

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05371

研究課題名（和文）代謝産物を直接活用可能な細胞プラスチックの新規利用プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Research and development of a novel platform of cell-plastics directly to use its metabolites

研究代表者

中西 昭仁（NAKANISHI, Akihito）

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：60640977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究より培養経時的な細胞死だけではなくUV-C照射による殺処理による細胞死を生死判定し、細胞死に関連するタンパク質成分の漏出が認められた。細胞プラスチック成型では外郭構造にヘリックスの長鎖長を有するタンパク質が細胞間接合に重要であることがわかり、特定の培養時期や殺処理された細胞を使用すると、細胞同士を接合させやすく、成型しやすくなることを示した。細胞プラスチックの成型時の香気成分は、GC/MSの解析の結果、抗菌性物質cis-2-Penten-1-olとして同定された。以上から、緑藻細胞を直接的に細胞プラスチックの原料とし、かつ細胞の生産する代謝産物を直接的に利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞カプセル技術については、必要な時期に細胞内容物を漏出させることが重要である。細胞死に際し、タンパク質成分の漏出が認められ、外郭構造にヘリックスの長鎖長を有するタンパク質が細胞間の接合に重要な内容物であると同定されている。以上から、細胞同士を接合させやすく、成型しやすくなる状態の細胞を示した。また、細胞プラスチックの香気成分を抗菌性物質として同定した。抗菌成分はプラスチック利用において重要な性能であり、細胞プラスチック利用における有意な成果だと考えた。従って、緑藻細胞を直接的な原料とし細胞の代謝産物の直接的な利用の可能性を示したことは代謝物の使用選択幅を広げた点で学術的に意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Cell viability and leakage of the cell-contents such as lipids and proteins were analyzed to evaluate the effect of the cell death by not only over time during culture but also sterilization treatment with UV-C irradiation. As a result, the leakage of protein components was observed derived from the cell death. In cell plastic fabrication, the proteins with long chains of -helices in the outer structure could play an important role in the cell-attachment, meaning that the cells in protein-leaking phase could easily contact each other and fabricated. As a result of GC/MS analysis, the aroma component from the cell plastics was identified as the antibacterial substance cis-2-penten-1-ol. The above research results displayed the possibility of using green algae cells directly as a raw material for cell plastics and directly utilizing the metabolites produced by the cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：細胞プラスチック 光合成微生物 細胞内容物

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、研究代表者らは新規バイオマスプラスチックとして、緑藻細胞を直接的に素材に用い成型した細胞プラスチックを提案した。当初は、細胞プラスチックの研究開発の初期段階であり、細胞の接合因子や有効利用可能な細胞内容物についての知見が不十分であった。そのため、単細胞緑藻のバイオマスプラスチック素材としての利用については、単細胞故に成形には細胞同士の効果的な接合が求められ、その接合には細胞が自発的に接合因子を生産する必要があると考えた。また細胞内容物の漏出についても、どのような処理が至適なのかも不明点が多く、物理的な処理や細胞の経時劣化を含め検討する必要がある。細胞の産生する有用物質についても、本研究で用いる *C. reinhardtii* NIES-2239 株のエレクトロポレーションを用いた形質転換系の最適化を加味し、遺伝子工学的な細胞の形質転換で生産可能性のあったビタミン E を挙げた。その他の有用物質についても、付加価値のある細胞プラスチックの利用を拡充する意味で、検討する必要がある。

以上のように、本研究申請案の内容を基に、細胞プラスチックの効果的な成形法の理解や細胞の有効利用法の研究開発が必要であった。

2. 研究の目的

細胞が適切に内容物を保有ならびに漏出する「細胞カプセル技術」と、ゲノム編集による形質転換株の創生ならびに接合法の開発で「細胞プラスチック成型/利用技術」を確立し、有用物質を生産するプラスチック原料の利用プラットフォームの構築を目的とした。

3. 研究の方法

既存の細胞プラスチックの作製には、緑藻の標準株である *C. reinhardtii* NIES-2239 株を原料にした。細胞からの細胞内容物の流出については、培養液の上清を対象にタンパク質の存在については BCA アッセイ法を使用、油脂の存在については GC/FID、炭水化物の存在については アンスロン法で評価した。細胞から内容物を流出させる手法としては、培養による細胞の経時劣化と UV-C 照射による殺処理法を採用した。*C. reinhardtii* の遺伝子導入はエレクトロポレーション法で試み、*Saccharomyces cerevisiae* 由来のプレフェン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) の導入を試みた。自立型プラスミドを用いた形質転換と、標的の遺伝子断片と CRISPR-Cas9 タンパク質を同時に用いた細胞の形質転換を試みた。形質転換体のセレクションにはゼオシン耐性遺伝子をマーカーを用いて実施した。細胞内の代謝動態を予測するために、注視する周辺の代謝経路の遺伝子情報が取得し、qPCR による網羅的な遺伝子転写レベルの解析を行った。香気成分は細胞プラスチック成型後に密閉容器にて静置し、容器の気相部分を回収し GC/MS で評価した。

4. 研究成果

緑藻細胞を細胞プラスチックの素材として利用する場合、細胞内の油脂は保湿成分としての価値がある。また一方で細胞が破壊され、タンパク質が細胞から流出すれば細胞同士を繋ぐ接合因子としての価値がある。そこで細胞の殺処理に細胞構造を維持させやすく殺処理法の有力な選択肢の一つ UV-C 照射を用いたが、細胞内代謝産物やその代謝などの細胞応答への影響は不明であった。そこで本研究は *C. reinhardtii* に対する UV-C 照射の影響を細胞生存率、油脂含有率とその組成、遺伝子転写量の推移で評価し、その応答を明らかにした。はじめに、UV-C

照射強度 $3.49 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 細胞液深度 5 mm であれば細胞密度 $1.6 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下の場合 10 分間の UV-C 照射で細胞が死滅することを示した。次に、UV-C 照射前後で細胞内の油脂に有意な差が見られないことを明らかにした。さらに、トランスクリプトミクス解析において、ストレス応答で油脂合成に代謝を流そうとするのではなく、UV-C の照射が *cyclopropane fatty acid synthase* などの油脂合成の主要な遺伝子転写量の低下によって油脂の合成が阻害され、*enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase* といった油脂の分解や *isocitrate dehydrogenase (NAD⁺)* といった TCA 回路の NADH^{2+} や FADH^2 の生産を促す代謝関連遺伝子が活性化したことを明らかにした。さらに、UV-C を照射された細胞が内容物の漏出に働くのかについて評価したところ、タンパク質の漏出と油脂の細胞での維持を確認した。タンパク質の漏出は細胞接合に、油脂の維持は有用物質の保持に繋がるため、細胞を細胞プラスチックの素材として用いる上で有利であることを示した。特に、今まで明らかにならなかった UV-C 照射時の緑藻細胞内の遺伝子転写量応答とエンドプロダクトとしての油脂含有率ならびに構成比の不変は、本研究ではじめて明らかになった点で学術的な意義があった。

またエレクトロポレーションによる導入の最適化を進めた結果、現在までに *C. reinhardtii* のゲノム編集用の条件の最適化、*C. reinhardtii* へのビタミン E 生産関連遺伝子の導入、ゲノム編集により FKB12 にビタミン E 合成関連遺伝子の挿入に成功した。しかしながら、世代を経るごとに形質転換体の生存が難しくなることも併せて明らかになり、二本鎖 DNA に直接影響を与える選択マーカーのゼオシンが選択圧として強すぎて悪影響を及ぼした可能性を示唆した。

また、有用物質としては油脂だけではなく、細胞プラスチックの成型時に得られる香気成分も評価した。GC/MS の気相画分の解析の結果、香気成分は抗菌性物質 *cis-2-penten-1-ol* として同定された。抗菌成分はプラスチック利用において重要な性能であり、細胞プラスチック利用における有意な成果だと考えた。以上の研究成果から、緑藻の細胞を直接的に細胞プラスチックの原料とし、細胞の生産する代謝産物を直接的に利用できる可能性を示した。

本研究の進捗によって、上記のとおり、細胞を細胞プラスチックの材料に用いた場合、細胞内の代謝物を直接的に使用可能にするための研究内容に大幅な進捗が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Akihito, Ozawa Nanami, Watanabe Masahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of Shifts of Gene Transcription Levels of Unicellular Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Due to UV-C Irradiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 633 ~ 633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11030633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根本 進太郎、中西昭仁
2. 発表標題 細胞プラスチック形成における細胞接合因子の特定
3. 学会等名 日本生物工学会 第76回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 根本 進太郎、中西昭仁
2. 発表標題 細胞プラスチック形成における細胞内容物の多角的な特性評価
3. 学会等名 日本生物工学会 東日本支部会 第18回 学生発表討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------