとめ

今後、さらなる効率向上を目指した手法の開発が必要であるが、現時点で CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術はリンドウにおける遺伝子の機能解析に有効な手法であることが示されている。また、改良型の Cas、Base Editing(一塩基編集)、Gene Targeting 等の新しい技術の利用性も検討していく必要がある。さらに、昨年秋の関係各省庁による通達では、ゲノム編集技術の利用により得られた生物の取扱い方針が示されている。「遺伝子組換え生物等」に該当しない場合はカルタヘナ法における規制対象外となるため、実用化し易いと考えられる。ヌルセグリガントの作出や確認手法、当代で編集ツールが組み込まれない手法の確立等を進めていく予定である。

4. 文献

1. Tasaki, K., Higuchi, A., Watanabe, A., Sasaki, N., and Nishihara, M. Effects of knocking out three anthocyanin modification genes on the blue pigmentation of gentian flowers. *Scientific Reports* 9, 15831 (2019).
2. Tasaki, K., Yoshida, M., Nakajima, M., Higuchi, A., Watanabe, A., and Nishihara, M. Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione *S*-transferase gene in Japanese gentian with the CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biology* (2020, in press)

講演番号：WS3-B05

産業応用から見た植物細胞培養技術によるファイトケミカル生産

多葉田 誉*

北海道三井化学株式会社 ライフサイエンスセンター

Phytochemical production by plant cell culture technology from the viewpoint of industrial application

Homare Tabata*

Life Science Center, Hokkaido Mitsui Chemicals, Inc.

*homare.tabata@mitsuichemicals.com

Plant-based phytochemicals have been successfully used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The content of phytochemicals in plants is often very low, so it is desirable to develop highly efficient methods for producing phytochemicals. Plant cell culture technology is one way to solve this problem. Plant cell culture technology is not only efficient in producing phytochemicals, but also better than cultivation in terms of ecology, traceability, and sustainability. To use phytochemicals as active pharmaceutical ingredients or intermediates, the plant chemicals must be isolated as a single component. On the other hand, when used as a functional ingredient in cosmetics and foods, it is used as a mixture of plant chemicals. An example of application to functional cosmetics is the production of *trans*-resveratrol by using Wild Grape cell suspension cultures. In addition, for application to pharmaceutical intermediates, high production methods for taxane compound that combine plant cell culture technology and gene control technology are being investigated.

1. はじめに

植物は多様なファイトケミカルを生産することが知られており、単一化合物に精製して医薬原体や中間体としての利用や、混合物の形で化粧品や食品など様々な分野で利用されている。しかしながら、実用化されているファイトケミカルは極一部に過ぎず、含有成分として同定され機能評価がなされたとしても安定的な供給が可能とならなければ産業利用には至らない。更に、植物資源の多くを海外からの輸入に頼っている現実があるが、生物多様性条約への対応に加え、COVID-19 の拡大により世界中で経済活動が停滞する事態を経験すると、サプライチェーンの見直しも考慮しなければならず、国内資源をどのように利用し尽くすかも重要な課題である。

2. 産業応用分野の違い

ファイトケミカルの産業利用において、医薬原体や中間体への利用では不純物の除去が必須となる。植物細胞培養により目的とするファイトケミカルが高生産されても、ほとんどの場合は目的とする 1 成分のみが生産されるのではなく、生合成上近縁の化

化合物が共存する。従って、培養において目的成分の高生産を図ると共に高い純度で生産できれば培養に続く抽出精製工程の軽減に繋がり、産業応用の観点で有利である。一方、化粧品や食品分野への利用では、最終製品の価格帯に適合した機能原料の配合濃度という観点が実用化には必須であり、また安全性の点で使用可能な溶剤が限られることからファイトケミカルの精製度を高めることは容易ではなく、混合物の形で機能性と安全性を追及することとなる。

3. 植物細胞培養技術によるファイトケミカル生産

産業応用の観点から、ヤマブドウ培養細胞を用いた機能性化粧品原料開発とイチイ培養細胞を用いたタキサン系医薬中間体の開発について紹介する。

ヤマブドウ (*Vitis coignetiae*) の茎部より天然型植物ホルモン IBA で継代培養可能な VcT1 株を取得し、*trans-resveratrol*(RSV)の高生産法を確立した。乾燥重量あたりの RSV 含量はブドウ茎部に比べて 3000 倍にもなり、また褐色を呈する RSV 重合体の生成を抑制して無色化し、更にシクロデキストリンによる包接で RSV の安定化を図ると共に水溶性を向上させ、機能性化粧品原料「ResverAQUA」を開発した[1]。

また、イチイ (*Taxus cuspidata*) 細胞培養による医薬中間体 10-deacetylbaaccatin III (10-DAB)の生産法開発を、NEDO が推進するスマートセルプロジェクトにおいて進めている。我々は 1990 年代にイチイ培養細胞による抗ガン剤 paclitaxel の生産法を開発したが[2]、本法によるタキサン系抗ガン剤の供給は全供給量の 20%程度に過ぎず、未だ殆どが海外での 10 年にも及ぶ栽培により供給されている。主要なタキサン系抗ガン剤はいずれも 10-DAB を中間体として合成されるが、イチイ樹木中のタキサン化合物含有濃度は数 100ppm 程度であり、多様なタキサン化合物を 10-DAB に変換することで収量を増加させる工夫がなされている。本プロジェクトでは、イチイ細胞培養技術と遺伝子制御技術を組み合わせにより 10-DAB の高効率生産技術開発に取り組むと共に、細胞増殖速度が極めて遅いイチイ細胞の培養スケール拡大には設備投資コストが課題となり、single-use bag を用いた培養についても検討を進めている。

4. まとめ

植物細胞培養技術はファイトケミカルの高効率生産法として有用であり、遺伝子発現制御技術との組み合わせにより、更なる選択的高生産への可能性が期待される。一方で、産業応用分野により実用化に向けた制限要因が異なるため、用途に適合した製造工程を確立する必要がある。今後、国有植物資源の価値は益々高まり、未利用希少資源由来のファイトケミカル生産についても植物細胞培養技術の応用が期待される。

5. 文献

1. Tabata, H. and Usuniwa, Y.: Characteristics of the cosmetic raw material containing *trans-resveratrol* produced by *Vitis coignetiae* cell suspension cultures., *Fragrance Journal*, 43(3), 74-77 (2015).
2. Tabata, H.: Paclitaxel production by plant-cell-culture technology, p.1-23. In: Zhong JJ (ed), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, vol.87. Springer (2004).

講演番号：WS4-C01

合成生物学で必要とされるバイオ分析

花井泰三*

九州大学 農学研究院

Bioanalysis for Synthetic Biology

Taizo HANAI*

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

*taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

Abstract It has become possible to select biomolecular parts with known functions, design DNA as if writing a program, and then artificially reconstitute these parts in a model organism to perform a specific purpose. This system of gene expression control, designed and reconfigured from a combination of biomolecular parts with known function, is called an "artificial genetic circuit" and was born in the field of synthetic biology research. Artificial gene circuits are expected to be applied to various engineering fields, such as metabolic control for bioproduction. In this presentation, we will explain the applications of synthetic biology, such as artificial genetic circuits and synthetic metabolic pathways, to bioproduction and discuss the bioanalytical techniques required in such synthetic biology fields.

1. はじめに

機能既知の生体分子パーツを組み合わせて設計・再構成された遺伝子発現制御システムは、「人工遺伝子回路」と呼ばれる。人工遺伝子回路は、作製者の意図に従った特定の目的を実行させることが可能であることから、物質生産を目的とした代謝制御などのさまざまなエンジニアリング分野への応用が期待される。人工遺伝子回路と複数の酵素遺伝子を組み合わせて構成された人工的な代謝経路（合成代謝経路）の研究をあつかうのは、合成生物学と呼ばれる研究分野である。本シンポジウムでは、これまでの研究を中心に、合成生物学の工学的な応用研究について解説を行い、合成生物学分野で必要とされるバイオ分析技術について議論したい。

2. 代謝トグルスイッチによるイソプロパノール生産向上

一般的な代謝工学の分野では、物質生産と競合する経路に関する遺伝子をゲノム上から破壊（ノックアウト）することで、目的物質の生産性の向上を図る。しかし、目的物質のトータル生産量は一細胞あたりの生産量×細胞数であるため、従来の遺伝子ノック

アウトに基づく代謝工学では、その破壊が著しい菌体増殖の低下を招く遺伝子は改変対象から排除するしかない。このため、物質生産と菌体増殖のどちらにも重要な酵素遺伝子が持つトレードオフ関係を解消することできない。我々は、人工遺伝子回路（代謝トグルスイッチ）を用いた遺伝子発現制御を行い、「菌体増殖に適した代謝状態（細胞増殖モード）」と「物質生産に適した代謝状態（物質生産モード）」を人為的に切り替えること（代謝流束制御）でこの問題を解決することを試みた[1]。代謝トグルスイッチの実際の利用には、我々が過去、合成代謝経路を大腸菌に導入することにより生産に成功しているイソプロパノールの生産[2]を対象とした。

3. 菌体濃度センサーによる自律的代謝流束制御

代謝トグルスイッチを用いた代謝流束制御では、その効果を最大限に引き出すために、代謝流束制御のタイミングが非常に重要となる。そのために、上記のイソプロパノール生産実験では、菌体密度を指標として代謝流束制御のために利用した IPTG 添加のタイミングを最適化した。しかし、実際の生産過程においてこの方法を行うためには、菌体密度を断続的にモニタリングし、誘導剤を添加しなければならない。このような人為的な誘導操作をなくし、大腸菌による自律的な代謝流束制御を実現するために、我々は大腸菌においてクオラムセンシング機構の再構築と改良に取り組んだ[3]。

4. 最後に

活性の高い酵素の獲得には、ランダム変異を導入する方法が用いられるが、そのスクリーニングには、細胞の破壊、活性の測定など、多くの手間がかかり、多くのサンプルを処理することは難しい。そこで、人工遺伝子回路を構築し、蛍光により酵素活性を評価できるハイスループットな酵素活性測定システムを構築する研究も最近行っている。

人工遺伝子回路は、細胞内外のさまざまな物質濃度をセンシングし、遺伝子発現の ON-OFF 制御などに用いることで、より有益で、複雑な動作を行わせることが可能となる。今後は、さまざまな物質をセンシングするバイオ分析法を、人工遺伝子回路に組み込むことができれば、合成生物学分野において、新たな展開が望めることとなる。

5. 文献

1. Yuki Soma, Keigo Tsuruno, Atsushi Yokota, Taizo Hanai: Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch, *Metabolic Engineering*, 23, 175 (2014).
2. Taizo Hanai, Shota Atsumi, James C. Liao: Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7814 (2007).
3. Yuki Soma, Taizo Hanai: Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production., *Metabolic Engineering*, 30, 7 (2015).

講演番号：WS4-C02

高機能化ナノ粒子を用いたバイオ分析

座古保^{1*}

¹愛媛大学

Bioanalysis using functionalized nanoparticles

Tamotsu Zako^{1*}

¹Ehime University

*zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

Sensitive detection of biomolecules such as proteins and DNA is important in medical diagnosis and bioscience research. Here we present our approach utilizing dark field microscopy (DFM) for the detection of nanoparticle aggregation induced by target biomolecules. Since DFM can detect scattered light from individual single metal nanostructures to examine AuNP aggregation, it is expected that a small amount of AuNP aggregates can be detected with DFM, which is difficult with the previous ensemble measurements. This approach has been successfully applied to detect DNA molecules at sub-pM level (1).

DFM was then employed to detect amyloid beta (A β) protein aggregates, including fibrils and oligomers. Since A β aggregates are neurotoxic and are considered to cause Alzheimer's disease, detection of A β aggregates is important for early recognition of diseases. However, conventional method using fluorescent probe, Thioflavine T, requires 1~5 μ M samples for their detection. Here the A β aggregates-induced AuNPs assembly was analyzed with DFM, and the LOD of A β oligomer and fibrils using this method reached as low as pM level (2). It is expected that this AuNP-based immune sensing method could be developed with higher sensitivity than traditional detection methods such as fluorescent probe detection. These insights should also open opportunities for the use of DFM in various analytical methods using NP assembly (3,4).

1. はじめに

生物情報の定量的理解のためには、高感度かつ簡便なバイオ分析手法が重要となる。近年、金ナノ粒子を用いたバイオ分析が注目されている。直径数~数十ナノメートルの金ナノ粒子の水溶液は赤色を呈している一方で、外部刺激・操作によって金ナノ粒子を凝集させると、水溶液は赤色から薄青色に変色する。これまで、この金ナノ粒子の色調の変化を利用して様々な分子を検出するセンサーを構築しようという試みが数多くされてきたが、検出感度に問題があった。

2. 金ナノ粒子を用いた高感度分子検出

我々は金ナノ粒子凝集を一分子観察してやれば、凝集を高感度に検出することができ、ひいてはターゲット分子の超高感度検出が可能になると考えた。この目的のために暗視野顕微鏡(DFM)を用いた。

DFMではコンデンサーで絞った光を照射し、ナノ粒子からの散乱光をイメージングする。視野下でナノ粒子あるいはその

凝集体一つひとつの散乱光強度を観察することで、ナノ粒子凝集体および凝集をおこすターゲット分子の高感度検出が可能になると期待できる (Fig.1)。

これまでに、表面修飾により高機能化した金ナノ粒子を用いて、DNA やタンパク質などの高感度検出に成功している。例えば、1本鎖 DNA を担持した金ナノ粒子(直径 40 nm)が塩および相補的な1本鎖存在下で示す非架橋凝集をDFMにより一分子解析することで、100 fM の試料 DNA を検出することができた (Fig. 2A) (1,3)。また、抗体修飾金ナノ粒子を用いた、アルツハイマー病などの原因と考えられているアミロイド凝集検出(Fig. 2B) (2)や、核酸アプタマー修飾金ナノ粒子による、タンパク質検出(4)に成功している。

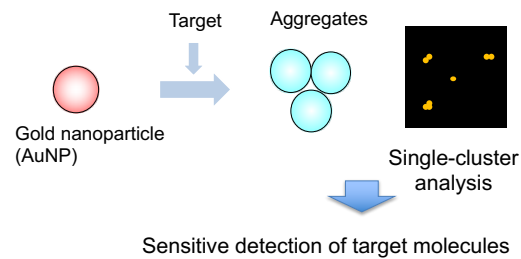


Fig. 1 Sensitive detection of target molecules using single-cluster analysis of target-induced AuNP aggregation

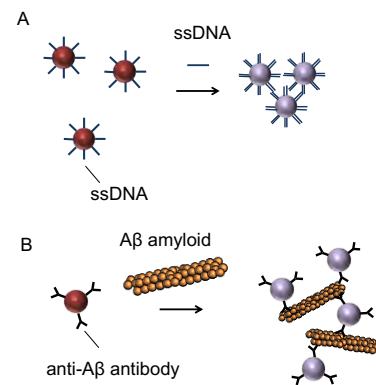


Fig. 2 AuNP aggregation induced by (A) ssDNA and (B) Aβ amyloid

3. まとめ

金ナノ粒子はバイオ分析において有望な材料であり、疾病の原因分子やマーカー分子検出などによる医用応用への展開が期待される。これには表面設計が鍵となっており、合成生物学的アプローチによる、様々な生体分子を用いた修飾法の開発が望まれる。

4. 文献

1. T. Bu, T. Zako*, M. Fujita and M. Maeda*, *Chem. Comm.*, 49, 7531 (2013)
2. T. Bu, T. Zako* and M. Maeda, *Anal. Sci.*, 32, 307 (2016)
3. G. Wang, T. Bu, T. Zako*, R. Watanabe-Tamaki, T. Tanaka, M. Maeda*, *Chem. Phys. Lett.*, 684, 310 (2017)
4. Y. Yano, M. Nisougi, Y. Yano-Ozawa, T. Ohguni, A. Ogawa, M. Maeda, T. Asahi and T. Zako* *Anal. Sci.*, 35, 685 (2019)

講演番号：WS4-C03

油中マイクロ水滴でのその場実験操作とタンパク分析法

○火原彰秀、福山真央

東北大学多元物質科学研究所

In-line pretreatment for water-in-oil microdroplet and its applications to protein analysis

Akihide Hibara*, Mao Fukuyama

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

*hibara@tohoku.ac.jp

Aqueous microdroplets in microfluidic devices have been utilized for various bioanalysis applications. We have proposed a selective enrichment method for the microdroplet operations by utilizing transport phenomena of solvent and solutes from the aqueous microdroplet to hydrophilic space in surrounding micelles in continuous organic phases. In this presentation, we will show some applications containing protein analysis.

1. はじめに

マイクロ流体を用いる高性能分析デバイスの研究が進展している。このなかで、マイクロ流路中の油中マイクロ水滴やマイクロウェル中に孤立した水相は、分子・粒子・細胞などを閉じ込める場として広く利用されている。しかしながら、ラボスケールでは一般的な濃縮や分離といった分析前処理操作の集積化は達成されていない。そこでわれわれは、マイクロ水滴と油相中のミセルの間の輸送現象を利用するマイクロスケールの「選択濃縮法」を着想した[1]。Fig. 1 にその概要を示す。

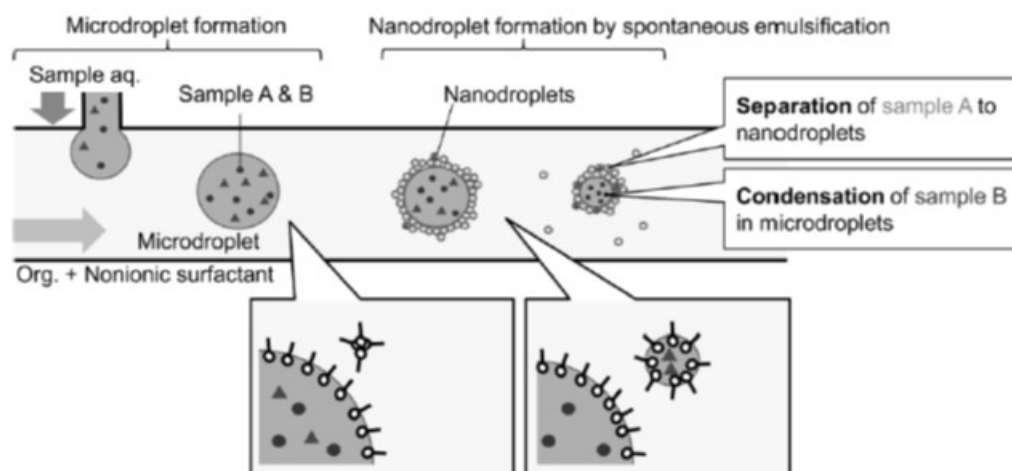


Fig. 1 Conception of microdroplet selective enrichment. Reprinted with permission from Ref. [1]. Copyright (2015) American Chemical Society.

2. 分配操作

マイクロ水滴をマイクロ流中のマイクロウェルに固定した状態で、ミセルを含む油相を流すとマイクロ水滴中の水がミセルの親水空間に分配する現状が連続して起こり、マイクロ水滴が縮小する。このとき同時に溶質もミセルに分配するが、その速度には溶質依存がある。これらの現象を利用すると、油相の流速、言い換えるとミセルの水滴への接触時間を変えるだけで濃縮と希釈を切り替えることができることを示した[2]。

3. タンパク濃縮・分析

タンパクを含む水溶液を濃縮すると結晶が得られることを見いだした。このとき濃縮速度により液滴内に得られる結晶数がことなる。タンパク過飽和溶液からの核生成現象解析に用いることができる[3]。また、蛍光ラベル化した小分子が濃縮中に油相ミセル側に分配しやすい現象を利用すると、濃縮中に競合的なバイオアッセイが集積可能であることも示した[1]。

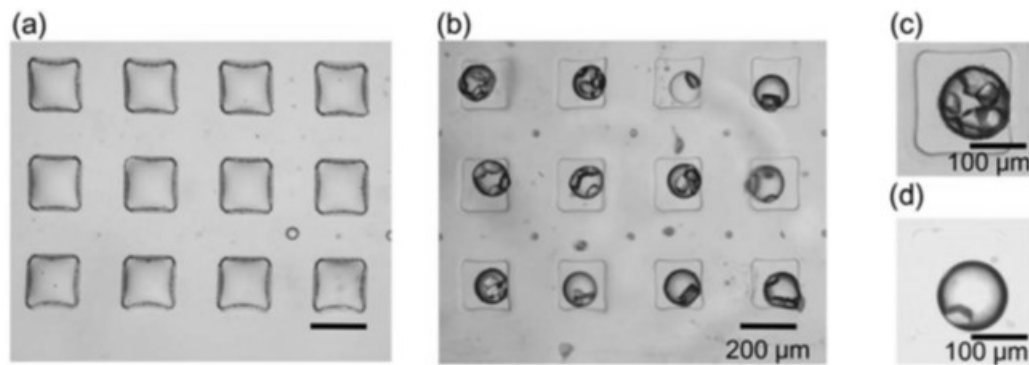


Fig. 2 Protein crystallization utilizing microfluidic selective enrichment. Reprinted with permission from Ref. [3]. Copyright (2015) Royal Society of Chemistry.

謝辞 この研究は「人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンス」の助成を受けたものです。

4. 文献

[1] M. Fukuyama, A. Hibara, Microfluidic Selective Concentration of Microdroplet Contents by Spontaneous Emulsification, *Analytical Chemistry* **87** (2015) 3562–3565.

DOI: [10.1021/acs.analchem.5b00155](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00155).

[2] M. Fukuyama, A. Hibara, Y. Yoshida, K. Maeda, Kinetic Switching of the Concentration/Separation Behavior of Microdroplets, *Analytical Chemistry* **89** (2017) 9279–9283. DOI: [10.1021/acs.analchem.7b02062](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02062).

[3] M. Fukuyama, A. Akiyama, M. Harada, T. Okada, A. Hibara, Microfluidic protein crystallisation controlled using spontaneous emulsification, *Analytical Methods* **7** (2015) 7128–7131. DOI: [10.1039/C5AY00578G](https://doi.org/10.1039/C5AY00578G).

講演番号：WS4-C04

ゲルマイクロドロップレット (GMD) 技術を活用した ハイスループット高生産性細胞スクリーニング手法の開発

津田 宗一郎^{1*}, 町田 雅之², 藤谷 拓嗣³

¹ 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ, ² 金沢工業大学, ³ 中央大学

Development of high-throughput screening method for high producer cells using gel-microdroplets (GMDs)

Soichiro Tsuda^{1*}, Masayuki Machida², Hirotsugu Fujitani³

¹On-chip Biotechnologies Co. Ltd., ²Kanazawa Institute of Technology, ³Chuo University

*s-tsuda@on-chip.co.jp

Abstract: Isolation of high-producer cells is a common yet labor-intensive issue with cell line development. We here propose a high-throughput screening method using gel microdroplets (GMDs) and microfluidic cell sorter to obtain such cells in semi-automated fashion.

1. はじめに

近年の合成生物学・代謝工学の飛躍的な発展により、目的とする有用物質（タンパク質、二次代謝産物）を産生する生物の構築は容易になりつつある一方、個々の細胞の「個性」に由来する物質生産性の違いは未だ課題となっている。これは遺伝子工学的に物質生産を行う場合に限らず、伝統的な紫外線照射などで変異体を作り細胞育種を行う場合でも同様であり、微生物や動物細胞など生物の種類に限らず普遍的な課題であると言える。

この問題に対し、我々が開発しているゲルマイクロドロップレット(GMD)とマイクロ流路型セルソーターを活用したハイスループットスクリーニング手法を紹介する。

2. 手法と結果

本手法ではまずマイクロ流路を用い、均一サイズの water-in-oil ドロップレットを作成する。これには包埋される細胞とハイドロゲル素材が含まれており、これを鋳型としてゲル化・オイル除去を行うことで、細胞が封入されたハイドロゲルの「ボール」（ゲルマイクロドロップレット、GMD）が生成できる。GMD の直径は 30~150 μm 程度までが可能であり、マイクロ流路を使うことで数十万個以上のスケールで大量にドロップレットが生成可能となる。

これら 1つ1つの GMD はいわば細胞が含まれる微小な「試験管」として見なすことがで

きるため、GMD 内部でアッセイを行うことでセルソーターにより高速にスクリーニングすることができる。

具体例を示す[1]。図1では、モデルタンパク質として分泌型ルシフェラーゼを生産するよう形質転換した出芽酵母をアガロース GMD ヘシングルセルで包埋した。酵母は GMD 内部で増殖、タンパク質生産を行うが、そのままでは生産された物質は GMD 外部へと拡散してしまうため、物質を内部へと留めておくための「しかけ」が必要となってくる。ここではルシフェラーゼに conjugate された HA タグと GMD のアガロースポリマー上に固定化した抗 HA タグ抗体を用いているが、これ以外にもナノビーズを GMD に大量に封入し、その表面上で抗原抗体反応やアビジン・ビオチン反応などにより生産物質を補足することも可能である。

捕捉された物質はタンパク質であれば蛍光二次抗体や、Halo タグと蛍光リガンドなどで蛍光標識することでセルソーターでのスクリーニングが可能になる（ここでは後者の方法を用いた）。ソーティングされた酵母を個別に培養し、分泌されたルシフェラーゼ活性を測定したところ、元株（図2点線）に比べて4倍以上の生産量を持つ株の取得が確認された（図2）。このスクリーニングを複数回行うことで、さらに生産性が高く、かつ増殖速度も高い個体の取得が可能になると期待できる。

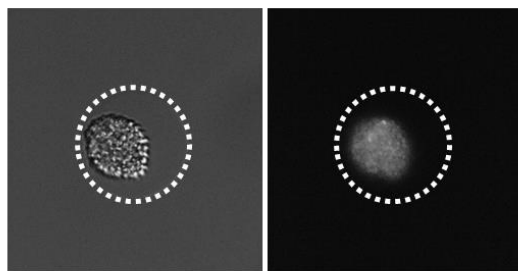


図1 ソートされたGMDの明視野・蛍光顕微鏡画像（点線はGMDの輪郭を表す）

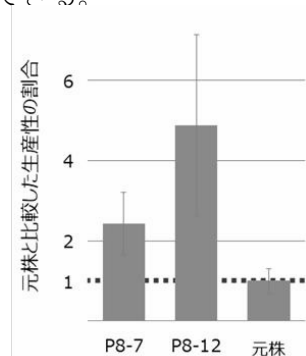


図2 ソートされた細胞の生産性

3. まとめ

生物を用いた物質生産において高生産化は避けて通れない問題であるが、寒天プレート上でコロニーを作るなどの伝統的な手法は手間がかかり、非効率的であった。GMD を用いる本手法はこれを半自動化・高効率化することができると期待される。ハイドロゲルはアガロースだけでなく、アルギン酸やゼラチン、その他人工ポリマーなど多様な素材が使用可能であり、かつ GMD 内アッセイについても設計の自由度が高く、様々な手法に対応できる。これにより普遍的な細胞育種の方法として GMD を用いたスクリーニング手法が有効であると考えている。

4. 文献

1. Fujitani, H., Tsuda, S., Ishii, T., and Machida, M: High-throughput screening of high protein producer budding yeast using gel microdrop technology, BioRxiv, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/830596v1>

講演番号：WS4-C05

人工細胞系を用いたデジタル免疫測定への挑戦

○上田 宏*, 蘇 九龍

東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所

A Challenge to digital immunoassay based on protocells

Hiroshi Ueda*, Jiulong Su

Lab. for Chem. and Life Sci., Inst. of Innov. Res., Tokyo Tech.

*ueda@res.titech.ac.jp

It is known that digital counting of fluorescent signals generated in many small compartments can significantly improve the detection sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). However, the reported digital ELISA systems need extensive washing steps to remove background signal, which hampers their performance. To tackle this problem, we developed a vesicle (Protocell) array wherein binding of an external protein analyte is coupled to signal amplification and intra-vesicular fluorescence readout.

1. はじめに

近年、臨床診断や食品衛生など多くの分野で、微小空間で一分子のターゲット由来の信号を検出し、陽性微小空間の数を数えることで、PCRやELISAなど各種測定の検出感度を飛躍的に向上できるデジタル測定系が注目されている。しかし、ミセルのような閉鎖空間で反応させ陽性ミセルをカウントするだけでよいPCRと異なり、デジタルELISAにおいては通常のELISAと同様ビーズ上で免疫反応と洗浄を行ったあと、それぞれのビーズを微小空間に分離して酵素反応を行い、陽性ビーズのカウントを行う必要があり、手間と時間がかかることから広く普及するには至っていない。このような洗浄操作が不要で、微小空間で実施可能な抗原・抗体測定法が開発されれば、簡便なデジタル免疫測定系構築の基盤技術となりうる。そこで今回、人工細胞Protocellを用いた分離不要な免疫測定系の検討を行った[1]。

2. 抗体検出系の構築

モデルとして、短いペプチドタグに対する抗体に対するセンサーとして働くProtocellの構築を試みた(Fig. 1)。このProtocellは単層リン脂質膜の外側にアンテナとなる6~15アミノ酸程度の認識タグ配列を出した直径10 μm程度の脂質小胞(リポソーム)であり、その下流に上皮細胞増殖因子由来の膜貫通配列を介してセンサー酵素であるβ-グルクロニダーゼ(GUS)変異体(GUS IV5_KW) [2]が結合されている。

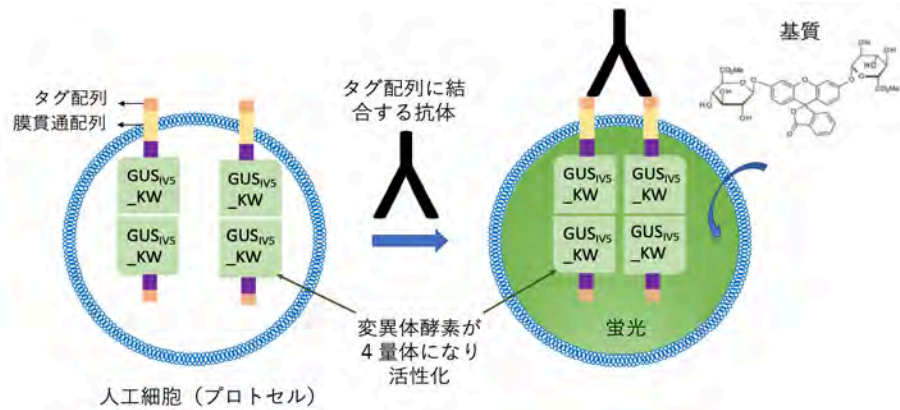


Figure 1. Scheme of protocell-based antibody sensor

この酵素は4量体であるGUSに安定化変異と二量体間界面変異を施したもので、通常は極めて低活性だが強制的に近接させると野生型とほぼ同じ活性を示す。これを精製成分からなる試験管内タンパク質合成系PURE systemを用いてProtocell中で合成することで、合成されたタンパク質のタグ部分が自発的に膜を透過して膜外に提示されることを期待した。この結果、期待通り6残基のヒスチジンが連なったHisタグを提示した場合、抗Hisタグ抗体を加えることで、蛍光を発するプロトセルが多数出現した。なおこの際、膜貫通配列を付加しないタンパク質を同時に発現させることで、提示効率が向上した。さらに代表的ながん治療用抗体であるハーセプチン(Herceptin, Trastuzumab)のミモトープを提示してフローサイトメーター(FCM)で陽性細胞をカウントした場合、加えたハーセプチン濃度に応じて蛍光陽性プロトセル数が増加した。

3. 抗原検出系の構築

このProtocellを各種抗原の検出に使えないか検討するため、タグとしてSpyTagという14残基のペプチドを提示する膜結合型酵素をプロトセル内で合成し、プロトセル外から、SpyCatcherというSpyTagと自発的に共有結合するタンパク質をカフェイン結合Nanobodyと融合したVHH(Caf)-SCタンパク質を加えることで、カフェインセンサーProtocellを調製した。

この結果、陽性コントロールであるHisタグ抗体あるいはカフェインにより、FCMで数えた蛍光陽性細胞の数が濃度依存的に増加した。すなわち抗原カフェインによりNanobodyの二量体形成が誘導され、センサーを活性化させることに成功した。なおこの際の検出感度は各種飲料水中のカフェイン量を十分検出可能なものであった。

4. まとめ

以上より、「信号伝達する人工細胞」のコンセプトが実証された。今後、protocellのサイズと検出法の最適化などによる感度向上について検討していきたい。

謝辞 本研究はJST SICORP「日本-シンガポール共同研究」の支援により行われた。

文献

- [1] Su, J., Kitaguchi, T., Hoon, S., Ueda, H., *et al.*: *Sci. Rep.*, **9**, 18189 (2019)
- [2] Su, J., Beh, C., Ueda, H., *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **128**, 677-682 (2019)

講演番号：WS5-A01

細菌ベシクルの複雑性と多機能性： リポソームとは何が違うのか？

田代 陽介^{1,2*}

¹静岡大学大学院工学領域, ²JST さきがけ

Complexity and multifunctionality of bacterial vesicles: what is different from liposome?

Yosuke Tashiro^{1,2*}

¹College of Engineering, Academic Institute, Shizuoka University, ²JST PRESTO

*E-mail: tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp

Abstract. Bacterial extracellular vesicles are mainly composed of proteins and phospholipids and called as “membrane vesicles”. Such liposome-like membrane vesicles are applied for vaccines because they are incorporated into cells. As those components are heterogeneous and variable, it is difficult to comprehensively understand those functions and properties. Here, I talk about characteristics of bacterial membrane vesicles and discuss the difference from synthesized liposome.

1. はじめに

多くの細菌は主にリン脂質と膜タンパク質で構成された膜小胞（メンブレンベシクル）を形成し細胞外に放出している。そのベシクル内部には細菌由来の様々な分子が内包されている点、細胞に取り込まれやすい点から、ワクチン等への応用が期待されている。一方、リン脂質二重層で構成されたリポソームは簡易的に合成され、従来よりドラッグデリバリーシステムの媒体や人工細胞創製の研究材料に応用されてきた。人工リポソームはその成分が均一であるものの、細菌ベシクルは細胞と同様に複雑であるがゆえに、その機能・特性については不明な点が多い。我々は細菌ベシクル形成の生物学的意義の理解とその生物工学的利用への展開を目的に、その形成機構解明を目指してきた。本講演では、これまでに明らかにしてきた細菌ベシクルの機能と特性について紹介し、リポソームとの共通点・相違点について議論する。

2. 細菌ベシクルの複雑性と多機能性

細菌ベシクルは他の生物における細胞外小胞（エクソソーム等）と同様に、構成するタンパク質、リン脂質等は多様性に富んでいる。構成されるタンパク質の大部分は細胞外膜に局在するタンパク質であるが、タンパク質だけではなくリン脂質においても各々の存在比は細胞外膜とベシクルで異なることが明らかとなり^{1,2}、細胞外膜の特

定の部分からベシクルが形成されると考えられた。*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 におけるベシクル特性の経時的変化を解析したところ、培養条件が同一であっても形成されるベシクルは培養段階で異なり、対数増殖期と定常期ではタンパク質組成が異なることが示された³。このような組成の異なるベシクルが形成される要因として、ベシクル形成プロセスが多岐にわたる点が挙げられる。

また、放出される細菌ベシクルは組成だけでなく形状も均一ではない。我々はこれまでに、膜小胞過剰形成株 *Buttiauxella agrestis* JCM1090^T $\Delta tolB$ 株について調べたところ、リン脂質二重層の一重膜から成るベシクルの他に、多重膜小胞 (multilamellar vesicles) や多小胞含有小胞 (multivesicular vesicles) を形成していることが明らかとなった。以上の結果から、特に細菌ベシクルを過剰に形成する細菌においては、放出されるベシクルの形状は一様でないことが示された。

このように細菌ベシクルは同一の細菌種から形成されていても組成・形状ともに一定ではないことから、生物学的機能としても様々である。細菌ベシクルは、細胞内部の不要物質の排出という細胞外分泌としての機能の他^{4,5}、細胞外シグナル等の伝達媒体としての機能を有していることをこれまでに示してきた⁶。特に細菌ベシクルの表面の特性は細菌種により大きく異なり、特定の細胞に選択的に情報を伝達する機能を有することが明らかとなった^{7,8,9}。

3. まとめ

以上のように、細菌ベシクルは合成リポソームに比べて、組成が多種多様でありその成分も環境変化により統一されておらず、機能・特性について不明な点が多い。その理由として小胞形成プロセスが多岐にわたることが挙げられる。しかしその種々雑多な特性が免疫効果を促進する要因となりワクチンとしての利用価値を高めていると考えられる。細菌ベシクルの形成機構と内包物の制御が可能となれば、さらなる細菌ベシクルの利用性を拡大するとともに、合成リポソームを用いた応用への転換など、様々な可能性が期待できる。

参考文献

1. Tashiro Y *et al.*, *Environ. Microbiol.* 14:1349-1362 (2012)
2. Tashiro Y *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem* 75:605-607 (2011)
3. Tashiro Y *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3732-3739 (2010)
4. Tashiro Y *et al.*, *J. Bacteriol.* 190:3969-3978 (2008)
5. Tashiro Y *et al.*, *J. Bacteriol.* 191:7509-7519 (2009)
6. Tashiro Y *et al.*, *Microbes Environ.* 25:120-125 (2010)
7. Hasegawa *et al.*, *Front. Microbiol.* 6:633 (2015)
8. Tashiro Y *et al.*, *Front. Microbiol.* 8:571 (2017)
9. Tashiro Y *et al.*, *Biophys. Physicobiol.* 16:114-120 (2019)

講演番号：WS5-A02

リポソーム膜におけるマイクロ～メゾスケール相分離挙動の評価

菅 恵嗣*

東北大学 大学院工学研究科 化学工学専攻

Characterization of Phase Separation Behaviors in Liposome Membranes at Microscale and Mesoscale

Keishi Suga*

Department of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

*keishi.suga.b7@tohoku.ac.jp

Biologically occurring vesicles, such as exosome, are considered as submicrometer-size lipid self-assembly. Herein, the phase separation behaviors of liposome membranes were studied focusing on nano-sized domain formation. The correlation between membrane fluidity and membrane polarity were investigated using fluorescent probes such as 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 6-lauroyl-2-dimethylamino naphthalene (Laurdan). Unsaturated lipids (DOPC) formed disordered phase (l_d), while the coexistence of saturated lipids and cholesterol (Chol) resulted in the formation of ordered phase, which was probed by decreased membrane fluidity and by membrane dehydration. The size of nanosized ordered domains was estimated using the TEMPO quenching method. Because TEMPO can quench DPH distributed in the disordered phases, the remaining fluorescence from DPH is proportional to the size of the ordered domain. The domain sizes calculated for DOPC/DPPC (50/50), DOPC/DPPC (25/75), DOPC/Chol (70/30), and DOPC/DPPC/Chol (40/40/20) were 13.9, 36.2, 13.2, and 35.5 Å, respectively. We estimated the ordered domains in milk exosome membranes, which were enriched with Chol and sphingomyelin.

1. はじめに

生体膜由来の脂質により形成される細胞外小胞(エクソソーム)は、細胞間の物質移動やシグナル伝達を担うことが知られている。エクソソームの基本構造は粒径 40-150 nm 程度の脂質二分子膜ベシクルであり、その膜はスフィンゴミエリン(SM)やコレステロール(Chol)で構成されていることが報告されている[1]。これら脂質は、細胞膜の機械的強度を向上させる役割を担い、さらに脂質膜中でドメイン(秩序相)を形成する性質がある[2]。従来では、顕微鏡で可視化できる脂質膜相分離(micrometer-size ドメイン)について研究が行われてきた一方で、サブミク

ロンサイズの膜ドメインを観察した例は少ない。本研究では、蛍光プローブによる膜特性解析を基盤としたナノサイズの脂質膜ドメイン形成挙動の評価手法について報告する[3]。

2. TEMPO-DPH 消光法によるナノドメイン評価

膜の疎水場に配向する蛍光プローブ(DPH, Laurdan)を用いて、各種のリポソーム膜における膜流動性ならびに膜極性を評価した。不飽和脂質から成るリポソームは高流動性かつ親水的な膜特性を示した。一方で、飽和脂質, SM および Chol を含むリポソームは秩序的な膜特性を示した。膜流動性と膜極性の相関より、秩序相の形成を定量的に解析することができる。さらには、秩序相に配向した DPH をラジカル剤 TEMPO で消光させ、その消光挙動よりドメインサイズを推定する方法を開発した。各種のリポソームにおける秩序相ドメインの半径は、DOPC/DPPC (50/50)では 13.9 Å, DOPC/DPPC (25/75)では 36.2 Å, DOPC/Chol (70/30)では 13.2 Å, DOPC/DPPC/Chol (40/40/20)では 35.5 Å であった。

3. エクソソームの膜特性解析

細胞へのエクソソームの取り込みや血中安定性など生理学的な知見は多数報告されているものの、エクソソーム膜の基礎的な膜物性に関する知見は乏しいのが現状である。蛍光プローブにより milk exosome (コスモバイオ社製)の膜流動性ならびに膜極性を評価した結果、その膜は不均一相であること明らかにした。脂質分析の結果、PC 脂質およびカルジオリピンにより disordered phase が、SM および Chol により ordered phase がそれぞれ形成されたと考えられる。

4. まとめ

蛍光プローブ解析に基づき、リポソーム(モデル系)やエクソソーム(実在系)の膜特性を定量的に評価した。サブミクロンサイズの脂質膜においても秩序相ドメインが形成されていることを明らかにし、エクソソームをはじめとする細胞外小胞で脂質相分離がおこる可能性を示した。今後、これら脂質膜特性と各種の生理学的機能の関係について解明し、膜設計の観点から生物工学分野の発展へと貢献したい。

5. 文献

[1] Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A.: Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.*, **66**, 30–41 (2017).

[2] De Almeida, R. F. M., Loura, L. M. S., Fedorov, A., and Prieto, M.: Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: A time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.*, **346**, 1109–1120 (2005).

[3] Suga, K., and Umakoshi, H.: Detection of Nano-sized Sized Ordered Domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch Binary Lipid Mixture Systems of Large Unilamellar Vesicles Using a TEMPO Quenching Method. *Langmuir*, **29**, 4830–4838 (2013).

講演番号：WS5-A03

リポソームを用いた人工細胞リアクターの構築と応用

松浦 友亮*

大阪大学 大学院工学研究科 生物工学専攻

Liposome based artificial cell assembly and its application

Tomoaki Matsuura*

Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

*matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

It has now become possible to reconstitute various biological systems *in vitro*, which exhibit features of the living cells, by assembling defined molecules. Using cell-sized liposomes and a reconstituted cell-free protein synthesis system, we have constructed an artificial cell from approximately 100 different defined molecules, which can synthesize protein of interest inside the cell-sized liposome. By using this in liposome protein synthesis system, we have been synthesizing various membrane proteins that enable the characterization of membrane proteins. In addition, in liposome protein synthesis system can be used for the directed evolution of membrane proteins entirely. Here, I will present the construction of *in liposome* membrane protein synthesis system and its application.

1. 【はじめに】

全ての細胞は、脂質から構成される細胞膜により、その内容物を区画化している。そのため、人工脂質二重膜であるリポソームは、細胞膜モデルとして、その物性は広く研究されてきた。近年、リポソームの内部にタンパク質合成反応を含む複雑な生化学反応を封入した細胞モデルを構築し、その性質を調べる研究が盛んに行われている。ボトムアップバイオロジーと呼ばれるこの研究領域では、最終的には自律的に複製する人工細胞を構築することを目指している。すなわち、無生物から生物を創り出せるかを問う。生物・生命を創り出すためには、少なくとも3つの要件を満たす必要がある。一つは、遺伝子・ゲノムがこれにコードされているタンパク質により複製すること、もう一つは細胞膜が複製すること、そして最後に、これらが同期して進行することである。現在、このような分子システムをボトムアップに創り出すべく盛んに研究が行われている。

2. 【人工細胞リアクターの構築と応用】

我々は、自律的に複製する人工細胞の構築を目指すと同時に、人工細胞を微小な反応

リアクターとして用いた応用研究にも取り組んできた。我々は、生物の主要構成成分である低分子、タンパク質、核酸、脂質を用いリポソーム内で様々なタンパク質を合成する技術を確立してきた¹⁻³⁾。約 100 種類の分子を組み合わせてできるこの「人工細胞」は、細胞サイズのリポソーム内で再構成型セルフリータンパク質合成系 PURE system により遺伝子を鋳型としてタンパク質を合成する。ゆえに酵素などの可溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質を機能がある状態で合成できる⁴⁻⁶⁾。この人工細胞は、再構成システムであるためリポソームのサイズ、脂質組成などを自在に調整可能である。このような特性を利用し、膜タンパク質機能のリポソームサイズ及び、脂質組成依存性を明らかにしてきた⁷⁻⁹⁾。例えば、ヒト由来のカルシウムトランスポーター Letm1 は、その機能を発現するためには脂質分子 cardiolipin が重要な役割を果たすことを明らかにした⁷⁾。加えて、これまでは困難であった膜タンパク質の機能進化を可能とした。具体例の一つとしては、*Staphylococcus aureus* 由来のポア形成膜タンパク質である α ヘモリシンの人工脂質膜へのポア形成効率を約 30 倍向上させることに成功した⁸⁾。最近では、生細胞では毒性が高すぎ、その機能を計測することが困難であった人工膜タンパク質の機能測定にも成功している⁹⁾。

再構成型システムの特性を利用して、新たな生体分子システムの構築を目指した研究も進めている^{10,11)}。生細胞が持っている細胞外の特定物質を認識し、これを細胞内部の生化学反応に変換する仕組みを人工細胞に持たせることに成功した¹⁰⁾。具体的には、ヒスタミンに応答する RNA 配列であるリボスイッチを開発、その下流に α ヘモリシンやホスホリパーゼ C をコードした遺伝子を PURE system と共にリポソーム内に封入した。この人工細胞はヒスタミンに応答し、内包する物質を放出する能力を持つようになった。本結果は、リボスイッチを変更することで、任意の物質に対して望みの応答を示す人工細胞の創生が可能であることを示している。また、バクテリアの細胞表層を模倣することで、人工細胞に固相に対する接着性を持たせることにも成功した¹¹⁾。具体的には、様々な物質に非特異的な吸着性を示すバクテリア由来の 200 nm もある繊維状タンパク質をリポソーム表面に固定化し、内部には酵素を内包することで、プラスチックやガラス表面といった全く性質の異なる表面に機能性のある人工細胞を接着させることに成功した。今後、この人工細胞を用いた医療・環境浄化分野における応用展開を期待している。

3. 【参考文献】

- 1) Fujii, S. *et al. Nat Protoc* 9, 1578-1591, (2014).
- 2) Nishimura, K. *et al. Langmuir* 28, 8426-8432, (2012).
- 3) Sunami, T. *et al. Anal Biochem* 357, 128-136, (2006).
- 4) Ohta, N. *et al. Sci Rep* 6, 36466, (2016).
- 5) Uyeda, A. *et al. ChemBioChem* 16, 1797-1802, (2015).
- 6) Fujii, S. *et al. ACS Chem Biol* 10, 1694-1701, (2015).
- 7) Okamura, K. *et al. J Biosci Bioeng* 127, 544-548, (2019).
- 8) Fujii, S. *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16796-16801, (2013).
- 9) Xu, C. *et al. Nature*, accepted
- 10) Dwidar, M. *et al. P J Am Chem Soc* 141, 11103-11114, (2019).
- 11) Noba, K. *et al. J Am Chem Soc* 141, 19058-19066, (2019).

講演番号：WS5-A04

大腸菌の外膜小胞高生産株の生産促進機構

尾島 由紘*, 東 雅之

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻

Production promoting mechanism of outer membrane vesicles in *Escherichia coli*

Yoshihiro OJIMA*, Masayuki AZUMA

Department of Applied Chemistry & Bioengineering,
Graduate School of Engineering, Osaka City University

*E-mail: ojima@osaka-cu.ac.jp

Escherichia coli produces extracellular vesicles, called outer membrane vesicles (OMVs), by raising a part of its outer membrane. Several gene-deficient mutants relating to envelope stress (*nlpI* and *degP*) and phospholipid accumulation in the outer leaflet of the outer membrane (*mlaA* and *mleE*) increase OMV production. The combinatorial deletion of these genes resulted that the double-gene-knockout mutant $\Delta mlaE\Delta nlpI$ showed the highest OMV production. Furthermore, observation of $\Delta mlaE\Delta nlpI$ cells using quick-freeze, deep-etch electron microscopy revealed that plasmolysis occurred at the tip of long axis in cells and OMVs were bubbled from the tip of long axis. Plasmolysis was also observed in cells of each single-gene-knockout mutant ($\Delta nlpI$, $\Delta mlaA$, $\Delta mlaE$, $\Delta degP$), suggesting that plasmolysis is a common phenotype in hyper-vesiculation strains of *E. coli*.

1. はじめに

近年、大腸菌を含むグラム陰性細菌が生産する外膜小胞(outer membrane vesicles; OMVs)と呼ばれる細胞外小胞に注目が集まっている。OMVsは、外膜が隆起し遊離してできた直径20~250 nmのナノ粒子であり、外膜やペリプラズムタンパク質によって構成される。これまでOMVsは、細胞から不要物を排出する機構であると考えられてきたが、近年になって細胞外に排出されたOMVsが様々な物質の運搬に関わっていることが明らかとなってきた。一方で、OMVsをバイオテクノロジーの分野で応用するには、生産量が少なく、分泌機構に不明な点が多いことが課題となっている。そこで本研究では、大腸菌の遺伝子改変によりOMVs高生産株を作製し、OMVsの生産を促進する機構を明らかにすることを目的とした。

2. OMVs高生産株の構築

大腸菌では、これまでいくつかの遺伝子欠損がOMVs生産量を増加させると報告されている。ペプチドグリカン層の構造維持に参与する*nlpI*遺伝子の欠損は外膜と架橋するペプチドグリカン分解を促進し[1]、外膜の外層と内層のリン脂質バランスを維持

する *mlaA* や *mlaE* 遺伝子の欠損は外膜外層へのリン脂質の蓄積を誘導し[2], ペリプラズムプロテアーゼをコードする *degP* 遺伝子の欠損はペリプラズムタンパク質の蓄積を引き起こすことで[3], それぞれ OMVs 生産量を増加させる. 我々は, これらの遺伝子欠損を重ね合わせ OMVs 生産量に与える影響を評価したところ, *nlpI* と *mlaE* の 2 重欠損株($\Delta mlaE\Delta nlpI$)が野生株の約 30 倍と最も高い生産量を示すことを明らかにした[4, 5].

3. OMVs 生産促進機構の解析

最も高い OMVs 生産量を示した大腸菌 $\Delta mlaE\Delta nlpI$ 株に関して, 急速凍結レプリカ観察を行ったところ, まず細胞の表面を観察した画像から 2 重欠損株では長軸の先端部から OMVs が隆起している様子が確認された. さらに細胞断面図の観察から長軸の先端部にペリプラズム空間が広がることで原形質分離が起きている様子が確認された. 以上の観察結果より, $\Delta mlaE\Delta nlpI$ 株では原形質分離により細胞膜から遊離した先端部の外膜がくびれて小胞を形成しやすくなり, OMVs 生産が促進されているのではないかと予想された. また, 原形質分離に関しては, それぞれ単独の遺伝子欠損株 $\Delta nlpI$, $\Delta mlaA$, $\Delta mlaE$, $\Delta degP$ 株においても観察され, 大腸菌の OMVs 高生産株に共通する表現型であると考えられる. さらに $\Delta mlaE\Delta nlpI$ 株では, 広がったペリプラズム空間内に小胞と思われる構造体が形成している様子が観察された. 細胞内小胞は $\Delta nlpI$ 株でも確認されたことから, ペプチドグリカン層の分解に関与する遺伝子 *nlpI* を欠損することで, ペリプラズム空間内での小胞形成が促進されると考えられる.

4. まとめ

外膜小胞(OMVs)は, モデル微生物である大腸菌をはじめグラム陰性細菌に共通する普遍的な現象である. ペリプラズム内に存在する細胞成分の分泌ツールとしても興味深く, OMVs 生産量の更なる向上や生産機構の解明により, 新しいバイオテクノロジー技術としての応用が期待できる.

5. 文献

1. Schwechheimer C., Rodriguez, D.L., Kuehn, M.J.: NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, 4, 375-389 (2015).
2. Roier, S., et al.: A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat. Commun.*, 7:10515 (2016).
3. Schwechheimer C., Kuehn, M.J.: Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 195, 4161-4173 (2013).
4. Ojima, Y., Yamaguchi, K., Taya, M.: Quantitative evaluation of recombinant protein packaged into outer membrane vesicles of *Escherichia coli* cells. *Biotech. Prog.*, 34, 51-57 (2018).
5. Ojima, Y., Sawabe, T., Konami, K., Azuma, M.: Construction of hypervesiculation *Escherichia coli* strains and application for secretory protein production. *Biotechnol. Bioeng.*, 117, 701-709 (2020).

講演番号：WS5-A05

グリシンによる細菌メンブレンベシクル産生の誘導とその特性

平山 悟^{1,2*}, 中尾 龍馬¹

¹国立感染症研究所 細菌第一部, ²新潟大学 大学院医歯学総合研究科

Characterization of glycine-induced bacterial membrane vesicles

Satoru Hirayama^{1,2*}, Ryoma Nakao¹

¹Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

²Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

*shirayama@dent.niigata-u.ac.jp

Abstract. Bacterial membrane vesicles (MVs) have been of great interest in recent years as a new nanoparticle delivery platform. Glycine, known to act on and weaken bacterial peptidoglycan, was found to dramatically enhance bacterial MV production. We focused on the flagella-deficient mutant of the non-pathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) and analyzed the characteristics of glycine-induced MVs. Supplementation of 1.0% glycine to culture medium not only induced cell deformation and sublysis but also increased MV production. The maximum MV yield was approximately 70-fold as the amount of protein. Compared to noninduced MVs, glycine-induced MVs had a larger mean particle size and increased inner membrane and cytoplasmic protein content in their protein profile. Notably, glycine supplementation induced MVs whose endotoxin activity was approximately 8 or 6 times lower than that of noninduced MVs when compared at the same protein or lipid concentrations, respectively. Nevertheless, glycine-induced MVs elicited an immune response in a mouse macrophage-like cell line and showed adjuvant activity in an intranasal vaccine mouse model comparable to noninduced MVs. We propose that the present method of inducing MV production with glycine can be used for emerging biotechnological applications of MVs that have immunomodulatory activities, while dramatically reducing the presence of endotoxins.

1. はじめに

細菌が放出するメンブレンベシクル (MV) は多面的な機能を有することから、ワクチン抗原やアジュバント、ドラッグデリバリーシステムなど、その応用展開が期待されている。MV 産生量は菌種によって相違があるが、グリシンによってプロバイオティクス大腸菌の MV 産生を顕著に増大できることを見出したため、その詳

細について紹介する。

2. グリシンが誘導する大腸菌 MV 産生とその特性

今後の応用展開を見据え、大腸菌はプロバイオティクスとして使用実績があり安全性の高い Nissle 1917 株 (EcN) を用いた。はじめに、鞭毛が MV 画分へ混入することを防ぐために、EcN の鞭毛欠損株を作出した。1.0%のグリシンを添加した培地でこの株を培養することにより、グリシン無添加条件に比較して MV 収量が顕著に増大し、タンパク質量としておよそ 70 倍、脂質量としておよそ 50 倍となった。グリシン誘導 MV は粒径が有意に大きくなるとともに、タンパク質の構成に変化が認められ、内膜タンパク質や細胞質タンパク質の割合が増大していることが示された。さらに、グリシン誘導 MV では、タンパク質量あたりのエンドトキシン活性が約 1/8 に減少した。一方で、グリシン誘導の有無に関わらず、EcN MV は免疫誘導活性を有しており、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 からの IL-6, IL-12 及び TNF- α のサイトカイン産生を添加量依存的に誘導した。また、オボアルブミンを抗原に用いて、マウス経鼻免疫実験によりアジュバント活性を評価すると、Poly(I:C)やコレラトキシン B サブユニットと同等か、それ以上に強力な粘膜アジュバント活性を示した。

3. まとめ

グリシンを用いた簡便な方法により、プロバイオティクス大腸菌からの MV 産生量を著しく増大させることができた。グリシン誘導 MV はサイズやタンパク質構成に変化が生じるものの、MV の有する免疫誘導活性や粘膜アジュバント活性は、非誘導 MV と同等に有していた。細菌の MV は医療をはじめとする様々な分野への応用展開のために研究がなされており、MV 収量の増大は今後の MV 活用に大きく貢献できる技術となることが期待される。

4. 文献

1. Hirayama, S. and Nakao, R.: Glycine significantly enhances bacterial membrane vesicle production: a powerful approach for isolation of LPS-reduced membrane vesicles of probiotic *Escherichia coli*. *Microb. Biotechnol.*, 13, 1162–1178 (2020).

講演番号：WS5-A06

プロバイオティクスの膜小胞を介した腸内環境制御の可能性

山崎 思乃*

関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科

Possibility of regulation of the host intestinal environment via membrane vesicles released from probiotics

Shino Yamasaki-Yashiki*

Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,

Kansai University

*E-mail: shino.ya@kansai-u.ac.jp

Lactic acid bacteria (LAB) are known as probiotics that contribute to the maintenance of a healthy intestinal microbiota composition. Notably, certain strains of LAB exhibit immunomodulatory effects on host gut immunity. We have elucidated that *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC 15893 promotes immunoglobulin (Ig) A production in Peyer's patch cells, and that membrane vesicles (MVs) released from the strain also exhibit the effects. We also demonstrated that the MVs are taken up from the intestinal lumen into the Peyer's patches, indicating that MVs might also regulate the gut immune system *in vivo*. Here, we will introduce these functions of MVs released from probiotics and discuss possibilities of regulating the host intestinal environment via MVs.

1. はじめに

ヒトの腸管には多種多様な腸内細菌が腸内細菌叢を形成して共生している。腸内細菌叢は宿主の生理機能に密接に影響し、そのバランスの破綻は腸疾患以外にも様々な疾病の引き金となる¹⁾。したがって、宿主の健康には腸内細菌叢のバランスの維持・改善が重要であり、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスの摂取が広く注目されている。中でも、腸管には生体で最大の免疫系である「腸管免疫系」が発達していることから、プロバイオティクスの免疫調節作用が期待されている。この免疫調節作用は、菌体成分や代謝物によりもたらされることが知られているが、我々は、プロバイオティクスが放出するメンブランベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞にもその作用があることを見出した。ここでは、プロバイオティクスが生産する MV の免疫調節作用について紹介するとともに、MV を介した腸内環境制御の可能性について議論したい。

2. 乳酸菌が放出するメンブランベシクル

腸管免疫系で重要なのが粘膜上に分泌される IgA 抗体であり、病原体の体内への侵入を阻止するほか、腸内細菌叢の多様性の維持にも関与する²⁾。我々はマウス小腸パイエル板細胞の IgA 産生を増強する乳酸菌として *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC

15893 を得ていたが、解析を進める中、培養液から超遠心分離により回収される難沈降性成分にも同様の作用があることを見出した。密度勾配超遠心分離により精製することで、その成分が直径 30~400 nm の MV であることを明らかにした³⁾。

3. メンブランベシクルによる腸管免疫系の活性化

細菌の MV 研究はグラム陰性菌で先行しており、厚い細胞壁をもつグラム陽性菌、特に非病原性細菌では遅れている。そこで、乳酸菌が放出する MV の機能を理解するために、*L. sakei* NBRC 15893 由来の MV がパイエル板細胞から IgA 産生を増強するメカニズムを解析したところ、MV は Toll 様受容体 2 を介して樹状細胞を活性化し、IgA 産生に関わる炎症性サイトカインなどの産生を促進することがわかった。また、MV に対する樹状細胞の応答は、菌体に対する応答と類似しており、MV の免疫賦活作用は菌体の特性を反映することが示唆された。さらに、マウスの腸管管腔に投与した MV がパイエル板内に取り込まれることを明らかにし、生体内で MV が腸管免疫系に直接作用する可能性を示した。

4. まとめ

我々は、多くの乳酸菌やビフィズス菌が MV を生産すること、発酵食品中にも MV 様の構造物が存在することなどを確認している。また、MV の放出が細菌に普遍的な現象ならば、腸管には腸内細菌が放出したおびただしい数の MV が存在し、宿主に多大な影響を及ぼしている可能性がある。ヒトのエクソソームは細胞間、組織間コミュニケーション因子としての機能をもつことが明らかになりつつあるが、プロバイオティクスを含め腸内細菌が放出する MV の機能はいまだ不明な点が多い。腸内環境の制御を目指すには、菌体成分や代謝物が宿主にもたらす作用のみならず、MV がもたらす作用についても理解する必要があるだろう。

引用文献

1. Carding S., Verbeke K., Vipond D.T., Corfe B.M., Owen L.J.; Dysbiosis of the gut microbiota in disease, *Microb Ecol Health Dis.*, **26**, 26191 (2015)
2. Pabst O.; New concepts in the generation and functions of IgA, *Nat Rev Immunol.*, **12**, 821-832 (2012)
3. Yamasaki-Yashiki S., Miyoshi Y., Nakayama T., Kunisawa J., Katakura Y.; IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC15893, *Biosci. Microbiota Food Health*, **38**, 23-29 (2019)

講演番号：WS6-B01

スマートポリマーを用いた細胞操作

宇都 甲一郎*, 荏原充宏

物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点

Maneuvering the cellular function with smart polymers

Koichiro Uto*, Mitsuhiro Ebara

Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science

* UTO.Koichiro@nims.go.jp

1. はじめに

細胞機能を司る要因として、生化学的、物理的、構造力学的シグナルなどが知られており、これらが時空間的に複雑に関わりあうことで生命システムが成り立っている。中でも、弾性率やトポグラフィーなど細胞足場の構造力学物性が発生、組織の再生、病気の発症などの生命現象と密接に関係することが明らかにされつつある。しかしながら、従来検討されている基材(足場)材料の構造力学的特性は培養中一定、すなわち「静的」システムが採用されており、生体内における細胞・組織周囲の「動的」環境とは異なる。そんな中、近年では動的環境を創出可能な新規細胞培養基材材料として形状記憶高分子材料が注目されている^[1]。我々はこれまでに半結晶性高分子である poly(ϵ -caprolactone) (PCL) をベースとした生体温度で駆動する形状記憶材料を開発し、動的な概念を有する新しい細胞培養基盤技術としての利用について報告してきた^[2]。本発表では、任意の表面およびバルク形状変化を誘導可能な細胞培養基材について紹介する(Fig. 1)。

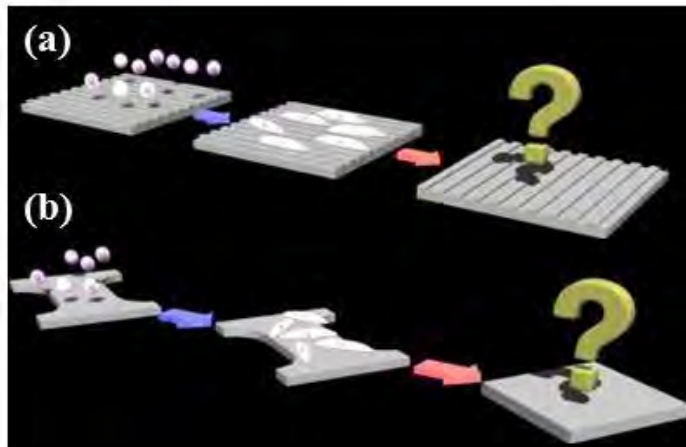


Fig. 1 Schematic illustration of adhered cell responses to changes of (a) surface topography and (b) dimension.

2. 結果と考察

形状記憶効果を表面/界面の二次元系に適用することで、細胞に対して足場のトポグラフィーを動的に変化可能な基材を作製し、細胞配向の秩序性（配向状態-ランダム状態など）や機能の動的制御に成功した(Fig. 1(a))^[3]。さらに、このトポグラフィー可変型培

養基材が、1細胞レベルでの細胞機能操作のみならず、より組織構造に近い多細胞系にも適用可能であることを明らかにした^[4]。一方、バルクの形状記憶特性の有用性を検討するために、マウス繊維芽細胞(NIH 3T3)を用いた培養実験を行った (Fig. 1(b))。ディメンション変化前の細胞配向は、固定化(記憶)させたひずみ量に強く依存し、低ひずみ領域でコンタクトガイダンスによる細胞配向が誘起された。一方、昇温によるディメンション変化を誘導させた後も細胞は細胞死を起こすことなく接着していることが観察され、高ひずみ領域ではディメンション変化後に細胞が高度に配向することを明らかとした。これは形状記憶培養基材のディメンション変化により細胞の強制的配向変化を誘起できたことを示す最初の例である^[5]。近年では、ナノファイバーから構成される形状記憶培養基材を作製し、ナノファイバー形成後に配向性をプログラム可能であるという特性を活用し、細胞の配向を手で操作するという技術を構築することに成功した^[6]。

3. まとめ

スマートポリマーが有する刺激応答性を活用し、動的培養材料を利用することで、細胞機能や運命の動的制御や環境変化に伴う細胞挙動の *in vitro* での観察が可能となる。これにより、細胞周囲の構造力学的および生化学的要因による機能制御や運命決定における役割のみならず、生体内における動的環境変化が及ぼす影響を解明できることが見込まれる。よって、材料科学を基軸とした細胞挙動制御技術の構築は、今後ますます重要となり、メカノバイオロジー研究の更なる発展や未だに十分な解明が進んでいない生物学的および医学的課題の解決に貢献できる可能性を秘めている。

4. 文献

1. Uto, K., Tsui, J. H., DeForest, C. A., Kim, D. -H.: Dynamically tunable cell culture platforms for tissue engineering and mechanobiology. *Prog. Polym. Sci.*, 65, 53-82 (2017).
2. Uto, K., Aoyagi, T., DeForest, C. A., Ebara, M.: Dynamic alterations of hepatocellular function by on-demand elasticity and roughness modulation. *Biomater. Sci.*, 6, 1002-1006 (2018).
3. Ebara, M., Uto, K., Idota, M., Hoffman, J. M., Aoyagi, T.: Shape-memory surface with dynamically tunable nano-geometry activated by body heat. *Adv. Mater.* 24, 273-278 (2012).
4. Mengsteab, P. Y., Uto, K., Smith, A. S. T., Frankel, S., Fisher, E., Nawas, Z., Macadangdang, J., Ebara, M., Kim, D. -H.: Spatiotemporal control of cardiac anisotropy using dynamic nanotopographic cues. *Biomaterials* 86, 1-10 (2016).
5. Uto, K., Aoyagi, T., DeForest, C. A., Hoffman, A. S., Ebara, M.: A combinational effect of 'bulk' and 'surface' shape-memory transitions on the regulation of cell alignment. *Adv. Healthcare Mater.* 6, 1601439 (2017).
6. Niiyama, E., Tanabe, K., Uto, K., Kikuchi, A., Ebara, M.: Shape-memory nanofiber meshes with programmable cell orientation. *Fibers* 7, 20 (2019).

講演番号：WS6-B02

「細胞と外場」の力学特性と器官原基の自己組織化

松崎賢寿¹，武部貴則²⁻⁴，吉川洋史¹

¹埼玉大学 理工学研究科，²東京医科歯科大学 統合研究機構，³シンシナティ小児病院 消化器部門，⁴シンシナティ小児病院 オルガノイドセンター

Defining Physical Properties of Extracellular Matrix and Cell Membrane Toward Self-Organizing Organ Bud

Takahisa Matsuzaki^{1*}, Takanori Takebe²⁻⁵, Hiroshi Y. Yoshikawa¹

¹Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, ²Institute of Research, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), ³Division of Gastroenterology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, ⁴The Center for Stem Cell and Organoid Medicine (CuSTOM), Cincinnati Children's Hospital Medical Center

*taka.chem@gmail.com / tmatsuzaki@mail.saitama-u.ac.jp

Abstract

Since our progress in artificially inducing liver bud from induced pluripotent stem cells, a number of researches have been tried to elucidate fundamental mechanism of organ formation and apply to actual transplant. We have been tried to quantitatively evaluate the impact of mechanical properties of "extracellular matrix and cell membrane" on self-organization of liver bud toward unveiling role of mechanical factors in organ development. First, we developed stiffness-tunable polymer substrate for liver bud formation. For the control of stiffness of polymer (Young's modulus, E kPa), the crosslinker concentration was finely tuned with mimicking mechanical environment of brain to cartilage surface ($E = 0.1$ to 100 kPa). We found that a moderate mechanical interaction between cells and substrate at $E = 10$ kPa maximized formation of liver bud. It should be noted that the methodology can be applied not only to the formation of various organ bud (e.g., kidney, cartilage, intestine, lung, heart, liver and brain etc.). These results clearly indicated that the substrate with tunable elasticity can be a general platform for organ bud culturing. Second, we focused on the mechanical properties of cell membrane (*i.e.*, membrane fluidity) which contribute to fundamental cellular functions (*i.e.*, collective movement and adhesion). We found that the un-differentiated cell membrane had a mechanical characters of membrane fluidity (*i.e.*, fingerprint of physical properties). By using the difference in the membrane physical fingerprints between differentiated and undifferentiated cells, bulk purification of cell source could be achieved which can contribute to the purification of liver bud toward future clinical application. In this presentation, I will introduce quantitative evaluation system of human liver buds that responds to the mechanical properties of extracellular stiffness. Then, as the latest research trends, I will introduce the role of cell membrane fluidity in the cell differentiation and its application.

2007年のヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) の発見以降, 分化誘導法を最適化することで様々な多細胞組織の創出に向けた研究が爆発的に進められてきている。その中でも Takebe らは, 生体内で肝臓原基 (臓器の芽) が出芽する際に関わる細胞種に着目し, ヒト iPSC からそれらを分化誘導することで, 試験管内で人工的に肝臓原基を創出することに成功した¹。そこで我々は, 生体内における力学因子 (硬さ) が臓器発生に果たす役割の解明に向け, 硬さに応答する器官原基の自己組織化を定量評価してきた。まず我々は, 細胞が感じる硬さとしては培養場の硬さ (ヤング率 E kPa) に着目して研究を開始した。培養場としては, 架橋剤の濃度で脳 ($E = 0.1$ kPa) から軟骨表面 ($E = 100$ kPa) まで硬さを自在に制御できる高分子ポリマーを活用した²。実際に合成した様々な硬さの高分子を肝臓原基の培養場として用いると, $E = 10$ kPa の中庸な硬さの場が肝臓原基の集合運動を最大化することを見出した³。このような場の硬さの特異点が存在していたのは, 適度な細胞一場相互作用が行える中庸な硬さの場の上で細胞の運動が活性化し, 大きな肝臓原基の集合運動につながったのが要因と考えている。次に我々が着目したのは, 細胞が感じるもう一つ重要な硬さである細胞自身の硬さであった。細胞自身の硬さとして特に着目した膜流動性は, 細胞の接着や運動といった基礎的な機能を制御しているため, 臓器原基の自己組織化のファーストステップである集合運動を理解する上で重要なファクターである^{4,5}。そこで実験としては, 膜の硬さに応じて色が変わる Laurdan を用いて膜流動性を評価すると, 未分化細胞膜に特有の膜流動性の特性 (物性指紋) があるという興味深い現象を見出した⁴。実際に分化細胞と未分化細胞の膜物性指紋の差を用いると, 分化細胞を短時間で大量純化に成功したため, 臨床応用に向けた細胞選別法としての利用が期待されている。本講演においては, まず培養場の硬さに応答するヒト肝臓原基の定量評価システムについて紹介する。次に最新の研究動向として, ヒト iPS 細胞の分化誘導時における細胞膜の硬さが果たす役割の解明とその応用について紹介する。

参考文献

1. T. Takebe,..., S. Aoyama, Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459), 481-484 (2013).
2. **T. Matsuzaki**,..., M. Tanaka,..., H. Y. Yoshikawa, High Contrast Visualization of Cell-Hydrogel Contact by Advanced Interferometric Optical Microscopy *J. Phys. Chem. Lett.* 5(1) 253 - 257 (2014).
3. T. Takebe,..., **T. Matsuzaki**,..., H. Y. Yoshikawa, H. Taniguchi, Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* 16(5) 556 - 565 (2015)
4. **T. Matsuzaki**,..., H. Y. Yoshikawa,..., T. Takebe, Defining Lineage-Specific Membrane Fluidity Signatures that Regulate Adhesion Kinetics, *Stem Cell Reports* 11(4) 852 - 860 (2018)
5. **T. Matsuzaki**,..., H. Y. Yoshikawa, M. Tanaka Adsorption of galloyl catechin aggregates significantly modulates membrane mechanics in. the absence of biochemical cues. *Phys Chem. Chem. Phys.* 19(30) 19937 - 19947 (2017).

講演番号：WS6-B03

荷電高分子で細胞の接着力を制御し凝集化させる ～接着細胞の自己凝集化誘導技術の開発と組織工学への応用展開～

岩井 良輔*

岡山理科大学 フロンティア理工学研究所

Development of cell self-aggregation induction technique and its application to tissue engineering

Ryosuke Iwai*

Frontier Science and Technology, Okayama University of Science

*iwai@ifst.ous.ac.jp

Abstract. We have developed cell self-aggregation technique (CAT) -based novel tissue engineering technology for use in regenerative medicine and drug screening culture models. In this presentation, we would like to introduce the basic mechanism of CAT and its application development such as mass production and shape control of cell aggregates and tissues by combining it with bio-inkjet device and silicone culture molds.

1. はじめに

我々は、荷電性高分子を用いて培養皿表面の荷電特性を制御することにより、細胞の接着性に変化が生じて、「細胞が培養表面に接着した後に自発的に剥離して凝集塊を形成する」ことを見出した[1]。この現象を、接着細胞の自己凝集化誘導技術 (Cell self-Aggregation induction Technique: CAT) として組織工学に応用し、荷電高分子の塗布形状、サイズや数などを設計することで、その二次元の形状に沿って凝集化した任意の形状とサイズを有する 3 次元の細胞組織体を培養皿に細胞を播種するだけで得ることに成功した[2]。本研究では、このような CAT を用いた組織作製の基盤技術からインクジェット装置やシリコン製の培養鋳型との組み合わせによる 3 次元組織体の量産や形状制御などの最新の応用展開までを紹介したい。

2. 基盤技術 (図 1A)

正負の両方の電荷を有する両イオン性の荷電高分子を市販の細胞低接着培養皿の表面に塗布した後、哺乳動物細胞をコンフルエント以上の高密度で播種すると、細胞は 1 時間以内には培養皿の全面に隙間のない接着細胞単層を形成する。さらに 10 時間程度培養を続けると、細胞単層は荷電高分子の正と負の電荷量が等しいと培養表面に接着したままの状態であるが、正電荷量が負電荷量より多くなると培養皿の辺縁部から剥離すると同時に凝集化を生じて、播種から約 1 日で単一の細胞凝集塊が形成する (図 1A)。

3. 応用例 1: 細胞凝集小球 (スフェロイド) の量産 (図 1B-1)

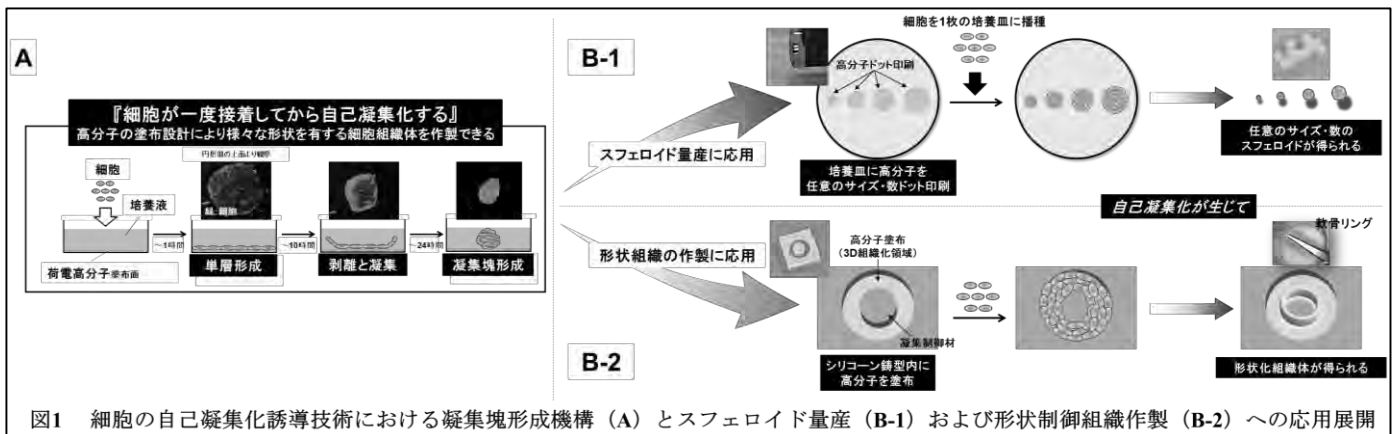
インクジェット装置を用いて荷電高分子を高精細にドット印刷 (ドット密度: 50 個以上/cm², ドット径: 1 mm 以下) した細胞低接着培養皿にヒト間葉系幹細胞を播種すると、高分子のドット印刷面にのみ細胞は接着して円形の細胞単層を形成した。細胞単層は 1 日の培養の間に剥離と凝集化を生じ、ドット数分のスフェロイドが形成して培養液中に浮遊した。これは、市販のスフェロイド作製用の培養ウェルプレートを用いた 10 倍以上の生産効率であり、高効率にスフェロイドを作製し得ることが確かめられた。

4. 応用例 2: 形状制御された組織の作製 (図 1B-2)

シリコン製の培養鋳型を用いることで細胞凝集塊の収縮による形状変化を制御できると考えた。例えば、輪形の組織体を作製するための培養鋳型として、荷電高分子を塗布した培養皿表面に円形に切り抜いたシリコン板を貼付して円形の培養溝を作った後、細胞凝集による収縮の制御材として円形溝の中央部にシリコン円板を貼付することで、輪形の培養溝を作り出した。培養鋳型内に軟骨細胞を播種すると、輪形の培養鋳型内に隙間のない細胞単層を形成した後、一体凝集化が生じて制御材の周囲に輪形の軟骨細胞の凝集塊が形成した。この凝集塊は 10 日程度の培養で、制御材の外径に沿って精密に形状制御された堅固な軟骨輪へと成熟化させることができた。

5. まとめ

CAT を用いた組織作製法においては、細胞を一度培養皿の任意の範囲に接着させ留めることで、形状制御された 3 次元の細胞組織体を量産することが可能となる。特殊な装置を必要とせず、培養皿ベースで細胞を播くだけの安価で簡便な本法は、再生医療や創薬試験モデルへの応用可能性が高いと考え、前臨床試験を積極的に進めている。



6. 文献

1. Iwai, R., Nemoto, Y., and Nakayama, Y.: The effect of electrically charged polyion complex nanoparticle-coated surfaces on adipose-derived stromal progenitor cell behavior, *Biomaterials*, **34**, 9096-9102 (2013).
2. Iwai, R., Nemoto, Y., and Nakayama, Y.: Preparation and characterization of directed, one-day-self-assembled millimeter-size spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells, *J Biomed Mater Res A*, **104**, 305-312 (2016).

講演番号：WS6-B04

細胞核の応力増幅培養による間葉系幹細胞の活性化

木戸秋 悟*

九州大学 先導物質化学研究所 医用生物物理化学分野

Activation of mesenchymal stem cells through nuclear-stress-enhancement

Satoru Kidoaki*

Biomedical and Biophysical Chemistry, IMCE, Kyushu University

*kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

Therapeutic properties of mesenchymal stem cells (MSCs) have close relations with the stemness, while which tend to deteriorate depending on the memory of mechanical dose from the culture matrix. To assure the maintenance of stemness of MSCs during usual expansion culture, it is essential to design the micromechanical environment to inhibit the lineage bias. For this issue, we have developed the microelastically-patterned hydrogels with triangular stiff domains on soft base, which drives both forward and reverse durotaxis of MSCs resulting in the nomadic migrations among different region of elasticity. This culture system was found to make MSCs undifferentiated and activated in terms of up-regulation in the genes relating to cell viability, proliferation and motility. In this talk, mechanisms of such activation effects for MSCs are discussed in relation to modulation of mechanical-stimuli to the cell nucleus.

1. はじめに

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)は近年の再生医療分野において、臨床応用への拡大が目覚ましい幹細胞の一つであるが、採取方法や個体差の影響、および培養中の状態変化等に起因した細胞ロット間のばらつきが大きく、その品質を保証する評価基準と培養技術の確立が強く求められている。培養中のMSCの品質変化の一因として、培養環境の力学的環境の経験履歴の記憶の関与が報告され[1]、MSCの品質保持培養における培養力学場の定義が課題となっている。この課題に対し我々は、細胞培養ゲルに対して微視的に非一様な弾性率分布を刻みこみ、MSCがその上を自発的に遊走する過程で力学場履歴を連続的に消去するというアプローチによりMSCに未分化状態を保持させる培養力学場の設計を行ってきた。すなわち、三角形の硬領域を持つ周期的非一様な弾性場で間葉系幹細胞を培養すると、各領域間の完全非定住運動の過程で、硬・軟領域に依存した分化偏向が抑制され未分化性が維持され得る（分化フラストレーション現

象) [2]。さらに、この培養を経た MSC では、一様弾性場や通常のプラスチック皿での培養では見られない細胞運動関連機能および生存、増殖関連機能に関連する遺伝子群が広範囲に発現上昇し、これらは MSC の治療効果増強にも関与するものであったことから[3]、このような培養モードをメカノ活性化培養と名付けた。なぜ、そのような細胞機能の活性化が生じるのか？本発表では MSC のメカノ活性化のメカニズムに関して、細胞内部応力の振動と細胞核の力学的動態の観点から解析結果を紹介する。

2. 非一様力学場・非定住運動に伴う細胞核形状ゆらぎの増幅

弾性パターンニングゲル（以下、P ゲル）上で運動する MSC において、広範囲な遺伝子発現調節が見られる原因として、非一様力学場上の運動に伴う細胞核への力学的刺激の増幅、およびこれらもたらすクロマチン高次構造の揺動が考えられた。そこで同培養中に細胞核に対する力学的刺激が増強され得るかどうかを確認するため、P ゲル上で運動する MSC の細胞核の長時間ライブセルイメージングを行った。細胞核の輪郭を抽出し、楕円近似における長軸と短軸の比から扁平率を測定した。細胞核の扁平率の時間ゆらぎに対して自己相関関数を計算し、コントロール条件であるプラスチック皿での同関数の挙動を比較したところ

(Fig.1a)、核変形ゆらぎの激しさを示す自己相関関数の緩和時間が P ゲル上培養において有意に短縮しており、TC に比べて P ゲル上では細胞核変形ゆらぎが明らかに増幅されていることが確認された (Fig.1b)。

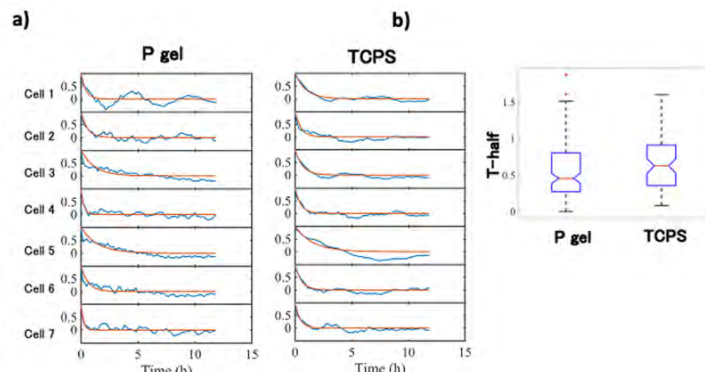


Figure 1 a) Typical autocorrelation functions of temporal changes in deformation of cell nucleus on patterned gel and TCPS. b) Halftime of the autocorrelation functions of patterned gels and TCPS.

3. 結論

P ゲル上での培養により、MSC の機能制御に関わる広範囲な遺伝子発現制御に関与する要因として、細胞核の変形ゆらぎの増幅が定量的に確認された。核応力ゆらぎの増幅培養は、クロマチン高次構造の力学的揺動を操作し、細胞機能の変調や活性化を導き得る。細胞外力学場の設計は、細胞の運動特性と呼応した細胞核応力の増幅操作を可能とし、新たな細胞操作技術の一モードを与えるものと期待される。

1. Yang, Anseth et al. Nature Materials 13, 645-652 (2014).
2. S. Kidoaki, Biophys. Rev. 11, 377-382 (2019)
3. S. Kidoaki, K.Moriyama, H.Ebata, PCT/JP2019/009747

講演番号：WS6-B05

リコンビナント素材を使った細胞凝集体 “セルザイク” ～MSC 細胞移植における効果検証～

中村 健太郎^{1*}

¹富士フイルム株式会社 バイオサイエンス&エンジニアリング研究所

CellSaic, A Cell Aggregate-Like Technology Using Recombinant Peptide Pieces for MSC Transplantation

Kentaro Nakamura^{1*}

¹FUJIFILM Corporation Bio Science & Engineering Laboratory

*kentaro.a.nakamura@fujifilm.com

Abstract

We, FUJIFILM, have entered the field of regenerative medicine with research and development of animal-free collagen-like scaffolding material, recombinant peptide (RCP) as the entry point, and have expanded to product development of products such as cells, culture media and regenerative medicine. In particular, we will introduce a cell therapy platform called CellSaic, which is a cell aggregate form obtained by combining cells and scaffolds. This CellSaic is a cell transplant form in which cells and petaloid RCP micro pieces (μ pieces) are arranged in a mosaic pattern, whereby central necrosis, which is a drawback of cell aggregates, can be avoided. The fact that central necrosis can be avoided is an advantage over other three-dimensional culture systems, and in this report we will introduce its basic performance, safety test results, and examples of utilization research in MSC transplantation. As an example of application in MSC transplantation, it is known that the efficacy is higher than administration of MSC cells alone in applications such as IBD, cerebral infarction, bone/cartilage region, islet transplantation, and lysosomal disease.

1. はじめに ～FUJIFILM の取組みと CellSaic～

幹細胞治療の領域では、その多様な機能ゆえに間葉系幹細胞 (MSC) に関する研究が盛んに行われてきた。併せて、細胞移植の形態としては単純な細胞懸濁液の投与から、細胞シート工学、3次元化へと研究が進展しており、バイオマテリアルとしての足場素材・スキャホールドの必要性が論じられている。実際、再生医療においては古くから、細胞、液性因子、足場が再生医療の3要素と呼ばれ重要な構成要件と考えられてきた。そのような背景の中で、我々、FUJIFILM はアニマルフリーのコラーゲン様の足場素材・リコンビナントペプチド (RCP) の研究開発を入口に再生医療へ参入し、細胞、培地、再生医療等製品の製品開発へと展開してきた。

今回は特にその中でも、細胞とスキャホールドを組み合わせることで得られる細胞凝集体形態 CellSaic (セルザイク) と呼ばれる細胞治療プラットフォームについてご紹介する。この CellSaic とは、細胞と花弁状 RCP 微細片 (μ ピース) をモザイク状に配置

することで、細胞凝集体が有する欠点であるセントラルネクロシスを回避出来るという細胞移植形態のことである。セントラルネクロシスを回避できるという点が、他の3次元培養システムに比べての利点であり、本報告ではその基本性能、安全性試験結果、及びMSC移植における活用研究例を紹介する。

2. MSC CellSaic による各種疾患治療研究

細胞のみで凝集体を形成すると、栄養酸素の供給、老廃物排泄が出来なくなる為に、中心部分から死んでいくセントラルネクロシスが観察される。それに対して、MSC CellSaic とすることにより、中心部分に対しても栄養酸素供給および老廃物排泄が可能となり、細胞の生存率が向上することが示された。加えて、in vivo における効果として、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植すると hMSC を細胞塊として移植した場合と比較して、セルザイクでは細胞の生存が大幅に向上し、かつ移植後の graft 内部への血管導入効率も高くなるという効果も確認された。MSC には様々な疾患で治療効果を有するという報告が多数存在するが、ここでは複数の疾患モデル動物における有効性確認試験での検証により、MSC 単独での治療よりも、MSC CellSaic として投与した方が治療効果を高められることが分かった (Fig. 1)。例として「糖尿病モデルマウスにおける膵島移植の効果増強」、「ライソゾーム病モデルマウスでの治療効果」、「炎症性腸疾患モデルマウスでの治療効果」、「脳梗塞モデルラットでの運動機能改善効果」「インスリン産生細胞への分化誘導とその効果」の結果を示した。併せて MSC CellSaic の安全性試験として、一般毒性試験、造腫瘍性試験いずれにおいても、特段の毒性を示さないことが分かった。

3. まとめ ～細胞治療～

現在は、細胞単独でのいわゆる Cell Therapy が簡便性の観点から先行している現状であるが、再生医療の一段の発展、進展においてはこのようなバイオマテリアルとの融合が実用化されることが必要であると考えられる。様々な再生医療製品が実用化、普及している未来の実現を期待している。

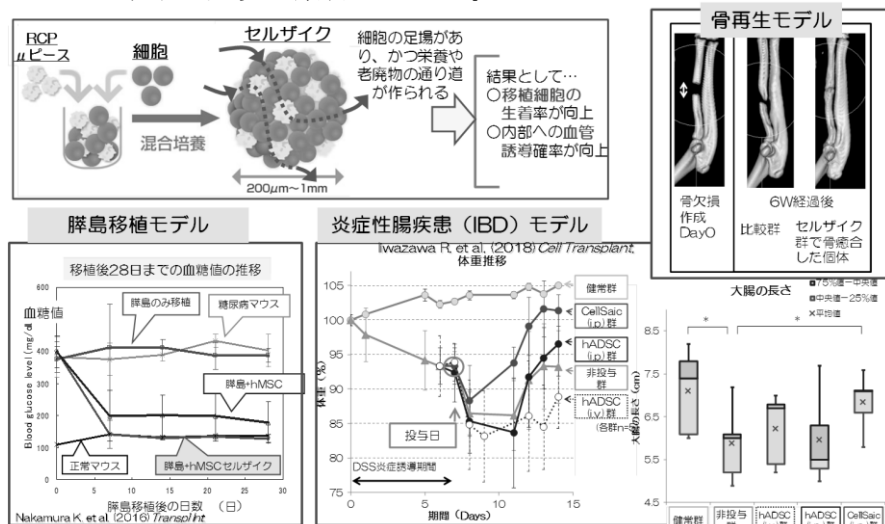


Fig. 1.
The design concept of CellSaic.

講演番号：WS7-C01

液胞内タンパク質・脂質・リン酸代謝とオートファジー

堀江（川俣） 朋子^{1*}, 籠橋 葉子², 大隅 良典¹

¹東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター,

²東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

Protein/lipid/phosphate metabolism and autophagy

Tomoko Kawamata^{1*}, Yoko Kagohashi², and Yoshinori Ohsumi¹

¹Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, ²School of Life Science
and Technology, Tokyo Institute of Technology

Autophagy is a cellular degradation pathway highly conserved in all eukaryotes. In this process, a portion of cytoplasmic proteins and even organelles are sequestered into autophagosomes and delivered to the lysosome/vacuole to be degraded. We now know that autophagy can degrade proteins, nucleic acids, and lipids. As an example, we recently demonstrated autophagy-dependent RNA degradation using a combination of metabolomics and molecular biological analyses in yeast [3]. In this symposium, we will discuss the late stage of autophagy: the metabolic flow of protein/RNA/lipid/phosphate and the final products in the vacuole.

1. はじめに

オートファジーは真核生物に保存された細胞内異化システムである。オートファジーが誘導されると、二重膜からなる隔離膜が細胞質成分を取り囲み、オートファゴソームが形成される。その後オートファゴソームは液胞/リソソームへと輸送され、外膜は液胞・リソソームと融合し、内膜とオートファゴソームに含まれる内容物は液胞・リソソーム内の種々の加水分解酵素群により適切に分解・代謝され、一部は細胞質へと輸送され再利用される等、代謝変動を引き起こす。これまでオートファジーはタンパク質分解システムとして広く認知されており、結果として生じるアミノ酸は栄養素として再利用されることが示されている [1]。また、タンパク質に結合している金属イオンなども同様に回収され再利用される [2]。一方、タンパク質以外について、例えば糖やリン酸、核酸、(膜)脂質の異化・代謝や中間・最終産物の輸送の過程についてはこれまでほとんど解明されてこなかった。

2. オートファジーと液胞内のリン酸代謝 ポリリン酸について

近年私達は出芽酵母を用い、オートファジーによりタンパク質分解と匹敵する量のRNAがヌクレオチド→ヌクレオシド→ヌクレオベースにまで分解される過程を明らかにすることに成功し[3]、オートファジーがRNA分解を介して核酸代謝に与える影響についても議論してきた。液胞へ運ばれたRNAは、液胞内のRNase, Rny1によりヌクレオチドへ分解され、その後すみやかにヌクレオチダーゼPho8によりヌクレオシドへ分解され、リン酸が液胞内に蓄積する。リン酸については、他の経路、例えばオートファジーで運ばれたリン酸化タンパク質、糖リン酸代謝物の分解やリン脂質の分解にもよっても生ずる可能性もあり、オートファジーによる物質の異化過程で生じるリン酸の動態について興味を持った。オートファジーとリン酸代謝を明らかにするため、生じたリン酸がポリリン酸へと変換されうるのかどうかについて検討してきた。その結果について発表する。

3. オートファジーによる脂質分解、オートファジー関連膜の膜組成

最近私達は 1) オートファゴソーム膜の脂質組成や、2)液胞内の脂質分解機構にも着目して解析を行っている。1) については、液胞に局在するリパーゼであるAtg15の欠損株を用い、オートファジーの内膜成分であるオートファジックボディ（オートファゴソームと液胞との融合に伴い液胞内に遊離するオートファゴソームの内膜小胞）を液胞画分から生化学的に単離することに初めて成功した（未発表）。これにより、オートファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析が可能になっただけでなく、液胞膜やオートファジックボディ膜の脂質組成の解析も解析可能になった。2) については、Atg15に依存した脂質分解活性をモニターできる生化学的手法の開発に成功している。

4. まとめ

3.については、現在進行中のプロジェクトであるが、これまで得られたオートファジーと液胞内リン酸代謝、オートファジー関連膜の組成や液胞内での膜脂質分解に関する結果について紹介したい。本研究は酵母での基礎研究であるが、応用的な側面からもオートファジーが細胞の代謝に与える影響を議論したい。

5. 文献

1. Onodera J, Ohsumi Y.: Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J. Biol. Chem.*, 280, 31582-6 (2005).
2. Kawamata T, Horie T, Matsunami M, Sasaki M, Ohsumi Y.: Zinc starvation induces autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 292, 8520-8530 (2017).
3. Huang H, Kawamata T, Horie T, Tsugawa H, Nakayama Y, Ohsumi Y, Fukusaki E.: Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J.*, 34, 154-68 (2015).

講演番号：WS7-C02

液胞膜を介したアミノ酸輸送の分子装置

関藤孝之^{1,2*}, 河田美幸^{1,2,3}

¹愛媛大学大学院 農学研究科 生命機能学専攻

²愛媛大学 プロテオサイエンスセンター ³愛媛大学 学術支援センター

The molecular machinery for amino acid transport across the vacuolar membrane

Takayuki Sekito^{1,3*}, Miyuki Kawano-Kawada^{1,2,3}

¹Department of Bioscience, Graduate School of Agriculture, Ehime University

²Proteo-Science Center, Ehime University

³Advanced Research Support Center, Ehime University

*sekito@agr.ehime-u.ac.jp

Abstract. The vacuole in eukaryotic cell serves as a sink organelle for amino acids, as well as a digestive compartment of proteins to generate amino acids. Analysis using the mutant of vacuolar amino acid transporter(s) enables to elucidate the vacuolar function in amino acid metabolism. We have identified several vacuolar amino acid transporters and analyzed their regulation and physiological role. We detected the transport activity of amino acids into isolated vacuolar membrane vesicles by a candidate of vacuolar basic amino acid transporter, Vbt1. About the regulation, *AVT4* and *AVT6*, both of which encode vacuolar amino acid exporter, were shown to be directly regulated by GATA transcription factors, which play an important role in cellular amino acid homeostasis. *Avt4* also seems to be post-translationally regulated and *Ypq* proteins, which have been suggested to be involved in basic amino acid transport across the vacuolar membrane, were found to be regulated in a various manner. We also present the emerging physiological role of vacuolar amino acid pool. The significance of vacuoles in amino acid metabolism will be discussed

1. はじめに

真核細胞の液胞はタンパク質を分解しアミノ酸を産生する一方、栄養豊富条件ではアミノ酸の貯蔵オルガネラとしても機能する。液胞内外へアミノ酸を輸送するトランスポーターの欠損株は、アミノ酸代謝における液胞の重要性を検討するうえで強力なツールとなる。近年、このトランスポーターの同定が進捗し、液胞のアミノ酸代謝における機能を実験的に検討する環境が整いつつある。本発表では液胞アミノ酸トランスポーターの同定解析によって得られた新知見を紹介したい。

2. 新規液胞アミノ酸トランスポーターの同定

出芽酵母は塩基性アミノ酸の70-90%を液胞内に蓄積する。これと一致して、出芽酵

母から単離された液胞膜小胞は ATP 依存的に塩基性アミノ酸を小胞内に取り込む。その分子装置は長い間不明であったが、我々は PQ ループタンパク質である Ypq2 が液胞膜小胞のアルギニン/ヒスチジン交換輸送活性の本体であると同時に、プロトン濃度勾配に依存してアルギニンを取り込む活性も有することを明らかにした[1]。しかし、*YPQ* 遺伝子破壊株においても液胞内に塩基性アミノ酸が蓄積することから、未知のトランスポーターの存在が示唆されていた。今回我々は破壊すると液胞内のアミノ酸含量が大幅に減少する *VBT1* 遺伝子を見出した。その破壊株の解析結果を報告する。

3. 液胞アミノ酸輸送の調節・生理

我々は液胞からアミノ酸を排出するトランスポーターをコードする *AVT4* と *AVT6* が *GATA* 転写因子により飢餓条件で直接転写誘導されることを明らかにした。また *Avt4* タンパク質の N 末端側には約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域が存在し、この領域が液胞からのアミノ酸排出に負に作用することを見出している。他にも我々や他のグループが *Ypq* タンパク質の発現レベルや安定性が栄養条件によって変化することを報告している。これらは、液胞膜を介したアミノ酸輸送が栄養条件に応答して様々な形で調節され細胞内アミノ酸ホメオスタシスに寄与することを示唆している。現在、液胞アミノ酸トランスポーターの欠損が窒素飢餓条件での生存率に及ぼす影響を調べることにより、オートファジーによるアミノ酸リサイクルの生理的意義を実験的に検討している。

4. まとめ

液胞アミノ酸トランスポーターは比較的基質特異性が広く、かつトランスポーター間で重複して機能することが明らかとなってきた[2]。機能重複は解析を困難にした一因であるが、同定が進んだ今、多重破壊すれば生育・生存の表現型が得られ、液胞機能の実験的な裏付けが可能になりつつある。また近年、動物リソソーム内腔のアミノ酸が *TORC1* 活性の調節シグナルであることが示唆され、液胞内アミノ酸プールが単なるアミノ酸の供給源でなく、アミノ酸代謝の統括的な役割を担う可能性も出てきた。液胞内外へのアミノ酸輸送はその根幹を担うと考えられ、地道な同定作業と併せて、生理的意義の理解へ向けてのアプローチも進めていきたい。

5. 文献

1. Kawano-Kawada, M., Manabe, K., Ichimura, H., Kimura, T., Harada, Y., Ikeda, K., Tanaka, S., Kakinuma, Y. and Sekito, T.: A PQ-loop protein Ypq2 is involved in the exchange of arginine and histidine across the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.*, 9(1), 15018 (2019).
2. Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y. and Sekito, T.: Transport of amino acids across the vacuolar membrane of yeast: its mechanism and physiological role. *Biol. Pharm. Bull.*, 41(10), 1496 (2018).

講演番号：WS7-C03

酵母の環境ストレス耐性における液胞型 ATPase の重要性

島 純*

龍谷大学 農学部

Importance of vacuolar ATPase on environmental stresses in yeast

Jun Shima*

Faculty of Agriculture, Ryukoku University

*shima@agr.ryukoku.ac.jp

Abstract: During the fermentation of dough, cells of *Saccharomyces cerevisiae* are exposed to numerous environmental stresses (baking-associated stresses) including freeze-thaw, high sugar concentrations, air-drying and oxidative stresses. To determine which genes are required for stress tolerance, a comprehensive phenomics analysis was performed under stress conditions that simulated those occurring during the commercial baking process. The data suggested that many genes are involved in stress tolerance in yeast. In particular, it was indicated that vacuolar H⁺-ATPase plays important roles in yeast cells under baking-associated stresses.

1. はじめに

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵醸造の中心的な役割を果たす微生物である。発酵醸造に用いられる *S. cerevisiae* 株は、産業酵母もしくは実用酵母と称される。一方、基礎科学のモデル生物として幅広い基礎研究に用いられており、これらに用いられる *S. cerevisiae* 株は実験室酵母と呼ばれる。産業酵母と実験室酵母には、様々な生理的・遺伝学的特性の違いが存在する。しかし、ゲノム情報に基づく主な解析ツールは、産業酵母における機能解析や優良株の育種にも活用可能であると考えられる。本研究では、表現型解析を用いて、製パン過程で生じる環境ストレスに対する *S. cerevisiae* の有する耐性機構に関する知見蓄積を目的とした。

2. 製パンと環境ストレス

生育に適さない環境において、生物はストレスを感知し適応反応を起こす。環境ストレスに応答して、生物はある程度適応する能力を有している。しかし、適応能力を超えたストレス環境では、その生育や機能は著しく阻害される。発酵醸造食品の製造プロセスは、*S. cerevisiae* にとって過酷なストレス環境であると考えられる。著者らの研究グループでは、製パンプロセスで負荷される環境ストレスに着目して研究を実施してきた。特に、高糖生地において、大量に添加されるショ糖に起因する高浸透圧ストレス（高ショ糖ストレス）、乾燥酵母（ドライイースト）製造工程における乾燥ストレス、パン生

地冷凍に伴う冷凍ストレスについて解析を行った。パン生地をいったん冷凍する製パン手法は「冷凍生地製パン法」とよばれる。冷凍生地製パン法は、消費者及び生産者に多くのメリットがあるが、冷凍ストレス耐性を有する *S. cerevisiae* 株の使用が必要である。高ショ糖、乾燥、冷凍の環境ストレスをあわせて製パン関連ストレス (Baking-associated stresses) と称している。

3. 表現型解析

S. cerevisiae の実験室株においては、遺伝子操作の簡便さを背景として、非必須遺伝子の欠損株の網羅的な作出が行われた。ストレス環境下における遺伝子欠損株の表現型を解析することにより、環境ストレス耐性に必要となる遺伝子群の把握が可能になると考えた。筆者らは、約 5,000 株からなる非必須遺伝子の二倍体遺伝子破壊株セットを用いて、ストレス耐性に重要な遺伝子の同定に向けて、製パン関連ストレスを負荷した際の表現型データを収集した。遺伝子破壊株セットに製パン関連ストレスを負荷した際の生育阻害を表現型の指標とした。それら解析の結果、各ストレス環境における解析において、約 50~200 個の遺伝子が各ストレス耐性に関与している可能性が考えられた。特に、液胞型 H^+ -ATPase のコンポーネントをコードする遺伝子が共通しており、製パン関連ストレスに液胞型 H^+ -ATPase が重要な役割を有している可能性が指摘できた。液胞 H^+ -ATPase は、細胞質のプロトン液胞に輸送する 10 数個のサブユニットからなるポンプ装置である。細胞に環境ストレスを負荷すると、細胞質が酸性化されることが指摘されていることから、液胞型 H^+ -ATPase は過剰になった細胞質のプロトンを液胞に運び込むことにより、ストレス耐性機能に貢献していると考えられた。

4. まとめ

液胞型 H^+ -ATPase は、細胞質のプロトンを調節にすることにより、*S. cerevisiae* の環境ストレス耐性に強く寄与していることが示唆された。これらの知見を活用した産業酵母の分子育種に取り組んでいる。また、細胞質からのプロトン除去について、細胞膜に存在する ATPase 機能をもつ *PMRI* 等との関連性を含めて検討を続けている。

5. 文献

1. Takagi, H., Shima, J.: "Stress tolerance of baker's yeast during bread-baking processes" in Stress biology of yeast and fungi. Tokyo: Springer, pp. 23-42 (2015).
2. 島 純、安藤聡、中村敏英: 酵母の環境ストレス耐性; 産業利用における重要性和分子機構. 日本食品科学工学会誌、57 : 225-231 (2010).
3. 安藤聡、中村敏英、島 純: ストレス環境下における網羅的表現型解析とストレス耐性酵母の分子育種. 日本食品科学工学会誌、57 : 367-371 (2010).

講演番号：WS7-C04

清酒酵母の液胞における機能性成分高蓄積機構と醸造特性との関係

金井 宗良^{1*}, 水沼 正樹²

¹独立行政法人酒類総合研究所, ²広島大学大学院 統合生命科学研究科

Relationship between the mechanism of high functional component accumulation of vacuole and brewing characteristics in sake yeast

Muneyoshi Kanai^{1*}, Masaki Mizunuma²

¹Brewing Microbiology Division, National Research Institute of Brewing

²Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

*kanai@nrib.go.jp

Abstract: *S*-adenosylmethionine (SAM) is a key regulatory compound in various biological reactions and functions as a major donor of methyl groups. SAM is highly accumulated in vacuoles in sake yeast compared to other yeast strains, bacteria, molds, or other microorganisms. To isolate a SAM-accumulating yeast strain, we screened methionine resistant strains using the yeast deletion library of budding yeast and identified *ADO1* encoding adenosine kinase as one of the factors participating in high SAM accumulation. Next, to elucidate the mechanism underlying SAM accumulation in sake yeast strains compared with that in laboratory yeast strains, we performed quantitative trait locus (QTL) analysis and identified *ERC1* gene, encoding a member of the multi-drug and toxin extrusion family having antiporter activity. Expression of the sake yeast *ERC1* haplotype (K7ERC1) resulted in intracellular SAM accumulation. Site-directed mutagenesis revealed that the N545I frameshift mutation was responsible for the K7ERC1 phenotype. Moreover, we presented evidence that stimulating SAM synthesis by this mutation turned on a metabolic switch that led to enhanced stress resistance and longevity.

1. はじめに

細胞内で独特な空間を有する巨大なオルガネラである液胞は、一昔前は「代謝活性が低く、単なる細胞の“ごみため”」とされてきたが、現代では、細胞内での解毒作用・自食作用や、アミノ酸、無機イオン・有機酸・糖類・液胞貯蔵タンパク質・プロテ

アーゼ等の貯蔵庫として様々な機能が報告されている。そこで、様々な微生物の中でも酵母、特に清酒酵母の液胞に高含有している機能性成分である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) (Fig. 1) に着目し、清酒酵母における SAM 高蓄積機構の解明及び「液胞」を

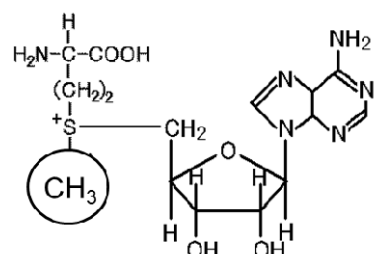


Fig. 1 *S*-adenosylmethionine (SAM)

ターゲットとした優良醸造用酵母の育種技術の開発を目的としている。

2. SAMとは

SAMはメチオニンとATPから合成され、主要なメチル基供与体として機能するなど生体内に存在する含硫アミノ酸代謝のkey物質であるため、アルコール性肝機能障害、うつ病、関節炎など様々な疾病に予防・治癒効果が認められている機能性成分である。また、SAMは様々な微生物の中でも酵母、特に清酒酵母に高含有しているため、日本の伝統的発酵食品である酒粕にも高含有している。

3. 酵母（清酒酵母）におけるSAM高蓄積機構の解析

まず、酵母細胞内でのSAM高蓄積機構の理解を目的にSAM高蓄積に寄与する新規遺伝子を同定するため、実験室酵母の一倍体による非必須遺伝子破壊株セットを用いて、メチオニン耐性を指標に新規SAM高蓄積株の探索を試みた。結果、アデノシンキナーゼをコードする*ADOI*遺伝子がSAM高蓄積に寄与するという新規な知見を見出した[1]。

次に、清酒酵母のSAM高蓄積能に寄与する遺伝子を同定するため、清酒酵母と実験室酵母の交配によるQTL（量的形質遺伝子座）解析を行った。結果、清酒酵母が持つSAM高蓄積能に、多剤・毒性化合物を排出する機能ドメインを有する*ERCI*遺伝子の機能が深く関与していることを見出した[2]。また、清酒酵母型*ERCI*に存在するフレームシフト変異（N545I）は、細胞内のメチオニンやATPの積極的な消費によるSAM高蓄積を誘導し、酸化及び熱ショックなど様々なストレスに耐性を示し、寿命が延長することを見出した[3]。さらに、清酒製造において、清酒酵母型Erc1の機能がアルコール発酵を正に制御していること、また清酒酵母のアルコール高発酵性と細胞内SAMの蓄積との間に深い関係性があることを明らかとした。

4. まとめ

酵母の液胞に高蓄積するSAMの生理的機能の全容を解明することで、高品質の酒質を可能とする液胞をターゲットとした優良酵母の育種技術の開発や、酒粕のような醸造副産物の高付加価値化・高機能化等に応用展開することが可能となる。

5. 文献

1. Kanai M, Masuda M, Takaoka Y, Ikeda H, Masaki K, Fujii T, Iefuji H.: Adenosine kinase-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* accumulates *S*-adenosylmethionine because of an enhanced methionine biosynthesis pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 1183-90 (2013).
2. Kanai M, Kawata T, Yoshida Y, Kita Y, Ogawa T, Mizunuma M, Watanabe D, Shimoi H, Mizuno A, Yamada O, Fujii T, Iefuji H.: Sake yeast *YHR032W/ERCI* haplotype contributes to high *S*-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 8-14 (2017).
3. Ogawa T, Tsubakiyama R, Kanai M, Koyama T, Fujii T, Iefuji H, Soga T, Kume K, Miyakawa T, Hirata D, Mizunuma M.: Stimulating *S*-adenosyl-L-methionine synthesis extends lifespan via activation of AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 113, 11913-11918 (2016).

講演番号：WS7-C05

液胞 ATPase の機能に着目したアルコール高発酵性酵母の育種

中瀬 舞*, 窪寺隆文, 広畑修二

白鶴酒造株式会社 研究室

Breeding of high fermentative activity mutants focusing on the function of vacuolar ATPase

Mai Nakase, Takafumi Kubodera, Shuji Hirohata

Research & Development Department, Hakutsuru Sake Brewing Co. Ltd.

*mai-nakase@hakutsuru.co.jp

We previously reported that clotrimazole (CTZ)-resistant strains become highly fermentable by decreasing the amount of ATP in the cell due to the high expression of the ATP binding cassette (ABC) transporter. However, it is speculated that the high expression of the ABC transporter causes the organic acid to be discharged and the acidity in sake to increase. Therefore, we focused on Vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) localized in the vacuolar membrane to decrease the intracellular ATP level without excreting organic acid outside the cell. To acquire strains that highly activate V-ATPase, a mutant strain resistant to bafilomycin A1 (Baf), which is a V-ATPase activity inhibitor, was selected from sake yeast. In a fermentation test the Baf-resistant strains exhibited high fermentability and the associated total amount of acidity and amino acidity in the sake were equal to or lower than those of the parent strain. The vacuolar pH, which indirectly reflects the activity of V-ATPase, was lower in the Baf-resistant strains than in the parent strain, suggesting that the V-ATPase was more activated. These results suggest that vacuolar acidification and/or activation of V-ATPase are involved in the high fermentability of Baf-resistant strains.

1. はじめに

我々はこれまでに清酒酵母 (*S. cerevisiae*) のクロトリマゾール (CTZ) 耐性株から、高確率でアルコール高発酵性株を取得できることを見出した[1]。しかし、CTZ 耐性株で醸造した清酒は、酸度が上昇する傾向がある。そこで、酸度に影響しない高発酵性株の育種法を新規に検討した。CTZ 耐性株のアルコール発酵性の向上は、細胞膜 ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの高発現による細胞内の ATP 量の低下が、解糖系を亢進したことが原因であると推測している。また、ABC トランスポーターは細胞内物質を非特異的に排出するので、細胞内の有機酸も排出する可能性があり、酸度が上昇したと推測する。そこで、細胞質の ATP を液胞膜局在の V-ATPase に消費させることで、酸度を上昇させることなく発酵性を向上できると仮説を立てた。Bafilomycin A1(Baf)

は V-ATPase の特異的阻害剤である。Baf 耐性株では V-ATPase の高活性化により酸度を上昇させることなく発酵性が向上すると考えられた。本報告では、清酒酵母から取得した Baf 耐性株の清酒醸造特性を確認し、高発酵性を示した変異株について詳細解析を実施した結果を紹介する。

2. Baf 耐性株の育種および醸造特性の確認

自社清酒酵母（親株）に UV を照射した後、Baf 含有培地で生育可能な Baf 耐性株を取得した。Baf 耐性株の発酵性を総米 50 g の小仕込み試験で確認した結果、65%以上の高確率で高発酵性が付与された。Baf 耐性株での標準的な高発酵性を示した株を Baf-1、最も発酵性が向上した株を Baf-2 として、総米 400 g の小仕込み試験で醸造特性を確認した結果、Baf-1 は親株よりも発酵性が高く、Baf-2 は Baf-1 よりも高かった。また、Baf-1 の酸度は親株とほぼ同等であり、Baf-2 では低減した。以上の結果から、清酒酵母の Baf への耐性化により、酸度を上昇させることなく、高確率で高発酵性を付与できることが確認できた。

3. Baf 耐性株の詳細解析

本育種法は、V-ATPase の高活性化が高発酵性につながるという仮説に基づいていたので、V-ATPase の活性を液胞内 pH で間接的に評価した。その結果、Baf 耐性株の液胞内 pH は親株よりも低く、このことから Baf 耐性株では V-ATPase が高活性化したことが示唆された。さらに、Baf-1 よりも Baf-2 の方が液胞内 pH は低かった。また、V-ATPase が消費する ATP の細胞内量と解糖系の基質であるグルコースの取り込み能を測定した結果、Baf 耐性株の細胞内の ATP 量は親株よりも減少し、グルコースの取り込み活性は親株よりも亢進した。

4. まとめ

Baf 耐性株では、V-ATPase の高活性化により細胞内 ATP 量が減少することで解糖系が亢進し、さらに解糖系の基質であるグルコースの取り込み活性の増加も相まって、発酵性が向上したことが示唆された。清酒醪中において酵母は常に様々なストレスに晒されている。近年液胞の酸性化が環境ストレス耐性に重要であるとの報告がある。Baf 耐性株は液胞をより酸性に保つことで、醪環境中のストレスへの耐性を獲得しているのではないかと考えている。

5. 文献

1. Hirohata, S., Watanabe, M., Nishimura, A., and Kondo, K.: Brewing properties of clotrimazole-resistant mutants isolated from sake yeast. *Seibutsu-kogaku*, 72, 283-289 (1994).

講演番号：WS8-A01

骨格筋と健康長寿社会

金村尚彦^{1*}, 久保田圭佑¹, 小曾根海知¹, 大塚香緒里², 村田健児¹, 国分貴徳¹

¹埼玉県立大学, ²川越リハビリテーション病院

Skeletal muscles and a society of health and longevity

Naohiko Kanemura^{1*}, Keisuke Kubota¹, Kaichi Ozone¹, Kaori Ootsuka²,

Kenji Murata¹, Takanori Kokubun¹

¹Saitama Prefectural University, ² Kawagoe Rehabilitation Hospital

*kanemura-naohiko@spu.ac.jp

Abstract

The elderly have impaired motor, neurological, immune, and cardiorespiratory functions. Various changes in physical function, such as muscle weakness and decreased range of motion, are observed in the elderly, and there is a qualitative change in muscle activity during movement. We conducted muscle synergy analysis by measuring muscle activity during continuous walking for one minute in the healthy young and elderly subjects. Compared with the young, the aged showed a simultaneous contraction of multiple muscles, suggesting that the pattern of muscle activity during movement changes with age. These suggest that the pattern of muscle activity during movement changes with age. Eight-week-old ICR mice were subjected to a downhill running exercise. The level running group showed no change compared to the control group, and the downhill running group produced muscle hypertrophy independent of speed. It was also observed to cause structural changes in the muscle tendon attachments. Aged rats were subjected to treadmill running and compared for myokine mRNA levels in the hindlimb muscles for the 1-week and 4-week exercise groups. Each factor was significantly increased in old rats compared to adult rats. BDNF was significantly increased in short-term running, and IL-6 and GDNF were significantly increased in long-term running. The present study suggested that myokine mRNA expression may be due to weekly age and running period. Further knowledge is needed to understand the changes in physical function in the elderly, what kind of exercise is effective, and what is the appropriate exercise load.

1. はじめに

高齢者は、運動、神経、免疫、呼吸循環等の機能低下により、予備能力や回復機能、適応力が低下する。日常生活動作において、加齢に伴い動作は問題なく遂行できても、筋活動パターンが変化する[1] [2]。本シンポジウムでは、高齢期における歩行時筋活

動パターンの変化と筋力トレーニングや運動の効果について、人や動物を対象とした研究の知見を報告する。

2. 歩行時における筋活動パターンの加齢への影響

高齢期には、筋力低下や関節可動域の低下など多様な身体機能の変化を認めるが、動作中の筋活動についても質的に変化している。健常若齢者と健常高齢者を対象に、表面筋電計を体幹筋・片側下肢筋の計 16 筋に電極を貼付し、床反力計付ダブルトレッドミルにて、1 分間の連続歩行時の筋活動を計測し、筋シナジーの類似性を検討した。若齢者にくらべて高齢者は、多数筋の同時収縮が出現し、動作時の筋活動パターンが加齢により変化していた。

3. 筋収縮形態による筋力トレーニングへの影響

8 週齢 ICR マウスを対象に走行運動を課した。平地+高速度走行群、下り坂+低速度群、下り坂+高速度群とその対照群とした。4 週間の運動介入後、肩関節棘上筋を採取して、H-E 染色による筋線維横断面積、筋線維数について比較検討した。平地走行群では、対照群と比較して変化を認めず、下り坂走行群は、速度に依存せず筋肥大を認めた。また筋腱移行部において、構造が変化することが観察された。遠心性筋収縮は、求心性筋収縮、等尺性筋収縮と比較して、トレーニング効果は得られやすいが、遅発性筋痛や筋損傷を誘発しやすい。高齢期における筋力トレーニングプログラムを作成する際に筋収縮形態や負荷量についても考慮する必要がある。

4. 老齢動物に対するトレッドミル走行がマイオカイン発現に与える影響

成体・老齢ラットに対し、介入期間は、短期（1 週間）と長期（4 週間）、低スピードにおけるトレッドミル走行運動介入（1 時間/1 日、60 分）を行い、後肢骨格筋（前脛骨筋、長趾伸筋）における IL-6、BDNF、GDNF mRNA 発現量の違いについて比較検討した。成体ラットと比較して老齢ラットでは、各因子が有意に増加した。BDNF は短期走行にて、IL-6 と GDNF は長期走行にて有意に増加した。マイオカイン mRNA 発現は週齢や走行期間に起因する可能性が考えられた。また老齢ラットにおいては、低強度で長期間の運動介入でもマイオカイン mRNA 発現に有用であることが示唆された。

5. まとめ

高齢期における身体機能の変化を理解し、どのような運動を行うと効果が得られるのか、適切な運動負荷量はどのくらいであるのかなど、更に知見を重ねていく必要がある。

6. 文献

1. Lo J, Lo OY, Olson EA, Habtemariam D, Iloputaife I, Gagnon MM, Manor B, Lipsitz LA. Functional implications of muscle co-contraction during gait in advanced age, *Gait Posture*, 53,110-114 (2017).
2. Monaco, V., Ghionzoli, A., and Micera, S.: Age-related modifications of muscle synergies and spinal cord activity during locomotion, *J. Neurophysiol*, 104(4), 2092-2102 (2010).

講演番号：WS8-A02

iPS 細胞由来臓器細胞や organ-on-a-chip を用いた 医薬品安全性評価技術の社会実装 ～骨格筋評価系への期待～

石田 誠一

崇城大学 生物生命学部

Industrial Implementation of New Technology for Drug Safety Evaluation Using iPS Cell-Derived Cells and Organ-on-a-chip

Seiichi Ishida

Sojo University, Department of Applied Life Science

ishida-s@life.sojo-u.ac.jp

Abstract

New technologies created in the field of life sciences have been used in the development of new drugs. However, considering the application of chemical substances to human beings for the first time, the safety evaluation methods of drug candidates need to be carefully evaluated. In this session, we will discuss the position of iPS cell-derived organ cells and organ-on-a-chip as safety assessment technologies in the test method evolution and translation process defined by OECD, and how they are expected to develop in the future.

1. はじめに

生命科学の分野で生み出されてくる新規の技術は今までも医薬品の開発に活用されてきている。しかしながら、医薬品の安全性評価はヒトへの新規化学物質の適用という点で、評価技術としても慎重な運用が求められている。そのため、例えば、OECD（経済協力開発機構）では、**図 1** に示すようなステップが厳格に規定されている。本セッションでは、iPS 細胞由来臓器細胞や organ-on-a-chip を用いた医薬品安全性評価技術をこのステップにおいてどのような位置づけに

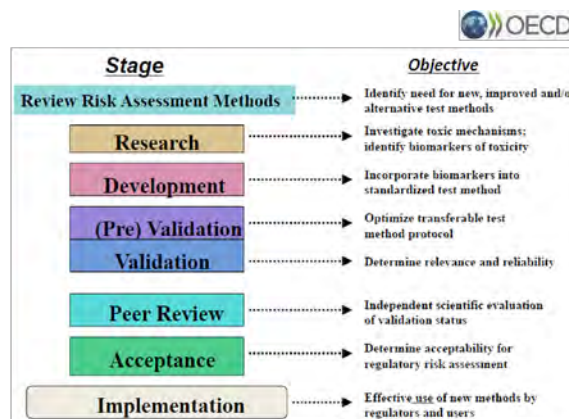


Fig. 1 Test Method Evolution and Translation Process: Concept to Implementation

あり、今後どのような展開が期待されるかについて、議論をしてみたい。

2. iPS 細胞由来臓器細胞

iPS 細胞から分化誘導された臓器細胞の応用としては、再生医療と創薬が考えられてきた。そのうち、創薬への応用は、ヒトへの適用がないため、実用化に近いとされていた。また、ヒト細胞を倫理面での懸念が少なく利用できることや、患者由来サンプルからの分化誘導により病態モデルが再現できるなど期待も大きい。しかしながら、分化誘導の再現性や細胞の未成熟さなどで、未だに実用化に至る途上にあると考えられている。本発表では、我々の経験をもとに、iPS 細胞由来臓器細胞が抱えている問題点と解決すべき課題を整理して、社会実装への道筋を考える。

3. organ-on-a-chip

organ-on-a-chip は2000年代初頭から開発が盛んになってきた新規の培養技術である。MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を応用し、スライドガラス大のチップ上に細胞培養チャンバーを複数配置し、培地を灌流することで、ヒトの臓器を模倣しようとするものである。近年は培養プラットフォームの市販も開始され、医薬品の安全性評価への応用も期待されている。今までのシャーレを用いた培養技術とは異なり、チップや灌流培養装置が付随する点で、安全性評価技術への応用については、新たな基準作りが必要と考えられている。我々の研究室でも、いくつか市販品を導入し、どのような基準が必要かの検討を進めてきた。そこでの結果を踏まえた考慮すべき点を考えてみる。(図2)



Fig. 2 Criteria for Organ-on-a-chip

4. まとめに代えて—臓器連関

我々の研究室では、肝臓の細胞を主に研究の対象としてきた。一方近年は、複数臓器間での相互作用をとらえる解析も活発化しており、様々な臓器細胞が供給可能な iPS 細胞とそれらを連結して培養できる organ-on-a-chip は強力な解析ツールと期待される。肝臓で患者の増加が予想されている非アルコール性肝炎 (NASH) も骨格筋との関係で捉えなおす報告がされている。同一ドナー由来で遺伝背景がそろった肝細胞と骨格筋による臓器連関を organ-on-a-chip 上で解析するような培養系が期待される場所である。安全性だけでなく、治療薬開発も目指す応用として、当日は議論できれば幸いである。

5. 文献

1. 石田誠一.: 医薬品のヒト体内動態評価のための in vitro 培養細胞の現状. 医学のあゆみ, 264, 603-608 (2018)
2. 石田誠一、伊藤弓弦.: Microphysiological Systems 用細胞とその標準化, 「臓器チップの技術と開発動向」 (酒井康行、金森敏幸監修) シーエムシー・リサーチ, 57-64 (2018),
3. Ishida S.: Organs-on-a-chip: Current applications and consideration points for in vitro ADME-Tox studies. Drug Metab Pharmacokinet. 33, 49-54 (2018).

講演番号：WS8-A03

収縮する骨格筋細胞を駆使することで明らかとなった 新規運動効果

根建 拓

東洋大学大学院生命科学研究科

Exploring the novel effects of exercise by utilizing contractile skeletal muscle cell models

Taku Nedachi*

Graduate School of Life Sciences, Toyo University

*nedachi@toyo.jp

Abstract

Adequate exercise exerts a variety of beneficial effects on body; however precise mechanisms how “exercise signal”, which are generated in skeletal muscle, could be transmitted to the whole body have not completely understood. About a decade ago, we succeeded to establish an advanced in vitro muscle contraction model using C2C12 myotubes, which allowed us to explore novel effects of exercise. One important contribution of this model should be on the field of skeletal muscle secreted peptides and proteins, defined as myokines. Because this model composes of only skeletal muscle cells, the identification of exercise-dependent myokines and understandings of their secretory mechanisms were dramatically proceeded. We recently investigated skeletal muscle-derived extracellular vesicles (EVs) and found that EVs secreted from contractile myotubes displayed an inhibitory effect on skeletal muscle cell differentiation, which was associated with the modification of miRNA content in EVs. In this session, I would like to introduce potential of in vitro muscle contraction models and overviewing these exercise-dependent secreted factors from skeletal muscles.

1. はじめに

骨格筋は運動器の主要な構成要素のひとつであるとともに、全身の代謝ホメオスタシスを制御する重要な役割を持っている。これまでに骨格筋の収縮パターンや収縮時間に応答して骨格筋のみならず全身で様々な生理変化が生じることが明らかにされているが、このメカニズムについては不明な点が多く残されている。我々は、培養筋管細胞 C2C12 への電気パルス刺激 (electrical pulse stimulation; EPS)によって人為的に収縮刺激のオン・オフをコントロールできる新しい in vitro 擬似的運動刺激モデルを世界に先駆けて開発し、新しい運動効果の探索を行っている (1,2)。

2. 骨格筋分泌因子（マイオカインや細胞外小胞）を介した収縮シグナルの伝達

近年、骨格筋は内分泌器官としての機能を持つことが示唆されている。骨格筋から分泌されるタンパク質・ペプチドは総称して「マイオカイン」と呼ばれており (3)、このようなマイオカインの一部は、局所的にあるいは血流に放出され、様々な器官や臓器の代謝を制御、全身のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしていると考えられている。前述した *in vitro* 擬似的運動刺激モデルは、骨格筋細胞の収縮に伴ってマイオカインが分泌調節されていることを直接的に証明できるために極めて有用であり、多数の運動依存的に発現分泌が調節されるマイオカイン（運動依存性マイオカイン）候補分子が、本モデルあるいはその改良モデルを用いた研究によって同定された。

最近、我々は本モデルとサイトカインアレイを組み合わせ、運動依存的に分泌変動するマイオカインの網羅的同定を試み、筋収縮依存的に骨格筋からの分泌量が低下する CXCL10 など複数のマイオカインを同定した (4,5)。CXCL10 は炎症促進作用や抗血管新生作用などを惹起することが知られており、運動依存的な生理変化の一部を仲介している可能性が考えられる。さらに、CXCL10 など新規同定されたマイオカインの一部は、過栄養状態や温熱刺激によって分泌が制御されていることが明らかとなり、運動以外の刺激によってもマイオカインの発現分泌は制御されていることが示唆された。

また、骨格筋細胞から直接放出される細胞外小胞 (Extracellular vesicles; EVs) についても同モデルを用いた解析を行った。収縮前後に放出される骨格筋由来 EVs を精製し、比較解析したところ、収縮誘導によって EVs に内包される少なくとも 5 種類の miRNA 量が変動しており、また、収縮後放出される EVs は C2C12 筋芽細胞の分化抑制を行う可能性が見出された。さらに、収縮によって EVs 内包量が変化する 5 種類の miRNA のうち少なくとも 1 つは筋分化制御と関連していることも確認された。すなわち、骨格筋はマイオカインに加えて EVs を細胞間コミュニケーション分子として利用し、収縮シグナルを他細胞に伝達していると考えられる。

3. まとめ

我々が開発した *in vitro* 擬似的運動刺激モデルは、骨格筋における収縮依存的な様々な生理変化を探索することを可能とした。特に本モデルは骨格筋細胞以外の混入がないため、骨格筋細胞から直接分泌される因子群の収縮依存的な制御に関する研究に極めて適している。今後、骨格筋が発するシグナルの詳細を明らかにしていくことで、運動効果を高める新規物質のスクリーニングなど多くの応用研究に発展していくことが期待される。

4. 文献

1. Fujita *et al.*, *Exp. Cell. Res.*, **313**(9), 1853-65 (2007).
2. Nedachi *et al.*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**(5), E1191-204 (2008)
3. Pedersen *et al.*, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**(2-3), 113-9 (2003)
4. Ishiuchi *et al.*, *Cytokine*, **108**, 17-23 (2018)
5. Ishiuchi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**(1), 97-105 (2018)

講演番号：WS8-A04

骨格筋の *in vitro* 評価系の潮流 ～2D から 3D へ、マウス由来からヒト由来へ～

清水一憲*

名古屋大学 大学院工学研究科 生命分子工学専攻

Current trends on development of *in vitro* skeletal muscle models

Kazunori Shimizu*

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering,

Nagoya University

*shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

This presentation will include the overview of the evaluation methods for cultured skeletal muscle cells and our recent achievements using the microsystem for contractile force measurement of tissue-engineered skeletal muscle tissues.

1. はじめに

骨格筋は身体の約40%を占める最大の組織であり、動力・代謝・分泌器官として大きな役割を果たしている。このため機能不全は全身に影響し、場合によっては死に至る。その要因は、難治性筋疾患や加齢・不動などによる筋萎縮、糖尿病、肥満など多岐にわたる。特に超高齢社会ではこうした疾患の患者数増大が深刻であり、骨格筋機能不全を改善するための医薬品が求められている。

2. 培養骨格筋細胞を用いた評価

医薬品開発プロセスにおいて、培養細胞を用いた候補化合物の薬効評価はひとつの重要なステップである。こうした薬効評価では、マウスやラット由来の初代骨格筋細胞やマウス由来株化骨格筋細胞 C2C12 などが古くから用いられており、いまま汎用されている。最近では、比較的容易にヒト由来骨格筋細胞を入手できるようになったことから、ヒト初代骨格筋細胞、ヒト株化骨格筋細胞、ダイレクトリプログラミング法を用いてヒト線維芽細胞などから誘導した骨格筋細胞、ヒト iPS 細胞から分化誘導した骨格筋細胞などが用いられはじめている。これらの培養骨格筋細胞は、一つの核をもつ筋芽細胞として増殖し、それらが融合することで多核の筋管細胞へと分化し、成熟すると収縮能をもつ。このユニークな特徴のため、候補化合物の薬効評価では細胞生存率、遺伝子・タンパク

質発現量などの通常の評価指標に加えて、独自の評価指標も用いられる。例えば、筋管細胞の幅や長さ、一細胞あたりの核の数、サルコメア構造をもつ筋管細胞の数、さらに電気刺激などに応答して収縮する筋管細胞の収縮特性などが挙げられ、その評価技術の開発も進んでいる。

3. おわりに

本講演では、培養骨格筋細胞を用いた評価について最近の動向を概説するとともに、培養筋組織の収縮力評価技術を利用した我々の最新研究成果 (Fig. 1) (1, 2)を紹介したい。

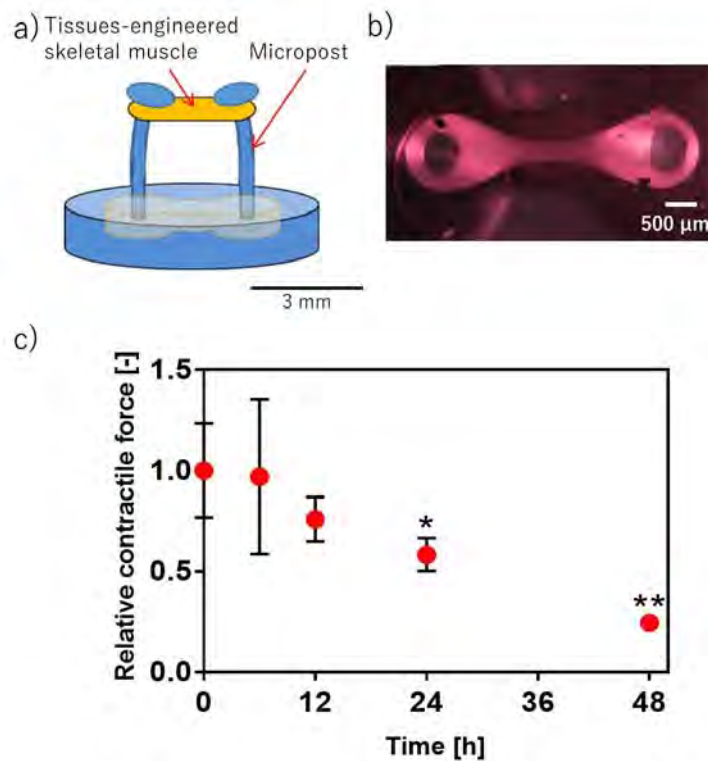


Fig. 1 Microsystem for measuring of contractile force of tissue-engineered skeletal muscles.
a) Schematic diagram of the system, b) Top view image of the tissue,
c) Decrease of contractile force of atrophy.

4. 文献

1. Shimizu, K., Genma, R., Gotou, Y., Nagasaka, S., and Honda, H.: Three-Dimensional Culture Model of Skeletal Muscle Tissue with Atrophy Induced by Dexamethasone, *Bioengineering*, 4, 56 (2017).
2. Shimizu, K., Ohsumi, S., Kishida, T., Mazda, O., and Honda, H.: Fabrication of contractile skeletal muscle tissues using directly converted myoblasts from human fibroblasts, *J Biosci Bioeng*, 129, 632-637 (2020).

講演番号 : WS9-B01

Research and resource development of archaea/extremophiles in RIKEN-JCM

Shingo Kato*, Takashi Itoh and Moriya Ohkuma

Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Research Center

*E-mail: skato@riken.jp

Since establishment in 1981, Japan Collection of Microorganisms (JCM), presently operating as a division of RIKEN BioResource Research Center (RIKEN-BRC), has been collecting, preserving and distributing microbial strains including a variety of extremophiles (e.g., thermophiles, acidophiles, halophiles, and piezophiles) and archaea (e.g., methanogens and ammonia-oxidizers). For instance, we maintain more than 650 strains of thermophilic bacteria and archaea growing optimally at 50°C or higher. The collected strains in JCM are distributed to many laboratories worldwide, and used in various fields of basic and applied science. Besides, we have also explored novel extremophiles and archaea in a variety of natural environments, mainly terrestrial hot springs¹⁻³. In this presentation, I would like to introduce the recent activity of JCM including isolation and characterization of novel extremophiles/archaea.

References

1. Itoh T, Miura T, Sakai H, Kato S, Ohkuma M, Takashina T. *Sulfuracidifex tepidarius* gen. nov., sp. nov. and transfer of *Sulfolobus metallicus* Huber and Stetter 1992 in the genus *Sulfuracidifex* as *Sulfuracidifex metallicus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70:1837-1842 (2020)
2. Kato S, Itoh T, Yuki M, Nagamori M, Ohnishi M, Uematsu K, Suzuki K, Takashina T, Ohkuma M. Isolation and characterization of a thermophilic sulfur- and iron-reducing thaumarchaeote from a terrestrial acidic hot spring. *ISME J.* 13:2465-2474 (2019)
3. Itoh T, Onishi M, Kato S, Iino T, Sakamoto M, Kudo T, Takashina T, Ohkuma M. *Athalassotoga saccharophila* gen. nov. sp. nov. isolated from an acidic terrestrial hot spring of Japan, and proposal of *Mesoaciditogales* ord. nov., *Mesoaciditogaceae* fam. nov. in the phylum *Thermotogae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1045-1051 (2016)

講演番号 : WS9-B02

Vietnam Type Culture Collection (VTCC) and international cooperation on utilization of microbial bioresource (mBRC)

Minh Hong Nguyen^{1*} and Vinh Van Hoang²

¹⁾ Faculty of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering, Phenikaa University, Hanoi 12116, Vietnam. ²⁾ Vietnam Type Culture Collection, VNU Institute of Microbiology and Biotechnology, Hanoi 123105, Vietnam.

*E-mail: minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn

Introduction of VTCC

Vietnam Type Culture Collection (VTCC) was established in 1995 as part of the Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University Hanoi. VTCC is the largest general culture collection in Vietnam. By 2019, VTCC is preserving 9719 microorganisms, including 2750 fungi, 1520 yeasts, 2199 bacteria, and 3250 actinomycetes. The online catalogue of VTCC has been updated with a total of 3839 strains, including 1075 fungi (204 species, 49 genera), 1077 yeasts (193 species, 67 genera), 940 bacteria (176 species, 52 genera) and 767 actinomycetes (419 species, 40 genera) for public users. In 2018, VTCC has provided 162 microbial cultures to 58 national institutions, universities, and manufacturers and received 31 strains as general and patent deposition.

VTCC is funded annually by the government for the conservation of microbial resources. Moreover, in this academic year, VTCC receives funding to carry out seven other projects focusing on the discovery of bioactive compounds from microorganisms, the development of biocontrol products and probiotics, genetic engineering of *Streptomyces* species and characterization of novel species. In 2018, three new anamorphs of *Ceramothyrium* from fallen leaves in Vietnam were published on the Journal *Advances in Microbiology*. Two master students are doing their thesis at VTCC and two staffs were sent for short courses at KTCC and BIOTEC Thailand this year. VTCC has also started implementing the Decree No. 59/2017/ND-CP on the management of access to genetic resources and the sharing of benefits arising from their utilization.

Implementation effort on the CBD and Nagoya Protocol

Vietnamese ratified NP by Oct.2014. Since then, the management and conservation of all resources belong to Biodiversity Conservation Agency (BCA); Ministry of resources and environment (MONRE), previously ministry of Science and Technology (MOST). In 2010, the Vietnamese national act. No 65/2010/ND-CP for biodiversity management and conservation does seem to fit NP. The new act that is more practical is needed likely to be adopted by the Vietnam government in two coming years. Based on practical experiences of NITE and VTCC collaboration in the tropical biodiversity of microbes, the collaboration is a good case study providing BCA, MONRE with valuable facts and experiences for making the new Act on ABS and Biodiversity.

講演番号 : WS9-B03

Surveillance and Genotyping of Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) among members of the family *Enterobacteriaceae* from different hospitals and environmental samples in the Philippines

Joel C. Cornista^{1*}, Anna Margarita D. Cuña², Helen Juvy A. Sanchez², and Marilen P. Balolong¹

Department of Biology, College of Arts and Sciences, University of the Philippines Manila, Ermita Manila, 1000 Philippines
Department of Science and Biology, College of Arts and Sciences, Miriam College, Katipunan Avenue, Loyola Heights, Quezon City 1108 Philippines
E-mail: jccornista@up.edu.ph

The production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) among *Enterobacteriaceae* is becoming to be a major health problem in the Philippines. Infections caused by ESBL-producing pathogens often result to limited therapeutic options causing treatment failure in patients. Today, incidents of ESBLs are continuously increasing due to the discovery of numerous types of these enzymes¹. However, reliable identification of ESBL-producing organisms has been challenging and time consuming causing its prevalence to be mostly underestimated. In our study that determined the prevalence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from four different provincial hospitals in Luzon, Philippines revealed that 18% out of the total 100 isolates were ESBL-producers based on phenotypic confirmatory disk diffusion test (PCDDT). Genotyping and sequencing of the different *bla* genes possessed by the ESBL-positive isolates showed that *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} were detected in 10 out of 18 ESBL-positive isolates (56%), while *bla*_{SHV} was found in 15 out of 18 isolates (83.3%). Interestingly, the *bla*_{OXA-1} gene was detected in all phenotypically confirmed ESBL isolates suggesting that it was the most predominant β -lactamase gene among the samples. Eight of the isolates harbored at least three genes; four of these isolates have *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{SHV}; three of the isolates have *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{SHV}; and one with *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{TEM}. Lastly, five isolates harbored all the four genes tested – suggesting that these isolates pose a more serious threat in the healthcare industry because of its resistance to a wider range of antibiotics.

In another study at the Ospital ng Maynila, Philippines, the presence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria from sputum, endotracheal aspirate, urine, corneal specimen, wound discharge, breastmilk, and abscess from infected patients were determined. About 55 out of 100 clinical isolates were considered to be ESBL-producers and identified as *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter hafnia*, *Enterobacter spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella cloacae*, *Klebsiella ozaenae*, and *Escherichia coli*. PCR amplification of the β -lactamase genes carried by these ESBL-producers showed that *bla*_{CTX-M} gene was the most predominant *bla* gene as it was present in all of the ESBL-positive strains

followed by the *bla*_{OXA} gene which was detected in 53/55 (96.4%) of the isolates. On the other hand, 44/55 (80%) of the isolates possessed the *bla*_{SHV} gene while 38/55 (69.1%) carried the *bla*_{TEM} gene. The presence of multiple *bla* genes within the same strain was also observed with 35 out of 55 (63.6%) isolates possessing all the four genes tested. Ten (18.2%) of the strains possessed three of the β -lactamase genes and another 10 harbored at least two genes. Interestingly, *bla* genes were also detected even for isolates that were negative for the PCDDT indicating that these genes might be present but the β -lactamase enzyme might not have been actively expressed by the bacteria.

Moreover, while ESBL-producing bacteria were found in clinical settings, it has recently been found to increasingly spread among various environments in the Philippines². We even detected ESBL-producing bacteria among *Enterobacteriaceae* isolated from bat guano of Cabalyorisa Cave, Mabini, Pangasinan. Results showed that 14 (93%) of the strains contained *bla*_{AmpC}, 13 (86.6%) harbored the *bla*_{SHV} gene and 12 (80%) possessed the *bla*_{OXA} and *bla*_{TEM} genes. Meanwhile, the *bla*_{CTX-M} gene was detected in all of the strains tested making it the most predominant *bla* gene present among the environmental samples similar to some clinical samples. Alarmingly, nine (60%) of the strains harbored all the *bla* genes tested and 3 (20%) strains harbored four gene while another three strains contained three *bla* genes. Because of the large occurrence of ESBL-producing bacteria with multiple β -lactamase genes both in hospital and environmental settings, there is therefore an urgent need to develop a more rapid and accurate method of ESBL detection and genotyping particularly within the Philippine setting.

References:

1. Varkey DR, Balaji V, Abraham J. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing strains from blood sample. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(3): 276–278 (2014).
2. Vital PG, Zara ES, Paraoan CEM, Dimasupil MAZ, Abello JJM, Santos ITG, RiveraI WL. Antibiotic Resistance and Extended-Spectrum β -lactamase Production of *Escherichia coli* Isolated from Irrigation Waters in Selected Urban Farms in Metro Manila, Philippines. *Water* (10)58 (2018).

講演番号 : WS9-B04

International trends in microbiome research and the role of Biological Resource Center (NBRC) -Development of microbial cocktail-

Takamasa Miura and Hiroko Kawasaki

Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE・NBRC)

E-mail: miura-takamasa@nite.go.jp

Microbiome research has revealed interactions between microbiota such as intestinal bacteria and soil bacteria, and the host and environment. As a result, it is increasing for expectations for the development as a new target for drug discovery, therapy, functional foods and cosmetics, as well as to improve agricultural production and for solving environmental problem fields. In order to understand the microbiome, various omics analyzes are being actively performed. One of the most popular omics analyzes is microbiome community measurement using next-generation DNA sequencing (i.e. metagenomics). This analysis consists of many processes including sampling, storage, transportation, DNA extraction, library preparation, sequencing, and data analysis. It is reported that there are variations in the method used in each process of each laboratory and differences in research skills, which are accumulated as biases and have a great effect on the analysis results^{1,2}). This means that the interpretation of data obtained by different methods is biased, and the compatibility of the data becomes low, so that it may not be possible to compare accurately with other results and/or lead to incorrect conclusions.

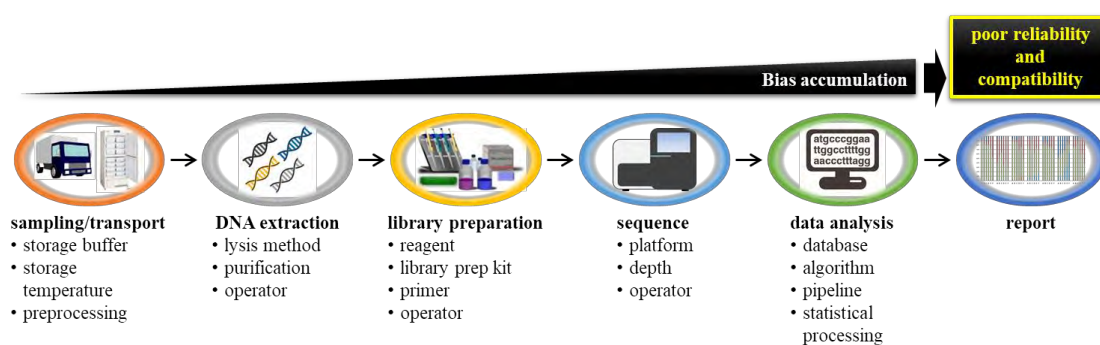


Fig. 1 Analysis process of microbiome measurement

To address this challenge, we have developed the mock community called microbial cocktail to aid in the development and assessment of microbiome community measurement methods. The “NBRC microbial cocktail” are cell cocktail and DNA cocktail in which the cells of well-identified 15 strains and those genomic DNA are mixed in equal amounts, respectively. The microbial strains are selected to contain gram-negative and gram-positive bacteria, a wide range of GC contents, and different genome sizes. These cocktails have been provided from

NBRC culture collections (<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/cocktail.html>). In this presentation, we will introduce the development of NBRC microbial cocktails, their accuracy, and the examples of their use.

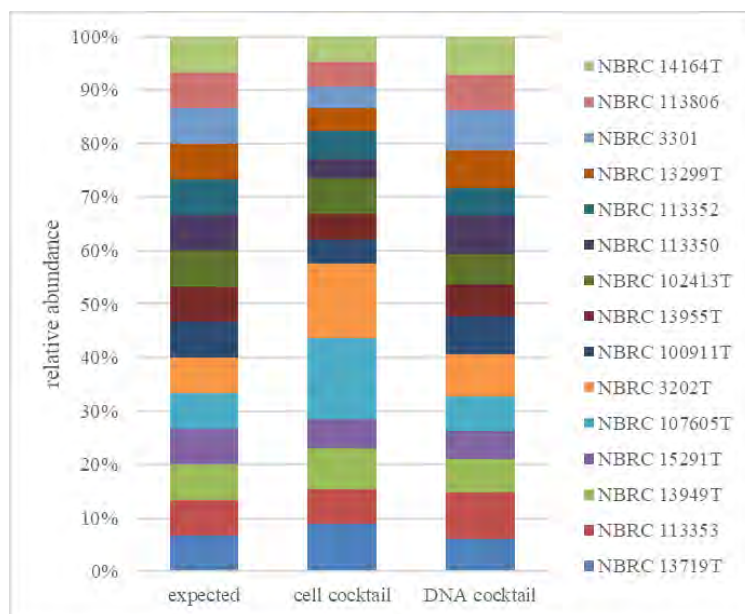


Fig. 2 Relative abundance of 15 strains in NBRC microbial cocktail

References

1. Costea, P., Zeller, G., Sunagawa, S., Pelletier, E., Alberti, A., Levenes, F., Tramontano, M., Driessen, M., Hercog, R., and other 49 authors: Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat. Biotechnol.*, 35, 1069–1076 (2017).
2. Sinha, R., Abu-Ali, G., Vogtmann, E., Fodor, A. A., Ren, B., Amir, A., Schwager, E., Crabtree, J., Ma, S., and other 5 authors: Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) project consortium. *Nat. Biotechnol.*, 35, 1077–1086 (2017).

講演番号：WS9-B05

Systematically investigate the binding behavior of CRISPR-Cas9 system with high-throughput profiling method

Chong Zhang^{1,2*}, Tianmin Wang^{1,2}, Jiahui Guo^{1,2}, Huibao Feng^{1,2}

¹MOE Key Laboratory for Industrial Biocatalysis, Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

²Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

*E-mail: chongzhang@tsinghua.edu.cn

Introduction

CRISPR/Cas9 is a promising tool in prokaryotic genome engineering, but its success is limited by the widely varying on-target activity of single guide RNAs (sgRNAs). Based on the association of CRISPR/Cas9-induced DNA cleavage with cellular lethality, we systematically profiled sgRNA activity by co-expressing a genome-scale library (~70,000 sgRNAs) with Cas9 or its specificity-improved mutant in *E. coli*. Based on this large-scale dataset, we constructed a comprehensive and high-density sgRNA activity map, which enables selecting highly active sgRNAs for any locus across the genome in this model organism. We also identified ‘resistant’ genomic loci with respect to CRISPR/Cas9 activity, notwithstanding the highly accessible DNA in bacterial cells. Moreover, we found that previous sgRNA activity prediction models that were trained on mammalian cell datasets were inadequate when coping with our results, highlighting the key limitations and biases of previous models. We hence developed an integrated algorithm to accurately predict highly effective sgRNAs, aiming to facilitate CRISPR/Cas9-based genome engineering, screenings and antimicrobials design in bacteria. We also isolated the important sgRNA features that contribute to DNA cleavage and characterized their key differences among wild type Cas9 and its mutant, shedding light on the biophysical mechanisms of the CRISPR/Cas9 system.

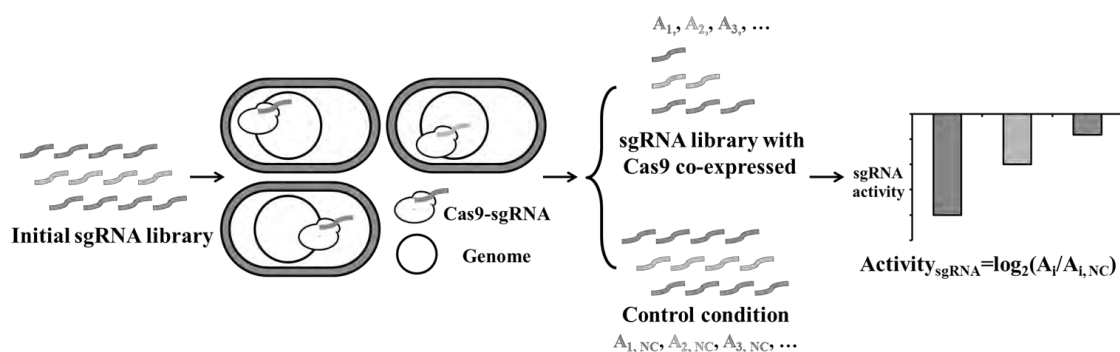


Fig. 1 Schematic illustration of the workflow for the sgRNA activity screening experiments¹.

On the other hand, the off-target effects have greatly restricted its capabilities as it can tolerate imperfect base-pairs between single guide RNA (sgRNA) and target DNA. To

comprehensively understand this, we generated two sgRNA libraries carrying saturated single- and double-nucleotide mutations towards relevant DNA targets. Based on a massively parallel approach, we profiled the *in vivo* binding affinity of dCas9 towards the DNA target guided by each individual sgRNA with particular mismatch mutations in these libraries. From the raw datasets and via mathematic modeling, we observed that in the seed region, combinatorial double mutations exhibit a synergistic effect in contrast to the two corresponding single mutations. Furthermore, we also established a biophysical model to fit the dataset and found that the binding activity is dominated by the thermodynamic properties of nucleic acids, a convolutional neural network was built to deal with insufficient parameters based on this model.

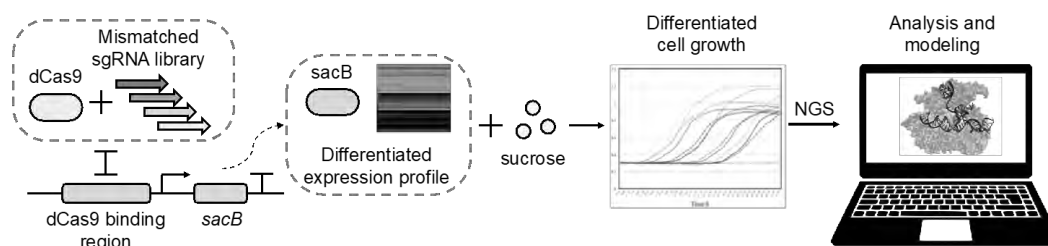


Fig. 1 Schematic illustration of the workflow for the guide-target mismatch effects on dCas9-sgRNA binding activity screening experiments.

Conclusion

The high-throughput profiling method presented here is potent to systematically investigate the binding behavior of CRISPR-Cas9 system, serving as a new tool for its biophysics study and engineering applications.

References

1. Guo, J., Wang, T., Guan, C., Liu, B., Luo, C., Xie, Z., ... Xing, X.-H. Improved sgRNA design in bacteria via genome-wide activity profiling. *Nucleic Acids Research*, (July), 1–18. <https://doi.org/10.1093/nar/gky572> (2018).

講演番号 : WS9-B06

River water pollution monitoring and assessment using bacterial indicators

Norhayati Ramli^{1*}

¹Department of Bioprocess Technology, Faculty of Biotechnology & Biomolecular Sciences,
Universiti Putra Malaysia

*E-mail: yatiramli@upm.edu.my

The generation of a huge amount of wastewater known as palm oil mill effluent (POME) by the palm oil industry¹ has become a critical issue to satisfy the increasingly stringent environmental regulations of the final discharge². To determine the impact of POME to the receiving river, the use of bioindicator is proposed as one of the promising approaches to be applied in complement with the current physicochemical assessment.

The effect of POME final discharge towards the bacterial community in the receiving river was previously assessed by using flow cytometry and high-throughput MiSeq. The bacterial community dynamics in POME final discharge was compared with the bacterial community in the unpolluted and polluted river due to final discharge. The shift of low nucleic acid (LNA) to high nucleic acid (HNA) bacterial cells in the affected river suggests the transformation of dormant to active cells due to POME final discharge³.

Besides, the *Chromatiaceae* and *Alcaligenaceae* which were not detected in the upstream but were detected in the downstream part of the river were proposed as the bioindicators to indicate the river water contamination caused by the POME final discharge⁴. These bioindicators were also shown to be present in the different final discharges produced from different biotreatment processes⁵, but not present in the other polluted river water⁶.

In addition, the reliability of bioindicators was proven as both of them were remained detected in the POME final discharge (>0.5%) despite the changes of environmental factors; temperature (25-40°C), pH (7-9), total suspended solids (low- and high-crop seasons) and UV irradiation time (30-120 min) with a positive correlation with biological oxygen demand (BOD₅) concentration.

The *Alcaligenaceae* or *Chromatiaceae* or both could be regarded as reliable and specific bacterial indicators to indicate the river water pollution caused by POME final discharge, due to its consistent present in POME final discharge and the affected rivers, and their survivability despite the changes of environmental factors.

References

1. Rupani, P., & Singh, R. (2010). Review of current palm oil mill effluent (POME) treatment methods: Vermicomposting as a sustainable practice. *World Appl. Sci. J.*, 11(1), 70–81.

2. Tabassum, S., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2015). An integrated method for palm oil mill effluent (POME) treatment for achieving zero liquid discharge - A pilot study. *J. Clean. Prod.*, 95, 148–155.
3. Sharuddin, S. S., Ramli, N., Mohd-Nor, D., Hassan, M. A., Maeda, T., Shirai, Y., Sakai, K. & Tashiro, Y. (2018). Shift of low to high nucleic acid bacteria as a potential bioindicator for the screening of anthropogenic effects in a receiving river due to palm oil mill effluent final discharge. *Ecol. Indic.*, 85, 79–84.
4. Sharuddin, S. S., Ramli, N., Hassan, M. A., Mustapha, N. A., Amran, A., Mohd-Nor, D., Sakai, K., Tashiro, Y., Shirai, Y. & Maeda, T. (2017). Bacterial community shift revealed *Chromatiaceae* and *Alcaligenaceae* as potential bioindicators in the receiving river due to palm oil mill effluent final discharge. *Ecol. Indic.*, 82, 526–529.
5. Mohd-Nor, D., Ramli, N., Sharuddin, S. S., Hassan, M. A., Mustapha, N. A., Amran, A., Sakai, K., Shirai, Y., & Maeda, T. (2018). *Alcaligenaceae* and *Chromatiaceae* as reliable bioindicators present in palm oil mill effluent final discharge treated by different biotreatment processes. *Ecol. Indic.*, 95, 468–473.
6. Zolkefli, N., Ramli, N., Mohamad-Zainal, N.S.L., Mustapha, N.A., Yusoff, M.Z.M., Hassan, M.A., Maeda, T., 2020. *Alcaligenaceae* and *Chromatiaceae* as pollution bacterial bioindicators in palm oil mill effluent (POME) final discharge polluted rivers. *Ecol. Indic.*, 111, 106048.

講演番号：WS10-C01

バイオシステムの非線形性について

高木 昌宏^{1*}

¹北陸先端科学技術大学院大学・生命機能工学領域

Non-linear characteristics of biosystems

Masahiro Takagi^{1*}

¹Japan Advanced Institute of Science and Technology

E-mail: takagi@jaist.ac.jp

Until the last century, science has continued to evolve by subdividing phenomena into more basic elements through analysis. This approach is based on “reductionism” which is the theory that all complex phenomena could be explained by applying the simplest and most basic physical mechanism (linear and mechanical approach). Indeed, biology as an academic field has also developed by elucidating life phenomena from individual organism level to molecular level. Reductionism contributed greatly to the development of science and technology, but many contradictions became apparent in the 21st century. Natural phenomena, especially biological phenomena, will not be fully understood in linear and mechanical models, because biological systems are basically open, dissipative and nonlinear. Fundamental questions about birth and evolution of life cannot be answered by existing scientific methods based on reductionism. The philosophical paradigm opposite to reductionism is “holism”, in which the universe and life phenomena are more than mere sums of elementary particles and can only be correctly understood in terms of the whole interaction.

In this symposium, I would like to discuss nonlinearity in biological phenomena and moreover the importance of holistic and non-linear way of thinking in understanding life phenomena from psychological aspect as well as physiological aspect.

1. はじめに：線形と非線形

線形とはつまり、 $1+1=2$ のように変化が一定で要素の重ね合わせで完全に解を予想する事が可能な、我々が算数で学んだ、ごく当たり前に理解している性質である。広い意味での線形性とは、物理的、数学的に物事を要素に分解すれば、必ずすべてを理解する事ができるという点で因果律に支配された「還元論」であり「決定論」である。科学・技術の進歩は、自然現象を線形性に基づいて理解する事で発展し続けてきた。しかし、物質や宇宙、生命の起源のような、自然科学における根源的な問いに対する答えを考える上では、線形性に基づいた決定論では、十分に理解できない事が示されつつある。線形性が当てはまらない現象、 $1+1$ が2にならない性質を、非線形と呼ぶ。要素の単純な重ね合わせが当てはまらない性質であり、背景には、協同現象がある。ミクロの視点での要素間の力が弱くても、マクロの視点で見れば、強い力が働

いている現象である。熱力学第2法則に逆らって起こる、自己組織化がその代表例であり、因果律に支配されない「構成論」であり「確率論」である。

2. 非線形、ゆらぎ、混沌：平均値と変動

我々が考える「正しい」というのは、線形性に起因する決定論での理解である。しかし実際には、正しいと理解をする中身には、絶対的に正しい場合と、統計的に正しい場合がある。統計的に正しい「平均値」からの変動を「ゆらぎ」と称し、線形的に判断する着目点が平均値だとすると、ゆらぎに着目するのが、非線形的な理解であり、さらに平均値とゆらぎの組み合わせが、「カオス（混沌）」である。

3. バイオシステムの謎：混沌と秩序

混沌と秩序は、相反する言葉ではあるが、実は混沌の動的な性質は秩序を生む根源でもある。データサイエンスやAIも、「混沌から秩序を見出すアプローチ」であり、非線形的である。生命現象に目を向けると、その最も重要な特徴は、階層性と秩序性である。分子、細胞、組織、個体、さらには生態系、共同体や社会という階層性、そして概日

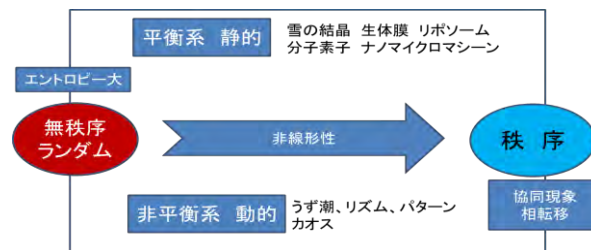


Fig. 1. 自己組織化プロセス（文献1より改変）

性、ホメオスタシス、蛍の明滅、心臓の鼓動、あるいは階層的な発生や進化プロセスと言った秩序性を理解するには、混沌から秩序が生まれる非線形性や自己組織化に着目しなくてはならない (Fig. 1)。物理学が、物質の根源に迫った結果、自然界の決定論的理解（粒子性）と確率論的理解（波動性）の双方に至ったように、生物学においても、分子・原子レベルまでの理解（決定論的な線形性の世界）から、量子レベルでの理解（確率論的な非線形の世界）に踏み込むことで、バイオシステムという秩序の理解と形成の謎に迫る事ができる。

4. 思考における非線形性：論理と直感

物を考えたり、ある種の決断をする時にも、「線形」「非線形」は、深く関わっている。簡単に言えば、「線形」は「因果」で、「非線形」は「直感（ひらめき）」である。創造的研究について考えると、後者がそれに当てはまる。つまり、因果という平均値からずれた「カオス」に突然起こった、新たな「知の秩序」である。その新たな秩序が、「因果」に内包されることにより、我々の理解は進歩するのである。偶然に発生した変異が、巨視的な自然選択により必然となる「生物進化」のプロセスにも通ずる。

5. 終わりに：部分と全体

物事を細かく分析すると、理解は深まるが結論に至らない事がある。バイオシステムに限らず、物事の本質を理解するには、部分に分解して理解する「リニア思考」だけでなく、要素間の相互作用が全体に及ぼす影響に目を向ける必要がある。見えていると思い込んでいる背景に、見えない要素間の相互作用が存在するのである。

6. 参考文献

1. 「自己組織化とは何か」（都甲 潔）講談社ブルーバックス

講演番号：WS10-C02

光合成と人工光合成のシステムケミストリー

中西 周次^{1,2*}

¹大阪大学・太陽エネルギー化学研究センター, ²大阪大学大学院・基礎工学研究科

Systems Chemistry in Natural and Artificial Photosynthesis

Syuji Nakanishi^{1,2*}

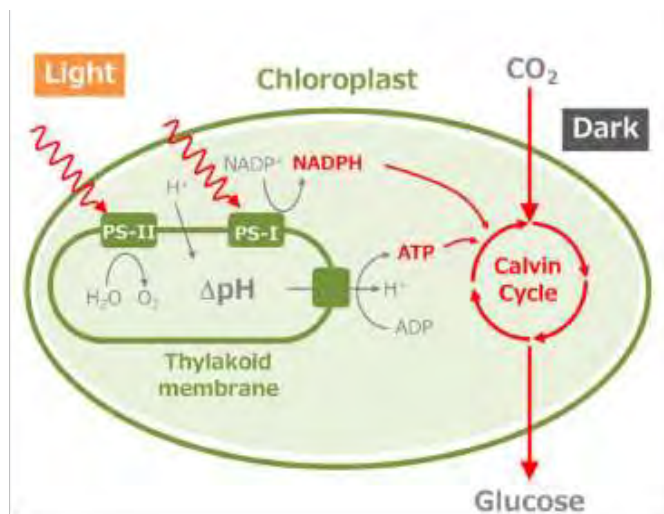
¹ Research Center for Solar Energy Chemistry, ²Graduate School of Engineering Science, Osaka University

*E-mail: nakanishi@chem.es.osaka-u.ac.jp

Based on concerns about the increased emission of anthropogenic CO₂ into the environment, there has been a growing interest in effective CO₂ fixation by using natural and artificial photosynthesis systems. Unlike natural systems, dynamic adaptation abilities against the fluctuating environments have not been obtained for artificial photosynthesis systems. In this talk, recent our efforts to understand the dynamic adaptation ability in natural (biological) photosynthesis and to emulate in artificial (chemical) systems will be discussed.

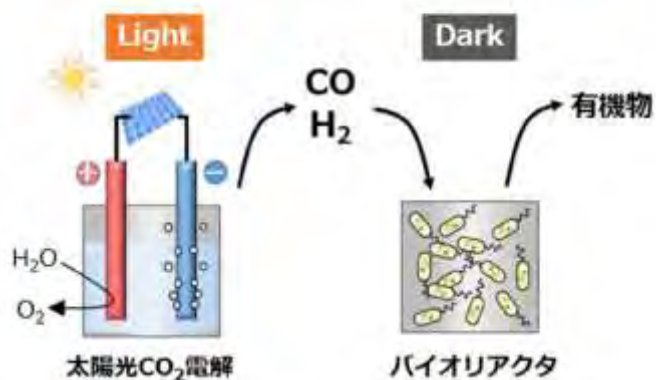
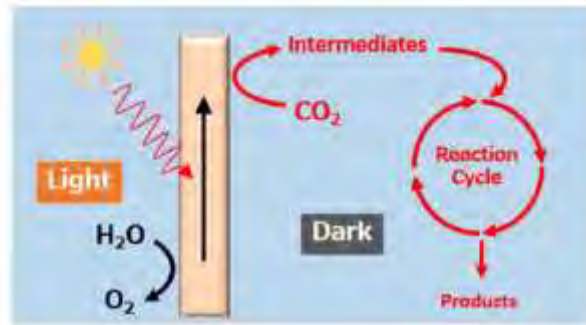
光合成の明反応では、PS-II 内で光生成した正孔による水の酸化反応を介して電子が光合成電子伝達系へと注入される。一方、光励起された電子は、チラコイド膜内のプラストキノンやプラストシアニンなどを経て、PS-I へと輸送される。PS-I で再び光励起されて高い還元力を獲得した光合成電子は NADP⁺を還元し、NADPH が生成する。一連の光合成電子伝達と共役してチラコイド膜内外に形成されるプロトン駆動力 (PMF) を元に ADP から ATP が合成される。こうして明反応において生産された NADPH と ATP は、細胞質内の円環状化学反応ネットワークであるカルビン回路において CO₂ の有機物への固定化に使用される。光合成における電子フラックスは、外部環境の光強度変化に応じてダイナミックに変化し、これは光合成生物の生育に大きな影響を及ぼし得る。そのため、光合成における光/化学エネルギー変換システムには、変動光に適応するための動的機能が

光合成の明反応では、PS-II 内で光生成した正孔による水の酸化反応を介して電子が光合成電子伝達系へと注入される。一方、光励起された電子は、チラコイド膜内のプラストキノンやプラストシアニンなどを経て、PS-I へと輸送される。PS-I で再び光励起されて高い還元力を獲得した光合成電子は NADP⁺を還元し、NADPH が生成する。一連の光合成電子伝達と共役してチラコイド膜内外に形成されるプロトン駆動力 (PMF) を元に ADP から ATP が合成される。こうして明反応において生産された NADPH と ATP は、細胞質内の円環状化学反応ネットワークであるカルビン回路において CO₂ の有機物への固定化に使用される。光合成における電子フラックスは、外部環境の光強度変化に応じてダイナミックに変化し、これは光合成生物の生育に大きな影響を及ぼし得る。そのため、光合成における光/化学エネルギー変換システムには、変動光に適応するための動的機能が



備わっている。地球の自転に伴う環境光の日周変動に適応するシステムである概日時計はその良い一例である。この概日時計の働きにより、暗時および明時にそれぞれ起こるべき化学反応を時間管理し、全体としての最適化が実現されている。他にも、光強度依存的な PS-II と PS-I の発現量の動的調整など、数多くの光環境適応システムが知られている。

重要なことに、こうした外部環境変化に対するエネルギー変換システムの非線形な応答は、系の構成要素（関与する化学種）自体の変化としてではなく、構成要素間の量的および質的な相互関係の変化、すなわち（様々な階層の）化学反応ネットワークの構造変化だけで発現する場合がある。このような化学反応ネットワークシステムを人工系でエミュレートすることができれば、非線形な動的機能を持つ新しい人工光合成系の実現が期待される。本講演においては、こうした考えの



下に進めている我々の研究グループの人工光合成研究の紹介を通して、天然光合成（生物工学）と人工光合成（化学）、ならびにそれらのハイブリッド系（生物化学工学）における CO₂ 資源化方策について議論したい。

References

1. Wu, Y., Kamiya, K., Hashimoto, T., Sugimoto, R., Harada, T., Fujii, K. and Nakanishi, S.: Electrochemical CO₂ reduction using gas diffusion electrode loading Ni-doped covalent triazine frameworks in acidic electrolytes. *Electrochemistry*, in press (2020).
2. Tanaka, K., Ishikawa, M., Kaneko, M., Kamiya, K., Kato, S. and Nakanishi, S.: The endogenous redox rhythm is controlled by a central circadian oscillator in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Photosynthesis Research*, 142, 203-210 (2019).
3. Su, P., Iwase, K., Harada, T., Kamiya, K. and Nakanishi, S.: Covalent Triazine Framework Modified with Coordinatively-unsaturated Co or Ni Atoms for CO₂ Electrochemical Reduction. *Chemical Sciences*, 9, 3941-3947 (2018).

講演番号：WS10-C03

タンパク質の空間捕捉と機能制御

藤田 誠^{1,2*}

¹東京大学大学院工学研究科, ²分子科学研究所

Protein encapsulation in a synthetic space for their function control

Makoto Fujita^{1,2*}

¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²Institute for Molecular Science

*E-mail: mfujita@appchem.t.u-tokyo.ac.jp

Protein encapsulation has long attracted many chemists and biologists because of its potential to control the structure and functions of proteins, but has been a daunting challenge because of their incommensurably larger size compared with common synthetic hosts. Here we report the encapsulation of small proteins within giant coordination cages. The proteins are attached to one bidentate ligand and, upon addition of Pd(II) ions (M) and additional ligands (L), M12L24 coordination nanocages self-assemble around the protein. Because of the well-defined host framework, the protein-encapsulated structure can be analyzed by NMR spectroscopy, ultracentrifugation and X-ray crystallography[1]. We demonstrated that the encapsulation of a protein in the molecular cage stabilizes the tertiary structure of the protein and improves its enzymatic activity. Particularly, when the encapsulated enzyme was exposed to an organic solvent, its half-life was prolonged 1000-fold. Kinetic and spectroscopic analysis of the enzymatic reaction revealed that the key to this stability is the isolated space; this is reminiscent of chaperonins, which use their large internal cavities to assist the folding of client proteins [2]. The single-molecule protein-caging affords a new type of protein-based nanobiotechnology that accelerates molecular biology research as well as industrial applications.



Figure 1. Protein encapsulation in a self-assembled M12L24 giant cage. Ubiquitin-encapsulated structure has been confirmed by NMR spectroscopy, ultracentrifugation and X-ray crystallography.

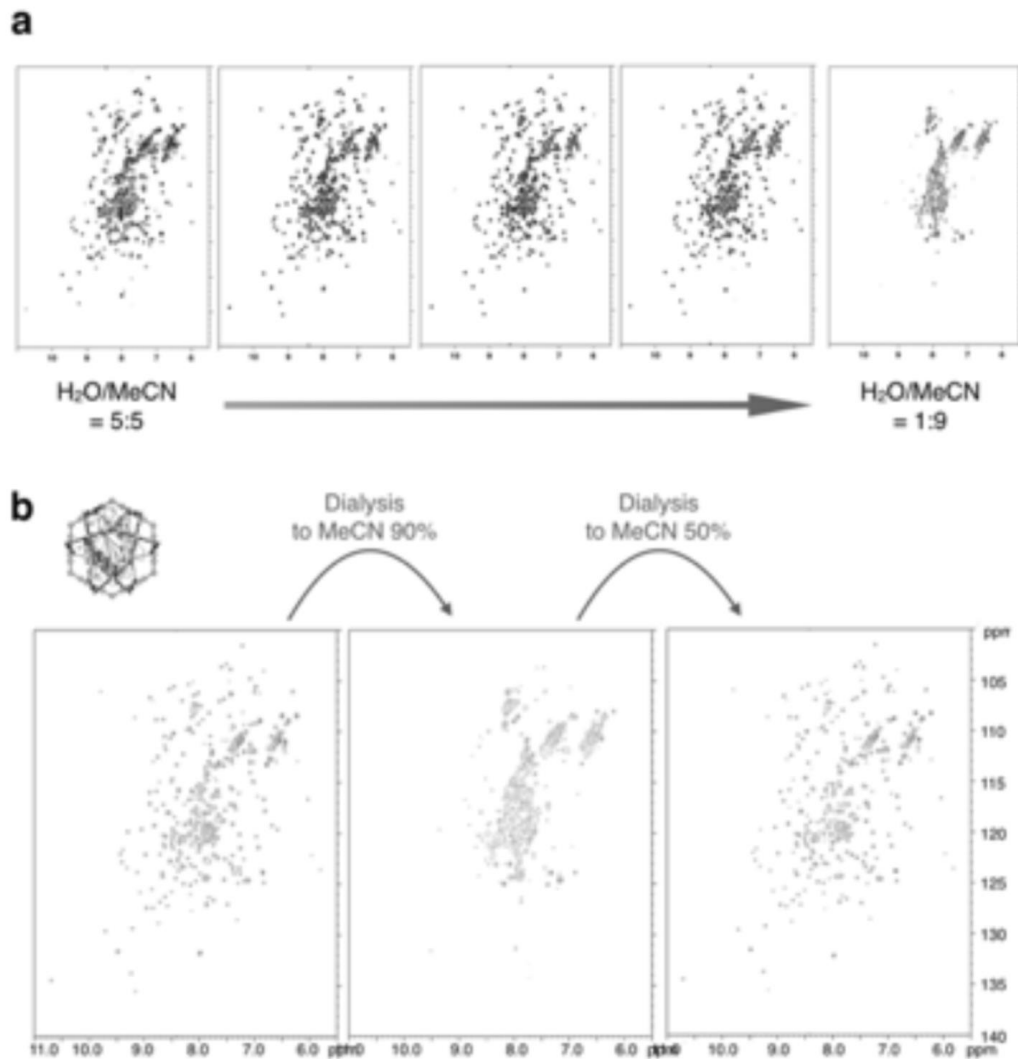


Figure 2. HSQC spectra of CLE-encapsulated cage (CLE: cutinase-like enzyme).

a: Tertiary structure is maintained upon short exposure to organic media (up to ~80% acetonitrile). **b:** Longer-period exposure of CLE to organic media once resulted in the denaturation of the tertiary structure with the loss of the enzyme activity. However, the immediate regeneration of the enzymatic activity was observed when the degraded CLE in the cage was retreated under standard aqueous conditions. This striking result is reminiscent of protein refolding by pot-like chaperonin.

References

1. Fujita, D., Suzuki, S., Sato, S., Yagi-Utsumi, M., Yamaguchi, Y., Mizuno, N., Kumasaka, T., Takata, M., Noda, M., Uichiyama, S., Kato, K., Fujita, M.: Protein encapsulation within synthetic molecular hosts. *Nature Communications*, 3, 1093 (2012).
2. In preparation

講演番号：WS10-C04

細菌集団における細胞不均一性と多様性

野村 暢彦^{1,3*}, 尾花 望^{2,3}, 豊福 雅典^{1,3}

¹筑波大学・生命環境系, ²筑波大学・医学医療系,

³筑波大学・微生物サステナビリティ研究センター

Heterogeneity and diversity in biofilms

Nobuhiko Nomura^{1,3*}, Nozomu Obana^{2,3} and Masanori Toyofuku^{1,3}

¹Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, ²Faculty of Medicine, University of Tsukuba, ³Microbiology Research Center for Sustainability, University of Tsukuba

*E-mail: nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

Biofilms are constructed by bacterial cells and matrix including, EPS, proteins, DNA, and membrane vesicles (MV). MVs include DNA, RNA, proteins, and bacterial signals, indicating that MVs are like communication balls in a biofilm. Recently, we reported that the Holin endolysin (HL) system is a universal mechanism for MV induction among bacteria. Interestingly the expression pattern of the HL system is heterogenous. As the HL (induced cell lysis) is genetically programmed, we consider that this is a bacterial programmed cell death. In biofilms, there are interactions such as cell-cell communication and heterogeneity.

1. はじめに

単細胞生物である微生物も、ほとんどが集団（バイオフィーム(BF)）で存在することが明らかになってきた。バイオフィームは、細胞外にマトリクスに覆われる事で、様々な環境ストレスや敵から守られる。さらに興味深いことに、単一の微生物から形成されたバイオフィームですら、様々な多様性（自然突然変異株）を持つ細胞が出現することもわかってきた。バイオフィームになることで、内部の細胞の多様性・不均一性を発現させながら環境ストレスに対応しているようである。それがバイオフィーム形成時のいつどこで出現するのか、また、その出現メカニズムやさらになぜそのような多様性・不均一性が生まれるのかについて我々の最新の知見と考えを発表させて頂く。

2. 細胞外膜粒子(MV)は細菌集団の細胞不均一性から生まれる

微生物も細胞外にシグナル（言語）を分泌し、細胞間で会話することが明らかになってきた。さらに近年、我々はグラム陰性と陽性の細菌の細胞外膜粒子(20~500 nm)（メンブレンベシクル (MV)）が、集団中の一部の細胞死を介して産生されることを明らかにした[1-3]。そして、そのMVには核酸 (DNA, RNA)・タンパク質さらに細菌

シグナル（言語）などが含まれ、様々な物質の輸送体として機能していることが明らかとなってきた[4]. つまり、1)細菌シグナルが細胞外に放たれ自由拡散による細胞間コミュニケーションと、2)MVにシグナルが含まれることで遠くまであるいは特異的な細胞間コミュニケーションの2種類のコミュニケーション法を細菌は有しているのである.

3. 環境変化により細胞不均一性を発現させバイオフィーム形態を変化させる

病原細菌（ウェルシュ菌）は、通常宿主（ヒト、動物）内の腸内などの嫌気下で体内温度（約37℃）で暮らしている。しかしながら、宿主が死んで環境中に放り出されたらその環境（温度・酸素等）に適応しなければならない。ウェルシュ菌は、宿主体内よりも低い温度になった場合、温度変化に応答してバイオフィームの外側部分の局在特異的に繊維状タンパク質を豊富に産生することで低温・好気条件下に適応していることがわかった[5]. そして、ウェルシュ菌のバイオフィーム中には、繊維状タンパク質を生産する細胞と生産しない細胞が共存する不均一性が存在する。これらのことから、酸素があると生育できないウェルシュ菌は温度を介して、酸素が豊富な宿主の外部環境を認識し、バイオフィーム形成が調節され、さらにバイオフィーム内で役割分担しつつ、集団として生存していることが示唆された。

4. 文献

1. Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, AL., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, NK., Osvath, SR., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, ES., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, LG., Cavaliere, R., Ahrens, CH., Charles, IG., Nomura, N., Eber, L., Whitchurch, CB.: Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7, 11220 (2016)
2. Toyofuku, M., Cárcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C., Kurosawa, M., Gademann, K., Pilhofer, M., Nomura, N., Eberl, L.: Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, 8, 481 (2017).
3. Toyofuku, M., Nomura, N., Eberl L.: Types and origins of bacterial membrane vesicles, *Nature Reviews Microbiology*, 17(1):13-24 (2019).
4. Toyofuku, M., Morinaga, K., Hashimoto, Y., Uhl, J., Shimamura, H., Inaba, H., Schmitt-Kopplin, P., Eberl, L., Nomura, N.: Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *The ISME Journal*, 11, 1504-1509 (2017).
5. Obana, N., Nakamura, K., Nomura, N.: Temperature-regulated heterogeneous extracellular matrix gene expression defines biofilm morphology in *Clostridium perfringens*. *npj Biofilms and Microbes*, 6, 29 (2020).

講演番号：WS11-A01

若手主導で考えるポストコロナ研究の未来

堀之内貴明*

理化学研究所 生命機能科学研究センター

Future of post-corona researches led by young scientists

Takaaki Horinouchi*

Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

*takaaki_horinouchi@riken.jp

Abstract

This symposium is organized with the aim of creating a new trend in yeast research led by young researchers by taking advantage of the annual conference, a place where all generations of researchers can come together. The recent epidemic of the COVID-19 has disrupted not only research activities but is also expected to significantly change the manner of future research activities. This web symposium, which is being held in response to the cancellation of annual conference, is considered a good opportunity to discuss from the perspective of young researchers who are thought to be greatly affected by the COVID-19 crisis. This presentation will provide an opportunity to discuss new research activities by describing the experiences of the speakers before, during and after the declaration of a state of emergency due to the COVID-19 pandemic. We hope to have a general discussion at the symposium and at a mixer for young researchers to be held after the session.

1. はじめに

本シンポジウムは、年次大会というあらゆる世代が一同に会する場を活用して、新たに若手研究者主導による酵母研究の潮流を生み出すことを目的とし、酵母の若手研究者を理学・工学の二つの視点に分けて、それぞれの分野における最新・最先端の成果を共有するとともに、聴衆参加型の議論を通じて各々の視点から多彩な酵母の魅力を伝えるとともに、分野を超えた新たな視点を参加者全体で見出すことを目指して企画された。

昨今の新型コロナウイルスの流行は、研究活動の中断や学術集会のオンライン化などの影響を与えるにとどまらず、今後の研究活動のあり方そのものを大きく変える可能性が高い。折しも今年度の大会の開催中止を受けて実施されるこのwebシンポジウムは、コロナ禍による影響が大きいと思われる若手研究者の観点から議論をする好機ととらえている。そこで本講演では、新型コロナウイルス流行による緊急事態宣言下およびそ

の前後における著者の体験を紹介することにより、新たな研究活動のあり方について議論するきっかけを提供する。本シンポジウムの総合討論、ならびに本セッションの後に開催される若手会ミキサーにて議論できれば幸いである。

2. コロナ禍が研究活動に与えた影響

2020年4月に発出された緊急事態宣言により、大学や研究機関への入構が制限され、多くの研究者の研究活動に多大な支障が生じた。著者の場合は共同研究先への出向が予定されていたが、緊急事態宣言に伴い出張の許可が下りなかったため、共同研究の開始に遅延が生じた。こうした研究活動の停止により学位取得を目前に控えた修士・博士課程の学生や任期付きポジションの若手研究者へのキャリアへの影響が懸念されている。著者が関与するプロジェクト研究ではステージゲート審査を秋に控えており、研究計画の見直しを余儀なくされた。こうした影響に対する支援事業も計画されているが[1]、研究者自身による自衛策も必要となろう。たとえば柔軟性の高い研究計画の立案や研究実施上のボトルネックの同定、各実験ステップに存在する属人性の有無の把握などが重要になると考えている。

また新型コロナウイルスの流行下では研究集会の開催が非常に困難となっている。本学会においても大会や若手夏のセミナーの開催が中止となり、研究発表の機会や他の研究者との交流の機会が大きく損なわれている。研究集会のオンライン化は全国で試みられており、著者らも模索している[2]ものの、実地での研究集会を完全に代替することは難しいことから、新たな研究成果公表や交流の在り方を模索する必要があると考えられる。

3. まとめ

2020年8月現在、新型コロナウイルスは再度感染拡大の兆しを見せており、収束の見通しが見えない状況である。コロナ禍という困難な状況は在宅勤務やWeb会議などの普及を強力に推し進める要因にもなった。同様に研究活動のあり方にもこれまで類を見ない変化が起こると考えられる。その端緒を開くには柔軟な思想とテクノロジーの活用が不可欠であり、多くの研究者の知恵を集結させる必要がある。本シンポジウムの総合討論、ならびに本セッションの後に開催される若手会ミキサーにて存分に議論できれば幸いである。

4. 文献

1. 令和2年度文部科学省補正予算（第2号） 大学や研究者への支援・研究基盤の強化 研究現場の環境整備を通じた研究活動の再開・継続への支援 https://www.mext.go.jp/content/20200527-mxt_kaikesou01-100014477-000-1.pdf (2020).
2. 生物工学若手研究者の集い第一回オンラインセミナー～WEBでの研究発表の重要性を考える～ https://www.sbj.or.jp/news/young_online_seminar_20200718_report.html (2020).

講演番号：WS11-A02

細胞間コミュニケーションを介した酵母の生存戦略

小田有沙^{1*}, 畠山哲央¹

¹東京大学 総合文化研究科

Adaptation at the communication level in yeast: voluntary triage

Arisa H. Oda^{1*}, Tetsuhiro S. Hatakemaya¹

¹the University of Tokyo

*odar@bio.c.u-tokyo.ac.jp

Abstract

In recent decades, chemical signaling networks for intercellular communication in microorganisms have been attracted attention from the perspective of microbial ecology. Although beneficial communications within the same species were well known, competitive communication within clonal cells is rare because it generally decreases the fitness. Here, we show that the fission yeast releases some toxins to kill even clonal cells and cause the delay in early growth phase during glucose starvation; it looks a suicide at first glance. However, cells growing in the starvation condition adapted to those toxins at the same time, and they continued to grow in the presence of toxins. Such a strategy with toxins and adaptation is beneficial to purify the cellular lineage selfishly in nutrient poor conditions. We named this phenomenon the voluntary triage. Besides, we identified the toxic compounds, and surprisingly we detected the same molecules from media conditioned by budding yeasts, phylogenetically distant species from the fission yeast. Such conditioned media also cause the delay phase in the growth of fission yeast, and vice versa. It suggests that the strategy we found is universally effective from close to distant species. We also discuss the importance of our finding to understand the major transition from unicellular to multicellular organisms.

1. はじめに

酵母は酒造や発酵食品、工業的な目的で人類に利用されてきた。一方で、分子生物学・細胞生物学の世界では、酵母は扱いやすい単細胞真核生物のモデル生物として、しばしば用いられている。単細胞モデルとしての従来の酵母の研究では、細胞内の応答が主な研究対象だったと言えよう。だが、自然環境下や、あるいは酵母が発酵に利用されている状況では、酵母の細胞は単一細胞として振舞っているわけではなく、細胞集団として振舞っているはずである。そこで、本シンポジウムでは、酵母の細胞集団としての環境

ストレスへの適応現象をご紹介します。

2. 酵母の飢餓ストレス適応と死

一般に、微生物が新しい環境に晒されると、その増殖は誘導期を経たのち、一定の世代時間で均等分裂を繰り返す対数期に入り、やがて静止期に至る。しかし、酵母の培地からグルコースを除き、代わりにグリセロールを与えると、適応し終えたはずの対数期に、増殖速度が減速する新規の現象が見られた。この増殖様式の変化が酵母の育つ環境変化によるのではないかと仮説を立て、培地の性質を調べた。すると、分裂酵母は、一定以上の密度条件下において、グルコースの飢餓のストレスに適応する際に、増殖阻害効果のある代謝産物を複数分泌していた。すなわち、高密度条件下での増殖停止の原因は、単に一部の栄養の枯渇にとどまらず、培地に分泌された代謝物との複合的なストレスによるものだと考えられる。一方で、増殖阻害物質を分泌した酵母は自身の分泌する増殖阻害物質にある程度耐性を獲得しうることがわかった。

3. まとめ

分裂酵母は、グルコース飢餓環境に適応する際、自身の増殖をも阻害する複数の代謝産物を環境中に分泌することを見出した。これは、酵母の環境適応を論じる上で、従来報告されてきた細胞内の応答と同時に、環境変化も取り扱う必要があることを示唆する。

自らの増殖をも抑制する物質の分泌は、生存には一見不利に思われる。だが、実際には飢餓環境へ適応した酵母は、増殖阻害物質への耐性も示した。さらに、グルコースと阻害物質の同時存在下で前培養した酵母は、より素早く飢餓に適応した。つまり、阻害物質は成長の阻害と同時に、飢餓への適応を促進することで、自らのリネージに有利な環境を作り出していると考えている。酵母の集団レベルでの適応を観察することで、細胞間相互作用を介した生存戦略を理解につながるだろう。

4. 謝辞

1. 大隅基礎科学創成財団 酵母コンソーシアム
2. 住友財団 基礎科学研究助成

講演番号：WS11-A03

野生の分裂酵母におけるフェロモン多様性と種分化

清家 泰介*

理化学研究所 生命機能科学研究センター

Pheromone diversification and speciation in wild fission yeast

Taisuke Seike*

Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN

*taisuke.seike@riken.jp

Abstract. Many species, from mammals to microorganisms, release sex pheromones to attract a potential partner of the opposite sex. The combination of a pheromone and its corresponding receptor determines the species-specific ability of males and females to recognize each other, and therefore causes reproductive isolation. This barrier might facilitate reproductive isolation leading to incipient speciation, but how do new combinations of pheromone and receptor evolve? We explored conservation of the mating pheromone communication system among 150 wild fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* strains of different geographical origins and the closely related species *S. octosporus*. Our recent study clearly showed an “asymmetric” pheromone recognition system in *S. pombe*: among the two pheromone/receptor pairs in this yeast, recognition between one pair is stringent, whereas that between the other pair is rather relaxed. We speculate that the “asymmetric” system in fission yeast might allow flexible adaptation to mutational changes of pheromones while maintaining stringent recognition of mating partners. Indeed, our previous study in *S. pombe* demonstrated experimentally that several mutations in a pheromone and its corresponding receptor can lead to reproductive isolation, which in turn may give rise to a new species. These findings contribute new insights into the evolutionary mechanisms underlying the diversification of pheromones.

1. はじめに

1つの種からどのようにして新しい2つの種が誕生するのかは、進化における最も注目すべき局面の一つである。新しい種の確立には、元々の種との交配を妨げる「生殖隔離」が重要であり、その原因の一つにフェロモンによる異性の識別機構の変化が挙げられる。フェロモンは昆虫・両生類のような動物から酵母のような微生物まで、異性を誘引するのに使われている。フェロモンとそれを受容する受容体間の結合は、種ごとに厳密に保たれているため、フェロモンの構造が変わると、受容体とはうまく結合できずに異性を引きつけることができなくなる。つまり、フェロモンが変化した集団は、生殖隔離にされ、新たな種として進化していく可能性がある。しかし、これまでフェロモンに多様性が生まれる仕組みについては、よく分かっていなかった。

2. 異性間で非対称なフェロモン認識機構の発見

私たちはまず、世界各地に棲息する野生の分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (150種) について、フェロモンとその受容体の遺伝子配列を解析した。*S. pombe* には、2つの性 (Plus型とMinus型)があり、これら異性間でフェロモンをやりとりして交配する。解析の結果、面白いことにM型細胞が分泌するM型フェロモンとその受容体の構造は全部の株で完全に同じであるのに対し、P型細胞が分泌するP型フェロモンとその受容体は、株間で極めて多様化していることが判った [1]。同じ種でありながら、自然界にはP型フェロモンは6種類、そしてその受容体は5種類もの多型が存在していた。この2つのフェロモンに見られる多様性の違いは、近縁種の *Schizosaccharomyces octosporus* においても見られる普遍的な現象であった。つまり、分裂酵母ではM型フェロモン/受容体のペアは厳密に保たれているが、P型フェロモン/受容体のペアは比較的柔軟性に富んでおり、その認識も曖昧になっているようである。

次に私たちは、分裂酵母 (*S. pombe*) と近縁種 (*S. octosporus*) の間でフェロモンと受容体遺伝子を入れ替えてみた。すると興味深いことに、P型フェロモンは他種のものとの交換しても機能することができたが、M型フェロモンは他種のものとの交換することはできなかつた [1]。受容体遺伝子も同様、P型受容体は入れ替えが可能だが、M型受容体は決して交換できなかつた [2]。これらはM型フェロモン/受容体は種特異的に作用し、一方P型フェロモン/受容体は種を超えて作用しうることを意味している。

3. まとめ

分裂酵母は異性間で非対称なフェロモン認識システムを持つことが判った。フェロモンの認識は「厳密である」と同時に「曖昧さ」も備わっており、これが生物の進化の原動力になっていると考えられる。実際、私たちは過去にM型フェロモンとその受容体遺伝子を協調的に変えることで、生殖隔離された人工的な酵母の作製にも成功している [3]。変異したフェロモンを特異的に感知できる変異した受容体が集団内に出現すると、それらの子孫は元々の集団から隔離され、新たな種として進化していくのかもしれない。こうした研究を通じて、自然界でのフェロモンの多様性と種分化について議論したい。

4. 文献

1. Seike, T., Shimoda, C., and Niki, H.: Asymmetric diversification of mating pheromones in fission yeast. *PLoS Biol.*, 17, e3000101 (2019).
2. Seike, T., Sakata, N., Shimoda, C., Niki, H., and Furusawa, C.: Distinct specificity of two pheromone G-protein coupled receptors, Map3 and Mam2, in fission yeast species. *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2020.07.22.215566 (2020).
3. Seike, T., Nakamura, T., and Shimoda, C.: Molecular coevolution of a sex pheromone and its receptor triggers reproductive isolation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 4405–4410 (2015).

講演番号：WS11-A04

脂質非対称性の感知機構から見えてきた細胞膜の新たな役割

小原 圭介*

名古屋大学大学院理学研究科

Sensing mechanism of lipid asymmetry highlights a novel role of the plasma membrane

Keisuke Obara

Graduate School of Science, Nagoya University

*obara.keisuke@g.mbox.nagoya-u.ac.jp

In the lipid bilayer of the plasma membrane, lipid molecules are distributed unevenly between the two leaflets, forming an asymmetric membrane. Maintenance and adequate regulation of this “lipid asymmetry” is essential for cell viability. We previously identified the sensor protein, Rim21, that senses alterations in lipid asymmetry in budding yeast. As to the sensing mechanism of lipid asymmetry by Rim21, we have proposed “antenna hypothesis” in which Rim21 utilizes its flexible cytosolic C-terminal tail (Rim21C) like an insect antenna to monitor the state of lipid asymmetry through interaction with the inner leaflet. We herein introduce recent advance in the sensing mechanism of lipid asymmetry based on this hypothesis.

Interestingly, Rim21 was originally reported as the sensor protein for extracellular alkalization. We have studied how Rim21 can sense distinct stresses, *i.e.* altered lipid asymmetry and external alkalization, and found that these stresses are both sensed by Rim21C moiety. Our following research suggested that external alkalization disturbs the state of lipid asymmetry, which in turn is sensed by Rim21C. Salt stress was also suggested to be sensed, at least partly, by Rim21 through alterations in lipid asymmetry. Together with other preliminary results, we propose that some of physicochemical stresses are at least partly sensed primarily by the plasma membrane and presented to plasma membrane proteins as alterations in physicochemical property of the membrane *e.g.* fluidity, lipid asymmetry, microdomain formation, and so on.

1. はじめに

細胞膜の脂質二重層では、内外層で脂質組成や役割が大きく異なる。その様な脂質非対称は多くの膜現象に密接に関わり、細胞の生存に必須である。私達は、その様な脂質非対称の状態変化を感知して適応反応を引き起こす脂質非対称センサータンパク質 Rim21 を同定した[1]。また、Rim21 が柔軟性の高いC末端細胞質領域 (Rim21C) を触角の様に用いて細胞膜内層との相互作用を繰り返しながら脂質非対称の状態を感知するという触角仮説を提唱した[2]。興味深いことに、Rim21 は外界のアルカリ化に応答

する Rim101 経路の最上流に位置している。単一の Rim21 が脂質非対称と外界のアルカリ化という異なる刺激をどの様にして感知できるのかは不明である。

2. Rim21 による脂質非対称感知機構～触角仮説の最新～

Rim21C 組換えタンパク質と各種脂質分子との結合を lipid overlay assay で調べたところ、Rim21C は負電荷を有する幾つかの脂質と結合した。結合した脂質は、*in vivo* ではほとんどが内層側に存在するため、Rim21C と相互作用可能な関係にある。また、負電荷は有していないが、ほとんどが内層側に存在するホスファチジルエターノールアミンを共存させると上記脂質との結合力が増強した。細胞膜脂質の組成や分布に関わる変異体を用いた *in vivo* 解析も併せて、脂質との相互作用の視点から触角仮説の最新を紹介する。

3. Rim21 が脂質非対称と外界のアルカリ化の両方を感知する仕組み

Rim21C 部分は、脂質非対称に乱れが生じると細胞膜内層から解離する。興味深いことに、外界のアルカリ化ストレスによっても Rim21C は細胞膜から解離した。細胞外の pH の情報が細胞膜を介して内層側に伝わったと考えられる。そこで、脂質非対称の形成・維持の原動力である脂質分子の二重層間反転移動を測定したところ、アルカリストレス下では大きく減少していた。脂質分子の二重層間反転移動は、細胞膜の分極に依存することが知られているため、細胞膜を脱分極させたところ、Rim21 依存的に Rim101 経路が活性化した。外界のアルカリ化は細胞膜の脱分極を引き起こすので、それを通して脂質非対称の乱れを誘発し、Rim21 によって感知される可能性が示された。この様に、細胞膜の状態変化を通じたアルカリストレスの受容に関する仮説を紹介する。

4. まとめ

Rim21 は柔軟性の高い C 末端細胞質領域を触角の様に用いて、細胞膜内層の酸性脂質との相互作用を通して脂質非対称の状態を感知すると考えられる。Rim21 はその能力を用いて、アルカリストレスを脂質非対称の変化という形を通して感知する可能性がある。また、アルカリストレスに限らず、外界の物理化学ストレスの幾つかは直接的には細胞膜そのものに受け取られ、その状態変化として細胞膜タンパク質に提示されること、すなわち細胞膜を巨大なマルチセンサーとして捉え直す考え方について議論したい。

5. 文献

1. Obara, K., Yamamoto, H., and Kihara, A.: Membrane protein Rim21 plays a central role in sensing ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **287**, 38473-38481 (2012).
2. Nishino, K., Obara, K., and Kihara, A.: The C-terminal cytosolic region of Rim21 senses alterations in plasma membrane lipid composition: Insights into sensing mechanisms for plasma membrane lipid asymmetry. *J. Biol. Chem.*, **290**, 30797-30805 (2015).

講演番号：WS11-A05

代謝酵素群の局在制御を介した代謝調節機構

三浦 夏子

大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科

Metabolic regulation through spatial reorganization of enzymes

Natsuko Miura*

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University

* miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp

Abstract

The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, has been used as a tool for investigating novel biological phenomena, as well as for screening relevant genes and useful chemicals. *S. cerevisiae* has also been used in the production of various chemicals. This species is thus useful for discovering, investigating, and utilizing novel phenomena. Here, we focus on a relatively new phenomenon, “liquid-liquid phase separation” by metabolic enzymes, and show how *S. cerevisiae* can be useful for elucidating and utilizing the phenomena for future bioproduction. While various metabolic enzymes have been known to coalesce within the cell, their spatial reorganization is triggered by different factors. We especially focus on the spatial reorganization of glycolytic enzymes to form a “Glycolytic body” or “G body” in response to hypoxia, which we previously saw in *S. cerevisiae* cells. It has been demonstrated that a G body formation possibly accelerates glucose metabolism within the cell. We discuss the possibility of using the mechanisms of G body formation for the bioproduction of chemicals in reference to examples utilizing phase-separating proteins and metabolic alteration, by forming an assembly of model metabolic enzymes in *S. cerevisiae* cells.

1. はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はスクリーニングのツールとして広く用いられてきたほか、新たな生命現象の探索と解明にも重要な役割を果たしてきた。近年見出されてきた代謝酵素の局在制御とそれに伴う代謝調節は、従来注目されてきた転写制御を介した代謝調節機構に並ぶ、細胞のもつ新たな仕組みとして物質生産や疾患等に関連する様々な領域で注目を集めつつある。本シンポジウムでは細胞内で集積するタンパク質の機構について概観するとともに、集合体の形成によって発揮される機能とその利用例をもとに、新たな生命現象をものづくりへ利用する際の障壁等についても議論したい。

2. 細胞内における代謝酵素の集積化

解糖系酵素をはじめとする代謝酵素はその多くが細胞質に散在すると考えられてきた。一方で近年、出芽酵母や一部のがん細胞では、解糖系酵素を中心とする 20 以上の代謝酵素が低酸素条件下で集合体を形成することが見出された[1,2]。この集合体は“Glycolytic Body”もしくは“G body”と名付けられ、低酸素条件下における細胞の代謝調節に貢献することが示唆されてきた[1,2]。G body の形成機構には不明な点が多いが、我々は以前に G body を形成するタンパク質には G body の形成に重要なアミノ酸配列が存在すること[1] などを見出してきた。

3. タンパク質の細胞内集積化機構を利用したものづくりへの展開

G body をはじめとした細胞内で液-液相分離により形成される酵素集合体は、代謝経路を担う複数の酵素群を細胞内空間の一箇所に集積させることができる。タンパク質の異種発現時等で問題となるタンパク質凝集とは異なり、集合した酵素群は一定の条件下ではその機能を保持するのみならず、各酵素間距離が短くなることで副産物の生成を抑え、効率的に基質から目的産物を生産することが可能である[3]。ここでは主要な液液相分離を起こすタンパク質を利用して行われた実証実験をとりあげ、G body 形成機構を将来的に物質生産に用いる可能性について議論したい。

4. 文献

1. Miura, N., Shinohara, M., Tatsukami, Y., Sato, Y., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M.: Spatial reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* enolase to alter carbon metabolism under hypoxia. *Eukaryot. Cell*, 12, 1106–1119 (2013).
2. Jin, M., Fuller, G.G., Han, T., Yao, Y., Alessi, A. F., et al.: Glycolytic Enzymes Coalesce in G bodies Under Hypoxic Stress. *Cell Rep.*, 20, 895–908 (2017).
3. Zhao, E. M., Suek, N., Wilson, M. Z., Dine, E., Pannuchi, N. L., et al.: Light-based control of metabolic flux through assembly of synthetic organelles. *Nat. Chem. Biol.*, 15, 589–597 (2019).

5. 謝辞

低酸素下における解糖系酵素の集合体形成は、京都大学 大学院農学研究科 植田充美教授の研究室で初めて見出しました。その後の研究展開についてご指導・ご助力賜りました、植田充美教授ならびに大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 片岡道彦教授と研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。本研究は以下の研究助成・事業による支援を部分的に受けて行いました。この場を借りて御礼申し上げます。

- ・内藤記念科学振興財団 2018 年度内藤記念科学奨励金・研究助成
- ・天野エンザイム科学技術振興財団
- ・2019 年大阪府立大学女性研究者支援事業

講演番号：WS11-A06

清酒醸造における酵母の共生

渡辺 大輔

京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻

Yeast symbiosis in sake making

Daisuke Watanabe*

Division of Food Science and Biotechnology,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University

*watanabe.daisuke.2w@kyoto-u.ac.jp

Abstract. Microbiology has developed on the basis of isolation and pure-culture techniques. Since the discovery of yeasts as microorganisms responsible for alcoholic fermentation, a variety of yeast species have been isolated away from their original habitats. Meanwhile, yeasts interact with other organisms in natural and artificial ecosystems. How yeasts cope with other organisms has not been fully elucidated at the molecular and genome levels. In this presentation, we introduce novel findings on yeast symbiotic relationship with human and lactic acid bacteria, especially in sake-making environments. Whole genome analysis revealed that sake yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* possess loss-of-function mutations in both negative and positive regulator genes for alcoholic fermentation. These mutations may be introduced through breeding by human for high fermentation performance and subsequent yeast stress adaptation. Lactic acid bacteria in kimoto-type sake making inhibited alcoholic fermentation through formation of a putative yeast prion. Such interaction may benefit both lactic acid bacteria and sake yeast by preventing rapid glucose consumption and ethanol accumulation in their habitats. These results will deepen our understanding of yeast ecological behaviors and contribute to new fermentation technology based on yeast symbiosis.

1. はじめに

アルコール発酵が酵母という微生物の働きによるものであることが発見されて以来、様々な環境から酵母が単離され、純粋培養を経て研究に用いられてきた。一方、生態系の中で酵母が他の生物とどのような共生関係を築いているのかについては未知な点も多く残されている。本発表では、清酒醸造環境における酵母と他の生物（人類、乳酸菌）との相互作用に関する最新の知見を紹介し、酵母研究の一つの方向性を提示したい。本研究の進展によって、酵母の生きざまがゲノムレベル・分子レベルでより深く理解され、酵母の共生に基づく新しい発酵技術の開発につながることを期待される。

2. 清酒酵母ゲノムに刻まれたアルコール発酵力向上のための育種の歴史

代表的な清酒酵母菌株群として知られるきょうかい酵母は、実験室酵母やパン酵母と同様に *Saccharomyces cerevisiae* に属するが、清酒もろみにおいて他の菌株にはない高いアルコール発酵力を示す。その原因として、二倍体のきょうかい酵母に共通したホモザイガス変異 (*rim15^{5055-5056insA}*) による PP2A^{B556} 複合体 (発酵を促進するエンジン役) の活性化を明らかにした。この変異は発酵力の上昇とストレス耐性の低下を同時に引き起こし、酵母にとっては本来望ましくない変化であると考えられる。そのため、きょうかい酵母が自然界で生き残ることはおそらく容易ではないが、高発酵力を望む人類によって維持されてきた。一方、PP2A^{B556} 複合体の構成因子をコードする *CDC55* 遺伝子の配列を解析した結果、異なるきょうかい酵母ごとに固有の機能欠失変異を有していた。これらはヘテロザイガス変異であり表現型には影響しないが、各株の適応過程において独立に PP2A^{B556} 複合体の不活性化が試みられた証拠であると推察される。以上のように、発酵力を高めたい人類とそれを防ぎたい酵母の間の攻防が、ゲノム配列から見出された。

3. 生酛造りにおける乳酸菌と酵母プリオン様因子の相互作用

伝統的清酒醸造法として知られる生酛造りでは、清酒酵母と生酛乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei* など) が共存する期間が存在する。実験室環境下で清酒酵母と生酛乳酸菌を共培養したところ、清酒酵母のグルコース抑制が解除される現象を見出した。これに伴い、清酒酵母のアルコール発酵力が低下することも明らかにした。清酒酵母の高発酵力は急激なグルコースの消費とエタノールの生成をもたらす。生酛乳酸菌は、清酒酵母に働きかけて発酵力を低下させることにより生育環境の悪化を防ぐと推察される。この現象に関与する因子として、*S. cerevisiae* における推定上のプリオン [*GAR⁺*] が挙げられる。[*GAR⁺*] は、細菌との共培養によって形成が誘導されグルコース抑制の解除を引き起こすことが報告されているが、その分子の実体は現在のところ未知である。[*GAR⁺*] の形成を誘導した酵母を用いた RNAseq 解析の結果、醸造環境において広く見られる乳酸菌-酵母間相互作用の鍵を握るシグナル伝達経路の候補が同定された。

4. 文献

1. Watanabe, D. and Takagi, H.: Yeast prion-based metabolic reprogramming induced by bacteria in fermented foods. *FEMS Yeast Res.*, **19**, foz061 (2019).
2. Watanabe, D., Kajihara, T., Sugimoto, Y., Takagi, K., Mizuno, M., Zhou, Y., Chen, J., Takeda, K., Tatebe, H., Shiozaki, K., Nakazawa, N., Izawa, S., Akao, T., Shimoi, H., Maeda, T. and Takagi, H.: Nutrient signaling via the TORC1-Greatwall-PP2A^{B556} pathway is responsible for the high initial rates of alcoholic fermentation in sake yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02083-18 (2019).
3. Watanabe, D., Kumano, M., Sugimoto, Y., Ito, M., Ohashi, M., Sunada, K., Takahashi, T., Yamada, T., and Takagi, H.: Metabolic switching of sake yeast by kimoto lactic acid bacteria through the [*GAR⁺*] non-genetic element. *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 624–629 (2018).

講演番号：WS11-A07

多様な酵母の個性を活かす日本酒醸造

(ゲノム・染色体から製品開発まで)

根来宏明*, 堀田夏紀, 小高敦史, 石田博樹

月桂冠株式会社 総合研究所

Applications of yeast genome analysis for sake brewing

Hiroaki Negoro*, Natsuki Hotta, Atsushi Kotaka, Hiroki Ishida

Gekkeikan Sake Co. Ltd., Research Institute

*negoro@gekkeikan.co.jp

Abstract. During sake fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* produces aroma and flavor compounds contributing to the pleasant taste for sake. To control the content of these compounds in sake, various methods for breeding yeast have been developed. For example, we previously isolated high ethyl caproate-producing strains using cerulenin resistance, or high malate-producing strains using dimethyl succinate sensitivity. Recently, novel breeding methods based on genome analysis were developed to further enhance their productivity without genetic modification. These strains were useful for improving the quality of sake.

1. はじめに

清酒醸造に用いられる酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) には多くの株が存在し、その種類によって醸される清酒の香味が大きく変化する。古くから、より品質が高い、あるいは香味に特徴のある清酒を目指して、育種法の開発が積極的に行われてきた。当社においても 1980 年代から現在に渡って、その時代の技術を適用させながら様々なタイプの酵母を産み出してきた。本発表では、そのいくつかをかい摘んでご紹介する。

2. カプロン酸エチル高生産と *FAS2* 変異の接合型

カプロン酸エチルは清酒の良い香り (吟醸香) の代表的な成分であり、「この成分が多い酒は鑑評会で高評価が得られる」という時代もあったほどである。酵母が発酵中にその前駆体として遊離脂肪酸を生成することに注目し、脂肪酸アナログであるセルレニンの耐性株を取得した結果、カプロン酸エチルを高生産する株が得られた[1]。現在、セルレニンを用いた育種法は吟醸造りの礎となって全国で利用されている。清酒酵母は通常 2 倍体であり、セルレニン耐性株の多くは *FAS2* 遺伝子にヘテロ接合型として変異を有する。我々は、セルレニン濃度を調整することで *FAS2* 変異をホモ接合型とし、カプロン酸エチルの生産性を更に上昇させる育種法を開発した[2]。得られた *FAS2* 変異ホモ接合型株は、これまで以上に吟醸香を生産する酵母として活躍している。

3. リンゴ酸高生産と糖新生酵素制御因子の変異

清酒には複数の有機酸が含まれ、そのうちリンゴ酸は爽やかな酸味を持つため、多くの高生産酵母が育種されてきた。これまでに我々はジメチルコハク酸感受性を指標としてリンゴ酸高生産株を得ている。本菌株についてゲノム比較解析およびプロテオーム解析を実施した結果、糖新生酵素の制御因子である *VID24* のヘテロ接合型変異により、細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼが蓄積してリンゴ酸生成を促進していることが明らかとなった[3]。また、*VID24* 変異は不完全優性であったため、非遺伝子組換えにより *VID24* 変異をホモ接合型とした株を取得すると、リンゴ酸生産性がさらに上昇していた[4]。以上より、ゲノム解析の知見を元に酵母を育種することで、清酒中のリンゴ酸を自在に上げられるようになった。

4. リンゴ酸低生産と染色体の異数性

先述とは逆に、酸味の少ない清酒を醸造するための手段としてリンゴ酸を低生産する酵母の取得を試みた。最近の報告から、16本の染色体のうち特定の領域を異数化させることで、ストレス応答や薬剤耐性などの表現型が変化することが知られている⁵⁾。これら異数体を用いて清酒醸造における表現型を調べると、2番染色体が重複した場合にリンゴ酸生産性が低下していた。これより、異数性を変化させる育種法を用いて、リンゴ酸生産性が低下した酵母を取得できる可能性が示された。

5. おわりに

微生物の解析技術の発展に伴い、育種酵母のゲノムレベルでの解析や、遺伝子をターゲットとした育種などが盛んに進められており、酵母の個性はますます多様化していくだろう。酵母を上手に育てあげ、それぞれの性格をうまくつかんだ酒造りを行うことで、消費者の皆様に美味しいお酒を届けられるように努めたい。

6. 文献

1. Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S.: Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2153-2154 (1991).
2. Kotaka, A., Sahara, H., and Hata, Y.: The construction and application of diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *FAS2* gene, *J. Biosci. Bioeng.*, 110 675-678 (2010)
3. Negoro, H., Matsumura, K., Matsuda, F., Shimizu, H., Hata, Y., and Ishida, H.: Effects of mutations of GID protein-coding genes on malate production and enzyme expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 4971-4983 (2020).
4. Negoro, H., Kotaka, A., Matsumura, K., Tsutsumi, H., Sahara, H., and Hata, Y.: Breeding of high malate-producing diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *VID24* gene, *J. Inst., Brew.*, 122, 605-611 (2016)
5. Natesuntorn, W., Iwami, K., Matsubara, Y., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: Genome-wide construction of a series of designed segmental aneuploids in *Saccharomyces cerevisiae*, *Sci. Rep.*, 30, 12510 (2015)

講演番号：WS12-B01

「腸内細菌の脂肪酸代謝とその産業利用」を学の視点から

岸野 重信

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

Industrial applications of Gut Microbial Fatty Acid Metabolite; from the viewpoint of academia

Kishino Shigenobu

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

E-mail: kishino.shigenobu.3e@kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

ヒトが摂取した食事成分は、宿主自身の持つ酵素（アミラーゼやプロテアーゼ、膵リパーゼなど）により低分子化され小腸で吸収される。宿主の酵素で消化されないものや、過剰摂取などにより吸収されなかった食事成分は大腸で水分除去されたのち、糞便として排出される。これが一般的な消化と吸収であるが、近年の研究で、腸管内に生息する腸内細菌が、宿主の代謝では代謝・吸収されない成分を利用し、その代謝物がヒトの健康に関わっていることがわかってきた。例えば、ビフィズス菌等による有機酸発酵産物である短鎖脂肪酸は、腸管バリア保護機能・脂質代謝改善機能・抑制性免疫細胞活性化機能などの生理機能を有することが報告されている。我々は、三大栄養素のうち脂質に着目し、腸内細菌がどのように代謝し、その代謝物がヒトに対してどのような生理機能を有するかを調べた。

2. 乳酸菌における不飽和脂肪酸代謝

2. 1 飽和化代謝

小腸に存在が確認されている乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* が、食事脂質の主な構成脂肪酸であるリノール酸の二重結合を複雑な経路で飽和化することを見出した¹⁾。本代謝には4つの不飽和脂肪酸変換酵素 [水和脱水酵素 (CLA-HY)、酸化還元酵素 (CLA-DH)、異性化酵素 (CLA-DC)、エノン還元酵素 (CLA-ER)] が関与し、水酸化脂肪酸やオキシソ脂肪酸、共役脂肪酸など多種多様な代謝中間体を生産する。さらに、本代謝は、リノール酸のみならず、亜麻仁油やエゴマ油に含まれる代表的なオメガ3脂肪酸である α -リノレン酸や、月見草油に含まれる γ -リノレン酸に対しても作用し、それぞれ対応した水酸化脂肪酸やオキシソ脂肪酸、共役脂肪酸、二重結合が一つ飽和化された部分飽和脂肪酸など、様々な修飾脂肪酸が生産される。

2. 2 水和化代謝

小腸に存在が確認されている乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* は、リノール酸を複数の水酸化脂肪酸へと代謝する²⁾。本代謝には、リノール酸の $\Delta 12$ 位の *cis*型二重結

合を認識して C13 位に水酸基を導入する水和酵素 FA-HY1 と、 $\Delta 9$ 位の *cis* 型二重結合を認識して C10 位に水酸基を導入する水和酵素 FA-HY2 が関与し、リノール酸は各水和酵素の作用により HYA(10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid)、13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid、10,13-dihydroxy-octadecanoic acid へと変換される。さらに水和酵素 FA-HY1 は、炭素数 18 の不飽和脂肪酸のみならず、炭素数 20 や 22 の不飽和脂肪酸にも作用し、アラキドン酸からは 15-hydroxy 脂肪酸を、DHA からは 14-hydroxy 脂肪酸をそれぞれ水和反応により生成することを見いだしている²⁾。

3. 乳酸菌由来不飽和脂肪酸代謝物の生理機能

乳酸菌における不飽和脂肪酸代謝から得られる様々な代謝物について、生産法および高純度化法を確立し、得られた代謝物を用いて腸管バリア機能制御、脂肪酸合成・脂質代謝制御、免疫制御、炎症抑制、抗酸化などの観点から生理機能評価を試みたところ、様々な興味深い機能を見いだした。例えば、リノール酸の代謝物である水酸化脂肪酸 HYA に腸管や口腔内における上皮組織のバリアの損傷機能^{3,4)}やメナキノン産生細菌（ヘリコバクターやカンピロバクターなど）に対する特異的な抗菌作用⁵⁾、また、HYA の代謝物であるオキソ脂肪酸 KetoA (10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid) に PPAR γ を介した脂質代謝制御の可能性⁶⁾を見いだしている。これらの結果は、乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝に依存して腸管内に生成される脂肪酸分子種が、宿主であるヒトの健康に何らかの影響を与えている可能性を示唆している。

4. おわりに

これまで食事由来の脂質は単なる貯蔵栄養源と思われてきた。本研究により、食事由来脂肪酸が乳酸菌に依存して様々な修飾脂肪酸(水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、エノン型オキソ脂肪酸、共役脂肪酸、部分飽和脂肪酸など)へと変換され、その代謝産物が宿主の健康に影響を与えることがわかってきた。これらの知見は、以前より抗炎症、抗肥満効果が報告されてきた乳酸菌に関して、その機能発現の実態を化合物レベルで説明しうるものであり、さらに、乳酸菌により生産される修飾脂肪酸が、宿主の健康維持において重要な意味を持つことを示唆するものである。今後、これらの機能性脂肪酸をポストバイオティクスとして実用化されることが期待される。

参考文献

- 1) I. Kimura et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108:8030–8035.
- 2) A. Hirata et al. (2015) J. Lipid Res., 56:1340-1350.
- 3) J. Miyamoto et al. (2015) J. Biol. Chem., 290:2902-2918.
- 4) M. Yamada et al. (2018) Sci. Rep., DOI:1038/s414598-018-27408-y.
- 5) H. Matsui et al. (2017) Helicobacter, 22:e12430.
- 6) T. Goto et al. (2015) Biochem Biophys Res Commun., 459:597-603.

講演番号：WS12-B02

「腸内細菌の脂肪酸代謝とその産業利用」を産の視点から

米島 靖記

Noster 株式会社 R&D 本部

Industrial applications of Gut Microbial Fatty Acid Metabolite; from the viewpoint of production

Yasunori Yonejima

R & D Division, Noster inc.

y.yonejima@noster.inc

It has been determined that gut microbes metabolically convert unsaturated fatty acids derived from dietary lipids to a variety of fatty acid derivatives. The physiological functions of these fatty acid metabolites have been gathering attentions along with an increasing interest in the relevance to the health of the host. Gut microbes catalyze the hydration, oxidation, reduction, and dehydration reactions targeting double bonds of polyunsaturated fatty acids; a broad range of fatty acids can serve as substrates, including linoleic acid, oleic acid, α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid. 10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) is a gut microbial metabolite derived from linoleic acid, which is the most abundant fatty acid of vegetable oils. It has been reported that long-term administration of HYA has an effect of improving glucose metabolism via the fatty acid receptors GPR40 and GPR120 in high-fat diet load obese model mice. We now advance application studies of HYA toward industrialization and have accomplished HYA production with 50 % purity at our pilot plant. We also conducted a clinical study regarding the effect on postprandial blood glucose after the ingestion of food with HYA and confirmed the suppressive effect on the postprandial elevation of blood glucose levels. It has also been reported that various fatty acids derived from HYA have physiological activity, and gut microbial fatty acid metabolites such as HYA are expected to have pharmaceutical and functional food applications. In this presentation, we would introduce our approach to industrial applications using gut microbial fatty acid metabolites.

1. はじめに

食事由来の脂質は腸内細菌の代謝を受け、様々な脂肪酸誘導体に代謝変換されることが判ってきており、腸内細菌脂質代謝物について、宿主の健康との関連性や、その生理機能への関心が高まっている。腸内細菌は多価不飽和脂肪酸の2重結合をターゲットに水和、酸化、還元、脱水反応を触媒することから¹、基質となる脂肪酸はリノール酸、オレイン酸、 α -リノレン酸、EPA、DHAなど多岐にわたる。

2. 腸内細菌脂肪酸代謝物 HYA の生理活性と実用化検討

我々が摂取する植物油に最も多く含まれる脂肪酸がリノール酸であり、リノール酸が腸内細菌の代謝によって産生される初期代謝物が HYA (10-hydroxy-*cis*-12-

octadecenoic acid)である。高脂肪食負荷肥満モデルマウスに HYA を投与すると、肥満の症状及びインスリン抵抗性が改善することが見いだされた²。我々は HYA を量産化する検討を実施し、リノール酸含量の高い植物油を基質に、HYA 変換活性の高い乳酸菌を加えて反応させることで、HYA が約 50%含有する植物油乳酸菌代謝物のパイロットスケールでの合成に成功した。更に、本品を用いて臨床試験を行い、食後の血糖値上昇を抑える効果を確認した³。

3. まとめ

HYA から変換される各種脂肪酸にも生理活性が報告されており、HYA を始めとする腸内細菌脂肪酸代謝物には、医薬品や機能性食品としての活用が期待される。本発表では、腸内細菌脂肪酸代謝物を活用した実用化への取り組みについて紹介する。

4. 文献

1. Kishino, S., Takeuchi, M., Park, SB., Hirata, A., Kitamura, N., Kunisawa, J., Kiyono, H., Iwamoto, R., Isobe, Y., Arita, M., Arai, H., Ueda, K., Shima, J., Takahashi, S., Yokozeki, K., Shimizu, S., and Ogawa, J.: Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, 17808-17813 (2013).
2. Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, K., Karaki, S., Mukoyama, H., Kishino, S., Li, X., Ichimura, A., Irie, J., Sugimoto, Y., Mizutani, T., Sugawara, T., Miki, T., Ogawa, J., Drucker, DJ., Arita, M., Itoh, H., and Kimura, I.: Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids, *Nat. Commun.*, 10, 1-15 (2019).
3. Yonejima, Y., Urushihara, M., Kitao, K., and Furihata, K.: Effects of HYA-containing food intake in those with high postprandial blood glucose level: a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover trial, *Progress in Medicine*, 39, 1147-1154 (2019).

講演番号：WS12-B03

皮膚細菌叢を制御する脂肪酸：公設試における基礎研究と企業支援

永尾寿浩*, 田中重光

大阪産業技術研究所森之宮センター 生物・生活材料研究部

Control of skin microbiota with fatty acid: basic research at public research and development institute, and technical support for the company.

Toshihiro Nagao*, Shigemitsu Tanaka

Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology, Morinomiya Center

*nagao@omtri.or.jp

Humans live with many microorganisms. As these include beneficial microorganisms that contribute to health as well as harmful microorganisms associated with diseases, the killing or suppression of all microorganisms with antibacterial agents is not ideal. We briefly review a new approach for the control of the skin microbiota while promoting human health using fatty acids with selective antibacterial activity against harmful microorganisms.

1. はじめに

ヒトの臓器（腸、皮膚、口腔など）の中または表層上には多数の微生物（細菌、糸状菌や酵母、ウイルス）が存在し、それらは健康に寄与する微生物（善玉菌）、疾病に関与する微生物（悪玉菌）、中間的な微生物などに分類できる。従って、全ての微生物の生育を抑制するのではなく、疾病に関与する微生物だけの生育を選択的に抑制すれば、ヒトと健康に寄与する微生物の良好な共生関係が成立する。本研究では、皮膚の微生物（皮膚細菌叢、skin microbiota または skin flora）に焦点を絞った。

2. 皮膚細菌叢を制御する脂肪酸

アトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis, AD）は、様々な要因が複合して発症・増悪化するが、それらのうちの1つが、炎症悪化と皮膚バリア破壊に関与する黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の増加である。一方、健常者では *S. aureus* の生育抑制作用等を保持する表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）が *S. aureus* より多い。ヒトの皮脂中に存在するサピエン酸（6-*cis*-C16:1, SA）は、弱酸性条件下において、*S. aureus* に対して強く、*S. epidermidis* に対して弱い選択的抗菌活性を示す。健常者の皮脂中の SA 含量は約 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であるが、この含量で *S. aureus* がほぼ抑制され、健全な皮膚細菌叢が維持されると推定される。しかし、AD 患者では、炎症部での SA 含量の減少によ

り *S. aureus* の抑制が効かなくなり、炎症が増悪化すると推定される。SA を皮膚に供給すれば良いが、この物質は天然油脂からの有効な供給源に乏しい。そこで我々は、限定的な植物油中に存在するパルミトレイン酸 (9-*cis*-C16:1, POA) が、SA と同じ選択的抗菌活性を示すことを見出した。

ニキビ (尋常性ざ瘡) は、顔面、胸背部の毛包・脂腺に見られる炎症性疾患であり、脂質代謝異常、角化異常、*Cutibacterium acnes* (アクネ菌、旧称: *Propionibacterium acnes*) などが複合的に関与して発症する。近年、アクネ菌の株レベルでの分類が行われ、ニキビ患者群に多いアクネ菌株、健常者群に多いアクネ菌株、および両群に均等に存在するアクネ菌株に分類された。また、ニキビ患者群に多い菌株は、ニキビの炎症の増悪化に関与することが示唆されている。そこで、桃谷順天館との共同研究により、ニキビ患者群に多い菌株だけの生育を選択的に抑制する脂肪酸を見出した。

3. 基礎研究から企業との共同研究、そして製品化へ

リパーゼを用いた機能性油脂の製造・精製に関する研究を行った後、新たな研究テーマを模索するため、脂質を用いた皮膚細菌叢の制御に関する研究に着手した。科研費研究や A-STEP 研究、発酵研助成金などを組合せ、研究結果が出るようになったが、「微生物は全て殺せ！」という世間の風潮があったため、共同研究企業がすぐに見つからなかった。しかし、自身の行ってきた研究は人の役に立つ筈である、という信念のもと、地道に研究を継続していると、世間における腸内細菌の認知度向上を契機として、皮膚細菌叢も認知されるようになり、桃谷順天館と共同研究することができた。商品化を検討する過程で、機能性油脂の製造・精製の研究を行った時代に築き上げてきた技術と人脈を活用することができ、POA を含む素材を配合した化粧品が 2019 年夏に販売された (販売会社: 明色化粧品)。この商品化をきっかけとして、今後、AD の炎症抑制などを目的とした研究に発展させていきたい。

4. まとめ

近年、抗菌や除菌グッズが多数出回り、微生物の存在しない環境で暮らすことが最善であるかのような風潮になっている。しかし、それは正しいだろうか。全ての微生物を抑制する必要がある場面もあるが、悪い微生物だけを選択的に抑制した方が良い場面もある。しかしながら、「ヒトは健康に寄与する微生物と共生すべき」という考えは、消費者には十分に受け入れられていない。この考えを普及することが、微生物の研究者の責務と考えている。

5. 文献

生物工学会和文誌 2020 年 10 月号に特集記事を投稿していますので、ここに記載する参考文献をご参照ください。

講演番号：WS12-B04

皮膚細菌叢を制御する脂肪酸：新しい化粧品の開発

杉野哲造*,宇山彩香

株式会社桃谷順天館 桃谷総合文化研究所

Control of Skin Microbiota with Fatty Acid: Development of Innovative Cosmetics

Teizo Sugino*, Ayaka Uyama

Momotani Juntankan LTD. Next Research & Innovation Labo

*t-sugino@e-cosmetics.co.jp

We are the first company in Japan to create a lotion in 1885. The lotion was developed at the time when there was no lotion, and it is still supported by many customers who suffer from acne. In this lecture, I am going to talk about the challenges of new things for our company that have continued for over 130 years. We are also going to talk about new projects we are currently working on.

1. はじめに

今から 130 年以上前の明治の時代、一人の男性がニキビに悩む妻のために 1 本の化粧水(ニキビ取り美顔水)を創りました。まだ、化粧水、と呼ばれるものが存在しない時代に、様々な苦難の上に開発され、今日でもニキビに悩む多くのお客様に愛される化粧水となっております。

以降、隣人の悩みを解決してあげたいと言う創業の精神を受け継いで、「こころ彩る美肌創りを通じて人々の幸せに貢献します」を企業理念に、多くの女性に健やかな美しさと笑顔をお届けしております。

2. 桃谷総合文化研究所

創業から 100 年以上続く、超ロングセラー化粧水である“ニキビ取り美顔水”。しかし、今日では多くの化粧水が市場にあふれ、コモディティ化がすすんでおります。桃谷総合文化研究所は、化粧品の常識に捕らわれない柔軟な発想や技術革新でイノベーションを生み出すためのプロジェクトを進めております。

プロジェクトを進める中、様々な課題にぶつかり、試行錯誤を繰り返しながら、2019 年夏に“モイストラボフローラ”という新しいブランドの立ち上げにいたしました。

3. おわりに

本講演では、“130年を超える老舗企業における新しいことへの挑戦”、をテーマに新規事業開発に関する様々なエッセンスをお話しさせていただきます。また、ここから私たちが進めている新しいプロジェクトについても可能な限りお話させていただきます。

企業において同様の仕事をされている方や経営に関わる方、企業との共同PJを進めるアカデミアの皆様方のご参加をお待ちしております。

講演番号：WS12-B05

サントリーにおける オープンイノベーションの変革と活用

福山 勝実

サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社

研究推進部 創発グループ

企業研究におけるオープンイノベーションは自前主義やコミュニケーションの課題からうまくいかないケースがある。

本講演ではサントリーにおけるオープンイノベーションの仕組みの変革とその活用について述べる。

講演番号：WS12-B06

バイオ分野におけるオープンイノベーションの動向と パートナーリングの機会

緒方 清仁

ナインシグマ・アジアパシフィック株式会社

ogata@ninesigma.com

これまで10年以上、オープンイノベーション支援を技術マッチングという側面から支援してきた立場として、バイオ産業におけるオープンイノベーションの現状と今後の展望について、具体的な事例を交えて紹介する。

医薬品業界をはじめとして、社外シーズ活用によるイノベーション創出は広く行われてきたが、従来は自社のニーズにそのまま当てはまるシーズの獲得、言わば狩猟型の取り組みがメインであった。一方、現在は、より早期のシーズを共にカタチにしていくという農耕型の取り組みへと移行していると考えている。

そういった移り変わりの中で、パートナーリングの機会を活かすために必要な心構えについてもお伝えする。

講演番号：WS13-C01

ゲノム編集技術の海水魚養殖への応用と産業化への展開

家戸敬太郎^{1*}, 鷲尾洋平¹, 岸本謙太², 梅川忠典², 木下政人^{2,3}

¹近畿大学水産研究所, ²リージョナルフィッシュ株式会社, ³京都大学 農学研究科
応用生物科学専攻

Application and industrialization of genome editing technology to marine fish aquaculture

Keitaro Kato^{1*}, Youhei Washio¹, Kenta Kishimoto², Tadanori Umekawa²,
Masato Kinoshita^{2,3}

¹Aquaculture Research Institute, Kindai University, ²Regional Fish Institute, Ltd.,

³Graduate School of Agriculture, Kyoto University

*kei-kato@kindai.ac.jp

We are working on the breeding of red sea bream by genome editing technology to shorten the breeding period. In order to increase the edible part, which is less than 40% of the body weight, we attempted the functional loss of the myostatin gene by the CRISPR/Cas 9 system. We successfully produced the homozygous mutant in the second generation of genome editing, and the muscle mass increased 1.2 times in the mutant. As a result of the feeding trial, the mutant grew larger even when fed at the same rate as the wild type. Therefore, it was suggested that the mutant is excellent as an aquaculture strain. Currently, genome-edited fish need to be cultivated on land. In order to carry out aquaculture production using genome-edited fish, it is necessary to develop aquaculture technology that is profitable even in high-cost land aquaculture, and we are currently conducting the research.

1. はじめに

マダイは海水養殖魚の中で生産量がブリに次いで2番目に多い重要な養殖魚種である。近畿大学では1960年代前半から成長の早い養殖用マダイの選抜育種による品種改良に着手し、養殖期間が約半分に短縮されたが、長い時間を要した。そこで我々は、より短時間で育種効果が得られることを期待してマダイのゲノム編集に2013年より取り組んでいる。ここではマダイを材料にしてゲノム編集によって可食部の割合を増加させた「肉厚マダイ」の作出とその特徴、さらに養殖産業への応用の展望について述べる。

2. マダイのゲノム編集

マダイは魚体重に占める可食部割合が4割以下と少なく、6割以上が廃棄されるという欠点がある。そこで、筋肉の過形成を抑える働きをもつミオスタチン (*mstn*) 遺伝子に着目した。この遺伝子を機能欠損させることができれば、可食部割合の増加が期待できる。マダイ *mstn* 遺伝子の配列を調べ、CRISPR/Cas9システムで使用するsgRNAを設計し合成した。別に合成したCas9 RNAとsgRNAを混合してマダイ人工授精卵にマイクロインジェクションし、500個体以上の稚魚を得た。

3. ゲノム編集マダイの継代飼育とその特徴

第一世代では、野生型と変異型のターゲット遺伝子を体内でモザイク状にもった魚と野生型のみをもつ魚が混在する。そこで DNA を抽出して調べたところ 42% の個体で高頻度に変異が導入されており、それらを次世代の作出に用いた。

第一世代が成熟して作られる配偶子は、それぞれ一つの生殖細胞からなるため、第二世代の中には全身の全ての細胞で変異型遺伝子をもつ魚が現れる。第一世代が産卵して得た第二世代の DNA を調べた結果、野生型、ヘテロ変異型およびホモ変異型が現れた。ホモ型は、孵化後数ヶ月で明らかに筋肉量の増大が肉眼でも容易に分かるようになり (Fig. 1)、筋肉量は約 1.2 倍に増加していた [1]。

マダイは 1 日に 1 個体の雌が数万粒以上の卵を産むため第三世代から目的の系統の量産化が可能となる。第二世代から得た卵と精子を人工授精して第三世代を作出した。上述

の通りホモ型では筋肉量が約 1.2 倍に増加したが、筋肉量が増加しても摂餌量が増加するようだと養殖コストは変わらない。そこで野生型とホモ型とを比較する飼育試験を実施した。その結果、ホモ型は、野生型と比べて同じように摂餌するが、摂餌した飼料を効率よく利用して野生型よりも大きく成長することから、生産性の高い養殖魚であると考えられた (Table 1) [2]。

4. まとめ

以上のように、ゲノム編集技術を利用することで、わずか三代でターゲットとした可食部が増大したマダイの量産に成功した。この技術を養殖産業に効果的に活用するために、陸上養殖の効率化と、安全安心な養殖魚の提供に向けて様々な取り組みを進めているところである。

5. 文献

1. Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T., Fukuyama, H., Kato, K., Kinoshita, M.: Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture* 495, 415–427 (2018).
2. Ohama, M., Washio, Y., Kishimoto, K., Kinoshita, M., Kato, K.: Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture* (in press).



Fig. 1. Myostatin homozygous mutant (top) and wild type (bottom).

Table 1. Growth performance of the wild-type (WT) and the homozygotes *mstn* mutants (HM) in the 8-weeks feeding trial

		Genotype	
		WT	HM
Initial body weight	(g)	WT	41.1 ± 0.2
		HM	42.7 ± 0.3*
Final body weight	(g)	WT	85.7 ± 1.9
		HM	94.7 ± 1.0*
Daily feed intake (DFI)	(%)	WT	1.48 ± 0.04
		HM	1.49 ± 0.04
Weight gain (WG)	(%)	WT	108.4 ± 4.8
		HM	122.3 ± 4.3*
Feed efficiency (FE)	(%)	WT	84.4 ± 0.4
		HM	89.9 ± 2.2*

Meas ± SD, n=3.

* Statistical significance between WT and Mutant (Mann-Whitney's U-test, $P < 0.05$).

DFI (%) = $100 \times \text{total feed intake} / \{(\text{Initial total weight} + \text{final total weight}) / 2\} / \text{rearing period (days)}$. WG (%) = $100 \times (\text{average weight gain} / \text{average initial body weight})$. FE (%) = $100 \times [\text{wet weight gain (g)} / \text{dry feed intake (g)}]$.

講演番号：WS13-C02

シングルセルゲノム解析が変革する海洋微生物研究

細川正人^{1, 2}

¹bitBiome 株式会社, ²早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構

Single-cell genomics accelerates marine microbiology research

Masahito Hosokawa^{1,2*}

¹bitBiome, Inc., ²Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University

*masahito.hosokawa@bitbiome.co.jp

Abstract

A wide variety of microorganisms exist in various natural environments, including the oceans. However, most of them are uncultured microorganisms that have not been isolated and cultured, and there are many challenges to understanding their characteristics. We have developed a single-cell genome sequencing technology as a powerful tool to study these uncultured microorganisms. Single-cell genome analysis enables us to obtain genomic information from diverse microbial populations individually, which is difficult to conduct with conventional metagenome analysis. It can be used for various studies, such as metabolic analysis, screening for functional genes, and identification of useful chemical synthesis pathways. In addition, by comparing the acquired genomes within the same species, it is possible to perform detailed comparative analysis at the strain level and even functional gene pathways. By taking advantage of these features, it is possible to describe the functions of microorganisms one by one. We are now attempting to create a genomic catalog of each microorganism using this technology in the study of the intestinal and environmental microbiome.

1. はじめに

海洋を含む様々な自然環境には多様な微生物が存在しているが、そのほとんどがこれまで単離培養されていない未培養微生物であり、存在が示唆されていながらも、その特性を理解するには多くの課題がある。養殖においては、種苗生産時などの病原菌を原因とした感染症発生などを適切に制御する必要があり、飼料や抗生物質投与を適正に扱うには、飼料・養殖池・対象生物の腸管などに存在する微生物の関係性を正しく理解する事が重要である。

我々は、これらの未培養微生物を研究するための有力なツールとして、「大規模1細胞ゲノムシーケンス技術」を開発している¹⁻⁴。シングルセルゲノム解析では、現在広く用いられているメタゲノム解析では困難である「多様な微生物群からゲノム情報を個別取得すること」が可能であり、代謝解析や機能遺伝子探索をベースとした難培養微生物の性状解析や有用化合物合成経路の探索など様々な高次解析への発展が可能である。また、取得した

ゲノムを同一種内で比較することで、株レベルでの比較解析や機能遺伝子パスウェイまで、詳細な理解が可能となる。これらの特徴を活かすことで、これまでその存在すら曖昧であった微生物の機能を1つずつ記述していくことが可能となる。現在、腸内・環境マイクロバイーム研究に本技術を活用し、微生物1つ1つの機能を記したゲノムカタログを作ろうとしている。本要旨では、大規模1細胞ゲノムシーケンス技術の一端を紹介し、発表では技術詳細と海洋微生物を中心とした応用例について紹介する。

2. 大規模1細胞ゲノムシーケンス技術の開発へ

我々が開発したシングルセルゲノム解析技術「SAG-gel」では、マイクロ流路内で細菌が1細胞ずつ小さなゲル状のカプセルに高速に封入され、細胞一つ一つが小さな反応環境に分離される。秒間数百個もの速度でカプセルが生成され、総計で数万～数十万個ものシングルセル封入カプセルが作られる。この無数のゲルカプセルは、1つの試験管にまとめて回収され、各種溶剤に順次浸漬されることで、カプセル内の細菌の溶解、DNAの精製・増幅が連続的に行われる。この増幅ゲノムを並列的に読み取り、配列を解析することで、各細菌のゲノム情報が一挙に獲得される。本法のポイントはゲルカプセルを反応環境として利用したことで、カプセルは外部からの反応環境汚染を抑制するほか、強力な溶剤を用いた細菌溶解と夾雑物洗浄除去操作の支持体として役立ち、これまで不可能であった1細胞由来ゲノムDNAの精製・反応などの連続多段階の処理を実現した。SAG-gelは、幅広い微生物種に適応可能で、一般実験室でも実行できるだけでなく、数百を超える高精度な細菌ゲノム情報を一度に得ることができる。

3. まとめ

本法を活用すれば、海洋や土壌などに生息する環境細菌や多様な生物の腸内細菌などの微生物ゲノム情報を圧倒的な速度で収集できる。この情報は、リファレンスゲノムとして、さまざまな微生物研究でのデータベースとして活用でき、ヒトや魚類等の健康と関わる細菌叢の機能理解のための基礎情報として、産業応用可能である。また、演者は、本法を社会実装するために、「bitBiome株式会社」を2018年に創業し、SAG-gelを活用したシングルセルゲノム解析サービス「bit-MAP®」を展開している。

4. 文献

1. Nishikawa Y, et al. Massively parallel single-cell genome sequencing enables high-resolution analysis of soil and marine microbiome. bioRxiv. 2020
2. Chijiwa R, et al. Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota. Microbiome. 2020 Jan 23;8(1):5.
3. Kogawa M, et al. Sci Rep. 2018 Feb 1;8(1):2059.
4. Hosokawa M, et al. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. Sci Rep. 2017 Jul 12;7(1):5199.

講演番号：WS13-C03

魚類表皮プロバイオティクス技術の創生

堀 克敏

名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻

Establishment of skin probiotics of fish

Katsutoshi Hori

Department of Biomolecular Engineering, Nagoya University

khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

Application of probiotics to fish is attracting our attention in aquaculture as an alternative strategy to antibiotic administration. In this study, we focus on skin probiotics of fish because fish is exposed to many active microorganisms in the aquatic environment. First, we have established a percutaneous infection model using zebrafish and *Yersinia ruckeri*, which causes Red-mouth disease mainly in salmon and trout. The NGS-analysis revealed that the epidermal microflora of dead fish was occupied by the pathogen. The disruption of the epidermal microflora also resulted in the occupation of the fish skin by the pathogen although fish did not die without a wound, suggesting that the epidermal microflora on the fish skin usually prevents pathogens from attaching to the epidermis, but stress-induced changes in the epidermal flora lead to pathogen dominance. We successfully isolated a new bacterial strain that inhibits the growth of several fish pathogens and demonstrated its effectiveness as skin probiotics of fish.

1. はじめに

抗生物質の使い過ぎによる耐性菌の拡がり世界的に問題となっている。抗生物質は、畜産や水産養殖現場においても大量に使用されてきた。一方で、安定的な食料生産のため、家畜や魚介類の病気対策は重要である。代表的な抗生物質代替技術としてワクチンがあるが、その開発は容易ではなく、現在認可されているワクチンの種類は限られている。最近、ヒトについてはプロバイオティクスが注目されており、動物に対する検討も始まっている。一般には腸内細菌が注目されているが、水中に生息する魚類は、陸上生物よりはるかに多くの微生物に曝されているため、皮膚が病原菌に接する機会是非常に高い。さらに、養殖現場では、高密度飼育による魚同士の接触や喧嘩、飼育槽壁面への接触により、表皮は傷つきやすい。つまり、養殖魚類は経皮感染のリスクが高い環境下に存在していると考えられる。そこで、演者らは、新しい魚病対策として、「魚類表皮版プロバイオティクス」を掲げ、研究を開始した。

2. 魚類表皮感染モデルの構築

社会実装の対象魚は養殖魚類であるが、養殖魚類への病原菌感染実験には慎重にならざるを得ない。遺伝子組換え生物を使わなくても、厳重な隔離状態のもと、病原菌と病気に感染した魚類を、厳重に封じ込めねばならない。また、成長の遅いあるいは季節性がある養殖魚の場合、条件を揃えて統計処理が可能な個体数を実験に供することは、大

変困難である。そこで、感染モデル系の構築から研究を始めた。生物学のモデル魚類であるゼブラフィッシュと、サケ・マス科魚類にアウトブレイクをもたらすレッドマウス病の病原菌 *Yersinia ruckeri* を用いることとした。経皮感染を成立させるため、魚に小さな刺し傷を与えた。試行錯誤の結果、低温ストレスを与えることにより、コイ科のゼブラフィッシュに、再現よく *Y. ruckeri* を感染させる系を確立することに成功した(図1)。

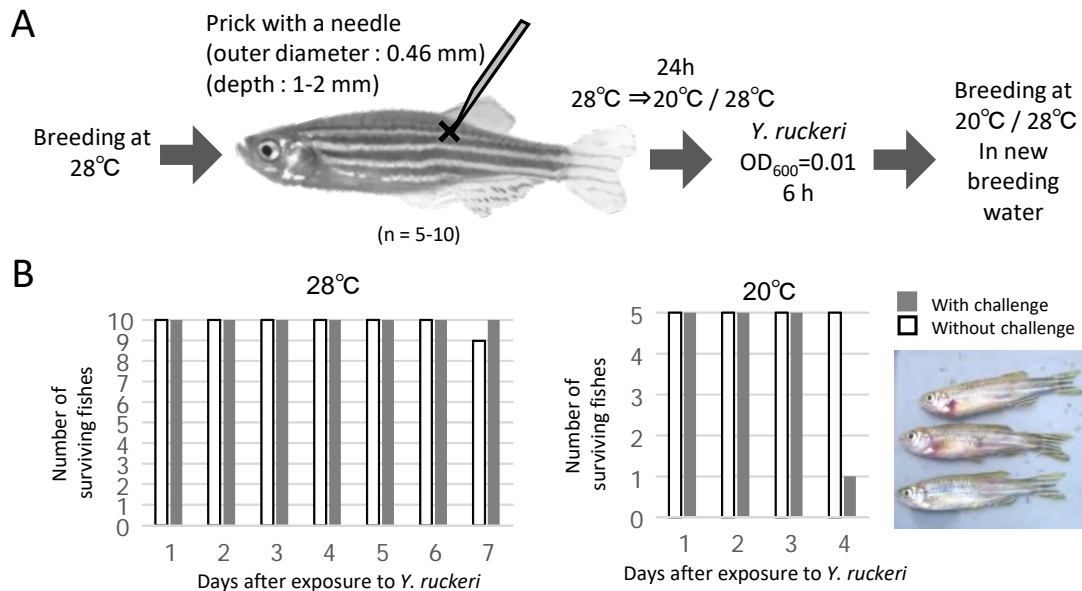


Fig. 1. The percutaneous infection model using zebrafish and *Yersinia ruckeri*.

A. Infection scheme. B. The results of infection experiments shown by the number of survival of the individual fish after pathogen challenge.

3. 経皮感染と魚類表皮マイクロフローラとの関係

次世代シーケンサーによる魚類表皮マイクロフローラの解析により、へい死個体の表皮細菌叢は *Y. ruckeri* に占有されていたことが明らかとなった。病原菌の表皮占有と表皮細菌叢の関係を調べるため、低温下で抗生物質処理をして表皮細菌叢を破壊した個体に、*Y. ruckeri* を暴露した。この処理による魚のへい死は観察されなかったが、表皮細菌叢は病原菌に占有されていた。普段は、魚類の表皮細菌叢が病原菌の表皮への付着を防いでいるが、ストレスにより表皮細菌叢が変化すると病原菌の優占化を招くおそれがあることが示されたと言える。

4. 表皮プロバイオティクス用微生物の探索

演者らは、複数の魚類病原菌の増殖を抑制する機能を示す新しい細菌株を単離した。この微生物株を投与したところ、ゼブラフィッシュの *Y. ruckeri* への経皮感染が有意に抑えられた(特許出願済み)。こうして、魚類における表皮プロバイオティクスの有用性が示唆された。

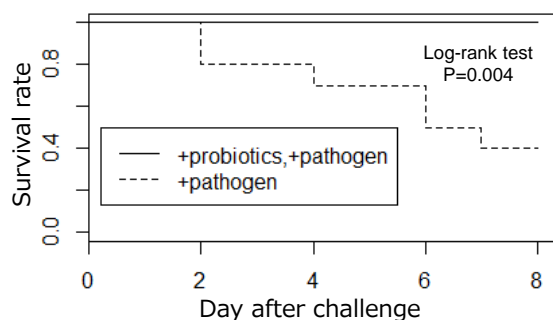


Fig. 2. Effect of skin probiotics.

講演番号：WS13-C04

国内サケマス養殖の現状と展望

¹*, 小堀 彰彦

¹ 全国養鱒振興協会

Present state and prospects of the salmon and trout farming in Japan

¹*Akihiko Kohori

¹Japan trout farmers association

* kobori@tansui.net

In recent years, the efforts for the salmon trout sea culture in western Japan and the Sea of Japan have been reported, and the land-based closed recirculating aquaculture of salmon is also drawing attention. In addition, with the aim of upgrading the status and differentiation of domestic rainbow trout, the 'special trout' that the inland-trout farming trade has been promoting since the end of the Showa period gained an appreciation and established a certain position, and many "local Salmon " brands are born. The background of these trends is considered to be the limit of domestic demand for yellowtail and red sea bream, which are the main fish species for offshore fish farming, the increase in domestic demand for salmon and trout, and the soaring prices of imported salmon and trout. At present, domestic trout fish that are cultivated in seawater are diversifying; in addition to the industrialized sea culture of silver salmon, the sea culture of rainbow trout, cherry salmon, and Satsukimasu are increasing. In order to establish the merchantability of these domestic large-size salmon trout, it is necessary to increase the production in the sea culture, but various problems should be considered for that purpose.

1. はじめに

近年、西日本や日本海側での海面サーモン養殖の取り組みが報告されるようになり、同時にサーモンの鎖循環式陸上養殖も注目を集めている。また、国産ニジマスの地位向上と差別化を目指して、昭和の終わりから内水面養鱒業界が開発を進めてきたスペシャル・トラウトが評価を得て一定の地位を確立し、各地で特色のある「ご当地サーモン」が誕生している。背景には、海面養殖の主要魚種であるブリやマダイの国内需要の限界、鮭鱒類の国内需要の増大と輸入鮭鱒類の価格高騰が考えられる。現在、海水養殖する国産サケ科魚類は多様化しており、産業化したギンザケの他に、ニジマスやサクラマス、サツキマスもある。これら国産大型養殖鮭鱒の商品性を確立するためには海面養殖での増産が必要であるが、そのための課題は多岐にわたる。

2. 海面養殖サーモン(トラウト)増産のカギを握る種苗供給の課題 ¹

トラウトの種苗は成熟前の中間サイズであり、このサイズの生産は最も効率が良い。

しかし、11-12月の短期間に集中出荷することになると、従来のニジマス生産サイクルに加え、これを組み込むには全体の生産サイクルを見直す必要があり、必ずしも増産には繋がらない。また、春夏の既存需要を満たせなくなることも考えられる。そのほかにも種苗の大型化や海への輸送手段の問題もある。

3. 海面養殖との連携の問題点・・・新たな疾病原因の侵入リスクにどう対応するか²

国産大型養殖鮭鱒の商品性を確立するためには海面養殖での増産が必要であるが、淡水から海水、またはその逆の活魚での移動に伴う、双方への新たな疾病原因侵入のリスクは対処すべき重要な問題点である。特にウイルスは変異が大きく、宿主も大きくジャンプすることもあり、十分に理解し、注意する必要がある。持続的養殖生産確保法ではサケ科魚類には宿主範囲の広いレッドマウス病（ERM）など6種の特定疾病が指定されており、海面・内水面のどちらで発生しても事業継続は困難になる。

3. 「ご当地サーモン」の開発とそれらの位置づけ³

昭和の終わり頃から養鱒業界が販売対策に苦慮する中で、研究側はバイオテクを利用した次世紀の新たな魚種の開発に向かっていた。こうした流れから1992年に登場したのが全雌異質三倍体である絹姫サーモンだった。こうしたスペシャル・トラウトが話題になりだすと、近年では生産者単位で、その地域を表す呼称を冠した「〇〇サーモン」が続々と登場してきた。このようないわゆる「ご当地サーモン」は、圧倒的に流通量の多い輸入鮭鱒とはひと味違う魚として、価値のある貴重性を重要視するものであり、大量生産・大量販売すべきものではない。したがって、従来からの多様な需要に向けたニジマス生産は維持しつつ、スペシャル・トラウトは区別して生産されなくてはならない。

4. まとめ 国産大型マス類の今後の方向

絹姫サーモンも当方の供給能力から地域限定、期間限定ではあるが使われて好評を得ている。輸入鮭鱒とはひと味違う魚を、各地域で安定的に供給できれば、販路の拡大も望める。また近年、国内各地でマス類の海面養殖を行なう事例が増えており、これらも「ご当地サーモン」として続々と登場している。海面利用で生産量が增大するであろうが、それらが輸入トラウトに取って代るのでは意味がない。スペシャル・トラウトは価値のある貴重性が売り物なのである。したがって、それらの種苗生産と区別して、海面養殖サーモンの種苗生産、従来のニジマスの生産を維持拡大していく必要がある。そのためには、もう一度生産基盤を整備する必要性を強く感じている。

5. 文献

1. 国内の種苗生産規模と海面サーモン用種苗の供給課題 養殖ビジネス 臨時増刊号 2019年 56巻第4号 p48-53
2. 内水面養鱒業と海面サーモン養殖業の役割分担とビジネスチャンス 月刊 養殖ビジネス 2017年4月号 p6
3. 内水面におけるスペシャルトラウト開発史と発展 養殖ビジネス 臨時増刊号 2019年 56巻第4号 p24-28

講演番号：WS13-C05

未来社会の食料増産を目指したナマズ養殖の取組み

田丸 浩^{1,2,3*}, 岡崎文美^{1,2,3}

¹三重大学大学院生物資源学研究科, ²三重大学先端科学支援機構バイオインフォマティクス部門, ³三重大学スマートセルイノベーション研究センター

Catfish farming efforts towards increasing food production in future society

Yutaka Tamaru^{1*}, Fumiyoshi Okazaki²

¹Graduate School of Bioresources, ²Section of Bioinformatics, Advanced Research Science Center, and ³Research Center for Cell Innovation, Mie University

*E-mail: ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

Global food demand is expected to increase significantly due to the explosive increase in the global population and the increase in living standards in developing countries, and there are concerns about tight supply and demand, coupled with the increase in use of biofuels and other food. In particular, since fish and meat, which are the main source of animal proteins, are consumed more economically, the increase in demand for meat is expected to increase by about 1.8 times, surpassing the overall global agricultural products by 2050. Catfishes have a long history of being used as edible fish in various parts of the world and more than 2,800 species were described in the catfish, making it the third largest group in the order of the fishes, after the Perciformes (about 10,000 species) and Carp (about 3,200 species). In this symposium, I would like to talk about the potential of catfish on the onshore farming in Japan and the world and to discuss with the biotechnologies of fish farming and effective use of waste heat from biomass plant power.

1. はじめに

地球の人口の爆発的増加と発展途上国の生活水準向上などにより、世界の食料需要は大幅な増加が見込まれるとともに、バイオ燃料などの食料以外への利用増大も相まって需給の逼迫が懸念されている。なかでも動物性タンパク質の主な供給源である魚肉や畜肉は経済的に豊かになると消費量が大きくなることから、肉類の需要増加は 2050 年までに世界の農産物全体を上回る約 1.8 倍になるとも予測されている。そこで動物性タンパク質の供給源となる食料を対象に、これまでになかった新しい方法による食料生産技術や持続可能性を飛躍的に向上させる水産システムに必要な技術の研究開発を通して、環境変化に影響されない、持続可能性の飛躍的な向上により、食を通じた豊かな暮らしの実現、新しい食品産業の創出、ひいては世界からの飢餓撲滅への貢献が求められている。

2. 魚類養殖の現状

天然漁獲の頭打ちによる魚類の供給不足を補っているのが養殖で、1990 年から急増している (Fig. 1)。しかし、魚類の需要が現在のペースで増えていくと、近いうちに養

殖による魚類の供給も需要に追いつかなくことがはっきりしている。その理由は、現在主流となっている海の一部を囲って行う海面養殖では、養殖に適している場所が限られている。魚は魚種によって生存できる水温が決まっているため、1年中その魚に適した水温を保てる場所が必要になる。さらに、近年の気候変動による自然災害等の影響を極力さけるためには、入り江のような内湾などの地形が求められる。こういった条件が満たせる土地は限られており、また漁業権も発生する。一方、すべて埋め尽くされてしまえば、それ以上海面養殖を増やすことはできない。

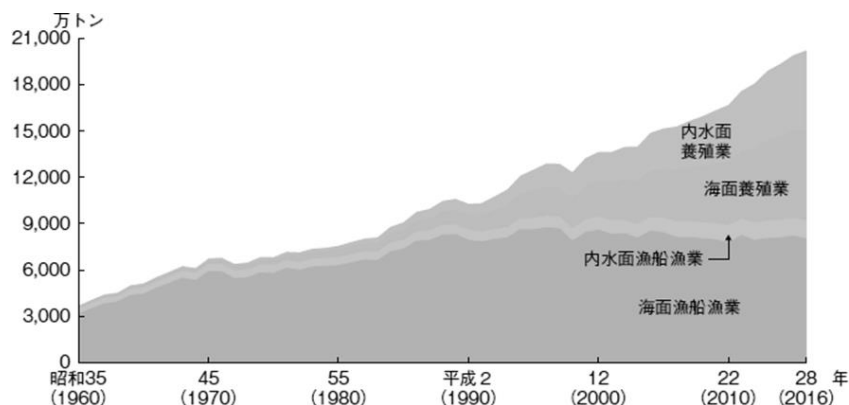


Fig. 1. Transition of global fisheries and aquaculture production.

FAO: Fishstat (Capture Production, Aquaculture Production) modified by Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

3. 養殖魚：ナマズ

ナマズ目の魚類は世界各地で古くから食用魚として利用された歴史をもつ。漁獲対象とされるのはアメリカナマズ科（北アメリカ）、ナマズ科・パンガシウス科（アジア）、およびヒレナマズ科（アジア・アフリカ）に所属する中・大型種が多く、これらの淡水産種は養殖も各地域で盛んに行われている。2006年の総漁獲量260万トンのうち、養殖ナマズが180万トンを占める。日本では在来のナマズ目魚類は全国各地（沖縄は海産種のみ）に分布するものの、その数は5科11種のみと極めて少なく、淡水産種としてはナマズ科ナマズ属の4種（ナマズ、イトトコナマズ、ビワコオオナマズ、タニガワナマズ）が存在する。一方、食用目的で1970年代に移植されたアメリカナマズが1980年代には霞ヶ浦に定着、その繁殖力の強さから数がどんどん増えている。

4. まとめ

本研究は、科学技術振興機構未来社会創造事業の支援を受けて行っている。2018年に閉鎖循環式陸上養殖に成功した和歌山県新宮市の「熊野なまず」を実験材料として、粘膜質である体表の網羅的な菌叢解析を行うとともに、微生物由来のタンパク質および柑橘類の果皮分解物を混合した飼料を開発することで、一般的に魚類飼料として利用されている魚粉を代替することを目指している。

5. 文献

1. Annual Report on Fisheries Agency in MAFF FY2019
 (<https://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/index.html>)