

創立100周年記念
第74回（2022年）
日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2022年（令和4年）10月17日（月）～20日（木）

会 場 Zoomによるオンライン形式



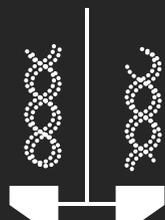
公益社団法人 日本生物工学会

創立100周年記念
第74回（2022年）
日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2022年（令和4年）10月17日（月）～20日（木）

会 場 Zoomによるオンライン形式



公益社団法人 日本生物工学会

創立 100 周年記念 第 74 回 (2022 年) 日本生物工学会大会 トピックス集 目次

〈トピックス要旨 (一般講演番号 / 一般講演タイトル / 講演者 / 所属)〉

【分類, 系統, 遺伝学 / 遺伝子工学】

- 2B02-03 B 会場 第 2 日 9:45 p. 6
全ゲノム解析に基づく時無し性・極早生コシヒカリの開発
○富田 因則
(静大・グリーン科技研)
- 3B02-01 B 会場 第 3 日 9:45 p. 8
Cas11d の設計・発現による新規ゲノム編集技術 CRISPR-Cas type I-D (TiD) の高効率化
○和田 直樹¹, 村上 愛美¹, 丸井 和也¹, 刑部 祐里子², 刑部 敬史¹
(¹ 徳島大院・社会産理工, ² 東工大・生命理工)
- 3B02-08 B 会場 第 3 日 9:45 p. 10
確率的 Cre-lox 組換え反応の機械学習ドリブンエンジニアリングによる任意の割合での
スパースラベリングの実現
○山内 悠至^{1,2}, 植田 充美¹, 青木 航¹
(¹ 京大院・農, ² 日本学術振興会)

【酵素学, 酵素工学 / タンパク質工学】

- 2A03-04 A 会場 第 2 日 10:30 p. 12
Extensive analysis of transglutaminase 1 substrate preferences using cDNA display
○T.I.K. Munaweera¹, Jasmina Damnjanovic¹, Moeri Nezu¹, Maurizio Camagna¹,
Takaaki Kojima², Kiyotaka Hitomi⁴, Hideo Nakano¹, Naoto Nemoto³
(¹ Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ² Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.,
³ Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ⁴ Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)
- 2A03-05 A 会場 第 2 日 10:30 p. 14
SH 基化学修飾による臨床検査薬酵素の機能改変と特性解析
○外山 二卯佳, 西矢 芳昭
(摂南大院・理工)
- 3A01-04 A 会場 第 3 日 9:00 p. 16
微生物酵素反応による新たな有用 S-置換システインスルフォキシド供給経路の構築
○水谷 拓¹, 原 良太郎¹, 竹内 道樹¹, 日比 慎², 上田 誠³, 小川 順¹
(¹ 京大院・農, ² 富山県大・工, ³ 小山高専)
- 3A01-06 A 会場 第 3 日 9:00 p. 18
化学酵素的アミド結合形成反応を利用したポリアミド合成への展開
○鈴木 達也¹, 唐鎌 翔大¹, 鈴木 伸², 木野 邦器^{1,2}
(¹ 早大院・先進理工, ² 早大・理工総研)

4A03-01 A会場 第4日 10:30..... p. 20
オーバーラップオペロン構造を用いた複数タンパク質の同時高発現

○西岡 優佑¹, Wolf Ruslana², 星田 尚司¹, 赤田 倫治¹
(¹ 山口大院・創成科学, ²Berlin University of Applied Sciences and Technology)

4A03-04 A会場 第4日 10:30..... p. 22
微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発

○伊藤 良浩^{1,2}, 佐々木 隆一¹, 朝里 さやか¹, 北口 哲也³, 上田 宏³
(¹ 味の素・バイオファイン研, ² 東工大・生命理工, ³ 東工大・化学生命研)

【発酵生理学, 発酵工学／代謝工学／オミクス解析】

2C01-02 C会場 第2日 9:00..... p. 24
糖消費速度が変化した時のコリネ型細菌中央代謝酵素の量的変動

○森下 風香¹, 浜岸 麻衣², 松田 史生³, 豊田 晃一⁴, 和田 大⁵, 乾 将行⁴, 横田 篤⁶, 柘植 陽太^{1,7}
(¹ 金沢大院・自科, ² 金沢大・理工, ³ 阪大院・情報, ⁴ RITE, ⁵ 摂南大・農, ⁶ 北大院・農, ⁷ 金沢大・新学術)

2C01-10 C会場 第2日 9:00..... p. 26
膜脂質組成改変によるマグネトソーム上の膜受容体の活性制御

○森本 啓太, 巴 瞭斗, 脇 駿也, 田中 剛, 吉野 知子
(農工大院・工)

3C01-13 C会場 第3日 9:00..... p. 28
酵母による高効率 D-乳酸生産を目指した機械学習モデルの構築

○山本 祥輝, 山田 亮祐, 松本 拓也, 萩野 博康
(大阪公大院・工)

4D04-05 D会場 第4日 11:15..... p. 30
ゲノムデータとメタボロームデータを用いた酵素遺伝子と代謝産物の推定法の開発

○岡橋 伸幸, 松田 史生
(阪大院・情報)

4D04-07 D会場 第4日 11:15..... p. 32
ヒト定量メタボロミクスに資する安定同位体標識内部標準群 (SILIS) のバイオプロダクション

○相馬 悠希¹, 高橋 政友², 今戸 優理², 松田 貴意³, 池田 明夏里⁴, 田邊 芽衣⁴, 寺内 勉⁴, 花井 泰三¹, 馬場 健史²
(¹ 九大院・農, ² 九大・生医研, ³ SAIL テクノロジーズ, ⁴ 大陽日酸)

【醸造学, 醸造工学／食品科学, 食品工学】

3D02-02 D会場 第3日 9:45..... p. 34
Tetragenococcus halophilus における自然挿入変異のターゲットスクリーニング

○額川 裕矢¹, 脇中 琢良², 茂木 喜信², 渡部 潤^{1,2,3}
(¹ 福島大・食農, ² ヤマサ醤油, ³ 福島大・食農・発酵研)

3D04-03 D会場 第3日 11:15..... p. 36
酵母のホモ変異型遺伝子を含む染色体領域の異数化が清酒醸造に与える影響

○堀田 夏紀¹, 小高 敦史¹, 戸所 健彦¹, 杉山 峰崇², 石田 博樹¹
(¹ 月桂冠・総研, ² 広工大・生命)

【環境浄化, 修復, 保全技術／環境工学, 廃水処理技術／バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 2E01-11 E 会場 第 2 日 9:00 p. 38
キッチンと融合タンパク質を複合化した重金属イオン吸着材料の作製

○重政 友貴, 中島 一紀, 青木 孝祐, 高野 力, 川崎 了
(北大院・工)

- 2E03-06 E 会場 第 2 日 10:30 p. 40
南極地域における大気バイオエアロゾル種組成変化

○小林 史尚
(弘前大院・理工)

- 3E01-08 E 会場 第 3 日 9:00 p. 42
リグニンからの芳香族ポリマー原料の選択的生産:

サルファイトリグニンからのバニリン酸生産への *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用

○鎌田 真未¹, 安田 智恵子¹, 樋口 雄大¹, 吉田 暁弘², 坂本 千穂¹, 大関 さおり¹, 上村 直史³, 政井 英司³, 園木 和典¹
(¹ 弘前大・農生, ² 弘前大・地域戦略, ³ 長岡技科大・物質生物)

- 4E03-07 E 会場 第 4 日 10:30 p. 44
Torulaspora quercuum を用いた紅藻糖化液を原料とした効率的なエタノール生産

○小西 正朗, 森本 一輝, 邱 泰瑛
(北見工大)

【生物化学工学／バイオプロセス】

- 2F02-08 F 会場 第 2 日 9:45 p. 46
カイコを用いたブタロタウイルス構造タンパク質の発現

○加藤 竜也^{1,2,3}, 角田 達紀², 米塚 亜美², 町田 佑樹³, 関口 智史³, 徐 剣⁴, 鈴木 亨⁵, 朴 龍洙^{1,2,3}
(¹ 静大・グリーン科技研, ² 静大・農, ³ 静大院・総合科技, ⁴ 静大・グリーン科技研 (現・華東師範大学), ⁵ 農研機構・動衛研)

- 2F04-05 F 会場 第 2 日 11:15 p. 48
耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属吸着プロセス

○高野 力¹, 中島 一紀¹, 川崎 了¹, 青柳 秀紀²
(¹ 北大・工, ² 筑波大・生命環境系)

- 3F04-04 F 会場 第 3 日 11:15 p. 50
Effect of electromagnetic field on plant growth and microbial rhizosphere

○Jeong Wook Jo, Ju Yeon Lee, Sung Woo Yang, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi, Hyung Joo Kim
(Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

- 2F04-12 F 会場 第 2 日 11:15 p. 52
最小サイズの発光酵素「picALuc」の開発とその応用

○大室 (松山) 有紀¹, 古田 忠臣², 松井 勇人¹, 叶井 正樹¹, 上田 宏³
(¹ 島津製作所, ² 東工大・生命理工, ³ 東工大・化学生命研)

4F02-12 F会場 第4日 9:45 p. 54
糖鎖成分群毎の抗体分取を可能とするアルカリ安定化 Fc 受容体固定化分離剤の開発

○谷口直優, 早川勇太, 寺尾陽介
(東ソー)

【生体医用工学／セル&ティッシュエンジニアリング】

2G01-03 G会場 第2日 9:00 p. 56
アニサキスと *C. elegans* の表面機能化法の開発と Living Drug Delivery System への
応用可能性の検討

○境慎司, Mubarak Wildan, 小嶋勝
(阪大院・基礎工)

2G01-08 G会場 第2日 9:00 p. 58
塑性流体を用いたヒト iPS 細胞の大量培養

○山本陸¹, 都倉知浩^{1,2}, 紀ノ岡正博¹
(¹ 阪大院・工, ² 藤森工業)

3G01-03 G会場 第3日 9:00 p. 60
高品質セルバンク構築のための細胞画像を用いた超早期細胞品質評価

○竹本悠人¹, 陶山隆史², 今井祐太¹, 蟹江慧¹, 松崎有未^{2,3}, 加藤竜司^{1,4}
(¹ 名大院・創薬, ² PuREC, ³ 島根大・医, ⁴ 名大・ナノライフシステム研究所)

【有機化学, 高分子化学／脂質工学】

4B02-10 B会場 第4日 9:45 p. 62
超広域感染阻止能を具備するバイオ超分子コーティング：新型コロナから白癬症まで

○大成冬真¹, 小野寺正孝², 白米優一¹, 芦内誠¹
(¹ 高知大院・総人間内科, ² 東洋濾紙株式会社)

4G03-06 G会場 第4日 10:30 p. 64
次世代油脂製造技術の開発～微細藻類による EPA 高生産検討～

○石塚匠, 尾崎達郎, 和田真由美, 齋藤猛, 小山伸吾
(花王)

全ゲノム解析に基づく 時無し性・極早生コシヒカリの開発

富田 因則^{1*}

¹ 静岡大学グリーン科学技術研究所植物ゲノミクス研究コア

〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836 静岡大学理学部総合研究棟

Tel: 090-1010-7342 Fax: 054-238-4929

E-mail: tomita.motonori.k29@kyoto-u.jp

コシヒカリのゲノムに時無し性極早生遺伝子 *e1* と大粒遺伝子 *GW2* を移入して、北海道で開花・登熟が可能な大粒のコシヒカ리를初めて開発し、種苗法による審査を経て品種登録された (品種登録第 28685 号)。さらに、コシヒカリの同質遺伝的背景において、時無し性極早生遺伝子 *e1* のゲノム構造と遺伝子発現を解析した。

はじめに

コシヒカ리를極早生化してライフサイクルを短縮すれば、北限拡大はもとより、植物工場生産も可能になり、大型台風や豪雨による被害を回避することができる。演者らは、コシヒカリより約 2 週間早生の突然変異系統「関東 79 号」から時無し性極早生遺伝子 *e1* を見出し、*e1* と大粒遺伝子 *Gw2*、*e1* と短稈遺伝子 *d60*、を組合せて北海道で開花・登熟が可能な大粒のコシヒカリ「コシヒカリ *e1Gw2*」(品種登録第 28685 号)¹⁾、多稈のコシヒカリ「コシヒカリ *e1d60*」を初めて開発した。さらに、コシヒカリの同質遺伝的背景において、*e1* のゲノム構造と発現を解析した。

I. 極早生・多稈コシヒカリ「コシヒカリ *e1d60*」の育成

著者らは、北陸 100 号が短稈遺伝子 *d60* を持ち、*d60* は配偶致死遺伝子 *gal* と共存すると配偶子が致死となるため、コシヒカリ (*D60D60galgal*) × 北陸 100 号 (*d60d60GalGal*) の交雑 F_1 (*D60d60Galgal*) では花粉稔性が 75% となり、 F_2 では 6 可稔長稈型 (*4D60D60:2D60d60GalGal*) : 2 部分不稔型 (*D60d60Galgal*) : 1 短稈型 (*d60d60GalGal*) の特異的な比で分離することを明らかにした²⁾。さらに、 BC_4F_1 で分離する部分不稔型個体 (*D60d60Galgal*) にコシヒカ리를 7 回戻し交雑して「コシヒカリ *d60*」を育成した³⁾。背丈を約 20 cm 抑制して倒伏を防止する *d60* は第 2 染色体に座乗し、緑の革命に貢献した短稈遺伝子 *sd1* に匹敵する生産性をもたらす^{4,5)}。コシヒカリ * 2/[$(\text{ヒカリ新世紀} \times \text{関東 79 号})F_3$ *e1sd1*] の BC_2F_2 で分離した

e1sd1 ホモ型個体⁶⁾と「コシヒカリ *d60*」との交雑 F_2 において、幼苗で選抜後育成した *d60* ホモ型個体群において、1 極早生・二重短稈 *e1sd1d60* : 3 極早生・短稈型 *e1Sd1d60* : 3 中生・二重短稈 *E1sd1d60* : 9 中生・短稈 *E1Sd1d60* に分離した。さらに、*e1Sd1d60* ホモ型の BC_2F_2 を 1 回親にして「コシヒカリ *d60*」を 3 回戻し交雑し、コシヒカリより 14 日早生で 24 cm 短稈の極早生・短稈の同質遺伝子系統「コシヒカリ *e1d60*」を育成した。

II. 極早生・大粒コシヒカリ「コシヒカリ *e1Gw2*」の育成

コシヒカリといのちの畝との F_3 で固定した大粒個体にコシヒカ리를戻し交雑し B_1F_2 で分離した大粒個体⁷⁾ と関東 79 号との F_2 で分離した極早生大粒型 *e1Gw2* ホモ型個体を 1 回親にしてコシヒカ리를反復親とする 4 回の戻し交雑を行った[$(\text{コシヒカリ}^*2//\text{コシヒカリ}/[(\text{コシヒカリ} \times \text{いのちの畝})F_3 \text{Gg}]/\text{関東 79 号})$] の BC_4F_2 において、極早生で大粒の *e1Gw2* ホモ型個体、小粒の *e1gw2* 型個体、晩生で大粒の *E1Gw2* ホモ型個体、小粒の *E1gg* 型個体が、 $1e1Gw2:3e1gw2:3E1Gw2:9E1gw2$ に分離し、さらに、 BC_4F_3 でコシヒカリより 14 日早生で 24.0% 大粒化した極早生・大粒の同質遺伝子系統「コシヒカリ *e1Gw2*」を固定した (図 1)⁸⁾。

III. 「コシヒカリ *e1Gw2*」の全ゲノム解析

e1 との連鎖が認められた第 7 染色体 8.3 Mb 地点の SNP マーカー⁶⁾の近辺には開花抑制遺伝子 *Ghd7* が座乗

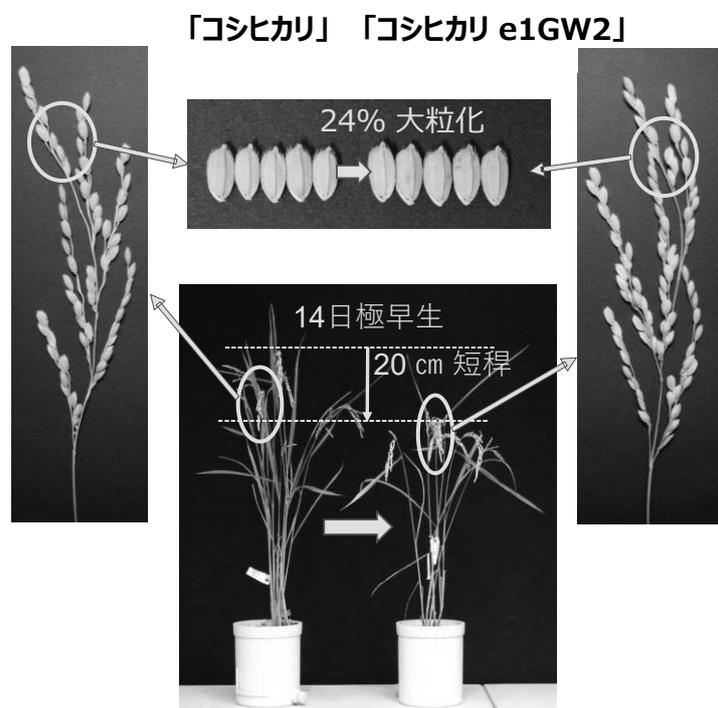


図1. 時無し性の開花性を持ち、大粒化したコシヒカリ
北海道における大粒コシヒカリの生産を可能にする。

している。「コシヒカリ e1d60」、「コシヒカリ e1Gw2」の全ゲノムを解読して、本研究室構築のコシヒカリの共通配列を参照にマッピングし、*e1*の変異同定を試みた。その結果、「コシヒカリ e1d60」、「コシヒカリ e1Gw2」の *Ghd7* に変異は無く、野生型であった。しかし、*Ghd7* の 5' 側 35,213 bp 上流にある *Xa21* 様配列 (全長 214 bp) 中に *e1* を移入した同質遺伝子系統に特有の SNP が見出され、RT-qPCR における *Ghd7* の発現の低下との関わりが推察される^{6,8)}。

本研究は JST 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP ハイリスク挑戦タイプ⁹⁾、JST 大学発新産業創出プログラム START プロジェクト推進型 SBIR の支援を受けた。

文 献

- 1) 育成者 富田因則 農林水産植物 *Oryza sativa* L. 品種登録第 28685 号 コシヒカリ駿河 e1Gg (2021).
- 2) Tomita, M., Tanisaka, T. The gametic non-lethal gene *Gal* on chromosome 5 is indispensable for the transmission of co-induced semidwarfing gene *d60* in rice. *Biology* **8**: 94 (2019).
- 3) Tomita, M. Combining two semidwarfing genes *d60* and *sd1* for reduced height in 'Minihikari', a new rice germplasm in the 'Koshihikari' genetic background. *Genet. Res. Cambridge* **94**: 235-244 (2012).
- 4) Tomita, M., Tanaka, J. Semidwarf gene *d60* affected by ubiquitous gamete lethal gene *gal* produced rare double dwarf with *d30* via recombination breaking repulsion-phase linkage on rice chromosome 2. *Genes* **10**: 874 (2019).
- 5) Tomita, M., Ishimoto, K. Rice novel semidwarfing gene *d60* can be as effective as Green revolution gene *sd1*. *Plants* **8**: 464 (2019).
- 6) Tomita, M., Obara, Y. Year-round flowering gene *e1*, a mutation at the *E1* locus on rice chromosome 7, and its combination with Green Revolution gene *sd1* in an isogenic cell line. *Gene* **815**: 146166 (2022).
- 7) Tomita, M., Yazawa, S., Uenishi, Y. Identification of rice large grain gene *GW2* by whole-genome sequencing of a large grain-isogenic line integrated with japonica native gene and its linkage relationship with the co-integrated semidwarf gene *d60* on chromosome 2. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 5442 (2019).
- 8) Tomita, M., Arai, Y., Kato, Y. Extremely early flowering and large grain isogenic japonica rice Koshihikari integrated with gene *e1* and *GW2*. *Plants* (submitted).
- 9) 富田因則 NGS 解析に基づく気候危機に負けない超多収・大粒・早晩生コシヒカリのゲノム育種。科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム A-STEP 成果集 **2022**: 35 (2022).

Cas11d の設計・発現による 新規ゲノム編集技術 CRISPR-Cas type I-D (TiD) の高効率化

和田 直樹¹・村上 愛美¹・丸井 和也¹・刑部 祐里子²・刑部 敬史^{1*}

¹徳島大学大学院社会産業理工学研究部, ²東京工業大学生命理工学院生命理工系

〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15 藤井節朗記念医科学センター

Tel: 088-634-6418 Fax: 088-634-6419

E-mail: kosakabe@tokushima-u.ac.jp

ゲノム編集技術は、ゲノム情報を正確かつ効率的に改変する技術であり、医療や農業など様々な分野での応用に向け技術革新が進んでいる。これまで我々は、*Microcystis aeruginosa* 由来の CRISPR-Cas type I-D を同定し、それをもとに開発した国産ゲノム編集技術 TiD の動植物ゲノム編集への利用を報告してきた。本研究では、新規 *cas11d* 遺伝子を設計し、他の *cas* 遺伝子や crRNA と共発現させることで、大腸菌からの Cas-crRNA 複合体精製における複合体安定性の向上、さらにヒト HEK293T 細胞内での DNA 切断効率の向上に成功したので報告する。これらの結果から、Cas11d の結合による複合体安定化がゲノム編集効率の向上に寄与することが示唆された。

1. はじめに

近年、ゲノム編集技術の目覚ましい発展により、ゲノム上の任意の配列を特異的に改変することが可能になってきた。短期間で正確かつ効率的に標的配列を改変できることから、基礎研究での利用だけでなく、医療、農業を含めた様々な分野での利用が進んでいる^{1),2)}。現在、最も汎用的に利用されているゲノム編集技術は、CRISPR-Cas9 である^{1),2)}。CRISPR-Cas9 では、CRISPR RNA (crRNA) 内の 20 塩基の配列を任意の配列へと変更するだけで標的遺伝子のノックアウト実験が可能である。課題としては、標的に似た配列へ変異を導入するオフターゲット効果や、標的配列の選択性の制限 (SpCas9 の場合は標的配列の 3' 末端に NGG 配列が必要) などが挙げられている^{1),2)}。また、日本国内での産業利用においては、知的財産の問題も指摘されている。このため、これらの課題を克服する新しい国産ゲノム編集ツールの開発が望まれていた。

CRISPR-Cas は、細菌や古細菌がファージ感染などへ対抗する手段として有する獲得免疫機構であり、2 Class, 6 type に分類される多様なシステムが存在する³⁾。我々はこれまで、機能未知であった CRISPR-Cas type I-D に着目し、新規ゲノム編集技術 TiD としての開発を行ってきた^{4),5)}。TiD は、5 つの Cas タンパク質 (Cas3d, 5d, 6d, 7d, 10d) と GTH (H:T,C,A) に続く 35, 36 塩基を認識する crRNA が複合体を形成することで、標

的配列を認識・切断する (図 1A)。Cas9 と比べて長い配列を認識するため、高い特異性が期待できる。我々はすでに、ヒト培養細胞や植物において TiD によるゲノム編集に成功し、TiD が小さな挿入・欠失の誘導に加え、PAM を挟んだ両方向へ長鎖欠失を誘導するなど、ユニークな性質を有することを明らかにしてきた。

近年、他の細菌の CRISPR-Cas type I において、*cas10* 遺伝子内にある小さな ORF から Cas11 が独立して発現していることが明らかとなった⁶⁾。また、CRISPR-Cas type I を真核生物のゲノム編集へ応用する際に、Cas11 が重要な役割を持つことが報告された⁷⁾。一方で、我々の開発した TiD は、Cas11d が発現していないにも関わらず、ゲノム編集が可能であった^{4),5)}。そこで本研究では、我々の開発した TiD における Cas11d の効果を検証するため、TiD *cas10d* 配列をもとに *cas11d* 遺伝子を設計し、その影響を解析した。

2. 実験材料と方法

(1) 大腸菌からの Cas-crRNA 複合体の精製

TwinStrept-Cas10d, Cas5d, Cas6d, Cas7d, Cas11d と crRNA を発現する大腸菌 BL21-AI 株を作製し、実験に用いた。大腸菌株を 1L TB 培地で培養、OE600:0.5-0.6 で IPTG を加えて各 Cas の発現を誘導した。一晚培養した後に細胞を回収し、超音波処理によって細胞を破碎、抽出したタンパク質を StrepTRAP HP (Cytiva) によって精製した。精製したタンパク質をさ

らにゲルろ過カラム Hi load®16/600 Superdex® 200 pg(Cytiva)により精製し、ウエスタン、SDS-PAGE によって解析した。

(2) ヒト HEK293T 細胞における NanoLUC SSA assay
ヒト細胞での発現用に最適化した各 *cas* 遺伝子発現ベクターと *EMX1* crRNA 発現ベクター、さらに *EMX1* 遺伝子配列を含む NanoLUC レポーター、Fluc 発現ベクターを HEK293T 細胞へと共導入した。トランスフェクションから2日後、Dual-Glo® Luciferase Assay (プロメガ)を用いて各 Luciferase 活性を検出し、解析した。

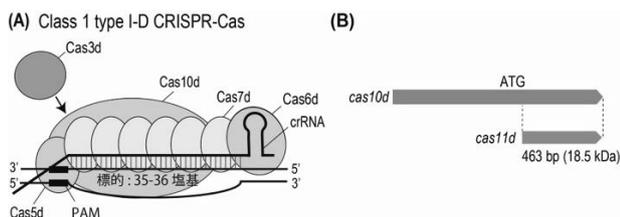


図1. TiD Cas-DNA-crRNA 複合体 (A)と *cas10d* 遺伝子内 ORF に設計した *cas11d* 遺伝子 (B).

3. 結果と考察

まず、*Microcystis aeruginosa cas10d* 遺伝子内の ORFs を解析し、McBrideら (2020)⁶⁾の報告をもとに 483 bp の ORF を同定し、*cas11d* 遺伝子と命名した(図 1B)。次に、ヒト HEK293T 細胞において、設計した Cas11d が他の Cas タンパク質と複合体を形成することを FLAG-Cas7d と抗 FLAG 抗体を用いたプルダウンアッセイにより明らかにした(図 2A)。さらに、大腸菌で Cas11d を含む全 Cas と crRNA を発現させ、複合体の精製を行なったところ、Cas11d がいない条件では複合体を安定に精製することができなかったが、Cas11d との共発現では複合体を安定に精製することができた(図 2B)。Cas11d が複合体へ結合することで、複合体の安定性が向上することが示唆された。

また、ヒト HEK293T 細胞において、我々が構築した NanoLUC SSA assay により変異導入効率への影響を解析したところ、Cas11d の共発現により変異導入活性が 2-5 倍向上することが明らかとなった(図 2C)。先の結果と合わせて考えると、細胞内での複合体の安定性が向上することで変異導入効率が向上したと考えられる。さらに近年、*Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の type I-D では Cas11d がヒト細胞でのゲノム編集に必須であると報告されており⁷⁾、我々が構築した TiD は他とは異なるユニークなシステムであることが示唆される。

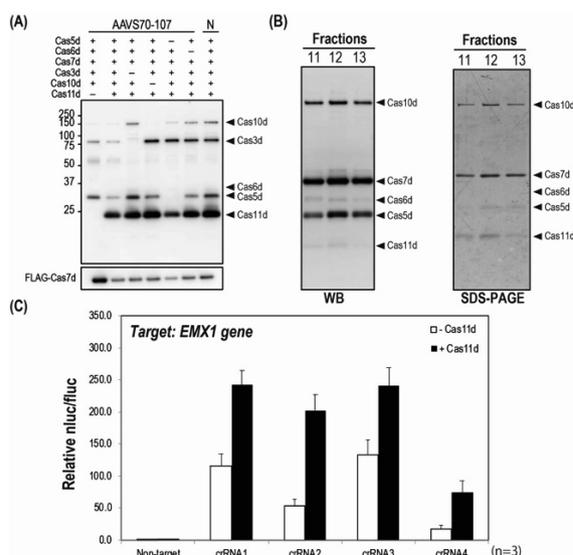


図2. Cas11d 発現が TiD 複合体の形成 (A) や安定性 (B)、ゲノム編集効率 (C) に与える影響の解析. (A) TiD 発現ヒト HEK293T 細胞での抗 FLAG 抗体を使ったプルダウンアッセイ (B) TiD Cas 発現大腸菌からゲルろ過により精製した各フラクションの解析 (C) ヒト HEK293T 細胞での NanoLUC SSA assay.

4. 今後の展望

今後は、Cas11d の発現に加え、TiD が持つ特性の更なる同定や改変、他の細菌由来の TiD との比較、さらに細胞への導入方法の検討など、様々なアプローチから TiD の改良を行なっていく。これらの研究を通して、高効率かつ高特異性を持つ国産ゲノム編集技術を開発し、医療、農業を含む様々な分野での利用を進めたい。

5. 参考文献

- Pickar-Oliver, A. and Gersbach C. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20** (8) 490-507 (2019)
- Wada, N. et al., *BMC Plant Biol.*, **20**, 234 (2020)
- Wada, N. et al., *Plant Physiol.*, **188** (4), 1825-1837 (2022)
- Osakabe, K. et al., *Commun. Biol.*, **3**, 648 (2020)
- Osakabe, K. Wada, N. et al. *Nucleic Acids Res.*, **49** (11), 6347-6363 (2021)
- McBride, T.M. et al., *Mol. Cell*, **80** (6), 971-979
- Tan, R. et al., *Mol. Cell*, **82** (4), 852-867

確率的 Cre-lox 組換え反応の機械学習ドリブンエンジニアリングによる任意の割合でのスパースラベリングの実現

山内 悠至^{1,2}・植田 充美¹・青木 航^{1*}

¹京大院・農, ²日本学術振興会

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

Tel: 075-753-6112 Fax: 075-753-6112

E-mail: aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

スパースラベリング法とは、全細胞集団のうち一部の細胞のみをまばらに標識することで、1 細胞レベルの解析を可能とする手法である。私たちは、機械学習を用いて Cre-lox 組換えシステムをエンジニアリングすることで、標識率を自由に制御可能な新規スパースラベリング法を確立した。本手法を用いることで、例えば、神経ネットワークの相互作用など、これまで解析が困難であった生命現象を 1 細胞レベルで理解できるようになると期待される。

はじめに

スパースラベリング法とは、全細胞集団のうち一部の細胞のみをまばらに標識することで、複雑な組織において 1 細胞レベルの解析を可能とする手法である。例えば、マウスの脳には 1×10^8 個ものニューロンが高密度に存在しているため、各ニューロンの機能や形態を詳細に調べることは難しい¹⁾。このような複雑な組織においても、スパースラベリング法を用いることで、一部のニューロンサブセットのみを対象に研究を行えるようになり、神経ネットワークの動作メカニズムを解析できるようになりつつある²⁾。

しかし、これまでに開発されたスパースラベリング法には、標識率を自由に制御できないという欠点が存在する。スパースラベリング法においては Cre-lox 部位特異的組換えを活用した手法が多く、例えば CreER 法では、Cre を誘導するタモキシフェンの濃度を制御することでスパースラベリングを行う³⁾。その他にも、MORF 法⁴⁾、MARCM 法⁵⁾、MADM 法⁶⁾、SPARC 法⁷⁾、STARS 法⁸⁾など様々な方法が開発されてきたが、いずれの方法でも標識率を自由に制御可能なスパースラベリングは実現できていなかった。

そこで本研究では、機械学習を用いて Cre-lox 部位特異的組換えをエンジニアリングすることで、任意の標識率を自由に選択可能な新規手法の開発を試みた。私たちは、2 組の lox 配列 (lox2272 と loxP) を交互に配置し、loxP 間に転写因子を配置した遺伝子配列を構築した (図 1)。Cre は lox2272 間と loxP 間のどちらか片方を認識し、切断する。lox2272 間が切断された場合のみ転写因子が発現し、遺伝子発現を誘導する。標識

率は Cre による lox2272 と loxP の切断比率により決定されるため、lox 配列の片方に変異導入し、Cre による切断率が変化すれば、標識率が変化する。そこで、lox2272 配列に網羅的変異を導入して各変異が標識率に与える影響を評価し、そのデータセットを用いて機械学習モデルを構築すれば、様々な標識率を示す変異 lox2272 配列を自由に設計できるようになると仮説を立てた。

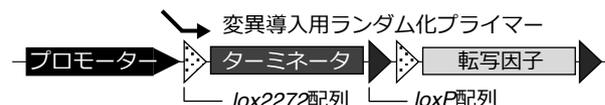


図 1 変異 lox2272 配列ライブラリの遺伝子配列

方法と結果

1. 変異 lox2272 配列ライブラリの構築と評価

方法: 私たちは、ランダム化 PCR を用いて、lox 配列の RBE (Recombinase Binding Element) の 13 bp に対して網羅的な変異を導入した変異 lox2272 配列ライブラリを構築した (図 2)。構築したライブラリをハイスクリーンな評価が可能な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入した後、Cre を誘導し、プラスミド抽出を行なった。抽出したプラスミドをテンプレートにして、各変異 lox2272 配列の Cre 切断率をイルミナシーケンサで評価した。



図 2 変異 lox2272 配列への変異導入位置

結果： イルミナシーケンサ解析の結果、約 2300 種類の変異 *lox2272* 配列それぞれの Cre 切断率を定量することに成功した。これらの変異 *lox2272* 配列の Cre 切断率は、野生型 *loxP* 配列に対して、0.05%–100%まで幅広い分布を示した (図 3)。

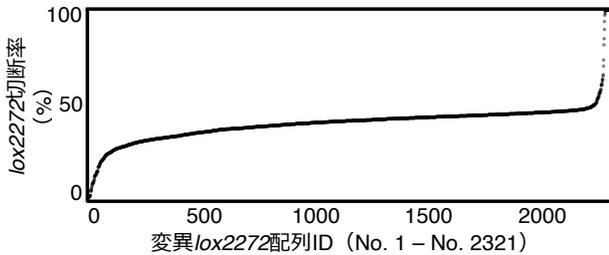


図 3 変異 *lox2272* 配列の Cre 切断率の評価

2. 任意の Cre 切断率を示す変異 *lox2272* 配列を予測可能なガウス過程回帰モデルの構築

方法： スパースラベリングの標識率を自由自在に制御可能とするために、任意の変異 *lox2272* 配列の Cre 切断率を予測可能なガウス過程回帰 (GPR) モデルを構築した。GPR モデルは、①線形回帰ではフィッティング不可能な場合でも使用可能、②関数が分布として得られるため推定の不確実性を表現可能という 2 つの利点があることから選択した⁹⁾。

まず、イルミナシーケンサで評価した約 2300 種類の変異 *lox2272* 配列と Cre 切断率のデータセットを、学習データセットとテストデータセットに 9:1 の割合で分割した。次に、学習データセットを用いて GPR モデルを構築し、テストデータの予測精度を検証した。さらに、構築した GPR モデルが任意の変異 *lox2272* 配列の切断率を予測できることを確かめるため、学習・テストデータセットの両方に含まれない変異 *lox2272* 配列の切断率を予測し、qPCR で検証した。

結果： 構築した GPR モデルで予測したテストデータの切断率と実際の切断率の相関は、 $R=0.92$ と高い性能を示した (図 4A)。また、未知変異 *lox2272* 配列の Cre 切断率を GPR モデルに予測させ、qPCR で検証したところ、相関は $R=0.96$ であり、極めて予測精度の高いモデルを構築することに成功した (図 4B)。このモデルを活用することで、 $5.7 \times 10^{-4} \% - 41 \%$ の範囲の標識率を達成できる新規変異 *lox2272* 配列群を取得することに成功した。

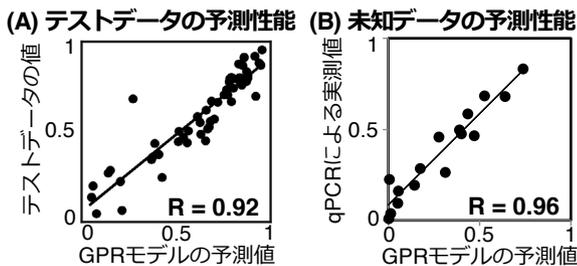


図 4 GPR モデルの構築と評価

3. ヒト培養細胞に対する応用

方法： この新規スパースラベリング法が酵母以外の真核生物でも利用できるかを検証した。取得した変異 *lox2272* 配列のうちランダムに選んだ 7 種類の配列をヒト培養細胞のゲノムに導入し、Cre 誘導を行った後に、ゲノム抽出を行なった。その後、各変異 *lox2272* 配列の切断率を qPCR で定量した。

結果： 酵母での切断率と培養細胞での切断率の相関は $R=0.9$ であり、私たちのスパースラベリング細胞はヒト培養細胞でも使用できることが示された (図 5)。

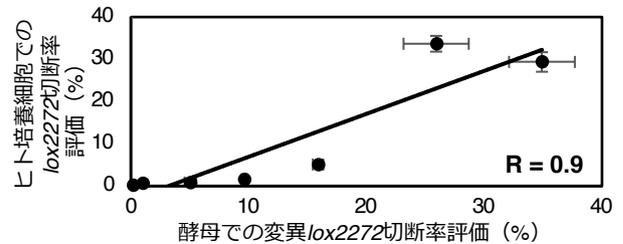


図 5 酵母での切断率と培養細胞での切断率の相関

総括と今後の展望

本研究では、変異 *lox2272* 配列の変異導入パターンと対応する Cre 切断率のデータセットを取得することで、任意の標識率でのスパースラベリングを可能とする変異 *lox2272* 配列を予測可能な GPR モデルを構築することに成功した。また、本研究で得られた $5.7 \times 10^{-4} \%$ の標識率を示す変異 *lox2272* 配列は、先行研究の中で最もスパースな標識を可能にするものである。さらに、変異 *lox2272* 配列の Cre による切断率は酵母とヒト培養細胞間で高い相関を示したことから、様々な真核生物において適応できる可能性が示唆された。

現在、モデル生物の中でもっともシンプルな神経ネットワークを持つ線虫 *Caenorhabditis elegans* を対象に、本スパースラベリング法を用いて神経ネットワークの機能解明を試みている。

文献

- 1) Herculano-Houzel, S., *et al.*, PNAS, **103**, 12138-12143 (2006)
- 2) Aoki, W., *et al.*, Scientific Reports, **8**, 1-9 (2018)
- 3) Hayashi, S., *et al.*, Developmental Biology, **244**, 305-318 (2002)
- 4) Veldman, M., B., *et al.*, Neuron, **108**, 111-127 (2020)
- 5) Lee, T., *et al.*, Neuron, **22**, 451-461 (1999)
- 6) Zong, H., *et al.*, Cell, **121**, 479-492 (2005)
- 7) Isaacman-Beck, J., *et al.*, Nature Neuroscience, **239**, 1168-1175 (2020)
- 8) Wang, S., Z., *et al.*, PLoS One, **4**, 4200 (2009)
- 9) 赤穂昭太郎, システム/制御/情報, **62**, 390-395 (2018)

Extensive analysis of transglutaminase 1 substrate preferences using cDNA display

Munaweera T.I.K ¹, Damnjanovic Jasmina ^{1*}, Moeri Nezu ¹, Maurizio Camagna ¹, Takaaki Kojima ²,
Kiyotaka Hitomi ⁴, Hideo Nakano ¹, Naoto Nemoto ³

¹ Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya University, Japan, ²Grad. Sch. Agri., Meijo University, Japan, ³Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama University, Japan, ⁴Grad Sch. Pharm. Sci., Nagoya University

* Tel: +81-52-789-7957 Fax: +81-52-789-4145

*E-mail: jasmina@agr.nagoya-u.ac.jp

Mammalian transglutaminases (TGs) are Ca²⁺-dependent enzymes that catalyze the formation of isopeptide cross-linking between glutamine and lysine residues of various or the same proteins. The eight isozymes of the TGs family (TG 1 to 7 and factor XIII) are distributed across a variety of tissues and involved in multiple biological processes. The abnormal activities of TGs are known to occur in various diseases while TG1 mutation has been found to link with lamellar ichthyosis and Alzheimer's disease. Differences in enzyme expression are found in such conditions and it has become important to analyze enzyme activity using isozyme-dependent substrates. We used the in vitro cDNA displayed libraries to gain insight into the preferred substrate amino acid sequence by human TG1. The amino acid libraries were randomized at positions -2, -1, +1, +4, +5, +6, and +9 from the glutamine residue, with respect to the consensus residues previously identified within the 12-mer sequence (K5 sequence: Sugimura *et al.* 2008) XXQXKLXXXWPX (where 'X' represent non-conserved amino acids). Library screening and analysis of the selected pool of sequences by next-generation sequencing (NGS) and in-house bioinformatics methods revealed a detailed substrate profile of TG1 indicating preferred as well as non-preferred sequences. Furthermore, candidate glutamine donor substrates with a higher enrichment factor than the K5 sequence have been identified and will be evaluated in the near future.

Introduction

Mammalian transglutaminases (TGs) catalyze the Ca²⁺-dependent cross-linking reaction between glutamine and lysine residues of proteins forming covalent isopeptide linkages (Eckert *et al.* 2014). There are eight isozymes from TG1 to 7 and Factor XIII, distributed over a variety of organisms of several kingdoms including plants, animals, and microorganisms. The enzymatic reaction starts with a formation of an acyl-enzyme intermediate through binding a glutamine residue of the substrate and cysteine residue of the TG active site. Since the acyl-enzyme intermediate forms with a glutamine donor, TG isozymes are known to have unique substrate preferences toward these substrates (Hitomi and Tatsukawa 2015).

TG1 is one of the extensively characterized isozymes,

essential for the formation of human skin epidermis, specifically for cross-linking structural proteins and formation of the cornified envelope. Aberrant expression of the TG1 gene has been identified to be related to the skin condition lamellar ichthyosis and Alzheimer's disease (Tripathy *et al.* 2020). Therefore, to study TG1 and develop therapeutic strategies, accurate identification of the substrate preference and development of sensitive peptide probes is required. Here, we applied the cDNA display system we recently developed (Damnjanovic *et al.* 2022) to study the substrate scope of human TG1.

Methodology

The outline of the selection is shown in Figure 1. Semi-randomized (SRL) library was designed using the K5 peptide sequence (YEQHKLPSSWPF) previously

identified as a good TG1 substrate by phage display (Sugimura *et al.* 2008) as a template. The library was created by random mutagenesis of seven positions of the peptide backbone considered important while conserving the reactive Gln (assigned 0 position). Such prepared DNA library was *in vitro* transcribed and obtained mRNA was photo-crosslinked to the puromycin linker (mRNA-linker library). This was followed by *in vitro* translation to obtain the mRNA display library and reverse transcription to obtain the cDNA display library. Affinity purification via C-terminal His-tag was performed prior to TG1 activity-based selection to remove display complexes lacking incomplete peptide sequences. The enriched library after three selection rounds was used for next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics analysis.

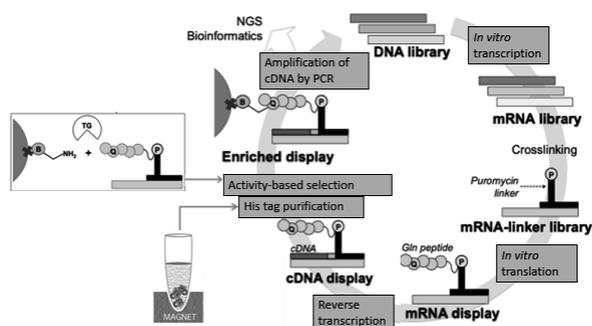


Figure 1. Outline of cDNA display platform for screening and selection of preferred TG1 peptide substrate.

Results and discussion

The enriched libraries were analyzed by paired-end sequencing (Illumina, NextSeq550). Data preparation was done using Seqkit and R, and analysis by Biopython. Amino acid enrichment at each randomized position was calculated and presented in Fig. 2. The results suggest that TG 1 shows preference at five out of seven mutated sites. Positions +5 and +6 seem to tolerate a wide range of sequences, which could be explained by the distance of these positions from the reactive Gln. Surprisingly, position +9, although distant from the Gln, indicates preference toward Phe. This could be related to the interactions of the peptide with other hydrophobic residues of the TG1 active site. Amino acid enrichment at positions in relative proximity to the Gln (−2, −1, +1, +4) indicates the preference towards Tyr at position −2, Tyr, or Glu at position −1, His at position +1, and Pro at position +4, as also observed by Hitomi and Tatsukawa,

2015. In addition, we have also identified the least preferred amino acid sequences, namely charged and polar ones in position −2, and Pro adjacent to Gln, at positions −1 and +1, while short amino acids and sulfur-containing Cys and Met were the least preferred at position +4.

The analysis of the top 150 enriched peptide sequences revealed peptides with higher enrichment factors (ER), such as 36.1 than the known K5 peptide with ER of 1.4. N and C termini of the peptides are dominated by nonpolar, hydrophobic residues such as Leu, Ile, and Phe in more than 60% at −2 position and Val in more than 90% of +9 position. The −1 and +1 positions surrounding Gln were enriched with polar or charged residues such as Ser, Tyr, and Arg in more than 60% of the sequences. Pro at the position +4 is found in more than 80% of sequences revealing the importance of Pro conservation at this position for substrate specificity.

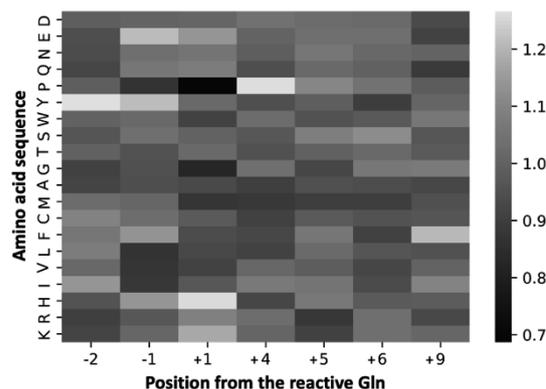


Figure 2. Heatmap showing the color-coded enrichment factor of each amino acid at each randomized position.

Future plan

Enriched peptide sequences will be analyzed using a machine learning approach to uncover the hidden rules of enrichment relevant to the understanding of the TG1 substrate profile. The specificity and activity of the enriched peptides will be compared with that of the K5 peptide in search of novel peptide probes to study TG1.

References

- 1) Sugimura, Y. *et al. FEBS J*, **275**, 5667–5677, 2008.
- 2) Eckert, R. L. *et al. Physiol. Rev*, **94**, 383–417, 2014.
- 3) Hitomi, K. and Tatsukawa, H. *Transglutaminases*, 63–82, 2015.
- 4) Damjanovic, J. *et al. Sci Rep*, **12**, 13578, 2022.
- 5) Tripathy, D. *et al. Neurobiol Dis*, **140**, 104849, 2020.

SH 基化学修飾による臨床検査薬酵素の機能改変と特性解析

外山 二卯佳・西矢 芳昭*

摂南大学大学院理工学研究科
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8
Tel: 072-800-1151 Fax: 072-838-6599
E-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp

臨床検査では、検査薬を長期保存するために抗菌剤を添加するが、その抗菌剤による酵素の失活が起こる事例がある。腎機能評価マーカーであるクレアチニンの測定用酵素として実用化されている *Arthrobacter* 属由来サルコシンオキシダーゼ (SoxA) についても、SH 基を化学修飾する抗菌剤の添加による失活が報告されている。本研究では、SH 基を化学修飾された SoxA の特性解析を行った。その結果、修飾 SoxA はオキシダーゼ活性の大幅な低下とデヒドロゲナーゼ活性の増加が見られ、3 箇所のシステイン残基 (Cys154, Cys232, Cys264) の修飾が確認された。変異体および計算化学解析から、2 箇所のシステイン残基 (Cys232, Cys264) の修飾による効果が SoxA の FADs / 面への O_2 エントランスを狭め、 O_2 との反応が低下し、デヒドロゲナーゼ化したと予想された。

1. はじめに

病気の早期発見や予防のために行う検査を臨床検査という。臨床検査には様々な検査方法があり、生化学検査は健康診断などでも行われている最もポピュラーな検査である。これは一般に、患者から採取した検体を、酵素が主成分の検査薬を用いて分析する。

生化学検査薬は液状で長期間保存する必要があり、そのために抗菌剤が添加される。しかし、その抗菌剤の添加により酵素の失活が起こる事例がある。

そのひとつが腎機能評価マーカーであるクレアチニンの測定用酵素として実用化されている *Arthrobacter* 属由来サルコシンオキシダーゼ (SoxA)^{1,2)} で、SH 基を化学修飾する抗菌剤の添加による失活が報告されている³⁾。しかし、失活の詳細は長らく不明だった。

われわれは、修飾 SoxA と未修飾 SoxA の比較を行った。修飾 SoxA は未修飾 SoxA と同様の円二色性スペクトルを示したが、反応混液の O_2 消費速度が極めて低く、基質を加えた際の吸光スペクトルも還元型となった。したがって、化学修飾は基質の酸化反応ではなく、続いて起こる O_2 との反応 (図 1) に影響することが確認

され、修飾 SoxA のデヒドロゲナーゼ (Dh) 化が示唆された。

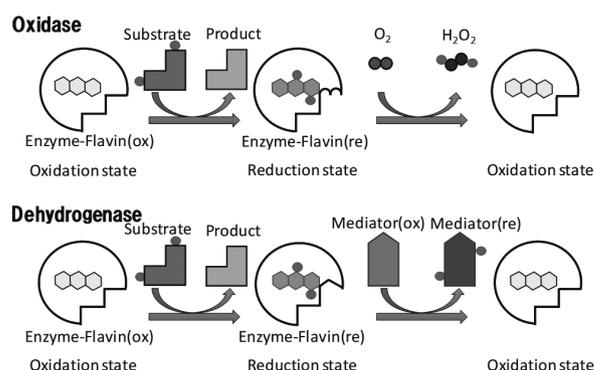


図 1. オキシダーゼ (Ox) とデヒドロゲナーゼ (Dh) の触媒機構⁴⁾、どちらもまず基質と反応しその後 Ox は O_2 と、Dh はメディエータと反応する。

そこで本研究では、SH 基を化学修飾された SoxA の特性解析を行った。

2. 結果及び考察

2-1 SH 基修飾剤による SoxA の修飾と分光分析

SoxA を SH 基修飾剤の 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one (MIT) や *N*-Ethylmaleimide (NEM), HgCl₂ などで処理したところ, 全てにおいてオキシダーゼ (Ox) 活性の低下と Dh 活性の増加が確認されたが, 修飾剤により Dh 活性の増加率に違いが見られた (図 2).

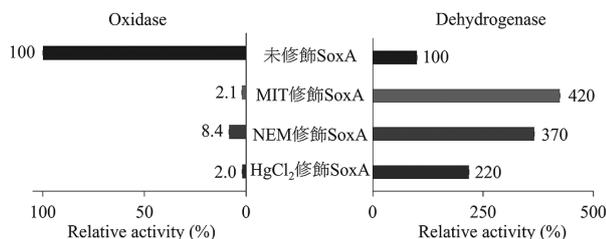


図 2. 各 SoxA の Ox と Dh の相対活性, 各未修飾 SoxA を 100 % とした相対活性 (%) を示した.

これらの修飾剤はシステイン側鎖を修飾するが, MIT は他の修飾剤と異なり分子内に硫黄を含むため, システインの SH 基と容易にジスルフィド結合を形成し得る. Dh 活性の増加率の差異は, 修飾様式の違いと関連すると考えられた.

2-2 修飾残基と修飾による影響

MALDI-TOF MS でのペプチド解析により, 3 箇所のシステイン残基 (Cys154, Cys232, Cys264) の修飾が確認された. これらの残基の変異体解析より, 2 箇所のシステイン残基 (Cys232, Cys264) の修飾効果による O₂ 取込み阻害が示唆された (図 3).

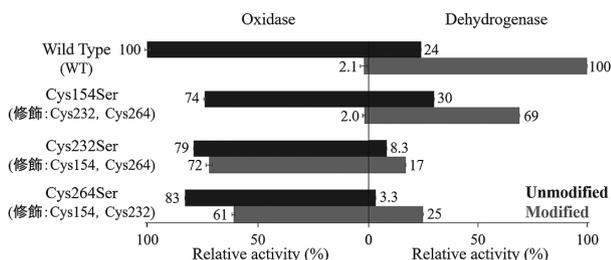


図 3. 各未修飾または修飾 SoxA の Ox と Dh の相対活性, Ox は WT の未修飾 SoxA を, Dh は WT の修飾 SoxA を 100 % とした相対活性 (%) を示した.

還元型 SoxA の計算化学解析により, システイン残基近傍にある補酵素 FAD_{si} 面への O₂ 取込みのエントランスが修飾により狭まり, O₂ との反応が低下したと予想された (図 4).

一方, FAD_{re} 面には基質結合部位があり, 酵素反応後生成物が遊離すれば O₂ 取込みが起こり得る. そこで, 遊離生成物 (ホルムアルデヒド) 濃度を測定したところ, 未修飾 SoxA に比べ修飾 SoxA は低下していた. 生成物が残ることで FAD_{re} 面が塞がれ, O₂ 取込みが阻害されると考えられた.

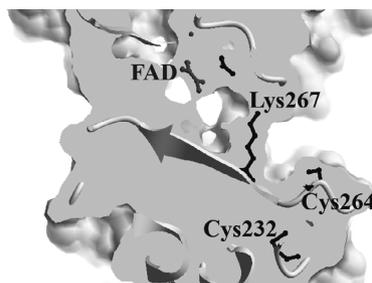


図 4. 未修飾 SoxA (還元型) の構造モデルの断面, FAD_{si} 面での O₂ の電子受容に関与している Lys267 へ続く空洞が見られた.

2-3 修飾 SoxA の応用

Dh 化した MIT 修飾 SoxA は, 熱安定性の向上が確認され, 構造モデルより, 化学修飾による新たな水素結合の形成が認められた. また, 本修飾 SoxA と反応し得るメディエータの探索を行った結果, 2,6-Dichlorophenol indophenol または 1-Methoxy PMS とホルマザン色素の組み合わせが利用可能であった. そこで, 本修飾 SoxA と水溶性ホルマザンを用いた臨床検査系を組み, 癌マーカー候補であるサルコシンのエンドポイントアッセイに利用できる目処を得た.

3. 今後の展望

本研究の SH 基修飾 SoxA は Dh 化されているため溶存酸素の影響を受け難く, クレアチニンやクレアチン, サルコシンなどのバイオセンサ用途が期待できる.

本研究における酵素の SH 基化学修飾は操作が簡便 (混ぜるだけ) で, 修飾剤の選択肢が非常に豊富である. 現在, 他の分析用酵素でも SH 基修飾剤を用いたプロテイン・エンジニアリングを試みている. SoxA のように, 抗菌剤での酵素活性低下や失活が, 実はタンパク質変性でなく酵素特性の大幅な改変によって起こるという事例が, 他にもあるのかもしれない.

また, SoxA 生産組換え大腸菌の長期培養にて, システイン残基に関わる活性低下が報告されている²⁾. われわれは, SoxA 生産菌の長期培養における Ox 活性低下に伴う Dh 活性増加を確認した. 自然界でも酵素の SH 基修飾による特性変化が起こるのではと思われ, その役割が興味深い.

文 献

- 1) Nishiya Y. and Imanaka T., *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 239-244, (1993)
- 2) Nishiya Y., Zuihara S. and Imanaka T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 367-370, (1995)
- 3) 西矢芳昭, 山本和巳, 川村良久, 愛水重典, 日本農芸化学会誌, **75**, 857-862, (2001)
- 4) Shimozawa Y., Yoshida S., Ikeda K., Kato Y., Toyama F. and Nishiya Y., *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, **8**, 65-70, (2020)

微生物酵素反応による

新たな有用 S-置換システインスルフォキシド供給経路の構築

水谷 拓¹・原 良太郎¹・竹内 道樹¹・日比 慎²・上田 誠^{1,3}・小川 順^{1*}¹ 京都大学大学院農学研究科, ² 富山県立大学工学部生物工学科, ³ 小山高専物質工学科

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学研究科

Tel: 075-753-6115 Fax: 075-753-6128

E-mail: ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp

S-置換システインスルフォキシドは、主にネギ属植物に含まれる生物活性化合物である。本化合物は健康志向の高まりから需要が増大しつつあるが、従来の生産法は安定性や安全性に課題があるため、実用的な生産法が望まれている。本研究では、トリプトファンシンターゼと L-イソロイシンジオキシゲナーゼを共発現する大腸菌を構築し、菌体触媒として用いることで S-置換システインスルフォキシドを入手容易な基質からワンポットで合成するプロセスを構築した。本プロセスは、有用 S-置換システインスルフォキシド合成におけるプラットフォームとして活用でき、多様な S-置換システインスルフォキシドの用途開発につながることを期待できる。

1. はじめに

ニンニクやタマネギなどのネギ属植物には、古来よりその薬効が経験的に知られている。近年、その生物活性の多くが S-置換システインスルフォキシドやその誘導体に起因することが明らかになってきた。例えば、ニンニクに多く含まれている(+)-アリイン (S-アリルシステインスルフォキシド) は、ニンニクを特徴づけるフレーバーの前駆体であるだけでなく、抗糖尿病活性などの健康増進機能も有するため、産業上有用な化合物である。

従来、S-置換システインスルフォキシドの生産法として、植物からの抽出や化学合成が知られている。しかしながらこれらの製法は、それぞれ農作物が天候の影響を受けやすいため供給が不安定になりやすいこと、金属触媒や有機溶媒を多量に使用するため環境負荷の大きいことが課題である。そのため、より実用的な生産法が求められている。そこで本研究では、安定的かつ温和な反応条件で S-置換システインスルフォキシドを供給するバイオプロセスの開発を目指した。

2. 方法

大腸菌由来トリプトファンシンターゼ (TrpAB) はチオールと L-セリンから S-置換システイン合成を可能にする¹⁾。また、我々が見出した *Bacillus thuringiensis* 由来 L-イソロイシンジオキシゲナーゼ (IDO) は α-ケトグルタル酸依存的に S-置換システインの立体選択的スルフォキシド化を可能にする²⁾。そこで、TrpAB と IDO を組み合わせたワンポット反応により入手容易な基質から S-置換システインスルフォキシドが合成できると予想した(図 1)。

まず、*trpAB* と *ido* を共発現する大腸菌を触媒とした S-置換システインスルフォキシド合成系の構築に向け、アリルメルカプタン、L-セリン、α-ケトグルタル酸を基質とした(+)-アリインの合成を検討した。続いて分解酵素の不活性化により、(+)-アリイン収量の向上を検討した。さらに、アリルメルカプタンに代えて様々なチオールを反応系に供し、多様な S-置換システインスルフォキシドの合成を試みた。

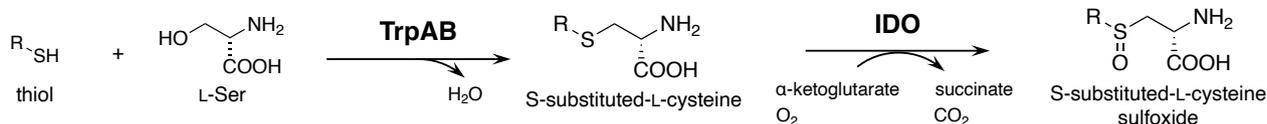


図 1 TrpAB と IDO による S-置換システインスルフォキシド合成プロセス。

3. 結果と考察

3.1 共発現菌体による(+)-アリイン合成反応系の構築

基質として各 100 mM アリルメルカプタン、L-セリン、および α -ケトグルタル酸、ならびに触媒として TrpAB と IDO を共発現させた大腸菌を用いた休止菌体反応を行い、反応溶液を HPLC で分析したところ、(+)-アリインが立体選択的に生成した (図2)。この結果は、TrpAB と IDO のワンポット反応が S-置換システインスルフォキシドの合成に有効であることを示す。しかし、(+)-アリインの収量は最大 7.2 mM にとどまった。

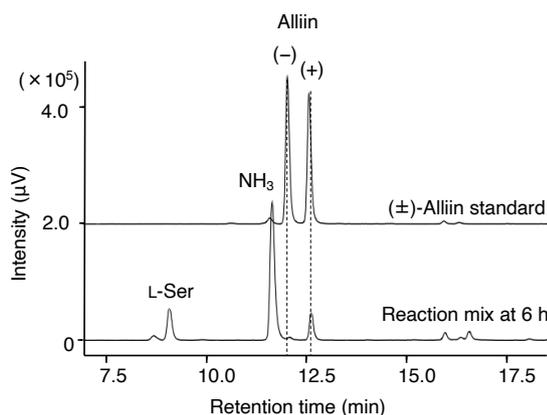


図2. TrpAB と IDO を共発現させた大腸菌を用いた反応液の HPLC クロマトグラム.

3.2 宿主内在性トリプトファンナーゼ遺伝子の破壊と触媒量の検討

上記(+)-アリイン収量の課題は、ワンポット反応の中間体である S-アリルシステインが宿主内在性トリプトファンナーゼ (TnaA) により分解されたためと予想した³⁾。そこで、*tnaA* 破壊株を宿主としてワンポット反応に用いたところ、13 mM の (+)-アリインを得ることができた。さらに、反応に用いる菌体量を増加させることで (+)-alliin 収量は最大 60 mM (10 g/L) にまで向上した。

3.3 多様な S-置換システインスルフォキシド合成

構築した反応系に対し、アリルメルカプタンの代わりに様々なチオールを適用し TLC、HPLC、LC-MS 分析を行った。その結果、直鎖チオールだけでなく、分岐鎖チオール、芳香環をもつチオールから対応する S-置換システインスルフォキシドが合成できた。具体的には、(+)-メチン、(+)-エチンなど植物に含まれる天然物や、S-フェニルシステインスルフォキシドなど非天然物も合成可能であった (図3)。

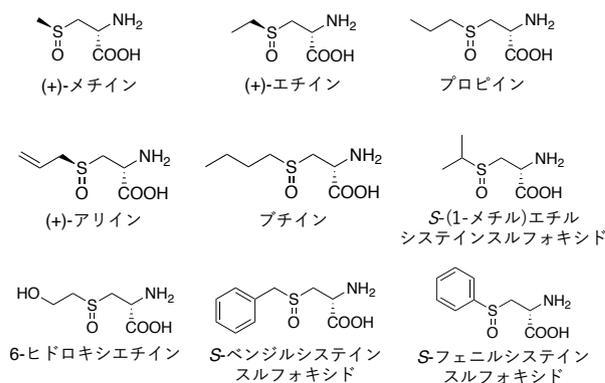


図3. 合成可能な S-置換システインスルフォキシド

4. 今後の展望

本研究では、S-置換システインスルフォキシドを微生物酵素により合成できることを示した。本反応系を用いることで、植物に含まれる有用 S-置換システインスルフォキシドの効率的な生産が可能となり、医薬品、食品などへの展開が期待される。また、機能が未評価な S-置換システインスルフォキシドの用途開発の契機となることも予想される。今後、より高効率な酵素の選抜や反応条件の最適化によって、生産性の向上を目指す。

謝 辞

この成果の一部は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) (P20011) および官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) の助成事業の結果得られたものです。また、本研究は科研費 (19K05794) および JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム (JPMJSP2110) の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Esaki, N., Tanaka, T., Miles, E. W., and Soda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **47** 2861–2864 (1983).
- 2) Hibi, M., Kawashima, T., Yajima, H., Smirnov, S. V., Kodera, T., Sugiyama, M., Shimizu, S., Yokozeki, K., and Ogawa, J.: *Tetrahedron Asymmetry*, **24** 990–994 (2013).
- 3) Mizutani, T., Hara, R., Iihoshi, T., Kozono, S., Takeuchi, M., Hibi, M., Takahashi, S., Ueda, M., and Ogawa, J.: *J. Biosci. Bioeng.*, in press. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.06.001

化学酵素的アミド結合形成反応を利用した ポリアミド合成への展開

鈴木 達也¹・唐鎌 翔大¹・鈴木 伸²・木野 邦器^{1, 2*}

¹早稲田大学大学院先進理工学研究科, ²早稲田大学理工学術院総合研究所

〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 早稲田大学大学院先進理工学研究科

Tel: 03-5286-3211 E-mail: kkino@waseda.jp

アミド化合物は医薬品や機能性素材など幅広い用途に利用される有用化合物である。我々はアデニル化酵素を利用した革新的な化学酵素的アミド結合形成反応を開発しており、キラリティを制御したジペプチドをはじめ構造多岐にわたる様々なアミド化合物の合成に成功している。本研究では、当該技術をさらに拡張させて、機能性素材として工業的利用が期待される多様なポリアミド化合物の合成法への展開可能性を検証した。最初に、アデニル化されるカルボキシ基とその部位への求核置換反応を担うアミノ基の両方を有するアミノ酸を当該アミド結合形成反応の基質とすることで、オリゴペプチド合成やポリアミノ酸合成が可能であることを明らかにした。さらに、当該反応が酵素・基質・求核剤の自由な組み合わせにより多様なアミド化合物の合成が可能であることから、クリック反応との連携によるポリアミドの合成法を検討した。クリック反応に必要な反応部位を両末端に有する二官能性のアミド化合物を当該反応を用いて調製し、クリック反応を試みたところ、そのアミド化合物をモノマー単位とするオリゴマーの合成を確認することができ、ポリアミド合成展開への可能性を見出した。本手法により、合成可能なポリアミドの多様性がさらに拡張され、新たな機能性高分子素材の開発の道を切り拓く有力な手段になり得ると期待できる。

1. はじめに

アミド化合物は優れた物理化学的特性や生理活性を有するため、医薬品や機能性化学品、健康食品など幅広い用途への利用展開が期待されている。我々はキラリティ制御が可能な化学酵素的アミド結合形成反応法を開発しており、D-, L-アミノ酸や非天然アミノ酸を任意に含むジペプチドをはじめ構造多岐にわたる様々なアミド化合物の合成に成功している¹⁾。化学酵素的アミド結合形成反応は、アデニル化酵素あるいはアデニル化活性を有するタンパク質による基質のカルボキシ基のアデニル化による活性化とそれに続く他基質のアミノ基による求核置換反応、すなわち、酵素反応と化学反応の組み合わせによりアミド結合が形成される(図1)。本反応の最大の特徴は、求核置換反応が化学的に進行するため、求核剤はアミノ酸やそのキラリティに制限されず求核活性を有する任意のアミンを連結させることができ、多様なアミド化合物の合成が可能となっている点である。

本研究では、機能性素材として工業的利用が期待さ

れるポリアミド化合物の多様な合成法の開発を目的に、当該技術のさらなる拡張可能性を検証した。

← Enzymatic adenylation → Nucleophilic substitution →

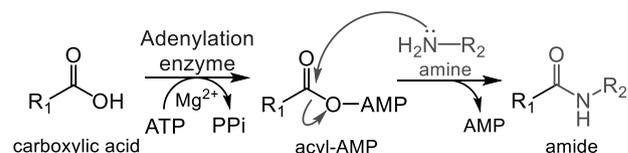


図1. 化学酵素的アミド結合形成によるアミド合成

2. 材料と方法

ペプチド性抗生物質であるチロシジンを産生する *Brevibacillus parabrevis* IAM1031 のチロシジン合成を担う NRPS 由来アデニル化ドメインの一つである TycA-A, グラム陽性細菌のペプチドグリカン合成に関わる酸-チオール結合酵素で cystein を C 末端とするジペプチド合成活性を有する *Bacillus subtilis* 168 由来 DltA, 脂肪酸類を認識する *Mycobacterium smegmatis*

mc² 155 由来 FadD26 をコードする遺伝子を His-tag 付加型タンパク質として大腸菌で高発現させ、取得・精製したものをアデニル化酵素として使用した。

3. 結果と考察

(1) アデニル化酵素を利用したポリアミノ酸合成

化学酵素的アミド結合形成反応の特性を踏まえ、アデニル化されるカルボキシ基と求核攻撃を行うアミノ基を有する化合物を基質とすれば、ホモポリアミドの合成が可能と考えた(図2)。そこで、TycA-Aの基質となる8種類のアミノ酸のL-, D-体を単独基質として反応を行った。LC-MS分析にて解析した結果、何れのアミノ酸においてもオリゴマーの生成を確認し、表1に示す鎖長のホモポリアミノ酸に相当するピークを検出した。本結果は、図2のスキームで合成が進行したことを示唆するものであり、鎖長に課題はあるが、ポリアミノ酸合成への可能性を明らかにすることができた。

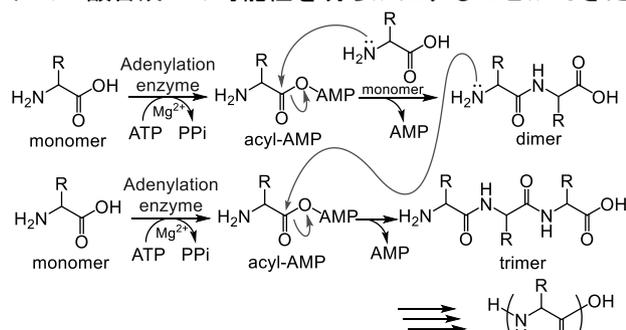


図2. 本技術による推定ポリアミノ酸合成スキーム

表1. TycA-A を利用したポリアミノ酸合成

Substrate	Length	Substrate	Length
	L-Ala 2~9 mer		L-Met 2~6 mer
	D-Ala 2~9 mer		D-Met 2~6 mer
	L-Val 2~6 mer		L-Phe 2~4 mer
	D-Val 2~6 mer		D-Phe 2~4 mer
	L-Leu 2~6 mer		L-Trp 2~4 mer
	D-Leu 2~5 mer		D-Trp 2~4 mer
	L-Ile 2~5 mer		L-Tyr 2~5 mer
	D-Ile 2~6 mer		D-Tyr 2~5 mer

(2) クリック反応との連携によるポリアミド合成

クリック反応とは2つのパーツを高い反応性と選択性で結合する反応である²⁾。一方、化学酵素的アミド結合形成反応は酵素・基質・求核剤の自由な組み合わせにより多様なアミド化合物の合成が可能である。そこで、アデニル化酵素を利用して両末端にクリック反応に必要な反応部位を有する二官能性アミド化合物を

合成後、クリック反応による重合化で多様なポリアミドが合成可能であると着想した(図3)。

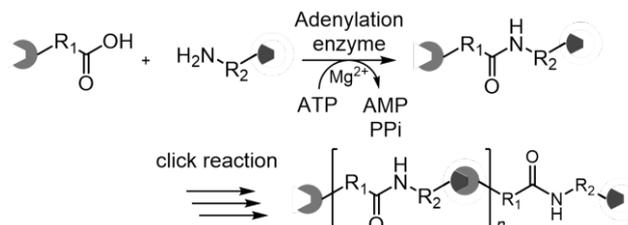
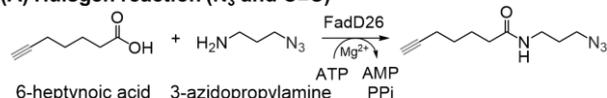


図3. クリック反応との連携によるポリアミド合成

FadD26 をアデニル化酵素とし、基質および求核剤に6-heptynoic acid 及び3-azidopropylamine を用いてクリック反応の一種であるHuisgen反応の反応部位N₃およびC≡Cを有するアミド化合物の合成を(図4A)、また、DltAを用いてD-Cys およびallylamine を反応させてThiol-ene反応の反応部位SHおよびC=Cを有するアミド化合物の合成を検討したところ、何れの場合も目的のアミド化合物の合成を確認することができた(図4B)。そこで、N₃およびC≡Cを有するアミド化合物を含む反応液にCu(I)触媒を添加してHuisgen反応による重合化を試みたところ、予想したオリゴマー(2~3量体)の合成を確認し、クリック反応との連携によるポリアミド合成への展開の可能性を見出すことができた。

(A) Huisgen reaction (N₃ and C≡C)



(B) Thiol-ene reaction (SH and C=C)

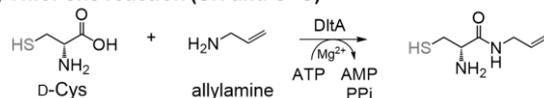


図4. アデニル化酵素を利用したクリック反応の基質となる二官能性アミド化合物の合成

4. 今後の展望

本研究では、化学酵素的アミド結合形成反応のポリアミノ酸合成への展開の可能性やクリック反応との連携によるポリアミド合成への展開の可能性を見出した。本手法は、酵素や基質の自由な組み合わせにより多様なポリアミドの合成への展開を可能とするものであり、新たな機能性高分子素材の開発の道を切り拓く有力な手段となり得ると考えている。

文献

- 1) 木野邦器, 鈴木伸, 原良太郎: 生化学, **93**(3), 338-348(2021).
- 2) Hartmuth G. Kolb, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**(11), 2004-2021 (2001).

オーバーラップオペロン構造を用いた 複数タンパク質の同時高発現

西岡 優佑¹・Wolf Ruslana²・星田 尚司¹・赤田 倫治^{1*}

¹山口大学大学院創成科学研究科, ²Berlin University of Applied Sciences and Technology
〒755-8611 宇部市常盤台 2-16-1 山口大学大学院創成科学研究科
Tel: 0836-85-9292 Fax: 0836-85-9201
E-mail: rinji@yamaguchi-u.ac.jp

有用タンパク質の多くは大腸菌を用いて生産されている。通常、大腸菌にクローニングして発現させる組換えタンパク質は 1 種類である。もし、複数のタンパク質を 1 つのプラスミドから同時に高発現できれば、タンパク質生産が効率的になる。2 つ以上のタンパク質を同時に高発現させる手段として大腸菌のオペロン構造を用いることが考えられるが、その報告例は少ない。これまでに、オペロン構造には上流遺伝子の終止コドンから下流に開始コドンがある場合に加えて、上流遺伝子の終止コドンの上流に開始コドンが存在することが知られている。このような遺伝子と遺伝子が重なっている構造をオーバーラップオペロン構造と名付け、上流遺伝子の終止コドンの 3 塩基目を起点として、下流遺伝子の開始コドンの A までの距離を数字で表すことにした。例えば大腸菌 MG1655 のゲノムには、0 である-TGATG-は 163 個、-3 である-ATGA-は 258 個と多く存在している。しかし、-4, -5, -6 はほとんどなく、-7 は 60 個、-8, -9 もほとんどないが、-10 は 34 個と、3 塩基毎に多くなるオーバーラップパターンが見られた。さらに、他の細菌や古細菌でも同様のパターンが存在した。このオーバーラップオペロン構造のパターンとタンパク質発現には関係があると考え、*srIA* プロモーターを用いて上流遺伝子として eEmRFP、下流遺伝子として *leuB* を用いて、オーバーラップオペロン構造を設計し、タンパク質を発現させた。結果は、0, -3 のオーバーラップオペロン構造では上流の eEmRFP は高発現し、下流の *leuB* は低発現となったが、-7, -10, -13, -16, -19 のオペロン構造においては、eEmRFP と *leuB* の 2 つが同時に高発現した。このことにより、-7 以上の 3 塩基毎のオーバーラップオペロン構造は 2 つのタンパク質の同時高発現が可能となり、オーバーラップの距離によって下流側のタンパク質の発現量が変化することが示された。

1. はじめに

原核生物のゲノム上では、1 つのプロモーターで 2 つ以上の遺伝子を同時に発現させるオペロン構造が主となっている。このオペロン構造を利用したタンパク質発現が報告されているが、上流遺伝子と比べて下流遺伝子の発現が低い結果となっていた¹⁾。我々は、まず、大腸菌 MG1655 株に存在するオペロン構造を調べた。オペロン構造には、遺伝子と遺伝子が離れたオペロン構造に加えて、遺伝子と遺伝子が重なったオーバーラップオペロン構造が知られている²⁾。我々はオーバーラップオペロン構造の存在量にパターンがあること、このオーバーラップオペロン構造パターンは大腸菌以外

の原核生物にも同様に存在することを見つけた。さらに、このオーバーラップオペロン構造パターンとタンパク質発現量の関係性を調べた。

2. 実験方法

まず、大腸菌 MG1655 株のゲノム上に存在するオペロン構造を上流遺伝子の終止コドンの 3 塩基目から下流遺伝子の開始コドンの 1 塩基目までの距離として遺伝子間の長さを表現することにした。

次に、大腸菌 HB101 を宿主にして、ソルビトールで高発現する *srIA* プロモーター³⁾を用いて上流遺伝子として赤色蛍光タンパク質 eEmRFP、下流遺伝子としてロ

イシン合成酵素を発現する *leuB* を用いて、オーバーラップオペロン構造を設計し、ソルビトール存在下でタンパク質を発現させ、SDS-PAGE でタンパク質の発現量を調べた。

3. 結果と考察

大腸菌 MG1655 のゲノム上のオペロン構造を調べた結果、上流遺伝子の終止コドンの3塩基目から下流遺伝子の開始コドンの1塩基目までの距離ごとで存在量が異なっている事が分かった (図 1)。オーバーラップした -3 が一番多く、次に0, 次が -7, -10, -13, -16, -19 と3塩基毎に多くなるオーバーラップパターンが見られた。

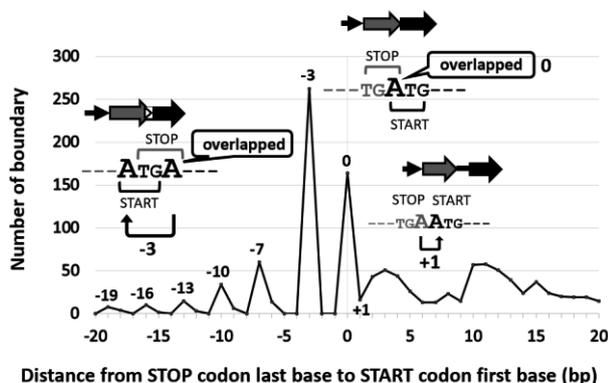


図 1. 大腸菌 MG1655 のオペロン構造における遺伝子と遺伝子の境界領域の長さ存在量

次に、大腸菌以外の 13 種類の原核生物についてゲノム上のオペロン構造を調べた結果、MG1655 株同様に 3 塩基毎のオーバーラップパターンが見られた。原核生物には、オーバーラップオペロン構造のパターンが存在していることが分かった。

オーバーラップオペロン構造のパターンとタンパク質発現の関係を知るため、上流 eEmRFP と下流 *leuB* の間を 0, -3, -7 から -19 までの 3 塩基毎のオーバーラップオペロン構造を設計し、タンパク質を発現させた (図 2)。結果は、0, -3 のオーバーラップオペロン構造では上流の eEmRFP は高発現し、下流の *leuB* は低発現となったが、-7, -10, -13, -16, -19 のオペロン構造においては、eEmRFP と *leuB* の 2 つが同時に高発現した。このことにより、-7 以上の 3 塩基毎のオーバーラップオペロン構造は 2 つのタンパク質の同時高発現が可能となり、オーバーラップの距離によって下流側のタンパク質の発現量が変化することが示された。

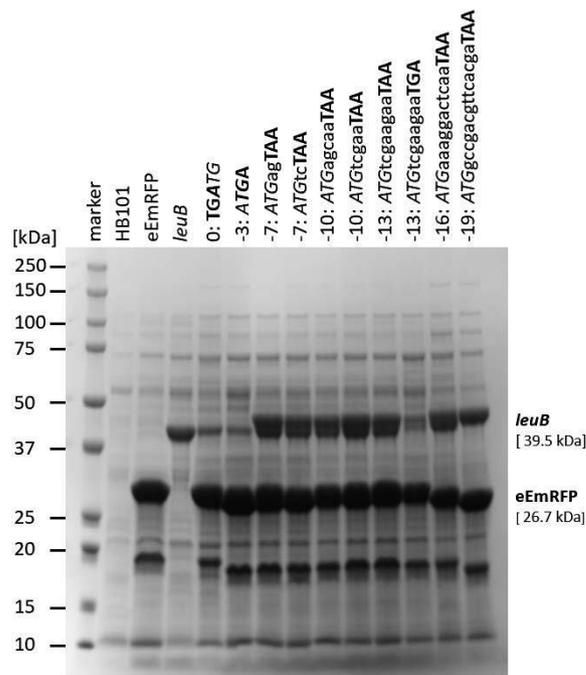


図 2. オーバーラップオペロン構造を用いたタンパク質発現

上流 eEmRFP の終止コドンを太字、下流 *leuB* の開始コドンを斜体で示した。

4. 今後の展望

本研究では、遺伝子と遺伝子が重なったオーバーラップオペロン構造を用いることで上流側と下流側の両方の遺伝子を同時高発現させることに成功し、また、遺伝子と遺伝子の重なり長さによって、下流遺伝子の発現量が変化することが分かった。現在は、遺伝子と遺伝子が離れたオペロン構造の仕組みについて解析を進めている。

5. 参考文献

- 1) Poulsen, C. *et al.*: *FEBS Lett.*, 584, 669–674, (2010)
- 2) Huber, M. *et al.*: *Nat Commun.*, 10, 4006, (2019)
- 3) Nakamura, M. *et al.*: *Mol Biotechnol*, 60, 912–923 (2018)

微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いた タンパク質高生産株スクリーニング法の開発

伊藤 良浩^{1,2*}・佐々木 隆一²・朝里 さやか²・北口 哲也³・上田 宏³

¹東京工業大学生命理工学院, ²味の素株式会社バイオ・ファイン研究所,

³東京工業大学化学生命科学研究所

〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社バイオ・ファイン研究所

Tel: 044-244-7162 Fax: 044-211-7832

E-mail: yoshihiro.ito45.p5c@asv.ajinomoto.com

近年, ゲノム編集及び長鎖 DNA 合成などの DNA 改変技術革新により, 有用タンパク質を高生産する微生物株樹立を目的とした大規模な遺伝子改変株ライブラリ構築が可能となっている. 一方で, 構築した膨大なライブラリの評価・解析がボトルネックとなっており, スループット性に優れたスクリーニング法の開発が望まれる. 本研究では, 微小ドロップレットを用いた微生物細胞培養と, 分泌タンパク質濃度に依存して蛍光強度が向上するバイオセンサー-Quenchbody を用いて, 蛍光強度を指標にしてハイスループットにタンパク質高生産株をスクリーニングする新規手法を開発した.

1. 背景

サイトカインや抗体を始めとするバイオ医薬品タンパク質の生産においては, 動物由来成分を含まない, 製造コストが安価であるといった利点から, 酵母、細菌などの微生物を用いた分泌発現が広く用いられている. 一般的にバイオ医薬品タンパク質を分泌生産する産業用微生物株は, プロテアーゼの欠失, 転写・翻訳系に関わる因子の強化などタンパク質生産に有用な遺伝子改変を多数導入することで樹立される. しかしながら, 一つずつ遺伝子改変を導入し, タンパク質生産における有効性を培養により評価するというサイクルを繰り返す One-by-One の従来手法では, 生産株の樹立に年単位の時間を要する. この課題に対して, 近年のゲノム編集技術や長鎖 DNA 合成技術などの技術革新により, 多数の遺伝子を同時に改変し, 10^6 を超える異なる遺伝形質を持った微生物細胞群から成る大規模な遺伝子改変株ライブラリの構築が可能となっており, 生産株樹立に要する期間の劇的な短縮が期待されている^{1), 2)}. 一方で, 膨大なライブラリを試験管等で培養評価することは現実的ではなく, 迅速かつ簡便なライブラリ評価を可能とするハイスループットなスクリーニング法の開発が望まれる.

本研究では, 多数の微生物細胞を同時に培養評価する手法として, ピコリットルサイズの微小なドロップ

レットである Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルジョンに微生物細胞をシングルセルとなるように封入し, エマルジョン内部で増殖, タンパク質を分泌生産するドロップレット培養技術に着目した³⁾. 次いで, エマルジョン内部で分泌されたタンパク質を測定する方法として, 抗原濃度依存的に蛍光強度が向上し, 洗浄や基質添加が不要という利点を持つ蛍光標識抗体 Quenchbody (Q-body) をバイオセンサーとして選定した⁴⁾. これらの要素技術を用いて, 蛍光強度を指標に多数の微生物細胞封入エマルジョンをセルソーターで選別し, バイオ医薬品タンパク質高生産株を迅速に取得可能とするスクリーニング法を開発した(図 1).

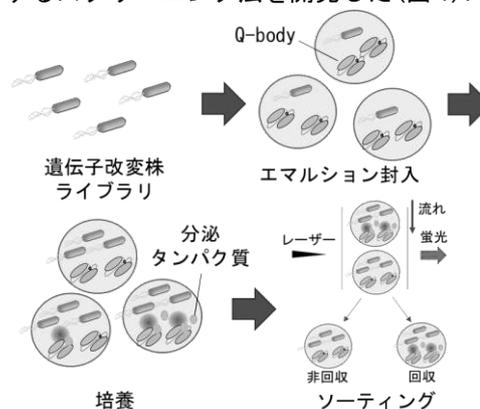


図 1. タンパク質高生産株スクリーニング法の概要

2. 実験材料と方法

(1) エマルジョン封入タンパク質の Q-body 検出

ヒト Bone Gla Protein(BGP)の C 末端 7 残基(BGP C7:RRFYGPV)を認識する蛍光色素 TAMRA 修飾 Anti BGP scFv Q-body をバイオセンサーとして用いた⁴⁾。モデルタンパク質としてヒト FGF9 を選択し、グラム陽性菌 *C. glutamicum* を宿主として、His6 タグ及び BGP C7 を融合した FGF9 を分泌発現し、Ni アフィニティ精製した。得られた FGF9-His6-BGP C7 を 3 段階の濃度 (0 nM, 30 nM, 3,000 nM) で Q-body とエマルジョンに封入し、セルソーターを用いて TAMRA 蛍光強度を測定した。

(2) エマルジョン内分泌タンパク質の Q-body 検出

C. glutamicum FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株、もしくはタンパク質非発現対照株を Q-body、培地と共に 1 細胞ずつエマルジョンに封入し、30 °C で 24 時間培養後、セルソーターを用いて TAMRA 蛍光強度を測定した。

(3) タンパク質生産株のエマルジョンソーティング

C. glutamicum 対照株、FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株を 50:1 の比率となるように混合し、Q-body 及び培地と共にエマルジョンにシングルセル封入、培養を行った後、セルソーターで高い蛍光強度を示すエマルジョンをソートした。ソート前後のエマルジョン由来コロニー各 20 個を発現ベクターのクローニングサイトにアニールするプライマーを用いて PCR し、対照株か FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株のいずれかを判別した。

3. 結果と考察

(1) エマルジョン封入タンパク質の Q-body 検出

Q-body を用いてエマルジョン内タンパク質濃度が測定可能か検討した。封入した FGF9-His6-BGP C7 濃度に比例した蛍光強度向上が認められ、Q-body の蛍光強度を指標としたエマルジョン内のタンパク質濃度測定が可能であることが示された(図 2)。

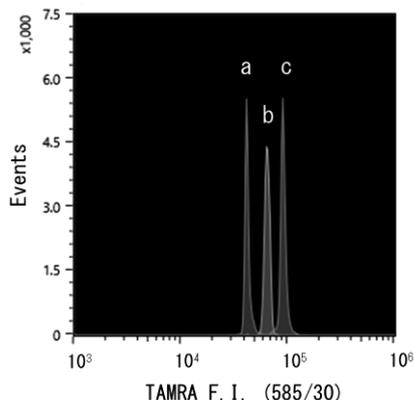


図 2. Q-body 及び FGF9-His6-BGP C7 封入エマルジョンのセルソーター解析
FGF9-His6-BGP C7 濃度: (a) 0 nM, (b) 30 nM, (c) 3,000 nM.

(2) エマルジョン内分泌タンパク質の Q-body 検出

エマルジョン内で培養を行った結果、FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株封入エマルジョンは、対照株に比べて高い蛍光強度を示し、エマルジョン内部で分泌された FGF9-His6-BGP C7 を Q-body で検出することに成功した(図 3)。

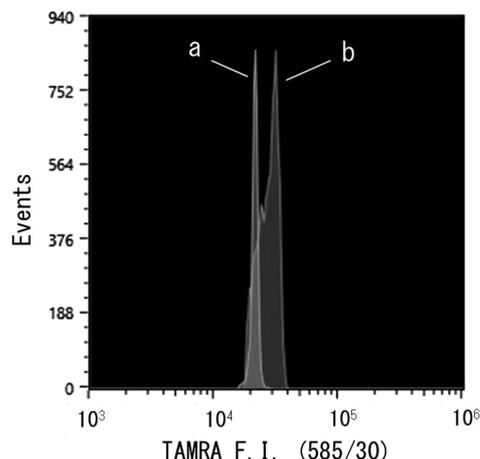


図 3. 培養後エマルジョンのセルソーター解析
(a) 対照株封入エマルジョン, (b) FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株封入エマルジョンの解析結果を示す。

(3) タンパク質生産株のエマルジョンソーティング

対照株と FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株をエマルジョン内で培養し、Q-body の蛍光強度を指標に選別可能か検討した。ソート前エマルジョン由来コロニーは全てが対照株であったが、ソート後エマルジョン由来コロニーは全て FGF9-His6-BGP C7 分泌発現株であり、ドロップレット培養でタンパク質生産株を選択的に回収する本スクリーニング法のコンセプト成立を確認した。

4. 今後の展望

今後は、本スクリーニング法を用いて遺伝子改変株ライブラリの評価を行い、バイオ医薬品タンパク質高生産株の取得検討を進める。

参考文献

- 1) Ronda, C., Pedersen, L., Sommer, M., Nielsen, A. *Sci. Rep.*, **6**, 19452 (2016).
- 2) Tsuge, K., Sato, Y., Kobayashi, Y., Gondo, M., Hasebe, M., Togashi, T., Tomita, M., Itaya, M. *Sci. Rep.*, **5**, 10655 (2015).
- 3) Kaminski, T., Scheler, O., Garstecki, P. *Lab Chip*, **16**, 2168-2187 (2016).
- 4) Abe, R., Ohashi, H., Iijima, I., Ihara, M., Takagi, H., Hoshika, T., Ueda, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17386-17394 (2011).

糖消費速度が変化した時のコリネ型細菌中央代謝酵素の量的変動

森下 風香¹・浜岸 麻衣²・松田 史生³・豊田 晃一⁴・

和田 大⁵・乾 将行⁴・横田 篤⁶・柘植 陽太^{1,7*}

¹金沢大学大学院自然科学研究科, ²金沢大学生命理工学類, ³大阪大学大学院情報科学研究科, ⁴RITE,

⁵摂南大学農学部, ⁶北海道大学大学院農学研究科, ⁷金沢大学新学術創成研究機構

〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学新学術創成研究機構

Tel: 076-234-4807

E-mail: ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

糖消費速度が変化した時に細胞内の中央代謝酵素の量がどのように変動するかを理解することは効率的な物質生産菌の作製に重要である。本研究ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌をモデルとして、定量プロテオミクス解析を用いてこの問題に取り組んだ。その結果、グルコース消費速度の変化に伴い、中央代謝酵素の量は大規模に変動し、そのうち 6 種類の酵素のタンパク質レベルがグルコース消費速度に相関して変動することを明らかにした。

1. はじめに

微生物を用いた有用物質生産では速い糖消費速度が必要である。糖消費速度の向上は代謝遺伝子や制御因子の高発現、変異導入などにより試みられているが、細胞当たりの糖消費速度が変化することで、中央代謝酵素の量がどのように変動するのかは不明な点が多い。

タンパク質の量的解析にはこれまでウエスタンブロットティングや二次元電気泳動といった手法が用いられてきた。これらの手法は精度は高いものの、多数タンパク質の同時定量に難点があった。近年、質量分析技術の発展により、細胞内のタンパク質を網羅的に測定するプロテオミクス技術が開発されてきた。また、プロテオミクスの中でも定量性や再現性を向上させた定量プロテオミクス（ターゲットプロテオミクス）解析も確立され、細胞内の特定のタンパク質群の解析に利用されている¹⁾。

本研究では定量プロテオミクス解析を用いて、アミノ酸生産菌であるコリネ型細菌におけるグルコース消費速度の変化に伴う中央代謝酵素の量的変動を解析することを目的とした。

2. 実験手法

コリネ型細菌の野生株として ATCC 13032 株 (WT)

を用いた。一細胞当たりのグルコース消費速度が増加する株として ATPase の構成遺伝子である *atpG* 遺伝子に一塩基置換を施した株 (*atpG*^{617c}) を使用した²⁾。グルコース消費速度が減少する株としてグルコースの取り込みに関わるホスホトランスフェラーゼシステム遺伝子 (*ptsG*) の欠損株を使用した。

3 株を合成培地に植菌し、30°C で培養して分光光度計を用いて細胞濁度 (OD₆₀₀) を測定した。グルコース濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。定量プロテオミクス解析のために ¹³C グルコース (U-¹³C6) を単一炭素源として培養し、対数増殖期で回収した菌体を使用した。菌体は破碎し、タンパク質を抽出した後、トリプシン消化し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) で分析した。

3. 結果と考察

はじめに WT 株, *atpG* 変異株, *ptsG* 欠損株における単位菌体量当たりのグルコース消費速度を調べたところ、WT 株に比べて *atpG* 変異株は 125% 増加し、*ptsG* 欠損株は 79% 低下した。

次に 3 株について定量プロテオミクスを行い、中央代謝経路 (解糖系, ペントースリン酸経路, TCA サイクル) の酵素量を調べた。図 1 に WT 株における酵素量を 1.0 とした *ptsG* 欠損株の酵素量を示す。8 酵素の量が WT 株に比べて 1.5 倍以上に増加した。そのうち

6 酵素がペントースリン酸経路の酵素であり、グルコース消費速度が低下するとペントースリン酸経路が活性化することが示唆された。

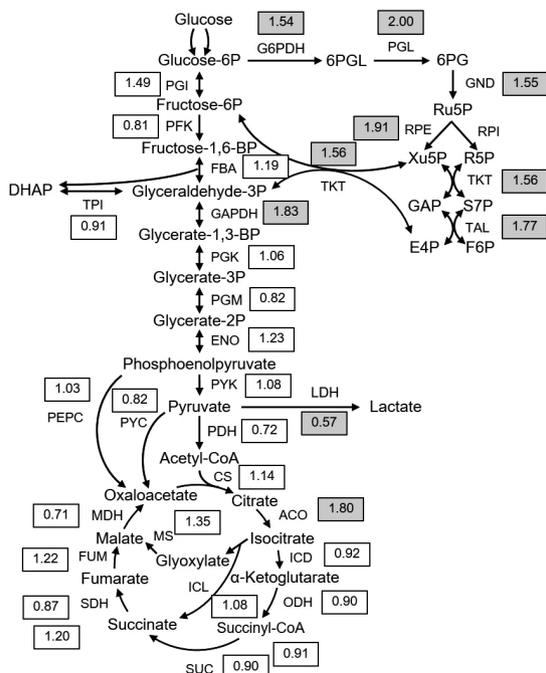


図 1. 糖消費速度の低下に伴う中央代謝酵素の変動

次に図 2 に WT 株における酵素量を 1.0 とした *atpG* 変異体の酵素量を示す. 13 酵素の量が WT 株に比べて 1.5 倍以上に増加した. そのうち 6 酵素が解糖系, 4 遺伝子が TCA 回路の酵素であった.

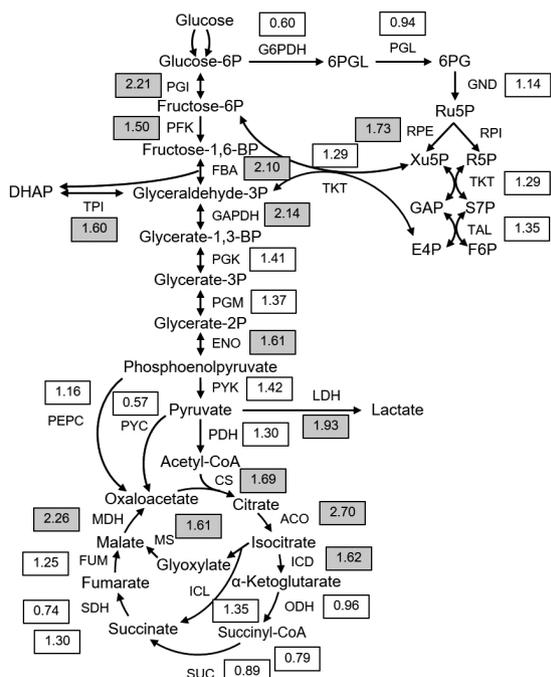


図 2. 糖消費速度の増加に伴う中央代謝酵素の変動

多くの解糖系, TCA サイクルの酵素量が増加した一方, ペントースリン酸経路の初発酵素であるグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) の量は 40% 減少した. これらの結果から, グルコース消費速度が増加した場合は, ペントースリン酸経路の流速を落として, 解糖系と TCA サイクルに炭素を誘導するように中央代謝経路の酵素量が変動したと考えられた. 二次元電気泳動を用いた先行研究では *C. glutamicum* ATCC 14067 株の H⁺-ATPase 活性を低下させると解糖系と TCA サイクルにおける多くの酵素のタンパク質レベルが増加すると報告されており³⁾, 本研究では ATCC 13032 をベースとした株でも同様の結果が得られた.

以上の結果をもとに酵素量がグルコース消費速度に比例して変動した酵素を調べたところ, ホスホフルクトキナーゼ (PFK), ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGM), ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) の E1 サブユニット, 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH), リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH), G6PDH の 6 種類が見出された (図 3).

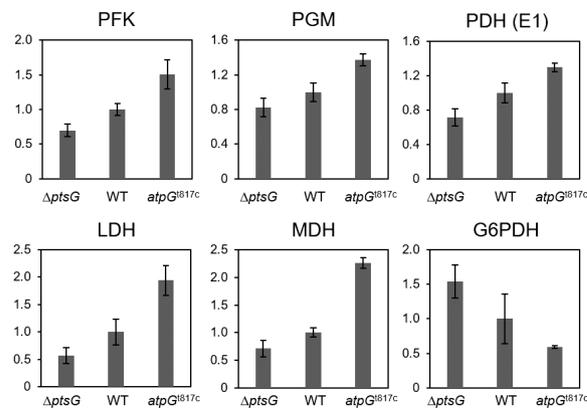


図 3. グルコース消費速度に比例して酵素量が変動する中央代謝酵素

以上により, 中央代謝酵素の量は細胞当たりのグルコース消費速度の変化に伴って, 大きく変動することが明らかになった. 今後はこの大規模なタンパク質レベルの変動が何をセンサーとして引き起こされるのかについてメカニズムの解明を目指す.

4. 参考文献

- 1) Matsuda F, et al., *PLoS One*, **12**, e0172742, 2017
- 2) Sawada K, et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 467–473, 2012
- 3) Li L, et al., *Proteomics*, **7**, 3348–3357, 2007

膜脂質組成改変によるマグネトソーム上の膜受容体の活性制御

森本 啓太・巴 瞭斗・脇 駿也・田中 剛・吉野 知子*

東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻

〒184-8588 小金井市中町 2-24-16

Tel: 81-42-388-7021 Fax: 81-42-385-7713

E-mail: y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* は細胞内にリン脂質膜で被覆された磁気微粒子 (マグネトソーム) を生合成する。我々は、マグネトソーム膜上にヒト細胞由来の膜受容体を発現させることで、創薬研究への応用を目指している。しかし、マグネトソーム膜上に発現させた膜受容体の活性が低下することが明らかとなり、原因の一つとしてヒト細胞とマグネトソームの膜脂質組成の違いがあげられる。そこで、本研究ではヒト細胞膜に豊富に存在するホスファチジルコリン (PC) とコレステロールを導入することでマグネトソームの膜脂質組成改変を行い、膜受容体の 1 種であるトロポミオシン受容体キナーゼ A (TrkA) 活性への影響を評価した。結果として、膜脂質組成改変により TrkA の比活性が向上することが示され、本手法を用いることでマグネトソームの実用化が期待される。

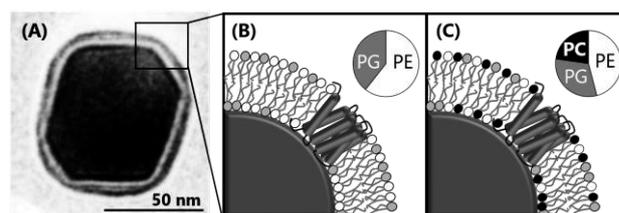
1. はじめに

磁性細菌は細胞の中でナノサイズの磁気微粒子 (マグネトソーム) を合成する細菌である。マグネトソームは、酸化鉄 (Fe_3O_4) の結晶から成る強磁性体であり、その表面は脂質とタンパク質を主な構成成分とする薄膜で覆われている (図 1A)。このような磁気微粒子は水中で高い分散性を示す一方で、磁石を近づけることで容易かつ迅速に回収することが可能である。また、粒子サイズが均一であることや生体膜に被覆されているなどの特徴を有することから、人工合成された磁気微粒子と比較して生体適合性が高く、ドラッグデリバリーや MRI の造影剤、磁気温熱治療等、様々な医療分野への応用が期待されている¹⁾。我々は、マグネトソーム膜上に創薬ターゲットであるヒト細胞由来の膜受容体を発現させることに成功しており、マグネトソームを膜受容体の優れた固定化担体として用いることで、ドラッグスクリーニングへの応用を試みている。

これまでに、マグネトソーム膜上に 7 回膜貫通型の受容体である甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR)²⁾ や 1 回膜貫通型のトロポミオシン受容体キナーゼ A (TrkA)³⁾ を発現させている。しかし、ヒト細胞膜上の受容体活性と比較して、マグネトソーム上での膜受容体のリガンド結合能が低下することが明らかとなっている。原因の一つとして、ヒト細胞とマグネトソームの膜脂質組成の違いがあげられる。そこでヒト細胞膜に

豊富に含まれ、かつマグネトソーム膜に存在しない脂質であるホスファチジルコリン (PC) の導入を試みた (図 1B,C)。その結果、PC を含有するマグネトソームの作製に成功し、さらに PC の導入によりマグネトソーム膜上に発現させた TSHR のリガンド結合能が向上することが示された²⁾。

本研究では PC に加え、ヒト細胞膜の主要な脂質であるコレステロールをマグネトソーム膜へ導入する手法を確立した。さらに、PC およびコレステロール導入により膜脂質組成を改変し、膜受容体の 1 種である TrkA の活性制御を試みた。



PE : phosphatidylethanolamine

PG : phosphatidylglycerol

図 1. マグネトソーム表面の膜脂質および膜受容体の局在様式

(A) マグネトソームの TEM 画像

(B) 野生株由来のマグネトソーム膜

(C) PC 合成株由来のマグネトソーム膜

2. 材料・方法

膜受容体である TrkA 遺伝子または TrkA および PC 合成酵素である phosphatidylcholine synthase (PCS) 遺伝子を含むプラスミドを電ポレーション法により *M. magneticum* 野生株に導入し、TrkA 株と TrkA-PCS 株を獲得した。得られた形質転換株を培養した後、破碎操作を行い、磁気回収を行うことで各マグネトソーム (TrkA-MNPs、TrkA-PCS-MNPs) を得た。コレステロール導入担体として、Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) を用い、マグネトソームに対して M β CD-cholesterol 溶液を添加し、30 分間振盪することでコレステロールを導入したマグネトソーム (TrkA-chol-MNPs、TrkA-PCS-chol-MNPs) を獲得した (図 2)。4 種類のマグネトソームに対して膜脂質組成解析および TrkA の発現確認を行った。また、TrkA の機能解析を行うことで、膜脂質組成変化による膜受容体活性への影響評価を行った。

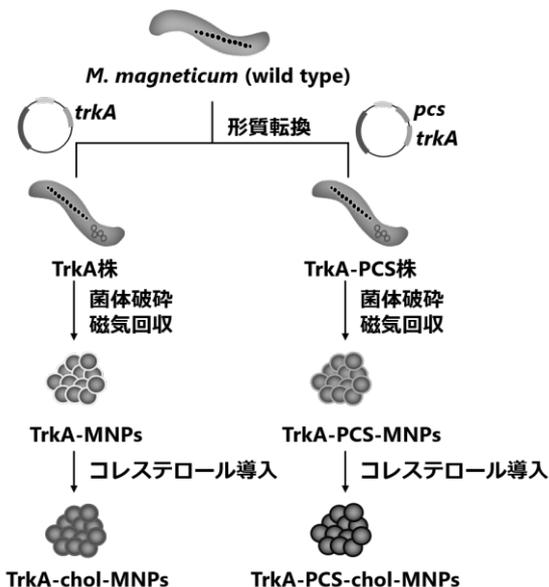


図 2. 膜脂質組成の異なる各マグネトソームの作製プロトコル

3. 結果と考察

脂質組成解析の結果、PC 合成遺伝子の導入によりマグネトソーム膜上で総リン脂質の約 23.0% にあたる PC が合成されることが示された。また、コレステロール導入を行うことで得られた TrkA-chol-MNPs および TrkA-PCS-chol-MNPs において 5.0、5.7 μ g/mg-MNPs のコレステロール導入が確認された。さらに、これらのマグネトソーム膜上には同等量の TrkA が発現していることが示された。

続いて TrkA のリガンドである神経成長因子 (NGF) を用いてリガンド結合試験を行った結果、全マグネトソームにおいてリガンド濃度依存的に NGF との結合

量が増加した (図 3)。4 種類のマグネトソームにおいてリガンドとの親和性を表す K_d 値は同等であったが、一方で膜脂質組成変化により粒子当たりの NGF 結合量が増大することが示され、TrkA の比活性が向上することが示唆された。

そこで、TrkA の自己リン酸化能およびキナーゼ活性を評価した結果、両試験において TrkA-PCS-chol-MNPs が最も高い活性を示し、TrkA-PCS-MNPs、TrkA-chol-MNPs、TrkA-MNPs の順に活性が高いことが示された。この結果から、比活性の向上に伴い、リガンド結合能以外の受容体活性も向上することが示唆された。

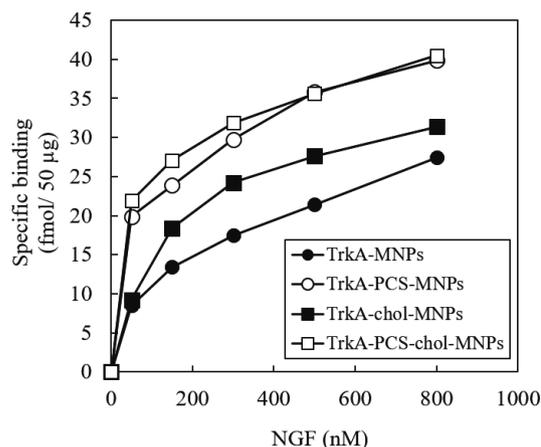


図 3. 脂質組成が異なるマグネトソーム膜上に発現させた TrkA の NGF との結合能評価

4. 今後の展望

本研究では、ヒト細胞膜に豊富に存在する PC とコレステロールの導入により、膜受容体の一種である TrkA の活性を制御可能であることを示した。この結果は、ヒト細胞膜の模倣がマグネトソーム膜上の受容体活性の向上に有効であるという我々の仮説をより一層強固にするものである。膜受容体の機能は脂質膜の組成により大きく変化することが報告されており、膜環境を自在に設計できる簡易・汎用化した脂質膜 - 膜受容体の調整は、創薬探索における革新的なツールとなりうる。我々は PC 合成量やコレステロール導入量の制御にも成功しており、発現させたい膜受容体ごとに最適な脂質膜環境を提供することが可能であると考えている。今後、マグネトソーム上の膜脂質組成の改変技術を強化し、膜受容体と脂質組成との関連性の包括的な理解に繋げていく。

5. 参考文献

- [1] Yan, L., et al.: *Microbiol. Res.*, **203**, 19-28 (2017)
- [2] Yoshino, T., et al.: *Metab. Eng.*, **67**, 125-132 (2021)
- [3] Honda, T., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1472-1476 (2015)

酵母による高効率 D-乳酸生産を目指した機械学習モデルの構築

山本 祥輝・山田 亮祐*・松本 拓也・荻野 博康

大阪公立大学大学院工学研究科

〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1 大阪公立大学大学院工学研究科

Tel: 072-254-9504

E-mail: ryamada@omu.ac.jp

種々の環境問題を背景に、生分解性プラスチックへの関心が高まっており、高純度な D-乳酸の生産技術の確立が必要とされている。既往の研究において、酵母に D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を発現させ、解糖系の 12 種類の酵素遺伝子の発現量を改変することで、高い D-乳酸生産性を示す事が報告されている。しかし、D-乳酸を生産するための計 13 種類の酵素遺伝子の発現量比は多様であり、発現量比を最適化し、より高い D-乳酸生産性を実現することは困難である。本研究では遺伝子発現量と D-乳酸生産量に関するデータを取得し、そのデータを基に、遺伝子の発現量から D-乳酸生産性を予測する機械学習モデルを構築した。構築した機械学習モデルを用いることで、13 種類の酵素遺伝子の発現量から D-乳酸生産性を予測することに成功した。また、解糖系酵素遺伝子である *PFK1* と *ENO2* の発現量が D-乳酸生産性に特に大きな影響を与えることが示唆された。

1. はじめに

遺伝子組換え技術などを用いて生物の細胞内代謝を改変する代謝工学の発展に伴い、微生物により種々の有用物質を生産する研究が盛んに行われている。特に、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は安全な微生物であり産業規模での培養技術が確立されており、D-乳酸などの様々な有用物質の生産への応用が期待されている。

既往の研究において、D-乳酸デヒドロゲナーゼ (D-LDH) および 12 種類の解糖系酵素の発現量を多様に変化させた酵母ライブラリーを作製し、そのライブラリーから高効率に D-乳酸を生産する酵母 YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 株が選抜された¹⁾。しかし、作製された各株の各代謝酵素発現量と D-乳酸生産性との関係は明らかとなっていない。もしこの関係を明らかにできれば、さらなる D-乳酸生産性の向上や、解糖系を経由する他の様々な有用物質の高効率生産への応用が期待できる。しかし、作製した酵母ライブラリー中の各株の各代謝酵素発現量と D-乳酸生産性との関係を網羅的に検証することは極めて困難である。

機械学習では、限られた数の既知のデータから機械学習モデルを作製し、未知のデータを予測することが期待できる。例えば、生物化学工学の分野では、微生物による β -カロテン生産における最適な遺伝子発現

量の予測²⁾や、酵母によるバイオエタノール生産における、発酵阻害物の影響予測³⁾などに利用されている。

本研究では、まず、様々な解糖系酵素遺伝子および D-LDH の発現量を有する酵母ライブラリーを作製し、各株の遺伝子発現量と D-乳酸生産性を測定した。次に、取得したデータを基に機械学習モデルを作製し、高効率な D-乳酸生産を実現するための最適な遺伝子発現量を予測した。

2. 材料と方法

(1) 宿主およびプラスミド

宿主は、エタノール生産を抑制した酵母 *S. cerevisiae* YPH499/dPdA⁴⁾ 株を用いた。また、プラスミドは、D-LDH 発現プラスミドおよび解糖系改変プラスミド¹⁾を用いた。

(2) 培養および培地

酵母の培養は、96 deep well で 30°C、1500 rpm、16 時間行った。培地には SCD 培地 (20 g/L Glucose、6.7 g/L Yeast nitrogen base、2.0 g/L Synthetic complete mixture drop-out) と YPD 培地 (20 g/L Glucose、10 g/L Yeast extract、20 g/L Peptone) を使用した。

(3) D-乳酸濃度・解糖系酵素発現量の測定

培養液上清の D-乳酸濃度は D-Lactate assay kit を用いて測定した。また、D-LDH および解糖系酵素遺伝

子の発現量はリアルタイム PCR 法により測定した。

(4) 機械学習モデルの構築

(3) において取得したデータを用い、Python により機械学習モデルを作製した。なお機械学習モデルを作製する際には、13 種類の遺伝子発現量を入力値、D-乳酸生産性を出力値とした。また、予測精度は実測値と予測値を用いて算出した決定係数の値で評価した。

3. 結果と考察

(1) D-LDH 発現酵母の作製

YPH499/dPdA 株を、D-LDH 発現プラスミドで形質転換することで D-LDH 発現酵母 YPH499/dPdA/DLDH/A5 株を作製した。作製した YPH499/dPdA/DLDH/A5 株の 16 時間培養後の D-乳酸濃度は 2.96 g/L であった。

(2) D-LDH 発現・解糖系改変酵母ライブラリーの評価

YPH499/dPdA/DLDH/A5 株を解糖系改変プラスミドで形質転換して D-LDH 発現・解糖系改変酵母ライブラリーを作製し、形質転換体 576 株の 16 時間培養後の D-乳酸生産量を測定した (図 1)。最も高い D-乳酸生産量を示した株は C69 (5.84 g/L) であった。D-乳酸濃度が 1.00 g/L を超えていた形質転換体のうち、200 株の遺伝子発現量を測定した。

(3) 機械学習モデルの構築・評価

(2) で取得した 200 株のデータを用いて複数のアルゴリズムで学習し、MLPRegressor を用いた機械学習モデルをメタモデルとしてスタッキングを行った。完成した機械学習モデルの決定係数は、訓練データを使用した場合に 0.686、テストデータ使用した場合に 0.660 となった。また、SHAP 値の計算により、解糖系酵素遺伝子である *PFK1* と *ENO2* の発現量が D-乳酸生産性に特に大きく影響することが示唆された。

(4) 機械学習モデルによる遺伝子発現量の予測

(3) において作製した機械学習モデルを用い、高い D-乳酸生産性を実現するための最適な遺伝子発現量の予測を行った (図 2)。最も高い D-乳酸生産性を示すと予測された遺伝子発現量は、特に解糖系酵素遺伝子である *FBA1*、*PFK1*、*PYK2* などの遺伝子発現量が多かった。また、予測された D-乳酸生産量は 7.96 g/L であり、実際に作製した株のうち D-乳酸生産性が最大であった C69 株の約 1.4 倍であった。

4. 今後の展望

本研究では機械学習モデルを構築し、遺伝子の発現量から D-乳酸生産性を予測することに成功した。今後は、D-乳酸生産性が最大になると予測された遺伝子発現量を再現し、高い D-乳酸性を有する酵母を作製する。

また、解糖系以外の経路を経由する他の物質生産においても本手法を応用し、その有用性を検証する。

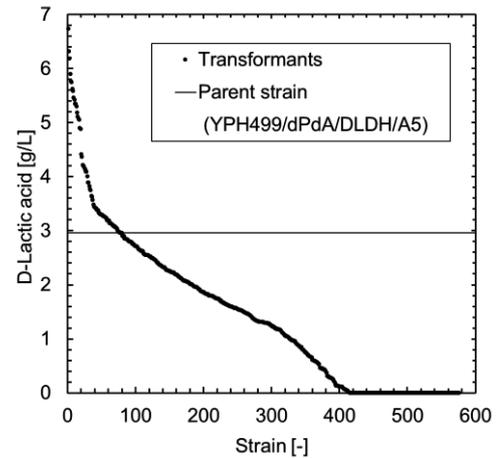


図 1 培養 16 時間後の D-乳酸生産量

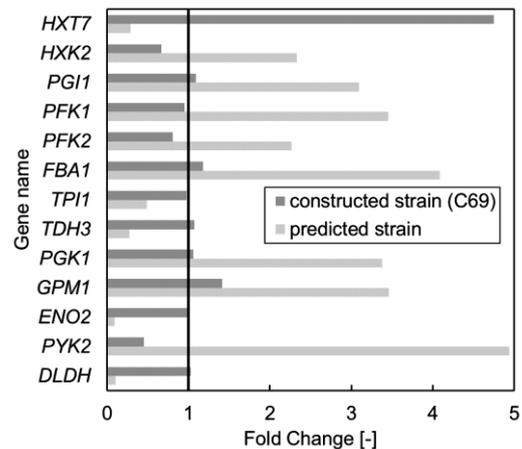


図 2 作製した株と予測した株の遺伝子発現量の比較

謝辞

本研究の一部は、JST さきがけ (JPMJPR20KB) および JSPS 科研費 (JP22H03803) の助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) R. Yamada *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, **114**, 2075 (2017).
- 2) Y. Zhou *et al.*, *Metab Eng*, **47**, 294 (2018).
- 3) M. Konishi *et al.*, *J Biosci Bioeng*, **129**, 723 (2020).
- 4) R. Yamada *et al.*, *ACS Synth Biol*, **6**, 659 (2017).

ゲノムデータとメタボロームデータを用いた

酵素遺伝子と代謝産物の推定法の開発

岡橋伸幸^{1*}・松田史生¹

¹大阪大学大学院情報科学研究科

〒565-0871 吹田市山田丘 1-5 大阪大学大学院情報科学研究科

Tel: 06-6879-4339 E-mail: n-okahashi@ist.osaka-u.ac.jp

微生物が産生する特殊な代謝産物の生合成酵素遺伝子は、新たな化学反応を触媒できる可能性のある遺伝子資源である。しかし、酵素の機能や基質・代謝産物の同定には労力を要する。そこで本研究では、迅速な酵素同定の実現を目指し、未同定も含めた微生物のゲノムデータとメタボロームデータを統合的に解析する *in silico* 酵素反応プラットフォームを開発した。ヒト腸内細菌株を題材にその有用性を検証し、既知の産生酵素と代謝産物の関係を推定できることを確かめた。

1. はじめに

背景と目的

微生物の持つ酵素遺伝子は新たな化学反応を触媒できる可能性のある遺伝子資源である。しかし、単離された菌株から有益な代謝産物や、その産生に関わる酵素遺伝子を同定する作業は労力を要し、遺伝子資源探索のボトルネックとなっている。菌株の解析にゲノミクスやメタボロミクスといった網羅的な解析技術が利用されているものの、未同定の代謝物や生合成遺伝子は往々にしてアノテーションを付与することが難しく、取得した大規模データが十分解読されないまま山積しているのが現状である。そこで、本研究では、未同定データを含めてゲノムデータとメタボロームデータを有機的につなぎ合わせる *in silico* 酵素反応プラットフォームを開発し、特定の菌株のみに存在する酵素遺伝子や代謝産物をハイスループットに推定する方法論の開発に取り組んだ。

解析原理

本法では、計算機上で推定される酵素反応や代謝産物を、特定の菌株で実験的に検出される酵素遺伝子や代謝産物と比較し、酵素の機能や、代謝物の質量、構造が合致するものをスクリーニングするという手順を取る (図 1)。計算機上では、与えられた基質と酵素反応から代謝産物を生成するプログラムを用いて、網羅的な[酵素反応-代謝産物]の組み合わせを作成する。

この時、酵素反応は実際に知られている基質特異性を意図的に緩め、仮定の反応も起こりえるようにすることで、未知の酵素反応や代謝産物も作り出す (図 1a)。一方、実験からは、特定の菌株群にのみ検出される代謝物は、当該菌株群のみが持つ酵素遺伝子によって産生されるという仮定に基き、菌株のゲノムデータとメタボロームデータから未知も含めて[酵素遺伝子-代謝産物]のペアを作成する (図 1b)。最後に、酵素遺伝子の配列から予測された EC 番号や、代謝産物の精密質量、マススペクトルが合致するものを絞り込み、すべての条件を満たすものが、特定の菌株で見出された酵素遺伝子とその代謝産物であったと推定できる。

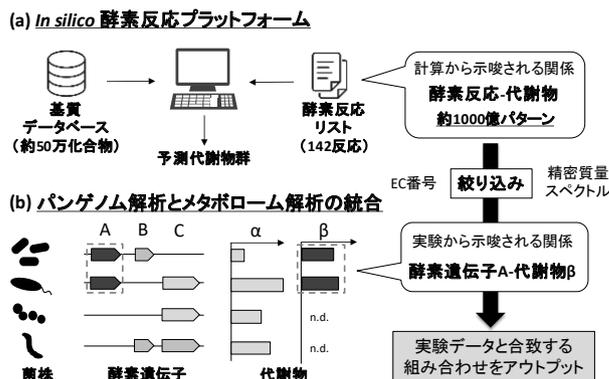


図 1 本解析法の原理

2. 方法

In silico 酵素反応プログラムは Python Ver. 3.7 上で RDKit を用いて構築した。SMILES からマスペクトルを予測する際には CFM-ID¹⁾ を用いた。解析法の妥当性検証にはヒト腸内細菌株を利用した。Bacteroidetes, Firmicutes, Enterobacteria, Actinobacteria に属する細菌計 17 株を Riken BRC から入手した。各菌株のゲノムデータは NCBI から入手し、BPGA²⁾ を用いた Pan-genome の作成と、DeepEC³⁾ を用いた EC 番号の推定を行った。メタボロームデータは、BHI 培地中で菌株を嫌気培養し、一層抽出した代謝物を液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析装置で分析することで取得した。

3. 結果と考察

In silico 酵素反応プラットフォームの構築

BRENDA データベース上の酵素反応を、EC 番号の第 2 ~ 3 階層レベルで基質特異性を緩めた 142 の酵素反応にまとめ、化学構造をプログラム上で扱う SMARTS 表記で記述した。このリストに対し、Human Metabolome Database などに記載されている約 55 万 6000 化合物を基質として代謝産物を作成した。その結果、仮想構造を含めて約 1009 億パターンの代謝産物が作成された。

解析の妥当性検証

本アプローチが機能することを確かめるために、ヒト腸内で優勢な 4 門の細菌のうち、Bacteroidetes 門細菌のみが持つことが既知であるスフィンゴ脂質生成初発酵素 Serine palmitoyl-CoA transferase (Spt) とその代謝産物 3-ketosphinganine (3KS, 図 2) を探索できるかどうかを検証した。

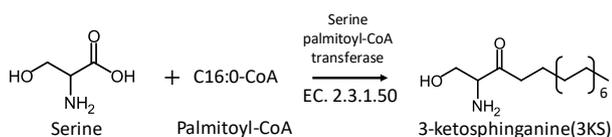


図 2 Bacteroidetes 門細菌が持つことが既知の反応

まず、腸内細菌株 17 株のノンターゲットメタボローム解析を行い、合計 11293 個のイオンが観測された。既報通り Bacteroidetes 門細菌 7 株にのみスフィンゴ脂質が検出され、これらのうち、精密質量が 300.290 のイオンに注目して以降の解析を進めた。17 菌株のゲノムデータを用いて 41053 遺伝子からなる Pan-genome を作成し、Bacteroidetes 門細菌 7 株にのみ存在する

遺伝子を探索したところ、248 個が該当した。これらの遺伝子の EC 番号を推定し、DNA やタンパク質の修飾に関わるタンパク質を除外した結果、109 遺伝子が絞り込まれた。

最後に、計算機上で推定された約 1009 億パターン [酵素-代謝産物] の中から実験データと合致するものを絞り込んだ (図 3)。精密質量が 300.290 と合致するものは 216 パターンであり、これらのうち、109 遺伝子と EC 番号が一致するものは 195 個であった。さらに、構造を示すマスペクトルの類似性に基づいて、これらをスコア化したところ、最もスコアが高いものは、図 2 に示す Spt によって 3KS が産生される組み合わせであった。このように、既知の関係を推定できたことから、本アプローチが機能することが確かめられた。

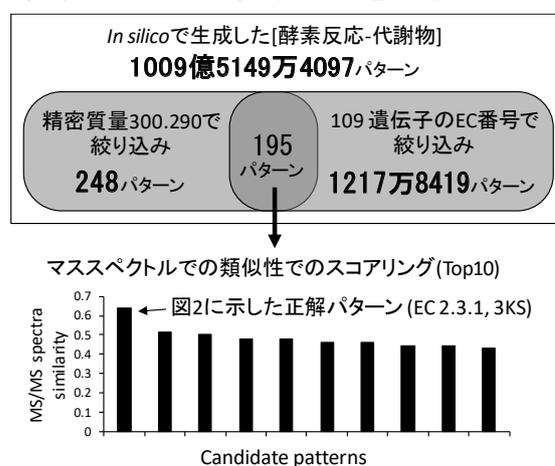


図 3 本アプローチを用いた絞り込みの結果

4. 今後の展望

本研究では、微生物のゲノムデータとメタボロームデータを統合的に解析する *in silico* 酵素反応プラットフォームを開発し、既知の酵素-代謝産物の関係を言い当てることできることを実証した。本技術を活用することで、未活用の微生物資源から有用な酵素遺伝子や代謝産物をハイスループットにスクリーニングすることが可能となり、グリーンイノベーションの実現を加速できると期待される。

謝辞

本研究は、JST ACT-X (JPMJAX20B2) の支援を受けて実施された。

文献

- 1) Wang *et al.*, *Anal. Chem.*, **93**, 11692-11700 (2021)
- 2) Chaudhari *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 27373 (2016)
- 3) Ryu *et al.*, *PNAS*, **116**, 13996-14001 (2019)

ヒト定量メタボロミクスに資する 安定同位体標識内部標準群 (SILIS) のバイオプロダクション

相馬 悠希^{1,2}・高橋 政友²・今戸 優理²・松田 貴意³・池田 明夏里⁴・田邊 芽衣⁴・
寺内 勉⁴・花井 泰三¹・和泉 自泰²・馬場 健史^{2*}

¹九州大学大学院農学研究, ²九州大学生体防御医学研究所,
³SAIL テクノロジーズ株式会社, ⁴大陽日酸株式会社

〒812-5852 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学生体防御医学研究所
Tel: 092-642-6170 Fax: 092-642-6172
E-mail: bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

各種クロマトグラフ質量分析装置を使用するメタボロミクスにおいて、質量分析で生じる「マトリックス効果」は定量性を損なう主な原因であり、代謝物濃度の絶対定量の実施を妨げている。この問題の解決策として安定同位体標識化合物を内部標準物質として添加する安定同位体希釈法 (Stable Isotope Dilution Method; SIDM) が考案されている。ただし、市販の安定同位体標準物質は非常に高価なため、SIDM は非現実的な手法に留まっている。そこで、比較的安価な ¹³C₆-Glucose を単一炭素源にして大腸菌などを培養し、¹³C 標識化代謝物群を一挙に取得する安定同位体標識内部標準品群 (SILIS) のバイオプロダクション法が考案されている。本研究ではヒト検体の定量メタボロミクスの実現に向けた SILIS バイオプロダクションに取り組んだ。人工代謝経路を用いて大腸菌の代謝を改変し、複数のヒト血漿由来の疾患バイオマーカーを含む SILIS の合成に成功した。

背景

メタボロミクスは、代謝物の網羅的解析を旨とし、表現型に最も近接したオミクス階層を対象とする高解像度分子フェノタイピング技術として、近年では代謝リモデリングの解明やバイオマーカー探索など、医科学分野でもその応用が期待されている。

メタボロミクス分野では、幅広い代謝物を観測するために、高選択性・高感度の各種クロマトグラフィー質量分析 (GC/MS, LC/MS 等) が第一義的手法として採用されている。同手法の発展に伴い、サンプル間の代謝物レベルの相対比較に基づく様々な代謝プロファイリング法が普及したが、各代謝物の絶対定量は殆ど実施されていない。その原因は、生体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリックス効果」が質量分析の定量性を損なわせるためである (図 1A)。この問題を解決する策として安定同位体希釈法 (SIDM) が考案されている (図 1B)¹⁾。同手法は、定量対象代謝物の安定同位体標識

化合物を既知濃度の内部標準として添加し、サンプル由来の代謝物と内部標準の検出強度比から濃度を算出する内部検量法である。ただし、市販の安定同位体標品は非常に高価なため、実質的にはコストと労力に合わない非現実的な手法に留まっている。

そこで、比較的安価な ¹³C₆-Glucose を単一炭素源にして大腸菌などを培養して ¹³C 標識し、代謝物群を一挙に取得する SILIS のバイオプロダクション法が考案されている (図 2)²⁻⁴⁾。しかし、代謝物の網羅性・標識化率・含有量などがヒトと微生物では大きく異なるため、ヒト検体に適用可能な SILIS は実質存在しない (図 2B)。今後、急速な発展が予想される大規模コホート研究、国際協力研究、ビッグデータに基づく人工知能研究などに向けて、ヒト定量メタボロミクス技術基盤の構築が急務となっている。

本研究では、合成生物学的アプローチによって代謝改変した大腸菌にヒト由来代謝物を合成させることで、ヒト検体に適応可能な SILIS 調製法を確立し、ヒト定量メタボロミクスの実現を図る。

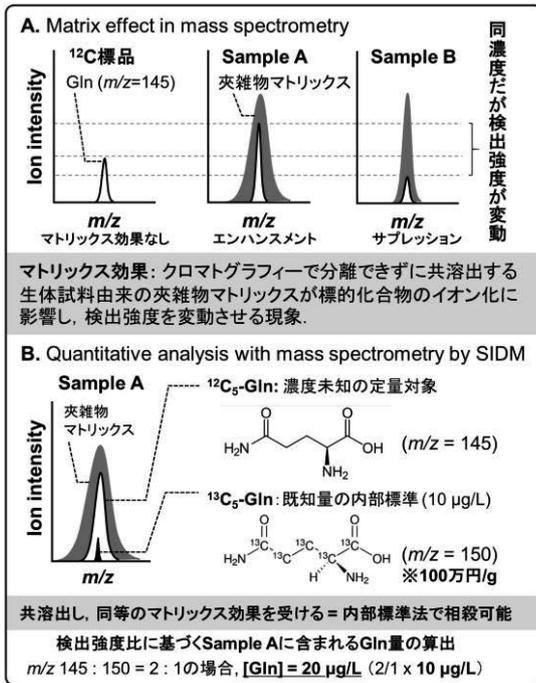


図 1. 定量メタボロミクス実用化に向けた課題

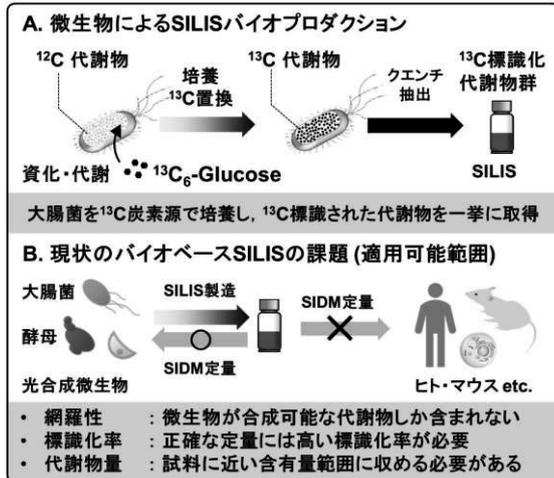


図 2. SILIS バイオプロダクションとその課題

材料と方法

ヒト由来の酵素遺伝子を大腸菌用にコドン最適化済みの人工合成遺伝子として取得し、P_LlacO₁プロモータ制御下の発現ベクターを構築した。これら大腸菌株 BW25113 系統株に導入し、ヒト血漿由来代謝物合成株 (SynPath 株) とした。構築した SynPath 株を 5 g/L ¹³C-glucose を単一炭素源とする M9 培地にて培養して ¹³C 標識した。SynPath 株の菌体から代謝物を抽出し、

液体クロマトグラフィーならびにイオンクロマトグラフィーと高分解能精密質量分析を組み合わせたメタボローム分析 (LC/HRMS/MS 分析, IC/HRMS/MS 分析) に供し、標的化合物の合成の有無と ¹³C 標識化率を評価した。上記の品質評価の後、調製した SILIS を用いた SIDM 法によって各ヒト血漿由来代謝物の定量を実施した。

結果と考察

ヒト血漿由来代謝物の合成と ¹³C 標識

¹³C 標識培養した SynPath 株のメタボローム分析の結果、本来は大腸菌が合成できないヒト血漿中の標的代謝物 (L-Kynurenine, Creatine, Creatinine) が検出された。この際、代謝物の分子中の炭素骨格のすべてが ¹³C 標識されていない同位体分子もわずかに検出されたが、炭素骨格のすべてが ¹²C のモノアイソトピックピークは検出されなかった。これは、培地中の ¹²CO₂ の取り込み反応が原因となって不完全に ¹³C 標識化された分子が一部あったが、種培養用の LB 培地由来の全 ¹²C 骨格の代謝物は残存しなかったことを示している。SIDM の定量精度に影響する ¹³C 標識化率は 95% 以上であり、定量メタボロミクスのための ¹³C 標識内部標準に適した品質の SILIS を取得することに成功した。

ヒト血漿リファレンス試料中の定量メタボロミクス

取得した SILIS を用いて米国 NIST が提供するヒト血漿リファレンス試料 (SRM1950) 中の代謝物濃度を定量した。まず、ベンチマークとして NIST から認証値が提供されているアミノ酸濃度を定量した結果、認証値と同等の定量値が得られた。次に SynPath 株で合成したヒト血漿代謝物を定量した結果、従来のヒト血漿分析に関する知見と比較して妥当な定量値を得られた。

以上のことから、本研究では代謝改変大腸菌を用いたバイオプロダクションによって取得した SILIS を用いて、ヒト血漿代謝物が定量可能であることを示した。今後は標的化合物の拡大を目指した代謝改変を実施し、医学研究・大規模コホート研究に実装可能な定量メタボロミクス技術基盤構築への発展を目指す。

文 献

- 1) Wu, L., *et al.* *Anal biochem* **336**, 2 (2005).
- 2) Bennett, DB., *et al.*, *Nat protoc* **3**, 8 (2008).
- 3) Dempo, Y., *et al.*, *Metabolites* **4**, 2 (2014).
- 4) Soma, Y., *et al.*, *JBB* **133**, 1 (2022).

Tetragenococcus halophilus における 自然挿入変異のターゲットスクリーニング

額川裕矢¹・脇中琢良²・茂木喜信²・渡部潤^{1,2,3*}

¹福島大学食農学類, ²ヤマサ醤油株式会社, ³福島大学食農学類附属発酵醸造研究所
〒960-1296 福島市金谷川 1 番地 福島大学食農学類
Tel: 024-548-8323 Fax: 024-503-4990
E-mail: watanabe@agri.fukushima-u.ac.jp

Tetragenococcus halophilus は醤油や味噌などの伝統的な発酵食品の製造に使用される乳酸菌であるが、実用的な形質転換系が確立されておらず、遺伝子機能解析が困難である。これまでの研究から、*T. halophilus* において内在性のインサーションシーケンス (IS) が活発に転移し、遺伝的多様性を生み出していることが明らかになっている。本研究では、この自発的な IS 転移により構築した変異株ライブラリーを、PCR で効率的にスクリーニングすることで、任意の遺伝子に IS が挿入された株を取得する、Targeting spontaneous Insertional Mutations IN Genomes (TIMING) 法を確立した。

1. はじめに

T. halophilus は醤油や味噌などの製造に使用される産業的に重要な微生物であるが、実用的な形質転換系が開発されておらず、遺伝子の相補やノックアウトなどの一般的な解析手法が適用できない。そのため産業上有用な表現型が見出されても、その表現型と遺伝型との因果関係を証明することは困難であった。これまでの研究により、*T. halophilus* において内在性の IS が活発に転移しており、アルギニンデヒミナーゼ経路の変異株¹⁾やタイコ酸合成に関与する遺伝子の変異株²⁾が比較的容易に取得できることが明らかになっている。この活発かつ自発的な IS の転移を利用すれば、さまざまな遺伝子に IS が挿入された変異株を作製可能であり、効率的な PCR スクリーニングを組み合わせることで任意の遺伝子に IS が挿入された変異株を取得可能であると考えた。非遺伝子組換えでありながら逆遺伝学的解析を可能にする本方法を Targeting spontaneous Insertional Mutations IN Genomes (TIMING) (図 1) とし、その概念実証をおこなった。また、この方法を利用して、優れた醤油醸造特性を有する株の育種に取り組んだ。

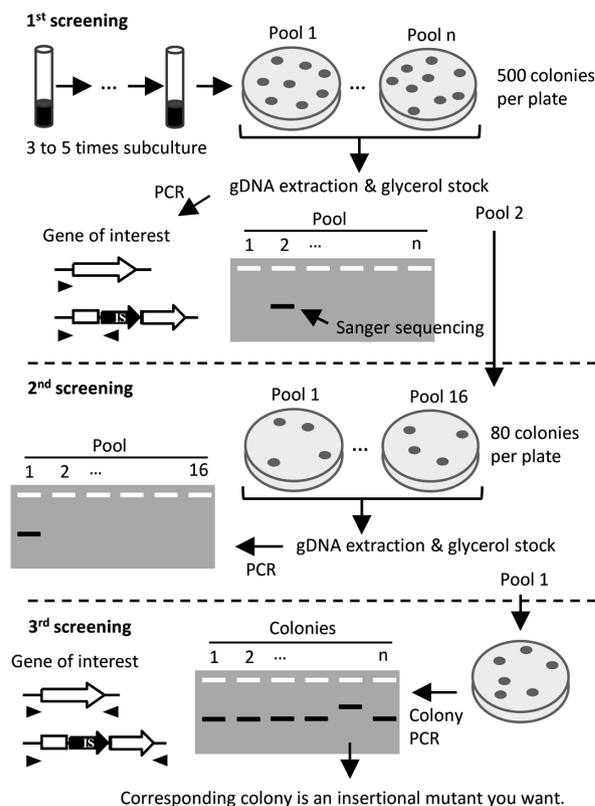


図 1. TIMING 法の概略

2. 実験方法

T. halophilus NBRC 12172 株を 10%NaCl を含む MRS 液体培地で 3-5 回継代培養した後、同寒天培地に塗抹した。1 プール当たり約 500 コロニーとなる変異株ライブラリーを 240 プール (約 10 万株相当) 作製した。任意の遺伝子と IS*Teha4* に設計したプライマーを用いた PCR で変異株をスクリーニングした。

3. 結果と考察

(1) TIMING 法の実現可能性調査

TIMING 法の実現可能性を把握するため、IS の転移率、IS*Teha4* の推定標的配列数、PCR の検出感度について検討した。

転移活性が高いと予想される IS*Teha4* と IS*Teha3* の転移率を調査するため、構築した変異株ライブラリーから無作為に 24 株を選択して、サザンブロット解析を実施した。その結果、IS*Teha4* は 5/24 株で (図 2)、IS*Teha3* は 1/24 株で転移が確認された。これは、本実験条件下で高頻度に転移する IS*Teha4* が TIMING 法を実現するための優れた変異源であることを示唆していた。

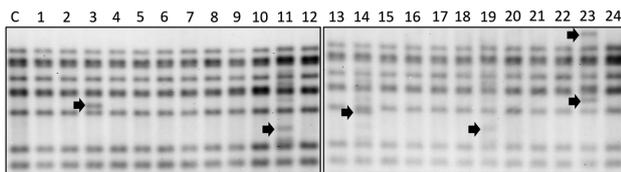


図 2. 無作為に取得した 24 株の IS*Teha4* の転移矢印は転移により増加した IS*Teha4* コピーを示す。

次に IS*Teha4* の標的配列について検討した。IS*Teha4* 周辺の配列から、この IS は高 AT 含量領域の TTANWWW を標的とすることが推定された。NBRC 12172 株のゲノムに IS*Teha4* の推定標的配列は 11218 ヶ所あり、AT 含量に依存した偏りはあるものの、ゲノム全体にほぼ満遍なく分布していた。このことから、IS*Teha4* の転移によりランダムな変異誘発が可能であると考えられた。

次に PCR の検出感度について検討した。既報¹⁾で取得済みの IS*Teha4* 挿入変異株と NBRC 12172 株のゲノムを任意の割合で混合し、PCR により変異株由来の配列を増幅した。その結果、今回構築したプールサイズであれば、目的の変異株がプール中に 1 株存在すれば PCR により十分に検出可能であると推定された。

(2) TIMING 法の実証と優良株の育種

次に、実際に任意の遺伝子変異株が取得可能か検討した。醤油醸造特性を考慮し、*arcA* と *cseA* に IS*Teha4* が挿入された変異株を取得することにした。

arcA はアルギニンをシトルリンに変換するアルギ

ニンデヒミンナーゼをコードする。シトルリンは醤油の火入れ工程でエタノールと反応し、発癌性物質のカルバミン酸エチルを生成する。*cseA* は娘細胞分離に関与する *N*-アセチルグルコサミニダーゼをコードする。この遺伝子の機能欠損は細胞クラスター形成を引き起こす³⁾。細胞クラスター形成株は醤油諸味を圧搾する際に濾布にトラップされることから、醤油の清澄化に有効である。つまり醤油醸造に使用するスターターとして、*arcA* や *cseA* の機能欠損株は好適である。

arcA 変異株と *cseA* 変異株は、それぞれ約 1 万株と約 4 万株をスクリーニングした段階で、各 1 株取得された。シーケンス解析により、*arcA* プロモーター領域と *cseA* コード領域に IS*Teha4* の挿入が確認された。*arcA* 変異株はアルギニンを分解せず、*cseA* 変異株は細胞クラスターを形成した (図 3)。以上の結果から、TIMING 法により任意の遺伝子変異株が取得可能であることが示された。

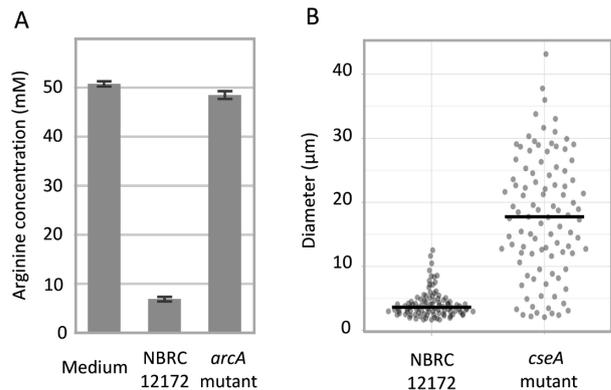


図 3. *arcA* 変異株 (A) と *cseA* 変異株 (B) の表現型

4. 結論

本研究では、*T. halophilus* における IS*Teha4* の自発的な転移を利用し、約 10 万株からなるライブラリーを構築した。醤油醸造に有用な *arcA* 変異株と *cseA* 変異株の単離に成功し、TIMING 法で任意の遺伝子変異株が取得可能であることを実証した。TIMING 法は実用的な形質転換系がない *T. halophilus* において逆遺伝学的解析ツールとして使用できるだけでなく、非遺伝子組換えの育種ツールとしても利用可能である。

文 献

- 1) Wakinaka T. and Watanabe J.: *Appl Environ Microbiol*, **85**, e00208-19 (2019)
- 2) Wakinaka T. et al.: *Microbiol Spectr*, **10**, e0033622 (2022)
- 3) Shirakawa D. et al.: *Biosci Biotechnol Biochem*, **84**, 1724-1735 (2020)

酵母のホモ変異型遺伝子を含む染色体領域の異数化が 清酒醸造に与える影響

堀田 夏紀^{1*}・小高 敦史¹・戸所 健彦¹・杉山 峰崇²・石田 博樹¹

¹月桂冠株式会社, ²広島工業大学生命学部

〒612-8385 京都市伏見区下鳥羽小柳町 101 番地 月桂冠株式会社総合研究所

Tel: 075-623-2130 Fax: 075-623-2132

E-mail: hotta@gekkeikan.co.jp

清酒酵母では清酒の香味に影響を与える遺伝子変異が多数知られており、それらの変異はヘテロ変異からホモ変異にすることで形質を強化することができる。また、遺伝子の変異だけでなく、染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数が増加することで表現型が変化することも知られている。本研究では、清酒醸造特性に影響を与えることが報告されている遺伝子を含む染色体領域を異数化させることで、その形質をさらに強化できるか検討した。その結果、変異型 *ARO4* を異数化させることで、 β -フェネチルアルコールをさらに高生産させることができた。

1. はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は研究用のモデル生物として用いられるだけでなく、ワイン、ビール、清酒といったアルコール飲料の製造で利用されている。清酒は日本の伝統的なアルコール飲料であり、清酒醸造に適した清酒酵母が選抜、使用されてきた。清酒酵母は実験室酵母と比較して、低温でよく発酵する、20%以上の高いアルコール発酵能を有する、優れた香味成分を生成する、孢子形成能が極めて低い、などの特徴がある^{1, 2)}。清酒の高付加価値化、多様化、差別化のために、優良な形質を持つ清酒酵母の育種法開発や、遺伝子の解析が行われてきた。

実験室酵母は主に一倍体である。一方、清酒酵母は二倍体である。そのため、二倍体清酒酵母では変異は通常ヘテロで導入される³⁾。そして、High-efficiency loss of heterozygosity (HEL0H) 法などを利用してホモ化させることが可能であり、半優性変異をホモ化することでその形質を強化することができる⁴⁾。

多くの産業用酵母では、倍数体ゲノムの頻度が高く、また、厳密に二倍体であるのではなく、染色体のコピー数多型を示す⁵⁾。染色体全領域が増減した株もあれば、部分的に染色体が増加した株も観察されている。染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数が増加することで表現型が変化することが知られており、異数化と清酒醸造特性についての研究も進められてい

る⁶⁾。

本研究では、優良な形質を持つ清酒酵母の育種法開発を目的とし、ホモ化した優性変異について、異数化によってコピー数を増加させることでその形質を強化できるかどうか検討を行った。

2. 方法

当社保有のきょうかい 9 号系の変異型 *ARO4* のホモ変異株 GK9A、きょうかい 9 号系の変異型 *PRO1* のホモ変異株 GK9P、きょうかい 7 号系の変異型 *LEU4* のホモ変異株 GK7L を親株として使用した。

各株の変異遺伝子のコピー数を 1 コピー増加させた株を作製した。まず、変異遺伝子のみの重複効果を簡便に見るために、1 コピー保持型プラスミドを用いた対象変異遺伝子の導入株を作製した。さらに、染色体が異数化した場合の複数遺伝子の重複効果を見るために、PCR-mediated chromosome duplication (PCDup) 法⁷⁾を利用した染色体部分重複株の作製を行った。PCDup 法では、変異遺伝子を含む約 200 kb の領域を重複させた。作製したプラスミド導入株と染色体部分重複株を、総米 50 g の清酒醸造試験に供し、上槽酒の各種分析を行った。

3. 結果と考察

GK9A からはコントロールプラスミドを導入した株を2株、変異型 *ARO4* を持つプラスミドを導入した株を7株取得した。同様に、GK9P からコントロール株2株、変異型 *PRO1* を持つプラスミド株7株、GK7L からコントロール株2株、変異型 *LEU4* を持つプラスミド株6株を取得した。小仕込み試験の結果、変異型 *ARO4* のプラスミド株はいずれも酢酸 β -フェネチル、 β -フェネチルアルコールを高生産した(図1)。変異型 *PRO1* のプラスミド株は、一部の株ではプロリンを高生産したが、大きく変化しない株も見られた(図2)。変異型 *LEU4* のプラスミド株では、いずれの株でもイソアミルアルコールを高生産したが、酢酸イソアミルは高生産した株とそうでない株が見られた(図3)。

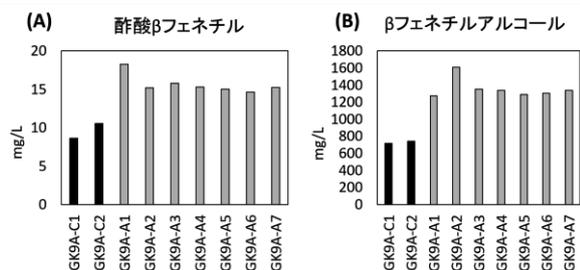


図1. 変異型 *ARO4* プラスミド導入株の清酒醸造試験

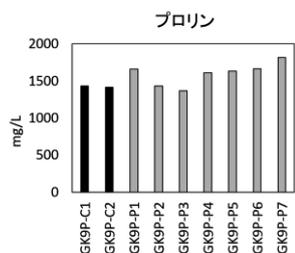


図2. 変異型 *PRO1* プラスミド導入株の清酒醸造試験

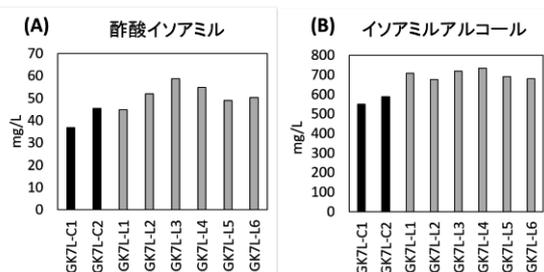


図3. 変異型 *LEU4* プラスミド導入株の清酒醸造試験

プラスミド株の結果から、変異型 *ARO4* は重複の効果期待できると考え、PCDup 株を作製し、評価する

こととした。GK9A から変異型 *ARO4* を含む二番染色体の領域を部分重複させた株を1株取得した(GK9A C2-4)。小仕込み試験の結果、プラスミド株の結果と同様に、変異型 *ARO4* を含む領域を重複させた株は酢酸 β -フェネチル、 β -フェネチルアルコールを高生産した。

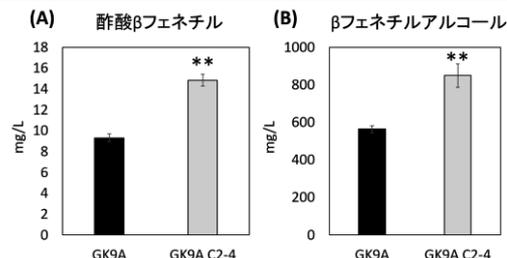


図4. 変異型 *ARO4* のPCDup 株の清酒醸造試験 (** $p < 0.01$)

今回検討した *ARO4*、*PRO1*、*LEU4* は、いずれもアミノ酸生成経路のフィードバック阻害感受性が低下する変異を持つ。コピー数増加の効果があまり見られなかった遺伝子は、アミノ酸生成経路で律速となっている反応が他に存在しているからではないかと考えられる。

4. 今後の展望

本研究では、清酒醸造において有用な遺伝子変異について、異数化させることでさらに形質を強化できることが明らかになった。異数化を活用することで官能的に差別化できる製品を作り出せる可能性があり、清酒の多様化に貢献できると考えられる。

参考文献

- 1) Katou, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 383-393 (2009).
- 2) Wu, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 636-640 (2009).
- 3) Akada, R. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 189-192 (2001).
- 4) Kotaka, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 675-678 (2010).
- 5) Borneman, A. *et al.*: *PLoS Genet.*, **7**, e1001287 (2011).
- 6) 堀田夏紀ら: 第71回日本生物工学会大会 (2019)
- 7) Natesuntorn, W. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 12510 (2015)

キチンと融合タンパク質を複合化した 重金属イオン吸着材料の作製

重政 友貴・中島 一紀*・青木 孝祐・高野 力・川崎 了

北海道大学大学院工学研究院環境循環システム部門

〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目

Tel/Fax: 011-706-6322

E-mail: k.naka@eng.hokudai.ac.jp

本研究ではキチンと融合タンパク質からなるバイオベースの重金属イオン吸着材料を開発した。キチン結合ドメインとメタロチオネイン（重金属捕捉タンパク質）の融合タンパク質をキチンに吸着した重金属イオン吸着材料は、未修飾のキチンと比較して、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} イオンなどの重金属イオンを高効率で吸着した。本コンセプトのバイオベース吸着材料はデザインが可能で低環境負荷の新規吸着材料として期待される。

1. はじめに

水溶液中の重金属イオンを取り除くためのキレート樹脂は石油化学をベースとして製造されているが、SDGs の観点から将来的には低環境負荷・資源循環型の重金属吸着剤の開発が必要である。本研究では、天然高分子であるキチンとタンパク質から構成される完全バイオベースの新規重金属吸着剤¹⁾を開発した(図 1)。金属吸着部位に重金属結合タンパク質である Metallothionein(MT)を、MT をキチンに結合するためのアンカータンパク質としてキチン結合ドメイン(ChBD)を選択し、それらの融合タンパク質(MT-ChBD)を作製した。その融合タンパク質を吸着したキチンを用い、水溶液中の重金属イオンの除去を検討した。

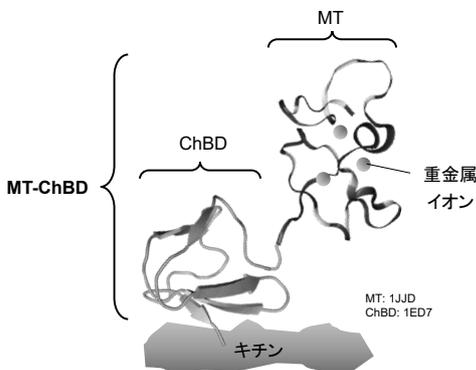


図 1 バイオベースの新規重金属吸着剤の概念図

2. 方法

2-1 融合タンパク質 MT-ChBD の発現と精製

Synechococcus elongatus 由来の MT と *Bacillus circulans* 由来の ChBD からなる融合遺伝子 MT-ChBD を挿入した pCold I ベクターで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、15°C でタンパク質発現を行った。発現したタンパク質は、通常の His-tag を使用した精製の他に、キチンを用いるより簡便なプロセスを用いて精製した。つまり、MT-ChBD を含む菌体破碎液にキチンを添加し、2 時間振とうすることで MT-ChBD を吸着・精製し、その MT-ChBD が吸着したキチンをそのまま重金属イオン除去剤として用いる手法である。

2-2 MT-ChBD 修飾キチンの重金属吸着特性の評価

His タグ精製した MT-ChBD (340 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液 3mL にキチン 0.1 g を添加し、2 時間振盪することでタンパク質を吸着させた。上清のタンパク質濃度の減少より吸着率を算出した。次に、MT-ChBD を修飾したキチンに Pb 、 Zn 、 Cd 、 Cu イオンを含む(各 10 ppm) 溶液を添加し、2 時間振盪することで重金属イオンを吸着させ、上清の各金属イオン濃度を ICP-AES によって測定することで吸着率を算出した。

2-3 脱着剤の検討

MT-ChBD 修飾キチンに吸着した重金属イオンを脱着させるために EDTA とクエン酸の添加を検討した。

MT-ChBD 修飾キチンに Pb, Zn イオン吸着させ, EDTA (20 mM) とクエン酸 (20 mM) をそれぞれ 5 mL 添加し, 2 時間振盪した. 遠心分離後の上清を ICP-AES で測定することで重金属イオンの脱着率を算出した.

3. 結果と考察

3-1 MT-ChBD の精製と吸着剤の作製

一般的に, タンパク質の精製は煩雑なプロセスや大量の化学試薬を必要とする. そこで, より環境負荷の少ないタンパク質精製法として ChBD のキチンへの結合性を用いた精製を検討した. この場合, MT-ChBD を吸着したキチンはそのまま重金属イオン吸着剤として利用できると考えられる (図 2A). 菌体破砕液とそこにキチンを添加した後の SDS-PAGE を図 2B に示す. 菌体破砕液に見られる過剰発現した MT-ChBD のバンド (14.6kDa, 矢印) がキチン添加後に薄くなっていることから, 夾雑タンパク質は吸着せず, MT-ChBD のみがキチン吸着していることが示された. この結果より, 菌体破砕液からのタンパク質の回収・精製と重金属イオン吸着剤の作製までの一連のプロセスを短時間かつ容易なステップで実行できる可能性が示唆された.

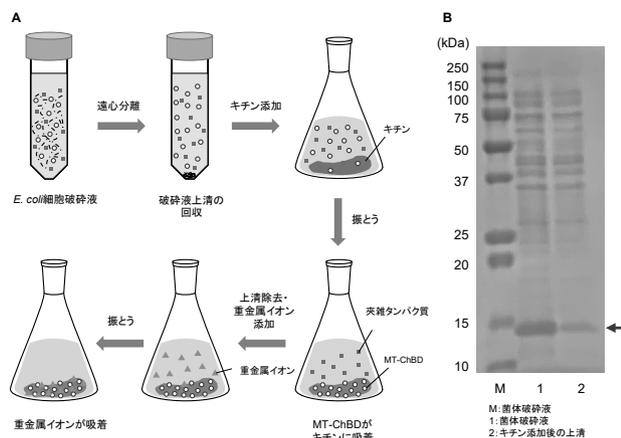


図 2. (A) 本研究で提案するタンパク質精製と吸着剤作製の同時プロセス, (B) キチン添加後のタンパク質濃度

3-2 MT-ChBD 修飾キチンの重金属吸着特性の評価

図 3 に MT-ChBD 修飾キチンを使用した重金属イオン除去実験の結果を示す. コントロールであるキチン単体と比較して, MT-ChBD 修飾キチンは全ての重金属イオンの吸着 (Pb:86%, Zn:80%, Cd:70%, Cu:42%) が確認された. キチンへ吸着した MT-ChBD 分子内の金属補足部位である MT が正常に機能しており, 本研究で使用した MT は重金属イオンの中でも Pb^{2+} , Zn^{2+} を優先的に吸着する性質を持っていることが示唆された.

3-3 吸着した重金属の脱着

通常, 吸着剤に吸着した重金属などのイオンは, pH 変化による解離や, EDTA などの錯化剤添加による脱着

により吸着剤から回収される. しかし, EDTA は環境中の重金属を溶出させてしまう可能性があるため, より温和で環境負荷の小さいクエン酸での重金属イオンの脱着を検討した (図 4). EDTA を用いた場合の脱着は, Pb が 73%, Zn が 79% であり, クエン酸を用いた場合は, Pb が 62%, Zn が 81% であった. クエン酸は EDTA よりも若干脱着率が低いものの, 脱着剤として十分に機能することが示された. また, MT-ChBD 修飾キチンから吸着した重金属イオンを脱着することができたことより, 本材料が再利用できる可能性が示唆された.

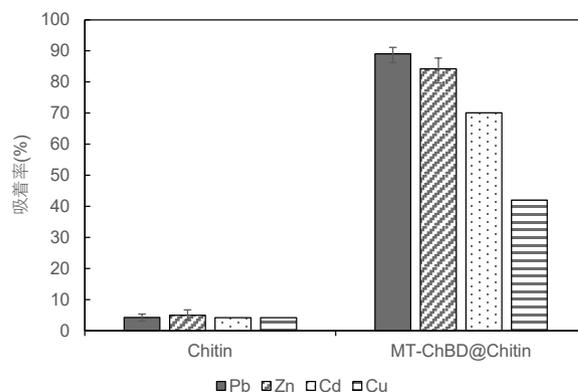


図 3. MT-ChBD 修飾キチンへの各金属イオンの吸着率

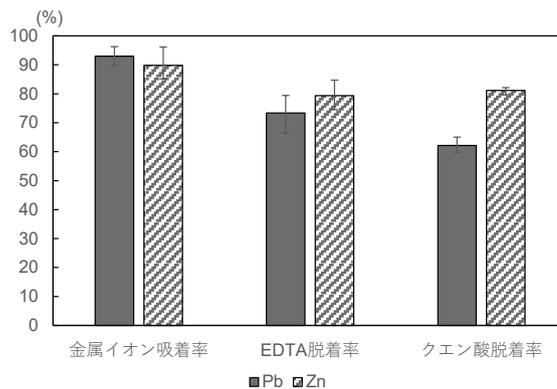


図 4. EDTA およびクエン酸による Pb, Zn の脱着

4. 結論

本研究で作製した新規材料は, 重金属イオンへの高い吸着率を示し, 従来の吸着材料と比べて, 低環境負荷, 低コストなどの優位性があると考えられる. さらに, 本材料は融合タンパク質のデザインを変更することで, 機能強化や他のターゲットへの吸着剤へと応用することも可能であるため, 環境分野のみならず様々な分野への応用が期待される.

5. 文献

- 1) Mwandira, W. et al., *Chemosphere*, **246**, 125733, (2020)

南極地域における大気バイオエアロゾル種組成変化

小林 史尚^{1*}

¹ 弘前大学理工学研究科

〒036-8560 弘前市文京町 3 弘前大学理工学研究科

Tel: 0172-39-3686 Fax: 0172-39-3686

E-mail: fumihisa@hirosaki-u.ac.jp

大気バイオエアロゾルとは空気中を浮遊する生物粒子のこと。南極は周りを海に囲まれた孤立した大陸で、寒冷でありほとんどが氷床で覆われているため独自の生態系をもつ。本研究では、バイオエアロゾル観測の経験をもつ演者が第 54 次南極地域観測隊に参加し、昭和基地と南極特別保護地区であるラングホブデ雪鳥沢におけるバイオエアロゾル経時観測を実施し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム分析を行った。昭和基地とラングホブデ雪鳥沢を比較した結果、一部のヒト起源と思われる細菌群は有意差があり、他の細菌群でも有意差があった。有意差の無い細菌群の方が割合も種類も多いため、本研究のバイオエアロゾル観測結果から、昭和基地では人為的な細菌の影響はほとんどないと判断した。

1. はじめに

南極大陸は、インド洋、太平洋、大西洋に囲まれ、地球上の他の大陸とは隔離されている。この大陸は、地球上で最も低温で広大な大陸であり、ここで生息する生物も、隔離と低温のために他の大陸に比べ極めて少なく特殊で脆弱な生態系をもつ。環境省を中心に南極環境保護が行われてきたが、昭和基地のヒトの出入りが続くことから、生活環境および生態系環境に関する環境アセスメントを行うことが必要かつ重要である。演者は、2021 年に環境アセスメント士（生活環境）に合格し、2022 年に取得した。

大気バイオエアロゾルとは、大気中に漂う生物粒子のことで、小さなものではウィルスや細菌、大きなものでは孢子や花粉、動植物の破片などを含む。演者は、これまで黄砂と挙動をともにする微生物、「黄砂バイオエアロゾル」の研究を行ってきた¹⁾。演者は、この大気バイオエアロゾルの採集と分析を実施し、種組成などの変動を計測することによって、大気環境における生活環境と生態系環境の変化を同時に調査できる方法として新規な提案を試みている。

本研究では、新たな環境アセスメント調査指標となりうる大気バイオエアロゾル観測を検討するために、演者が第 54 次日本南極地域観測隊（2012 年 11 月～2013 年 3 月）に共同利用研究課題の一つとして参加し、南極におけるバイオエアロゾル観測を実施した。南極の昭和基地とラングホブデ雪鳥沢（南極特別保護地区）

においてバイオエアロゾル採集を行い、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム分析から生物相の経日変化を比較し、検討した²⁾。

2. 実験材料と方法

図 1 は、本研究で観測を実施した南極地域の昭和基地とラングホブデ雪鳥沢の位置の概略を示す。昭和基地では、ヘリポート付近でバイオエアロゾル観測を実施した（60° 00' S、39° 36' E）。観測期間は、2012 年 12 月 26 日から 2013 年 1 月 21 日および 2013 年 2 月 2 日から 8 日まで、毎日 9 時ごろ（現地時間）から正確に 1 時間行った。もう一つの観測地点ラングホブデ雪鳥沢は、東オングル島から南に約 20 km 離れたところにある露岩地域で人の居住区から遠く離れており、南極特別保護地区に指定されている。特別に許可された者以外立ち入り禁止で、その生態系を含む自然が保護されており、人為的影響のほとんどない地域といえる。バイオエアロゾル観測実施期間は、2013 年 1 月 26 日から 30 日まで、9 時ごろ（現地時間）から 1 時間と 16 時ごろ（現地時間）からの 1 時間行った。観測場所は、ラングホブデ雪鳥沢入り口（69°15' S、39°43' E）で実施した。

バイオエアロゾルサンプラーは演者らが独自に開発した携帯可能な装置を用いた¹⁾。このポータブルバイオエアロゾルサンプラーは、小型軽量エアポンプ、雑菌汚染防止のためのモーター制御のチューブシャツ

ター、それらの動力源となるリチウム電池、蒸気滅菌したメンブレンフィルターユニット（Durapore 製）と孔径 0.45 μm の蒸気滅菌したメンブレンフィルター（HVLPO4700、ミリポア製）から成る。得られたメンブレンフィルターサンプルは、雑菌汚染のないように簡易クリーンブース内でガンマ線滅菌済みの 50 mL 容量プラスチックチューブに入れ、冷凍のまま日本へ持ち帰り、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム分析を行った。

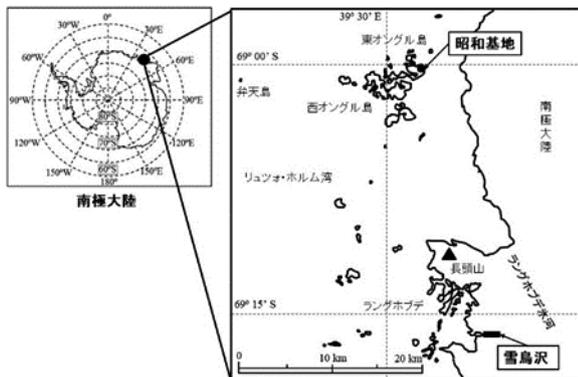


図1 南極地域において実施した観測地点

3. 結果と考察

図2は、昭和基地とラングホブデ雪鳥沢におけるバイオエアロゾルの網の種組成から算出したそれぞれの網における平均値を示す。分散が等しくないと仮定するt-検定を片側で推算した。Alphaproteobacteria 網のP値は0.0542、Betaproteobacteria 網は0.0775、Gammaproteobacteria 網は0.438、Deltaproteobacteria 網が0.137、Bacilli 網が0.296、Actinobacteria 網が0.196と有意水準5%では全て平均に差があるとはいえず、人為起源の細菌群は少なかった。しかしながら、Alphaproteobacteria 網とBetaproteobacteria 網においては、有意水準10%において、それぞれラングホブデ雪鳥沢、昭和基地の方が高いということがわかった。ラングホブデ雪鳥沢よりも有意に多かった昭和基地におけるBetaproteobacteria 網においては、*Burkholderiaceae* 属細菌がその54.2%、*Oxalobacteraceae* 属細菌が26.7%、*Neisseriaceae* 属細菌が10.8%と三種の菌株がほとんどを占めていた。

Oxalobacteraceae 属細菌および *Neisseriaceae* 属細菌は、昭和基地のバイオエアロゾルの中に多く検出され、南極特別保護地区であるラングホブデ雪鳥沢においてあまり検出されなかった。これは、何らかの理由で人為的に南極地域の昭和基地持ち込まれた可能性が高い。しかしながら、昭和基地および雪鳥沢におけるバイオエアロゾル観測結果の比較において、有意水準5%では差がみられなかった。この結果から、現在のと

ころ、バイオエアロゾル観測結果からは、南極地域の昭和基地環境への人為的影響はほとんどないといえる。

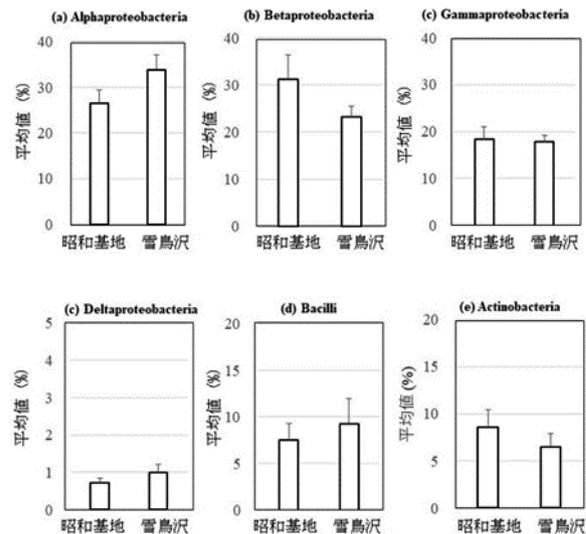


図2 検出された大気バイオエアロゾルにおける各網の比率における昭和基地と雪鳥沢の比較

4. 今後の展望

本研究では、の大気バイオエアロゾル観測を環境アセスメントの計測に用いることができることがわかった。演者らは、南極バイオエアロゾルにおいて他に、ペンギン起源バイオエアロゾル³⁾、係留気球を用いた高高度南極バイオエアロゾル⁴⁾、南極大陸氷床上のバイオエアロゾル⁵⁾を実施しているの、今後も南極バイオエアロゾル研究の重要性は増すとされる。

謝辞

本研究は、第54次日本南極地域観測隊、特に生物圏および気水圏グループのご協力によって実施されました。ここに心より感謝申し上げます。また、本研究は国立極地研究所公開利用研究(AA0-54-03)によって行われ、科研費23405003の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) Kobayashi, F. *et al. Earozoru Kenkyu* (Japanese), **22**, 218-227 (2007)
- 2) Kobayashi, F. *Kankyokagaku Kaishi* (Japanese), **35**, 113-120 (2022)
- 3) Kobayashi, F. *et al. Polar Sci*, **10**, 71-78 (2016)
- 4) Kobayashi, F. *Polar Sci*, **32**, No.100842, 1-7 (2022)
- 5) Kobayashi and Hayashi. *Earozoru Kenkyu* (Japanese), **37**, 109-119 (2022)

リグニンからの芳香族ポリマー原料の選択的生産： サルファイトリグニンからのバニリン酸生産への *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用

鎌田 真未¹・安田 智恵子¹・樋口 雄大¹・吉田 暁弘²・坂本 千穂¹・大関 さおり¹・
上村 直史³・政井 英司³・園木 和典^{1*}

¹ 弘前大学 農学生命科学部, ² 弘前大学 地域戦略研究所, ³ 長岡技術科学大学 工学研究院 物質生物系
〒036-8561 弘前市文京町 3 弘前大学農学生命科学部

Tel: 0172-39-3585 Fax: 0172-39-3894

E-mail: sonoki@hirosaki-u.ac.jp

本研究ではリグニン由来の多様な芳香族化合物を資化する *Pseudomonas* sp. NGC7 株を宿主として、針葉樹サルファイトリグニンのアルカリ酸化分解物から、耐熱性ポリマー原料として利用可能なバニリン酸 (VA) を生産する微生物株を分子育種した。水酸化銅固定化触媒を用いた連続式アルカリ酸化分解、膜分離を経て得られたサルファイトリグニンの分解物にはアセトバニロン (AV), バニリン (VN), VA が主要な芳香族モノマーとして含まれていた。これらの混合物から VA を選択的に蓄積させるために、先ず NGC7 株が保有する 4 つの推定 VA *O*-demethylase 遺伝子セット (*vanA1B1* ~ *vanA4B4*) のうち、VA 変換に主要に関わる *vanA4B4* を破壊し、さらに *Sphingobium* sp. SYK-6 株由来の AV 変換酵素遺伝子群 (*acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*) の発現プラスミドを組み込んだ。その結果サルファイトリグニン分解物から 91 mol% [mol VA/mol (AV+VN+VA)], AV, VN, VA からなる分解物モデルから 90 mol% の収率で VA を生産できたが、fed-batch 培養では 79 mol% に低下した。この収率の低下は、*vanA1B1* ~ *vanA4B4* の全ての破壊に加えて、VN reductase と高いアミノ酸配列同一性を示す遺伝子 (*PSN_2384*) を破壊することで、96 mol% にまで改善できることを明らかにした。

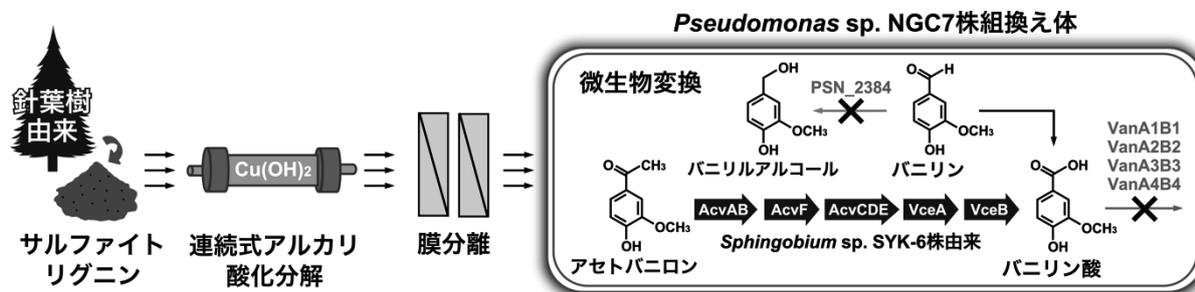


図 1. 化学分解と微生物代謝を利用したサルファイトリグニンからの VA 生産の概要。

1. はじめに

非可食バイオマスの主成分である天然芳香族高分子リグニンは、その構造の複雑さから利用は限定的である。利用に向けた障壁の 1 つに、リグニンを低分子化して得られる芳香族化合物の混合物から特定の化合物を獲得することが困難であることが挙げられる。このことを克服できれば、リグニンの有効利用を具体化す

ることができる。そこで本研究では、リグニン由来の多様な芳香族化合物を利用して良好に増殖し、また芳香族化合物に対してより順応性が高い *Pseudomonas* sp. NGC7 株¹⁾の代謝系を利用して、工業リグニンの 1 つであるサルファイトリグニンをアルカリ酸化分解して生成する芳香族化合物の混合物から、耐熱性ポリマー原料として利用できる VA を高収率で生産する微生物株の分子育種を検討した (図 1)。

2. 実験方法

2-1. リグニンの連続式アルカリ酸化分解

針葉樹サルファイトリグニン（東京化成）の連続式アルカリ酸化分解は、Cu(OH)₂固定化触媒²⁾を充填した固定床流通式反応器で行った。リグニン溶液（2 M NaOH 水溶液に溶解）は 0.025 mL/min、酸素 2.0 mL/min（標準状態換算）で供給し、反応温度 180°C、反応槽の内圧は 0.70~0.85 MPa とした。得られた分解液を精密ろ過、限外ろ過（5,000, 1,000 MWCO）処理して得た分子量 1,000 以下の画分を分解物とした。

2-2. VA 生産株の作製と VA 生産能評価

以下の遺伝子型を持つ VA 生産株を作製した。それぞれの遺伝子欠失は相同組換えにより行い、AV 変換酵素遺伝子群（*acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*）³⁾ はプラスミドで導入した。

NGC711/*acv/vce*

$\Delta vanA4B4$, *acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*

NGC720/*acv/vce*

$\Delta vanA4B4$, Δaph , $\Delta vanA1B1$, $\Delta vanA2B2$,

$\Delta vanA3B3$, *acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*

NGC729/*acv/vce*

$\Delta vanA4B4$, Δaph , $\Delta vanA1B1$, $\Delta vanA2B2$,

$\Delta vanA3B3$, ΔPSN_2384 , *acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*

各菌株を 15 g/L グルコース及び 10 mM (AV+VN+VA) を含む分解物または分解物モデル（1.6 mM AV, 5.8 mM VN, 2.6 mM VA）を添加した合成培地で培養し（30°C）、各化合物量を HPLC で定量した。Fed-batch 培養は溶存酸素（DO）-stat で行い、グルコースと分解物モデルを供給した（30°C, pH 7.0, DO = 20%）。

3. 結果と考察

NGC7 株は 4 つの推定 VA *O*-demethylase 遺伝子セット（*vanA1B1*~*vanA4B4*）を保持しており、VA の変換には *vanA4B4* が主要に関わることをこれまでに見だしていた⁴⁾。*vanA4B4* を破壊し、AV 変換酵素遺伝子群を組み込んだ NGC711/*acv/vce* 株は、サルファイトリグニン分解物から 91 mol%、AV, VN, VA からなる分解物モデルからは 90 mol% の収率で VA を生産した（図 2A, B）。しかし fed-batch 培養ではその収率は 79 mol% に低下した（図 3 ○）。そこで *vanA1B1*~*vanA4B4* を全て破壊した NGC720/*acv/vce* 株を作製して同様に fed-batch 培養を行ったが、VA 収率は 84 mol% までしか上昇せず、収率低下の原因が未だ存在することが示された。NGC7 株のゲノムには *P. putida* KT2440 株由来の VN reductase と 97 % のアミノ酸配列同一性を示す遺伝子

（*PSN_2384*）が存在したため、NGC7 株の休止細胞懸濁液に VN を添加したところ、VN の還元産物であるバニリルアルコールが検出された。そこでさらに *PSN_2384* を欠損させた NGC729/*acv/vce* 株を作製して fed-batch 培養を行った結果、分解物モデルから 96 mol% の収率で 3.1 g/L の VA が得られた（図 3 ●）。

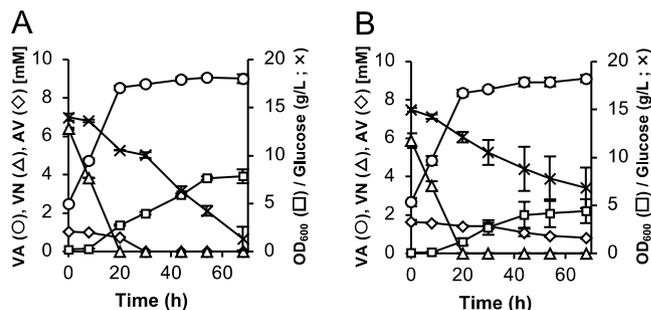


図 2. NGC711/*acv/vce* 株によるサルファイトリグニン分解物 (A) と分解物モデル (B) からの VA 生産。

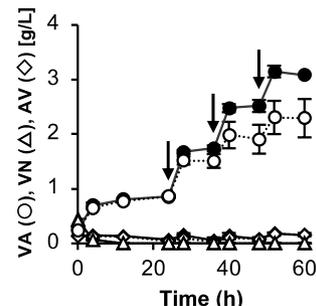


図 3. NGC711/*acv/vce* 株 (open symbols) と NGC729/*acv/vce* 株 (closed symbols) による分解物モデルからの VA 生産 (fed-batch 培養). 矢印は分解物モデルの添加点を示す。

4. 今後の展望

本研究では、針葉樹由来のサルファイトリグニンをアルカリ酸化分解して生成する芳香族化合物の混合物から選択的に VA を生産できる微生物株を分子育種した。リグニン利用の障壁解決に微生物代謝をさらに適用することを目指し、広葉樹や草本植物のリグニンに由来するより多様な芳香族化合物に対して、代謝経路の最適化を現在進めている。

参考文献

- 1) Akutsu, M., *et al.*: *Bioresour. Technol.*, 359, 127479 (2022)
- 2) Yoshida, A., *et al.*: PCT/JP2021/048664 (2022)
- 3) Higuchi, Y., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, e00724-22 (2022)
- 4) 安田ら: 第 66 回リグニン討論会 (2021)

謝辞

本研究は JST 未来社会創造事業 (JPMJMI19E2), 弘前大学若手研究者支援事業の支援を受けて実施した。

Torulaspora quercuum を用いた 紅藻糖化液を原料とした効率的なエタノール生産

小西 正朗^{1*}・森本 一輝¹・邱 泰瑛¹

¹北見工業大学工学部

〒090-8507 北見市公園町 165 番地

Tel: 0157-26-9402 Fax: 0157-26-9125

E-mail: konishim@mail.kitami-it.ac.jp

ガラクトースを効率的にエタノール発酵できる酵母の開発は、ガラクトンが多く含まれる大型藻類の紅藻を原料としたエタノール生産を開発上で重要である。ガラクトース発酵効率を改善するため、本研究では環境中からガラクトース発酵性酵母を分離し、バイオエタノール生産への適用可能性を評価した。ガラクトース発酵性酵母として分離された *Torulaspora quercuum* KRT82 及び KRT85 株は栄養培地の YP 培地に唯一炭素源として 200 g/L ガラクトース (Gal) を加えた条件で、それぞれ 54.77 ならびに 59.92 g/L のエタノールを生産した。20 g/L の Gal, 10-13 g/L のグルコースを含むテングサ糖化液から 54-57% の理論収率でエタノールを生産できた。分離株は基準株にない凝集性を示した。凝集性を利用し、繰り返し回分培養をしたところ、39 時間で $38 \text{ g L}^{-1}_{\text{-working volume}}$ のエタノールを生産することができ、体積あたり生産性は $0.98 \text{ g L}^{-1}_{\text{-working volume}} \text{ h}^{-1}$ に達した。

背景および目的

地球温暖化による気候変動の懸念から化石燃料由来の炭酸ガスの排出量の削減が求められている。エタノール (EtOH) はガソリンの代替燃料として既存の自動車に直接利用できる代替燃料であり、2018 年の世界生産量は 8600 万 t に達しており、主要な生産地域は米国 (56%)、ブラジル (28%)、ヨーロッパ (5%)、中国 (4%)、カナダ (2%)、インド (2%) である。燃料用 EtOH の生産は伸び続けており、原料確保が重要な課題のひとつとなっている。現在の主要な原料であるサトウキビやトウモロコシは食料との競合が懸念されている。第 2 世代バイオエタノールの原料とされるリグノセルロース系バイオマスは強固な結晶性セルロースや高含量のリグニンにより糖化の際に多くの労力やエネルギーを必要とすることから経済性が担保できていない。また、農作地の競合の問題が残る。ブルーカーボンとして注目される大型藻類は陸生の植物より光合成による炭酸ガス固定効率が 2-20 倍高いとされ、糖含量も高いことが知られている。特に紅藻類は緑藻や褐藻より糖含量が高い。また、リグノセルロース系バイオマスと比べリグニン含量が少なく、セルロースの結晶性も低いいため、糖化が容易である点も発酵原料として有利である。しかしながら、紅藻の主要な多糖はガラクトンとグルカンであるため、糖化液には多量のガラクトースが含

まれる。一般的に EtOH 生産に利用される *Saccharomyces cerevisiae* はガラクトースを資化できるものの発酵性をもたない。そこで本研究では環境中からアルコール発酵性の酵母を分離し、ガラクトース発酵性の高い酵母を選択することで、紅藻由来の糖化液から効率的に EtOH を生産できる微生物の分離を試みた。

方法

サンプリングは 2015 年の春に、所属大学近辺、香りゃんせ公園、女満別駅、サロマ湖周辺で実施した。バツタ、花、木の実等を 15 ml のスクリュウキャップ付きチューブに用意した 2 ml の抗生物質、乳酸、EtOH を加えた YM 培地中にサンプリングした。室温で酵母が増殖するまで震盪培養し、増殖した酵母を抗生物質入りの YM 培地で単離した。単離した酵母は rRNA の遺伝子配列に基づく系統分類により同定し、糖の資化性、発酵性、ストレス耐性 (50% グルコース (Glc), 5% EtOH, 0.4% 酢酸) を評価した。糖化液は寒天もしくは市販のテングサを原料とし、硫酸加水分解 (121°C, 30 min) および酵素糖化 (メイセラーゼ, 明治) により調整した。EtOH 発酵試験は 500 ml 容量のフラスコで 100 ml の培地を仕込んで試験した。培地は Yeast Nitrogen Base (YNB) もしくは YP (10 g/L 酵母エキス, 20 g/L ペプト

ン)をベースとし、糖(Glcもしくはガラクトース(Gal))や糖化液を加えたものを用いた。培地中の糖やEtOHはHPLCを用いて定量し、酵母の増殖は濁度法を用いて標準曲線から乾燥菌体重量(DCW)を算出した。

結果および考察

スクリーニングの結果、アルコール発酵性を示した82株の酵母の糖資化性、発酵性、ストレス耐性試験をしたところ、5株のGal発酵性酵母を見出した。rRNAの部分配列(D1/D2領域)による系統分類から、Gal発酵性酵母は*Schzosacharomyces pombe*, *Torulospora quercuum* (2株), *Vanderwaltozyma verrucispora*, *Candida tropicalis*であった。これらの株の発酵力を評価するため、YNBもしくはYPベースの培地にGlcおよびGalをそれぞれ200 g/L加えた培地で評価したところ、*T. quercuum*と同定されたKRT82株およびKRT85株はYP培地でGlcから*Saccharomyces cerevisiae* NBRC1136株(84.8 g/L)と同等のそれぞれ77.7および66.3 g/LのEtOHを生産した。Galを単一炭素源とした場合、*S. cerevisiae*はEtOHを生産しなかったのに対し、KRT82株およびKRT85株はそれぞれ54.8ならびに60.0 g/LのEtOHを生産した。この結果から*T. quercuum*はGalからGlcと同等の発酵力を示し、Galを効率的にEtOHに変換できることを見出した。しかしながら、最少培地のYNBをベースとした場合、増殖が悪くEtOH生産効率が低いことも判明し、栄養要求性が高いことが欠点であることがわかった。*T. quercuum*の基準株であるCBS11403株も同様の特性を持っていることが確認された。1%硫酸処理と酵素糖化ならびに活性炭処理したテングサ糖化液中では*T. quercuum*は24-36hの培養で8.46-10.1 g/LのEtOHを生産し、理論収率は54.0-57.6%であった。その際の体積あたりのEtOH生産性は0.235-0.419 g L⁻¹ h⁻¹であった。グルコースからのみEtOHを生産できる*S. cerevisiae* NBRC 1136のEtOH生産量は5.5 g/Lであり、*T. quercuum*の半分程度の収量であった。既往研究で報告がある*Kluyromyces maxianus* ATCC 36907は紅藻糖化液から24 hで10.6 g/LのEtOHを生産することが報告されており¹⁾、*T. quercuum*は同等の性能を持っていることがわかった。また、生産性はゲノム編集でガラクトース発酵性を付与した*S. cerevisiae* GEN.PK2 (CCW12p-PGM2)²⁾を上回ることがわかった。面白いことに、環境から分離した*T. quercuum*は糖化液中で基準株には認められない高い凝集性を示すことを見出した(図1)。僅か3分の静置で酵母細胞が凝集し菌体と培養液を分離できることがわかった。そこで、*T. quercuum* KRT85株を用いて、繰り返し回分培養によるEtOH生産を実施した。図2に繰り返し回分培養中のGlc, Gal, DCWおよびEtOHの経時変化を示す。最初の24時間で糖を完全に消費し10 g/lのEtOHを生産した。そ

の後、培地交換を繰り返し3-6時間で糖をEtOHに変換できることがわかった。Working Volume当たりの生産性は0.98 g L⁻¹ working volume h⁻¹に達した³⁾。このような高効率で紅藻バイオマス由来糖化液をEtOHへ変換した例は報告がなく分離した酵母は紅藻を原料とするバイオEtOH生産の宿主として高いポテンシャルを持つことがわかった。一方、YP培地のように富栄養な環境でのみエタノールを効率的に生産することは、コスト増加に繋がる欠点である。したがって、栄養要求性を解明し、培地の改変や育種によって、貧栄養な培地でも高効率なEtOH生産法を開発する必要がある。

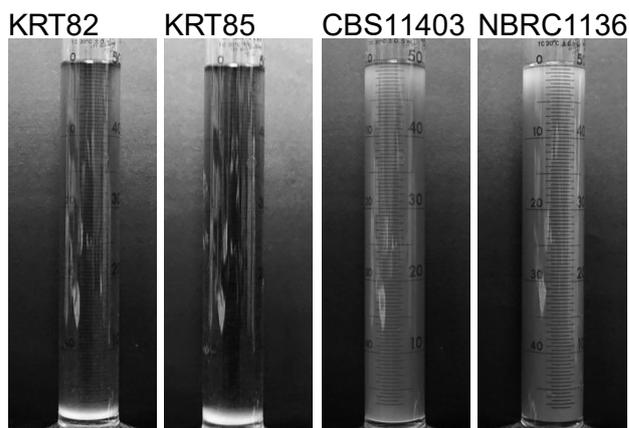


図1. *T. quercuum*の凝集性。KRT82, KRT85, CBS11403: *T. quercuum*, NBRC1136: *S. cerevisiae*

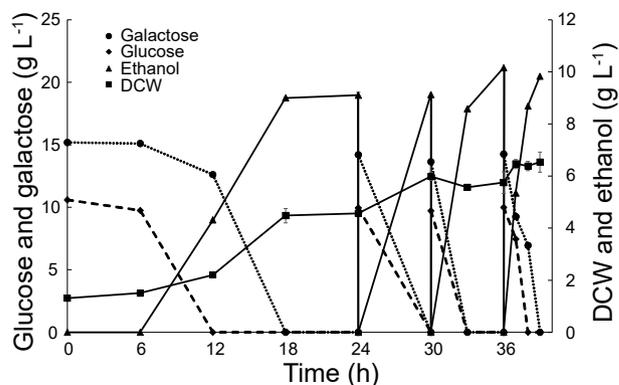


図2. *T. quercuum* KRT85株による紅藻糖化液を原料とするEtOH生産、24, 30, 36hに培地交換

文 献

- 1) Wu, C.H. et al.: J. Microbiol. Biotechnol. **24**, 1245-1253 (2014).
- 2) Sunwoo, I.Y. et al.: J. Biotechnol. **297**, 78-84 (2019).
- 3) Morimoto, K. et al.: Bioresour. Technol. Rep. **17**, 100952 (2022).

カイコを用いたブタロタウイルス構造タンパク質の発現

加藤竜也^{1,2,3*}・角田達紀²・米塚亜美²・町田佑樹³・関口智史³・

徐剣⁴・鈴木亨⁵・朴龍洙^{1,2,3}

¹静岡大学グリーン科学技術研究所, ²静岡大学農学部応用生命科学科, ³静岡大学総合科学技術大学院,
⁴静岡大学グリーン科学技術研究所 (現・華東師範大学), ⁵農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究
部門

〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836 静岡大学グリーン科学技術研究所

Tel: 054-238-4937 Fax: 054-238-4937

E-mail: kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp

ブタロタウイルス A は生産現場で最も多く検出され, 特に子豚に嘔吐や下痢を引き起こす主要病原体の一つである。感染した個体は, 発育遅延に加え重症化すると死に至るため, その経済的損失は甚大である。本研究では, ブタロタウイルス A ワクチン開発の基盤を整備するために, 群抗原である内殻タンパク質 VP6 と中和誘導抗原である外殻タンパク質 VP7 をカイコ幼虫で調製することを目的とした。VP6 については, N 末端側にタグ配列のみ (T-VP6), もしくはタグ配列とカイコ 30K タンパク質 (30K6G) のシグナル配列を付加した融合タンパク質 (30k-T-VP6) として発現させた。VP7 については, C 末端側にタグ配列を付加 (VP7-PA), もしくは N 末端側にタグ配列と 30K6G シグナル配列を付加した融合タンパク質 (30k-T-ΔVP7) として発現させた。T-VP6 と 30k-T-VP6 はカイコ一頭あたりそれぞれ 330 μg および 50 μg, VP7-PA と 30k-T-ΔVP7 は 26 μg および 49 μg 精製できた。T-VP6 は透過型電子顕微鏡で直径約数十 nm のウイルス様粒子として確認できたが, 30k-T-VP6 はそのような粒子は確認できなかった。今後これら組換えタンパク質をワクチンとして動物に接種し, その効果を検証する予定である。

ブタロタウイルス A は生産現場で最も多く検出され, 特に子豚に嘔吐や下痢を引き起こす主要病原体の一つである。感染した個体は, 発育遅延に加え重症化すると死に至るため, その経済的損失は甚大である¹⁾。ロタウイルス A はウイルス粒子の外殻を構成する VP7 (G 遺伝子型) と VP4 (P 遺伝子型) の 2 つの遺伝子の組合せで分類され, これらの遺伝子はそれぞれが抗原として機能し中和抗体を誘導する。これまでに 37 種類の G 遺伝子型と 51 種類の P 遺伝子型が存在する。現在ブタロタウイルス A の G/P 遺伝子型は複数報告されており, 未だに有効なワクチンは開発されていない。本研究は, ブタロタウイルス A ワクチン開発の基盤を整備するために, 群抗原である内殻タンパク質 VP6 と中和誘導抗原である外殻タンパク質 VP7 を, 組換えタンパク質大量生産の有望な宿主であるカイコ幼虫^{2),3)}で調製することを目的とした。

VP6 は, N 末端側に精製用のアフィニティタグ (Strep-tag II および FLAG タグ) を連結させた T-VP6

と, アフィニティタグに加えてカイコ体液タンパクである 30K6G タンパク質のシグナル配列を付加した 30k-T-VP6 として発現させた。また VP7 は, C 末端側に PA タグを付加させた VP7-PA と, N 末端側の自身のシグナル配列 (1-54 アミノ酸残基) を 30K6G タンパク質のシグナル配列とアフィニティタグ (Strep-tag II および FLAG タグ) 配列に置換した 30k-T-ΔVP7 として発現させた。カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyherovirus, BmNPV) をベースとしたカイコバクミド発現系⁴⁾を用いて, 発現を試みた。

カイコ幼虫でそれぞれの構造タンパク質の発現をウェスタンブロットで確認したところ, T-VP6 は脂肪体に, 30k-T-VP6 は体液と脂肪体に予想される分子量 (約 45 kDa) に発現が確認された。また 30k-T-VP6 のほうが少し分子量が大きく, 体液中にも発現が認められたことから, 30k-T-VP6 は付加したシグナル配列によりカイコ体液中へ分泌されたと同時に修飾を受けていることが示唆された。また VP7-PA および 30k-T-ΔVP7

は共に体液と脂肪体に予想よりも少し大きな分子量 (約 37 kDa) に発現が確認された。このことから、カイコ内では VP7 自身のシグナル配列も正常に働くことが確認された。

これら発現した構造タンパク質を、StrepTactin Sepharose カラムクロマトグラフィーによりカイコ体液および脂肪体から精製を行った。T-VP6 はカイコ脂肪体抽出液から、30k-T-VP6 はカイコ体液からそれぞれほぼ単一のバンドを精製することができた (図 1A)。T-VP6 と 30k-T-VP6 は、カイコ幼虫 1 頭当たりそれぞれ 330 μ g および 50 μ g のタンパク質を精製することができ、T-VP6 に関しては、カイコ幼虫 112 頭で約 37 mg の精製タンパク質を得ることができた。VP7-PA と 30k-T- Δ VP7 は、カイコ幼虫 1 頭当たりそれぞれ 26 μ g および 49 μ g のタンパク質を精製することができ、30k-T- Δ VP7 に関しては、カイコ幼虫 545 頭から約 27 mg の精製タンパク質を得ることができた (図 1B)。

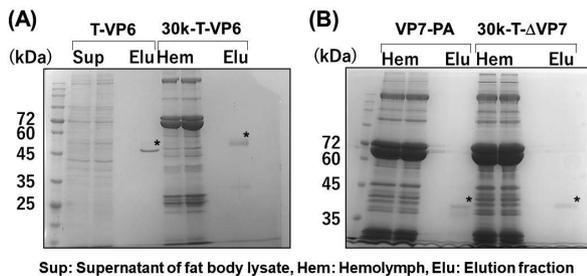


図 1. それぞれの構造タンパク質の精製,
(A) VP6, (B) VP7

精製した T-VP6 と 30k-T-VP6 の形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察をしたところ、T-VP6 は直径数十 nm の粒子を形成していたが、30k-T-VP6 は直径数 nm の微小な粒子のみが確認された (図 2A)。このことから、VP6 はタグ配列の付加に関係なくウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) を形成するが、シグナル配列を付加することで、VLP 形成が妨げられることが明らかとなった。さらに、T-VP6 と 30k-T-VP6 を Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) で処理すると、T-VP6 の分子量は変化しなかったが、30k-T-VP6 の分子量は小さくなり T-VP6 とほぼ同じ分子量に変化した (図 2B)。このことから、30k-T-VP6 には N 型糖鎖が付加されており、その N 型糖鎖が VLP 形成を阻害していることが示唆された。さらに、VP7-PA と 30k-T- Δ VP7 も PNGase F で処理すると分子量が減少したことから、

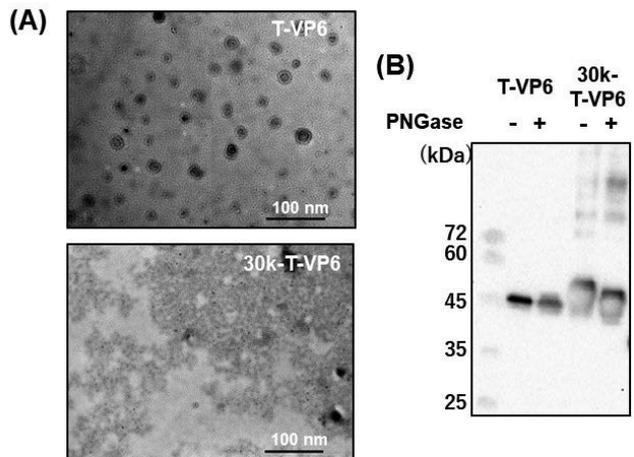


図 2. 精製した VP6 の特徴,
(A) TEM 像, (B) PNGase F 処理

VP7-PA と 30k-T- Δ VP7 にも N 型糖鎖が付加されていることが示唆された。また VP7-PA と 30k-T- Δ VP7 の形態を顕微鏡で確認したところ、共に数 nm の微小な粒子しか確認されなかったが、シヨ糖密度勾配遠心分離の結果、沈降の度合いに違いがあった。このことから VP7-PA と 30k-T- Δ VP7 で形態に違いがあることが示唆された。

本研究ではカイコ幼虫でブタロタウイルス A の構造タンパク質である VP6 と VP7 の発現および精製を行い、T-VP6 と 30k-T- Δ VP7 に関しては、それぞれ 112 頭、545 頭のカイコから約 37 mg と約 27 mg の精製タンパク質を得ることができた。また、カイコがブタロタウイルス A ワクチン開発の生産宿主として優れていることを示すと同時に、VLP ワクチン開発の可能性をも示すことができた。今後、カイコで調製したこれら組換え構造タンパク質のワクチンとしての効果をブタを用いた攻撃試験で検証する予定である。

文 献

- 1) Valasova *et al.*: *Vaccines*, **9**, 48 (2017).
- 2) Kato *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 459–470 (2010).
- 3) Usami *et al.*: *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 246–250 (2010).
- 4) Motohashi *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 564–569 (2005).

耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属吸着プロセス

高野 力¹・中島 一紀¹・川崎 了¹・青柳 秀紀^{2*}

¹北海道大学大学院工学研究院, ²筑波大学 生命環境系

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学 生命環境系

Tel: 029-853-7212 Fax: 029-853-4605

E-mail: aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

電子機器の需要増大や、SDGs の観点から、使用済み金属のリサイクルの重要性が高まっている。著者らはこれまでに、環境負荷を低減した金属リサイクルを実現するため、中性条件下で増殖し、強酸性条件下で生存可能な耐酸性細菌を用いて、pH 1.5 条件下での金属吸着プロセスを構築した。本研究では、金属濃度の高い条件 (Co, Cu, Li, Mn, Ni 各 1 g/L) への適用と、より高効率な金属吸着剤の開発を目的として、金属吸着に關与するタンパク質の特定を試みた。種々検討した結果、金属濃度の高い条件下では、金属濃度の低い条件 (100 mg/L) と異なり、*Priestia* sp. Mn7 株が優れた処理効率を示した。また、各菌株のタンパク質発現の比較から、強酸性条件下での金属吸着に關与するタンパク質の存在が示唆された。

背景

5G 通信や、Internet of Things、電気自動車の普及に伴い、電子機器に使用される金属の需要は急増しており、2050 年には現在の約 3 倍に増加すると予測されている¹⁾。鉱山由来の一次資源のみで増加分を賄うことは困難である。二次資源として、使用済み電子機器に由来する電子廃棄物が注目されている。電子廃棄物は、有価金属を多く含むことに加え、適切な処理を行わないと重金属による環境汚染を引き起こす懸念があることから、リサイクル技術の確立が求められる。現在、主流となっているのは、強酸を用いて金属イオンを浸出したのち、溶媒抽出、中和沈殿等により金属を回収する化学的リサイクル法である。この方法は、(a) 多量のエネルギーや中和剤を必要とする、(b) 有機溶媒を使用する、等の点から、一部の金属にしか適用できず、環境負荷も大きい²⁾。

生物工学的な代替手法として、細菌や植物の細胞表層に金属を吸着するバイオソープション (Biosorption) に関する研究が行われている^{3,4)}。しかし、その多くは中性条件下での検討であり、酸浸出液との pH の乖離が大きく、中和処理が必須となる (図 1A)。

この現状を踏まえ、我々は、強酸性条件下での金属吸着を基にした、新規な金属リサイクルシステムのコンセプト (図 1B) を考案した。これまでに、中性条件下で高い増殖能力を示し、強酸性条件下で生存可能な耐酸性細菌を複数単離し、強酸性条件下での金属吸着能力の評価を行ってきた。本研究では、耐酸性細菌由

来の金属吸着材の開発を目的として、金属濃度の高い条件下での金属吸着挙動や、金属吸着処理による耐酸性細菌のタンパク質発現の変化について検討を行った。

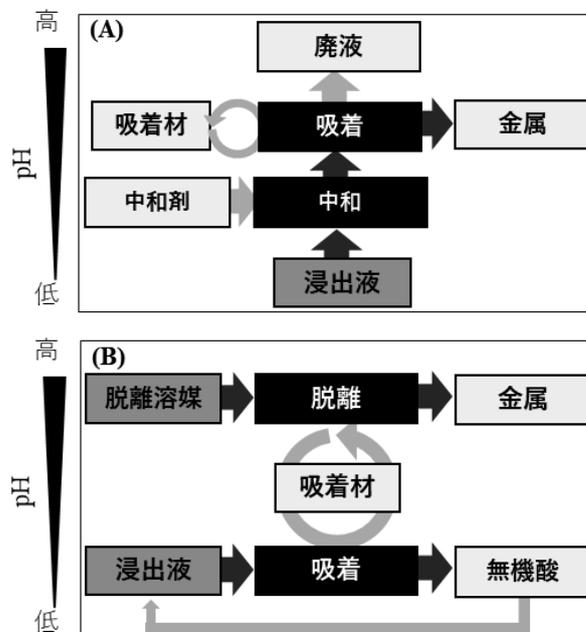


図 1 金属リサイクルプロセスの模式図.

- (A) 従来のプロセスでは中和剤の投入が必要。
- (B) 新規なコンセプトでは中和処理が不要であり、吸着材や浸出液の再利用によるコスト抑制が可能。

方法

これまでに我々が独自に単離培養、獲得した、耐酸性と金属吸着能力を有する、*Comamonas* sp. HTL、*Enterobacter* sp. MnA、*Pseudomonas* sp. MS3、*Priestia* sp. Mn7 の各菌株と、中性条件下での金属吸着能力を有するモデル菌株の *Micrococcus luteus* JCM1464 を用いて、強酸性条件下での金属吸着プロセスを構築した。模擬金属浸出液 (pH 1.5, Co, Cu, Li, Mn, Ni を各 100 mg/L または 1 g/L 含む) に 5 種類の菌株を順次添加、回収して、それぞれの菌株について、各金属に対する吸着能力と選択性を評価した。

次に、各単離菌株について、模擬金属浸出液からの金属吸着処理と、金属イオンを含まない酸性溶液中での処理を行い、可溶性、不溶性それぞれのタンパク質を抽出した。二次元電気泳動によりタンパク質発現を比較した。発現が変化したスポットをゲルから切り出し、トリプシンで消化したのち質量分析によりタンパク質の同定を試みた。

結果と考察

5 菌株を用いた金属吸着プロセスにおいて、金属吸着量が最大となったのは *M. luteus* 1464 株 (179.38 mg/g-dry cell)、次いで *Priestia* sp. Mn7 株 (91.95) であった (図 2)。しかし、*M. luteus* JCM1464 株は菌体生産に高濃度の培地と長時間の培養が必要であり、コスト増加の要因となるため、*Priestia* sp. Mn7 株が、強酸性条件下での金属吸着に適した菌株であると評価した。また、金属濃度 100 mg/L で高い金属吸着能力を示した菌株 (*Comamonas* sp. HTL、*Pseudomonas* sp. MS3) の吸着率が、金属濃度 1 g/L の条件では低下したことから、最大吸着容量が低いことが示唆された。

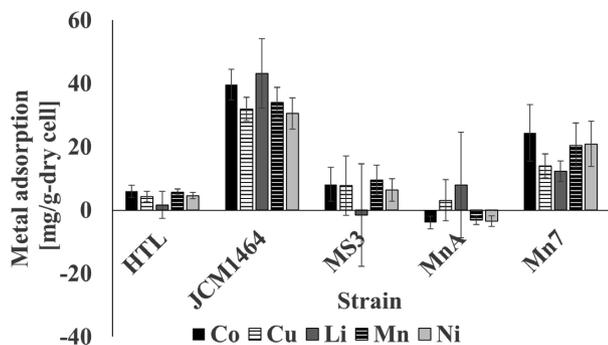


図 2 pH 1.5 条件下での金属吸着処理における各菌株の金属吸着量 [mg/g-dry cell]。 *M. luteus* JCM1464 株と *Priestia* sp. Mn7 株が高い金属吸着量を示した。

菌体を吸着材として用いる手法では、従来の化学的

法や、中性条件下でのバイオソープション^{3,4)}と比べて十分な金属吸着効率に達しないことから、耐酸性細菌のタンパク質を利用した、強酸性条件下で使用可能な吸着材の開発を提案した。その基礎的知見を得るため、各菌株から可溶性タンパク質、不溶性タンパク質を抽出し、発現を比較した結果、SDS-PAGE 後のゲルにおいて、金属存在下でのみ発現したスポットや、発現が促進されたスポットが存在した (図 3)。これらのスポットを形成したタンパク質は、強酸性条件下での金属吸着に関与している可能性が示唆された。現在、質量分析によるタンパク質の同定について検討中である。

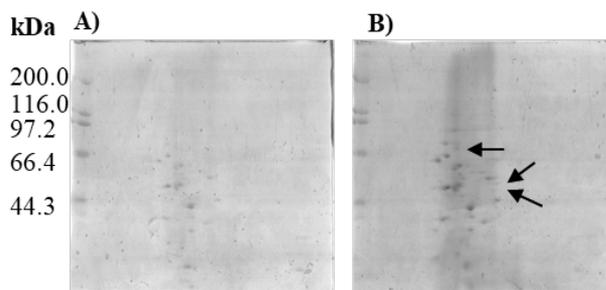


図 3 二次元電気泳動による *Priestia* sp. Mn7 株の可溶性タンパク質発現パターンの比較。金属不存在条件下 A) と比べて、金属存在条件下 B) では発現が促進されるタンパク質 (→) が見られた。

結論

本研究では、高濃度の模擬金属浸出液中での金属吸着処理を行い、各菌株の吸着挙動の評価と、強酸性条件下での金属吸着に関与するタンパク質の同定を試みた。その結果、(1) 菌株によって適用可能な金属濃度が異なる、(2) 金属吸着プロセスを構築する場合、菌体の生産効率と目的とする金属の吸着効率の両面から評価する必要がある、(3) 強酸性条件下での金属吸着に関与するタンパク質が存在する、ことが示唆された。今後、吸着能力の高い菌体の探索、菌体生産効率の改善や、タンパク質を活用した金属吸着材の開発により、強酸性条件下における金属吸着プロセスの効率向上に取り組む予定である。

文献

- 1) Elshkaki et al.: *Environ. Sci. Technol.*, **52**, 2491-2497 (2018).
- 2) Bruckner et al.: *Metals*, **10**, 1107 (2020).
- 3) Isildar et al.: *J. Hazard. Mater.*, **362**, 467-481 (2019).
- 4) Rizvi et al.: *Environ. Monit. Assess.*, **192**, 801 (2020).

Effect of Electromagnetic Field on Plant Growth and Microbial Rhizosphere

Jeong Wook Jo¹, Ju Yeon Lee¹, Sung Woo Yang¹, Seung Jun Kim¹, Hak Jin Song¹, Yong Keun Choi¹, Hyung Joo Kim^{1*}

¹Department of Biological Engineering, Konkuk University
Department of Biological Engineering, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea
Tel: +82-2-2049-6111
E-mail: hyungkim@konkuk.ac.kr

Electromagnetic field (EMF) has been recognized as an important environmental factor for plants. Therefore, in this study, we aimed to examine the effect of EMF on plant growth and rhizosphere microorganisms. *Raphanus sativus* was used as the experimental plant. The experiments were conducted in a system comprising a frame for a tube, coil-wound plastic bobbin, soil, seeds, and power supply. After plant exposure to EMF, the concentration of the plant growth hormone, indole-3-acetic acid (IAA), and the lengths of stems and roots were measured. The microbes in the rhizosphere were analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The stem and roots showed maximum growth in the 48-h EMF stimulation group (113.36 ± 0.16 mm and 93.53 ± 1.97 mm, respectively). IAA concentration was minimum in the 48-h EMF stimulation group (3.24 ± 0.47 mg/L). DGGE results showed that EMF application induced differences in the bacterial rhizosphere population. Our study demonstrated that the application of EMF for plant could be a convenient and inexpensive plant growth promoting system.

1. Introduction

In recent years, various natural and artificial factors that can promote plant growth and productivity have been investigated. Among them, the earth's electromagnetic field (EMF) has been recognized as an important environmental factor for plants¹⁾. In this study, we applied an artificial EMF during plant growth and investigated its effects on plant growth. We monitored the length of plant stems and roots, variations in plant growth hormone concentration, and alternations in the microbial rhizosphere during artificial EMF exposure. EMF was applied using a coil-type generator. For plant hormone analysis, we selected indole-3-acetic acid (IAA)—the most common plant growth hormone in many plant species²⁾. The microbes in the rhizosphere were analyzed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

2. Materials and Methods

In this study, we used *Raphanus sativus* (seed) as the experimental plant. The experimental assembly and processes for exposure of plants to EMF are shown schematically in Figure 1. The tubes (D: 17 mm, L: 120 mm) were filled with 3 g of organic soil for plant seed germination and cultivation. The cultivation was carried out under illumination with an intensity of $80 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ at 22–25 °C. The coil-type EMF generator was constructed using a 0.2 mm copper wire wound 100 times around the tube, and the ends of the wire were connected to the power supply. The magnetic flux density at the center of the coil bobbin was approximately 0.1–0.15 mT at 0.5 VDC application. Magnetic flux density was measured using a tesla meter. Five seeds were added to each tube and irrigated with 10 mL of distilled water. When sprouts were observed in

the tubes (generally three days after seeding), the plants (*R. sativus*) in each tube were exposed to EMF for 0 (control), 24, 48, and 72 h. After seven days of cultivation, the plants were harvested, and their stem and root lengths and IAA concentration were determined. In addition, the soil samples in the tubes were collected to analyze the rhizospheres.

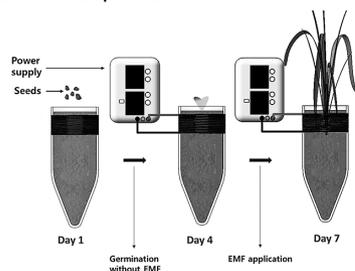


FIG 1. Schematic representation of the experimental assembly for the electromagnetic field application to plants

3. Results and Discussion

The effect of various EMF application times on the stem and root lengths of plants is shown in Figure 2. The results indicated that 48 h of EMF application caused the maximum growth in both stems and roots. The stem and root lengths showed an increase of 23.15% and 23.35%, respectively, compared with those of the control (i.e., plants without EMF application). Plant hormone analysis revealed that 48 h of EMF exposure resulted in minimum plant IAA concentration. Previous research has shown that the endogenous IAA concentration of plants is inversely proportional to plant growth rate³. DGGE analysis revealed that EMF application resulted in noticeable changes in the rhizobacterial flora after seven days of cultivation (FIG 3), indicating that the interaction between the microbial rhizosphere and plants is an important parameter for plant growth⁴. Therefore, from these observations, it could be deduced that the application of EMF during plant growth may help regulate plant growth rate and metabolism.

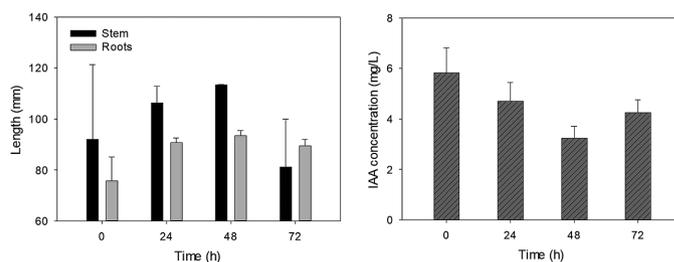


FIG 2. Stem and root lengths and indole-3-acetic acid concentrations for various electromagnetic field application times

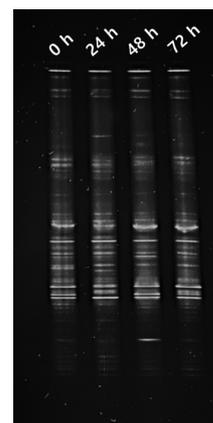


FIG 3. Denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of the soil samples for various electromagnetic field application times

4. Conclusion

The results of this study showed that exposing plants to EMF induces changes in both plant growth and endogenous hormone concentration. Maximum growth was observed after 48 h of application. However, at 72 h, the growth rates decreased compared with those after 48 h of EMF application. These applications also changed the microbial rhizospheres. Further research is needed to determine the beneficial effects of EMF on plants.

References

- 1) Maffei, M. E. *Front. Plant Sci.* **445**, 1–15, 2014
- 2) Bunsangiam, S. *et al. Sci. Rep.* **11**, 1–13, 2021
- 3) Tanimoto, E. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**, 249–265, 2005
- 4) Nihorimbere, V. *et al. Biotechnol Agron Soc Environ.* **15**, 327–337, 2011

最小サイズの発光酵素「picALuc」の開発とその応用

大室 (松山) 有紀^{1*}・古田 忠臣²・松井 勇人¹・叶井 正樹¹・上田 宏³

¹島津製作所基盤技術研究所, ²東京工業大学生命理工学院,

³東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所

〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-9-4 島津製作所基盤技術研究所

Tel: 0774-39-3397 Fax: 0774-39-3829

E-mail: omuro.yuki.cc9@shimadzu.co.jp

発光酵素は、幅広い分野でレポータータンパク質として使用されている。発光酵素には、高い発光値、高い熱安定性、そして立体障害による標的の機能阻害を防ぐサイズの小ささが求められる。

我々は本研究において、カイアシ類由来人工発光酵素 ALuc (21 kDa) を 13 kDa まで削ることで最小サイズの発光酵素「picALuc」を作製した。picALuc は高い発光値および高い熱安定性を示した。また、そのアプリケーションとして、picALuc または NanoLuc と蛍光タンパク質とをプロテアーゼ認識配列を介して融合させたプローブをプロテアーゼ処理した結果、picALuc プローブにおいてより高い生物発光共鳴エネルギー (BRET) シグナルが得られた。さらに、picALuc を用いたタンパク質断片相補アッセイ (PCA) によりラパマイシン依存的な FKBP-FRB 間相互作用を測定した結果、最大で 12 倍の Signal/Background (S/N) 比を示した。

これらの結果から、picALuc は、レポータータンパク質としてならびに分子間相互作用の検出において、とても有用性の高い新規発光酵素であると考えられる。

背景と目的

発光酵素は、基礎生物学から検査・診断までの幅広い分野において、高感度なレポータータンパク質として利用されている。従来、ホタル由来発光酵素 FLuc (62 kDa)・ウミシイタケ由来発光酵素 RLuc (36 kDa) がよく使用されてきたが、2001 年に、カイアシ類由来発光酵素 GLuc が同定された。GLuc は、シグナルペプチドを除き 18 kDa と小サイズである上、FLuc・RLuc より 200 倍以上明るく、熱耐性も高い¹⁾。さらに最近、より明るく熱耐性が高い小サイズの発光酵素として TurboLuc (16 kDa)²⁾・NanoLuc (19 kDa)³⁾・ALuc (21 kDa)⁴⁾などが作製されてきた。発光値の高さは測定の感度に、熱耐性の高さは測定の安定性や適用範囲の広さに繋がる。さらにサイズの小ささは、標的タンパク質に対する立体障害の抑制、発現時のフォールディングの容易さ、そして創薬分野における低分子化合物の発光での有用性といった点などにおいてメリットがある。

当初、我々は、ALuc を利用した分子間相互作用検出系 Protein-fragment Complementation Assay (PCA) の構築を目指していた。PCA は、レポータータンパク質を分割し相互作用パートナーに各々融合させ、相互作用時に分割断片が近接することにより、元構造を取

ることで回復したレポータータンパク質の活性等を測定する手法である (図 4 左上参照)。ALuc を利用した PCA の開発中、我々は偶然にも、N 末端から 49 個のアミノ酸を削った断片のみでさえ発光値を維持していることを見出した。この ALuc 断片のサイズは 15.6 kDa で、TurboLuc (15.8 kDa) よりわずかに小さかった。そこで本研究では、我々は ALuc をより小型化することによる有用なレポータータンパク質の創出ならびにその応用を目指した。

結果

picALuc の作製

ALuc の欠損変異体を、アフリカミドリザル腎由来細胞 Cos-7 細胞で一過性分泌発現をさせ、上清に基質を添加し発光値を測定した (図 1)。上述の N 末端 49 アミノ酸を削った (欠損変異体) ΔN1 は全長 ALuc と同等の発光値を示したが、N 末端 60 アミノ酸を削った ΔN2 の発光値は著しく低かった。一方、C 末端 18 アミノ酸 (ループ領域) を削った ΔC1 は発光値を維持していたものの、さらにループ-ヘリックス-ループ領域 (16 アミノ酸) まで削った ΔC2 の発光値は非常に低かった。そこで、ΔN1 から C 末端 18 アミノ酸を削った ΔN1C1 の発光値を測定したところ、ほぼ発光値を維持してい

た。さらに $\Delta N1C1$ のN末端を4アミノ酸、C末端を2アミノ酸削った変異体の発光値は全長ALucと同等であった。我々は、この欠損変異体を、元のALucの文字を残し、小さい(pico)と光る(ピカッ)という意味を加え「picALuc」と名付けた。picALucのサイズは、120アミノ酸、13 kDaであり、明るい発光酵素の中で最小サイズである⁵⁾。

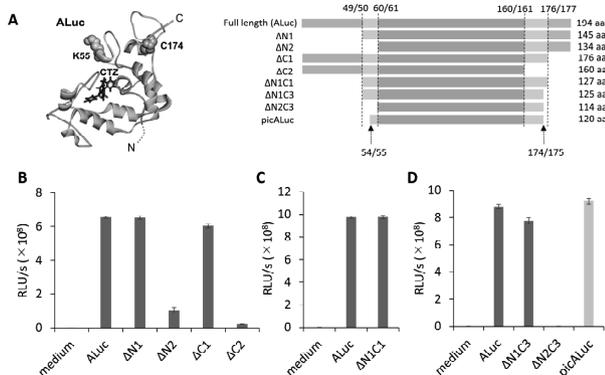


図1. picALucの作製 (A) ALuc構造モデルとALuc欠損変異体。(B-D) Cos-7細胞培養上清での各ALuc欠損変異体の発光値。 [文献5)より改変]

NanoLuc・ALucとの比較

既存の明るい発光酵素と比較するため、等濃度(68 nM)のNanoLuc・ALuc・picALucの発光値を測定した結果、ALuc・picALucは、NanoLucよりも高濃度の基質を必要とするものの、同程度の最大発光値を示した(図2A)。また、picALucの熱安定性については、ALucよりやや低いものの、NanoLucと比較して同等以上であった(図2B)。

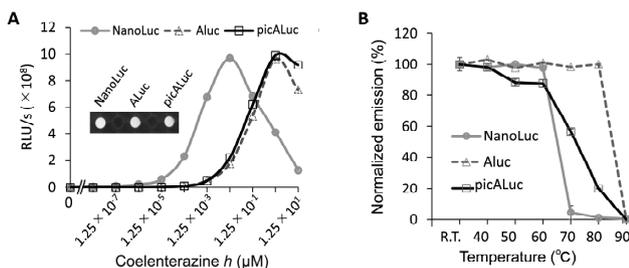


図2. picALuc・ALuc・NanoLucの比較 (A) 発光値。(B) 熱安定性。各温度で10分間のインキュベーション後に発光値を測定。 [文献5)より改変]

アプリケーション1: picALucを利用したBRET

生物発光共鳴エネルギーBioluminescent energy transfer (BRET)のシグナルは、発光酵素-蛍光タンパク質間の距離の6乗に反比例するため、原理的に発光酵素のサイズが小さいほどシグナルが大きくなる。そこで、発光酵素(picALucまたはNanoLuc)と蛍光タンパク質とをプロテアーゼ認識配列を介して融合させ、プロテアーゼ添加による認識配列切断により、発光酵素と蛍光タンパク質を解離させることで、プロテアーゼ添加前のBRETシグナルを測定した。まず、発光酵素

とYFPとをTEV protease認識配列で繋いだ場合、NanoLucとpicALucの発光スペクトルはほぼ同じであり、BRETシグナルは、picALucを利用した方がNanoLucを利用した場合よりも1.7倍高かった(図3)。また、発光酵素とmCherryとをトロンビン認識配列で繋いだ場合においても、BRETシグナルは、picALucを利用した方がNanoLucを利用した場合よりも2.5倍高かった。

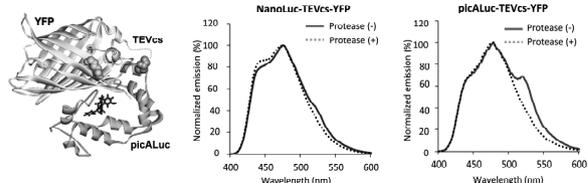


図3. BRETアプリケーション [文献5)より改変]

アプリケーション2: picALucを利用したPCA

picALucを利用したPCAを構築するために、ループ領域内でpicALucを2分割した。ラパマイシン依存的に相互作用をするFKBPとFRBにpicALucの断片を各々融合したプローブを大腸菌で発現させ作製した。各50 nMのプローブを混合し、50nMラパマイシンを添加した結果、発光値(S/B比)が12倍に増加した(図4)。

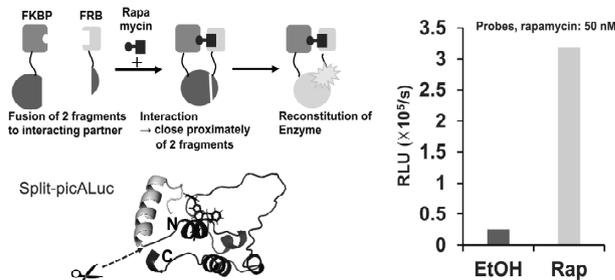


図4. PCAアプリケーション

結論

我々は、明るい発光酵素の中で最小サイズ(13 kDa)である発光酵素picALucを開発した。そして、picALucアプリケーションとして、BRETを利用した反応の検出に有用であること、さらにPCAを利用した相互作用解析にも適用可能であることを示した。

文 献

- 1) S Markova *et al.* *Photochem. Photobiol.* **95**, 705–721 (2019)
- 2) DS Auld *et al.* *Biochemistry* **57**, 4700–4706 (2018)
- 3) MP Hall *et al.* *ACS Chem. Biol.* **7**, 1848–1857 (2012)
- 4) SB Kim *et al.* *Bioconjug. Chem.* **24**, 2067–2075 (2013)
- 5) Y Ohmuro-Matsuyama, T Furuta *et al.* *ACS Chem. Biol.* **17**, 864–872 (2022)

糖鎖成分群毎の抗体分取を可能とする アルカリ安定化 Fc 受容体固定化分離剤の開発

谷口 直優¹・早川 勇太¹・寺尾 陽介^{1*}

¹ 東ソー株式会社

〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1

Tel: 0467-77-2212 Fax: 0467-77-5590

E-mail: yousuke-terao-uc@tosoh.co.jp

動物細胞で培養生産される抗体医薬品は多様な糖鎖修飾を受けた混合物として生産される。この糖鎖の構造が薬効に関与するため、糖鎖構造を制御した抗体医薬品の開発が進展している。

当社は、その開発支援を目指し、糖鎖成分群毎の（活性の大きさ毎の）抗体分離が可能な Fc 受容体固定化分離剤を開発した。さらに、抗体製造現場における抗体分取用分離剤としての利用をめざし、耐アルカリ性能、動的吸着性能を向上させた分離剤を開発した。本開発品は製造スケールにおいて活性の大きさ毎の抗体分取を可能とするため、今後の抗体医薬品製造現場における多様な用途での利用に期待ができる。

1. 背景と目的

動物細胞で培養生産される抗体医薬品は、Fc 領域の特定位置に動物細胞特有の糖鎖修飾がなされ、多様な糖鎖成分をもった混合物として生産される。この糖鎖構造が抗体の細胞障害活性 (ADCC 活性) に関与するため¹⁾、糖鎖構造を制御した、高機能な抗体医薬品の開発が進展している。その開発を支援する技術、例えば糖鎖成分群毎に抗体を成分分離でき、開発抗体の性能や品質を分析可能な技術の構築が求められていた。

そこで当社では、抗体の Fc 領域に特異的に結合する Fc 受容体 (FcR) をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー用分離剤を開発した²⁾ (TSKgel®FcR-III A-NPR, TSKgel®FcR-III A-5PW として販売中)。FcR は抗体に対して糖鎖成分毎に異なる結合力を示すため、本分離剤により、糖鎖成分群毎の分離、つまり活性の大きさ毎の抗体成分分離が可能となった。この分離した糖鎖成分比を算出し評価することで、抗体の性能や品質を迅速に分析できる技術の構築に成功した。

本報告では、分析用途だけではなく、抗体を活性の大きさ毎に分取する分取用途として、製造現場で必要とされるアルカリ洗浄を可能とする耐アルカリ性能、ならびに大容量処理を可能とする高吸着性能を有する新規分取用分離剤の開発をおこなったので報告する。

2. 材料と方法

(1) アルカリ安定化 FcR の作製

FcR (ヒト Fcγ Receptor IIIa) のアルカリ安定性を向上させるため、ランダム変異導入による安定化変異体の作製をエラープローン PCR 法を用いておこない、耐アルカリ性能が向上した FcR 遺伝子を作製した。高密度培養法により、大腸菌内に FcR を発現させた後、抽出、精製の工程を経て高純度 FcR を取得した。

(2) FcR 固定化分離剤および FcR カラムの作製

固定化用官能基を導入した、分取用ベース基材 Toyopearl 樹脂 (多孔性、平均粒子径 45 μm) に対して、抗体吸着性能向上を指向した固定化法により FcR を固定化した。作製した FcR 固定化分離剤を I. D. 4.6 mm × 75 mm (容量 1.2 mL) カラムへと充填し、FcR カラムを作製した。

(3) FcR カラムの性能評価

a. **耐アルカリ性能の評価** 抗体精製を模した連続クロマト試験 (平衡化、抗体吸着、洗浄、溶出、アルカリ洗浄 (0.1 M NaOH, 15 分, 25°Cにて洗浄: 抗体精製現場での洗浄条件を参照)、再平衡化の各ステップを繰り返し実施)をおこなった。連続 100 回繰り返し使用後の抗体吸着量維持率を算出することで、FcR カラムの耐アルカリ性能を評価した。

b. **抗体吸着性能の評価** 作製したカラムに目的抗体を種々の接触時間にて負荷し、負荷濃度の 10%破過容

量から、充填剤の動的吸着量を算出し、吸着性能を評価した。

c. 抗体分離性能の評価 作製した FcR カラムを用いて、目的抗体を中性緩衝液で結合させた後、pH を 6.0 から 3.0 付近まで段階的に下げるステップ溶出法により抗体を溶出し、分離クロマトグラムを得た。分離された抗体をピークごとに分取し、分取フラクションに含まれている抗体の糖鎖構造を LC-MS 解析により評価した。

3. 結果

a. 耐アルカリ性能の評価 作製したカラムにおいて、アルカリ洗浄工程を含む連続 100 回クロマト試験後も、抗体吸着性能が 90%以上保持されていた (図 1)。

b. 抗体吸着性能の評価 作製したカラムは、接触時間が 5 分以上の条件にて、動的吸着量 45g/L 以上の性能を示した。この値は、当社開発ラボスケール分取用カラム「TSKgel® FcR-III A-5PW」の 3 倍以上の性能を示す値であり、吸着性能の向上を確認した (図 2)。

c. 抗体分離性能の評価 pH 幅 0.2 毎のステップ溶出により、pH 4.6-3.8 の範囲で抗体を複数のピークに溶出/分離可能であることを確認した (図 3)。また図 4 の糖鎖構造解析により、溶出時間が遅い画分 (図 3 中 F3, F4) になる程、糖鎖の末端にガラクトースが付加された G1F, G2F 糖鎖を含む抗体成分の割合が大きくなること判明した (図 4)。すなわち、本カラムの利用により、異なる糖鎖構造を持つ抗体成分群毎の分離/分取が可能であることを見出した。また G1F, G2F 成分の割合が大きくなる程、抗体活性が大きくなることから³⁾、抗体を活性の大きさ毎に分離/分取可能であることが示された。

さらに複数の抗体医薬品 (リツキサン, アクテムラ, ハーセプチン等) においても、同様に抗体分離/分取が可能であったことから、種々の抗体医薬品に対する本カラムの汎用性が示唆された。

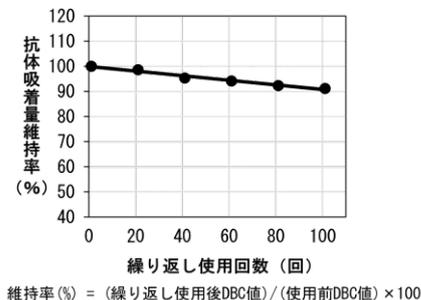


図 1. FcR 固定化分離剤の耐アルカリ性能評価

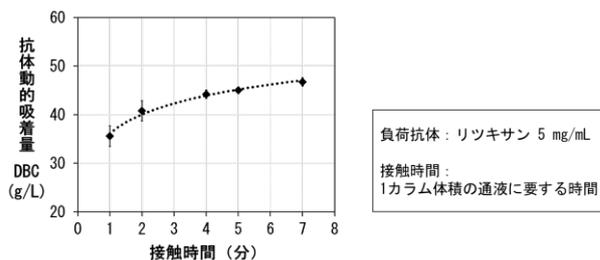


図 2. 抗体動的吸着量 DBC の評価

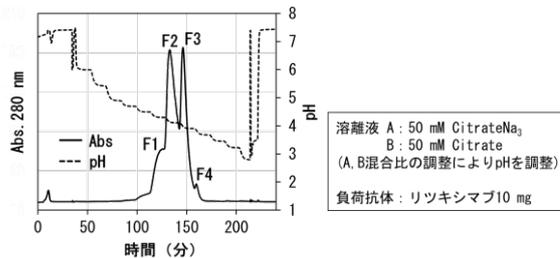


図 3. 抗体分離クロマトグラム

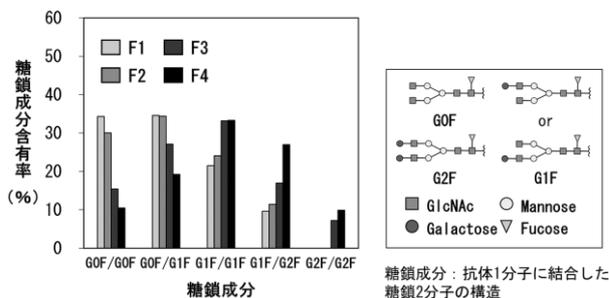


図 4. 糖鎖構造解析

4. まとめと今後の展望

開発 FcR 固定化分離剤は、抗体製造現場での利用も検討可能な耐アルカリ性能、抗体吸着性能を有し、かつ糖鎖成分群毎の (活性の大きさ毎の) 抗体分取を可能とした。現在は本開発品の上市に向け、外部機関における顧客評価を依頼中である。今後、さらなる評価先の探索ならびに、本開発品の他用途の探索を進めていく。

文 献

- 1) Jefferis, R., *Trends in Glycoscience and Glyco-technology*, **21**, 105-117 (2009).
- 2) Tanaka, T *et al.*, *Tosoh Research & Technology Review*, **63**, 77-82 (2019).
- 3) Kiyoshi, M *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 1-11(2018).

アニサキスと *C. elegans* の表面機能化法の開発と Living Drug Delivery System への応用可能性の検討

境 慎司*・Wildan Mubarak・小嶋 勝

大阪大学大学院基礎工学研究科

〒560-8531 豊中市待兼山町 1-3 大阪大学大学院基礎工学研究科

Tel: 06-6850-6252

E-mail: sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

生存を損なうことなく生物の表面を機能化できれば、その生物の有する機能を活用した新たな利用法が生まれると期待される。本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) およびアニサキスの表面に西洋わさび由来ペルオキシダーゼを固定し、フェノール性水酸基を有する高分子をゲル化させることで、厚さ約 10 μm のタンパク質や多糖、合成高分子など様々な素材のゲル薄膜でスーツを着せるように表面を覆う方法を開発した。この方法で表面にゲル薄膜を形成させた *C. elegans* は、その前後で生存率は変化せず、移動速度、化学走性とも低下しなかった。さらに、このゲル薄膜にカタラーゼを含ませると、過酸化水素から線虫を保護するシールドとして機能した。また、ゲル薄膜にグルコースオキシダーゼを含ませると、生体外の検討において培養液中のグルコースから過酸化水素を生成し、周囲のガン細胞を殺すことができた。

緒言

人類は、生物の有する機能やそれをもたらす形態や構造などを利用・模倣しながら生活を豊かにしてきた。たとえば、酵母の表面を機能化してバイオ燃料・グリーン化学品生産に利用する検討が行われている¹⁾。また、動物細胞の表面を機能化して利用する検討も行われており、細胞表面にヘパリンを固定化することで、細胞や臓器移植時の虚血再灌流障害からの細胞を保護に有用となることが報告されている²⁾。

本研究では、体を動かしながら移動する線虫の表面を、非遺伝子的手法により機能化する方法について検討を行った。線虫は、周囲に存在する特定の化学物質に対して方向性を持った行動をする化学走性を有することが知られている。最近では、*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) が、がんの臭いに対する化学走性を有するとして、がん検査に利用されている。なお、この *C. elegans* のがん検査への利用についての検討のきっかけとなったのは、アニサキスによる食中毒を発症した患者の早期胃がんアニサキスが附着していたとの症例報告³⁾とのことである。このような線虫の機能を利用すれば、線虫表面に各種物質を担持することで、特定の場所にその物質を輸送し、作用させ

ることが可能であると考えられる。そして、その実現には任意のタイミングでのアニサキスの殺傷やアレルギー反応の抑制方法の開発などの検討すべき課題はあるものの、アニサキスのがん探知能力を、がんの部位に抗がん剤を送達させて治療を行う Living Drug Delivery System として利用することも期待される。

本研究では、線虫の動きを阻害せず、また、臭いを検知する能力を利用するなどの観点から、分子量 10 万程度の物質も透過する柔軟なヒドロゲルの薄膜を、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) が触媒する架橋形成反応により線虫表面に形成させることに取

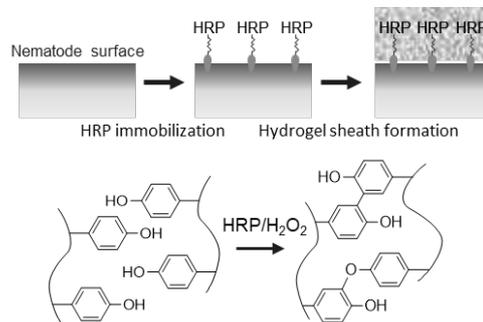


図 1. 線虫表面の機能化と HRP によるゲル薄膜形成時の架橋形成反応模式図.

り組み、酵素を固定することによるゲル薄膜の機能化も試みた（図1）。

実験方法

細胞膜修飾剤 BAM と HRP を結合させて作製した BAM-HRP をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解し、線虫を 10 分間浸した。洗浄後、フェノール性水酸基とフルオレセインを導入したアルギン酸誘導体（Alg-Ph-AF）および H₂O₂ をそれぞれ 1.0% と 1.0mM で含む PBS に 10 分間浸し、ゲル薄膜を形成させた。酵素を固定化する検討ではフェノール性水酸基を修飾したカタラーゼもしくはグルコースオキシダーゼを Alg-Ph-AF と H₂O₂ を含む PBS に溶解させた。

化学走性の評価は Alg-Ph ゲル薄膜を形成させた *C. elegans* を用い、低濃度で誘引行動を示すことが知られているイソアミルアルコールを用いて行った。

結果と考察

BAM-HRP を表面に固定した *C. elegans* とアニサキスのいずれを用いた場合にも、Alg-Pg-AF に起因する蛍光が観察された（図2a）。一方で、BAM-HRP を固定しなかった場合には、蛍光が観察されなかったことから、HRP の触媒する架橋形成反応（図1）により、ゲル薄膜が形成されていることがわかった。また、その Alg-Pg-AF ゲルの厚さは約 10 μm であった（図2b）。アニサキスの場合には、蛍光顕微鏡により体表面の凹凸を明確に観察することもできた（図2c）。このゲル薄膜は、Alg-Ph-AF 以外にも、フェノール性水酸基を導入したゼラチンやキトサン、ポリビニルアルコールなどの誘導体からも作製することができ、様々な材料からゲル薄膜を作製できることがわかった。

ゲル薄膜形成後の生存率を評価したところ、BAM-HRP の表面固定、Alg-Ph-AF ゲル薄膜形成のいずれの後にも生存率は 90% 以上であり、これらの線虫の生存を損なわない方法であることがわかった。また、

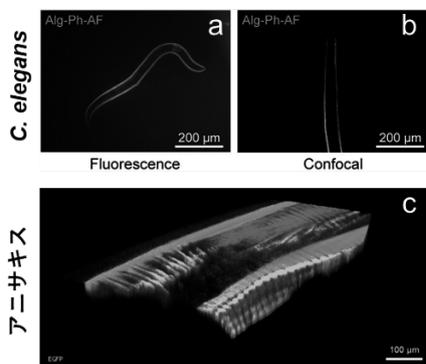


図2. ゲル薄膜を形成させた *C. elegans* とアニサキスの蛍光顕微鏡写真⁴⁾。

ゲル薄膜形成後の *C. elegans* の移動速度は、ゲル薄膜形成前のもものと比較してほぼ変化はなく、イソアミルアルコールに誘引される線虫の程度にも有意な差はなかった。これらの結果は、形成したゲル薄膜が柔軟であるとともに、イソアミルアルコールなどの物質を良好に透過することを示している。

ゲル薄膜の機能化の検討として、フェノール性水酸基を修飾したカタラーゼを *C. elegans* 表面のゲル薄膜に固定化したところ、1 M H₂O₂ 水溶液中において、ゲル薄膜を形成させていないものとカタラーゼを含まないゲル薄膜を形成させたものよりも高い生存率を示した（図3）。さらに、アニサキス表面に形成させるゲル薄膜中に、フェノール性水酸基を修飾したグルコースオキシダーゼを固定化し、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞を含む培養液中に入れたところ、24 時間後には大部分の細胞を殺すことができた。これらの結果は、ゲル薄膜にさまざまな機能を付与でき、その機能と線虫の機能をあわせた利用が可能であることを示す。

アニサキスのがん治療への利用については、不要になった際の殺傷法や適当な担持物質、アレルギーの抑制など、検討が必要な課題はあるものの、本研究で得られた結果は、その可能性を期待させるものである。

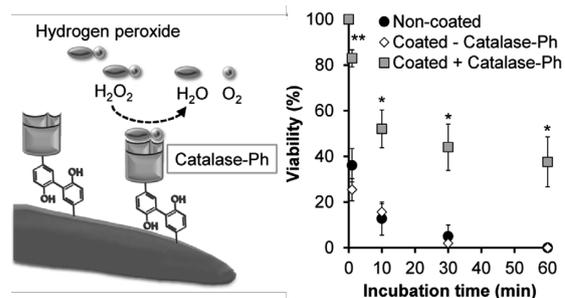


図3. ゲル薄膜に含まれるカタラーゼによる H₂O₂ 分解模式図と 1M H₂O₂ に浸して 60 分間の生存率変化⁴⁾。

結言

線虫の表面機能化のために、HRP を使ったゲル薄膜形成法の開発に取り組んだ。そして、この方法により線虫の生存を損なうことなく、さまざまな機能を有するゲル薄膜を形成することができるようになった。今後、Living Drug Delivery System への応用も含めた検討を行っていく。

文献

- 1) 近藤昭彦, *生物工学会誌*, **89**, 154-160 (2011).
- 2) 寺村裕治, *Organ Biology*, **28**, 128-135 (2021).
- 3) Sonoda H et al., *Surg. Today*, **45**, 1321-5 (2015).
- 4) Mubarok W et al., *Mater Today Bio*, **15**, 100328 (2022).

塑性流体を用いたヒト iPS 細胞の大量培養

山本 陸^{1*}・都倉 知浩^{1, 2}・紀ノ岡 正博¹

¹大阪大学大学院工学研究科, ²藤森工業株式会社
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 大阪大学大学院工学研究科
Tel: 06-6879-7445 Fax: 06-6879-4246
E-mail: yamamoto_riku@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) は大量培養工程の構築が必要とされる一方で, せん断応力への耐性が低く, またその培地は起泡性が高いため, 現状として本細胞の培養は, 上面通気での酸素供給が可能な $\leq 10^1$ L の規模に限られている. 本研究では塑性流体の利用により, 気泡通気に伴う流動を気泡周囲のみに限定し, また細胞集塊の無攪拌浮遊維持を可能とした. 気泡上昇速度は抑制されガスホールドアップが向上した. 本系において hiPS 細胞は増殖を示し, 無攪拌かつ下部からの気泡通気により酸素供給可能なスケラビリティの高い培養系を構築した.

はじめに

hiPS 細胞は再生医療などへの展開が期待され, 実用化に向けた大量培養工程の構築が必要とされている. これまで微生物や動物細胞に広く用いられてきたタンク型の三次元懸濁培養装置は, 高密度かつ, 省スペース, 省コストで培養が可能であり, スケラビリティの高さから hiPS 細胞培養に対しても応用が期待されている.

このような懸濁環境下において, 足場依存性を持つ hiPS 細胞は, 球状の集塊を形成し増殖する. 一方で集塊径の過度な増大は, 拡散律速や圧迫により増殖を阻害するために¹⁾, 他の集塊との凝集・合がしやすい培養槽内での沈降を抑制する必要がある.

また hiPS 細胞はせん断応力への耐性が非常に低い. 一般にスケールアップに伴い攪拌翼周りのせん断応力は増加するため, 大規模な培養装置では, 従来の攪拌による浮遊維持は困難である. また規模の拡大に伴い深部通気による酸素供給が一般的であったが, 起泡性の高い培地を用いる hiPS 細胞培養では, 気泡導入によるせん断応力の影響や, 発泡層の形成により, 排気系への溢流による圧力損失やコンタミネーション発生のリスクを無視できない.

これらのことから, hiPS 細胞の培養装置設計には, 細胞集塊の過度な凝集を防ぐ分散状態の維持と, 低せん断応力環境, 低泡沫な酸素供給を擁する培養系が求められる.

塑性流体とは液中に微小構造を持つことで, 降伏応

力未満の力では流動せず, 固相のような様相を示す流体である. 降伏応力を超えた力が加わる領域では, 構造が破壊され流動を生じるが, 加力を止めると時間経過とともに微小構造は回復する. このような現象はチキソトロピーと呼ばれている. 比重の小さい細胞集塊は沈降抑制が可能であり, 高分子の利用により hiPS 細胞の浮遊培養が可能な培地も本流体に分類される²⁾.

本研究では, これらの特性を利用することで, 流動を局所かつ一時的なものに抑制し, 気泡通気による酸素供給が可能な培養系の構築を目指した.

材料と方法

ニュートン流体として市販培地を, 塑性流体として市販培地にポリマー溶液を混合した培地を作成した. ノズルとなる単一の針を下部中心に設置したカラム型培養装置 (図 1) にそれぞれの流体を充填して通気を行い, 気泡が上昇する様子を高速度カメラにて撮影し解析を行った. また塑性流体中に hiPS 細胞集塊を播種し, それぞれの通気速度で培養を行った. このとき, みかけの比増殖速度 μ^{app} (h^{-1}) は, 播種時の細胞密度 X_0 (cells/mL) と培養後の細胞密度 X_f (cells/mL), 培養期間 t (h) から, 次の式を用いて算出した.

$$\mu^{app} = \ln(X_f/X_0)/t$$

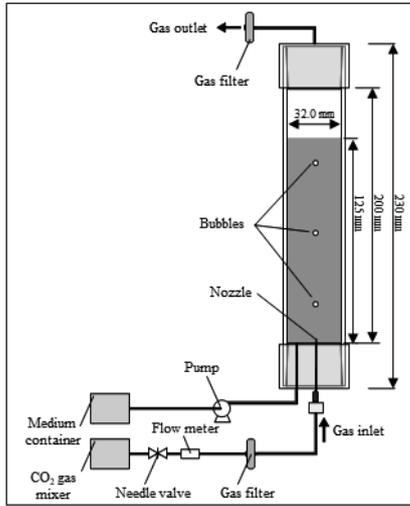


図1 カラム型培養装置の概形

結果と考察

流体中の気泡の挙動

各流体における気泡通気による影響を比較するために、細胞集塊を模した粒子の浮遊状態並びに気泡の挙動を評価した。通気速度が 2.0×10^{-2} vvm 以下の条件では、粒子の浮遊状態は維持され、気泡上昇速度はニュートン流体中と比較し抑制された (図 2A)。これにより気泡は液中に長時間保持され、ガスホールドアップは向上した (図 2B)。塑性流体中の微小構造は上昇する気泡により破壊され、時間経過に伴い回復する。気泡の通過頻度が低い場合、微小構造は再構築され粒子の浮遊維持と気泡上昇抑制が可能となるが、通過頻度が高い場合、構造は維持されず液相となり、気泡上昇速度の増加や粒子の沈降が生じたことが考えられる。

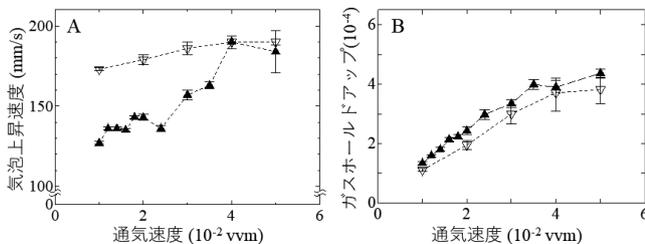


図2 それぞれの通気速度でニュートン流体 (白三角形) と塑性流体 (黒三角形) 中に気泡導入した際の気泡上昇速度 [A] とガスホールドアップ [B]

塑性流体を用いた気泡導入を伴う hiPS 細胞培養

塑性流体を用いた気泡通気を伴う三次元培養系での hiPS 細胞増殖を評価するため、単一ノズルのカラム型培養装置を用いて培養を行った。無通気条件では増殖がみられなかったのに対し (図 3 下部実線)、通気速度の増加とともにみかけの比増殖速度は増加した。これは細胞増殖が気泡通気による酸素供給に依存している

ことを示唆しており、また 2.0×10^{-2} vvm の条件では、従来の上面通気により酸素供給を行う懸濁培養装置と同程度の μ^{app} (図 3 上部破線) を示した。これは気泡通気を伴う本培養系が上面通気と同様に細胞の増殖を妨げず酸素供給可能であることを示唆している。ただし集塊の沈降、合一が生じる 4.0×10^{-2} vvm の条件ではみかけの比増殖速度は小さく、浮遊維持可能な通気条件を維持する必要があることが示された。

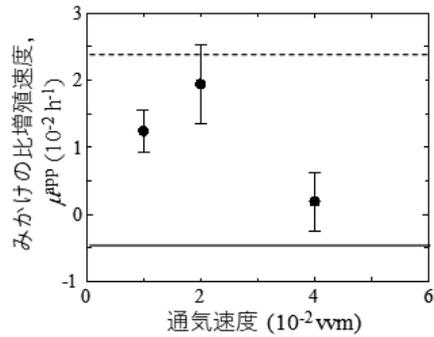


図3 塑性流体を用いた気泡導入を伴う培養系における hiPS 細胞のみかけの比増殖速度。下部実線は無通気条件、上部破線は上面通気を伴う翼攪拌型培養装置でのみかけの比増殖速度の平均値をそれぞれ示す。

今後の展望

本研究により、ベンチスケールの単純なモデルを利用した無攪拌通気培養系が提案された。hiPS 細胞の大量培養を行うためには、このような培養系に加え、スケラビリティの高い周辺技術の開発や、回収・凍結などの前後工程を含めた設計が必要とされる。現在、我々は塑性流体を用いることで、低頻度の攪拌による培養を可能とした培養系を用い、無菌的操作での用事調製や、閉鎖系を維持したまま培地交換を行う工程を検討しており、これまでシングルユースバッグ培養装置を用いて、10 L 規模での hiPS 細胞培養工程の構築を達成している。将来的には、より大規模な培養装置において下部からの酸素供給が必要となることが想定されるため、本研究をベースとした、酸素供給が可能な培養装置設計が必要とされる。

謝辞

本研究はAMEDの課題番号JP19bw0604001の支援を受け行われた。

文献

- 1) Nath S.C., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 469-475 (2017)
- 2) Otsuji T.G., *et al.*, *Stem Cell Reports*, **2**, 734-745 (2015)

高品質セルバンク構築のための 細胞画像を用いた超早期細胞品質評価

竹本悠人¹、陶山隆史²、今井祐太¹、蟹江慧¹、松崎有未^{2,3}、加藤竜司^{1,4*}

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科, ²PuREC 株式会社,
³島根大学医学部, ⁴名古屋大学ナノライフシステム研究所
〒464-8601 名古屋市千種区不老町創薬科学研究館 302 号室
Tel: 052-747-6811 Fax: 052-747-6813
E-mail: kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

要旨

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) は、その分化能や免疫制御能などから再生医療における治療用細胞源として期待されている。さらに近年、MSC は他家細胞治療への応用も承認され、安定かつ安価な治療用細胞として大量製造と品質管理のための技術確立が急務となっている。PuREC 社が開発した Rapidly expanding clones (RECs) は骨髄由来 MSC のシングルセルから取得される超高純度 MSC であり、10 継代以上も高い増殖能を維持可能な培養性能、骨などへの高い分化能など、他家治療用細胞として極めて有望である。しかし、他家の治療用細胞を製造するためには、十分な細胞数・バイアル数を提供可能なセルバンクを効率的に構築することが必須である。さらに、セルバンクの構築には極めて大きなコストがかかるため、ドナーセレクションの段階から高品質なロット、かつ、セルバンクを確実に構築できる将来的な培養維持性能の理解が必要とされる。ところが、現在、このようなセルバンク構築の超初期段階 (ドナーセレクション後の拡大培養の初期) に、将来的な継続培養性能の可能性や、その後培養した細胞の品質の予測を定量的に行える技術は存在していない。この結果、マスターセルバンク構築のためのロットやクローンの「品質予測に基づいた選抜」は現状不可能であり、保険的に大量の候補ロット・クローンの培養・維持がセルバンク構築における大きなコスト問題として現場を圧迫している。

本研究では、REC を用いたセルバンク品質管理の効率化技術として、細胞形態情報解析技術を用いて、培養中の細胞の初期段階の画像情報のみから、将来的な継続継代培養性能を超早期に定量予測する技術を開発したのでこれを報告する。

本文

背景

近年、幹細胞研究の発展により、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、間葉系幹細胞 (Human mesenchymal Stem Cell, hMSCs) などを用いた細胞性医薬品の開発が日進月歩で進められている。中でも hMSCs は、ヒトの脂肪組織や骨髄など多様な組織から採取が可能であり、in vitro での培養が容易であることから、歴史的にも多くの臨床実績と知見が蓄

積されつつある。

hMSCs は細胞源として、骨や脂肪をはじめとした様々な組織へと分化させる機能以外にも、血管再生支持機能や免疫調節機能がもたらす治療の有効性が認められている¹⁾。このため、軟骨などの移植による再生治療の他に、低ホスファターゼ症や GVHD などにも有効であることが示され、医薬品として承認を受けている。結果、細胞を用いた細胞性医薬品 (再生医療等製品) にはこれまでの医薬では治療が困難だった疾患に対する創薬としてますます期待が高まっている。

島根大発ベンチャー・PuREC 株式会社は、ヒト骨髄

などから LNGFR (CD271) Thy1 (CD90) の 2 種の抗体を用いることで極めて効率よくヒト MSC を選別する手法を開発し、LNGFR Thy-1 共陽性細胞の中で特に増殖の速いクローン細胞を Rapidly expanding clones (RECs) を効率的に生産する技術を確認している。REC はシングルセルから取得される超高純度 MSC であるとともに、均一性・遊走性・分化能などが高く²⁾、他家治療用細胞として極めて有望である。

他家の治療用細胞を製造するためには、十分な細胞数・バイアル数を提供可能なセルバンクを効率的に構築することが必須であるが、hMSCs は拡大培養の為に継代を繰り返すことによって品質劣化や不均一性がもたらされること³⁾や、供給源や培養条件の違い、あるいはドナー個体の差によって増殖能や分化能のポテンシャルが異なることも知られている⁴⁾。このような不均一性や個体差は治療効果に直結するため、細胞製造における品質管理技術は、現状極めて重要な課題となっている。従って、安定的にセルバンクを構築する為にはドナーセレクションの段階から高品質なロット、かつ、セルバンクを確実に構築できる将来的な培養維持性能の理解が求められている。しかしながら、現在、このようなセルバンク構築の超初期段階（ドナーセレクション後の拡大培養の初期）に、将来的な継続培養性能の可能性や、その後培養した細胞の品質の予測を定量的に行える技術は存在していない。

本研究の概要

本研究では継代数 1 のクローン MSC から得られた画像を基に継代維持性能を予測する機械学習モデルを構築することを目的とし、クローン MSC 間における形態情報の比較検証や機械学習における学習データ量の重要性について報告する(図 1)⁵⁾。

クローン MSC の比較検証の為に、各クローン MSC を用いて継代数 1 の時点での経時的な位相差画像を取得し、取得後も継代培養を継続することで各クローン MSC の継代維持性能を評価した。得られた画像は当研究グループで開発した画像解析技術⁶⁾を適用することで、形態的特徴量×経時変化×集団不均一性を含めた高次元データを特徴量とし、クローン MSC 間の形態的な違いや増殖性や継代維持性能との関連性を分析した。次に、継代維持性能予測モデル構築の為に、画像枚数と経時データという観点での学習データ量の違いによる精度検証を行った。細胞製造の現場では画像撮影プロトコルは標準化されておらず、製造施設ごとに撮影条件は異なることが想定される。その為、本研究では学習データ量が異なるときの予測精度の安定性と予測モデルの再現性を評価し、実製造現場を想定した実現可能な機械学習モデル構築スキームを提案する(図 2)。

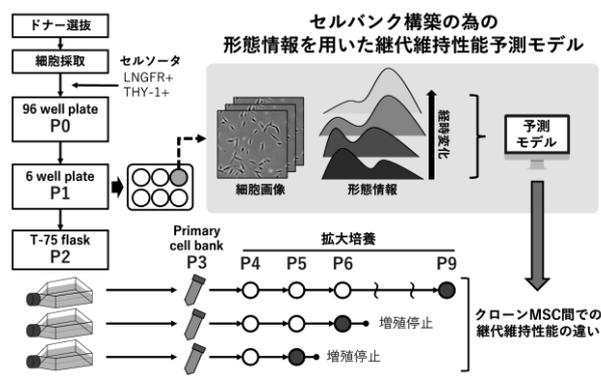


図1. 研究概要

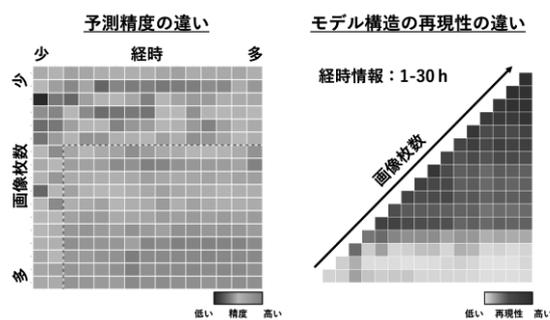


図2. 学習データ量による予測精度・モデル再現性の違い

文献

- Fontaine, M. J., Shih, H., Schaefer, R. & Pittenger, M. F.: *Transfusion Medicine Reviews*, **30**, 37-43, (2016).
- Mabuchi, Y., Morikawa, S., Harada, S., Niibe, K., Suzuki, S., Renault-Mihara F, Houlihan, D. D., Akazawa, C., Okano, H., and Matsuzaki, Y.: *Stem Cell Reports*, **1**, 152-165, (2013)
- Takemoto, Y., Imai, Y., Kanie, K., Kato, R.: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **131**, 198-206, (2021)
- Rosland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J. C., Goldbrunner R., Lønning, P. E., Bjerkvig, R., Schichor, C., *Cancer research*, **69**, 5331- 5339, (2009)
- Suayama, T., Takemoto, Y., Miyauchi, H., Kato, Y., Matsuzaki, Y., Kato R.: *Inflammation and Regeneration*, 10.1186/s41232-022-00214-w (2022)
- Sasaki, H., Takeuchi, I., Okada, M., Sawada, R., Kanie, K., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.: *PLoS ONE*, **9**, e93952, (2014)

超広域感染阻止能を具備するバイオ超分子コーティング

: 新型コロナから白癬症まで

大成 冬真¹・小野寺 正孝²・白米 優一¹・芦内 誠^{1*}

¹高知大学大学院 総合人間自然科学研究科, ²東洋濾紙株式会社
〒783-8502 南国市物部乙 200 高知大学大学院総合人間自然科学研究科農林海洋科学専攻
Tel: 088-864-5114 Fax: 088-864-5200
E-mail: ashiuchi@kochi-u.ac.jp

新型コロナウイルス感染症は社会を大きく混乱させた。パンデミック収束の道筋さえ見いだせない今日、持続的な感染防止に資する「新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 不活化プラスチック」がウィズコロナ期の社会基盤を支える産業部材として注目されている。今回、納豆ネバの「ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA)」と歯磨き粉に含まれる「セチルピリジニウムカチオン (CPC)」から新製された超分子素材「PGA イオンコンプレックス (PGAIC)」の抗菌特性について調査した。プラーク法に準拠した「SARS-CoV-2」不活化試験を実施したところ、「PGAIC コーティング」による事実上の完全感染阻止 (>99.9%の不活化率) という画期的な成果を得た。さらに、抗カビ性試では、難治性真菌症の「白癬菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 症」への高い殺菌効果が示唆された。

1. はじめに

人類と感染症の歴史は古く、農耕が発展した約 1 万年前にはマラリアが発生していた¹⁾。人類は感染症との戦いの中で、ワクチン接種やアルコール消毒など感染症に対するいくつかの防御術を見い出してきた。医療を含む科学技術が発展した現代でも感染症は人類の脅威である。加えて近年の土地利用開発に伴い、人類は自然環境の急速な開拓を行なっている。また人口の増加と交通手段の発達により地球規模の人流が活発化した。これらはコロナウイルス感染症を含む人獣共通感染症が人間に感染する機会を増加させている²⁾。

2019 年に発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) はパンデミックを繰り返し、いまだ収束のための道筋は見通せていない。社会活動の停滞を余儀なくされ 2020 の先進国 7 カ国およびヨーロッパの平均 GDP 成長率は -5.5% を記録した (IMF データより)。医療従事者の肉体的・精神的負担も極大化している。今日、持続的な感染防止に資する「新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 不活化プラスチック」がウィズコロナ期の社会基盤を支える産業部材として求められている。

今回、納豆ネバの「ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA)」と歯磨き粉に含まれる「セチルピリジニウムカチオン

(CPC)」から新製された超分子素材「PGA イオンコンプレックス (PGAIC: 図 1)」の抗ウイルス・抗菌特性について興味深い事実が判明したので報告する。

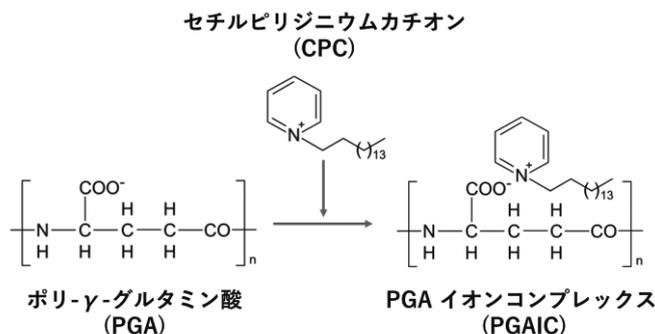


図 1. PGA と CPC から新生された PGAIC の構造

2. 材料および方法

(1) PGAIC コーティング剤の合成³⁾

2%PGA 水溶液と温수에溶解させた CPC 水溶液 (PGA モル量に対して 120% モル量分) を混和し、PGAIC を合成した。合成した PGAIC を吸引濾過で回収した後 60°C の蒸留水で洗浄し、再び吸引濾過で回収した。回収した PGAIC を凍結乾燥し、無水エタノールに溶解させたも

のを PGAIC コーティング剤とした。

(2) 基材への PGAIC コーティング

PET 樹脂フィルムに 10% PGAIC コーティング剤をスピンコーターでコーティングし、風乾させた。また 0.1% PGAIC コーティング剤に濾紙を 5 秒間浸漬した後 35°C で乾燥させた。

(3) 抗ウイルス性試験

PGAIC コーティングした PET フィルムを用いてプラーク法 (ISO 21702) に準拠した SARS-CoV-2 不活化試験を行なった。

(4) 抗カビ性試験

PGAIC コーティングした濾紙を用いて白癬菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) に対する抗カビ性試験 (JIS L 1921: 吸収法) を行なった。

3. 結果と考察

(1) 抗ウイルス性試験の結果

SARS-CoV-2 の不活化試験の結果、「PGAIC コーティング」による 99.9% 以上の不活化という画期的な結果を得た (図 2, 3)。本結果は事実上の「PGAIC コーティング」による完全感染阻止を示すものである。

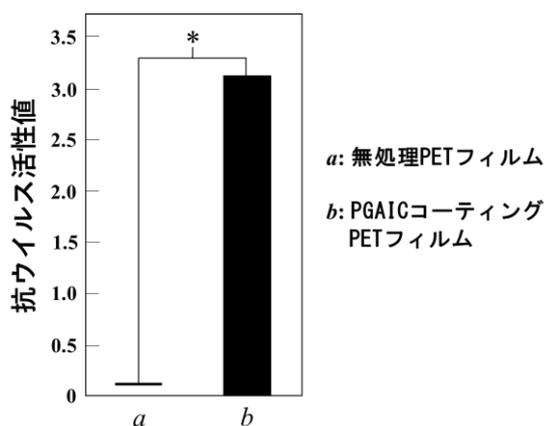


図 2. PGAIC の SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス活性値

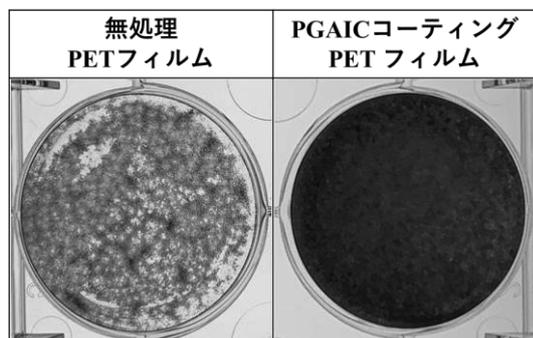


図 3. プラーク試験結果の様子 (白点がプラーク)

(2) 抗カビ性試験の結果

PGAIC コーティングによる白癬菌への殺菌効果 (99% の殺菌) が確認された (図 4)。難治性真菌感染症として知られる白癬菌症は、皮膚科における真菌感染症患者の多くが罹患し、その頻度は日本人の 5 人に 1 人と推定されている⁴⁾。またクロカビ、アオカビ、クロコウジカビに対しても高い殺菌効果が確認された。

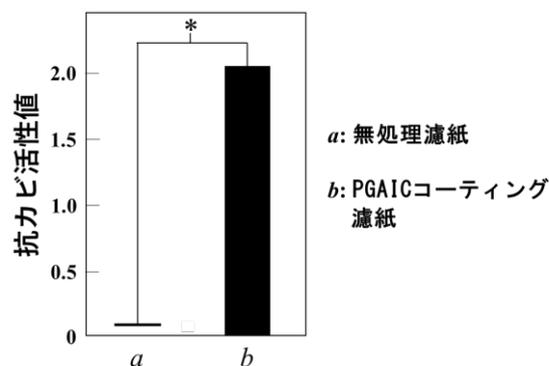


図 4. PGAIC の白癬菌に対する抗カビ活性値

4. 今後の展望

本研究により PGAIC はヒトに重篤な感染症を引き起こすエンベロープ型ウイルスから真菌に至るまでの「超広域感染阻止能」を備えた (稀有の) 衛生強化目的部材として有望であることが示された。PGAIC による材質不問の持続的コーティング⁵⁾を明らかにした先行事例を鑑みれば、本件「PGAIC コーティング」にはウィズコロナ期に入った現代社会の健康と産業を支える標準的な生活用材としての利用拡大に加え、その本格的な社会実装化に向けた新展開にも期待が持てる。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご協力いただいた東洋濾紙株式会社に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Greenwood, B. *Nature Medicine.*, **14**, 363 (2008).
- 2) McNeely, J. A. *Ambio.*, **50**, 767-781 (2021).
- 3) Ashiuchi, M. *et al.* *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **5**, 1619-1624 (2013).
- 4) 福田知雄, 爪白癬これまでの内服療法-イトラコナゾールとテルビナフィン-, *真菌誌.*, **60**, 67-71 (2019).
- 5) Ashiuchi, M. *et al.* *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24588-24599 (2015).

次世代油脂製造技術の開発

～微細藻類による EPA 高生産検討～

石塚 匠^{1*}・尾崎 達郎¹・和田 真由美¹・齋藤 猛¹・小山 伸吾¹

¹花王株式会社生物科学研究所第 1 研究室

〒640-8580 和歌山市湊 1334

Tel: 080-7613-5988

E-mail: ishizuka.takumi@kao.com

エイコサペンタエン酸 (EPA) は有用な生理機能が多数報告されており、人口増加に伴い世界的な需要は高まりつつある。しかし、主要な供給源を天然の魚油に依存しており、将来的な供給不足や水産環境への負の影響が懸念されている。我々は EPA 生産能を有する微細藻類 *Nannochloropsis* に着目した技術開発を行っており、これまでに野生株の 3~4 倍の EPA 生産性を示す「EPA 高生産株」の創製に成功している。藻類による油脂製造においては油脂抽出効率の低さが課題の一つであるが、細胞壁合成に関わる遺伝子を破壊することにより、抽出効率が大幅に向上することが見出された。本稿では、EPA 高生産性と易抽出性を併せ持った「EPA 高生産×細胞壁欠損株」を分子育種により開発した内容について紹介する。

1. 背景

エイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5n-3) やドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6n-3) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は有用な生理機能が多数報告されており¹⁾、現在では医薬品やサプリメント、水産餌料等に利用されている。人口増加に伴い PUFA の世界的な需要は高まりつつあるが、主要な供給源を天然の魚油に依存しており、将来的な供給不足や水産環境への負の影響が懸念されている。そのため、PUFA のサステナブルな新規供給源の開発が必要とされている。

不等毛植物門真正眼点藻綱に属する微細藻類 *Nannochloropsis* は高い光合成能・生育速度・油脂生産性を有することから、世界中で幅広く研究が進められている。加えて、PUFA の一種である EPA の生産能を有していることから、PUFA のサステナブルな新規供給源として注目されている。我々はこれまでに *Nannochloropsis* の EPA 合成に関わる遺伝子群を同定しており、それらの遺伝子を多重発現強化することで、野生株の 3~4 倍の EPA 生産性を示す「EPA 高生産株」の開発に成功してきた²⁾ (図 1)。

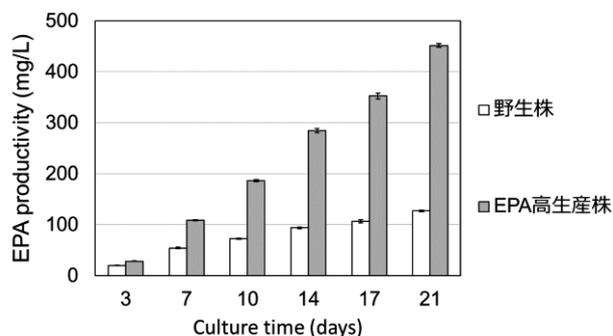


図 1. 野生株および EPA 高生産株における EPA 生産性

藻類による油脂製造においては油脂抽出効率の低さが課題の一つとして想定されている。*Nannochloropsis* の細胞壁には厚いセルロース層とアルジェナン層が存在し、堅固な細胞構造をとるため抽出効率が低いと考えられている³⁾。一方で、筆者らはこれまでに、内在の細胞壁合成に関わる遺伝子を破壊することにより細胞壁が薄くなり、油脂抽出効率が大幅に向上することを見出してきた (図 2)。

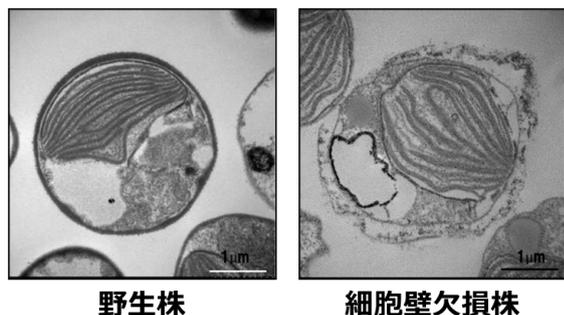


図 2. 野生株および細胞壁欠損株における TEM 画像

上述の EPA 高生産化と細胞壁欠損の特性を掛け合わせた改変株を開発することにより、PUFA のサステナブルな新規供給源としての *Nannochloropsis* の価値をさらに高めることができるのではないかと考えられた。そこで本稿では、EPA 高生産性と易抽出性を併せ持った「EPA 高生産×細胞壁欠損株」を分子育種により開発した内容について紹介する。

2. 方法

本研究では *Nannochloropsis oceanica* NIES-2145 株（野生株）に対し種々の EPA 合成関連遺伝子を発現強化した EPA 高生産株を親株として使用した。*Nannochloropsis* 内在のセルロース合成に関わる *Cellulose synthase A1 (CESA1)* およびアルジェナン合成に関わると推定される *Fatty acid synthase 3 (FAS3)* の遺伝子破壊用コンストラクトを作製し、ゲノム上の *CESA1*, *FAS3* の相同領域（上流 1.0~1.5 kbp および下流 1.0~1.5 kbp）と抗生物質耐性遺伝子を含む遺伝子断片を PCR にて増幅した。増幅した遺伝子断片をエレクトロポレーション法により EPA 高生産株に導入し、コロニー PCR による遺伝子破壊株のスクリーニングを行った。硝酸を窒素源とする f/2 培地にてフラスコ培養を行い、適宜サンプリングおよび Bligh & Dyer 法による全脂質抽出を行って GC にて分析した。培養 10 日目の培養液から乾燥藻体または湿潤藻体を調製し、ヘキサンを加えて攪拌することで脂質を抽出した。Bligh & Dyer 法にて抽出した全脂質量に対するヘキサン抽出での脂質量の割合を算出し、抽出効率とした。

3. 結果と考察

EPA 高生産×細胞壁欠損株の EPA 生産性は野生株と比較して大幅に高く、親株である EPA 高生産株と同程度であることが確認された。また、EPA 高生産×細胞壁欠損株の乾燥条件における抽出効率は約 80%であり、

野生株および EPA 高生産株の抽出効率（約 60%）と比較して抽出効率が向上していた。

一般的に藻類からの油脂抽出は、乾燥藻体に対し溶剤を加えて攪拌することで油脂の抽出を行っている。この方法は抽出効率の高さが利点である一方、乾燥工程には多量のエネルギーを必要とするため、変動費や CO₂ 排出量の高さが問題となっている。この点を鑑み、近年では乾燥工程を経ない湿潤藻体からの油脂抽出が推奨されている⁴⁾。そこで、本開発株についても湿潤条件下での油脂抽出検討を行った。その結果、EPA 高生産×細胞壁欠損株における抽出効率は約 60%という高い値を示し、EPA 高生産株の抽出効率と比較して大幅な抽出効率の向上が確認された（図 3）。

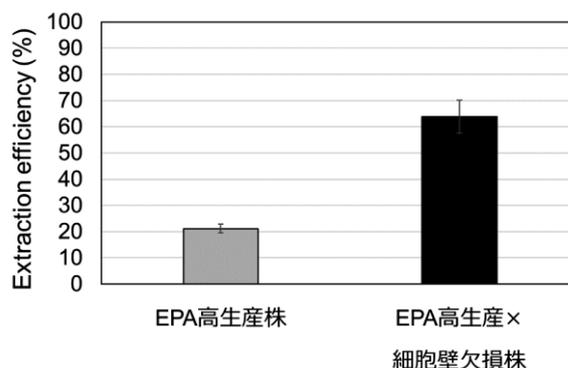


図 3. 湿潤条件での油脂抽出効率

4. 結言と今後の展望

本研究では、微細藻類 *Nannochloropsis* における EPA 高生産と油脂抽出効率向上を併せ持つ改変株を開発した。上記改変株は野生株と比較して EPA の生産性が大幅に高く、乾燥・湿潤の両条件において油脂抽出効率が大幅に向上していた。今後は上記改変株の大規模培養から油脂精製までのトータルプロセスでの評価を行い、微細藻類によるサステナブルな PUFA の製造に取り組んでいきたい。

5. 参考文献

- 1) Shahidi, F., Ambigaipalan, P., *Annual Review of Food Science and Technology*, **9**, 345-381, (2018)
- 2) 尾崎達郎, 和田真由美, *オレオサイエンス*, **20**, (2020)
- 3) Scholz, M. J., et al., *Eukaryotic Cell*, **13**, 1450-1464, (2014)
- 4) DOE, National algal biofuels technology review, (2016)

創立 100 周年記念
第 74 回 (2022 年) 日本生物工学会大会トピックス集

2022 年 10 月 3 日発行

発行所 公益社団法人 日本生物工学会
〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
大阪大学工学部内

TEL. 06-6876-2731 FAX. 06-6879-2034

E-mail: info@sbj.or.jp

<https://www.sbj.or.jp>