

プログラム名： セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 細胞刺激技術開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 28 年 度

研究開発課題名：

プローブ導入を利用した細胞選別技術の開発

研究開発機関名：

株式会社ユーグレナ

研究開発責任者

鈴木 健吾

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本年度は研究計画書に記載した通り、引き続き各種変異原（重イオンビーム等）を利用し、より多くの *Euglena* の変異体作製を試みることを計画した。また、今年度はすでに取得済みの油脂高含有株を詳細に特徴付け（例えば遺伝子発現プロファイルの取得）することで、セレンディピターを利用してよりポテンシャルのある細胞を取得するための手がかりを得ることを検討している。同様に、各要素技術によるイメージングを行いやすい運動性低下株についても特徴づけを試みることにした。さらに、各種プローブの導入効率を検討することを始め、実際に細胞選別における実証に進むにあたって有用なプローブをとってどのような種類のものが適しているかについて、判断材料を揃える。具体的な目標としては、以下を設定した。

- ・ユーグレナへの最適なプローブ導入条件の検討と蛍光を利用した細胞の選抜

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

・ユーグレナの油脂高含有株の特徴づけ

新たに油脂の染色が少なくなる個体を変異体集団から選抜することにより、逆に油脂含有量が低くなっている可能性がある株（B5ZFeL）を取得することに成功した。また、これまでに取得できていた油脂高含有株（B1ZFeL 株）にさらに変異原処理を実施した集団からの選抜により、さらに油脂を多く含む可能性がある株（B6ZFeL）が取得できている。今後はこういった株の中で実用化に結びつきそうな株を選抜していく予定である。なお、油脂高含有ユーグレナ及びそれらを取得する方法は特許として出願するに至っている。

・ユーグレナへの最適なプローブ導入条件の検討と蛍光を利用した細胞の選抜

ユーグレナの細胞内に実際に複数種類のプローブを導入し、結果的に細胞内の特定の mRNA に結合する ECHO プローブを利用することで特定の細胞を選抜できる可能性があることが示すことができた。それをもとに細胞内にプローブを導入する条件を検討し、目的の細胞を選抜できるかを検証した。当該方法を利用した特徴ある生細胞分取の実証はできていないが、プローブ導入方法、及び細胞内プローブの検出方法は改善された。今後さらに条件を検討することで目的を達成したいと考えている。

2-2 成果

・ユーグレナの油脂高含有株の選抜

これまでに確立できた油脂高含有候補株を効率的に取得する方法をもとに、本年度は、さらに変異株を取得することを試みた。その結果、再現良く候補となる変異株を選抜することができ、既存の油脂高含有株 B1ZFeL 株に続いて、油脂含有量が低いことが予想される B5ZFeL 株と B1ZFeL よりもさらに油脂を多く含む可能性のある B6ZFeL 株について、Bodipy 染色をもとに新規に取得できている（図 1A および B 参照）。B5ZFeL 株については、低酸素条件開始の比較的初期（4 時間）において差がみられており、環境変化へのセンシングについて野生株と異なる挙動を示す表現型である可能性が示唆された。

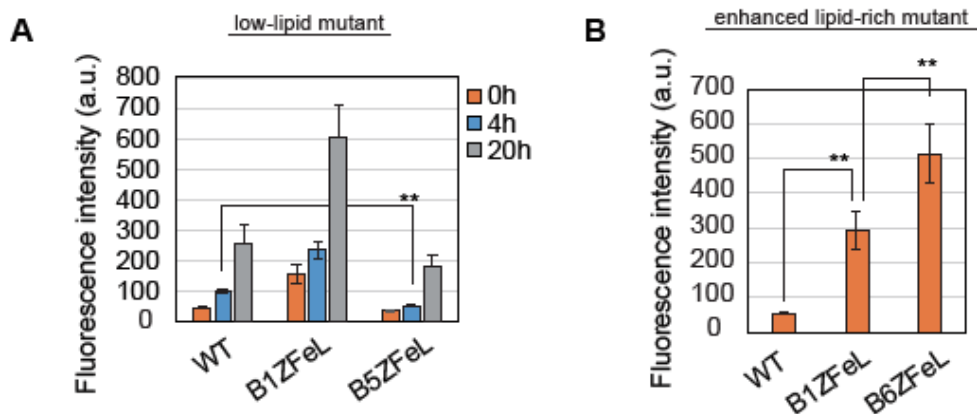


図 1: 野生株 (WT) と変異株 (B1ZFeL 及び B5ZFeL) の Bodipy 染色による蛍光強度比較
低酸素条件開始前、開始 4 時間後、20 時間後にてそれぞれ蛍光強度を比較した (各 n=3)。

** : $p < 0.005$, t 検定 (ボンフェローニ補正)

・ユーグレナへの最適なプローブ導入条件の検討と蛍光を利用した細胞の選抜

目的のプローブが導入された細胞集団を準備するにあたって、エレクトロポレーション法により ECHO プローブの導入について中心的に条件検討及び評価を行った。その結果、一定の条件下で mRNA の poly A tail を認識可能なプローブを細胞内に導入できている可能性が高いことが確認できた。その一方で、一部の細胞ではエレクトロポレーションによりダメージを受け、死細胞となったために細胞膜の透過性が上がり擬陽性となる可能性が示された。様々な検討の結果、現状でエレクトロポレーション後に生死判定を行い、生細胞のみを選抜するのは困難であると考えられた。このため、本研究においてはそれらを区別することなくセルソーターでクローン化し、増殖を基準に目的の細胞 (プローブが導入されかつ生きている細胞) の選別可否を検証したが、これまでに目的の細胞を得るに至ってはいない。その原因として現在想定しているのは、前述の通りエレクトロポレーションにおける条件が最適かされていないことであると推測しており、今後、その条件を最適化することで目的の細胞を得られる可能性があると考えている。

2-3 新たな課題など

ユーグレナの細胞内にプローブ導入をするにあたって、エレクトロポレーション法によって死細胞が出現することで、結果的に選抜の過程で擬陽性の細胞を選抜してしまう可能性が出てきている。今後は、既述の通り死細胞が出現しないエレクトロポレーションの条件検討を行う必要がある。

3. アウトリーチ活動報告

特になし