

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：57301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04116

研究課題名（和文）メタボロミクスを用いたナノ秒パルス電界による生体代謝制御技術の開発

研究課題名（英文）Development of metabolic control technology based on nanosecond pulsed electric field using metabolomics

研究代表者

越村 匡博（Koshimura, Masahiro）

佐世保工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：80610310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノ秒パルス電界（nsPEF）が出芽酵母の代謝に及ぼす影響について着目し、代謝物質の網羅的解析と遺伝子発現解析を行った。nsPEFを印加しても出芽酵母が生成するアルコール量には変化がないことを明らかにした。一方、細胞内の親水性代謝物質においてはコントロール群と処理群の間で差があることが示された。さらに、発現遺伝子においても群間に差があることが明らかとなり、nsPEFを代謝制御へと応用が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超短時間で高エネルギーを放出することができるパルスパワー技術を利用したナノ秒パルス電界（nsPEF）は非加熱的に細胞内の状態を変化させることができるため、生物学分野への応用が期待されているが、作用メカニズムについて不明な点が多いことが問題となっている。今回nsPEF印加によって出芽酵母の遺伝子発現および代謝物質に変化が生じることが明らかとなり、nsPEF印加が微生物の代謝制御技術に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this grant, we examined comprehensive analysis of metabolites and gene expression analysis, focusing on the effects of nanosecond pulsed electric fields on the metabolism of budding yeast. It was found that the amount of alcohol produced by budding yeast was not affected by the application of nsPEF. On the other hand, there were differences in intracellular hydrophilic metabolites between the control and treated groups. Furthermore, it was found that there were differences in gene expression among the groups, indicating that nsPEF may be applicable to metabolic control.

研究分野：農芸化学

キーワード：メタボロミクス ナノ秒パルス電界 出芽酵母 代謝

1. 研究開始当初の背景

超短時間で高エネルギーを放出するパルスパワーは高電界パルス (PEF) やパルス放電プラズマなどの極限環境を作り出すことができるため、近年では電気工学に限らず、バイオ技術、農業、環境分野などへ展開され始めている。特に PEF は生体との親和性が高く、液体低温殺菌やウイルス不活化など医療分野への応用が活発に行われている。このように生物学的用途において有効性が示され微生物や細胞の滅菌・死滅について広く研究されている一方で、細胞増殖の亢進などについてはほとんど研究されておらず、どのように生体に作用しているのかそのメカニズムは未解明な部分が多く、このため生物工学分野における革新的な発展を阻害している。近年ではより細胞に影響を与えられるナノ秒パルス電界 (nsPEF) による細胞活性化について研究が進められているが生体の代謝経路は複雑であり、代謝制御については国内外を通じてほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子およびその表現型である生体内化学反応 (代謝) に対して、遺伝子の発現量解析と代謝物質の一斉分析をすることによって、nsPEF が生体へどのように作用しているかそのメカニズムを解明することを目的とする。本研究で対象とする生物はモデル生物として使用されている出芽酵母とし、細胞膜における電気穿孔の閾値の電界強度を印加する。網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析と代謝物質の網羅的解析 (メタボロミクス) を用いて、nsPEF が微生物の生体内化学反応 (代謝) に及ぼす作用メカニズムを解明し、nsPEF による生体の代謝制御技術の確立へ繋げる。

3. 研究の方法

本研究では具体的な研究の進め方として、nsPEF の出芽酵母生育能への影響実証・解明、細胞増殖およびエタノール生成量を指標とした生体応答実証・解明、nsPEF による遺伝子発現 - 生体内化学反応 (代謝) 相互作用の実証・解明および応用技術開発、の 3 つのステップで取り組んだ。

nsPEF の生体への影響について、最も基本的な生体反応である生死から始まり、出芽酵母の特徴であるエタノール、そして細胞内の親水性化合物へと解析対象を変化させた。最終的には遺伝子発現解析を行うことで、nsPEF の影響を遺伝子レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) nsPEF の出芽酵母生育能への影響実証・解明

パルス幅および繰り返し周波数を固定し電界強度を変化させて nsPEF を印加した後、出芽酵母懸濁液の生菌数の観察と濁度 (OD 値) の経時変化を測定した。メチレンブルー染色法による生存率の算出では、電界強度を大きくするほど生存率は低下する傾向にあることが分かった。OD 値の測定では、いずれの電界強度においてもコントロールと比較して最大値が大きく低下しており、電界強度が大きくなると OD 値の上昇があまり見られなかった。これらの結果より、電界強度を大きくすると出芽酵母が死ぬ割合が高くなることが分かった。一方、生菌数の割合がコントロールとほとんど同じである電界強度において最大 OD 値が低くなっていることから、nsPEF 印加による出芽酵母の増殖抑制が示唆された。

(2) 細胞増殖およびエタノール生成量を指標とした生体応答実証・解明

増殖曲線の測定、膜損傷率の算出およびエタノールの定量分析を行った。電界強度が大きい条件下では定常期に至る時間がコントロールと比較して約 1.5 倍長くなった。その理由としては同条件下においては死滅率がコントロールの約 10 倍であったことが原因であると考えられる。膜損傷率については、細胞膜に対する電気穿孔閾値の電界強度まではコントロールとほぼ同程度であったが、それ以上の電界強度になると膜損傷率は大きく増加し、最大で約 7 倍の差が生じた。これらの結果より、大きな電界強度を印加すると膜損傷により出芽酵母が死滅することが明らかとなった。一方、エタノールの定量分析においては、生菌数をそろえた条件下ではエタノール生成量に変化が生じなかった。これにより、nsPEF を印加してもエタノール生成能に影響しないことが確認された。

(3) nsPEF による遺伝子発現 - 生体内化学反応 (代謝) 相互作用の実証・解明および応用技術開発

メタボローム解析(代謝物質解析)の結果より,コントロール群と処理群の間で群間に差があることが明らかとなった(図1)。また,多くの代謝物質において量的変化が生じていた。これらの結果より nsPEF 印加によって生体内の代謝応答が生じていることが明らかとなった。様々な代謝物質が変化していることから,代謝応答については特定の代謝経路が変化するのではなく複数の経路で変化が生じることが示唆された。RNA-Seq 解析についてはコントロールとある電界強度を印加した菌体について実施した。その結果,コントロール群と処理群の間で群間に違いがあることが明らかとなった。これらの結果より,nsPEF 印加が遺伝子発現に影響を及ぼし,その結果として代謝物質が変化することが分かった。これにより nsPEF の印加条件を詳細に検討することによって代謝物質を選択的に生産する技術を確立することが期待される。

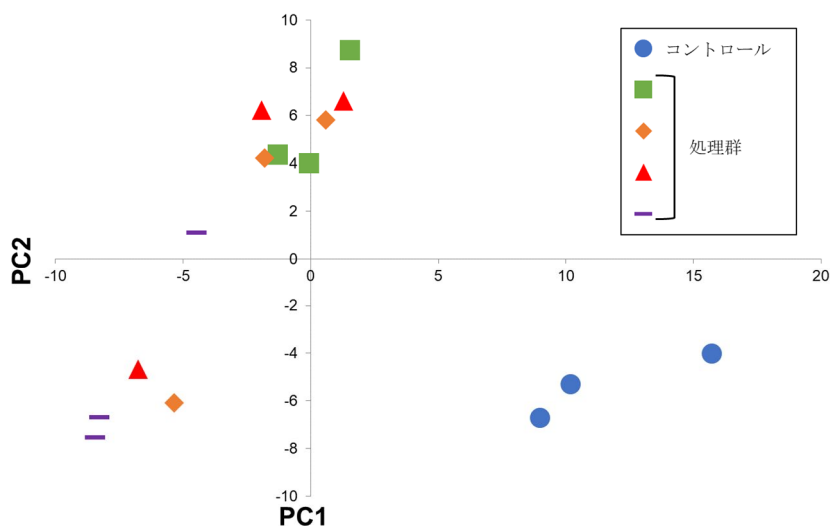


図1 メタボローム解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rin Takeuchi, Azumi Yotsuda, Sakura Hirayama, Takeshi Ihara, Takashi Yamasaki, Masahiro Koshimura
2. 発表標題 The effect of pulse electric field on alcoholic fermentation ability of yeast
3. 学会等名 IUMRS-ICYRAM 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内凜, 猪原武士, 山崎隆志, 越村匡博
2. 発表標題 高電界パルスにおける酵母のアルコール発酵能への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越村匡博, 竹内凜, 四田杏美, 猪原武士, 山崎隆志
2. 発表標題 ナノ秒パルス高電界による酵母代謝への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
研究分担者	山崎 隆志 (Yamasaki Takashi) (20270382)	佐世保工業高等専門学校・物質工学科・教授 (57301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	猪原 武士 (Ihara Takeshi) (30634050)	佐世保工業高等専門学校・電気電子工学科・准教授 (57301)	

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