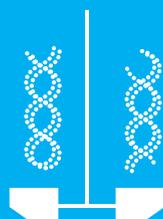


# 第73回（2021年） 日本生物工学会大会

## トピックス集

会 期 2021年（令和3年）10月27日（水）～29日（金）

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

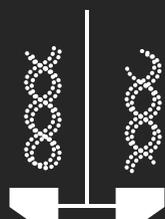


# 第73回（2021年） 日本生物工学会大会

## トピックス集

会 期 2021年（令和3年）10月27日（水）～29日（金）

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

## 第 73 回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】

- G2H1-0202 H1 会場 第 2 日 10:00…………… p. 6  
ショウジョウバエからの野生酵母の単離と産業への展開

○清家 泰介<sup>1</sup>, 武方 宏樹<sup>2</sup>, 阪田 奈津枝<sup>3</sup>, 古澤 力<sup>3</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪大院・情報, <sup>2</sup> 琉球大・理, <sup>3</sup> 理研・生命機能)

### 【遺伝子工学】

- G2H1-0309 H1 会場 第 2 日 11:00…………… p. 8  
新規ゲノム編集ツール TiD を用いたヒト細胞のゲノム編集

○和田 直樹<sup>1</sup>, 村上 愛美<sup>1</sup>, 丸井 和也<sup>1</sup>, 宮下 尚之<sup>2</sup>, 刑部 祐里子<sup>3</sup>, 刑部 敬史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 徳島大院・社会産理工, <sup>2</sup> 近畿大院・生物理工, <sup>3</sup> 東工大・生命理工)

- G2H2-0207 H2 会場 第 2 日 10:30…………… p. 10  
バイオプラスチック合成能力を有する *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築

○梅林 勇氣<sup>1</sup>, 阿部 汐里<sup>1</sup>, 河合 盛進<sup>2</sup>, 鈴木 宏昭<sup>2</sup>, 山田 美和<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 岩手大・農, <sup>2</sup> トヨタ紡織株式会社・新領域開拓部)

### 【酵素学, 酵素工学】

- G2H3-0211 H3 会場 第 2 日 10:00…………… p. 12  
コラーゲン由来ジペプチドであるヒドロキシプロリルグリシンの菌体反応系による生産

○古渡 翔, 木野 邦器  
(早大・先進理工)

- G2H4-0107 H4 会場 第 2 日 9:30…………… p. 14  
*Aspergillus nidulans* 由来新規ラムノガラクトツロナンリアーゼの機能・構造解析

○鈴木 裕満<sup>1</sup>, 伊東 昂希<sup>1</sup>, 酒井 杏匠<sup>1</sup>, 堀 千明<sup>2</sup>, 高須賀 太一<sup>3</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 名城大院・農, <sup>2</sup> 北大院・工, <sup>3</sup> 北大院・農)

- G3H5-0101 H5 会場 第 3 日 9:00…………… p. 16  
ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による海藻多糖  $\beta$ -1,3-キシランの資化機構  
- 分泌型  $\beta$ -1,3-キシラナーゼの機能解析 -

○堀 沙那恵<sup>1</sup>, 岡崎 文美<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup> 三重大院・生資, <sup>2</sup> 三重大・先端科学研支セ)

### 【タンパク質工学】

- G3H5-0306 H5 会場 第 3 日 11:00…………… p. 18  
新規 2 次元分離プロテオミクスによる自己抗体バイオマーカー探索法の開発

○益井 実鈴<sup>1</sup>, 塩川 つぐみ<sup>2</sup>, 多田 宏子<sup>2</sup>, 二見 淳一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 岡山大院・統合科学, <sup>2</sup> 岡山大・自然生命支援セ)

## 【抗体工学】

- G3H4-0303 H4 会場 第3日 11:30**…………… p. 20  
新規架橋型高親和性低分子ペプチドを使った抗体医薬品の精製技術  
○伊東 祐二, 大迫 奈菜, 嶋本 亮輔, 寺西 広翼, 早田 光希, アブドゥール ラフィーク  
(鹿児島大院・理工)
- G3H4-0313 H4 会場 第3日 11:30**…………… p. 22  
遊離ナノボディのアフィニティをハイスループットに評価可能とするペプチドバーコーディング  
○宮崎 拓己<sup>1</sup>, 松崎 友星<sup>1</sup>, 青木 航<sup>1,2,3,4</sup>, 植田 充美<sup>1,2,3,4</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>JST・COI-NEXT, <sup>4</sup>京都バイオ計測センター)

## 【発酵生理学, 発酵工学】

- G2H5-0112 H5 会場 第2日 9:00**…………… p. 24  
アルドラーゼを介した代謝系へのホルムアルデヒド取込みを伴う増殖非依存型発酵による有用物質生産  
○山本 啓介, 中根 修平, 土坂 享成, 榎本 亜希代, 長谷川 真由, 瀧田 千温, 武田 明子  
(Green Earth Institute)

## 【代謝工学】

- G2H5-0205 H5 会場 第2日 10:00**…………… p. 26  
光エネルギーを利用した大腸菌におけるメバロン酸のイソプレノールへの変換  
○佐野 海瑚人<sup>1</sup>, 田中 涼<sup>1</sup>, 鎌田 健太郎<sup>1</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>, 石井 純<sup>2</sup>, 弘埜 陽子<sup>3</sup>, 原 清敬<sup>3</sup>, 戸谷 吉博<sup>1</sup>, 清水 浩<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・情報, <sup>2</sup>神戸大院・科技イノベ, <sup>3</sup>静大・食栄)
- G3H6-0201 H6 会場 第3日 10:30**…………… p. 28  
磁性細菌における脂質代謝制御によるマグネトソーム膜改変とマグネタイト形成能への影響評価  
○巴 瞭斗, 藤本 一嗣, 新垣 篤史, 田中 剛, 吉野 知子  
(農工大院・工)
- G3H6-0206 H6 会場 第3日 10:30**…………… p. 30  
アンチセンスペプチド核酸を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発  
○日詰 達哉<sup>1</sup>, 岡野 憲司<sup>2,3</sup>, 佐藤 悠<sup>2</sup>, 本田 孝祐<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>阪大・生工国際セ, <sup>3</sup>阪大・先導学研機)

## 【醸造学, 醸造工学】

- G3H7-0213 H7 会場 第3日 10:00**…………… p. 32  
玄米を用いた泡盛醸造における FA および 4VG の生成過程の解析  
○杉江 雄貴<sup>1</sup>, 眞榮田 麻友美<sup>2</sup>, 上地 敬子<sup>1</sup>, 渡嘉敷 建孝<sup>3</sup>, 平良 東紀<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>琉球大・農, <sup>2</sup>東農大・応生科, <sup>3</sup>石川種麴店)
- G3H7-0301 H7 会場 第3日 11:00**…………… p. 34  
全ゲノム情報を用いた系統解析による戦前の泡盛麴に含まれる黒麹菌類の菌叢の推定  
○塚原 正俊<sup>1</sup>, 東 春奈<sup>1</sup>, 久貝 樹幹<sup>1</sup>, 外山 博英<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>バイオジェット, <sup>2</sup>琉球大・農)

**【環境浄化, 修復, 保全技術】**

- G3H2-0105 H2 会場 第 3 日 9:30** ..... p. 36  
微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく嫌気バイオプロセスの向上

○林 稜也<sup>2</sup>, 安池 一貴<sup>2</sup>, 片桐 美紀<sup>1</sup>, 大前 貴裕<sup>2</sup>, 窪野 一郎<sup>2</sup>, 田代 陽介<sup>1</sup>, 二又 裕之<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup> 静大・工, <sup>2</sup> 静大院・総合科技, <sup>3</sup> 静大・グリーン科技研)

- G3H2-0106 H2 会場 第 3 日 9:30** ..... p. 38  
基質競合下における代謝ネットワークの進化と微生物共存

○鈴木 研志<sup>1,5</sup>, 上原 悠太郎<sup>2</sup>, 栗栖 太<sup>3,5</sup>, 野尻 秀昭<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup> 東大院・農生科, <sup>2</sup> 東大院・工・都市工, <sup>3</sup> 東大院・工・水環セ, <sup>4</sup> 東大院・農生科・アグテック, <sup>5</sup> 東大・CRIM)

**【環境工学, 廃水処理技術】**

- G3H1-0302 H1 会場 第 3 日 11:00** ..... p. 40  
酸素供給能は自家熱型高温好気消化プロセスに影響を及ぼす

○井出本 貴宏, 張 敏, 田代 幸寛, 丸山 明子, 酒井 謙二  
(九大院・生資環)

**【バイオマス, 資源, エネルギー工学】**

- G3H2-0208 H2 会場 第 3 日 10:30** ..... p. 42  
単細胞緑藻のみを用いて作製した細胞プラスチックの解析と評価

○鶴田 茜<sup>1</sup>, 中西 昭仁<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup> 東京工科大・応生, <sup>2</sup> 東京工科大院・バイオニクス)

**【生物化学工学】**

- G3H3-0207 H3 会場 第 3 日 10:00** ..... p. 44  
ダイズの成長に伴う根圏微生物叢の変動解析

○木伏 真子<sup>1</sup>, 西川 洋平<sup>2,3</sup>, 細川 正人<sup>1</sup>, 井手 圭吾<sup>1,3</sup>, 小川 雅人<sup>2,3</sup>, 穴井 豊昭<sup>5</sup>, 竹山 春子<sup>1,2,3,4</sup>  
(<sup>1</sup> 早大院・先進理工, <sup>2</sup> 早大・ナノライフ創新研, <sup>3</sup> 産総研・早大 CBBDOIL, <sup>4</sup> 早大・生命動態研, <sup>5</sup> 九大院・農)

- G3H3-0302 H3 会場 第 3 日 11:00** ..... p. 46  
耐酸性細菌を利用した有用金属リサイクルシステムの開発

○高野 力<sup>1</sup>, 村山 晃一<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 筑波大院・生命環境, <sup>2</sup> フタムラ化学)

**【バイオプロセス】**

- G3H4-0204 H4 会場 第 3 日 10:30** ..... p. 48  
CO<sub>2</sub> を再資源化する Gas-to-Lipids バイオプロセスの開発

○奥田 源己<sup>1</sup>, 渡邊 研志<sup>1</sup>, 中瀬 玄德<sup>1</sup>, 廣谷 蘭<sup>1</sup>, 石垣 元務<sup>1</sup>, 中島田 豊<sup>1</sup>, 松浦 将吏<sup>2</sup>, 松山 恵介<sup>3</sup>, 秋 庸裕<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 広島大院・統合生命科学, <sup>2</sup> 中国電力株式会社, <sup>3</sup> 長瀬産業)

**G3H4-0213 H4 会場 第3日 10:30**..... p. 50  
新規の不純物吸着剤を用いたシンプルで効果的な生物学的製品の精製方法

○西八條 正克<sup>1,2</sup>, 鴻池 史憲<sup>1,2</sup>, 平山 翔太<sup>1,2</sup>, 末岡 拓馬<sup>1,2</sup>, 八浦 妃佐子<sup>1,2</sup>, 水口 和信<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>カネカ, <sup>2</sup>次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

### 【植物細胞工学, 組織培養, 育種工学】

**G2H7-0201 H7 会場 第2日 10:00**..... p. 52  
NGS 解析に基づくゲノム育種で育成された大粒・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Gg」  
及び晩生・短稈コシヒカリ型新品種「コシヒカリ駿河 d60Hd16」

○富田 因則  
(静大・グリーン科技研)

### 【生体医用工学】

**G2H7-0102 H7 会場 第2日 9:00**..... p. 54  
細胞外小胞のエンジニアリングによるタンパク質ソーティングの制御と薬物送達への応用

○曾宮 正晴, 黒田 俊一  
(阪大・産研)

### 【セル&ティッシュエンジニアリング】

**G2H7-0203 H7 会場 第2日 10:00**..... p. 56  
人工転写活性化因子 / アプタマー複合体を用いた特異的 RNA を検出する遺伝子発現システム

○鄭 飛揚<sup>1</sup>・河邊 佳典<sup>2</sup>・上平 正道<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・システム生命, <sup>2</sup>九大院・工)

### 【生体情報工学, バイオインフォマティクス】

**G2H3-0301 H3 会場 第2日 11:00**..... p. 58  
未培養腸内細菌の1細胞ロングリードシーケンスによる完全長ゲノムの獲得

○細川 正人<sup>1,2</sup>, 小川 雅人<sup>1</sup>, 西川 洋平<sup>1</sup>, 佐伯 達也<sup>2</sup>, 依田 卓也<sup>2</sup>, 有川 浩司<sup>2</sup>, 竹山 春子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>早大院・先進理工, <sup>2</sup>bitBiome)

### 【核酸工学】

**G2H6-0301 H6 会場 第2日 11:30**..... p. 60  
PD-SELEX 法を用いた直交性 RNA-RBP ペアの発見

○福永 圭佑, 横林 洋平  
(沖縄科学技術大学院大学)

### 【ペプチド工学】

**G2H6-0302 H6 会場 第2日 11:30**..... p. 62  
細胞評価及び動物行動試験評価を用いた新規塩味ペプチドの発見

○竹内 友里, 池田 彩, 清水 一憲, 本多 裕之  
(名大院・工)

## ショウジョウバエからの野生酵母の単離と産業への展開

清家 泰介<sup>1,2,3\*</sup>・武方 宏樹<sup>4</sup>・阪田 奈津枝<sup>3</sup>・古澤 力<sup>3,5</sup>・松田 史生<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院情報科学研究科, <sup>2</sup>大阪大学先導的学際研究機構,

<sup>3</sup>理化学研究所生命機能科学研究センター, <sup>4</sup>琉球大学戦略的研究プロジェクトセンター,

<sup>5</sup>東京大学大学院理学系研究科

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-5 大阪大学大学院情報科学研究科 B 棟 724 室

Tel: 06-6879-7433 E-mail: taisuke.seike@ist.osaka-u.ac.jp

有用物質生産において、実績の高い出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に加え、新しい機能や特性を持った新たな酵母の利用も期待されている。そこで本研究では、酵母を餌とし移動性の高いショウジョウバエに着目し、ハエのクロップ（微生物を蓄える器官）から野生酵母を単離することを試みた。その結果、現在までに 37 属 98 種類の野生酵母の単離に成功し、新種酵母も 16 種単離できた。以上から、ショウジョウバエを用いて野生酵母を集める方法は有用であることが示唆された。ここでは 1 例として、ハエから単離した分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* を紹介する。

### 1. はじめに

酵母は広く発酵食品に利用され、私たちの生活には欠かせない産業微生物の一つである。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、酒類やパン類などの生産に利用されており、各企業がそれぞれの用途に合わせて望ましい表現型を示す系統株を樹立させている。

一方で、*S. cerevisiae* は高濃度のグルコース存在下では、非常に高い効率でエタノールを生産するクラブツリー効果を示すため、酒類製造には大きな効力を発揮するが、エタノール以外の化合物の生産を目的とする場合には、しばしば収率の低下を招く結果になる。そこで、クラブツリー効果を示さない酵母を用いた代謝改変の試みも進んでいる。また環境問題の観点から、エタノール生産時の冷却コスト削減のため、高温耐性を示す酵母 (*Kluyveromyces* 属など) や、特定の物質を生産する酵母 (油脂を生産する *Yarrowia* 属など) の利用も注目されており、多種多様な酵母を用いた産業利用が期待されている。しかし現状では、*S. cerevisiae* や *Schizosaccharomyces pombe* といったモデル生物でない野生酵母の情報が不足しており、今後の産業利用のさらなる発展に向け、自然界からの未知の酵母種の単離と、新たな機能の発見が求められている。

自然界に棲息する酵母のうち、私たちが認識できているものは 1 割にも満たないと言われている (酵母分

類学の教科書 The Yeasts 第 5 版)。そのため、野外に棲息する未記載の酵母種の中に、有用な酵母が含まれている可能性は極めて高いと考えられる。では酵母はどこに棲息しているのだろうか? いくつかの研究で「昆虫の体内」が酵母のホットスポットであることが報告されている<sup>1)</sup>。そこで、私たちは野生酵母の探索にあたり、昆虫のショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエは酵母を餌とし、移動性が高く、さらに腸管内に摂餌した微生物を蓄えるクロップと呼ばれる袋状の臓器を所有していることから、ハエの体内には多様な酵母が棲息していると考えた。

### 2. 材料・方法

#### ショウジョウバエの採集

牛乳パックの中に、熟したバナナを切り刻んで入れ、紐を使い地表から 2 m ほどのところの木にぶら下げた (図 1)。次の日、牛乳パックを覆うようにジップロックを被せ、底をパンパンと叩くことにより、ショウジョウバエをジップロック内に移動させ回収した。これまでに大阪・奈良・東京・沖縄などの複数の地点でバナナトラップを仕掛け、数千匹を超えるショウジョウバエを採集した。ショウジョウバエの採集には、名古屋大学の石川由希講師、田中良助助教、および東京大学の内田唯研究員に協力を得た。



図1. バナナトラップによるショウジョウバエの採集

### 野生酵母の分離

ショウジョウバエを1.5 mL チューブに移し、滅菌水で洗浄後に、ハエをホモジナイザーベッスルで破碎し、滅菌水を再度加えて、懸濁液を YPD および PDA 寒天培地に希釈してまいた。バクテリアの増殖を抑えるために、アンピシリンおよびクロラムフェニコールを 100 μg/mL で加えた。30°C で 2 日間培養後、シングルコロニーを分離し、コロニーの色・見た目、顕微鏡による細胞形態の観察を行い、最終的にリボソーム RNA 遺伝子の D1/D2 領域の塩基配列から種を同定した。

## 3. 結果

現在までに、37 属 98 種類もの野生酵母を単離することに成功した (図2)。加えて、これまで報告ない新種酵母も 16 種類発見しており、ハエの体内には期待通り多種多様な酵母が棲息していることが判った。そこで、単離した野生酵母において、発酵過程で生じるような熱や pH などのストレスへの耐性能、主要な糖・アルコールの資化能などについて、詳細に解析中である。



2021年6月時点で  
37属98種、新種16種

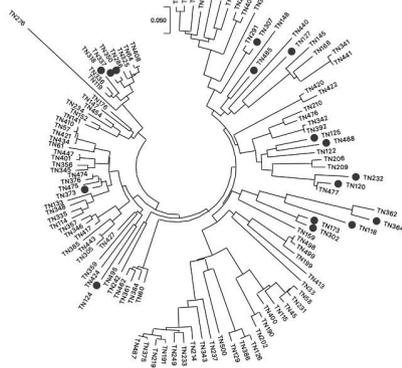


図2. 得られた野生酵母の解析と系統樹  
系統樹の青丸は新種酵母を表している。

これまでに得られたデータの1例として、私たちは複数の地点のショウジョウバエから、分裂酵母の一種 *Schizosaccharomyces japonicus* の単離に成功した。研究で一般に使用されている *S. japonicus* 株は、九州大学のいちご畑から単離されたものである<sup>2)</sup>。興味深いことに、ハエから単離した *S. japonicus* 株は 40°C 以上の高温耐性を有しており、さらに植物や果物などから分離された系統株と比較して、孢子形成能が極めて高いことが判った<sup>3)</sup>、また通常は孢子形成をしない条件下 (窒素源が存在) でも孢子を作ることができるという特異な特徴を持っていた (図3)。

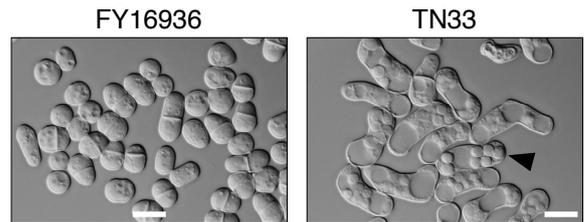


図3. *S. japonicus* の顕微鏡写真  
YEA プレートで 30°C, 1 日間培養後の細胞形態。  
FY16936 は実験室標準株, TN33 はハエから単離した株。  
矢印は代表的な孢子を示す。スケールバーは 10 μm。

## 4. 考察と今後の展望

自然界の至る所 (花や樹液など) に棲息し、移動性の高いショウジョウバエを利用して野生酵母を集める方法は有用であると考えられる。特にハエの体内では、消化酵素などの様々なストレスを受けるため、耐性の強い酵母に加え、孢子形成能が強化された酵母が存在する可能性が高い。またハエのクロープ内では、雑種形成や異系交配も盛んに行われているとも報告されており<sup>4)</sup>、通常とは異なる表現型を示す野生酵母の単離も期待できる。今後は、特に特定の代謝経路が強化された酵母や、クラブツリー効果を示さない酵母を見出したいと考えている。そして得られた情報を集約し、野生酵母のリソースの提供と産業への展開を目指す。

## 参考文献

- 1) Suh, S.O. *et al.* *Mycol Res*, **109**, 261 (2005).
- 2) Yukawa and Maki, *Kyushu Daigaku Kiyou* (Japanese), 218-226 (1931)
- 3) Seike, T. *et al.* *J Fungi*, **7**, 350 (2021)
- 4) Reuter, M. *et al.* *Curr Biol*, **17**, 81-83 (2007)

# 新規ゲノム編集ツール TiD を用いたヒト細胞のゲノム編集

和田 直樹<sup>1</sup>・村上 愛美<sup>1</sup>・丸井 和也<sup>1</sup>・宮下 尚之<sup>2</sup>・刑部 祐里子<sup>3</sup>・刑部 敬史<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>徳島大学大学院社会産業理工学研究部, <sup>2</sup>近畿大学大学院生物理工学研究科, <sup>3</sup>東京工業大学生命理工学院  
〒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410

Tel: 088-634-6418

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

本研究では、機能未知な CRISPR-Cas タイプ I-D システムをもとに新規国産ゲノム編集ツール TiD システムを開発し、ヒト細胞におけるゲノム編集への利用に成功した。まず、*in vitro*において、TiD にユニークなタンパク質である Cas10d がヌクレアーゼ活性を持つことを明らかにした。さらに、TiD によるヒトゲノムの編集により、CRISPR-Cas9 と同様の小さな挿入・欠失に加え、18 kb に及ぶ長鎖欠失を誘導できることを明らかにした。また、標的配列以外へのオフターゲット変異は検出されなかった。これらの結果は、TiD が特異性の高いユニークな国産ゲノム編集ツールであること示しており、今後、医療や農業分野を含めた様々な分野への展開が期待できる。

## 1. はじめに

近年、ゲノム編集技術の発展が著しい。ゲノム編集技術は、ゲノム上の標的配列に対して特異的に変異を導入できる技術であり、従来技術と比べて正確かつ効率的に、また短期間で変異体を作成可能であることから、基礎研究での利用から医療、産業、農業分野まで幅広い応用が期待されている<sup>1),2)</sup>。なかでも、現在最も汎用的に利用されているゲノム編集技術は、細菌や古細菌が持つ獲得免疫機構である CRISPR-Cas9 をゲノム編集技術としてツール化したものである。例えば、*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 は PAM として 5' -NGG-3' を認識し、その上流 20 塩基を標的配列とすることができる。課題としては、ゲノム上の意図しない配列へと変異を導入してしまうオフターゲット効果や、標的配列の選択性の制限などが挙げられ、さらには日本国内での産業・医療へと利用の際には知的財産の問題が生じることから、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る。

本研究では、自然界に存在する多様な CRISPR-Cas システムの中から、未だ機能の同定が進んでいない CRISPR-Cas type I-D システムに着目し、新規ゲノム編集技術 TiD としての開発を行った<sup>3)</sup>。TiD は、5 つの Cas タンパク質 (Cas3d, 5d, 6d, 7d, 10d) と 35, 36 塩基を認識する crRNA から構成される (図 1)。認識する標的配列が 35, 36 塩基と Cas9 よりも長いため、高い特異性を持つことが期待される。我々はすでに、大腸菌

において TiD が認識する PAM 配列の同定、また TiD による植物でのゲノム編集にも成功している<sup>3)</sup>。本研究では、さらにその応用範囲を広げ、TiD によるヒト細胞でのゲノム編集への利用可能性を検証した。

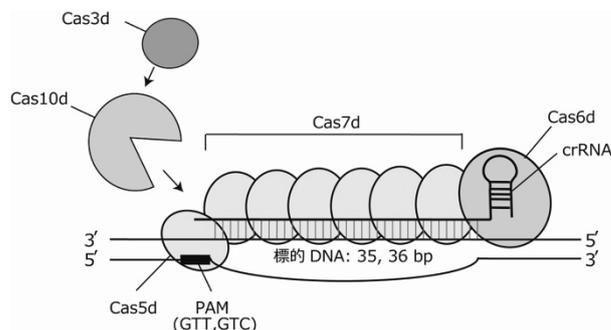


図 1. 新規ゲノム編集ツール TiD が形成する Cas-DNA-crRNA 複合体の概要図。

## 2. 実験材料と方法

### (1) *In vitro* ssDNA nuclease assay

HEK293T 細胞で C 末端に 6xHis タグを付加した Cas3d, Cas10d を発現させ、それぞれをまず Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を用いて精製し、さらに Superdex 200 Increase 10/300GL (Cytiva) を用いたゲルろ過により精製した。精製した各 Cas タンパク質を用いて ssDNA の分解活性を解析した。反応産物をアガロースゲル電気泳動によって解析した。

(2) TiDによるヒト HEK293T 細胞でのゲノム編集  
TiD *Cas3d*, *Cas5d*, *Cas6d*, *Cas7d*, *Cas10d*を hEF1 $\alpha$  プロモーターにより、また TiD crRNA を hU6 プロモーターによって発現する TiD ベクターを構築し、ヒト HEK293T 細胞へと導入した。トランスフェクションしてから 72 時間後のサンプルからゲノム DNA を抽出し、Cell assay ならびに Long PCR による解析を行った。Cell assay は、標的配列を含む約 500 bp の領域を増幅し、Surveyor<sup>®</sup> Mutation Detection kit (Integrated DNA technologies) を用いて、メーカーのマニュアルに従って行った。Long PCR は、標的配列を挟んで 25 kb までの領域を増幅するプライマーセットを用いて行った。また、PCR 産物は Mighty TA Cloning Kit (タカラバイオ) を用いてクローニングを行い、シーケンス解析を行った。

### 3. 結果と考察

#### (1) *In vitro* ssDNA nuclease assay

*in vitro*において、精製した *Cas10d*, *Cas3d* タンパク質の ssDNA 切断活性を調べたところ、*Cas10d* が ssDNAヌクレアーゼ活性を持つことを明らかにした (図 2)。この結果は、TiD では *Cas10d* が DNA 切断を担うことを示している。また、type I-E システムで DNA 切断活性を担っていることが報告されている *Cas3* ではなく<sup>5), 6)</sup>、TiD にユニークなタンパク質である *Cas10d* が切断活性を持つことから、TiD は既知のシステムとは異なるユニークなシステムであると考えられる<sup>4)</sup>。

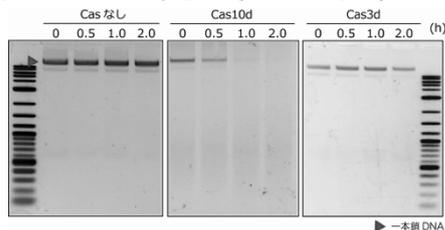


図 2. *In vitro* ssDNAヌクレアーゼアッセイ。

#### (2) TiDによるヒト HEK293T 細胞でのゲノム編集

TiD によってヒト細胞でゲノム編集が行えるのかを検証するため、ヒト *AAVS* 遺伝子および *EMX1* 遺伝子を標的とした TiD gRNA を設計し、動物細胞用に最適化した TiD *cas* 発現ベクターと共にヒト HEK293T 細胞への導入を行った。その結果、*Cas9* 同様の短い欠失に加え、18 kb にも及ぶ長鎖欠失が誘導されていることが明らかとなった (図 3)。また、タイプ I-E で報告されている PAM 上流に向けた長鎖欠失ではなく<sup>5) 6)</sup>、PAM の両方向に向けて長鎖欠失が誘導されていた (図 3)。この結果も、TiD が既知の方法とは異なるユニークな技術であることを示している。また、標的箇所以外へのオフターゲット変異も検出されなかったことから<sup>4)</sup>、TiD は高い特異性を持つゲノム編集技術であると考えられる。

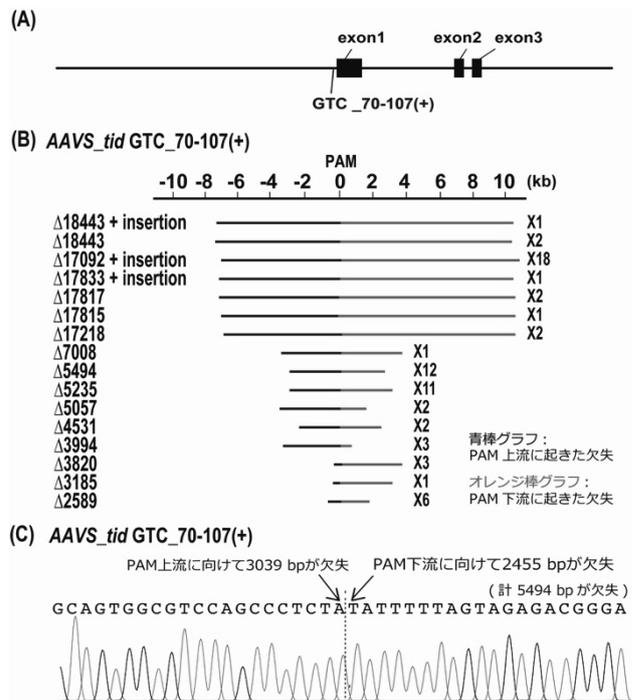


図 3. TiD によりゲノム編集を行った HEK293T 細胞の変異解析. (A) *AAVS* 遺伝子座の構造 (B) 検出された長鎖欠失のリストとそのプロファイル. (C) 長鎖欠失の DNA 解析の一例.

### 4. 今後の展望

今回の実験結果により、TiD はヒト細胞でのゲノム編集が可能であること、また既報の CRISPR-Cas とは異なるユニークな国産ゲノム編集ツールであることが明らかとなった。現在、効率の向上やノックアウト株の樹立、他の技術への応用など様々な改良を進めている。また、我々は TiD を用いて植物でのゲノム編集に成功していることから<sup>3)</sup>、今後、医療、産業、農業分野を含めた様々な分野への展開が期待できる。

### 5. 参考文献

- 1) Wang H, *et al.*: *Annu. Rev. Biochem.*, **85**: 227-64 (2016)
- 2) Wada, N. *et al.*: *BMC Plant Biol.*, **20**, 234 (2020)
- 3) Osakabe K. *et al.*: *Commun. Biol.*, **3**, 648 (2020)
- 4) Osakabe, K. and Wada, N. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **49** (11), 6347-6363 (2021)
- 5) Morisaka, H. *et al.*: *Nat. Commun.*, **10**, 5302 (2019)
- 6) Dolan A. E. *et al.*: *Mol. Cell.*, **74** (5), 936-950. e5. (2019)

# バイオプラスチック合成能力を有する *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築

梅林 勇気<sup>1</sup>・阿部 汐里<sup>1</sup>・河合 盛進<sup>2</sup>・鈴木 宏昭<sup>2</sup>・山田 美和<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>岩手大学大学院総合科学研究科農学専攻, <sup>2</sup>トヨタ紡織株式会社・新領域開拓部

〒020-8500 盛岡市上田 3 丁目 18-8 岩手大学農学部

Tel: 019-621-6155 Fax: 019-621-6155

E-mail: myamada@iwate-u.ac.jp

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、バイオマスを原料として、微生物によって合成される生分解性バイオプラスチックである。我々は、廃棄海藻を原料とした PHA 合成を目指している。これまでに、海藻やアルギン酸を原料として、PHA を合成可能な 2 種の *Cobetia* 属細菌を新規に見出した。しかし、本菌の PHA 生産量は実用化菌株と比較すると低く、代謝改変による PHA 合成能力の改良が必要となるが、これまでに *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換えが行われた報告はない。そこで、本研究では、*Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築を目指した。その結果、接合伝達法によって外来プラスミドを導入した *Cobetia* 属細菌の形質転換に成功した。

## 1. はじめに

近年、石油系プラスチックが海洋環境中に流出・蓄積することで引き起こす海洋プラスチック問題が危険視されている。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、バイオマスを原料として、微生物の細胞内で合成・蓄積されるバイオプラスチックであり、海洋中でも生分解性を示すことから海洋プラスチック問題の解決策として注目されている。しかし、PHA の製造コストは高く、原料コストの削減が求められている。

このような背景のもと、我々は PHA の安価な原料としての利用例がほとんどない廃棄海藻に着目し、海藻の主成分であるアルギン酸もしくは粉碎した乾燥海藻を貧栄養培地に添加した際に、典型的な PHA の一種であるポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] を合成可能な *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5-11-6-3) と *Cobetia* sp. IU190790JP01 (5-25-4-2) を見出すことに成功した<sup>1)</sup> (図 1)。しかし、本菌の P(3HB) 生産量は実用化菌株に劣るため、実用化に向けては、代謝改変による PHA 合成能力の改良が必要である。代謝改変を行うために、遺伝子組換え技術は必須であるが、これまでに *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換えが行われた報告はない。

そこで、本研究では *Cobetia* 属細菌の遺伝子組換え系の構築を目指した。

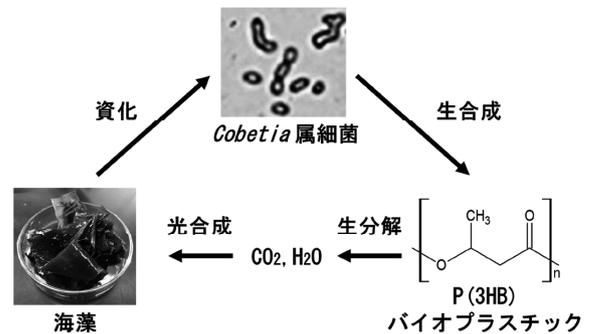


図 1 *Cobetia* 属細菌による海藻からの PHA 合成

## 2. 材料と方法

### (1) 菌株と培養

本研究で使用した *Cobetia* 属細菌は、Luria-Bertani (LB) 培地、もしくは PHA 合成用寒天培地<sup>1)</sup>を用いて 30°C で培養した。エレクトロポレーション後の形質転換体の選抜には、LB/Cm 寒天培地 (NaCl 3.5%、Chloramphenicol: 1.0 µg/ml) を用い、30°C で 2 日間培養した。接合伝達による形質転換体の選抜は、LB/Cm 寒天培地 (NaCl 10%、Chloramphenicol: 10 µg/ml) を用い、30°C で 5 日間培養した。

## (2) 使用したプラスミド

本菌の様々な抗生物質に対する感受性を検討したところ、Cmに対して高い感受性を示したため、Cm耐性遺伝子を有する広宿主ベクターpBBR1 MCS-1を使用した。

## (3) エレクトロポレーション法

本菌を対数増殖期中期まで培養した後、集菌した菌体の洗浄操作を2回行い、エレクトロコンピテントセルを作成した。100  $\mu$ lのエレクトロコンピテントセルに、pBBR1 MCS-1を500、1000 ngとなるように添加し、MicroPulser™を用いて、1.8~2.7 kVの電圧、時定数4 mscの条件でエレクトロポレーションを行った。

## (4) 接合伝達法

pBBR1 MCS-1を*Escherichia coli* S17-1 (*E. coli* S17-1)に導入し、OD<sub>660</sub>の値が0.5となるようにLB/Cm液体培地で培養した。*Cobetia*属細菌も同様に対数増殖期中期まで培養し、両菌を様々な比率で混合し、LB寒天培地(NaCl 2%)で培養して、接合伝達した。続いて、培地上の菌体をLB/Cm寒天培地(NaCl 10%)に植え継ぎ、形質転換体の選抜を行い、供与菌あたりの形質転換体の数を求めることで形質転換効率を算出した。

## 3. 結果と考察

### (1) エレクトロポレーションによる形質転換体の作成

適切なエレクトロコンピテントセルを作成するため、低いイオン強度となる培地組成、対数増殖期となる培養時間、菌体の洗浄操作の検討を行った。さらにエレクトロポレーション時の電圧や添加するプラスミドDNA量などについても検討したが、いずれの条件でも形質転換体は得られなかった。

### (2) 接合伝達による形質転換体の作成

*E. coli* S17-1をプラスミド供与菌、*Cobetia*属細菌を受容菌とした接合伝達を試みた結果、LB/Cm寒天培地上に多数のコロニーが得られた(図2)。そのうち、5個のコロニーからプラスミドを抽出し、各コロニーから抽出した、プラスミドのサイズとDNA配列の確認を行った。その結果、変異導入などされおらず、目的のプラスミドが本菌に、適切に導入されていることが示された。

### (3) 接合伝達条件の最適化

続いて、形質転換効率の向上を目的に、プラスミド供与菌と受容菌の比率を検討した。その結果、5-11-6-3株では、供与菌:受容菌の比率が5:1のとき、5-25-4-2株では、供与菌:受容菌の比率が2:1のとき、形質転換効率が最も高かった(表1)。これらの値は、これまでに報告されている海洋細菌の形質転換効率<sup>2)</sup>(*Oceanibulbus indolifex*:  $2.7 \times 10^{-2}$ , *Roseobacter*

*denitrificans*:  $2.0 \times 10^{-4}$ )と同程度であるため、本研究で確立した*Cobetia*属細菌の形質転換法は有効であると考えられる。

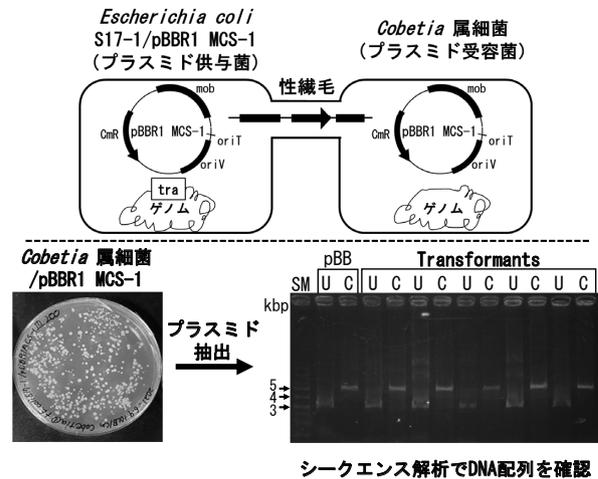


図2 接合伝達による形質転換体の取得  
SM=サイズマーカー、pBB=pBBR1 MCS-1 (4.7 kbp)、  
U=制限酵素未処理、C=制限酵素処理

表1 供与菌と受容菌の比率と形質転換効率

供与菌:受容菌	菌株	
	<i>Cobetia</i> sp. 5-11-6-3	<i>Cobetia</i> sp. 5-25-4-2
1:1	$(1.48 \pm 0.64) \times 10^{-3}$	0
2:1	$(8.69 \pm 1.25) \times 10^{-4}$	$(2.01 \pm 0.55) \times 10^{-2}$
5:1	$(2.92 \pm 1.37) \times 10^{-3}$	$(6.64 \pm 0.23) \times 10^{-4}$

## 4. 今後の展望

今後は、本菌のPHA合成経路に焦点をあて、代謝経路改変による海藻を原料としたPHA生産量の向上を目指していきたい。さらに、*Cobetia*属細菌は、好塩性や速い生育速度など、工業的な物質生産の微生物宿主として有用な性質を有する。よって、本研究で確立した形質転換法は、海藻を原料としたPHA合成に限らず、*Cobetia*属細菌を宿主とした多様な物質生産を目指す際に、重要な技術基盤となることが期待できる。

## 参考文献

- Moriya H., Takita Y., Matsumoto A., Yamahata Y., Nishimukai M., Miyazaki M., Shimoi H., Kawai S., and Yamada M.: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 974 (2020)
- Piekarski T., Buchholz I., Drepper T., Schobert M., Wagner-Doebler I., Tielen P., and Jahn D.: *BMC Microbiology*, **9**, 265 (2009)

# コラーゲン由来ジペプチドである ヒドロキシプロリルグリシンの菌体反応系による生産

古渡 翔・木野 邦器\*

早稲田大学大学院 先進理工学研究科 応用化学専攻  
〒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

コラーゲンペプチドは皮膚及び骨機能の改善に資する健康素材として、食品や化粧品分野で利用されている。このうち *trans*-4-L-ヒドロキシプロリルグリシン (Hyp-Gly) は、コラーゲンペプチド摂取後の血液中にジペプチドのまま長期間残存して機能性を示すことが報告され、近年、それを精製した製品の供給増への期待が大きくなっている。しかし、これまでに Hyp-Gly を効率的に生産するプロセスは報告されていない。そこで我々は、無保護の L-アミノ酸をシーケンシャルに連結してジペプチドを合成する L-アミノ酸リガーゼ (Lal) を用いた Hyp-Gly 生産プロセスの開発に着手した。その際、プロセスの簡略化と低コスト化を目指し、外部添加していた高価な補酵素 ATP の再生が可能な Lal を高発現させた大腸菌を用いる菌体反応系とした。宿主大腸菌による Hyp-Gly 分解や基質 Hyp の取り込み律速、Gly 分解などが生産を阻む新たな課題として顕在化したが、原因酵素の欠失や生産条件の最適化を図り、産業上有用な Hyp-Gly の効率的生産プロセスの開発に成功した。

## 1. はじめに

コラーゲンを加熱変性させて可溶性となったゼラチンを酵素などで加水分解して得られるコラーゲンペプチドは、皮膚及び骨機能の改善に資する健康素材として、食品や化粧品分野で利用されている。コラーゲンペプチドを摂取した際、Hyp を含むジペプチドやトリペプチドがヒトプロテアーゼによる分解に耐性を有し、血中に長期間残存することが明らかになっている<sup>1)</sup>。

Hyp-Gly は血中に比較的多く含有されるため健康機能性に関する研究が盛んに行われており、さらに近年では、Hyp-Gly や X-Hyp-Gly 濃度を高めたコラーゲンペプチドが国内企業にて製品化されている。しかし、このような市場での供給増への大きな期待にも関わらず、現在までに Hyp-Gly を供給可能な生産プロセスは報告されていない。そこで、アミノ酸を原料とする選択的な Hyp-Gly 合成法の開発を検討した。

我々はこれまで、*Pseudomonas syringae* NBRC14081 株由来の Lal である TabS において、L-プロリルグリシン (Pro-Gly) の効率的合成が可能な改変酵素の創製に成功している<sup>2)</sup>。TabS の結晶構造は明らかになっていないものの、既知 Lal における知見を踏まえたアミノ酸配列の比較解析や TabS の構造予測より、基質認識

部位近傍に位置し酵素活性に影響を及ぼす可能性のある Ser85 と His294 残基にサチュレーション変異を加えて Pro-Gly 合成活性の向上した S85T 及び H294D の二種類の有効変異を見出している。また、二重変異酵素とすることで相乗的な活性の向上を確認している<sup>2)</sup>。

以上の経緯を踏まえ、本研究では、Hyp-Gly 合成への TabS (S85T/H294D) の利用と工業生産を見据えたプロセスの開発を目指した。

## 2. 方法

菌体反応系による生産は、TabS (S85T/H294D) 高発現大腸菌を用い、アミノ酸やグルコース (Glc) を含む基質溶液を基本として各種条件検討を行った (図 1)。

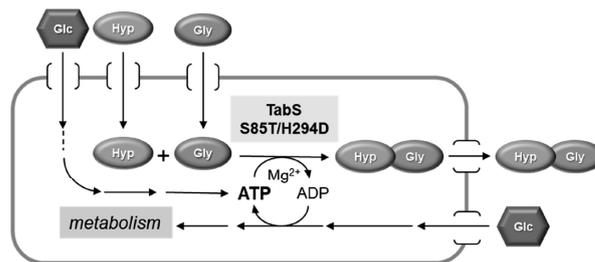


図 1. 菌体反応系による Hyp-Gly 生産

当該菌体反応では、Lal によるジペプチド合成反応と宿主の有する糖代謝系を活用した ATP 生産及び再生系が共役するため、ATP の外部添加を必要としない低コストでの Hyp-Gly 生産が可能になると考えた。

### 3. 結果と考察

#### (1) 精製酵素反応における Hyp-Gly 合成活性評価

TabS (S85T/H294D) 高発現大腸菌より酵素を精製し、宿主内在の酵素による反応への影響を排除した状態で Hyp-Gly 合成活性を評価した。その結果、Pro-Gly と同様に Hyp-Gly についても高収率で合成できることを確認したため、菌体反応系での検討に移行した。

#### (2) Hyp-Gly 分解活性の評価

微生物はジペプチドをアミノ酸に加水分解するペプチダーゼを一般に有している。実際、宿主大腸菌 BL21 (DE3) に外部添加した Hyp-Gly が完全に分解されたため (図 2 左)、この分解活性の抑制が必要となった。

そこで、Pro-Gly をはじめとする広範にジペプチドを分解することが報告されているペプチダーゼ D (PepD)<sup>3)</sup> を欠失させた大腸菌 BL21 (DE3)  $\Delta pepD$  株を作製して Hyp-Gly 分解活性の有無を評価した。その結果、PepD が Hyp-Gly の主要な分解に関与することが明らかになり、当該大腸菌欠損株を宿主とすることで Hyp-Gly 分解の大幅な抑制に成功した (図 2 右)。

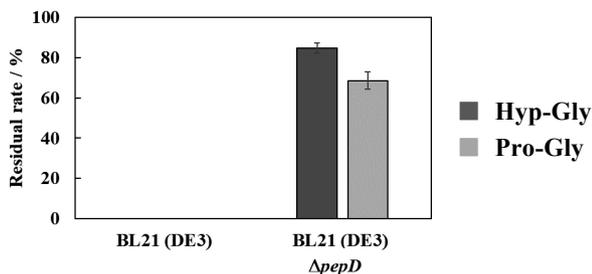


図 2. PepD 欠失による Hyp-Gly と Pro-Gly の分解活性

#### (3) Hyp-Gly 生産における Hyp 取り込み律速の解除

大腸菌 BL21 (DE3)  $\Delta pepD$  を宿主とする組換え株では、予想に反して Hyp-Gly の蓄積は認められなかった。Pro-Gly 生産での蓄積量もわずかであったため本宿主では Hyp と Pro の菌体内取り込みが律速と推察した。

そこで、Pro 取り込み強化に有効と報告のある高浸透圧下での K<sup>+</sup>添加<sup>4)</sup> が Hyp にも効果があると考え、KCl の各種添加濃度にて Hyp-Gly 生産試験を実施した。その結果、Hyp-Gly の蓄積が初めて確認され、400 mM KCl 添加時に収量が最大となった (図 3)。本結果より、Hyp-Gly 生産において Hyp 取り込み律速解除の重要性

を明らかにし、ATP 無添加での菌体反応系による Hyp-Gly 生産に成功した。

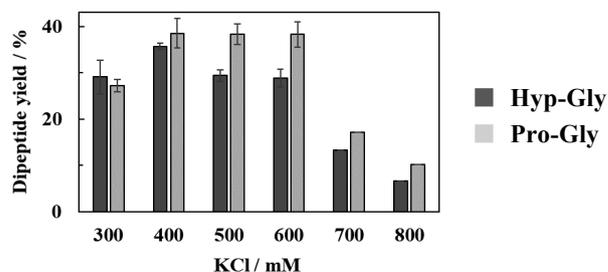


図 3. ジペプチド合成収率に及ぼす KCl 添加濃度の影響

#### (4) 生産条件の最適化検討

KCl 添加による Hyp 取り込み強化では Hyp-Gly の生産収率はまだ高くない (図 3)。そこで、Hyp-Gly 生産へ影響を与える因子を多面的に検討した結果、基質である Gly と菌体の濃度に着目した。菌体濃度増は生産収量向上に効果があったが、大腸菌による Gly 分解を確認していたため、両因子のバランスを考えて検討した。その結果、Gly の増量は菌体濃度増によるマイナス効果を緩和し、Hyp-Gly 生産活性の向上に有効であった。条件の最適化により、Hyp-Gly の対 Hyp モル変換率 80% を超える高収量生産に成功した。

### 4. 今後の展望

本研究では、大腸菌における Hyp の取り込み律速を明らかにし、その解消のもと ATP の外部添加を必要としない効率的な Hyp-Gly 生産プロセスの開発に成功した。本結果は、コラーゲン由来ジペプチドの微生物生産に成功した初の報告である。今後は本プロセスのスケールアップ等、工業化に向けた検討を進める。

### 謝辞

本研究は、その研究費の一部を焼津水産化学工業株式会社からの支援を受けて行われた。

### 参考文献

- 1) Shigemura Y., et al., *J. Food Chem.*, **129**, 1019–1024 (2011).
- 2) Kino H., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 155–159 (2016).
- 3) Ulrich, S., et al., *Microbiology*, **123**, 153–160 (1994).
- 4) Sasaki H., et al., *Bull. Soc. Sea Water Sci.*, **79**, 64–69 (2010).

# *Aspergillus nidulans* 由来新規ラムノガラクトツロナンリアーゼの 機能・構造解析

鈴木 裕満<sup>1</sup>・伊東 昂希<sup>1</sup>・酒井 杏匠<sup>1</sup>・堀 千明<sup>2</sup>・高須賀 太一<sup>3</sup>・加藤 雅士<sup>1</sup>・  
志水 元亨<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>名城大学大学院農学研究科農学専攻

<sup>2</sup>北海道大学工学研究院応用化学部門生物工学分野

<sup>3</sup>北海道大学農学研究科連携研究部門連携推進分野

〒468-8502 愛知県名古屋市天白区塩釜口1丁目501

E-mail: moshimi@meijo-u.ac.jp

糸状菌は、外界に存在する多糖に応答して様々なタンパク質を分泌することが知られている。本研究では、糸状菌のモデル生物の一種である *Aspergillus nidulans* がペクチン応答的に生産する細胞外タンパク質を網羅的に解析した。その結果、306 種のタンパク質が同定された。機能既知のタンパク質（多糖分解関連酵素、プロテアーゼ、リパーゼ、その他）の他に、すでに機能が明らかになっているタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性のない機能未知タンパク質 (HP) が 55 種類同定された。同定された HP のリコンビナントタンパク質を調製し、種々の多糖と反応させたところ、HP1 はペクチンの主鎖であるラムノガラクトツロナン (RG) を脱離分解する新規の RG lyase であることが判明した。さらに、X 線結晶構造解析から  $\beta$ -helix 型の構造を有することが明らかとなった。

## 1. 背景

植物細胞壁に含まれる多糖は、セルロース、ヘミセルロース（主にキシランおよびマンナン）、ペクチンから構成されており、糸状菌はこれらの多糖を分解・利用している (Rytioja J. *et al.*)。ペクチンは様々な構成成分からなり、それらの結合様式も多岐にわたる複雑な構造を有するが、糸状菌によるペクチン分解機構については、未だ完全には解明されていない。近年、腸内細菌によるペクチンの分解についての研究がなされ、これまでに報告されていない活性を有する新規酵素が多数見出されている (Ndeh D. *et al.*, Ana SL. *et al.*)。しかしながら、腸内細菌から見出されたペクチン分解に関与する酵素遺伝子の多くは糸状菌のゲノム DNA にコードされている遺伝子とは相同性を有さない。このことから、糸状菌には未知のペクチン分解酵素が存在することが予想された。

本研究ではモデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* がペクチン応答的に生産する細胞外タンパク質を網羅的に解析し、同定された機能未知タンパク質 (HP) の機能を明らかにすることを試みた。

## 2. 材料と方法

ペクチンを唯一の炭素源として *A. nidulans* を 48 時間培養し、生産された細胞外タンパク質を LC-MS/MS にて網羅的に解析した。同定された HP をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* にて異種生産させ、機能を解析した。HP と種々の多糖 ( $\alpha$ -1,5-アラビナン、アラビノガラクトタン、 $\beta$ -1,4-ガラクトタン、ポリガラクトツロン酸、ラムノガラクトツロナン I (RGI)、ラムノガラクトツロナン (RG)) を反応させ、それぞれの分解産物を TLC および MALDI-TOF-MS にて解析した。また、機能が明らかになった HP1 について、X-線結晶構造解析を行った。

## 3. 結果と考察

### 同定された細胞外タンパク質の種別

ペクチンを唯一の炭素源として *A. nidulans* を培養したところ、306 種の細胞外タンパク質が同定された (図 1)。機能既知のタンパク質（多糖分解関連酵素、プロテアーゼ、リパーゼ、その他）の他に、すでに機

能が明らかになっているタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性のない機能未知タンパク質 (HP) が 55 種類同定された。

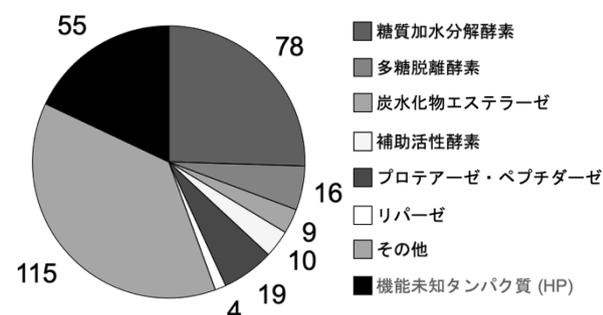


図 1. 同定されたタンパク質の種類別。

### TLC による多糖分解産物の分析

同定された HP1 を *P. pastoris* にて異種生産させ精製後、種々の多糖 ( $\alpha$ -1,5-アラビナン, アラビノガラクトタン,  $\beta$ -1,4-ガラクトタン, ポリガラクトン酸, RGI, RG) と反応させた。その結果、 $\beta$ -1,4-ガラクトタン (不純物として RG を含む), RGI および RG にて分解産物が検出された (図 2)。

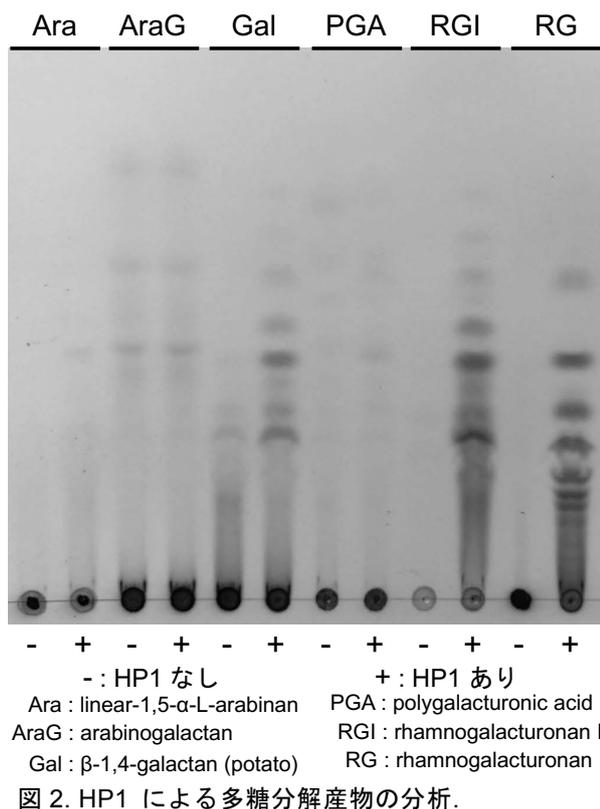


図 2. HP1 による多糖分解産物の分析。

### MALDI-TOF-MS による RG 由来の分解産物の同定

HP1 による RG の分解産物を MALDI-TOF-MS に

て解析した。その結果、不飽和 RG オリゴ糖 ( $\Delta$ GR など) が検出されたことから、HP1 は新規ラムノガラクトツロンリアーゼであることが明らかとなった (図 3)。

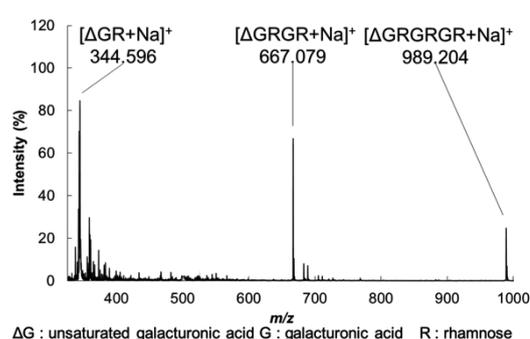


図 3. HP1 による RG 分解産物の同定。

### X線結晶構造解析による HP1 の立体構造

HP1 は  $\beta$ -helix 型の構造を有することが明らかとなった (図 4)。現在 HP1 の活性アミノ酸残基の特定など詳細な解析を進めている。

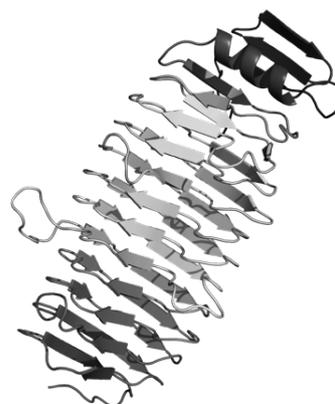


図 4. HP1 の立体構造。

### 4. 今後の展望

今後は HP1 と基質との複合体構造を明らかにし、基質結合部位の特定および反応機構の解明を試みる。HP1 は植物細胞壁を構成するペクチンに含まれる RG を分解し、RG オリゴ糖を生産することから、ペクチンからのオリゴ糖生産および植物バイオマスの利用に貢献しうる。

### 参考文献

- [1] Rytioja J. *et al*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **78**, 614, (2014)
- [2] Ndeh D. *et al.*, *Nature*, **548**, 612, (2017)
- [3] Ana SL. *et al.*, *Nat. Microbiol.*, **3**, 210-219, (2018)

# ヒト腸内細菌 *Bacteroides cellulosilyticus* による

## 海藻多糖 $\beta$ -1, 3-キシランの資化機構

### — 分泌型 $\beta$ -1, 3-キシラナーゼの機能解析 —

堀 沙那恵<sup>1</sup>・岡崎 文美<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>三重大学 大学院生物資源学研究所, <sup>2</sup>三重大学 先端科学研究支援センター

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577 三重大学大学院生物資源学研究所

Tel: 059-231-9561 Fax: 059-231-9634

E-mail: okazaki@bio.mie-u.ac.jp

$\beta$ -1, 3-キシランは、紅藻類および緑藻類の細胞壁にのみ存在する海藻特有の多糖である。 $\beta$ -1, 3-キシラン資化能を有する細菌は主に海洋環境から分離されており、これまでにヒト腸内細菌では報告がない。近年、ヒト腸内細菌が海藻多糖類の資化酵素遺伝子を有することが明らかとなってきたことから、ヒト腸内細菌ゲノム情報を探索した結果、ヒト腸内細菌 *B. cellulosilyticus* のゲノム中に推定  $\beta$ -1, 3-キシラン資化遺伝子クラスターを見出した。本遺伝子クラスターに含まれる 2 種類の分泌型  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼの機能解析を行ったところ、両酵素は異なる作用様式を有し、相乗的作用により  $\beta$ -1, 3-キシランを効率的に分解していることが示唆された。本研究結果は、ヒト腸内における優勢菌群である *Bacteroides* 属細菌が、海藻多糖  $\beta$ -1, 3-キシランの資化能を有することを示すものであり、海藻食とヒトの健康に関する新たな知見を与えるものと考えられる。

## 1. はじめに

$\beta$ -1, 3-キシランは D-キシロースが  $\beta$ -1, 3-結合した直鎖構造のホモポリマーであり、紅藻類および緑藻類の細胞壁にのみ存在する海藻特有の多糖である<sup>1)</sup>。代表的な食用海藻では、海苔の原料である紅藻スサビノリおよびアサクサノリ、緑藻クビレズタ（ウミブドウ）などに含まれている。

$\beta$ -1, 3-キシラナーゼは  $\beta$ -1, 3-キシロシド結合を加水分解する酵素の総称であり、 $\beta$ -1, 3-キシランに作用して種々のオリゴ糖を生ずるエンド  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼ (1, 3- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32) と、 $\beta$ -1, 3-キシランおよび  $\beta$ -1, 3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生ずるエキソ  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼ ( $\beta$ -1, 3-キシロシダーゼ) (1, 3- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.72) に分類される<sup>2)</sup>。

$\beta$ -1, 3-キシラン資化能を有する細菌は主に海洋環境から分離されており、現在までに酵素機能が明らかとなっているエンド  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼ遺伝子は海洋性細菌由来の 8 遺伝子のみである<sup>3)</sup>。これまでに

$\beta$ -1, 3-キシランを資化するヒト腸内細菌は報告されていない。

近年、ヒト腸内細菌 *Bacteroides plebeius* が、紅藻類の硫酸化多糖ポルフィランの資化遺伝子を有することが明らかとなり、ヒト腸内細菌による海藻多糖類の資化が注目された<sup>4)</sup>。*Bacteroides* 属細菌はヒト腸内における優勢菌群であり、多糖類の資化遺伝子がクラスターを形成した Polysaccharide Utilization Loci (PULs) により、多様な多糖類を効率的に資化している。

そこで我々は、既報の海洋性細菌由来  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼ遺伝子と配列相同性を示す遺伝子をヒト腸内細菌ゲノム情報から探索した。その結果、ヒト腸内細菌 *B. cellulosilyticus* のゲノム中に推定  $\beta$ -1, 3-キシラン資化遺伝子クラスターを見出した。本研究では、ヒト腸内細菌による  $\beta$ -1, 3-キシランの資化機構を明らかにすることを目的として、本遺伝子クラスターに含まれる 2 種類の分泌型  $\beta$ -1, 3-キシラナーゼ (*BcXyn26A* および *BcXyn26B*) の機能解析を行った。

## 2. 方法および結果

### (1) $\beta$ -1,3-キシラナーゼ遺伝子の探索

既報の  $\beta$ -1,3-キシラナーゼ<sup>3)</sup> をクエリーとして、BLAST 検索した結果、*B. cellulosilyticus* のゲノム配列中に分泌型  $\beta$ -1,3-キシラナーゼをコードすると推定される 2 遺伝子 (*xyn26A* および *xyn26B*) が推定  $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ遺伝子および推定糖輸送体遺伝子と共にクラスターを形成していることを見出した (図 1)。両遺伝子と高い配列相同性を有する遺伝子は、*B. intestinalis*, *B. timonensis*, *B. gallinarum* のゲノム中からも見出され、それらは同様の遺伝子クラスターを形成していた。

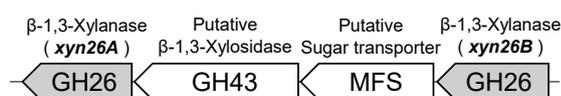


図 1. 推定  $\beta$ -1,3-キシラン資化遺伝子クラスター

両遺伝子の演繹アミノ酸配列に基づく相同性検索と分子系統解析の結果、*Bacteroides* 属細菌由来の配列が相同性を示した配列は海洋性細菌由来のものであったことから、これらの遺伝子は海洋性細菌からの水平伝播により獲得されたことが推察された (図 2)。

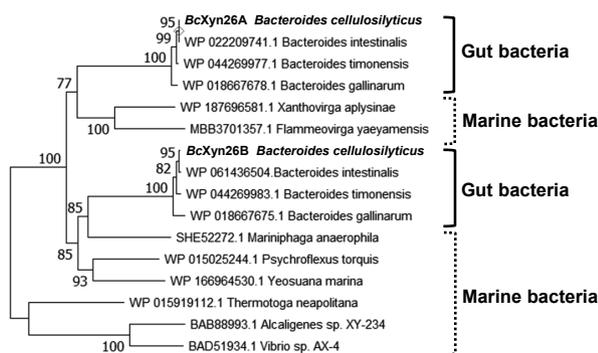


図 2.  $\beta$ -1,3-キシラナーゼの分子系統樹

### (2) $\beta$ -1,3-キシランに対する作用性

両遺伝子の塩基配列をコドン最適化後に全合成した。大腸菌 BL21 (DE3) を発現宿主として組換えタンパク質を発現、精製し、組換え酵素 *BcXyn26A* および *BcXyn26B* を調製した。精製酵素を  $\beta$ -1,3-キシランと反応させ、反応生成物を TLC で確認した。その結果、両酵素は  $\beta$ -1,3-キシランに特異的に作用したことから、いずれも  $\beta$ -1,3-キシラナーゼであることが明らかになった。*BcXyn26B* は  $\beta$ -1,3-キシロピオースを主生成物とする種々の重合度の  $\beta$ -1,3-オリゴ糖を生成し、典型的なエンド型の作用様式を示した。一方、*BcXyn26A* は  $\beta$ -1,3-キシロピオースのみを生成し、エキソ型様の作用様式を示した。両酵素を同時に反応させた場合では、単糖と二糖のみが検出された (図 3)。このことから *BcXyn26B* が生成した重合度 3 以上の  $\beta$ -1,3-キシロオ

リゴ糖に *BcXyn26A* が作用して単糖と二糖に分解するという、両酵素の相乗的作用により  $\beta$ -1,3-キシランを効率的に分解していることが考えられた。

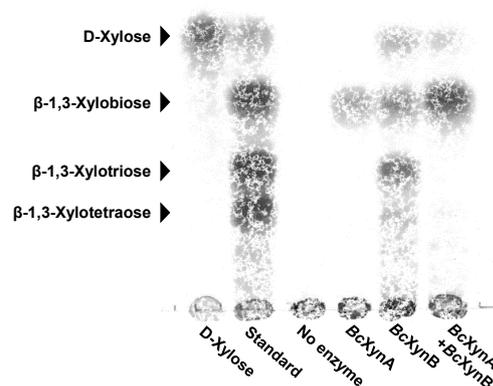


図 3.  $\beta$ -1,3-キシランに対する作用性

### (3) 反応至適温度および反応至適 pH

*BcXyn26A* の反応至適温度は、35 °C であり既報の中温性海洋細菌由来酵素と同様であった。一方、*BcXyn26B* の反応至適温度は 50 °C と高い値を示した。また、反応至適 pH は、*BcXyn26A* は 7.5、*BcXyn26B* は 5.0~6.5 であり、両酵素で差異が見られた。このことは、両酵素遺伝子が異なる海洋性細菌からの水平伝播に由来することを示唆している。

### (4) $\beta$ -1,3-キシランの推定資化機構

以上の結果から、*B. cellulosilyticus* は *BcXyn26A* および *BcXyn26B* の相乗的作用により菌体外で  $\beta$ -1,3-キシランをキシロースおよび  $\beta$ -1,3-キシロピオースまで分解し、次いで糖輸送体により菌体内に取り込み、菌体内の  $\beta$ -1,3-キシロシダーゼがキシロースにまで分解し、資化すると推定している。今後、ヒト腸内細菌による  $\beta$ -1,3-キシラン資化機構の解明を進める。

## 3. 今後の展望

*Bacteroides* 属細菌は、宿主ヒトの生理機能に影響を与える有用腸内細菌と考えられている。本研究結果は、海藻食とヒトの健康に関する新たな知見を与えるものであり、新しいプレバイオティクスあるいはシンバイオティクスとしての応用展開が期待される。

### 参考文献

- [1] Iriki, Y. *et al.*: *Nature*, **187**, 82-83 (1960)
- [2] Fukui, S. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 270-282 (1960)
- [3] Okazaki, F. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 6749-6757 (2013)
- [4] Hehemann, J. H. *et al.*: *Nature*, **464**, 908-912 (2010)

# 新規 2 次元分離プロテオミクスによる 自己抗体バイオマーカー探索法の開発

益井 実鈴<sup>1</sup>・塩川 つぐみ<sup>2</sup>・多田 宏子<sup>2</sup>・二見 淳一郎<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>岡山大学院ヘルスシステム統合科学研究科, <sup>2</sup>岡山大学自然生命支援センター

〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1 岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科

Tel: 086-251-8217

\*E-mail: futamij@okayama-u.ac.jp

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の登場により, がん免疫治療への期待が高まっているが, ICI の奏効は個人差が大きい点が課題である. 当研究室ではがん免疫治療の個別化医療を促進する診断薬として自己抗体を網羅的に定量評価するシステムを開発中であり, 肺がんに対する ICI 治療の臨床経過と相関する自己抗体バイオマーカーの探索も同時に進めている. 本研究では, ヒト肺がん由来細胞株の lysate に対して反応する自己抗体が認識している抗原をプロテオミクス手法で効率的に同定するため, 動物細胞内の総タンパク質の可溶化技術と, 逆相 HPLC を組み合わせて hydrophobicity/molecular-mass (HYD/MM) で分離する新規な 2 次元電気泳動法の開発に成功し, 簡易で再現性の高い手法として活用できることを確認したので, その手法をご紹介します.

## 1. はじめに

従来のがんの 3 大治療法 (化学療法・外科療法・放射線療法) に加え, 現在, がん免疫療法が新しい柱として注目されている. 特に免疫チェックポイント阻害剤は, 一部の進行がんに対して従来の治療成績を大幅に上回る著効例を示す一方で, 個人差も大きく, 奏効率の予測と, この治療が効かない患者群への対応が大きな課題となっている. この課題突破には, がん免疫応答をプロファイリングし, がん免疫サイクルの活性化レベルをモニタリングする技術で現場をサポートしなければならない. 当研究室ではがん免疫サイクルの活性化に伴って上昇する各種の「がん抗原に対する自己抗体群」をバイオマーカーとして定量評価する抗体検査診断技術 (MUSCAT-assay)<sup>1)</sup> の開発を進めている. 本研究では, このバイオマーカー網の強化を目的に, 各種の臨床検体の血清中に含まれる自己抗体バイオマーカーをプロテオミクスで同定・拡張する作業を進めている. この過程で, 肺がん患者由来の血漿検体を活用し, ヒト肺がん由来細胞株の cell lysate に対して反応する自己抗体バイオマーカーの出現パターンを 1 次元電気泳動を用いて western blotting 法で解析を行っていたが, SDS-PAGE の結果よりバンドが非常に込み合っており, 目的バンドを切り出すことが大変困難であり, 2 次元電気泳動法が必要となる. 等電点

と分子量で分離する 2 次元分離は広く活用されている信頼性の高い技術であるが, 数百検体の解析を想定するとコスト面からも効率化を考えたい. 我々は以前, ヒト培養細胞内の総タンパク質から核酸を完全に除去すると, 変性状態でも高い水溶性を示すことを発見<sup>2)</sup> しており, この技術を活用することとした (図 1). この可溶性変性総タンパク質は逆相 HPLC で疎水性度別に大量かつ精細に分画が可能である. これを SDS-PAGE で分離するだけで, 高い再現性で HYD/MM で 2 次元分離されたゲルを容易に大量生産ができる手法を開発した.

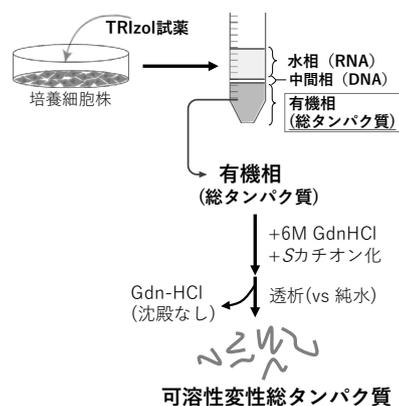


図 1. 動物細胞内の総タンパク質の可溶化技術

## 2. 方法および結果

### (1) 細胞内総タンパク質 (TCP) の調製

ヒト培養肺がん細胞株より TRIZOL Lysate を調製し、核酸の入っていない有機相のみを抽出して総タンパク質を取得した。6M の Gdn-HCl で変性させたあと TAPS-Sulfonate による S-カチオン化を行った。純水に対して透析することで可溶性の変性タンパク質を取得した。なお、このサンプル中には細胞内総タンパク質がほぼ完全に可溶化できていることを確認している。

### (2) 逆相 HPLC と SDS-PAGE による 2 次元分離

TAPS-TCP を逆相 HPLC により疎水性度別に分画し、1 分ごとにサンプルを回収した。分画サンプルを凍結乾燥処理することで SDS-PAGE に使用できるサンプルを取得し、SDS-PAGE で分離した (図 2)。

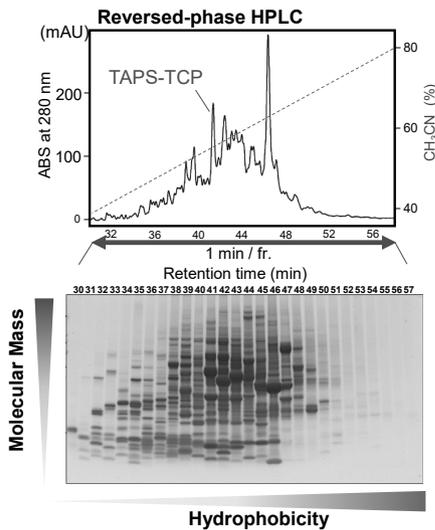


図 2. HYD/MM による TAPS-TCP の 2 次元分離

### (3) 新規 2 次元分離技術を用いたプロテオミクス

MUSCAT-assay による測定で、腫瘍抗原 p53 に対する自己抗体価が高いことが判明している肺がん患者血漿をモデルとして使用し、2 次元分離技術を活用した western blotting を行った。この結果、自己抗体がメインバンドとして反応していることが示された (図 3)。また、メインバンドに対応するバンドを CBB 染色ゲルから切り出してゲル内酵素消化を行い、LC-MS/MS 解析を行った。MASCOT 検索結果より、切り出したバンドに p53 タンパク質が含まれていることが確認された。

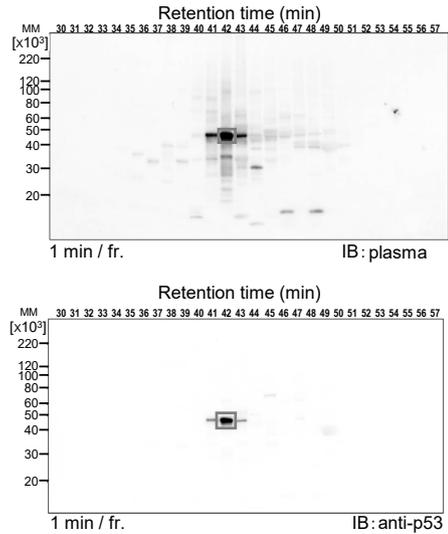


図 3. 肺がん患者血漿を用いた western blotting (上) とリプロービングによる検証 (下)

## 3. 今後の展望

今回開発した HYD/MM による 2 次元分離技術は、逆相 HPLC で TCP を分画さえすれば、あとは品質が一定の市販ゲルを用いて SDS-PAGE を行うことで、低コストに均質なレプリカを大量に調製することが可能である。我々の実施データに基づけば、10cm シャーレ 6 枚分の培養細胞から 18mg の TCP が取得され、144 枚分の 2 次元分離が同一サンプルから容易に調製できる。また、分離能を上げるためには逆相 HPLC 分画のフラクションタイムを短くすれば解像度も上げられ、従来の pI/MM に匹敵する分離を再現することができる手法である。よってこの新規法は、多検体の測定を「安価かつ高解像度」で実施できる画期的な方法であり、大規模なプロテオミクスに貢献すると考えられる。

## 謝辞

本研究の一部は JST-START プロジェクト支援型の助成により行われた。

## 参考文献

- 1) Futami J, et al.: *Bioconj. Chem.* **26**, 2076 (2015)
- 2) Futami J, et al.: *PLoS One*, **9**, e113295 (2014)

# 新規架橋型高親和性低分子ペプチドを使った 抗体医薬品の精製技術

伊東 祐二\*・大迫 奈菜・嶋本 亮輔・寺西 広翼・早田 光希・アブドゥール ラフィーク

鹿児島大学理工学研究科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1 丁目 21-35 鹿児島大学理工学研究科

Tel: 099-285-8110 Fax: 099-285-8037

E-mail: yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

抗体医薬品の製造において、*Staphylococcus* 属バクテリア由来のプロテイン A を固定化したプロテイン A カラムは、現在、必要不可欠な抗体の精製技術となっている。しかし、このプロテイン A は、分子量も大きく高価であるという問題から、長くこの代替物の開発が求められてきた。そこで、我々はランダムペプチドライブラリよりヒト IgG の Fc に特異的な分子内 SS 結合を含む 17 残基のペプチドを見出し、抗体精製用の親和性リガンドとして利用するため、その改良を行ってきた。Fc への親和性を維持しながら種々の SS 結合の変換を行い、最終的に、抗体精製用の親和性リガンドとして、プロテイン A の代替物となりうる特性を持つペプチドリガンドのデザインに成功した。本研究で開発したペプチドを使った抗体医薬品製造用の新規精製プロセスの開発が期待される。

## はじめに

抗体医薬品は、ガンや自己免疫疾患をはじめ、様々な疾患に対する極めて有効な治療薬として臨床の現場で使用されており、今後も多くの抗体医薬品の開発が進んでいくと考えられる。この抗体医薬品の製造において、*Staphylococcus* 属バクテリア由来のプロテイン A を固定化したプロテイン A カラムは、現在、必要不可欠な抗体の精製技術となっており、極めて大きな市場を占めている。しかし、これに用いるプロテイン A は、発現用宿主細菌由来のタンパク質やエンドトキシンの混入を避けるため、高度な精製が必要であり、精製用のリガンドとしては高価であるという課題を持つ。

この課題を解決するため、新たな抗体精製用のリガンドの開発がおこなわれてきたが、現在までに実用化に至っていない。我々は、新たな抗体精製用のリガンドを開発するため、T7 ファージディスプレイシステムによって構築したランダムペプチドライブラリから、バイオパニングという手法により、ヒト IgG<sub>1</sub> の Fc に結合するペプチドを見出し、アミノ酸の変異導入により改良することで、高親和性ペプチド IgG-BP を得た<sup>1,2)</sup>。この IgG-BP は、分子内 SS 結合を有する 17 残基からなるペプチド(アミノ酸配列: GPDCAYHRGELVWCTFH)

で、ヒト IgG<sub>1</sub> 抗体に、 $K_D$  値 8 nM で結合する。さらに、このペプチドを固定化したカラムを用いて、ヒト血清より IgG を精製すると 98% 以上の純度での抗体精製が可能であることが分かった。このように、IgG-BP は、抗体精製用のアフィニティリガンドとして十分な機能を有していたが、欠点として分子内に有する SS 結合が、還元剤やカラムの再生時に使用するアルカリ溶液に対する耐性が弱いことが、実用化の道を阻んでいた。

本研究では、IgG-BP の高い IgG への親和性を維持しながら、IgG-BP の分子内 SS 結合を別の結合へ変換することで、還元剤やアルカリ溶液に対する耐性を獲得させることに成功した<sup>3)</sup>。本発表では、新規架橋型 IgG-BP (IgG-BPA) の特性と、それを固定化したカラムの性質を新規抗体精製技術確立に向け評価した。

## 結果と考察

### IgG-BP の分子内 SS 結合の新規架橋

還元剤やアルカリ性に対し耐性の弱い SS 結合は、繰り返し使用される抗体医薬品精製用アフィニティリガンド中からは、排除したい構造である。これを達成するため、別の共有結合への変換など種々の検討を行ったが、その中で、SS 結合還元後のチオールの架橋方法

について、表 1 に示した架橋剤を使って検討した（使用したペプチドは、IgG-BP の N 末端側にスペーサーとして GSGGS の配列を付加したのものを使用した）。架橋後、架橋物を逆相 HPLC にて精製し、BIAcore T-200 にて、ヒト IgG<sub>1</sub> との親和性を評価した。その結果、表 1 に示したように、元の IgG-BP に比べ、1, 1-dichloroacetone 架橋では、親和性の低下 ( $K_d$  の上昇) が 5 倍程度に抑えられ、また、1, 1-dichloroacetophenone 架橋の様に、親和性が元のペプチドよりむしろ強くなるものが見られた。

表 1 IgG-BP の架橋物のヒト IgG<sub>1</sub> 抗体との親和性

架橋剤	$K_d$ 値 (nM)
(SS 結合)	8.0
1, 1-dichloroacetone	45.6
1, 1-dichloroacetophenone	6.4
1, 1-dichloropinacolin	112
1, 3-dichloroacetone	4900

これらの架橋剤の架橋反応を図 1 に示す。このようなペプチド・タンパク質の SS 結合還元後のチオールの架橋方法として、1, 1-dichloro 誘導体を使用したのは、本研究が初めてであり、SS 結合の間に 1 炭素のみを挿入することで、元のペプチドの構造を大きく変化させず、その結果、親和性が保持されたと考えている。

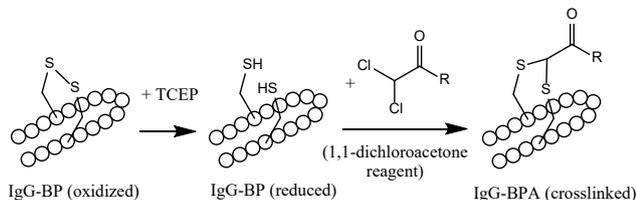


図 1 1,1-dichloroacetone 誘導体試薬による IgG-BP の架橋反応

### 新規架橋ペプチド IgG-BPA 固定化カラムによる抗体の結合溶出試験

1, 1-dichloroacetone 架橋した IgG-BPA を NHS で活性化した樹脂 (HiTrap-NHS, Cytiva) に固定化し、抗体の結合・溶出・再生試験を行った結果を図 2 に示すが、pH 7.4 と pH 3.0 での pH の変化で、抗体の吸着、溶出が行えていることが分かる。

### 新規架橋ペプチド IgG-BPA 固定化カラムのアルカリ耐性

最後に、この IgG-BPA 固定化カラムを用いた、アルカリ処理後の DBC (Dynamic Binding Capacity) の評価結果を図 3 に示した。元の IgG-BP が繰り返しのアルカリ処理によって急速に DBC の低下がみられるのに対し、1, 1-dichloroacetone 架橋体 (IgG-BPA) では、30 回処理に対しても DBC (並びに SBC) の大きな低下は見

られなかった。このように、IgG-BPA は、架橋によって大きなアルカリ耐性を獲得していることが分かった。

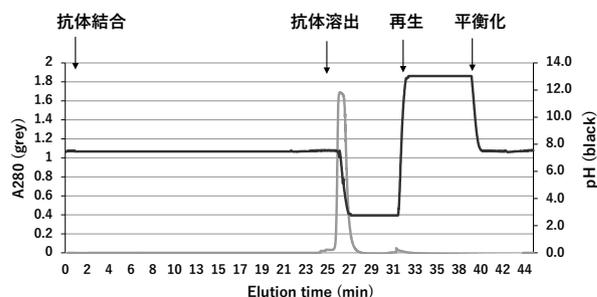


図 2 新規架橋型 IgG-BP を固定化したカラムによるヒト IgG 抗体の結合・溶出・再生試験

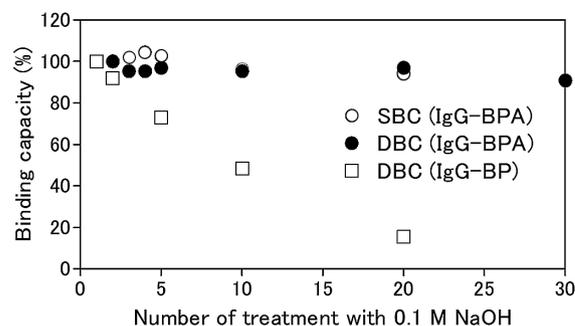


図 3 IgG-BPA を固定化したカラムのアルカリ処理に対する耐性 1 回処理後の結合容量に対する相対値 (%) で示した。

以上の様に、本研究で開発した、SS 結合間を炭素原子 1 個で挟むチオエーテル結合にて架橋する方法により、IgG-BP の抗体親和性を大きく低下させることなく、その化学的安定性を上げることに成功した。得られた新規架橋型 IgG-BPA を固定化したカラムは、抗体精製用カラムとして十分な機能を有することが示されたことから、本カラムによる新たな抗体医薬品精製技術の確立を目指したい。

本研究は、AMED 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業：課題番号 20am0401002 の成果であることを申し添えます。

## 文 献

- 1) 特許第 5994068 号/2016.9.2: IgG 結合性ペプチド及びそれによる IgG の検出および精製方法
- 2) Kishimoto, S. et al., *Bioconjugate Chemistry*, **30**, 698-702 (2019).
- 3) 特願 2021-082739: ペプチド架橋剤及び当該架橋剤で架橋された架橋ペプチド

# 遊離ナノボディのアフィニティをハイスループットに 評価可能とするペプチドバーコーディング

宮崎 拓己<sup>1</sup>・松崎 友星<sup>1</sup>・青木 航<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>・植田 充美<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> 京大院・農, <sup>2</sup> JST CREST, <sup>3</sup> JST COI-NEXT, <sup>4</sup> 京都バイオ計測センター, <sup>5</sup> JST FOREST

〒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

ナノボディは、通常の抗体と同等の親和性を有しつつ、大きさが 1/10 程度であるため組織浸透性や生産性に優れ、次世代抗体として注目を集めている。我々は、遊離型のナノボディの結合力をハイスループットに評価可能なペプチドバーコーディング法を開発した。本手法は、ナノボディのわずかな結合力の差を区別しつつ、数千から数十万種類の遊離型ナノボディの結合力をワンポットで評価可能である。本手法により、優れたナノボディを迅速に取得できるようになると期待される。

## 1. はじめに

ナノボディとはラクダ科由来の重鎖抗体の変領域である。ナノボディは通常の抗体と比べて同等の親和性を有しつつ、通常の抗体の 1/10 程度の大きさであるため組織浸透性や微生物による生産性などに優れ、次世代抗体のひとつとして注目を集めている。

ナノボディの結合力をハイスループットに評価するために、ファージディスプレイや酵母ディスプレイなどが一般的に用いられる。しかし、ファージや酵母などの担体に固定化したナノボディは遊離状態と異なる結合力を示すことも多く、結合力を正確に定量するには適していない。

そこで我々は、遊離型ナノボディの結合力をハイスループットに評価可能なペプチドバーコーディング法を開発してきた[1]。本手法ではまず、各ナノボディに対して、ユニークなペプチドバーコードをエンコードする DNA バーコードを対応付ける (図 1a)。ペプチドバーコードは、質量分析計で高感度かつ特異的に検出できるように設計する。次に、ペプチドバーコード付加ナノボディライブラリとして *Pichia pastoris* に一斉発現させる (図 1b)。このナノボディライブラリを抗原と混合し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

で結合力依存的にナノボディを分画する (図 1c)。最後に、各フラクションのペプチドバーコードを質量分析計で定量し、各ナノボディの結合力を推定する (図 1d)。先行研究においてペプチドバーコーディング法のコンセプトを実証したが、微小な結合力の差を評価できるかどうかは不明であった[1]。そこで本研究では、ナノボディのわずかな結合力の変化をペプチドバーコーディング法で評価できることを実証しようと試みた。

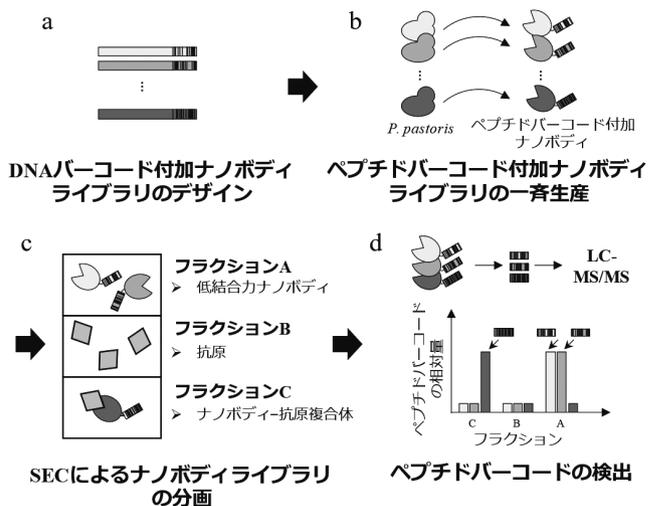


図 1. ペプチドバーコーディング法の概略

## 2. 方法

モデルとして、結晶構造が明らかになっている anti-GFP nanobody を用いた[2]. Anti-GFP nanobody の網羅的アラニン置換ライブラリを構築し、各変異体にユニークなペプチドバーコードを付与した。全ナノボディ変異体を一斉に *P. pastoris* に発現させ、ナノボディ変異体ライブラリを調製した。ナノボディを結合力の違いで分離するために、GFP 抗原と反応させた後、SEC で分画した。それぞれのフラクションをトリプシンで処理してペプチドバーコードを遊離させ、質量分析によりペプチドバーコードを定量することで各ナノボディ変異体の結合力を推定した。

## 3. 結果と考察

### (1) ナノボディ変異体ライブラリの構築と分離

まず、多様なペプチドバーコードを WT anti-GFP nanobody に付加して SPR で評価したところ、解離定数に影響は見られなかった。この結果は、ペプチドバーコード自体はナノボディの結合力に影響しないことを示唆している。次に、GFP のみ・ナノボディ変異体ライブラリのみ・それらの等モル混合物を SEC で分離した。その結果、等モル混合物において高分子量側にシフトしたピークが観察され、抗原との結合力に依存してナノボディを分画することに成功した (図 2)。

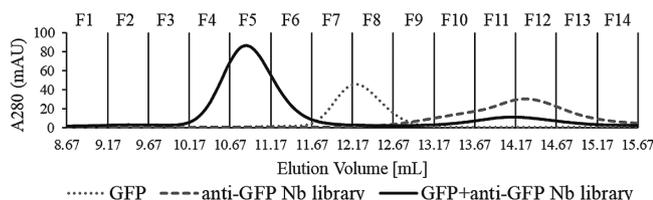


図 2. SEC によるナノボディ変異体ライブラリの分離

### (2) ペプチドバーコードの定量による各ナノボディの結合力の推定

我々は、SEC の各フラクションにおけるペプチドバーコードの存在比率を定量することで、各ナノボディ変異体の結合力を推定できると考えた。GFP とナノボディ変異体ライブラリの等モル混合物のフラクション (結合画分 F5 と非結合画分 F12) を回収してペプチドバーコードを定量したところ、大部分のペプチドバーコードは、F5 に含まれていた。一方、5 種類のナノボディ変異体 (R35A, Y37A, W47A, G50A, E103A) のペプチドバーコードの大半が F12 で検出された (図 3a)。

GFP とナノボディ変異体ライブラリのモル比 2:1 混合

物において同様の分析を行ったところ、非結合画分には R35A と R103A 由来のペプチドバーコードのみが多量検出された (図 3b)。これらの結果は、各変異体の結合力変化を反映していると考えられる。

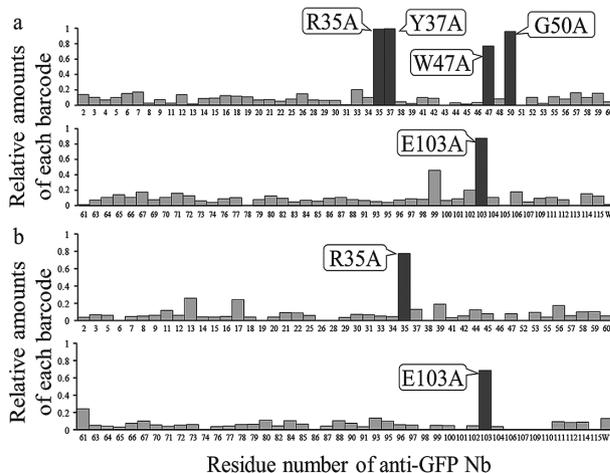


図 3. 各アラニン置換体由来のペプチドバーコードの相対強度

### (3) ペプチドバーコーディング法の検証

結合力が低下したと推定される 5 つのナノボディ変異体を SPR で評価したところ、R35A・G50A・E103A は GFP に結合しなかった。Y37A・W47A・野生型の解離定数は  $1.6 \times 10^{-8}$  M,  $7.2 \times 10^{-10}$  M,  $1.2 \times 10^{-11}$  M であった。またこれらのアミノ酸残基は、GFP: anti-GFP nanobody 複合体の結晶構造から予想された重要部位と一致した。これらの結果から、ペプチドバーコーディング法は結合力の微小な変化を捉えられることを実証できた[3]。

## 4. 今後の展望

本研究では、わずかな結合力の差を区別しつつ、数百種類の遊離型ナノボディをワンポットで評価可能なペプチドバーコーディング法の開発に成功した。本手法は容易に拡張可能であり、数十万種類の遊離型ナノボディを一回で評価可能である。現在、SRMAtlas データベース[4]と、融合タンパク質をハイスループットにデザインするための DNA アレイ合成を統合する事で、簡便かつスケーラブルなペプチドバーコーディング法の開発を進めている。

## 5. 参考文献

- [1] Miyamoto, K., *et al.*, *PLOS ONE*, 14(4), e215993, 2019
- [2] Kubala, M.H., *et al.*, *Protein Sci.*, 19, 2389–2401, 2010
- [3] Matsuzaki, Y., *et al.*, submitted
- [4] Kusebauch, U., *et al.*, *Cell*, 166, 766–778, 2016

# アルドラーゼを介した代謝系へのホルムアルデヒド取込みを伴う 増殖非依存型発酵による有用物質生産

山本 啓介<sup>1\*</sup>・中根 修平<sup>1</sup>・土坂享成<sup>1</sup>・

榎本亜希代<sup>1</sup>・長谷川真由<sup>1</sup>・瀧田千温<sup>1</sup>・武田明子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Green Earth Institute 株式会社

〒113-8485 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学アントレプレナーラボ (南研究棟)

Tel: 03-3818-9211 Fax: 03-3818-9212

E-mail: keisuke.yamamoto@gei.co.jp

コリネ型細菌による増殖非依存型発酵は、発酵阻害物質の存在下でも物質生産が可能であるという特長を有する。演者らはこの特長を「微生物に対して毒性を示す物質を物質生産の原料として用いる」という発想へと転換した。そこでホルムアルデヒドを 2 次原料として添加し、アルドラーゼを介してこれを代謝系に取り込むことで、2,4-ジヒドロキシ酪酸、ホモセリン、1,3-プロパンジオールといった有用物質を生産し、この概念を実証した<sup>1)</sup>。

## 1. 序論

演者らが定義する増殖非依存型発酵とは、コリネ型細菌などの好気性微生物を好氣的に増殖させる菌体増殖相と増殖させた菌体を嫌氣的（または微好氣的）雰囲気に移し菌体の増殖を伴わず化合物の生産を行う物質生産相とから成る発酵手法である。本手法は公益財団法人地球環境生産技術研究機構（RITE）により開発され<sup>2)</sup>、当社ではこの技術による物質生産の事業化、および生産物質の多様化を目指した研究を行っている。

増殖非依存型発酵の利用により様々な特徴が生まれるが、演者らは特に物質生産相において発酵阻害物質が存在しても物質生産が可能であるという点に着目し、この特長を「微生物に対して毒性を有する物質を物質生産の原料として用いる」という発想へと転換した。これを実証する実験系として、一般的に生物に対して毒性を有すると認識されているホルムアルデヒドを増殖非依存型発酵における物質生産相で 2 次原料として添加し、1 次原料であるグルコースから解糖系を通じて生じるピルビン酸とアルドール反応させる代謝反応を含む人工代謝系を設計した（図 1）。この反応により 4-ヒドロキシ-2-オキソ酪酸（4-hydroxy-2-oxobutyrate, HOB）が生じる。ピルビン酸に対して①カルボニル還元、②カルボニル還元的アミノ化、③脱炭酸後のアルデヒド還元を行うとそれぞれ乳酸、アラニン、エタノールが生じることはよく知られているが、HOB に対して①-③と同じ官能基変換を行うと、それ

ぞれ 2,4-ジヒドロキシ酪酸 (2,4-dihydroxybutyrate, DHB)、ホモセリン (homoserine, hSer)、1,3-プロパンジオール (1,3-propanediol, PDO) が生産されることが期待された。そこで演者らは、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 株を宿主菌体として、上述の酵素反応に必要な遺伝子を導入しこれら物質の生産を行うことで上述概念の実証を試みた。

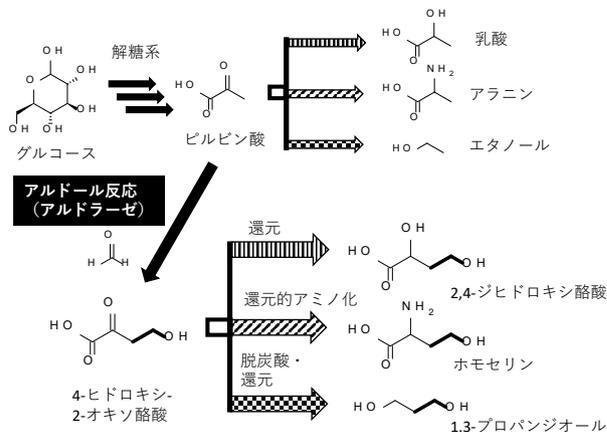


図 1. アルドラーゼによるホルムアルデヒドの代謝系への取込みと、それにより期待される生産物

## 2. 方法

DHB および hSer の生産には ATCC13032  $\Delta ppc \Delta ldhA \Delta adhE \Delta ald$  株を宿主とし、大腸菌由来アルドラーゼ

遺伝子 *hpaI* および大腸菌由来リンゴ酸脱水素酵素遺伝子変異体 *mdh5E*<sup>3)</sup> または *Lysinibacillus sphaericus* 由来ロイシン脱水素酵素遺伝子 *leuDh* をプラスミドにて導入した株を用いた。PDO の生産には ATCC13032  $\Delta ppc$   $\Delta pyc$   $\Delta poxB$   $\Delta alaA$   $\Delta ilvB$   $\Delta cg0931$   $\Delta adhE::PgapA-hpaI$   $\Delta ald::PgapA-hpaI$   $\Delta ldhA::PgapA-hpaI$  株を宿主とし、*hpaI* と *Lactococcus lactis* 由来 *kivD* との融合遺伝子および *Klebsiella pneumoniae* 由来 *dhaT* 遺伝子をプラスミドにて導入した株を用いた。

フラスコ培養で増殖させた菌体を遠心分離にて回収し、湿菌体として 10% (w/v) となるようにバッファーに懸濁させ、グルコースを添加することで物質生産を開始した。ホルムアルデヒドはシリンジポンプで連続的に添加し、pH は水酸化カリウム水溶液を添加して制御した。hSer 生産では窒素源の供給を目的としてホルムアルデヒド水溶液に硫酸アンモニウムを混合した。なお、本稿では、アルカリやホルムアルデヒドの添加による希釈の効果などを排除し実験間の比較を簡単にするため、基質や生産物の濃度は物質生産開始時から容量が変化しないと仮定した数値に換算して示している。

### 3. 結果と考察

DHB, hSer, PDO いずれの生産菌株も物質生産相にて目的物を生産した (図 2)。反応終了時の濃度はそれぞれ 418mM, 158mM, 228 mM であった。また、対糖収率は 126 mol%, 62 mol%, 64 mol%, ホルムアルデヒドの生産物への利用効率は 65 mol%, 32 mol%, 46 mol% であった。DHB については Walther *et al.*<sup>4)</sup> が一般的な発酵手法により終濃度 5.3 g/L (44 mM), 対糖収率 15 mol% (0.1 g-DHB/g-Glc) での生産を報告しているが、演者らの手法による生産性能は菌体増殖相での糖消費を含めてもこれを大幅に上回る。また、ホルムアルデヒドを添加して PDO を生産する手法は演者らとは独立に Wang *et al.*<sup>5)</sup> が報告しているが、この例では増殖依存型発酵のため生産効率が低く、PDO の終濃度は 6.7 mM (0.508 g/L) に留まっており、増殖非依存型発酵の優位性が顕著に示されている。hSer 生産では野生型 *LeuDh* の非天然基質 HOB に対する活性が低いことが、他 2 化合物に比べ生産性が劣る理由だと考えている。

### 4. 結論

本研究により増殖非依存型発酵においてホルムアルデヒドのような発酵阻害物質が人工代謝経路により取り込まれ物質生産が可能であることが示された。また、本手法により一般的な発酵方法では効率的な生産が難しい物質も高効率で生産できることも示された。1 次原料由来でピルビン酸以外の代謝物やホルムアルデヒド以外の 2 次原料、さらにはそれら 2 成分の炭素-炭素結合形成を触媒する酵素を用いることで、今後本手法により多様な物質が生産可能となることが期待される。

また、本研究を通じて本手法を用いて DHB, hSer,

PDO が生産できることも示された。これらの有用物質については、今後、酵素改変を含めた菌体改良、および培養・物質生産条件の検討により生産性能がさらに改善されることが期待される。

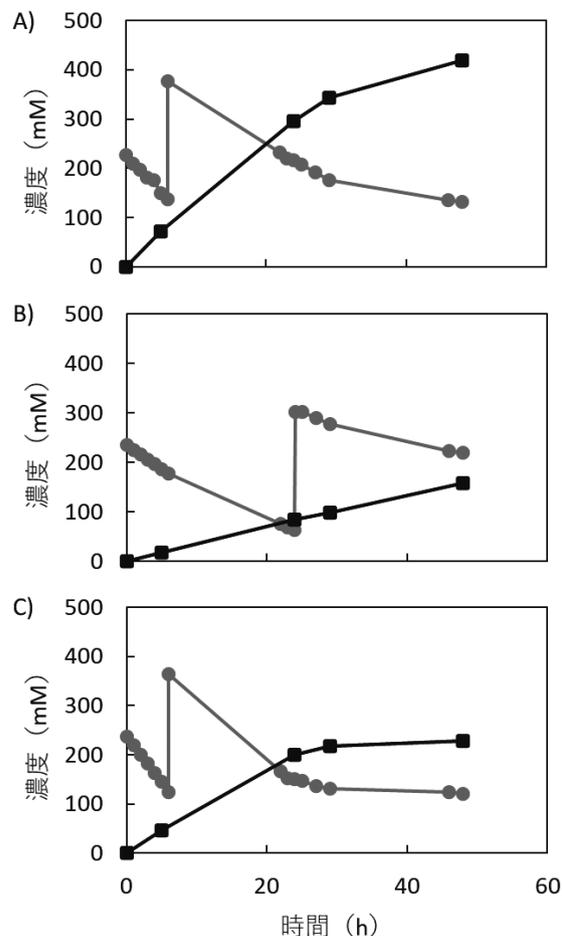


図 2. 代謝系へのホルムアルデヒド取込みを伴う増殖非依存型発酵。グルコース (灰色丸印) および目的物 (黒色角印) の経時変化 : A) DHB, B) hSer, C) PDO。

### 参考文献

- 1) a. Green Earth Institute 株式会社, Natural Beauty 株式会社, 特許第 6668577 号, 2020-03-18. b. Green Earth Institute 株式会社, 特許第 6894650 号, 2021-06-30.
- 2) 乾将行, 湯川英明, 生物工学, **90**, 396-400 (2012).
- 3) Frazão, C. J. R., Topham, C. M., Malbert, Y., François, J. M., Walther, T., *Biochemical Journal*, **475**, 3887-3901 (2018).
- 4) Walther, T., Calvayrac, F., Malbert, Y., Alkim, C., Dressaire, C., Cordier, H., François, J. M., *Metabolic Engineering*, **45**, 237-245 (2018).
- 5) Wang, C., Ren, J., Zhou, L., Li, Z., Chen, L., Zeng, A.-P., *ACS Synthetic Biology*, **8**, 2483-2493 (2019).

# 光エネルギーを利用した大腸菌における メバロン酸のイソプレノールへの変換

佐野 海瑚人<sup>1</sup>・田中 涼<sup>1</sup>・鎌田 健太郎<sup>1</sup>・松田 史生<sup>1</sup>・石井 純<sup>2</sup>

弘埜 陽子<sup>3</sup>・原 清敬<sup>3</sup>・戸谷 吉博<sup>1\*</sup>・清水 浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大学情報科学研究科, <sup>2</sup>神戸大学科学技術イノベーション研究科

<sup>3</sup>静岡県立大学食品栄養環境科学研究所

〒565-0871 吹田市山田丘 1-5 大阪大学情報科学研究科

Tel: 06-6879-7446 Fax: 06-6879-4396

E-mail: shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

ATP は細胞の増殖や維持、様々な化合物の生合成に必要な重要なエネルギー通貨である。高度好塩菌が有する膜タンパク質のロドプシンは、光の照射によって細胞内外でプロトン濃度勾配を生み出し、ATP 合成酵素によってプロトン濃度勾配を利用して ATP を再生できる。本研究では、大腸菌にロドプシンを実装することで、光エネルギーを利用して ATP を生み出す能力を付与し、ATP を必要とするメバロン酸からイソプレノールのバイオコンバージョンに応用した。結果として、光のみをエネルギー源としてメバロン酸をイソプレノールに変換する反応を駆動することに成功した。

## 1. はじめに

ATP は細胞の生育や様々な化合物の生合成に関わる重要な補酵素であり、様々な有用物質の生合成に関与している。メバロン酸経路を介したイソプレノール生産においては、メバロン酸をイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) に変換する際に 3 分子の ATP を消費する (図 1)。大腸菌などの従属微生物は、好気条件において炭素源を TCA 回路で CO<sub>2</sub> に酸化する際に NADH を生産し、呼吸鎖電子伝達系を介して NADH の電子を酸素に受け渡す過程でプロトンをくみ出し、膜を挟んだプロトン濃度勾配を生み出す。この勾配を利用して ATP 合成酵素が ADP と無機リン酸から ATP に再生する。この仕組みは ATP を効率的に生み出すことができるが、必然的に炭素源を CO<sub>2</sub> としてロスするため、目的物質の生産においては大きな損失である。炭素源の消費なく ATP を生み出すことができれば、ATP を利用する物質生産を効率化するための新しいアプローチになる。

高度好塩菌が有するプロトンポンプ型ロドプシンは、大腸菌で発現可能な膜タンパク質である<sup>1)</sup>。ロドプシンに光が当たると結合している発色団の all-trans retinal が異性化する。この変化がロドプシン全体の構造変化を引き起こし、細胞内のプロトンが細胞外へ輸送される。プロトン濃度勾配によって ATP 合成酵素

が働くため、ロドプシンを発現した細胞では光エネルギーを利用して ATP を再生することが可能である。

本研究では、ロドプシンによる光エネルギーを利用した ATP 再生を、生合成に ATP を必要とするイソプレノール生産に応用した。大腸菌はグルコースからメバロン酸を高効率に生産することができる<sup>2)</sup>。そこで、メバロン酸を原料として、グルコースなしに光のみをエネルギー源として、メバロン酸をイソプレノールに変換することを目的とした。

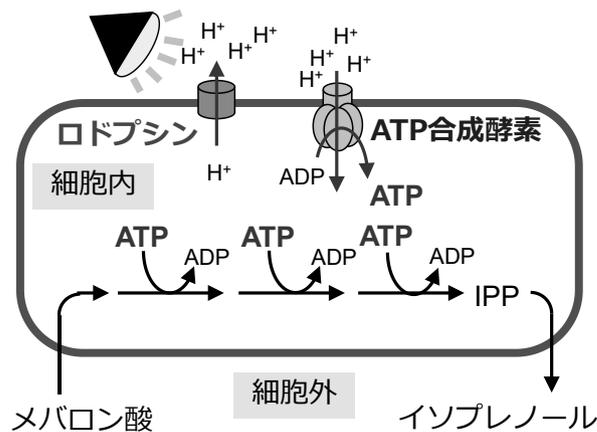


図 1 本研究のイソプレノール生産の概要図

## 2. 方法

大腸菌 MG1655 (DE3) 株を宿主として、メバロン酸からイソプレノールへの変換に必要な遺伝子（酵母由来の *ERG12*, *ERG8*, *MDV1* と枯草菌由来の *nudF*）と高度好塩菌 *Haloterrigena turkmenica* 由来のデルタロドプシン遺伝子を導入したロドプシン発現イソプレノール生産株を構築した。メバロン酸からイソプレノールへの変換能力を評価するため、LB 培地で細胞を増殖させた後、メバロン酸を単一炭素源とした M9 最小培地に細胞を懸濁し、明条件では  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  の LED 白色光を照射して培養を行った。培養液中のイソプレノール濃度はガスクロマトグラフを用いて測定した。

また、ロドプシンによるプロトンポンプ能力は、菌体を非緩衝溶液に懸濁し、光の点灯・消灯を繰り返したときの細胞外 pH の変化によって評価した。

## 3. 結果と考察

構築した菌株について、光照射に応じたプロトンポンプ活性があるか確認した。細胞を回収し、非緩衝液に懸濁した。1 分間隔の明暗サイクルにおいて、pH センサを利用して溶液の pH の変化を記録した。明期間では  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  の白色光を照射した。溶液中のプロトン濃度変化を図 2 に示す。光を当てている期間には細胞外のプロトン濃度が増加しており、デルタロドプシンが細胞内のプロトン細胞外にくみ出していることが示された。また、暗の期間には細胞外のプロトン濃度の減少が見られた。これはロドプシンのポンプが働かなくなり、ATP 合成酵素を通して細胞外のプロトンが細胞内に流入したためである。

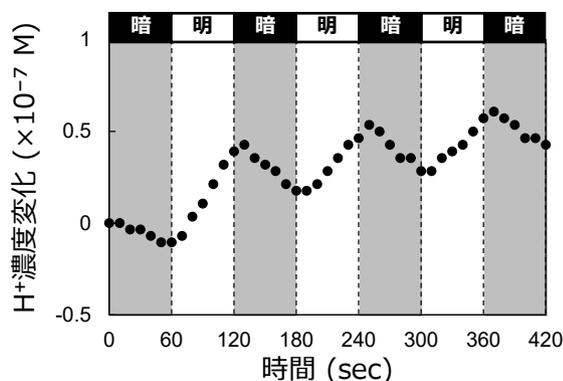


図 2 ロドプシン発現イソプレノール生産株におけるプロトンポンプ活性能力の評価

ロドプシンによって光エネルギーから生み出された ATP を利用して、メバロン酸からイソプレノールへの

変換が可能か検証した。まず初めに、合成培地を利用して構築した菌株を培養し、変換に用いる菌体を準備した。メバロン酸のみを炭素源として含む合成培地に細胞を懸濁し、明条件と暗条件で培養液をインキュベートした。結果として、イソプレノールの生産量、比生産速度において明暗条件間の有意差が確認された。24 時間目までにイソプレノールを明条件で  $0.63 \pm 0.04 \text{ mM}$ 、暗条件で  $0.26 \pm 0.03 \text{ mM}$  生産し、明条件において 2.4 倍に上昇した。本培養開始 9 時間目までのイソプレノールの比生産速度は、明条件で  $20.4 \pm 0.6 \mu\text{mol gDCW}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、暗条件で  $10.0 \pm 0.7 \mu\text{mol gDCW}^{-1} \text{h}^{-1}$  であり、明条件において 2.0 倍に上昇した (図 3)。

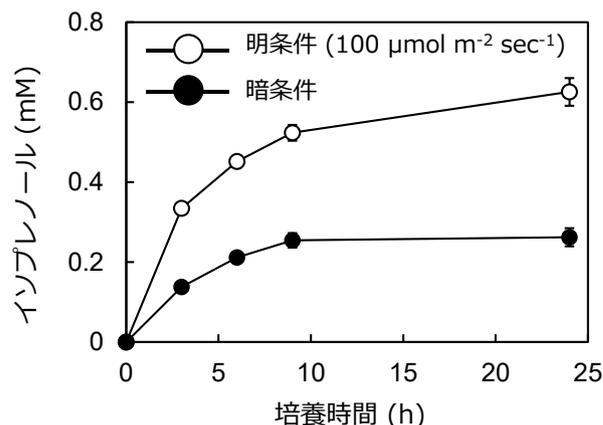


図 3 ロドプシン発現イソプレノール生産株の光照射の有無によるイソプレノール生産性の比較

## 4. 今後の展望

本研究では、ロドプシンによる光駆動のプロトン輸送とそれに伴う ATP 再生を利用することで、光のみをエネルギー源として、グルコースなしにメバロン酸をイソプレノールに変換することに成功した。本手法は ATP という多くの代謝反応に共通する補酵素の再生を導く手法であるため、ATP 消費を伴う様々な変換プロセスの駆動に広く利用できるだろう。

## 5. 謝辞

本研究は、JST 未来社会創造事業 JPMJMI17EJ の支援を受けて実施したものです。

## 6. 参考文献

- 1) Kamo, N *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 285 (2006)
- 2) Wada, K *et al.*: *J Biosci Bioeng*, **123**, 177 (2017)

# 磁性細菌における脂質代謝制御による マグネトソーム膜改変とマグネタイト形成能への影響評価

巴 瞭斗・藤本 一嗣・新垣 篤史・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。我々はこれまでに、マグネトソーム膜にヒト細胞由来の膜受容体を発現させ、創薬研究への応用を試みている。さらに、ヒト細胞膜の主要な脂質であるホスファチジルコリン (PC) の生合成経路を、PC を合成しない磁性細菌に導入することで、膜受容体の機能向上を示している。本研究では PC 合成酵素を導入した磁性細菌において、脂質組成の自在な改変技術を確立した。さらに、PC を合成する磁性細菌の形質転換体においてマグネタイト形成能を評価し、野生株と比較してマグネタイト粒径が増大することを明らかとした。

## 1. はじめに

磁性細菌とは、その名の通り細胞内にナノサイズの磁気微粒子 (マグネトソーム) を生合成する細菌の総称である。このマグネトソームは、マグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) やグレイジャイト ( $\text{FeS}_2$  や  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) などの結晶からなり、多くのタンパク質を含む脂質膜に被覆されている。したがって、高い結晶構造的な均一なサイズ分布、生体膜に覆われているといった特徴を有することから、マグネトソームは人工ナノ磁気微粒子と比較して生体適合性が高く、免疫アッセイや 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<sup>1)</sup>。中でも我々は、マグネトソーム膜上にヒト細胞由来の膜受容体の発現に成功しており<sup>2)</sup> (図 1 右上)、作製した機能性マグネトソームを様々なアプリケーションへ応用することを目指している (図 1)。このようなマグネトソームの医療応用において、求められる磁気特性や粒子サイズが異なるため、粒子サイズの制御法の確立は重要であると考えられる。

代表的な *Magnetospirillum* 属においては、まず細胞質内膜が陥入することにより空の小胞が形成される。続いて小胞内に鉄イオンが輸送されることによって、小胞内の鉄濃度が上昇し、鉄イオンの結晶化が促進することでマグネトソームが形成される。したがって、

小胞サイズの制御によりマグネトソームサイズの制御が可能であると考えられる。小胞形成には膜リン脂質が大きく関わっていることから、我々は磁性細菌における膜リン脂質組成を改変することによって、マグネトソームサイズの制御を試みた。

本研究では、ヒト細胞膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) の生合成経路を磁性細菌に導入し、マグネタイト形成能の評価を行った。さらに、PC 含有量を制御することにより、脂質組成の自在な改変を試みた。

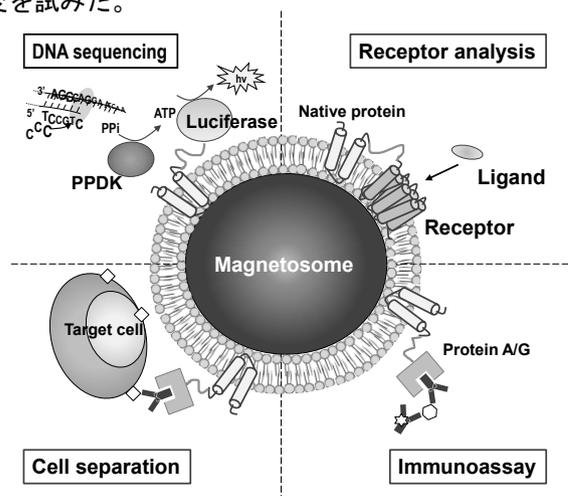


図 1. 機能性マグネトソームの応用展開例

## 2. 解析データおよび方法

PC 生合成経路として CDP-diacyl-glycerol とコリンの縮合により PC を合成する *phosphatidylcholine synthase* (*pcs*) と、ホスファチジルエタノールアミンのメチル化により PC を合成する *phosphatidylethanolamine-N-methyl transferase* (*pmt*) の 2 種の PC 合成遺伝子を用いた (図 2)。それぞれをエレクトロポレーション法によって *M. magneticum* の野生株 (WT 株) に導入した、PCS 株および PMT 株に加え、空ベクター導入株 (EV 株) を評価に用いた。これらの株を MSGM (Magnetospirillum growth medium) を用いて定常期まで培養した後、菌体膜およびマグネトソーム膜の脂肪酸組成、脂質組成を解析した。また、各株から得られたマグネトソームを TEM を用いて観察し、マグネタイト粒径を計測した。次に、PCS 株において PC 合成に必須であるコリンを MSGM に終濃度 2~2000  $\mu\text{M}$  となるように加えて培養することにより、PC 含有率の異なるマグネトソームを作出した。得られたマグネトソームの粒径を TEM 観察によって計測し、PC 含有量とマグネタイト粒径の相関の評価を行った。

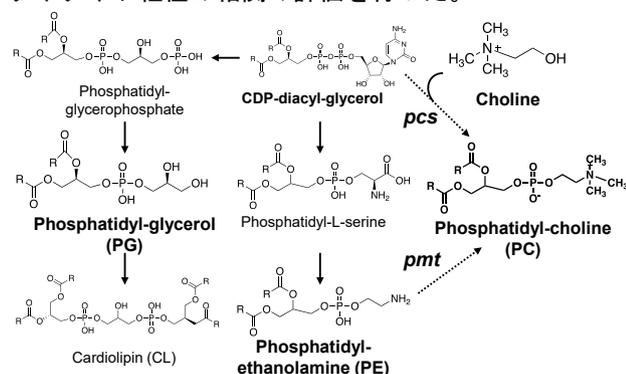


図 2. *M. magneticum* における脂質合成経路  
\*点線は今回導入した経路

## 3. 結果と考察

*M. magneticum* への PC 合成遺伝子の導入により、PCS 株において PC 含有率は 33% であり、PMT 株においては 19% であることが示された。続いて、各 PC 合成株のマグネタイト粒径を評価したところ、非 PC 合成株である WT 株や EV 株と比較してマグネタイト粒径が有意に増大していることが明らかとなった (図 3)。特に、PC 合成株では 10-20 nm の粒子数が減少し、50-60 nm の粒子数が増加していた。そこで、PC 合成株において脂肪酸組成を評価した結果、WT 株と比較してオレイン酸 (18:1) の割合が増加し、パルミトレン酸 (16:1) の割合が減少していることが示された。したがって、長鎖の脂肪酸の割合が増加したことで、膜の流動性が変化し、マグネタイト粒径を制御する小胞サイズが増大したことが示唆された。

さらに、脂質組成の自在な改変を目的に PC 含有量の調整を試みた。コリンを終濃度 2, 20, 200, 2000  $\mu\text{M}$  となるように MSGM に添加して PCS 株を培養した結果、それぞれの添加濃度において PC 含有率は 0%, 15%, 26%, 34% と、異なる PC 含有率のマグネトソームの作出が可能であることが示された。また、PC を導入したときにのみマグネタイト粒径が増大することが確認された。

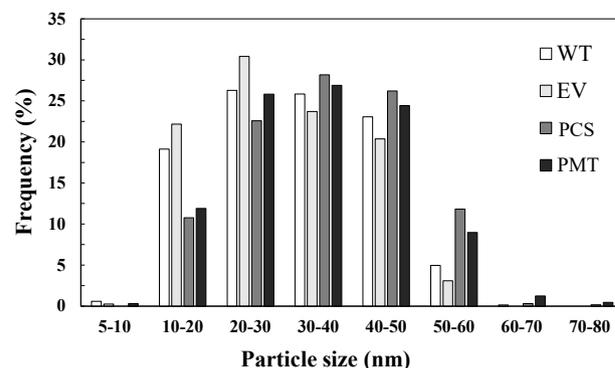


図 3. PC を合成する磁性細菌におけるマグネタイト粒径

## 4. 今後の展望

本研究では、磁性細菌における脂質代謝制御によるマグネトソーム膜脂質改変により、マグネタイト粒径の制御が可能であることを明らかとした。マグネタイト粒径が増大することで飽和磁化が向上することから、今後ドラッグデリバリーや磁気温熱治療など高い飽和磁化が求められるアプリケーションに、本技術は有用であると考えられる。また、我々はこれまでにマグネトソーム膜上にヒト細胞由来の膜受容体を発現することに成功しており、さらに PC の生合成により膜受容体の機能向上を示している<sup>3)</sup>。膜受容体のような膜貫通タンパク質は、膜脂質の組成により受容体の膜結合部位の安定性が変化し、活性が変化することが報告されている。これらの知見から、今後磁性細菌において様々な脂質組成を改変することで、マグネトソーム膜上に発現させた膜受容体のさらなる機能向上が可能になると考えられる。

## 5. 文献

- [1] Yan, L., et al.: *Microbiol. Res.*, **203**, 19-28 (2017)
- [2] Yoshino, T., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 465-472 (2006)
- [3] Yoshino, T., et al.: *Metab. Eng.*, **67**, 125-132 (2021)

# アンチセンスペプチド核酸を用いた マイクロバイオータ改変技術の開発

日誌 達哉<sup>1</sup>・岡野 憲司<sup>2,3\*</sup>・佐藤 悠<sup>2</sup>・本田 孝祐<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>大阪大学 大学院工学研究科, <sup>2</sup>大阪大学 生物学国際交流センター, <sup>3</sup>大阪大学 先導的学際研究機構

〒565-0871 吹田市山田丘 2-1 大阪大学 生物学国際交流センター

Tel: 06-6879-4086

E-mail: okano@icb.osaka-u.ac.jp

近年、ヒト体内や環境中の微生物細菌叢（マイクロバイオータ）の働きがヒトの健康改善や地球上の元素循環に重要であることが明らかになりつつある。マイクロバイオータの働きを自在に制御できれば、健康維持や持続的耕地利用といった様々な社会課題の解決に貢献できるが、そのような技術は不在である。そこで、我々は細胞透過作用のあるペプチドを用いて標的微生物の必須遺伝子 mRNA にのみ結合するペプチド核酸（PNA）を菌叢に導入し、菌種特異的に増殖を阻害する手法の開発に着手した。*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas putida* からなる 3 菌共培養系に対して、*E. coli* もしくは *B. subtilis* に対するアンチセンス PNA と膜透過ペプチドの融合体を導入した結果、菌種特異的な細胞死の誘導に成功した。PNA を用いたマイクロバイオータ改変技術は菌叢機能の理解と応用に向けた強力なツールになると期待される。

## 1. はじめに

次世代シーケンスを始めとする種々のオミックス解析技術の進歩により、微生物細菌叢（マイクロバイオータ）の群集構造決定やメタ代謝経路の類推が可能となりつつある<sup>1)</sup>。これに伴い、ヒト体内や環境中に存在するマイクロバイオータがヒトの健康改善や地球上の元素循環において、重要な働きを示すことが明らかとなっている<sup>1)</sup>。一方で、菌叢機能のさらなる解明や制御の実現には、メタ解析から得られた仮説を検証するための人工菌叢モデルの構築方法や群集構造改変手法が求められるが、そのような手法は不在である。そこで、本研究では、マイクロバイオータ研究の発展に貢献すべく、ペプチド核酸（PNA）を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発に取り組んだ。

PNA とは、DNA の糖リン酸からなる主鎖構造を *N*-(2-aminoethyl)glycine ポリマーで置換した核酸類似体である。PNA は、DNA や RNA とは異なり、リン酸基による負電荷の反発がないため、DNA/DNA、DNA/RNA よりも強い結合力を示す<sup>2)</sup>。また、PNA は非天然構造を有するため、ヌクレアーゼに対して耐性を有する<sup>3)</sup>。これらの特性から、微生物の必須遺伝子 mRNA 配列に相

補なアンチセンス PNA を微生物に導入することで、必須遺伝子の発現を抑制し、細胞死を誘導することが可能である<sup>4)</sup>。また、PNA に膜透過ペプチドの一種である (KFF)<sub>3</sub>K 配列を付加することで、PNA の細胞透過性が向上し、微生物細胞内への導入が促進されることが知られている（図 1）<sup>5)</sup>。

以上の背景を踏まえ、我々は微生物に固有かつ生育に必須な配列を標的とするアンチセンス PNA を微生物細菌叢に導入し、菌叢中の特定微生物を死滅させることでマイクロバイオータの改変ができるというアイデアのもと、3 種の微生物からなる共培養系を用いた検証実験を行った。

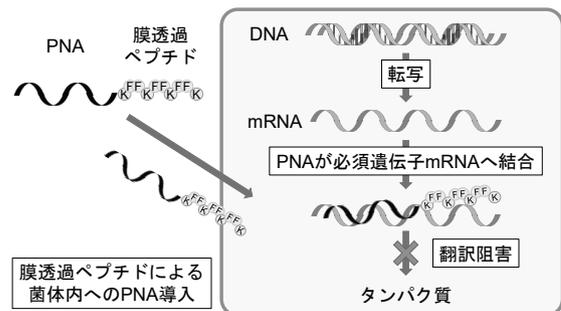


図 1. PNA による必須遺伝子の発現抑制機構

## 2. 方法

モデル菌叢として、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas putida* からなる 3 菌共培養系を用いた。また、3 種の微生物の生育の個別計測を可能にするために異なる抗生物質への耐性を賦与した。

各微生物の初期菌体量が  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL となるように培養液 200  $\mu$ L を調製し、培養開始時に各微生物の必須遺伝子の mRNA を標的とする (KFF)<sub>3</sub>K-PNA を添加した。培養は、PNA 非添加時において各菌が同等の生育を示した 33°C で行った。経時的に培養液を採取し、3 種の異なる抗生物質を添加した LB 寒天培地に塗布することで各微生物の生菌数を個別計測し、(KFF)<sub>3</sub>K-PNA の添加が各菌の増殖に与える影響を評価した。

## 3. 結果と考察

PNA 非添加時における、3 菌共培養の結果を図 2 に示す。*E. coli* および *B. subtilis*、*P. putida* は、培養 34 時間後にそれぞれ  $6.9 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.8 \times 10^7$  CFU/mL、 $7.0 \times 10^7$  CFU/mL まで増殖した。

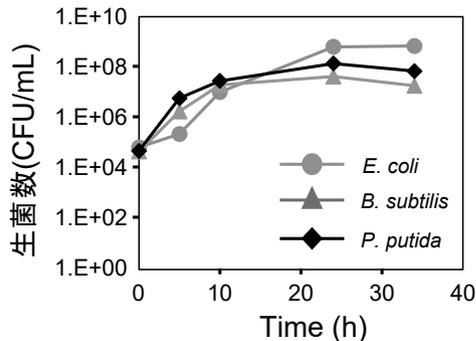


図 2. 3 菌の増殖曲線 (PNA 非添加時)

*E. coli* の必須遺伝子である *acpP* を標的とした (KFF)<sub>3</sub>K-PNA を添加した場合の増殖曲線を図 3 に示す。

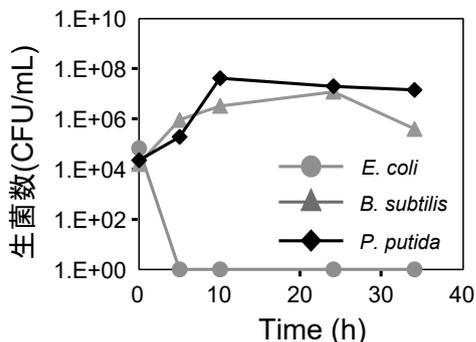


図 3. 3 菌の増殖曲線 (抗 *E. coli* PNA 添加時)

6  $\mu$ M の PNA の添加により、標的細菌である *E. coli* の細胞死が誘導され、培養 5 時間で完全に死滅した (図 3)。一方、非標的菌である *B. subtilis* および *P. putida* は培養 34 時間後にそれぞれ  $4.0 \times 10^5$  CFU/mL、 $1.5 \times 10^7$  CFU/mL まで増殖し、PNA の添加による非標的菌の顕著な増殖抑制はみられなかった (図 2、3)。

*B. subtilis* の必須遺伝子である *ftsZ* を標的とした場合も同様に、5  $\mu$ M の PNA 添加により、標的細菌である *B. subtilis* は 5 時間で完全に死滅した (図 4)。また、非標的菌である *E. coli* および *P. putida* は培養 34 時間後にそれぞれ  $3.5 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.2 \times 10^8$  CFU/mL まで増殖することができた (図 2、4)。

これらの結果から、PNA の添加により菌種特異的な細胞死の誘導が可能であることが明らかとなった。

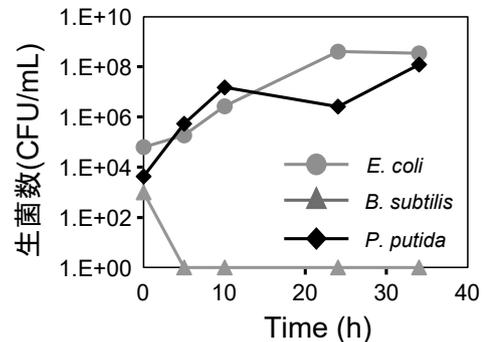


図 4. 3 菌の増殖曲線 (抗 *B. subtilis* PNA 添加時)

## 4. 今後の展望

上記の実験に引き続き、アンチセンス PNA を用いた *P. putida* の増殖抑制についても、現在検討中である。本研究で得られた結果は、アンチセンス PNA がマイクロバイオータ改変のための強力なツールとなることを示唆しており、菌叢機能の理解と応用のための人工菌叢作成への利用が期待できる。

## 参考文献

- 1) Foo, J. L. et al.: *Biotechnol. J.* **12**, 1600099 (2017)
- 2) Egholm, M. et al.: *Nature*, **365**, 566–568 (1993)
- 3) Demidov, V. V. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1310–1313 (1994)
- 4) Good, L. and Nielsen, P.E.: *PNAS*, **95**, 2073–2076 (1998)
- 5) GOOD, L. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 360–364 (2001)

# 玄米を用いた泡盛醸造におけるフェルラ酸および 4-ビニルグアヤコールの生成過程の解析

杉江雄貴<sup>1</sup>・眞榮田麻友美<sup>2</sup>・上地敬子<sup>1</sup>・渡嘉敷建孝<sup>3</sup>・平良東紀<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>琉球大学農学部, <sup>2</sup>東京農業大学応用生物科学部, <sup>3</sup>石川種麹店

〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1 琉球大学農学部

Tel: 098-895-8802 Fax: 098-895-8802

E-mail: tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp

泡盛古酒の特徴香バニリンの前駆体 4-ビニルグアヤコール (4VG) は、黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の生産する各種酵素によって生成される。まず、キシラーナーゼ (Xln) によって原料米中のヘミセルロースからフェルロイルオリゴ糖 (FAO) が遊離され、次にフェルラ酸エステラーゼ (FAE) によって FAO からフェルラ酸 (FA) が遊離され、遊離 FA が菌体内に取り込まれフェノール酸脱炭酸酵素 (PAD) によって 4VG に変換され、菌体外に放出されると推定されている (図 1)。本研究では、泡盛醸造中の FA および 4VG の生成過程を調べる目的で、ヘミセルロース成分を多く含む二分搗き玄米を用いて小仕込試験を行い、麹およびモロミ中の関連する化合物と酵素活性の定量を経時的に行った。FAO, FA および 4VG の量は麹中よりもモロミ中で圧倒的に多かった。菌体量あたりの Xln および FAE 活性は製麹初期 (30 時間) で最も高かった。製麹 30 時間の麹を仕込んだモロミ中で FAO および FA は最も多く検出され、その量は製麹時間が長いほど減少した。一方、製麹 30 時間の麹を用いたモロミでは 4VG はほとんど検出されず、42 時間以降、製麹時間が長い程増大した。このことは、これまでに報告されている麹中の PAD 活性と相関があった。製麹時間に伴う PAD の発現誘導は、基質である遊離 FA の増大によるものだと考えられていた。しかしながら、製麹 30 時間の麹を用いたモロミでは遊離 FA が十分あるにも関わらず 4VG 生成が認められなかった。これらの結果から、モロミ中では PAD の発現は誘導されず、製麹中に既に発現・蓄積されていた PAD によって、モロミ中の FA が 4VG に変換されていることが示唆された。

## 1. はじめに

泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒で、全ての原料米に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を生やす全麹仕込みと、長期貯蔵によって古酒化することが特徴である。泡盛古酒の特徴香の一つバニリンは、泡盛醸造過程で生成される 4-ビニルグアヤコール (4VG) から貯蔵中に非酵素的酸化によって生成される。4VG は、*A. luchuensis* の生産する各種酵素によって、泡盛醸造中に図 1 に示す過程で生成されると推定されている (要旨参照)。

バニリン香に富む古酒の原酒を製造するには、これらの過程を明らかにし制御する必要がある。本研究では、4VG の前駆体である FA を多く含む玄米 (二分搗き) を用いて醸造を行い、麹およびモロミ中の Xln および FAE 活性と FAO, FA および 4VG の定量を経時的に行い、

その生成過程の解析を行った。

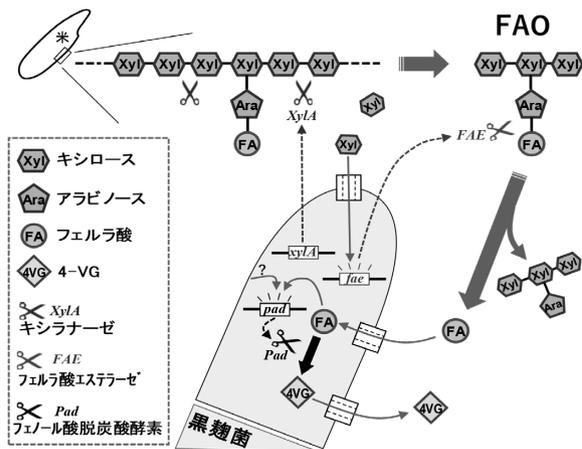


図 1. 黒麹菌による 4VG の生成過程 (推定)

## 2. 方法および結果

### 1) 製麴および仕込み条件

製麴温度は、種付けから 24 時間までは 38°C、24–30 時間は 36°C、30 時間以降は 34°C とした。30、42、54、66 時間製麴した麴を用いて仕込みを行った。仕込みは麴 100 g に対して水道水 170 mL を加え、10% 乾燥酵母（泡盛 101 号酵母）溶液 0.1 mL を加えてモロミとし、0、1、2、3、7、14 日目のモロミをサンプリングした。

### 2) 麴中およびモロミ中の FAO, FA, 4VG の定量

麴は 4°C で一晩水抽出した溶液をサンプルとした。モロミは遠心分離後の上清をサンプルとした。サンプル中の FA および 4VG は HPLC で定量した。FAO はアルカリ処理によって得られた総 FA から遊離 FA を引いた値とした。

### 3) XIn および FAE 活性

XIn 活性は、キシランを基質とし、一定時間の酵素反応によって生成された還元糖量とした。FAE 活性は、原料米をアミラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ処理して調整した FAO を基質とし、一定時間の酵素反応によって生成された遊離 FA 量とした。

## 3. 結果

### 1) 麴中およびモロミ中の FAO, FA, 4VG の量

麴中では FAO および FA の生成量はモロミ中に比較すると明らかに低く、4VG はほとんど検出されなかった。FAO, FA および 4VG はモロミ発酵 2 日目までに急激に上昇し、FAO および FA は麴中よりもモロミ中で 4 倍以上、4VG は 100 倍以上検出された（図 2A）。

モロミ中の FAO および FA は製麴時間が長いほど減少したが、4VG は製麴時間が長いほど上昇した（図 2B）。

### 2) XIn および FAE 活性

菌体量あたりの XIn 活性は製麴 30 時間で最も高く、それ以降は減少していた（図 3）。FAE 活性も製麴 30 時間で最も高く、42 時間までに減少しそれ以降はほぼ維持されていた。

## 4. 考察

XIn および FAE 活性は製麴中に十分に検出されたが、麴中の FAO および FA は、モロミ発酵 2 日目と比較すると 4 分の 1 程度しか検出されなかった。すなわち、FAO および FA は製麴中に発現・蓄積された XIn および FAE によって、一部は製麴中に、多くはモロミ中で生成されたことが分かった。4VG は製麴 42 時間以上の麴で仕込んだモロミ中で生成され、その量は製麴時間が長い

ほど高いことが分かった。先行研究において、PAD は製麴 42 時間以降に麴中で発現し、増大することが報告されている（図 3）<sup>1)</sup>。製麴時間に伴う PAD の誘導は、基質である遊離 FA の増大によるものだと考えられていた。一方、製麴 30 時間の麴で仕込んだモロミ中では、遊離 FA が十分にあるにも関わらず、4VG がほとんど生成されなかった（図 2B）。これらの知見と今回の結果から、モロミ中では FA の有無に関わらず PAD の発現は誘導されず、製麴中に既に発現・蓄積されていた PAD によって、モロミ中の FA が 4VG に変換されていることが示唆された。

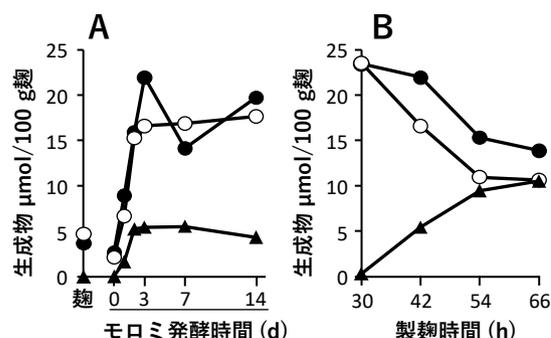


図 2. 麴中およびモロミ発酵時間ごとの生成物量 (A) および製麴時間ごとのモロミ中の生成物量 (B) . A は 42 時間麴, B はモロミ発酵時間 3 日目の生成物量を示す。●, FAO; ○, FA; 4VG, ▲.

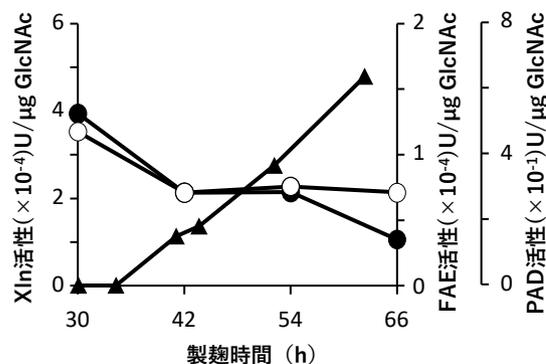


図 3. 麴中の菌体量あたりの XIn 活性 (●) および FAE 活性 (○)。PAD 活性 (▲) は Maeda ら (JBB, 2018) による。

## 文献

- 1) Maeda, M., Tokashiki, M., Tokashiki, M., Uechi, K., Ito, S., & Taira, T. *J. Biosci. Bioeng.*, **126** (2), 162–168. (2018).

# 全ゲノム情報を用いた系統解析による 戦前の泡盛麴に含まれる黒麴菌類の菌叢の推定

塚原 正俊<sup>1\*</sup>・東 春奈<sup>1</sup>・久貝 樹幹<sup>1</sup>・外山 博英<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社バイオジェット, <sup>2</sup>琉球大学農学部  
〒904-2231 沖縄県うるま市塩屋 315 株式会社バイオジェット  
Tel/FAX: 098-979-3515 E-mail: tsuka@biojet.jp

泡盛は、約 600 年の歴史を有する沖縄県の特産品で、醸造過程で黒麴菌が用いられることが大きな特徴である。これまでに、戦前の泡盛黒麴には複数の菌株が含まれていたことが報告されているものの詳細はわかっていない。今回、戦前の黒麴に関する報告を再検討するとともに、新たに全ゲノム情報による系統解析を応用し、戦前の泡盛黒麴の菌叢についての情報取得を試みた。その結果、戦前の黒麴には複数の *A. luchuensis* グループの株が含まれていたこと、その菌叢は地域ごとに特徴があったことが示唆された。これらは、全ゲノム解析の結果を泡盛醸造の歴史の一端の理解につなげることができた成果である。

## 泡盛黒麴菌の歴史的背景

泡盛は、約 600 年の歴史を有する沖縄県の特産品で、日本最古の蒸留酒である。泡盛の醸造上の大きな特徴の 1 つは、伝統的に黒麴菌 *Aspergillus luchuensis* を用いて醸造することである。従って、黒麴菌の歴史的な理解を進めることは、泡盛文化全体の理解と継承に重要である。一方、沖縄では、第 2 次世界大戦において大きな人的被害とともに、酒造所そのものや関連した文献の多くを焼失したことから、泡盛醸造に関する歴史的な情報が少なく、分からないことが多い。

戦前の泡盛醸造では、黒麴は醸造過程で得られた品質の高い麴を一部保管し次の醸造に用いるという種麴を使わない友麴で製造され、黒麴に複数の菌株が混在していた。戦後は、泡盛が復興する過程で選抜された黒麴菌株が種麴として広く利用されるようになったことから、戦前と現在の黒麴では菌叢が異なっていると考えられる。戦前の泡盛黒麴に含まれる菌株に関する報告はいくつかあるものの、現在の分類体系とは異なることなどから、どのような系統の株が含まれていたのかを把握することは難しい。今回、過去の文献を元に採取の経緯や分類結果を再検討するとともに、それらの菌株と菌株保存機関の株との紐付けを検討し、さらに全ゲノム情報を用いた系統解析結果と相互比較することで、戦前の黒麴の菌叢の一端を明らかにする試みを行った。

## 戦前の泡盛黒麴菌に関する報告

泡盛黒麴菌は、1901 年に乾によって初めて分離され、その後、戦前、戦後を含め黒麴菌に関するいくつかの報告がなされている<sup>1)</sup>。これらの報告では、主に形態や生化学的な評価による分類がなされ、戦前の黒麴には特性が異なる複数の菌株が含まれていたことが示されている。一方、これらの菌株が現在の分類体系でどのような系統の株であったのかについては、過去と現在の分類体系が異なっていることなどから<sup>2)</sup> (図 1)、過去の黒麴に含まれる株を把握することが難しい。

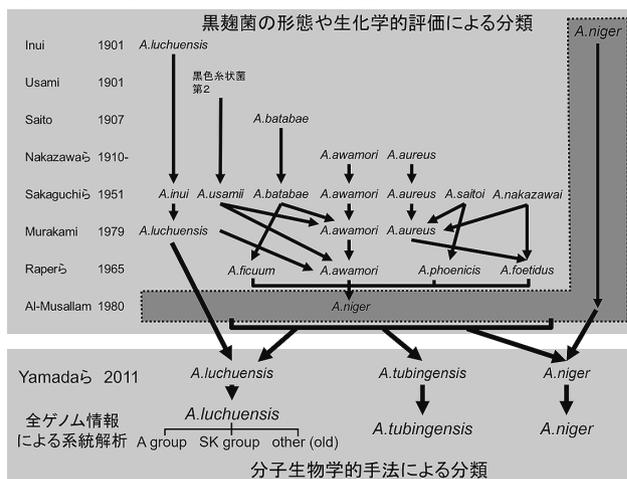


図 1. 黒麴菌分類の変遷 (文献<sup>3)</sup>を改変)

## 全ゲノム情報による系統解析

我々は、全ゲノム情報を用いた系統解析手法を構築し、複数の黒麹菌株および近縁株を対象として詳細な系統関係を解析した。その結果、*A. luchuensis* は大きな2グループ (A、SK)、およびこれらに属さず分岐が古い株 (old) が存在することが明らかとなった。また、泡盛醸造に用いられているアワモリ株がAグループ、サイトイ株がSKグループに属していること (図2)、さらに菌株保存機関が保有している株のほとんどは、AあるいはSKグループに属していることがわかった。このことは、歴史的な泡盛醸造の過程でAグループおよびSKグループ株の特性を指標に選択し続けられた結果、黒麹から採取される株の多くが2グループに含まれることになったと考えることができる。今回解析した一部の黒麹菌は、戦前に分離した株という情報が付帯していることから、それらの採取情報と系統解析の結果を対合することで、戦前の黒麹に含まれる黒麹菌株に関する情報取得を進めた。

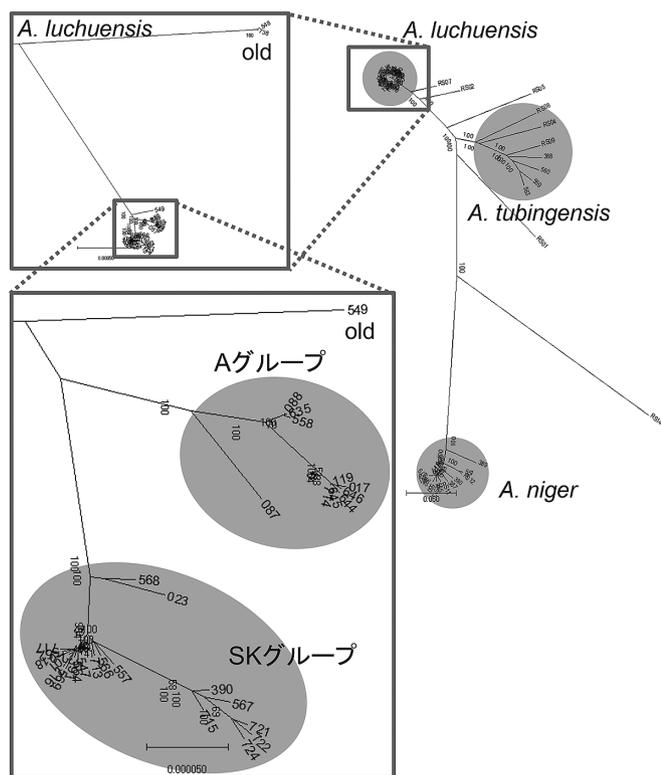


図2. 全ゲノム情報を用いた黒アスペルギルス類の系統解析

## 戦前の黒麹に存在していた菌叢の推定

全ゲノム情報を用いた系統解析の結果を用いて、主に中澤ら<sup>3)</sup>、坂口ら<sup>4)</sup>の戦前麹からの菌株分離に関する報告と比較した (図3)。その結果、1933年当時の黒麹は、沖縄県南部 (那覇、首里)、名護、離島 (宮古、八重山) の地域ごとにそれぞれの傾向が観察され、黒麹菌株が酒造所ごとではなく地域で保持されていたと

考えられる結果が得られた。このことは、当時の泡盛醸造では、種麹は使用せず、友麹として用いる黒麹は地域の酒造所間で相互に譲り合っていたという記録<sup>5)</sup>と符合する。さらに、沖縄県南部や八重山の黒麹には、2グループ (A、SK) に属さない株 (old) が広く含まれていたと推測され、現在の商用黒麹菌株 (A、SK) とは異なる系統の黒麹菌株が戦前の泡盛醸造に寄与していたことが示唆された。

以上の結果から、全ゲノム情報による系統解析と過去の報告を用いることで、戦前の黒麹には複数の *A. luchuensis* グループの株が含まれていたことが確認され、その菌叢は地域ごとに特徴があったことが示唆された。

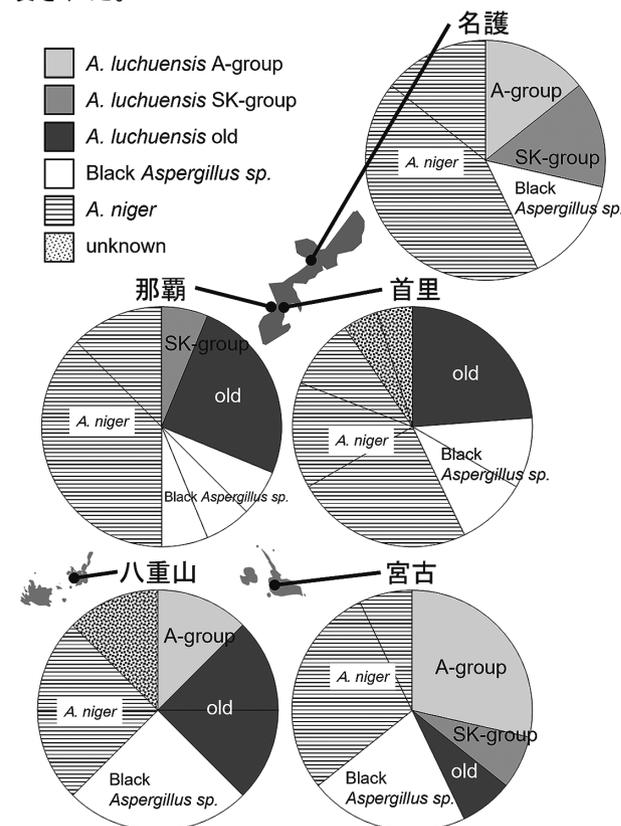


図3. 戦前の黒麹から採取された菌株の推定

## 文献

- 1) 村上英也：麹学 (村上英也編), 48-81, 日本醸造協会 (1986)
- 2) 山田修：バイオサイエンスとインダストリー, 71, 499-503 (2013)
- 3) 中澤亮治, 霜三雄, 渡邊寛：農芸化学会誌, 12, 931-974 (1936)
- 4) 坂口謹一郎, 飯塚廣, 山崎千二：應用菌學, 3, 53-63 (1950)
- 5) 森貞信：日本醸造協会雑誌, 30, 817-823 (1935)

# 微生物由来蓄電性鉱物を介した電子共生に基づく

## 嫌気バイオプロセスの向上

林 稜也<sup>1</sup>・安池 一貴<sup>1</sup>・片桐 美紀<sup>2</sup>・大前 貴裕<sup>1</sup>・窪野 一郎<sup>1</sup>・田代 陽介<sup>1</sup>・

二又 裕之<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>静岡大学大学院総合科学技術研究科, <sup>2</sup>静岡大学工学部, <sup>3</sup>静岡大学グリーン科学技術研究所

〒432-8561 浜松市中区城北 3-5-1 静岡大学工学部

Tel: 053-478-1178 Fax: 053-476-0095

E-mail: futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

本研究では、微生物が生成する蓄電性バイオミネラルが嫌気微生物複合系に及ぼす影響についてバイオプロセスの観点から解析を実施した。微生物が生成する蓄電性バイオミネラル、汽水湖底泥および電子供与体として乳酸を用いて長期間連続回分運転により集積培養を行った。蓄電性バイオミネラル無添加系を対照とした。生成する有機酸、水素およびメタンを測定した結果、両培養系とも乳酸の減少に伴い酢酸およびプロピオン酸が蓄積し、継代培養に伴い酢酸消費に伴うメタン生成が確認された。蓄電性バイオミネラル添加系の方が酢酸消費速度およびメタン生成速度が共に 1.5~2 倍程度速かった。16S rRNA 遺伝子 V4 領域のアンプリコンシーケンス解析を行った結果、蓄電性バイオミネラル添加系において特異的な群集構造の形成が確認された。主座標分析から *Comamonadaceae* および *Eubacteriaceae* が特異的群集構造の形成に寄与していることが示唆された。蓄電性バイオミネラル添加系より分離された I-6 株は 16S rRNA 遺伝子解析の結果 *Acetobacterium* 属細菌であることが明らかとなり、微生物燃料電池で I-6 株を培養したところ電流生産が確認された。これらの結果から、蓄電性バイオミネラルを電子授受の場とした微生物電子共生系が形成され、微生物電子共生系の構築に伴う嫌気バイオプロセスの向上が示唆された。

### 1. 緒言

微生物の物質変換能力の向上とその制御は、バイオテクノロジーの発展にとって必要不可欠である。近年、細胞外導電性物質を介した電子授受システムが、嫌気的廃水処理能の向上や新規エネルギー生産システムとして着目されている。また、社会実装を想定した場合、導電性鉱物を介して形成されると推定される微生物電子共生系の好適制御に関する知見は必要不可欠である。これまで導電性鉱物を介した電子授受に基づく微生物の応答は特定の微生物に関して知見が蓄積されつつある<sup>1)</sup>ものの、未だ限定的である。また、分離株を用いた微生物電子共生系に関する報告例はあるものの、実際の環境サンプルを用いた複合微生物系に基づく微生物電子共生系に関する知見は非常に少ない。

そこで本研究では、高電流密度を生産した微生物燃

料電池<sup>2)</sup>の負電極バイオフィームから分離された硫酸還元細菌によって生成される蓄電性鉱物と佐鳴湖底泥を用いた集積培養系を構築し、この蓄電性鉱物添加系の物質変換能力を長期間に渡り評価するとともに、その実態である微生物生態系について解析した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 嫌気集積培養系の構築

汽水湖底泥 0.2 g を接種源、4 mM 乳酸を電子供与体とした培地 100 mL に蓄電性鉱物を約 0.13 g 加えた蓄電性鉱物添加系および蓄電性鉱物無添加の対照系を構築した。微生物生態系の代謝を評価するため、経時的に有機酸およびメタンの濃度を HPLC および GC にて測定した。両培養系において乳酸の消費を確認後、乳酸を再添加した。3 回の乳酸消費確認後、上清約 95% を

新鮮な培地と置換する継代培養を行った。また、蓄電性鉍物添加系で集積培養された微生物の分離を行い、微生物の同定および代謝評価を行った。本実験は三連系で実施した。

## 2-2 微生物群集構造解析

微生物の空間的分布を調べるため、蓄電性鉍物添加系および対照系の菌液を 1.0 mL 採取し、10  $\mu$ L の SYBR Green I ( $\times 100$ ) を添加した後、暗所にて 15 分静置後、観察した。構築された微生物群集構造を解析するために、蓄電性鉍物添加系および対照系から継代毎に採取された沈殿物および上清のサンプルから DNA を抽出した。その後、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE の結果を基に MDS 解析、並びに 16S rRNA 遺伝子 V4 領域のアンプリコンシーケンス解析を行い、微生物群集構造解析を行った。

## 2-3 集積系から分離された微生物の代謝評価

供試した培地にゲランガムを 0.45% となるよう添加し、蓄電性鉍物添加系 108 日目の培養液を適時希釈し、6-well plate 法で分離をした。68 日培養後、コロニーを供試培地に接種し、代謝を評価するために有機酸濃度測定を行った。

## 3. 結果

### 3-1 蓄電性鉍物存在下における微生物生態系

両培養系において乳酸の消費に伴い酢酸およびプロピオン酸の生成が確認された。蓄電性鉍物添加系は継代培養 23 代目まで乳酸消費は  $2.8 \text{ mM day}^{-1}$  と安定であった。対照系および蓄電性鉍物添加系の継代培養 11 代目および 16 代目以降では酢酸の消費に伴うメタンの生成が確認された。興味深いことに蓄電性鉍物添加系のメタン生成量は対照系と比較して  $2.1 \pm 0.41$  倍であった。これら結果より、蓄電性鉍物添加系は蓄電性鉍物による代謝活性の促進が示唆された。

### 3-2 蛍光顕微鏡観察および微生物群集構造解析

蛍光顕微鏡観察の結果、蓄電性鉍物添加系の微生物は蓄電性鉍物上で生息していることが確認された。PCR-DGGE 解析を行った結果、蓄電性鉍物添加系と対照系で異なる微生物群集構造の形成が示唆された。また、アンプリコンシーケンス解析の結果、両培養系において *Clostridiaceae* の優占が明らかとなった。対照系では *Campylobacteraceae*、蓄電性鉍物集積系では *Eubacteriaceae* および *Comamonadaceae* の特異的な集積が確認された。

また蓄電性鉍物添加系では、酢酸あるいは水素から

電子を受容し  $\text{CO}_2$  からメタン生成が可能な水素利用メタン生成アーキア *Methanosaetaceae* がアーキアにおいて優占種であった。興味深いことに OTU\_004, OTU\_005 および OTU\_144 の塩基配列を持つ微生物は蓄電性鉍物添加系の特異的な群集構造の形成に寄与することが示唆された。

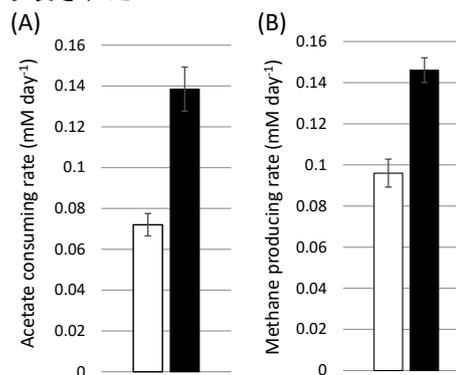


図 1. 蓄電性鉍物が嫌気的物質変換能に及ぼす影響 (A) 酢酸消費速度, (B) メタン生成速度. □: 対照系, ■: 蓄電性鉍物添加系.

## 4. 考察

アンプリコンシーケンス解析から対照系と比較して蓄電性鉍物添加系には EET を行うと報告されている *Methanosaetaceae* および *Hydrogenophaga* 属の存在が確認された。蓄電性鉍物添加系の形成に寄与する OTU\_005 の塩基配列と一致した分離菌株 *Acetobacterium* sp. I-6 株は乳酸を基質とした酢酸生成および MFC 条件下において酢酸消費に伴う電流生産を示した。鉍物を介した特異的な微生物群集構造の形成<sup>3)</sup>や異属微生物同士の共生的代謝が知られている。そのため、蓄電性鉍物を介した電子授受による微生物電子共生系形成に I-6 株の関与が推察された。共生系の理解には更なる微生物の分離と解析が必要である。

以上の結果より、蓄電性鉍物は微生物の電子プールとして機能し、電子共生を行う微生物群集構造の形成を通じて嫌気的物質変換活性の向上に寄与したと推察された。

- 1) Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H-Q, Fredrickson, J.K. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 651-662. (2016).
- 2) Suzuki, K., Kato, Y., Yui, A., Yamamoto, S., Ando, S., Rubaba, O., Tashiro, Y., and Futamata, H. *J. Biosci. Bioeng.* **125**, 565-571. (2018).
- 3) Kato S., Nakamura, R., Kai, F., Watanabe, K., Hashimoto, K. *Environ. Microbiol.*, **12**, 3114-4123. (2010).

# 基質競合下における代謝ネットワークの進化と微生物共存

鈴木 研志<sup>1,5\*</sup>・上原 悠太郎<sup>2</sup>・栗栖 太<sup>3,5</sup>・野尻 秀昭<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>東京大学院農学生命科学研究科, <sup>2</sup>東京大院工学系研究科, <sup>3</sup>東京大院工学系研究科附属水環セ,

<sup>4</sup>東京大院農学生命科学研究科附属アグテック, <sup>5</sup>東京大学 CRIIM

〒113-8657 東京都文京区 1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科

Tel: 03-5841-3070 Fax: 03-5841-8030

E-mail: kensuzuki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

本研究では、基質競合下における微生物の多種共存機構を代謝ネットワーク形成の観点から解明するため、5種の異属 phenol 分解菌 (*Acinetobacter* sp. C26、*Comamonas testosteroni* R2、*Cupriavidus* sp. P-10、*Pseudomonas* sp. LAB-08 および *Variovorax* sp. HAB-30) を様々な順序で植菌する連続集積培養系を用いて、群集構造および細胞外代謝産物を経時的に解析した。その結果、植菌順序によって複数種が共存できる場合とできない場合があり、R2 株、C26 株、P-10 株、HAB-30 株および LAB-08 株の順で植菌することで、4種が共存することが明らかとなった。しかも、C26 株および P-10 株の植菌順序を入れ替えると R2 株が単独で生存することが明らかとなった。そこで、4種が共存した培養系の代謝産物を解析したところ、培養に伴い代謝産物の種数が増加することが示された。また、P-10 株の植菌後に代謝産物のプロファイルが大きく変化することが示された。どのように代謝ネットワークが形成されていたのかを解析するため、植菌毎に新規検出あるいは消失する代謝産物を解析したところ、少なくとも 22 種の代謝産物を介した代謝ネットワークが形成されていることが予測された。以上の結果から、本 5 菌株培養系では C26 株および P-10 株間で形成される代謝ネットワークが共存に寄与しており、適切なネットワークの進化が微生物の多種共存を可能にしていることが示唆された。

## 1. はじめに

科学技術の発展が生活を豊かにしている一方で、自然は減少の一途にあり、環境保全のみでなく「再生」が必要不可欠である。その為には、物質循環の基盤であり汚染物質分解能を持つ微生物とその集団である微生物群の理解が重要であるが、微生物が如何にして共存し、汚染物質分解等の機能を発揮・維持するのはほとんどが未解明である。環境中で微生物は、限られた資源を競合しつつも共存しその多様性を維持している<sup>1),2)</sup>。一方で、基質競合条件下では最も競争力が高い微生物のみが生存すると考えられており<sup>3)</sup>、現実と理論的理解には大きな乖離がある。

これまでの研究で、phenol を唯一の炭素源として増殖できる異属細菌を組み合わせて培養すると、phenol を競合しつつ種間で代謝産物を分配し共存することが示唆されてきた<sup>4)</sup>。その一方で、どのような菌株の組み

合わせでも共存が成立するわけではないことが示されてきた<sup>5)</sup>。即ち、基質競合下における微生物共存には、適切な菌株の組み合わせで代謝のネットワークが形成されることが必要不可欠であると考えられた。そこで本研究では、5種の phenol 分解菌を様々な順序で植菌し、群集構造変遷および細胞外に分泌された代謝産物を経時的に解析することで、微生物共存機構を代謝ネットワーク形成の観点から解明することを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試菌株および連続集積培養系の運転

フェノール分解菌である *Acinetobacter* sp. C26 株、*Comamonas testosteroni* R2 株、*Cupriavidus* sp. P-10 株、*Pseudomonas* sp. LAB-08 株および *Variovorax* sp. HAB-30 株を用いた。R2 株を 1 種目として phenol を炭素源とする連続集積培養系を構築した。連続集積培養

系の滞留時間を 5 days とし、phenol 負荷速度を 15 mg day<sup>-1</sup> とした。培養期間中、培養液を回収し菌密度 (OD<sub>600</sub>) を測定した。培養 15 日毎に新しい菌株を植菌し (表 1)、群集構造および培養上清中代謝産物を解析した。全ての実験は 3 連で行った。

表 1. 植菌順序

Patterns	The order of inoculation				
	1	2	3	4	5
1	R2	C26	P-10	HAB-30	LAB-08
2	R2	P-10	LAB-08	C26	HAB-30
3	R2	P-10	HAB-30	C26	LAB-08
4	R2	P-10	C26	HAB-30	LAB-08
5	R2	P-10	LAB-08	HAB-30	C26
6	R2	P-10	HAB-30	LAB-08	C26

## 2) 群集構造解析および代謝産物の分析

連続集積培養系から回収した菌体より DNA を抽出し PCR-DGGE 解析に供した。培養上清から PPL 固相カラムを用いて代謝産物を抽出し orbitrap-MS による分析に供した。

## 3. 結果および考察

### 1) 菌密度の増加と群集構造変遷

全 6 パターンで植菌を行ったところ、全ての培養系で OD<sub>600</sub> 値が増加し、培養 75 日目にはパターン 6 が最も高い OD<sub>600</sub> 値を示した (図 1A)。各培養系の群集構造変遷を解析したところ、パターン 1 で HAB-30 株を除く 4 種の共存が確認された一方で、その他の培養系ではほとんどの場合 R2 株が単独で優占化することが明らかとなった。特に、C26 株と P-10 株の植菌順序のみが異なるパターン 4 でも R2 株が単独で生残していた (図 1B)。これらの結果から、植菌順序が共存には重要であり、代謝ネットワークの形成プロセスの違いが共存できる微生物の種数を左右することが示唆された。

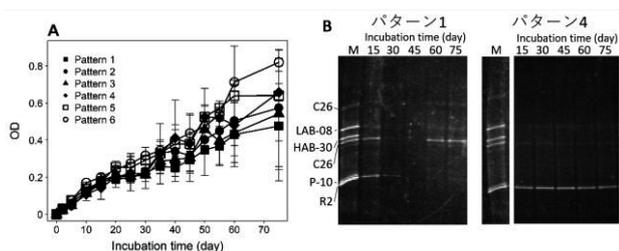


図 1. 連続集積培養系における菌密度および群集構造変化。A) 各培養系における OD<sub>600</sub> 値の変化。B) パターン 1 およびパターン 4 の群集構造変遷。

### 2) 代謝ネットワークの進化

パターン 1 で形成されていた代謝ネットワークを解析するため、培養上清を分析したところ、培養に伴って代謝産物の種数も増加した (図 2A)。3 連で実験を行った内 2 つの培養系で同様の代謝産物プロファイルの

変遷が確認された (図 2B)。1 つの培養系では培養 30 日目に大きく代謝産物プロファイルが変化する一方で、培養 45 日目以降では他の 2 つの培養系と同様のプロファイルになることが示された。興味深いことに、培養 30 日目から 45 日目に代謝産物プロファイルが大きく変化することが明らかとなった。この期間は P-10 株が植菌されたタイミングであった。しかも、P-10 株と R2 株の植菌順序のみが異なるパターン 4 では R2 株が単独で生残することから、C26 株と P-10 株間で形成される代謝ネットワークが共存に重要であることが示唆された。代謝ネットワークの構造を推定するため、植菌毎に新規検出あるいは消失する代謝産物を解析したところ、少なくとも 22 種の代謝産物がネットワーク形成に関与していることが示唆された。また、それらの代謝産物は分子量 200 以上のものが多く、二次代謝産物や溶菌した細胞由来の代謝産物である可能性が高いことが示唆された。

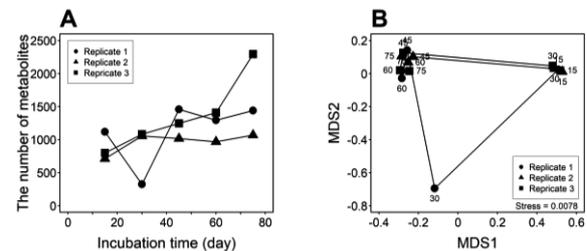


図 2. 代謝産物の変化。A) 代謝産物種数の変化。B) 多次元尺度法による代謝産物プロファイル解析。

## 3. 展望

本研究で、微生物が共存するためには適切な代謝ネットワークの形成プロセスを経ることの重要性が示された。つまり、微生物が共存できる代謝ネットワークをデザインすることができれば、機能的微生物群の構築や、土着菌群の好適制御が可能になり、微生物利用技術の革新に繋がることから、環境保全・再生への貢献が期待される。また、微生物生態系を一つの代謝ネットワークと捉えることで、これまで概念として捉えられてきた機能や群集構造の安定性の理論的な説明が可能になることが期待される。

## 参考文献

- 1) Foster KR, Bell T: *Curr Biol.*, **22**, 1845–50 (2012)
- 2) Widder S *et al.*: *ISME*, **10**, 2557–2568 (2016)
- 3) Hansen SR, Hubbell SP: *Science*, **207**, 1491–93 (1980)
- 4) Aziz FAA *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **131**, 77–83 (2021)
- 5) Aziz FAA *et al.*: *Front. Microbiol.*, **6**, 1148 (2015)

# 酸素供給能は自家熱型高温好気消化プロセスに影響を及ぼす

井出本 貴宏・張 敏・田代 幸寛\*・丸山 明子・酒井 謙二

九州大学大学院生物資源環境科学府

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Tel: 092-802-4739

E-mail: tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

自家熱型高温好気消化 (ATAD) は、複合微生物による発熱等により 50°C 以上の高温下で好気的に進行するプロセスである。先行研究により、福岡県築上町の実機では特徴的な細菌叢変化および理化学特性を示すことを明らかにした。本プロセスはサステナブル資源循環利用技術として期待される一方、酸素供給に要する高い消費電力が課題である。そこで本研究では、未報告である因子として酸素供給能の重要な指標である  $K_La$  (総括酸素移動容量係数) が ATAD プロセスにおよぼす影響を解明した。その結果、異なる  $K_La$  条件下では細菌叢や理化学特性に影響を及ぼすことが明らかとなった。特に、消化効率および窒素維持率の観点から、消費電力の小さい低酸素供給下でも本 ATAD プロセスを実施し、高窒素含有液肥を生産できることが示唆された。

## 1. はじめに

ヒトし尿は、窒素やリン、カリウムなどの栄養素が豊富に含まれており、古くから肥料や土壌改良剤として利用されてきた。近年、資源の循環利用や持続可能な農業の促進の観点から、食料生産にヒトし尿を再利用することが期待されている。しかしながら、未処理のヒトし尿は病原性微生物や有害物質を含むため、農地にそのまま還元することはできず、適切な処理をする必要がある。

自家熱型高温好気消化 (ATAD) は、複合微生物の発熱等により 50°C 以上の高温下で好気的に進行する排水処理プロセスとして知られる<sup>1)</sup>。本プロセスでは高温処理による病原性微生物の死滅・反応時間の短縮、嫌気性処理と比較して設備の簡便性、pH 制御が不要といった利点が挙げられる<sup>2)</sup>。一方で、好気性処理であるため、曝気に多大なエネルギーコストがかかることが課題となっている。

福岡県築上町では、本プロセスを利用して、町内のし尿および汚泥を液肥化に応用している。先行研究では、実機における細菌叢および温度や DO などの理化学特性は 3 段階 (Initial, Middle, Final) で変化することを明らかにした<sup>3)</sup>。また、酸素供給方式およびせん

断応力が細菌叢および理化学特性変化に寄与する因子であることを報告した<sup>4)</sup>。一方で酸素供給に要する高い消費電力が課題として未解決である。そこで本研究では、未報告である因子として酸素供給能の重要な指標である  $K_La$  (総括酸素移動容量係数) が ATAD プロセスに及ぼす影響を調べた。

## 2. 材料と方法

本実験では築上町液肥製造施設で採取した原料 (し尿および汚泥) および種菌として液肥を用いた。まず、通気攪拌装置を導入したバイオリアクター<sup>3)</sup>を用いて、攪拌速度 1000 rpm における  $K_La$  値と通気量を調べた。測定には窒素置換による排気法を行い、 $K_La$  を 10、25、50、90  $h^{-1}$  に設定した。また、実機と類似した温度変化を模倣しながら、pH 非制御下、回分式で 9 日間消化試験を行った。温度、DO、pH、ORP を常時オンラインで計測し、適宜サンプリングした試料について、細菌叢、COD、アンモニア態窒素濃度を分析した。

### 3. 結果と考察

D0 値の比較では、低  $K_{La}$  において消化初期にほぼ 0 となり無酸素状態となったが、高  $K_{La}$  では 4 mg/L 以上となり、低  $K_{La}$  において実機と同様の変化を示した。また、細菌叢解析の結果、主要細菌である *Acinetobacter indicus* 類縁菌が優占となり、 $K_{La}$  が大きいほど、占有率が大きくなった。一方で、同様に主要細菌である *Aliarcobacter cibarius* 類縁菌は  $K_{La}$  が小さいほど、占有率が大きくなった。これより、主要細菌の出現と消滅に  $K_{La}$  による差が見られた。

3 段階における COD の比較では、いずれの  $K_{La}$  でもほぼ類似して減少し、減少率は  $K_{La}$  25 で最大、 $K_{La}$  90 で最小となったものの、約 60% と大きな差はなかった (図 1)。このことから低酸素供給条件下でも有機物の分解が進行することが示唆された。

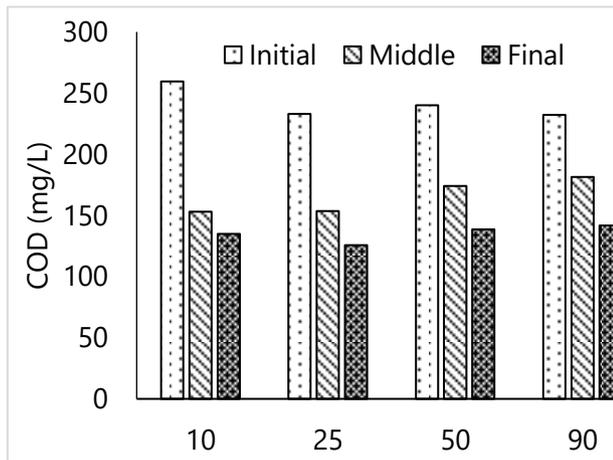


図 1 各段階における COD 変化

インドフェノール法によるアンモニア態窒素濃度の測定では  $K_{La}$  による減少率の差が見られた (図 2)。 $K_{La}$  が小さい場合、アンモニア態窒素の減少率はほとんど一定であり、維持率が高かった。一方で  $K_{La}$  が大きい場合、アンモニア態窒素の減少率は進行とともに大きくなり、維持率が低かった。このことから低酸素供給下において高い窒素維持率を確保し、液肥生産において有用であると示唆された。

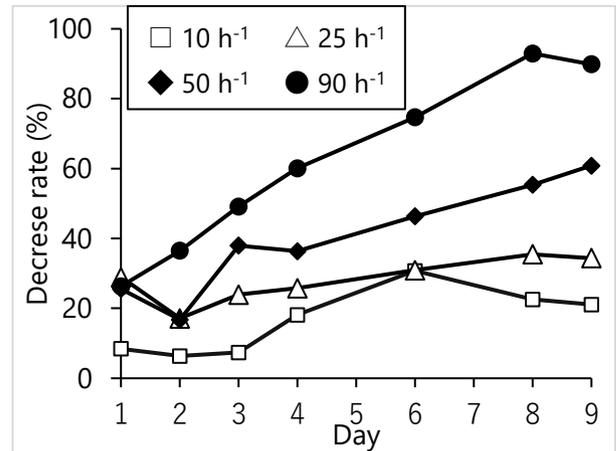


図 2 アンモニア態窒素濃度の減少率の推移

以上の結果より、自家熱型高温好気消化プロセスにおいて酸素供給能は細菌叢変化や理化学特性に影響を及ぼすことが明らかになった。特に消化効率および窒素維持率の観点からも、 $K_{La}$  が小さく、消費電力の小さい酸素供給下でも本 ATAD プロセスを実施可能であり、高窒素含有液肥を生産できることが示唆された。

### 4. 今後の展望

先行研究の酸素供給方式およびせん断応力に加えて、酸素供給能が ATAD プロセスの新たな制御因子であることが明らかとなった。さらに、16S アンプリコン解析法の導入により、細菌叢を種レベルで解明することが可能となりつつある。理化学特性に加えて細菌叢を統合して ATAD プロセスを制御できれば、サステナブル資源循環利用技術としての利用が拡大することが期待される。

### 参考文献

- 1) Wang, P et al., *Eng. Agric. Environ. Food*, **7**, 1-6 (2014)
- 2) Layden, N.M. et al., *J. Environ. Eng. Sci.*, **6**, 665-678 (2007)
- 3) Tashiro, Y et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, 6 (2018)
- 4) Zhang, M et al., *J. Biosci. Bioeng.*, in press

# 単細胞緑藻のみを用いて作製した 細胞プラスチックの解析と評価

鶴田 茜<sup>1</sup>・中西 昭仁<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>東京工科大学応用生物学部, <sup>2</sup>東京工科大学バイオ・情報メディア研究科

〒192-0982 東京都八王子市片倉町 1404-1 学校法人片柳学園 東京工科大学

Tel: 042-637-2427

E-mail: nakanishiah@stf.teu.ac.jp

SDGsをはじめ炭素循環に関する社会の関心が高まる中、炭素源をバイオマスとしたグリーンプラスチックは世界中で活発に研究されてきた。グリーンプラスチックの生産では原料の抽出や精製に設備や費用コストの課題があったことから、本研究では強固な細胞壁を有する緑藻細胞を直接原料として使うことで、これらのコスト削減を狙う計画を立てた。さらに、当該研究では現在までにマトリックス成分として生分解性ポリマーを用いてきたが、マトリックス成分をも細胞から供給させて、細胞のみを由来とする細胞プラスチックの作製を併せて計画した。そこで、本発表では細胞プラスチック作製方法の検討ならびに作製された細胞プラスチックの表面構造と力学特性の評価を目的とした。

## 1. はじめに

プラスチックは汎用性や加工性に優れていて、現代社会において必要不可欠な素材である。しかしながら、プラスチックは生産量の 99%以上を非循環また有限の石油を原料としていることや、マイクロプラスチックのように難分解性プラスチックが環境中に残留していることを課題として孕んでいる。内閣府がムーンショット目標にて 2050 年までに地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現することを掲げているように、炭素循環型の原料への代替が社会的に求められている。

現在までにグリーンプラスチックに関する研究が世界中で活発に進められてきた<sup>1)</sup>。乳酸をはじめ微生物によるプラスチック原料の生産が積極的に進められる中で、原料の抽出や精製のコスト低減を狙って、我々は微生物そのものをプラスチック原料として生産することを発案した。特に、*Chlamydomonas* sp. や *Chlorella* sp. といった緑藻は光合成によって二酸化炭素を炭素源に細胞を構成でき、バイオマス生産性に優れ、強度ある細胞壁を有し、また単細胞であるのでプラスチック成型時に自由に配置できる<sup>2), 3), 4), 5)</sup>。更には、環境中に普遍的に存在する緑藻であることから、

細胞を繋ぐマトリックス成分に生分解性の原料を用いれば環境での分解も期待される<sup>4)</sup>。以上のことから、提案する細胞プラスチックは循環型社会の構築の一助となる可能性がある。

現在までに、細胞を平面的に配置しレイヤー化した後に二次元ポリマーを塗布し重ね合わせた積層型細胞プラスチック<sup>2)</sup>と、細胞とマトリックス成分を混ぜて成型した混合型細胞プラスチック<sup>3), 4), 5)</sup>を開発してきた<sup>6)</sup>。どちらの細胞プラスチックの作製であっても細胞への充填剤の添加が必須であり、原料の抽出や精製のコストの更なる低減には緑藻のみからなる細胞プラスチックの作製が必要であると考えた。

## 2. 実験方法

細胞プラスチックの作製には、*Chlamydomonas reinhardtii* が用いられた。細胞内容物は細胞を超音波破碎に供することで溶出された。処理液は遠心分離後、上清成分が回収・凍結乾燥されて、細胞内容物として回収された。細胞内容物は細胞と混合されて成型され、細胞プラスチックが作製された。本発表で示す細胞プラスチックは、150 mg の細胞に対して、10 ~ 30 mg の細胞由来の内容物を混合することで作製さ

れた。細胞プラスチックの表層は走査型電子顕微鏡 (SEM) で解析・評価された。細胞プラスチックの力学特性評価は引張強度試験機によって解析・評価された。

### 3. 結果と考察

細胞に内容物を混合し成形することで、細胞プラスチック様の物体を作製できた (図 1: a)。細胞プラスチックの表面構造を SEM 像で解析した結果、遠景では滑らかな構造が、近景では細胞と考えられる構造体が確認された (図 1: b, c)。以上より、緑藻細胞のみを原料とした細胞プラスチックを作製できたと考えた。なお、成型時、細胞プラスチックは鋳型に張り付く傾向があったため、用いる鋳型を最適化する必要があった。作製された細胞プラスチックの力学特性を評価するため、応力-ひずみ曲線を作成した (図 2)。応力-ひずみ曲線から、弾性の限界を迎えると大きく破断することが明らかになった。細胞と細胞内容物の混合比を変えて作製された細胞プラスチックは全て同様の傾向を示したが、一方でヤング率が混合比に依存的な変動を示した。このことからマトリックス成分として細胞内容物が力学強度付与の観点で機能していることが示唆された (data not shown)。

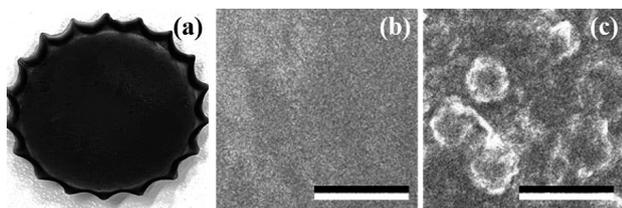


図 1. 緑藻のみで作製された細胞プラスチック、(a) 細胞プラスチックの写真; (b) SEM 像遠景 ( $\times 20$ ) スケールバー 500  $\mu\text{m}$ ; (c) SEM 像近景 ( $\times 1,000$ ) スケールバー 10  $\mu\text{m}$

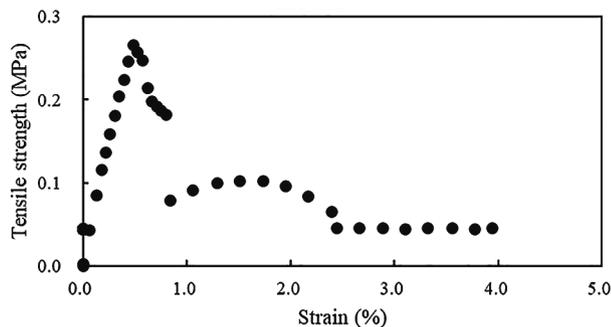


図 2. 細胞プラスチックの力学試験評価

### 4. 今後の展望

本研究を進めることで、細胞をプラスチックの素材として用い実用化する際の課題点を複数点明らかにすることができた。例えば、細胞プラスチックの力学特性に影響を及ぼす因子が具体的に特定されておらず、目的のプラスチックが要求する力学特性に適合させられるような、細胞プラスチック作製法のカタログ化が難しいことが課題である。ただし、顕出された課題点は新たな研究シーズを生み、細胞プラスチックの実用化を早めてくれる可能性が高い。今後はメタボローム解析を基盤に関連する内容物の特定を進め、成型方法に係る各種パラメータの最適点を決定して、社会ニーズに応えられる多様な特性を有する細胞プラスチックの実現を目指す。

### 謝辞

本研究は、NEDO 先導研究プログラム/未踏チャレンジ 2050 の助成で実施された。

### 参考文献

- 1) Nakanishi, A.<sup>\*†</sup> Iritani, K.<sup>\*</sup> Sakihama, Y.: *J. Nanotechnol. Nanomaterials*, **1**, 72–85 (2020).
  - 2) Nakanishi, A.<sup>\*</sup>† Iritani, K.<sup>\*</sup> Sakihama, Y., Ozawa, N., Mochizuki, A., Watanabe, M.: *AMB-Express*, **10**, 112 (2020).
  - 3) Nakanishi, A.<sup>\*</sup>† Iritani, K.<sup>\*</sup> Sakihama, Y., Watanabe, M.: *Int. J. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 159–164 (2020).
  - 4) Nakanishi, A.<sup>\*</sup>† Iritani, K.<sup>\*</sup> Sakihama, Y., Watanabe, M., Mochizuki, A., Tsuruta, A., Sakamoto, S., Ota, A.: *Appl. Sci.*, **11**, 847 (2021).
  - 5) Iritani, K.<sup>\*</sup>† Nakanishi, A.<sup>\*</sup> Ota, A., and Yamashita, T.: *Global Challenges*, **5**, 2100026 (2021).
  - 6) Nakanishi, A.<sup>\*</sup>† Iritani, K.<sup>\*</sup>: *Annal. Biol. Res.*, **12**, 58–61 (2021).
- (<sup>\*</sup>: 共同筆頭著者、<sup>†</sup>: 責任著者)

# ダイズの成長に伴う根圏微生物叢の変動解析

木伏 真子<sup>1</sup>・西川 洋平<sup>2,3</sup>・細川 正人<sup>1,2</sup>・井手 圭吾<sup>1,3</sup>

小川 雅人<sup>2,3</sup>・穴井 豊昭<sup>5</sup>・竹山 春子<sup>\*1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>早大院・先進理工, <sup>2</sup>早大・ナノライフ創新研, <sup>3</sup>産総研・早大 CBB-01L

<sup>4</sup>早大・生命動態研, <sup>5</sup>九大院・農

〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 早稲田大学先端生命医科学センター

Tel: 03-5369-7326 Fax: 03-5369-7326

E-mail: haruko-takeyama@waseda.jp

植物根から分泌される成分の影響を強く受ける土壌領域は根圏と呼ばれる。根圏には周辺土壌とは異なる微生物が定着し、植物と活発に相互作用することが知られているが、その詳細については未解明な部分が多い。そこで我々は、土壌の作物生産力の向上につながる植物-微生物相互作用の解明を目標に掲げ、ダイズやその根圏の微生物叢から網羅的に獲得したシングルセルゲノムを詳細に解析し、根圏微生物の時空間的な変動評価を試みている。本発表では、佐賀大学圃場の土壌を用いたポット栽培のダイズを対象として、ダイズの品種・成長段階・植物体からの距離に応じた微生物叢の変化について、16S rDNA 解析およびシングルセルゲノム解析を行った。16S rDNA 解析とシングルセルゲノム解析の組み合わせにより、変動が見られた微生物種における個々の微生物の株レベルでの機能評価が可能となり、有用な根圏微生物の網羅的探索が可能になると期待される。

## 1. はじめに

植物根から分泌される成分の影響を強く受ける土壌領域は根圏と呼ばれ、根から離れた土壌とは異なる微生物が定着することが知られている。また、植物体内に生息する共生微生物も存在し、特に根粒菌はマメ科植物の根に特殊な共生器官（根粒）の形成を誘導する共生窒素固定細菌である。

99%が培養困難とされる土壌微生物の特徴の解明に向け、16S rDNA 解析やショットガンメタゲノム解析などのゲノム情報を基にした研究手法が広く用いられている。前者は微生物の系統を特定することに適し、サンプル間の微生物叢構造の比較が可能である一方、16S rDNA の配列が同じでも植物体との相互作用が異なる微生物株が存在するため、16S rDNA 系統情報のみによる微生物叢の機能の推測には不足がある。また、後者は微生物叢の遺伝子情報から群集全体の機能を推測することに用いられるが、多様性の高い土壌微生物には未だ全ゲノム情報が明らかになっていない株も多く、機能情報と微生物系統の結びつけが困難である。近年、根圏や根内に生息する微生物が植物の生育に密接に関

係していることが明らかになりつつあるが、その詳細については未解明な部分が多い。

そこで本研究では、微生物ゲノムの特徴を個々に評価するシングルセルゲノム解析と群集全体を俯瞰することに適した16S rDNA 解析を用いてダイズの成長に伴う根圏微生物叢の変動を解析した。

## 2. 方法

### (1) 植物体（ダイズ）と土壌の採取

2021年1月-5月において、2品種（フクユタカ、佐大H01号）のダイズを対象として佐賀大学圃場の土壌を用いたポット栽培を行った。栽培条件として、植物育成用のLEDを装着した密閉型インキュベーターにおいて日照時間および温度を管理した人工光栽培、ガラス室において太陽光を光源とした自然光栽培の2種を行った。また、五葉期、開花期、登熟期の3つの成長段階においてのダイズおよび土壌を採取した。

### (2) ダイズ根圏の分画

ダイズ苗をポットから外し、手で振揺することで根から剥がれ落ちた土を周辺土壌とした。次に、根を蒸留水と共にチューブ①に入れ、10回程度上下に浸漬し、

別のチューブ②に移した。②に蒸留水を加え、30秒ON、30秒OFFからなる10サイクルの超音波洗浄を10分間行った。各チューブの蒸留水画分は遠心分離(10,000 xg, 10分間)にかけ、①のペレットを根圏(遠位)、②のペレットを根圏(近位)とした。さらに、洗浄後の根から根と根粒を採取した(図1)。

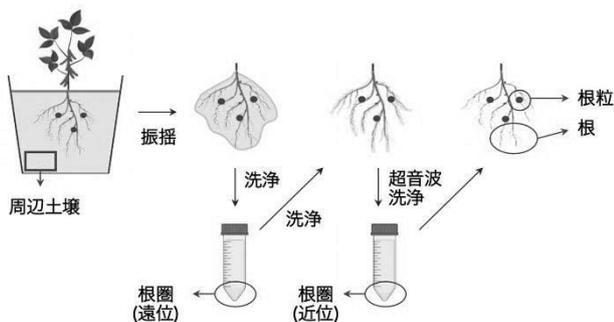


図1. 土壌の分画方法とサンプルの分類

### (3) DNA抽出と系統マーカー遺伝子情報の取得

Extrap Soil DNA Kit Plus Ver. 2 を用いて、土壌サンプルの蒸留水懸濁液およびホモジナイズされた根・根粒のサンプルからDNAを抽出した。真菌ITS領域を対象としたgITS-ITS4プライマーセットおよび細菌16S rDNAのV3-V4領域を対象とした341F-806Rプライマーセットを用いて、それぞれの配列情報を取得した。

### (4) シングルセルゲノムの取得

根圏土壌および根粒を対象として、マイクロ流体デバイスを用いた微小液滴作成技術により単一細胞のゲノムを増幅しシングルセルゲノム情報を取得した<sup>1)2)3)</sup>。

## 3. 結果と考察

### (1) 植物体(ダイズ)の成長に伴う微生物叢の変動

土壌や根における細菌叢組成は、上位3綱(*Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidota*)の占有率が、植物体から距離が近いほど高くなっており、根粒では*Bradyrhizobium*属が優占種であった(図2)。真菌叢組成は、各サンプルにおいて*Ascomycota*門が主要であり、根・根粒においては*Fusarium*属が優占していた。

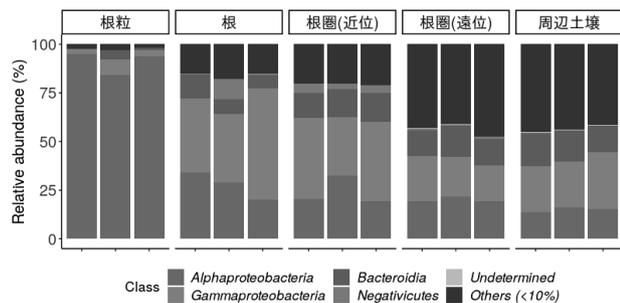


図2. 細菌叢組成(フクユタカ\_自然光栽培\_開花期)

また、栽培時期や植物体の品種に関わらず、周辺土壌、根圏、植物体内部と、植物体に近いほどサンプル内の細菌種の多様性が低下しており、植物体からの距離による細菌叢構造の変化がみられた。一方、ダイズ2品種間で細菌叢構造に大きな差は見られなかった。また、ダイズの成長に伴う細菌叢構造の変動は、根圏土壌では確認されたが、根や根粒においては一定の菌叢が保たれることが明らかとなった(図3)。

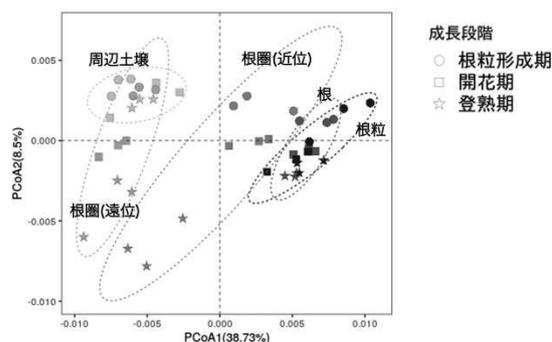


図3. 細菌叢構造の比較(フクユタカ\_自然光栽培)

### (2) 根粒菌における株レベルのゲノム相同性の評価

ダイズの3つの成長段階で採取した根圏土壌と根粒から、単一細胞由来のゲノムを合計3796個獲得した。根圏土壌からは347属にわたる多様な微生物ゲノムが獲得され、根粒からはダイズの生育に必須となる根粒菌*Bradyrhizobium*属のゲノムが多数取得された。さらに、系統内でシングルコピーであるマーカー遺伝子の配列をもとに根粒菌ドラフトゲノムの相同性を確認した結果、16S rDNAによる系統が同じ属であった根粒菌同士が株レベルでは異なるゲノムを持つことを確認した。植物体と密な相互作用を行う土壌微生物において、個々の微生物ゲノムを用いた株レベルでの詳細な比較が可能であるシングルセルゲノム解析は有用である。

## 4. 今後の展望

植物と微生物の相互関係を解析して有用微生物の情報を蓄積することでデータベース化を行い、将来的に持続可能な農業基盤の構築に貢献したいと考えている。

## 謝辞

本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業(管理人:生研支援センター)によって実施された。

## 文献

- 1) Hosokawa, M. *et al.*: *Sci Rep* 7, 5199 (2017).
- 2) Chijiwa, R. *et al.*: *Microbiome* 8, 5 (2020).
- 3) Nishikawa, T. *et al.*: *bioRxiv* 2020.03.05.962001

# 耐酸性細菌を利用した有用金属リサイクルシステムの開発

## Development of a valuable metal recycling system using acid-tolerant bacteria

高野 力<sup>1</sup>・村山 晃一<sup>2</sup>・青柳 秀紀<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>筑波大学大学院生命環境科学研究科, <sup>2</sup>フタムラ化学(株)

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

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

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

環境親和性の高いリサイクル技術として、耐酸性細菌を用いた有用金属分離回収システムの開発を試みた。独自に開発した耐酸性細菌スクリーニング法である「pH変動培養法」を用いて、種々の環境試料から Co, Cu, Mn, Ni, Li のいずれかの金属を pH 1.5 の条件下で回収する耐酸性細菌を単離した。各金属を 100 mg/l ずつ含む模擬電子廃棄物浸出液 (pH 1.5) を対象として、各単離菌株を逐次添加し、回収を行う分離回収システムの開発を試みた。本システム全体での各金属の回収率は Co: 6.4%, Cu: 11.5%, Mn: 7.3%, Ni: 6.1%, Li: 4.5% となった。また、各菌株の金属回収量に対する、対象金属の割合 (金属選択性) は Co: 22.7%, Cu: 45.5%, Mn: 32.9%, Ni: 22.2%, Li: 22.3% であった。

### 1. 背景

5G 通信技術を基幹とし、Internet of Things を活用したスマート社会を実現するため、通信基盤や電気自動車等に使用される電子機器、部品の需要は急速に拡大している。これに加えて、SDGs に掲げられている“持続可能な社会実現”の観点からも、廃棄される機器、部品類のリサイクルの重要性が高まっている。電子廃棄物に含まれる有用金属の持続可能なリサイクル技術として、好酸性細菌を用いたバイオリッチングが注目されている。しかし、下流工程である浸出液からの金属回収は、化学的手法や、中性条件でのバイオソープションが主流であり、強酸性の浸出液を中和する工程が必要となる。

本研究では環境負荷やコストを低減するため、a) 中性条件で容易に培養、増殖が可能、b) 強酸性条件下で金属を回収できる、という特長を持つ耐酸性細菌を探索、活用することで、金属浸出液から直接金属を分離回収するリサイクルシステム (図 1) の開発を試みた。

### 2. 材料と方法

#### 2-1 耐酸性金属回収細菌の単離

pH 変動培養法<sup>1)</sup>を用いて、Co, Cu, Mn, Ni, Li のいずれかの金属イオンを含む培地中で、土壌、河川水等の環境試料を pH 7→1→7 の条件で変動培養し、得られたコロニーを単離した。中性条件で培養し、得られた菌

株を、各金属を 100 mg/l ずつ含む模擬電子廃棄物浸出液 (pH 1.5, 100 ml) に添加し、金属回収処理を行った。30 min ごとに上清を回収し、原子吸光分析により各金属の濃度を測定した。金属濃度の経時変化から各菌株の金属の回収能力と選択性を評価した。

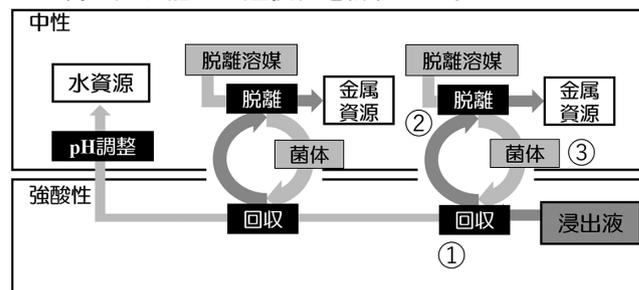


図 1. 本研究の目標とする金属リサイクルシステム。

①強酸性で金属を回収, ②中性で金属を脱離, ③菌体を金属回収に再利用。

#### 2-2 金属分離回収システムの開発

各菌株の金属回収量および選択性から、添加する順序と反応時間を決定した。100 ml の模擬電子廃棄物浸出液に単離菌株を 1 (g-dry cell/l) になるように懸濁し、金属を回収後、遠心分離により上清を回収した。回収した上清に次の菌株を添加し、金属を回収した。引き続き、同様な処理を 3 菌株について連続して実施した。それぞれの菌株を処理後の上清中の金属濃度を前述 (2-1) と同様に測定し、各菌株の金属回収能力と選択

性を評価した。

得られた結果を基に、各菌株の処理順序を入れ替え、金属回収能力と選択性が最大となる条件を検討した。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 耐酸性金属回収細菌の単離

pH 変動培養法により、環境試料から4種類の耐酸性細菌を単離培養した(表1)。各菌株は中性条件下で増殖可能であった。各菌株の金属の回収能力や選択性を評価した結果、Co, Cu, Ni, Li について有意な回収が見られた(表1)が、Mn 回収能力を持つ菌株は単離培養されなかった。そこで、中性条件下で Mn 回収能力を持つことが知られている菌種<sup>2)</sup>で、本研究において模擬浸出液から Mn を有意に回収した *Micrococcus luteus* JCM1464 株を Mn 回収細菌として用いた(表1, No. 4)。

以上の結果から、強酸性条件および金属存在下という2つの選択圧に耐性を持ち、バイオマス生産が容易な菌株を一度にスクリーニングする手段として、pH 変動培養法が有効であることが示された。本法を用いることで、新規な耐酸性金属回収細菌や、従来、耐酸性や金属回収能力が知られていなかった菌株の獲得が期待される。また、本法を他の選択圧に適用することで、様々な条件に対して耐性を有する多様な細菌を獲得できる可能性がある。

#### 3-2 金属分離回収システムの開発

金属回収能力および選択性を基に決定した条件で模擬金属浸出液の金属回収処理を行い、各金属ともに回収される結果が得られた(図2)。全体での各金属の回収率は Co: 6.4%, Cu: 11.5%, Mn: 7.3%, Ni: 6.1%, Li: 4.5% となった。そのうち、各金属を最も回収した菌株が、Co: 2.8%, Cu: 3.4%, Mn: 3.0%, Ni: 2.4%, Li: 1.9% を回収した。また、各菌株の金属回収量に対する、対象金属の割合は Co: 22.7%, Cu: 45.5%, Mn: 32.9%, Ni: 22.2%, Li: 22.3% であった。

金属選択性は菌株によって異なることから、金属回収メカニズムや、細胞膜表面の組成が異なる可能性が示唆された。

全体として、各金属を回収する傾向が示された。しかし、一部の菌株で回収量が負の値を記録した点や、試行回数ごとに回収量のばらつきが大きい点から、モデル系としての再現性に課題がある。反応系全体のスケールアップや、添加する菌体量の増加などによる精度改善を試みる。

また、各金属の回収量、選択性ともに中和沈殿や溶媒抽出を用いる化学的手法<sup>3)</sup>、中性条件下でのバイオソープション<sup>4)</sup>と比較して低い。今後は、さらに金属

回収能力や選択性の高い菌株の探索や育種を行うと共に、処理系の改良のため、遺伝子発現を基に各菌株の金属回収メカニズムの解明を試みる。

### 4. 結論

本研究では、耐酸性細菌を用いて強酸性条件下で金属を回収するという目標は達成できたが、金属選択性に課題が残った。本研究で提案する、耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属分離回収システムは、中和や溶媒抽出を伴う化学的手法、中性条件下でのバイオプロセスを完全に代替するものではない。しかし、浸出液中の金属濃度を低減することで、中和剤の使用量を低減する、特定の金属の存在割合を低下させる等により、金属リサイクルの環境負荷やコストの低減に貢献しうる。

表1. 使用した菌株および金属回収能力。

No.	Ident. strain	Ref. accession.	Cu	Co	Ni	Mn	Li
1	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	MG719526	3.28	-0.22	2.22	1.14	1.31
2	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki	MT605582.1	3.13	0.00	1.49	0.55	2.05
3	<i>Bacillus megaterium</i>	MN653271.1	<b>3.29</b>	1.05	<b>3.12</b>	1.43	0.53
4	<i>Micrococcus luteus</i> (Type strain)	AF542073.1	2.08	0.69	1.63	<b>2.89</b>	1.73
5	<i>Comamonas testosteroni</i>	MK426827.1	2.75	<b>1.26</b>	2.87	1.46	No data

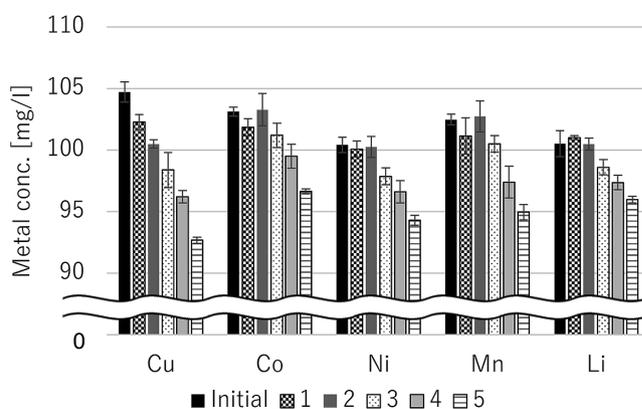


図2 金属分離回収システムによる各金属の回収量。

5 菌株を順次用いて金属回収処理を行うことで、各金属の回収が可能であることが示された。

### 文 献

- 1) 高野ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.161 (2017).
- 2) Martin, P. et al.: *Radiochimica Acta*, **106**, 217-228 (2017).
- 3) Xiao, Y. et al.: *Hydrometallurgy*, **140**, 128-134 (2013).
- 4) Oves, M. et al.: *Saudi Journal of Biological Sciences*, **20**, 121-129 (2013).

# CO<sub>2</sub> を再資源化する Gas-to-Lipids バイオプロセスの開発

奥田 源己<sup>1</sup>, 渡邊 研志<sup>1</sup>, 中瀬 玄德<sup>1</sup>, 廣谷 蘭<sup>1</sup>, 石垣 元務<sup>1</sup>,

中島田 豊<sup>1</sup>, 松浦 将吏<sup>2</sup>, 松山 恵介<sup>3</sup>, 秋 庸裕<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 広島大学大学院統合生命科学研究科, <sup>2</sup> 中国電力株式会社, <sup>3</sup> 長瀬産業株式会社

〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 広島大学大学院統合生命科学研究科

Tel: 082-424-7755 Fax: 082-424-7755

E-mail: aki@hiroshima-u.ac.jp

多様な有用脂質を生産するラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は健康食品、化粧品、化成品やバイオ燃料など幅広い分野における産業微生物として利用が期待される。本研究ではオーランチオキトリウム属の酢酸資化性に着目し、CO<sub>2</sub> から嫌氣的に酢酸を生成する酢酸生成菌と好気性のオーランチオキトリウム属を組み合わせた複合発酵系により、CO<sub>2</sub> 固定と有用脂質生産を同時に実現する Gas-to-Lipids バイオプロセスの確立を目的とした。オーランチオキトリウム属が酢酸を炭素源とした培地で増殖および脂質生産が可能な条件を決定した後、CO<sub>2</sub> を主たる炭素源とする条件で培養した酢酸生成菌アセトバクテリウム属の培養液にオーランチオキトリウム属を接種して培養したところ、顕著な増殖と脂肪酸生産が認められ、CO<sub>2</sub> ガスからの脂質生産に成功した。現在は脂質生産効率の向上をめざして、細胞増殖および脂質蓄積条件の最適化と連続培養系の構築を進めている。酢酸を介したオーランチオキトリウム属と酢酸生成菌の複合発酵系は、CO<sub>2</sub> のみならず、多様な未利用資源からバイオ燃料や化学品を生産するバイオプロセスへの応用が期待できる。

## 1. 背景

化石資源の枯渇や地球温暖化を背景に、農作物の非可食部分、食品製造残渣および下水汚泥などの未利用・廃棄物バイオマスを微生物の物質変換能力を活用してバイオ燃料や化学品を生産するバイオリファイナリーに関する研究が活発化している。我々も高度不飽和脂肪酸や抗酸化性カロテノイドを高度に蓄積する油糧微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウムを微生物触媒としたバイオマス転換に関する研究を展開してきた<sup>1)</sup>。近年、海洋に豊富に存在する未利用バイオマスである大型褐藻類の利用技術を開発する中で、オーランチオキトリウム属の特定の株が酢酸を含む有機酸を旺盛に資化することを見出した<sup>2)</sup>。オーランチオキトリウム属の有機酸に対する高い資化性を活かし、CO<sub>2</sub> を還元固定化して酢酸を遊離生成するホモ酢酸生成菌と組み合わせた二段階培養システム (Gas-to-Lipids バイオプロセス) を提案した (図 1)<sup>3)</sup>。このプロセスは火力発電所などから排出された CO<sub>2</sub> を

脂質生産原料としての再資源するカーボンリサイクルの技術として有望である。本研究では Gas-to-Lipids バイオプロセスの確立に向け、酢酸標品および酢酸生成菌が CO<sub>2</sub> を固定して生成した酢酸を炭素源としたオーランチオキトリウム属の培養諸条件の検討に取り組んだ。

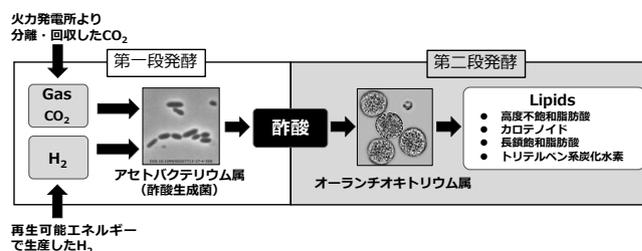


図 1. Gas-to-Lipids バイオプロセスによるガスからの有用脂質生産

## 2. 結果および考察

### (1) 酢酸資化特性の解析

トリグリセリド高生産性の *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株について 6 g/L ポリペプトン、2 g/L 酵母エキス、20 g/L 人工海水塩を含む培地に酢酸標品を炭素源として添加して培養条件を検討した。その結果、酢酸濃度 3-4% (v/v)、pH6.0-7.5 の範囲で特に顕著な増殖と脂肪酸生産が認められた。また、ポリペプトンおよび酵母エキスの代替窒素源として安価なコーンステープリカーが利用可能であることがわかった。

### (2) 二段階培養による CO<sub>2</sub> からの脂質生産

H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (60:40, v/v) 混合ガスを基質として酢酸生成菌 *Acetobacterium woodii* DSM1030 株を培養して得られた 29.3 g/L 酢酸と菌体を含む *A. woodii* 培養液に *A. limacinum* SR21 株を接種して培養したところ、顕著な細胞増殖 (7.4 g/L) および脂肪酸生成 (4.5 g/L) が認められた (図 2)。培養前の *A. woodii* 培養用培地に同等濃度の酢酸標品を添加した合成培地で *A. limacinum* SR21 株を培養した場合と比較すると、窒素源が *A. woodii* の培養で消費された分だけ細胞収量は 20%程度低かったが、細胞あたりの脂肪酸含有率は約 2 倍であった。この結果はオーランテオキトリウム属株の増殖や脂質生産を阻害する物質がアセトバクテリウム属株によって生産されておらず、今後の条件至適化による生産性の向上が期待できることを示している。

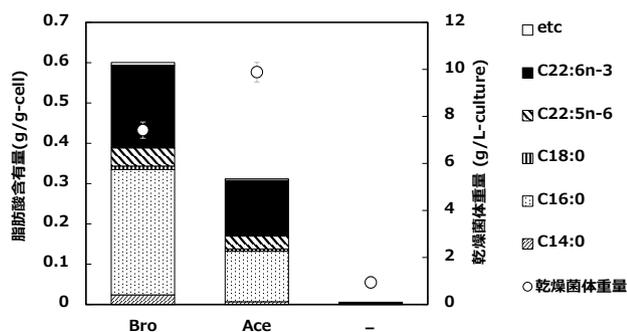


図 2. 二段階培養による CO<sub>2</sub> からの脂肪酸生産  
酢酸生成菌 *A. woodii* DSM1030 を CO<sub>2</sub> 存在下で培養後の回収液 (Bro、29.3 g/L 酢酸を含む)、*A. woodii* 培養用培地に 30 g/L 酢酸を添加した培地 (Ace) および、*A. woodii* 培養用培地 (-) にそれぞれ *A. limacinum* SR21 株を接種して、28°C、250rpm にて 48 時間培養した。

### (3) バイオリアクターにおける流加培養

3 L 容ジャーフェーマンターに 30 g/L の酢酸ナトリウムを含む培地を 1.5 L 入れ、アスタキサンチン高生

産性の *Aurantiochytrium* sp. RH-7A-7 株<sup>4)</sup> を接種した。培養開始 18 時間以降に 300 g/L 酢酸ナトリウム、200 g/L コーンステープリカー、ミネラルおよびビタミン類を含む流加培地を培養開始 18 時間以降に流速 6.25 mL/h で流加した結果、48 時間の培養時点での細胞収量は 16.9 g/L であった。現在、細胞増殖性のさらなる向上のため培地組成および酢酸流加条件の検討を進めている。

## 3. 今後の展望

酢酸を介した二段階発酵系により CO<sub>2</sub> ガスからの油脂生産を実現した Gas-to-Lipids バイオプロセスは、低炭素・循環型社会の実現に向けたカーボンリサイクルの技術の一つとして有望である。また、酢酸生成菌は草本類リグノセルロースが資化可能であるなど、極めて多様なバイオマスを原料化できるため、酢酸を介したオーランテオキトリウム属との複合発酵系によるバイオリファイナリー技術のさらに多角的な展開が期待される。

## 参考文献

- 1) Arafiles K. H. V., Iwasaka H., Eramoto Y., Okamura Y., Tajima T., Matsumura Y., Nakashimada Y., Aki T. Value-added lipid production from brown seaweed biomass by two-stage fermentation using acetic acid bacterium and thraustochytrid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 9207-9216 (2014)
- 2) Perez C. M. T., Watanabe K., Okamura Y., Nakashimada Y., Aki T. Metabolite profile analysis of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown on acetate-based medium for lipid fermentation. *J. Oleo Sci.*, **68**, 541-549 (2019)
- 3) 秋庸裕, 渡邊研志, 中島田豊, 松村幸彦, 岡村好子, 田島誉久, 廣谷蘭, 石垣元務, 黛新造, 吉田和広, 沢田健, 角田祐介. 特願 2017-250129 (2017).
- 4) Watanabe K., Arafiles K. H. V., Higashi R., Okamura Y., Tajima T., Matsumura Y., Nakashimada Y., Matsuyama K., Aki T. Isolation of high carotenoid-producing *Aurantiochytrium* sp. mutants and improvement of astaxanthin productivity using metabolic information. *J. Oleo Sci.*, **67**, 571-578 (2018)

# 新規の不純物吸着剤を用いたシンプルで効果的な 生物学的製品の精製方法

西八條 正克<sup>1,2\*</sup>・鴻池 史憲<sup>1,2</sup>・平山 翔太<sup>1,2</sup>

末岡 拓馬<sup>1,2</sup>・八浦 妃佐子<sup>1,2</sup>・水口 和信<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>株式会社カネカ, <sup>2</sup>次世代バイオ医薬品製造技術研究組合

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

Tel: 050-3133-7504

E-mail: Masakatsu.Nishihachijo@kaneka.co.jp

バイオ医薬品等の生物学的製品は、一般的に培養工程にて生産され、多段階のクロマトグラフィー工程により高純度化されるが、クロマトグラフィー工程前に細胞由来の不純物を効率良く除去することが精製工程全体のプロセスの強化には重要である。我々は、抗体医薬品製造プロセス開発において、新規の不純物吸着剤を用いたシンプルで効果的な細胞由来不純物の除去技術を開発した。本発表では、ウイルスベクターなど他の生物学的製品の製造プロセスへの本技術の適用検討について報告する。

## 1. 背景と目的

遺伝子組換えタンパク質やウイルス粒子などの生物学的製品は、医薬品や医薬品製造、診断などの分野で幅広く使用されており、多様化、複雑化している。生物学的製品は、一般的に動物細胞や微生物の培養により生産され、細胞分離や細胞破碎の工程（ハーベスト工程）を経て、クロマトグラフィーや膜分離などにより高純度精製される。精製工程の初期段階であるハーベスト工程で細胞由来の多様な不純物（宿主由来タンパク質（HCPs）や DNA、細胞残渣など）を効率良く除去することが精製工程全体のプロセスの強化には重要である。我々は、抗体医薬品の精製プロセス開発研究において、新規の不純物吸着剤を用いた HCPs や DNA 等の効果的な除去技術の開発に成功した。モノクローナル抗体を発現する CHO 細胞の清澄化培養上清を本吸着剤で処理した結果、抗体の収量を損なうことなく、HCPs を数分の 1、DNA を 1/100 以下に低減できることを確認した。さらに、本処理液を後段のプロテイン A 担体を用いたクロマトグラフィー工程に供することで、クロマト溶出液の品質向上に加え、カラムへの残留不純物量低減効果を確認した。本効果は、繰り返し使用における担体寿命の延長効果につながる。本研究では、

この新規不純物吸着剤の各種生物学的製品への適用評価を含め、生物学的製品全般の精製プロセス強化の可能性を調べた。

## 2. 材料と方法

### (1) 不純物吸着剤の吸着特性評価

各種培養液（IgG を産生 CHO 細胞、組み換えタンパク質を産生組換え大腸菌）や各種市販ポリペプチドを緩衝液に溶解したサンプルに不純物吸着剤（開発品のため詳細は非開示）を液量に対して 1~10%添加し、1 時間攪拌後、遠心分離した。この上清中のポリペプチドを定量（吸光度、ELISA、HPLC）し、目的物の回収率を評価した。また、不純物として、市販の核酸やエンドトキシンの試薬を用いて吸着能も評価した。

### (2) アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの清澄化

AAV ベクターを生産する HEK293 細胞培養液を界面活性剤処理し、細胞溶解後に核酸分解酵素を加え、一定時間処理して核酸分解後液を得た。核酸分解後液を①既存法（デプスフィルターろ過、タンジェンシャルフローフィルトレーション（TFF））と②新規開発法（吸着剤による処理とろ過）で清澄化処理し、各サンプルの AAV ベクターのゲノムタイター、不純物タンパク質

量、宿主由来 DNA 量を評価した。また、アフィニティークロマトグラフィーによる精製、形質導入効率も評価した。形質導入効率は精製 AAV ベクターを HEK293 細胞に感染させ、AAV ベクターから導入された蛍光タンパク質遺伝子の発現量を蛍光強度で評価した。

### 3. 結果と考察

#### (1) 不純物吸着剤の吸着特性評価

種々のポリペプチドに対する不純物吸着剤の吸着特性を調べた。インスリンやアルブミンなど 5 種類のポリペプチド溶液（培養液もしくは緩衝液に溶解された状態）に吸着剤を混合後、遠心上清中の各ポリペプチドの濃度を測定した結果、いずれも 90% 以上の高収率で回収でき、本吸着剤が広範なポリペプチドの精製に利用可能であることが確認できた。また、不純物として、各種核酸（プラスミド、リボソーム RNA）およびエンドトキシンの吸着除去を評価したところ、いずれも効果的に除去できることが分かった。エンドトキシンの除去特性は、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質の精製に、有効であると考えられた。

#### (2) AAV ベクターの清澄化

遺伝子治療における有望なウイルスベクターである AAV ベクターへの応用も評価した。AAV ベクターは、高価な核酸分解酵素を用いた DNA 断片化、デプスフィルターによる細胞溶解後残渣の除去、限外ろ過膜を用いたタンジェンシャルフローろ過 (TFF) による不純物除去などの煩雑な工程を経て、さらに多段階のクロマトグラフィーや超遠心により精製されるのが一般的である。まず、核酸分解酵素と不純物吸着剤処理の組み合わせについて評価したところ、不純物吸着剤処理を組み合わせることで、高価な核酸分解酵素を通常の 1/10 量に削減した条件でも十分に宿主由来 DNA を低減できることが分かった (図 1)。

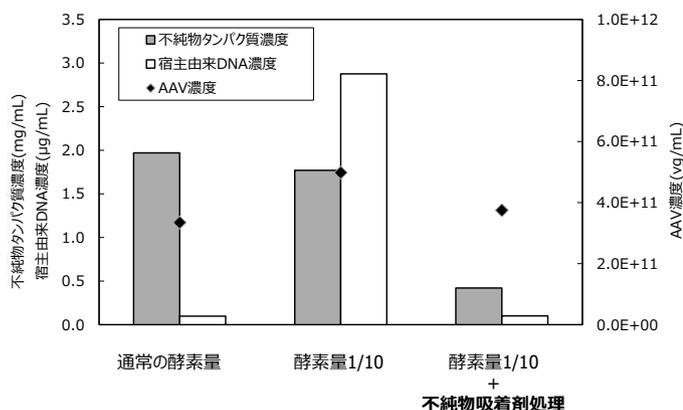


図 1 核酸分解酵素と不純物吸着剤処理による AAV ベクターの前処理

さらに、より実践的な手法として、不純物吸着剤の添加とろ過による清澄化工程を評価した結果、比較対照のデプスフィルターによる清澄化と TFF 工程から構成される従来法と比較して TFF 工程を省略した単純なプロセスへの改良が可能であることが示唆された。本新規プロセスでは、HCPs や DNA 等の不純物を効率的に除し、高収率で AAV ベクターのクロマトグラフィー前の精製が可能であった。また、この清澄化液を市販のアフィニティー担体で精製処理した結果、不純物吸着剤を用いた新規清澄化プロセスは既存法と同程度以上の精製収率および品質（形質導入効率）で AAV ベクターが得られることを確認した。以上のように、不純物吸着剤は、AAV ベクターの生物活性を損なわずに、工程を簡略化できることが確認できた。

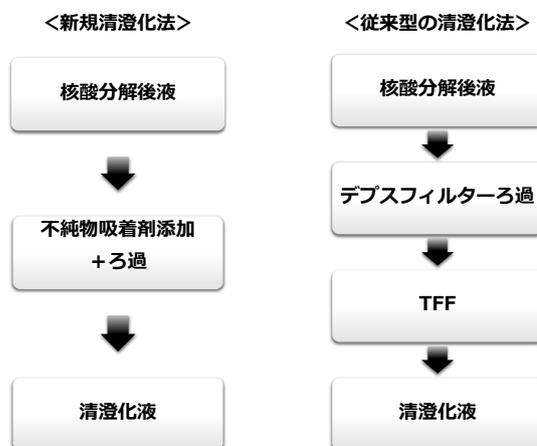


図 2 AAV ベクターの清澄化法の比較

### 4. まとめと今後の展望

新規不純物吸着剤は、組換えタンパク質医薬品からウイルスベクターなどの新しいモダリティを含め、幅広く生物学的製品の精製プロセスに適用できることが分かった。現在は、生物学的製剤の製造プロセスへの導入を目指し、抗体や AAV ベクターを対象として、本吸着剤の直接添加とフィルターろ過による、より実践的な使用方法の開発を進めている。今後、さらに幅広い生物学的製品への応用も進めていく予定である。また、本吸着剤のフィルターへの積層やカラムへの充填などによりデバイス化して製造プロセスに導入することも可能であると考えている。幅広いモダリティに対して、様々な形態でプロセスに導入し、生物学的製品の精製プロセス強化に貢献していく。

### 5. 謝辞

本研究は、AMED の課題番号 (JP20ae0101057 及び JP21ae0201001) の支援を受けた。

# NGS 解析に基づくゲノム育種で育成された大粒・短稈コシヒカリ型 新品種「コシヒカリ駿河 d60Gg」及び晩生・短稈コシヒカリ型 新品種「コシヒカリ駿河 d60Hd16」

富田 因則<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 静岡大学グリーン科学技術研究所

〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836 静岡大学理学部総合研究棟 403

Tel: 054-238-4929 Fax: 054-238-4929

E-mail: tomita.motonori@shizuoka.ac.jp

次世代シーケンス (NGS) 解析に基づくゲノム育種、すなわち、コシヒカリのゲノムに粒重を 34% 増加させる大粒遺伝子 *GW2*, 背丈を約 20 cm 抑制する短稈遺伝子 *d60*, 開花を 2 週間遅延させる晩生遺伝子 *Hd16* を 5~7 回の戻し交雑で移入・集積し、全ゲノム解析によりコシヒカリゲノムへの置換を証明した品種が、種苗法による審査を経て 2021 年 3 月に新品種として登録された。「コシヒカリ駿河 d60Gg」はコシヒカリより粒重が 31% 増加し、背が 20 cm 低くて気候危機下で倒伏しにくい我国初の大粒・短稈コシヒカリである。「コシヒカリ駿河 d60Hd16」はコシヒカリより 2 週間晩生で夏場の高温登熟障害を回避し、秋台風に対する倒伏抵抗性を兼ね備えた晩生・短稈コシヒカリである。

## はじめに

地球温暖化に伴って激化する気候変動の下、我国米作面積 1 位の品種コシヒカリには、多発する集中豪雨や大型台風による広域的な倒伏害はもとより、高温による登熟障害や病虫害が増大し、減収と品質低下を被っている。2018 年には西日本豪雨や伊勢湾台風に匹敵する台風 21 号をはじめ風速 54 m/s 以上の大型台風が過去最高の 7 個発生し、2019 年の台風 19 号は 2 例目の激甚・非常災害に指定されるなど、農林水産業に甚大な被害が相次いでいる。

著者は、その解決策として、コシヒカリを頑健・安定多収に改変するため、短稈、大粒、晩生に関する原因変異を NGS 解析によって解明するとともに、コシヒカリのゲノムに短稈、大粒、晩生遺伝子を統合した新品種を開発した(富田 2021)。

## 短稈遺伝子 *d60* の同定

コシヒカリの短稈突然変異系統「北陸 100 号」から背丈を 20 cm 短縮させる短稈遺伝子 *d60*(第 2 染色体 10.3 Mb に座乗)を発見するとともに、*d60* と配偶子致死遺伝子 *gal*(第 5 染色体 7.0 Mb に座乗)が補足的に作用して配偶子致死を誘発するという珍しい遺伝現象を

見出した(Tomita & Tanisaka, 2019)。この補足配偶子致死は、花粉では第一分裂後に栄養核が消失し、生殖核の第二分裂後に致死となり、コシヒカリ(*D60D60Gal/Gal*) × 北陸 100 号(*d60d60gal/gal*) の交雑  $F_2$  では、6 可稔長稈型(*4D60D60+2D60d60Gal/Gal*):2 部分不稔型(*D60d60Gal/gal*):1 短稈型(*d60d60Gal/gal*) に分離する。*gal* は日印品種を問わず普遍的に存在するため、*d60* は *gal* から配偶子致死作用のない *Gal* への同時変異なくして、自然界では得られなかった貴重な短稈遺伝子だった(Tomita & Tanaka, 2019)。

## 大粒遺伝子 *GW2* の同定と *d60* との統合

大粒の遺伝子源として、岐阜県の在来品種「いのちの壱」の大粒形質に着目し、コシヒカリへの戻し交雑移入を繰り返す過程で、大粒について遺伝学的に解析した。コシヒカリ × いのちの壱の  $F_2$  で分離し、次代  $F_3$  で固定した大粒型個体を一回親とし、コシヒカリを反復親とする 5 回の戻し交雑を行う過程で、 $BC_nF_2$  世代で大粒の遺伝を分析し、分離した大粒型個体を花粉親にしてコシヒカリへの戻し交雑を行った。 $BC_3F_2$  では、粒大がコシヒカリより大きい 28.1~30.0  $mm^3$  の大粒型個体、コシヒカリと同程度で 21.6~24.0  $mm^3$  の小粒型個体、その中間型個体が、1 遺伝子の理論比 1 大粒型:2 中間

型:1小粒型に分離し,大粒は1遺伝子支配であった.

続いて,大粒遺伝子をマッピングするために,いのちの畝×日本晴の交雑F<sub>2</sub>1,328個体で分離した小粒ホモ型128個体を用いてイネの12本の染色体を網羅するSSRマーカーを用いて大粒遺伝子との連鎖解析を行った.その結果,大粒遺伝子は第2染色体7.6~8.2 Mbに位置するDNAマーカーと強く連鎖していた.さらに,大粒遺伝子を移入した同質遺伝子系統の全ゲノム解析の結果,大粒遺伝子は第2染色体8.1 Mb地点のユビキチンリガーゼの1塩基欠損型の大粒遺伝子GW2と同座であった(Tomita et al., 2019).

コシヒカリにGW2を移入した品種「コシヒカリ駿河Gg」は,粒重が34%増(千粒重29.6 g)で食味値も新潟コシヒカリの81.0に匹敵する80.0を示す我国初の大粒コシヒカリであり,米産コシヒカリと優位に差別化することができる.さらに,大粒で短稈のコシヒカリを開発するため,コシヒカリd60(Tomita & Ishimoto, 2019)×いのちの畝のF<sub>2</sub>で分離した大粒短稈型GW2d60ホモ型個体にコシヒカリを1回戻し交雑し,さらに,BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>で分離したGW2d60ホモ型個体にコシヒカリd60を反復親として4回戻し交雑した.育成されたGW2とd60を併せ持つ品種「コシヒカリ駿河d60Gg」は,粒重が31%増(千粒重28.8 g)で24 cm短稈化し,大粒で穂が重くても台風で倒れにくい(図1).

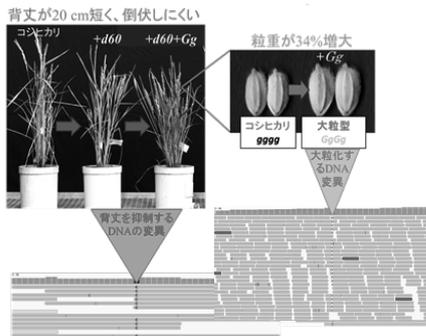


図1. 倒れにくく大粒化した「コシヒカリ駿河d60Gg」

## 晩生遺伝子Hd16の同定とd60との統合

真夏の登熟を避けて品質・収量を確保する遺伝子源として,伊勢神宮の神田で発見された変異種「イセヒカリ」の晩生形質に着目した.コシヒカリ×イセヒカリのF<sub>2</sub>で分離した最晩生個体を1回親.コシヒカリを反復親とする戻し交雑を行い,各BC<sub>n</sub>F<sub>2</sub>で出穂期の遺伝を分析しつつ,最晩生の分離個体を花粉親にしてコシヒカリへの戻し交雑を行った.BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>において,コシヒカリと同等の早生型個体,中生型個体,イセヒカリより7日晩生の晩生型個体が1早生:2中生:1晩生に分離した.従って,イセヒカリに由来し,コシヒカリの遺伝的背景で14日出穂遅延させる1個の晩生遺伝子が検出された.以後,BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>~BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>で分離した晩生ホモ型を花粉親にしてコシヒカリに戻し交雑し,晩生同質遺伝子系統(BC<sub>5</sub>F<sub>2</sub>)を育成した.その全ゲノム解析の結果,第3染色体33.0~34.3 Mb領域にSNPsが集中する以外はコシヒカリに置換されていた.この内,コー

ディング領域でコシヒカリとの変異は晩生遺伝子Hd16の第9エキソンの1塩基置換のみであった(Tomita et al., 2021).Hd16を移入した品種「コシヒカリ駿河Hd16」は,コシヒカリより14日晩生で高温登熟を回避できる(図2).さらに,「コシヒカリ駿河d60Hd16」は猛暑回避に加えて,d60によって20 cm短稈化し,秋台風に対する耐倒伏性が強化された.

以上のように,気候危機下で生産が安定・多収化し,食味・品質は新潟コシヒカリと遜色のないスーパーコシヒカリを開発した.本年度は愛媛県農林水産研究所他3県で生産力検定試験が実施されている.

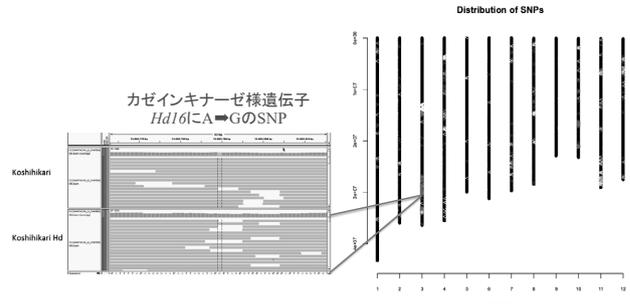


図2. 第3染色体にHd16が移入されて2週間晩生化した「コシヒカリ駿河Hd16」のゲノム

## 文 献

1. 富田因則 NGS解析に基づく気候危機に強い超多収・大粒・早晩生コシヒカリの育種. 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2021: 36 (2021).
2. Tomita, M., Ishimoto, K. Rice novel semidwarfing gene *d60* can be as effective as Green revolution gene *sd1*. *Plants* **8**: 464 (2019).
3. 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).
4. 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).
5. Tomita, M., Tokuyama, R., Matsumoto, S., Ishii, K. Whole genome sequencing revealed a late-maturing isogenic rice Koshihikari integrated with *Hd16* gene derived from an Ise Shrine mutant. *Int. J. Genomics* **2021**: 4565977 (2021)
6. 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).

品種: 育成者 富田因則, 農林水産植物 *Oryza sativa* L. 第28385号 コシヒカリ駿河Hd16, 第28386号 コシヒカリ駿河d60Hd16. 第28387号 コシヒカリ駿河Gg, 第28388号 コシヒカリ駿河d60Gg (2021)

# 細胞外小胞のエンジニアリングによる タンパク質ソーティングの制御と薬物送達への応用

曾宮 正晴\*・黒田 俊一

阪大・産研

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1 大阪大学産業科学研究所

Tel: 06-6879-8462

E-mail: msomiya@sanken.osaka-u.ac.jp

細胞外小胞 (EV) を薬物送達システム (DDS) として応用するためには、EV 内に任意の積荷タンパク質を内封する事が必要不可欠である。本研究ではヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293T を用い、EV に局在する膜タンパク質であるテトラスパニンに、ラパマイシンによってヘテロ二量体化するタンパク質ドメインを融合する事で、ラパマイシン依存的に任意の積荷タンパク質を EV 内にソーティングし、細胞外へ分泌させることに成功した。さらに EV にウイルス由来膜融合タンパク質を提示する事で、EV が細胞内に取り込まれた後の細胞膜との融合を促進し、積荷タンパク質をレシピエント細胞内で機能させることが可能となった。本研究の知見は、EV の DDS 応用における基盤的な技術となる。

## 1. はじめに

細胞外小胞 (extracellular vesicle, EV) は、あらゆる細胞から分泌されるサブミクロンサイズの膜小胞である。EV には分泌細胞 (ドナー細胞) 由来のタンパク質や核酸が含まれており、これらの内包物が他の細胞 (レシピエント細胞) に取り込まれることで、細胞間の物質・情報伝達に寄与していると考えられている。このような背景の元、EV を薬物送達システム (drug delivery system, DDS) として応用する研究が盛んに行われている<sup>1)</sup>。EV を DDS に利用するためには、任意の治療用分子を EV 内に内包させる事が必要である。これまでに種々の EV 内への薬物内封法が報告されているが、いずれも効率が低く、実用的な方法は存在しない。

そこで本研究では、EV 内に任意のタンパク質をソーティングさせ、細胞外に分泌させる方法を開発することを目指した。EV 局在膜タンパク質の一つであるテトラスパニン CD81 の C 末端に、ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体化する FK506-binding protein (FKBP) を融合し、EV に内包する積荷タンパク質には FKBP の結合相手である FKBP-rapamycin binding protein (FRB) を融合して発現させることで、ラパマイシンの存在下で CD81-FKBP と FRB 融合タンパク質が結合し、

EV 内に任意の積荷タンパク質がソーティングされて細胞外に分泌されることを実証した (図 1)。さらに EV がレシピエント細胞に取り込まれて積荷タンパク質を細胞質へ放出する効率を、レポーターアッセイによって評価した。

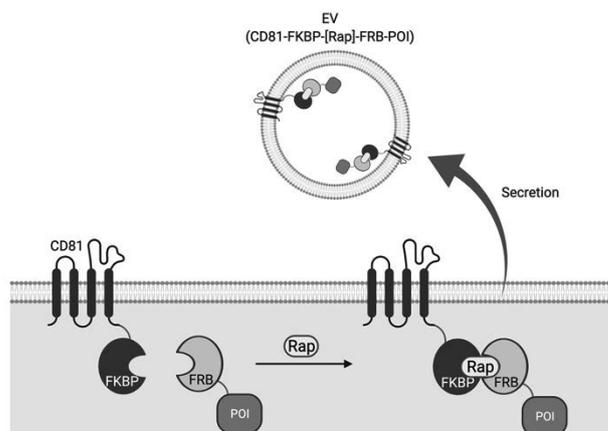


図 1. ラパマイシンによる積荷タンパク質 (POI) の EV へのソーティング (Created with BioRender.com)

## 2. 方法

HEK293T 細胞(ドナー細胞)に、FKBP 融合 CD81 および FRB 融合タンパク質(protein of interest, POI)を発現するプラスミドを導入した。POI として、テトラサイクリン転写活性化因子(tetracycline transactivator, tTA)、あるいは Cre recombinase を使用した。遺伝子導入から数日後、培養上清を回収し、PEG 沈殿によって EV を濃縮した。ラパマイシン添加による EV 内への POI のソーティング効率は、HiBiT タグで標識した POI の PEG 沈殿画分の量を定量する事で評価した。

EV を、各 POI に対応したレポーター遺伝子を発現するレシピエント細胞(HEK293T)に添加し、24 時間後にレポーター遺伝子の発現を評価した。POI が tTA の場合には TRE プロモーター下流のレポーター遺伝子発現、Cre recombinase の場合には LoxP 配列の切断によるレポーター遺伝子発現の変化を測定した<sup>2)</sup>。

## 3. 結果と考察

HEK293T 細胞に CD81-FKBP および FRB-Cre-HiBiT を発現させ、1~100 nM のラパマイシン存在化で培養後、培養上清を回収して PEG 沈殿画分の HiBiT 量を定量した結果、ラパマイシンの添加によって、濃度依存的に HiBiT 量が増加した(図 2)。この結果より、想定通りラパマイシン依存的に EV 内へ POI をソーティングし、細胞外に分泌可能な事が示された。

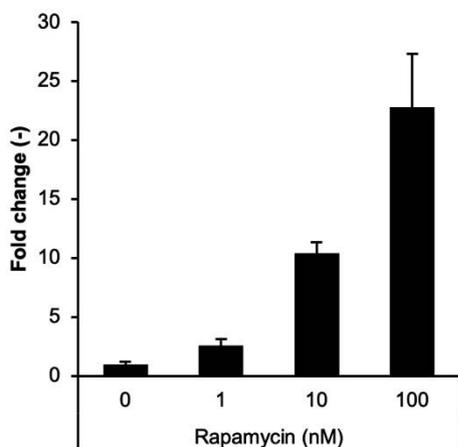


図 2. ラパマイシン依存的な POI (Cre-HiBiT) の EV 内へのソーティング

次に、POI を含む EV をレシピエント細胞に添加してレポーター遺伝子の発現量を指標に POI の送達効率を評価した。しかしながら、当初は POI を含む EV をレシピエント細胞に添加してもレポーター遺伝子の発現

上昇は見られず、EV は細胞内に取り込まれるものの、エンドソーム脱出が不十分であり、細胞質へ POI を送達できていない事が示唆された。

そこでドナー細胞に、酸性 pH 依存性の膜融合活性を持つ水疱性口内炎ウイルスのエンベロープタンパク質(VSV-G)を共発現させ、EV の膜融合活性およびエンドソーム脱出効率の増強を図った。その結果、VSV-G およびラパマイシンの存在下では、EV による POI のレシピエント細胞への送達認められ、tTA を POI に使用した場合、レシピエント細胞における TRE プロモーター下流のルシフェラーゼ遺伝子の発現が飛躍的に増加した(図 3)。また同様に、POI として Cre を用いた場合にもレシピエント細胞における LoxP 配列の組換えが確認できた事から、本方法は様々なタンパク質に適用できると考えられる。

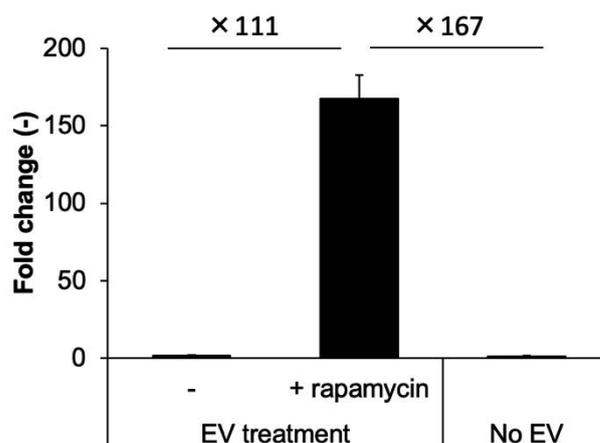


図 3. VSV-G 提示 EV が送達する tTA によるレシピエント細胞のレポーター遺伝子の発現変化

## 4. 今後の展望

本研究で確立した EV 内へのタンパク質内封および送達技術を、小動物を用いた in vivo 試験において評価する必要がある。また、VSV-G は免疫原性が高いタンパク質であり、in vivo での頻回投与は望ましくないと考えられるため、VSV-G に代わる膜融合メカニズムの付与が必要である。これらの課題をクリアする事で、EV が様々な治療用タンパク質を送達する DDS として利用可能になると考えられる。

## 文 献

- 1) Somiya, M. *et al.*: *AIMS Bioeng.* **4**, 73-92 (2016)
- 2) Somiya, M. and Kuroda, S: *bioRxiv*, 2021. 02. 16. 431359 (2021)

# 人工転写活性化因子/アプタマー複合体を用いた 特異的 RNA を検出する遺伝子発現システム

鄭 飛揚<sup>1</sup>・河邊 佳典<sup>2</sup>・上平 正道<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院 システム生命科学府, <sup>2</sup>九州大学大学院 工学研究院

〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地 九州大学大学院工学研究院 化学工学部門

Tel: 092-802-2743 Fax: 092-802-2793

\*E-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

本研究では、外的要因や細胞内変化などを検出し、遺伝子発現の活性化を誘導することができる細胞内 RNA センサーの構築を目的とした。RNA アプタマーとその認識ドメインおよび人工転写活性化因子に基づいて標的 RNA をスイッチとした人工遺伝子転写活性化システムの構築を行った。標的 RNA が含まれる細胞においてのみ、遺伝子発現の活性化を検出することが可能であった。本研究で開発したシステムは、ターゲットとなる RNA を迅速かつ簡便に検出できるとともに、外来遺伝子をコンディショナルに高発現させるためのツールとして利用できる。

我々は、これまで合成生物学的アプローチに基づいた人工遺伝子回路の開発に取り組んでおり、熱ショックプロモーターとポジティブフィードバック遺伝子回路を用いた温熱誘導型高肝機能発現細胞株の開発<sup>1)</sup>、低酸素応答プロモーターを用いた低酸素応答血管新生誘導組織構築技術の開発<sup>2)</sup>、p53 遺伝子活性を検出して DNA 損傷を検出するシステムの開発<sup>3)</sup>などを報告してきた。より複雑な人工遺伝子回路を設計できれば、細胞自身が自律的に遺伝子発現量を調節する 高度に制御された遺伝子発現システムの構築が可能となる。

本研究では、特定の RNA を検出可能なシステムの開発を目的とした。RNA アプタマーおよび、それに特異的に結合することができるバクテリオファージ由来の

コートタンパク質を用いて、コートタンパク質と転写活性化因子を融合した融合タンパク質および RNA アプタマーに基づく標的 RNA 誘導型の遺伝子発現システムの構築を行った。このシステムでは、ターゲット RNA をスイッチとして目的遺伝子発現を誘導できる。ES/iPS 細胞からの分化誘導した細胞のスクリーニングや、がん細胞またはウイルス感染細胞の同定・選抜、組換えタンパク質生産への応用が期待できる。

## RNA 検出システムの構築

バクテリオファージ由来のコートタンパク質は、そのファージゲノムにあるステムループ RNA アプタマーを認識し、結合することができる。MS2 コートタンパ

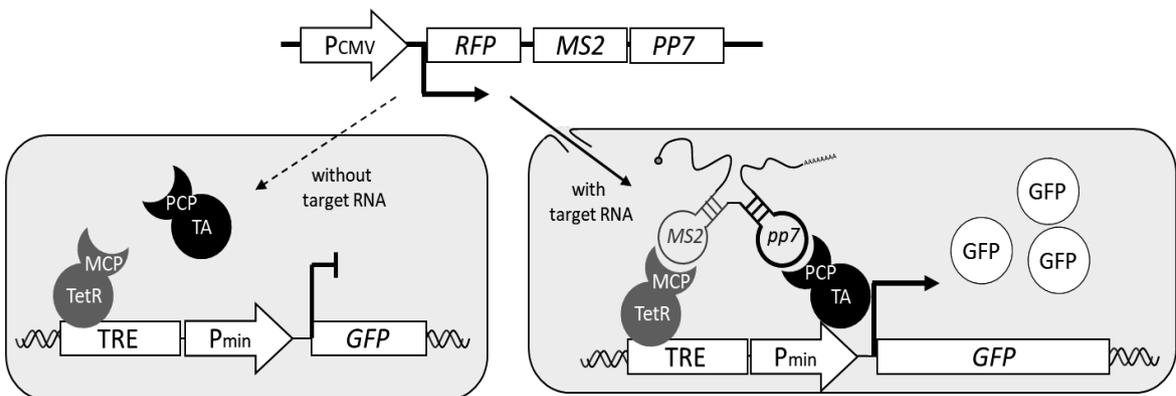


図 1. 人工転写活性化因子/RNA アプタマーを用いた RNA 検出システムの概略図

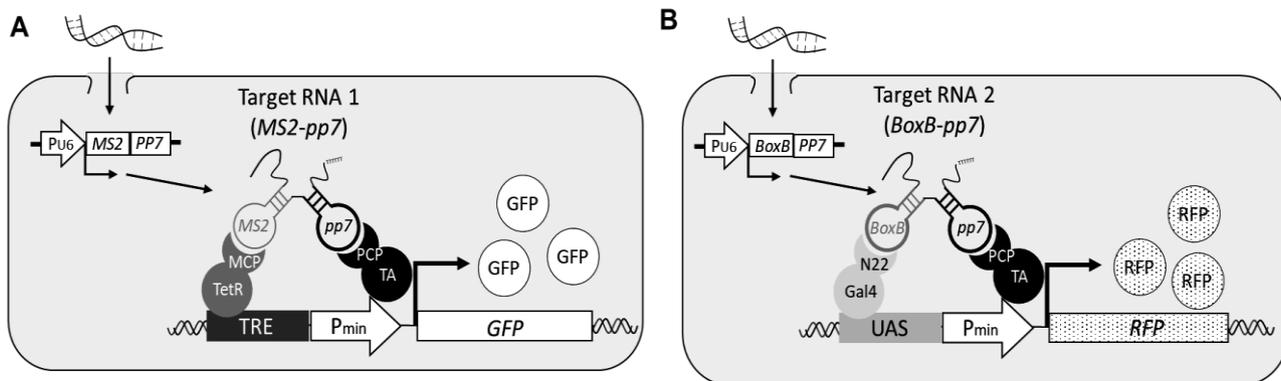


図 2. 複数の標的 RNA 検出のための概略図

(A) *MS2-pp7* RNA アプタマーによる GFP 発現 (B) *BoxB-pp7* RNA アプタマーによる RFP 発現

ク質 (MCP) と PP7 コートタンパク質 (PCP) を DNA 結合ドメイン (TetR) または転写活性化ドメイン (TA) と融合タンパク質とすると、二種類のアプタマー *MS2-pp7* からなる RNA を、各コートタンパク質が同時に認識し、TetR-PCP/*pp7-MS2/MCP-TA* リボ核酸・タンパク質 (RNP) 複合体が形成され、TRE プロモーターの活性化を誘導すると期待できる。一方、RNA アプタマーがない細胞では、RNP 複合体の形成ができず、TRE プロモーターが活性化されない。これにより、*MS2-pp7* を有する RNA の有無に依存した転写活性が誘導できると考えた (図 1)。

はじめに、本コンセプトが正しく機能するか評価するため、TRE-GFP レポート遺伝子発現ベクターを導入した応答細胞 (CHO/TRE-GFP) を作製した。融合タンパク質 (MCP-TA および PCP-tetR) 発現ベクターとともに U6 プロモーター制御下で発現可能な RNA アプタマー発現ベクターを GFP 応答細胞に導入したところ、RNA アプタマー発現ベクターが融合タンパク質発現ベクターとともに遺伝子導入された条件でのみ、GFP 発現が検出できた。これにより、本システムが特異的 RNA 検出へ応用できることがわかった。

## 複数の RNA 検出の実証

複数の RNA を同時に検出することができれば、細胞の環境や状態をより正確に判断するシステムの構築が可能である。複数の RNA 検出を行うために、DNA 結合ドメインである Gal4 を、ファージコートタンパク質 N22 と融合させた Gal4-N22 タンパク質遺伝子発現ベクターおよび *BoxB-pp7* 含有 RNA アプタマー発現ベクターを作製した。*MS2-pp7* 含有 RNA アプタマーが存在する場合、tetR ドメインの結合部位をもつ TRE プロモーターが活性化し、GFP 発現が誘導される。一方、*BoxB-pp7* 含有 RNA アプタマーの場合、Gal4 ドメインが UAS プロモーターに結合することで、RFP 発現が誘導される (図 2)。このシステムの検証のために、UAS-RFP 発現ユニットを CHO/TRE-GFP 細胞ゲノムに組込んだ遺伝子組換

え CHO 細胞 (CHO/TRE-GFP/UAS-RFP) を樹立した。この細胞に対して RNP 形成に必要なとされる各プラスミドベクターを遺伝子導入した。導入 48 時間後に蛍光を観察したところ、RNA アプタマーである *MS2-pp7* または *BoxB-pp7* を遺伝子導入した条件の細胞において、緑色または赤色蛍光をそれぞれ観察できた。*MS2-pp7* と *BoxB-pp7* 同時に遺伝子導入した細胞では、GFP と RFP をともに検出できた。また、標的 RNA がいない場合、蛍光は観察されなかった。これにより、本研究で開発した RNA 検出システムではクロストークなしに異なる RNA を検出できることがわかった。

## おわりに

本研究は、細胞内の環境変化を検出し、遺伝子発現の活性化を誘導することができる汎用型細胞内 RNA センサーの構築を目指している。コートタンパク質と転写活性化因子の融合タンパク質は、ターゲット RNA が存在する場合にのみ遺伝子発現を誘導し、状態の異なる細胞を区別することができる。これまでに細胞内の miRNA を検出するシステムはあったが、複雑なシグナル変換を必要とし、汎用的な技術となっていない。最近、細胞型を検出し、がん治療の目的を達成するように設計された人工遺伝子回路の開発が報告された<sup>4)</sup>。本研究で開発したシステムは、分化誘導細胞の同定や選抜ならびに組織構築、がん細胞特異的アポトーシスの誘導などの基礎的研究だけでなく、ウイルス感染の検出や生体バイオリアクターによる組換えタンパク質生産のツールとして応用可能である。

## 文 献

- 1) Kitano, H. *et al.*: *Cytotechnology*, **73**, 353 (2021).
- 2) Masumoto, S. *et al.*: *J Biosci. Bioeng.*, **132**, in press (2021).
- 3) Ono, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 463 (2015).
- 4) Huang, H. *et al.*: *Nat. Commun.*, **10**, 4801 (2019).

# 未培養腸内細菌の 1 細胞ロングリードシーケンスによる 完全長ゲノムの獲得

細川正人<sup>1,2,3\*</sup>・小川雅人<sup>3,4</sup>・西川洋平<sup>3,4</sup>・佐伯達也<sup>2</sup>・依田卓也<sup>2</sup>

・有川浩司<sup>2</sup>・竹山春子<sup>1,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>早大院・先進理工, <sup>2</sup>bitBiome, <sup>3</sup>早大・ナノライフ創新研, <sup>4</sup>産総研/早大・CBB-D-OIL, <sup>5</sup>早大・生命動態研

〒162-0041 東京都新宿区早稲田鶴巻町 513 120-5 号館 115 室

Tel: 03-5272-1284 Fax: 03-5369-7326

E-mail: masahosokawa@aoni.waseda.jp

環境中に生息する多種多様な難培養性細菌の機能理解に向けて、メタゲノム・シングルセル(1細胞)ゲノム解析などのゲノム解析法が開発されてきた。一方、個々の未培養細菌株における機能比較には、完全長ゲノムの獲得が必要である。本研究では、1細胞ロングリードシーケンスを用いて未培養細菌の完全ゲノムを構築するゲノムアセンブリパイプラインを構築した。本手法を応用し、ヒト糞便中の未培養腸内細菌から完全長ゲノム配列を複数獲得し、宿主毎に異なる株特異的な遺伝子配列の特定が可能であることを実証した。

## 1. はじめに

環境細菌のメタゲノム解析では、未培養細菌群集から DNA を抽出して解析を行うが、断片化された遺伝子配列を細菌株レベルまで細かく分別し、個々の機能までを推定することは困難である。多種多様な未培養細菌群の全貌を明らかにする理想的な方法は、1細胞(シングルセル)からゲノム配列を解読する「1細胞ゲノミクス」を高精度・ハイスループットに行うことである。

通常の1細胞ゲノム解析法では、1細胞からシーケンス可能な DNA 量を得るために全ゲノム増幅を行う必要がある。この過程で、コンタミネーション DNA の増幅、過大な増幅バイアス、多量のキメラ DNA が発生する。このため、1細胞シーケンスでは、全データの大部分が非ターゲット増幅物に由来し、対象細菌ゲノムの一部しか解読できないことが頻発する。

こうした1細胞ゲノム解析での問題を打破するために、当研究グループは、マイクロ流体技術を用いて作製したドロップレットを用いて、1細胞ゲノムを高精度に増幅する手法を開発してきた<sup>1),2),3)</sup>。さらに、独自のシーケンスデータ解析パイプラインを開発し、細菌1細胞から高品質なドラフトゲノム(95%以上の完全性、5%以下のコンタミ率)を得ることができるショートリードシーケンスの解析ワークフローを報告してきた<sup>4)</sup>。これまでの wet/dry 両面の開発により、配列エラーを軽減したドラフトゲノム配列を獲得できるように

なった。しかし、1本の完全長ゲノムへと再構成することはなお困難であり、断片化した数十本の塩基配列へ集約することが限界であった。一方で、最近ではロングリードシーケンサーを環境細菌メタゲノム解析に用いることで環境細菌の完全長ゲノムを獲得できることが報告されているが、1細胞ゲノム(SAG)では有効な解析手順が確立されておらず実施報告がない。

そこで、本研究では、ロングリードシーケンサーを用いて1細胞増幅ゲノムから細菌の完全ゲノムを構築するゲノムアセンブリパイプラインを構築した。

## 2. 実験方法

本手法は、1細胞シーケンス時に行われる1細胞ゲノム増幅に起因する「ドラフトゲノム中のコンティグ配列の短鎖断片化」を解消するため、独自のデータ処理によって長鎖のゲノム配列を構築するよう設計した。本処理工程では、はじめに、1細胞ロングリードシーケンス(SAG-LR)のアセンブリによって得られるドラフトゲノムに対して、シーケンスリードのマッピングを行うことで過度な読み取り部を特定する。次に、余剰なシーケンスリードを除去して、再アセンブルを行う。この操作を繰り返すことで、読み取り深度を平坦化させ、広範なゲノム領域をカバーしたドラフトゲノムを構築する。最後に、同一SAGから得たショートリードシーケンスデータを用いて配列補正を行う。

1細胞ゲノム増幅物は、当研究室で開発した SAG-gel 法<sup>1)</sup>を用いて、大腸菌およびヒト糞便中腸内細菌から SAG を収集し、ロングリードシーケンス (Oxford Nanopore Technologies) とショートリードシーケンス (Illumina) を併用してデータを収集した。

### 3. 結果および考察

はじめに、大腸菌 SAG をモデルとして、既存のアセンブラにより構築したドラフトゲノムの完全性を評価した結果、ゲノム完全性は最大 87.5% であり、一部の配列が欠落していることが確認された。欠落した配列は SAG-LR 中の相対読み取り深度が浅い領域に集中していることが示されたため (図 1)、アセンブリに供する SAG-LR の前処理で完全性を改善しようと考えた。

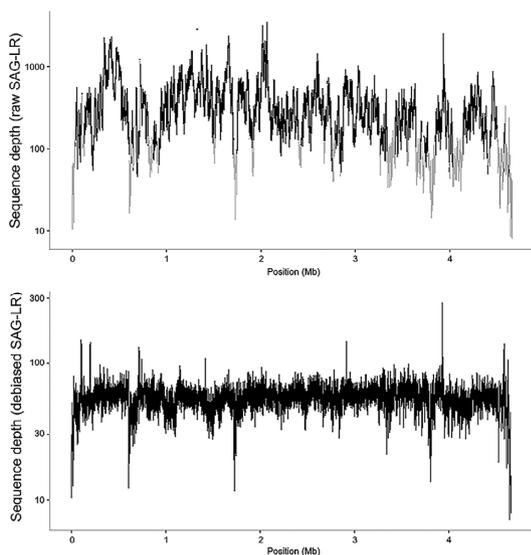


図 1 バイアス低減処理によるゲノム完全性の向上  
バイアス低減処理を行った前後の SAG-LR の大腸菌ゲノム領域における読み取り深度を表す。灰線部はドラフトゲノムに含まれない配列領域。(上) バイアス処理前、(下) バイアス処理後

開発したパイプラインを用いた場合、バイアス処理前の大腸菌 SAG-LR からは 39 本の配列断片、ゲノム完全性 81.7% のドラフトゲノムが得られた。バイアス低減処理を 1 度行くと、13 本の配列断片、ゲノム完全性 99.3% のドラフトゲノムが得られ品質改善が確認され

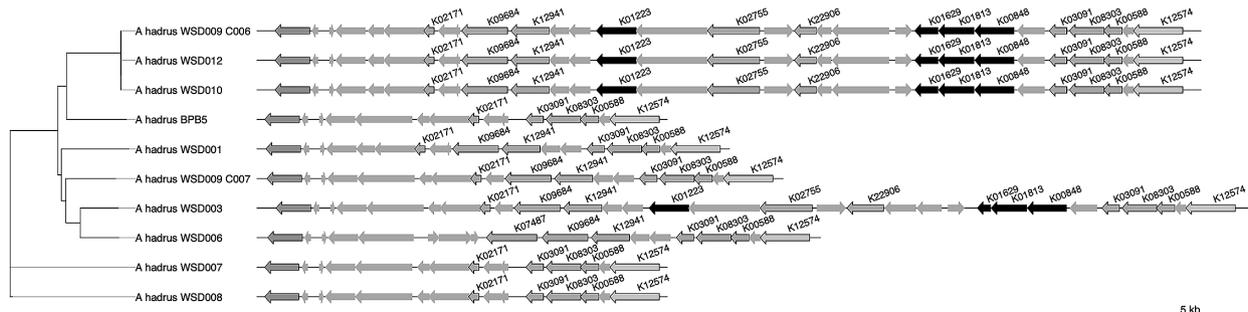


図 2 *A. hadrus* 株における糖代謝モジュールの保有性 黒色矢印が糖代謝機能遺伝子を示す。

た。さらに繰り返しバイアス低減処理を行うことでドラフトゲノムの配列断片数は最終的に 2 本にまで減少し、4.66 Mbp に達する 1 本の完全長大腸菌ゲノム配列が獲得された。もう 1 本のコンティグは、大腸菌が有する F プラスミドであった。以上の結果から、開発したパイプラインを用いて、SAG-LR からプラスミドを含む細菌完全長ゲノムを構築できることが示された。

次に、ヒト糞便中の腸内細菌に本手法を応用した。腸内細菌 *Anaerostipes hadrus*, *Ruminococcus gnavus*, *Agathobacter rectalis* について 3-8 人の検体から完全・準完全長ゲノム配列を獲得した。*A. hadrus* のゲノムの構造変異を解析した結果、各株のゲノム全域にわたって主にプロファージと見られる株特異的配列領域が確認された。獲得した 9 株の *A. hadrus* ゲノムと既知の 52 株の *A. hadrus* ゲノムを用いて株間系統解析を行った結果、コア遺伝子の配列よりも機能遺伝子の保有に強い地域特異性が確認された。特に、糖代謝系や薬剤耐性遺伝子などの保有性に株間の相違が見られ、同一細菌種においても異なる機能を有することが示唆された (図 2)。これらの *A. hadrus* 株に見られるゲノム構造は宿主毎に異なる傾向を有しており、細菌亜株の判定、遺伝子伝播関係の推定などに有効であることが示唆された。

### 4. 今後の展望

当研究グループで開発した 1 細胞ゲノム解析技術 SAG-gel と本研究で開発した 1 細胞ロングリードシーケンスパイプラインを併用することで、未培養腸内細菌の完全長ゲノム獲得が可能であることを実証した。本手法は、他の環境細菌の解析にも適用可能であり、高精度な細菌ゲノム情報の高速な蓄積、さらなる詳細な解析への貢献が期待される。

### 参考文献

- [1] Chijiwa R. *et al.*, *Microbiome*, **8**, 1-14, (2020)
- [2] Hosokawa M. *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 1-11, (2017)
- [3] Nishikawa Y. *et al.*, *PLoS One*, **10**, e0138733, (2015)
- [4] Kogawa M. *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 1-11, (2018)

# PD-SELEX 法を用いた直交性 RNA-RBP ペアの発見

福永 圭佑<sup>1</sup>・横林 洋平<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 沖縄科学技術大学院大学 (OIST) 核酸化学・工学ユニット

〒904-0495 沖縄県国頭郡恩納村字谷茶 1919-1

E-mail: yohei.yokobayashi@oist.jp

ファージに提示させた RNA 結合タンパク質 (RBP) 変異体ライブラリーと RNA ライブラリーを試験管内で共進化させる新たな手法: PD-SELEX 法を開発した。ライブラリー vs. ライブラリーのセレクションを通して強い結合親和性 (解離定数 = 約 7 pM)・高い特異性 (S/N 比 = 4000 以上) を持つ新規 RNA-RBP ペア (CS1 RNA - LS4、および CS2 RNA - LS12) を同定することに成功した。

## 1. はじめに

ファージや古細菌由来の RNA-RNA 結合タンパク質 (RBP) ペア (例: MS2 RNA - MS2CP, Box C/D Kink-turn RNA - L7Ae) は目的の RNA とタンパク質とを繋ぐアダプター分子として合成生物学・ケミカルバイオロジー・細胞生物学研究において広く用いられている。一方で、哺乳動物細胞で機能することが示された RNA-RBP ペアの種類は限られており、拡充の必要性が指摘されている [1]。このような分子パーツの種類を増やすためには、機能することが既に分かっている RNA-RBP ペアの結合選択性を改変し、新規 RNA-RBP ペアを創製することが有効な戦略となる。今回、我々は PD-SELEX 法を用いた RNA-RBP 複合体の試験管内共進化実験を行い、直交性 RNA-RBP ペアを同定することに成功したので報告したい [2]。

## 2. 解析データおよび方法

### (1) PD-SELEX 法のデザインと RNA-RBP 複合体選択のストラテジー

PD-SELEX 法はファージディスプレイ (PD) ライブラリー及び RNA ライブラリーを用い、RNA-RBP 複合体を試験管内で共進化させる手法である。複合体の選択は二段階のアフィニティーセレクションにより行われる。RBP の C 末端側に融合した短いペプチドタグ (Strep-tag II) を用いて Strep-Tactin 磁気ビーズ上に RBP (PD ライブラリー) の固定化する。この固定化した RBP に対して RNA ライブラリーのセレクションを行う (図 1, 1st purification)。次に、RNA ライブラリー

の 3' 側 (Docking sequence) に対して相補的な配列の DNA を固定化した磁気ビーズを用いて RNA を捕捉し、RNA-RBP 複合体を回収する (図 1, 2nd purification)。熱溶出または RNase H 処理によって回収した RNA ライブラリー、PD ライブラリーはそれぞれ RT-PCR・*in vitro* 転写、または大腸菌感染により増幅が可能であり、一連の操作 (ラウンド) を複数回行うことで RNA-RBP 複合体を濃縮する。

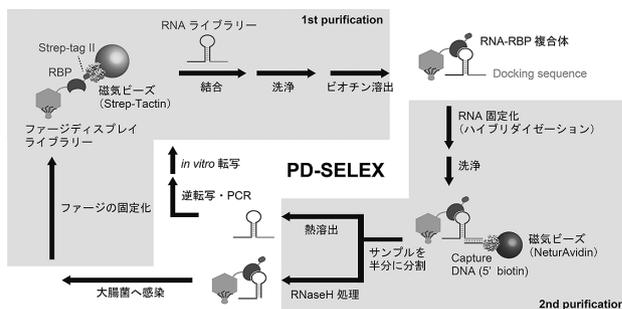


図 1. PD-SELEX の概略図

### (2) 初期ライブラリーのデザイン

ステムループ構造のループ部分 20 塩基をランダム化 (N = A, C, G, or U) した全長 76 塩基の RNA ライブラリーをデザインした (図 2, 左側)。 $4^{20} = \text{約 } 1.1 \times 10^{12}$  のライブラリーサイズであり、*in vitro* では全ての配列空間をカバーすることができる。また、X 線結晶構造解析の論文を参考にして *A. fulgidus* 由来のリボソームタンパク質 L7Ae の RNA 結合面に位置するアミノ酸 8 残基をランダム化 (E34X, K37X, E40X, I88X, E89X, V90X, P91X, C92X; X は 20 アミノ酸を示す) した PD ライブラリーを構築した (図 2, 右側)。PD ライ

ブラリーのサイズは約  $4.0 \times 10^8$  であった。

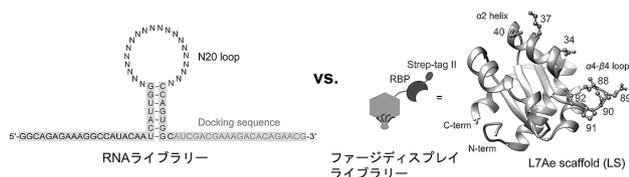


図 2. 初期ライブラリーのデザイン

### 3. 結果と考察

#### (1) PD-SELEX セレクションの評価

RNA ライブラリー vs. PD ライブラリーの試験管内分子進化を 6 ラウンド行い、次世代シーケンシング (NGS) でセレクションの評価を行った。6 ラウンド後の RNA ライブラリーを NGS 解析したところ配列の濃縮が見られた (図 3, 上)。PD ライブラリーにおいても同様に配列の濃縮が見られ (図 3, 下)、上位クローン (LS1-LS20) の 89 残基目では Arg/Trp、90 残基目では Arg の出現頻度が高かった。スキヤフォールドとして用いた親タンパク質 L7Ae と比較した場合、明瞭な配列相同性は見られなかった。

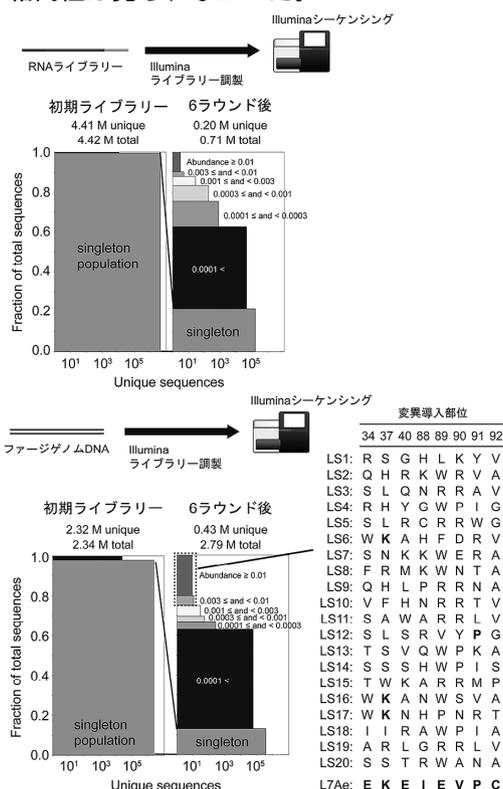


図 3. NGS によるライブラリーの評価

#### (2) 再セレクションによるペア対応付けの決定

どの RNA と RBP が結合するペアなのかを決定するため、濃縮された RBP の上位クローン 20 種類 (LS1-LS20) をリコンビナントタンパク質として個別に調製した。また、6 ラウンド後の RNA 上位配列を含む小規模の多様性の第二世代 RNA ライブラリーを作製し、個々のリコンビナント LSx に対してセレクション (従来の SELEX 実験) を行い、NGS 解析で結合のトレンドを明らかにした。頻出する 2 つのコンセンサス配列 (CS)、1: UUGUGASGC (S = G or C)、2: UCCAUGACGC に着目して解析してみると、CS1 RNAs は LS4 に、CS2 RNAs は LS12 に対して選択的な結合を示していた。

二次構造予測を行ったところ CS1 は対称的な内部ループ構造、CS2 は典型的な Kink-turn 構造の形成に参与していることが示唆された。これらを含む最小化構造の RNA をデザイン・合成し、表面プラズモン共鳴 (SPR) による結合解析を行ったところ “CS1 RNA - LS4 ペア”、“CS2 RNA - LS12 ペア” はそれぞれ解離定数 7 pM と傑出した結合を示した (図 4)。一方、“CS1 RNA - LS12”、“CS2 RNA - LS4” の組み合わせではそれぞれ 28 nM、114 nM の解離定数であり (図 4)、本来の RNA-RBP ペアよりも 4000 倍以上結合力が弱いことが明らかとなった。また、セレクションによって得られた LS4 はキックターンモチーフに対する結合親和性が減弱していると考えられ、L7Ae と比較して生体直交性が向上している可能性がある。

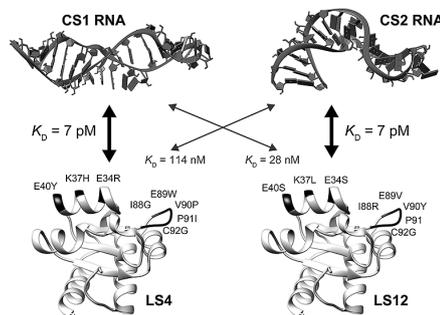


図 4. 直交性 RNA-RBP ペアの発見

### 4. 今後の展望

核酸-タンパク質 (ペプチド) 間相互作用を解析、または結合選択性を改変するための基盤技術として PD-SELEX 法が活用されることが期待される。

### 文 献

- 1) Kawasaki, S. *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **63**, 99-110 (2020).
- 2) Fukunaga, K. and Yokobayashi Y., *Nucleic Acids Res.*, doi:10.1093/nar/gkab527 (2021).

# 細胞評価及び動物行動試験評価を用いた

## 新規塩味ペプチドの発見

竹内 友里・池田 彩・清水 一憲・本多 裕之\*

名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻

〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学工学研究科

Tel: 052-789-3215 Fax: 052-789-3214

E-mail: honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

近年、減塩方法として塩味増強・代替物質の利用が注目されている。しかし、既報の塩味増強・代替物質はオフフレーバーがあったり、塩味増強性が弱いといった課題があり、高活性の塩味物質が求められている。本研究では、塩の代替物質となる高活性な塩味ペプチドの探索を行った。既報の塩味ペプチドの残基を伸長し、塩味活性を評価した。まず、塩味受容体の一つである上皮性ナトリウムイオンチャネル (ENaC) を HEK293 細胞に一過的に発現させ、Ca<sup>2+</sup>イメージングを用いて塩味を評価する細胞評価系を構築し、ペプチドの塩味増強を評価した。次に、C57BL/6J マウスの塩味嗜好性を利用した二瓶選択試験を用いて、高活性塩味ペプチドの活性を検証した。

### 1. はじめに

近年、塩分の過剰摂取が世界中で問題になっている。塩分を過剰に摂取することは、健康に対して様々な害を及ぼすことが知られている<sup>1)</sup>。対策として減塩食材や減塩メニューの開発が行われているが、おいしさを感じにくいなどの問題がある。「塩味代替物質・塩味増強物質」の利用が注目されているが、既報の塩味代替物質である塩化カリウム、塩化アンモニウムにはえぐみや渋みを感じられ、塩味増強物質であるトレハロースにはオフフレーバーが含まれ、既報の塩味増強ペプチドである RA (Arg-Ala) や WW (Trp-Trp) は塩味活性が弱いといった課題があり、高活性の新規塩味物質が求められている。我々は Fmoc 固相合成法によりセルロースメンブレン上にペプチドアレイを作製する技術を持っており、様々な生理活性ペプチドの探索に成功している<sup>2), 3)</sup>。本研究では、既報の塩味ペプチドを残基伸長することで新たな高活性の塩味ペプチドの探索を試みた。まず、塩味受容体である上皮性ナトリウムイオンチャネル (ENaC) を HEK293 細胞に発現させ、ENaC を活性化させるペプチドを探索した。次に、得られたペプチドの *in vivo* での活性を、C57BL/6J マウスの塩味嗜好性を利用した二瓶選択試験で検証した。

### 2. 方法

#### (1) 細胞評価系の構築及び塩味ペプチドの評価

塩味を評価できる細胞評価系を構築するために、塩味受容体 ENaC の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットを一過性に共発現させた HEK293 細胞を作製した。既報の塩味ペプチドの中でも活性の高かった RA, WW, WL (Trp-Leu) に対し、物性により 8 グループ化したアミノ酸を付加して活性を評価した (図 1)。ENaC が活性化されると細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入が発生することを活かし、塩味は Ca<sup>2+</sup>イメージングで評価した。

#### (2) 二瓶選択試験 (two-bottle choice test)

8 匹の C57BL/6J マウスを 1 匹/ケージに飼育して二瓶選択試験を行い、塩味評価を行った。まず蒸留水をコントロールとして 15, 30, 45, 75, 150 mM NaCl 水溶液を提示し、マウスの塩味嗜好性を検証した。次



図 1. アミノ酸のグループ分け

に、30 mM NaCl 水溶液に 0.2 mM NVRA を添加した溶液を、蒸留水に対して提示し、NVRA ペプチドの嗜好性を評価した。

### 3. 結果及び考察

#### (1) Ca<sup>2+</sup>イメージングによるペプチドの塩味活性評価

ENaC 発現 HEK293 細胞を用いて、残基伸長ペプチド塩既報塩味ペプチド RA を N 末端側に伸長した NVRA というペプチドが高活性を示すことがわかった (図 2)。これは元配列 RA の 5.3 倍、既報で最も活性の高いペプチド WW の 1.5 倍の活性であった。このことから、NVRA ペプチドは既報の中で最も活性の大きい塩味ペプチドであることが示唆された

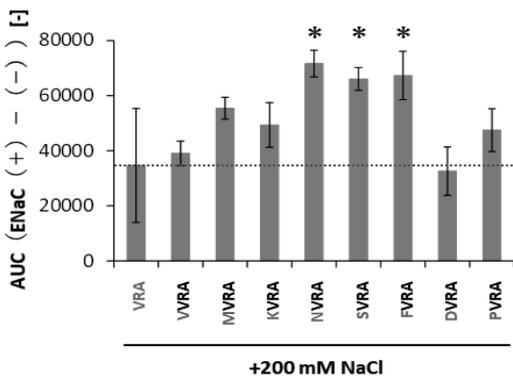


図 2. 残基伸長ペプチドの塩味活性評価  
蛍光強度変化の差 [ENaC 発現細胞の蛍光強度変化 - 非発現細胞の蛍光強度変化] で評価

#### (2) 二瓶選択試験によるペプチドの塩味活性評価

ペプチドの塩味を *in vivo* で評価するために、二瓶選択試験を行った。蒸留水に対し濃度の違う NaCl 水溶液を提示してマウスの塩味嗜好性を検証した (図 3)。その結果、15, 30, 45 mM NaCl の嗜好性に対し、75, 150 mM で NaCl の嗜好性が有意に低いことがわかった。このことから、C57BL/6J マウスの塩味嗜好性は約 50 mM NaCl を閾値として嗜好性から嫌悪性に転換すると考えられる。そこで、50 mM 以下の NaCl を嗜好性塩味、50 mM 以上の NaCl を嫌悪性塩味と定義した。次に、無味の蒸留水、嗜好性塩味の 30 mM NaCl、嫌悪性塩味の 150 mM NaCl に 0.2 mM の NVRA ペプチドを添加し、その嗜好性を評価した (図 4)。その結果、蒸留水に NVRA を添加しただけで、30 mM NaCl と同程度の嗜好性を示し、150 mM NaCl に添加した際は嫌悪性から嗜好性への有意な上昇が見られた。ENaC は「おいしい」塩味を検知する受容体であることが報告されている<sup>4)</sup>。このことから、NVRA の添加によって ENaC が活性化され嗜好性塩味が嫌悪性塩味を凌駕したと考えられる。よって、NVRA は嗜好性の高い「おいしい」塩味を呈味する可能性が示唆された。

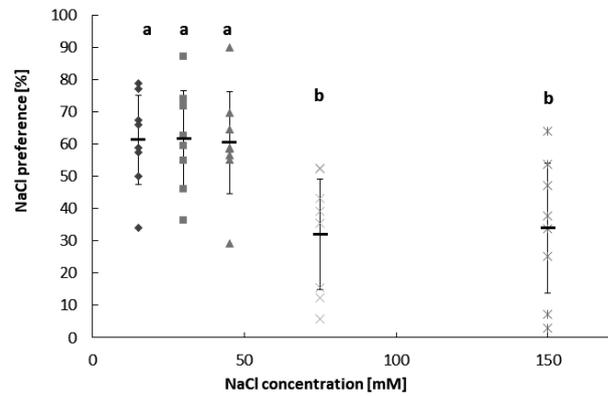


図 3. マウスの塩味嗜好性評価  
添字 (a, b) の両群間で  $p < 0.05$

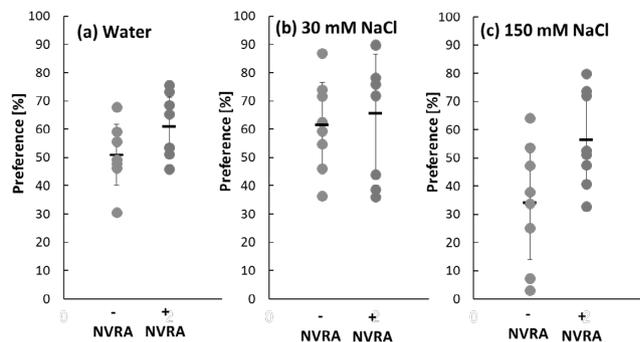


図 4. マウスの NVRA 嗜好性評価  
(a) 蒸留水, (b) 30 mM, (c) 150 mM NaCl

### 4. 今後の展望

本研究により、NVRA という嗜好性の高い塩味ペプチドの取得に成功した。また、NVRA の残基置換により、可食性のタンパク質から酵素により取得可能な 4 残基塩味ペプチドの取得にも成功した。今後は、更なる塩味ペプチドの取得のために、分子ドッキングシミュレーションを用いて NVRA と ENaC の間に働く相互作用を解明したいと考えている。

### 文 献

- [1] Nwabuo, C. C. et al., Curr. Hypertens. Rep. 22, 11, (2020).
- [2] Imai, K. et al., J. Biosci. Bioeng., 128(1), 44-49 (2019).
- [3] Yoshioka, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 550, 177-183 (2021).
- [4] Nomura, K. et al., Neuron, 106, 816-829.e6 (2020).

**第73回日本生物工学会大会講演トピックス集**

2021年10月13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](mailto:info@sbj.or.jp)

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