第76回(2024年)

日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2024年(令和6年)9月8日(日)~10日(火)

会 場 東京工業大学 大岡山キャンパス



公益社団法人 日本生物工学会

第76回(2024年)

日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2024年(令和6年)9月8日(日)~10日(火)

会 場 東京工業大学 大岡山キャンパス



公益社団法人 日本生物工学会

第76回(2024年)日本生物工学会大会 トピックス集 目次

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

【遺伝子工学】

1Cp05 C 会場 第1日 14:18 … p. 8 リン輸送体の基質特異性改変による亜リン酸依存性生物学的封じ込め技術の高度化
○三輪 朱莉,百川 直輝,石田 丈典,池田 丈,舟橋 久景,黒田 章夫,廣田 隆一 (広島大院・統合生命科学)
3Cp10 C 会場 第 3 日 15:30
〇角 悟, 石飛 隼人, 小山 拓也, 末次 正幸 (立教大学・理・生命理)
3Cp16 C 会場 第 3 日 16:54
〇四川 想人 $^{-}$ 、佐藤 埔貞 $^{-}$ 、佐人间 智史 $^{-}$ (1 京大院・医 2 京大院・農 3 広島大院・統合生命科学)
【酵素学,酵素工学】 1Gp09 G 会場 第1日 15:18
○伊藤 栄紘,能戸 湧太,関戸 崚太,杉本 航,蒲池 利章 (東工大・生命理工)
2Fp04 F 会場 第 2 日 16:06p. 16電気化学式センサへの応用に向けた L- グルタミン酸オキシダーゼの機能改変
○久世 圭太朗 , 戸田 啓太 , 一柳 敦 (キッコーマン)
3Fp01 F 会場 第 3 日 13:30p. 18フェルラ酸を一段階でバニリンに変換する酵素の開発
〇古屋 俊樹 1 , 藤巻 静香 1 , 木野 邦器 2 , 廣瀬 修一 3 , 白坂 直輝 3 , 牛尾 慎平 3 (1 東京理科大・創域理工 2 早大・先進理工 3 (株)長瀬産業)
3Fp08 F 会場 第 3 日 15:06p. 20NRPS 由来アデニル化ドメインを用いたジケトモルフォリンの効率的合成法の開発
〇星 くるみ 1 , 唐鎌 翔大 1 , 鈴木 伸 2 , 木野 邦器 1,2 (1 早大院・先進理工 2 早大・理工総研)

【タンパク質工学】

2Gp03 G 会場 第 2 日 15:54
〇宮本 愛 1 , 森 壮流 1 , 伊達 実鈴 1 , 本莊 知子 1 , 大橋 圭明 2 , 木浦 勝之 2 , 垣見 和宏 3 , 二見 淳一郎 1 (1 岡山大院・ヘルスシステム 2 岡山大・医歯薬 3 近大・医)
3Gp07 G 会場 第 3 日 14:54 ········ p. 24 耐熱化変異タンパク質をスクリーニングするための新手法
吉村 俊祐 ¹ , 森下 松太 ¹ , 大城 隆 ^{2,3} , ○鈴木 宏和 ^{2,3} (¹ 鳥取大院・持続創生, ² 鳥取大・工, ³ 鳥取大・GSC)
3Gp12 G 会場 第 3 日 16:06
〇大室(松山)有紀 1 ,古田 忠臣 2 (1 島津製作所, 2 東工大・生命理工)
【オミクス解析】
3Ep16 E 会場 第 3 日 16:54
【抗体工学】
3Hp08 H 会場 第 3 日 15:06 ······ p. 30 AI によるデザインと生細胞イメージングを用いた評価による細胞内抗体の開発
〇前島 大樹 1 , 佐藤 優子 1,2 , Stasevich Timothy 2,3 , 木村 宏 1,2 (1 東工大・生命理工 , 2 東工大・IIR, 3 コロラド州立大学)
【代謝工学】
2Dp02 D 会場 第 2 日 15:42
○石原 静流 ¹, 折田 和泉 ¹, 松本 謙一郎 ², 福居 俊昭 ¹(¹ 東工大・生命理工, ² 北大院・工)
2Dp05 D 会場 第 2 日 16:18
○加藤 淳也 ^{1,2} , 桑田 裕一 ¹ , 竹村 海正 ¹ , 加藤 節 ¹ , 藤井 達也 ² , 和田 圭介 ² , 渡邊 真宏 ² , 中道 優介 ² , 青井 議輝 ¹ , 森田 友岳 ² , 村上 克治 ² , 中島田 豊 ¹ (¹ 広島大院・統合生命科学, ² 産総研)

2Dp09 D 会場 第2日 17:18
菌叢機能制御に向けたバクテリオファージによる菌叢改変技術の開発
○田中 友樹 ¹, 杉山 涼雅 ¹, 川口 愛未 ¹, 岩木 宏明 ², 岡野 憲司 ²(¹ 関西大院・理工, ² 関西大・化生工)
3Dp05 D 会場 第3日 14:18
マルチオミクスデータを用いた出芽酵母動的代謝アンサンブルシミュレーターの構築
○佐藤 源気, 山崎 一輝, 岡橋 伸幸, 松田 史生 (阪大院・情報)
【醸造学,醸造工学/食品科学,食品工学】
1Kp03 K 会場 第1日 13:54p. 40ヒト外挿可能な腸内細菌叢培養モデルの構築に向けて
〇佐々木 大介 1,2 , 新谷 知也 1 , 松木 泰 3 , 近藤 昭彦 1,2 (1 神戸大院・科技イノベ, 2 バッカス・バイオイノベーション, 3 神戸大・戦略企画室)
2Kp02 K 会場 第 2 日 15:42 ····· p. 42
低温ストレス応答下の Saccharomyces cerevisiae の包括的脂質解析
〇岡橋 伸幸 1,2,3 , 原 大樹 1 , 飯田 順子 2,4 , 松田 史生 1,2,3 (1 阪大院・情報, 2 阪大・島津分析イノベーション協働研, 3 阪大・先導的学際研機構, 4 島津製作所)
2Kp09 K会場 第2日 17:18····· p. 44
超臨界流体クロマトグラフィー質量分析による煮干のワイドターゲット定量リピドーム分析
〇松原 保仁 1 , 松岡 博美 1 , 藤川 護 1 , 大西 茂彦 1 , 高橋 政友 2 , 馬場 健史 2 (1 香川県産技セ 2 九大・生医研)
【環境工学,廃水処理技術】
1Jp11 J会場 第1日 15:54
カーボンナノファイバーの生分解の真理と新技術
〇堀 克敏 1,2 , 高橋 慧良 1 , 蟹江 純一 2 , 上野 光保 3 , 阿多 誠文 3 , 関谷 瑞木 3 , 上島 貢 3 (1 名大院・エ , 2 フレンドマイクローブ , 3 日本ゼオン)
3Jp06 J 会場 第3日 14:42 ····· p. 48
結晶性セレンを生成する新規耐塩性亜セレン酸還元菌 Malaciobacter sp. UFI-3 の単離と特徴づけ
○古田 有輝, 石橋 知也, 井上 大介, 池 道彦 (阪大院・工)
【生物化学工学】
2Np07 N会場 第2日 16:54 ······ p. 50
Corynebacterium glutamicum における芳香族化合物排出因子の探索
〇金田 実郎, 永井 暉, 野中 鏡士朗, 髙橋 史員, 小山 伸吾 (花王)

【培養工学/バイオプロセス】

1Mp09 M 会場 第1日 15:18	p. 52
	$3^{1,2}$, 清水 皓太 2 , 山野一足立 範子 2 , 大政 健史 2 (1 日本ハム・中央研, 2 阪大院・工)
2Mp08 M 会場 第 2 日 17:06 ····································	p. 54
(¹ 筑波	\bigcirc 梅原 嘉宏 1 , 青柳 秀紀 1,2 な大院・生命農学学位 $P,^2$ 筑波大・生命環境系)
3Mp09 M 会場 第 3 日 15:18 ····································	_
OL	山平 真也 ¹ , 光野 秀文 ² , 神崎 亮平 ² , 山口 哲志 ¹ (¹ 阪大・産研, ² 東大・先端研)
【植物細胞工学,組織培養,育	種工学】
2Bp04 B 会場 第 2 日 16:06 ···································	p. 58
微生物感染機構解明に向けた 1 細胞レベルのダイズ根毛遺伝	_
	² 美里 ² , 濱崎 英史 ⁴ , 松井 南 ^{4,5} , 竹山 春子 ^{1,2,3,6}
【生体医用工学/セル&ティッシュエン	ノジニアリング】
1Ap15 A 会場 第1日 16:42 ····································	
○小嶋 一聖 ¹ , 山本 晴 ²	² , 臼井 達哉 ² , 呰上 大吾 ² , 田中 剛 ¹ , 吉野 知子 ¹ (¹ 農工大院・工 , ² 農工大院・農)
1Bp07 B 会場 第 1 日 14:54 リン脂質ポリマー修飾アルギン酸ゲルを用いたバイオ人工膵	_
	○二ツ橋 龍,金子 真大,井藤 彰 (名大院・工)
2Ap02 A 会場 第 2 日 15:42 ····································	p. 64
C)吉川 晃生 , 齊藤 彰吾 , 田中 祐圭 , 大河内 美奈 (東工大・物質理工)
2Ap04 A 会場 第 2 日 16:06 ···································	
\bigcirc 水野 滉基 1 , 木村 和恵 1 , 田中 1	健二郎 ¹ , 池内 暁紀 ^{2,3} , 村本 伸彦 ² , 加藤 竜司 ^{1,4} タ自動車 , ⁴ 名古屋大学ナノライフシステム研)

•	14:42 ······ p. 68 シトシン"は毛包オルガノイドの毛幹伸長を促進する
	○景山 達斗 ^{1,2} , 福田 淳二 ^{1,2} (¹ 神奈川産総研, ² 横国大院・工)
	【生体情報工学,バイオインフォマティクス】
1	14:06 ······ p. 70 現頻度パターンの解析ツールの開発
	山崎 将太朗 1,2 , ○若松 太一 2 , 加藤 晃 2,3

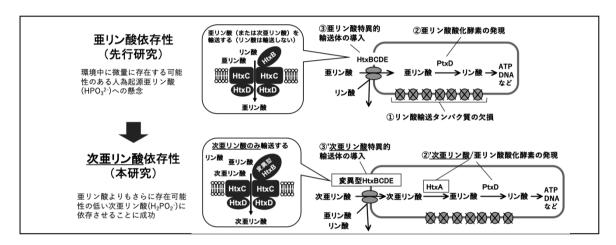
リン輸送体の基質特異性改変による 亜リン酸依存性生物学的封じこめ技術の高度化

三輪 朱莉・百川 直輝・石田 丈典・池田 丈・舟橋 久景・黒田 章夫・廣田 隆一*

広島大学統合生命科学研究科

〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 広島大学統合生命科学研究科

Tel: 082-424-7749 Fax: 082-424-7047 E-mail: hirota@hiroshima-u.ac.ip



現在、有用な遺伝子組換え微生物(GMM)が数多く開発されている。これら GMM の高度利用では屋外開放系での利用が想定されているものもあるが、GMM が環境中に拡散した場合、生物多様性を脅かすことが懸念されるため、その対応は実用利用において必須のものとなる。私たちはこれまでに、環境中にほとんど存在しない亜リン酸(HPO_3^2)に生育を依存させ、微生物の拡散を防止する生物学的封じ込め技術を開発した。本技術は他の封じ込め技術に比べ、低コストで高い拡散防止効果を発揮する。しかし近年、農作物の生育補助剤など人為起源の亜リン酸が環境中に放出される可能性がある。環境亜リン酸は、検出された場合でも 100 nM 以下であり、亜リン酸封じ込め株の生育をサポートできる量ではないが、この懸念を払拭するための技術開発も必要である。そこで本研究では、亜リン酸よりもさらに環境中の存在量が少ないと考えられる次亜リン酸(H_2PO_2)に生育を依存させる生物学的封じ込め技術を開発した。

1. はじめに

遺伝子組換え技術の発展により、食料、環境、エネルギー分野の地球規模課題の解決に期待される、様々な GMM が開発されている。特に微細藻類による太陽光エネルギーを利用した有用物質生産や、バイオレメディエーションのための GMM が既に開発されているが、これらは屋外開放系での利用が想定される。しかし、GMM の屋外開放系での利用は、カルタヘナ法の第一種使用に相当し、現状では使用の承認を得ることが非常に困難である。

そこで、第一種使用を可能にする拡散防止措置のひとつとして生物学的封じ込めに注目が集まっている。この技術は、宿主生物に、自然環境では生存できず、人工的な環境でのみ生存できる性質を付与する手法である。当研究室では生命に必須な元素であるリンの限にとんど存在しない亜リン酸に限はさせる生物学的封じ込め技術を開発したり。本技術は、リン酸に特異性を示さず、還元型の無機リン化合物では、リン酸に特異性を示さず、還元型の無機リン化合物では、リン酸に特異性を示さず、還元型の無機リン化合物がより、カーンの数を選択的に取り込む。HtxBCD 輸送体の(Pseudomonas stuzer / WM88 の次亜リン酸代謝オペロン由来)を導入、さらに、亜リン酸を酸化する酵素 PtxD

を導入することで適用できる。

この封じ込め技術は人工アミノ酸要求性など他の生物学的封じ込め技術よりも高い拡散防止効果を発揮し、要求物質である亜リン酸も安価に得ることができる。しかし近年、亜リン酸が農作物の生育補助剤として使用される場合があり、人為的に環境中に放出される可能性があるため、その対応が求められる。

本研究ではリンの取り込みを担う HtxBCD 輸送体の 基質結合タンパク質 HtxB に変異導入することで輸送 基質を次亜リン酸のみに限定し、亜リン酸よりもさら に環境中の存在量が少ないと考えられる次亜リン酸に 生育を依存させる生物学的封じ込め技術を開発した。

2. 結果·考察

2.1 次亜リン酸特異的輸送体の作製

HtxBCD は HtxB が基質結合タンパク質 (SBP)、 HtxCD が膜タンパク質として機能する ATP 依存型 ABC 輸送体である。我々の先行研究にて、HtxBCD は in vivoにおいて非常に高い亜リン酸取り込み能力 を示す輸送体として機能することが確認されてい た。一方で、他グループによる in vitro の結合試 験では亜リン酸に対する親和性が極めて低いことが 報告され、この矛盾点に興味が持たれた。そこで HtxBの基質結合部位の変異体 HtxB^{W52A}、HtxB^{D206A}、 HtxB^{D206N}を作製し²⁾、リン輸送能検定株 MT2012 にこ れらの変異型 HtxB を含む HtxBCD を導入し、基質取 り込み能力を調べた。これらの変異体は基質に対す る結合能力を喪失すると予想されたが、解析の結 果、興味深いことに、いずれの変異型 HtxBCD も次 亜リン酸に対する特異性のみを保持していることを 発見した。特に取り込み効率の良い、HtxB^{W52A}CD と HtxB^{D206A}CD を次亜リン酸特異的輸送体として次亜リ ン酸依存性封じ込め技術に応用した。

	リン酸	亜リン酸	次亜リン酸			
HtxBCD(野生型)		00000	00000			
HtxB ^{W52A} CD			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •			
HtxB ^{D206A} CD			000000			
HtxB ^{D206N} CD						
PstSCAB	00000:	00000:	00000			

図 1. 野生型 HtxBCD とリン酸輸送体 PstSCAB をコントロールとして用いた。 $OD=1.0\times10^{-6}$ まで 10 倍ずつ希釈した培養液を $10\,\mu$ L ずつ、それぞれを唯一のリン源とする培地にスポットして培養した。

2.2 次亜リン酸依存性封じ込めの適用と評価

E. co/i MG1655 に対して①保有する全ての無機リン酸およびリン酸エステル輸送体(計7種類)の破壊②次亜リン酸資化のための HtxA と PtxD の導入③次亜リン酸特異的輸送体 HtxB^{NS2A}CD または HtxB^{D206A}CD の導入

を行い、次亜リン酸依存性株の作製を行った。 HtxB^{N52A}CD または HtxB^{D206A}CD を導入した株 (AM101, 102) と、亜リン酸依存性封じ込め株の増殖比較をした。そ の結果、AM101, 102 はどちらも厳密な次亜リン酸依存 性を示すことが確認された。

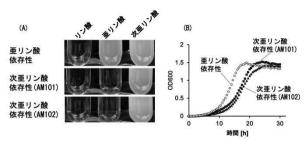


図2. 亜リン酸/次亜リン酸依存性封じ込め株の増殖の様子 (A)培養終了時の培養液の様子(B) 各封じ込め株の増殖曲線

2.3 封じ込め効果の評価

次亜リン酸依存性封じ込め技術の信頼性を調べるために、非許容培地(リン酸培地)でも生育できるようなエスケープ変異体の出現頻度を測定した。AM101 および AM102 について、それぞれ 3.1×10^{10} , 6.7×10^{10} cells を LB 寒天培地にプレーティングし、 37° Cで 21日間培養した。その結果、いずれの株もエスケープ変異体は出現しなかった。本測定の検出限界値は 1.5×10^{-11} 以下(AM101)、 3.3×10^{-11} 以下(AM102)であり、いずれの次亜リン酸依存性封じ込め株も極めて低い変異体出現頻度であることを確認した。

3. 今後の展望

次亜リン酸は亜リン酸よりも還元型のリン化合物であり、酸化的な地球環境では亜リン酸よりもさらに存在量が少ないと考えられる³⁾。また、酸化還元電位が亜リン酸よりもさらに低く、酸化されやすいため、亜リン酸が万が一自然環境中に漏れ出てしまでは、次亜リン酸が万が一自然環境中に漏れ出てしまでは依ず物質を環境中の存在確率がさらに低いと考えられる物質に変更することで、さらなる安全性の向上に成りた。今後は有用物質生産に期待される微細藻類への適用を進めていく。また、実用化に向けた環境中の次亜リン酸量の測定や、自然環境を模した系において封じ込め効果の実証を行う。

3. 文献

- 1) Hirota R., et al., Sci. Rep., 7, 44748.(2017)
- 2) Adams P.N., et al. Sci. Rep., 9, 10231(2019)
- 3) Liu W.,et al., Sci. Total Environ., 881, 163463(2023)

オリゴプールを用いた無細胞でのマルチプラスミド合成

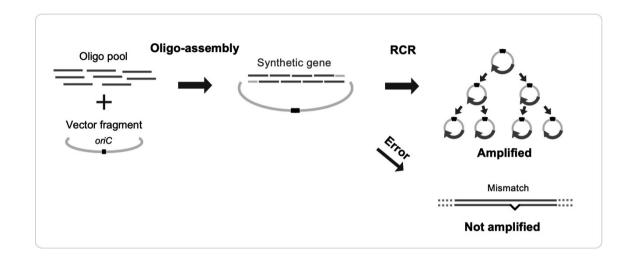
角 悟・石飛 隼人・小山 拓也・末次 正幸*

立教大学理学部生命理学科

〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1 立教大学理学部

Tel: 03-3985-2372

E-mail: suetsugu@rikkyo.ac.jp



人工遺伝子はオリゴ DNA を出発材料にして作られる二重鎖 DNA であり、生命科学研究において強力なツールである。最大百万種の配列のオリゴ DNA を提供することのできるオリゴプールは人工遺伝子合成のハイスループット化に有用である一方で、量と質の 2 つが課題である。これらを解決するため、我々は試験管内環状 DNA 増幅法 RCR (Replication Cycle Reaction) を利用した新しい人工遺伝子合成法を開発した。この方法を用いて 64 種類の配列を含むオリゴプールから 4 種類のプラスミドを一反応液中で同時合成することに成功した。また、オリゴ DNA の化学合成過程で生じる配列エラーを除去する方法も開発し、プラスミドのフィデリティを上げることにも成功した。本方法は、微量かつエラーの多いオリゴプールから無細胞でプラスミドライブラリーを合成するユニークな方法である。

背景・目的

人工遺伝子の需要は合成生物学の進展によって高まりつつある。人工遺伝子の作製には化学的に合成された数十塩基の一本鎖のオリゴ DNA が出発材料に用いられ、一般的に PCR をベースにした PCA 法 (Polymerase Chain Assembly) によって二重鎖 DNA が作られる ¹⁾。遺伝子合成の課題は、オリゴ DNA の化学合成のコストと配列エラーである。近年オリゴプールと呼ばれる最大百万種の配列の混合物が提供されるサービスがあり、人工遺伝子合成のハイスループット化とコストの低減が期待されている。一方、オリゴプールを利用する上での問題は、1 つあたりのオリゴ DNA が微量であることと一定数の配列エラーが含まれることである。

このようなオリゴプールから正確性の高い人工遺伝子を作製するため、独自技術である試験管内環状 DNA

増幅法 RCR(Replication Cycle Reaction)²⁾を組合わせたオリゴ DNA のアッセンブリ法とエラー除去法を開発した。RCR は大腸菌の染色体複製機構を再構成した系であり、セルフリーで 1 分子の環状 DNA を指数関数的に増幅することが可能である。

結果と考察

1. オリゴ DNA のアッセンブリ (Oligo-assembly)

23 種類の 200 塩基のオリゴ DNA を用いたアッセンブリ条件の検討過程において、タンパク質の熱凝集の際に DNA アッセンブリが促進されることを見出した(図 1)。この熱凝集による DNA アッセンブリ促進にはタンパク質特異性があり、クレアチンキナーゼやエノラーゼで見られ、一方で BSA などでは検出されなかった。おそらく、熱変性過程で特定のタンパク質が微量の一本鎖

DNA 同士を巻き込む形で凝集し、DNA 相補鎖間のアニーリングを促進しているものと思われる。次に、RCR を介して得られたアッセンブリ産物を増幅し、環状のプラスミドが得られるか検討した(0ligo-assembly-RCR)。具体的には、sfGFP遺伝子(0.7 kb)を構成する16種類の配列を持つオリゴプールと直鎖状のベクターDNA(2.3 kb)をクレアチンキナーゼの熱凝集効果を利用して環状にアッセンブリし、引き続きRCRによる環状DNA 増幅を行った。その結果、目的の sfGFP 発現プラスミドが得られた。なおこのとき、フェムトモーラーレベルの超低濃度のオリゴプールからの合成が可能であった。

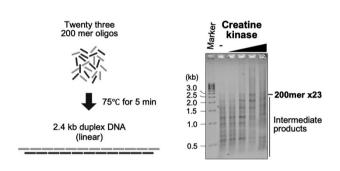


図 1. 特定のタンパク質による Oligo-assembly の 促進

2. エラー除去系の構築

上述のプラスミドを大腸菌に導入したところ、sfGFP の蛍光を呈するコロニーを多く得ることができた一方 で、オリゴ DNA の配列エラーに由来する非蛍光コロニ ーも約20%確認された。そこで次に、大腸菌のミスマ ッチ修復(MMR)タンパク質群³⁾を用いたエラー除去を 検討した。オリゴ DNA の配列エラーはアニーリングの 際、ミスマッチ DNA を形成し MMR タンパク質群によっ て認識される。MMR タンパク質群の作用は、複製の進 行を抑えるため、エラーを含む DNA は RCR 増幅されな くなる。よって、ミスマッチをもたない正確な環状 DNA のみが増幅されることになる。実際に、sfGFP オリゴ プールのアッセンブリ産物を MMR タンパク質群が含ま れる RCR に供したところ、非蛍光コロニーの割合は 数%にまで抑えられた。このことから、MMR タンパク 質群と RCR 増幅系との組合わせによって配列エラーを うまく除去できたといえる。

3. マルチプラスミドの同時合成

ハイスループットなプラスミド合成を検討するために、64 種類の配列を含んだオリゴプールとベクターDNA (3.0 kb) を 01 igo-assembly-RCR したところ、4 種類の色素遺伝子(各 0.7 kb) $^{4)}$ 発現プラスミドを一反応

液中で同時合成することに成功した(図 2、大腸菌形質転換コロニーの割合)。また、エラー除去系を加えたRCRによって配列エラーに由来する未着色コロニーの割合を 22.1%から 5.0%までに抑えることも確認された(図 2、Error-removal)。

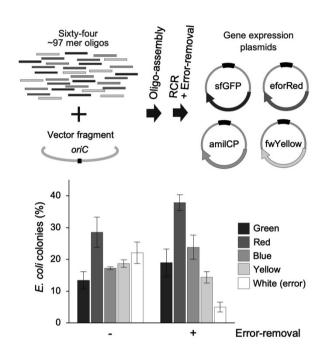


図 2. 同時合成した 4 種類のプラスミドとエラー プラスミドを有する大腸菌コロニーの割合

今後の展望

本研究で開発した技術はオリゴプールから優れたフィデリティで複数のプラスミド(ライブラリー)の合成を可能とするものである。今後は、ライブラリーサイズを大きくしていき、カーボンニュートラルに期待される酵素のプロトタイピングなどに応用していきたいと考えている。

油 文 献

- Kosuri S & Church GM : Nat Methods, 11 : 499– 507, (2014)
- 2) Su'etsugu M, et al : Nucleic Acids Res, 45 : 11525-11534, (2017)
- Borsellini A, et al: Nucleic Acids Res, 50(11):
 6224-6234, (2022)
- 4) Liljeruhm J, et al : J Biol Eng, 12(1):1-10, (2018)

CRISPR-Cas9 に基づく LoAD システムの改良による

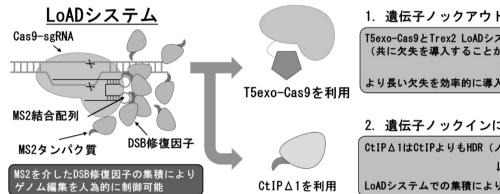
目的特化型ゲノム編集技術の開発

西川 想大^{1,2}·佐藤 瑞貴³·佐久間 哲史^{2*}

¹京都大学大学院医学研究科,²京都大学大学院農学研究科,³広島大学大学院統合生命科学研究科 〒602-0841 京都市上京区梶井町 448-5 クリエイション・コア京都御車 202 号 リージョナルフィッシュ株式会社気付

Tel: 075-600-0309

E-mail: sakuma.tetsushi.5k@kvoto-u.ac.ip



1. 遺伝子ノックアウトに特化したツール

T5exo-Cas9とTrex2 LoADシステムの組み合わせ (共に欠失を導入することができる)

より長い欠失を効率的に導入し、遺伝子をノックアウト

2. 遺伝子ノックインに特化したツール

CtIP∆1はCtIPよりもHDR(ノックインに重要)を促進

LoADシステムでの集積により、遺伝子ノックインに特化

要旨

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集では、編集の効率 やパターンが細胞種や遺伝子座によって左右されてし まう。我々はこれまでに、ゲノム編集結果を制御可能 な LoAD システムを報告した。本研究では、LoAD シス テムに更なる改良を加えることで、目的(遺伝子ノッ クアウト/ノックイン)により特化した新規ゲノム編集 技術を開発した。これらのシステムを状況に応じて使 い分けることで、様々な編集パターンを網羅可能であ り、疾患治療から品種改良まで幅広い分野での活用が 期待される。

はじめに

CRISPR-Cas9 は、Cas9 タンパク質と sgRNA が複合体 を形成して標的配列に DSB (DNA 二本鎖切断) を導入 し、その後の修復経路を介した遺伝子改変を可能とす る。しかしながら DSB 修復経路は複数存在しており、 細胞種や遺伝子座で優位に働く経路が異なるため、編 集の効率やパターンが大きく左右されてしまう。

我々はこれまでに、ゲノム編集結果を制御可能とす る新技術「LoAD システム」を報告した¹)。このシステ ムでは、sgRNAに MS2 結合配列を付加することで、MS2 タンパク質と融合した任意の DSB 修復因子を Cas9 周 辺に集積する。集積する因子を用いて DSB 修復経路を 制御することで、望んだ編集結果を効率的に取得可能 である。

本研究では、LoAD システムの構成要素である Cas9 タンパク質と集積因子に着目し、それぞれに改良を加 えることで、目的(遺伝子ノックアウト/ノックイン) により特化したツールの開発を目指した。

結果

T5exo-Cas9 を利用した遺伝子ノックアウト特化型 LoAD システムの開発

T5exo-Cas9 は Cas9 の N 末端に T5 exonuclease (T5exo)を融合させたツールである。T5exo は DNA を 5´→3´方向に分解する機能をもっており、T5exo-Cas9 は欠失を効率的に導入できることが報告された ²⁾。一方で我々は、DNA を 3´→5´方向に分解する機 能をもつ Trex2 を利用した Trex2 LoAD システムを用 いることで、小規模欠失が効率的に向上することを明 らかにしている10。そこで、共に欠失を誘導する効果

を有しつつ分解の方向性が異なるこれらの技術を組み合わせることで、欠失導入により特化した遺伝子ノックアウトツールの開発を目指した。その結果、ゲノム編集のパターンが大幅に変化し、より長い欠失(>3 bp)を効率的に導入できることが明らかとなった(図1)。このことは、DNAを両方向に分解することで、両末端から削り込むことができたことに起因するとそえられる。より長い欠失を導入することで、遺伝子ノックアウトの確実性を高めると同時に、Cas9の切断箇所から離れた塩基をも除去可能であり、遺伝子ノックアウトに特化したツールとしての有効性が示された。

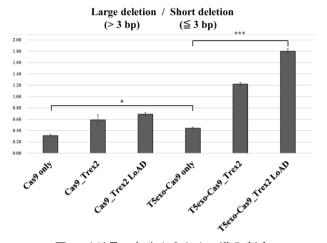


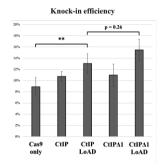
図 1. より長い欠失(>3 bp)の導入割合

CtIP∆1 を利用した遺伝子ノックイン特化型 LoAD システムの開発

CtIP は相同配列依存的修復(HDR)における初期反応に働くタンパク質であり、LoAD システムを用いて集積することで、ノックイン効率を向上させることができる $^{1)}$ 。他方で、CtIP Δ 1 は CtIPのドメイン欠失変異体であり、HDR活性を更に高めることが報告された $^{3)}$ 。これらの知見を元に、遺伝子ノックインにより特化させる戦略として、CtIP Δ 1 を LoAD システムに適用する系を検証した。

初めに、一本鎖 DNA ドナーを用いたノックイン法での効果を検証した。このノックイン法は、細胞毒性が抑えられるものの編集効率が低いことが欠点である。検証の結果、 $CtIP\Delta1$ を集積させた $CtIP\Delta1$ LoAD システムにおいてノックイン効率の平均値が最大となることが示された(図 2 左)。さらに、全編集産物のうち目的のノックイン産物の割合を示す産物純度の平均値においても、 $CtIP\Delta1$ LoAD システムにおいて最大となることが実証された(図 2 右)。

続いて、二本鎖 DNA ドナーノックインを行う PITCh 法での効果を検証した。PITCh 法とは、ノックイン配列の両末端に短い相同配列を付加することで、マイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用した高効率な



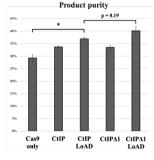
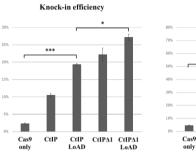


図 2. 一本鎖 DNA ドナーノックインにおける効率・純度



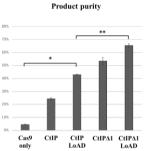


図 3. 二本鎖 DNA ドナーノックインにおける効率・純度

遺伝子ノックインが可能な手法である 4 。結果として、PITCh 法においても、一本鎖ドナーの場合と同様に、CtIP Δ 1 LoAD システムで最大のノックイン効率および産物純度を示した(図 3)。

以上の結果から、CtIP Δ1 LoAD システムは一本鎖 DNA ドナーおよび二本鎖 DNA ドナーのいずれを利用したノックイン法においても、ノックイン特化型ツールとして利用可能であることが示された。

まとめと考察

本研究では、LoAD システムを基盤とし、T5exo-Cas9 や CtIP Δ1 を取り入れることで、効率的な遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能な目的特化型ゲノム編集技術を開発した。これらのツールを状況に応じて使い分けることで、様々なアプリケーションに利用可能である。今後、集積する因子や Cas9 の改変体を更に拡充し、多様なゲノム編集操作を高度化する包括的なプラットフォームを確立していきたい。

猫文

- 1) Nakade *et al.*, *Nat Commun*, **9**, 3270. (2018)
- 2) Zhang *et al.*, *Sci China Life Sci*, **63**, 1918-1927. (2020)
- 3) Howard *et al.*, *Nucleic Acids Res*, **48**, 5485-5498. (2020)
- 4) Nakade *et al.*, *Nat Commun*, **5**, 5560. (2014)

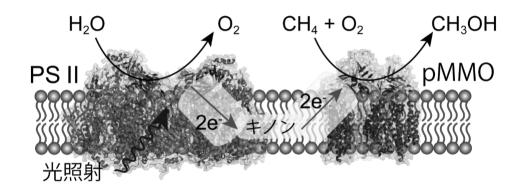
膜結合型メタンモノオキシゲナーゼと光化学系 II を再構成した 人工脂質二分子膜構造体を用いた光駆動メタン酸化反応

伊藤 栄紘・能戸 湧太・関戸 崚太・杉本 航・蒲池 利章*

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1 M6-7

Tel: 03-5734-3123 Fax: 03-5734-3357 E-mail: tkamachi@bio.titech.ac.jp



要旨

メタン資化細菌が持つ膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ(pMMO)はメタンをメタノールに酸化する反応を 触媒する。先行研究では、pMMO を含む膜画分に好熱性シアノバクテリア由来の光化学系 II(PSII)を再構成し た光駆動メタン酸化反応系を構築した。この反応系は、光照射により PSII が水から電子を取り出し、pMMO によるメタン酸化反応が進行する。本研究では、pMMO と PSII を人工脂質二分子膜構造体に再構成した反応 系において、高効率の光駆動酸化反応を達成した。

1.はじめに

近年のシェール革命により、天然ガスの主成分であるメタンの有効利用が世界中で求められている。メタンの酸化物であるメタノールは、次世代のエネルギー・炭素資源として注目されているが、現在の工業的な生産には非常に多量のエネルギーを必要とする。メタンの有効利用に向けて、メタンを唯一の炭素・エネルギーを必要とする。メタンでは、メタンを唯一の炭素・エネルギーが表して生育するメタン資化細菌由来が持つ酸が成に行われている。MMO は常温常圧、一段階の反応でメタンをメタノールへ選択的に酸化する反応を触媒する。メタン資化細菌の細胞内膜に存在する膜結合型MMO(pMMO)は、NADHからの電子を膜中のキノンを介して受容し、メタン酸化反応を触媒する。

これまでに、pMMOを含むメタン資化細菌膜画分に好熱性シアノバクテリア由来光化学系 II(PSII)を再構成して、光駆動メタン/メタノール変換反応(PSII-

pMMO 膜画分)を達成した ¹⁾。この反応では、光照射で PSII による水の酸化から得た電子を利用して、pMMO の触媒作用によりメタン/メタノール変換を達成している。本研究では pMMO と PSII を人工脂質二分子膜構造体であるバイセルやリポソームへ再構成した反応系を構築して光駆動酸化反応を試みた。

2. 材料と方法

本研究では、Methylosinus trichosporium OB3b 由来 膜画分から n-dodecyl-β-D-maltoside で可溶化した pMMO と Thermosynechococcus elongatus BP-1 由来 PSII を用いた。人工脂質二分子膜構造体には、1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) と CHAPSO を 2.6:1 で調製したバイセルと、DMPC または 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) で調製した直径およそ 100 nm のリポソームを用いた。調製したバイセルおよびリポソームに可溶化 pMMO

を再構成して、10 mM MgCl₂ と 20 mM CaCl₂ 含有 25 mM MOPS-KOH buffer (pH7.0)に懸濁した。pMMO 活性測定のために、スクリューキャップバイアルに pMMO 再構成バイセルおよびリポソーム溶液 300 μ L と電子供与体である duroquinol 1 mg を加えて、セプタ付きキャップで密栓した。気相に基質であるプロピレンを添加して反応を開始した。また、pMMO 再構成バイセルおよびリポソームに PSII と電子伝達体の decylplastoquinone を再構成した反応溶液 (PSII-pMMO 再構成バイセルおよび PSII-pMMO 再構成リポソーム)を密栓したスクリューバイアル中で攪拌し、気相に基質を添加して、ロングパスフィルター(HOYA、R66、660 nm: 35.2%T)を通した赤色光 (20 μ E/m²·s)を照射することで光駆動酸化反応を開始した。酸化反応生成物はガスクロマトグラフ(FID)で定量した。

3. 結果と考察

プロピレンを基質とした pMMO の活性測定の結果、pMMO 再構成バイセルでは可溶化 pMMO よりも活性が増大した(図 1 A)。これは別のメタン資化細菌由来pMMO を用いた先行研究結果 ②と同じく、可溶化により不安定化した pMMO の構造が、平面性の高いバイセルの脂質二分子膜への再構成で安定化することで酵成パームでは、DMPC リポソームの場合は可溶化 pMMO と同程度の活性であり、DOPC リポソームの場合はバイセルと同様に可溶化 pMMO よりも活性が増大した(図 1 B)。バイセルの脂質二分子膜を形成が増大した(図 1 B)。バイセルの脂質二分子膜を形成が増大した(図 1 B)。バイセルの脂質二分子膜を形成が増大した(図 1 B)。バイセルの脂質二分子膜を形成が増大した(図 1 B)。がイセルの脂質二分子膜を形成が増大したのである。

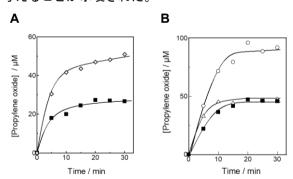


図 1 人工脂質二分子膜構造体へ再構成した pMMO の酵素活性。A: pMMO 再構成バイセル(◇)、B: pMMO 再構成リポソーム、1.8 mM DMPC (△)、1.8 mM DOPC (○)、可溶化 pMMO (■)。

さらに DOPC リポソームの場合、pMMO 再構成に 用いるリポソーム濃度を変化させたところ、リポソー ム濃度の増加に伴って pMMO 活性も増大した(図2)。 高濃度 DOPC リポソームに再構成した pMMO 活性は、同タンパク質濃度の膜画分よりも大きくなった。特に脂質濃度が 5.2 mM から 18 mM にかけて pMMO 活性の増加が大きくなっており、この脂質濃度範囲でpMMO の安定化に寄与する環境が形成されていると考えられる。

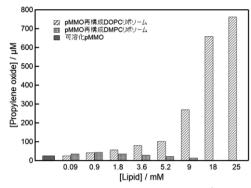


図2 pMMO 活性における再構成リポソーム脂質 濃度の影響。

これらの結果を踏まえて、PSII-pMMO 再構成バイセルおよび PSII-pMMO 再構成 18 mM DOPC リポソームを調製し、基質にメタンを用いた光駆動酸化反応を行った。その結果、どちらも光照射した場合のみ時間経過に伴って反応生成物のメタノール濃度が増大した(図3)。したがって、先行研究と同様に、人工脂質二分子膜構造体へ再構成された PSII において光照射により水の酸化から得た電子が、脂質二分子膜中のキノンを介して pMMO へ伝達され、メタン/メタノール変換が達成された。さらに PSII-pMMO 再構成 18 mM DOPC リポソームの場合、先行研究の PSII-pMMO 膜面分よりも光駆動メタン酸化反応効率が向上した。

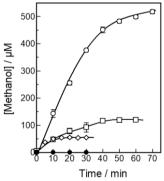


図3 PSII-pMMO 再構成膜を用いた光駆動メタン酸化反応。PSII-pMMO 膜画分 (□)、PSII-pMMO 再構成バイセル (◇)、PSII-pMMO 再構成 18 mM DOPC リポソーム (○、遮光条件●)。

参考文献

- 1. Ito H. et al., ChemBioChem, 19, 2152-2155 (2018)
- 2. Rosenzweig A. C. et al., Journal of Biological Chemistry, 293, 10457-10465 (2018)

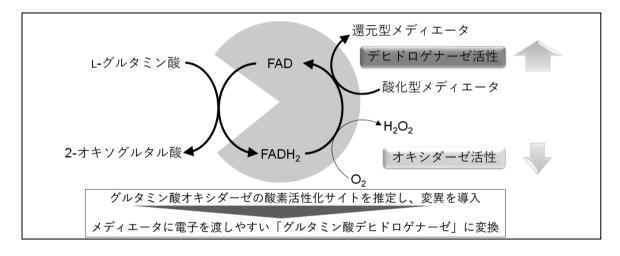
電気化学式センサへの応用に向けた L-グルタミン酸オキシダーゼの機能改変 久世 = 太朗*・戸田 啓太・一柳 敦

キッコーマン株式会社

〒278-0037 千葉県野田市野田 338

Tel: 04-7123-5511

E-mail: kkuze@mail.kikkoman.co.jp



要旨

はじめに

FAD 型 L-グルタミン酸オキシダーゼ(L-glutamate oxidase: GLOD)は、L-グルタミン酸の酸化的脱アミノ反応を触媒し、L-グルタミン酸に対する高い特異性を持つことから $^{1)}$ 、うま味測定、培地成分測定などに汎用される。

L-グルタミン酸の測定には、GLOD を使用した電気化学式バイオセンサが利用される。GLOD は、L-グルタミン酸を酸化して生じた電子を酸素に受け渡し、酸素を過酸化水素に還元するオキシダーゼ活性が高い。この特性を利用して、L-グルタミン酸の酸化と同時に生成される過酸化水素を電気化学的に定量する L-グルタミン酸センサが構築されている ²⁾。

一方、電気化学式バイオセンサによる測定原理としては、メディエータを介して測定対象化合物から電極まで電子を伝達させ、シグナルとして検出するものも存在する。この場合、L-グルタミン酸の酸化により生じた電子は、GLODを経由してメディエータに渡ることになる。本演題ではこの活性をL-グルタミン酸に対するデヒドロゲナーゼ活性と表現する。

メディエータ型の電気化学式バイオセンサに GLOD を利用する場合、従来の GLOD では、デヒドロゲナーゼ活性に比べてオキシダーゼ活性が高く、L-グルタミン酸由来の電子の一部が、メディエータではなく分析試料中の溶存酸素に渡ると予想される。

そこで、メディエータ型の電気化学式バイオセンサ

により適した L-グルタミン酸測定用酵素の開発を目的として、GLOD のオキシダーゼ活性を低減し、デヒドロゲナーゼ活性を向上させる、GLOD の「デヒドロゲナーゼ化」を試みた。

2. 方法

Streptomyces sp. MOE-7 由来の GLOD (M7GLOD) に耐熱性変異を導入した耐熱型 M7GLOD のモデル構造と、酸素分子の活性化サイトが解析されている FAD 型サルコシンオキシダーゼ (MSOX) の結晶構造 ³⁾ (PDB ID: 3QSS)を比較して、M7GLOD における酸素分子の活性化サイトを予測した。

この結果をもとに、酸素分子の侵入および活性化を阻害するような変異を加えた M7GLOD を設計し、それらの変異体を組換え生産して調製した細胞抽出液のオキシダーゼ活性とデヒドロゲナーゼ活性の比率(OX/DH)を評価した。

3. 結果と考察

M7GLOD と MSOX の構造比較から、M7GLOD では 423 位のリジン残基の側鎖が酸素分子の活性化サイトを形成すること、および 423 位のリジン残基のフレキシブルな側鎖を 496 位のロイシン残基の側鎖が支えていることが推察された(図 1)。そこで、496 位のロイシンを対象に、側鎖の嵩を小さくする変異を導入した。これにより、423 位のリジン残基側鎖のフレキシビリティが増し、酸素分子の活性化サイトが維持できなくなると予想された。L496 をアラニン、グリシンなどに置換した変異体を複数作製し、それぞれのオキシダーゼ活性(OX) およびデヒドロゲナーゼ活性(DH) を測定した結果、活性比率(OX/DH) は変異導入前と比較して大幅に小さくなった(図 2)。

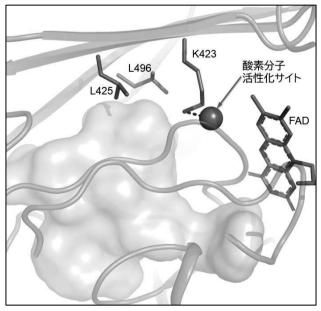


図 1. M7GLOD の推定酸素分子活性化サイト

次に、M7GLOD モデル構造中の空洞を解析した結果、酸素分子の活性化サイトから酵素の分子表面に向けて、酸素分子が通過できる大きさの空洞が存在した。この空洞が酸素分子の侵入経路だと考え、その構成アミノ酸を調べたところ、425 位のロイシン残基がその側鎖を経路に向けて位置していた(図 1)。そこで、425 位のロイシン残基を更に側鎖の嵩が大きいアミノ酸残基に変異させることで、酸素分子の侵入が抑制されると考えた。実際に、L425 をフェニルアラニンなどの嵩高いアミノ酸に置換した変異体では、OX/DH が小さくなった(図 2)。

これらの手法で探索した変異の導入により、OX/DH が 1/60 倍まで低減した改変型 M7GLOD を取得できた。

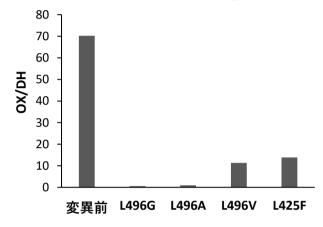


図 2. M7GLOD 変異体の OX/DH

今後の展望

本演題により得られた L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受けにくいと予想され、メディエータを介した電気化学的な L-グルタミン酸 測定への応用が可能であると考えられる。

L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼとしては、補酵素が NAD (P) 型のものが既に知られているが、電気化学式バイオセンサに使用するにはジアホラーゼや補酵素である NAD の添加が必要となり 4、技術的難易度が高いと考えられる。デヒドロゲナーゼ化した GLOD では補酵素の FAD が酵素に結合しているため、電気化学式グルタミン酸センサに適用しやすいと期待される。

猫文

- 1) Kusakabe, H. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1323-1328 (1983)
- 2) Wollenberger, U. *et al.*: *Biosensors*., **4**, 381-391 (1989).
- 3) Kommoju, P.R. *et al.*: *Biochemistry*., **50**, 5521-5534 (2011).
- 4) Monošík, R. *et al.*: *Food Anal. Methods.*, **6**, 521–527 (2013).

フェルラ酸を一段階でバニリンに変換する酵素の開発

古屋俊樹 1* · 藤巻静香 1 · 木野邦器 2 · 廣瀬修一 3 · 白坂直輝 3 · 牛尾慎平 3

¹東京理科大学創域理工学部, ²早稲田大学大学院先進理工学研究科, ³(株)長瀬産業 〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641 東京理科大学創域理工学部

Tel: 04-7122-9396 E-mail: tfuruya@rs.tus.ac.jp

ラン科のバニラ属植物から得られる上質な甘い香りのバニリンは、香粧品として広く使用されているが、価格が高騰している。これまでに、米ぬか等の農産廃棄物から豊富に得られるフェルラ酸を原料としてバニリンを生産する手法が報告されているが、いずれも複数の酵素反応を経るプロセスである。本研究では、4-ビニルグアヤコールに対して活性を示す酸化酵素 Ado を分子進化させることにより、フェルラ酸を一段階でバニリンに変換する微生物酵素の開発に初めて成功した。開発した酵素とフェルラ酸を常温で混ぜるだけでバニリンを生成できるため、確立した技術は簡便かつ環境にやさしい香料化合物生産手法を提供することができる。

1. はじめに

上質な甘い香りのバニラの主成分であるバニリンは香粧品として大きな市場を有しているが、とないたくになった。 大きないため供給量も需要に対応できず価格がら高豊はている。これまでに、米ぬか等の農産廃棄かがを開発してがに、大きなのできれば、製造法の対応では、大きなのできれば、製造法の対率化と大きな及のできれば、製造法の対率化と大きな及のできれば、製造法の対率化と大きなを対生をできなが、それを可能とする機生物を表は知られていない。本研究では、フェルラ酸を消にリンに変換する新規酵素の創製を目指した。

2. 材料と方法

フェルラ酸と部分構造が類似する 4-ビニルグアヤコールやイソオイゲノールの C=C 結合を酸化的に切断

する酵素として真菌由来の酸化酵素 Ado が知られているが、側鎖がカルボキシ基のフェルラ酸に対しては活性を全く示さない(図 1)。Ado はカロテノイド酸と利用して、活性中心の鉄を利用して、酸素分子を用いて C=C 結合を補酵素非依存的に切断分子を用いて C=C 結合を補酵素非依存的に切断分子を用いてはいると反応するようによる画が出るできる。そこで、Ado の立に対したとができる。そこで、Ado の立に対したと明発できる。そこで、Ado の立に対したの相互により解析し、基質との相互作人を表示していると予想されるアミノ酸残基を関係的に種々のアミノ酸に置換した変異体ライブラリーを作製し、フェルラ酸に対する活性を評価した。

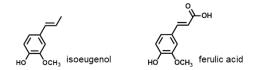


図 1. イソオイゲノールとフェルラ酸の化学構造

3. 結果と考察

(1) F82 への変異導入

Ado にイソオイゲノールを結合させたモデルをドッキングシミュレーションにより構築したところ、F82は基質の芳香環と相互作用することが推測された(図2)。このアミノ酸残基をヒドロキシアミノ酸や塩基性アミノ酸に置換することで、フェルラ酸に対する親和性が向上することを予想した。そこで変異を導入したところ、F82を Tyr に置換することでフェルラ酸に対する活性を微弱ながら付与することができた。

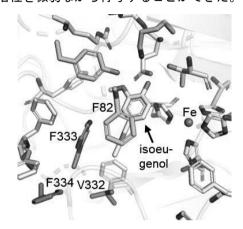


図 2. Ado にイソオイゲノールを結合させた活性中心 のモデル

(2) V332/F333/F334への変異導入

F82Y変異体へのさらなる変異導入により、フェルラ酸に対する活性の向上を目指した。Ado や F82 変異体にイソオイゲノールやフェルラ酸を結合させたモデルより、V332、F333、F334 は基質の側鎖と相互作用することが推測された(図 2)。イソオイゲノールとフェルラ酸の違いは側鎖構造にあるので(図 1)、側鎖と相互作用するこれらのアミノ酸残基に変異を導入することで、フェルラ酸に対する親和性がさらに向上することを予想した。そこで、V332、F333、F334にランダラリーからフェルラ酸に対する活性が上昇した酵素を少りフェルラ酸に対する活性が上昇した酵素を多数取得でき、m258変異体では、活性が 244 倍に向上していた(図 3)。

この変異体では、V332 および V334 が Arg に置換されており、Arg のアミノ基がフェルラ酸のカルボキシ基と静電的相互作用を示すことにより、フェルラ酸に対する親和性が向上したことが示唆された。反応速度定数の解析からも、この変異体のフェルラ酸に対する高い親和性を裏付ける結果を得た。

(3) m258 変異体を利用したパニリン生産

m258 変異体をコードする遺伝子を大腸菌内で発現

させ、フェルラ酸からのバニリン生産を試みた。当該大腸菌はpH 10.0、30 $^{\circ}$ で高い変換活性を示したため、この条件下で 10 mM のフェルラ酸と反応させた。その結果、24 時間で 7.0 mM (1.1 g/L)のバニリンを生産することができた(図 4)。

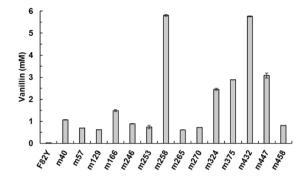


図 3. V332/F333/F334 変異体のバニリン合成活性

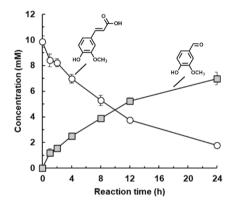


図 4. m258 変異体を利用したフェルラ酸からのバニリン生産

4. 今後の展望

本研究では、フェルラ酸を一段階でバニリンに変換する微生物酵素の開発に初めて成功した。米ぬかや小麦ふすま等の農産廃棄物から豊富に得られるフェルラ酸を、開発した酵素と常温で混ぜるだけでバニリンを生成できるため、確立した技術はナチュラルかつサステナブルなバニリン生産手法を提供することができる。今後は、酵素のさらなる高活性化や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予定である。

文 献

- 1) Furuya, T., *et al.*: *ChemBioChem*, **15**, 2248 (2014).
- 2) Fujimaki, S., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **90**, e0023324 (2024).

NRPS 由来アデニル化ドメインを用いた ジケトモルフォリンの効率的合成法の開発

星 くるみ 1・唐鎌 翔大 1・鈴木 伸 2・木野 邦器 1.2 *

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科応用化学専攻,² 早稲田大学理工学術院総合研究所 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 早稲田大学先進理工学研究科

Tel: 03-5286-2918 E-mail: kkino@waseda.jp

1st step Hydroxyamide synthesis by chemoenzymatic amide bond formation

HO OH +
$$H_2N$$
 OH Adenylation enzyme HO H_2N OH H_2N H_2N H_3N H_4N H_4N H_4N H_5N H_5N

2nd step Diketomorpholine synthesis by intramolecular cyclization

ジケトモルフォリン (DKM) は、ヒドロキシ酸とアミノ酸から成る最小の環状デプシペプチドであり、多様な生物活性や機能性が期待できるが、構造類似体の環状ジペプチドであるジケトピペラジン (DKP) に比べると報告は多くない. 我々は独自に開発した化学酵素的アミド結合形成反応によって、キラリティを制御した任意のジペプチドや DKP の 1 ポット合成に成功している 11 . ヒドロキシ酸を基質とするアデニル化ドメインを本法に適用することで、新たにヒドロキシアミドも合成可能となることを明らかにしたが、自発的環化反応が律速となって DKM の合成収量は低い. 本研究では、ヒドロキシアミド合成後に水を除去してから有機溶媒を添加するという 2 ステップ反応系を構築することで、cyclo (L-PLA-L-Pro) や cyclo (D-PLA-D-Pro) などの DKM の効率的合成に成功した. 多様な生物活性の発現が期待される DKM を供給可能とする本研究成果は、創薬をはじめ産業上有用な多くの生理活性化合物の開発研究に貢献する.

1. はじめに

ジケトモルフォリン(DKM)はヒドロキシ酸とアミノ酸から成る最小の環状デプシペプチドで、類似の環状ジペプチドであるジケトピペラジン(DKP)に比べ報告は多くないが、多様な生物活性や機能性が期待できる.

我々はこれまでに、独自に開発した NRPS 由来アデニル化ドメインを利用する化学酵素的ジペプチド合成法において、キラリティを制御した任意のジペプチドや DKP を pH 制御によって 1 ポットで合成することに成功している 11 . 本手法の特徴は、基質のアミノ酸に対し、求核剤として任意のアミノ酸やその誘導体を導

入でき、アミノ酸エステルを導入することで合成する ジペプチドエステルは温和な条件下で自発的に環状化 することにある.

単独発現させた Brevibaci//us parabrevis IAM 1031 のチロシジン合成酵素由来のアデニル化ドメイン(TycA-A) は、L、D-アミノ酸や非天然アミノ酸に加えてヒドロキシ酸やケト酸も認識してアデニル化することを見出した。そこで、DKP 合成法を適用して DKM の効率的合成法の開発を試みた。しかし、ヒドロキシアミド合成は進行するが、自発的環化による DKM の生成量は極めて少なかった²⁾. 本研究では、DKM 合成における最適な環化条件の検討を行った。

2. 材料と方法

NRPS 由来アデニル化ドメインである TycA-A と、ピロリン酸分解酵素である大腸菌由来のピロホスファターゼ(PPase) をそれぞれ大腸菌で高発現させ、精製・取得し、精製酵素反応系で実験を行った。

DKP 合成法を適用し、ヒドロキシ酸の L-フェニル乳酸 (L-PLA) をアデニル化基質、アミノ酸メチルエステルの L-Pro-OMe を求核剤として DKM の合成を検討したところ、DKM の合成量は少なかった。これは、ヒドロキシアミドエステルの末端のヒドロキシ基が、ジペプチドの末端のアミノ基と比べて求核活性が低いため環化反応が律速となったと推察した。そこで、求核剤を Proとしてヒドロキシアミドを合成した後、環化反応を進行させる 2 ステップ反応系を考案して検討を行った.

3. 結果と考察

(1) 2 ステップ反応系による DKM 合成法の構築

アデニル化基質の L-PLA と求核剤の L-Pro に対して TycA-A と PPase の 2 種類の酵素を添加し、ATP と Mg^{2+} 存在下でヒドロキシアミドを合成した。その後、環化 反応促進を狙い、酸触媒として希硫酸を添加した.

HPLC による分析の結果, 2 ステップ反応系において DKM の生成を確認し(図 1)酸触媒の添加で環化が促進されることがわかった. しかも, アデニル化基質をエステル体にする必要もなくなった.

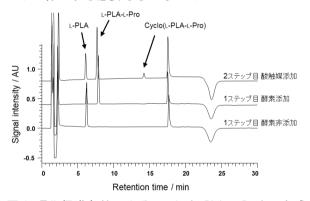


図 1. 環化促進条件による cyclo(L-PLA-L-Pro)の合成

(2) DKM 合成における水の除去効果の検討

2 ステップ目について、酸触媒の添加に加え、環化の逆反応を防ぐために水を除去して有機溶媒への置換を検討した、水から置換する有機溶媒の種類によるDKM 合成量及び、置換しない場合の合成量を比較した、

その結果、有機溶媒に置換せず水のままよりも、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノールに置換した方が DKM の合成量が多かった(図 2). 特にアセトニトリルへ置換した場合に cyclo(L-PLA-L-Pro)の合成収率が最も高い結果であった. なお、希硫酸無添加では DKM

は合成されず、環化促進として酸触媒の重要性が明らかとなった。

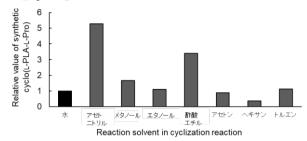


図 2. 環化反応における溶媒置換の効果 (水溶媒を基準とした cyclo(L-PLA-L-Pro)合成量の相対値)

(3) 各種基質の組み合わせによる DKM 合成反応

基質と求核剤には複数の組み合わせを検討したが、L,D-PLAに対し、L,D-ProやL-Hydroxyproline(L-Hyp)を求核剤とする組み合わせによる DKM 合成時の HPLC分析結果を図3に示した. 基質と求核剤がL-体あるいはD-体同士の方が DKM の合成量が多く、立体構造的に環状化しやすい可能性が考えられる.

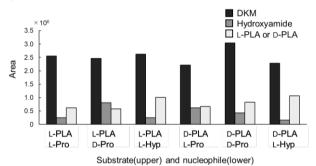


図3. 基質の組み合わせによる DKM 合成反応の比較

4. 今後の展望

本研究では、化学酵素的アミド結合形成反応を用いたヒドロキシアミド合成に加え、環化条件の検討により、効率的な DKM 合成法の開発に成功した。本手法は精製酵素反応系で実施しているが、我々はヒドロキシアミドがプロテアーゼ耐性を有することも見出しているため、菌体反応系でのヒドロキシアミド合成も検討し、工業的に導入しやすい DKM 合成法の開発を目指す。また、合成した DKM の機能性や活性評価を実施し、用途開発や各種産業分野への展開を図る。

文献

- Karakama, S., Suzuki, S., Kino, K., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 106, 4469-4479 (2022).
- 2) 唐鎌翔大, 鈴木伸, 木野邦器, 第73回日本生物 工学会, 要旨集: G2H3-0205, p.114 (2021).

自己抗体バイオマーカーの網羅的定量評価システム開発と 機械学習を用いたがん識別能の向上

宮本 愛 ・森 壮流 ・伊達 実鈴 ・ 本莊 知子 ・

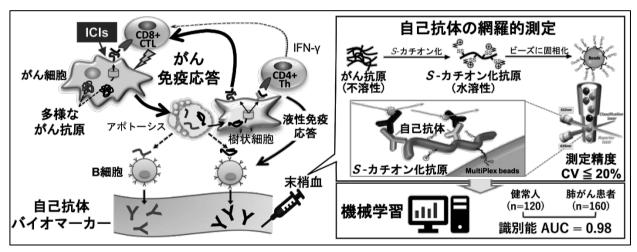
大橋 圭明²·木浦 勝之²·垣見 和宏³·二見 淳一郎 ^{1*}

¹ 岡山大学大学院・ヘルスシステム統合科学、² 岡山大学病院・医歯薬 、³ 近畿大学・医 〒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 蛋白質医用工学分野

Tel: 086-251-8217

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

Graphical abstract



【要旨】

がん治療において、延命効果が期待できる「がん免 疫治療」では、がん免疫応答の活性化が治療効果と相 関している。しかし、投薬後の腫瘍に対する免疫応答 は個々人で大きく異なり、治療効果にも個人差が見ら れる。このため、個々人のがんと免疫の相関関係をプ ロファイリング・モニタリングする技術の開発が求め られている。そこで、当研究室では免疫系から異物と して認識されるがん抗原タンパク質群に対する自己抗 体を網羅的に定量評価するシステムである MUSCAT-Assav (Multiple S-cationized antigen beads array assay)の実用化研究に取り組んでいる。現在、118 種 類の自己抗体測定パネルをプロトタイプとして整備し、 測定精度が20%以下の精密測定系を完成させた。また、 健常人 (n=120) と肺がん患者 (n=160) の自己抗体測定結 果を機械学習(cross-validation)で解析した結果、識 別能は AUC:0.98 となり、極めて高い精度での識別が 可能であることが示された。

1. はじめに

がん患者にとって、がん免疫治療は有効な治療法の 1 つとなってきた。特に免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs) は、現在、がん免疫応答を活性化するための 最も有望な治療法である。しかし、腫瘍に対する免疫 応答は個々人で大きく異なるため、治療効果を示す患 者も限定的である。ICIs の治療効果を予測するバイオ マーカーは盛んに研究されており、現在、腫瘍 PD-L1 発現や腫瘍遺伝子変異量(TMB)、マイクロサテライト不 安定性(MSI)が治療効果予測に用いられている 1-3)。 し かし、これらのバイオマーカーは腫瘍組織を使用する ため、腫瘍の不均一性や高い侵襲性などの課題がある。 このため、日常診療の血液検査の残渣でも対応可能な 低侵襲な免疫プロファイリング・モニタリング技術が 期待されている。そこで我々は、がん免疫サイクルの 活性化に伴って上昇する「がん抗原に対する自己抗体 群」がバイオマーカーになると考え、測定系の実用化 研究に取り組んでいる。

2. 方法および結果

(1) MUSCAT-assay システムの作製

がん抗原タンパク質群の大半は不安定で凝集しやすい物性である 4 。このため、タンパク質の Cys 残基に化学修飾法で正電荷を導入することでタンパク質を可溶化する \mathcal{S} -カチオン化法で全長・水溶性抗原を取得した。これらの 118 種類の抗原は Multi-plex 磁気ビーズに固相化し、自己抗体群を同時に多項目で定量評価できる MUSCAT-assay (Multiple \mathcal{S} -cationized antigen beads array assay) システム 5 を作製した。

(2) 測定精度評価

MUSCAT-assay システムにおける測定データの信頼性を保証するために、S-カチオン化抗原をウサギに免疫して陽性コントロールとなるウサギポリクローナル抗体を取得する方法 ®を確立し、59 種類の陽性コントロール抗体を取得した。これらを用いて MUSCAT-assayシステムの測定精度を評価した結果、アッセイ内測定精度は 20%以下、アッセイ間測定精度は 30%以下であり、一般に臨床診断薬で求められる精度を達成した。

(3) がん識別性能評価

118 種類の自己抗体測定パネルを用いて、健常人 120 名と非小細胞肺がん患者 160 名の血漿における自己抗体プロファイルを測定し、MUSCAT-assay システムのがん識別能を統計学的手法と機械学習を用いて評価した。健常人の血漿は、がんや自己免疫疾患の既往歴のない120 人分(20-39 歳、40-59 歳、60-79 歳の各女性 20 人、各男性 20 人)を東北メディカル・メガバンク機構から入手した(研究番号 2021-0056)。肺がん患者の血漿は、岡山大学病院の岡大バイオバンクから入手した(岡山大学倫理委員会:申請番号 1903-028)。

統計学的手法を用いた評価では、健常人における各自己抗体測定値の平均+2標準偏差以上を「陽性」と定義し、陽性数を元に ROC 解析 (Receiver Operating Characteristic analysis) を行った。その結果、識別能 AUC:0.88、感度:78.1%、特異度:85.0%となった(図1A)。

機械学習を用いた評価では、ランダムフォレスト法で教師あり学習アルゴリズムを適用し、その識別能評価には一つのコホート内で判別性能を検証することができる層化5分割クロスバリデーションを用いた。解析の結果、識別能 AUC:0.98、感度:96.3%、特異度:91.1%となり、機械学習を用いることで識別能が向上した(図18)。

以上の結果から、末梢血中の自己抗体はがん免疫応 答と相関するバイオマーカーとして有用であることが 示された。

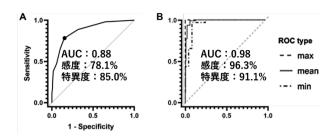


図 1. がん識別能評価 A. 統計学的手法、B. 機械学習

4. 今後の展望

本システムが、がん免疫治療の効果予測にも有用であることを示すために自己抗体の測定・解析を進める。機械学習においては、解析するバイオマーカーの数が多いと過剰適合が起こり、予測の精度が低下することがあるため、使用する自己抗体数の絞り込みも視野に入れて研究を行う予定である。

5. 謝辞

本研究の一部は JST-START プロジェクト支援型、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2126、JSPS 科学研究費助成事業 22H01881 の支援により行われた。

6. 参考文献

- 1) Lizza E. Hendriks *et al.*, *linical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy*, **7(6)** 647-660 Transl Lung Cancer Res (2018)
- 2) Galina G Lagos *et al.*, *Beyond Tumor PD-L1: Emerging Genomic Biomarkers for Checkpoint Inhibitor Immunotherapy*, **40** 1-11 Am Soc Clin Oncol Educ Book (2020)
- 3) Jonathan C Dudley *et al.*, *Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade*, **22(4)** 813-20 Clin Cancer Res (2016)
- 4) Ahmadi, H. et al., Unusual aggregation property of recombinantly expressed cancer-testis antigens in mammalian cells, 170, 435 J. Biochem. (2021)
- 5) Futami, J. et al., Sensitive Multiplexed Quantitative Analysis of Autoantibodies to Cancer Antigens with Chemically S-Cationized Full-Length and Water-Soluble Denatured Proteins, 26, 2076 Bioconjug. Chem. (2015)
- 6) Miyamoto, A. et al., Engineering Cancer/Testis Antigens With Reversible S-Cationization to Evaluate Antigen Spreading, 12:869393 Front. Oncol. (2022)

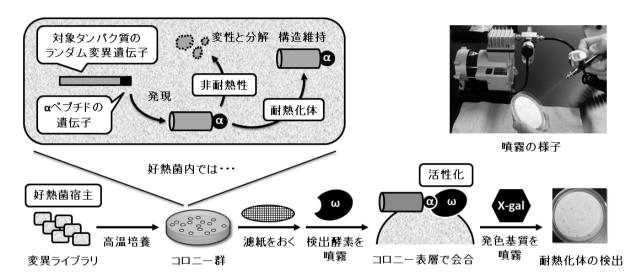
耐熱化変異タンパク質をスクリーニングするための新手法

吉村 俊祐¹·森下 松太¹·大城 隆^{2,3}·鈴木 宏和^{2,3}*

「鳥取大学大学院持続性社会創生科学研究科,²鳥取大学工学部, ³鳥取大学工学部付属グリーン・サスティナブル・ケミストリー研究センター

〒680-8552 鳥取県鳥取市湖山町南 4-101 鳥取大学工学部

Tel: 0857-31-5907 Fax: 0857-31-0881 E-mail: hirokazusuzki@tottori-u.ac.jp



要旨

任意タンパク質のランダム変異遺伝子を発生させる ことは容易だが、得られたライブラリから耐熱化変異 体をコードするものを同定するのは難しい。本研究で は、耐熱化変異体を生産するコロニーを簡便にスクリ ーニングできる新手法を開発した。その原理は、耐熱 化変異体が好熱菌中で安定に維持されるという仮説に 基づき、本手法は好熱菌コロニー中の対象タンパク質 を視覚的に検出することを可能にする。検出のために 本研究では耐熱性 LacZ を探索し、その ω 断片が α 相 補性を示すことを確認した。モデル酵素を α 断片と融 合させながら好熱菌 K1041 株中で生産させ、ω断片つ づいて発色基質(X-gal)を噴霧したところ、期待通り コロニーが青く呈色した。注目すべきことに、耐熱化 変異体を生産するコロニーは、非耐熱性の野生型酵素 を生産するコロニーより強く呈色した。本結果は、当 該工程により耐熱化変異体を生産するコロニーを直接 検出できることを暗示する。モデル酵素の変異ライブ ラリを構築し、同工程によって陽性株をスクリーニン グした。得られた陽性株がもつ変異遺伝子は耐熱化変 異体をコードしており、本手法が耐熱化変異体のスク リーニングに実用的であることが示された。本手法の スクリーニングは対象タンパク質の機能に依存せず、 原理上はあらゆるタンパク質を対象にできる。このよ うな手法の前例は少なく、多様なタンパク質からの耐 熱化変異体の創出に有用と期待できる。

背景と目的

酵素触媒は、様々な産業分野での高度利用が期待されているが、常温菌由来の酵素は安定性が乏しく、長期利用や保存が難しいという弱点をもつ。また高度好熱菌や超好熱菌に由来する酵素は、安定性に優れるものの反応至適温度が高温領域にあるものが多く、常温での利用が望ましい業界においては利用しづらい。同様な課題は、酵素に限らず他タンパク質(抗体など)についても共通で、このことから非耐熱性(不安定)のタンパク質から耐熱化(安定化)変異体を創り出す研究が今も広く行われている。

耐熱化変異タンパク質を創出する手法として、様々なものが提案されてきた。ある手法では、タンパク質の立体構造に基づき、自由エネルギー計算や分子動力学計算を行いながら合理的に耐熱化変異体を設計する。これには対象タンパク質の立体構造情報が必須であり、そのような情報がないタンパク質に対しては適用でき

ない。近年の AI 技術は、迅速なタンパク質立体構造予測を可能にしているが、耐熱化変異の予測については発展途上の段階である。

他手法としては、進化工学的にランダム変異遺伝子を発生させ、得られたライブラリから耐熱化変異体の遺伝子をスクリーニングするものがある。この手法は幅広いタンパク質を対象にできるが、スクリーニング工程に膨大な労力と時間ならびに経費が費やされる。汎用的かつ簡便なスクリーニング法も提案されているが、課題が残されているためか実施例は少ない。現状として、耐熱化変異タンパク質を創出することは難しく、有用タンパク質の実用化を制限する要因となっている。そこで本研究では、耐熱化変異タンパク質を簡便かつ汎用的にスクリーニングできる新手法の開発に取り組んだ。

作業仮説

発表者らは、Geobaci//us 属好熱菌に関する応用生物学的研究を行っている。研究対象は複数あるが、その中には G. thermodenitrificans K1041 が含まれる。本株は60℃あたりで良好に生育し、電気穿孔法による効率的な形質転換が可能である³³。異種タンパク質は高温培養下で生産されにくい。これはタンパク質が熱変性し、さらには分解されるためと推察できるが、見方を変としてきると好熱菌中で安定に維持されるタンパク質は熱安にと好熱菌中で安定に維持されるタンパク質は熱マク質を簡便に検出することができれば、それは耐熱化変異体のスクリーニングに利用できるかもしれないと考えた。

耐熱性レポーターの探索

上述の仮説を検証するために、耐熱性レポータータンパク質を探索した。好熱菌細胞中の対象タンパク質を検出するためのものだが、対象タンパク質の特性に影響を与えないよう、レポーターは小型であることが好ましい。ここで注目したのが β -ガラクトシダーゼ(LacZ)である。大腸菌 LacZ は、小さい α 断片と大きい α 断片に分割でき、それらは自発的に再会合することで LacZ 活性を回復する。もし好熱菌由来の LacZ に同性質があれば、その α 断片は耐熱性の小型レポーターとして利用できるだろうと考えた。

情報検索により、 /acZ 様遺伝子を G. stearothermophi/us 10 のゲノム配列から見出した。その発現産物(GsLacZ)は二量体で産生され、 β -ガラクトシダーゼ活性を示した。 α 断片(37 残基)と ω 断片に分割したところ、各々は不活性であったが、自発的再会合により LacZ 活性を回復した。 α 断片を熱処理(70°C、1 h)しても、 ω 断片と再会合した。よって当該 α 断片は、十分な耐熱性をもつと考えられた。

作業仮説の検証

以前の研究 $^{5)}$ で実験対象とした熱不安定酵素($PyrF_A$)と、その耐熱化変異体($PyrF_V$)を用いて作業仮説の検証を行った。各酵素の C 末端に GsLacZ の α 断片が融合するような遺伝子を構築し、K1041 株に導入した。得られた形質転換体を 50° Cでコロニー化させ、コロニー上に濾紙を置いた。界面活性剤を濾紙に噴霧し、コロニー中の細胞を部分的に溶菌させた。つづいて GsLacZ の ω 断片を噴霧し、さらに X-gal 溶液も噴霧した。期待通りコロニーの位置に青い呈色が見られたが、その呈色は $PyrF_V$ を生産するコロニーの方が強かった。本結果は、耐熱性のタンパク質は好熱菌細胞内で維持されやすいという仮説を支持していた。

スクリーニングのモデル実験

上述の手法で、耐熱化変異タンパク質がスクリーニングできるかを検証した。変異 PCR 法を用いて $pyrF_A$ のランダム変異遺伝子を発生させ、それらを K1041 株に導入することで変異ライブラリを得た。ライブラリ細胞(約 5000)をコロニー化し、上述の工程で細胞中の $pyrF_A$ を検出した。9 個のコロニーが呈色し、二次スクリーニングを経て 8 個の陽性株を得た。陽性株の $pyrF_A$ 領域を解析したところ、8 個中 1 個は変異がなかったが、残り 7 個には同一の変異が見られた。当該変異遺伝子から発現産物を調製したところ、それは $pyrF_V$ (上記参照)と同等な耐熱性を示した。ライブラリの品質が悪く、複数の変異体を得ることはできなかったが、本手法は耐熱化変異体のスクリーニングに利用できた。

今後の展望

本スクリーニング法は対象タンパク質の機能に依存せず、原理上あらゆるタンパク質を対象にできる。このような手法は前例が少なく、多様なタンパク質からの耐熱化変異体の創出に有用と期待できる。今後は実施例を増やし、本手法によりできることと、できないことを明らかにしていきたい。少なくともライブラリ構築の効率化は、解決すべき課題だと考えている。

参考文献

- 1) Chautard, H., et al.: Nat. Methods, **4**, 919-921 (2007).
- 2) Asial, I., et al.: Nat. Commun., 4, 2901 (2013).
- 3) Koyama, K., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**, e0105122 (2022).
- 4) Kurashiki, R., *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **107**, 7475–7488 (2023).
- 5) Suzuki, H., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 149-158 (2015).

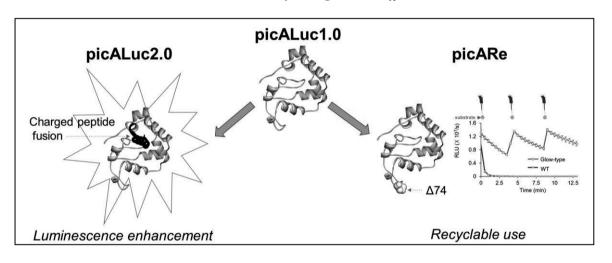
最小サイズの発光酵素 picALuc の改良:

"picALuc2.0" & "picARe"

大室(松山) 有紀1*・古田 忠臣2

¹ 島津製作所基盤技術研究所,² 東京工業大学生命理工学院 〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-9-4 島津製作所基盤技術研究所

> Tel: 0774-39-3397 Fax: 0774-39-3829 E-mail: omuro.yuki.cc9@shimadzu.co.jp



要旨

発光酵素は、レポータータンパク質として、基礎研究分野から診断・検査までの幅広い分野で利用されている。前回、実用レベルの明るさをもつ発光酵素の中で世界最小サイズの発光酵素 picALuc について発表した。今回、明るい picALuc 変異体 "picALuc2.0"、および長時間発光が持続し、さらに Day スケールでリサイクル利用もできる picALuc 変異体 "picARe" について報告する。

背景

レポータータンパク質として、発色酵素、蛍光タンパク質や発光酵素が主に利用されている。発光酵素は、発色酵素・蛍光タンパク質と比較し、バックグラウンドが低いため、S/N 比が高く、検出限界濃度が低いという長所をもつ。一方、蛍光タンパク質と比べて明るさが劣る点、また基質添加直後に最大発光値を示した後、急速に発光値が減衰する点が短所である。

我々は、第74回日本生物工学大会(2022年度)にて、実用レベルの明るさをもつ発光酵素の中で最小サ

イズの発光酵素 "picALuc1.0" (13 kDa・120 アミノ酸) の開発について発表した 1)。サイズが小さいと、標的 タンパク質の機能に影響を与えにくく、発現時に正しいフォールディングになりやすく、さらにコードする 遺伝子が短いことによりゲノム挿入効率が高いため、レポータータンパク質としての有用性が高まる。本大会では2つの picALuc 改変体の開発について報告する。

picALuc2.0 の開発

開発当初はウイルス検出用にウイルス由来プロテアーゼ検出系の開発を狙っていた。そこで picALuc1.0 の末端にモデルとして TEV プロテアーゼ認識配列 (7 アミノ酸) を付加し、さらに末端に荷電アミノ酸を付加すれば、プロテアーゼで処理した際、ON 型もしくはOFF 型のセンサーにならないかと考えた。

センサーとはならなかったものの、面白いことに、 C 末端に付加した場合、正電荷アミノ酸 (Arg, Lys)・ 負電荷アミノ酸 (Asp, Glu) のいずれを利用した場合も、 発光値の顕著な上昇が見られた。そこで、発光値の増 強へと目的を切り替え、ポリアラニンや Gly-Ser (GS) リンカーを用いたリンカー長の影響および TEV プロテアーゼ認識配列の各位置の Ala 置換などのスクリーニングを実施した。その結果、TEV プロテアーゼ認識配列の 7 番目を Ala に置換し、末端に Lys (K)を付加した場合、picALuc1.0 より約 50 倍にも及ぶ高い発光値を示した(図 1)。我々は、この明るい picALuc 改変体を"picALuc2.0"と名付けた 2 。

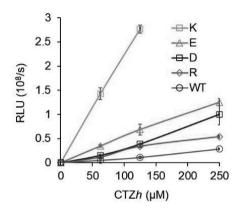


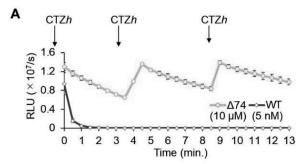
図 1 荷電ペプチド付加による発光値変化 横軸:基質濃度、縦軸:発光値。エラーバー:SD(n=3)。

picARe の開発

picALuc を含む多くの発光酵素において、反応基質由来の副生成物等が原因で酵素が不活性化するために、基質添加直後に最大発光値を示した後、急速に発光が減衰してしまう(このような発光パターンを Flash 型発光と呼び、逆に発光減衰が緩やかな発光パターンを Glow 型発光と呼ぶ。)。発光減衰後に基質を再添加しても発光は回復せず、酵素を再添加すると発光が回復する。 すなわち、基質は不足しておらず、酵素の不活性化が Flash 型発光の要因となっている。

我々は偶然、picALuc1.0 の残基番号 70-78 からなる ループ部分においていずれかのアミノ酸を欠失させる と、発光値はかなり低下するものの、Glow 型発光になることを見出した。基質の再添加により、発光値が回復することから、この欠失変異体では、酵素の不活性 化がほとんど起きていないことも示唆された(図2A)。

さらに、初めの基質添加から1日室温で反応液を置いた後も、基質を再添加すると85%の発光値を維持していた。また2日後でも71%の発光値を示した(図2B)。このようにDay スケールで再利用ができるのは、酵素の不活性化が起こりにくいことに加え、picALucの熱安定性が高いためである¹⁾。我々は、このpicALuc変異体に、Revial、Reuse、Recycleの意味を込め、"picARe"と名付けた³⁾。



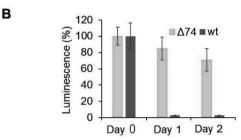


図2 picARe の発光

横軸:時間 (A: min、B: day)、縦軸:発光値。エラーバー: SD (n=3)。

結論・今後の展望

明るい picALuc2.0 の開発により、より高感度な検出が可能となった。 さらに明るく、発現量が多い picALuc2.1 を現在開発しており、多色化などを含め多様な応用が考えられる。

Glow 型発光を示す発光酵素は picARe 以外に 2 酵素のみしか報告がなく 4.5)、その中でも Day スケールでリサイクル利用できるのは picARe のみである。、蛍光タンパク質においても光照射による退色がしばしば問題になることから、基質がある限りほとんど光減衰をしないという点で picARe は優れており、経時的測定や簡易計測への応用が考えられる。

今後も picALuc は進化し続け、その利用用途が広まることが期待される。

参考文献

- Ohmuro-Matsuyama Y et al., ACS Chem. Biol. 17, 864-872 (2022)
- Ohmuro-Matsuyama Y et al., Biotechnol. J. 18, e2200560 (2023)
- 3) Ohmuro-Matsuyama Y et al., FEBS J. 290, 5554-5565 (2023)
- Bessho-Uehara M et al., Luminescence 32, 924-931 (2017)
- 5) Schenkmayerova A et al., Nat. Commun. 12, 3616 (2021)

細菌集団の遺伝子発現モニタリングのための 低インプット RNA-seq の開発

西村 美郁 1,2·林 哲太郎 5·久世 真理子 5·二階堂 愛 5,6·

竹山 春子 1, 2, 3, 4 • 細川 正人 1, 2, 3, 4 *

¹早稲田大学大学院先進理工学研究科、²産総研・早大生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ、³早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構、⁴早稲田大学先進生命動態研究所、

5理化学研究所生命機能科学研究センター, 6東京医科歯科大学難治疾患研究所

〒169-8555 新宿区大久保 3-4-1 早稲田大学 63 号館 5-11B

Tel: 03-5286-8386

E-mail: masahosokawa@aoni.waseda.jp

解析対象と細菌集団の遺伝子発現動態

開発技術 低インプット・高感度・高時間分解能

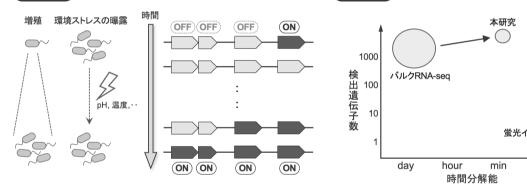
必要細胞数

0

SAC

10²

10⁶



細菌の増殖過程や環境ストレス応答における遺伝子発現動態の理解は、基礎生物学やバイオものづくり応用において重要である。RNA-seq は未知の転写産物を含む網羅的な遺伝子発現の評価が可能である。しかし、市販の RNA 抽出試薬と RNA-seq 試薬を使用したプロトコルは、百万から十億個程度の細胞数を要求し特に培養初期の分析が困難であった。コストの面からも多数サンプルの一括解析には不向きなことも課題である。そこで、本研究では我々がこれまでに開発した細菌 1 細胞 RNA-seq 技術 ¹⁾ を応用して、1000 細胞相当の低インプット試料(セミバルク試料)から並列的に RNA-seq を実施する手法を開発した。本手法は分析に必要とする細胞数が非常に少ないため、これまで解析が難しかった培養初期の細菌や難培養性の細菌、さらにプロテオミクスやメタボロミクスとの統合解析にも適用できる。

1. はじめに

細菌の遺伝子発現解析には、FISH などの蛍光イメージングや、細胞中の RNA 分子配列を捉える RNA-seq が用いられている。蛍光イメージングは、形態学的特徴を含む多角的な解析が可能だが、プローブ設計を必要とし、解析可能な遺伝子数が限られる。RNA-seq は、全ての転写産物を捉えることができ、未知の転写物の同定も可能である。一度の解析で複数試料の分析を実

行できるため、時系列でサンプリングされた試料などの比較解析に適する。しかし、一般的な手法ではシーケンス解析に足る核酸を確保するために 10⁶ 個以上の多数の細胞を要求する。そのため、細胞数が少ない増殖初期の培養液や RNA 発現が抑制される培養後期の培養液を連続的に分析することが困難であった。この課題の解決には、RNA が微量な低インプット試料からの高感度な遺伝子発現検出と、多試料の一括分析を可能にするスループットを兼ね備える必要がある。この実現のために、本研究では、我々がこれまでに開発した

高感度な細菌 1 細胞 RNA-seq 技術を基盤とした技術開発を行った(図 1)。本技術は、真核細胞の 1 細胞 RNA-seq のために開発された RamDA-seq²⁾を改良した手法である。RamDA-seq はランダムプライミングと鎖置換増幅による全転写産物の完全長に近い捕捉を特徴とする。

本研究では、本技術を大腸菌などの頻用される細菌のセミバルク試料に適用し、細菌集団の増殖過程における遺伝子発現モニタリングの実行性を評価した。

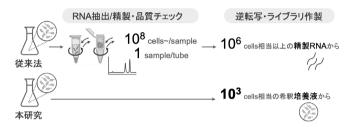


図 1. 従来のバルク RNA-seg 手法と本手法の比較

2. 材料 · 方法

Escher ichia coli K-12 を LB 培地で一晩振盪培養後、1:50 の割合で新たな LB 培地に移し 37℃, 200 rpm で培養した。培養後 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 分の 10 時点で培養液を回収し、吸光度計で 0D₆₀₀ 値を測定した後、-80℃で保管した。氷上で融解した培養液を 0D₆₀₀ 値に基づいて希釈し(N=3)、約 1000 細胞を含む細菌懸濁液を RNA-seq 処理の試料とした。RamDA-seq² をベースとした細菌 RNA-seq は既報のシングルセル反応 ¹² と類似の手順で行い、低インプット試料から RNA 抽出を必要とせずに RNA-seq データを取得した。

3. 結果 考察

各時点の約 1000 細胞相当の低インプット試料から 検出された遺伝子数は 3000 遺伝子以上であり、大腸 菌ゲノム上遺伝子の 70%程度を網羅した。10⁶以上の細 胞数を必要とする従来のバルク RNA-seq と同等の遺伝 子検出感度を 3-4 オーダー少ない細胞数で実現した。 最短 15 分毎にサンプリングした各時点の遺伝子発現パターンを比較することで、増殖初期から後期にかけての動的な発現遺伝子の変化の様子が捉えられた(図 2)。また、発現変動遺伝子の発現強度をヒートマップで可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視化した結果、培養初期は転写翻訳や生合成が で可視れていたるとが示された(図 3)。

以上の結果より大腸菌において、本技術が約 1000 細胞程度の低インプット試料からの遺伝子発現解析を実

現し、多時点における網羅的な遺伝子発現情報の取得を可能とすることを実証した。

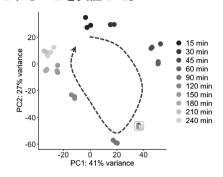


図 2. 大腸菌の増殖過程に沿った 遺伝子発現パターンの経時変化

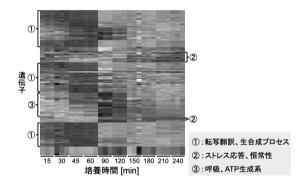


図 3. 大腸菌の増殖過程に応じた 細胞内活性化機能の変化

4. 今後の展望

本技術は、様々な培養条件下や環境ストレス下での 細菌の遺伝子発現応答を高い時間分解能で網羅的に解 析することを可能にする。これにより、細菌の生理機 能の理解が深まるだけでなく、バイオものづくりなど 細菌を利用した応用分野での貢献が期待される。分析 に必要とする細胞数が非常に少ないため、これまで解 析が難しかった培養初期の細菌や難培養性の細菌、さ らにプロテオミクスやメタボロミクスとの統合解析に も適用できると考える。

謝辞

本研究は JST 革新的 GX 技術創出事業ならびに創発 的研究支援事業の支援を受けたものです。

体文

- Nishimura, M. et al., J. Biosci. Bioeng., 136, 152-158 (2023)
- 2) Hayashi, T. et al., *Nat Commun.*, **9**, 619 (2018)

AI によるデザインと生細胞イメージングを用いた評価による 細胞内抗体の開発

大樹 1* · 佐藤 優子 1,2 · Stasevich Timothv^{2,3} · 木村 宏 1,2 前島

1東京工業大学生命理工学院,2東京工業大学科学技術創成研究院,

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology. Colorado State University 〒226-8503 横浜市緑区長津田町 4259 東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学センター 木村研究室

Tel: 045-924-5742 Fax: 045-924-5742

E-mail: maejima.d.ab@m.titech.ac.jp; hkimura@bio.titech.ac.jp

■ AIツールを用いた細胞内抗体の設計

Original scEv



MAOVOLOOSGAELMKPGASV KISCKATGYTFSSYWIEWVK ORPGHGLEWIGEILPGSGSN NYNEKEKGKATETADTSSNT AYMQLSSLTSEDSAVYYCAS TDGYYWGQGTLVTVSAGGG.



</>

入力したタンパク質立体構造と 同じ構造をとることが予想される 配列を設計

V





■生細胞イメージング等を用いた評価

α-H4K16ac original scFv - sfGFP



抗体配列由来scFvの多くは 細胞内での機能的発現が困難 (標的ヒストン修飾が存在する 核内に局在しない)



凝集性の低下 発現量と熱安定性の向上 タンパク質分解の抑制 など





プローブの機能性 (核局在性)の向上

本手法を用いることで、細胞内scFv抗体の開発が飛躍的に進むと期待できる。

一本鎖可変領域抗体(scFv)や細胞内抗体(intrabody)といった低分子抗体は構造安定性が低く、 その多くは細胞内での機能的発現が困難であった。本研究では、ヒストン修飾特異的抗体に関し て、AIを用いた方法により安定性の高い細胞内抗体を設計し、生細胞イメージング等を用いて機 能性を評価した。

その結果、新たに7種類のヒストン修飾抗体について、機能的細胞内抗体を得ることができ た。AI ツールを用いて設計した細胞内のプローブは、オリジナルの scFv と比べて、凝集性の低 下、発現量と熱安定性の向上、タンパク質分解の抑制などが見られ、これらの性質の改善により 細胞内抗体として機能を発揮すると考えられる。

この手法は、任意の抗体からの細胞内抗体の開発に用いることができるため、様々なセンサー 開発や創薬への広い範囲での応用が期待できる。

1. はじめに

一本鎖可変領域抗体(scFv)やこれを細胞内で発現さ せた細胞内抗体(intrabody)といった低分子抗体は医 療や生命科学分野における実験技術の開発に重要であ る。しかし、scFv の多くは細胞内で構造安定性が低く、 機能的分子として発現させることは容易ではない。こ

れは主に、本来細胞外タンパク質である抗体の内部で 形成されるジスルフィド結合が、還元環境である細胞 質や細胞核内では形成されないためであると考えられ る」。また、多くの抗体クローンに適用可能な汎用的な 細胞内抗体開発手法が確立されておらず、開発スルー プットが低いことが問題となっている2。

本研究では、ヒストン修飾特異的抗体に関して、AI

ツールを用いた方法により安定性の高い細胞内抗体を設計し、生細胞イメージングプローブとしての機能性を評価した。これにより、スループットの高い細胞内抗体開発プラットフォームの構築を試みた。

2. 方法

AIツールを用いた細胞内抗体の設計

主に以下の工程で細胞内抗体を設計した。

- i. 抗体の配列から抗原結合部位を含む領域(可 変領域)を抽出し、小分子化したオリジナル scFv 配列を設計した。
- ColabFold (AlphaFold2 の利便性改良版)^{3,4}を 用いてオリジナル scFv の立体構造を予測した。
- iii. オリジナル scFv の予測構造を ProteinMPNN (Protein message-passing neural network)⁵ に入力し、構造安定性が高いと予想される scFv 配列を設計した。ProteinMPNN は、ディープニューラルネットに基づき、入力したタンパク質立体構造と同じ構造をとることが予想される配列を設計するプログラムである。この設計に基づき作製されたタンパク質は、発現量や構造安定性などが向上することが報告されている⁶。なお、抗原特異性の変化を防ぐため、抗原結合部位周辺3A以内のアミノ酸残基は固定した。

生細胞イメージングを用いた機能性の評価

ー種類の抗体につき基本的に 5 つの設計 scFv をコードする DNA を合成し、sfGFP を融合したプローブを培養細胞で発現させ、生細胞イメージングにより核局在性を計測した。これにより、核内の標的に結合しうるかどうかを評価した '。

3. 結果と考察

AI ツールを用いた設計の結果、scFv 配列全体の約 三割に及ぶ大幅なアミノ酸残基の変異が導入された。

生細胞イメージングを行い、核/細胞質輝度比を計測することで核局在性を定量した結果、7種類のヒストン修飾抗体において、少なくとも1つの核局在性が高い細胞内抗体を得ることができた(表1)。

設計した細胞内抗体の特異性を検証するため、H3K14ac(ヒストンH3の14番目のリジン残基のアセチル化修飾)などのヒストンアセチル化に特異的な細胞内抗体について、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(TSA, Trichostatin A)で処理した。その結果、核局在性が増強したことから、これら細胞内抗体の特異性は維持されていると考えられた(図1)。

細胞内抗体発現細胞の抽出液や in vitro 翻訳産物

のウェスタンブロッティングの結果、設計した細胞内 抗体はオリジナルの scFv と比べて、凝集性の低下、発 現量と熱安定性の向上、タンパク質分解の抑制などが 見られた。これらの性質の改善により細胞内抗体とし て機能を発揮すると考えられる。

表 1. 生細胞イメージングによる細胞内抗体の評価

ζ 1. — Т-/үЩ	יין ויטת		/ IC	וו נסי ע	当にいっ	コントト	キャンロエル	щ
Target	Clone	d1	d2	d3	d4	d5	others	_
H3S10ph	7G1G7	+	+	+	++			
H4K16ac	1B2			++		+		
H3K14ac	7G8	++		+				
H3K36me3	13C9		++			+		
H3K27ac	9E2H10						+	
H3K4me3	16H10				+			
H3K4me2	27A6		+	+				
H3K36me2	2C3							
H3K9me3	2F3							
γ H2AX	37C9							
γ H2AX	30F7							

++: highly functional

+ : functional

α-H3K14ac designed scFv-sfGFP

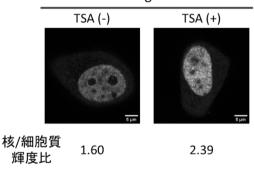


図 1. 細胞内抗体プローブの蛍光顕微鏡画像

謝辞

本研究は、部分的に株式会社島津製作所との共同研究として実施され、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム(JPMJSP2106)および科研費(JP21H04764、JP24H02325)の支援を受けた。

参考文献

- 1) Sato Y. et al. J Mol Biol 428, 3885 (2016)
- 2) Sato Y. et al. *Microscopy* **70**, 415 (2021)
- 3) Mirdita M. et al. Nat Meth 19, 679 (2022)
- 4) Jumper J. et al. *Nature* **596**, 583 (2021)
- 5) Dauparas J. et al. *Science* **378**, 49 (2022)
- 6) Sumida K. et al. *JACS* **146**, 2054 (2024)

Ra/stonia eutropha 改変株によるアミノ酸由来 2-ヒドロキシアルカン酸ユニット含有ポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成

石原 静流 1·折田 和泉 1·松本 謙一郎 2·福居 俊昭 1*

1東京工業大学生命理工学院,2北海道大学工学研究院

〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259 東京工業大学生命理工学院

Tel: 045-924-5766 Fax: 045-924-5766 E-mail: tfukui@bio.titech.ac.jp

Polyhydroxyalkanoate (PHA)

微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は種々の自然環境における生分解性が高く、難分解性の石油化学プラスチックの代替素材として注目されている。本研究では PHA 素材種の拡張に向け、ポリ (3-ヒドロキシブタン酸) [P (3HB)] 生産菌 Ralstonia eutropha を宿主として 2-ヒドロキシアルカン酸 (2HA) ユニットを含む PHA 共重合体の生合成を目指した。R. eutropha グルコース資化性改変株に、分岐鎖アミノ酸の分解により 2-ヒドロキシアシル-CoA (2HA-CoA) を生成する経路と 2HA-CoA を基質とできる PHA 合成酵素改変体を導入した。この改変株はリン源制限無機塩培地での培養において、3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットに加えて、主にロイシン・バリンに由来した 2HA ユニットを含有した四元共重合体、または六元共重合体を生合成した。

研究背景と目的

近年、難分解性の石油化学プラスチックによる自然環境汚染の深刻化を受け、プラスチックによる環境負荷の軽減に向けた施策が検討されている。その一プラスチックの開発が挙げられる。微生物産生ポリエイスチックの開発が挙げられる。微生物産生ポリエイスチックの開発が挙げられる。微生物産生ポリエイスルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)はババいの出来、かつ、海洋を含は負荷型高分子素材でありよい生分解性を示す環境低負荷型高分子素材でありますである。現在、を関係であれている。現在、といりなる利用である。として、さらなる利用範囲の拡大には、用途に適した物性を発揮する多様なの開発が必要である。

PHA 合成酵素 (PhaC) は PHA 生合成の鍵酵素である。 野生型 PhaC による重合反応は 3 位水酸基特異的であ り、通常、PHA は 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) ユニッ トから構成される。 一方、近年では野生型 PhaC が基質とできない 2-ヒドロキシアシルーCoA (2HA-CoA) を重合できる PhaC 変異酵素がタンパク質工学的改変により取得され、2HA ユニットを含む PHA 共重合体の生合成が可能になった。このような PhaC 変異型酵素として、Pseudomonas sp. 61-3 由来のタイプ II PhaC の二重アミノ酸変異体 PhaC $_{STOK}$ (S325T/Q481K) や、2種類のタイプ I PhaC のキメラ酵素であり、配列制御重合能を示す PhaC $_{AR}$ がある 11 。筆者らはこれまでに、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] 生産菌である Ra/stonia eutropha に PhaC $_{AR}$ を導入した改変株が 3HB と 2-ヒドロキシブタン酸 (2HB) からなる PHA ブロック共重合体を生合成することを示した。また、この過程で R. eutropha における 2HB 代謝関連酵素遺伝子を新たに同定した 21 。

本研究では多様な PHA 共重合体を安価な炭素源から 生合成することを目指し、R. eutropha を宿主とした 種々の 2HA ユニットを含有した PHA 共重合体の生合成 を検討した。

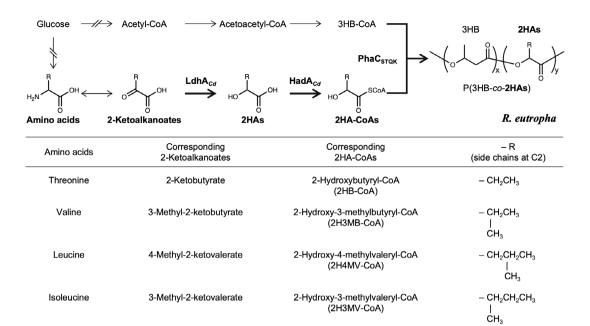


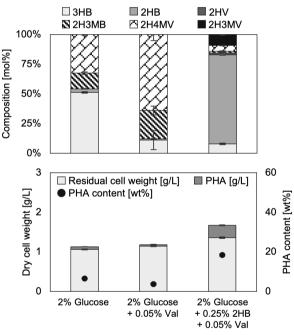
Fig. 1. R. eutropha 改変株におけるアミノ酸由来 2HA モノマーユニット含有 PHA 共重合体の生合成経路。

結果と考察

R. eutropha 染色体上の PHA 合成関連オペロン上の phaC を、各種 2HA-CoA を基質とできることが E. co/i 宿主で報告されている PhaCstox³ の遺伝子へ置換した。また、Clostridioides difficile 由来の 2-ヒドロキシ酸脱水素酵素 LdhA_{Cd}、CoA 転移酵素 HadA_{Cd}をコードする遺伝子を R. eutropha 染色体上の高発現領域に挿入した。これら外来酵素により分岐鎖アミノ酸の分解で生じた 2-ケト酸を還元し、CoA 化することで生成した 2HA-CoA を重合する代謝経路を構築した(Fig. 1)。

作製株をグルコースを炭素源としたリン源制限無機塩培地による PHA 生産培養に供した。菌体を回収して凍結乾燥し、乾燥菌体のメタノリシス処理と GC による PHA 分析の結果、生合成された PHA は 3HB ユニットと、スレオニン/バリン/ロイシンに由来すると推定される 2HB、2H3MB、2H4MV の各 2HA ユニットから構成される四元共重合体であることを見出した。さらに、グルコースに加えて 2HB とバリンを共添加した条件では、前述の 4種のユニットに加え、2-ヒドロキシペンタ酸(2HV)とイソロイシン由来と推定される 2H3MV の計6種のユニットからなる六元共重合体が生合成された。現在、2HV ユニットの由来について解析を行っている。得られた共重合体はいずれも低蓄積率であったものの、2HA ユニットは50~90%と高分率であった(Fig. 2)。

本研究では改変 R. eutropha 株がグルコース原料から生合成されたアミノ酸に由来する多様な 2HA-CoA モノマーを重合可能であることを示した。さらなるアミノ酸代謝の改変・制御により、様々な共重合体を生合成する基盤とできる可能性がある。これら 2HA ユニット含有 PHA 共重合体の物性については今後の検討項目であるが、新用途へ展開可能な共重合体が見出されることが期待される。



100 mL phosphate-limited mineral salt medium, 30°C, 120 h (N = 3). Fig. 2. *R. eutropha* 改変株によるアミノ酸由来 2HA モノマーユニット含有 PHA 共重合体の生合成。

文献

- 1) Taguchi S. and Matsumoto K., *Polymer Journal*, **53**:67-79 (2021).
- 2) Ishihara S. *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **107**:7757-7569 (2023).
- 3) Mizuno S. *et al.*, *J Biosci Bioeng*, **125**:295–300 (2018).

ガス原料からのエタノール高生産に向けた

好熱性酢酸生成菌 Moore / la thermoacet i ca の代謝設計と検証

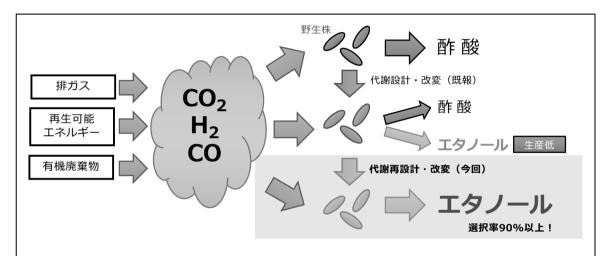
加藤 淳也 1.2・桑田 裕一 1・竹村 海正 1・加藤 節 1・藤井 達也 2・和田 圭介 2・

渡邊 真宏2・中道 優介2・青井 議輝1・森田 友岳2・村上 克治2・中島田 豊1*

¹ 広島大学大学院統合生命科学研究科,² 産業技術総合研究所 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1丁目3番1号 広島大学大学院統合生命科学研究科

Tel: 082-424-4443

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



カーボンリサイクルによるものづくり技術の開発に向け、ガス原料(CO, H_2 , CO_2)を資化して生育する好熱性酢酸生成菌を宿主としてエタノール高生産株の創製を目指した。これまでに遺伝子組換えによる代謝改変によってエタノール生産能の付与には成功していたが生産性の低さが課題であった。今回、その代謝ボトルネックを解消するために代謝経路を再設計した結果、合成ガスを原料として、エタノールを選択性 90%以上で高生産する株の創製に成功した。

1. はじめに

化石資源の恩恵により人類は飛躍的に文明を発展させたが、将来的な資源の枯渇と、化石資源利用にともなう温室効果ガスの排出が課題である。 代替資源の探索や利用化が求められる中、我々は微生物を活用してガス原料 (CO, H_2, CO_2) からものづくりをする「ガス発酵」の研究を進めている。これは様々なカーボン(炭素)資源をリサイクルしてものづくりができる技術である、工場からの廃ガスなどに加え、家庭ごみなどの固形の廃棄物も合成ガス $(CO, H_2$ が主成分) 化により原料として利用できることから注目されている。

2. 背景•目的

我々はガス原料からのエタノール生産を目的として、 CO, H_2, CO_2 を資化する好熱性酢酸生成菌 Moore/la thermoacetica を宿主とした微生物開発を進めてきた.これまでに、遺伝子組換えによる代謝改変によってエタノール生産能の付与に成功している 1 . しかし、酢酸を副生し、エタノール収率が低かったことから、エタノール収率を向上させるために酢酸合成経路を破壊したが、生育および物質生産がともに停止した(図 1). そこで、今回、これまでの結果から代謝ボトルネックを推定し、従来の代謝設計を見直すことでエタノール高生産株の創製を目指した.

3. 方法

代謝ボトルネック抽出を目的として、ガスからエタノールに至る反応経路全体について各種補因子を介した電子の授受(酸化還元バランス)およびエネルギー(ATP生成・消費)に着目した化学量論計算を行った。結果にもとづき、ボトルネックを解消する代謝経路を設計した。設計を反映した遺伝子組換え株を作製してガスを基質とした培養実験を行うことで検証を行った。

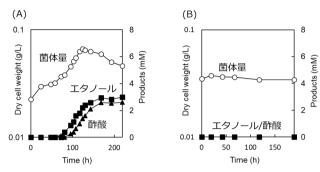


図1. 従来株に対する酢酸合成経路破壊の効果 (A) 過去作製のエタノール生産株、(B) 過去作製のエタノール生産株の酢酸合成経路破壊株.

4. 結果·考察

4-1. 酸化還元パランス

ガスを代謝してエタノールにいたる経路に関して化学量論計算を行うと、電子の授受に関して補因子の適正化が必要であることが判明した. 過去に構築したエタノール生産株は内生のNADH依存型のアルデヒドロゲナーゼと NADPH 依存型のアルコールデヒドロゲナーゼを利用してアセチル-CoA からエタノールを生成するが、この場合 NAD (P) H の供給に過不足が生じる. 一方、NADPH 依存型のアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼに置き換えた場合で検討したところ、酸化還元バランスは適正となることが推測された. NADPH 型の耐熱性アルデヒドデヒドロゲナーゼは既存の遺伝子の適に見つからなかったものの、好熱菌由来酵素の変異型の一つに NADPH 依存的なものを見出したため、導入することとした.

4-2. ATP 生成·消費

酢酸生成と共役する基質レベルのリン酸化が失われるため、ATP 生成と消費のバランスを考えると代謝の駆動に十分な ATP が生成されない可能性が考えられた.

M. thermoacetica はフェレドキシン(Fd)の酸化によりプロトンポンプを駆動し ATP の合成を行う経路を保

有する. この機構を補助するため、還元型 Fd の補填を目的として外来のFd 依存型ヒドロゲナーゼを導入することとした.

4-3. 微生物改良の結果

以上の指針にもとづき、酢酸合成経路の破壊と組み合わせた改良株を作製した.本株は、COを含むガスを基質として培養すると増殖しながらエタノールを選択性CO00%以上で高生産した(CO20C

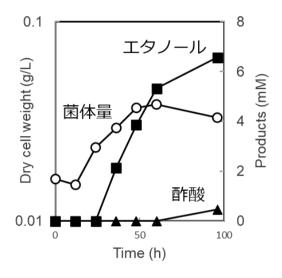


図2. 改良した生産株の培養プロファイル

4-4. 今後の展望

今回の酸化還元バランスと ATP 生産・消費に対する 改良点それぞれについて、エタノール高生産への寄与の程度を明らかにすることで、本株のさらなる高性能 化や、エタノール以外の化合物生産の設計も可能となることが期待される。また、今回開発したエタノール高生産株はエネルギー源として CO を必須としているが、今後、代謝エネルギーが低い H_2 と CO_2 からのエタノール高生産株の代謝設計にも応用可能と考えている。

4. 文献

- 1) Takemura, K. and Kato, J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 569–574 (2021)
- 2) 特願 2024-040427

菌叢機能制御に向けたバクテリオファージによる 菌叢改変技術の開発

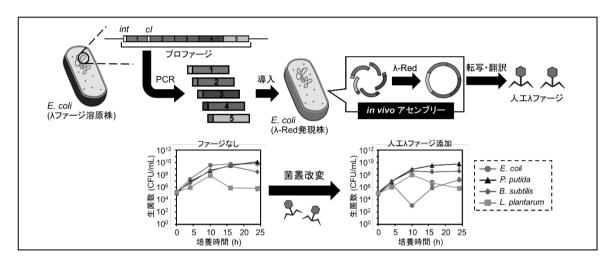
田中 友樹 1·杉山 涼雅 1·川口 愛未 1·岩木 宏明 2·岡野 憲司 2*

1関西大学大学院理工学研究科,2関西大学化学生命工学部

〒564-0073 吹田市山手町 3-3-35 関西大学化学生命工学部

Tel: 06-6368-0808

E-mail: okano. k@kansai-u. ac. jp



1. 緒言

自然界では様々な微生物が共存し、微生物菌叢と呼 ばれる生態系を形成している。菌叢内では、微生物が 形成する複雑なネットワークにより、単菌では成し得 ない高次的な機能が発揮されている。例えば、腸内細 菌叢が人に与える健康増進効果 1) やメタン発酵槽での エネルギー生産2)が挙げられる。これらの機能を理解 し、改良するには、菌叢の微生物構成を自在に変化さ せ、菌叢機能を制御する技術が必要である。しかし、 菌叢内の微生物を選択的に殺滅する汎用的手法は現状 存在しない。そこで、我々はバクテリオファージが持 つ宿主特異的な溶菌機構に着目し、菌叢内の標的微生 物のみを死滅させる技術に利用することを考えた。こ のような技術の実現性を検証すべく、本研究では、4菌 からなる人工菌叢においてファージを用いた菌叢改変 を実施した。また、標的微生物を溶菌するファージを 迅速に獲得することを目指し、ファージが溶原化した 微生物のゲノムを設計図としてファージを人工合成す る技術の開発を行った。そして、合成した人工ファー ジでも菌叢改変が可能であるかを検証した。

2. 天然ファージを用いた菌叢改変

人工菌叢の構成菌には Escher ichia coli (クロラムフェニコール耐性を付与)、Pseudomonas putida (ネオマイシン耐性を付与)、Bacillus subtilis (ストレプトマイシン耐性を付与)、Lactiplantibacillus plantarum (酸耐性有り)を用いた。E. coliを宿主とする T7 ファージは NBRC より入手し、他の 3 菌を宿主とするファージは土壌あるいは下水から単離したものを使用した。

終濃度 0.5% (w/v) の CaCO₃ を含む LB 培地に各菌を 10⁵ CFU/mL になるように植菌し、そこにファージを個別に添加した後、34℃で培養を行った。培養液を経時的に採取し、クロラムフェニコール、ネオマイシン、またはストレプトマイシンを含む LB 寒天培地と MRS 寒天培地 (pH 6.0)を選択培地として用いることで、各菌の生菌数を個別に測定した。

菌叢改変の結果 (図 1)、 ファージ非添加時はいずれの菌も 10^2 オーダー以上生菌数が増加した。一方、ファージを添加することで標的細菌のみ生菌数が有意に減少した。T7 ファージの添加により $E.\ co/i$ の生菌

数は最大で 5.33×10^1 CFU/mL まで減少した。同様に、 Φ PpMK の添加により *P. putida* の生菌数を 2.27×10^2 CFU/mL、 Φ BsK0、 Φ LpTT の添加により *B. subtilis*、 *L. plantarum* の生菌数をそれぞれ 6.27×10^3 CFU/mL、 1.60×10^3 CFU/mL まで減少させることに成功した。

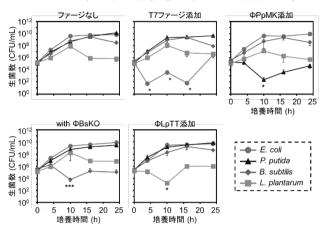


図1. 天然ファージ添加による菌叢改変

3. 人工ファージを用いた菌叢改変

ファージを菌叢改変ツールとして利用するには、標的細菌に感染するファージの獲得が必須である。しかし、現行のファージ単離方法は、宿主菌の培養液としき環境サンプルを混合すると思しき環境サンプルを混合するとする、純粋培養可能な細菌を宿主とする、大夕ゲノム解析の隆盛により、続々と見つかってきたプロファージに着目した。溶原株のプロファージ配列を設計図として溶菌力のみを有したファージを入てきれば、ファージの単離を介することなく、溶菌ファージが獲得できると考えた。

本アイデアを実証すべく、本研究では λ ファージ溶原化株のゲノムに組込まれたプロファージ配列からファージの人工合成を試みた(図 2)。E.~co/i NBRC 3301(λ ファージ溶原株)のゲノムを鋳型に溶原化遺伝子である int、cI をコードする領域以外のプロファージ配列を 10 kbp 程度の断片に分割し、PCR 増幅した。この際、各断片の末端に隣接断片と重複する配列を約 50 bp 付加し、これらの断片を E.~co/i に λ -Red recombinase を発現させておくことで、重複配列間の相同組換えによって、隣接断片同士を連結することができる。これにより全長のファージ DNAが合成され、宿主が持つ転写翻訳機構によって溶菌カのみ有した人工 λ ファージが合成される30。

合成したファージでも天然ファージ同様、菌叢改変を実施した。その結果、人エ λ ファージにより標的細菌である *E. co/i* の生菌数を最大で 1.17×10 3 CFU/mLまで減少させることができた(図 3)。

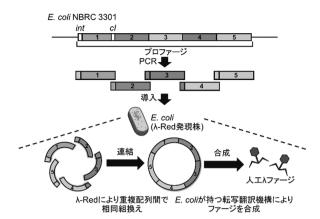


図2. 人工 λ ファージの合成方法

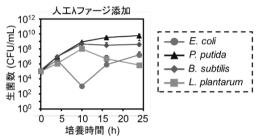


図3. 人工 λファージによる菌叢改変

4. 結論

従来、ファージの宿主特異性は種々の細菌の単培養系において評価され、複合微生物系で評価した研究は少ない。本研究では人工菌叢にファージを添加することで、ファージが菌叢内で標的微生物を宿主特異的に溶菌し、菌叢改変ツールとして有効であると実証した。

ファージによる菌叢改変には目的の宿主域を持つファージの獲得が必須であるが、現行のファージ単離法であるプラークアッセイ法では純粋培養可能な宿主に感染するファージしか獲得できなかった。対して、本研究では溶原株のプロファージからファージを合成し、菌叢改変可能であった。このことから、ファージの単離を介さずファージを人工合成し、菌叢改変を実施するという新たな菌叢改変の戦略を確立した⁴⁾。

5. 参考文献

- 1) Singh, R. K. *et al.*: *J. Transl. Med.* **15**, 73 (2017)
- 2) Tang, Y. Q. *et al*.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**.375-383 (2015)
- 3) Chen, L. *et al.*; *Cell. Rep. Methods.*, **2**, 100217 (2022)
- 4) Tanaka, T. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **15**.1403903 (2024)

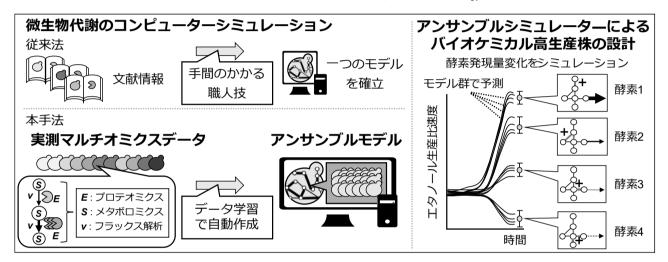
マルチオミクスデータを用いた 出芽酵母動的代謝アンサンブルシミュレーターの構築

佐藤 源気 1*・山崎 一輝 1・岡橋 伸幸 1・松田 史生 1

「大阪大学大学院情報科学研究科

〒565-0871 吹田市山田丘 1-5 大阪大学大学院情報科学研究科

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



1. 要旨

出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae の代謝をコンピューターシミュレーションするための新手法を開発した. 従来法ではシミュレーションモデルの作成に職人技が必要とされてきた. そこで、実測データでパラメータを学習した複数のモデルを自動作成する手法を開発した. 作成した代謝アンサンブルシミュレーターを用いることで、エタノールやさまざまなバイオケミカルを高生産する出芽酵母株の設計が可能になる.

2. はじめに

出芽酵母の物質を作る能力をさらに高める設計が、発酵産業の進展や、新しいバイオケミカル産業の実用化にとって重要である。特に、最適な酵素発現量のパターンを設計し、生産速度を最大化する基盤として、動的な代謝をシミュレーションできるモデルが期待されている。しかし、動的モデルの作成には、酵母細胞内における酵素反応パラメータ(K_m など)の値が全代謝反応に対して必要となり、そのセットを一つに決定する手技が要求されてきた。そこで、本研究では複数の出芽酵母株の細胞内代謝物量、酵素タンパク質発現量、代謝フラックスからなる実測マルチオミクスデー

タを取得し、実測データを再現するパラメータを学習した動的代謝モデルの集団(アンサンブル)を自動作成した. 得られたアンサンブルモデルにより酵素発現量変化のシミュレーションを実施し、アンサンブルシュミレーター構築の妥当性を検証した.

3. 方法

S. cerevisiae野生株 (BY27002) とその中心炭素代謝に関連する1遺伝子破壊株10株(図1)を好気条件下SD 培地中で回分培養し、ターゲットメタボロミクス、ターゲットプロテオミクス、「3C-代謝フラックス解析で細胞内代謝物量、酵素タンパク質発現量、代謝フラックスを測定した.解糖系・トレハロース生合成・ペントースリン酸経路(PPP)・TCA 回路・電子伝達系を含む中心炭素代謝の80反応について、反応機構を考慮したミカエリスメンテン型速度式1.20で記述し、既報の代謝物による酵素活性制御30を備えた動的代謝モデルを構築した.動的モデルの時間発展にはPython3とscipy.integrate.solve_ivpを用いた.

4. 結果と考察

まず, 各酵素反応の反応速度が野生株の実測データ に一致するよう, ランダムなパラメータを作成し, そ

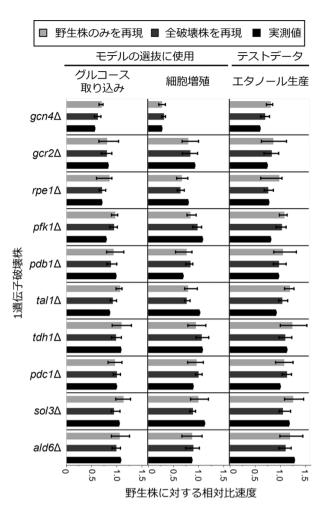
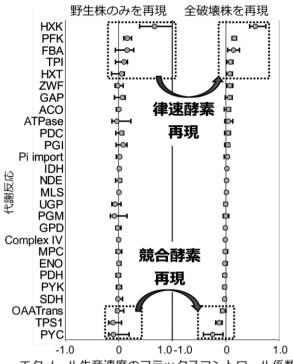


図 1. モデルによる物質収支フラックスの予測

こから代謝状態が濃度変化に対して安定となるモデルを 2000 個選抜した. 次に、モデル中の酵素タンパク質発現量と代謝物濃度を 1 遺伝子破壊株の実測データに変換して、代謝状態の時間変化をシミュレーションした. 各モデルが破壊株を再現したかどうかを、 グルコース取り込み速度・比増殖速度を実測値の±30%の範囲で再現したかで判定したところ、最大で 6 株を再現するモデルが存在した. そこで、 より多数の株を再現するモデルが存在した. そこで、 より多数の株を再現するように、複数株を再現するモデル 200 個の初期集団から、遺伝的アルゴリズムを用いて新たなモデルの生成・評価を反復した. 合計 50,000 個のモデルを生成・評価したところ、 破壊株 10 株を再現できるモデル 100 個を獲得できた. 全破壊株の再現により、 アンサンブルシミュレーションとしてのエタノール生産比速度の予測性が向上した(図 1).

そこで、アンサンブルシミュレーターにより、代謝 コントロール解析を行った、野生株のエタノール生産 速度が、各酵素濃度の微小変化をシミュレーションし たときに増加するかを示す、フラックスコントロール



エタノール生産速度のフラックスコントロール係数

図 2. アンサンブルシミュレータ―による エタノール生産フラックスの代謝コントロール解析 係数を計算した(図 2). 全破壊株の再現により、係数 の予測範囲が縮小し、解糖系の既知の律速反応である 4) ヘキソキナーゼ(HXK)、 ホスホフルクトキナーゼ (PFK) が高い係数を、 競合反応であるピルビン酸カル ボキシラーゼ (PYC) が低い係数を示すなど、妥当な動 的代謝のシミュレーションが確かめられた.

5. 今後の展望

本手法を発展させ、代謝アンサンブルシミュレーターを実測データから短時間で自動作成可能とすること目指す.これにより、様々なバイオケミカルを生産する微生物株の設計や、培養方法の最適化を可能とし、バイオものづくりの基盤技術としたい.

斜辞

本研究は JSPS 科研費 JP22H01879, JP24KJ1663, JST, CREST, JPMJCR21N2 の支援を受けて実施された.

文献

- Smallbone, K et al., FEBS. Lett., 587, 2832–41 (2013)
- 2) Boecker, S *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, **17**, e10504 (2021)
- 3) Hu, M et al., Metab. Eng., 76, 1-17 (2023)
- 4) Lao-Martil, D *et al.*, *Metabolites.* **12**, 74 (2022)

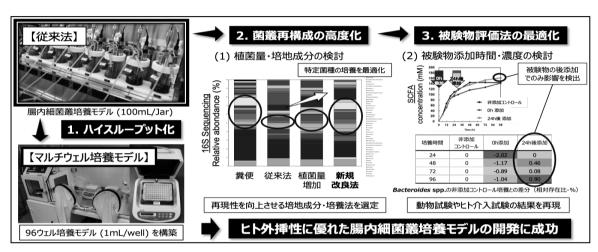
ヒト外挿可能な腸内細菌叢培養モデルの構築に向けて

佐々木 大介^{1,2*}・新谷 知也¹・松木 泰³・近藤 昭彦^{1,2}

¹神戸大学科学技術イノベーション研究科、²株式会社バッカス・バイオイノベーション、 ³神戸大学戦略企画室

〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

Tel: 078-803-6144 Fax: 078-803-6192 E-mail: daisuke@port.kobe-u.ac.jp



神戸大学・近藤研究室では、ヒト大腸内の腸内細菌を *in vitro* 培養することで菌叢構造と代謝産物を再構築する KUHIMM (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model)の開発を進めてきた. KUHIMM は、実際にヒトが摂取すること無しに、食品成分などの被験物の機能性を解析できるモデルとして利用できる。本大会では、腸内細菌叢の解析において、より高精度で高解像度なヒト外挿性を目指し(1)植菌量・培地成分の検討、(2)被験物添加時間・濃度の検討を行った第3世代モデル開発に向けた最新の研究成果を報告する.

【背景と目的】

近年、ヒトの健康維持や増進が腸内細菌の種類と代 謝産物に相関していることが明らかになり、機能性を 持つ素材の摂取によって腸内細菌に介入する「腸活」 が注目されている。それらの素材の研究開発におい て、機能性や安全性の確認は動物試験やヒト介入試験 を選択するのが一般的だった。しかしながら、動物と ヒトの腸内細菌叢が異なるために得られた結果に齟齬 が起きること、現代における動物愛護の観点から試験 の中止や実験動物の価格が高騰するなどの問題が起き ている。一方のヒト介入試験は、実際のヒトを対象に するために発生する倫理の問題、費用や時間の開発コ ストの問題が依然としてあるだけでなく、近年では腸 内細菌による素材の分解や代謝物の産生、細菌の栄養 共生などに関する情報が得られないことが指摘されて いる. このような背景から、10年ほど前にKUHIMMの 開発が本格的に開始され、現在までに第1・2世代

KUHIMM を開発し多くの研究成果を報告してきた 1,2).

しかしながら、食品などの機能性を持つ素材だけでなく医薬品や菌製剤の評価について、これまでの動物試験やヒト介入試験を代替し、さらにヒト腸内細菌の動態の外挿性に優れる培養モデルの開発には至っていなかた。そこで本研究では、報告済みの1.ハイスループット化に加え(Graphical Abstract)、2. 菌叢再構成の高度化(再現性の向上)、3. 被験物質評価法の最適化による改良を目的とした.

【材料と方法】

承認済みの臨床研究実施計画に基づき、健康者ボランティア(20-60代)から回収した糞便を 24h 以内に別々に培地へ接種し、それぞれの培養を開始した、腸内細菌叢の培養は GAM 培地を基礎とし、嫌気的に37℃で撹拌する方法で行った、培養期間中に培養液を採取することで、核酸解析や代謝物の解析に供した.

【結果と考察】

(1) 植菌量・培地成分の検討 菌叢構造の類似性を 16S rRNA 遺伝子の網羅的なシーケンスで解析するこ とで、従来法と比較して菌叢構造の再現性が向上する 糞便接種量の最適化、培地成分とその濃度の選定に成 功した. 具体的には. 糞便の接種量(vol/Jar)につい て 0.0125%, 0.05%(従来法), 0.125%, 1.25%を比較した (健康者6名). その結果, 1.25%および0.125%ではピ アソン積率相関係数(接種前の糞便中の腸内細菌叢の 構造に対する比較検体の菌叢構造データの相関)は従 来法に比べて高値であったが、1.25%では培養 pH の低 下や総菌数の下り幅が大きかった. したがって. 0.125%(図 1 AB. ②接種量増加)が、従来法と比較して 菌叢の再現性や多様性を向上させると結論した. さら に、最適化した糞便接種量において腸内細菌叢の再現 性を向上させる追加の培地成分や組合せ、濃度の検討 を行った. その結果, ムチンだけを追加した培養での み、菌叢の再現性や多様性の上昇が検出され(図 1 AB. ③改良法), その最適な濃度範囲がおおよそ 0.4-0.8% であること明らかにした. 0.8%ムチンを追加した培養 において、従来法や糞便の接種量増加では再現できな かった酪酸産生菌群の生育を特異的に促進できたこと が、菌叢の再現性の向上に貢献していると考えられた (図1C).

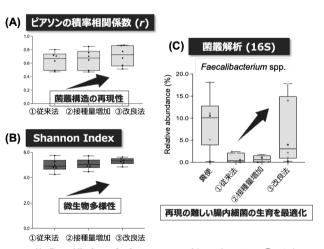


図 1. **菌叢再構成の高度化(再現性の向上)**, ①従来 法・②糞便接種量増加(ムチン添加なし)・③最適化 (接種量増加+ムチン添加あり)を 72h 培養で比較. (C) は酪酸産生菌群の例として *Feacal i bacter i um* spp. の 結果を図示.

(2) 被験物添加時間・濃度の検討 改良培養法を用いて被験物の添加時間や量による菌叢構造および代謝産物への影響を従来法と比較することで、評価法として最適な添加時間・添加量の選定に成功した、具体的には、動物試験やヒト介入試験の報告が多い「難消化性デキストリン(DEX)」を例に、培養した腸内細菌叢

への最適な添加時間の比較を行った(0.3%DEX. 健康者 6名). その結果, 糞便の摂取と同時に被験物を添加 した場合と培養 24h 後付近で菌叢や代謝産物の構造や 構成比が元の糞便に近づいた時に添加した場合を比較 した結果、後者でのみ、プロピオン酸濃度や Bacteroides 属細菌量の増加を検出し(Graphical Abstract 右)、動物試験やヒト介入試験で得られる結 果を KUHIMM で再現することができ、被験物の最適な 評価条件の知見を得ることに成功した。さらに、異な るエンテロタイプを持つ健康者 4 名の糞便を接種源 に、DEX を様々な濃度で添加培養して短鎖脂肪酸濃度 の比較を行った. その結果. 培養 24h 後の DEX 添加に おいて、0.2%以上の添加量でその影響を検出すること ができた(図2左).この添加濃度は、実際のヒトの1 日の食物流入量・大腸容積とそれぞれの食品・薬品等 の摂取量に換算しても十分に現実的な濃度や量である ことが示された(図2右). 以上の結果から、ヒト腸内 細菌叢 in vitro評価系としての有効性が確認され、 ヒト外挿可能な第3世代 KUHIMM の開発に成功した.

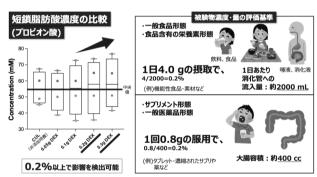


図 2. 被験物の最適な添加条件の検討, 0. 05-0. 3%難 消化性デキストリン(DEX)を培養 24h 後に添加し, 72h まで培養して比較.

【今後の展望】

神戸大学・近藤研究室が開発した第3世代 KUHIMM は従来の100 mL/Jar 培養から同様の性能を持つ1mL/well-96 ウェルプレート培養にスループットが上がっただけでなく、ヒト大腸の腸内細菌叢構造や代謝物構成の再現性の向上、被験物評価法の最適化を完了し、これらの評価を再現性よく実施可能となった.

今後、KUHIMMはヒト外挿性の高い腸内細菌評価法の基礎となり、近い将来には多くの動物試験やヒト介入試験を代替することでの社会実装が期待される。

文 献

- 1) Shintani T. *et al.*, Medicine in Drug Discovery, 22:100184. (2024)
- 2) Hoshi N. *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, 105:2625-2632. (2021)

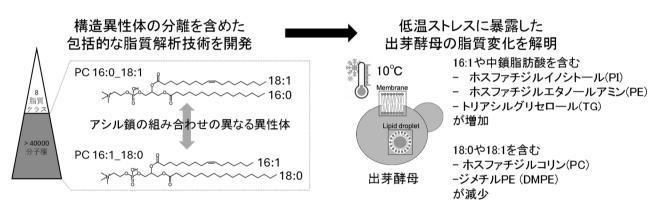
低温ストレス応答下の Saccharomyces cerevisiae の 包括的脂質解析

岡橋 伸幸 ^{1, 2, 3, *}•原 大樹 ¹•飯田 順子 ^{2, 4}•松田 史生 ^{1, 2, 3}

¹大阪大学大学院情報科学研究科, ²大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所, ³大阪大学先導的学際研究機構, ⁴島津製作所

〒565-0871 吹田市山田丘 1-1-5 大阪大学大学院情報科学研究科

Tel: 06-6879-4339 Fax: 06-6879-7433E-mail: n-okahashi@ist.osaka-u.ac.jp



要旨

出芽酵母は低温ストレスに対して膜脂質の構造や組成を変化させることで適応する。しかし、様々な脂質クラスに属する各分子種の増減は分かっていない。本研究では、アシル鎖パターンの異なる構造異性体を含めた包括的な脂質解析技術を開発し、低温暴露した出芽酵母の脂質の解析を行った。その結果、低温環境で特徴的に増減する脂質分子種を見出した。それらの合成に関わる酵素遺伝子の破壊株は、低温環境でのみ増殖遅延が見られ、低温応答に重要な脂質代謝を明らかにすることができた。

背层

清酒や白ワインなどの醸造時に出芽酵母は 10℃前後の低温ストレスにさらされる。これに対し、出芽酵母は膜脂質の組成やアシル鎖の鎖長、不飽和度を変化させることで低温環境に適応する。これまでの研究では、アシル鎖の不飽和度の増加 ¹⁾ や、ホスファチジルイノシトール(PI) 総量の増加 ²⁾といった脂質中の部分構造に注目した研究がなされてきた。しかし、グリセロ脂質には 2 つのアシル鎖の総鎖長、総不飽和皮が可して、組み合わせが異なる構造異性体が多数存在することから、それらを区別した分子種レベルでの包括的な脂質の変動は捉えられていない。そこで本研究では、

高分解能質量分析装置の Data-independent acquisition (DIA) モードを用いて、アシル鎖由来イオンを包括的に計測するリピドミクス技術を開発し(図1)、低温暴露した出芽酵母の脂質の量的・質的な変化を解析した。

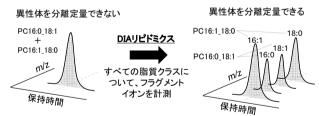


図1 DIA リピドミクスの概要

方法

Saccharomyces cerevisiae BY4947 株を SD 培地中で $0D_{600}$ =1 付近まで 30° Cで好気的に培養し、その後、 10° C に移した。0.5 h と 3 h 後に $0D_{600}$ ×培養液量 (mL) が 10 となるように 菌体を回収し、メタノール: クロロホルム: 水 = 10:5:1 の 1 層抽出法で脂質を抽出した 3° 。分析には、液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析装置 (LCMS-9050, 島津製作所) を用い、ウィンドウ幅 15 Da の DIA リピドミクスを行った。

結果と考察

DIA データを解析するために、炭素数が6から28、 不飽和度が0か1のアシル鎖からなるリン脂質とグリ セロ脂質の全分子種について、プリカーサーイオンと アシル鎖由来のフラグメントイオンの m/z をリストア ップした。これによって、総計 52315 分子種の分離定 量が可能となった。本法を用いて、低温暴露した出芽 酵母の脂質を解析したところ、22 クラス 427 分子種を 定量でき、うち 46 種のリン脂質は本法で初めて分離 定量できた構造異性体であった。続いて、主成分分析 を行ったところ、30℃と10℃の脂質プロファイルが明 確に異なることが分かった。低温条件で変動した脂質 分子種を調べるために、3 hのデータを用いてボルケ ーノプロットを作成した(図 2)。その結果、炭素数 18 のアシル鎖を含むホスファチジルコリン(PC) やジメチ ルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)が特徴的に 減少していた。一方、16:1を含むステロールエステル (SE) や多くのリン脂質、リゾリン脂質、トリアシルグ リセロール(TG)が増加していた(図 2)。

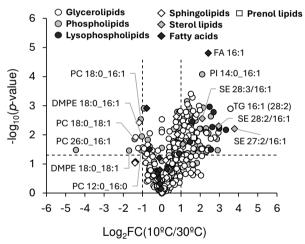


図2計測された脂質のボルケーノプロット

リン脂質の鎖長を詳細に調べたところ、増加した分子種はアシル鎖の鎖長が短く、不飽和度が大きいことが分かった(図 3)。特に、鎖長 $10\sim15$ の中鎖脂肪酸やパルミトレイン酸(16:1)が結合した PI、PE が特徴的に増加していた(図 3)。TG についても同様の傾向が見られた。そこで、中鎖脂肪酸への特異性が高いとされるアシル基転移酵素 S/c1 の破壊株のスポットアッセイを行ったところ、 10° C条件でのみ増殖が遅延する傾向が見られ(図 4)、中鎖脂肪酸をリン脂質中に取り込むことが出芽酵母の低温下の増殖を促進することが示唆された。

今後の展望

脂質膜のエンジニアリングによって、低温下でも活発に増殖できる出芽酵母株を育種できると期待され

る。また、本研究で開発した包括的かつ高解像度の脂質測定技術は、様々なストレスが膜脂質に与える影響を調べることに利用可能であり、細胞のストレス克服に向けた指針を提供できると考えられる。

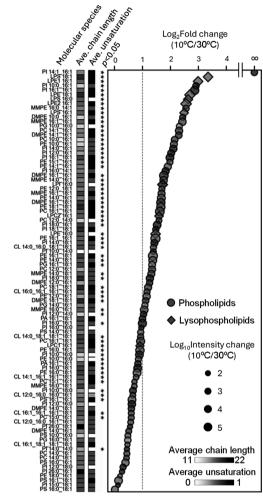


図3 低温ストレス下で増加した脂質分子種

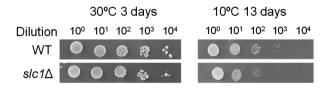


図 4 S/c1 破壊株のスポットアッセイ

文献

- Nakagawa, Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 291, 707-713 (2002)
- Yang, C et al.: Biochem. Eng. J., 194, 108884, (2023)
- Komori, S. et al.: J. Biosci. Bioeng., 135, 102– 108 (2023)

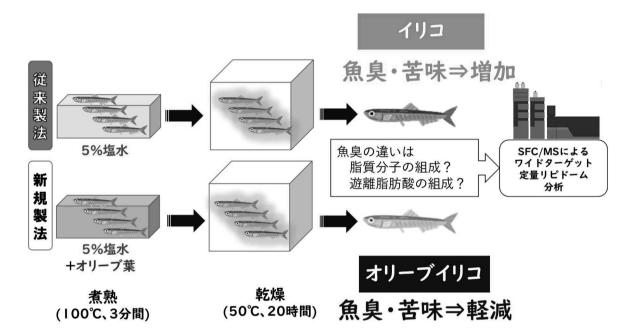
超臨界流体クロマトグラフィー質量分析による 煮干のワイドターゲット定量リピドーム分析

松原 保仁 1* · 松岡 博美 1 · 藤川 護 1 · 大西 茂彦 1 · 高橋 政友 2 · 馬場 健史 2

¹香川県産業技術センター,²九州大学 生体防御医学研究所

〒761-8031 香川県高松市郷東町 587-1 Tel: 087-881-3175 Fax: 087-881-0425

E-mail: we1557@pref.kagawa.lg.jp



要旨

煮干の魚臭は、カタクチイワシに含まれる高度不飽和脂肪酸が、製造過程の乾燥処理において酸化され、低分子のアルデヒドが生成することによるものと考えられている ¹⁾。そこで、煮干の魚臭の強弱に関与する脂質成分を明らかにすることを目的とし、魚臭が強い従来製法の煮干(以下、イリコ)とオリーブ葉に含まれるポリフェノールの抗酸化力を活用して製造した魚臭が弱い煮干(以下、オリーブイリコ)を用いて、超臨界流体クロマトグラフィー質量分析(SFC/MS)によるワイドターゲット定量リピドーム分析を行った。

その結果、793 種類の脂質分子について定量値 (pmol/mg-sample) を算出した。各脂質分子について、イリコとオリーブイリコの含量を比較した結果、オリーブイリコのコレステロールエステル (ChE) および遊離脂肪酸含量が、イリコの半分程度の値であり、ホスファチジルコリン (PC) の含量は、イリコの 1.5 倍の

値を示した。オリーブイリコの魚臭がイリコに比べて 弱いのは、酸化を受けやすい高度不飽和脂肪酸の含量 が低いため、乾燥工程で高度不飽和脂肪酸の酸化によ り生成する直鎖アルデヒドが少ないことに起因する と推察した。

1. はじめに

煮干は、生のカタクチイワシを約5%の塩水中で3分間煮熟し、冷却した後、50℃の温風で約20時間乾燥して製造されるため、特有の臭気を発生する。我々は、オリーブ葉の抗酸化力に着目し、従来製法のイリコの魚臭抑制に取り組み、低温乾燥オリーブ葉を添加した塩水中でカタクチイワシを煮熟することで、煮干の魚臭と内臓の苦味が低減することを見出し、新たな煮干(オリーブイリコ)の製造方法を開発した²。また、オリーブイリコの出汁は、従来製法のイリコ出汁の魚臭を苦手に感じる人にも好まれ、オリーブイリコ出汁の香りが、ヒト試験において心理・生理的な鎮静効果を

有し、心身両面に影響することを明らかにしている³⁾. 煮干の魚臭は、乾燥工程での高度不飽和脂肪酸の酸化に起因し、イリコとオリーブイリコの魚臭の違いは、脂質分子や遊離脂肪酸の組成と関係していると考え、SFC/MS によるワイドターゲット定量リピドーム分析を行った。

2. 実験方法

煮干は、製造日および製造者が異なるイリコ(2種類)とオリーブイリコ(2種類)の合計4種類を用い、液体窒素で急冷後、マルチビーズショッカーにて破砕した。脂質は、19種の各脂質クラスの安定同位体内部標準物質を含むメタノールで抽出し、メタノール:クロロホルム:水の混合溶媒で分画を行い、クロロホルム層の半分をリピドーム分析、残りは脂肪酸組成を決定するため酸化処理を行った。個々の脂質分子の定量は、順相の DEA カラムを装着した SFC/MS を用いて実施し、脂肪酸組成の決定には、別途、逆相カラムによる分離系を用いて行った。

3. 結果と考察

定量リピドーム分析の結果、793 種類の脂質分子について定量値(pmol/mg-sample)を算出した。煮干に含まれる主要な脂質分子は、コレステロール、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、トリグリセリド(TG)であった(図 1)。各脂質分子について、イリコとオリーブイリコの含量を比較した結果、オリーブイリコのコレステロールエステル(ChE)および遊離脂肪酸(FA)含量が、イリコの半分程度の値であり、PCと PE の含量は、イリコによべて高い値を示した(図 1)。PC および PE 等の含量が、イリコによいとに適した(図 1)。PC および PE 等の含量があることが知られておりが、オリーブイリコの含量が高いことから、高度不飽和脂肪酸の酸化防止に寄与している可能性が考えられた。

煮干の遊離脂肪酸は、パルミチン酸 (FA16:0)、パルミトレイン酸 (FA16:1)、オレイン酸 (FA18:0)、リノール酸 (FA18:1)、高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸 (FA20:4)、エイコサペンタエン酸 (FA20:5)、ドコサペンタエン酸 (FA22:5)、ドコサペキサエン酸 (FA22:6)を主に含んでいた。これらの含量は、イリコに比べてオリーブイリコの値が少ない傾向を示した (図2)。高度不飽和脂肪酸の酸化安定性は、含まれる二重結合数に比例して低下するため、EPA や DHA は非常に酸化されやすいことが知られている つ。オリーブイリコの魚臭がイリコに比べて弱いのは、酸化を受けやすい高度不飽和脂肪酸の含量が低いため、乾燥工程で高度不飽和脂肪酸の酸化により生成する直鎖アルデヒドが少ないことに起因していると推察した。

4. 結言

本研究において、煮干の魚臭の違いは、SFC/MSによるワイドターゲット定量リピドーム分析を行うことで、脂質分子、遊離脂肪酸の含量の違いにより、説明できることを明らかにした。

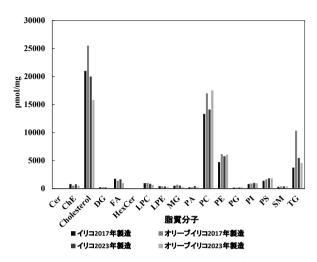


図1 煮干に含まれる脂質分子の含量

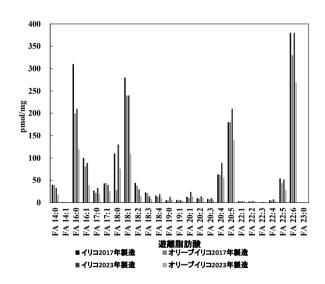


図2 煮干に含まれる遊離脂肪酸の含量

文 献

- 1) 宮下和夫ら:オレオサイエンス,18,317-324(2018).
- 2) 松原保仁, 柴﨑博行:特許第6439116号.
- 3) 松原保仁:香料. 290, 39-45(2021).
- 4) M. F. King *et al.*, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 545-551 (1992).

カーボンナノファイバーの生分解の真理と新技術

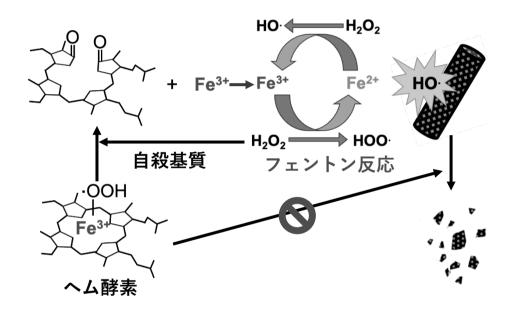
堀 克敏^{1,2*}・高橋慧良¹・蟹江純一²・上野光保³・阿多誠文³・関谷瑞木³・上島 貢³

¹名古屋大学大学院工学研究科,²フレンドマイクローブ,³日本ゼオン

〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学工学研究科 1 号館

Tel: 052-789-3339

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



要旨

カーボンナノチューブ (CNT) は優れた材料であるが、生体毒性や生態系の攪乱などが懸念されており、安全性や環境動態、生分解性に関する知見が求められている。2008~2009 年に、米国ピッツバーグ大学の Allenと Star らが、CNT は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)で分解されることを報告して以来 1.2)、各種ペルオキシダーゼによる CNT 分解に関する報告が続き、CNT の酵素分解は通説となった。しかし、細菌酵素による単層 CNT の分解を詳細に解析したところ、CNT は酵素によるて分解されるのではなく、ヘム酵素から遊離した鉄イオンと過酸化水素によるフェントン反応によって分解されていることが明確になった。上記通説は誤りてあり、真の分解機構が明らかになった。これによって、環境中に放出された CNT の動態予測や分解管理技術の開発に新たな光が当たる。

背景: Star らのグループによって酸化処理した単層 CNT (0-SWCNT) の HRP による分解が報告されて以来、様々なペルオキシダーゼが CNT を分解可能であることが報告されてきた。以来、CNT がペルオキシダーゼによって分解されることは定説となった。しかし、自然界に普遍的に存在し、排水処理等でも中心的な働きをするバクテリアのもつ酵素による CNT 分解の報告は皆無であった。他方、バクテリアのもつ染料脱色ペルオキシダーゼ (DyP) がリグニンを分解し得ることが報告されてきた。そこで、高いリグニン分解活性を有し、かつ土壌中に普遍的に存在する Pseudomonas putida mt-2 に着目し、この株のもつ DyP (mt2DyP)による 0-SWCNT 分解能力について調べた。

方法: Mt2DyP を Brevibacillus 発現系により分泌生産した。酵素活性は、ABTS と 10 mM の H₂O₂ を基質として、

ABTS 酸化物の生成初速度を測定することで求めた。30 $\mu g/ml$ の 0-SWCNTs を、4 μM の酵素と 1~ 100 mM の H_2O_2 を含む PBS 中で分解試験に供した。CNT は、0.25% の SDS 存在下で 10 分間超音波処理することにより凝集塊を分散させた後、750 nm の吸光度を測定することにより定量した。また、ラマン分光と XPS により、CNT の分解過程の変化を計測し、LC-MS により分解産物の検出を行った。

結果: $30 \mu g/ml$ の 0-SWCNTs は、DyP の存在下で 30 日間インキュベートすることにより、 H_2O_2 の濃度依存的に分解された(図 1)。特に $100 \, \text{mM}$ の H_2O_2 存在下においては、30 日足らずで完全に消失し、CNT 懸濁液は透明になった。このことはラマン分光の結果によって支持された。XPS では、分解過程における酸素原子の導入も観察された。また、分解産物であるシンナスドビドが LC-MS により検出された。しかし、酵素に上がが上で割定したところ、わずか 60 分間以内に DyP はたいことが示唆された。酵素の失活に同調するよのでないことが示唆された。酵素の失活に同調するよい、鉄イオンの放出が観察されたことから、外部添加

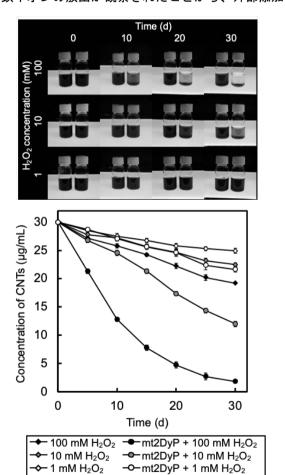


図 1. CNT 分解実験. (上) 分解の様子. 各左の瓶は 酵素を含まないコントロール. (下) 分解曲線

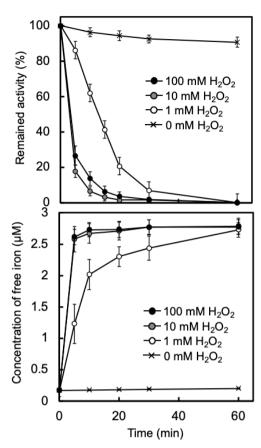


図2. (上)酵素活性. (下)鉄イオンの放出

の H_2O_2 と鉄(II) イオンによってヒドロキシラジカルを生じるフェントン反応が真の分解メカニズムではないかと考察した(図2下)。そこで、鉄(II) イオンをキレートする DTPA を添加したところ、CNT 分解が顕著に阻害された。同様な現象は、普遍的なへム酵素であるP450 でも起こることが確認された。そもそも H_2O_2 はペルオキシダーゼにとっては自殺酵素であることが知られている。よって、我々の結果は合理的である。そこで、HRP による O-SWCNT の分解も、実際には酵素反応ではなくフェントン反応によるものではないかと疑い、注意深く実験したところ、そのことが立証された。そして、過去の論文の多くは酵素活性そのものの測定法に大きな誤りがあることを、我々は明らかにした 3 。

文 献

- Allen, B.L., Kichambare, P.D., Gou, P., Vlasova, I.I., Kapralov, A.A., Konduru, N., Kagan, V.E., Star A., *Nano Lett.* 8, 3899-3903, (2008).
- Allen, B.L., Kotchey, G.P., Chen, Y.N., Yanamala, N.V.K., Klein-Seetharaman, J., Kagan, V.E., Star A., *J. Amer. Chem. Soc.* 131, 17194-17205, (2009).
- 3) Takahashi, S., Taguchi, F., Hori, K., *Front. Environ. Sci.*, **11**, 1184257, (2023).

結晶性セレンを生成する新規耐塩性亜セレン酸還元菌

Malaciobacter sp. UFI-3 の単離と特徴づけ

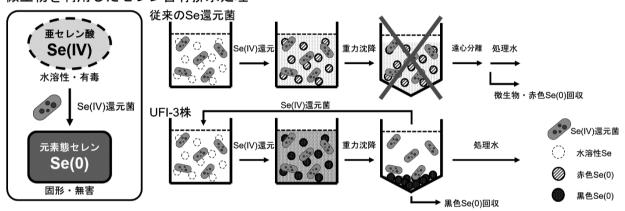
古田 有輝*・石橋 知也・井上 大介・池 道彦

大阪大学大学院工学研究科

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1 大阪大学大学院工学研究科

Tel: 06-6879-7674 Fax: 06-6879-7675 E-mail: furuta@wb. see. eng. osaka-u. ac. jp

微生物を利用したセレン含有排水処理



要旨 セレン(Se)含有排水の生物学的処理の性能向上を目的として、新規の耐塩性亜セレン酸(Se(IV))還元菌 Malaciobacter sp. UFI-3 株を単離した。本菌株は 5%の高塩分濃度下において増殖することができ、好気、嫌気の両条件下で Se(IV) を還元し沈降性に優れた結晶性の黒色元素態 Se(Se(0)) を生成した。既存の Se(IV) 還元菌はすべて、沈降性に乏しいアモルファス状の赤色 Se(0) を生じることから、UFI-3 株は特異な Se(IV) 還元メカニズムを有することが示唆された。本菌株は、高濃度の塩分を含む排水処理に適用でき、Se(0) を沈降分離により容易に除去・回収することができる有用な菌株であるといえる。

1. セレン含有排水の生物学的処理の課題

セレン(Se)はガラス染料や半導体材料など工業的に広く利用されるレアメタルである。環境中では様々な形態をとるが、元素態 Se(Se(0))は固体で安定である一方、セレン酸(Se(VI))や亜セレン酸(Se(IV))は水溶性で生体に対して毒性を示すため、Seを含む排水は適切に処理することが求められている。Se含有排水の処理技術として、微生物の Se 還元機能を利用して液相中の Se(VI) /Se(IV) を固体の Se(0) へと還元して除去する生物学的処理が注目されている。生物処理は、現在用いられている物理化学的処理と比較して低

コスト・低環境負荷での処理を行うことができるメリットを有する。一方、Se 含有排水には高濃度の塩分が含まれていることが多く $^{1)}$ 、生物作用の阻害が生じることが課題となっている。また、既存の Se (IV) 還元菌によって生成されるアモルファス状の赤色 Se (0) は沈降性に乏しく、通常の重力沈降では容易に分離・除去することができないため、微生物を用いた Se (IV) 還元反応の後に、遠心分離や凝集沈殿等の固液分離処理を設けないといけないことも重要な問題である。

2. 耐塩性 Se(IV) 還元微生物集積系 D'2)

我々は、上述した生物学的 Se 含有排水処理の課題を克服するポテンシャルを秘めた耐塩性 Se(IV)還元微生物集積系 D' (集積系 D') を構築した。集積系 D' は、水産加工場の活性汚泥を植種源として、5%の塩分と 1 mM の Se(IV)を含む乳酸無機塩培地を用いて、嫌気条件 4 日/好気条件 3 日の計 7 日間の培養を行い、培養液の 10%を新たな培地に植え継ぐ操作を繰り返すことで集積された。集積系 D' は 5%の高塩分濃度下で 1 mM の Se(IV)を 7 日以内にほぼ全量還元し、液相から除去することができた。この還元能は好気条件 7 日の植え継ぎを繰り返すことでは維持できず、嫌気条件 4 日/好気条件 3 日のサイクルで植え継ぎを繰り返した場合でのみ、維持することがで

きた。また、特筆すべき特徴として、嫌気条件下でのSe(IV)還元により黒色の沈殿物を生成することが示され、この沈殿物はXRD分析により六方晶の結晶性を有する黒色Se(0)であることが明らかとなった。

既存の Se(IV) 還元菌が生成する Se(0) は、すべてアモルファス状の赤色 Se(0) であり、その周囲は細胞外高分子で覆われているため沈降性に乏しい。一方、集積系 D' が生成する結晶性の黒色 Se(0) は沈降性が高く、重力沈降により容易に固液分離できることが実験的にも確認された。また、培地中の硫酸イオン濃度を低くすると Se(IV) 除去能が低下し、黒色 Se(0) の沈殿量が減少したことから、黒色 Se(0) の生成には硫黄代謝が関連していることが示唆された。集積系 D' 内には多様な微生物が存在していたことから、黒色 Se(0) 形成反応の機構を解明するため、集積系 D' から黒色 Se(0) 生成に関与する細菌(群)を単離することを試みた。

3. 黒色 Se(0)を生成する耐塩性 Se(IV) 還元菌 Malaciobacter sp. UFI-3株の単離

集積系 D'を、乳酸塩を含む Marine Broth の平板培地にプレーティングし、好気的または嫌気的な培養を行い (Se (IV) を含む系と含まない系の両者を設定)、培地上に形成された代表的なコロニーを 5 つ採取した。各コロニーは Se (IV) を含む液体培地を用いて、集積系 D'の維持条件と同様の嫌気条件 4 日/好気条件 3 日での培養に供し、黒色の沈殿が生成されたものについて、その培養液を再び同様の平板培養を行うことで純化をはかった。結果として、最終的に液体培養において Se (IV) を還元し、黒色 Se (0) を生成する細菌株を単離することができた。

定義されていない混合微生物系が Se(IV) を還元し、 黒色 Se(0) が生成したという事例は僅かながら報告されている $^{3)4}$ が、純粋菌による黒色 Se(0) は確認されていなかったため、集積系 D' においては複数の微生物の相互作用で黒色 Se(0) が生成されていると予想していたが、単独で黒色 Se(0) を生成する Se(IV) 還元菌の存在が確認されたことは極めて興味深く、Se の微生物代謝における未知の側面を示唆するものといえる。

単離された菌株を UFI-3 と命名し、各種生理特性試験、および 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統学的解析およびを行ったところ、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性の運動性を有するグラム陰性短桿菌であり、Ma/aciobacter 属細菌であることが明らかとなった。また、増殖特性試験の結果から、 $20\sim42^{\circ}$ C、 $pH 6.0\sim9.0$ 、塩分濃度 $1\sim9\%$ で生育可能な耐塩性細菌であり、増殖の至適温度は $28\sim37^{\circ}$ C、至適 pH は 8.0、至適塩分濃度は $3\sim7\%$ であった。このことから、UFI-3株は比較的広範な環境条件下での利用が可能であるといえる。

4. Ma/aciobacter sp. UFI-3 株の Se(IV) 還元特性

1 mM の Se(IV)を含む培地(Marine Broth に炭素源として乳酸塩を添加したもの)で嫌気的または好気的に 7 日間の液体培養を行うことにより、Ma/aciobacter sp. UFI-3 株による Se(IV) 還元特性を評価した(図 1)。この結果、UFI-3 株は、5%の高塩分濃度下においても、嫌気・好気の両条件下で Se(IV)を還元できることが明らかになった。

UFI-3 株は、嫌気条件下では試験期間内に 8~9 割の Se(IV)を還元し液相から除去したが、培養液はアモル ファス状の Se(0) に特有の赤色を呈することはなく、 結晶性 Se(0)と考えられる黒色の沈殿のみを生成した。 この間、炭素源である乳酸の消費は僅かであり、明確 な細胞増殖も観察されなかった。一方、好気条件下で は、4日以内にSe(IV)のほぼ全量が還元・除去された が、黒色沈殿の生成とともに培養液の赤色への呈色が 確認された。また、乳酸は効率的に消費され、それに 伴う明確な菌体増殖も示された。これより、UFI-3 株 は好気条件下では既往の還元菌同様に、Se(IV)還元に よってアモルファス状の赤色 Se(0)を生成するが、嫌 気条件下においては、これまでに報告のない結晶性の 黒色 Se(0)への代謝を行うことが示唆された。なお、 好気条件下でも黒色沈殿の生成されたことは、培養系 内で部分的に形成された嫌気環境において黒色 Se(0) への代謝が生じていたものと解釈できる。

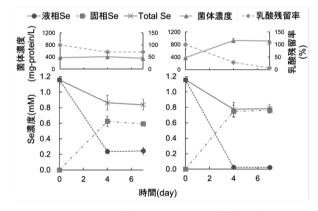


図 1. UFI-3 株の Se(IV) 還元特性試験 左:嫌気条件下、右:好気条件下

文 献

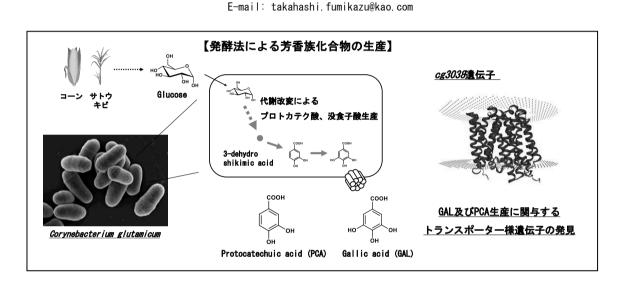
- 1) Soda et al., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 82(1), 173-181, (2017)
- 内田寛大ら, 第 73 回日本生物工学会大会, (2021)
- 3) Hageman *et al.*, *Journal of Hazardous Materials*, 329, 110-119, (2017)
- 4) Povedano *et al.*, *Journal of Hazardous Materials*, 445, 130557, (2023)

Corynebacterium glutamicum における 芳香族化合物排出因子の探索

金田 実郎・永井 暉・野中 鏡士朗・髙橋 史員*・小山 伸吾

花王株式会社 生物科学研究所

〒640-8580 和歌山県和歌山市湊 1334 番地 Tel: 070-3297-1263 Fax: 073-426-5027



我々は抗酸化剤、半導体用薬剤など多方面で産業利用される没食子酸に着目し、Corynebacter ium glutamicum を用いた糖からの没食子酸生産研究を進めている。しかし本菌において機能する没食子酸排出因子に関しては不明であった。本研究において、膜貫通型のトランスポーター様内在性遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、その生産能を評価した結果、cg3038遺伝子破壊株において没食子酸生産性が宿主菌株比で3割にまで減少することが見いだされた。続いて cg3038遺伝子強化株の生産性を評価した結果、没食子酸生産性が宿主菌株比で3倍、さらに没食子酸前駆体であるプロトカテク酸の生産性が5倍に向上した。本結果から、cg3038遺伝子が没食子酸及びプロトカテク酸の排出因子である可能性が新たに示唆された。

1. 背景

石化由来原料及び希少植物からの芳香族化合物製造法に次ぐ第三の製造方法として、バイオマスなどの再生可能資源から微生物を用いて芳香族化合物を生産する技術の開発が進められている。低環境負荷かつ気候変動の影響を受けにくい安定的な製造方法として多くのメリットが期待される一方、産業利用に向けては生産性向上などによるコストダウンが望まれる。そのアプローチのひとつとして、目的物の細胞外への輸送因子を特定することは非常に重要である。例えば、アミ

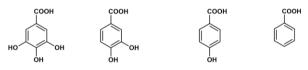
ノ酸の発酵生産においては *Corynebacter ium* g/utamicum におけるリジントランスポーターLys E^{11} や グルタミン酸排出に関わるメカノセンシティブチャネル $NCg | 1221^{21}$ に関する研究が大きく貢献している。

没食子酸は、植物ポリフェノールの一つで、多方面で産業利用される工業的に重要な芳香族化合物である。しかし、現在はウルシ科の植物に生じる五倍子から抽出して製造されるため、収量が天候に左右されやすく、生産地も限定されている。一方、発酵生産によ

る没食子酸生産例は数が少なく、特に *C. glutamicum* において機能する没食子酸排出因子に関しては筆者らの知る限りでは報告されていない。そこで本研究では *C. glutamicum* における没食子酸排出因子の探索を行った。

2. 結果と考察

C. glutamicum NBRC12168 (=ATCC13032) 株を親株として、トランスケトラーゼ遺伝子及びデヒドロシキミ酸デヒドラターゼ遺伝子の強化、シキミ酸デヒドラターゼ遺伝子の強化、さらにプロトカテク酸ヒドロキシラーゼ遺伝子の導入により没食子酸生産菌 KC148 株を作製した。本菌株を宿主として、内在性の膜貫通型のトランスポーター様遺伝子破壊株を作製し、その生産能を評価することで、没食子酸排出因子の特定を試みた。結果、プロトカテク酸及び 4-ヒドロキシ安息香酸の輸送活性が知られる PcaK³⁾ や安息香酸トランスポーターBenK, BenE³⁾ などの類縁化合物(図 1)の輸送活性が報告されている遺伝子の破壊株においては生産性の減少が観察されなかった一方で、cg3038遺伝子破壊株において生産性が宿主菌株比で3割にまで減少することが見出された。(図 2)



没食子酸 プロトカテク酸 4-ヒドロキシ安息香酸 安息香酸

図 1. 没食子酸とその類縁芳香族化合物の分子構造

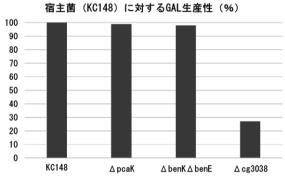
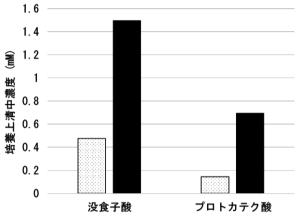


図 2. 遺伝子破壊株の没食子酸生産性

次に、KC148 株の cg3219 (乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子) 領域に cg3038 遺伝子をノックインする形で導入した cg3038 強化株を作製した。KC148 株の cg3219

破壊株をコントロールとして、*cg3038* 強化株の没食子酸及びプロトカテク酸生産性を評価した。結果、*cg3038* 強化株では没食子酸生産性がコントロール比で 3 倍に向上した。さらに没食子酸前駆体であるプロトカテク酸の生産性も 5 倍に向上した。(図 3)



□KC148 △ cg3219 ■KC148 △ cg3219::cg3038 図 3. cg3038 強化株の没食子酸 及びプロトカテク酸生産性

cg3038 翻訳産物は Major Facilitator Superfamily に属し、12 回膜貫通領域を有すると推定され(図 4)、本結果から cg3038 遺伝子が没食子酸及びプロトカテク酸の排出に関与する新規トランスポーターである可能性が示唆された。

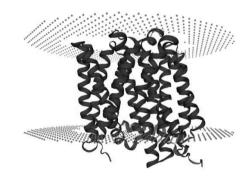


図 4. cg3038 の推定立体構造

2. 文献

- Vrljic, M. et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826 (1996).
- 2) Nakamura, J. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4491-4498 (2007).
- 3) Chaudhry, M. T. *et al.*, *Microbiol.*, **153**, 857-865 (2007).

筋芽細胞の足場フリーでの無血清浮遊培養方法の検討

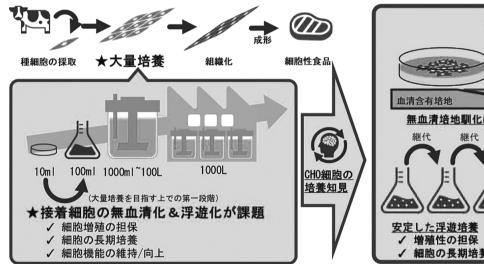
Myoblast culture without scaffold in suspension culture

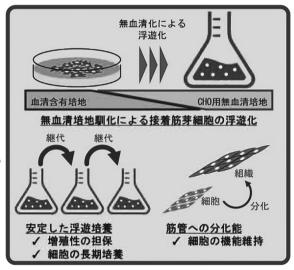
橋本 昂士郎^{1,2*}・清水 皓太²・山野-足立 範子²・大政 健史²

1日本ハム㈱中央研究所、2大阪大学大学院工学研究科

〒565 - 0871 大阪府吹田市山田丘 2 - 1 U1E 棟 801

Tel: 06-6879-4580 Fax: 06-6879-7938 E-mail: ko.hashimoto@nipponham.co.jp





要旨

近年、細胞性食品(いわゆる培養肉)が代替タンパク質として注目されている。しかし、その生産プロセスは発展途上である。特に細胞の大量培養の課題が非常に大きい。本研究では、筋繊維の前駆細胞である筋芽細胞を用いて、その大量培養方法について検討した。スケールアップの観点から、CHO細胞などで広く用いられる足場フリーでの浮遊培養が有用だと考え、筋芽細胞への適応性について検証を行った。

緒言

世界人口の増加や温暖化に伴う食糧生産性の低下などに起因し、将来のたんぱく質不足が懸念されるようになってきた。代替肉として、植物や真菌由来のたんぱく質の活用も進められているが、細胞性食品が実現すれば、動物性たんぱく質を、畜産より環境負荷を抑えながら、また、アニマルウェルフェアにも配慮しながら生産することが可能になるため、世界各国で細胞性食品の製造技術に関する研究開発が進められている。

その生産プロセスは種細胞の採取・細胞の大量培養・細胞の回収・細胞の成形という工程をとるが、発展とこである。特に細胞の大量培養が最も大きな課題とされている。その原因の一つに、畜肉を構成する筋芽細胞、線維芽細胞、脂肪前駆細胞がいずれも足場依存の指導を持つ細胞であることが挙げられる。一方でスケールアップ簡便性の観点からは足場非依存的な浮遊培養が優れた培養方法といえる。実際にこの方法で培養されるチャイニーズハムスター卵巣細胞(以下 CHO 細胞)は、抗体医薬品生産などで産業利用されており、最大で20,000L 規模での実生産が行われている。そこで本研究では、培養肉を構成しうる細胞のうち、筋芽細胞を用いた浮遊培養に着目し、検討を行った。

結果および考察

筋芽細胞株として、マウス由来 C2C12、ラット由来 L6 を用いた。増殖培地として 10%FBS-DMEM、CH0 用無血清培地 CHO-SFM-A、分化誘導培地として 2%Horse Serum (HS)-DMEM を用いた。

まず、筋芽細胞株の無血清浮遊培養への馴化を行った。筋芽細胞株の浮遊培養への馴化は、CHO 細胞の無血清浮遊培養への馴化手法を参考にした。10 cmディッシュ上で 10%FBS-DMEM を用いた接着培養を開始し、継代毎に増殖培地の半量を CHO-SFM-A に置換し、徐々に無血清化を行った。また、10%FBS-DMEM と CHO-SFM-A の比が1:31 の条件からの継代時に増殖培地をすべて CHO-SFM-A に置換し、完全無血清化させた。本条件で L6 は完全無血清化に伴い、浮遊化がみられたものの、C2C12 では接着性の低下は見られたが、浮遊化には至らなかった(図1)。そこで、C2C12 は無血清化したのちに、低接着プレートに播種し、浮遊化を行った。

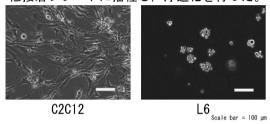


図1 完全無血清化後の筋芽細胞

次に静置条件で浮遊化させた筋芽細胞株を用いて 125 ml フラスコを用いた振とう培養を検討した。種々の条件検討を経て、振とう時の回転直径 25 mm, 振とう速度 140 rpm での条件が最も凝集が少なく培養できることが明らかとなった。

本条件にて C2C12 を培養したところ、継代時にトリプシン処理をすることで、継代培養も可能であることが分かった。また L6 についても同条件でフラスコ培養および、継代による長期培養が可能であった。

これらの細胞を用いて、回分培養を行った。培養の条件はこれまでと同様とし、播種密度を $5x10^5$ cells/ml とした。回分培養中は 24 時間ごとにサンプリングを行い、生細胞密度、生存率を計測した。その結果、いずれの細胞も培養開始後 24 時間までは細胞数は横ばいで推移し、その後増殖を始めた。C2C12 では培養開始後 72 時間後に $15.5x10^5$ cells/ml, 1.6 では $15.5x10^5$ cells/ml に達した。(図 $15.5x10^5$ cells/ml cells/ml cells/ml $15.5x10^5$ cells/ml に達した。(図 $15.5x10^5$ cells/ml cells/ml

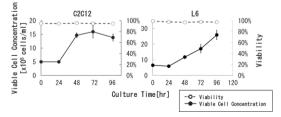


図 2 回分培養中の生細胞密度と生存率の推移

最後に浮遊培養を行った筋芽細胞を筋分化誘導し、 その筋管分化能を検証した。回収した細胞を分化誘導 培地に懸濁し、無処理のディッシュ上で培養した。分 化誘導中は 2~3 日ごとに培地交換を行った。接着培養した筋芽細胞は、通常およそ 10~14 日目で細胞同士の融合を伴う筋管の形成が見られるが、浮遊化した細胞はいずれも接着性が低下しており、分化誘導中に細胞が剥離し、筋管の形成が認められなかった。(図3)

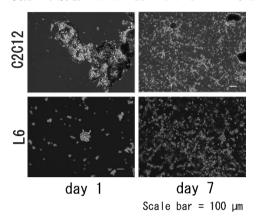


図3 無処理ディッシュ上での分化誘導

そこで、C2C12 を用いて分化誘導条件の検討を行った。 播種直前のトリプシン処理の有無、播種時の培地(10% FBS-DMEM 又は 2%HS-DMEM)、ディッシュへのコーティン グについて検討を行った。その結果、ディッシュのコ ラーゲンコーティングが最も効果が大きく、他の条件 の影響は小さかった。そこで、検討した条件のうち、 播種直前にトリプシン処理を実施した細胞を用いて、 播種時の培地を 2%HS-DMEM としてコラーゲンコートディッシュ上に播種し、分化誘導を行った。その結果、 細胞の接着性が上昇し、分化誘導期間中細胞が剥離することなく、8 日目以降筋管の形成が確認された(図 4)。

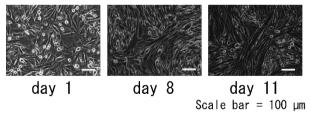


図 4 コラーゲンコートディッシュ上での 浮遊化 C2C12 の分化誘導

以上の結果から、筋芽細胞株を分化能が維持された 状態、かつ接着担体を用いない条件で浮遊培養するこ とが可能であることが示された。この結果は CHO 細胞 で使用されているプラットフォームが、細胞性食品用 の細胞でも活用可能であることを示唆するものである。

産業化に向けては、細胞密度のさらなる上昇や、畜 産由来細胞への適用など、検討の余地は残されている ものの、本研究の結果は細胞性食品の産業化に向けた 足がかりとなりうる。

簡便な腸管模倣上皮ー微生物共培養システムの開発と利用

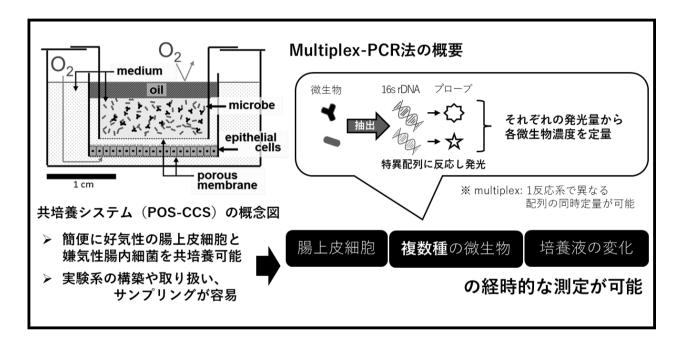
梅原 嘉宏1•青柳 秀紀1,2*

1 筑波大学大学院 生命農学学位プログラム, 2 筑波大学 生命環境系

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Tel: 029-853-7212

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



要旨

近年、腸内細菌や腸内細菌業が宿主に様々な影響を及ぼすことが示唆され、腸内細菌や腸内細菌 叢と宿主細胞の相互作用に関心が高まっている。腸内細菌や腸内細菌叢と宿主細胞の相互作用を理解するために有効な in vitro の共培養モデルが求められている。しかしながら、腸内には偏性嫌気性の細菌も数多く生息しており、酸素が必要な宿主細胞と簡便に共培養ができるシステムの構築は困難であった。我々は、この課題を解消した新規な共培養システム (Partial Oil Sealing Co-Culture System: POS-CCS) を開発し、これまで単一の嫌気性腸内細菌と好気性の腸上皮細胞の共培養を実現すると共に、両者の相互作用の一端を解析してきた 1,2)。本研究では POS-CCS と Multiplex-PCR 法を適切に組み合わせることで、デザインした複数種の腸内細菌とモデル腸上皮細胞との共培養を実現すると共に、その培養経過の定量的把握に、国内外を通じてはじめて成功した。

1. はじめに

プロバイオティクスの作用機序の解明や製品化、製剤化のための動物実験代替法として、有効な in vitro の共培養モデルの需要が高まっている。腸内微生物の多くは偏性嫌気性であり、腸上皮細胞は好気性の細胞で

あるという特徴を両立し、簡便に共培養ができるシステムの構築は困難であった。我々は、酸素要求性の異なる微生物と腸上皮細胞を簡便に共培養できるシステム(Partial Oil Sealing Co-Culture System: POS-CCS)を

独自に開発し、種々の単一嫌気性微生物との共培養と相互作用を解析してきた^{1,2)}。しかしながら、腸内環境では複数の腸内細菌が相互作用しているため、有効な*in vitro* の共培養モデルを考えた場合、単一の腸内細菌ではなく、複数種の腸内細菌とモデル腸上皮細胞の共培養系を構築する必要がある。

本研究では、デザインした複数種の腸内細菌とモデル腸上皮細胞との共培養系の構築、共培養の経過の定量的把握、および相互作用の解析を試みた。

2. 材料と方法

モデル腸内細菌として、Lactobacillus paragasseri、Bifidobacterium longum subsp. longum を、腸上皮のモデルとして Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いた。L. paragasseri と B. longum の 16s rDNA を解析し、V6 領域をターゲットとした Multiplex-PCR 法に使用可能なプライマーとプローブを設計し、それぞれの菌体濃度を測定した。POS-CCS を用いて、MDCK 細胞と L. paragasseri と B. longum の共培養を行った。共培養中の、腸上皮細胞の単層膜の生育指標である経上皮電気抵抗(TEER: Trans epithelial electrical resistance)と生存率、培養液の pH、L. paragasseri と B. longum のそれぞれの菌体濃度、を経時的に測定し、共培養の経過を定量的に把握した。

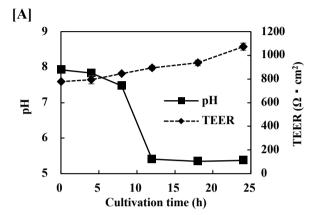
3. 結果と考察

POS-CCS を用いた MDCK 細胞と L. paragasseri と B. longum の共培養の経過を図1に示した。培養液の pH に着目すると、培養8~12h 目にpH が7.5 から5.4 に低下した(図1[A])。これは微生物の増殖による有 機酸の産生によるものと推察された。L. paragasseri と B. longum の菌体濃度は、培養 4~24 h 目までにいずれ も 1,000 倍以上増殖していることが示された(図1[B])。 腸内における Bifidobacterium と Lactobacillus の存在比 は 99:1 とされており 3)、本実験系においても B. longum と L. paragasseri は同様の比で推移した。一方、pH の 低下に対して TEER は経時的に増加する傾向を示した。 MDCK は pH 5 を境にバリア機能の破綻や増殖が抑制 されることが報告されている 4)。本共培養系では培養 12 h 目以降は pH の値は約 5.4 を示し、安定していた ため、MDCK のバリア機能が維持(あるいは向上)し たと考えられた。また、ヒト腸内の pH の値は 5~7 で あり⁵⁾、本実験での変動はこの幅に収まっていた。

以上の結果から、POS-CCS と Multiplex-PCR 法を組み合わせることによって、TEER の上昇と培養後の生存率、微生物による有機酸産生に伴う pH の低下、B. longum と L. paragasseri の菌体濃度を経時的に把握すると共に、一定の範囲内で腸管腔の環境を模倣することができた。我々の知る限り、実験者によりデザイ

ンされた複数種の微生物とモデル腸上皮細胞を共培養し、それぞれの培養経過を捉えた系は初めての報告である。本研究で開発した共培養システムは、今後、ヒトやヒト以外の宿主も含めた腸内細菌や腸内細菌叢と宿主細胞の相互作用の理解推進に大きく貢献することが期待される。

謝辞: 本研究の一部は JSPS 科研費 JP23KJ0274 の助成を 受け実施した。



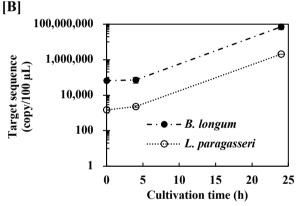


図 1. Partial Oil Sealing Co-Culture System (POS-CCS) を用いた MDCK 細胞と *L. paragasseri* および *B. longum* の共培養経過. [A] 培養液の pH と TEER の経時的変化、[B] *B. longum* と *L. paragasseri* の増殖経過.

文献

- 1) Umehara, Y., Aoyagi, H.: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **135**, 487-492 (2023).
- 2) Umehara, Y., Aoyagi, H.: MPS World Summit 2024, 12, 5 (2024).
- 3) Aizawa, E., et al.: Journal of Affective Disorders, 202, 254-257 (2016).
- 4) Manissorn, J., et al.: Scientific Reports, 7, 1798 (2017)
- 5) Yamamura, R., et al.: Frontiers in Microbiomes, 2, 1192316 (2023).

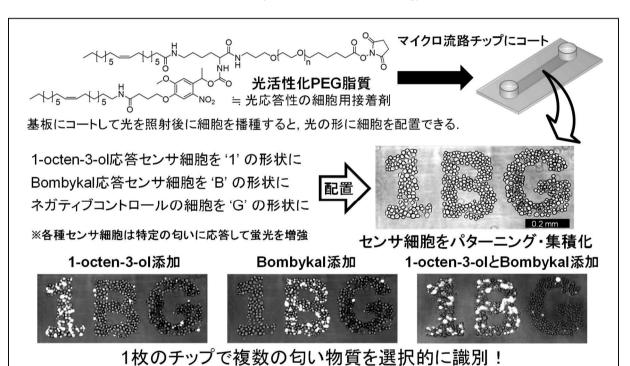
匂いを識別するための嗅覚受容体発現細胞の 光パターニング技術の開発

山平 真也 1* · 光野 秀文 2 · 神崎 亮平 2 · 山口 哲志 1

¹ 大阪大学産業科学研究所、² 東京大学先端科学技術研究センター 〒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: 06-6879-8465

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



要旨

様々な匂いを高感度かつ選択的に識別する技術は、水質検査から疾病診断まで多くの応用が期待されている。そのような匂いの検出素子として、特定の匂いに応答して蛍光を増強する嗅覚受容体発現細胞が開発されている。本研究では、光により細胞を基板上に捕捉できる光活性化 PEG 脂質を用いて、複数種類の嗅覚受容体発現細胞をマイクロ流路内にパターニングした。これにより、複数の匂い物質を選択的に識別することが可能であった。

緒言

様々な匂いを高感度かつ選択的に識別する技術は、

水質検査から疾病診断まで多くの応用が期待されている。複数種類の匂い物質を判別するには、複数種類の匂い物質を判別するには、それぞれの素子のサンプルに対する応答を解析する必要がある。そのような素子として、嗅覚受容体・共受容体・のムセンサタンパク質を共発現させた細胞は、優として検出できる¹⁾. 一方、センサ細胞の配置方法は限度にない物質を基拠シグナルとして検出できるが、他をを対した。複数種類のセンサ細胞を基板上に、複数種類のセンサ細胞を可では、光でを調整を構捉できる光活性化 PEG 脂質 ²⁾を用いて、複数種類のセンサ細胞をマイクロ流路内にパターニングし、複数の匂い物質を選択的に識別した.

実験方法

光活性化 PEG 脂質を修飾した基板上では、光照射前には細胞が捕捉されないが、光照射 ($\lambda \leq 405$ nm)によって分子内の脂質がアンカーとして細胞膜に作用可能となり、細胞を基板上に捕捉できる (図 1. a). したがって、この基板上に光で任意の形状を描画し、細胞を播種して洗浄すると任意の形状に細胞を配置できる。この技術を用いて、特定の匂い物質に応答して蛍光強度が上昇する複数のセンサ細胞を、マイクロ流路内の微小領域にそれぞれ別の形状で配置した. 具体的には、匂い物質の 1-octen-3-ol に結合する嗅覚受容体 0r13aを昆虫細胞株 (SF21 細胞) に発現させたセンサ細胞、Bombykal に結合する BmOR3 を発現させたセンサ細胞、および匂い物質受容体を発現していないネガティブコントロールの細胞 (図 1. b) を、それぞれ'1'、'B'、'G'の形状にパターニングした (図 1. c).

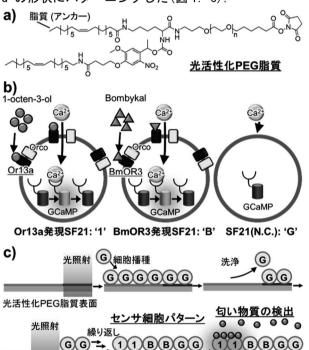


図 1. a) 光活性化 PEG 脂質, b) 各種センサ細胞の構造, c) 各種センサ細胞のパターニング方法

結果と考察

1-octen-3-ol, または Bombykal, およびその両方を含む溶液をマイクロ流路に導入し、センサ細胞の蛍光強度の変化を解析した。匂い物質等を添加する前の平均蛍光強度を FO とし、蛍光強度の増加分を ΔF として $\Delta F/FO$ を求めたところ、それぞれ' Γ '、または' Γ B'、および' Γ 1'と' Γ B'の形状の細胞パターンで蛍光強度の上昇が確認された。一方、それぞれの匂い物質に対応しない細胞パターンや、ネガティブコントロールである' Γ G'の形状の細胞パターンでは蛍光強度の上昇は

見られなかった(図 2). したがって、1枚の基板上に複数種類のセンサ細胞をパターニングし、複数種類の匂いを識別できたことが示された③、本技術は、細胞自体が有する基板への接着機能に依存せず、様々な細胞に幅広く適用できるパターニング技術である. そのため、多種多様なセンサ細胞を高密度に集積し、様々な匂い物質を選択的に識別するための統合的なプラットフォーム技術として期待される.

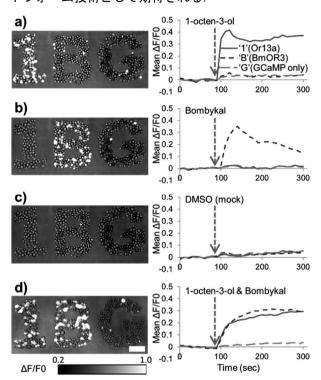


図 2. 左:明視野と Δ F/F0 (Range: 0.2-1.0) の重ね合わせ画像.右: '1', 'B', 'G' それぞれの平均 Δ F/F0 の時間変化.a) 100 μ M 1-octen-3-ol 添加時,b) 10 μ M Bombykal 添加時,c) 0.1% DMSO 添加時,d) 1-octen-3-ol と Bombykal の両方を添加時. Scale bar: 100 μ M

文献

- Mitsuno, H., Sakurai, T., Namiki, S., Mitsuhashi, H., and Kanzaki, R.: Biosens. Bioelectron. 65, 287-294 (2015).
- Yamahira, S., Misawa, R., Kosaka, T., Tan, M., Izuta, S., Yamashita, H., Heike, Y., Okamoto, A., Nagamune T., and Yamaguchi, S.: *J. Am. Chem.* Soc. 144, 13154-13162 (2022).
- 3) Yamahira, S., Mitsuno, H., Yamaoka, M., Nagamune, T., Okamoto, A., Kanzaki, R., and Yamaguchi, S.: *Biosens. Bioelectron.:X.* 18, 100473 (2024).

微生物感染機構解明に向けた

1細胞レベルのダイズ根毛遺伝子発現解析

蘇 千雅 1·松永 浩子 2.3 · Ashok Samuel 2 · 奥平 美里 2 ·

濱崎 英史 4·松井 南 4,5·竹山 春子 1,2,3,6*

1早稲田大学大学院先進理工学研究科,2早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構,

³産総研・早大生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ, ⁴理化学研究所環境資源科学研究センター, ⁵横浜市立大学木原生物学研究所, ⁶早稲田大学先進生命動態研究所

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

Tel: 03-5272-1289

E-mail: haruko-takeyama@waseda.jp

ダイズと根粒菌の共生は、収量・品質の向上に繋がる。この共生関係は、根粒菌が根表面の根毛細胞に感染することから始まる。根粒菌の感染機構の解明を目指した先行研究では、単一細胞からなる根毛を数万細胞以上収集し1つの対象として解析を行っており、様々な感染段階の根毛を区別した解析が困難であった。本研究では、根毛1細胞レベルでの遺伝子発現解析(RNA-seq)による根粒菌感染機構の解明を目指した。その結果、非感染・感染前・感染と継時的に変化する根毛感染動態の遷移とその遺伝子発現を捉えることが出来た。現在は他の植物生育促進根圏細菌のダイズ根毛への影響を調べ、その有用性について考察を進めている。

1. はじめに

ダイズはタンパク質を多く含み、その安定生産は今後の食糧問題解決の鍵になると期待される。ダイズの成長促進には、根粒菌や放線菌等の植物生育促進根圏細菌(PGPR)との共生が寄与している。特に根粒菌は、ダイズと共生するため、ダイズ根表面に存在する根毛に根粒菌が感染することが知られている。根粒菌が根

毛に感染する際、根毛内の転写状態が変化するため、 詳細な根粒菌のダイズ感染機構の理解には根毛レベル での遺伝子発現動態を捉えることが有効である。

感染機構の解明を目指した先行研究では、数万細胞以上の根毛を 1 つの解析対象として遺伝子発現解析 (RNA-seq)) を行っており、様々な感染段階の根毛を区別した解析が困難であった。そこで本研究では、根毛 1 細胞レベルでの RNA-seq により、詳細な根粒菌感

染機構解明を目指した。

2. 材料 · 方法

根粒菌(Bradyrhizobium japonicum USDA110)及びダイズ根内から分離した放線菌(Streptomyces)を培養した。続いて、根粒菌のみの接種群、根粒菌と放線菌の共接種群、細菌非接種群のダイズを準備した。2日間培養後、根毛1細胞レベルを微小組織採取装置で打ち抜き・回収しRNA-seq¹⁾を行った(図1)。

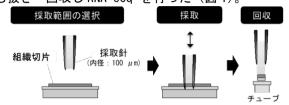


図1. 微小組織採取装置の原理

3. 結果 - 考察

根粒菌の感染機構解明を目指し、根粒菌接種及び細 菌非接種ダイズにおける根毛 RNA-seg を行った。感染 段階の特定のため、遺伝子発現の結果をクラスタリン グし、ダイズ根毛の遺伝子発現パターンを分類した。 その結果、根粒菌を接種したダイズ根毛の遺伝子発現 パターンは複数種に分かれることが示された(図 2)。 その中のクラスター2 は既知の根粒菌感染マーカー遺 伝子を発現しており、根粒菌が感染段階であることが 示唆された。また、細胞状態の遷移過程を推測する擬 似時間解析の結果、根毛の感染段階が矢印の方向で遷 移していくことが示唆された。よってこれらの解析か ら、根粒菌を接種させたダイズ根毛内で、感染前・感 染段階と複数の感染段階を区別することが可能であっ た。以上により、根毛の遺伝子発現を1細胞レベルで 解析することで、根粒菌の根毛への詳細な感染段階を 特定可能なことが示された。

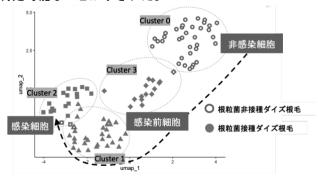


図 2. 根粒菌接種及び細菌非接種ダイズにおける 根毛のクラスタリング

また各感染段階の根毛の特徴を捉えるため、GO enrichment 解析を実施した。その結果、根粒菌とダイズが共生後期(根粒の発達時)に重要な役割を果たすことが知られている²⁾カロテノイド生合成経路の遺伝子群が、根粒菌感染前細胞で有意に発現上昇していた。特に、感染前細胞であるクラスター1ではカロテノイド生合成経路の上流の遺伝子、また感染細胞であるクラスター2では下流の遺伝子の発現が上昇していた(図 3)。カロテノイドが、根粒菌とダイズの感染初期に何らかの役割を果たす可能性が示唆された。



図3. カロテノイド生合成経路

加えて、根粒菌と放線菌の共接種におけるダイズ根毛の影響を調べるため、共接種・根粒菌単独接種及び細菌非接種ダイズにおける根毛のRNA-seq解析後、クラスタリングを行った。その結果、根粒菌と放線菌を共接種したダイズ根毛は、根粒菌接種及び細菌非接種ダイズとは異なるクラスターを形成した。これは、根粒菌と放線菌を共接種したダイズ根毛は特徴的な遺伝子を発現しており、それらの遺伝子がダイズの成長促進に関連する可能性が示唆された。

4. 今後の展望

本研究では、根毛1細胞レベルのRNA-seqにより、根粒菌のダイズ根毛への詳細な各感染段階の遺伝子発現動態を捉えた。今後は、根粒菌感染後期にも注目し、感染機構全体の解明を目指す。加えて根毛1細胞レベルのRNA-seqを、有用細菌スクリーニングへの応用するための検討を進める予定である。

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(管理法人:生研支援センター)によって実施されました。

Graphic abstract は BioRender.com で作成した。

汝献

- 1) Yamazaki et al., *Sci Rep.* **10**, 7083 (2020)
- 2) Kim et al., *Plant Physiol*, **162**, 1420-1433 (2013)

3D イメージング解析に基づいた がんオルガノイドの薬剤応答性評価

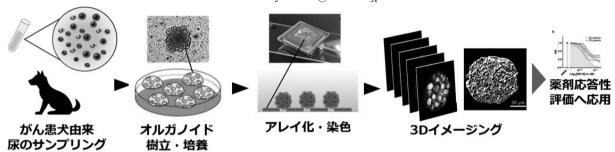
小嶋 一聖 1·山本 晴 2·臼井 達哉 2·呰上 大吾 2·田中 剛 1·吉野 知子 1*

¹東京農工大学大学院 工学研究院 生命機能科学部門 ²東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門

〒184-0013 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



がんオルガノイドは幹細胞性を持つ3次元培養モデルであり、生体内の薬剤応答を高度に再現するため、患者の治療法選択に応用が期待されている。しかし、同一株内でも形態や薬剤応答などに不均一性が存在する。本研究では、当研究室で単一細胞解析用に開発した Microcavity array 法を改良し、単一オルガノイドを平面上にアレイ化し、3Dイメージング解析技術を確立した。また、本技術を用いてがんオルガノイドの不均一な薬剤応答を定量化した。今後、がんオルガノイドの不均一性解析や詳細な薬剤スクリーニングへの応用が可能と考えられる。

1. はじめに

がん組織は自己複製能と分化能をもつごく僅かなが ん幹細胞と、それによって形成される分化細胞から構 成される。また、がん幹細胞はがんにおける転移や再 発、薬剤耐性など化学療法に対する高い抵抗性を獲得 する原因の 1 つであることが報告されている 1)。その ため、治療の標的としてがん幹細胞が重要視されてい るが、従来の細胞株モデルではがん幹細胞の維持が難 しく、がん組織の再現が不十分であるという課題が存 在する。こうした課題を解決するために、近年、新た な培養モデルとしてがんオルガノイドが注目されてい る。がんオルガノイドは、幹細胞性を維持した3次元 培養モデルであり、由来組織の表現型や遺伝子型など の特徴を高度に再現できるため、患者にとって最適な 治療薬の決定を in vitro で正確かつ迅速に行うことな ど、患者の治療法選択への応用が期待されている。し かし、がんオルガノイドは同一株内でも表現型や遺伝 子発現などに不均一性を有することが確認されており、 その性質からオルガノイド間に不均一な薬剤応答が現れることが報告されている ²⁾。現在行われている薬剤応答性評価では、多様な表現型を持つオルガノイドを1つにまとめて生存率を評価する方法が主流であり、平均化された薬剤応答でしか評価することができない。そこで本研究では、当研究室で単一細胞解析用に開発した Microcavity array (MCA)法 ^{3,4)}の改良を行い、単一オルガノイドを平面上にアレイ化することによる 3Dイメージング解析技術の確立を試みた。また、本技術をがんオルガノイドの薬剤応答性評価に応用した。

2. 方法

Ni 製 MCA (孔径: 20μm, 孔数: 4,000)の下部に Poly Dimethyl Siloxane (PDMS)製の流路を結合し、オルガノイド捕捉用のデバイスを構築した(図 1)。また、使用するがんオルガノイドとして、膀胱がん患犬由来の尿から樹立したがんオルガノイドを使用した。オルガノイド捕捉デバイスをペリスタポンプに連結し、がんオルガノイド懸濁液をデバイスに導入することで MCA 上

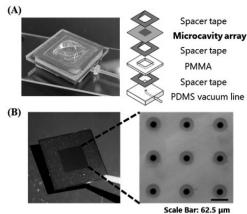


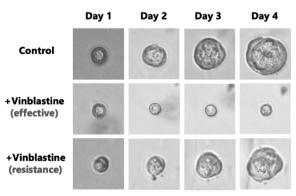
図 1. オルガノイド捕捉デバイスの構成 (A), および Microcavity array (MCA)のレイアウト(B)

にオルガノイドの捕捉を行った。洗浄操作後、核をDAPI、細胞骨格をActi-stain670、幹細胞マーカーである Lgr5 を抗 Lgr5 抗体で染色を行い、MCA 上に捕捉されているがんオルガノイドの共焦点顕微鏡観察を行った。また画像解析ソフトを用いて 3 次元画像解析を行い、構成細胞数、体積、核体積、Lgr5 体積の算出を行った。薬剤応答性評価については、抗がん剤であるビンブラスチンが 10, 1, 0.1 nM になるように調整した培地で 3 日間曝露した後、同様に染色・解析を行った。

3. 結果と考察

共焦点顕微鏡による観察の結果、MCAを用いることで最大 2.5×10^3 個のオルガノイドを同一平面上にアレイ化し、同一デバイス上で染色からイメージングまでの解析が可能であることを確認した。また、画像解析の結果、構成細胞数と体積の間には正の相関があり、また核体積に対する Lgr5 体積の割合の間には負の相関が確認された。これらのことから、MCA を用いてアレイ化したオルガノイドを単一レベルで解析可能であることが示された。

薬剤応答性評価について、経時観察の結果、ビンブラ



Scale bar: 20 µ

図.2 ビンブラスチン(lnM)曝露下におけるがんオルガノイドの経時観察

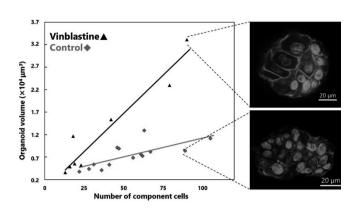


図 3. 画像解析によって取得した構成細胞 数と体積の相関

スチンの濃度に依存してオルガノイドの成長抑制が確認された。一方で、薬剤耐性を示し成長したオルガノイドの存在も確認した(図 2)。そこで、薬剤耐性を行したがんオルガノイドについて MCA で捕捉を行い結果、1 細胞あたりの体積が増加ることを確認した(図 3)。また、核体積に対するした。とないで、単れていることを確認した。ビンブラスチンは細胞のがあることを確認した。ビンブラスチンは細胞の極調を阻害する効能を持つことから、1 細胞あたりの体積が増大したことについては、薬効が見られた構いの積が増大したことについては、薬効が見られた構いであることが考えられた。以上より、MCA を用いてわいてもしたがんオルガノイドは、薬剤応答性評価において有用であり、薬剤耐性を有するオルガノイドの解析にも適していることが示された。

4. 今後の展望

従来の手法では、オルガノイドの 3D イメージング解析に時間がかかることや、単一レベルでの薬剤応答性評価が困難であった。しかし、本技術はこれらの課題を解決できる新たなハイスループット解析手法である。さらに、当研究室ではこれまでに MCA を用いた細胞の回収および染色工程の自動化技術の開発を行いが、オペレーター間の操作技術による不均一性を排除してきた。今回確立した解析技術と統合することで、より迅速かつ高精度な解析が可能になると考えられる。今後、さらなる調整法の検討により、より高精度かつ詳細な不均一性解析や in vitro での薬剤応答性評価を実施できると期待される。

文献

- [1] Batlle, E., et al.: *Nat Med.* **23(10)**, 1124-1134, (2017)
- [2] Roerink, S. F., et al.: *Nature*. **556(7702)**, 457-462, (2018)
- [3] Yoshino, T., et al.: Anal Chem. 88(14), 7230-7237, (2016)
- [4] Yoshino, T., et al.: *Biotechnol J.*. **17(6)**, e2100633, (2022)
- [5] Negishi, R., et al.: *Biosens. Bioelectron.* **67**, 438-442, (2015)

リン脂質ポリマー修飾アルギン酸ゲルを用いた バイオ人工膵臓の開発

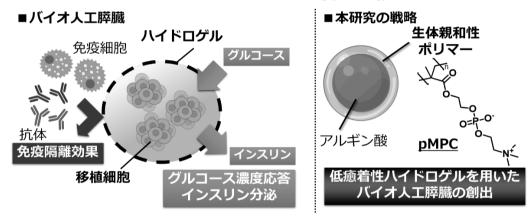
二ツ橋 龍 ・金子 真大・井藤 彰 *

1名古屋大学工学研究科.

〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学研究科 化学システム工学専攻

Tel: 052-789-3374

E-mail: ito.akira@material.nagoya-u.ac.jp



I型糖尿病の根治治療として、インスリン分泌細胞を内包したハイドロゲルや半透膜により構成されるバイオ人工膵臓が注目されている。ハイドロゲルの材料としてアルギン酸は広く用いられてきたが、生体内での炎症の惹起と癒着が問題となっている。本研究では、アルギン酸ハイドロゲルと生体分子との相互作用を低減するため、高い生体親和性を有するリン脂質ポリマーである 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーをハイドロゲル表面に修飾した。このハイドロゲルを用いて作製したバイオ人工膵臓を糖尿病マウスへ他家移植したところ、1カ月間にわたって正常血糖値を維持することに成功した。

1. はじめに

近年、血糖値の制御を担うインスリンを分泌する膵 β細胞が自己免疫によって破壊されて発症する I 型糖 尿病の患者数が増加している。糖尿病の標準治療はイ ンスリン注射であるが、厳密な血糖値コントロールが 困難であり、異常な低血糖を招く恐れがある。 I 型糖 尿病の根治治療として膵島移植が開発されたが、移植 細胞が宿主の免疫系により破壊される異物反応が問題 となっている。

こうした状況の中、新たな根治治療法としてバイオ 人工膵臓への注目が集まっている。バイオ人工膵臓は 半透膜やハイドロゲルを用いてインスリン分泌細胞を 包埋することで作製される。半透膜やハイドロゲルは 酸素、二酸化炭素、グルコース、インスリンといった 比較的分子量の小さな物質を透過することで、包埋細 胞の生理活性を維持する一方で、抗体や免疫細胞といった分子量の大きな物質を透過しないため、移植細胞 はレシピエントの免疫から隔離される。 バイオ人工膵臓のためのハイドロゲル材料として、アルギン酸が広く用いられてきたが、移植後に炎症の惹起による癒着が生じることが課題である。本研究では、高い生体親和性を有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーをアルギン酸ゲルの表面に修飾することで、癒着しにくいアルギン酸由来バイオ人工膵臓の開発を試みた。

2. 実験方法

アルギン酸と 2-アミノエチルメタクリルアミドをアミド縮合することで、メタクリル化アルギン酸(MA Alg) $^{1)}$ を合成した。MA Alg 水溶液を、塩化カルシウム、MPC、光開始剤(Irgacure1173)を含有した水溶液に滴下しイオン架橋させた。次いで、365~nm の紫外線を 15~分間照射すること、ゲル表面に poly (MPC) (pMPC)が修飾された pMPC Alg ビーズを得た。また、比較対照として、MPC を含まない液を用いて同様の操作を行うことで MA Alg ビーズを作製した。

ウシ血清アルブミン(BSA) およびトリプシンを濃度 1.5 mg/mL になるように D-PBS に懸濁した。懸濁液に作製したハイドロゲルビーズを浸漬し、37 °Cで $24 \text{ 時間静置した。その後、上清のタンパク質濃度を BCA Assay により測定した。$

マウス膵 β 細胞由来 MIN6 細胞の細胞塊を作製し、細胞塊 600 個を MA Alg 水溶液 1 mL に懸濁した。この懸濁液に対し、イオン架橋および MPC の表面修飾を行うことでバイオ人工膵臓を得た。Balb/c にストレプトゾシンを注射することで、糖尿病モデルマウスを作製した。血中グルコース濃度が 300 mg/dL を超えた時点で糖尿病とみなした。糖尿病マウスの腹腔へ作製したバイオ人工膵臓を移植し、30 日間の血糖値推移を追跡した。

3. 結果と考察

FT-IR 測定により作製したゲルビーズの表面構造を分析したところ、MPC 由来のピークが認められた。この結果は、ゲル表面に pMPC 層が構築されたことを示している。

pMPC の修飾がゲルビーズと生体分子との相互作用に与える影響を検討するため、ハイドロゲルビーズへのタンパク質吸着量を測定した。その結果、BSA およびトリプシンの両方に対して、pMPC Alg ビーズは MA Alg ビーズに比べて吸着量が減少した(図 1)。この結果は、ゲルビーズ表面に pMPC 層が構築されたことで、タンパク質との相互作用が低減したことを示している。タンパク質吸着は癒着の初期段階であるため、pMPC 修飾により癒着の抑制が期待された。

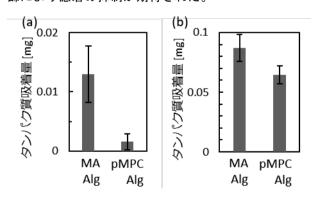


図 1. ハイドロゲルビーズへの (a) BSA および (b) トリプシンの吸着量。

MA Alg ビーズおよび pMPC Alg ビーズにインスリン分泌能力を有する MIN6 細胞を包埋しバイオ人工膵臓を移植した。作製したバイオ人工膵臓を糖尿病マウスへ他家移植したところ、MA Alg ビーズを用いた群では、正常血糖値を維持した個体が認められなかった(図2a)。これに対して、pMPC Alg ビーズを用いた群では5 匹中 4 匹が正常血糖値を維持した(図2b)。

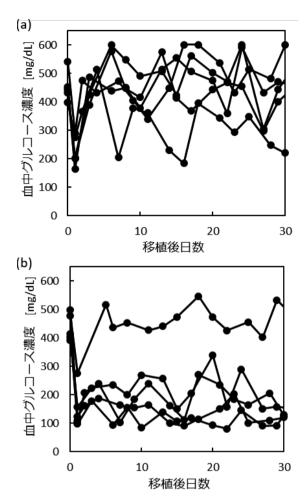


図 2. インスリン分泌細胞を内包した(a) MA Alg ビーズまたは (b) pMPC Alg ビーズを移植した糖尿病マウスの血糖値推移。

4. 結論と今後の展望

メタクリル化アルギン酸を用いてゲルビーズ表面に MPC を重合させることで、ビーズ表面へ pMPC 層を構築した。pMPC Aig は、MA Alg ビーズに比べて低いタンパク質吸着を示した。さらに、pMPC Alg ビーズを用いたパイオ人工膵臓は、糖尿病マウスの血糖値を 1 カ月にわたって正常血糖値に維持することができた。以上の結果から、アルギン酸ゲル表面への pMPC の修飾は、バイオ人工膵臓の機能向上に有用であると考えられる。今後、修飾方法の最適化によって、より長期間血糖値を制御できるバイオ人工膵臓の開発を目指す。

5. 文献

 Oju Jeon, Kamal H. Bouhadir, Joseph M. Mansour, Eben Alsberg, *Biomaterials*, 30, 2724-2734, (2009)

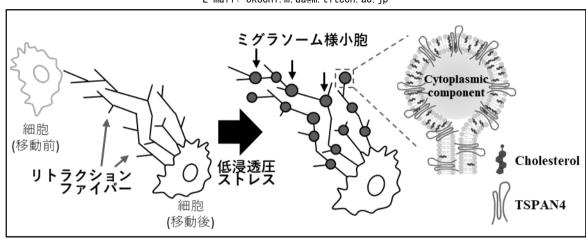
低浸透圧ストレスが誘導する ミグラソーム様小胞の形成

吉川 晃生・齊藤 彰吾・田中 祐圭・大河内 美奈*

東京工業大学 物質理工学院

〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1 東京工業大学物質理工学院

Tel: 03-5734-2116 Fax: 03-5734-2116 E-mail: okochi.m. aa@m. titech. ac. ip



要旨

一部の細胞は、遊走後に線維状の組織リトラクションファイバーを残し、この上に細胞外小胞ミグラソームを形成する。ミグラソームは、細胞間情報伝達ツールとして様々な生理学的プロセスに関与している可能性が示唆されているが、その形成機構は十分に解明されていない。本研究では、生細胞に低浸透圧ストレスを与えることで、リトラクションファイバー上にミグラソーム様小胞の形成が誘導されることを明らかにした。この結果は、ミグラソームの形成機構として膜張力が関与していることを示唆している。

1. 背景と目的

一部の遊走細胞は、軌跡を示す様にリトラクションファイバー(RFs)と呼ばれる線維状の脂質膜構造を形成する。2015年に、RFsに形成される細胞外小胞ミグラソームが発見され(**)、ゼブラフィッシュ胚の器官形成やニワトリ胚の血管新生などの様々な生理学的プロセスに関与している可能性が示唆されている。さらに近年では、腫瘍骨転移や網膜硝子体疾患等への関与も示唆されており、潜在的な治療標的としてもまた注目

されている^②。ミグラソームの形成阻害などの治療戦略を打ち出すにはその形成機構を解明することが非常に重要であるが、ミグラソームの形成機構は十分に明らかにされていない。

RFs は細胞遊走に伴い引き抜かれるようにして形成すること、またミグラソームは RFs に産生されることから、ミグラソームの形成機構として RFs の膜張力が関与する可能性がある。そこで本研究では、生細胞に低浸透圧ストレスを与えることで細胞膜張力を増加させ、RFs 上でのミグラソーム形成を評価した。また、ミグラソームに濃縮される膜タンパク質 TSPAN4 が形成する tetraspanin-enriched microdomain にはコレステロールが関与することから、コレステロールの局在性を評価した。

2. 方法

(1)細胞株の作製

ミグラソームマーカー膜タンパク質である TSPAN4 に緑色蛍光タンパク質 sfGFP を融合し、さらに細胞質イメージングにむけ、自己切断ペプチド (T2A) を介して赤 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 mCherry を 連 結 さ せ た pcDNA3. 1(+)-TSPAN4-sfGFP-T2A-mCherry プラスミド

をヒト神経膠腫(H4)細胞に安定的に導入した。

(2) 低浸透圧ストレス処理

Fibronectin 溶液で修飾 $(10 \mu g/mL, 2 h)$ した 96 well ガラス基板に、H4 細胞を 1.0×10^4 cells/mL, $100\mu L/well$ で播種した。一晩培養後、培地と等量の滅菌水を滴下することで低浸透圧ストレスを与え、蛍光顕微鏡でタイムラプス撮影 (2 or 4 s/frame) を行った。 (3) 細胞染色

コレステロール染色は、低浸透圧ストレス処理の際に滅菌水で調製した 7.4%ホルムアルデヒド溶液を滴下することで低浸透圧ストレスを与えると同時に固定化し、0.5 mg/mLのFilipin溶液で30 min,室温でインキュベートすることで行った。

(4) LPDS 処理による細胞内コレステロール量の低下

リポタンパク質欠損血清(LPDS)を10%含む培地で48時間培養することで細胞内コレステロール量を低下させた。コントロールにはウシ胎児血清(FBS)を10%含む培地を用いた。

3. 結果と考察

(1)H4 細胞への低浸透圧ストレス処理

細胞培養液に滅菌水を滴下し低浸透圧ストレスを与えたところ、わずか数秒で RFs にミグラソーム様小胞が形成される様子が観察された $^{(3)}$ (図 1)。これらの小胞は直径 0.5–2.0 μm であり、細胞質に発現させたmCherry を含んでいた。続いて mCherry 特異的な現象ではないことを確認するため、Calcein 染色を行った細胞に対しても同様に低浸透圧ストレスを与えたところ、ミグラソーム様小胞に Calcein が内包されることが確認され、細胞質に存在する任意の分子をミグラソーム様小胞に内包できることが示唆された。

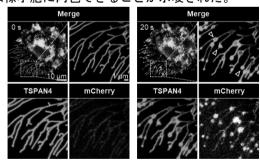


図 1. H4 細胞への低浸透圧ストレス処理による ミグラソーム様小胞の形成(▽: ミグラソーム様小胞) (2) ミグラソーム様小胞へのコレステロール局在観察

ミグラソームにはコレステロールが局在することが知られている。そこで、低浸透圧ストレスにより形成されたミグラソーム様小胞でも同様にコレステロールが局在するかを観察した。コレステロールに特異的に結合する Filipin 試薬は固定化細胞に使途が限られるため、滅菌水で調整した 7.4%ホルムアルデヒド溶液を用いることで、低浸透圧ストレスを与えると同時に固定化し、染色を行った。その結果、ミグラソーム様小

胞にコレステロールが局在することが示された(図2)。

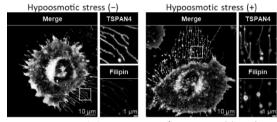


図 2. Filipin 染色によるミグラソーム様小胞への コレステロールの局在観察

(3) 小胞形成へのコレステロールの必要性評価

ミグラソーム様小胞形成におけるコレステロールの必要性評価を行った。LPDS 処理によりコレステロールレベルを低下させた細胞では、ミグラソーム様小胞の形成数が有意に減少し、ミグラソームにおけるコレステロールの必要性と同様の傾向を示した⁽⁴⁾。コレステロールは細胞膜の膜張力への耐性を高めると同時に、膜弾性率を増加させる効果をもつ⁽⁵⁾。本結果は、コレステロールの減少により膜弾性率の高い領域を十分に形成することができず、また膜張力への耐性が弱くなったことで RFs が破断しやすくなり、小胞の形成数が減少した可能性がある。

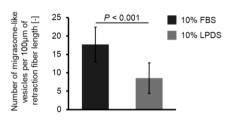


図3. FBS または LPDS 処理細胞における ミグラソーム様小胞形成数の評価

4. 今後の展望

本研究では、低浸透圧ストレスにより、ミグラソーム様小胞が形成することを明らかにした。ミグラソームと同様に、ミグラソーム様小胞は細胞質成分を内包し、その形成にはコレステロールが必要であることが示された。これは、ミグラソーム形成機構に膜張力が関与することを示唆し、浸透圧の変動による新規な細胞外小胞形成プロセスとしての応用が期待される。

文 献

- 1) Ma, L. et al., Cell Res. 25, 24-38 (2015).
- Zhang, X. et al., Cell Death Discov. 9, 381 (2023).
- Yoshikawa, K. et al., FEBS Lett. 598, 437-445 (2024).
- 4) Saito, S. *et al.*, *Mater. Sci. Eng. C* **131**, 112495 (2021).
- Chen, Z. and Rand, R. P., *Biophys. J.* 73, 267–276 (1997).

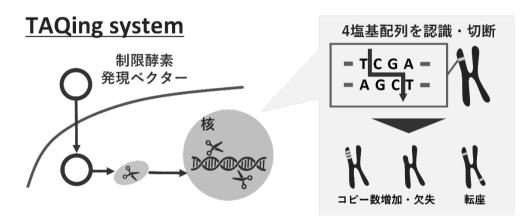
シングルセル解析を用いたゲノムシャッフリング効果の分析

水野滉基 1* · 木村和恵 1 · 田中健二郎 1 · 池内暁紀 2.3 · 村本伸彦 2 · 加藤竜司 1.4

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科, ²豊田中央研究所, ³トヨタ自動車, ⁴名古屋大学ナノライフシステム研

〒464-8601 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院創薬科学研究科

Tel: 052-747-6835 Fax: 052-747-6813 E-mail: kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp



ランダムなゲノムの改変を誘導し多様な表現型を示す細胞を獲得

再生医療や抗体医薬品の製造など動物細胞を応用した分野では、短期間かつ効率的に細胞育種と樹立を行うプロセスが、安定供給や製造コストの実現に大きく影響する。このため、多様性をもった細胞クローンを作出し、高性能クローンを選抜することはプロセス開発の安定性や効率化のためにも重要な技術課題とされている。しかし、実験的に細胞の品質を意図的に操作することは容易ではなく、一度の実験で効率的に多様な細胞クローン集団を作出することは難しい。

そこで本研究では、制限酵素(Taq I)を人為的に発現させることで「高度に変異した細胞を大量に製造する育種技術(TAQing)」を動物細胞へ応用し、遺伝子レベルでの細胞多様性拡大についてシングルセル RNA-seq 解析を用いて検討した。結果、TAQing は効率的にゲノム多様性の拡大を誘導し、様々な品質クローンを獲得する育種技術となり得る可能性が示唆された。

1. 背景

細胞は、近年の細胞・遺伝子工学の技術発展に伴い、 再生医療や抗体医薬品の製造、創薬研究など多岐に応 用されている。

動物細胞を応用した物質生産や他家細胞による細胞 医薬品のための研究分野では、機能性が高い細胞クローンを獲得することが製造プロセスの安定化や製造コストの削減に非常に重要であることが知られる。高機能細胞クローンを得るためには、短期間かつ効率的な細胞育種と樹立が必要となり、様々な機能性を有する細胞クローン集団を自在に作製する技術と、これを効 率的にスクリーニングする技術を組み合わせた有用クローン作出技術が求められる。

目的の機能を有する動物細胞を作出するには、遺伝子工学を用いた遺伝子単位でのデザインが標準的なアプローチであり、機能性に直結するタンパク質分子を自在に設計して機能付与する手法が広く用いられている。しかし、目的に機能獲得に重要な分子についての知見が少ない場合や、目的機能が複数の機能性タンパク質の協調によって制御されている場合には、目的の機能を向上させる設計は、手探りで時間がかかるものになることが多い。細胞によっては、安定かつ高効率の遺伝子導入ができない場合や、タンパク質は発現し

たものの細胞としての機能性の獲得にまで至らない場合などにおいて、その最適化や原因究明は非常に難しい。さらに、メカニズムが未解明の機能や、飛躍的に異なる機能を人為的に設計することは難しい。また、近年は CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術の発展により、目的の遺伝子変異体を作出することも容易になりつつあるが、数個の遺伝子変異だけでは画期的な機能性の作出にはならない場合も多い。

様々な細胞機能性を、プレ知識に縛られずに創出する一つのコンセプトとして、薬剤や紫外線などを用いたランダムな変異体作出法が知られる。しかしこれらで得られる変異体は、ゲノムレベルでの大きな改変は期待できないため、想像をはるかに超えるような機能性の作出が難しい場合がある。

細胞における多様な機能拡張技術として TAQing システムがある。この方法は、制限酵素 (Taq I) を生体内で人為的に発現させ、それに伴うゲノムレベルの切断の修復機構によって、ゲノムや染色体レベルでの変異体を作出する技術である $^{1)}$ 。この技術は、既に酵母や植物の育種技術として応用されているが、動物細胞への応用の報告は数少ない $^{2),3}$ 。本研究では、TAQing システムを動物細胞へ応用し、比較的安定なクローン作出条件を最適化した後、シングルセル RNA-seq 解析によって細胞集団に生じた変化の定量的かつ網羅的な理解を試みた。

2. 材料と方法

本研究では、Taq I を組み込んだプラスミドベクターをヒト胎児腎細胞 (HEK293) に導入した。導入から3日後の細胞についてシングルセル RNA-seq 解析を実施し、Taq I の発現量からコントロール群と Taq I 群に分類し、各群を比較することで TAQing による遺伝子レベルでの変化について解析を実施した。解析にはRのパッケージである Seurat 等を用いた。

3. 結果と考察

はじめに、コントロール群と Taq I 群での発現変動遺伝子を算出し、Gene Ontology 解析 (GO 解析)を用いて Taq I の導入によって応答する遺伝子群の生物学的機能を明らかにした。その結果、DNA の合成や免疫応答に関連する機能が検出された。これより、Taq I による DNA の二本鎖切断が正常に行われ、修復機構が働いていることが示唆された (図 1)。

続いて、主成分分析 (PCA) を用いてシングルセルレベルでの遺伝子発現量の多様性について検討した。その結果、Taq1 群では Control 群と比較して集団内のプロットにばらつきが見られた。この結果から、TAQing シ

ステムによって染色体の重複や欠失が発生し、遺伝子 発現量に多様性が生じる現象が確認された。

また、TAQing によるコピー数変異(CNV)の影響を調査するため、シングルセルレベルで全染色体における CNV の推定を行った結果、TAQing によって Control 群と比較して多くの箇所で遺伝子重複や欠失を誘引できていることが定量的に確認された。

これらの結果から、TAQingシステムというゲノムをシャッフリングする変異体創出技術のゲノムレベルでの大規模かつ効率的な変異体誘導能を示唆することができ、本システムが動物細胞においても多様な機能性を作出できる有効性を持つことが確認された。

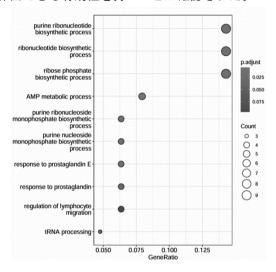


図 1 Gene Ontology 解析

4. 今後の展望

本研究によって TAQing の効果をシングルセルレベルで検証し、ランダムなゲノム変異を発生させる技術としての有用性を示すことが出来た。この結果から、TAQing は効率的にゲノム多様性の拡大を誘導し、様々な品質クローンを獲得する育種技術となり得る可能性が示唆され、動物細胞を応用した分野におけるプロセス開発の安定性や効率化に大きく貢献することが期待される。

文 献

- 1) Muramoto, N. *et al.*: *Nature Communications*, **9** (2018)
- 2) Tanaka, H. *et al.*: *Plant Journal*, **103**, 2139–2150 (2020)
- 3) Yasukawa, T. *et al.*: *Communications biology*, **5**(2022)

愛情ホルモン"オキシトシン"は 毛包オルガノイドの毛幹伸長を促進する

景山 達斗 ^{1,2} · 福田 淳二 ^{1,2*}

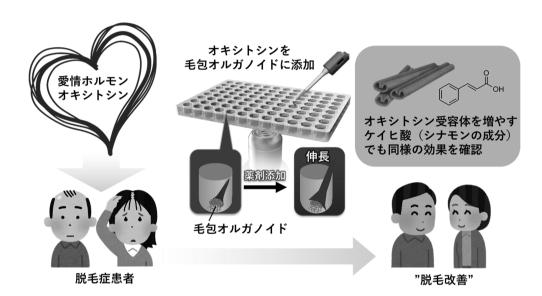
1神奈川県立産業技術総合研究所,2横浜国立大学大学院工学研究院

〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5

化工安工棟 5 階 516 号室 横浜国立大学大学院工学研究院

Tel: 045-339-4008 Fax: 045-339-4008

E-mail: fukuda@ynu.ac.jp



薄毛は年齢とともに進行するため、その治療に対するニーズは男女ともに大きい。現在、脱毛症患者の多くは育毛剤や発毛剤を利用しており、早期に治療を開始すれば、脱毛の進行を抑制できるようになってきた。しかし、生殖器への副作用やほとんど有効性を示さない患者もいるなど解決すべき課題も多く、新薬開発への期待は大きい。我々は、育毛・発毛剤開発のためのスクリーニング系として、毛包オルガノイドを開発し、このオルガノイド評価系を用いて新薬の候補を探索する中で、愛情ホルモン "オキシトシン" の発毛効果を見出した。本発表では、オキシトシンの発毛メカニズムと育毛・発毛剤への応用について、最新の研究結果を紹介する。

1. はじめに

オキシトシンは出産期や授乳期の女性から産生されるホルモンとして知られ、家族やペットとのスキンシップによっても、男女問わず、産生されるため"愛情ホルモン"とも呼ばれる。近年では、オキシトシンがストレスを緩和し精神的な安らぎを与える効果が明らかとなり、ストレス関連疾患に対する有効性も報告されてきた。ほかにも、心筋、消化器、生殖器など様々な臓器・組織の機能を向上させる効果もわかっているが、

毛包とオキシトシンの関係については、ほとんど理解が進んでいない。本研究では、オキシトシンが毛包に与える効果について、独自の毛包オルガノイドを用いて検証を行った。

2. 方法と結果

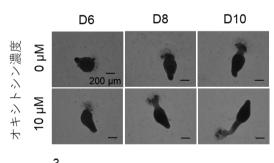
我々は近年、発毛剤の効果を検証する in vitro モデルとして、毛包オルガノイドを開発した 1)、2)。このモデルでは、生体外で伸長する毛幹様構造の長さを指標に発毛剤の有効性を評価できる。既存の発毛剤であるミ

ノキシジルにも応答することから²⁾、信頼性の高い評価系として期待される。

毛包オルガノイドは、ヒト毛乳頭細胞とヒト毛包由来の上皮系細胞を 1:1 の比率で混合し、ごく低濃度(2%)のマトリゲルを添加した培地で 4 日間浮遊培養することで作製した。この毛包オルガノイドを、オキシトシン添加培地で6日間処理し、毛幹様構造の長さを顕微鏡画像から定量した。また、オキシトシン添加培地で6日間処理し、毛幹の根元に存する毛乳頭細胞に対して、オキシトシン受容体の免疫染色とウエスタンブロッティングを行うとともに、オキシトシン添加に伴い発現上昇する遺伝子群についオキシトシン添加に伴い発現上昇する遺伝子群についオキシトシンがナル経路を活性化させる薬剤候補を毛包オルガノイドに添加し、毛幹伸長を促進する薬剤の評価を行った。

3. 結果と考察

オキシトシンの添加により、毛包オルガノイドから伸長する毛幹様構造の長さは、添加なしのコントロールと比べて有意に増加した(図1)。詳細に解析を行うと、毛乳頭細胞はオキシトシン受容体を有しており、オキシトシンに応答した毛乳頭細胞が、隣接する毛母細胞の増殖を促進する成長因子(VEGF等)を産生することで、発毛作用を発揮する可能性が示唆された3)。



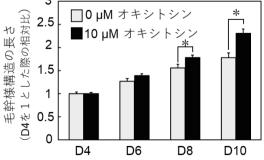


図 1 毛包オルガノイドを用いたオキシトシンの評価、顕微鏡写真(上)と毛幹長の定量結果(下)

オキシトシンは、血中での安定性が低く、分解されやすいペプチドである。また、分子量が大きい(Mw:1007)

ため経皮吸収性が低い。育毛・発毛剤への応用を考えると、より分解性が低く、分子量の小さい代替物が好ましい。実際に、毛包オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングを行った結果、オキシトシン受容体を増加させる作用のあるケイヒ酸(シナモンの成分)で毛幹様構造の長さが増加することを確認した(図 2)⁴⁾。ケイヒ酸は、分子量が小さく(Mw:148)分解性も低いため、オキシトシンシグナル経路を活性化する育毛・発毛剤への応用が期待される。

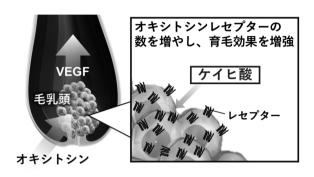


図2 ケイヒ酸の発毛促進効果

4. 結論

本研究では、オキシトシンやケイヒ酸が毛包に作用し、発毛を促す可能性を明らかにした。今後、脱毛症の動物モデルやヒト毛包のオーガンカルチャーモデルによる詳細な解析が必要であるが、本研究によりオキシトシンシグナルが脱毛症治療薬の新たなターゲットとなる可能性が示された。

文 献

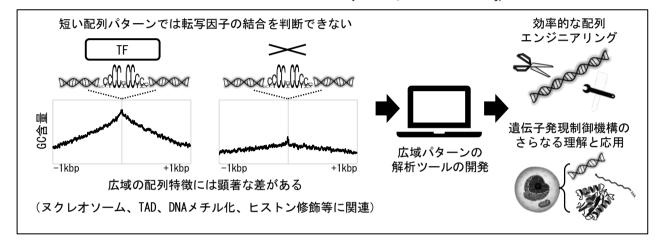
- 1) Kageyama, T., Shimizu, A., Anakama, R., Nakajima, R., Suzuki, K., Okubo, Y., and Fukuda, J.: Reprogramming of three-dimensional microenvironments for in vitro hair follicle induction, *Science Advances*, 8, eadd4603 (2022).
- 2) Kageyama, T., Miyata, H., Seo, J., Nanmo, A., and Fukuda, J.: In vitro hair follicle growth model for drug testing, *Scientific Reports*, 13, 4847 (2023).
- 3) Kageyama, T., Seo, J., Yan, L., and Fukuda, J.: Effects of oxytocin on the hair growth ability of dermal papilla cells, *Scientific Reports*, 13, 15587 (2023).
- 4) Kageyama, T., Seo, J., Yan, L., and Fukuda, J.: Cinnamic acid promotes elongation of hair peg-like sprouting in hair follicle organoids via oxytocin receptor activation, *Scientific Reports*, 14, 4709 (2024)

広域にわたる塩基出現頻度パターンの解析ツールの開発

山﨑 将太朗 1*, 2 · 若松 太一 2 · 加藤 晃 3, 2

- 1大阪大学微生物病研究所付属バイオインフォマティクスセンター.
- 2 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域.
- ³ 奈良先端科学技術大学院大学デジタルグリーンイノベーションセンター

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学微生物病研究所付属バイオインフォマティクスセンター Tel: 06-6879-8297 E-mail: Shotaro-vamasaki@biken.osaka-u.ac.jp



遺伝子発現制御機構の解明と応用には、制御に関わるシス配列を解析するツールが必要不可欠である。しかし、従来のツールが着目する数塩基から数十塩基の狭域の配列パターンだけでは、シス配列とトランス因子の関係性を十分に説明することはできなかった。そこで本研究では、広域にわたる塩基出現頻度パターンを解析し、その頻出パターンとの類似度の評価や、対照配列集団との比較を可能とするツールを開発した。ヒト転写因子 SP1 を例に解析を行った結果、転写因子が結合するシス配列では、約 1000 塩基にわたって塩基の出現頻度に偏りがあることが明らかとなった。さらに、転写因子が結合するシス配列に頻出する広域パターンをモデル化し、機械学習法を用いて転写因子の結合の有無を分類・予測した結果、狭域の配列パターンだけでは判断できなかった転写因子の結合の有無を、多くの例において予測することに成功した。本解析ツールは、RNA 結合タンパク質の認識配列やコアプロモーターなど様々な要素の広域パターン解析にも使用可能であり、配列エンジニアリングの効率化や遺伝子発現制御機能の理解と応用に貢献すると期待される。

はじめに

遺伝子は発現する場所や時期、量が厳密に制御されている。その制御を理解し応用するためには、制御に関わるシス配列の理解が重要である。一般的に、これらのシス配列は数塩基から数十塩基の短い配列とされ、MEME(Multiple EM for Motif Elicitation) つに代表されるモチーフ解析ツールによって、その同定や探索が行われる。しかし、細胞内でのシス配列とトランス因子の結合は、単純なコンセンサス配列の保存性だけでは説明付けられないことが知られている。例えば、転写因子の場合、シス配列に周辺の数百塩基以上にわ

たる領域のヌクレオソームや、DNA メチル化、ヒストン修飾、TAD(Topologically Associating Domains)等の特徴が重要であることが知られている ²⁾。また、GC 含量等の配列の特性が、それらヌクレオソーム等の特徴の形成に関わっていることも示されており、遺伝子発現制御の理解には、狭域のシス配列のパターンだけではなく、広域のヌクレオソーム等の特徴や塩基配列パターンも考慮する必要がある ³⁾。しかし、既存ツールではこのような広域の配列特徴を解析することは困難だった。そこで本研究では、狭域のモチーフ解析ツールと同様に広域における頻出パターンをモデル化し解析するツールの開発を行った。

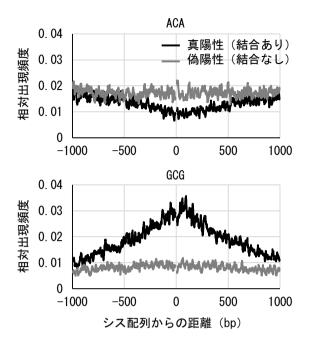


図 1. 真陽性と偽陽性で顕著に出現頻度が異なる配列パターンの例

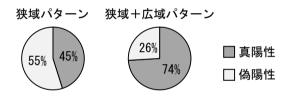


図 2. 従来ツール (FIMO) による偽陽性率 (左) と本ツールを使用した場合の偽陽性率 (右)

データと方法

まず、転写因子の認識配列を JASPAR からダウンロ ードし、FIMO (Find Individual Motif Occurrences) 1)ツールを用いて、ヒトゲノム全体から探索し、その前 後 1000 塩基を含む約 2000 塩基長の配列を取得した。 続いて、ReMap2022 からダウンロードした ChIP-seg デ ータと比較することで、転写因子が結合しているシス 配列(真陽性)と、転写因子が結合していないシス配 列(偽陽性)を定義した。次に、スライディングウィ ンドウ方式をベースとした配列評価によって、真陽性 のシス配列における広域での塩基出現頻度の変動パタ ーンをモデル化した。最後に、モデル化した変動パタ ーンと、真陽性および偽陽性の配列の類似度を評価し、 機械学習法を用いて、類似度から真陽性と偽陽性の判 別(転写因子の結合予測)を行った。正確な検証を行 うため、パターンのモデル化および学習に用いたデー タと、テストに用いたデータは完全に独立させた。

結果と考察

ヒト転写因子 SP1 を例に解析を行ったところ、pvalue < 10⁻⁷以下という厳しい基準でシス配列を探索 したにも関わらず、検出されたシス配列のうち、16個 の ChIP-seg データのいずれか一つでも転写因子の結 合が観察されたもの(真陽性)は 45%しか存在してい なかった。これは、転写因子の結合の有無が異なる場 合でも、狭域でのシス配列のパターンは非常に類似し ていることを意味している。一方で、広域でのパター ンには大きな差があり、転写因子が結合しているシス 配列では、シス配列を中心に GC 含量が高い山型のパ ターンが見られた。さらに、詳細な解析を行った結果、 ACA や CGC などの出現頻度のパターンが特に転写因子 の結合の有無で異なっていることが明らかとなった (図1)。さらに機械学習を用いた分類・予測によって、 狭域パターンでの検出結果(真陽性率 45%)を再分類 した結果、真陽性率は74%にまで向上した(図2)。こ れは本ツールがモデル化した広域パターンが、実際の 細胞内での転写因子の結合の有無に関わっていること を強く示唆している。これまで転写因子の結合をより 正確に理解するためには、ヌクレオソームや、DNA メ チル化、ヒストン修飾、TAD などの専門的な解析が必 要とされてきた。しかし、これらの解析を全て実施す ることは容易ではなく、多くの場合では狭域のシス配 列解析にとどまっていた。それに対し、本ツールは純 粋な塩基配列のみから広域の制御要因の理解を試みる ものであり、従来のシス配列解析を超える情報を迅速 かつ容易に提供できる。

今後の展望

本ツールは開発中であり、今後1年以内の完成とリリースを目指している。アルゴリズムの改良とユーザビリティの改善を進めており、Google Colaboratoryを用いてインストール不要かつ簡便に解析できる形で提供する予定である。本ツールの導入により、遺伝子発現制御機構の理解と応用が大きく進展することが期待される。

参考文献

- Bailey, T. L. et al., Nucleic Acids Res., 43, W39-W49 (2015)
- Schoenfelder, S., and Fraser, P., *Nat. Rev. Genet.*, 20, 437-455 (2019)
- 3) Dror, I., et al., Genome Res., 25, 1268-1280 (2015)

第76回(2024年)日本生物工学会大会トピックス集

2024年8月26日発行

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

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

E-mail: info@sbj.or.jp https://www.sbj.or.jp