

平成22年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19360370

研究課題名（和文） プロトプラストの機能を高度利用した新規機能性物質の創製と利用

研究課題名（英文） Utilization of protoplast for producing and screening of useful metabolites and it' s application.

研究代表者

青柳 秀紀（AOYAGI HIDEKI）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00251025

研究成果の概要（和文）：プロトプラスト機能を用いた新規機能性物質の創製と利用を行った。細胞壁を除去したプロトプラストの物質移動速度や移動物質の種類や変動を解析した。独自に見出した酵母プロトプラストの細胞壁成分分泌生産現象を解析し、培養条件を最適化する事で、抗腫瘍活性を有する細胞壁成分を高効率生産できた。人工細胞壁を装着したイチイプロトプラストに、ジャスモン酸類等を供給して培養した結果、タキサン系化合物が高度に生産された。

研究成果の概要（英文）： A high-speed system for production of useful materials using protoplasts was developed. In microbial and plant protoplasts, some products are released freely into the broth with the double consequences of increasing overall productivity and facilitating down stream processing. Furthermore, since many high molecular weight substances which are otherwise not accessible to the cells (due to the presence of cell wall) can directly access the cell membrane in protoplasts, the composition and concentrations of the metabolites produced by protoplasts vary from those produced by cells. It was found that the yeast protoplasts are cultured in a liquid static culture so as to diffuse cell wall components in the culture broth with the result that while maintaining the state of the protoplasts, protoplasts could produce the cell wall components in the culture broth. By optimizing the culture conditions, large amount of the cell wall components with antitumor activity was produced. *Taxus* protoplasts with artificial cell walls produce taxoids efficiently and released the compounds into the medium. Moreover, the adequate supply of methyl-jasmonate, etc. were useful to enhance the taxoids production in *Taxus* protoplasts. This novel system has great potential in useful metabolite production.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物化学工学、細胞機能開発工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：微生物プロトプラスト、植物プロトプラスト、人工細胞壁、細胞壁成分、タキソール、メタボロミクス、バイオリクター、有用代謝産物

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。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、それを基本に発展してきた生物関連産業は停滞し、閉塞状態にある。この現状を打破するためには新たな方法論の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞に代わる有用物質生産の新たな担い手として、微生物や植物の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着目した。プロトプラストが新たな培養環境に接するときに示す適応反応、さらに細胞壁を除去した場合の物質移動速度や移動物質の種類や変動、増殖能の消失によるエネルギー代謝の変動などを、有用物質生産機能の拡大という視点から整理し、得られた知見を背景に、プロトプラストの機能を高度利用した新規機能性物質の創製と利用を行う。

3. 研究の方法

微生物プロトプラストのモデルとしてパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞とプロトプラストの代謝産物総体の違いをメタボロミクス解析により解析する。解析結果に基づき、プロトプラストが新たな培養環境に接するときに示す適応反応、物質移動能の変化、増殖能の消失によるエネルギー代謝の変動を解析した。また、細胞壁を除去した場合の物質移動速度や移動物質の種類や変動についても解析を行った。

得られた知見を活用し、酵母プロトプラストを用いた細胞壁成分の効率的生産条件の検討を行った。また、細胞壁成分の大量生産を行う上で重要な細胞壁成分の実用的な分離精製法の開発を試みた。

植物プロトプラストのモデルとしてイチイ (*Taxus*) のプロトプラストの機能解析を行った。さらに、イチイの細胞壁近傍に微量に存在する有用物質で、社会的ニーズが高い、タキソールなどのタキサン類をターゲットとし、プロトプラストにおける生産挙動を細胞と比較し、タキサン類の生産源および探索源としてのプロトプラストの可能性について検討を行った。

4. 研究成果

パン酵母 (*S. cerevisiae*) を対象に、細胞壁を除去した場合の物質移動速度や移動物質の種類や変動を解析した結果、酵母プロトプ

ラストが生産する細胞壁成分を培養液中に分泌、拡散させ、プロトプラストの近傍に蓄積、沈着しないようにすることにより、プロトプラストの状態を維持したまま細胞壁成分が大量に培養液中に分泌生産され、シート状に蓄積するという特殊な現象を見出した (図1)。(一般的に、パン酵母プロトプラストはゲルなどに包埋し培養すると細胞壁成分を生産し、プロトプラスト近傍に細胞壁成分が蓄積、沈着することで、細胞壁の再生が完了し、細胞に戻り、増殖がはじまる)。

この現象を、酵母プロトプラストを用いた細胞壁成分の新規生産法として活用する事を考案した (プロトプラスト機能を活かした細胞壁成分生産法はこれまで存在していない)。

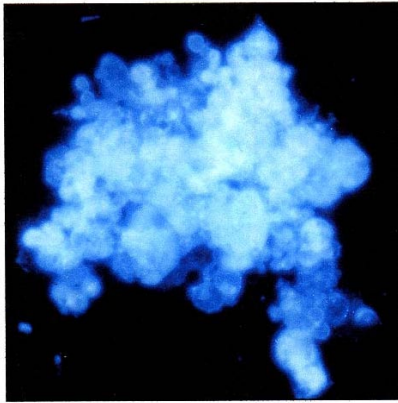


1 cm

図1 パン酵母プロトプラストを適切な条件下で液体静置培養した際の細胞壁成分の分泌生産の様子(培養24h)

パン酵母プロトプラストを適切な条件下で液体静置培養することにより生じる細胞壁成分の分泌生産現象の普遍性について、3種類のパン酵母および *Schizosaccharomyces pombe* のプロトプラストを作製し、適切な条件下で液体静置培養した結果、いずれの酵母プロトプラストにおいても、培養数時間後から肉眼で確認できるサイズの固形物質が培養液中に現れた。固形物質の量は経時的に増加し、培養24時間目にはシャーレの底面を覆い、シート状に蓄積した。酵母プロトプラストが生産した固形物質は β -グルカンの蛍光染色剤で染色された (図2)。

固形物質は酵母細胞壁溶解酵素で処理すると完全に分解された。また、Aculeacin A (β -1,3-グルカン合成阻害剤) を添加した培地を用いてパン酵母プロトプラストを培養した結果、培養液中に固形物質は全く生産されなかった。種々詳細に検討した結果、酵母プロトプラストが生産した固形物質は



— : 25 μm

図 2 パン酵母プロトプラストにより分泌生産された細胞壁成分の Fluostain による蛍光染色写真

いずれも β 1,6/1,3D グルカンを含む細胞壁成分であることが明らかとなった。

通常、酵母細胞から細胞壁成分を得るためには、高い圧力による細胞破碎や薬剤処理が用いられている。これらの操作は煩雑であるとともに、処理を行う過程で細胞壁成分が劣化する。また、使用した薬剤の廃液処理に高いコストがかかる。そこで、プロトプラストが低張液中でバーストする性質に注目し、従来法の問題点を排除した簡便な細胞壁成分の精製、回収法を考案した。パン酵母プロトプラストを液体静置培養した後の培養液を回収し、遠心分離を行うと細胞壁成分はパン酵母プロトプラストと共に全て沈降した。沈降物を蒸留水に懸濁するとパン酵母プロトプラストはすべてバースト（破碎）し、完全にプロトプラストを除去し、簡便に細胞壁成分のみに純化し、回収することが可能であった。

パン酵母プロトプラストによる細胞壁成分の最適生産条件を検討するために、細胞壁成分を簡便かつ迅速に定量できる方法を確認した。セル内の試料の均一混合と温度制御が可能な特殊蛍光光度計を独自に開発し、細胞壁成分に特異的に蛍光染色する色素を用いて蛍光染色した後、開発した特殊蛍光光度計で蛍光強度を測定した。その結果、細胞壁成分の濃度と蛍光強度との間に良好な比例関係が得られ、蛍光強度に基づき迅速に細胞壁成分の量を測定する事が可能となった。

パン酵母プロトプラストの細胞壁成分の分泌生産現象をメタボロミクス（代謝産物総体）解析した結果を活用し、細胞壁成分生産用の培養条件を検討した結果、培養液中のプロトプラストの濃度、培地の pH、浸透圧、培養温度、補因子の添加および培養液の振とう等の条件が細胞壁成分の生産量、品質、形状に大きく影響を及ぼす事を明らかにした。

また、培地に含まれるアミノ酸の組成や量、窒素源の種類や量により、生産される β 1,6/1,3D グルカン含有量が大きく変動した。

実用化を考慮し、経口投与可能な機能性カプセルを開発し、カプセル内にパン酵母プロトプラストを封入することで、脆弱なプロトプラストに物理的強度を付加すると共に、細胞壁成分を効率的かつ大量にカプセル内に生産、蓄積させるシステムを開発した。カプセル作製操作やプロトプラスト培養の簡便性、経口投与可能で食品として安全性が認可されている点を指標に素材のスクリーニングを行い、アルギン酸カプセルを作成した。種々検討した結果、アルギン酸カプセル内にパン酵母プロトプラストを封入し、適切な条件下で培養した結果、細胞壁成分がカプセル内で良好に生産され蓄積した。また、カプセルを蒸留水に懸濁するとパン酵母プロトプラストはすべてカプセル内でバースト（破碎）し、簡便に細胞壁成分のみに純化し、遠心分離の操作を行う事なく、細胞壁成分を封入したカプセルを回収する事ができた。

酵母プロトプラストが生産した細胞壁成分の生理活性の評価実験を実施した際、生産した細胞壁成分を凍結乾燥し、水に懸濁した結果、細胞壁成分は数十～数百 μm のサイズ分布を有しており、均一に分散させる事が困難であった。種々検討した結果、数 μm の細胞壁成分微粒子の調製が可能となった。微粒子化した細胞壁成分は蒸留水に均一に分散した。生産された細胞壁成分は高い抗腫瘍性活性、抗酸化活性およびエリクター活性が認められた（エリクター活性に着目し、細胞壁成分を担持させた植物細胞の培養用シートを作成し、その有用性を示唆した）。

なお、微小重力条件下でパン酵母プロトプラストによる細胞壁成分の分泌生産を試みた結果、ファイバー状の細胞壁成分を生産する事にも成功しており、培養法を種々工夫する事でニーズに応じた様々な形状の細胞壁成分を生産する事が可能である。

本研究により、高純度パン酵母細胞壁成分（ β 1,6/1,3D グルカン）の試薬品化と大量生産システムの構築を行う上で基盤技術が確立され、本系が細胞壁成分の新規生産法として有用である事が示された。

また、本システムは酵母や大腸菌の組換えタンパク質の細胞外分泌生産の系にも高い有効性を示した。

植物プロトプラストのモデルとして、木本性植物のイチイ（*Taxus*）の培養細胞および植物体の葉から作製したプロトプラストを用い、細胞から細胞壁を除去した場合の物質移動速度や移動物質の種類や変動を解析した。その結果、細胞壁を除去したプロトプラストでは、通常の細胞では細胞壁近傍に微量にし

か存在しないタキソールなどのタキサン系化合物の分泌生産が顕著に促進されることを明らかにした。この現象は各種のジャスモン酸類やウロン酸加熱生成物を培地に適切に添加することによりさらに促進された。

また、培養温度と通気条件が設定可能な新規な小型振盪培養システムを開発した。本システムは、(1) 特殊プラグを上部に装備した円筒型培養器を回転振盪することで8連の培養が可能、(2) 取扱が容易で、培養器ごと個別に培養温度 (10~50°C) と通気条件 (ガスの種類や通気量 [0~500 ml/min]) を個別に自由に設定できる (振盪速度、振幅、通気量、温度などの調整により、 $k_L a$ と k_V [培養器の換気能力を示す係数] を任意に設定でき、三角フラスコでは設定できなかった培養環境を実現)、等の特長を有している。本システムを用いて適切な培養条件の探索を行った。

得られた解析結果を総括し、外来性エリシターと内在性エリシターを適切に含有する人工細胞壁を作成し、イチイプロトプラストに装着して、メチルジャスモン酸を添加して培養した結果、タキソールなどのタキサン系化合物の分泌生産が著しく促進された。

さらに、エチレンや酸素のナノバブルやマイクロバブルを高効率で作成できるシステムを構築し、適切に供給を行い、培養した結果、種々のタキサン系化合物の生産が大幅に増大した (細胞を用いた場合の数十倍に増大)。

本研究により、細胞に代わる有用物質生産の新たな担い手としてのプロトプラストの有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Hideki Aoyagi : Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. *Biochemical Engineering Journal* 査読有、DOI: 10.1016/j.bej.2010.05.004 (2010).
- ② Hisashi Semba, Eita Ichige, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, and Hideki Aoyagi: Efficient production of active form recombinant cassava hydroxynitrile lyase using *Escherichia coli* in low-temperature culture. In *Fett-Neto, Arthur Germano (Ed.) Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods and Applications. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 643*, 査読有、*Humana Press*. pp.133-144 (2010).
- ③ Hideki Aoyagi, Hideki Ishii, Ugwu Charles and Hideo Tanaka: Effect of heat generated products from uronic acids on the physiological activities of microbial cells and its application. *Bioresour Technol.* 査読有、99, 4534-4538

(2008).

- ④ Hideki Aoyagi: Application of protoplasts for producing useful metabolites. Proceeding of the international symposium on bioindustry development. Asian association of agricultural colleges and universities. 査読無、P. 63-70 (2007).

[学会発表] (計10件)

- ① 青柳秀紀: プロトプラスト機能を高度利用した有用物質の環境低負荷型生産と探索. JST 新技術説明会, 2010年3月12日, 東京.
- ② 青柳秀紀ら: 培養温度と通気条件が設定可能な小型振盪培養システムの開発. 日本生物工学会, 2009年9月24日. 名古屋
- ③ 青柳秀紀ら: 微小重力が酵母プロトプラストの細胞壁成分分泌生産現象に及ぼす影響. 日本生物工学会, 2009年9月24日. 名古屋
- ④ 青柳秀紀ら: 酵母プロトプラストを用いた細胞壁成分の分泌生産システムの開発. 化学工学会 (学生交流会), 2009年3月3日. つくば
- ⑤ 青柳秀紀: プロトプラスト機能を活用した有用物質生産システムの開発. 日本放線菌学会, 2009年2月20日, 東京.
- ⑥ 青柳秀紀: プロトプラスト機能を高度利用した新規な細胞壁成分の新規生産法の開発—機能性細胞壁成分の生産とその利用. JST イノベーションブリッジ, 2008年11月26日, 東京.
- ⑦ Hideki Aoyagi : Development of system for producing alkaloids using direct culture of leaves in intact plant. 13th International Biotechnology Symposium (IBS-2008), 2008年10月16日, Dalian, China.
- ⑧ 青柳秀紀ら, プロトプラスト機能を高度利用した細胞壁成分の新規生産法の開発第2報, 日本生物工学会, 2008年8月28日, 仙台
- ⑨ 青柳秀紀ら, エチレンナノバブルの作製とその利用, 日本生物工学会, 2008年8月28日, 仙台
- ⑩ Aoyagi, H.: Application of protoplasts for producing useful metabolites. *The international symposium on bio-industry development*, 2007年12月4日, Taichung, Taiwan.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 植物組織の培養方法及び有用物質の製

造方法、並びに培養液製造装置及び植物組織
培養装置

発明者：青柳秀紀

権利者：ハウステック（株）

種類：特許

番号：特願 2009-44749

出願年月日：2009年2月26日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI HIDEKI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
准教授

研究者番号：00251025

(2)研究分担者

田中 秀夫 (TANAKA HIDEO)

筑波大学・名誉教授

研究者番号：40015657

福崎 英一郎 (FUKUSAKI EIICHIROU)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：40273594

(3)研究協力者

[海外共同研究者]

Legge Raymond

ウオータールー大学・化学工学部・教授

(カナダ)