

CrimsonNinjas\_jp(iGEM Japan-United)

# 成果報告書



# 概要

CrimsonNinjas\_jp(iGEM Japan-United)は世界中、特に日本において影響力の強いうつ病に注目した。現在うつ病の治療法は高額な精神療法と副作用の重い薬物療法しか確立されておらず、それらのリスクの高い治療法が課題となっている。そこで私たちはその欠点を克服する方法として、Saffron(*Crocus Sativus*)由来の抗うつ成分(Crocetin, Crocin, Picrocrocin)を大腸菌に合成させ、菌体内に抗うつ成分を蓄積した大腸菌を含んだクッキーを作製し社会に提供することで革新的なセルフコントロール手段の実装を目指した。

研究活動のみならず、プロジェクトの方向性を見定めるために様々なステークホルダーとのディスカッション(Human Practices)、合成生物学を広く日本に根付かせるための教育活動(Education)、最終プロダクトを社会実装する想定での市場分析/プロダクト作成(Entrepreneurship)などアウトリーチ活動にも力を入れた。

弊チームはこれらの活動を合成生物学の世界大会であるiGEM 2023にて発表した。研究面だけでなく、プロジェクト全体のストーリー性が高く評価され、初出場でありながらhigh-school sectionにて総合優勝であるGrand Prize他複数のAwardを受賞した。

# 千一△概要

PI :

立教大学理学部生命理学科 末次 正幸 教授

Secondary PI :

石川県立大学 生物資源工学研究所 中川 明 講師

Instructor :

立教大学大学院 理学研究科 生命理学専攻 博士前期課程 2年 山岸 勇太

Advisor :

Harvard大学 山形 方人 博士

東京大学 医学部 医学科 3年 末松 万亩

Team Leader :

私立 武蔵高等学校 2年 大竹 海碧

Team Member :

私立 芝高等学校	2年	阿曾 祥大
私立 麻布高等学校	1年	天野 春翔
私立 近畿大学附属豊岡高等学校	2年	池上 十和子
国立 久留米工業高等専門学校	2年	今津 有瑛
私立 三田国際学園高等学校	2年	角野 陽奈美
国立 大阪大学	1年	金岡 大樹
東京都立 多摩科学技術高等学校	2年	酒井 純
私立 灘高等学校	2年	佐々木 慧
私立 西大和学園高等学校	2年	佐野 一
埼玉県立 松山高等学校	3年	島本 悠太
私立 S高等学校	2年	庄司 茜
東京都立 武蔵高等学校	2年	平 圭祐
私立 A I C J 高等学校	3年	土井 瞭
私立 A I C J 高等学校	1年	内藤 煌瑛
私立 栄光学園高等学校	3年	中村 陽斗
千葉県立 船橋高等学校	1年	西本 圭佑
私立 白陵高等学校	1年	堀川 莉緒
私立 立命館宇治高等学校	3年	溝上 藍
私立 明治大学	1年	蓑和 湊太
私立 桜蔭高等学校	1年	八尾 歩実
私立 長尾谷高等学校	3年	横川 暖

# 活動報告

## 研究活動

### Wet

#### 概要

プロジェクト開始時は、大腸菌を用いた低コストで安定的な抗うつ成分生産プラットフォームの作成を目標とした。そのため、一般的な大腸菌株であるBL21(DE3)株を用いてSaffron由来の抗うつ成分の生産を目指した。しかし専門家とのディスカッションやラボでの経験を踏まえ、抗うつ成分を蓄積した大腸菌をそのまま人が食べられる形を目指し、プロジェクトの方向性を大幅に変更した。Wetでは目標に対して法律面と安全面の対応策を実験により実証した。

法律面ではカルタヘナ法が遺伝子組換え体の増殖に対して主に規制をしていることから大腸菌株をChromosome-freeの状態にすることによって抗うつ成分は蓄積しているものの菌体を保ち、増殖しない大腸菌株の作成を目指した。安全面ではFDAにて人の経口摂取が認められている*E.coli Nissle* 1917株を使用し、抗うつ成分の生産とChromosome-freeの確認を目指した。

最終成果は下記の通りである。

#### 〈抗うつ成分生産〉

- ・特別な基質を含まない条件下にてBL21(DE3)株、DH5α株でのCrocetin生産を確認した。
- ・特別な基質を含まない条件下にてBL21(DE3)株でのPicrocrocinの生産を確認した。異種発現によるin vivoでのPicrocrocin生産に世界で初めて成功した。
- ・*E.coli Nissle* 1917株でのカロテノイド生産に成功した。

#### 〈増殖をしない大腸菌の作成〉

- ・BL21(DE3)株にて、増殖が抑えられていることを確認した。
- ・BL21(DE3)株にて、染色体が分解されていることを蛍光顕微鏡を用いて確認した。
- ・*E.coli Nissle* 1917株にて、増殖が抑えられていることを確認した。BL21(DE3)での経験から、Chromosome-free化に成功していることが推測される。

## 抗うつ成分生産

### Crocetinの生産

#### 1.研究の背景

CrocetinはSaffron(*Crocus Sativus*)の二次代謝産物であり、精神疾患をはじめ様々な疾患への効果が認められているCrocetinの前駆体である。またCrocetin自身もうつ病、酸化[1]、がん、心筋虚血、多発性硬化症、[2]、血栓、認知症、脳虚血、パーキンソン病[3]、疲労[4]への効果が確認されている。そのため高付加価値カロテノイドとして注目が集まっている。

現在Crocetinの供給先は、Saffron柱頭からの複雑な抽出と精製に依存している[5]。しかしながら精製品は純度が低く、製造プロセスには大規模な処理が必要だ。またSaffronの柱頭を1kg得るためには、約15万から20万本の花を手作業で収穫する必要がある。これらはSaffronがRed Goldと呼ばれ、Saffron由来の成分のコストを上昇させている理由の1つだ。加えて、Saffronが主に生産されるイラン等での深刻な児童労働を引き起こす原因となっている[6]。

またSaffronは気候等環境要因による負の影響を受けやすいうえに、3倍体なため遺伝子編集が困難だ。Saffron由来の成分はその複雑な構造と豊富なキラル中心のために化学合成において不活性または有毒な光学異性体が容易に形成される。これらはSaffronとSaffron由来の成分のコストが高く保たれている理由になっている[6]。

私たちは微生物によって低コストで安定的なCrocetin生産を目指した。これは2012年から2022年にわたり、4つのiGEMチームが挑戦してきたがいずれも失敗に終わっている[7][8][9][10]。

## 2. 研究の方法と結果

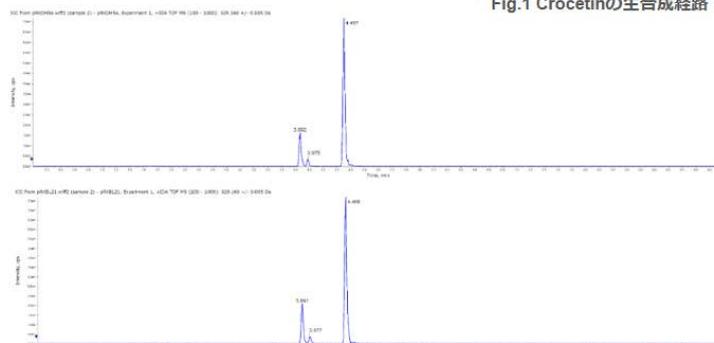
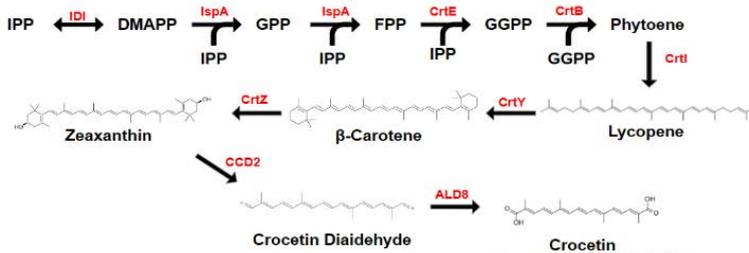


Fig.3 HP-LC-MS/MSスペクトル

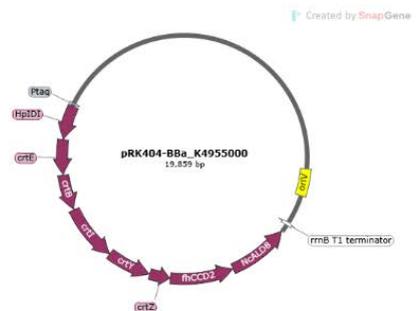


Fig.2 使用したプラスミド

各遺伝子の由来は下記の通り  
 HplDI : *Haematococcus pluvialis*由来[11]  
 crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ : *E. coli*と同様に  $\gamma$ -Proteobacteriaに属する *Pantoea ananatis* (reclassified from *Erwinia uredovora*) 由来[12]  
 fhCCD2 : *Freesia hybrida*由来[11]  
 NcALD8 : *Neurospora crassa*由来[11]

HplDI : カロテノイド生産量が2~3倍になるとされている[13]

私たちはCrocetinの生合成経路(Fig.1)上の酵素を含むプラスミド(Fig.2)をRIKEN BRC(<https://web.brc.riken.jp/en/>) から購入し、ヒートショック法を用いてBL21(DE3)株とDH5 $\alpha$ 株に導入した。共にTB 50 ml cultureでの培養を行なったのち、培養液を抽出し、HP-LC-MS/MSで解析したところCrocetinの生産が確認できた(Fig.3)。

## 3. 詳細

詳細の実験条件などはiGEM Registry of Standard Biological Parts BBA\_K4955000([Part:BBa\\_K4955000 - parts.igem.org](https://parts.igem.org/Part:BBa_K4955000)) (Designed by:Kaisei Otake, Group:iGEM23\_Japan-United)を参照されたい。

## 4. その他



Fig.4 抽出後の粉末

左がBL21(DE3)株の形質転換体の培養液を抽出したもの (Crocetin有)であり、右が*E. coli* Nissle 1917株の形質転換体の培養液を抽出したもの。ともに黄色いことが分かる。

*E. coli* Nissle 1917株にもFig.2のプラスミドを導入し、BL21(DE3)株、DH5α株と同様の条件で培養、抽出を行ったが、HP-LC-MS/MSにてCrocetinのピークを確認することができなかった。抽出粉末は黄色くなっており(Fig.4)、HP-LC-MS/MSにて生合成経路上流のカロテノイドであるZeaxanthinのピークも確認できなかったことからMS条件に問題があった可能性が考えられる。

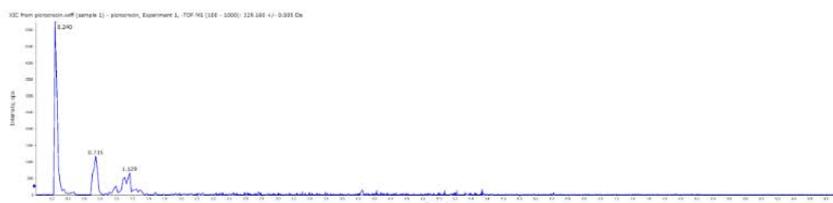
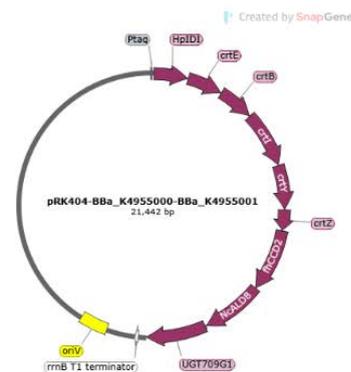
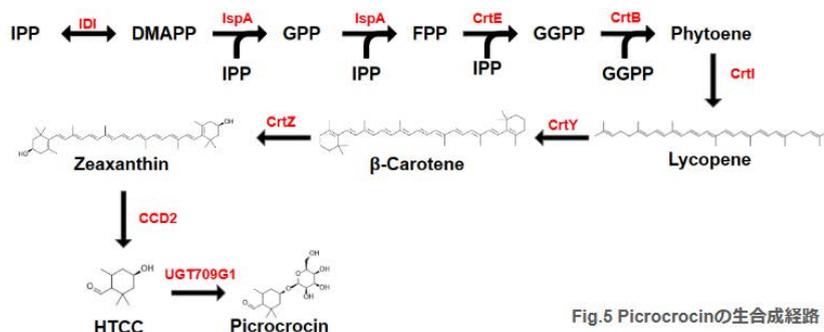
## Picrocrocinの生産

### 1.研究の背景

PicrocrocinはSaffron(*Crocus Sativus*)の二次代謝産物であり、うつ病,癌,血栓,酸化,心筋虚血,動脈硬化[2]、脳虚血[14]への効果が確認されている。そのため高付加価値配糖体テルペノイドとして注目が集まっている。

従来の生産方法における課題は「Crocetinの生産」に書いた通りであるが、食品添加物としてのSaffron由来の成分を考察すると、Picrocrocinは風味に関わる成分であることから特に代用が難しいとされている[15]。私たちは微生物によって低コストで安定的なPicrocrocin生産を目指した。これは過去2つのiGEMチームが挑戦してきたがいずれも失敗に終わっている[7][8]。

### 2.研究の方法と結果



私たちはPicrocrocinの生合成経路(Fig.5)上の酵素のうち、Fig.2のプラスミドが持っていない酵素であるUGT709G1をアセンブリし、Fig.6のプラスミドを作成した。ヒートショック法を用いてBL21(DE3)株に導入した。TB 50 ml cultureでの培養を行なったのち、培養液を抽出し、HP-LC-MS/MSで解析したところPicrocrocinの生産が確認できた(Fig.7)。

異種発現によるHTCCからPicrocrocinの生体内変換並びに特別な基質添加を行わない条件下でのPicrocrocinを合成する代謝経路を異種にて構築したのは世界で初めての成功であった。

### 3.詳細

詳細の実験条件などはiGEM Registry of Standard Biological Parts BBa\_K4955001([Part:BBa K4955001 - parts.igem.org](http://parts.igem.org/Part:BBa_K4955001)) (Designed by:Kaisei Otake, Group:iGEM23\_Japan-United)を参照されたい。

## Crocinの生産

### 1.研究の背景

CrocinはSaffron(*Crocus Sativus*)の二次代謝産物のなかでも、特に疾患への治療などでの効果が強く見られている成分である。

私たちは微生物によって低コストで安定的なCrocin生産を目指した。これは2012年から2022年にわたり、4つのiGEMチームが挑戦してきたがいずれも失敗に終わっている[7][8][9][10]。

### 2.研究の方法と結果

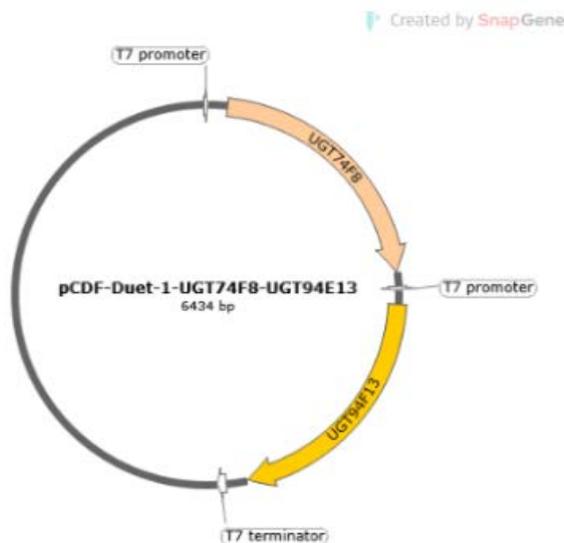


Fig.8 使用したプラスミド

遺伝子の由来は下記の通り

UGT74F8,UGT94E13 : *Gardenia jasminoides*. [17]

CrocetinからCrocinの変換を行うことが分かっているUGT74F8,UGT94E13[17]をpCDF-Duet-1ベクターにin-fusion法でアセンブリしプラスミドを作成した(Fig.8)。ヒートショック法を用いてBL21(DE3)株に導入した。作成した大腸菌株を5 ml magic mediumで30度にて一晚培養後、集菌してLysis bufferで懸濁しソニケーションを行った。遠心し、上澄み50 $\mu$ lにCrocetinを5 $\mu$ l加えて反応液を作成した。反応液を25度、30度で1時間、一晚反応させたものをHP-LC-MS/MSで測定したところ、Crocinのピークを確認することができなかった。今後抽出条件やMS条件を検討する必要がある。

## 増殖をしない大腸菌の作成

### 1.研究の背景

私たちは抗うつ成分を細胞内に蓄積した大腸菌をクッキーに直接含ませて一般社会に提供することを目標とした。現在の遺伝子組み換え生物に対する規制は”増殖”に焦点をあてている。そのため私たちは設計した大腸菌の増殖能を無くすことができれば、自分たちの作製したクッキーを実装する際の規制的なハードルを下げられるのではないか、という仮説を立てた。その仮説をもとに、目標成分を生産した大腸菌の増殖能をなくすことを目標とした。

私たちは社会実装を想定していたため、エスケープ(遺伝子変異により増殖阻害を掻い潜って増えてくる菌体)の発生率を極限まで抑えられるシステムが好ましかった。染色体に選択的な制限酵素と厳重な発現制御システムを用いることで、Chromosome-free(つまり増殖しない)の、大腸菌の作製が可能であることが知られている[18]。それらに近いシステムを立教大学理学部生命理学科末次研究室の向井崇人助教が開発されているため、そちらを使用させていただき形で研究を進めた。

### 2.詳細

詳細の実験条件などはiGEM Registry of Standard Biological Parts BBa\_K4955002([Part:BBa\\_K4955002 - parts.igem.org](http://Part:BBa_K4955002 - parts.igem.org)) (Designed by:Kaisei Otake, Group:iGEM23\_Japan-United)を参照されたい。

コロニー形成の有無による増殖しなくなったことの確認

### 1.研究の方法と結果

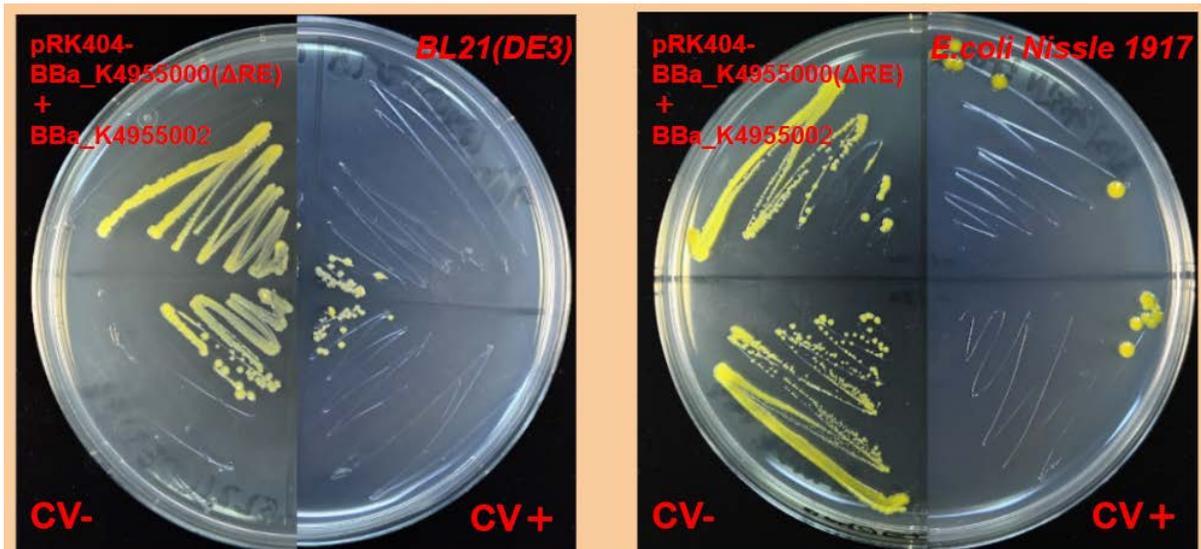


Fig.9 コロニー形成の有無による増殖しなくなったことの確認

Fig.2のプラスミドをヒートショックで導入したBL21(DE3)株と*E.coli* Nissle 1917株に対して、TSS法を用いてCrystal Violet(CV)で誘導される非常に強固な発現系で管理された染色体に選択的な制限酵素を導入した。

形質転換を行ったBL21(DE3)株と*E.coli* Nissle 1917株をそれぞれ適切な抗生物質とCV(1 $\mu$ M)を含んだLB寒天培地、適切な抗生物質のみを含んだLB寒天培地に撒いた。37°Cで一晩インキュベートしたところ、共にCVを含んだプレートのコロニー形成が明らかに阻害されていることが確認できた(Fig.9)。この結果は増殖しない大腸菌株の作製に成功したことを示している。

ただCVを含んだプレートでも一部コロニーの形成がみられるのは、エスケープ変異体が一定の割合で現れるからだと考えられる。

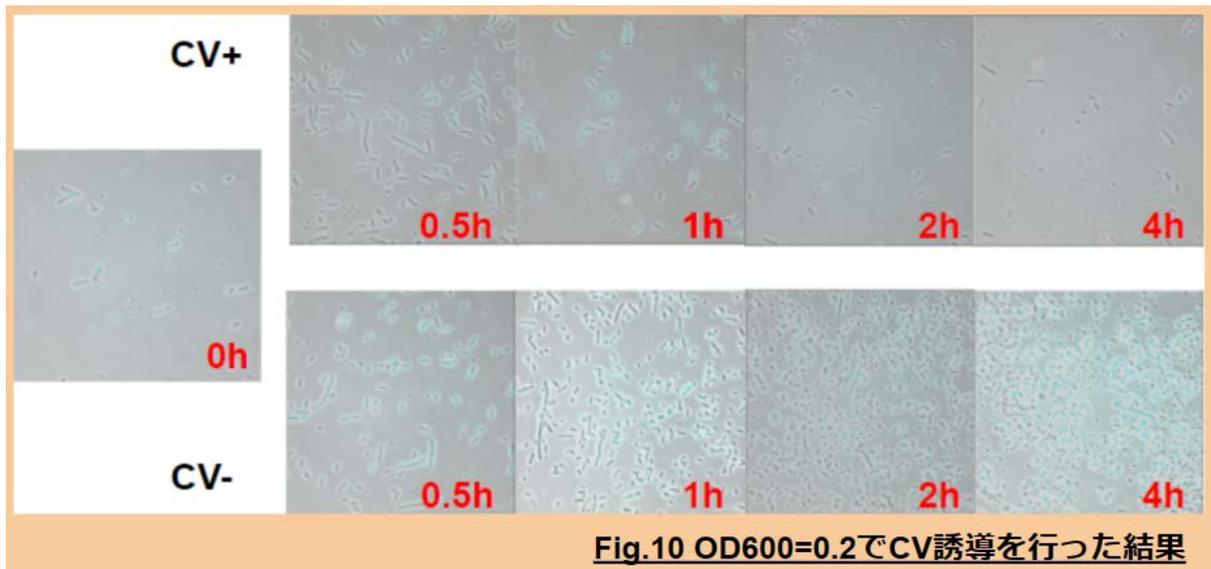
### 蛍光顕微鏡によるChromosome-freeの確認

私たちはさらなる機能実証のためにDAPIと蛍光顕微鏡を用いてChromosome-free化の確認を行った。DAPIはDNAに結合する蛍光色素なため、染色体の有無を蛍光の有無で確認することが可能である。

私たちは作製した大腸菌株の培養液をCV誘導後複数のタイミングでサンプリングし、蛍光顕微鏡観察を行うことによってChromosome-free化の確認に成功した。

### OD600=0.2でCV誘導を行った結果

#### 1.研究の方法と結果



作成した大腸菌株を適切な抗生物質を含むLB培地5mlに植菌し、試験管で18~24時間振盪培養を行った(前培養)。final culture 5ml, OD600=0.01になるように前培養液をTB培地で希釈して試験管で振盪培養した。OD600=0.2になったタイミングでfinal 1 $\mu$ M CVを加えた。またこの際ネガティブコントロールとしてCVを加えない試験管も同時に培養した(本培養)。

CV誘導後、0h,30min,1h,2h,4hでサンプリングし、蛍光顕微鏡観察を行った。CV誘導を行ったサンプルのみ蛍光の消失が確認できた(Fig.10)。

## OD600=8でCV誘導を行った結果

### 1.研究の背景

使用したシステムの強みはChromosome-freeになっても設計したプラスミドによる機能が維持されることに加え、増殖や内因性の遺伝子ネットワークにエネルギーを割かなくなるため導入した生合成経路による生産量が増加する可能性が挙げられることだった[19]。私たちはCrocetinなどの物質生産を見る際にOD600=8でIPTG誘導を行っていた。同じタイミングでCV誘導を行うことによってChromosome-free化した大腸菌での物質生産が確認できないか挑戦した。

### 2.研究の方法と結果

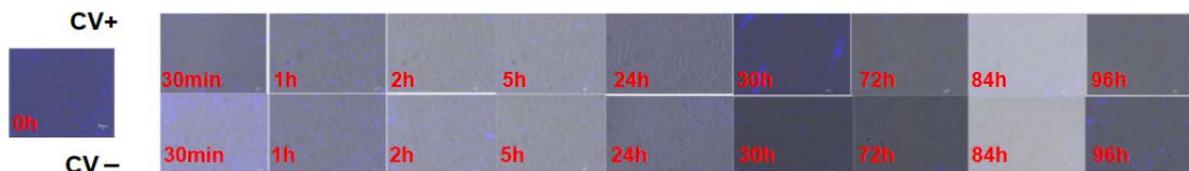


Fig.11 CV誘導後の蛍光顕微鏡観察結果

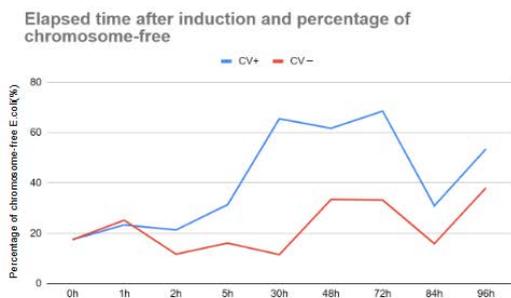


Fig.12 経過時間ごとのChromosome-free細胞の割合

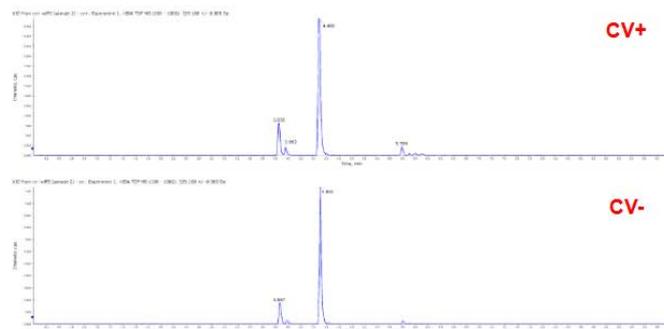


Fig.13 HP-LC-MS/MSスペクトル

OD600=8でCV誘導を行った場合も大腸菌のChromosome-free化を確認することができた(Fig.11)。ImageJを用いてChromosome-free状態の大腸菌の割合をもとめた(Fig.12)。このとき1つの条件につきミニマムで300菌体は解析を行った。CV誘導を行わなかったネガティブコントロールサンプルと比べて30h~72hサンプルは明らかにCV誘導を行ったサンプルのChromosome-free化がなされていることを確認した。

CV誘導を行わなかったサンプルにおいてもChromosome-free状態が確認されているのは解析を行った画像や解析プログラムの問題だと考えられる。またCV誘導後84h経過サンプルのChromosome-free状態の大腸菌割合が急激に下がったのはエスケープ変異体が増殖したからだと考えられる。

Chromosome-free状態が明確に確認できたCV誘導後72時間サンプルとCV誘導は行わなかったものの同じ条件で培養したサンプルをHP-LC-MS/MSで解析したところ両者共にCrocetinの生産が確認できた(Fig.13)。ただこれはchromosome-free状態になる前の大腸菌が生産したCrocetinを検出した可能性やエスケープ変異体による生産であった可能性が考えられる。また生産量の比較は時間が足りず行うことができなかった。抽出やHP-LC-MS/MSの条件は既にCrocetinの検出に成功していたプロトコルと同じもので行った。

Chromosome-free状態が明確に確認できたCV誘導後72時間サンプルとCV誘導は行わなかったものの同じ条件で培養したサンプルをHP-LC-MS/MSで解析したところ両者共にCrocetinの生産が確認できた(Fig.13)。ただこれはchromosome-free状態になる前の大腸菌が生産したCrocetinを検出した可能性やエスケープ変異体による生産であった可能性が考えられる。また生産量の比較は時間が足りず行うことができなかった。抽出やHP-LC-MS/MSの条件は既にCrocetinの検出に成功していたプロトコルと同じもので行った。

## Dry

### 概要

Crocetin, Crocin, Picrocrocinの3種類のSaffron系物質は抗うつ病に関与することが知られている。しかしこれらの物質はサフラン類似の花からのみ抽出されており、抽出には栽培環境や遺伝的要因などから不安定な事項が多く存在した。そこで我々はModeling手法を用いて主に抗うつ効果の分子レベルでの理解とこれら物質の大腸菌内での産生量理解を行った。我々は「Docking Simulation」, 「物質生産量」の大きく分けて二点についてモデリングした。

### Docking Simulation

#### Introduction

Docking Simulationとはあるタンパク質とあるリガンドの相互作用を立体構造をもとに予測する手法である。本Docking simulationではSaffron系薬剤(Crocetin, Crocin, Picrocrocin)によるNorepinephrine(以後NE)の再取り込み阻害機構を分子レベルで予測した。

#### Material and Method

まず、我々はターゲットタンパク質であるNorepinephrine transporter (以後NET)(ID:P23975)をAlphaFold DB[1]よりPDB形式で取得し、リガンドとして使用するNEの再取り込み阻害効果が期待されるCrocin, Crocetin, PicrocrocinはChem DBより取得した。ただし、Crocinは1から5型の内1型のみデータベースに該当したためその構造を利用した。

これらのオープンデータより我々はまずNETにおけるdocking siteをfpocket web serverを用いて予測した。これは稠密な原子充填ゾーンで定義されたアルファ球のみが保持され、それ以外のアルファ球は破棄されることにより、リガンドがドッキングする場所をスクリーニン

グする手法である。続いてfpocketより得られたdocking siteの候補をNET-NE間相互作用の先行研究[2]を用いてF72, D75, A145, Y152残基付近に絞り込み, AutoDock Vinaを用いてdocking simulationを行った。Autodock Vinaはリガンドとタンパク質間における結合エネルギーを計算し, その値が低いものを結合パターンの候補として出力するソフトウェアである。この時AutoDock Vinaの設定はGrid Centerを(X, Y, Z) = (1, -3, 0), Grid Sizeを(X, Y, Z) = (15, 15, 15)としてシミュレーションを実行した。

## Results

結果はCrocetin, Crocin, Picrocrocinの順に紹介する。まず, Crocetinはサフラン系物質に属する細長いカルテノイドカルボン酸であり, Crocinの糖鎖修飾前駆体である[Fig.1A][3]。初めにCrocetin-NET間相互作用の可能性を予測するため, CrocetinとNEの3次構造類似性を算出したところ類似性は低く, RMSDが4.2360Åであることが判明した。そこで, 実際にNETのNE binding site付近をAutodock VinaのDocking Gridで囲み5つの最終コンフォメーションをScoreの良いものから算出した。その結果, Fig.2Cの構造が最も付近のbinding siteに近い距離で安定していると考えられ, 特にA145との距離はそれぞれ2.6Åであった。この値はかろうじて互いの水素結合の範囲である2.72Å以下であるが, その他のbinding siteのアミノ酸残基との結合距離は遠く, CrocetinはNETと結合しない可能性が示唆された[Fig.2]。

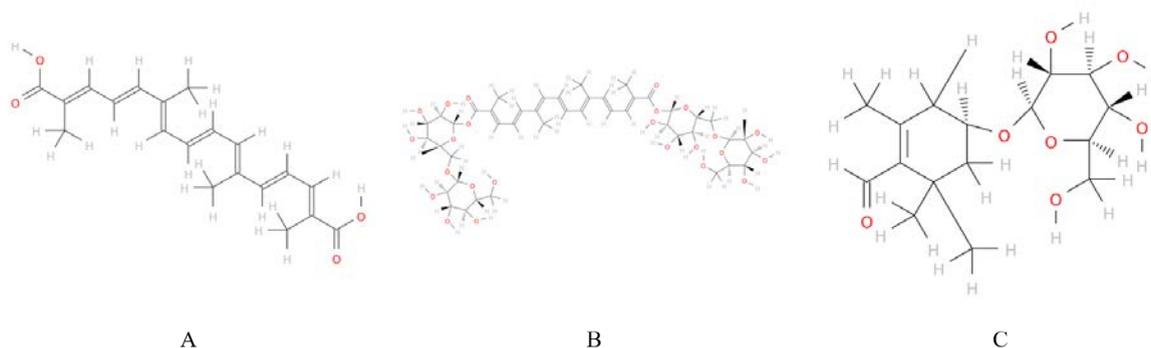


Fig.1) 3種類のサフラン系物質の2次構造

AはCrocetin, BはCrocin, CはPicrocrocinである。また, 本解析で使用したCrocinはI型であるためBはI型のCrocinの構造である。

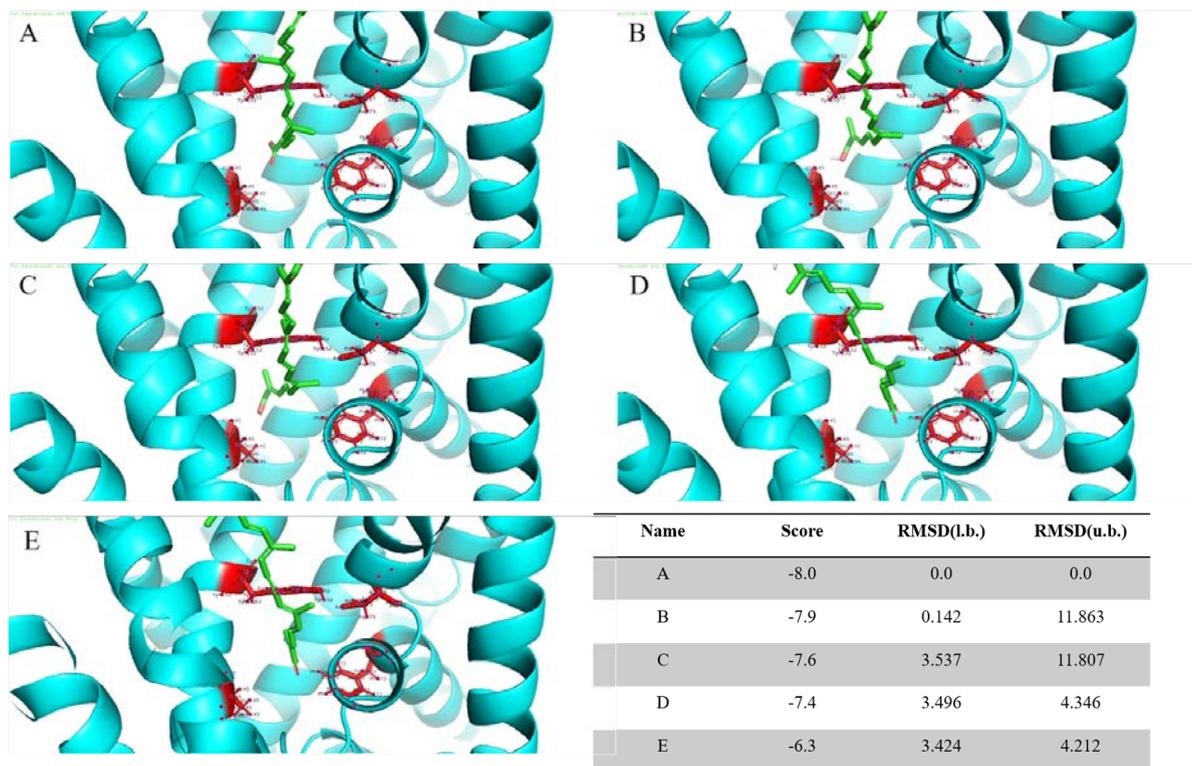
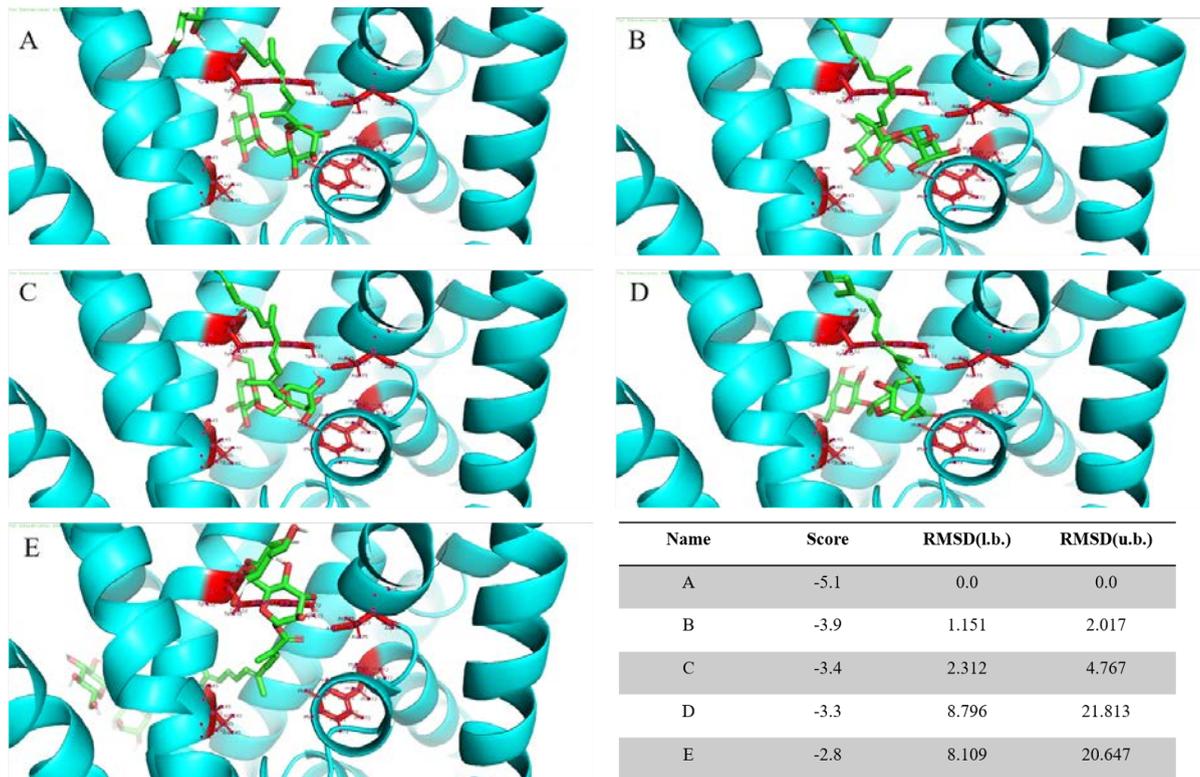


Fig.2) Autodock VinaによるCrocetin-NETドッキングシミュレーションの結果.

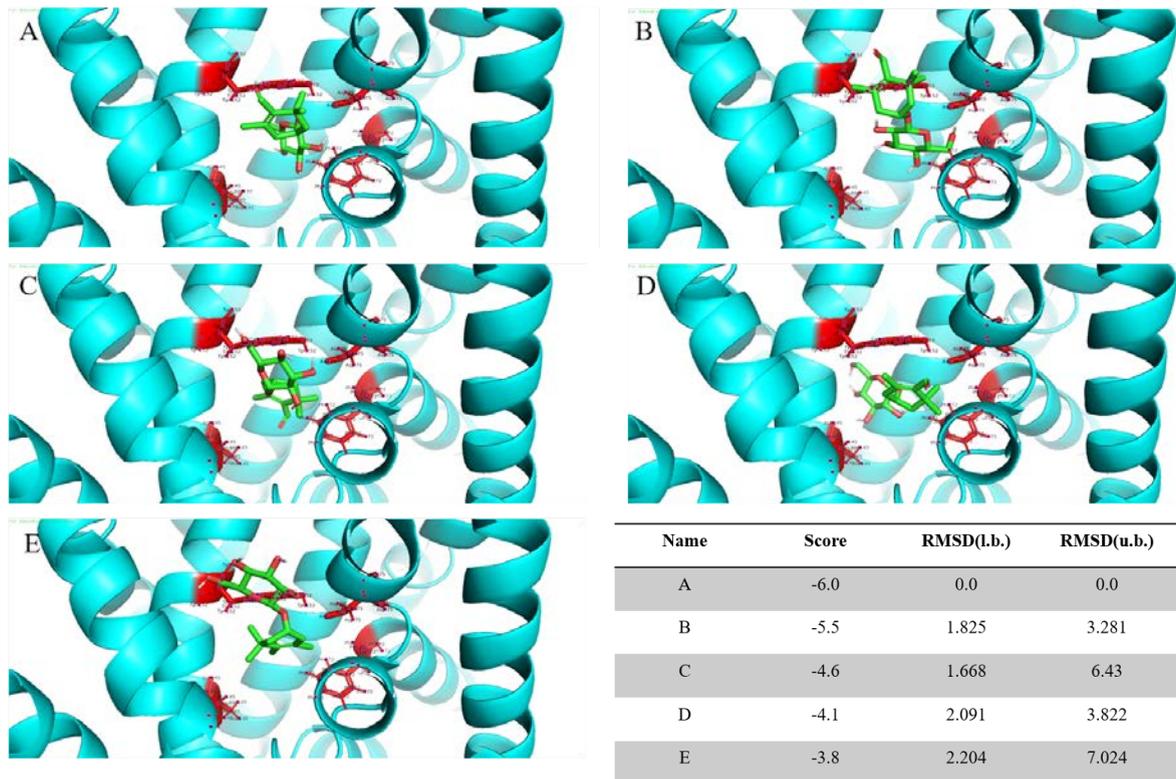
Autodock Vinaによって予想された結合可能性が高い上位5個のコンフォメーションを示している。CyanはNET, GreenはCrocetin, RedはNE binding siteである。Scoreは結合自由エネルギーであり、負に大きくなるほど良いと考えられている。ポジティブコントロールとしてNE-NET間のScoreは-6.1であり、必ずしもこの値が高いほど正しい結合コンフォメーションであるというわけではない。

続いて、Crocetinは先ほど記載した通り、Crocetinに糖鎖修飾が行われることで得られる構造であり、糖鎖修飾の様式によってI-Vの5種類が存在する[Fig.1B][3]。しかし、Chem DB上に存在したCrocetinの3次構造はI型の分子だけであったため、本解析ではI型のみドッキングシミュレーションの対象とした。なお、この際、3次構造類似性はCrocetinと同等程度の類似性であることが見込まれたため、Crocetinは類似性解析は行わなかった。しかし、ドッキングシミュレーションの結果驚くべきことに、両端に付加されているグルコースが結合する可能性が確認された[Fig.3]。また、Vina Scoreは最も良い数値で-5.1であり、CrocetinもCrocetinと同様に結合可能性は低いことが予想された。



**Fig.3) Autodock VinaによるCrocin-NETドッキングシミュレーションの結果.**  
Autodock Vinaによって予想された結合可能性が高い上位5個のコンフォメーションを示している。CyanはNET, GreenはCrocin, RedはNE binding siteである。Scoreは結合自由エネルギーであり、負に大きくなるほど良いと考えられている。

最後に、Picrocrocinはサフラン系物質の中でもCrocin, Crocinとは一部異なる修飾課程であり、全サフラン系物質に共通する中間物質であるZeaxanthinの両端に付加されているサフラナール分子に、グルコースが付加されていることで構成される分子である[Fig.1C]。PicrocrocinはNEとの3次構造類似性が高く、RMSDが1.8303Åである。そこでPicrocrocinにおいてもこれまでの分子同様に Autodock Vinaを用いてドッキングシミュレーションを行った。その結果、五分の三のコンフォメーションにおいて、Crocin同様にGlucose残基がNE binding site結合していたが、残りの五分の二のコンフォメーションにおいてはサフラナール残基が結合している可能性が示唆された[Fig.4]。具体的には、Picrocrocinのサフラナール残基とY152およびF72の芳香環が $\pi$ - $\pi$ スタッキング相互作用を起こすことで、NE binding siteと結合している可能性が示唆された[Fig.4][4]。



**Fig.4) Autodock VinaによるPicrocrocin-NETドッキングシミュレーションの結果.**  
Autodock Vinaによって予想された結合可能性が高い上位5個のコンフォメーションを示している。CyanはNET, GreenはCrocetin, RedはNE binding siteである。Scoreは結合自由エネルギーであり、負に大きくなるほど良いと考えられている。

#### Engineering Cycle

本モデルでは、CryoEMを用いた具体的な解析を行っておらず、今後具体的に分子作用機序を明らかにすることで、よりうつ病自体の神経科学的な原因究明および、効果的な治療薬開発を加速することが期待される。

#### Discussion

以上の結果より、Crocetinはそれ単体ではNE binding siteと相互作用する可能性は低く、糖鎖修飾を受けてCrocetinに構造変換することでCrocetinの両末端に結合しているグルコースとNET上のNE binding siteが結合する可能性が示唆された。また、グルコースはNETの発現量自体を低下させることが知られており[5]、Crocetinは1分子につき4分子のグルコースを保持しているため、NETの発現量低下に寄与していることが予想される。さらに、CrocetinがNETと相互作用する場合、分子サイズが大きいため、NETとの接触確率をあげることができるほか、コカインのようなNEの強いアンタゴニスト性を持ちづらいことなどから、Crocetinは直接的かつ間接的にNE reuptakeの阻害に関与していることが予測された。Picrocrocinはサフラナル残基による直接的なNETとの相互作用により、NEのアンタゴニストとして働くことが示唆された。また、Picrocrocinもグルコースを保持しており、グルコース自体がNE binding siteと相互作用する可能性と、Crocetin程では無いことが予想されるが、NET自体の発現量を抑える効果が期待される。以上の理由により、CrocetinおよびPicrocrocinは抗うつ効果が発揮されると考えられ、特にNEのreuptake阻害に効果的に働きかけることが示唆された。

## 物質生産量モデル

### Introduction

物質生産量モデルとは常微分方程式を用いて時間変化に応じて産物の量がどう変化するかを予測する手法である。このモデルの利点は、微分方程式であることで、複雑な関数を用いずに簡便な数式のみで時系列データの分析に使用できることである。弊チームではwet研究においてCrocetinの産生までは確認されている。しかし、Crocicnの生産は確認できず、時間依存変化や最大量が取得できる時刻などが不明であった。そこで、我々はシンプルな物質生産量モデルを、先行研究のCrocicnI-V型の産生量のデータにフィッティングさせ[3]、時間経過におけるCrocicn量を分析した。なお、Picrocrocicnの産生量は先行研究が存在しないかつ、弊チームで時間依存の定量を行うことができなかったため行っていない。

### Material and Method

まず、我々は簡単な常微分方程式モデルをCrocetin, Crocicn(I-V)の2種類のコンパートメントに分けて時間についての従属変数とし、通常細胞についてのみ任意の値でパラメータを設定した[Equation.1]。このモデルはCrocetin-Crocicn間の関係の変化を時間経過によって捉えるのに適しており、複雑な関数を用いずとも理解がしやすいため採用した。また、CrocicnのI-V型はUGT74F8とUGT94E13という2種類の遺伝子によって産生量がそれぞれ調節されている。また先行研究でも、UGT74F8のみ、UGT74F8-UGT94E13, UGT94E13-UGT74F8の3パターンでそれぞれCrocicn量を観測していたためこれらについて別々に解析することとした。そこで、まずは実データにフィットするパラメータの推定を行うために先行研究のデータを基に推定を行った。パラメータは初期に設定していたもの(a=0.1, b=0.1)をベースのパラメータとして最小二乗法にて推定し、最適化されたパラメータを用いて実データと微分方程式の解曲線を重ねてプロットした。この時、aはCrocetinからCrocicnが瞬間時間において合成される速度を表しており、bはCrocicnの瞬間時間あたりの自然消滅速度を表している。さらに、力学系理論を用いることでCrocetinとCrocicnの関係性の分析を行った。まず、Equation.1は簡便な常微分方程式であり、線形性を持つことから線形変換したのち、係数行列に着目して相空間(ベクトル場)を描いた。力学系理論とは、数学の理論であり、微分方程式の解がどのような初期条件で最終的にどうなるかを表す分かり易い方法であり、CrocetinおよびCrocicnが無限時間後、最終的にどの程度産生されるかを理解するよい手法である。なお、今回の常微分方程式の数値計算は全てR言語のdeSolveライブラリの4次ルンゲクッタ法で行われ、パラメータ推定は最小二乗法とoptim関数のNelder-Mead法を用いて行われた。

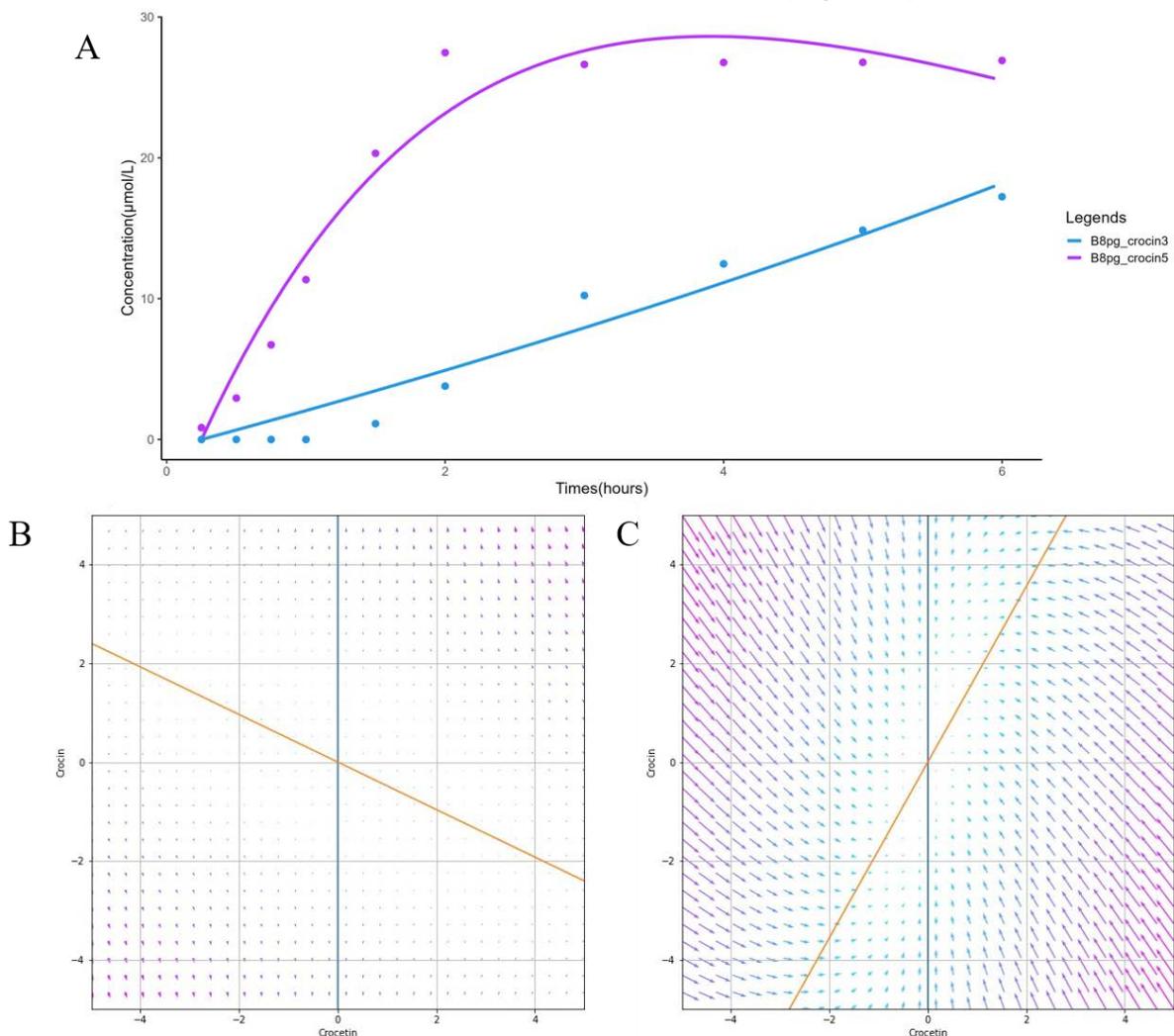
$$\frac{d[Crocetin]}{dt} = -a[Crocetin]$$
$$\frac{d[Crocicn]}{dt} = a[Crocetin] - b[Crocicn]$$

**Formula.1** : Crocetin-Crocicnの産生量関係を表した常微分方程式。

### Results

まず、UGT74F8のみを発現させたベクターでの結果から説明する。UGT74F8は主にCrocicn(III)とCrocicn(V)を生産する際に必要になる遺伝子であり、その他の型のCrocicnの産生

には基本的に深く関与しないことが知られている[3]. そのため, Fig.5Aに示しているのは Crocin(III)とCrocin(V)の経時変化である. まず, UGT74F8単発現下ではCrocin(III)は1時間から6時間の間で単調増加することが示された. また, Crocin(V)は計測開始から2時間までは単調増加し, 3-4時間で最大生産量(約27 $\mu\text{mol/L}$ )となったのち, 徐々に下降傾向になることが示された. また, 下降速度は緩やかであるとみられ, 一定時間Crocin(V)がベクター内に蓄積する可能性が示唆された[Fig.5A]. 次に, CrocetinとCrocin(III&V)の相空間を描いた. Fig.5Bでは Crocetin-Crocin(III)間の関係性を表しており, Crocetin richな環境かつCrocin(III) poorな環境が初期状態であるとする近似的に(Crocetin, Crocin) = (4, 0)の座標位置が初期値であると考えられ, 各点から生えるベクトルをたどっていくとCrocetinは0に収束し, Crocinは大量に生産されることがわかる. また, Crocetin-Crocin(V)の関係性を表しているFig.5Cでも同様の点(4, 0)が初期値として点付近の矢印を追っていくと遠回りをしながらも青とオレンジのヌルクラインの交点(0, 0)に収束することがわかる. このことはCrocin(V)が長期間ベクター内に留まることと, 緩やかに分解されいくことを示唆している[Fig.5B,C].



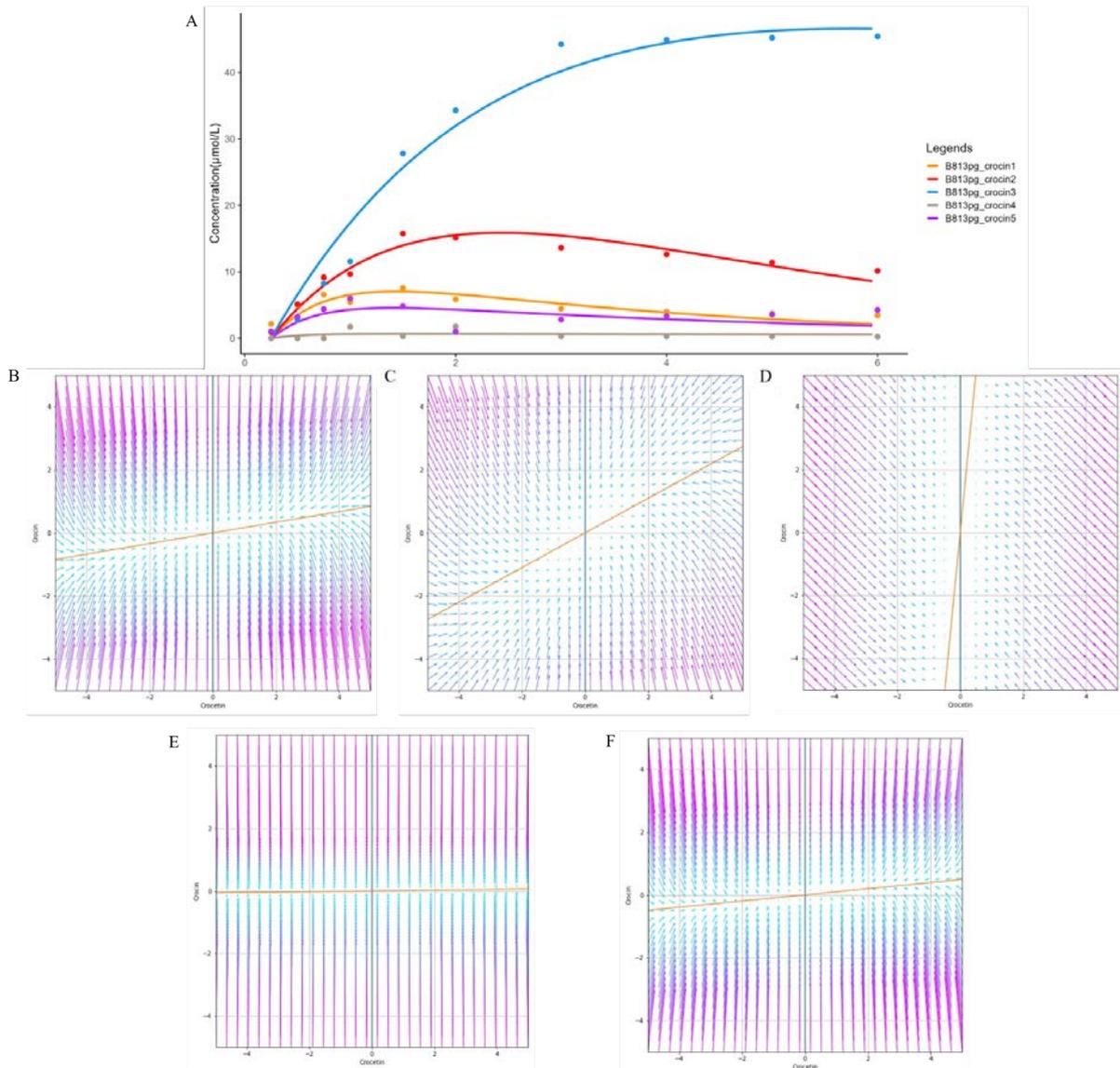
**Fig.5) UGT74F8のみを発現させたベクターでのCrocinの時間変化とCrocetin-Crocin間の関係.**

**A**は横軸に時間を取り, 縦軸にCrocinのモル濃度を取ってプロットしたグラフである. 青がCrocin(III), 紫がCrocin(V)を表している. **B**はCrocetin-Crocin(III)の相空間である. 初期値は(Crocetin, Crocin) = (4, 0)から始まり, 矢印方向に解が飛んで行く. **C**もCrocetin-Crocin(V)の相空間である. こちらもBと同様に(4, 0)から矢印をたどり, 最終的にBとは異なる青とオレンジのヌルクラインの交点(平衡解)に遠回りをしながら収束することが見てとれる.

続いて, UGT74F8-UGT94E13を順番に発現させたベクターでのCrocetin, Crocin量の結果を紹介する. Fig.6Aに示しているのはUGT74F8のみ発現させた時と同様Crocin(I-V)の全ての経時変化である. まず, Crocin(I)およびCrocin(V)は定量開始から約1時間後で最大量(それぞれ $5.5\mu\text{mol/L}$ ,  $4.5\mu\text{mol/L}$ )を生産することが示された. その後はFig.5Aで扱ったモデル同様に緩やかに減少していくことが示された. また, Crocin(II)は定量から約2時間後で最大量(約 $15\mu\text{mol/L}$ )を生産し, その後はほかの型のCrocinと同様に緩やかに生産量が減少していく. さらに, 興味深いことに, Crocin(III)はCrocin(II)の最高生産量の2倍ほど産生されて, 6時間の定量時間では広義単調増加することが示唆された. また, Crocin(IV)はほとんど産生されないことが示された.

次にCrocetinとCrocin(I-V)の相空間をそれぞれFig.6B-Fig.6Fに示した. まず, Crocetin-Crocin(I&V)の関係は, UGT74F8のみの発現ベクターの際と同様に(4, 0)を初期値として, ベクトルを追っていくと, Crocin(I&V)が少量産生されて(0, 0)に収束することがわかる. このことからFig.6AにおけるCrocin(I&V)の挙動と一致しており, ピーク後Crocin(I&V)生産量は緩やかに減少し, やがて0になることが示された. Crocetin-Crocin(II)の関係は, 概ねCrocin(I&V)の時同様であるが, (4, 0)を初期値としてベクトルを追っていくとCrocin(I&V)と比べて遠回りをしながら(0, 0)に収束することが示された. また, これはFig.6AのCrocin(II)の挙動と一致することが確認でき, 緩やかにCrocin産生量が0に収束することが示唆された.

続いて, Crocetin-Crocin(III)の相空間は(4, 0)を初期値としてベクトルに沿っていくとこれまでの物質とよりも遠回りをして(0, 0)に収束することが見てとれる. このことからFig.6Aで見切れてしまった6時間以降も物質は産生され続け, やがて緩やかに減少していくことが示された. また, Crocetin-Crocin(III)の相空間は(4, 0)近傍のベクトルの傾きが最も大きく, ほかの型のCrocin量よりも多く産生されることが分かった. 最後に, Crocetin-Crocin(IV)の相空間は(4, 0)からほとんど動くことができず, 生産量は0に近いまま増加しないことが示された.

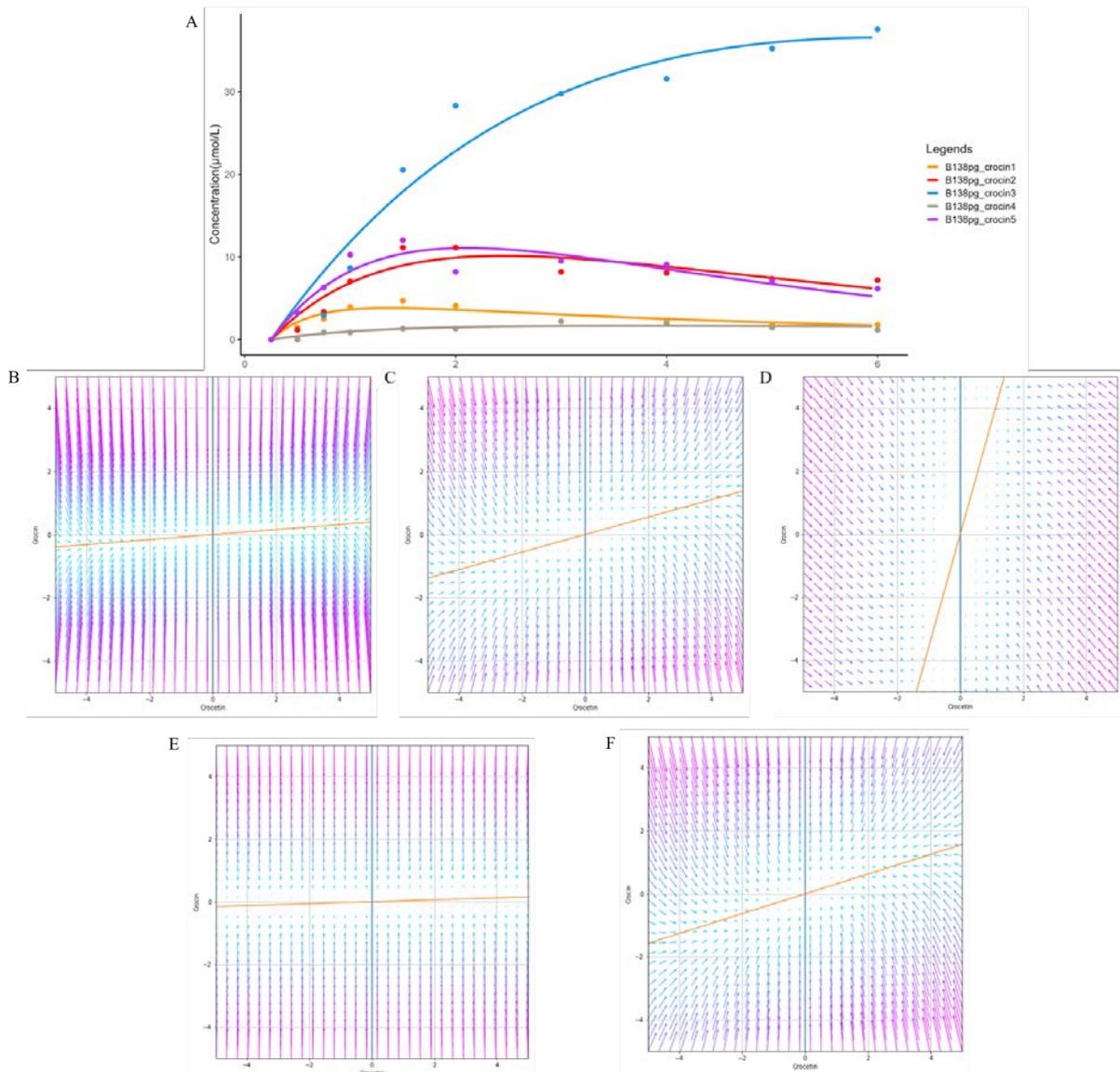


**Fig.6) UGT74F8-UGT94E13を発現させたベクターでのCrocetinの時間変化とCrocin-Crocin間の関係.**

Aは横軸に時間を取り、縦軸にCrocinのモル濃度を取ってプロットしたグラフである。黄色がCrocin(I)、赤がCrocin(II)、青がCrocin(III)、グレーがCrocin(IV)、紫がCrocin(V)を表している。B-CはCrocetin-Crocin(I-V)の相空間である。初期値は(Crocetin, Crocin) = (4, 0)から始まり、矢印方向に最終的に解が飛んで行く。

最後に、Fig.6の際と発現する順序を入れ替えたUGT94E13-UGT74F8を順番に発現させたベクターでのCrocetin, Crocin量の結果を紹介する。Fig7.Aに示しているのはこれまで同様Crocin(I-V)の全ての経時変化である。まず、Crocin(I)はFig.6であつかったデータとほぼ変わらない量発現しており、前述データと同様の定量から約1時間で産生量がピーク(約5.4μmol/L)を迎え、その後は緩やかに減少する。また、Crocin(IV)もFig.6のデータとほぼ同様に産生量が増加しないことが示された。また、Crocin(II)とCrocin(III)に至っても概ね前述データと変わらない結果が得られた。しかし驚くべきことに、Crocin(V)はFig.6のデータと違い、Crocin(II)と同程度の産生量を得ることが結果として分かった。ここで、Crocin(V)に着目してFig.7Fの相空間を確認するとオレンジのヌルクラインの傾きが少々増加しており、(4, 0)近傍

のベクトルの傾きが大きいことがわかる。このことから、産生量が増加することが直感的にも確認できる。



**Fig.7) UGT94E13-UGT74F8を発現させたベクターでのCrocinの時間変化とCrocetin-Crocine間の関係。**

これまでのFigures同様に、Aは横軸に時間を取り、縦軸にCrocinのモル濃度を取ってプロットしたグラフである。青がCrocine(III)、紫がCrocine(V)を表している。B-CはCrocetin-Crocine(I-V)の相空間である。初期値は(Crocetin, Crocine) = (4, 0)から始まり、矢印方向に最終的に解が飛んで行く。

### Engineering Cycle

本解析では先行研究のデータを使用して、弊チームのwetにおける効率のよいCrocinの取得方法を考案することができ、また、シンプルなモデルとパラメータで生産量を予測することができるため、再現性を高めることができた。

### Discussion

これらの結果より、まず、UGT74F8はCrocine(III)とCrocine(V)の産生量に関与し、特にCrocine(V)の顕著な増加を得ることができた。これは、UGT74F8単体を発現させた場合、Crocine(V)が最

も効率的に取得でき、かつ、最大で約27 $\mu\text{mol/L}$ 得られることが分かった。また、UGT94E13とUGT74F8の共発現はCrocetin(I)を生産することでCrocetin(II)とCrocetin(III)を得ることが知られており、これによりCrocetin(I)はCrocetin(II)とCrocetin(III)の変換に使用されることで、Crocetin(I)の産生量がCrocetin(II&III)と比べて少ないことが考えられる[3]。

さらに、UGT74F8-UGT94E13ではCrocetin(V)の産生量がCrocetin(I)と同程度で少なかったのに対し、UGT94E13-UGT74F8の順序発現するとCrocetin(V)の量が増加すること示唆されたが、これはCrocetin(III)以外のCrocetin産生によってCrocetin(V)は産生量がそもそも抑制され、順序によって抑制の度合いが変わる可能性が示唆された。なお、今回のCrocetin(I-V)は全て分解の速度が緩やかであり、Crocetinはされにくい可能性が示唆された。以上より、CrocetinはUGTのプラスミド発現順序によって大きく産生量が揺らぐものもあれば、Crocetin(III)のように順序に関係なく安定的に産生量を得ることができ物も存在し、全てのCrocetinは分解が低速で進むことが明らかになった。

## 物質生産量モデル(追加分)

### Improved models

$$\frac{d[\text{Crocetin}]}{dt} = -(\alpha + \gamma + \zeta)[\text{Crocetin}] + \xi[\text{Crocetin IV}]$$

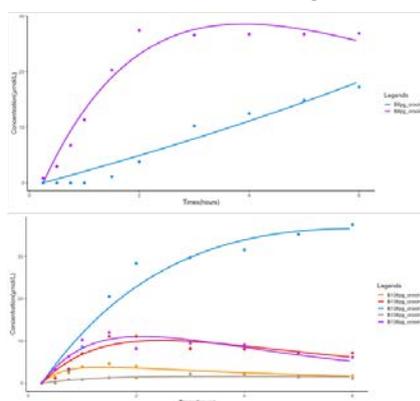
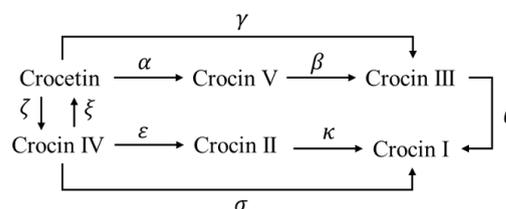
$$\frac{d[\text{Crocetin I}]}{dt} = \theta[\text{Crocetin III}] + \sigma[\text{Crocetin IV}] + \kappa[\text{Crocetin II}]$$

$$\frac{d[\text{Crocetin II}]}{dt} = \zeta[\text{Crocetin IV}] - \kappa[\text{Crocetin II}]$$

$$\frac{d[\text{Crocetin III}]}{dt} = \gamma[\text{Crocetin}] + \beta[\text{Crocetin V}] - \theta[\text{Crocetin III}]$$

$$\frac{d[\text{Crocetin IV}]}{dt} = \zeta[\text{Crocetin}] - (\varepsilon + \xi)[\text{Crocetin IV}]$$

$$\frac{d[\text{Crocetin V}]}{dt} = \alpha[\text{Crocetin}] - \beta[\text{Crocetin V}]$$



Wiki Freeze後、同様の結果をより具体的に説明できるモデルを構築した。ここではCrocetinはCrocetinから各々合成されることから逐次反応のモデルを導入した。

## 参考文献

### Web参考文献

[1]Deepu Pandita.(2021).Saffron (Crocus sativus L.): phytochemistry, therapeutic significance and omics-based biology.Medicinal and Aromatic Plants: Expanding their Horizons through Omics.

[2]Zahra Maqbool, Muhammad Sajid Arshad, Anwar Ali, Afifa Aziz, Waseem Khalid, Muhammad Faizan Afzal, Sneh Punia Bangar, Mohamed Addi, Christophe Hano and Jose Manuel Lorenzo.(2022).Potential Role of Phytochemical Extract from Saffron in

Development of Functional Foods and Protection of Brain Related Disorders. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

[3] Zeliha Selamoglu, Senay Ozgen. (2016). Therapeutic Potential of Saffron Crocus (*Crocus sativus* L.). Turkish Science and Technology.

[4] María José Bagur, Gonzalo Luis Alonso Salinas, Antonia M. Jiménez-Monreal, Soukaina Chaouqi, Silvia Llorens, Magdalena Martínez-Tomé and Gonzalo L. Alonso. (2017). Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food. *Molecules*.

[5] Wen Wang, Ping He, Dongdong Zhao, Lijun Ye, Longhai Dai, Xueli Zhang, Yuanxia Sun, Jing Zheng and Changhao. (2019). Construction of *Escherichia coli* cell factories for crocin biosynthesis. *Microbial Cell Factories*.

[6] Majid Shokrpour. (2019). Saffron (*Crocus sativus* L.) Breeding: Opportunities and Challenges. *Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops Volume 6* 675-706.

[7] [Team: WashU - 2012.igem.org](https://www.igem.org/Team/WashU-2012)

[8] [Team: Uppsala - 2013.igem.org](https://www.igem.org/Team/Uppsala-2013)

[9] [Team: Uppsala - 2017.igem.org](https://www.igem.org/Team/Uppsala-2017)

[10] [Latvia-Riga - iGEM 2022](https://www.igem.org/Team/Latvia-Riga-2022)

[11] Norihiko Misawaa, Takashi Maokab and Miho Takemura. (2022). Carotenoids: Carotenoid and apocarotenoid analysis—Use of *E. coli* to produce carotenoid standards. *Methods in Enzymology*.

[12] Misawa, N. (Ed.). (2021). *Carotenoids: Biosynthetic and biofunctional approaches*. (advances in experimental medicine and biology 1261). Singapore: Springer.

[13] Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K., & Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 324, 421–426.

[14] Anastasia Kyriakoudi, Stella A Ordoudi, Marta Roldán-Medina and Maria Z Tsimidou. (2015) Saffron, A Functional Spice. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*

[15] Rezaee R, Hosseinzadeh H. 2013. Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16: 12–26.

[16] Gianfranco Diretto, Oussama Ahrazem, Ángela Rubio-Moraga, Alessia Fiore, Filippo Sevi, Javier Argandoña, Lourdes Gómez-Gómez. (2019) UGT709G1: a novel uridine diphosphate glycosyltransferase involved in the biosynthesis of picrocrocins, the precursor of safranal in saffron (*Crocus sativus*). *New Phytologist Foundation*.

[17] Xiangdong Pu, Chunnian He, Yan Yang, Wei Wang, Kaizhi Hu, Zhichao Xu, and Jingyuan Song. (2020) In vivo production of five crocins in the engineered *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*.

[18] Catherine Fan, Paul A. Davison, Robert Habgooda, Hong Zeng, Christoph M. Decker, Manuela Gesell Salazar, Khemmathin Lueangwattanapong, Helen E. Townley, Aidong Yang, Ian P. Thompson, Hua Ye, Zhanfeng Cui, Frank Schmidt, C. Neil Hunter, and Wei E. Huang. (2020). Chromosome-free bacterial cells are safe and programmable platforms for synthetic biology. *PNAS*.

[19] R. M. Blumenthal, S. A. Gregory, J. S. Cooperider. (1985). Cloning of a restriction-modification system from *Proteus vulgaris* and its use in analyzing a methylase-sensitive phenotype in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164, 501–509

## Dry参考文献

- [1] Varadi, Mihaly, et al. "AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models." *Nucleic acids research* 50.D1 (2022): D439-D444.
- [2] Schlessinger, Avner, et al. "Structure-based discovery of prescription drugs that interact with the norepinephrine transporter, NET." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.38 (2011): 15810-15815.
- [3] Pu, Xiangdong, et al. "In vivo production of five crocins in the engineered *Escherichia coli*." *ACS Synthetic Biology* 9.5 (2020): 1160-1168.
- [4] Ali, Mohd Sajid, and Hamad A. Al-Lohedan. "Spectroscopic and molecular docking investigation on the noncovalent interaction of lysozyme with saffron constituent "Safranal"." *ACS omega* 5.16 (2020): 9131-9141.
- [5] Straznický, N. E., et al. "Norepinephrine transporter expression is inversely associated with glycaemic indices: a pilot study in metabolically diverse persons with overweight and obesity." *Obesity science & practice* 2.1 (2016): 13-23.

## アウトリーチ活動

### Human Practices

私たちはプロジェクトが社会にとって良いものであることをHuman Practiceの活動を通して示し、iGEMの理念をもとにプロジェクトのブラッシュアップを続けた。その際に心がけたことは以下の二点である。

1. 幅広いステークホルダーと関わり、意見を交わすこと
2. 得た知見をプロジェクトに反映し、改善すること

一点目では、専門家、企業、一般人など、より多くのステークホルダーと関わることで私たちに欠けていた知見を得たほか、プロジェクトに関する意見を収集した。二点目では、一点目で得た知見やフィードバックなどをプロジェクトに活かし、改善することを繰り返すことでプロジェクトの質の向上に役立てた。

### プロジェクト設計

私たちは日本において深刻な課題となっているうつ病に焦点をあて、一般人と医療関係者を対象にその現状を調査した。また、うつ病治療の課題を知り、抗うつ成分の大腸菌を用いた低コストで安定的な生産を考え、研究者や企業の方々とディスカッションを行った。

### 最終プロダクトの決定

生産した抗うつ成分を患者へ届ける方法について、実際に診療に携わっている精神科医やアレルゲンフリーの商品開発を行っている企業のCEOとディスカッションを行なった。これらの話し合いを通して、簡単に作ることができ、多くの人が食べやすい抗うつ成分を含んだクッキーを製作することを最終目標に決めた。

## 多様なステークホルダーとの関わり

より社会に寄り添ったプロジェクトとするために、多様な方々と関わり、プロジェクトの改善や意見交換を行なった。

実際には、ゲノム編集食品の販売を行っている企業や遺伝子組み換え微生物による物質生産の社会実装を目指している企業などより社会に近づけた形での話し合いを行った。

また、うつ病を減らすための取り組みを市議会議員の方とディスカッションをして考えたり、外部での研究発表を行ったりするなど、多様な人との関わりを重視して活動した。

Human Practiceの詳しい活動についてはWikiを参照ください。

## Education

日本語で合成生物学にアクセスする手段は極めて少ないため、計13個の教育活動を行うことで合成生物学の普及に貢献した。全てのプロジェクトを実施する際に心がけたことは以下の二点である。

1. 年齢や性別、地域や社会的立場、身体的特徴など様々なバックグラウンドによって学びが制限されないこと。
2. 新たな知識や機会に繋がるように参加者のフィードバックを次のプロジェクトに反映すること。

一点目は小学生、中高生、大人、ほぼ全ての年齢層向けの企画をそれぞれ実施すること、また視覚障害者を対象としたバリアフリーなプロジェクトを行うことでなるべく多くの方が合成生物学とうつ病に関する理解を深められるようにした。私たちが学校や地域に依存しないチームであるという特性を活用し、日本中の様々な地域でEducationを行った。

二点目は実験におけるDBTLサイクルのように、Educationにおいても既に行ったプロジェクトを次のプロジェクトの質の向上に役立てることで、参加者により良い企画を提供できるようにした。

## SNSの運用

Youtube、Twitter、Instagramを用いて合成生物学に関する基礎知識の発信を行った。例えば合成生物学の基礎、実験操作の基本、プライマー設計などの動画を投稿した。以下のリンクから動画を閲覧することができる。

[https://www.youtube.com/@CrimsonNinjas\\_jp](https://www.youtube.com/@CrimsonNinjas_jp)

より詳しい合成生物学の基礎知識は、noteというプラットフォームから記事を発行した。これらの記事は英語への翻訳も行った。

[https://note.com/igem\\_ninjas/](https://note.com/igem_ninjas/)

# What is Synthetic biology and iGEM?

## Welcome

Starting today, every Friday, the iGEM high school student team CrimsonNinjas\_jp will be publishing a series of articles summarizing topics of synthetic biology and iGEM under the title "Weekly iGEM".

CrimsonNinjas\_jp has two main focuses: research activities and outreach activities. As part of our outreach activities, we hope that "iGEM Weekly" will help spread awareness and generate discussion about synthetic biology. I would like to make this article so that anyone, from those who have no knowledge at all about synthetic biology to iGEMers, can read it and learn something new, but since I am still learning, I would appreciate it if you could point out any incorrect information in the article. As for the schedule, this and the next article will be introductory, and after that, I hope to write articles that are interesting even to experienced iGEMers. Eventually, as we approach Grand Jamboree (iGEM's main conference held every November), the focus of articles will be on iGEM. I also hope to touch on new hot topics as well.

In this article, as a part of introduction, I would like to give an overview of synthetic biology/iGEM.

## 小学生を対象とした企画

続いて小学生を対象としたワークショップ企画を行った。「微生物とは何か？」などの説明をした後、自ら新しい微生物をデザインする形式で進行させた。その結果、小学生から「色々な動物を組み合わせで作った神話上の動物」「工作後のゴミを食べていい香りに変えてくれる微生物」など多くのアイデアが提案され、活発な話し合いができた。「これらの生き物がリスクをしっかりと考えた上で実現できたら良い」といった感想もあり、小学生が楽しみながら合成生物学に関する知見を深められる良い機会となった。

## 中高生を対象とした企画

中高生を対象として、二つの実験教室を行った。PCRと電気泳動、GFPの形質転換など、合成生物学の研究へ実際に用いられる実験教室を無料で提供した。この際ゲノムが含む個人情報についても説明し、それらを倫理的に正しく扱うための講義やディスカッションを行った。企画後の参加者に合成生物学への理解を質問したところ、以下のような回答が得られた。これらの企画で用いた資料は全てオープンアクセスとなっている。

2-2.合成生物学について、どのような分野に分かる範囲で説明してください。

15件の回答

バイオテクノロジー

解析生物学の応用。新しい生物を創造したり、絶滅したものを復活させたりできる。

生物学の一つでDNAを使ってゲノム編集して生物をつくる分野

遺伝子を操作して、生物を扱う分野

多数の遺伝子を構築、改変して新しい生物をデザインする分野

今までの解析生物学とは異なり、生物を1から作ることでもっと理解しようとする学問。試験館内で分子が生物作ったり、既存に生物を有用改変したりする。塩基配列を読んで増やし挿入する。結果を解析して、またデザインする

生物のあらゆる要素を組み合わせ生命機能を設計したり、人工の生物システムを構築する。

自然界に存在する生物から、遺伝子を抽出し、身のまわりにいるような生物に新たな機能を追加することによって、環境問題や病気に対抗しようとする分野

## 大人を対象とした企画

合成生物学に関して、興味のある中高生や大人に広めることはできても、全く関わる機会や興味のない層へのアプローチは困難である。今回私達は「地域の高校生が今取り組んでいること」にフォーカスした地域の大学で行われた講演会にて登壇し、13-74歳という幅広い年齢層で且つ合成生物学に関する認知度が50%を満たさない地域の人々に対し私達の取り組みをはじめ、合成生物学とは何かについて講演を行った。「”遺伝子組み換え”という言葉に対するイメージが変わった」という感想が印象的であった。今後も正しい合成生物学に関する知識を広めていきたい。

## 視覚障害者を対象とした企画

私たちはより多くの人に正しく合成生物学を広めるため、科学への参加が特に難しい層について考えた。そこで推測されたのが視覚障害者である。私たちは点訳本を作成し、半永久的に使えるよう図書館に寄付しました。

## Entrepreneurship

私たちの研究がもたらしうる社会的な意義についても調査を行い、将来的な研究の有用性について考察した。

## ビジネスモデルの構築

研究を社会に実装していくことを想定し、ビジネスモデルの構築を行った。製品としてはサフランをクッキーに添加して販売することを想定し、製品のニーズやSWOTの分析、損益分岐点の特定等を行い、現実的なビジネスとして考察した。詳細については下記のプロジェクトの成果のまとめ(wiki)を確認されたい。

## 製品プロトタイプ作成

地元のパティスリーであるひつじ組様(<https://hitsuzigumi.theshop.jp/>)にレシピ考案をご協力いただき、製品のプロトタイプ制作を行った。Akaito Saffron様(<https://akaito.jp/>)からご提供いただいたサフランを実際に添加し、クッキーを制作した。



### 試食会の開催

うつ病支援の会あさお様(<http://web-asao.jp/hp2/utsubyou-ongaesi/>)にご協力いただき、制作したプロトタイプを試食会を開催した。試食会においては、うつ病患者当事者の方やそのご家族の方などうつ病の治療を身近に体感している方々に、うつ病に対するセルフコントロール手段としての本製品についてたくさんのご意見をいただいた。



## その他

- ・プロジェクト成果のまとめ(wiki)(各活動の詳細はこちらを確認されたい) ([Home | Japan-United - iGEM 2023](#))
- ・Promotion Video (<https://youtu.be/jeaDTL0rXeA?si=G5oYpL1mWcEcJ2JP>)
- ・Presentation Video (<https://youtu.be/uwQ4JTHa4cc?si=SvectQk-RNqd1t50>)
- ・N高等学校・S高等学校研究部 入部
- ・バイテク情報普及会 第7回高校生科学教育大賞 優秀賞 受賞([プレスリリース | 【学校の枠を超えた高校生チーム“CrimsonNinjas jp”】 第7回高校生科学教育大賞 優秀賞 受賞のお知らせ | バイテク情報普及会 \(cbijapan.com\)](#))
- ・コスモ・バイオ株式会社 iGEM応援団 採択
- ・「細胞を創る」研究会 16.0 ポスター発表

## 謝辞

弊チームが活動を行うにあたり、多くの方々からご支援とご協力を賜りました。

我々の活動を高校生科学教育大賞優秀賞としてご選出いただき、プロジェクトの遂行にあたって多大なお力添えを頂いたバイテク情報普及会様に心より感謝申し上げます。

プロジェクトの方向性に関して、専門的見解から貴重なご助言をいただいたパイオニアエコサイエンス株式会社様、株式会社akaito様、弘前大学の斉藤まなぶ教授、加納颯人氏、小野達矢氏、後藤恭平氏、塩見みゆき氏、ひつじ組様、うつ病支援の会あさお様、角川ドワンゴ学園研究部の皆様に心から感謝申し上げます。

iGEMへの参加とプロジェクト遂行に際し、資金面でご支援いただいたFermelanta株式会社様、ANRI株式会社様、株式会社digzyme様、バイテク情報普及会様、コスモ・バイオ株式会社様、松木光平氏、漆原茂氏、山梨貴士氏、掘越敏明氏、小池秀幸氏、津田将志氏、齋藤想聖氏、中井雄治氏に深い謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、豊富な経験と熱心な指導、適切な助言をいただいた立教大学理学部生命理学科末次研究室の向井崇人助教、鈴木祥太助教、角悟氏、一戸謙太氏、島本恵太氏、東京大学農学部分子育種学研究室の葛山智久教授、井原雅盛氏、福田夢月氏、iGEM経験を基に冷静なご指導をいただいたAnindita Puri氏、親切なサポートと大腸菌株の分与をいただいた国立成功大学分子医学研究所の橋本昌征教授に厚く感謝いたします。

チーム設立初期から献身的なご助言を賜ったHarvard大学の山形方人博士、iGEM経験を基に的確なアドバイスをくださった東京大学の末松万宙氏、研究を遂行する際に細やかなご指導とご助言をくださった立教大学理学部生命理学科末次研究室の山岸勇太氏に心より感謝申し上げます。

研究を遂行するにあたり、豊富な知識と経験を基に熱心なご指導とご助言を賜り、パリで開催されたGrand Jamboreeにも同行いただいた石川県立大学生物資源工学研究所の中川明講師、並びに的確でかつ丁寧なご教鞭と研究施設・試薬の使用を許可していただいた立教大学理学部生命理学科の末次正幸教授に心より御礼申し上げますと共に深謝いたします。

