

発電方法が人口の増減に与える影響のシミュレーション

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学 大学院工学系研究科 システム専攻 青山和浩 教授

要約

今回、私は発電方法（火力発電・太陽光発電・原子力発電）別の CO₂排出量に注目し、最適な発電方法の割合を考察するという目的で研究を行った。Insight Maker というシステムダイナミクスのソフトを用いて、人口と発電方法、CO₂排出量のモデルを作成し、発電方法の割合を様々な値に変えながら発電方法が人口の増減に与える影響を検証した。本研究で設定した様々なパラメータの下では、火力発電が6割、太陽光発電が4割、原子力発電が0割となるような割合で発電を行うことが最適だという結果が得られた。

キーワード；システムダイナミクス、システム、因果ループ図、人口、火力発電、太陽光発電、原子力発電、CO₂排出

ABSTRACT

The goal is to find the best ratio in generating electricity by focusing on CO₂ emission of each way of generation (Thermal, Solar, Nuclear). The study used Insight Maker, a software for system dynamics, to create a model of population, ways to generate electricity, and CO₂ emission. The result shows it is the best to use thermal power at a rate of 60%, solar power at a rate of 40%, and no nuclear power, given the various parameter set in the current study.

Keywords; system dynamics, system, causal loop diagrams, population, thermal power, solar power, nuclear power, CO₂ emission

はじめに

火力発電は発電量が安定するが、1kwh の発電に大量の CO₂排出が伴い、太陽光発電は比較的 CO₂排出量が少ないが、安定性に欠け、原子力発電は最も CO₂排出量が少ないが、事故のリスクが大きい。これらの発電方法別の特性を踏まえ、最適な発電方法の割合を考察する。何をもち「最適」とするかについては、今回は発電量の安定性と CO₂量が死亡率の増加に関わると仮定し、2020 年から 2100 年までの間に人口の減少を最も抑える発電方法の割合を「最適」と定める。(CO₂量の増加による地球温暖化の進行は、異常気象や災害、熱中症などによる死者数を間接的に増加させると考えるため。)

様々な原因が複雑に関わりあう仕組みを、時間経過を追って考察する必要があるため、システムダイナミクスの手法を用いた。

研究内容

1. システムダイナミクスについて

<定義>

システム...共通の目的を持つ多数の要素の集合体。各要素が他の要素と相互に関連している。

システムダイナミクス...対象のシステムが時間経過に伴いどのような変化をするのかを考察する手法。複雑な現代社会のシステムを解析することができる。

モデル...対象のシステムを抽象化・捨象化し、各要素とその関係を示したもの。

2. 目標

発電方法の割合をどのように定めると人口の減少が最も抑えられるのかを調べる。仮定として、死亡率は CO₂量に加え、初電力量の安定性からの影響を受けるとする。このようにすると、単に CO₂排出量の少ない発電方法を使うことだけが最適では無く、発電量の安定性も重要であることを反映できる。

3. 因果ループ図の作成

因果ループ図とは、ある変数の増減が別の変数の値に影響を与えていることを矢印で示し、要素同士の因果関係の循環を示した図である。現実世界の複雑な因果関係を単純なモデルで表すための有効な手段である。

<主要な要素>

- ・人口、出生率（一定）、死亡率
- ・必要電力量、総発電量、電力充足指数（初電力量の安定性）
- ・発電方法別の発電割合、発電方法別の CO₂排出量、CO₂量が死亡率に与える影響

<要素間の関係>

- ・人口が増えると必要電力量が増える。
- ・必要電力量が増えると CO₂量が増える。
- ・CO₂量が増えると人口が減る。
- ・火力発電が増えると電力は充足するが CO₂量は増える。
- ・太陽光、原子力発電が増えると CO₂量は減るが、電力充足指数が不安定になる。

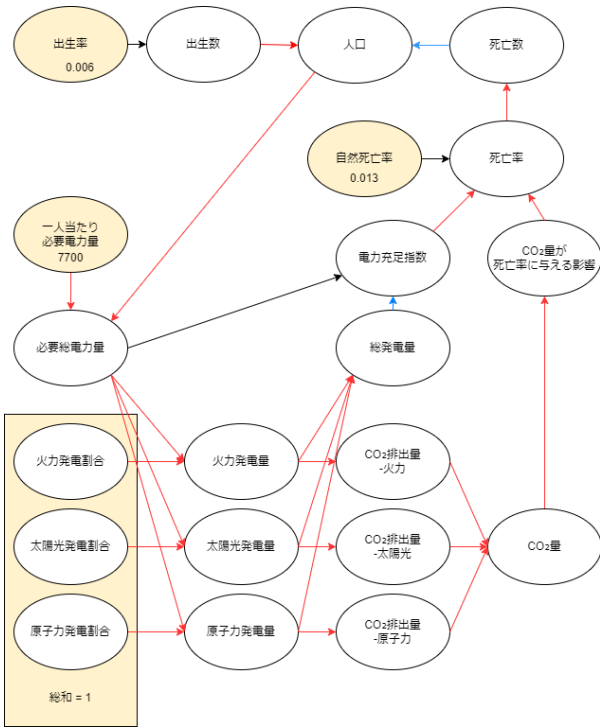


図1 モデルの因果ループ図

図1は、以上に挙げた要素間の関係を因果ループ図にまとめたものである。矢の前の要素が増加したとき、矢の先の要素が増加するなら赤、減少するなら青で表されている。

4. モデルの構築

因果ループ図を元にシステムダイナミクスのモデルを作成する。人口モデル、電力モデル、CO₂量モデルに大別される。

<Insight Maker におけるモデル表現>

- Stock (四角) ...ある時点の累積値の量。
- Flow (二重矢印) ...時間経過に伴う Stock の変化の流れ。
- Variable (楕円) ...ある時点の要素が持つ値。
- Converter (六角形) ...入力に対する出力を設定する。
- Link (矢印) ...Stock, Flow, 間を接続。
- * () 内は Insight Maker 内で表されている形を示す。

<Stock として表す要素>

- 人口
- CO₂量

<Flow として表す要素>

- 出生数/死亡数 (人口に対して)
- 排出量/吸収量 (CO₂量に対して)
- * 吸収量は植物などが毎年吸収する一定の量。

<Converter として表す要素>

- 電力充足指数 (充足率を死亡率に変換するために使用。)

<Variable として表す要素>

- 人口モデル...出生率 (一定)、死亡率、自然死亡率 (一定)、電力充足指数、CO₂量が死亡率に与える影響
- 電力モデル...1人当たり必要電力量 (一定)、必要総電力量、各発電方法の割合とその発電量
- CO₂量モデル...各発電方法のCO₂排出量

<システムダイナミクスモデルの作成>

- 単位...万人 (人口)、kWh (電力)、億トン (CO₂量)

① 人口モデル

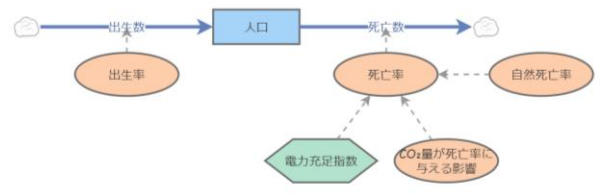


図2 人口についてのSDモデル

- [出生率] = 0.006
- [自然死亡率] = 0.0013 (2023, 厚労省)
- [CO₂量が死亡率に与える影響] = 0.000000001 * [CO₂量] (死亡率への影響を重みづけしている。)
- [電力充足指数] = (総発電量が0の時に死亡率が0.02 増えるような一次関数を設定した。)
- [死亡率] = [自然死亡率] + [電力充足指数] + [CO₂量が死亡率に与える影響]

② 発電モデル

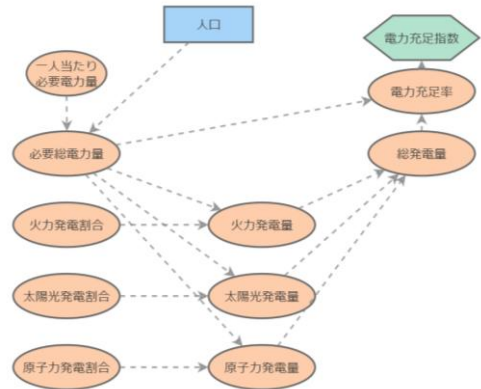


図3 発電についてのSDモデル

- [一人当たり必要電力量] = 7700 (2023, 環境省)
- [必要総電力量] = [一人当たり必要電力量] * [人口]
- [各発電割合] = (任意の値、合計=1)
- [各発電量] = [必要総電力量] * [各発電割合]
- [総発電量] = (各発電量の総和)
- [電力充足率] = $\frac{[総発電量]}{[必要総電力量]}$

③ CO₂量モデル

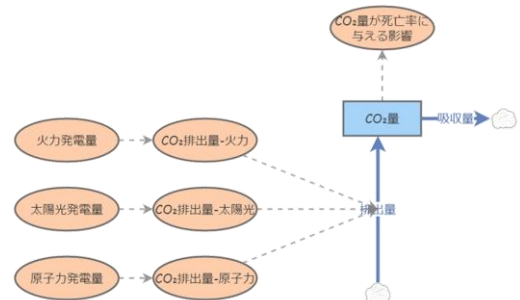


図4 CO₂量についてのSDモデル

- ・[CO₂排出量-火力] = 10 * [火力発電量]
- ・[CO₂排出量-太陽光] = 0.3 * [太陽光発電量]
- ・[CO₂排出量-原子力] = 0.2 * [原子力発電量]
- ＊関西電力のホームページを元に数値を決定した。
- ・[排出量フロー] = (各発電方法のCO₂排出量の総和)
- ・[吸収量フロー] = 600000000 (2023, 環境省)
- ・[CO₂量が死亡率に与える影響] = 0.000000001 * [CO₂量]

④ 原子力発電の短所の表現 —原発事故—

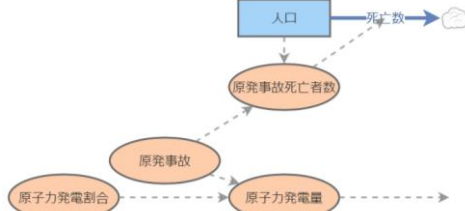


図5 原発事故のモデル化

- ・[原発事故] = IfThenElse (Pulse (2050, 1, 10) = 1, 0, 1)
 ...2050年に原発事故が起き、10年間原子力発電が不可能になる。Pulse関数の出力をIf関数で1から0に変えることで、[原子力発電量]を零倍している。
- ・[発電量] = [必要総電力量] * [発電割合] * [原発事故]
- ・[原発事故死亡者数] = [人口] * 0.0002 * (1 - [原発事故])
 ...47都道府県のうち1つに位置する原発の事故は、その都道府県民の1%の犠牲者を生むと考えた。(1/47*0.01=0.0002)
- ・変えられたPulse関数の出力を元に戻している。

⑤ 火力発電の短所の表現 —天候不順—

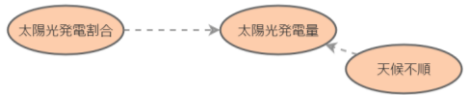


図6 天候不順のモデル化

- ・[天候不順] = IfThenElse (Pulse (2020, 1, 1, 10) = 1, 0, 1, 1)
 ...2020年から10年に1度天候不順で発電量が1割になる年がある。[原発事故]の関数と同様である。
- ・[発電量] = [必要総電力量] * [発電割合] * [天候不順]

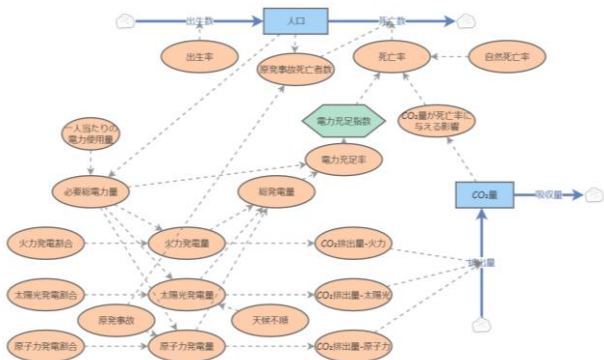


図7 モデルの全体図

<モデルの妥当性の検証>

制作したモデルのある程度の妥当性を検証するために、[原子力発電割合]を零にした状態で[火力発電割合]と[太陽光発電割合]の二変数を変更し、2100年の人口にどのような影響を与えるか、簡易的なシミュレーションを実行した。

火力	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
太陽光	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
原子力	0	0	0	0	0	0
人口 (2021)	4,657	6,054	6,534	6,453	6,340	6,225

表1 火力発電割合と太陽光発電割合のバランスが人口に与える影響の確認

上表より、過剰な[火力発電割合]はCO₂量を増加させ、人口が減少する状況を引き起こすが、一方で過剰な[太陽光発電割合]も発電の不安定性による[電力充足指数]の低下をもたらし、人口の減少に繋がることが読み取れる。各発電方法の長所と短所を踏まえ、最適な各発電方法の割合を考察するために、このモデルを用いてシミュレーションを行う。

5. シミュレーションの実行

<使用した初期値>

- ・[人口] = 12000
- ・[CO₂量] = 100000000

<方法>

[火力発電割合]、[太陽光発電割合]、[原子力発電割合]の値を合計が1になるように0.1刻みで調整し、2100年時点の人口と、時間経過に伴う人口と死亡率の推移をシミュレーションする。

<結果>

[火力発電割合] = 0.6、[太陽光発電割合] = 0.4、[原子力発電割合] = 0のとき、2100年の人口が最大となった。シミュレーションした場合の数が膨大であるので、最初に2100年の人口のみを原子力発電割合ごとに示す。ここでは、火力・太陽光発電割合を順に「0.7-0.2」などと表す。

① 原子力発電割合 = 0

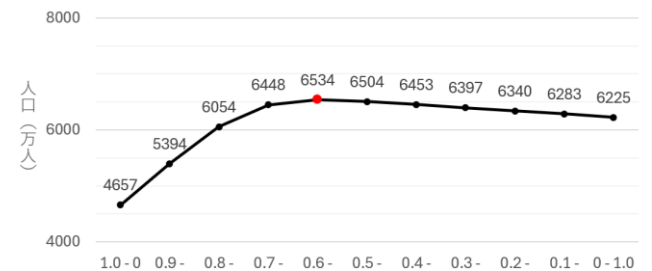


図8 [原子力発電割合] = 0のときの人口

② 原子力発電割合 = 0.1

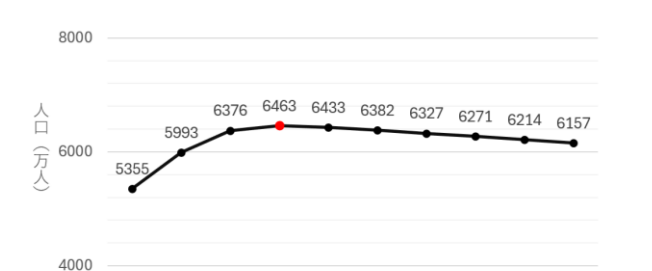


図9 [原子力発電割合] = 0.1のときの人口

③ 原子力発電割合 = 0.2

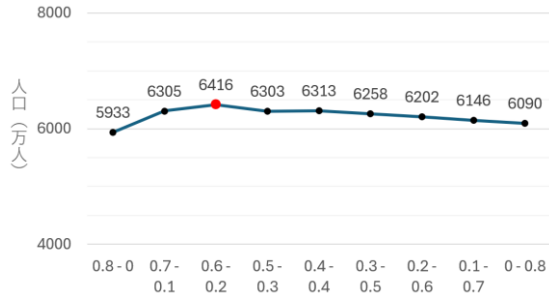


図10 [原子力発電割合] = 0.2のときの人口

④ 原子力発電割合 = 0.3以降も、2100年の人口の最大値を更新することなく、少しずつ減っていった。

次に最適な発電方法の割合の下、人口と死亡率の時間経過に伴う推移を示す。

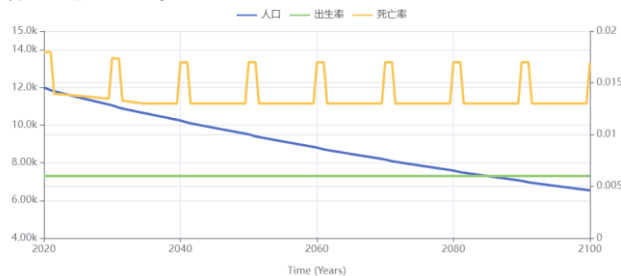


図11 最適な発電方法の割合における人口と死亡率

左縦軸に人口、右縦軸に出生率（一定）と死亡率、横軸に時間を示す。天候不順により定期的に死亡率は上昇するが、火力発電の発電量の安定性、太陽光発電のCO₂排出量の少なさを最大に生かすことのできる発電割合である、

6. 考察

[火力発電割合] = 0.6、[太陽光発電割合] = 0.4、[原子力発電割合] = 0のときに、2100年の人口が6534万人と最大になった。これから得られる結論として、CO₂の排出を防ぐために、多少発電量が安定しなくても太陽光発電を併用するのが良いということが挙げられる。また、原発事故が起きた時のリスクを設定すると、原子力発電を使わないという選択肢が最適であることが分かった。しかしこのモデルでは原発事故が2050年に必ず起きることになっているが、実際は極めてまれな事象であり、CO₂の排出を抑えながらも安定して発電することのできる原子力発電の長所はもう少し考慮されるべきである。

また原子力発電割合がどのような値であっても、火力発電割合が5割を下回ると2100年の人口は減少を始めた。このことからやはり火力発電の持続的な発電量の安定性が大きいということが考えられる。

<改善点・今後の課題>

- 使用した数値、特にCO₂量についての各種の値の中には正確性の無いものが含まれているため、正確なデータと数値を収集し、設定する必要がある。
- ある値を別の値に変換するときの重みづけの数字を現実世界に即して決めるべきである。

- 原発事故が起きる確率の低さを考慮するべきである。
- 発電方法の割合における「最適」を人口によって評価したが、発電量の安定性やCO₂量が現実世界で人口との直接的な因果関係を持つかどうかには疑問が残るので、捨象してしまった他の要素もモデルに取り込む必要がある。

7. 謝辞

一連の研究は、東京大学大学院工学系研究科の青山和浩教授、TAの島田智允さん、桂晨巍さん、瀧墨さん、近藤空さん、劉静維さんのご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

スポーツイベントの運営

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学大学院工学系研究科システム創生学専攻 教授 青山和浩 教授

要約

今回はスポーツイベントの運営に注目し、チケット価格と利益の関係を調べるという目的で研究を行った。Insightmaker というシステムダイナミクスソフトウェアを用いて、実際のスポーツのイベントを想定してシュミレーションモデルを作成し、様々な条件で観客数や利益についてシミュレーションを行った。

ABSTRACT

In this study, I focused on the management of sporting events, with the objective of investigating the relationship between ticket prices and profits. Using Insightmaker, a system dynamics software, I created a simulation model of an actual sporting event and simulated the number of spectators and profits under various conditions.

はじめに

サッカーやバスケ、バレーなどでは試合前に広告などで宣伝し、当日は多くのスタッフが会場ではたらき、人々はチケットを買い、売店でグッズを買い楽しんでいる。そのなかでそういったスポーツイベントの運営側の利益はどうなっているのかについて疑問を持った。システムダイナミクスという方法でシステムの要素間の関係をモデルで示し時間経過によるシミュレーションした。

研究内容

1. システムダイナミクスについて

〈目的〉

システム…複数の構成要素からなるある目的を持ったひとまとまりの集合体。各要素が他の要素と相互関連している。

システムダイナミクス…予測の対象となる変数が時間変化を通して「どのような動きを示すか」「どのように変化していくのか」を追跡するシミュレーション手法。

1. モデル…対象としたシステムを抽象化・捨象化し、要素とその関係を示したもの。システムダイナミクスモデルでは、ストックとフローから構成される。

2. 目標

〈研究の目標〉

チケットの価格設定によって収益、観客者数などがどのように変化するかについて調べる。仮定として、運営側の収入はチケット販売とグッズ販売、支出は人件費とプロモーション費と施設費によって決まるものとする。

3. 因果ループ図の作成

因果ループ図とは、ある変数の増減が別の変数の値に影響を与えていることを矢印で示し、その連なりで要素同士の因果関係の循環を示した図である。複雑な因果関係を単純なモデルで表すことができる。

〈主要な要素〉

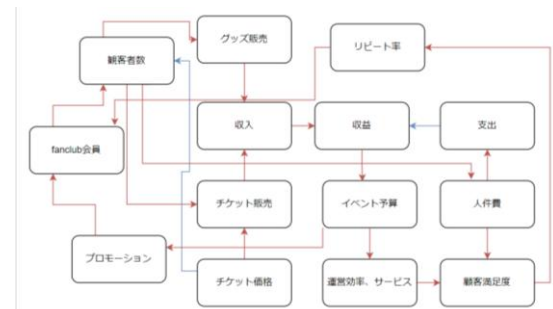
- ・収入、支出、収益、チケット販売、グッズ販売
- ・人件費、イベント予算、プロモーション、チケット価格
- ・観客者数

〈要素間の関係〉

- ・チケット価格を上げると観客者数は減る。
- ・収益が増えたとイベント予算も増え、運営効率やサービスの質も上がる。
- ・顧客満足度が増加するとリピート率が上がる。
- ・プロモーションが増加すると Fancub 会員や観客者数も増加する。

〈因果ループ図〉

矢の前の要素が増加した時、矢の先の要素が増加なら赤、減少なら青で表している。



4. モデルの構築

因果ループ図を元にシステムダイナミクスに使うモデルを作成していく。

〈insightmaker におけるモデル表現〉

- ・ストック (四角) …ある時点の変数の量、物がたまる「箱」
- ・フロー (青矢印) …時間帯における変数の流れ、物の流れ。
- ・バリエブル (楕円) …システムに必要な数値 (定数) を定義
- ・コンバータ (六角形) …情報の変換 (関数) 等を定義。
- ・コネクタ (矢印) …ストック、フロー、コンバータ間を接続。

- ・ソース(雲)…物の無限の出入り口。
()内は insightmaker で表されている形

<ストックとして表す因子>

- ・収益 (・Fancclub 会員)

<フローとして表す因子>

- ・収入 ・支出
(・新規入会人数・退会人数)

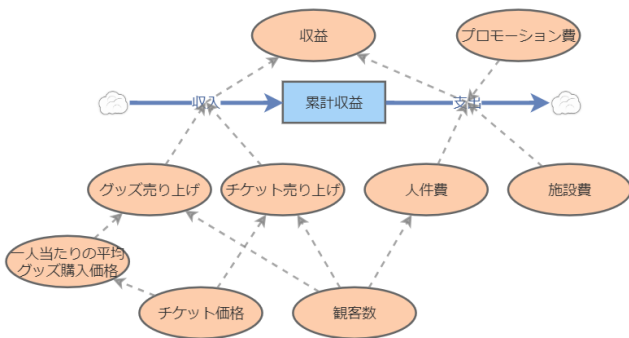
<コンバータとして表す因子>

- ・チケット販売 ・チケット価格 ・グッズ販売
- ・イベント予算 ・リピート率 ・観客者数
- ・プロモーション ・人件費 ・顧客満足度
- ・運営効率 ・サービス

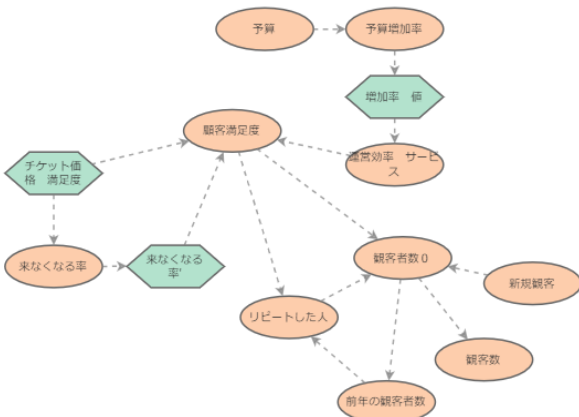
<システムダイナミクスモデルの作成>

モデル①

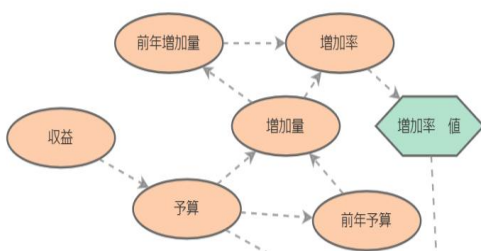
① 収益



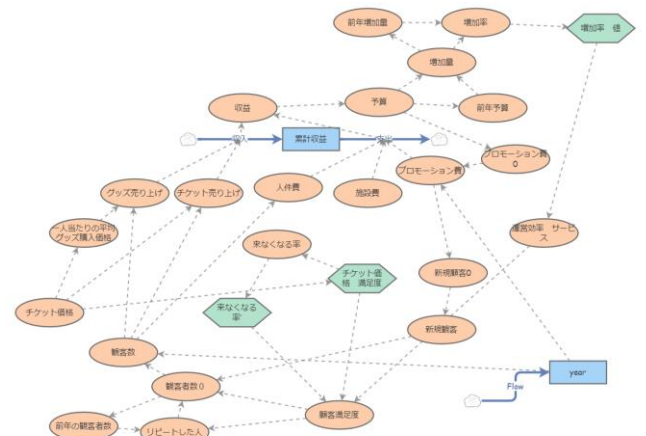
② 観客者数



③ 予算の増減



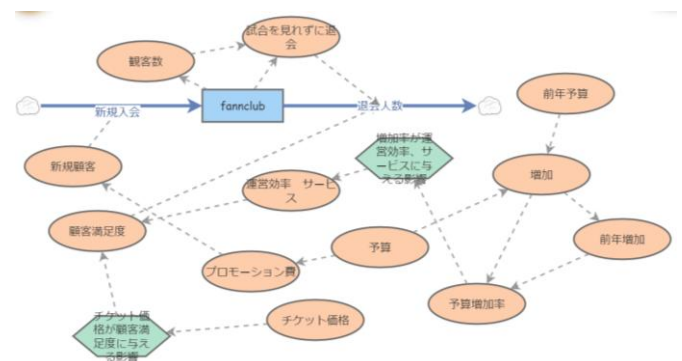
<モデルの全体図>



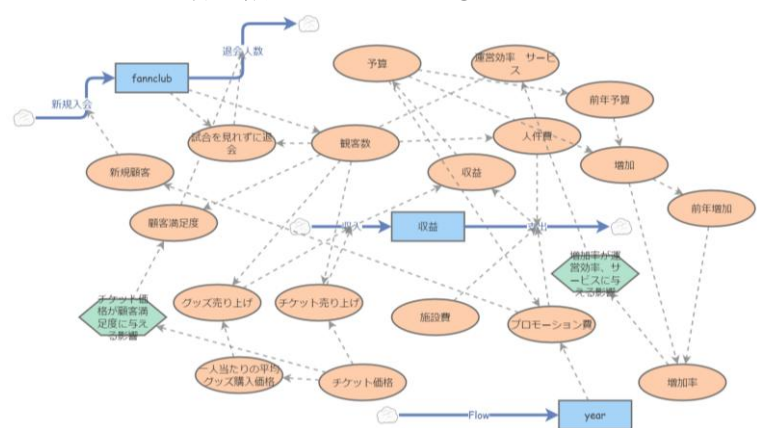
モデル②(Fancclub ありバージョン)

観客者数は Fancclub 会員のみとする。

① Fancclub 関係



収益と予算の増減についてはモデル①と同じ



<モデルの全体図>

<構成要素間関係の数式化>

モデル①

(1) 収益

- ・収入=[チケット売り上げ]+[グッズ売り上げ]
- ・支出=[施設費]+[人件費]+[プロモーション費]
- ・プロモーション費=IfThenElse([year]=0, 500000, [予算]*0.1)

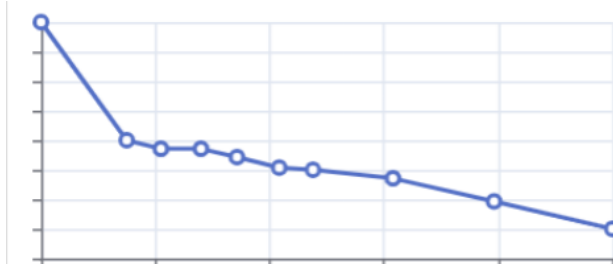
プロモーション費については一回目は 500000 円、二回目以降は予算の 10 パーセントとする。(後のシミュレーションで数値は変える)

- ・収益=[収入]-[支出]
- ・グッズ売り上げ=[観客数]*[一人当たりの平均グッズ購入価格]
- ・チケット売上=[観客数]*[チケット価格]
- ・人件費=([観客数]/1000)*100000
- ・一人当たりの平均グッズ購入価格=[チケット価格]/3
- ・施設費=5000000 円

(2) 観客者数について

- ・観客数=IfThenElse([year]=0, 10000, [観客者数 0])
観客数については 0 年目は 10000 人とする。
- ・新規顧客 0=[プロモーション費]/1000
- ・新規顧客=IfThenElse([新規顧客 0]<10000, [新規顧客 0], 10000)
- ・リピートした人=[前年の観客者数]*[顧客満足度]
- ・観客者数=[新規観客]+[リピートした人]
- ・前年の観客者数=Delay([観客者数 0], 1, 10000)

・チケット価格満足度



チケットの価格で客の満足度を定義する。チケット価格が上がるにつれて満足度は下がるが比例関係で下がっていきわけではないことを表している。

- ・来なくなる率=(1-[チケット価格 満足度])
- ・来なくなる率'



来なくなる率の値によって来なくなる率' を定義する。来なくなる率が上がると来なくなる率' も上がる。

- ・顧客満足度=([チケット価格 満足度]+[運営効率 サービス]-[来なくなる率'])/2

(3) 予算の増減

- ・予算=Delay([収益], 1, 10000000)
- 一回目は 10000000 円、二回目からは前の収益が予算となる。
- ・前年予算=Delay([予算], 1, 0)
 - ・増加量=[予算]-[前年予算]

- ・前年増加量=Delay([増加], 1, 10000000)
- ・増加率=([増加]+1)/([前年増加]+1)

・増加率 値



増加率が大きくなるほど大きくなるが比例関係ではなく、ある程度大きくなるとほぼ一定の値を返すようになっている。(運営効率、サービスの評価は最高の 1 となる。)

(4) Fancclub 関係(モデル②)

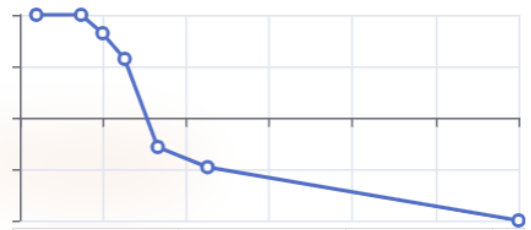
- ・新規入会=新規顧客=[プロモーション費]/1000
(プロモーション費 1000 円で一人新規入会するとする。)
- ・退会人数=[fancclub]*(1-[顧客満足度])+[試合を見られずに退会]
- ・顧客満足度=([チケット価格が顧客満足度に与える影響]+[運営効率 サービス])/2
- ・観客数=IfThenElse([fancclub]<50000, [fancclub], 50000)

収容可能人数を 50000 人とし、Fancclub 会員が五万人より少ない場合は Fancclub 会員、5 万人より多い場合は、上限の五万人としている。

- ・試合を見られずに退会=IfThenElse([fancclub]>[観客数], ([fancclub]-[観客数])*0.1, 0)

試合を見られずに退会は Fancclub 会員が観客者数より多い場合、見に行けなかった人の 10 パーセントが退会することを意味する。

・チケット価格が顧客満足度に与える影響



チケット価格が高くなるにつれて返す値が小さくなるようにしている。(ある一定値を超えると急激に小さくなるようにしている。)

5. シミュレーション

<使用した数値>

- ・0 年目の観客数…10000 人
- ・施設費…5000000 円
- ・人件費…観客 1000 人に対しスタッフ 1 人
スタッフ一人当たり 100000 円
- ・一人当たりの平均グッズ購入価格…チケット価格の 1/3
- ・0 年目のプロモーション費…500000
- (・はじめの Fancclub 会員…10000 人)

モデル①

〈シミュレーション I〉

プロモーション費は予算の 1/10 に保ったままチケット価格を変化させる。観察対象は収益と観客数なので、収益（収入、支出）と観客者数、満足度に注目する。

〈シミュレーション II〉

チケット価格は保ったまま予算に対するプロモーション費の割合を 1/10 から変化させる。シミュレーション I と同様に収益（収入、支出）と観客者数、満足度に注目する。

モデル②

〈シミュレーション I〉

初期の Fanclub 会員を一定に保ったままチケット価格を変化させる。観察対象は収益と Fanclub 会員の变化なので収益、（収入、支出）と Fanclub 会員、に着目する。

〈シミュレーション II〉

チケット価格を一定に保ったまま初期の Fanclub 会員を変化させる。シミュレーション I と同様に収益、（収入、支出）と Fanclub 会員、に着目する。

〈結果〉

モデル①

シミュレーション I

条件：プロモーション費=予算*0.1

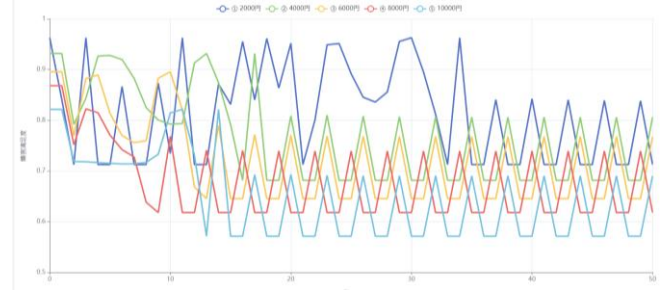
チケット価格 2000, 4000, 6000, 8000, 10000



上図 収益



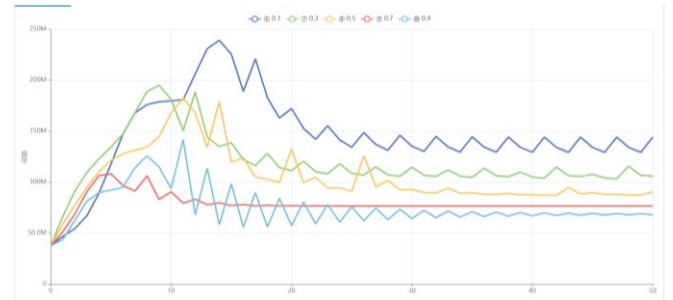
上図 観客数



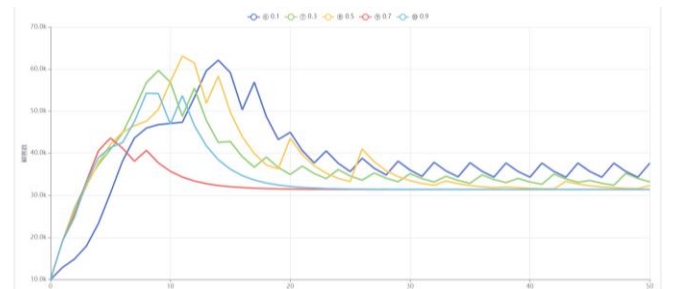
シミュレーション II

上図 満足度

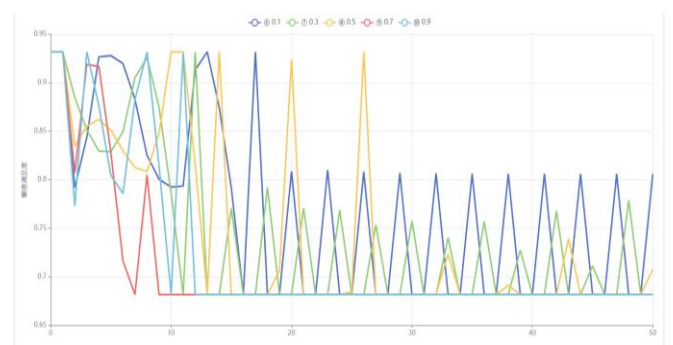
条件：プロモーション費=予算*0.1 0.3 0.5 0.7
チケット価格 4000 円



上図 収益



上図 観客数



上図 満足度

モデル②

シミュレーション I

条件：Fanclub 会員 10000 人

チケット価格 2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000



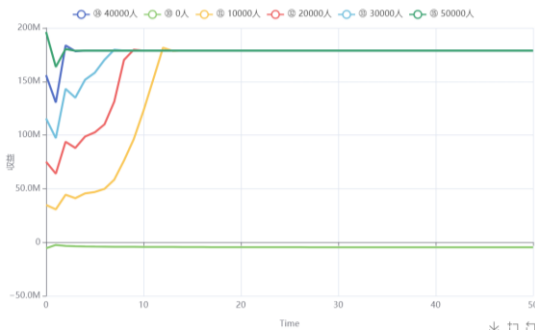
上図 Fanclub 会員

上図 収益

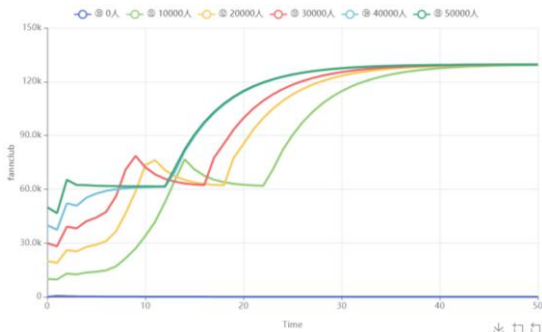
シミュレーション II

条件：チケット価格 4000 円

Fanclub : 0、10000、20000、30000、40000、50000



上図 収益



上図 Fanclub

<結果まとめ>

モデル①

シミュレーション I

収益はチケット価格が高いほど大きくなる。

観客者数はチケット価格が 4000 円の時に最大をとる。

満足度はチケット価格が安いほど高くなる。

シミュレーション II

収益はプロモーション費が予算*0.1 のときに最大となった。

観客者数はプロモーション費が予算の 10%、30%、50%の時に

最大となった。最大となる年数は異なった。

<シミュレーションから得られた結論>

チケット価格を高くすると収益は大きくなる。しかし、観客数にはそのような関係はないため、収益と観客数がともに大きくなるバランスの良いチケットの適正値があると考えられる。また、

プロモーション費については(予算*0.9)よりも(予算*0.1, 0.3, 0.5)のほうがいい結果を得られたので大きくすればするほど良いということはないと考えられる。適切なプロモーション活動をするのがいい。

モデル②

シミュレーション I

チケット価格が 2000 円の時、Fanclub 会員はどんどん減っていったが 3000 円から 6000 円までは増えていき一定の値に収束した。7000 円ではあまり変化がなく、8000 円を超えると逆に減っていった。

収益は 2000 円の時はずっと下がっていきマイナスになった。3000 円から 6000 円までははじめは増加していき一定の値に収束した。7000 円ではあまり変化せず、8000 円を超えると 2000 円と同じように収益はどんどん下がっていった。

シミュレーション II

Fanclub 会員の初期値が 0 人だと減っていったがそれ以外は途中で違いはあるが最終的にほぼ同じ値に収束した。

収益も 0 人のときはマイナスだがそれ以外は最終的に同じ値に収束した。

<シミュレーションから得られた結論>

チケット価格を 4000 円にすれば Fanclub 会員が一番多くなった。6000 円にすれば収益が一番大きくなった。

6. 考察

<モデル①>

シミュレーション I では、チケット価格を高くすれば収益は増えるが観客数はあまり増えなかった。観客数が増えなかったのは、収益の増加に伴う予算の増加による運営効率、サービスが顧客満足度に与える+ (プラス) の影響よりも、チケット価格が上がったことによるチケット価格満足の低下、来なくなる率の増加が顧客満足度に与える- (マイナス) の影響の方が大きかったからだと考えられる。チケット価格を高くすれば予算が増加するためプロモーションを活発に行い、新規顧客が増え観客数は増えると考えていたがチケット価格の高値化が顧客満足度に与える- (マイナス) の影響が大きかった。

シミュレーション II ではプロモーション費の予算に対する割合が小さいほど収益が増加し、観客数も割合が 10%、30%、50%の時に多くなった。プロモーション費の割合が予算の 70%、90%の時に収益、観客数が増加しないのは、収益が増加しないのは予算の多くの割合をプロモーション費として消費するので支出が増えるからだと考えられる。観客数が増加しないのは、割合を高くしたプロモーションによって得る新規顧客の人数の増加の影響より、収益、予算の減少による運営効率、サービスの低下が顧客満足度に与える- (マイナス) の影響、予算に対するプロモーション費の割合が高いとはいえ予算自体がだんだんと減少していきそれに伴いプロモーション費も少なくなり新規顧客が集まらなくなる、新規顧客の減少の影響の方が大きかったからだと考えられる。プロモーション費の割合が低いと、支出が減り収益、予算が増え運営効率、サービスが高くなり顧客満足度の増加、観客数の増加につながる。これが、プロモーションのよって得る新規顧客数がプロモーション費の割合が高いときよりも少ないのに観客数が増加しているのに影響していると考えられる。

〈モデル②〉

シミュレーションⅠではチケット価格が 4000 円の時に Fanclub 会員が一番多くなっており、6000 円の時に収益が一番多くなっている。チケット価格が 3000、4000、5000、6000 円では収益が最終的に一定の値になっているがこれはイベント参加人数の上限が今回は 50000 人となっており Fanclub 会員の数がこれを超えれば参加人数が MAX となり収益がそれ以上増えないからである。参加人数が MAX50000 人でそれより増えないため、Fanclub 会員が 50000 人を超える 3000 から 6000 円の中では最も値段の高い 6000 円の時に収益が最大となっている。参加人数の上限を 100000 人に増やしてもやはり結果は同じであった。

シミュレーションⅡでは Fanclub 会員の初期値を 0 以外のどんな値から始めても最終的に同じ値に収束した。最終的に収束することから新規入会と退会、収入と支出でつりあいのとれるところが存在することがわかる。このことから Fanclub 会員が 0 人からスタートするとこのシミュレーションの要素だけでは会員を増加は見込めず、ほかに何か別のアプローチが必要となると考えられる。10000 人以上いるならこのシミュレーションである程度増加が見込める。

このモデルにおける数値や因果関係の数式は、実際の数値的関係の大きさを関数として正しく表すことができていない可能性がある。これを解決するためにはもっと現実社会のデータを収集、分析し、因果関係を正確に数値化する必要がある。

〈今後の課題〉

- ・現実に適用できるモデルにするために、正確なデータを収集する必要である。
- ・今回、収入はグッズ販売やチケット販売、支出は人件費、施設費、プロモーション費のみとしたがほかにはないのか、また設定した数値も適切だったのかを調べる必要がある。
- ・スポーツイベントでは屋台などもあり、またイベント会場に来るための交通費など全体の経済活性についても調べたい。
- ・一番数値化が難しかった「顧客満足度」は現実にもう少し近づけるようにしたい。
- ・スポーツチームの試合観戦ならチームの勝率やスター選手による観客者数の影響も考えたい。

【謝辞】

この一連の研究は、東京大学大学院工学系研究科の青山和浩教授、TA の桂晨巍さん、瀋墨さん、島田智充さん、劉静維さん、近藤空さんのご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

過疎地域における観光産業が都市人口に与える影響についてのシミュレーション

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学大学院工学系研究科システム創成学専攻 教授 青山和浩

要約

今回は観光産業が過疎地域に与える影響について研究を行った。Insight Maker というシステムダイナミクスソフトウェアを用いて、都市の人口や観光客の増減についてのシミュレーションモデルを作成してシミュレーションを行い、どのような政策を行えばよいかを検討した。

キーワード；システムダイナミクス、システム、因果ループ図

ABSTRACT

I studied about an effect which the tourism industry gives a depopulated area. I made a simulation model and simulated the change of the population of a city and of the number of tourists.

はじめに

今日、農村等の過疎化は重大な問題とされ、その対策として観光産業に目を向けたいわゆる町おこし・村おこしが行われているが、実際それらは一定の効果を発揮しているのか疑問に思ったので、研究テーマとすることにした。

システムダイナミクスという方法でシステムの要素間の関係をモデルで示し時間経過によるシミュレーションを行った。

研究内容

1. システムダイナミクスについて

〈目的〉

システム…複数の構成要素からなるある目的を持ったひとまとまりの集合体。各要素が他の要素と相互関連している。

システムダイナミクス…予測の対象となる変数が時間変化を通して「どのような動きを示すか」「どのように変化していくのか」を追跡するシミュレーション手法。

モデル…対象としたシステムを抽象化・捨象化し、要素とその関係を示したもの。システムダイナミクスモデルでは、ストックとフローから構成される。

2. 目標

〈研究の目標〉

どのような政策を行うと観光客や人口が増えていくかについて調べる。仮定として、観光への魅力は観光施設の数に比例して大きくなるとする。また、観光客は宿泊施設で必ず1泊するものとする。

3. 因果ループ図の作成

因果ループ図とは、ある変数の増減が別の変数の値に影響を与えていることを矢印で示し、その連なりで要素同士の因果関係の循環を示した図である。複雑な因果関係を単純なモデルで表すことができる。

〈主要な要素〉

- ・人口 ・流入率 ・流出率 ・死亡率 ・観光産業労働者数
- ・宿泊施設数 ・観光施設数 ・観光客数 ・利益

〈要素間の関係〉

- ・人口が増えると観光産業の労働力が増加するので、観光施設やホテルが増える。
- ・観光産業の労働力が増加すると支出が増加する。
(人件費が増加するため)
- ・観光施設が増えると観光への魅力が増加する。
- ・観光の魅力が増加すると観光客が増える。
- ・観光客が増えると収入が増える。
- ・収入が増えると利益が増え、支出が増えると利益が減少する。
- ・利益が大きくなると職の魅力が大きくなり、流入率が増加、流出率が減少する。

〈因果ループ図〉

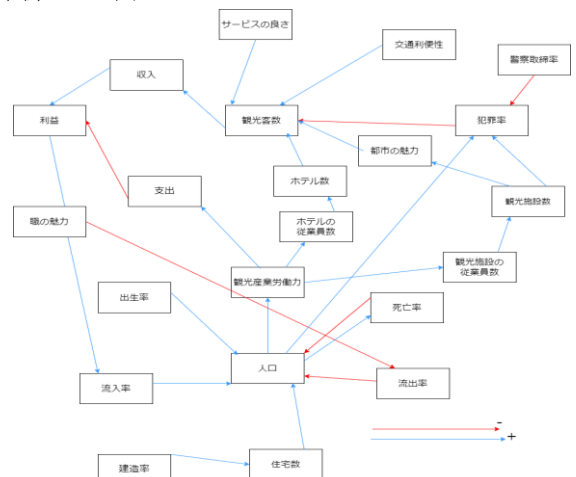


図1 観光客数と人口の増減についての因果ループ図

図1は、観光客数と人口の因果関係を示す因果ループ図である。矢の前の要素が増加した時、矢の先の要素が増加するときは青色の矢印、減少するときは赤色の矢印で示している。

4. モデルの構築

因果ループ図を元にシステムダイナミクスに使うモデルを作成していく。

〈Insight Maker におけるモデル表現〉

- ・ストック(四角)・・・ある時点の変数の量、物がたまる「箱」
 - ・フロー(矢印)・・・時間帯における変数の流れ、物の流れ。
 - ・コンバータ(六角形)・・・システムに必要な数値(定数)および情報の変換(関数)等を定義。
 - ・コネクタ(矢印)・・・ストック、フロー、コンバータ間を接続。
 - ・ソース(雲)・・・物の無限の出入り口。
- ()内は Insight Maker で表されている形

〈ストックとして表す因子〉

- ・人口 ・ホテル数 ・観光施設数 ・観光客数 ・住宅数

〈フローとして表す因子〉

- ・出生数 ・死亡数 ・流入数 ・流出数
- ・建造数 ・解体数
- ・観光客の増加数 ・観光客の減少数
- ・住宅の増加数

〈コンバータとして表す因子〉

- ・土地占有率による影響 ・居住割合による影響
- ・ホテル従業員数による影響 ・施設従業員数による影響
- ・観光への魅力 ・職への魅力
- ・ホテルの収容割合による影響
- ・収益による影響

〈システムダイナミクスモデルの作成〉

① 人口と住宅数の関係

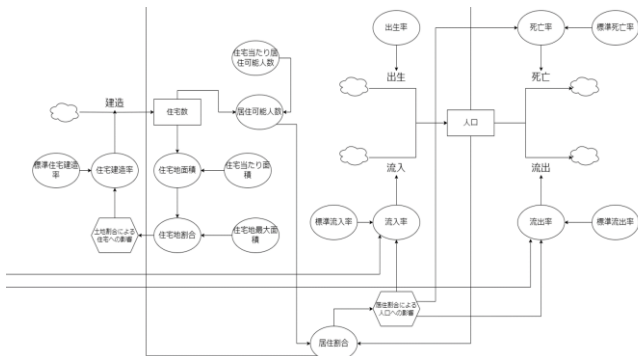


図2 人口と住宅数との関係を表すモデルの部分

② 人口とホテル、観光施設数の関係

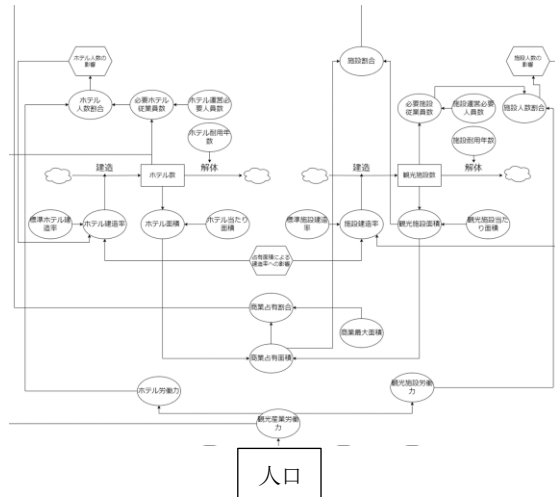


図3 観光産業労働人口と各施設数との関係についてのモデル

③ 観光業と観光客数の関係

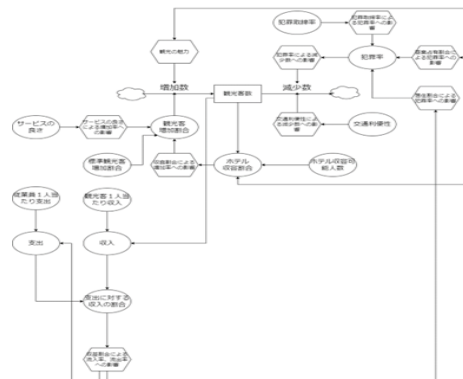


図4 観光客数と施設数の関係を表すモデル

③ 全体図

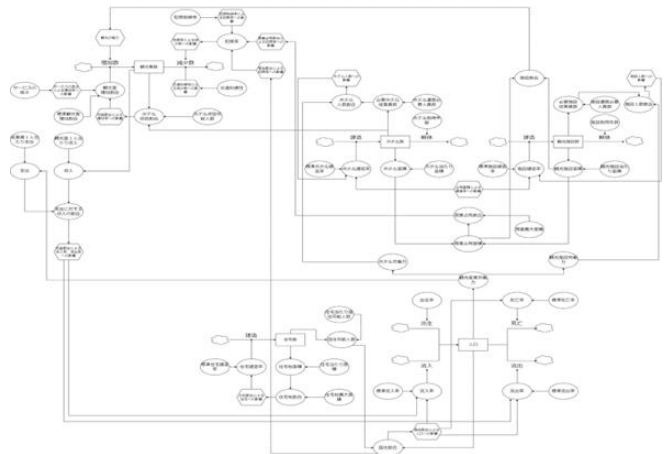


図5 人口と観光客数の関係を表すモデル

〈構成要素間関係の数式化〉

(1) 人口と住宅数の関係

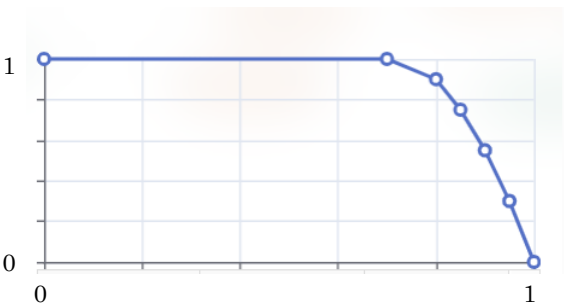
- ・建造数=住宅数 * 住宅建造率

- ・住宅建造率=土地割合による住宅の影響 * 0.05
 - ・流入数=人口 * 流入率
 - ・流入率 = 居住割合による人口の影響 * 利益による流入率、流出率への影響 * 0.05
 - ・流出数 = 人口 * 流出率
 - ・流出率 = (2-利益による流入率、流出率への影響)*(2-居住割合による人口の影響)*0.07
- 利益による流入率、流出率への影響の関数はグラフ1のように定義した。横軸は0から2までの値を取り、グラフはS字型になるように作成した。



グラフ1 S字型曲線

また、居住割合による人口の影響の関数はグラフ2のように定義した。横軸は0から1の範囲の値を取り、横軸が1に近づくほど急激に減少するようにグラフを作成した。



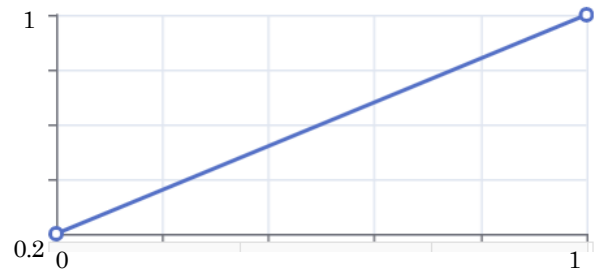
グラフ2 急降下型曲線

(2) 人口とホテル、観光施設数の関係

- ・観光産業労働力=人口*0.1
- ・ホテル建造数=ホテル数*ホテル建造率
- ・ホテル建造率=占有面積による建造への影響*ホテル雇用割合による建造への影響*0.1
- ・観光施設建造数=観光施設数*観光施設建造率
- ・観光施設建造率=占有面積による建造への影響*観光施設雇用割合による建造への影響*0.1
- ・ホテル解体数=30年前のホテル建造数+ホテル従業員数/20
- ・観光施設解体数=40年前の観光施設建造数+観光施設従業員数/60

占有面積による建造への影響の関数について、グラフ2と同じグラフで定義する。

ホテル雇用割合による建造への影響、観光施設雇用割合による建造への影響の関数は、下図のように定義する。労働力が豊富であるほど施設の建造は促進されると考え、このように定義した。



グラフ3 直線型関数

(3) 観光業と観光客数の関係

- ・観光客増加数=観光客数*観光客増加割合*観光への魅力*2 (値の調整のため2倍している。)
- ・観光客増加割合=収容割合による観光客への影響*1.68
- ・観光客減少数=犯罪率による観光客への影響*1.25

観光への魅力の関数はグラフ3のように直線のグラフで定義する。値域は0から2であり、横軸は0から1の範囲で変化する。

収容割合による観光客の影響の関数について、次の図のような形の関数を定義する。これは、人気がないとほかの人もなかなか訪れようとはしてくれないが、かえって混雑しすぎていても訪れるのをあきらめる人がいるのを表している。



グラフ4 台形型関数

犯罪率による観光客への影響の関数については、グラフ2と同じもので定義する。

5. シミュレーション

<使用した数値>

- ・初期人口=52000(人)
- ・初期住宅数=30000(棟)
- ・初期ホテル数=90(棟)
- ・初期観光施設数=150(棟)
- ・初期観光客数=6000(人)

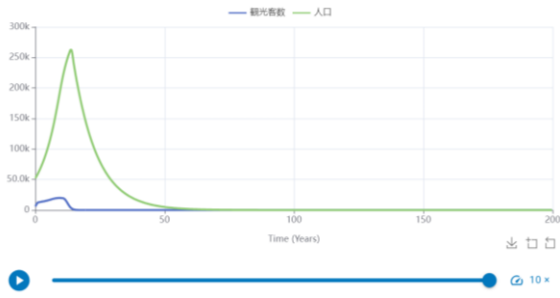
<シミュレーション>

～観光客支援か、都市の魅力上昇か～
観光産業の労働者をホテルと観光施設に配分する比を変化させ、観光者数と人口の変化をシミュレーションする。

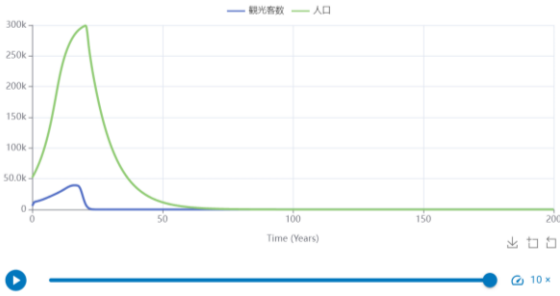
<結果>

シミュレーション

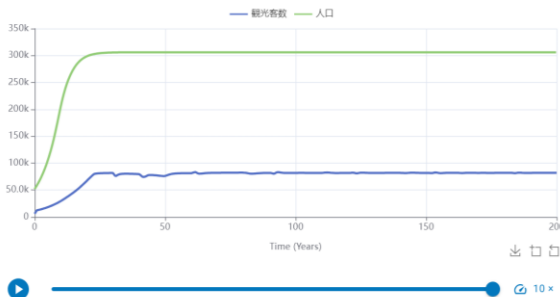
グラフ5 ホテル従業員：観光施設従業員=6：4の場合



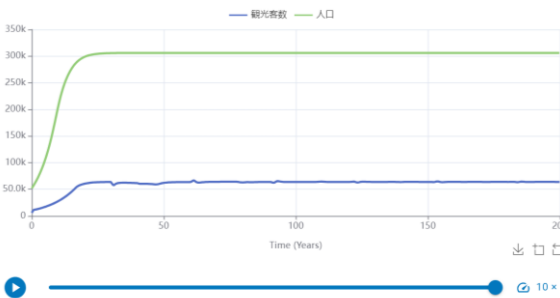
グラフ6 ホテル従業員：観光施設従業員=5：5の場合



グラフ7 ホテル従業員：観光施設従業員=4：6の場合



グラフ8 ホテル従業員：観光施設従業員=3：7の場合



グラフ9 ホテル従業員：観光施設従業員=2：8の場合

〈結果まとめ〉

5：5のときまでは都市は人口減少の一途を辿ったが4：6としたとき、人口は住宅数による居住限界まで増加した。また、3：7、2：8と観光施設従業員の割合を増やすと、同様に人口は居住限界まで増加したが、観光客は割合を増やすにつれて減少した。

〈シミュレーションから得られた結論〉

観光客を呼びこみ、都市を活性化するには、観光客の旅行支援をするよりも都市の観光の魅力を高めるような政策を行った方が良い。

6. 考察

ホテル従業員の割合が大きいとき、観光客が最終的に0になり、人口も減少したのは、観光施設の従業員がいないために観光施設の建設ができず、観光の魅力が低くなってしまったためだと考えられる。

観光施設従業員の割合を6割から増加させていったときに、観光客の最終的な人数が減少していったのは、ホテルの数が十分でないために都市を訪れようとする観光客を収容しきることができずに観光客数が減少したと考えられる。

〈今後の課題〉

- 実際の社会に適用できるモデルにするために、正確なデータを収集する必要がある。
- 実際は交通利便性や警察の治安維持の取り組み、ホテルや観光施設のサービスの良し悪しなども観光客の増減に関係すると考えられるので、それらの要素を取り込んでモデルを作る必要がある。
- 都市の人口を左右する条件として、観光のみを取り扱ったが、実際は最低賃金などの考える要因をモデルに取り入れる。

【謝辞】

この一連の研究は、東京大学大学院工学系研究科の青山和浩教授、院生の島田智允さん、劉静維さん、大学生の桂晨巍さん、瀧墨さんのご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

森林の切り開きが人口に与える影響のシミュレーション

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学大学院工学系研究科システム創成学専攻 教授 青山和浩

要約

今回私は、森林伐採と人口の増減の関係を調べるという目的で研究を行った。InsightMaker というシステムダイナミクスのソフトウェアを用いて、森林を切り開いて農耕と牧畜を行う人々を想定したシミュレーションモデルを作成し、森林を切り開くことと人口の増減、また植林を行った場合の人口の増減についてシミュレーションを行った。

キーワード；システムダイナミクス、システム、因果ループ図、森林伐採、植林

ABSTRACT

I studied about the relationship between deforestation and population changes. I made a simulation model assuming deforestation for agriculture and livestock. I explored the effects of deforestation on population and the impact on population if reforestation is implemented.

はじめに

今日、アマゾンやアフリカ、アジアの島などには人口の急増を受けて多くの森林を切り開いている地域があるが、このまま森林伐採を続ければ、イースター島のように人が住めなくなるのではないかと思ひ、検証した。

システムダイナミクスという方法でシステムの要素間の関係をモデルで示し時間経過によるシミュレーションした。

研究内容

1. システムダイナミクスについて

〈目的〉

システム…複数の構成要素からなるある目的を持ったひとまとまりの集合体。各要素が他の要素と相互関連している。

システムダイナミクス…予測の対象となる変数が時間変化を通して「どのような動きを示すか」「どのように変化していくのか」を追跡するシミュレーション手法。

モデル…対象としたシステムを抽象化・捨象化し、要素とその関係を示したもの。システムダイナミクスモデルでは、ストックとフローから構成される。

2. 目標

〈研究の目標〉

森林を切り開いて農地や牧草地にすると人口がどう変化するか調べる。仮定として、人が生きていくためには穀物と家畜が必要であり、需要と供給の割合が死亡率に影響を与える。ただし穀物のほうが死亡率に与える影響が大きい。また、切り開いた土地には、生産性の高い新しい土地と生産性の低い古い土地があり、一定の割合で農耕も牧畜もできない不毛な土地となり、それがまた一定の割合で森林へと自然に回復する。農地と牧草地では、農地のほうが地力低下しやすく、自然回復がしにくい。

3. 因果ループ図の作成

因果ループ図とは、ある変数の増減が別の変数の値に影響を与えていることを矢印で示し、その連なりで要素同士の因果関係の循環を示した図である。複雑な因果関係を単純なモデルで表すことができる。

〈主要な要素〉

- ・人口、出生率、死亡率
- ・食糧需要、食糧供給、実質供給 ※食糧とは、穀物と家畜
- ・農地、牧草地、森林、植林

〈要素間の関係〉

- ・人口が増加すると食糧需要が増加する。
- ・食糧需要が増加すると、農地や牧草地が増加する。
- ・農地や牧草地が増加すると食糧供給が増加する。
- ・食糧供給が増加すると死亡率が減少し、人口が増加する。
- ・森林は農地や牧草地、植樹によって決まる。

〈因果ループ図〉

図1に示すように、矢頭の要素が増加したときに矢尾の要素も増加する関係を赤の矢印、矢尾の要素が減少する関係を青の矢印で示した。

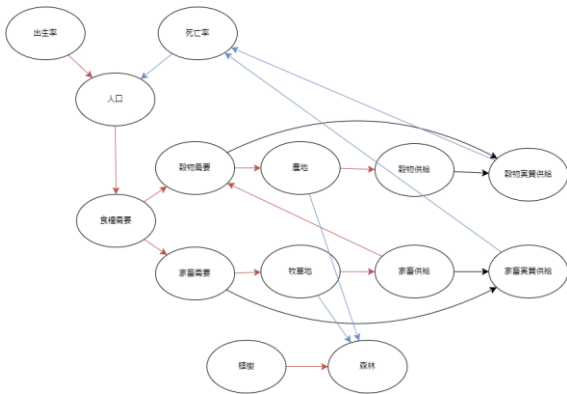


図1 使用目的に応じた農地の増減に関する因果ループ図

4. モデルの構築

因果ループ図を元にシステムダイナミクスに使うモデルを作成していく。

〈Insight Maker におけるモデル表現〉

- ・ストック (四角) …ある時点の変数の量、物がたまる「箱」
- ・フロー (二重矢印) …時間帯における変数の流れ、物の流れ。
- ・コンバータ (記号なし) …システムに必要な数値 (定数) および情報の変換 (関数) 等を定義。
- ・リンク (矢印) …ストック、フロー、コンバータ間を接続。
- ・雲マーク (雲) …物の無限の出入り口。

〈ストックとして表す因子〉

- ・人口 ・森林 ・新しい農地、新しい牧草地
- ・古い農地、古い牧草地 ・不毛な土地

〈フローとして表す因子〉

- ・出生数 ・死亡数
- ・農地拡大、牧草地拡大 ・地力低下
- ・自然回復 ・植林

〈コンバータとして表す因子〉

- ・穀物の実質供給/需要が死亡率に与える影響
- ・家畜の実質供給/需要が死亡率に与える影響

〈システムダイナミクスモデルの作成〉

①人口の増減

図2は人口をストック、出生数と死亡数をフローとして定義した人口の増減をモデル化したシステムダイナミクスモデルである。

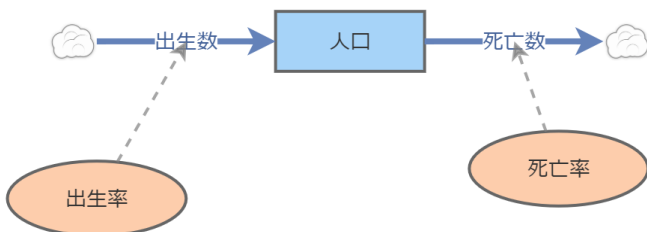


図2 人口の増減を表現するシステムダイナミクスモデル

②食糧需要

図3は人口に応じて食糧需要という変数を定め、そこから穀物需要と家畜需要を定義したシステムダイナミクスモデルである。

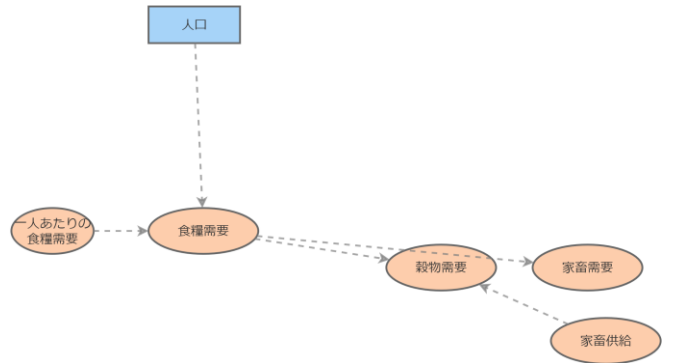


図3 穀物と家畜の需要を表現するシステムダイナミクスモデル

③死亡率の決定

図4は、穀物と家畜それぞれの需要と供給の関係が死亡率に与える影響をコンバータで示したシステムダイナミクスモデルである。

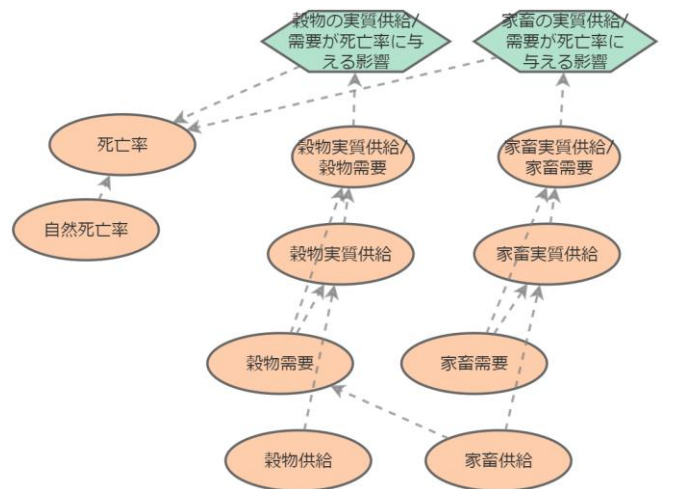


図4 死亡率を表現するシステムダイナミクスモデル

④食糧供給

図5は新しい農地、牧草地と古い農地、牧草地をストックとし、地力低下をフローとしてそれぞれから食糧の供給をモデル化したシステムダイナミクスモデルである。

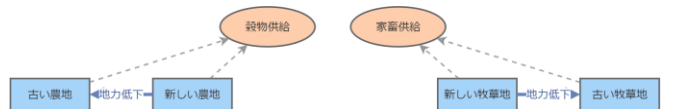


図5 穀物と家畜の供給を表すシステムダイナミクスモデル

⑤土地利用の変化

図6は森林、新しい土地、古い土地、不毛な土地をストック、農地や牧草地の拡大、地力低下、不毛化、自然回復、植林をフローとして土地の状態をモデル化したシステムダイナミクスモデルである。

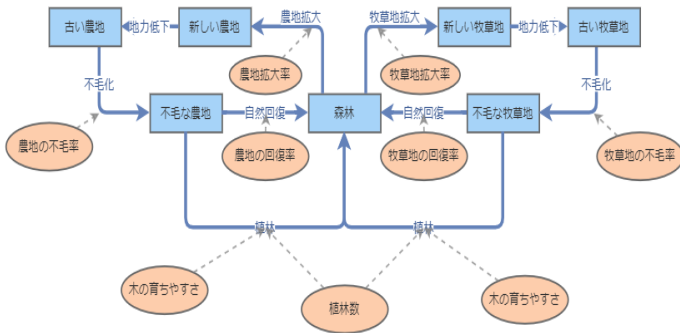


図6 使用中の土地と不毛な土地、森林の循環を表現するシステムダイナミクスモデル

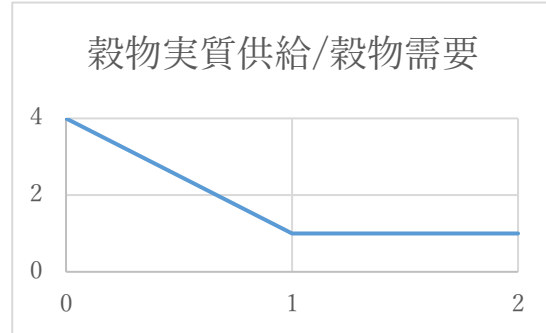


図8 穀物実質供給量が死亡率に与える影響

<モデルの全体図>

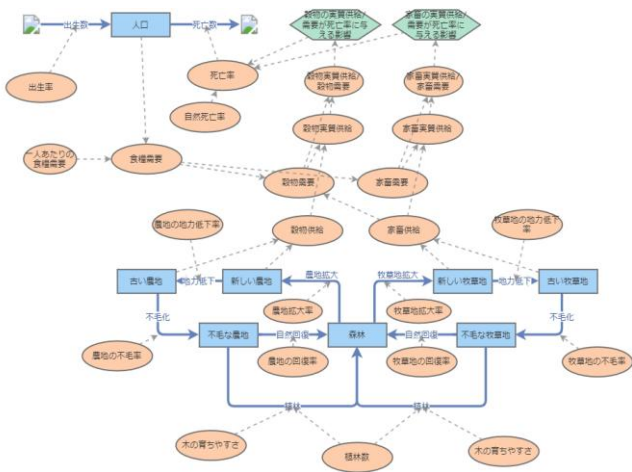


図7 システムダイナミクスモデルの全体図

<構成要素間関係の数式化>

①人口の増減

人口=出生数-死亡数 (のストック)
 出生数=人口*出生率
 死亡数=人口*死亡率

②食糧需要

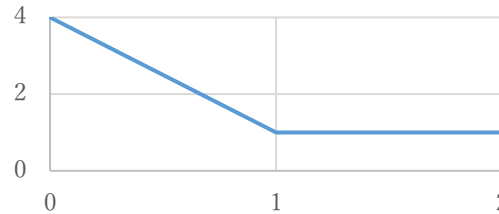
食糧需要=一人あたりの食糧需要*人口
 穀物需要=食糧需要*0.6+家畜供給
 家畜需要=食糧需要*0.4

③死亡率の決定

穀物実質供給=Min(穀物需要, 穀物供給)
 家畜実質供給=Min(家畜需要, 家畜供給)
 実質供給は、需要と供給のうち少ない方を表している。

死亡率=自然死亡率*穀物の実質供給/穀物需要が死亡率に与える影響*家畜の実質供給/家畜需要が死亡率に与える影響

穀物実質供給/穀物需要



家畜実質供給/家畜需要

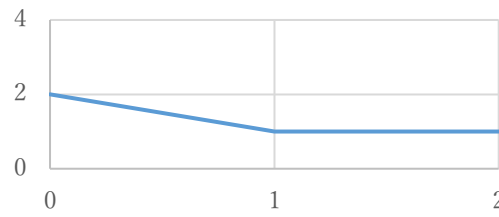


図9 家畜実質供給量が死亡率に与える影響

図8、図9において縦軸が死亡率に与える影響であり、穀物や家畜の実質供給/需要が1より小さい、つまり実質供給が需要よりも少ない場合、死亡率に与える影響が大きくなることを表している。

④食糧供給

穀物供給=新しい農地+古い農地*0.5
 家畜供給=新しい牧草地+古い牧草地*0.5

⑤土地利用の変化

森林=自然回復+植林-農地[牧草地]の拡大 (のストック)
 新しい農地[牧草地]=農地[牧草地]の拡大-地力低下 (のストック)
 古い農地[牧草地]=地力低下-不毛化 (のストック)
 不毛な農地[牧草地]=不毛化-自然回復 (のストック)

農地[牧草地]拡大=森林*農地[牧草地]拡大率
 農地[牧草地]の地力低下=新しい農地[牧草地]*農地[牧草地]の地力低下率
 農地[牧草地]の不毛化=古い農地[牧草地]*農地[牧草地]の不毛率

農地への植林=Step({20 years}, [植林数]*[農地での木の育ちやすさ])
 牧草地への植林=Step({20 years}, [植林数]*[牧草地での木の育ちやすさ])

これは、20年目から毎年、植林数*木の育ちやすさの数だけ木が増えていくことを表している。植林数は他のスライダーとリンクさせ、0から100の間で自由に数字を変更できるようにした。

5. シミュレーション

〈使用した数値〉

- ・出生率=0.12
- ・一人あたりの食糧需要=5
- ・自然死亡率=0.1
- ・森林=3000

- 農地
- ・拡大率=0.2
 - ・地力低下率=0.55
 - ・不毛率=0.6
 - ・回復率=0.08
 - ・木の育ちやすさ=6

- 牧草地
- ・拡大率=0.1
 - ・地力低下率=0.5
 - ・不毛率=0.5
 - ・回復率=0.1
 - ・木の育ちやすさ=5

「シミュレーションⅠ」 一切植林をしない

「シミュレーションⅡ」 20年目から毎年植林する
(1) 植林数 50, (2) 植林数 100

〈結果〉

シミュレーションⅠ

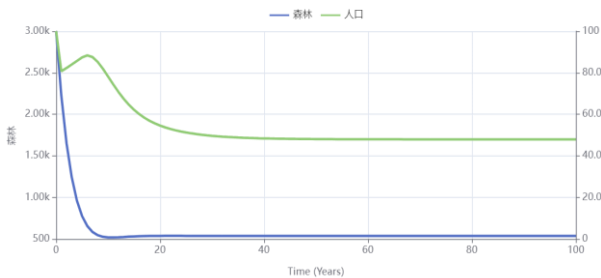


図 10 植林しない場合の森林と人口の推移

シミュレーションⅡ 上から(1), (2)

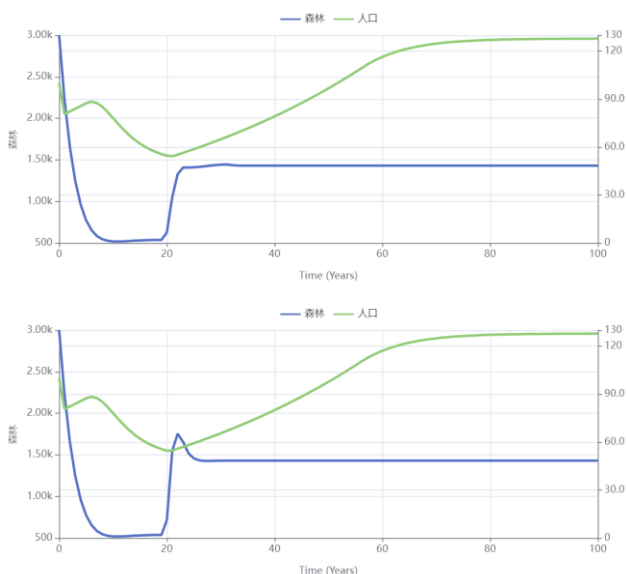


図 11 植林する場合の森林と人口の推移

〈結果まとめ〉

シミュレーションⅠ

図 10 より、1年目は人口が急減する。6年目までは人口が増えていくが、森林がゼロに近くなると再び人口が減少し始める。ある程度の時間がたつと、一定になる。

シミュレーションⅡ

図 11 より、植林をした次の年から人口が増えていき、ある程度で一定になる。森林は植林をした 2 年後に停滞または減少している。植林数が 50 と 100 とで、最終的に行き着く人口は変わらない。

〈シミュレーションから得られた結論〉

植林しなければ人口は減少するが、毎年植林すると人口は増加する。どちらの場合もこのシミュレーションでは値が一定になる。その値は、一年あたりの植林数によって変わらない。

6. 考察

1年目は農地も牧草地もまだないため、食糧不足で人口が急減する。6年目までは森林を切り開いて食糧が得られるために人口が増えていくが、森林がゼロに近くなると再び人口が減少し始める。ある程度の時間がたつと、少ない土地で生きていけるだけの人口のまま一定になる。これは、土地利用が循環して安定するからだと思う。植林すると、その数年後には森林にする不毛な土地がなくなって、土地利用が安定していく。

〈今後の課題〉

- ・このシミュレーションには蓋然性が全くなく、数値があてにならないため、現実世界のデータなどをもとに設定する必要がある。
- ・穀物と家畜の供給は、新しい土地と古い土地の二段階で区別したが、一年たつごとに土地の供給率は少しずつ下がっていく。
- ・土地の拡大を森林に拡大率をかけたものと定めたが、拡大率は食糧需要や労働力によって変化する。
- ・シミュレーションの結果から、穀物の供給が足りていない分を家畜の供給で補うという状況で人が生きていることが分かったが、炭水化物を取らずに生活するのはごく限られた地域の人である。
- ・シミュレーションⅠで、人口の推移がほぼ一定になりゼロにならないのは食糧不足による死亡率への影響の数値が小さいためだと考えられる。

【謝辞】

この一連の研究は、東京大学大学院工学系研究科の青山和浩教授、TAの桂 晨巍さん、瀧 墨さん、島田 智允さん、劉 静維さん、近藤 空さんのご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

真核微生物におけるオートファジーの観察

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 助教 岩間 亮

要約

酵母や糸状菌は人間の細胞と類似した仕組みを持った真核生物である。今回の研究では、明視野顕微鏡や電子顕微鏡を使って、酵母と糸状菌の細胞構造・細胞形態を調べるとともに、蛍光顕微鏡を使って酵母のオルガネラをより詳しく観察した。加えて、環境刺激に対する細胞応答の一例として、酵母の飢餓状態下におけるオートファジーの誘導に注目した。オートファジーのメカニズムをより深く理解するために、2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞した大隅良典博士によって最初に同定された特定のオートファジー関連遺伝子を欠損させた酵母株を解析した。

キーワード；オートファジー、酵母、糸状菌、オルガネラ

ABSTRACT

Yeast and filamentous fungi are eukaryotic microorganisms with cellular systems similar to human cells. In this study, I examined the cellular structure and morphology of yeast and filamentous fungi using both light and electron microscopy, while also observed organelles within yeast cells in greater detail using fluorescence microscopy. Additionally, as an example of cellular response to environmental stimuli, I focused on the induction of autophagy in yeast under starvation conditions. To gain deeper insight into the autophagy mechanism, I analyzed yeast strains with deletions of specific autophagy-related genes, initially identified by Dr. Yoshinori Ohsumi, who won the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2016.

はじめに

酵母や糸状菌は我々ヒトと同様の基盤的細胞システムを持つ真核生物である。特に、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は真核生物のモデル生物として長く使われてきている。今回、これら酵母や糸状菌の細胞を観察し、細胞外観や細胞小器官の様子を理解することを目指した。酵母を用いた研究が大きな学術的な発見に貢献した例は多い。今回、2016年に大隅良典先生がノーベル生理学・医学賞受賞となった「discoveries of mechanisms for autophagy」を題材とし、酵母の飢餓応答としてのオートファジーとそれに関わる遺伝子の機能を理解することとした。

研究内容

I 酵母、糸状菌の観察

〈目的〉

酵母、糸状菌を培養し、デジタルマイクロスコープ、電子顕微鏡を用いてそれぞれを観察する。

〈菌株〉

- *Saccharomyces cerevisiae* X2180, Sec63-EGFP 株, Vph1-EGFP 株, Pex11-EGFP 株, Aco1-EGFP 株, Osw5-EGFP 株
- *Yarrowia lipolytica* CXAU1
- *Aspergillus nidulans* A1149
- *Aspergillus oryzae* RIB40

〈試薬〉

Trace elements solution [0.1%(w/v) FeSO₄•7H₂O, 0.88%(w/v)

ZnSO₄•7H₂O, 0.04%(w/v) CuSO₄•5H₂O, 0.015%(w/v) MnSO₄•4H₂O, 0.01%(w/v) Na₂B₄O₇•10H₂O, 0.005%(w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O, 0.1%(v/v) H₂SO₄], YPD (酵母完全培地) [1.0%(w/v) yeast extract, 2.0%(w/v) bacto peptone, 2.0%(w/v) glucose], YGuu (糸状菌完全培地) [0.5%(w/v) yeast extract, 1.0%(w/v) glucose, 10 mM uracil, 10 mM uridine, 0.1%(v/v) Trace elements solution]

*プレートを作製する際には、1.5–2.0%(w/v) agar を添加した。

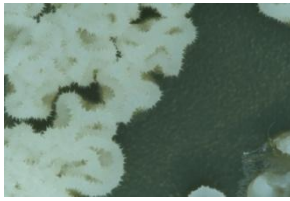
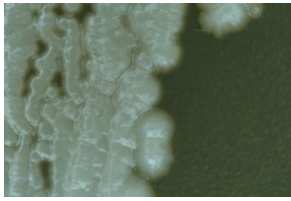
〈手順〉

1. YPD プレートに *S. cerevisiae* X2180 と *Y. lipolytica* CXAU1 の野生型株を各 3 枚ずつ植菌し、YGuu プレートに *A. nidulans* A1149 と *A. oryzae* RIB40 を各 3 枚ずつ植菌した。
2. 培養 3 日目に、それぞれの菌株をデジタルマイクロスコープでそれぞれ観察した。
3. 培養 1 日目の *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡用の固定は、四酸化オスミウムを用いた方法で、研究室の TA が行った。
4. *S. cerevisiae* の Sec63-EGFP 株, Vph1-EGFP 株, Pex11-EGFP 株, Aco1-EGFP 株, Osw5-EGFP 株を YPD 液体培地に植菌して、対数増殖期の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果〉

S. cerevisiae

Y. lipolytica



A. nidulans

A. oryzae

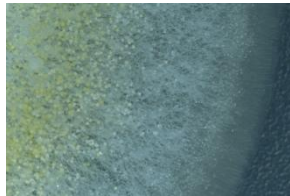


図 1. 各菌株のプレート培地での生育

S. cerevisiae

Y. lipolytica

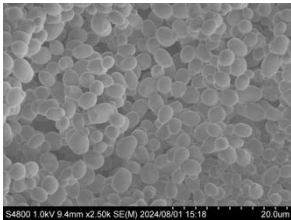


図 2. *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* の電子顕微鏡像

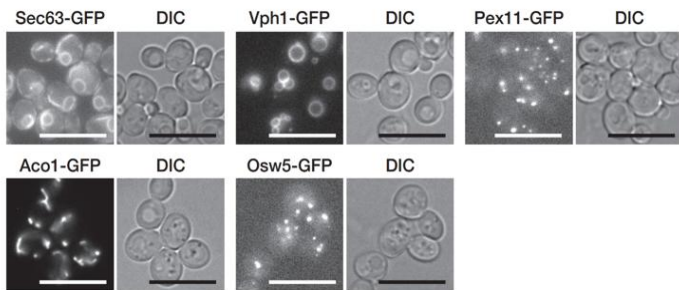


図 3. *S. cerevisiae* の各オルガネラの蛍光顕微鏡像

デジタルマイクロスコープで観察すると、*S. cerevisiae* は水分量が多いように見えて、*Y. lipolytica* は乾燥し、とげのようなものが多く出ているように見えた (図 1)。また、*A. nidulans* は、中心にいくにつれてコロニーの色が透明から緑色になっていた一方で、*A. oryzae* は中心にいくにつれて、透明から薄い黄色になっていた (図 1)。電子顕微鏡で観察すると *S. cerevisiae* は球体のものが密集していて出芽痕も見えた (図 2)。*Y. lipolytica* は糸状のものが密集して、とげを作っている様子が観察できた (図 2)。

それぞれのオルガネラに局在するタンパク質に GFP を付加させることで、オルガネラの観察を行った。*Sec63* は核の周りと細胞膜の直下、*Aco1* は細胞の表面付近、*Osw5* は液胞内部やその近傍、*Pex11* は細胞内全体に点状に存在していた (図 3)。また、*Vph1* は細胞中央部分の一つ以上の球体状に存在することが示された (図 3)。

〈考察〉

酵母と糸状菌の生育について、酵母は培地の表面に沿うように増殖していったのに対して、糸状菌は根のようなものが培地の中まで入り込むように増殖していた。

オルガネラの観察について、小胞体は核についているものかと思っていたが、*Sec63* の分布から核についていない小胞体も存在することが分かった。ミトコンドリアは *Aco1* の分布から、球体状のものだけでなく棒状になっているものなど様々な形状のものがあるということが分かった。脂肪滴は様々なオルガネラとの接触がある器官だが、*Osw5* の分布と DIC から液胞との接触があることが確認できた。ペルオキシソームは *Pex11* の分布から小さな球体の構造をとっていることが分かった。液胞は *Vph1* の分布から、細胞に存在する数が細胞ごとに違うことが分かったが、これは細胞の成長過程によって生じる差だと考えられる。

II オートファジーの顕微鏡観察

〈目的〉

窒素飢餓状態、Rapamycin を加えたときにおけるオートファジーの様子を明視野顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いてそれぞれ観察する。さらに、特定の遺伝子が欠失させることで、特定のタンパク質が発現しないようにした株において、オートファジーが見られるかどうかを観察する。

〈菌株〉

S. cerevisiae X2180 GFP-Atg8 (Wild-type), *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg15Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δatg15Δ*

〈試薬〉

YPD 液体培地 [2% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose], SD(-N)液体培地 [2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids]

〈方法〉

1. YPD 液体培地 100 mL に各菌株を植菌し、30°C で対数増殖期まで培養した。
2. 対数増殖期の細胞を 2.5 OD₆₀₀ 分を、後の SDS-PAGE、ウェスタン解析用に 2 本分回収した。
3. 培養した菌体溶液を 40 mL ずつに分け、1 本には 10 μL の Rapamycin を加えた。また、もう 1 本については、集菌後に SD(-N)液体培地で 2 回洗浄した後 50 mL の SD(-N)液体培地に懸濁した。
4. 30°C、200 rpm で 3 時間培養した。
5. それぞれのサンプルについて 2.5 OD₆₀₀ 分を回収した。
6. Rapamycin を加えたサンプルについて、蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果〉

Wild-type では液胞内全体に蛍光が見られた。また、*atg15Δ* では液胞内が粒子状の蛍光が観察され、粒子が活発に動いている様子が観察された (図 4)。*atg2Δ*, *atg2Δ atg15Δ* はともに、蛍光が液胞の外全体的に観察された (図 4)。

〈考察〉

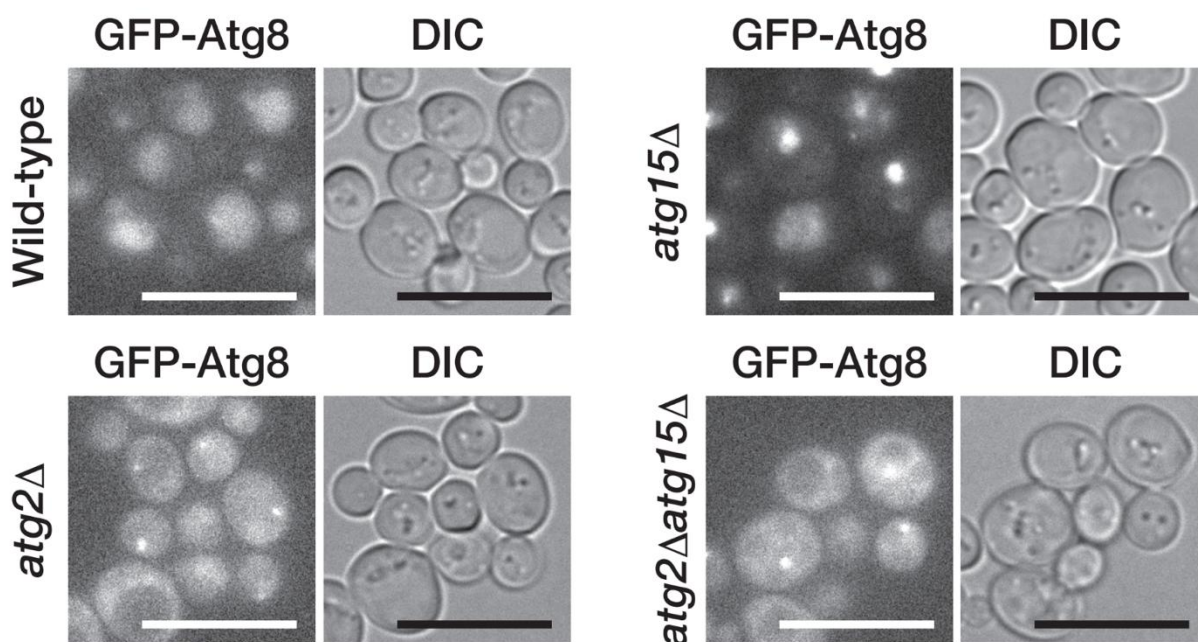


図 4. 蛍光顕微鏡を用いたオートファジーの観察

GFP-Atg8 はオートファジーの進行とともに、液胞内に輸送されることが知られている。Wild-type では液胞内全体に蛍光が見られたことから、液胞内に GFP が散在していることが分かり、オートファジーが正常に行われていると考えられる。一方で、*atg15Δ* は液胞内に粒子状の蛍光が確認されたことから、GFP-Atg8 を内部に含むオートファゴソームが液胞内で分解されていないと考えられる。このことから、Atg15 は液胞内でのオートファゴソームの分解に関わるタンパク質だと推測できる。また、*atg2Δ*、*atg2Δ atg15Δ* では液胞の外に蛍光が見られたことから、GFP-Atg8 が液胞内に存在しないと考えられる。また、液胞外の蛍光が粒子状ではなく全体に見られたことから、オートファゴソームが作られないことによると考えられる。このことから、Atg2 はオートファゴソームの形成に関わるタンパク質だと推測できる。

III ウェスタン解析を用いたオートファジーの観察

〈目的〉

ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、タンパク質を分離した後、GFP 抗体を用いたウェスタン解析を行う。オートファジーが進行し、GFP-Atg8 が液胞内で分解されると、分解に一定の耐性のある GFP が検出されることを確認する。また、オートファジーが生じていない時では GFP はどのような形で存在しているかを解析する。

〈菌株〉

S. cerevisiae X2180 GFP-Atg8 (Wild-type), *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg15Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δatg15Δ*

〈材料・試薬〉

直径 0.5 mm ジルコニアボール, Trichloroacetic acid (TCA), SDS サンプルバッファー [250 mM Tris, 8% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 40%(v/v) glycerol, 100 mM DTT], TGX ゲル, SDS-PAGE

Buffer [25 mM Tris, 200 mM glycine, 3.5 mM SDS], TBS-T Buffer [25 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4], PVDF 膜, 転写バッファー, スキムミルク, α -GFP antibody, α -mouse IgG, HRP-linked antibody, ImmunoStar Zeta

〈方法〉

1. II で回収した菌体に、100 μ L の 10%TCA を加え、5 分間氷上で静置した。
2. 15000 rpm、5 分、4°C の条件で遠心し、TCA 溶液を除去した。
3. 1000 μ L の氷冷アセトンを加え、超音波処理によってペレットを崩した。
4. 15000 rpm、5 分、4°C の条件で遠心し、アセトンを除去した後、乾燥させた。
5. 250 μ L の SDS-PAGE サンプルバッファーで菌体を懸濁しながら、スクリーキャップチューブに移した。
6. ジルコニアボールを適量加えた。
7. Micro smash を用いて、5500 rpm、30 秒 (interval; 60sec) の条件で 3 回破壊操作を繰り返した。
8. 1400 rpm、10 分、65°C の条件でインキュベートした。
9. 1500 rpm、5 分、室温の条件で遠心し、上澄みを取得した。
10. ポリアクリルアミドゲル作成用のガラス器具を組み立て、溶液を入れて、ゲルが固まるまで静置した。
11. ゲルが固まった後、9 で作った 12 個のサンプル、SDS-サンプルバッファー、分子量マーカーをポリアクリルアミドゲルのウェルにそれぞれ入れた。
12. 300 V 定電圧で 25 分電気泳動した。
13. 25 V の電圧をかけてゲル内のタンパク質を PVDF 膜に転写した。
14. PVDF 膜を 5%スキムミルク溶液に浸して、30 分以上震盪した。
15. 一次抗体(α -GFP antibody)を含む TBS-T Buffer に PVDF 膜を浸して、1 時間以上震盪した。

16. TBS-T Buffer にて3回ほど洗浄した。
17. 二次抗体(α -mouse IgG, HRP-linked antibody)を含む TBS-T Buffer に PVDF 膜を浸して、30 分間震盪した。
18. TBS-T Buffer にて3回ほど洗浄した。
19. 化学発光検出装置を用いて、ImmunoStar Zeta を用いた化学発光法によって GFP を検出した。

〈結果〉

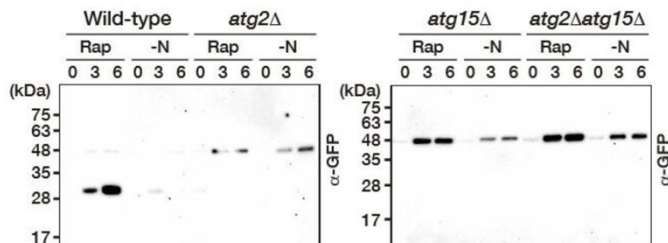


図 5. ウェスタン解析を用いたオートファジーの観察

Wild-type では、YPD 液体培地に Rapamycin を加えたときも、SD(-N)培地で培養したときも、28 kDa あたりにバンドが見られた。また、*atg2Δ*、*atg15Δ*、*atg2Δatg15Δ* ではいずれも 48 kDa のあたりにバンドが見られた (図 5)。この 48 kDa のバンドは Wild-type でも見られるものの、その量は極めて少なかった。また、いずれの菌株、培地でも培養 0 時間よりも培養 3 時間、6 時間の方がバンドが濃く検出されていた (図 5)。

〈考察〉

28 kDa のバンドが検出された Wild-type では GFP-Atg8 が液胞内で分解され、GFP のみが検出されていたと考えられるため、オートファジーが正常に起きていたと推測される。また、48 kDa にバンドが検出された *atg2Δ*、*atg15Δ*、*atg2Δatg15Δ* では、GFP-Atg8 が液胞内で分解されず、GFP-Atg8 そのものが検出されていたと考えられるため、オートファジーは正常に起きていなかったと考えられる。顕微鏡での観察結果から、*atg2Δ* では液胞の外側全体に蛍光が見られるため正常にオートファゴソームが作られず、液胞内に入らなかったことで GFP-Atg8 が分解されず残っていたと考えられ、*atg15Δ* では液胞内で粒子状の蛍光が見られるため、オートファジックボディー (オートファゴソーム由来の液胞内小胞) が液胞内で正常に分解されなかったことで、GFP-Atg8 が分解されず残っていたと考えられる。このように、*atg2Δ* と *atg15Δ* で GFP-Atg8 が液胞内で分解されず、28 kDa にバンドが検出されなかった原因には両者で違いがあると考えられる。さらに、培養 0 時間よりも培養 3 時間、6 時間の方がバンドが濃く検出されていたのは、オートファジーを行う際に必要となる Atg8 が含まれるオートファゴソームを作り続けるため、時間経過とともに Atg8 の量が多くなっていくからだと考えられる。

YPD 液体培地に Rapamycin を加えたときと、SD(-N)培地で培養したときを比較すると、Rapamycin を加えたときの方が 28 kDa にバンドが濃く検出されていることから、窒素飢餓状態にするよりも、Rapamycin を加えた方がオートファジーがより活発に生じることが分かる。

まとめ・感想

オートファジーに関する実験について、蛍光顕微鏡での観察から *ATG2* はオートファゴソームの生成に関わる遺伝子、*ATG15* はオートファゴソームを液胞内で分解することに関わる遺伝子であることが分かった。また、ウェスタン解析では、Atg8 に着目することで、オートファジーが起きていることを表すことができた。

今回の研修では、反復作業をしているうちに間違った操作をしてしまい、結果に影響が出てしまったので、実験をする上では集中力を切らさず、正確性を求めることが重要だと感じた。

また、オートファジーは病気のなど様々なことに関係していることはわかっているが、オートファゴソームの膜はどのようにして生成されるのかなど、まだまだ謎な部分も多いため、これからの研究に意識を向けていきたい。

〈謝辞〉

この一連の研究は、東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻の岩間亮助教、院生の方のご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

真核微生物および酵母のオートファジーの観察

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 助教 岩間 亮 先生

要約

オートファジーは真核生物におけるタンパク質を分解するシステムである。オートファジーは不必要となったタンパク質を分解し、アミノ酸を再利用するのに必要なプロセスの一つである。オートファジーの仕組みを解明するうえで、酵母を用いた研究が重要な役割を果たしてきた。本研究では、これらの研究を通して明らかにされてきたオートファジーに關与するタンパク質を理解するために、オートファジー遺伝子を欠失させた酵母を利用した。酵母におけるオートファジー研究で、マーカーとして使用されるGFP-Atg8を使い、蛍光顕微鏡観察やウェスタン解析を行った。また、これら研究に用いた酵母などの真菌類の細胞構造を理解するため、プレート上で酵母や糸状菌を含んだ真核微生物を培養し、細胞の形態やオルガネラ(細胞小器官)を観察した。

キーワード；酵母、糸状菌、顕微鏡観察、ウェスタン解析、オートファジー

ABSTRACT

Autophagy is a widely conserved protein degradation system in eukaryotes. It is essential for breaking down unnecessary proteins and recycling their amino acids. Research using yeast has been pivotal in uncovering the mechanisms of autophagy. In this experiment, I utilized deletion mutants of autophagy-related genes, which have been identified through these studies, to gain insight into the proteins that are involved in autophagy. Using GFP-Atg8, a common marker in autophagy research, I conducted fluorescence microscopy and Western blot analyses. Additionally, I cultured eukaryotic microorganisms, including yeast and filamentous fungi, on plates and observed cellular morphology and organelles.

Keywords; yeast, filamentous fungus, microscopy, Western analysis, autophagy

はじめに

オートファジーは、細胞内で不要になったオルガネラやタンパク質を分解して、タンパク質等をアミノ酸にすることで再利用できるようにする真核生物で広く保存されたシステムである。これにより、細胞の恒常性を維持する重要な役割を持っている。これらオートファジーのメカニズムの解明には、酵母での研究が大きな役割を担ってきた。今回の実験では、真核微生物の酵母や糸状菌を培養し、細胞形態や細胞小器官を電子顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、GFP-Atg8を用いた蛍光顕微鏡観察やウェスタン解析により、オートファジーにおいて、どのようなタンパク質が関与しているのかを調べた。

研究内容

I 真核微生物の培養と観察

〈使用する菌株〉

- *Saccharomyces cerevisiae* X2180
- *Yarrowia lipolytica* CXAUI
- *Aspergillus nidulans* A1149
- *Aspergillus oryzae* RIB40

〈試薬〉

Trace elements solution [0.1%(w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.88%(w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04%(w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.015%(w/v) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.01%(w/v) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.005%(w/v)]

(NH_4)₆Mo₇O₂₄•4H₂O, 0.1%(v/v) H₂SO₄], YPD (酵母完全培地) [1.0%(w/v) yeast extract, 2.0%(w/v) bacto peptone, 2.0%(w/v) glucose], YGuu (糸状菌完全培地) [0.5%(w/v) yeast extract, 1.0%(w/v) glucose, 10 mM uracil, 10 mM uridine, 0.1%(v/v) Trace elements solution]

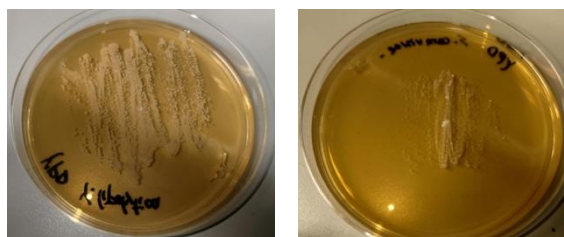
*プレートを作製する際には、1.5–2.0%(w/v) agar を添加した。

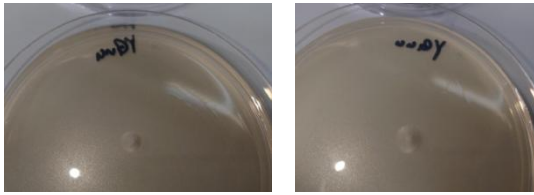
〈手順〉

1. YPD プレートには *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* の WT を、YGuu プレートには *A. nidulans* と *A. oryzae* を植菌した。
2. 30℃で培養し、プレートに植菌したものは培養の様子を観察した。
3. 培養 1 日目の *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡用の固定は、四酸化オスミウムを用いた方法で、研究室の TA が行った。
4. 植菌 3 日目の様子をデジタルマイクロスコープで観察した。

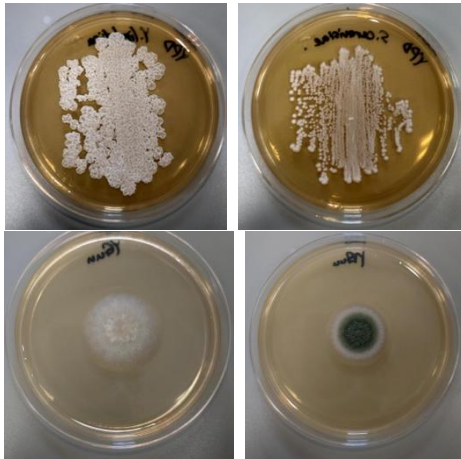
〈結果〉

i 肉眼での観察





(図1) 植菌後1日目の生育の様子
 左上: *Y. lipolytica* 右上: *S. cerevisiae*
 右下: *A. oryzae* 右下: *A. nidulans*



(図2) 植菌後3日目の生育の様子
 左上: *Y. lipolytica* 右上: *S. cerevisiae*
 右下: *A. oryzae* 右下: *A. nidulans*

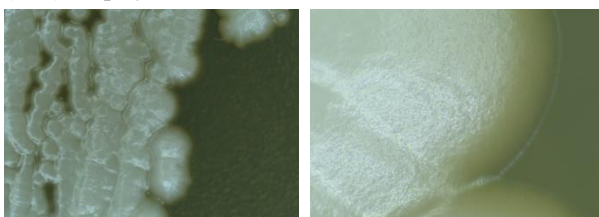
酵母については、*Y. lipolytica* は1日目には個々で独立して、1つ1つ判別できるほどであった(図1)。3日目にはしわが寄っているように見えた。表面はとげ上になっていた(図2)。*S. cerevisiae* は1日目には集まっている部分は1つのまとまりのように見えた(図1)。3日目はクリーム状になっていた(図2)。

糸状菌の方では、*A. oryzae* はドーム状に成長し、中央部分はフェルト状に見えた(図2)。*A. nidulans* は平面的に広がった(図2)。中心から緑色、白色、透明となっていた(図2)。

ii デジタルマイクロスコープでの観察



(図3) *Y. lipolytica* のデジタルマイクロスコープ画像



(図4) *S. cerevisiae* のデジタルマイクロスコープ画像



(図5) *A. oryzae* のデジタルマイクロスコープ画像



(図6) *A. nidulans* のデジタルマイクロスコープ画像

Y. lipolytica は、iでの観察の通り表面にとげ状のものが生えていることが確認できた(図3)。肉眼での観察よりも密集して生えているように見えた(図3)。一方で、*S. cerevisiae* は表面はなめらかで、人の肌に質感が似ていた(図4)。iでの観察の通り集まっている部分は1つのまとまりになっていた(図4)。

デジタルマイクロスコープで見た糸状菌については以下のようにであった。iでの観察結果に加えて、*A. oryzae* は菌が黄色と白色の2つに分かれていた(図5)。中心のほうが黄色のものが多く、外側に行くにつれて白色で小さいものが多かった(図5)。また、菌は糸のような部分とボールのような部分の2種類があった(図5)。*A. nidulans* については、iの観察の通り中心から外側にかけて緑色、白色、透明と変化していた(図6)。中心部分には大きめの丸い塊が円状に並んでいた(図6)。また、右の画像から外側に向かって枝分かれをしながら進んでいることが読み取れた(図6)。

〈考察〉

A. nidulans の色の变化の仕方から、菌は放射状に広がったと考えられる。*A. nidulans* は時間が経つと緑色へ変化すると考えられる。デジタルマイクロスコープの結果から、*A. oryzae* も時間が経つと菌の色は白色から黄色に変わっていくと考えられる。

II 蛍光顕微鏡を用いたオートファジーの観察

〈目的〉

GFPは β -バレル構造をとっており、強固な構造となっているため、オートファジーでGFPが付いたAtg8を分解しようとするときGFPだけが分解されずに残る。それを利用してAtg8の動態を見る。

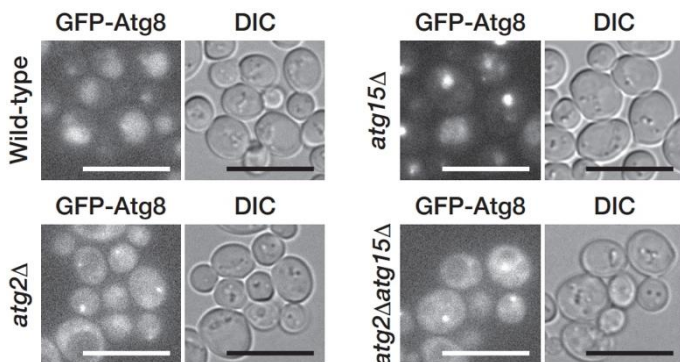
〈菌株〉

S. cerevisiae X2180 GFP-Atg8 (Wild-type), *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2* Δ , *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg15* Δ , *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2* Δ *atg15* Δ

〈手順〉

1. YPD 液体培地 100 mL に各菌株を植菌し、30°Cで対数増殖期まで培養した。
2. 対数増殖期の細胞を 2.5 OD₆₀₀ 分を、後の SDS-PAGE、ウェスタン解析用に 2 本分回収した。
3. 培養した菌体溶液を 40 mL に分け、1 本には 10 μL の Rapamycin を加えた(Rapamycin の終濃度は 0.2 μM)。また、もう 1 本については、集菌後に SD(-N)液体培地で 2 回洗浄した後 50 mL の SD(-N)液体培地に懸濁した。
4. 30°C、200 rpm で 3 時間培養した。
5. それぞれのサンプルについて 2.5 OD₆₀₀ 分を回収した。
6. Rapamycin を加えたサンプルについて、蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果〉



〈図 7〉 蛍光顕微鏡による *S. cerevisiae* の観察画像

DIC：明視野顕微鏡の観察画像

左上：*S. cerevisiae* の自然種

右上：*S. cerevisiae* の *ATG15* 欠失株

左下：*S. cerevisiae* の *ATG2* 欠失株

右下：*S. cerevisiae* の *ATG2, ATG15* 二重欠失株

S. cerevisiae の野生型株の蛍光顕微鏡を用いた観察画像と見比べて、*atg15Δ*株は液泡が光っているもののその大きさが小さく、輝点が動いていた（図 7）。*atg2Δ*株、*atg2Δ atg15Δ*株では液泡は光っておらず、液泡以外の部分が光っていた（図 7）。

〈考察〉

*atg2Δ*株、*atg2Δ atg15Δ*株については、Atg8 が細胞質中に存在している。一方、*atg15Δ*株ではオートファジックボディが分解されていないと考えられる。以上のことから、Atg2 はオートファゴソームの形成に、Atg15 はオートファジックボディの分解にそれぞれ役割を持っていると考えられる。

Ⅲ ウェスタン解析を用いたオートファジーの確認

〈目的〉

SDS-PAGE はタンパク質の分離をする操作であり、網目状のゲルを用いて、小さい分子ほど移動度が大きくなる。SDS によってタンパク質に負の電荷を与えることで、電気を流した際に一定方向にタンパク質が動くようにしている。また、SDS-PAGE で目的のタンパク質がどこに移動したかを調べる

手法としてウェスタン解析がある。今回、飢餓条件に置いた細胞、あるいは Rapamycin 処理した細胞における、GFP-Atg8 の様子をこれら手法で確認することにした。

〈材料・試薬〉

直径 0.5 mm ジルコニアボール、Trichloroacetic acid (TCA), SDS サンプルバッファー [250 mM Tris, 8% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 40%(v/v) glycerol, 100 mM DTT], TGX ゲル, SDS-PAGE Buffer [25 mM Tris, 200 mM glycine, 3.5 mM SDS], TBS-T Buffer [25 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4], PVDF 膜, 転写バッファー, スキムミルク, α-GFP antibody, α-mouse IgG, HRP-linked antibody, ImmunoStar Zeta

〈細胞破碎の手順〉

以下の操作は細胞の酵素の働きを抑えるために冷やした状態で行った。

1. IIで回収した *S. cerevisiae* の各種 GFP-Atg8 株に、100 μL の 10%TCA を加えて、5 分間静置した。
2. 15000 rpm、5 分、4°Cの条件で遠心分離器にかけて、TCA 溶液を除去した。
3. 1000 μL の氷冷アセトンを加えて、超音波処理によってペレットを崩した。
4. 15000 rpm、5 分、4°Cの条件で遠心分離機にかけて、アセトンを除去し、乾燥させた。
5. 250 μL の SDS-PAGE サンプルバッファーで菌体を懸濁し、スクリューキャップチューブに移した。
6. 直径 0.5 mm のジルコニアボールを加えた。
7. Micro Smash を用いて、5500 rpm、30 秒の条件で破碎操作を 3 回行った。
8. 1400 rpm、10 分、65°Cでインキュベートした。
9. 15000 rpm で 5 分間遠心分離器にかけ、50 μL の上清を取得した。

〈SDS-PAGE の手順〉

1. TGX ゲルを調製した。
2. ゲルのウェルに調製した細胞破碎液を入れた。
3. 300V の定電圧で電気泳動した
4. 操作が終了したら、ゲルを水に移した。

〈ウェスタン解析の手順〉

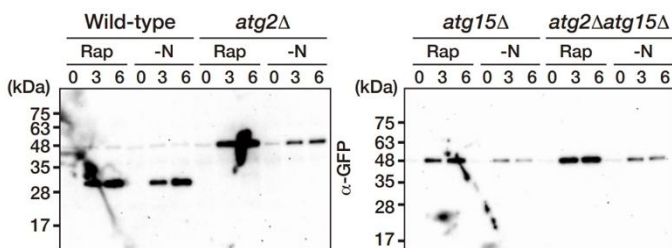
1. PVDF 膜とゲルを 25V の電圧にかけて、PVDF 膜にタンパク質を転写した。

2. PVDF 膜を 5% スキムミルクに浸して、30 分以上震盪した。
3. 一次抗体(α -GFP antibody)を含む TBS-T Buffer にメンブレンを浸して、1 時間以上震盪した。
4. TBS-T Buffer で 3 回洗浄した。
5. 二次抗体を含む TBS-T Buffer にメンブレンを浸して、30 分間震盪した。
6. TBS-T Buffer で 3 回洗浄した。
7. 化学発光検出装置を用いて、ImmunoStar Zeta を用いた化学発光法によって GFP を検出した。



(図 8) SDS-PAGE の様子

(結果)



(図 9) ウェスタン解析の結果

左から 6 つごとに *S. cerevisiae* の野生型株、*atg2Δ* 株、*atg15Δ* 株、*atg2Δatg15Δ* 株。Rap は Rapamycin 使用のもので、-N は飢餓状態にしたものを示す。0、3、6 の数字はそれぞれ処理開始後 0、3、6 時間後に回収したことを示す。

全てのところで 0 の部分はバンドが著しく薄かった(図 9)。また、野生型株以外のすべての株について、すべて同じ位置にバンドが確認された(図 9)。Rapamycin 使用のものと同様に飢餓状態のものも両方で野生型株に分子量の小さなバンドが確認された Rapamycin 使用のものと同様に飢餓状態のものをそれぞれの株で比べると、Rapamycin 使用のものの方がバンドは濃くなっていて、さらに時間が経つほどバンドは濃くなっていった(図 9)。

(考察)

全てのところで 0 の部分のバンドが著しく少ないことから、GFP-Atg8 の細胞内存在量が極めて少ないと考えられる。この条件では、オートファジーが起きていないと考えられる。GFP には Atg8 がついていたので、図 9 のバンドの位置の違いは GFP についている Atg8 が分解されたかどうかである。当然、Atg8 が分解されずに残ったままだと全体でのタンパク質の大きさは、GFP 単体よりも大きくなる。すなわち、バンドは上のほうに出てくる。逆に、Atg8 が分解されると、分解

されていないときよりも下のほうにバンドが出てくる。このことから、図 9 を見ると野生型株のバンドが他のものよりも下のほうに出ているので、オートファジーが起こり Atg8 が分解されたとわかる。バンドが濃いほど GFP が多いことになるので、野生型株における小さなバンドの濃さ(GFP 単体に相当するバンドと考えられる)はオートファジーの活発さと比例しているのではないかと考えた。よって、Rapamycin 使用のものの方が飢餓状態のものよりもオートファジーが活発に起こっていると考えられる。時間が経つほどバンドが濃くなったのは、GFP が分解されにくいに加えて、オートファジーが起こり続けたことが原因だと思われる。

atg2Δ 株、*atg15Δ* 株、*atg2Δatg15Δ* 株は全て同じ位置で野生型株より上にバンドが出ていて、Atg8 が分解されていないと思われる。II の蛍光顕微鏡による観察画像から、Atg2 はオートファゴソームの形成に役割を持ち、Atg15 はオートファジックボディの分解に役割を持つと考えられる。これらのことから、*atg2Δ* 株や *atg15Δ* 株において Atg8 が分解されていないのは、*atg2Δ* 株ではオートファゴソームが形成されずオートファジーが起こらなかったためであり、*atg15Δ* 株ではオートファジックボディが分解されず、オートファジーが完了しなかったためであると考えられる。

まとめ・感想

オートファジーにおいて Atg2 と Atg15 はどちらも欠けるとオートファジーが正常に行われなくなるほどの重要な役割をもっていることがわかった。また、蛍光タンパク質を用いるとタンパク質の動きを直接見ることができ、どのようなことが起こっているのかがわかりやすかった。

今回の研修では、微生物の培養やウエスタン解析などの高校ではなかなか体験できないことに触れることができ、とても興味深かった。同じオートファジーについて調べているが、蛍光タンパク質によって調べたときとウエスタン解析によって調べたときとは、結果の見え方が大きく変わり面白かった。そして、実験で得られた画像やデータからどれだけ多くの情報を得られるかが実験の質を左右することも学べた。

自分の体の中でも起きていることを知らないというのはもったいなく感じたので、もっとこのような細胞の中での動きについて知ってみようと思った。

(謝辞)

この一連の研究は、東京大学 大学院農学生命科学研究科の岩間亮助教、院生の内内朗宏氏、飯泉雄矢氏のご指導のおかげで達成されたものであり、ここに謝意を表します。

真核微生物および酵母のオートファジーの観察

愛知県立岡崎高等学校 2年

指導：東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 助教 岩間 亮 先生

要約

大隅良典博士は、真核生物の主要なタンパク質分解システムであるオートファジーの仕組みを解明した先駆的な研究により、2016年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。オートファジーは真核生物間で高度に保存された過程であり、酵母や糸状菌などの微生物でも観察される。本研究では、酵母と糸状菌に焦点を当て、その細胞形態や細胞小器官を観察した。さらに、GFP-Atg8をマーカーとして、蛍光顕微鏡とウェスタン解析によって酵母のオートファジーを解析し、オートファジーの働きを確認した。

キーワード；オートファジー、SDS-PAGE、ウェスタン解析

ABSTRACT

The 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to Dr. Yoshinori Ohsumi for his pioneering work in elucidating the mechanisms of autophagy, a major protein degradation system within eukaryotic cells. Autophagy is a highly conserved process across eukaryotes and is also observed in microorganisms such as yeast and filamentous fungi. In this study, I focused on yeast and filamentous fungi, and observed their cellular morphology and intracellular organelles. Additionally, using GFP-Atg8 as a marker, I analyzed autophagy in yeast through fluorescence microscopy and Western blotting analysis to confirm autophagy activity.

はじめに

オートファジーは真核生物に広く保存された細胞内タンパク質分解システムである。その形態学的発見は古かったが、分子メカニズムが明らかになってきたのは、1990年代以降、大隅良典博士らの酵母を用いてオートファジーに関わる遺伝子を同定する先駆的な研究が行われてからである。このような例を筆頭に、酵母は真核生物の細胞内システムを解明するのに、モデル生物として長く研究されてきている。今回、真核微生物である酵母や糸状菌の細胞形態や細胞小器官を観察するとともに、酵母を用いたオートファジー研究の一端に触れることを目的とした。

研究内容

I 酵母と糸状菌の観察

〈目的〉

デジタルマイクロスコープ、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて真核微生物である酵母や糸状菌の細胞形態、細胞小器官を観察し、その構造の特徴を知る。

〈試薬〉

Trace elements solution [0.1%(w/v) FeSO₄•7H₂O, 0.88%(w/v) ZnSO₄•7H₂O, 0.04%(w/v) CuSO₄•5H₂O, 0.015%(w/v) MnSO₄•4H₂O, 0.01%(w/v) Na₂B₄O₇•10H₂O, 0.005%(w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O, 0.1%(v/v) H₂SO₄], YPD (酵母完全培地) [1.0%(w/v) yeast extract, 2.0%(w/v) bacto peptone, 2.0%(w/v) glucose], YGuu (糸状菌完全培地) [0.5%(w/v) yeast extract, 1.0%(w/v) glucose, 10 mM uracil, 10 mM uridine, 0.1%(v/v) Trace elements solution]

*プレートを作製する際には、1.5–2.0%(w/v) agar を添加した。

〈菌株〉

- *Saccharomyces cerevisiae* X2180, Sec63-EGFP 株, Vph1-EGFP 株, Pex11-EGFP 株, Aco1-EGFP 株, Osw5-EGFP 株
- *Yarrowia lipolytica* CXAU1
- *Aspergillus nidulans* A1149
- *Aspergillus oryzae* RIB40

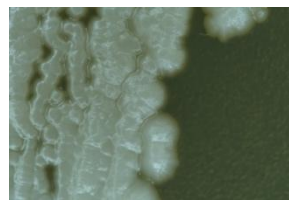
〈手順〉

1. YPD プレート培地に *S. cerevisiae* X2180 と *Y. lipolytica* CXAU1 を植菌した。また、YGuu プレートに *A. nidulans* A1149 と *A. oryzae* RIB40 を植菌した。
2. 培養 1 日目の *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡用の固定は、四酸化オスミウムを用いた方法で、研究室の TA が行った。
3. 植菌 3 日目の様子をデジタルマイクロスコープで観察した。
4. *S. cerevisiae* の Sec63-EGFP 株, Vph1-EGFP 株, Pex11-EGFP 株, Aco1-EGFP 株, Osw5-EGFP 株を YPD 液体培地に植菌して、対数増殖期の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果〉

S. cerevisiae

Y. lipolytica



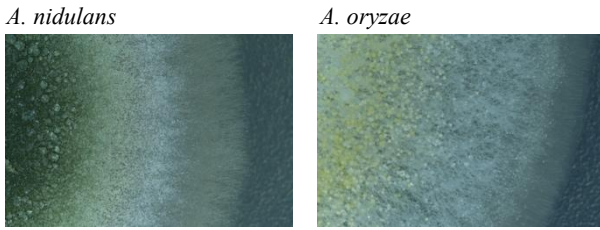


図 1. 各菌株のプレート培地での生育

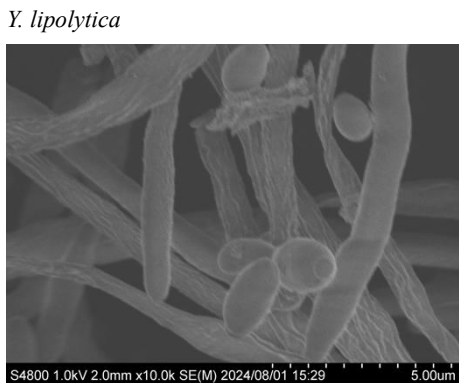
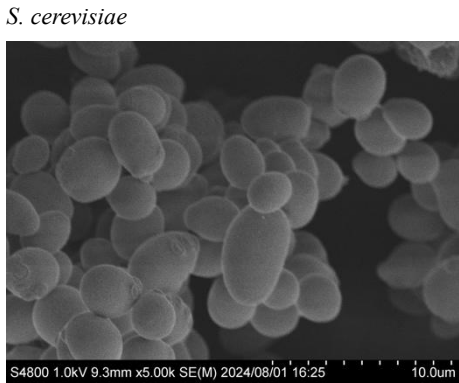


図 2. *S. cerevisiae* と *Y. lipolytica* の電子顕微鏡像

植菌 3 日目の酵母を観察すると、*S. cerevisiae* はなめらかなクリーム状、*Y. lipolytica* は乾燥していてしわが多いように感じた (図 1)。また、*A. nidulans* は中心のあたりが緑色で周りが白色で、横から見ると平面的だった (図 1)。一方、*A. oryzae*

は全体が白い糸で覆われていて、わずかに黄色の斑点が存在していた (図 1)。横から見ると、盛り上がっていて立体的だった (図 1)。

電子顕微鏡で観察すると、*S. cerevisiae* は丸い粒のようなものが見られ、出芽痕も確認された。*Y. lipolytica* はマイクロスコープと同様にひも状のものが確認された (図 2)。

Sec63-GFP では、細胞内に円や曲線状の発光が見られた (図 3)。Vph1-GFP では、細胞内に輪状の発光が複数見られた (図 3)。Pex11-GFP では、一つの細胞に多数の小さな粒状の発光が見られた。細胞内に散在していた (図 3)。Aco1-GFP では、形や大きさが異なる細長い発光が見られ、中心の周りにあった (図 3)。Osw5-GFP では、粒状の発光が複数見られた。それらは細胞内の一部分にまとまっているように見えた (図 3)。

〈考察〉

S. cerevisiae はなめらかなクリーム状、*Y. lipolytica* は乾燥している状態と大きく異なるが、どちらも白い部分が連なるように密集している。これは酵母が出芽して増殖するため、連なるように細胞が増えていくからだと考えられる。一方で、*A. nidulans* と *A. oryzae* のコロニーは、いずれも白い糸で覆われている。これは、糸状菌が菌糸を伸長させながら成長しているため、その一部の菌糸が観察されるためと考えられる。

Sec63 は小胞体、Vph1 は液胞、Aco1 はミトコンドリア、Osw5 は脂肪滴、Pex11 はペルオキシソームのタンパク質である。Sec63 から、小胞体は核の周りや細胞膜のすぐ内側にあると考えられる。Vph1 から、液胞は一つの細胞に複数ある場合があり、その大きさも様々であると考えられる。また、ミトコンドリアは教科書等で楕円形の粒の形状として表現されるが、Aco1 から、実際は細長い管状をしていると考えられる。Osw5 から、脂肪滴は粒状で細胞質に複数存在し、液胞内にも存在すると考えられる。Pex11 から、ペルオキシソームは小さい粒状であり、細胞質に複数存在すると考えられる。

II 蛍光顕微鏡を用いたオートファジーの観察

〈目的〉

細胞の特定のタンパク質を欠失させ、窒素飢餓状態の細胞のオートファジーを観察することで、オートファジーに関与するタンパク質について理解する。

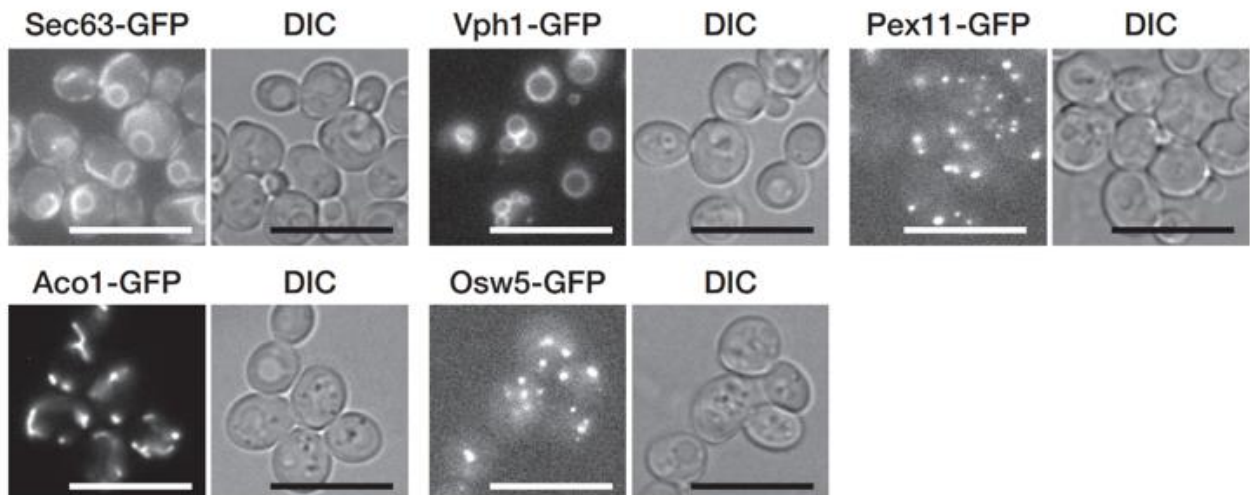


図 3. *S. cerevisiae* の各オルガネラの蛍光顕微鏡像

〈菌株〉

S. cerevisiae X2180 GFP-Atg8 (Wild-type), *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg15Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δatg15Δ*

〈試薬〉

YPD 液体培地 [2% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose], SD(-N)液体培地 [2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids]

〈手順〉

1. YPD 液体培地 100 mL に各菌株を植菌し、30°Cで対数増殖期まで培養した。
2. 対数増殖期の細胞を 2.5 OD₆₀₀ 分を、後の SDS-PAGE、ウェスタン解析用に 2 本分回収した。
3. 培養した菌体溶液を 40 mL に分け、1 本には 10 μL の Rapamycin を加えた(Rapamycin の終濃度は 0.2 μM)。また、もう 1 本については、集菌後に SD(-N)液体培地で 2 回洗浄した後 50 mL の SD(-N)液体培地に懸濁した。
4. 30°C、200 rpm で 3 時間培養した。
5. それぞれのサンプルについて 2.5 OD₆₀₀ 分を回収した。
6. Rapamycin を加えたサンプルについて、蛍光顕微鏡で観察した。

〈結果〉

Wild-type では、蛍光が液胞内一様に見られた (図 4)。*atg15Δ* では、液胞内の一部分に強い蛍光が観察された。*atg2Δ*、*atg2Δatg15Δ* では、蛍光が液胞の外側の細胞質が一様に見られた。

<考察>

Wild-type では、オートファジーが正常に行われて Atg8 が細胞内に取り込まれて分解されたと考えられる。一方、*atg15Δ* では、蛍光が液胞内の一部分に見られ、その輝点が動いていた。GFP-Atg8 はオートファジーの進行とともに、オートファ

ゴソーム内に取り込まれ、最終的に液胞に運ばれて分解されることが知られている。その結果、液胞内の分解に一定の耐性を持つ GFP が液胞全体に分散することで、液胞全体に蛍光が見られるようになる。今回、液胞内に動く輝点が見えたことから、Atg15 が欠失したことで、オートファジックボディー

(オートファゴソームが液胞内に取り込まれて生じる小胞) が分解されず、Atg8 の分解が行われなくなったと考えられる。ゆえに、Atg15 はオートファジーにおける液胞内でのオートファジックボディーの分解に作用するタンパク質であると考察できる。

*atg2Δ*では液胞外の部分に一樣な蛍光が見られたため、Atg2 を欠失したことで、GFP-Atg8 を液胞内に取り込めなくなったと考えられる。ゆえに、Atg2 はオートファジーにおける Atg8 を細胞内に取り込む過程に関するタンパク質であると考察できる。

*atg2Δatg15Δ*では*atg2Δ*と同じような蛍光パターンが見られた。Atg2 と Atg15 の両方を欠失させたが、Atg15 が関与する液胞内での分解よりも先に、Atg2 が関与する細胞内に取り込む過程があると考えられる。

III ウェスタン解析によるオートファジーの測定

i .SDS-PAGE のサンプル調整

〈目的〉

菌体を細かく破碎して、電気泳動可能な状態でタンパク質溶液を抽出する。

〈菌株〉

S. cerevisiae X2180 GFP-Atg8 (Wild-type), *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg15Δ*, *S. cerevisiae* X2180 GFP-Atg8 *atg2Δatg15Δ*

〈材料・試薬〉

直径 0.5 mm ジルコニアボール, Trichloroacetic acid (TCA), SDS

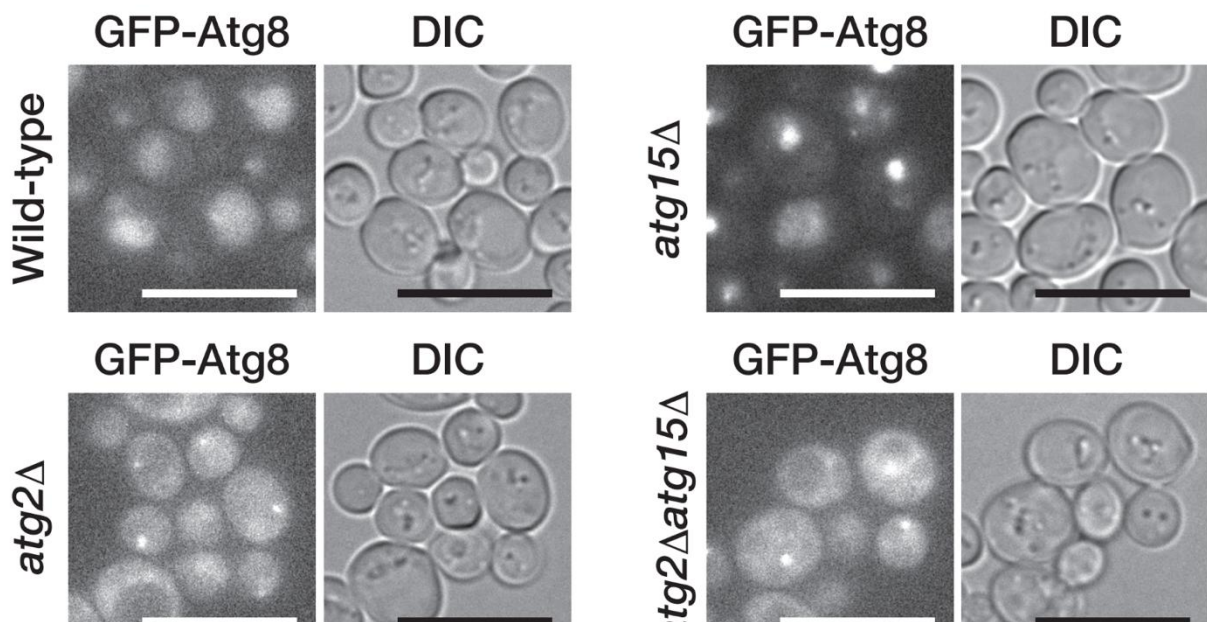


図 4. 蛍光顕微鏡を用いたオートファジーの観察

サンプルバッファー [250 mM Tris, 8% SDS, 0.1% Bromophenol blue, 40%(v/v) glycerol, 100 mM DTT]

〈手順〉

1. II で回収した菌体に、100 μ L の 10%TCA を加え、5 分間氷上で静置した。
2. 100 μ L の 10%TCA を加え、5 分間氷上で静置した。
3. 15000 rpm、5 分、4°C の条件で遠心し、TCA 溶液を除去した。
4. 1000 μ L の氷冷アセトンを加え、超音波処理によってペレットを崩した。
5. 15000 rpm、5 分、4°C の条件で遠心し、アセトンを除去した後、乾燥させた。
6. 250 μ L の SDS-PAGE サンプルバッファーで菌体を懸濁しながら、スクリーキャップチューブに移した。
7. 直径 0.5 mm ジルコニアボールを適量加えた。
8. Micro Smash を用いて、5500 rpm、30 秒 (interval: 60 sec) の条件で 3 回破砕操作を繰り返した。
9. 1400 rpm、10 分、65°C の条件でインキュベートした。
10. 15000 rpm、5 分、室温の条件で遠心し、上清を取得した。

ii. ウェスタン解析

〈目的〉

得られたタンパク質溶液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、その後、PVDF 膜へとタンパク質を転写して、ウェスタン解析を行う。GFP を特異的に認識する一次抗体 (α -GFP antibody) を用いることによって、GFP-Atg8 の量やその変化を解析する。

〈材料・試薬〉

TGX ゲル, SDS-PAGE Buffer [25 mM Tris, 200 mM glycine, 3.5 mM SDS], TBS-T Buffer [25 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween-20, pH 7.4], PVDF 膜, 転写バッファー, スキムミルク, α -GFP antibody, α -mouse IgG, HRP-linked antibody, ImmunoStar Zeta

〈手順〉

1. i で作った 12 個のサンプルを TGX ゲルのうちの 12 個のウェルに入れた。その際、残りの 2 個のウェルには、SDS-PAGE サンプルバッファーと分子量マーカーをそれぞれ入れた。
2. 300V の定電圧で電気泳動した。
3. PVDF 膜とゲルを 25V の電圧にかけて、PVDF 膜にタンパク質を転写した。
4. PVDF 膜を 5% スキムミルクに浸して、30 分以上震盪した。
5. 一次抗体 (α -GFP antibody) を含む TBS-T Buffer にメンブレンを浸して、1 時間以上震盪した。
6. TBS-T Buffer で 3 回洗浄した。
7. 二次抗体を含む TBS-T Buffer にメンブレンを浸して、30 分間震盪した。
8. TBS-T Buffer で 3 回洗浄した。
9. 化学発光検出装置を用いて、ImmunoStar Zeta を用いた化学発光法によって GFP を検出した。

〈結果〉

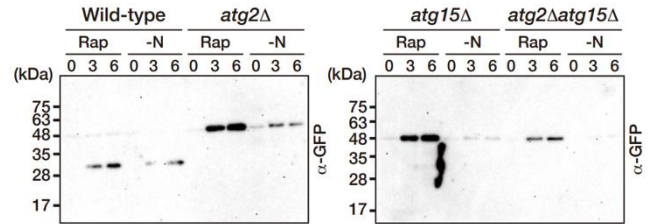


図 5. ウェスタン解析を用いたオートファジーの観察

どの菌株を使用した場合においても、Rapamycin 入りの培地のバンドのほうが SD(-N)培地のバンドよりも濃く検出された (図 5)。Wild-type では 28 kDa、他の 3 つの菌株では 48 kDa のバンドが濃く検出された (図 5)。また、培養時間が長くなるにつれて、バンドが濃く検出された (図 5)。

〈考察〉

Rapamycin 入りの培地のバンドのほうが SD(-N)培地のバンドよりも濃く検出されたのは、SD(-N)培地では窒素源が枯渇していたのに対して、Rapamycin 入りの培地では窒素源が十分にある状態でオートファジーを誘導したため、オートファジーを生じさせようと細胞内の Atg8 が増加したからであると考えられる。

Wild-type では 28 kDa、他の 3 つの菌株では 48 kDa のバンドが濃く検出されたことから、Wild-type では Atg8 が分解されて分子量が小さくなり、他 3 つの菌株では Atg8 が分解されず分子量が大きいままであると考えられる。ゆえに、Wild-type ではオートファジーが起きていて、他 3 つの菌株ではオートファジーが起きていないと考察できる。

図 4 も併せて考えると、Atg2 はオートファジーにおける Atg8 を細胞内に取り込む過程に関与するタンパク質、Atg15 は液胞内の分解に関与するタンパク質であると考えられる。培養時間が長くなるにつれてバンドが濃く検出されているのは、オートファジーを生じさせようと、細胞内の Atg8 が増加したからであると考えられる。

まとめ・感想

ウェスタン解析によってオートファジーの発生を測定し、蛍光顕微鏡によるオートファジーの観察と同様の結果を得た。Atg15 はオートファジーにおける液胞内での Atg8 の分解に作用するタンパク質であり、Atg2 は Atg8 を細胞内に取り込む過程に関するタンパク質であると分かった。

今回の研修を通して、真核微生物の構造や、オートファジーに関与しているタンパク質について学ぶことができた。しかし、それだけでなく研究の大変さや楽しさも学ぶことができた。研究は、細かな待ち時間が多かったり、消毒を逐一おこなったりするなど体力的につらく感じることも多かったが、その分結果が得られたときはとても嬉しく感じた。

〈謝辞〉

この研究は東京大学 細胞遺伝学研究室の岩間亮助教、院生の大内朗宏氏、飯泉雄矢氏のご指導のもと達成できたものであり、ここに感謝の意を表します。