

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 7 年 4 月 9 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 久留米大学 分子生命科学研究所
職 名 教授
研究代表者 齋藤成昭

下記のとおり令和6年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:24024)

1. 共同研究課題名	分裂酵母の CRISPRi を用いた産業価値の高い代謝物質の生産			
2. 共同研究目的	本研究の目的は産業価値の高い代謝物質であるニコチン酸アデニンジヌクレオチド (NaAD)の酵母による生産法を確立することである。NaAD は検査試薬や研究用試薬として用いられている。一方、非常に高価な試薬(百二十万円/g)であり、安価な生産方法が求められている。そこで、申請者が開発した CRISPRi 法を用いて酵母の代謝経路を改変し NaAD の生産とその質量分析による定量を試みる。本研究は NaAD の産業上の安定供給に貢献するだけでなく、同様の有用物質生産の基盤になる。			
3. 共同研究期間	令和6年4月1日 ~ 令和7年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 齋藤 成昭	久留米大学 分子生命科学 研究所 細胞工学研究部門	職名:教授 学位:博士(理学) 取得年月日:1999.3.31	研究の総括	
(分担研究者) 石川 健	同上	講師	酵母株の作製・解析	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	個体代謝生理学	氏 名	西村 隆史

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

本共同研究では申請者(久留米大学)が酵母細胞株作成や細胞サンプル調製を行い、質量分析によるメタボローム解析を西村隆史博士(群馬大学)が行うという研究計画を立てた(項目 1,2)。また、論文リバイスのためレビューアから要求された実験を追加して計画した(項目 3)。

(1)NaAD 蓄積の経時変化: 申請者の用いる方法は、CRISPRi の誘導処理から標的遺伝子の転写抑制が始まるまで 18 時間程度かかる。これまでの共同研究では、qns1 の CRISPRi 誘導後 26 時間後に NaAD が通常の 23.5 倍まで蓄積することを明らかにした。本研究では、培養時間により NaAD 蓄積量が増加するか調べるため、CRISPRi 誘導後 18~72 時間の細胞を回収し、NaAD 量を質量分析により定量する。

(2)ニコチン酸添加による NaAD 蓄積: ヒトの NAD 合成経路はトリプトファンから始まるキヌレニン経路で合成されるが、分裂酵母はキヌレニン経路を持たず、細胞外から取り込んだニコチン酸から NaAD や NAD を合成する。そこで、NaAD の原料であるニコチン酸を培地に添加し、NaAD 蓄積量が増加するか質量分析で定量する。

(3)CRISPRi コントロール株のメタボローム: CRISPRi のコントロール株は、プラスミドから非特異的 sgRNA と dCas9 タンパク質を発現する。これらがメタボロームに及ぼす影響を野生株と比較し、この株の性質を理解する。

7. 共同研究の成果

本共同研究課題において、生体調節研究所との共同研究が貢献した内容についても具体的に記載してください。

(1)NaAD 蓄積の経時変化: CRISPRi 誘導後 18~72 時間の細胞を回収し、NaAD 量を生体調節研究所にて西村博士が質量分析計で定量した。その結果、対数増殖期(18~43 時間)では NaAD が細胞に蓄積し続け、43 時間後で最も高い NaAD 蓄積が観察された。また、栄養枯渇により細胞増殖が止まる静止期(50~72 時間)には NaAD 量が著しく低下した。以上の結果から、qns1 の CRISPRi 誘導後、対数増殖を維持することが NaAD 生産に適していることが明らかになった。

(2)ニコチン酸添加による NaAD 蓄積: ニコチン酸添加培地における培養条件検討を行った。

(3)CRISPRi コントロール株のメタボローム: CRISPRi のコントロール株と野生株のメタボロームを生体調節研究所にて西村博士が質量分析計で解析した。予想通り、コントロール株と野生型では一部の代謝物質質量が異なった。このため、標的遺伝子の CRISPRi を用いたメタボローム解析はコントロール株との比較により評価するべきであることが確認された。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお、論文の場合は、PDF ファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Ishikawa K., Soejima S., **Nishimura T.**, **Saitoh S.**: Arrayed CRISPRi library to suppress genes required for *Schizosaccharomyces pombe* viability. Journal of Cell Biology 224(1), e202404085 (2025)

② この共同研究に基づくとの記載のある論文

Ishikawa K., Soejima S., **Nishimura T.**, **Saitoh S.**: Arrayed CRISPRi library to suppress genes required for *Schizosaccharomyces pombe* viability. Journal of Cell Biology 224(1), e202404085 (2025)

③ 学会発表を行った主なもの 3 件以内(学会名、開催日、演題)

1. **Shigeaki Saitoh**, Cellular adaptation to nutrient limitation, NORTHWEST A&F UNIVERSITY(西北農林科技大学)2024 年 10 月 中国西安、招待講演
2. **石川健**、副島朗子、**西村隆史**、**齋藤成昭**、分裂酵母の全必須遺伝子ノックダウンライブラリ、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 29 日、福岡県福岡市、ポスター発表
3. **石川健**、分裂酵母の全必須遺伝子ノックダウンライブラリ、2024 年度内分泌・代謝学共同研究拠点成果発表会・ワークショップ、2024 年 12 月 23 日、群馬県前橋市、招待講演

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

1. 電子メールで研究計画や論文のリバイス方針などの打ち合わせを行った。
2. 分担研究者(石川)が 2024 年度成果発表会・ワークショップ(上記)で共同研究の成果を発表した。
3. 2 の際、研究打ち合わせも行った。