

日本農芸化学会 関西支部
第511回 講演会

講演要旨集

2019年12月7日(土)
神戸大学 農学部 C101 講義室



日本農芸化学会関西支部

支部賛助企業

関西支部の活動は、下記の支部賛助企業様からのご支援により支えられています

アース製薬株式会社	東洋紡株式会社
植田製油株式会社	ナカライテスク株式会社
株式会社ウォーターエージェンシー	日世株式会社
江崎グリコ株式会社	株式会社日本医化器械製作所
株式会社カネカ	日本新薬株式会社
菊正宗酒造株式会社	ハウスウェルネスフーズ株式会社
黄桜株式会社	ヒガシマル醤油株式会社
月桂冠株式会社	不二製油株式会社
甲陽ケミカル株式会社	松谷化学工業株式会社
三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社	三井化学アグロ株式会社
サントリーホールディングス株式会社	株式会社三ツワフロンテック
住友化学株式会社	大和酵素株式会社
株式会社第一化成	理研化学工業株式会社
宝酒造株式会社	株式会社ロッテ
築野食品工業株式会社	和研薬株式会社

プログラム

受付	11:00~
開会の辞	13:00~13:05
~~~~~ 一般講演 ~~~~~	
	13:05~16:01
	座長：富永将大（神大院・イノベ）
* 1. 13:05	酵母でのリジン高生産を目的としたホモクエン酸合成酵素Lys20の高機能化 ○松下智紀、今西浩之、豊川洋一、磯貝章太、高木博史 奈良先端大・バイオ
*2. 13:18	酵母におけるグルタミン酸キナーゼPro1の高機能化とプロリン高生産への応用 ○高崎友里恵、磯貝章太、豊川洋一、高木博史 奈良先端大・バイオ
*3. 13:31	アルコール発酵過程に特異的な酵母シグナル伝達メカニズムの解析 ○川島幹也 ¹ 、梶原拓真 ¹ 、渡辺大輔 ^{1,2} 、高木博史 ¹ ¹ 奈良先端大・バイオ、 ² 京大院・農
	座長：石川周（神大院・イノベ）
*4. 13:44	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の鉄代謝改変に基づくキシロースからの1,2,4-ブタントリオール発酵生産 ○湯川貴弘 ¹ 、番場崇弘 ¹ 、蓮沼誠久 ^{1,2} 、近藤昭彦 ^{1,2,3} ¹ 神大院・イノベ、 ² 神大・先端バイオ工、 ³ 理研・環資
*5. 13:57	新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発 ○能崎健太 ¹ 、富永将大 ¹ 、梅野太輔 ² 、近藤昭彦 ^{1,3,4,5} 、石井純 ^{1,5} ¹ 神大院・イノベ、 ² 千葉大院・工、 ³ 理研・環資、 ⁴ 神大院・工、 ⁵ 神大・先端バイオ工
*6. 14:10	メラトニン生産性を簡便かつハイスループットに評価するメタボライトセンサの開発 ○浅間梨々花 ¹ 、田畑琢也 ¹ 、中村泰之 ^{1,2} 、中村朋美 ¹ 、加藤寛子 ¹ 、近藤昭彦 ^{1,2,3} 、石井純 ^{1,2} ¹ 神大院・イノベ、 ² 神大・先端バイオ工、 ³ 神大院・工
休憩	14:23~14:30

*印は農芸化学会関西支部若手優秀発表賞対象講演

座長：金丸研吾（神大院・農）

7. 14:30 進化デザインによる新規テルペノイドセンサの開発  
○富永将大¹、小川ひろ¹、能崎健太¹、近藤昭彦^{1,2,3,4}、石井純^{1,4}  
¹神大院・イノベ、²神大院・工、³理研・環資、⁴神大・先端バイオ工
- *8. 14:43 プロバイオティクス性*Bacteroides*属細菌による次世代発酵乳  
○山本雄大、佐藤賢宏、高瀬隆一、渡辺大輔、橋本涉  
京大院・農
- *9. 14:56 イノシトール異性体を相互変換するコンビナトリアル  
エンザイモロジー  
○牧野恒平、石川周、吉田健一  
神大院・イノベ

座長：川口秀夫（神大院・イノベ）

- *10. 15:09 ヒマワリにおけるヘリオラクトン生合成機構の解明  
○新出ひかる¹、若林孝俊^{1,2}、山本舜也³、滝川浩郷^{2,3}、  
水谷正治¹、杉本幸裕^{1,2}  
¹神大院・農、²JST/JICA SATREPS、³東大院・農
- *11. 15:22 トマトにおけるキャリステジン生合成経路の解析  
○三川津香沙¹、秋山遼太¹、加藤敦²、刑部敬史³、刑部祐里子³、  
杉本幸祐¹、水谷正治¹  
¹神大院・農、²富大・病院薬、³徳大・生物資源
- *12. 15:35 免疫化学的手法を用いたカイコのSNAREタンパク質の機能解析  
○笹尾菜子、北川梨紗、金丸研吾、宇野知秀  
神大院・農
- *13. 15:48 HPLC-ELSDによるヒトABCタンパク質の脂質排出活性  
測定手法の確立  
○高橋智¹、北悠人¹、木岡紀幸¹、植田和光²、木村泰久¹  
¹京大院・農、²京大・iCeMS

休憩

16:01~16:10

*印は農芸化学会関西支部若手優秀発表賞対象講演

~~~~~ 受賞公演 ~~~~~

2019年度 農芸化学女性企業研究者賞 16:10~16:35

「ポリフェノールの体内動態に関する研究」

畠森 菜美乃（サントリーウエルネス株式会社）

座長：裏出 令子（京都大学複合原子力科学研究所）

休憩

16:35~16:40

~~~~~ 特別公演 ~~~~~

神戸発！先端バイオ研究：ゲノム編集とスマートセル 16:40~17:40

座長：吉田 健一（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科教授）

「塩基編集技術の開発と育種応用」

西田 敬二（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科教授）

「スマートセルインダストリーに資するメタボローム解析技術の開発と応用」

蓮沼 誠久（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、  
先端バイオ工学研究センター長）

~~~~~ 優秀発表賞（支部長推薦）および 優秀発表賞（賛助企業推薦）表彰式 ~~~~~

17:40~17:50

移動

17:50~18:10

懇親会 会場：神戸大学アカデミア館3階「さくら」

18:10~20:10

要旨

一般講演

\*01 酵母でのリジン高生産を目的としたホモクエン酸合成酵素 Lys20 の高機能化

○松下智紀、今西浩之、豊川洋一、磯貝章太、高木博史

(奈良先端大・バイオ)

【目的】リジンは必須アミノ酸の一つで、動物は食物から摂取しなければならない。これまでに、醸造・発酵食品産業で広く用いられている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ホモクエン酸合成酵素 Lys20 がリジンによるフィードバック阻害によって活性制御を受けることで細胞内のリジン含量が厳密に調節されている (Feller *et al.*, 1999)。また、当研究室でもリジン高含有酵母の育種を目的として *LYS* 遺伝子群の高機能化変異を多重導入し、リジン含量を比較したところ、*LYS20* にアミノ酸置換を伴う変異を導入した株でのみリジン含量が顕著に増加したため、リジン含量の増加に Lys20 の高機能化が重要であることが示された。Lys20 においては、フィードバック阻害感受性を低下させるアミノ酸置換 (R276K および S385F) が細胞内リジン含量の増加に寄与することが報告されている (Feller *et al.*, 1999)。しかし、これらのアミノ酸置換体は進化分子工学的な手法で遺伝子に変異を導入することで取得されたもので、高機能化 Lys20 の取得には時間と労力を必要とする。本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来の同酵素 (Lys4) の構造をテンプレートに行ったホモロジーモデリングにより、各アミノ酸置換がリガンド結合性に及ぼす影響を計算することで、リジン含量を増加させる高機能化酵素を理論的かつ効率的に取得することを試みた。

【方法・結果】既知のアミノ酸置換 (S385F) について最適化を行うため、ミネソタ大学バイオテクノロジー研究所の協力のもと、Lys20 の各アミノ酸残基を別のアミノ酸に置換した際のリガンド (2-オキソグルタル酸、リジン) との結合性を計算した。その結果、385 番目残基セリンのグルタミン酸への置換が、フェニルアラニンへの置換と比べてリジンとの結合性が低下することが示唆された。そこで、S385E 置換型 Lys20 を構築し、実験室酵母に導入したところ、細胞内リジン含量が R276K 置換型 Lys20 あるいは S385F 置換型 Lys20 の導入株と比べて有意に増加した。以上の結果から、Lys20 の S385E 置換によって既知のアミノ酸置換よりもリジンによるフィードバック阻害感受性が低下し、リジン含量が増加した可能性が示された。また、大腸菌を用いて野生型および各置換型組換え Lys20 を発現・精製し、ホモクエン酸合成酵素活性のリジンによるフィードバック阻害感受性を解析したところ、S385E 置換型 Lys20 は既知のアミノ酸置換型 Lys20 と比べてリジン存在下でも高い活性を示した。

\*02 酵母におけるグルタミン酸キナーゼ Pro1 の高機能化とプロリン高生産への応用

○高崎友里恵、磯貝章太、豊川洋一、高木博史

(奈良先端大・バイオ)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、プロリンは細胞質で主にグルタミン酸から還元的に合成される。特にプロリン合成系の初発酵素である γ -グルタミンキナーゼPro1は、その活性がプロリンによるフィードバック阻害を受けることから、細胞内プロリン含量を制御している鍵酵素である。当研究室ではこれまでに、Pro1にAsp154Asn, Ile150Thr, Glu149Lysなどのアミノ酸置換が導入されると、フィードバック阻害感受性が低下し、プロリンが過剰合成されることを見出した。また、これらのアミノ酸置換型Pro1を発現した酵母は、細胞内プロリン含量が顕著に増加するとともに、冷凍、乾燥、酸化、浸透圧、エタノールなどのストレスに耐性を示し、発酵能やエタノール生産性が向上することを報告してきた。プロリン高含有酵母を取得することで、プロリンの代謝制御機構や生理機能への理解が深まるだけでなく、酵母機能を活用した発酵化学産業への応用も期待できる。このような背景のもと、当研究室では沖縄の蒸留酒「泡盛」の醸造工程で生成する「蒸留粕」の有効利用を目的として、泡盛酵母からプロリン高含有変異株を取得した。本変異株のプロリン高含有機構を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った結果、*PRO1* 遺伝子にアミノ酸置換 (Gln79His) を伴うヘテロサイガスな変異が存在していた。ホモロジーモデリングによりPro1の構造を予測した結果、I150T やE149Kと同様に、Q79HはPro1の活性中心を構成する部位の近傍に位置することが示唆され、フィードバック阻害感受性の低下に関与している可能性が考えられた。そこで本研究では、新たに見出したQ79H置換型Pro1の酵素特性を解析し、プロリン高生産への効果を検証することを目的とした。

【方法・結果】泡盛酵母変異株のゲノムDNAを抽出し、ジデオキシ法によるDNAシーケンスを行うことで、*PRO1* 遺伝子の変異 (Q79H) を確認した。また、親株と変異株を最少培地で培養し、細胞内アミノ酸含量を測定した結果、変異株では親株と比べて約10倍のプロリンを蓄積していることが明らかになった。現在、Q79H置換型Pro1のフィードバック阻害感受性について、大腸菌で発現させた野生型Pro1およびQ79H置換型Pro1の組換え精製酵素を用いた解析を行っている。また、実験室酵母の*PRO1* 遺伝子壊株を用いて、野生型Pro1およびQ79H置換型Pro1を発現させた形質転換体を取得し、Pro1のQ79H置換が細胞内プロリン含量の増加に寄与するかどうかを解析している。

\*03 アルコール発酵過程に特異的な酵母シグナル伝達メカニズムの解析

○川島幹也<sup>1</sup>、梶原拓真<sup>1</sup>、渡辺大輔<sup>1,2</sup>、高木博史<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup>京大院・農)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高いアルコール発酵力を有し、広く産業利用されているが、そのメカニズムには未解明な部分も多い。当研究室では *S. cerevisiae* に属する清酒酵母を用いて、栄養シグナル伝達に関わる Greatwall-ENSA-PP2A<sup>B55δ</sup> 経路およびストレス応答性転写因子 Msn2/4p が高発酵力の鍵を握ることを明らかにしてきた (Watanabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016; 2019)。しかしながら、発酵力調節における両者の関連性については不明である。本研究では、発酵過程における PP2A<sup>B55δ</sup> と Msn2/4p の関係に着目し、アルコール発酵を司るシグナル伝達の全体像に関する理解を深めることを目的とした。

【方法・結果】近年、浸透圧ストレス下において、PP2A<sup>B55δ</sup> が Msn2p の活性化に関与することが報告された (Reiter *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2013)。そこで、発酵過程における Msn2/4p 標的遺伝子の発現に対する PP2A<sup>B55δ</sup> の役割を qRT-PCR 法により調べた。その結果、実験室酵母の野生型株では、発酵過程の初期において Msn2/4p 標的遺伝子の発現が誘導され、PP2A<sup>B55δ</sup> 機能欠損株では、発現誘導がさらに促進された。これらの発現誘導は、Msn2/4p の機能欠損によりほぼ打ち消された。したがって、発酵過程では浸透圧ストレス下とは異なり、PP2A<sup>B55δ</sup> が Msn2/4p を不活性化するという新規な現象が見出された。Msn2/4p を介した遺伝子発現の誘導は、酵母細胞壁の主要構成成分である 1,3-β-グルカンの合成を促し、アルコール発酵への代謝フラックスを減少させる (Watanabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016)。PP2A<sup>B55δ</sup> 機能欠損株では、野生型株と比較して発酵過程における 1,3-β-グルカン含量の上昇がより顕著であり、アルコール発酵は阻害されていた。また、これらの表現型は、Msn2/4p の機能欠損により打ち消された。以上の結果から、PP2A<sup>B55δ</sup> による Msn2/4p の不活性化が高発酵力に関与するという発酵力調節メカニズムが明らかになった。

さらに、Msn2/4p が 1,3-β-グルカン合成を促す原因を調べるため、1,3-β-グルカン合成酵素の上流因子について解析を行った。その結果、推定上の細胞壁センサーである Wsc3/4p の関与が示唆された。WSC3 または WSC4 遺伝子の破壊により、発酵過程における 1,3-β-グルカン含量が顕著に減少し、発酵力が上昇した。Wsc3/4p は、Msn2/4p が不活性化されている対数増殖期には影響を及ぼさないことから、発酵過程における Msn2/4p の活性化に応答して働く標的因子であると推測された。以上の結果から、PP2A<sup>B55δ</sup> と Msn2/4p を介した発酵過程に特異的なシグナル伝達メカニズムが機能しており、発酵力調節に重要な役割を果たすと考えられる。

\*04 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の鉄代謝改変に基づくキシロースからの 1,2,4-ブタントリオール発酵生産

○湯川貴弘<sup>1</sup>, 番場崇弘<sup>1</sup>, 蓮沼誠久<sup>1,2</sup>, 近藤昭彦<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup> 神大院・イノベ, <sup>2</sup> 神大・先端バイオ工, <sup>3</sup> 理研・環資)

【目的】

D-1,2,4-ブタントリオール (BT) は、様々な医薬品や化成品の原料として利用できる。また、BTをニトロ化することで得られる1,2,4-ブタントリオールトリナイトレートは、ロケットの推進剤などニトログリセリンの代替品として期待されている。現在のBT製造方法は、高温高压の反応条件や高価な触媒を必要とするため、環境負荷の少ない製造法開発が望まれている。そこで本研究では、発酵阻害物に対する耐性が高く、バイオマス原料からの物質生産に適している酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いて、稲わらの前処理液からのBT製造方法の開発を目指した。

【方法・結果】

これまで酵母を用いたBT生産の報告例は無く、酵母内でBT合成経路の2-ケト3-デオキシ-キシロネートから3,4-ジヒドロキシブタナールへの反応を触媒する酵素Kdcが未

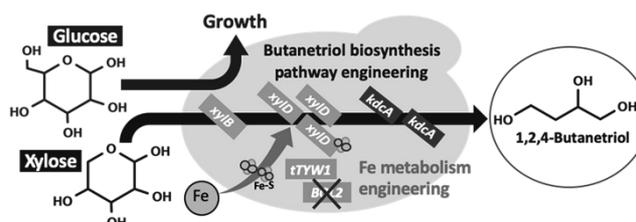


Fig. 1 本研究の概略図

知であった。本研究では、基質特異性の異なるKdcを複数選択し、酵母に導入することで、BT生産に適したKdcを探索した。その結果、*Lactococcus lactis*由来kdcAをTDH3プロモーターの制御下で2コピー発現させた場合に最もBT生産量が高く、0.7 g/LのBTを生産することに成功した。しかしながら、BT生産量が向上した株においても、中間生成物であるキシロネートが多量に蓄積することが確認された。原因として、キシロネートを2-ケト-3-デオキシ-キシロネートへと変換する酵素XylDの活性が十分でないことが考えられた。XylDは鉄硫黄タンパク質であり、酵母では、原核生物由来の鉄硫黄タンパク質の活性が非常に低いことが報告されている。本研究では、酵母の鉄硫黄クラスターの合成、および鉄の代謝に関わる遺伝子の破壊や過剰発現を行うことで、XylDの活性強化を試みた。その結果、鉄硫黄クラスターを小胞体の表層に隔離するタンパク質Tyw1、あるいは鉄の取り込みを制御するタンパク質Bol2がXylDの活性向上に大きく寄与することを明らかにした。特に、変異型TYW1の過剰発現およびBOL2の破壊を組み合わせることにより、5.9倍のXylD活性の強化に成功し、10 g/Lのキシロースから1.6 g/LのBTを生産することに成功した(対糖収率 23.1%)。最後に、この株を用いて稲わらの前処理液を原料としたBT生産試験を行ったところ、96時間で1.1 g/LのBTを生産することに成功した。

\*05 新規な3機能性融合マーカーを用いた酵母遺伝子スイッチの組織的開発

○能崎健太<sup>1</sup>、富永将大<sup>1</sup>、梅野太輔<sup>2</sup>、近藤昭彦<sup>1,3,4,5</sup>、石井純<sup>1,5</sup>

(<sup>1</sup>神大院・イノベ、<sup>2</sup>千葉大院・工、<sup>3</sup>理研・環資、
<sup>4</sup>神大院・工、<sup>5</sup>神大・先端バイオ工)

【目的】

遺伝子発現を自在に制御し人工の生物機能を構築するために、内/外来の転写因子を利用した人工の転写制御系(遺伝子スイッチ)が用いられる。原核生物に機能最適化された遺伝子スイッチが多数開発されてきた一方で、真核生物の酵母では、機能最適化の困難さから、実用に供するスイッチが不足している。本研究では、新規な3機能性融合マーカーを用いて、スイッチ性能が向上した変異体を迅速かつ簡便に選抜できる進化工学法を確立し、多数のスイッチの組織的な開発を行った。

【実験と結果】

Pseudomonas fluorescens 由来の転写因子 PhIF とウイルス由来の転写活性化ドメインおよび核移行シグナルとを融合し、人工の転写因子 PhITA を作製した。PhITA は、結合配列 *phlO* を融合した人工プロモータ(P*phlO*) 下流の遺伝子発現を活性化し("ON")、誘導物質 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) と結合すると *phlO* から解離する(下流遺伝子の発現"OFF")。遺伝子スイッチの選抜のために、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ HSV-TK とブレオマイシン耐性タンパク質 Ble、緑色蛍光タンパク質 GFP の融合体 TBG を、P*phlO* の下流に配置し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入した。この酵母株に、変異 PCR によって作製した PhITA 変異体ライブラリを導入した。まず、得られた酵母ライブラリを抗生物質 Zeocin 存在下で培養して、Ble の機能による Zeocin の無毒化に十分な量の TBG を発現する変異体を濃縮した(ON 選抜)。次に DAPG とプロドラッグである 5FdU の存在下で培養することで、漏出發現した TBG の HSV-TK 活性により 5FdU が活性化された細胞のみを死滅させた(OFF 選抜)。こうして得た遺伝子スイッチ変異体群の、DAPG による誘導活性(S/N 比)を GFP 蛍光によりスクリーニングしたところ、最高で 7 倍の S/N 比を示す変異体を得られた。また、DAPG 存在/不在時にそれぞれ ON/OFF 選抜を行い、DAPG によって P*phlO* 下流遺伝子の発現を最大 14 倍の S/N 比で誘導できる逆転型の遺伝子スイッチを取得した。

さらに、*Vibrio fischeri* 由来の転写因子 LuxR や *Pseudomonas putida* 由来の転写因子 CamR を用いた遺伝子スイッチについても、同様の方法で S/N 比向上あるいは高感度化に成功した。本講演では、取得した変異の組み合わせが、遺伝子スイッチの S/N 比あるいは応答感度に与える影響についてまとめて報告する。

\*06 メラトニン生産性を簡便かつハイスループットに評価する
メタボライトセンサの開発

○浅間梨々花<sup>1</sup>, 田畑琢也<sup>1</sup>, 中村泰之<sup>1,2</sup>, 中村朋美<sup>1</sup>, 加藤寛子<sup>1</sup>,
近藤昭彦<sup>1,2,3</sup>, 石井純<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 神大院・イノベ, <sup>2</sup> 神大・先端バイオ工, <sup>3</sup> 神大院・工)

【目的】

微生物が本来生産しない化合物を効率的に発酵生産できる代謝改変株を創出する研究が進められている。しかし、通常はクロマトグラフィーなどの分析機器を用いて目的化合物の生産量を定量するため、1日に評価できる改変株の数は限られていた。そこで、ランダム変異等により生じる膨大な改変株を含むライブラリの生産性を、簡便かつハイスループットに評価できる酵母メタボライトセンサに注目した。目的生産物のモデルとして、概日リズムに関与し睡眠障害の治療薬等に利用される低分子化合物のメラトニンを選択した。外来の代謝生合成経路を導入した酵母細胞が発酵生産するメラトニン量を蛍光レポーター遺伝子の発現により簡便に評価でき、更に、他の化合物の評価系の構築にも拡張できるセンサの開発を目指した。

【方法・結果】

メタボライトセンサに拡張性を持たせるために、真核生物で普遍的に保存されているG蛋白質シグナル伝達経路に着目した。リガンド刺激によりシグナル伝達経路が活性化され、緑色蛍光蛋白質(GFP)が発現するようにゲノムを改変した酵母株において、G蛋白質共役型受容体(GPCR)の一種であるヒト由来のメラトニン受容体(MTNR1A)を細胞膜に発現させることで、メラトニン濃度依存的にGFPレポーターが発現するメラトニンセンサを構築した(図1)。

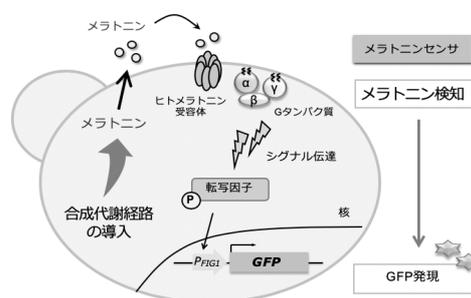


図1 酵母メタボライトセンサのメカニズム

更に、MTNR1Aの発現プロモーター変更や活性減衰変異導入により様々なメラトニン生産濃度域に対応できるようにセンサの感度チューニングを行った。構築したセンサは、構造が類似したセロトニン等の生合成中間体には感知せず、メラトニンのみを特異的に検知した。また、生合成経路を導入した酵母が生産するメラトニン濃度も、GFP蛍光測定により簡便かつ迅速に定量可能であった。このように、GPCRを用いてメラトニン濃度を測定できる酵母メタボライトセンサの開発に成功した。本技術は、発現させるGPCRの種類を変更することで他の化合物検出にも拡張できると期待される。

07 進化デザインによる新規テルペノイドセンサの開発

○富永将大<sup>1</sup>、小川ひろ<sup>1</sup>、能崎健太<sup>1</sup>、近藤昭彦<sup>1,2,3,4</sup>、石井純<sup>1,4</sup>
(<sup>1</sup>神大院・イノベ、<sup>2</sup>神大院・工、<sup>3</sup>理研・環資、<sup>4</sup>神大・先端バイオ工)

【目的】

テルペノイドは、医薬品や香料、バイオ燃料などとして、産業的価値の高い化合物群である。これらの生物生産には、テルペノイド合成酵素の同定と細胞内活性の向上が必須であるが、テルペノイド生産の評価をハイスループットに実施する方法の不在がこれを阻んでいた。そこで本研究では、種々のテルペノイドに応答してレポータ遺伝子の発現をON/OFFする"酵母テルペノイドセンサ"の構築を試みた。

【方法・結果】

モノテルペンセンサの構築: *Pseudomonads putida*由来の転写因子CamRにウイルス由来の転写活性化ドメインと核移行シグナルを付加した人工の転写因子CamTAと、酵母*GALI*由来のコアプロモーター配列にCamRの結合配列を融合した人工プロモーター(*PcamO*)を構築し、*PcamO*の下流に緑色蛍光タンパク質(GFP)を配置した。これらを酵母*Saccharomyces cerevisiae*に導入したところ、CamTA活性に由来するGFPの発現がみられた。この酵母株を、モノテルペンであるカンファー、ボルネオール、そしてβ-ピネンを100 μMの濃度で含有する培地で培養したところ、カンファー/ボルネオールが存在するときのみCamTAが不活化され、GFP発現が大きく低下した。

ボルネオール/ピネン応答性の進化工学: まず3機能性の融合セレクトタ(チミジンキナーゼ(hsvTK)とゼオシン耐性タンパク質(Ble)、およびGFPの融合体、TBG)を*PcamO*の制御下に配置した酵母株を構築した。次に、変異PCRによってCamTAのライブラリを作製し、この酵母株に導入した。得られた酵母ライブラリについて、テルペノイド不含かつゼオシン含有の培地で培養することで、CamTAの活性によりTBGが発現しゼオシン耐性を示す細胞だけを濃縮した。さらに、ボルネオールまたはβ-ピネンと、5FdUとを含有する培地で培養することで、これらのモノテルペンに応答しないCamTA変異体の活性によってTBGが発現した細胞だけを、TBGのhsvTK活性によってリン酸化された5FdUの細胞毒性によって死滅させた。このようにして、ボルネオールおよびβ-ピネンに応答するCamTA変異体を取得した。得られた変異体の多くは、CamTAのDNA結合に関与するN末端部位に変異を共有していたことから、これらの変異は、CamTAのリガンド選択性には影響を与えず、さまざまなモノテルペンへの応答感度を全て向上させる変異であると結論した。本講演では、カンファー、ボルネオール、そしてβ-ピネンにそれぞれ特異的に応答するCamTA取得の試みについても紹介する。

\*08 プロバイオティクス性 *Bacteroides* 属細菌による次世代発酵乳

○山本雄大、佐藤賢宏、高瀬隆一、渡辺大輔、橋本渉

(京大院・農)

【目的】近年、腸内細菌と宿主であるヒトの健康との相関関係が注目されている。ヒト腸内優占種である *Bacteroides* 属細菌群は、日和見感染菌を含む一方で、肥満との逆相関や食物繊維からの短鎖脂肪酸の分泌などの観点から次世代プロバイオティクスの可能性が指摘されている<sup>1)</sup>。当研究室では、多種の *Bacteroides* 属細菌が腸内の宿主細胞から分泌される細胞外粘性物質（グリコサミノグリカンやムチン）を分解することを明らかにし、その腸内優占性を示唆した<sup>2)</sup>。最近、本細菌群が宿主細胞外粘性物質を資化することにより必須アミノ酸や短鎖脂肪酸を分泌することを見出し、宿主との相利共生関係を提唱した<sup>3)</sup>。そこで本研究では、*Bacteroides* 属プロバイオティクスによる次世代発酵乳の開発を目指した。

【方法・結果】*Bacteroides* 属細菌群のうち、今回の実験には宿主細胞外粘性物質の資化能を有し、かつバイオセーフティーレベル1の *B. thetaiotaomicron*、*B. ovatus* および *B. faecis* を用いた。これら3種の発酵乳への利用の可能性を調べるため、牛乳中の炭水化物のうち99%を占めるラクトースについて、 β -ガラクトシダーゼ活性測定による分解性評価とラクトース最少培地での生育による資化性評価を行った。その結果、3種の *Bacteroides* 属細菌すべてがラクトースの分解性および資化性を示すと共に、生育に伴った培養液のpHの低下も観察された。そこで、これら3種のうち、ラクトースの資化能が最も高い *B. thetaiotaomicron* による発酵乳の作製を試みた。牛乳に植菌し嫌気培養を行ったところ、牛乳培養液のpHが経時的に低下し、培養開始から3時間後には牛乳培養液がヨーグルト様ゲル状を呈し始めた。今回作製した発酵乳と、市販のヨーグルトをスターターに用いた発酵乳を対象に、有機酸を定量比較した。その結果、*B. thetaiotaomicron* による発酵乳では、乳酸は低い値を示したのに対し、コハク酸、酢酸およびプロピオン酸などの短鎖脂肪酸が多量に含まれることが明らかとなった。

【考察】牛乳中で *B. thetaiotaomicron* がラクトースを分解代謝する過程で短鎖脂肪酸を分泌し牛乳培養液中のpHを低下させた結果、カゼインが凝集することによりゲル化が促進されたと考えられる。*B. thetaiotaomicron* による発酵乳は、従来の発酵乳と比較して、旨味成分であるコハク酸を多く含有することから、呈味性に優れた次世代乳製品として期待される。

<sup>1)</sup>Koropatkin *et al.* (2012) *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 323. <sup>2)</sup>Kawai *et al.* (2018) *Sci. Rep.* **8**, 10674. <sup>3)</sup>佐藤ら(2019)日本農芸化学会2019年度大会一般講演トピックス集, 46.

\*09 イノシトール異性体を相互変換するコンビナトリアル・エンザイモロジー

○牧野恒平、石川周、吉田健一

(神大院・イノベ)

【目的】

イノシトールはシクロヘキサンの6価アルコールであり、水酸基の結合方向の組み合わせが異なる9種類の異性体が存在する。自然界では *myo*-inositol (MI) が最も豊富に存在しており、植物種子のリン酸貯蔵物質であるフィチン酸 (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-6 リン酸) のリン酸を脱離させることで、米ぬかや小麦ふすまを原料として安価に供給される。その他のイノシトール異性体は希少かつ高価であるが、有用な生理活性を示すものがある。例えば *scyllo*-inositol (SI) や *allo*-inositol (AI) はアルツハイマー病の発症に関与しているとされるアミロイドβタンパク質(Aβ)の凝集を抑制する活性が報告されており、一方 *D-chiro*-inositol (DCI) はインスリン様作用を持ち、血糖降下、多嚢胞性卵巣症候群の改善に効果があることが知られている。その他のイノシトール異性体の生理機能は、その希少性故に未だ不明であり、その解明を促進するためにもそれらの安価かつ容易な生産方法が求められている。

本研究ではイノシトールの代謝経路およびその遺伝子群が解明されている *B. subtilis* 及び *G. kaustophilus* (GK) のイノシトール脱水素酵素をコードする遺伝子である *iolG*、*iolW*、*iolX* 及び *gk1897*、*gk1898*、*gk1899* を選択的に2つずつ組み合わせて枯草菌内で機能させることによって、MIを様々な希少イノシトールへ変換する可能性を探る *in vivo* コンビナトリアル・エンザイモロジーを試みた。さらにイノシトール中間代謝物 (2KMI) 異性化酵素をコードする遺伝子である *iolI* を追加導入して、生成する希少イノシトールが変化するか否かについても検証した。

【方法・結果】

作製した株の内のいくつかでMIからSIまたはDCI(株によってはSIとDCIが同時に)への変換が行われたが、その他の希少イノシトールへの変換は未だ確認できていない。好熱菌であるGK由来の酵素活性を高めることを狙いとして培養温度を37℃から55℃へとシフトした実験において、GK由来の *iolI* を含む株についてMIからSIまたはDCIへの変換率が上昇したことが確認できた。

\*10 ヒマワリにおけるヘリオラクトン生合成機構の解明

○新出ひかる<sup>1</sup>、若林孝俊<sup>1,2</sup>、山本舜也<sup>3</sup>、滝川浩郷<sup>2,3</sup>、水谷正治<sup>1</sup>、
杉本幸裕<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 神大院・農、<sup>2</sup> JST/JICA SATREPS、<sup>3</sup> 東大院・農)

【背景・目的】

ストリゴラクトン(以下、SL)は、世界各地で農作物に深刻な被害をもたらしている根寄生雑草ストライガおよびオロバンキの種子発芽促進物質として知られており、植物地上部の枝分かれを抑制する植物ホルモンとしての機能も有している。そのためSL生合成機構の解明は、根寄生雑草の防除および植物の生長制御において非常に重要であると言える。本研究室ではこれまでに、オロバンキによる深刻な寄生被害を受けているヒマワリ(*Helianthus annuus*)の根滲出液から、新規SLを単離・同定し、ヘリオラクトンと命名した。ヘリオラクトンは開環型のSLで、三環ラクトン(ABC環)を有する典型的SLと区別して非典型的SLと呼ばれる。すべてのSLは β -カロテンを出発物質とし、共通前駆体であるカーラクトン(以下、CL)から生合成されるが、非典型的SLにおいては、CL以降の生合成経路の解明が進んでいない。

本研究では、ヒマワリのヘリオラクトン生合成機構の解明を目指している。

【方法・結果】

ヘリオラクトンはその構造から、CLが酸化、メチル化されたカーラクトン酸メチル(以下、MeCLA)から変換されると推定される。そこで、SL生合成条件下で2週齢まで育てたヒマワリの水耕液に、カロテノイド生合成阻害剤であるフルリドン进行处理してSL生成を抑え、そこにMeCLAを投与し24時間後の水耕液を回収することで、MeCLAのヘリオラクトンへの変換を調べた。その結果、投与したMeCLAがヘリオラクトンへ変換されることを確認した。

一方、ヘリオラクトンとMeCLAではA環の二重結合の位置が異なる。そこで、MeCLAと同じA環の二重結合の位置をもつイソヘリオラクトンをヒマワリの水耕液に投与し、ヘリオラクトンへの変換を調べた。その結果、イソヘリオラクトンのヘリオラクトンへの変換は見られなかった。これらの結果から、ヘリオラクトンは、MeCLAからイソヘリオラクトンを介さずに生合成されると考えられる。

現在は、MeCLAを投与し24時間以内までの変換過程を調べ、イソヘリオラクトンの生合成へ関与の有無を検証している。また、ヒマワリの水耕液からは、ヘリオラクトンより分子量が16大きい新たな化合物の存在も確認された。今後は、ヘリオラクトンの代謝についても調べ、ヒマワリのSL生合成機構の全貌を解明していきたい。

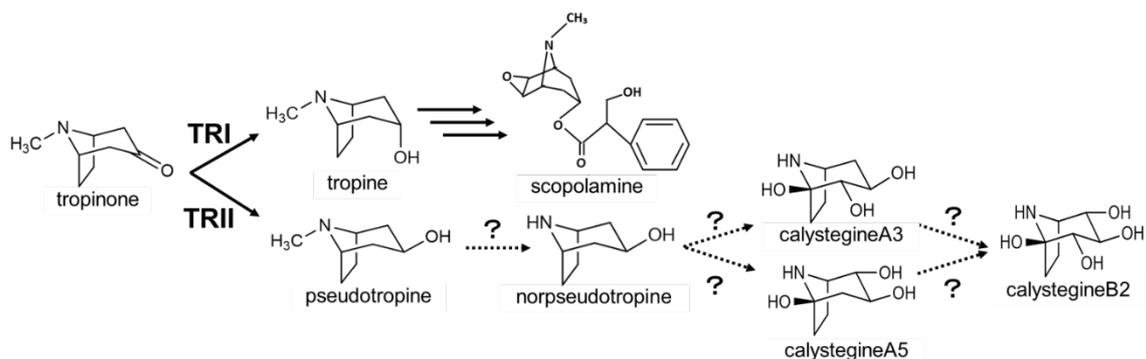
\*11 トマトにおけるキャリステジン生合成経路の解析

○三川津香沙<sup>1</sup>、秋山遼太<sup>1</sup>、加藤敦<sup>2</sup>、刑部敬史<sup>3</sup>、刑部祐里子<sup>3</sup>、
杉本幸裕<sup>1</sup>、水谷正治<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神大院・農、<sup>2</sup>富大・病院薬、<sup>3</sup>徳大・生物資源)

【背景・目的】

キャリステジン (calystegine) は、ヒルガオ属 *Calystegia sepium* から単離されたノルトロパンアルカロイドであり、トロパン環上のヒドロキシ基の個数によってキャリステジン-A、-B 及び -C に分類され、また、ナス科やコカノキ科などでも生合成されている。キャリステジンには、 β -グルコシターゼ及び α -ガラクトシダーゼの強力な阻害剤として作用するものがあり、特に B2 と C1 はゴーシェ病という難病の治療薬のシーズとして近年注目されている。また、B3 は糖タンパク質糖鎖の生合成を阻害することから、生化学的ツールとしての関心が高まっている。キャリステジンはトロピノン還元酵素 II (TR II) によるカルボニル基の還元を経てシュードトロピンへと変換され、さらに脱メチル化およびトロパン環の数段階の水酸化反応により生合成されると推定される。そこで、キャリステジン生合成経路の解明を目的とし、本研究では、TR II を CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集を行い、下流経路を遮断したトマト (*Solanum lycopersicum* cv. *Micro-Tom*) を作出し、シュードトロピン以降の生合成経路を解析した。



【方法・結果】

本研究では、ナス属植物トマトの茎切片に *Agrobacterium rhizogenes* を感染させて作出したトマト毛状根を材料とした。毛状根抽出物を GC-MS で分析した結果、キャリステジン A3、A5 及び B2 が検出された。次に、トマト TR II のエクソン領域で設計した 2 本の guideRNA を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、本ベクターを導入した *A.rhizogenes* を感染させて形質転換毛状根を作製した。得られた TRII 破壊株を分析した結果、キャリステジン類は検出されず、トロピノン以降の経路が遮断された毛状根の作出に成功した。次に、TRII 破壊株にシュードトロピンを添加して培養したところ、キャリステジン類の生産を確認することができた。

\*12 免疫化学的手法を用いたカイコの SNARE タンパク質の機能解析

○笹尾茉莉、北川梨紗、金丸研吾、宇野知秀

(神大院・農)

【目的】

昆虫の変態や羽化、摂食などのさまざまな生理現象は脳などに存在する特異的な神経細胞で合成される神経ペプチドにより主に引き起こされる。昆虫の神経ペプチドは、様々な環境を感知し、主に脳で合成された後、神経ペプチドを含む小胞が形成され、軸索の中を小胞輸送し、末端の神経分泌器官から合成される。しかし、神経ペプチドを含む小胞の輸送や分泌を制御するタンパク質については、ほとんど明らかになっていない。

またSNAREは、小胞の膜への融合を直接引き起こすタンパク質である。SNAREには、t-SNAREとv-SNAREの2種の分子がそれぞれ異なる膜に存在し、互いに結合することで、膜融合やペプチド分泌を引き起こす。

本研究では、SNAREタンパク質のカイコ脳内における局在から、神経ペプチド分泌に関与するSNAREタンパク質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

SNAREタンパク質のうち、t-SNAREであるSNAP25とSyntaxin1A、v-SNAREであるVAMP2のcDNAをカイコ脳から分離し、大腸菌内でタンパク質を発現し、カラムクロマトグラフィーにより精製後、発現タンパク質を用いてウサギとラットで抗体を作成した。次に、抗体を用いた免疫組織染色に関しては、SNAREが脳の中の神経ペプチドを分泌する神経細胞に局在するかを検討した。組織はカイコの脳およびアラタ体の切片を用い、蛍光二重染色により同じ神経細胞に局在するかを検討した。

その結果、SNAP25はカイコ脳内の中心付近が広く染色された。Syntaxin1Aは、脳の中心部に存在する複数の神経細胞が染色された。VAMP2は脳内の中心付近が広く染色され、脳中心部の一部の細胞も染色された。カイコのインスリン様タンパク質のBombyxinの染色箇所はSNAP25とは部分的に一致し、Syntaxin1Aについては、局性が一致した。また、前胸腺刺激ホルモンPTTHの染色箇所は一致しなかった。

\*13 HPLC-ELSDによるヒトABCタンパク質の脂質排出活性測定手法の確立

○高橋智<sup>1</sup>、北悠人<sup>1</sup>、木岡紀幸<sup>1</sup>、植田和光<sup>2</sup>、木村泰久<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京大・iCeMS)

【目的】

ABCタンパク質は、ATP結合・加水分解のエネルギーを用いて基質を輸送する能動輸送体である。ヒトは48種類のABCタンパク質を持ち、これらのタンパク質は脂溶性化合物からの生体の保護、脂質恒常性の維持など様々な役割を持つ。ヒトのABCタンパク質のうち、脂質輸送型のABCタンパク質はリン脂質やコレステロールの輸送に関与し、その機能異常は、動脈硬化、黄斑変性、アルツハイマー病など、様々な疾病に関連する。ヒトABCタンパク質のうち、輸送する化合物が未知であるものは10種類以上あり、これら基質未知のタンパク質の中には多くの脂質輸送体が含まれると考えられる。これらのタンパク質の基質を特定することは、脂質恒常性維持機構のさらなる理解につながる。

機能未知のABCタンパク質が脂質輸送に関与するかを明らかにするためには、複数の脂質種を同時に検出・定量する必要がある。酵素を用いた測定方法が脂質定量に広く用いられるが、この手法は一斉分析に不向きである。また、質量分析系を用いた検出では脂質種間の定量的比較ができない。そこで本研究では、様々な脂質種を同時に検出・定量する簡便な一斉分析系の確立を目的とした。

【方法・結果】

本研究では、順相クロマトグラフィーによって、極性頭部の構造に基づいてリン脂質種ごとに分離することを試みた。検出には蒸発光散乱光検出器 (ELSD) を用いた。グラジエント条件の最適化により、コレステロール、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンなど、主要な膜脂質を分離でき、20~800 ngの範囲で定量できる分析系が確立できた。

次いで、コレステロールとPCを排出するヒトABCA1とヒトABCB4について本手法を用いて活性測定を行った。ABCA1またはABCB4をHEK293細胞に一過的に発現させ、脂質受容体としてアポリポタンパク質A-Iもしくは胆汁酸を加え、脂質を排出させた。この培地を回収し、HPLCで分析したところ、脂質受容体依存的なPCとコレステロールの排出を観測できたことから、本実験系は生細胞を用いた分析にも利用可能であることが確認できた。さらに、ABCA1とABCB4の分析結果からはPC以外のリン脂質は検出されず、これら2つのタンパク質がコレステロールとPCを主に排出していることが明らかになった。

要旨

受賞講演

ポリフェノールの体内動態に関する研究

富森 菜美乃 (サントリーウエルネス株式会社)

多くの野菜、果実や穀物などに含まれている植物由来のポリフェノールには、様々な生理作用が知られている。日常の食事からだけでなく、サプリメント等からポリフェノールを摂取する機会も増えている。摂取するポリフェノールの体内動態を理解、把握しておくことは、摂取したポリフェノールが体内でどのように効果を発揮しているのかを考える上でとても大切なことである。また体内動態を把握しておくことは、有用性のみならず安全性を担保する上での科学的根拠の一つとなる。

セサミンはゴマリグナン的一种で、ゴマ種子中に約1%程度含まれる成分である。エピセサミンはセサミンの立体異性体であり、ゴマ油の製造過程でセサミンからエピセサミンに約半分程度変換されることで得られる成分である。セサミンやエピセサミンには生体内での抗酸化作用<sup>1)</sup>、抗炎症作用、日常的に疲労を感じている方の睡眠の質に関する主観的状态改善など様々な生理機能<sup>2)</sup>が報告されており、これらを含むサプリメントは健康維持のために利用されている。

そこで、ポリフェノールの体内動態研究の一例として、セサミンとエピセサミンについて紹介する。セサミンとエピセサミンの吸収・分布・代謝・排泄について詳細に調べた<sup>3)</sup>。また、*in vitro* 試験でヒトにおけるセサミンおよびエピセサミンの代謝物を同定した後、セサミンおよびエピセサミン単回摂取時および28日間反復摂取時の体内動態を調べた<sup>4), 5)</sup>。セサミンおよびエピセサミンの体内動態を把握することは、科学的根拠に基づき有用性と安全性を考え判断する一助となっている。

(参考文献)

- 1) Nakai M et al., *J Agric. Food. Chem.*, 51, 1666-70, 2003.
- 2) Takemoto D et al., *Glob J Health Sci*, 7, 1-10, 2015.
- 3) Tomimori N et al., *Mol Nutr Food Res*. 61, doi: 10.1002/mnfr.201600844, 2017.
- 4) Tomimori N et al., *Biol Pharm Bull*, 35, 709-16, 2012.
- 5) Tomimori N et al., *Biopharm Drug Dispos*, 34, 462-73, 2013.

名前: 富森 菜美乃 (TOMIMORI Namino)

連絡先: 〒619-0284 京都府相楽郡精華町精華台 8-1-1 サントリーワールドリサーチセンター サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所

e-mail: Namino\_Sugiura@suntory.co.jp

略歴:1996年3月 岡山大学農学部総合農業科学科卒業
1996年4月 サントリー株式会社 生物医学研究所配属
2000年10月 同 基礎研究所配属
2001年03月 同 健康科学研究所配属
2002年03月 同 食品研究所配属
2003年10月 同 健康科学研究所配属
2009年04月 サントリーウエルネス株式会社に社名変更
現在に至る

主な研究テーマ: 食品成分の体内動態研究

要旨

特別講演

特別講演「神戸発！先端バイオ研究:ゲノム編集とスマートセル」

塩基編集技術の開発と育種応用

西田 敬二（神戸大学 先端バイオ工学研究センター・
大学院 科学技術イノベーション研究科）

（発表要旨）

ゲノム編集技術としてこれまで ZFN、TALEN、CRISPR などのプログラム可能なヌクレアーゼによる DNA 切断が主流であり、基本的には標的部位において DNA 二重鎖切断を引き起こした後に宿主細胞が修復する過程で配列の変換を期待するものである。これまで遺伝子操作が困難であった材料においても非常に有効であること、また外来 DNA 断片を残さないために遺伝子組み換えの規制が適用されない可能性があることから、医療分野から農業分野に至る応用化に向けて急速に導入が進められている。一方、課題として、改変配列あるいは相同組み換えの不確実性や、また細胞毒性によって適用が困難な細胞もあった。

ヌクレアーゼに代わるエフェクターを用いることによってより多様なアプリケーションの開発も進んでおり転写制御やエピゲノム操作なども開発されてきたが、特にゲノム配列の改変においてヌクレアーゼの課題を補完しうる、DNA 脱アミノ化反応を触媒するデアミナーゼ等を用いる Base editing（塩基編集）の技術開発と応用展開が広がってきている。

現状、塩基編集は主にヌクレアーゼ失活型の CRISPR/Cas9 に脱アミノ化酵素を結合させることで DNA 塩基の変換反応を行い点変異を実現する。これによってこれまで DNA 切断に関わる不確実性や毒性を回避することができ、またドナーDNA の挿入なしに精密な配列改変が可能となるため、遺伝子治療から植物育種までの幅広い応用可能性が期待されている。また変換できる塩基の種類や、標的とできる領域の幅などについての制約を克服すべく技術開発が競われている状況になっている。本講演では塩基変換技術について、開発の過程や動作原理を解説しつつ、直近の技術進歩や派生技術、また育種を含めた様々な応用展開とその可能性について紹介したい。

（参考文献）

- 1) Banno S, et al. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol.* Feb 5. doi: 10.1038/s41564-017-0102-6. (2018)
- 2) Shimatani Z, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol.* Mar 27. doi: 10.1038/nbt.3833. (2017)
- 3) Nishida K, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, Aug 4. pii: aaf8729. (2016)

名前:西田 敬二 (NISHIDA Keiji)

連絡先:〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-49

神戸大学統合研究拠点アネックス棟 306 号室

e-mail:[keiji\\_nishida@people.kobe-u.ac.jp](mailto:keiji_nishida@people.kobe-u.ac.jp)

略歴:2001年3月 東京大学理学部生物科学科卒業

2006年3月 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻博士後期課程修了

2006年4月～2008年4月 立教大学理学部博士研究員

2008年5月～2013年5月 ハーバード大学医学部博士研究員

2013年6月～2016年3月 神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究部
特命准教授

2016年4月～2016年10月 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科
特命准教授

2016年11月～ 神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科 教授

2018年7月～ 神戸大学 先端バイオ工学研究センター 教授

神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科 兼任

2018年11月～ 神戸大学 先端バイオ工学研究センター 副センター長
及び 先端プラットフォーム技術開発部門・部門長

現在に至る

主な研究テーマ: ゲノム編集技術、人工進化、細胞内共生

特別講演「神戸発！先端バイオ研究:ゲノム編集とスマートセル」

スマートセルインダストリーに資するメタボローム解析技術の開発と応用

蓮沼 誠久（神戸大学 先端バイオ工学研究センター
・大学院科学技術イノベーション研究科）

次世代シーケンサーの開発、分析装置の高解像度・高感度化、遺伝子・タンパク質配列解析等の情報解析技術の進展により、バイオ関連データが爆発的に増加している。他方、ゲノム編集や DNA 合成に代表される遺伝子工学ツールに革新が起こり、バイオ操作を自動で行うラボオートメーションが実装されつつある。そこで、ビッグデータから抽出した有用情報を活用し、先端的な遺伝子工学で生物代謝を改変する Engineering Biology の社会実装が世界的に進んでいる。我が国ではサイバー空間とフィジカル空間が高度に融合した「超スマート社会」を未来の姿として共有し、これを世界に先駆けて実現するための取り組みを強力に推進している。バイオモノづくり分野では爆発的に増加するバイオデータとバイオテクノロジーを有効に繋ぐことにより、化学品、食品、その他の新機能材の創出がこれまでにない期間、コスト、性能で開発できることが期待されている。こうした背景の下、2016年度から NEDO スマートセルプロジェクトが実施されている。「高度に機能がデザインされ、機能の発現が制御された生物細胞」をスマートセルと定義し、スマートセルを用いた次世代産業「スマートセルインダストリー」の構築が期待されている。微生物は代謝系の中で多くの化合物を作り出すことができることから、その機能を最大限活用することで、高効率な物質製造プロセスを構築することができる。しかしながら、細胞の代謝システムは複雑に制御されており、従来手法では生産性の向上に限界があった。代謝フラックスを改変する意図をもって代謝系酵素の遺伝子導入を試みても、内性の調節機構に阻まれ、目論見通りに代謝改変を実現できる例は多くない。代謝工学では、過去の知見に基づいて、遺伝子の発現量を変化させて代謝経路を改変するが、研究者の知識は効果的な代謝改変の戦略構築に必ずしも十分でなく、成功例は限定的である。すわなち、試行錯誤の要素が大きく、物質生産技術の開発に時間がかかり、期待する生産を実現できないケースも多かった。スマートセルプロジェクトでは生産性の高い微生物を短期間で育種するための高度な情報解析技術や計測技術と先進バイオ技術の統合、最適な自動化を目指し、これまでに開発してきたエッジ要素技術(バイオインフォマティクスによる代謝経路設計技術・遺伝子発現ネットワーク解析技術・遺伝子配列設計技術、長鎖 DNA 合成技術、動的メタボローム解析、定量ターゲットプロテオーム解析等)を有機的に連携させた独自の Design/Build/Test/Learn (DBTL) システムとして「スマートセル創出プラットフォーム」の開発に取り組んでいる。評価系としてはメタボロミクスを中心に、多様な微生物に対して大量のデータセットを精度良く、高い再現性で提供する計測技術の開発に取り組んでいる。メタボロミクスは、細胞内の代謝物蓄積量をスナップショット的に俯瞰できる技術と

して有効であるが、安定同位体炭素を用いた *in vivo* ^{13}C 標識技術を組合せることにより、化合物のターンオーバーも観測することが可能となり、代謝物の蓄積量と動的変動（時間変化）を同時に俯瞰することが可能になる。これにより、細胞内における炭素原子の分配が分かり、代謝経路中のボトルネック反応の特定が進んでいる。一方、高度な情報解析技術を有効に活用するためには、大規模で多様性に富んだデータセットを体系的に取得する必要がある。しかしながら、現状のメタボローム解析は必ずしもハイスループットとは言えない。また、スループットを優先してデータの精度を落とすこともできない。高精度かつハイスループットなメタボローム解析技術の開発は、微生物育種戦略の立案に要する時間を短縮し、代謝メカニズムを反映した現実性の高いスマートセルの設計図の構築に寄与することが期待されている。本講演ではスマートセル創出プラットフォームに資するメタボローム解析の現状について紹介したい。

(参考文献)

- 1) Vavricka et al., *Trends Biotechnol.*, S0167-7799(19)30178-7, 2019
- 2) Bamba T. et al., *Metab. Eng.*, 56, 17-21, 2019
- 3) Guirimand G. et al., *Green Chem.*, 21, 1795-1808, 2019
- 4) Vavricka C.J. et al., *Nat. Commun.*, 10, 2015, 2019
- 5) Hasunuma T. et al., *Metab. Eng.*, 48, 109-120, 2018
- 6) Kono T. et al., *Nat. Commun.*, 8, 14007, 2017

名前: 蓮沼 誠久 (HASUNUMA Tomohisa)

連絡先: 〒657-8501 兵庫県神戸市六甲台町 1-1

神戸大学先端バイオ工学研究センター

e-mail: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

略歴: 1998年3月 大阪大学工学部応用生物工学科卒業

2004年3月 大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻博士課程修了

2004年4月 地球環境産業技術研究機構(RITE) 研究員

2008年4月 神戸大学大学院工学研究科応用科学専攻 学術推進研究員

2008年7月 同 特命助教

2009年8月 神戸大学自然科学系先端融合研究環 講師

2011年7月 JST さきがけ研究者(兼任)

2012年8月 神戸大学自然科学系先端融合研究環 准教授

2015年3月 同 教授

2016年4月 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 教授

2018年7月 神戸大学先端バイオ工学研究センター長, 現在に至る

主な研究テーマ: メタボロミクスを活用した代謝制御メカニズムの解明と物質生産への応用

日本農芸化学会関西支部第511回講演会
幹事校 神戸大学

代表： 吉田 健一
庶務： 金丸 研吾
石川 周

<お知らせ>

- 支部幹事・参与会は、11：45 から神戸大学農学部 B204 教室にて開催いたします。
- 懇親会を18：10より神戸大学アカデミア館3階「さくら」にて開催します。奮ってご参加ください。
参加費：一般 事前 4,000 円（当日 5,000 円）、学生：1,000 円
- 次回支部例会（第512回講演会）予定
開催日時：2020年2月1日（土）
会場： 京都大学百周年時計台記念館2階 国際交流ホール
口頭発表申込締切： 2019年12月27日（金）
講演要旨提出締切： 2020年 1月 7日（火）
講演会参加申込締切： 2020年 1月16日（木）
懇親会参加申込締切： 2020年 1月23日（木）

問い合わせ先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院農学研究科
村井 正俊
E-mail： m\_murai@kais.kyoto-u.ac.jp
Tel： 075-753-6406
Fax： 075-753-6408

日本農芸学会 関西支部 事務局
支部ホームページ <http://kansai.jsbba.or.jp/>

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院農学研究科内

庶務幹事

Tel： 075-753-6394
Fax： 075-753-6456

会計幹事

Tel： 075-753-6395
Fax： 075-753-6454

2019年12月7日 発行