

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04569

研究課題名(和文) ナノバブルによるプロトプラスト機能の活性化と有用物質の高速度生産システムの開発

研究課題名(英文) Activation of protoplast function by nanobubbles and development of high-speed production system for useful metabolites

研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI, Hideki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：独自に構築したナノバブル生成システムにより様々なガスのナノバブルを高効率に生成し、種々の培養系に適用できた。酵母や植物の細胞やプロトプラストを用いて種々検討した結果、プロトプラストは細胞に比べて高い物質移動能やペリプラズムに蓄積する有用物質のフィードバック制御からの解放など、優れた特性を有することが示唆された。プロトプラストはナノバブルに対する応答性が高い可能性が示唆された。ナノバブルを酵母や種々の植物の細胞やプロトプラストに作用させることで、様々な有用物質を効率的に生産できた。また、バイオリアクターを構築すると共に、果実の追熟、微生物の不活化、果実表面の農薬除去など幅広い利用性を提案できた。

研究成果の概要(英文)：The nanobubble generation system was originally developed. This system can generate nanobubbles of various gases with high efficiency. The generated nanobubbles could stably exist in different solutions and media. Various investigations using yeast, plants cells and protoplasts suggested that the metabolites biosynthesized by protoplasts were released into the culture broth, with the double benefits of increasing the overall productivity and facilitating downstream processing. Various nanobubbles enhance those phenomena. Application of nanobubbles to yeast, various plants cells and protoplasts resulted in efficient production of useful metabolites. The bioreactor capable of supplying nanobubbles was also developed. The nanobubbles can be also used for ripening of fruit, inactivation of microbes, removal of chemicals on fruit surface, etc.

研究分野：生物化学工学、細胞機能開発工学

キーワード：ナノバブル エチレン プロトプラスト バイオリアクター 追熟 植物 微生物 細胞壁

## 1. 研究開始当初の背景

20世紀は微生物、植物などの細胞を用いた有用物質生産の時代であったが、現在、細胞を用いる従来の有用物質生産は頭打ちの状態にあり、それを基本に発展してきた生物関連産業は停滞し、閉塞状態にある。

本申請者は、この現状を打破する方法論の確立を目指し、細胞に代わる有用物質生産の新たな担い手として、細胞の細胞膜の外側にある細胞壁を除去したプロトプラストに注目し、その機能解析をおこなうとともに、ナノバブルを活用することで、プロトプラスト機能を拡大し、有用物質生産へ応用することを考案した。さらに、ナノバブルの利用性の拡大を試みた。

## 2. 研究の目的

20世紀は微生物、植物などの細胞を用いた有用物質生産の時代であった。しかしながら現在、細胞を用いる従来の有用物質生産法は頭打ちの状態にあり、それを基本として発展してきた生物(細胞)関連産業は停滞し、閉塞状態にある。そのため、この現状を打破できる新たな方法論の確立が必要である。

申請者は、微生物や植物の細胞が有する細胞膜の外側にある“細胞壁”を除去したプロトプラストが有する優れた機能に注目し、細胞に代わる有用物質生産の新たな担い手として、プロトプラストの可能性について研究を遂行してきた。

本研究では、これまで申請者が実施してきた「プロトプラストによる有用物質生産研究」および「培養用のナノバブルの効率的作成システムの開発」を行う過程で見出した、独自の現象を解析するとともに、有効活用し、新規な有用物質の高速生産システムの開発を試みる。さらに、ナノバブルの新たな利用展開についても検討をおこなう。

## 3. 研究の方法

微生物のモデルとして酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を実験に使用した。種々の条件下で*S. cerevisiae*の細胞とプロトプラストを培養し、代謝産物総体の違いや培養特性などを比較解析した。

植物のモデルとしてニチニチ草(*Catharanthus roseus*)やイチイ(*Taxus cuspidata*)の培養細胞(二酸化塩素を使用し、高効率に誘導)やそのプロトプラストを作成し、種々の培養実験や代謝産物の解析を行った。

多孔性ガラス膜を装備したナノバブル生成システムを独自に作製し、種々のガスのナノバブルを作成した。コールターカウンターを用いてナノバブルの粒径分布や個数の測定をおこなった。

ナノバブルが微生物や植物の細胞、プロト

プラストの生理活性に及ぼす影響を、代謝産物の挙動や培養特性に基づき解析した。

得られた知見を活用し、ナノバブルの供給が可能なバイオリアクターシステムを設計、構築した。

## 4. 研究成果

本研究で構築したナノバブル生成システムを用い、ナノバブルの効率的な生成条件を設定した結果、エチレンや酸素などの種々のガスのナノバブルを高効率で生成できた。コールターカウンターを用いて、経時的にナノバブルの粒径分布や個数を測定し、その挙動を把握した結果、生成したナノバブルは種々の溶液や培地中で長期間、安定に存在していることが確認された。

*S. cerevisiae*の細胞とプロトプラストを用いて種々検討した結果、プロトプラストは細胞に比べて高い物質移動能やペリプラズムに蓄積する有用物質のフィードバック制御からの解放など、優れた特性を有することが示唆された。得られた知見を活用し、組換え微生物が細胞内に生産した異種タンパク質を蓄積してしまう問題の解決にプロトプラスト機能の適用を試みた。異種タンパク質のモデルとしてクチナーゼを選択し、組換え酵母プロトプラストを作成し、種々検討した結果、細胞壁がクチナーゼ分泌の障壁になっていることが示唆された。細胞壁を除去したプロトプラストではクチナーゼが培養液中に分泌生産され、全体の生産量も増大した。物理的な強度に乏しいプロトプラストの脆弱性を補うために、プロトプラストに人工細胞壁を装着させることを考案し、種々検討した結果、アルギン酸カルシウムカプセルでプロトプラストを包括し、培養条件を最適化することで、攪拌振盪培養条件下でもプロトプラストは破壊されることなく、良好にクチナーゼを分泌生産することが可能となった。さらに、培養系に酸素ナノバブルを供給することにより、クチナーゼ生産が促進した。

酵母プロトプラストをアルギン酸カルシウムカプセル内に接種し、適切な培養条件を設定し、培養したところ、カプセル内で細胞壁成分が生産、蓄積され、細胞壁成分を高濃度を含むカプセルを作成することができた。さらに、培養系に酸素ナノバブルを供給することにより、細胞壁成分の生産が促進した。生産された細胞壁成分は植物細胞や動物細胞に対し優れた生理活性を示した。

以上、得られた知見を活用し、種々のバイオリアクターを構築した。

植物のモデルとして、ニチニチ草とイチイの培養細胞とプロトプラストを用いて種々検討したところ、細胞に比べてプロトプラストは高い物質移動能およびペリプラズムに蓄積する有用物質のフィードバック制御からの解放など、優れた特性を有することが示

された。

エチレンナノバブルおよび酸素ナノバブルを含む培地でニチニチ草とイチイの培養細胞やプロトプラストを培養した結果、コントロールと比べてアジマリシン（血圧降下作用を有するインドールアルカロイド）やパクリタキセル（抗癌作用を有するタキソイド系化合物）の生産量が顕著に増大した。特に、今回、使用したニチニチ草とイチイのプロトプラストではナノバブルによる有用物質の生産促進効果ならびに細胞外への分泌生産は細胞に比べて10倍以上の高い値を示した（プロトプラストは細胞に比べて各種ナノバブルに対する感受性が高い傾向を示した）。

さらに、エリシターであるメチルジャスモン酸（MeJA）とエチレンナノバブルや酸素ナノバブルを含む培地を使用し、培地交換を行いながら細胞やプロトプラストを培養した結果、アジマリシンやパクリタキセルの生産が増大した（アジマリシン=約50 mg/L、パクリタキセル=約40 mg/L）。また、細胞の培養系では検出されなかった複数の代謝産物がプロトプラストの培養系でみられた（化合物の同定については現在検討中）。

以上、得られた知見を活用し、種々のバイオリアクターを構築した。また、スケールアップした植物培養系において雑菌汚染の早期発見の必要性が生じ、種々検討する過程で、エンドキシンの高感度、迅速測定法を開発し、その有用性を示した。

ナノバブルの利用性の拡大を目指し、エチレンナノバブルを含む水溶液を植物の種子に噴霧したところ、エンドウの種子の発芽を著しく阻害した。一方、カイワレ、ニチニチ草、レタスの種子に対しては顕著な発芽促進効果が認められた。

産業界においてエチレンガスを使用して果実追熟をおこなっていることに着目し、エチレンナノバブルがバナナの追熟に及ぼす影響を解析した。未熟状態のバナナ果実（Bobby：低地栽培とSweetio：高地栽培の2種類）を、エチレンナノバブルを含む水溶液に5分間浸漬後、成熟度を解析した。エチレンナノバブルを作用させたバナナではコントロールと比較して、果皮色の変化、クロロフィルの減少、硬度低下、糖度上昇が非常に短い時間でみられた。また、エチレンナノバブルとMeJAを作用させることで追熟促進効果がみられた。

さらに、本研究で開発した技術は、ニチニチ草やイチイの水耕栽培（植物工場のモデル）による有用物質の分泌生産促進、大腸菌の不活化、果実表面の農薬の洗浄など、幅広い分野で活用できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Masato Takahashi, Hideki Aoyagi, Practices

of shake-flask culture and advances in monitoring CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. Applied

Microbiology and Biotechnology, 査読有, 102, 2018, 4279-4289, DOI:10.1007/s00253-018-8922-8

Whangchai, K., Uthaibutra, J., Nuanaon, N., Aoyagi, H., Effect of ozone microbubbles and ultrasonic irradiation on pesticide detoxification in tangerine cv. Sai Nam Pung. International Food Research Journal, 査読有, 24, 2017, 1135-1139.

Chua Jedton, A., Aoyagi, H., Uthaibutra, J., Pengphol, S., Whangchai, K., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by treatment with different temperatures of microbubbles ozone containing water. International Food Research Journal, 査読有, 24, 2017, 1006-1010.

Dandy Ahamefula Osibe, Nneka Virginia Chiejina, Kazuyoshi Ogawa, Hideki Aoyagi, Stable antibacterial silver nanoparticles produced with seed-derived callus extract of *Catharanthus roseus*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 査読有, 22, 2017, 1-8,

DOI:10.1186/s13568-017-0464-4

Masato Takahashi, Yoshisuke Sawada, Hideki Aoyagi, Development of a circulation direct sampling and monitoring system for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations in the gas-liquid phases of shake flask systems during microbial cell culture. AMB Express, 査読有, 7, 2017, 163,

DOI:10.1186/s13568-017-0464-4

Hideki Aoyagi, Yoichi Katakura, Akio Iwasaki, Production of secretory cutinase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. Springerplus, 査読有, 5, 2016, 160-165, DOI:10.1186/s40064-016-1806-4  
岸下 昇平, 青柳 秀紀, CHO細胞培養におけるIgGモノクローナル抗体の酸性電荷バリエーションに対する温度シフトの影響、バイオインダストリー、査読無、32、2015、59-65.

〔学会発表〕(計11件)

Ajeeta Anand, Hideki Aoyagi, Hydrogen phosphate ion as novel accelerator and inhibitor of Maillard reaction. 化学工学会第49回秋季大会、2017年.

高橋 将人, 青柳 秀紀, 振盪フラスコ培養中のフラスコ気相部が培養微生物群集に及ぼす影響の解析、第69回日本生物工学会大会、2017年.

大瀧 賀也, 青柳 秀紀, LAL固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドキシンの遊離特性の定量的解析(第2報)、第69回日本生物工学会大会、2017年.

猪瀬 陽加、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズを用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用、第69回日本生物工学会大会、2017年。

大瀧 賀也、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズ法を用いた種々のグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析、第5回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2017年。

猪瀬 陽加、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズを用いたエンドトキシンの超高感度・迅速測定法の開発と利用、第5回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2017年。

大瀧 賀也、飯島 綾、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析、第68回日本生物工学会大会、2016。

猪瀬 陽加、飯島 綾、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用、第68回日本生物工学会大会、2016年。

高橋 将人、青柳 秀紀、気相および液相のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>に着目した振盪フラスコ培養法の解析、第68回日本生物工学会大会、2016年。

飯島 綾、青柳 秀紀、LAL固定化ビーズ法を用いた*Escherichia coli*の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析、第67回日本生物工学会大会、2015年。

Hideki Aoyagi, Preparation of the ethylene nanobubbles and it's application for the useful metabolite production. Biotechnology International Congress 2015 “Biotechnology for healthy society”, 2015年。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI, Hideki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025

### (3) 連携研究者

馬場 健史 (BAMBA, Takeshi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：10432444

中尾 洋一 (NAKAO, Yoichi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60282696

王 碧昭 (OU, Hekisyau)

流通経済大学・経済学部・教授

研究者番号：80261775