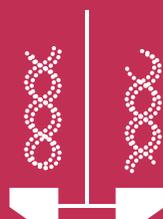


第77回（2025年） 日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2025年（令和7年）9月10日（水）～12日（金）

会 場 広島工業大学 五日市キャンパス 三宅の森 Nexus21



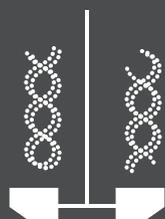
公益社団法人 日本生物工学会

第77回（2025年） 日本生物工学会大会

トピックス集

会 期 2025年（令和7年）9月10日（水）～12日（金）

会 場 広島工業大学 五日市キャンパス 三宅の森 Nexus21



公益社団法人 日本生物工学会

第 77 回 (2025 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, 分子生物学および遺伝子工学】

- 1Hp12 H 会場 第 1 日 16:02 p. 8
麹菌における薬誘導性遺伝子発現系の有用性評価
○横山 将己¹, 五味 勝也^{1,2}, 新谷 尚弘¹
(¹ 東北大院・農, ² フジワラテクノアート)
- 2Hp01 H 会場 第 2 日 15:50 p. 10
Prime editing の活性制御に資する逆転写酵素の改良
○杉山 健, 佐久間 哲史
(京大院・農)
- 3Hp05 H 会場 第 3 日 14:18 p. 12
酵母の栄養飢餓応答制御によるアルコール耐性の強化とイソブタノール生産の向上
○前田 颯也, 三木 凜音, 黒田 浩一
(京工繊大院・工芸科学)
- 3Hp10 H 会場 第 3 日 15:28 p. 14
rrn コピー数の人為的増加による微生物の増殖促進とタンパク質生産性の強化
○佐藤 悠奈¹, 岡野 憲司², 本田 孝祐^{3,4}, 宮崎 健太郎⁴, 佐藤 悠⁵
(¹ 山口大院・創成, ² 関西大・化生工, ³ 阪大・先導的学際研機構, ⁴ 阪大・生工国際セ, ⁵ 山口大・中高温微研セ)

【酵素学, タンパク質工学および酵素工学】

- 1Bp03 B 会場 第 1 日 13:54 p. 16
会合特性を持ちやすい短鎖 CDR3 VHH 抗体の単量体化促進足場を用いたフェージ提示法
○渡邊 佑斗, 河田 早矢, 伊藤 智之, 中澤 光, 梅津 光央
(東北大院・工)
- 1Bp12 B 会場 第 1 日 16:02 p. 18
自己抗体スパーク応答は肺がん患者におけるがん免疫治療効果を予測する
○森 壮流¹, 北川 未央², 長谷川 智一², 染谷 正則², 土屋 高旭², 後町 俊夫², 本莊 知子¹, 伊達 実鈴¹, 森井 真理子¹,
宮本 愛¹, 二見 淳一郎¹
(¹ 岡山大院・統合科学, ² 札幌医大・医)
- 1Dp06 D 会場 第 1 日 14:40 p. 20
多機能タンパク質を用いた貴金属の選択的凝集および磁力回収システムの構築
○上田 帆高, 中島 一紀, 今村 沙弥香, 高野 力
(北大院・工)

2Ap08 A 会場 第 2 日 17:24 p. 22
試験管内人工代謝反応によるポリプロピレン分解活性の向上

○星 斎槻, 千葉 剛大, 杉森 大助
(福島大・共生システム理工)

2Cp01 C 会場 第 2 日 15:50 p. 24
Sequence-to-function deep learning framework for fluorescent immunosensor engineering

○ Bo Zhu, Akihito Inoue, Keisuke Mizutani, Ken Kobayashi, Takanobu Yasuda, Tetsuya Kitaguchi
(Science Tokyo)

3Cp06 C 会場 第 3 日 14:40 p. 26
日本の洗濯に最適化した α -アミラーゼの開発

○日置 貴大, 釋 真緒, 寺井 三佳, 川原 彰人, 高橋 史員
(花王)

【代謝生理学・発酵生産】

1Gp13 G 会場 第 1 日 16:14 p. 28
複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御：メタ連続発酵における代謝モデルを用いた発酵挙動の推定

○古閑 友紀¹, 梶本 寛太¹, 宮本 浩邦^{2,3,4}, 濱田 浩幸¹, 酒井 謙二¹, 大城 麦人¹, 田代 幸寛¹
(¹ 九大院・生資環, ² 千葉大・園芸, ³ 理研・生命医科学, ⁴ サーマス)

2Fp05 F 会場 第 2 日 16:38 p. 30
少数の実測データを用いた代謝速度論モデルの作成による大腸菌コハク酸生産株の生産律速点の同定

○竹谷 友之¹, 二井手 哲平², 佐藤 美和¹, 伊藤 潔人¹, 清水 浩², 戸谷 吉博²
(¹ 日立製作所, ² 阪大院・情報)

【醸造・食品工学】

2Mp08 M 会場 第 2 日 17:24 p. 32
一細胞自家蛍光シグネチャー解析に基づく食品汚染菌のリアルタイム検出

○鳥澤 創¹, 張 譯云¹, 畔柳 ひとみ², 迫田 紘史², 上崎 菜穂子², 岡野 千草³, 八幡 穰^{3,4}
(¹ 筑波大院・生命環境, ² プリマハム株式会社, ³ 筑波大・生命環境系, ⁴ 筑波大・高等研・微生物サステイナビリティ研究セ)

2Np09 N 会場 第 2 日 17:36 p. 34
低グルテリン米「春陽」が清酒発酵過程における酵母の遺伝子発現に与える影響

○柚山 泰成^{1,2}, 赤坂 直紀¹, 渡辺 大輔¹
(¹ 奈良先端大・バイオ, ² 株式会社飯田)

【環境バイオテクノロジー】

- 1Kp15 K会場 第1日 16:38** p. 36
バイオ蛍光プローブを用いた大気中アスベスト全自動測定装置の開発
○西村 智基¹, 加賀 健一郎², 石田 丈典¹, 市川 京香¹, 池田 丈¹, 舟橋 久景¹, 廣田 隆一¹, 黒田 章夫¹
(¹ 広島大院・統合生命科学, ² 東亜ディーケーケー)
- 1Lp13 L会場 第1日 16:14** p. 38
酵母 *Kluyveromyces marxianus* の高温耐性に関する新規遺伝子の探索と同定
○松鹿 昭則, 鈴木 俊宏, 星野 保
(産総研)
- 3Kp03 K会場 第3日 13:54** p. 40
生分解性ポリアミド iNylon の分解挙動
○米村 まいな¹, 加藤 太一郎¹, 横山 理沙¹, 横川 由起子¹, 谷池 俊明², An Yingjun³, 高原 淳³, 小島 正幸⁴, 嶋中 博之⁴,
金子 達雄⁵, 根来 誠司⁶
(¹ 鹿児島院・理工, ² 北陸先端科学大, ³ 九州大ネガティブエミッションテクノロジー研究セ, ⁴ 大日精化工業,
⁵ 江南大学, ⁶ 兵庫県大院・工)

【生物化学工学】

- 1Pp03 P会場 第1日 13:54** p. 42
液体描画技術による細胞シート上へのバイオフィームマニピュレーション
○宮内 麻衣¹, 谷口 英嵩¹, 井之上 一平², 田中 祐圭¹
(¹ 科学大・物質理工, ² サントリーグローバルイノベーションセンター)
- 2Pp02 P会場 第2日 16:02** p. 44
イソフラボンに誘引されるダイズ根圏細菌叢の系統・機能解析
○佐久間 紘大¹, 木伏 真子¹, 西川 洋平^{2,3}, 細川 正人^{1,2,4}, 穴井 豊昭⁵, 杉山 暁史⁶, 竹山 春子^{1,2,4}
(¹ 早大院・先進理工, ² 早大・ナノライフ創研, ³ 産総研・バイオものづくり研究センター, ⁴ 早大・生命動態研,
⁵ 九大院・農, ⁶ 京大・生存研)
- 3Op12 O会場 第3日 16:02** p. 46
膨潤性と細胞接着性を併せ持つマイクロファイバーによる動物細胞の効率的かつ高密度な固定化と
エクソソーム生産への応用
○塩見 尚史, 張 朋飛, 中塚 修志, 熊谷 和夫, 松山 秀人
(神戸大・先端バイオ工研セ)
- 3Pp04 P会場 第3日 14:06** p. 48
DO Jump 法 - 簡便な k_{La} 測定法の開発
嘉悦 佳子, 卯津羅 淳子, ○石井 伸佳
(長瀬産業)
- 3Qp10 Q会場 第3日 15:28** p. 50
3D シェーカーを利用したマルチスループット多臓器生体模倣システムの開発ならびに
その有用性検証
○吉富 廉, 杉浦 慎治
(産総研)

【植物バイオテクノロジー】

- 2Dp01 D 会場 第 2 日 15:50 p. 52
ホップ栽培におけるバイオ炭施用が及ぼす影響について

沓掛 登志子, 今堀 莉子, 杉村 哲, ○善本 裕之
(キリンホールディングス 飲料未来研究所)

- 2Dp09 D 会場 第 2 日 17:36 p. 54
ゲノム編集による効率的な品種開発を支援する AI の開発

○小谷野 仁, 黒羽 剛, 吉田 均
(農研機構)

【動物バイオテクノロジー】

- 1Ip11 I 会場 第 1 日 15:50 p. 56
毛包オルガノイドを用いたセロトニンの発毛促進効果の理解

○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)

- 2Ep06 E 会場 第 2 日 17:00 p. 58
免疫チェックポイント阻害剤担持型磁性ナノ粒子を用いた膀胱がん温熱療法

○齊藤 凜太郎¹, 金子 真大¹, 権田 将一², 河合 憲康², 井藤 彰¹
(¹ 名大院・工, ² 名市大院・医)

- 2Ip03 I 会場 第 2 日 16:14 p. 60
マイクロマニピュレーションロボティクスを用いたスフェロイドの空間的細胞特性の解析

○田中 健二郎¹, 酒井 蓮¹, 中島 亮太², 嵯峨山 功幸², 長谷川 信二², 田中 伸明², 尾崎 学士², 加藤 竜司^{1,3}
(¹ 名大院・創薬, ² 日本精工, ³ 名大・ナノライフシステム研)

【分析計測化学】

- 2Op06 O 会場 第 2 日 17:00 p. 62
嗅覚受容体の応答を指標にした実臭気の知覚抑制

○福谷 洋介¹, 金牧 怜奈^{1,2}, 岸上 佳保里², 齋藤 芽生¹
(¹ 農工大院・工, ² エステー株式会社)

- 2Op10 O 会場 第 2 日 17:48 p. 64
電子密度トポグラフィーで見出した等価な Fab 領域による抗原蛋白質認識における順序性の可能性

○松本 崇¹, 佐藤 瑛美², 小園 拓馬², 北村 亮¹, 佐藤 孝¹, 長谷川 智一¹, 神田 浩幸¹, 殿塚 隆史², 西河 淳²
(¹ 株式会社リガク, ² 農工大・農・院、応用生命)

【生体分子工学】

- 1Jp02 J 会場 第 1 日 13:42 p. 66
細胞膜透過性改善技術による天然ペプチド化合物の潜在的生理活性の探索

○兼田 康平, 鈴木 海渡, 小倉 知也, 長谷部 文人, 丸山 千登勢, 濱野 吉十
(福井県大院・生物資源)

麹菌における薬誘導性遺伝子発現系の有用性評価

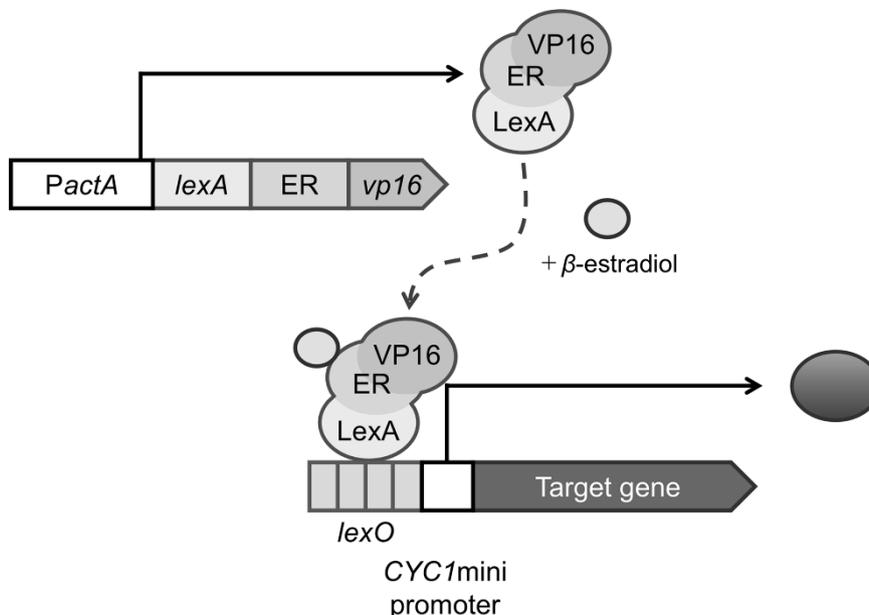
横山 将己¹・五味 勝也^{1,2}・新谷 尚弘^{1*}

¹ 東北大学大学院農学研究科, ² 株式会社フジワラテクノアート

〒980-8572 仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1 東北大学大学院農学研究科

Tel: 022-757-4445

E-mail: takahiro.shintani.d7@tohoku.ac.jp



要旨

糸状菌は優れたタンパク質生産能を有し、中でも安全性の高い麹菌は組換えタンパク質の生産宿主として有望である。そのため、タンパク質生産に最適な遺伝子発現ツールの開発が期待されている。しかし、現行の麹菌における遺伝子発現制御系は、炭素源への依存性や、発現誘導前の基底レベルの発現があることなどの課題があった。そこで本研究では、これらの課題を克服するため、 β -エストロジオールを利用し、その濃度に依存して機能する遺伝子発現系の構築を試みた。

はじめに

組換えタンパク質の生産は、産業酵素やバイオ医薬品の供給を支える重要技術である。近年では、遺伝子組換え技術を用いた食品タンパク質の「精密発酵」が注目されており、スタートアップ企業の参入も活発である。なかでもカビの一種である糸状菌は、タンパク質分泌能が高く、ヒトに近い糖鎖修飾能を有することから、機能性タンパク質の生産宿主として有望視されている。とりわけ麹菌 *Aspergillus oryzae* は、長年の

食経験に基づく安全性が確立されており、産業利用に適した微生物とされている。このような背景から、麹菌を含む糸状菌を利用した有用物質生産のための合成生物学的ツールの開発が期待されているが、現行の麹菌における遺伝子発現制御系にはいくつかの課題が残る。第一に、炭素源依存的な発現系が多く、誘導には炭素源シフトが必須であり、グルコースなどによる炭素源カタボライト抑制も引き起こされる。第二に、発現誘導前でも基底レベルの転写が起り、厳密な制御が困難である。そこで、本研究では厳密な制御を可能とする遺伝子発現系の構築に着手した。植物や出芽酵母では、エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン (ER-LBD) を利用した β -エストロジオール濃度依存的な遺伝子発現システムが報告されている¹⁾。そこで、大腸菌由来の LexA DNA 結合ドメイン、ER-LBD、VP16 転写活性化ドメイン (AD) からなる人工転写因子 (LexA-ER-VP16; XEV) を麹菌で発現させ、*lexO*-コアプロモーターの下流に連結した β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の発現を評価した。さらに、本発現系を用いたデンプン分解酵素群の転写因子 AmyR の制御も実証した。

材料と方法

麹菌 *Aspergillus oryzae* (RIB40) を親株とし、人工転写因子 XEV の発現コンストラクトと、*lexA box-cyc1* ミニプロモーター (*lexO-cyc1mini*) の下流に GUS レポーター遺伝子 (*uidA*) を連結したコンストラクトを導入した株を作製した。本株を Czapek-Dox (CD) 最小培地で 24 時間前培養後、様々な濃度の β -エストラジオールを添加して培養を続け、GUS 活性を測定した。GUS 活性は、37°C で 1 分間に *p*-ニトロフェニル- β -D-グルクロニドから 1 nmole の *p*-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を 1 U として算出した。

さらに、内在性遺伝子 *amyR* のプロモーター領域を *lexO-cyc1mini* に置換した株を作製し、XEV を発現させた。CD (Fru) 最小培地で 24 時間培養後、 β -エストラジオールを添加した CD (Mal) 最小培地で 24 時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し、分泌されたデンプン分解酵素群の生産量を SDS-PAGE にて分析した。

結果と考察

まず、構築した本発現系に対して薬剤濃度に対する応答性を検証した。 β -エストラジオールを各濃度で添加して 24 時間培養した結果、GUS 発現量は 5 nM まで濃度依存的に増大し、高濃度域ではプラトー化した。薬剤非添加区 (0 nM) では発現がほぼ完全に抑制されたことから、本システムは発現の漏れが極めて少なく、厳密な発現制御が可能であることが示された (図 1)。

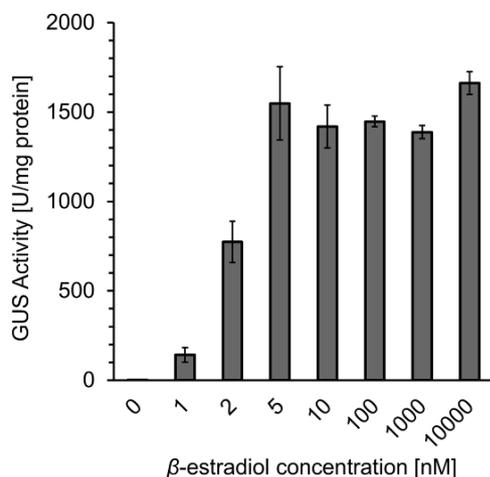


図 1 XEV 発現系におけるレポーター遺伝子発現の β -エストラジオール濃度依存性

続いて、発現誘導による経時変化と発現強度を評価した。 β -エストラジオールを 10 nM 添加後、GUS 活性は 8 時間後まで直線的に増大し、その後プラトーに達したことから、迅速な発現誘導が可能であることがわかった。また、このとき達した最大発現量は、麹菌における高発現プロモーターの代表例である *amyB* プロモーターによる発現量に匹敵する高いレベルであり、

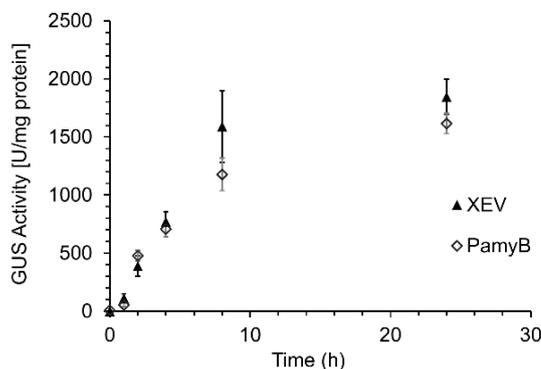


図 2 XEV 系と PamyB 発現系の応答性比較

本システムが強力な発現誘導能を併せ持つことも明らかになった (図 2)。

レポーター遺伝子による評価に続き、本発現系の実用性と性能を内在遺伝子の制御によって検証するため、デンプン分解酵素群のマスターレギュレーターである転写因子 *amyR* を制御対象とした。転写因子は微量な発現でも下流に影響を及ぼすため、その制御はシステムの厳密性を評価する上で優れた指標となる。エストラジオール添加前および添加後 24 時間のデンプン分解酵素群のタンパク質量を SDS-PAGE によって解析した。薬剤非添加区では、*amyR* 破壊株 ($\Delta amyR$) と同等まで抑制され、添加区では添加濃度に依存して生産量は増加した。5 nM 添加区では、野生株である RIB40 と同等までタンパク質量が上昇していた (図 3)。

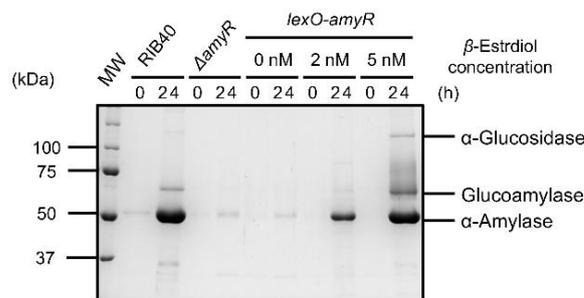


図 3 XEV による *amyR* 制御時の SDS-PAGE

以上の結果は、本発現系が基底発現を極めて低く抑制しつつ誘導時には強力な *amyB* プロモーターに匹敵する高い発現量を示すという優れた ON/OFF 特性を持つことを示している。本システムは培地の栄養源に依存せず、薬剤添加のみで迅速かつ簡便に発現誘導が可能である。これらの特徴から、麹菌における厳密な制御を可能にし得る新たなツールとして、将来的には遺伝子の機能解析や、有用物質生産の高度化に向けたプロモーターの最適化にも利用されることが期待される。

文献

- 1) Diana S M Ottoz, Fabian Rudolf, Joerg Stelling *Nucleic Acids Res.* 42(17), e130, (2014)

Prime editing の活性制御に資する逆転写酵素の改良

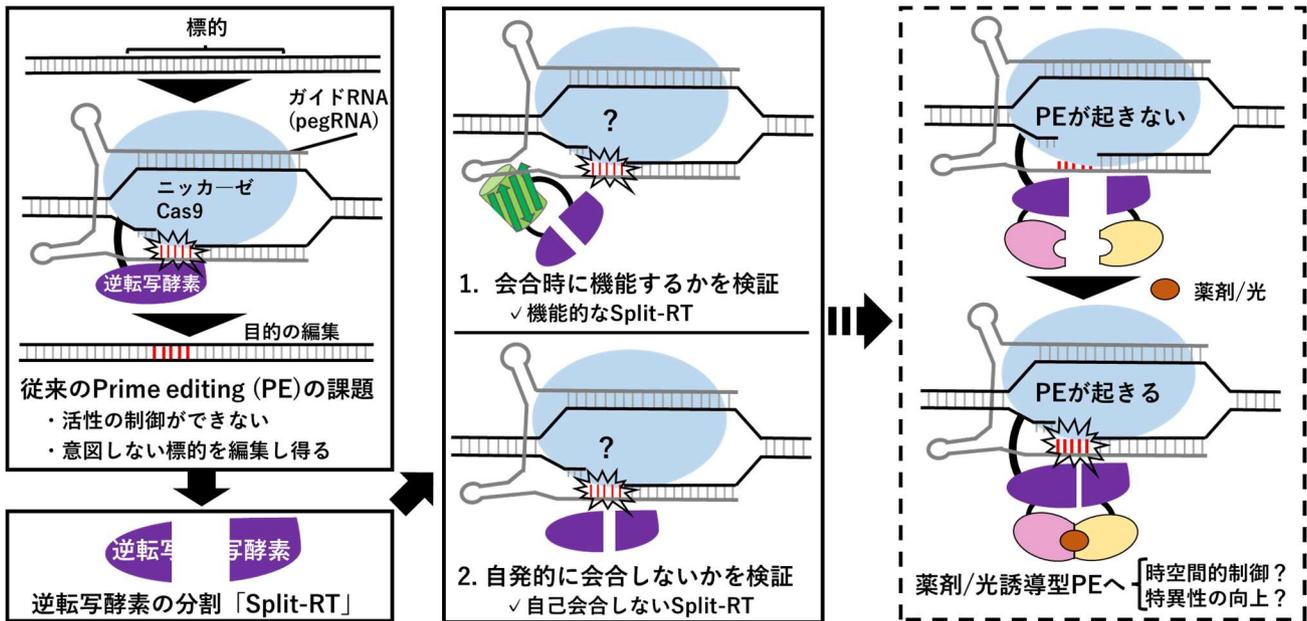
杉山 健¹・佐久間 哲史^{1*}

¹ 京都大学大学院農学研究科

〒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@kyoto-u.ac.jp



次世代のゲノム編集技術の一つとして知られるプライム編集 (Prime editing; PE) は、置換や挿入など様々な配列改変を精密に誘導できることから注目を浴びている。これまでにさまざまな改良技術が報告されている PE であるが、更なる特異性向上や活性制御については依然として改良の余地がある。そこで本研究では、PE の構成要素である逆転写酵素 (Reverse Transcriptase; RT) を分割したスプリット体 (Split-RT) を開発した。Split-RT の機能性と自己会合性を検証した結果、作製した Split-RT の内の 3 種類において、会合時に機能して配列改変を起こし、かつ自発的に会合しないことが確認できた。このことから、RT を特定の位置で Split 化することにより、機能性を保持しつつ自己会合しない Split-RT を創出できることが明らかとなった。今後はこの Split-RT の会合を薬剤や光によって制御し、時空間的に活性をコントロールできる誘導型 PE の開発を目指す。

はじめに

CRISPR-Cas9 を用いた一般的なゲノム編集法では、標的とするゲノム領域に DNA 二本鎖切断 (DSB) を引き起こし、修復経路を利用して遺伝子改変を行う。一方で次世代のゲノム編集技術の一つであるプライム編集 (PE) では、ニッカーゼ Cas9 と逆転写酵素 (RT) の融合体、および逆転写の鋳型配列を含むガイド RNA (pegRNA) を用いて、意図せぬ変異を生じやすい DSB を介さない

ゲノム編集を実行する (Graphical Abstract 左上)。編集可能なパターンは多岐にわたり、全種の塩基の置換や短鎖の挿入・欠失、またはこれらを組み合わせた配列改変を誘導できる¹⁾。

これまでにさまざまな改良技術が開発され、高効率かつ高精度な編集が可能となった PE であるが、活性を制御するシステムの開発は進んでおらず、意図しない標的に作用する場合があることも報告されている²⁾。そこで本研究では、PE の構成要素である RT を分割し

たスプリット体 (Split-RT) を開発した (Graphical Abstract 左下)。

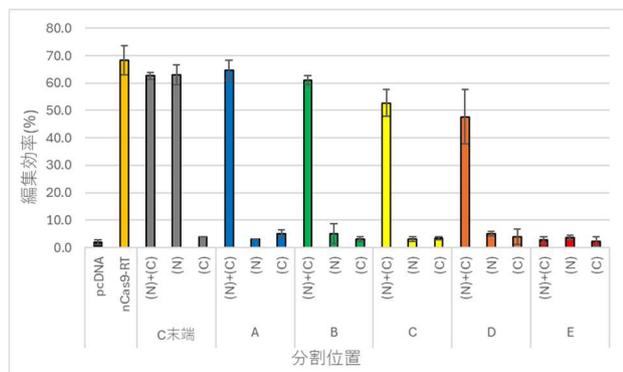
方法と結果

Split-RT のデザインとしてはまず、機能的に重要なアミノ酸や他種 RT と比較して保存されたアミノ酸を避け、立体構造などを考慮して候補を多数設計した。誘導型 PE では、薬剤/光による刺激を受けて初めて機能する性質をもたせる必要があるため、会合を誘発した際に機能し、かつ自発的に会合しない Split-RT が求められる。このために以下の検証を実施した。

1. Split-RT の機能性の検証

設計した候補が会合時に機能するかを検証するため、自己会合の性質をもつ GFP の分割体に Split-RT の N 末端側と C 末端側をそれぞれ融合させた構造体の発現ベクターを作製し、RT を抜いた Prime editor (PE Δ RT) 発現ベクターとともに HEK293T 細胞に導入した。(Graphical Abstract 中央上段)。もし機能的な Split-RT を構築できたならば、PE Δ RT と共に N 末端あるいは C 末端側のいずれかのみが存在する場合は RT が機能しないため PE が起きず、両方が存在する場合のみ Split-RT が会合して機能を回復し、PE が起きると想定された。

シーケンス解析により PE による塩基置換の効率を解析した結果、初期検討段階で作製した Split-RT の候補のうち 2 種類において、N・C 末端側が両方存在する際にのみ塩基置換が生じる (すなわち会合時に機能する) ことが示された³⁾。その後、更なる分割箇所の追加や RT 内にみられた変異の修正を経て Split-RT のラインナップを拡充した上で解析を行った結果、高い機能性を有する多数の Split-RT を同定することに成功した (図 1)。特に分割位置 A や B においては、通常の Prime editor と同程度の編集効率を示した。



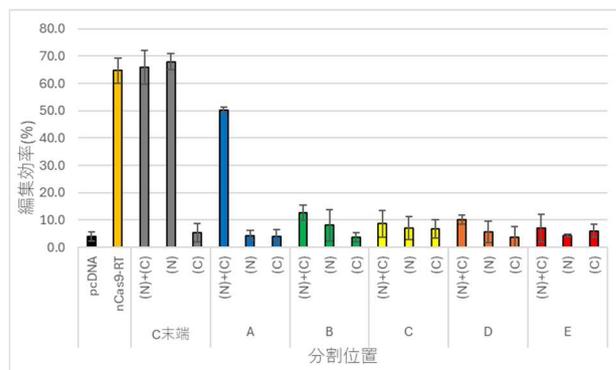
(図 1) Split-RT の機能性検証の結果 (一部抜粋)

2. Split-RT の自己会合性の検証

次に、Split-RT が自発的に会合するかどうかを確認するため、Split-RT の N 末端側ないし C 末端側のみを

発現するベクターを作製し、PE Δ RT 発現ベクターとともに HEK293T 細胞に導入して、前項と同様の解析を行った (Graphical Abstract 中央下段)。RT は nCas9 と融合させずに別途発現させても機能し、PE を起こすことが分かっているため⁴⁾、もし構築した Split-RT が自己会合するならば、PE Δ RT とともに N・C 末端側が両方存在する場合に PE が起き、Split-RT が自己会合しない場合は N・C 末端側が両方存在する場合でも PE が起きないと想定された。

シーケンス解析の結果、複数種類の Split-RT において、N・C 末端側が両方存在していても塩基置換効率が低い、つまり自発的に会合しない/しにくい、あるいは自発的に会合するものの機能しないことが示された (図 2)。前項の機能性検証の結果と併せて、RT を B, C, D で分割した Split-RT においては、会合時に機能し、かつ自発的に会合しない/しにくい Split-RT であると判明した。



(図 2) Split-RT の自己会合性検証の結果 (一部抜粋)

まとめと今後の展望

本研究では PE の活性制御や特異性向上を目指し、誘導型 PE へ向けて Split-RT の開発を行った。検証の結果、機能的でかつ自己会合性の低い Split-RT を複数種同定することに成功した。今後は薬剤/光で会合するタンパク質と、同定した Split-RT の N・C 末端側をそれぞれ融合することにより、特定の条件下でのみ Split-RT が会合し機能する、誘導型 PE へと応用する計画である (Graphical Abstract 右)。

文献

- 1) Anzalone, A. V. *et al.*, *Nature*, 576, 149-157, (2019)
- 2) Liang, S. Q. *et al.*, *Nat. Methods*, 20, 898-907, (2023)
- 3) 杉山ら, 特願 2024-81112
- 4) Liu, B. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 40, 1388-1393, (2022)

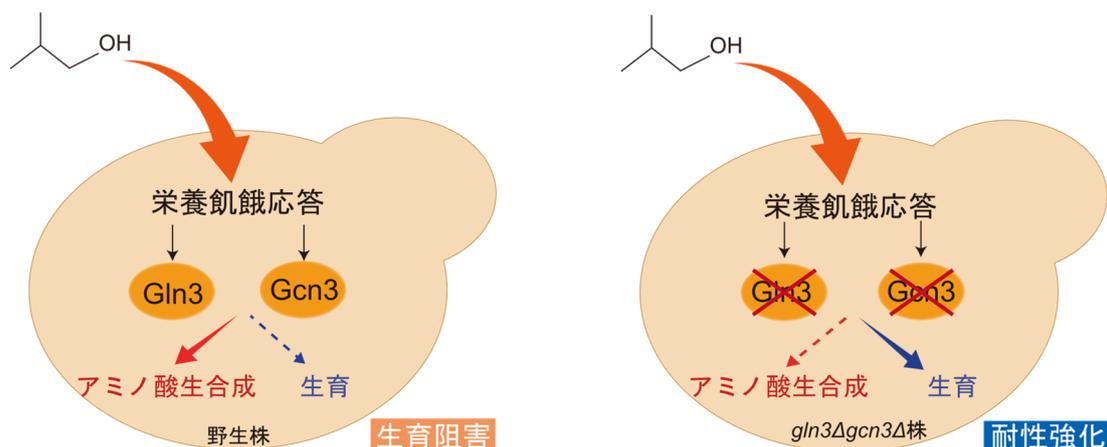
酵母の栄養飢餓応答制御による アルコール耐性の強化とイソブタノール生産の向上

前田 颯也・三木 凜音・黒田 浩一*

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町1 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

Tel: 075-724-7814 E-mail: kuroda@kit.ac.jp



[要旨]

近年、持続可能なエネルギー源としてバイオ燃料への関心が高まっている。特にイソブタノールは、高エネルギー密度、低吸湿性などの利点からエタノールに代わる次世代バイオ燃料として注目されている。しかし、出芽酵母はイソブタノールに対する耐性が低く、生産効率の低下の一因となっている。これまでに当研究室では、イソブタノールなどの分岐鎖アルコールが毒性を発揮する機構として、窒素飢餓応答の強制的誘起が重要であることを見出してきた。本研究では、栄養飢餓応答に関与する *GLN3*、*GCN3* 遺伝子の破壊により、その応答制御を図ることで、耐性および生産能をさらに向上させることができた。また、競合経路の *ALD6* 遺伝子を追加破壊した株や *gln3Δgcn3Δ* 二倍体株を構築した結果、大幅に生産量が増加した。

1. はじめに

近年、気候変動や化石燃料の枯渇への懸念から、持続可能なエネルギー源として微生物を用いたバイオ燃料生産の研究が進められている。中でも、イソブタノールは、エタノールに比べ高エネルギー密度などの利点を有し、ガソリン代替やジェット燃料への利用が可能な先進的なバイオ燃料である。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、遺伝子操作の容易さや安全性から有用物質生産に広く利用されている。*S. cerevisiae* はアミノ酸合成経路を介してイソブタノールなどの分岐鎖アルコールを生産する能力を有している。しかし、従来の代謝経路改変による生産性向上の試みでは、十分な生産レベルに達してい

ない。その要因の一つとして、イソブタノールなどの分岐鎖アルコールによる細胞毒性があり、高生産を追求する際の障壁となっている。

これまでに当研究室では、窒素飢餓応答に関する *GLN3* 遺伝子の破壊により、イソブタノール耐性および生産能を大きく改善してきた¹⁾⁻⁵⁾。本研究では、*GCN3* 遺伝子の追加破壊により栄養飢餓応答を制御し、分岐鎖および高級アルコールに対する耐性をさらに強化した。また、競合経路に関する *ALD6* 遺伝子の破壊や *gln3Δgcn3Δ* 二倍体株の構築によりイソブタノール生産能のさらなる向上を目指した。

2. 方法

(1) アルコール耐性試験

BY4741 *gln3Δ*株において、アミノ酸飢餓応答に関する *GCN3* 遺伝子を相同組換えにより破壊した。この *gln3Δ gcn3Δ* 株をはじめ、野生株、*gln3Δ* 株、*gcn3Δ* 株を前培養し、初期 $OD_{600}=0.1$ になるようイソブタノールなどのアルコールを含む SC 培地に添加後、30°C で 24 時間静置培養した。

(2) イソブタノール生産試験

生産試験対象株に対して、イソブタノール生産経路に関する 5 つの酵素を過剰発現する pJA184 プラスミド⁶⁾を導入した(図 1)。それぞれの株を SC-Ura 培地で培養し、グルコース濃度を 2%、10% と上げ、本培養では SC-Ura 15% グルコース培地で初期 $OD_{600}=7.5$ 、30°C、24 時間、250 rpm で培養した。培養後の上清を、HPLC の RID により定量分析した。

また、生産量をさらに向上させるため、BY4742 にて同様の遺伝子破壊を行った後、二倍体株を構築するとともに、競合経路に関する *ALD6* 遺伝子を追加で破壊した株を構築し、生産試験を行った。

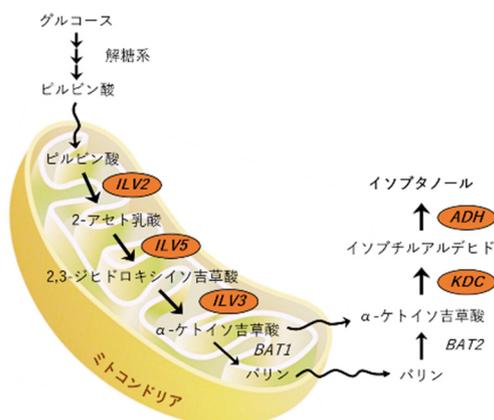


図 1. pJA184 による酵素の過剰発現³⁾

3. 結果

(1) 遺伝子破壊によるアルコール耐性の強化

分岐鎖アルコールに耐性を持つ *gln3Δ* 株に対し、*gcn3Δ* 株は高級アルコールへの耐性が向上した。さらに、*gln3Δ gcn3Δ* 株では両方の特性を併せ持ち、分岐鎖かつ高級アルコールへの耐性強化に成功した。

(2) アルコール耐性株を用いたイソブタノール生産

アルコール耐性を強化した *gln3Δ gcn3Δ* 株は以前に報告した *gln3Δ* 株と比べて、細胞乾燥重量あたりの生産量が約 2.5 倍に向上した(図 2)。また、構築した *gln3Δ gcn3Δ* 二倍体株では一倍体株と比較して生産量が約 1.1 倍に向上し、*gln3Δ gcn3Δ ald6Δ* 株では *gln3Δ gcn3Δ* 株と比較して約 2.7 倍に生産量が向上した(図 2)。

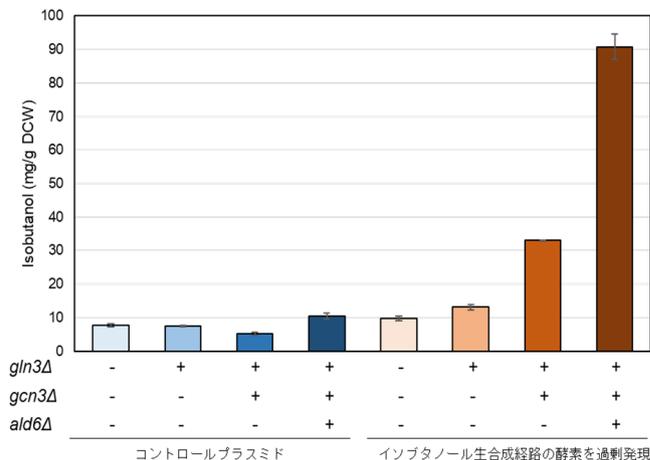


図 2. 細胞乾燥重量あたりのイソブタノール生産量

4. 今後の展望

本研究では、酵母のイソブタノール耐性と生産性を同時に向上させることに成功した。酵母のアルコール耐性は従来、膜組成の変化が重要とされてきたが、栄養飢餓応答の制御という新たなアプローチを採用している点で独自性を有する。また、耐性株にてイソブタノール生産能が向上したことから、バイオものづくりにおいて、代謝改変だけではなく生産株のストレス耐性強化が重要であることが改めて示された。耐性強化と代謝改変が相乗的作用を示したことは今後のバイオものづくり研究において有用な知見となる。今後、アルコール耐性のさらなる強化を通じてバイオ燃料などの高効率生産に貢献し、実用化・産業化への展開が期待される。

5. 謝辞

本研究は、JST 革新的 GX 技術創出事業 (Gtex) JPMJGX23B4 および JSPS 科研費 JP22H02240 の支援により実施されました。

文 献

- 1) Kuroda, K. *et al.*, *Cell Systems*, **9**, 534-547 (2019)
- 2) 黒田浩一, バイオエネルギー再燃, 第 2 章, 第 5 節 (シーエムシー出版), 39-47 (2021)
- 3) 黒田浩一, クリーンエネルギー, **29**(12), 25-30 (2020)
- 4) 黒田浩一, バイオサイエンスとインダストリー, **78**(3), 221-223 (2020)
- 5) 黒田浩一, 配管技術, **62**(7), 1-5 (2020)
- 6) Avalos, J.L *et al.*, *Nature Biotechnology*, **31**, 335-341 (2013)

rrn コピー数的人為的増加による 微生物の増殖促進とタンパク質生産性の強化

佐藤 悠奈¹・岡野 憲司²・本田 孝祐^{3,4}・宮崎 健太郎⁴・佐藤 悠^{5*}

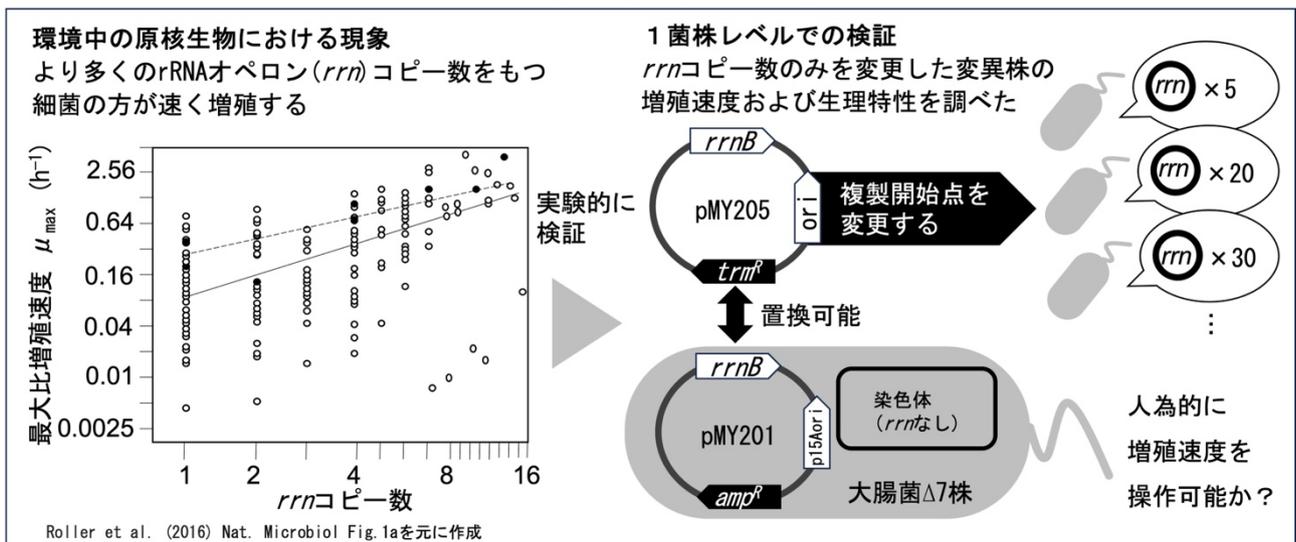
¹ 山口大学大学院創成科学研究科, ² 関西大学化学生命工学部, ³ 大阪大学先導的学際研究機構,

⁴ 大阪大学生物工学国際交流センター, ⁵ 山口大学中高温微生物研究センター

〒753-8515 山口市吉田 1677-1 山口大学農学部

Tel: 083-933-5841

E-mail: yusato@yamaguchi-u.ac.jp



要旨

多くの微生物は増殖に時間を要するため、産業応用には増殖速度を向上させる技術の開発が重要な課題である。増殖速度に影響を与える因子の1つとして、翻訳に関与するリボソーム RNA オペロン (*rrn*) のコピー数が知られている。本研究では *rrn* コピー数を人為的に増加させることで、増殖速度の向上が可能かどうかを検証した。大腸菌では、ある範囲において *rrn* コピー数の増加に伴い増殖速度の向上が確認された。さらに、過剰なコピー数の *rrn* をもつ株では、細胞の小型化と細胞あたりのタンパク質量の増加が観察され、タンパク質高生産株としての有用性が示された。

背景

微生物は、その多様な代謝能力により、工業、医療、食品製造、水処理など幅広い産業分野で利用されている。しかし、環境から分離された微生物の多くは増殖が遅く、研究の進展や産業応用のボトルネックとなっている。そのため、“微生物の増殖を加速させる技術”の開発は、現代の微生物工学における重要な課題である。

微生物の増殖速度に影響を与える要因の1つとして、翻訳に関与する *rrn* コピー数が挙げられる。一般的に *rrn* コピー数が多い細菌ほどリボソーム含有量が高く、増殖速度が速いことが知られている¹⁾。一方、*rrn* コピー数の増加は、炭素利用効率の低下やエネルギーコストの増大といった代謝面での負担を伴う¹⁾。そこで本研究では、「富栄養条件下において、*rrn* コピー数を人為的に増加させることで、微生物の増殖が促進される」という仮説を立て、検証した。

rrn の欠損や追加が宿主細胞の表現型に与える影響については、モデル細菌を対象としたゲノム上の遺伝子操作により評価されてきた²⁾。しかし、多くの微生物はゲノム上に複数コピーの *rrn* を有し、コピー間で「ゲノム上の位置」や「塩基配列」にばらつきがある。そのため、ゲノム上にて *rrn* を改変すると、単なるコピー数の増減にとどまらず、その他の予期せぬ影響が生じる可能性が高い。そこで本研究では、これらの問題を回避するため、プラスミド上に単一種類の *rrn* を導入した大腸菌変異株³⁾を用いて、*rrn* コピー数が増殖に与える影響を明確に評価した。

手法

本研究ではプラスミド上にのみ *rrn* をもつ株を利用して、プラスミドの複製開始点を置換することで細胞内の *rrn* コピー数を変化させ、増殖への影響を評価した。試料として“プラスミド上にのみ単一の *rrn* を有する大腸菌変異株”を使用した。本株は、ゲノム上の 7 コピーの *rrn* を欠損させた *Escherichia coli* $\Delta 7$ 株 ($\Delta rrnG$, $\Delta rrnA$, $\Delta rrnD$, $\Delta rrnE$, $\Delta rrnH$, $\Delta rrnB$, $\Delta rrnC$) に、*rrnB* を補完するプラスミド pMY201 (Amp^R・*sacB*・*rrnB*・p15A-ori) を形質転換した株である³⁾。派生株の作製には、pMY201 と交換可能なプラスミド pMY205-p15Aori (Trm^R・*rrnB*・p15A-ori) を使用した。pMY205-p15Aori の複製開始点のみを置換し、pMY205-pMW119ori・pMY205-pBR322ori・pMY205-pUC19ori という 3 種類のプラスミドを作製して $\Delta 7$ 株に形質転換した。各プラスミドのコピー数は先行研究の値を参考にした⁴⁾。また、比較対象として pMY205-p15Aori 上から *rrnB* を欠損させた空ベクターを作製し、ゲノム上に 7 コピーの *rrn* を有する BL21 (DE3) 株に形質転換した。

構築した各変異株は LB 培地にて 37°C, 180 rpm で培養した。光学濃度 (OD₆₀₀) で増殖をモニタリングし、増殖曲線から各菌株の最大比増殖速度を算出した。また、各変異株において細胞の形状やサイズを調べるため、光学顕微鏡を用いた観察を行なった。加えて、生菌数測定ならびにタンパク質の定量を行った。

結果・考察

作製した複製起点の異なるプラスミド 4 種類をもつ $\Delta 7$ 派生株、および空ベクターをもつ BL21 (DE3) 株の増殖速度を比較した。予想通り、*rrn* の推定コピー数が最も多い pUC19-ori 株では増殖が最も速く、最も少ない pMW119-ori 株では最も遅い増殖を示した。この傾向を定量的に把握するため、図 1 に *rrn* コピー数と最大比増殖速度の関係を示した。その結果、約 20 コピーまでは、*rrn* コピー数の増加に伴って最大比増殖速度が向上することが確認された。

一方、p15A-ori 株と pUC19-ori 株は *rrn* コピー数に約 30 倍の差があるにもかかわらず、最大比増殖速度および最終到達濁度には明確な差異は見られなかった。これらの結果は、*rrn* コピー数の操作による増殖促進効果に一定の上限が存在する可能性を示唆している。

rrn コピー数の違いにより、増殖速度以外の差異が生じているのかも検証した。p15Aori 株と pUC19ori 株を用いて細胞形状やサイズ、および 1 細胞あたりのタンパク質量を比較した。細胞サイズに関しては、12 時間培養後の静止期の細胞を観察した結果、p15Aori 株よりも pUC19ori 株の長径は約 0.7 倍、体積は約 0.8 倍となっており、細胞の縮小がみられた (表 1)。また、各フェーズにおける生菌数およびタンパク質を定量し、1 細胞あたりのタンパク質量を計算した。その結果、

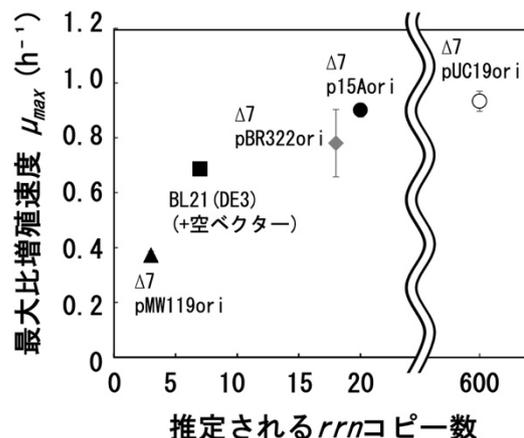


図 1. *rrn* コピー数と比増殖速度との関係

pUC19ori 株は p15Aori 株の約 1.1 倍に増加していた。この値を細胞体積あたりのタンパク質量に換算すると約 1.7 倍に増加していた。そのため、*rrn* コピー数の人為的改変は、細菌の増殖速度を速めるだけでなく、省スケールでのタンパク質の生産量を増加させる上でも *rrn* のコピー数が有用であることを示している。

表 1. 変異株間での細胞サイズとタンパク質量の比較

株名 (推定 <i>rrn</i> コピー数)	p15Aori (約 20 コピー)	pUC19ori (約 600 コピー)
平均長径 (μm)	3.38 (± 0.64)	2.41 (± 0.52)
平均体積 (μm^3)	6.20 (± 0.99)	4.93 (± 0.71)
細胞あたりのタンパク質量 (pg/CFU*)	0.501 (± 0.134)	0.564 (± 0.0713)

*Colony Forming Unit (CFU)

今後の展望

上記の研究を通して、*rrn* コピー数の増加に伴い、増殖の加速と細胞あたりのタンパク質生産量の向上が確認された。今後は細胞内のプラスミドコピー数の正確な定量を進めるとともに、他のモデル細菌やプラスミド上にのみ *rrn* を有する細菌種を対象として同様の解析を進め、本現象の普遍性を検証する。また、特定のタンパク質の産生量の向上に本研究の系が利用かどうか検証してゆく予定である。

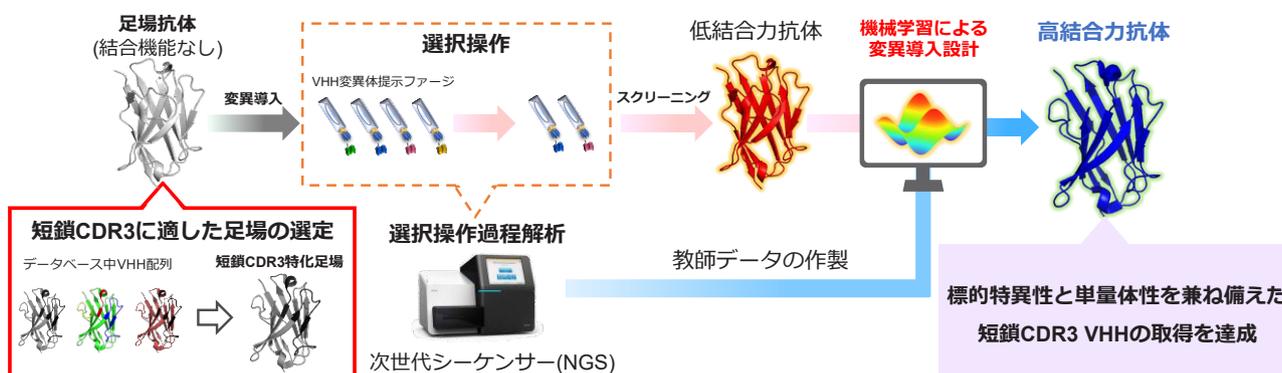
文献

- 1) Roller, B. R. K., Stoddard, S. F., Schmidt, T. M.: *Nat. Microbiol.* **1**, 16160 (2016)
- 2) Fleurier, S., Enke, T. N., Rother, M., Gogarten, J. P., Ochman, H.: *Nucleic Acids Res.* **50**, 12601-12620 (2022)
- 3) Kitahara, K., Yasutake, Y., Miyazaki, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 19220-19225 (2012)
- 4) 橋本 義輝: *生物工学会誌* **89**, 609-613 (2011)

会合特性を持ちやすい短鎖 CDR3 VHH 抗体の 単量体化促進足場を用いたファージ提示法

渡邊 佑斗・河田 早矢・伊藤 智之・中澤 光・梅津 光央*

東北大学大学院工学研究科
〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11 東北大学大学院工学研究科
Tel: 022-795-7275 Fax: 022-795-7276
E-mail: mitsuo@tohoku.ac.jp



要旨

ラクダ科動物由来の重鎖抗体可変領域断片 (VHH) には3つの相補性決定領域 (CDR) が存在し、中でも CDR3は結合特異性と親和性に大きく寄与することが多い。また、その鎖長は他の CDRと比較して多様性に富むが、短鎖 CDR3を持つ VHHは単量体性が低下しやすい傾向がある。そこで本研究では、短鎖 CDR3を有しながらも単量体を維持し、標的特異的に結合できる VHHの取得を目的とした。

1. はじめに

ラクダ科動物由来の重鎖抗体可変領域断片 (VHH) は、分子量約15 kDaの小型単量体タンパク質でありながら、高い結合力を持つ次世代の低分子抗体モダリティとして研究されている。抗体の可変領域では相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列が多様化することで標的結合性を獲得するが、VHHの CDR3はアミノ酸配列だけでなく長さも多様化できるために、CDR3の結合性への寄与が大きい。一方で、短鎖 CDR3を持つ VHHは構造中の疎水性界面が露出しやすく、二量体や多量体となりやすいという報告がある¹⁾。当研究室においても、構造安定化のためにデータベース中の最頻出アミノ酸を用いて構成した VHH (コンセンサス VHH) を設計し、その CDR3を改変してポリペプチド標的に結合する短鎖 CDR3 VHH (CDR3長: 8残基) を取得しているが、二量体化しやすい特性を示している (図1)。

そこで本研究では、データベース中から単量体性の高い短鎖 CDR3を有する VHHを足場配列として選抜し、ファージ提示法による生体外選択操作と親和性向上を目的とした機械学習を組み合わせることで、短鎖 CDR3を有しながらも単量体を維持しつつ、標的特異的に結合できる VHHの取得を目指した。

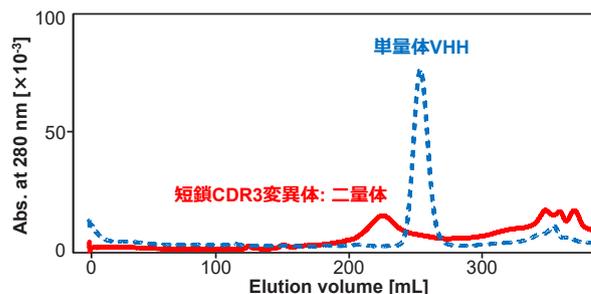


図1. 二量体化した短鎖 CDR3 VHHの SEC

2. 結果と考察

(1) 単量体化促進足場配列の選定と生体外選択操作

タンパク質構造情報データベース (PDB) に単量体で登録されているVHHは単量体として構造安定であると考え、PDBから8残基の短鎖CDR3を持つVHHを探索したところ、1つのVHH構造 (PDB ID: 5JMR) がヒットした。そこで、5JMRのVHHを大腸菌発現系で発現させ、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 精製時の溶出位置をもとに単量体性を評価したところ、5JMRは溶液中で単量体として存在していることがわかった。

次に、5JMRのCDR3中の8残基にランダム変異を導入したファージミドベクターを作製し、大腸菌TG-1株を形質転換することでVHH提示ファージライブラリーを調製した。この時、生体外選択操作における他のCDR3鎖長との選択性を比較するため、コンセンサス配列を足場として、CDR3長が12, 16, 19残基となるようにランダム化したファージライブラリーも調製し、5JMRライブラリーと混合して計 8.2×10^8 規模のライブラリーを作製した。調製したライブラリーを用いてポリペプチド標的に対する結合選択操作を4回実施し、3回目の選択操作後に得られた変異体群の配列解析を行ったところ、8残基の短鎖CDR3変異体の有意な濃縮が見られた。そこで、単離したVHH変異体を大腸菌発現させ、精製タンパク質を用いた酵素固定化免疫吸着法 (ELISA) による結合特異性評価およびSEC精製による単量体性評価を実施した。その結果、短鎖CDR3を有しながらも単量体として標的的特異的に結合する変異体を取得することができた (図2, 図3)。以上のことから、適切な足場配列を用いることで、生体外選択操作により単量体調製可能かつ標的に対して特異的結合活性を有する変異体を取得できることが示唆された。

(2) 親和性向上を指向した機械学習予測と機能評価

得られた変異体の結合機能向上に向けて、NGS解析データを用いた機械学習による親和性成熟を試みた²⁾。機械学習にはアミノ酸配列とその機能値を紐づけたデータが必要となる。本研究では、結合選択操作の各段階における各VHH変異体の存在率を疑似的な結合機能とみなし、配列と紐づけたデータを教師データとして機械学習に供した。具体的には、生体外選択操作の3ラウンド目における結合陽性ファージ群と結合陰性ファージ群の遺伝子配列を次世代シーケンサー (NGS) で解析し、各VHH変異体の配列に対する存在率比データを取得し、得られたデータに基づきベイズ最適化を用いた機械学習を実施した。そして、実験的に得られた選択操作後変異体をリード抗体として、そのCDR3領域のうち、末端の8残基を除いた7残基からランダムに4か所変異を導入した計 5.8×10^6 種の変異体について、機能スコア値の予測を行った。その結果、CDR3配列中の特定の4残基に対する特定アミノ酸への置換が有望であることが示唆された (図4)。

そこで、予測結果に基づいて2次ライブラリーを作製し、バイオレイヤー干渉法による標的親和性評価を実施した結果、機械学習前と比較して標的親和性が13倍向上したVHH変異体 (結合解離定数 $K_D = 1.05 \mu\text{M}$) を取得することができ、さらにSECによる単量体性を評価したところ、溶液中で単量体として存在していた (図3)。これらの結果からNGSの解析結果を教師データとした機械学習により、単量体性を維持したまま親和性を向上できる可能性が示唆された。

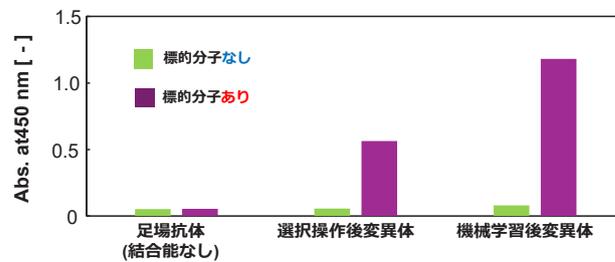


図2. ELISAでの標的的特異的結合性評価

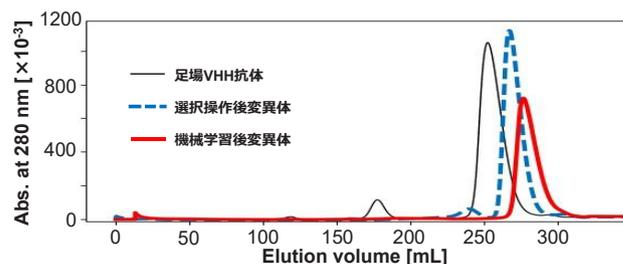


図3. SEC精製時の溶出位置からの単量体性評価

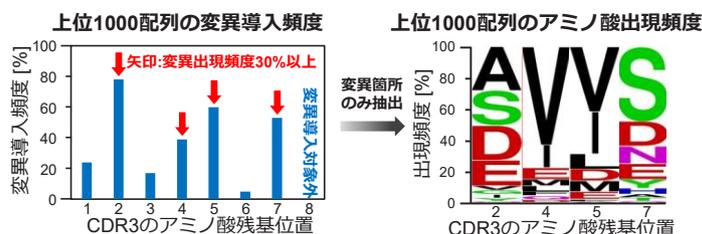


図4. 機械学習予測上位1,000配列における変異導入頻度 (左) およびアミノ酸出現頻度

3. 今後の展望

本研究では、短鎖CDR3に適した足場配列の選定し、ファージディスプレイ法および機械学習を融合させることで、短鎖CDR3を有していても単量体調製可能かつ標的的特異的な結合能を有するVHHの取得を達成した。

本手法を用いることで、医薬品や診断試薬などの開発において、短いCDR3による結合が優位な標的に対しても、短鎖CDR3変異体の多量体化を未然に防ぎ、構造安定なVHHを取得することができると考えている。

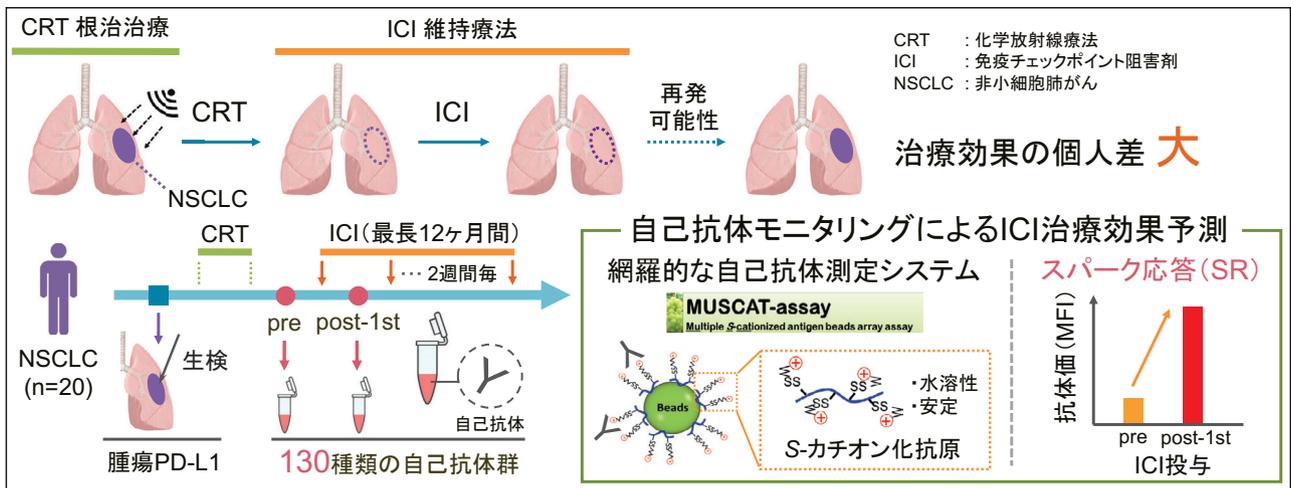
文献

- 1) Smith, A. C., *et al.*: *mAbs.*, **15**, 2215363 (2023)
- 2) Kawada, S., *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **140**, 51-58 (2025)

自己抗体スパーク応答は肺がん患者における がん免疫治療効果を予測する

森 壮流¹・北川 未央²・長谷川 智一²・染谷 正則²・土屋 高旭²・後町 俊夫²・
本莊 知子¹・伊達 実鈴¹・森井 真理子¹・宮本 愛¹・二見 淳一郎^{1*}

¹岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科, ²札幌医科大学医学部 放射線医学講座
〒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: futami.j@okayama-u.ac.jp



【要旨】末梢血中の自己抗体は、体内で生じた免疫応答の履歴を反映するバイオマーカーであり、個人差の大きいがん免疫治療における治療効果予測への応用が期待されている。本研究では、130種類以上の自己抗体を網羅的かつ定量的に測定可能な MUsCAT-assay (multiple S-cationized antigen beads array assay) を用いて、化学放射線療法後に免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) を投与した非小細胞肺癌患者における自己抗体応答の経時的变化と治療効果との関連を解析した。その結果、ICI 投与前から初回 ICI 投与 2 週間後にかけて、複数の自己抗体価が急上昇する「スパーク応答」が一部の症例で認められ、良好な治療効果と相関することが示唆された。

1. はじめに

がん免疫治療の一種である免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、がん細胞に対する免疫応答を再活性化し、一部の進行がんの治療予後を改善してきた。切除不能の非小細胞肺癌 (NSCLC) に対する標準治療として、化学放射線療法 (CRT) により腫瘍を縮小させた後、再発抑制を目的として ICI を投与する維持療法がある¹⁾。現在、個人差が大きい治療効果を予測するバイオマーカーとして、腫瘍組織における PD-L1 発現スコアが用いられている。しかし、CRT 後に腫瘍が縮小・消失すると組織採取は困難である。また腫瘍生検は侵襲的

で継続的なモニタリングには不向きである。さらに生検では腫瘍の一部しか評価できず、腫瘍内不均一性の影響を受けやすい課題がある²⁾。これらを背景に我々は、低侵襲かつ再現性に優れ、日常診療での運用が可能なバイオマーカーとして末梢血中の自己抗体群に着目している。自己抗体は免疫応答の個人差を反映して多様な出現パターンを示す。そこで、130種類以上の自己抗体の網羅的測定が可能な MUsCAT-assay (multiple S-cationized antigen beads array assay) システム³⁾を構築し、実用化研究を進めている。

2. 方法

(1) 自己抗体測定系「MUSCAT-assay」の構築

多くの自己抗原タンパク質は凝集性が高く、不安定な物性を示す。そこで、抗原タンパク質のCys残基に正電荷を導入するS-カチオン化法³⁾を用いて、水溶性の全長抗原を取得した。これらの抗原をLuminexビーズに固定化し、同時多項目の自己抗体測定が可能な「MUSCAT-assay」システムを構築した。

(2) 臨床検体と対象患者

CRT後にICIを投与した切除不能なNSCLC患者20名を対象とした⁴⁾。ICI投与前と初回ICI投与2週間後の2時点の血清中に含まれる130種類の自己抗体を測定した。腫瘍PD-L1発現スコアは、CRT開始前の腫瘍生検サンプルを抗PD-L1抗体(22C3; Dako)で染色して評価した。これらの臨床検体は札幌医科大学から入手した(倫理承認番号: 352-144)。

(3) 自己抗体スパーク応答の定義

ICI投与前と初回ICI投与2週間後の2時点における自己抗体価(MFI)を比較し、各抗体価変動の倍率と差分を算出した。倍率で2倍以上かつ差分で5000以上上昇した場合を「スパーク応答(SR)」と定義した。

(4) SRおよびPD-L1発現と治療効果の相関解析

治療効果は、CRT終了後から再発または転移が確認されるまでの期間である無再発生存期間(PFS)を指標として評価した。SRの有無によるPFSの差をカプランマイヤー法およびログランク検定により解析し、治療効果との関連を評価した。さらに、治療効果予測の精度を高めるため、SRと腫瘍PD-L1発現を組み合わせた層別解析を行った。SR陽性またはPD-L1発現が50%以上のいずれかを満たす症例をGroup 1、両方を満たさない症例をGroup 2とし、両群のPFSを比較した。

3. 結果と考察

20名中7名の患者において、ICI投与前から初回ICI投与2週間後にかけて複数の自己抗体価が急上昇するSRが確認された(図1)。

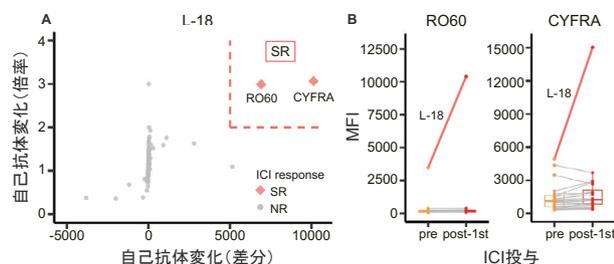


図1. スパーク応答の一例

(A) 患者L-18の130種類の抗体価変動、(B) L-18でSRが確認されたRO60とCYFRAの患者20名の抗体価変動(pre: ICI投与前、post-1st: ICI投与2週間後)

SR陽性例のうち5例は、無再発生存を維持しており、SR陽性群の2年PFSは66.7% (95% CI: 37.9-100)、陰性群では30.8% (95% CI: 13.6-69.5)であった(図2A)。SRは良好な治療効果と関連することが示唆された。さらに、SRとPD-L1発現スコアを組み合わせた層別解析では、Group 1 (SR陽性またはPD-L1 \geq 50%)の2年PFSは72.9% (95% CI: 46.8-100)、Group 2 (SR陰性かつPD-L1 $<$ 50%)は18.2% (95% CI: 5.19-63.7)であり、2つのマーカーを組み合わせることで治療効果予測の精度が向上する可能性が示された(図2B)。

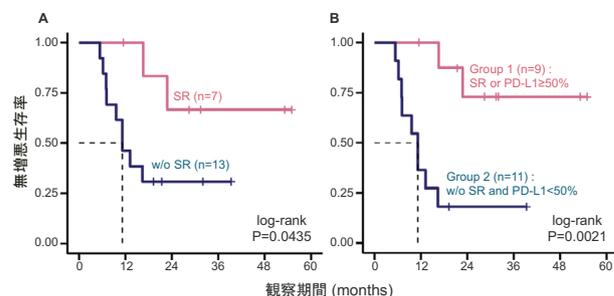


図2. 生存曲線

(A) SRのみ (B) SRとPD-L1発現

注目すべき点は、PD-L1陰性でありながらSR陽性が認められ、無再発生存を維持した症例が2例存在した事である。これは、腫瘍の不均一性によりPD-L1発現の評価が困難な場合においても、血中自己抗体モニタリングが補完的な指標となり得ることを示している。

なお、SRで上昇した自己抗体の種類は患者ごとに異なり、共通性はなかった。この結果は免疫応答の個人差を反映しており、MUSCAT-assay法による網羅的な自己抗体測定の重要性を示唆するものである。本結果はScientific reports誌に掲載予定である。

4. 今後の展望

CRT後は臨床的に腫瘍が確認されない。初回のICI投与2週間後に、体内に残存していた微小ながんに対する免疫応答の活性化が微量の末梢血で評価できた点と、SR陽性が予後と強く相関していた点が画期的である。MUSCAT-assay法による自己抗体の網羅的精密測定は、免疫応答に関わる多くの疾患分野で個別化医療を推進するツールとなる可能性がある。

5. 謝辞

本研究の一部は、JST次世代研究者挑戦的研究プログラムJPMJSP2126の支援により行われた。

6. 文献

1. Spigel DR *et al.* *J Clin Oncol*, **40**, 1301-1311 (2022)
2. Haragan A *et al.* *Lung Cancer*, **134**, 79-84 (2019)
3. Miyamoto A *et al.* *Front Oncol*, **12**: 869393 (2022)
4. Someya M *et al.* *Cancer Sci*, **113**, 4394-4400 (2022)

多機能タンパク質を用いた貴金属の選択的凝集および 磁力回収システムの構築

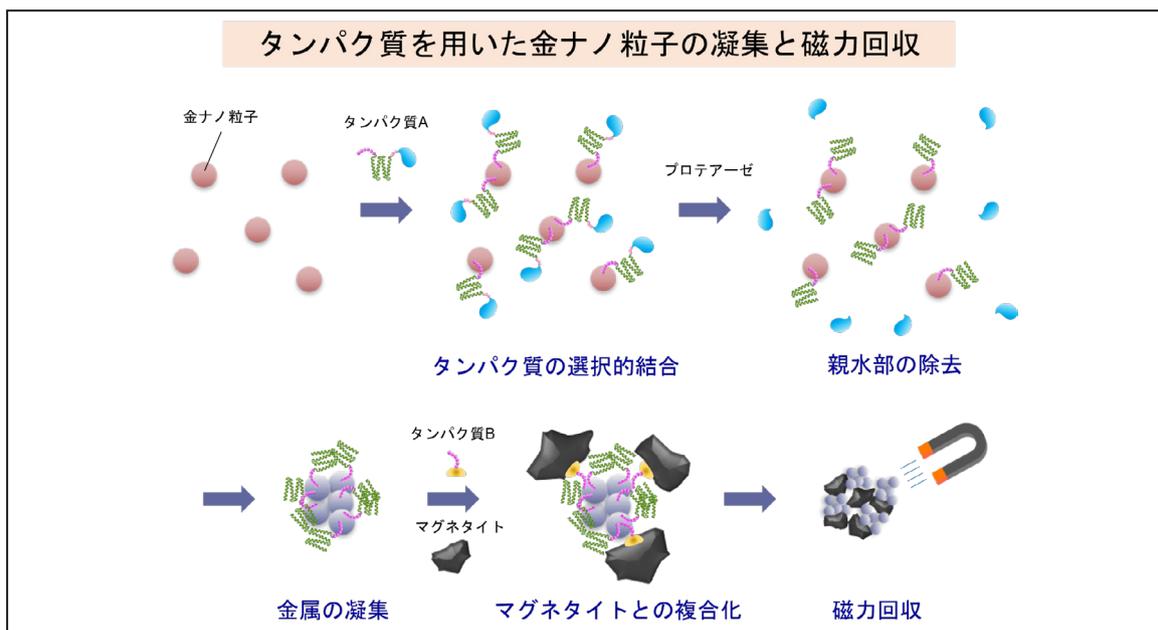
上田 帆高・中島 一紀*・今村 沙弥香・高野 力

北海道大学 大学院工学研究院 環境循環システム専攻

〒060-8628 札幌市北区北 1 3 条西 8 丁目

Tel: 011-706-6322

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



金属結合部位と凝集促進部位を有する融合タンパク質を用いて金ナノ粒子の凝集を検討した。さらに、金ナノ粒子の凝集体とマグネタイトを複合化するためのタンパク質を用いることで、磁力による簡便かつ効率的な貴金属回収方法を開発した。

背景・目的

近年、天然資源の枯渇や電子機器廃棄物の増加に伴い、都市鉱山などからの貴金属の効率的な回収が重要な課題となっている。従来の貴金属回収では、高エネルギーや高環境負荷の劇薬を必要とするプロセスが多く、低エネルギー・低環境負荷の新たな金属回収技術の開発が急務である。我々の研究グループでは、環境負荷の少ない手法として、タンパク質やペプチドを利用した金属回収技術に取り組んでいる。特に、ファージディスプレイ法をはじめとする進化分子工学的手法により獲得されるターゲット金属に選択的に結合する

ペプチド・タンパク質はリガンドとして非常に魅力であり、これまでにそれらを用いた金属回収用タンパク質を開発してきた。

我々では以前の研究において、金属/鉱物微粒子を選択的に凝集させるための融合タンパク質のデザインについて検討している。この融合タンパク質は、金属結合部位、凝集促進部位、安定化部位など複数のドメインからなる融合タンパク質であり、これを用いることで銅鉱物などの金属微粒子の凝集に成功している。

本研究ではこの技術をベースとして、金ナノ粒子の新たな回収法について検討を行った。具体的には、タ

ンパク質を用いて金ナノ粒子の凝集を行い、その凝集体を別のタンパク質によりマグネタイト(磁性微粒子)と複合化することで、磁力により金ナノ粒子の回収を行うアプローチである。

実験方法

金凝集用タンパク質 A は、(a) 金と特異的に結合する金結合ペプチド、(b) 金ナノ粒子の凝集を誘導するための疎水性タンパク質¹⁾、(c) 水中での分散・安定性を高めるための親水性タンパク質²⁾、および(d) 親水性タンパク質を切断・除去するための部位特異的切断サイト、から構成される。一方、マグネタイト複合化用タンパク質 B は、金結合ペプチドとマグネタイト結合タンパク質からなる(図1)。これらの融合タンパク質は、大腸菌発現系を用いて作製し、His-tag アフィニティークロマトにより精製した。

金ナノ粒子の凝集実験では、まず金ナノ粒子(Abs₅₇₂=1)に対し、金凝集用タンパク質 A (終濃度 50 μg/mL) を添加し、25°C でインキュベートすることで粒子表面へのタンパク質の結合を行った。その後、部位特異的切断酵素(HRV-3C プロテアーゼ)を添加することで親水性タンパク質部分を除去した。これにより、金ナノ粒子表面に疎水性タンパク質が露出し、疎水性相互作用により金ナノ粒子の凝集を誘導した。凝集後の金ナノ粒子に対して、マグネタイト微粒子(終濃度 10 mg/mL)、およびマグネタイト複合化用タンパク質 B (終濃度 50 μg/mL) を添加することで複合化を行った。その後、磁石により、金ナノ粒子-マグネタイト複合体を溶液中から回収した。回収効率は、上清中の金ナノ粒子の吸光度により評価した。

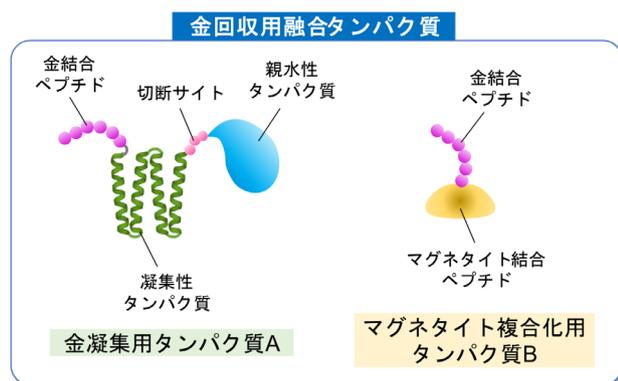


図1. 金ナノ粒子回収のためのタンパク質デザイン

結果および考察

金ナノ粒子は本来水溶液中で安定に分散しているが、金凝集用タンパク質 A を添加することにより、粒子の明瞭な沈降が観察され、タンパク質による金ナノ粒子の凝集が示唆された(図2)。沈降後の金ナノ粒子を顕微鏡(明視野)により観察したところ、タンパク質の存在下でナノ粒子同士が集合し、比較的大きな凝集体

を形成している様子が確認された(図2)。これより、融合タンパク質による表面修飾を介して、金ナノ粒子間に疎水性相互作用が働き、凝集が促進されたことが示唆された。さらに、この凝集体にマグネタイト粒子およびマグネタイト複合化用タンパク質を添加することで、金ナノ粒子とマグネタイトの複合体が形成された。形成された複合体は磁石によって効率的に回収可能であり(図3)、吸光度測定の結果から、金ナノ粒子の90%以上が回収できることが明らかとなった。

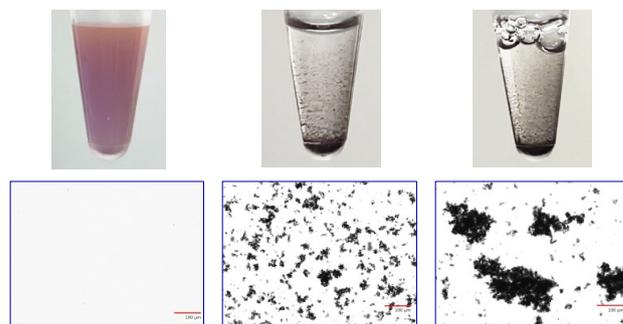


図2. 金ナノ粒子の沈降の様子

(左) タンパク質非添加, (中) タンパク質添加(親水性タンパク質非切断), (右) タンパク質添加(親水性タンパク質切断)

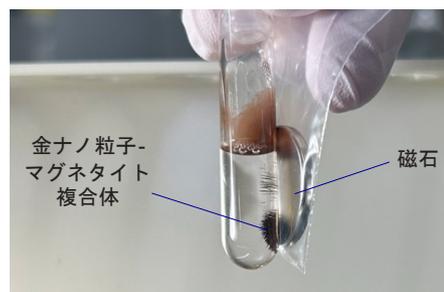


図3. 金ナノ粒子-マグネタイト複合体の磁力回収

まとめと今後の展望

タンパク質を用いて金ナノ粒子の凝集とマグネタイトとの複合化を行い、磁力による回収に成功した。本手法は、水溶液中に分散した金ナノ粒子を、特別な設備や試薬、複雑な工程を必要とせず、比較的簡便に分離・回収できる有効な方法であると思われる。今後、共存物質(他種金属, プラスチック)が存在する条件での選択性、複合体からの金属の回収法等の検討を行い、種々の有価金属回収へと展開していきたい。

文献

- 1) Wibowo, D. *et al. Langmuir*, **31**, 1999-2007 (2015)
- 2) Godigamuwa, K. *et al. J. Mater. Chem. B*, **11**, 1654-1658 (2023)

試験管内人工代謝反応によるポリプロピレン分解活性の向上

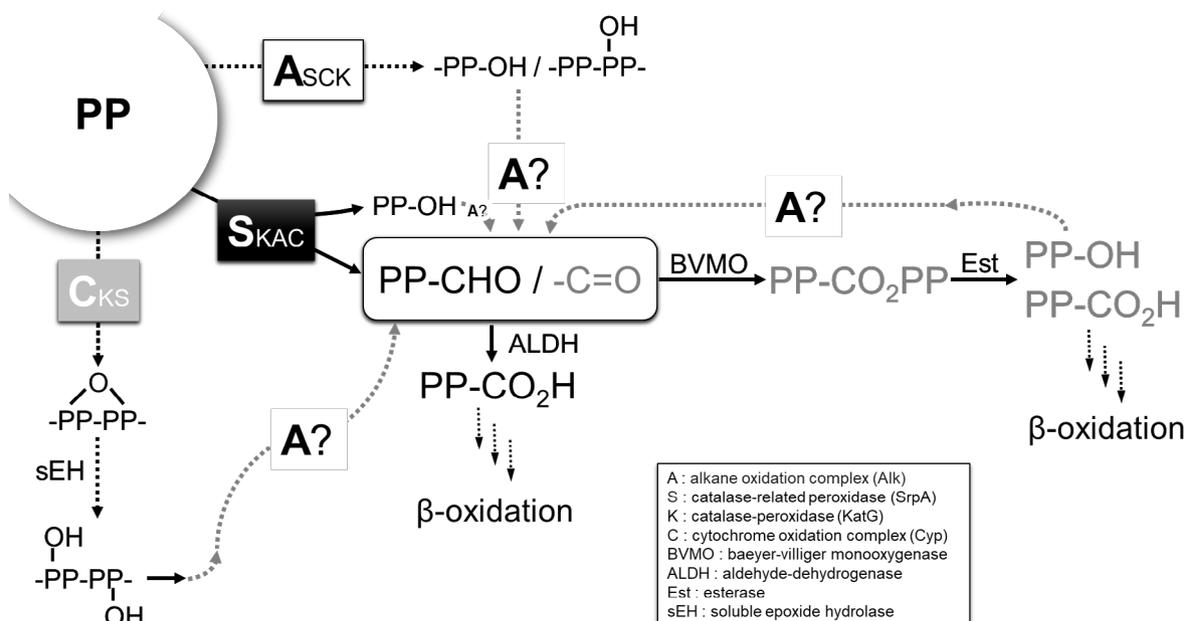
星 齋槻・千葉 剛大・杉森 大助*

福島大学 共生システム理工学類

〒960-1296 福島県福島市金谷川1番地

Tel: 024-548-8206 Fax: 024-548-8206

E-mail: sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp



我々は、ポリプロピレン (PP) のバイオアップサイクル技術の開発を目指し、これまでに PP 分解菌 *Acinetobacter* sp. 17-5-3D 株¹⁾から分解、代謝に関わる酵素の推定を進めてきた。PP 分解における初期分解過程に関与すると予想された 4 種類の酸化酵素のうち Catalase-related peroxidase (SrpA) が主役として機能することを明らかにした。さらに、4 種類の酸化酵素を混合した複合酵素反応 (4 Mix) が最も高い PP 分解活性を示し、SrpA 単独酵素反応と比較して分解活性が 1.2 倍向上することを見出した。さらに、分解生成物を代謝すると予想された 4 種類の代謝酵素を複合化させた反応を検討した結果、4 種類の酸化酵素と代謝酵素 3 種類を複合化 (7 Mix) させた場合、4 Mix 反応に比べ PP 分解活性が 3.7 倍まで向上した。

1. はじめに

使用済みプラスチックは世界中で大量に廃棄され、その多くは、単純焼却あるいはサーマルリサイクル、埋設処分に頼っている。そのため、近年、マイクロプラスチック汚染や資源循環など、世界規模の大きな課題になっている。我が国では、2030 年までに年間約 900 万トン発生する廃棄プラスチックの 3 割を資源転換する技術開発目標を設定している。しかしながら、物理化学法によるケミカルリサイクルは依然として数 100°C、数 100 kPa、高価な金属触媒を必要としている。また、得られるガス、油は化学原料に適していないば

かりか有害物質の発生も伴うため、エネルギー的、経済的にもメリットが見出されていない現状である。

そこで我々は、廃棄 PP のバイオアップサイクル技術の開発を目指し、生体触媒による PP 分解および有用物質変換を目的とした研究を行っている。本発表では、PP 分解菌 *Acinetobacter* sp. 17-5-3D 株¹⁾が持つ PP 分解、代謝に関わる 7 種類の酵素を複合化させた人工代謝反応により PP 分解活性が約 4 倍向上し、有用なアルデヒド、アルコール類を生成させることに成功したことについて報告する。

2. 実験方法、結果と考察

PP 分解菌 *Acinetobacter* sp. 17-5-3D 株¹⁾ のゲノム解析により、全遺伝子を解読するとともに PP 分解・代謝経路の全容を把握した。PP 分解の初期過程に関わる酵素として 4 種類の酸化酵素および酵素群 A (Alkane 1-monooxygenase: AlkA, B, rubredoxin: RubA, rubredoxin reductase: RubB)、C (Cytochrome b561: Cyp, ferredoxin: Fdx, ferredoxin reductase: Fdr1, 2)、K (Catalase-peroxidase: KatG)、S (Catalase-generated peroxidase: SrpA) を推定し、大腸菌により組換え生産、機能解析を行った。その結果、4 種類のうち酸化酵素 S、K がキー酵素であると特定した。さらに、酵素 S の組換え生産量は酵素 K の約 1/1000 であったにもかかわらず、マイクロ PP (mPP、平均粒径 5 μ m, Mn 3,000) の 24 h 分解率は約 30% であり、酵素 K の約 2 倍であったことから、酵素 S が PP 分解の主役を担っていることを突き止めた。また、酵素 S と PP オリゴマー (n=20) のドッキングシミュレーションの結果、PP オリゴマーが酵素 S のクレフトから活性中心であるヘムに至るポケットにもっともらしく結合することが予測された (図 1)。一方、酵素 K と PP オリゴマーの酵素-基質複合体は形成されないという予測結果が得られた。これらの結果からも酵素 S が PP 分解の主役酵素であると結論づけた。酵素 S は低分子量 mPP だけでなく高分子量 PP シート (Mw 250,000, Mn 67,000) も分解し、水溶性アルデヒド/ケトンと不溶性沈殿物として一級あるいは二級アルコールを生成することがわかった。単一酵素による PP の分解、特に高分子量の PP を分解し、有用性が期待できるアルデヒド/ケトン、アルコールの生成を実験的に証明したのは我々が知る限り世界初の成果である。

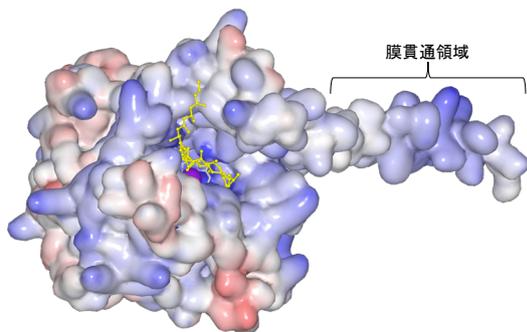


図 1. PP 分解キー酵素 S と PP オリゴマー (n=20) のドッキングシミュレーション結果

さらに、PP 分解および有用物質変換効率の向上を目指し、PP 分解生成物の代謝に関わると予想された 4 種類の代謝酵素 (BVMO, ALDH, Est, sEH) を複合化させた人工代謝反応について検討した。その結果、図 2 に示すように 4 Mix 反応に比べ BVMO、Est、ALDH を複合化した 7 Mix 反応では PP 分解活性が 3.7 倍まで向上することがわかった。PP 分解活性が向上した要因とし

て、BVMO、Est、ALDH によって PP 分解産物が代謝されたことで PP 分解反応が円滑に進んだこと、PP 酸化酵素 S、K を阻害するアルデヒドが脂肪酸に変換されたことによるものと考えられる。また、アルデヒド/ケトン生成量が反応 4 時間で停止していることから、ALDH のアルデヒド処理速度を上回るアルデヒドが生成したのではないかと推察した。

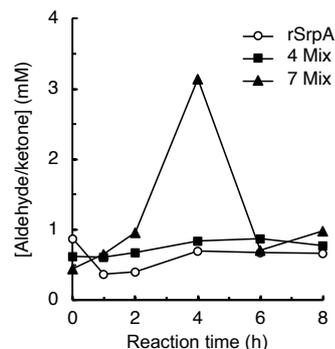


図 2. 酵素反応におけるアルデヒド/ケトン量

3. 今後の展望

単独酸化酵素よりも複数種の酸化酵素による分解、さらに複数種の代謝酵素を複合化させた人工代謝反応において PP 分解が効率的に進行することがわかった。しかしながら、PP のアップリサイクル技術を社会実装するには、格段に反応効率を向上させる必要がある。そこで、我々は以下の取り組みを進めている。

- ・ キー酵素の比活性や耐熱性などの機能向上と生産量の増大
- ・ 人工代謝系の最適化

今回発表したように、複数種類の酵素を複合化させた人工代謝系の最適化を進めたとしても、微生物の分解・代謝効率には遠く及ばない可能性が考えられる。そこで、我々はゲノム編集や中性子線による PP 分解菌親株自身の PP 分解、代謝能の増強を並行して進めている。さらに、育種した菌を宿主として利用することも視野に入れている。また、PP 分解・変換反応によって生成した化合物をより付加価値の高い工業原料に変換する合成ルートの開発や PP の前処理を含めた化学工学的アプローチも必須である。世界に先駆けた日本発の技術になることを目指して研究開発を加速させたいと考えている。

謝辞

本研究は (独) 環境再生保全機構の環境研究総合推進費 (JPMEERF20221005)、JST 共創の場形成支援プログラム (JPMJPF2010) の支援を受けたものである。

文献

- 1) 杉森大助ら、プラスチック分解微生物、特開 2025-030789.

蛍光免疫センサー設計を加速する深層学習を利用したアミノ酸配列-機能予測 Sequence-to-function deep learning framework for fluorescent immunosensor engineering

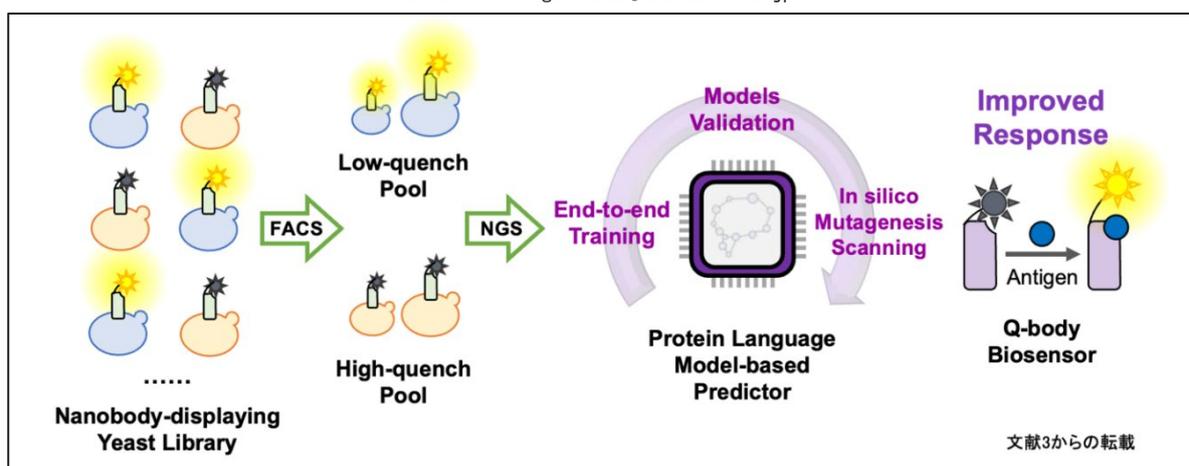
朱 博(Bo Zhu)¹・井上 暁人(Akihito Inoue)²・水谷 圭佑(Keisuke Mizutani)³・小林 健(Ken Kobayashi)³・安田 貴信(Takanobu Yasuda)¹・北口 哲也(Tetsuya Kitaguchi)^{1*}

¹東京科学大学総合研究院, ²東京科学大学生命理工学院, ³東京科学大学工学院

〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259 東京科学大学総合研究院

Tel: 045-924-5270 Fax: 045-924-5248

E-mail: kitaguc.t.aa@m.titech.ac.jp



要旨

蛍光免疫センサーであるクエンチ抗体(Q-body)は、混ぜるだけで試料に含まれる抗原濃度を定量できるという特長から、臨床診断、食品衛生管理、物質生産モニタリングなど多岐にわたる用途での利用が期待されている。しかし、実用的な性能に達するには試行錯誤が必要であり、数カ月以上の期間を要するという課題があった。本研究では、ラクダ科由来抗体ナノボディのライブラリーを蛍光色素 TAMRA の消光によってスクリーニングすることで得られた 10⁴ 種類程度の配列データを用い、消光を強めるアミノ酸変異を予測するモデルを構築した。このモデルを利用して、わずか数日のうちに性能を高めた Q-body の開発に成功した。

はじめに

Q-body は、抗体の N 末端側に蛍光色素が標識された抗体であり、抗原が存在しないとき蛍光色素は消光しているが、抗原結合に伴って消光が解消され蛍光強度が上昇する(蛍光応答)という仕組みを作用原理としている^{1,2)}。この蛍光応答を大きくするためには、抗原

が存在しないときに蛍光色素が強く消光するように設計を工夫することが重要となる。そのため、蛍光色素の消光効果を抗体のアミノ酸配列から予測できれば、実用的な Q-body の開発期間を飛躍的に短縮することができる。しかし、抗体の抗原認識部位を構成するアミノ酸配列は多様であることから、この予測は極めて困難であった。

アミノ酸配列と消光効果の対応づけ

アミノ酸配列と消光効果を対応づけた深層学習用のデータセットを取得するために、ナノボディを酵母に提示し、抗体の N 末端側に蛍光色素が配置されるように標識した。具体的には、コイルドコイル形成ペプチド E4 を融合したナノボディライブラリーを酵母表面に発現させ、蛍光色素 FITC および TAMRA で修飾したペプチド K4 を混合することで、酵母上で抗体を蛍光標識した。TAMRA は消光の指標として用い、FITC はナノボディの発現量を補正する目的で使用している。この標識抗体提示酵母を FACS により TAMRA の蛍光が強く消光されたものと弱く消光されたものの 2 つに分けて回収した(図 1A)。それぞれのグループの TAMRA/FITC

比（値が低いほど消光が強い）は、弱い消光で回収したグループでは平均 1.2、強い消光で回収したグループでは平均 0.30 であり、消光効果によって明確に選別されていた（図 1B）。これら 2 つのグループについて、NGS 解析したあと翻訳することで、抗体のアミノ酸配列と TAMRA の消光効果が対応づけられたデータセットを取得した。

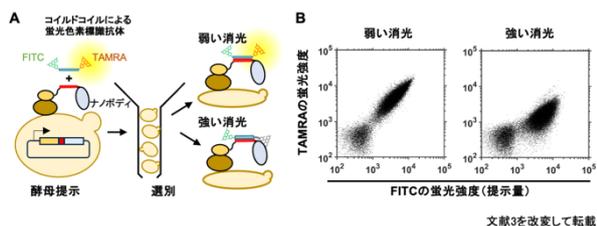


図 1. (A) 蛍光色素標識抗体を提示する酵母の FACS による選別。(B) 消光で選別したナノボディを提示する酵母のフローサイトメトリー解析。

消光を予測する深層学習モデルの構築

蛍光色素の消光および Q-body の蛍光応答に重要だと考えられている抗体の相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列と消光効果を学習させることで TAMRA の消光効果を予測する深層学習モデルの構築を目指した。具体的には、事前学習済みのタンパク質言語モデル ProtBert-BFD に単層パーセプトロンを接続し、CDR のアミノ酸配列と消光効果の対応づけを End-to-End で再学習させた分類モデルを構築し、消光の確率スコアの予測を可能とした（図 2A）。

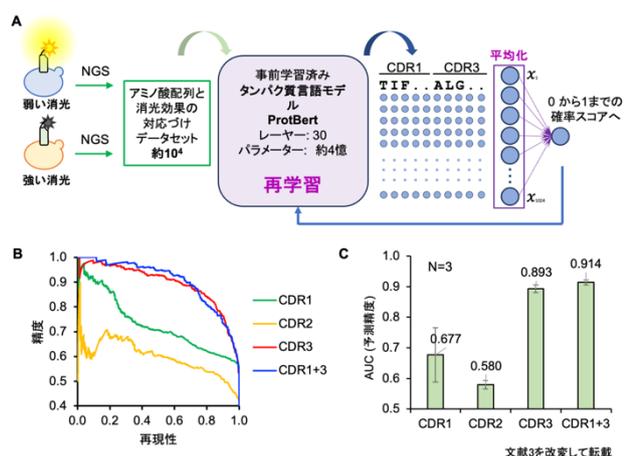


図 2. (A) 消光を予測する深層学習を駆使した分類モデルの構築法。(B) 各分類モデルの精度-再現性 (PR) 曲線。(C) 各分類モデルの PR 曲線の AUC 値。

まずは、3 つある CDR の消光への寄与を比較するため、CDR1、CDR2、CDR3 の配列をそれぞれ用いた 3 種類のモデルを別々に構築したところ、CDR3 の予測精度が一番高く、消光への寄与が一番大きいと考えられた。

さらに、予測可能な配列空間を拡張するため、CDR1 と CDR3 の組み合わせ配列を用いたモデルを構築したところ、最も高い予測精度を示したため（図 2B、C）、これを「NanoQ-model-1.0」と命名し、予測モデルとして使用することにした³⁾。

強い消光を示すナノボディの予測と検証

NanoQ-model-1.0 による消光の予測を検証するために、新型コロナウイルスの受容体結合ドメイン (RBD) を認識するナノボディ RBD10i14 を利用した。アミノ酸配列にインシリコで部位飽和変異を導入し、各変異体における消光の確率スコアを得た。このスコアの値が高いほど、ナノボディを TAMRA で標識したときに強い消光を示すと予測できる。インシリコ変異導入によりスコアが特に高かった 112.1、112、114、116 番目の 4 か所のそれぞれ 2 種類のアミノ酸変異について、それらの変異をナノボディに導入して酵母表層に提示した。そして、蛍光標識による消光効果を検証したところ、変異導入前と比べて TAMRA/FITC 比は 8 種類のうち 6 種類で低くなっており、強い消光が観察された（図 3A）。その 6 種類の変異体のうち、抗原結合能が維持されていた E112R 変異体について、大腸菌によりナノボディを調製し、蛍光色素を標識したところ、蛍光応答も上昇していた（図 3B）。NanoQ-model-1.0 の活用により、経験的な試行錯誤に依存せず Q-body の高性能化を効率的に実現できることが示された。

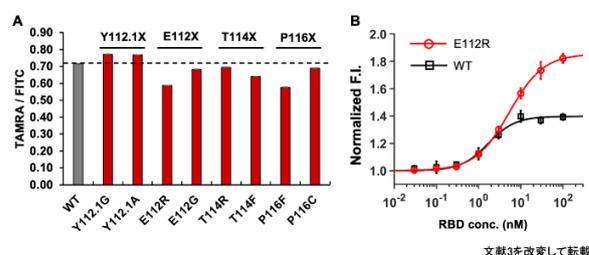


図 3. (A) 酵母表層に提示されたナノボディの消光効果。(B) E112R 変異体の抗原依存的な蛍光応答。

今後の展望

本研究で開発した深層学習モデルの概念を拡張することで、Q-body に限らず様々なタンパク質の機能をアミノ酸配列から予測できるモデルが構築できる。さらに発展すれば、特定の機能を持つタンパク質を自由自在に設計・創出できるようになり、生命科学にとどまらず、医療や環境、食品といった幅広い分野へ応用できる。

文献

- 1) Abe R *et al.*, *J Am Chem Soc*, **133**, 17386–17394 (2011).
- 2) Yasuda T *et al.*, *Chem Commun*, **57**, 8206–8209 (2021).
- 3) Inoue A & Zhu B *et al.*, *JACS Au*, **5**, 955–964 (2025).

日本の洗濯に最適化した α -アミラーゼの開発

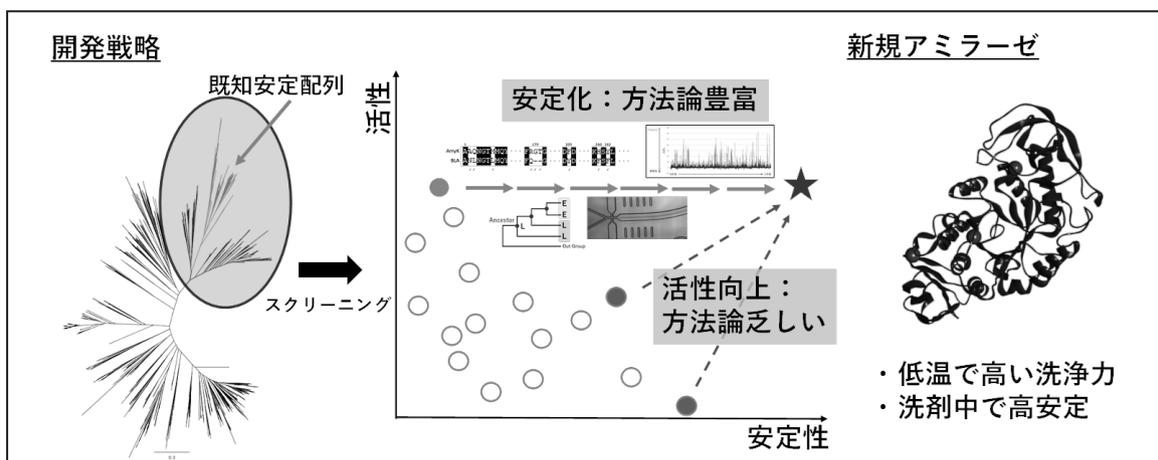
日置 貴大*・釋 真緒・寺井 三佳・川原 彰人・高橋 史員

花王株式会社

〒640-8580 和歌山県和歌山市湊 1334

Tel: 080-3395-8365

E-mail: hioki.takahiro@kao.com



要旨

産業用酵素の中でも重要な酵素の1つである洗剤用酵素の開発では、界面活性剤存在下での安定性を指標に組み込んだ酵素探索が一般的である。本研究では、既知高安定配列の近縁配列群から活性のみを指標に酵素を探索し、その後配列比較などの手法により安定化を行う、という戦略を提案する。実際に、既知酵素よりも高活性であるものの非常に不安定なアミラーゼを見出した後、様々な手法で安定化変異を取得することで大幅に安定性を向上させ、高洗浄力と高安定性を両立する新規高性能アミラーゼの開発に成功した。

1. はじめに

多くの洗濯用洗剤には洗浄成分として酵素が配合されている。洗剤用酵素は産業用酵素の中でも食品用、飼料用と並んで大きな市場を形成する重要な酵素である。花王ではこれまでにセルラーゼ¹⁾やプロテアーゼ²⁾など様々な洗剤用酵素を独自開発してきた。

多くの食品汚れに含まれるデンプンは汚れの難除去に寄与するが、高分子であり界面活性剤による洗浄が困難である。そこでデンプンを除去するために洗剤

用酵素として α -アミラーゼが利用される。花王においても過去に洗剤用アミラーゼの開発を行い、特徴的なアミラーゼを見出している^{3,4)}。これらは特にアルカリ pH で高い活性を示すアミラーゼであるが、近年では液体洗剤の普及により中性 pH での洗浄が一般化している。また、洗濯に温水が用いられる欧州などと異なり、日本の洗濯は低温で行われるため、低温で高い洗浄力を示すアミラーゼが求められる。そこで本研究では、日本の洗濯に最適化した中性・低温で高い洗浄力を示す新規洗剤用アミラーゼの開発に取り組んだ。

液体洗剤への酵素配合には界面活性剤存在下での高い安定性が必須であることから、洗剤用酵素開発では界面活性剤への安定性を指標に組み込んだ酵素探索が一般的である。しかし、タンパク質工学的な活性向上と比較して、安定性向上の方法論は豊富に存在する。本研究では、既知の高安定配列の近縁配列から、活性のみを指標に酵素を選抜し、その後安定化を行うという開発戦略を提案する。

2. 結果及び考察

既知の高安定アミラーゼである *Bacillus licheniformis* 由来アミラーゼ (BLA)⁵⁾ の近縁配列を

データベースから抽出し、中性・低温（20℃）におけるデンプン分解活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、様々な既知の洗剤用アミラーゼ野生型配列と比較して低温で顕著に高い活性を示すアミラーゼ AmyK を見出した（図 1）。洗浄試験の結果、AmyK は室温において既知の野生型配列と比較して顕著に高い洗浄力を示した。一方で、AmyK は界面活性剤存在下で非常に不安定であった。既知の洗剤用アミラーゼ野生型配列と比較しても著しく安定性が劣っていたことから、AmyK は従来の洗剤用酵素開発では優先的に選抜されない配列だと考えられる。

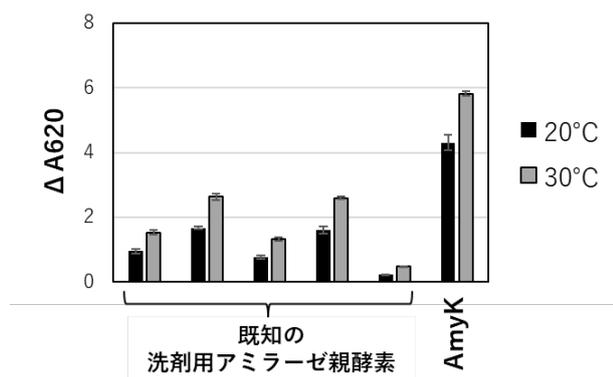


図 1. 様々なアミラーゼのデンプン分解活性

つづいて AmyK の安定化変異の探索を行った。はじめに既知の高安定配列である BLA との配列比較および変異実験から、4 つの安定化変異を取得した。これらの安定化変異を導入しても AmyK の低温洗浄力は低下しなかった。

次に、AmyK 及び既知の洗剤用アミラーゼの近縁配列群を用いて、祖先型配列設計により様々な祖先型アミラーゼ配列を設計した。複数の祖先型アミラーゼが界面活性剤存在下で高い安定性を示したため、これらとの配列比較をもとに AmyK を部位特異的に祖先化した変異体を評価し、6 つの安定化変異を取得した。

上記以外にも、折りたたみエネルギー計算による *in silico* スクリーニングや、ハイスループットスクリーニング技術の活用などにより、安定化変異を多数取得した。取得した様々な安定化変異を多重化および組み合わせ最適化することで、AmyK の高い活性は維持したまま安定性を大幅に向上させることに成功した。

最後に、AmyK の高い活性に寄与する残基を調べた。AmyK と近縁であり中程度の活性を示す BkoAmy と AmyK の配列を比較した。変異実験の結果、BkoAmy の 4 残基を同時に AmyK の持つアミノ酸に置換することで、AmyK

と同程度まで活性が向上した。興味深いことに、これらのうち 2 つの変異は別の変異と組み合わせただけのみ活性向上効果を示した（図 2）。このようなエピスタティックな効果を示す変異を単純な変異スクリーニングで取得することは困難であることから、この結果は、親酵素探索において活性のみを指標とした本開発アプローチの有効性を支持するものだと考えられる。

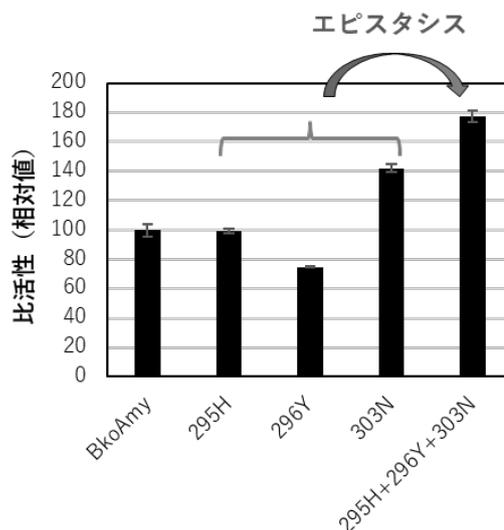


図 2. BkoAmy の部位特異的 AmyK 化による活性向上

3. 今後の展望

本研究では低温での高洗浄力と高安定性を両立する新規高性能アミラーゼの開発に成功した。ここで開発したアミラーゼは実際に花王製品において活用されており、今後も洗剤をはじめとした様々な用途に活用が期待される。また、本開発のアプローチは他酵素種の開発においても有効な手法だと考えられる。

文献

- 1) Ito, S. et al., *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1275-1281 (1989).
- 2) Saeki, K. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 501-508 (2007).
- 3) 五十嵐一暁ら, *日本農藝化学会誌*, **69**, 13 (1995).
- 4) Hagihara, H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1744-1750 (2001).
- 5) Morgan, F. J., and Priest, F. G., *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 107-114 (1981).

複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御 :

メタ連続発酵における代謝モデルを用いた発酵挙動の推定

古閑 友紀^{1*}・梶本 寛太¹・宮本 浩邦^{2,3,4}・濱田 浩幸¹・酒井 謙二¹・

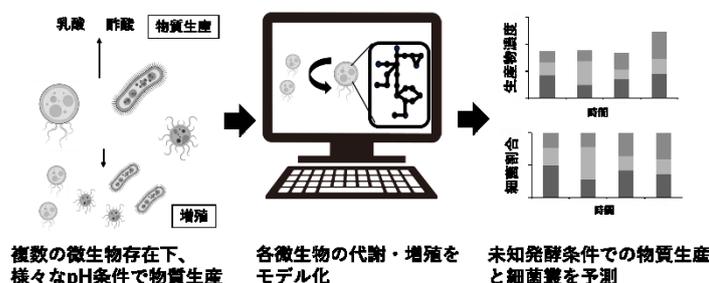
大城 麦人¹・田代幸寛¹

¹〇九大院・生資環, ²千葉大・園芸, ³理研・生命医科学, ⁴サーマス

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Tel: 092-802-4740

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



メタ発酵は複合微生物系を用いた有価物の生産プロセスである。先行研究では、回分発酵にてモデル食品廃棄物からの 39.2 g/L の光学活性 L-乳酸生産の達成¹⁾や、連続化による希釈率の生産物と細菌叢に及ぼす影響を解明している²⁾。メタ発酵には

複数基質の利用や非殺菌などの利点がある一方で、生産物・微生物叢の制御技術の未構築などの課題がある。本研究では、数学的アプローチに基づく代謝モデルの構築により、連続発酵における各微生物と物質生産の挙動の推定を試みた。その結果、メタ連続発酵において、5つの異なる pH 条件の各微生物の増殖、物質生産と消費を高精度に表現可能なモデルが構築された。さらに、このモデルにより、未知条件における基質と生産物、細菌叢の経時的かつ定量的な推定を可能にした。

1. はじめに

有機酸は食品や化粧品、医薬品など幅広く利用されており、需要は年々増加している。複合微生物系を用いた有価物の生産プロセスとしてメタ発酵が提唱されている¹⁾。メタ発酵には複数の基質を利用できること、汚染の影響を受けにくく開放的な環境での運用が可能であることから食品廃棄物などの未利用資源を非殺菌、低コストで利用可能なことが利点である。しかし現在までにメタ発酵を制御するための技術的、理論的な知見は乏しい。先行研究では、純粋培養では行われていないユニークな pH 制御により優占種を変化させた選

択的な 39.2 g/L の L-乳酸生産を報告し、メタ発酵中での細菌叢を制御することが有機酸生産に重要であることを見出している¹⁾。

複合微生物系における各微生物種の物質生産・消費を解明することで有用物質生産の最適化や制御戦略の構築が可能である。しかしながら、メタゲノムやメタトランスクリプトームといった遺伝子解析手法では、同一酵素が合成と消費の両方に関与し、実際の活性とは異なるため、各微生物種の物質生産・消費量の解析は困難である。これらの問題に対する解明手段として数学的アプローチがある。特に、速度論モデルは、化学量論と代謝の制御機構も考慮したモデルであり、代謝物および酵素の濃度の関数として代謝フラックスを

経時的かつ定量的に扱うことで、微生物間の代謝物交換や基質の競合など、微生物間相互作用の理解に役立つ。そこで本研究では、複合微生物系における代謝解析を進展させるために、メタ発酵における各微生物種の増殖、物質生産を推定可能な新たな代謝解析手法の開発を行い、構築したモデルによる未知条件におけるメタ発酵挙動の推定を行った。

2. 材料と方法

複合種菌として堆肥を用い、pH を非制御 (4.92) と一定制御 (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) の5条件で連続発酵を行い、代謝産物、グルコース消費、細菌叢を解析した。代謝シミュレータでメタ連続発酵中の主要細菌である *Heyndrickxia coagulans*, *Caldibacillus hisashii*, *Anaelosalibacter bizertensis*, *Xylanivirga thermophila* および “その他の細菌” の計5種の細菌種について、代謝と増殖をそれぞれ Michaelis-Menten 型速度式と Monod 式による代謝モデルを構築した (図1)。構築した代謝モデルのパラメータを推定し、実験値と比較することで、モデルの評価を行った。構築したモデルを用いて、pH を6.2に制御した未実施条件における発酵挙動を推定し、実際の発酵試験結果と比較した。

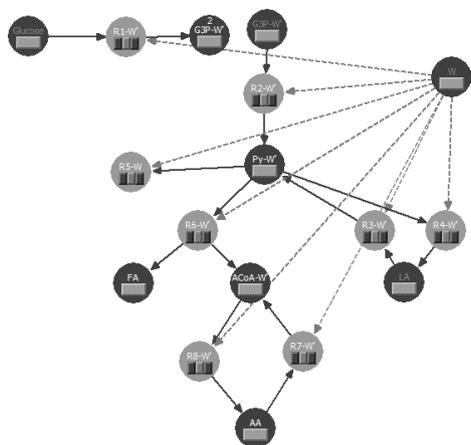


図1. 簡略化された *H. coagulans* の EMP 経路のモデル

3. 結果と考察

モデルの評価

pH 7.0 では乳酸、酢酸、ギ酸、酪酸が同程度生産され、*C. hisashii* 及び *X. thermophila* が優占種となった。発酵初期における *H. coagulans* の割合減少、*C.*

hisashii の維持、発酵後期における *X. thermophila* の増加はモデルによって高精度に表現された。pH6.5では、連続発酵開始後に乳酸が >0.5 mol/L の高濃度で生産されたが、その後減少した。*C. hisashii* が優占化したほか、発酵後期では *A. bizertensis* が優占化した。有機酸生産と細菌叢の挙動をモデルは精度よく表現した。pH4.92, 5.5, 6.0では *H. coagulans* が優占的に存在し、代謝物として乳酸が生産された。グルコース消費や乳酸生産も高精度に一致する結果となり、すべての pH 条件で有機酸生産、グルコース消費、細菌叢を経時的かつ定量的に表現可能なモデルを構築した。

未知条件における発酵挙動の推定

構築されたモデルを用いて、各微生物の増殖速度パラメータを変更することで、未知条件である pH6.2 の物質生産と細菌叢の推定を行った。pH6.2 では *H. coagulans* が優占化した一方で、*C. hisashii* がわずかに存在した。乳酸が主生産物として生産された一方で、 <0.03 mol/L で酢酸と酪酸が生産された。モデルでのシミュレーションにおいて、*H. coagulans* と *C. hisashii* の2種が優占化することを推定し、実際の実験データと一致した。さらに、乳酸が主生産物として、酢酸、ギ酸が <0.03 mol/L で生産されることを再現した。

以上の結果より、複合微生物系を用いたメタ連続発酵において代謝モデルを用いることで解析が困難であった微生物の挙動を経時的かつ定量的に解析を可能にし、さらに未知条件におけるメタ発酵プロセスの挙動を推定可能にした。

4. 今後の展望

未利用資源を用いた有価物生産や連続化といった先行研究の結果に加え、本研究の代謝モデルによる各微生物の機能や発酵挙動推定により、複合微生物プロセスを工業、農業、環境、医薬等へ応用を目指す複合微生物工学の学問分野としての発展だけでなく、SDGs に資する資源利用技術としての応用が期待される。

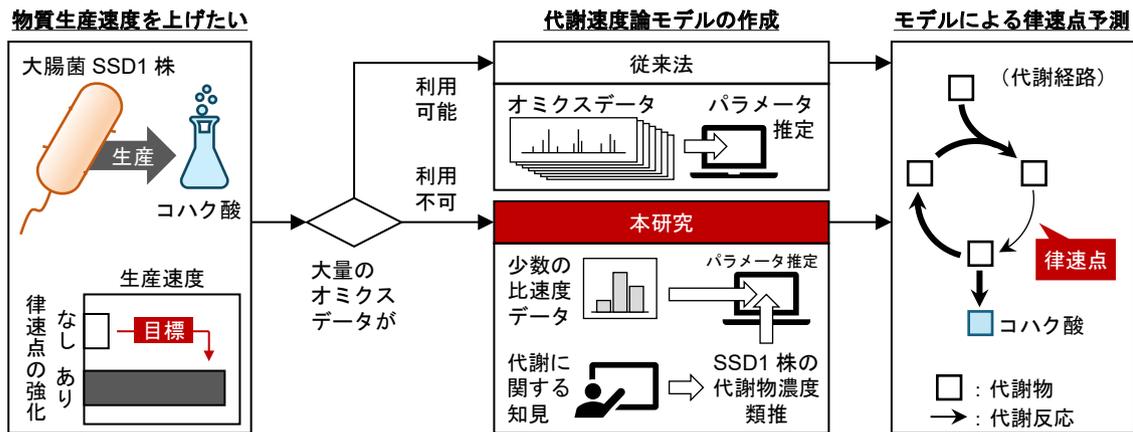
参考文献

- 1) Tashiro et al., *Bioresour. Technol.*, 52-59, 2016
- 2) Koga et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 136, 5, 391-399, 2023
- 3) 田代ら, *生物工程*, 99, 12, 627-630, 2021

少数の実測データを用いた代謝速度論モデルの作成による 大腸菌コハク酸生産株の生産律速点の同定

竹谷 友之¹・二井手 哲平²・佐藤 美和¹・伊藤 潔人¹・清水 浩²・戸谷 吉博^{2*}

¹ 日立製作所, ² 阪大院・情報
〒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: 06-6879-7432 Fax: 06-6879-7431
E-mail: ytoya@ist.osaka-u.ac.jp



要旨

持続可能なものづくりの実現に向け、微生物の代謝を利用した物質生産に期待が集まっている。その生産速度を左右する代謝反応である律速点を計算機上で予測するために、代謝物の動態を数学的に記述した速度論モデル（以下モデル）を作成した。大量のオミクスデータがない場合でも精緻なモデルを作成するために、我々は、少数の新規実測データと代謝に関する知見を活用したモデル作成法を提案・実施し、大腸菌コハク酸生産株の律速点の同定に成功した。

背景・目的

微生物の代謝を利用した物質生産は、バイオマス等の非枯渇性資源を原料として、基礎化学品であるコハク酸等の有用物質を生産する。そのため、持続可能なものづくりの実現に貢献すると期待を集めている。その実用化に向けては高い生産速度を備えた菌株の開発が求められる。生産速度の向上には、代謝経路上の律速点の解消が鍵となる。

律速点を予測するには、各代謝反応（酵素反応）の速度式を記述し、代謝の動態をシミュレートする速度

論モデルが有用である。しかし、速度式中の V_{max} や K_M 等は文献値のない未知パラメータであることが多く、モデル作成の障壁の一つとなっている。未知パラメータは、もしメタボローム等のオミクスデータが大量であれば、高精度に推定可能である¹⁾。一方、オミクスデータがない場合は手作業での設定・調整が必要であり²⁾、高精度な決定は困難であった。

そこで本研究では、オミクスデータがない場合でも、少数の比速度データと、類似の株や培養条件など代謝に関する知見を活用して、代謝速度論モデルを作成する手法を提案した（図1）。さらに、手法の妥当性を検証するため、本手法を大腸菌 *Escherichia coli* SSD1 株 ($\Delta pykAF \Delta sfcA \Delta maeB \Delta zwf$)³⁾ によるコハク酸生産の律速点の同定に適用した。

方法・結果・考察

モデル作成に用いるデータとして、SSD1 株を微好気培養し、グルコースやコハク酸等 6 種類の細胞外代謝物の消費・生産比速度を取得した。提案するパラメータ推定手法でモデルを作成し、各反応の律速点である度合いを表すフラックス制御係数 (FCC) を評価したところ、FCC の中央値が高い反応にホスホエノールピル

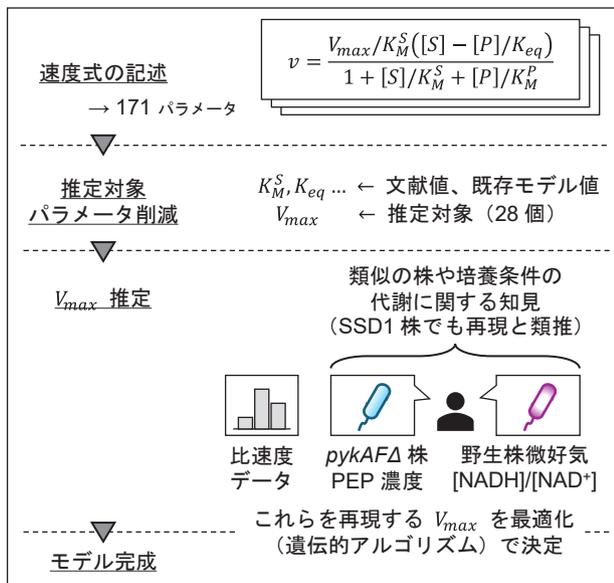


図 1. 提案手法によるモデル作成

ピルビン酸 (PEP) カルボキシキナーゼ (PCK) が含まれていた (図 2)。経路上のそれぞれの酵素を過剰発現したところ、PCK の場合のみコハク酸の比生産速度が 2 倍以上に向上しており (図 3)、律速点の同定に成功した。

パラメータ推定ではまず、総パラメータ 171 個のうち推定対象を酵素発現量に依存する V_{max} 28 個に絞り、パラメータ探索範囲を削減した (図 1)。その他のパラメータは文献値や野生株の既存モデルにおける値を設定した。本モデルにより PCK を律速点と予測できたため、この設定法の妥当性が示された。

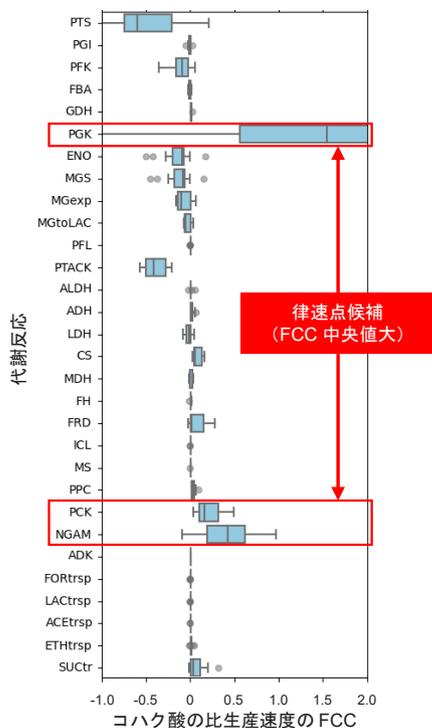


図 2. 提案手法で作成したモデルによる律速点予測

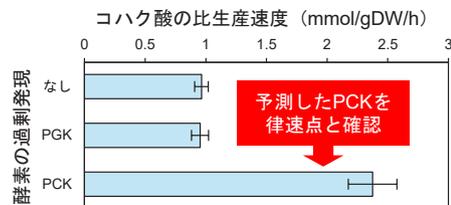


図 3. 律速点の酵素過剰発現による確認。
NGAM は該当する酵素がないため実施せず

V_{max} 推定には上記比速度データに加え、メタボロームデータの代替として、類似の株や培養条件の代謝に関する知見を用いた (図 1)。すなわち、SSD1 株と同じくピルビン酸キナーゼ遺伝子が破壊された $\Delta pykAF$ 株における高い PEP 濃度⁴⁾や、野生株の微好気条件下の [NADH]/[NAD⁺] 比⁵⁾について、微好気条件下の SSD1 株でも再現するものと類推して V_{max} 推定に用いた。これらの知見のうち PEP 濃度を省くと PCK の FCC の順位が低下して律速点と予測できず (表 1)、類似株の代謝物濃度情報という知見を用いた有効性が示された。

表 1. PCK の FCC の中央値の順位 (全 30 反応中) と代謝に関する知見の利用の関係

知見の利用	PCK の順位
PEP 濃度と [NADH]/[NAD ⁺] 比	3 位
PEP 濃度のみ	3 位
[NADH]/[NAD ⁺] 比のみ	24 位
なし	24 位

今後の展望

本研究で確立した速度論モデルに基づく律速点同定手法は、物質生産の生産速度を向上させるための菌株の開発に広く利用できる。例えば、野生株のモデルがあれば、改変株について、少数の実測データから速度論モデルを構築し、生産律速点を簡便に予測・同定できると想定する。大量の新規実測データを要求しない本手法は、菌株開発期間を短縮し、物質生産の実用化・産業化の加速に貢献するものと考えている。

文献

- 1) Millard P. *et al.*: *PLoS Comput. Biol.*, **13**, e1005396 (2017).
- 2) Oliveira A. *et al.*: *PLoS Comput. Biol.*, **17**, e1008704 (2021).
- 3) Toya Y. and Shimizu H.: *J. Biosci Bioeng.*, **134**, 29–33 (2022).
- 4) Toya Y. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **26**, 975–992 (2010).
- 5) De Graef M. R. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 2351–2357 (1999).

一細胞自家蛍光シグネチャー解析に基づく 食品汚染菌のリアルタイム検出

鳥澤 創¹・張 譯云¹・畔柳 ひとみ²・迫田 紘史²・上崎 菜穂子²・

岡野 千草^{3*}・八幡 穰^{3,4*}

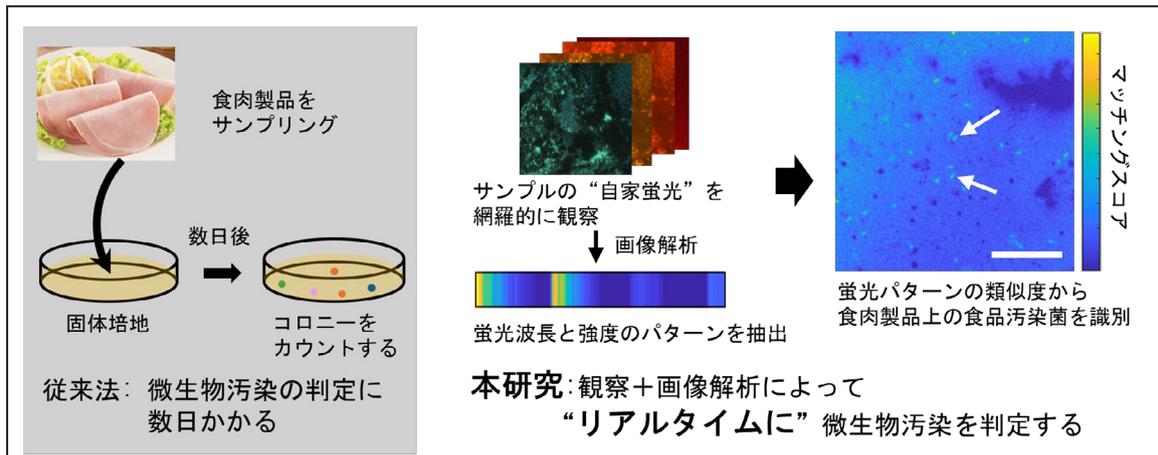
¹筑波大学大学院 生命環境科学研究科, ²プリマハム株式会社, ³筑波大学 生命環境系,

⁴筑波大学 高等研究院 微生物サステナビリティ研究センター

〒305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学 生命環境系

Tel: 029-853-7098

E-mail: okano.chigusa.gb@u.tsukuba.ac.jp(岡野), yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp(八幡)



要旨

食品の微生物汚染をリアルタイムで検出する技術は、汚染された食品が工場から出荷されることを防ぐための鍵となる。我々はこれまでに、一細胞自家蛍光シグネチャー解析により食品上に付着したモデル細菌をリアルタイムに検出する食品検査法の概念実証に成功している。本研究では実用化を念頭に、食品工場から実際に単離された汚染菌を接種したハム上での検出を試験した。

背景・目的

食品製造現場では、これまで一般的に培養法を用いて食品上の微生物汚染を検出してきた。しかし、培養法は検査結果の判定までに日単位の時間を要し、品質管理上のボトルネックとなっていた。微生物汚染の検出をその場で、かつリアルタイムで行うことができれば、汚染した製品の流通の予防、問題のある工程の迅

速な特定、検査工程の大幅な省力化など、大きなメリットがある。そこで我々は、食品表面をレーザー共焦点スペクトル顕微鏡でダイレクトに可視化し、微生物特有の細胞自家蛍光シグネチャー (IF)^{1),2)}を検出することで微生物汚染をリアルタイムで検査する手法の開発を行っている。IFとは、細胞内の分子が放出する自家蛍光が重ね合わされた信号であり、細胞の生理状態や種類を反映する。これまでに我々は食肉製品上でモデル細菌として大腸菌を検出することに成功している。本研究では、製品などから単離された、代表的な食品汚染菌 (乳酸菌 4 種: *Weissella viridescens*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc citreum*) の検出試験を行った。

結果

(1) 食肉製品と食品汚染菌の IF の比較

食肉製品(ハム)と食品汚染菌の IF が異なることを明らかにした(図 1)。まずレーザー共焦点スペクトル顕微鏡を用いて、4 種類の励起レーザー光を順に照射しながら各サンプルを観察し、蛍光スペクトル画像を 1 細胞の解像度で網羅的に取得した。次に、画像解析によって、励起波長と蛍光波長の組み合わせごとにサンプルの蛍光強度を算出した。これらを統合したものを IF として抽出し、ヒートマップとして可視化した。このヒートマップからは、いくつかの励起波長においてハムと食品汚染菌が大きく異なる IF を示すことが分かる。

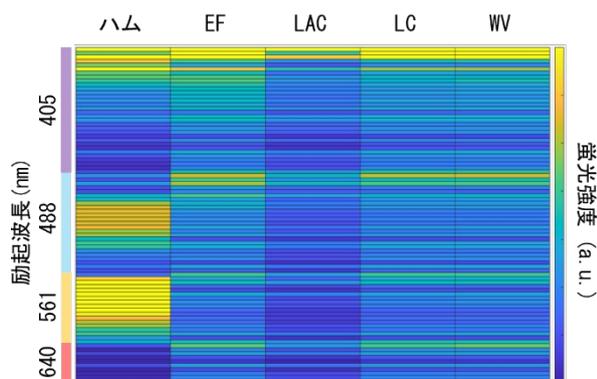


図 1. IF の平均ヒートマップ. EF: *E. faecalis*, LAC: *L. curvatus*, LC: *L. citreum*, WV: *W. viridescens*. 行は各蛍光波長帯を示す。

(2) 食肉製品上での食品汚染菌のリアルタイム検出

ここまでで観察された IF の違いを手がかりとして、市販ロースハム上での食品汚染菌の検出を検証した(図 2)。市販ロースハムは背景自家蛍光の強度が高く、単純な蛍光強度の違いによる細菌の可視化検出は困難である。そこで今回は、スペクトル形状の類似度を指標としたマッチングスコアをマッピングすることにより、食品汚染菌の可視化を試みた。

まず、食品汚染菌とハムの IF 群それぞれに対して MATLAB で構築したルーティンによりブラインドスペクトル分解を実施し、成分スペクトルのライブラリを抽出した。食品汚染菌のライブラリ中には菌種や培養条件によって変動しない、食品汚染菌に共通の成分が観察された。また、この成分はハムのライブラリには含まれないものであった。

この食品汚染菌に特異的なスペクトル成分などをキーとして、画像中の各ピクセルのスペクトルが食品汚染菌のスペクトルと類似しているかをマッピングする画像処理アルゴリズムを構築した。ハム上に食品汚染菌を塗布して自家蛍光スペクトル画像を撮影し、上記のアルゴリズムにより類似度(マッチングスコア)をマッピングした。元のスペクトル画像(図 2a)では食品汚染菌を確認することが困難であるのに対して、マッチングスコア画像(図 2b)では細菌の位置が高ス

コア部位として可視化されていることが分かる。

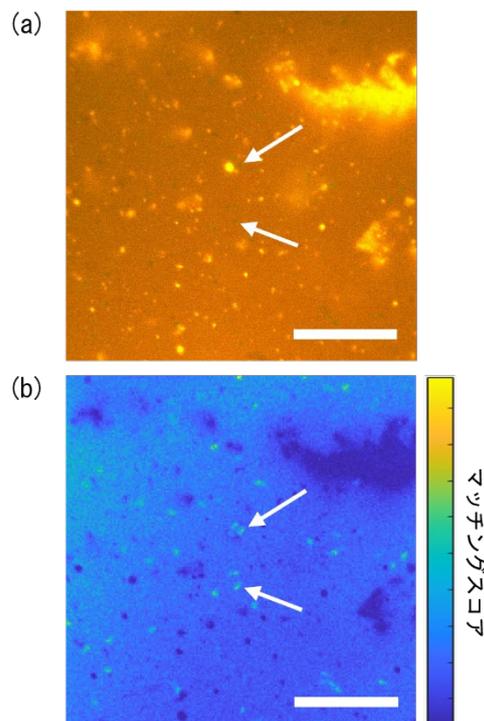


図 2. 食品汚染菌(*E. faecalis*)を塗布したハムの画像に対して、スペクトルの類似度を調べた結果. (a)元のスペクトル画像, (b) (a)と同じ視野に対してマッチングスコアをマッピングした画像. 矢印で示した領域などが食品汚染菌の領域に相当する. スケールバー: 20 μm .

まとめ・展望

これまでに、背景自家蛍光が比較的弱い食品を対象として、モデル細菌(大腸菌)が検出できることを明らかにしてきた。今回、背景自家蛍光が強い食品上で、自家蛍光の弱い食品汚染菌の可視化に成功したことは、実用化に向けて一歩前進したとすることができる。一方で現段階では、食品の個体差や細菌の種、撮影条件によっては正確に検出できないケースがあるため、今後はより堅牢な検出技術の確立を目指し、改良を進めていく。

参考文献

- 1) Y. Yawata, *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e00608-19 (2019),
- 2) U. S. Patent No. 11, 002, 678

謝辞

本研究は、JST 創発的研究支援事業 課題番号 JPMJFR210G(代表者:YY), JST START 大学・エコシステム推進型 大学推進型 課題番号 JPMJST2052(代表者:YY), 日本学術振興会 特別研究員制度 課題番号 23KJ0289(代表者:CO)から支援を受けて実施されました。ご支援に深く感謝申し上げます。

低グルテリン米「春陽」が清酒発酵過程における 酵母の遺伝子発現に与える影響

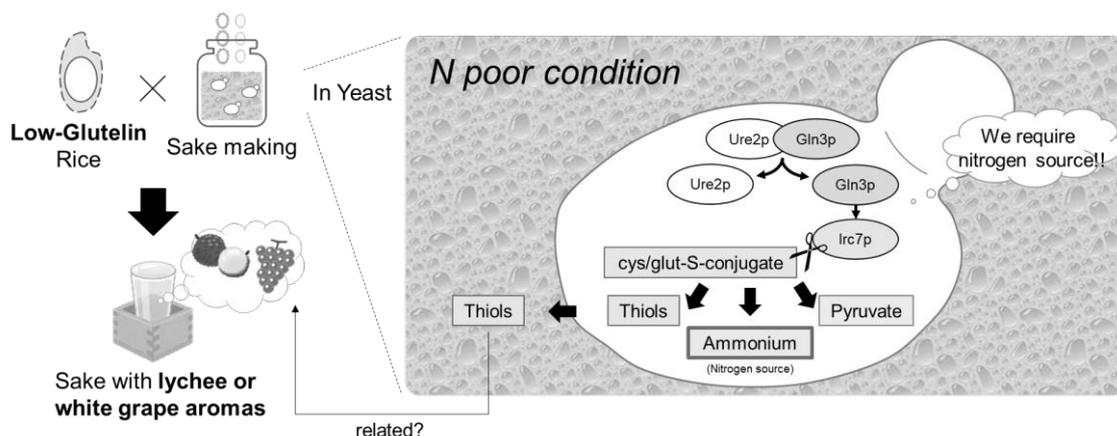
柚山 泰成^{1,2}・赤坂 直紀¹・渡辺 大輔^{1*}

¹奈良先端科学技術大学院大学先端科学研究科バイオサイエンス領域, ²株式会社飯田

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5 奈良先端科学技術大学院大学

Tel: 0743-72-5420

E-mail: watanabe.daisuke@bs.naist.jp



消化性の高いタンパク質であるグルテリンの含量が少ない米品種「春陽」を用いて清酒を製造すると、一般的な清酒ではあまり見られないライチや白ブドウのような特徴的な香りが生じることがある。しかし、この香りに関与する成分や生成メカニズムに関しては、不明な点が多く残されている。そこで本研究では、春陽を用いた清酒発酵における酵母の転写応答を調査し、特徴香に関与する遺伝子の探索を行った。RNA-seq 解析の結果、春陽使用区の酵母では複数の窒素源トランスポーター遺伝子が高発現しており、窒素カタボライト抑制が解除されている可能性が示唆された。また、窒素カタボライト抑制の制御下にあるβ-リアーゼ遺伝子が、特徴香生成に関わる候補遺伝子として見出された。本成果は、低グルテリン米を用いた清酒発酵における酵母の代謝応答の理解を深めるとともに、特徴香の生成メカニズム解明への手がかりを提供するものである。

1. はじめに

グルテリンは、米に含まれる主要かつ消化性の高いタンパク質であり、その含有量は清酒中のアミノ酸量に大きく影響する。アミノ酸は清酒に旨味や雑味を与えることから、淡麗な酒質を実現するために、低グルテリン米（例：春陽）が開発されてきた。興味深いことに、春陽を用いて清酒を造ると、ライチや白ブドウを思わせる特徴香が生じることが経験的に知られている。この香りは一般的な清酒ではあまり見られないことから注目されており、春陽を使用する酒蔵は近年増

加している。しかしながら、この特徴香に関与する成分は未解明な部分が多く、生成メカニズムは明らかになっていない。一方、ワインにおいて類似の香りは、酵母が生成する低嗅覚閾値のチオールに由来することが知られており、春陽使用清酒の特徴香にも同様のチオールが関与している可能性が示唆される。そこで本研究では、低グルテリン環境下における酵母の転写応答を明らかにするとともに、春陽使用清酒の発酵中に酵母がチオールを生成する可能性を検討し、その特徴香の成分同定と生成機構の解明を目指した。

2. 材料・方法

掛米に使用する米品種（春陽または一般米）を変えて、総米 200 g による清酒の小仕込み試験を実施した。春陽の α 化米（AAS-70、徳島製麹株式会社）、又は一般米の α 化米（AA-70、同社）および乾燥麹（1-70A、同社）を用いて、15°C一定の一段仕込み（n=2）を行った。酵母は清酒酵母きょうかい 901 号（K901）を使用した。発酵 6 日目、12 日目、18 日目のもろみから採取した酵母より total RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。

3. 結果・考察

3.1 低グルテリン米使用により誘導される窒素代謝応答

春陽使用区で発現が上昇した遺伝子群に対して遺伝子オントロジー（GO）エンリッチメント解析を行った。その結果、アミノ酸代謝に関わる複数の生物学的プロセスが濃縮されていた（図 1）。特に、アミノ酸代謝・輸送に関するプロセスの濃縮が顕著で、詳細な解析においてアンモニウム膜輸送体等の発現も上昇していたことから、春陽の使用により窒素代謝応答が誘導されたと考えられる。また、これらの遺伝子群の濃縮は発酵 6 日目に最も強く現れており、窒素代謝応答は発酵前半に強く誘導されたと推察される。当研究室では以前に、このような遺伝子発現が清酒酵母において抑圧されていること（窒素カタボライト抑制）を報告しているが¹⁾²⁾、低グルテリン米を使用することにより、その傾向が解除されると考えられる。

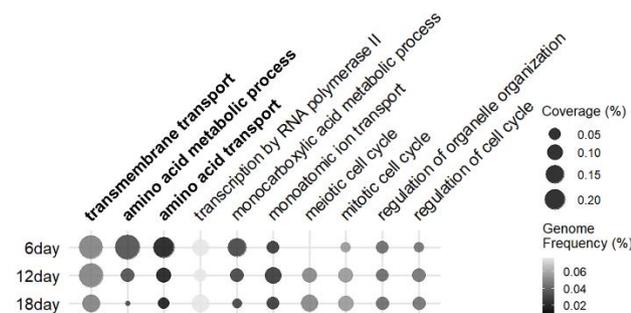


図 1. 春陽試験区で発現上昇した遺伝子群において濃縮された GO 上位 10 項目, *Saccharomyces* Genome Database の Gene Ontology Slim Mapper を用いた。

さらに各遺伝子の発現プロファイルの詳細な解析を行った結果、窒素カタボライト抑制の鍵因子である Gln3p と Dal80p の制御下にある代表的な遺伝子¹⁾の多くが共通して高発現していた（図 2）。低グルテリン米の使用により発酵環境中の窒素源が低下したことが引き金となり、窒素の利用可能性を高めるための遺伝子発現応答が引き起こされたのではないかと推察される。

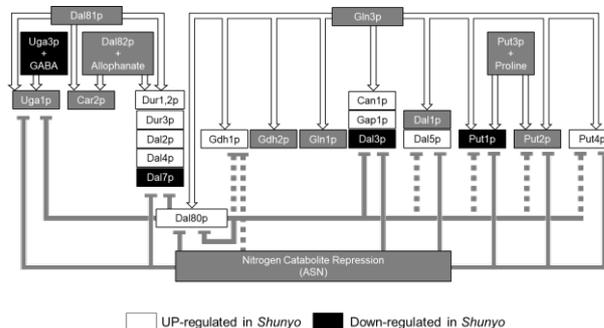


図 2. もろみ 6 日目における窒素カタボライト抑制関連遺伝子の発現変動

3.2 チオール生成関連遺伝子の発現プロファイル

チオール生成に関与する炭素-硫黄リアーゼ遺伝子群の発現変動を調べた結果、 β -リアーゼ遺伝子 *IRC7* のみが、春陽使用区の発酵 6 日目に顕著な発現上昇を示した（図 3）。*IRC7* は窒素カタボライト抑制下で発現が抑制される遺伝子の一つであり、Gln3p によって転写が促進されることが知られている³⁾。以上より、低グルテリン米の使用により *IRC7* 発現が転写レベルで高まり、チオール生成に関与する可能性が示された。

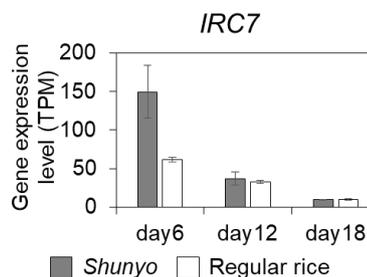


図 3. 春陽を用いた清酒発酵中の *IRC7* の発現量

4. 今後の展望

IRC7 の過剰発現株を用いて、春陽使用清酒の特徴香成分が多量に生成された清酒を製成することで、GC-MS 等による特徴香の同定が可能になると期待される。その同定により、生成メカニズムの解明が進み、香りを制御する醸造技術の発展が期待される。

文献

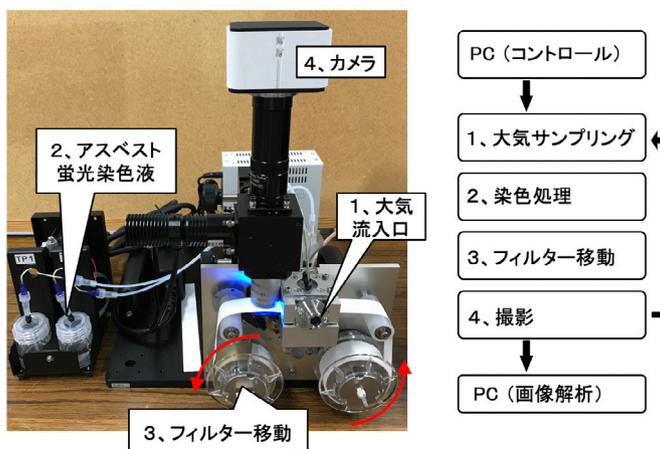
- 1) Akasaka, N. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **405**, 159-168 (2025).
- 2) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02083-18 (2019).
- 3) Thibon, C. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1076-1086 (2008).

バイオ蛍光プローブを用いた大気中アスベスト 全自動測定装置の開発

西村智基¹・加賀健一郎²・石田文典¹・市川京香¹・池田文¹・舟橋久景¹・廣田隆一¹・

黒田章夫^{1*}

¹広島大学大学院統合生命科学研究科, ²東亜 DKK
〒739-8530 東広島市鏡山 1-3-1 広島大学大学院統合生命科学研究科
Tel: 082-424-7758 Fax: 082-424-7047
E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp



アスベスト含有建材を使用した建造物の老朽化による解体、建替えが今後ピークを迎えようとしている。アスベストは大気1リットルあたり1本が環境基準だが これを自動で測る装置はまだ存在しない。当研究室ではタンパク質の結合特異性を利用したアスベストの蛍光検出方法を開発してきた。本発表では、大気中アスベストのモニタリングへ向けて、大気捕集から蛍光染色、顕微鏡画像のAIによる分析までの全工程を自動化した連続測定装置の開発について報告する。

1、はじめに

2021年4月1日、改正大気汚染防止法が施行され、建物の解体時にアスベストによる健康被害を防ぐための対策を徹底することとなっている。これまでの飛散アスベスト検査の公定法は、時間と手間がかかる位相差顕微鏡と電子顕微鏡を使う方法であったため、解体現場で利用できるモニタリング技術になり得なかった。そこで発表者らは、アスベストに結合するタンパク質を利用し、特異的な蛍光試薬（バイオ蛍光プローブ）を開発した。大気捕集フィルターに蛍光試薬を滴下し、光って見えるアスベストを計測する方法を開発した。

落射蛍光顕微鏡は励起光を上から照射するので、従来必要であった大気捕集フィルターの透明化を必要としない。また、暗い視野の中で蛍光が光るので、フィルター上のアスベストの検出が容易である。この特徴を活かして大気捕集から顕微鏡による観察、計測まで全ての工程を自動化した装置の開発を目指した。

2、材料と方法

PM2.5 自動検出器（東亜ディーケーケー株式会社製 FPM-377C）は、大気微粒子を捕集したフィルターにベータ線を当て、その吸収量から PM2.5 の測定を連続的

に行う装置である。ポンプ駆動時（大気サンプリング時）はリールユニットのセルがテープ状フィルターを挟み込んで空気が漏れない構造になり、フィルター上に大気中の浮遊微粒子が捕集される。一定時間捕集後、ベータ線吸収法によりフィルター上のPM2.5が測定される。測定後リールユニットのセルが下降し（挟み込みが解除され）、フィルターがリールによって一定方向に巻き取られ移動する。大気中アスベスト全自動測定装置の開発には、本リールユニットを利用することとした（図1）。さらに、アスベスト蛍光試薬が流れ込む染色装置、蛍光検出ユニット、解析ソフトウェアを追加して大気中アスベスト自動計測装置を作製した（図1）。

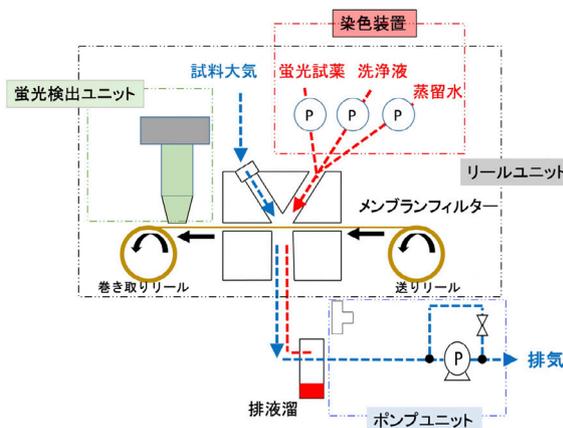


図1. 大気中アスベスト全自動測定装置の構成

3、結果

大気中アスベスト全自動測定装置の「測定開始」ボタンを押すと、ポンプユニットが起動してサンプリングが始まる。規定時間のサンプリング後、蛍光染色ユニットが起動する。最初に、洗浄液がメンブランフィルターに滴下され、次に染色液（蛍光試薬）によってアスベストが染色される。その後さらに洗浄液によって余分な染色液を洗い流す。染色後、メンブランフィルターの挟み込みが解除され、リールが回転することによってメンブランフィルターが移動し、染色された部分が蛍光検出ユニットの直下まで移動する。装置からメンブランフィルター送り完了信号が、I/O端子を介して顕微鏡制御ソフトへ送られ、蛍光検出ユニットが作動開始する。励起光が照射され、Z軸を動かしながらフォーカス合成により画像が取得される。画像が画像フォルダに保存されると、人工知能画像解析ソフトウェア（アスベストを学習させたもの）に指令を出し、解析が開始される。

本装置を、人工的にアスベスト浮遊環境を再現できる実験用チャンバーを装備した施設に持ち込み、従来

法（位相差顕微鏡、電子顕微鏡）による測定との比較試験を行った。同時に、位相差顕微鏡および電子顕微鏡によるアスベスト濃度を計測するためのサンプリングを行った。両者による計測結果を比較することで、大気中アスベスト全自動測定装置の検出率を評価した。その結果、バラツキはあるものの、平均するとほぼ位相差顕微鏡で測定したアスベスト濃度と同程度の数値を示すことがわかった（図2左）。

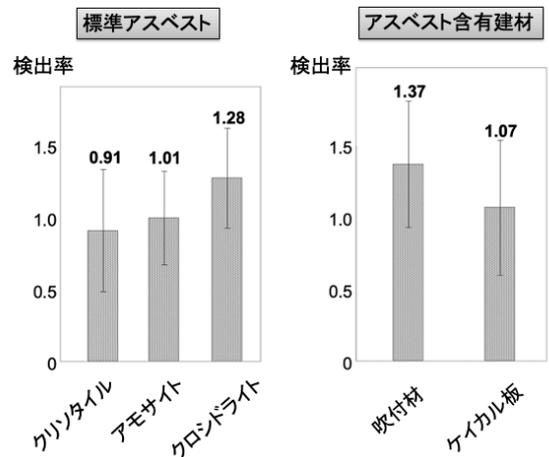


図2. 大気中アスベストの測定結果。検出率は自動計測装置/位相差・電子顕微鏡の値の比を表す。

実際の解体現場では、アスベスト以外にも様々な繊維や粒子が飛散している可能性がある。そこで、アスベスト含有吹付材（アモサイト 3.5%、クリソタイル 0.5%、クロシドライト 0.5%含有）とアモサイト含有ケイカル板を粉砕して人工チャンバー内に飛散させた場合の計測比較を行った。その際、測定結果を比較するために、位相差顕微鏡と電子顕微鏡（元素分析含む）による計測を用いた。その結果、全自動計測装置とマニュアルでの測定結果がほぼ一致する（1.37、1.07の検出率）ことがわかった（図2右）。今後は実際の解体現場での試験が必要と考えられるが、世界初となる大気中アスベスト検査の連続化、自動化の実現に近づいたと考えている。

文 献

- 1) Kuroda A, Fluorescent labeling of asbestos fiber for enhanced asbestos detection under fluorescence microscopy, *Front Public Health* 13:1568581 (2025)
- 2) 黒田章夫、石田文典、西村智基、大気中アスベストを迅速検査するための蛍光顕微鏡法の開発と自動化の試み、*廃棄物資源循環学会誌*、31、pp. 345-351 (2020)

酵母 *Kluyveromyces marxianus* の高温耐性に関する 新規遺伝子の探索と同定

松鹿 昭則^{1*}・鈴木 俊宏^{1**}・星野 保^{1***}

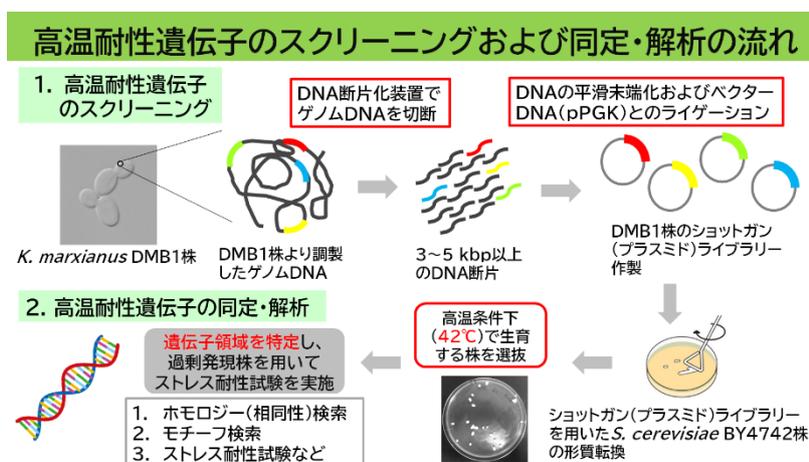
¹産業技術総合研究所

(* 現 近畿大学工学部, ** 現 王子ホールディングス株式会社, *** 現 八戸工業大学工学部)

*〒739-2116 東広島市高屋うめの辺1番

Tel: 082-434-7005

E-mail: a-matsushika@hiro.kindai.ac.jp



1. はじめに

食料と競合しない非可食性バイオマスを効率的にエタノールに変換するには、糖化と発酵を並行して行うプロセスの開発が生産コスト削減の観点から望まれるが、この並行複発酵 (SSF) には糖化酵素の反応温度域 (40°C 以上) で発酵が可能な耐熱性酵母が必要となる。また、耐熱性の高い酵母を用いることは、発酵の効率化や冷却エネルギーの節約、雑菌汚染の低減につながるなど、そのメリットは大きい。

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は、50°C 弱でも生育ができることから、高温条件下における物質生産やSSFへの利用も検討されている。その実現に向けた基盤的情報として、*K. marxianus* の有する高温耐性分子機構の把握は、安定な高温発酵系を構築する上で極めて重要である。これまでに、*K. marxianus* において、*CTT1* 遺伝子など活性酸素除去酵素をコードする遺伝子を過剰発現させることで酸化ストレスが抑制され、高温条件下での増殖が向上するなどの報告がある¹⁾。しかしながら、本酵母の高温耐性分子機構についての知見は乏しく、高温耐性を支える主要な遺伝子も明らか

かになっていない。

本研究では、バガス糖化液から分離した *K. marxianus* DMB1 株²⁾から高温ストレス耐性に寄与する遺伝子の探索を行い、新規機能未知遺伝子を単離した。この高温ストレス耐性遺伝子を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において過剰発現させ、高温条件下での生育 (増殖) やエタノール生産性への効果を検討した。

2. 材料と方法

(1) 高温耐性候補株のスクリーニング

K. marxianus DMB1 株から抽出したゲノム DNA を DNA 断片化装置を用いてランダムに切断後、3~5 kbp 以上の DNA 断片を分画した。分画した DNA の末端を平滑化してベクター (pPGK) に挿入し、ショットガン (プラスミド) ライブラリーを作製した。これを *S. cerevisiae* BY4742 株に形質転換し、SD 寒天培地において 42°C で培養し、数日後に生育可能な株として 3 クローン取得した。

(2) ストレス耐性の評価

高温などのストレス耐性試験は、スポットアッセイにより行った。酵母細胞菌体を滅菌水で懸濁し、1 スポットあたり 1×10^6 cells から 3.2×10^2 cells になるように順次希釈して SD 寒天培地にスポットした。その後、30°C または 41°C で 2~3 日間培養した。また、高温ストレス耐性試験は、好氣的増殖に伴う濁度 (OD₆₀₀) 測定や嫌氣的なエタノール発酵試験でも実施した。発酵培養液中の糖やエタノールは HPLC で定量測定した。

3. 結果と考察

(1) 高温耐性付与遺伝子 *KTPI* の単離・同定

スクリーニングで得られたクローンからプラスミドを単離し、DNA シークエンス解析した結果、2 つのクローンは DMB1 株のゲノム領域を保持していなかったが、残り 1 つのクローンには DMB1 株由来の 2 種類の遺伝子 (機能未知遺伝子及び *KmDOM34*) が含まれていることを確認した (図 1A)。これらの遺伝子をそれぞれ単離し、*S. cerevisiae* BY4742 株の形質転換を行ったところ、機能未知遺伝子の形質転換体は高温 (41°C) の条件下で耐性を示した。そのため、この機能未知遺伝子を *KTPI* (*K*luyveromyces *T*hermotolerant *P*rotein 1) と命名し、この遺伝子は高温ストレス耐性に寄与する遺伝子であることが判明した (図 1B)。

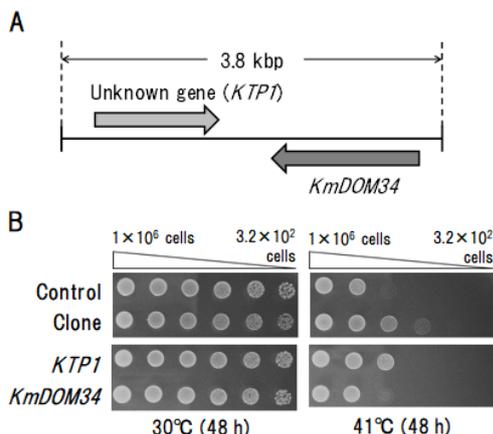


図 1. (A)高温耐性酵母株が保持していたゲノム領域、(B)30°C および 41°C で 2 日間培養後の生育能

KTPI の塩基配列より推定される Ktp1 タンパク質 (335 アミノ酸) のホモロジー検索により、Ktp1 は *K. marxianus* 以外の酵母では相同性がみられず、また特徴的なモチーフも存在していなかったことから、*K. marxianus* 特有のタンパク質であることが示唆された。

(2) 高温条件下での増殖効率とエタノール生産性

KTPI を用いた BY4742 株の形質転換体 (*KTPI* 過剰発現株) は、通常の培養温度である 30°C において、コントロール株と比べて、SD 液体培地における好氣的増殖能はあまり変化しなかった。一方、40°C の高温条件下では、*KTPI* 過剰発現株はコントロール株と比べ

て増殖速度が速くなり、最終到達 OD が 2 倍程度高くなった (図 2)。BY4742 株に加えて、他の *S. cerevisiae* 実験株や実用株を宿主として *KTPI* を過剰発現させる株も作製し、高温 (41~43°C) の条件下で SD 液体培地における好氣的増殖能を比較した結果、いずれの形質転換株も顕著に増殖が向上した。また、41°C での *KTPI* 過剰発現株とコントロール株の生存率を蛍光染色法で経時的に調べたところ、24 時間後の生存率がコントロール株は 70%程度に減少していたのに対し、*KTPI* 過剰発現株の生存率は 90%以上維持されていた。

さらに、これらの株を 41°C の高温条件下でグルコースからのエタノール発酵能を比較した結果、*KTPI* 過剰発現株はコントロール株と比べてグルコースからのエタノール生産性が顕著に向上した。

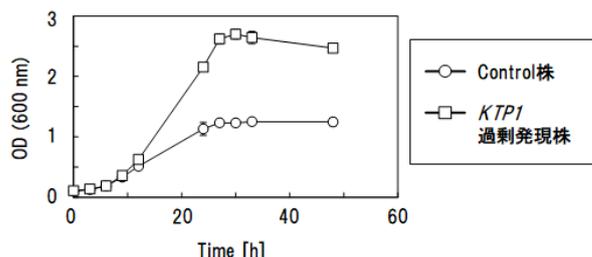


図 2. 高温条件下 (41°C) における増殖能

(3) 高温以外のストレスに対する効果

KTPI が高温以外の環境ストレスに対する耐性化にも重要か否かを検証するため、過酸化水素、酸、塩、フルフラールなどの阻害物質をそれぞれ含む SD 寒天培地上でスポットアッセイを行った。その結果、これらストレス条件下で *KTPI* 過剰発現株はコントロール株と比べて生育が顕著に向上したことから、*KTPI* はマルチストレス耐性に関与することが強く示唆された。

4. 今後の展望

本研究で単離した *KTPI* を *S. cerevisiae* において過剰発現することにより、高温耐性のみならず様々な環境ストレスに対する耐性を獲得させることができるため、次世代型の発酵技術の構築や各種有用物質の製造工程への適用など、実用化が期待できる技術シーズと考えている。

一方で、*KTPI* の機能解析はまだまだこれからである。現在、*K. marxianus* において *KTPI* 破壊株の構築を進めるとともに、*KTPI* の遺伝子発現解析などについて検討中である。これらの解析により、*KTPI* が関与するストレス耐性機構を解明することにより、その知見を応用することで、さらなる物質生産革命に繋げたい。

参考文献

- [1] 特許 6474063
- [2] Goshima, T., et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(7), 1505-1510 (2013)

生分解性ポリアミド iNylon の分解挙動

○米村まいな¹, 加藤太一郎^{1*}, 横山理沙¹, 横川由起子¹, 谷池俊明²,

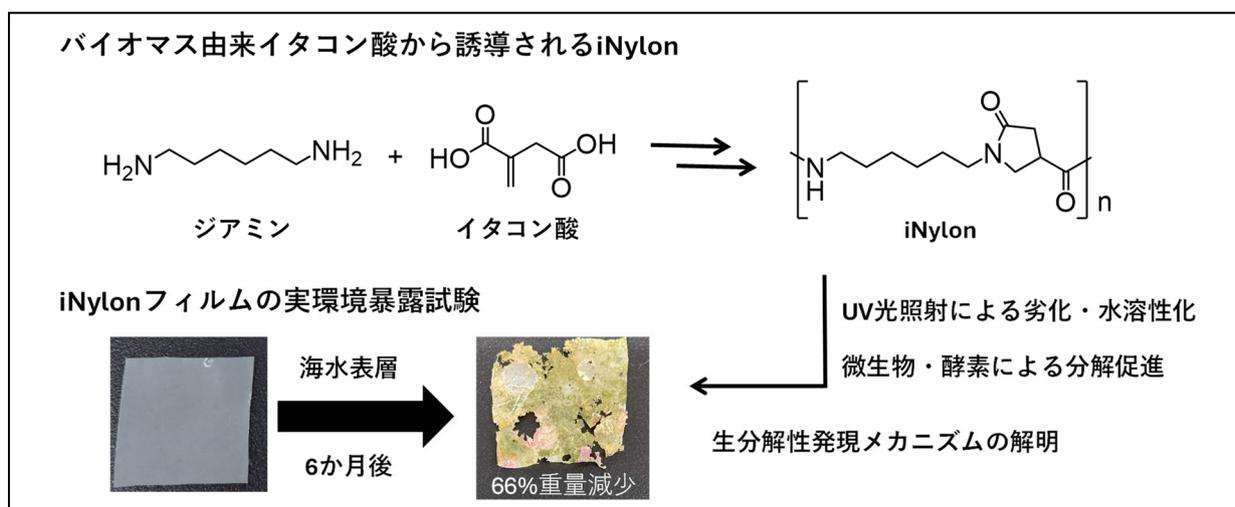
Yingjun An³, 高原淳³, 小島正幸⁴, 嶋中博之⁴, 金子達雄⁵, 根来誠司⁶

¹鹿児島大学大学院理工学研究科, ²北陸先端科学技術大学院大学, ³九州大学ネガティブエミッションテクノロジー研究センター, ⁴大日精化工業株式会社, ⁵江南大学, ⁶兵庫県立大学大学院工学研究科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-35 鹿児島大学大学院理工学研究科理学専攻

Tel: 099-285-8112 Fax: 099-285-8112

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



要 旨

プラスチックゴミ問題を解決するためには、①リサイクル手法の開発と②海洋生分解性素材の開発の2方面からの技術開発が必要である。本発表では生分解能力を有するナイロン誘導体 iNylon(アイニーロン)に関する研究を紹介する。iNylonは構造中にピロリドン環構造を有し、UV 光照射によって水溶性化するという特異な化学的性質を示すことから、生分解特性や易リサイクル特性を示す次世代型ナイロンとしての利用が期待されている。ただしその光分解メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。本研究では UV 光照射と *in vitro* 酵素分解試験を通して、その分解メカニズムを解明した。また実環境下にて速やかに生分解を受ける iNylon 誘導体の開発にも成功した。

プラスチックゴミ問題解決のために

プラスチックは幅広い用途に活用され、人類、社会に必要不可欠な材料の一つである。一方、近年ではそ

の製造・廃棄過程における二酸化炭素排出と、海洋におけるマイクロプラスチック生成・蓄積が大きな社会問題となっている。これらの問題を解決するためには大きく2つの技術開発の進展が必要だと著者らは考えている。つまり、使用済みプラスチックを再生・再利用(リサイクル)する技術の開発と、生分解性機能を示す新素材の開発である。

例えば二酸化炭素排出に目を向けてみると、プラスチック製造時の化石燃料のナフサ分解や使用後に廃棄されたプラスチックの焼却によって年間およそ1,600万トンの二酸化炭素の排出が試算されている。政府が掲げる2050年のカーボンネットゼロの実現に向けて、二酸化炭素排出量の削減は喫緊の課題であり、化石資源依存で消費型のリニアエコノミーから、再資源化を進める循環型のサーキュラーエコノミーへと社会構造を大きく転換させる必要性に直面している。このような背景から、使用済みプラスチックをリサイクルする技術の開発が必要不可欠である。

一方、回収・再利用することが極めて困難な用途で利用されるプラスチック素材も存在する。例えば漁業分野で

利用される漁網やブイ、ロープであったり、農業分野での被覆肥料や農業用マルチシートであったりが挙げられる。これらは使用用途で意図せず環境中に放出されてしまうことも多く、海洋プラスチックゴミ問題の主要因の一つとなっている。そこでこのような用途で利用されるプラスチックには、使用中は十分な耐久性を示しながら、使用後は必要に応じて自然環境中で微生物等の力で分解される、いわゆる生分解性機能を付与することが求められつつある。現在までにポリエステル系プラスチックについては有望な候補素材が開発されているが、ポリアミド系プラスチック(ナイロン)に対する開発はほとんど進んでいなかった。

ナイロンをリサイクルする手法の開発

プラスチックの中でもナイロンは軽量でありながら強靱性、耐熱性を示す等優れた特性を持つため、繊維、自動車部品、漁網など様々な用途にて利用されている。ナイロンの世界年間生産量は890万トン超(2020年)あり、今後も需要の拡大が見込まれている一方、マテリアルリサイクルの困難性や、実用的なケミカルリサイクル技術の未確立によって、使用後は大半が埋立・焼却処分されている。著者らの研究Gでは、1970年代から世界に先駆けてナイロンを資化する微生物・酵素の研究を進めており、独自のナイロン加水分解酵素群(Nyl series)を利用したリサイクル手法の開発を進めてきた。その結果、化学的前処理による水溶性オリゴマー化と、Nyl seriesによる酵素的加水分解処理を組み合わせることによって、ナイロン-6 やナイロン-66 といった汎用ナイロンをほぼ 100%の効率にてモノマー成分にまで戻すことができるバイオロジカルモノマーリサイクル(BMR)技術を確立するに至っている¹⁾。

生分解性を示すナイロンの開発

ナイロンが、漁網やブイなど漁業分野では欠かせないプラスチック素材であることは先に述べたが、天然には存在しない分子構造を有することから生分解を受けず、マイクロプラスチック化して海洋ゴミとして環境中に蓄積してしまっている。マイクロプラスチック化したナイロンがサンゴ等の海洋生物に蓄積することも近年報告されており、生体への影響も懸念されている²⁾。つい最近、ナイロン-6 とナイロン-66 のコポリマーからなる釣り糸が海洋生分解性を示す可能性が指摘されたが³⁾、ほとんどのナイロン製品は環境に負荷をかけていることに間違いはない。

著者らの研究Gでは、上記問題を解決する生分解性ナイロンの開発を進めており、ジアミンとバイオマス由来のイタコン酸から誘導されるピロリドン環を有する iNylon に着目している(Graphical Abstract の図参

照)。iNylon は本発表の共著者でもある江南大学の金子達雄教授らを中心に開発されたナイロン誘導体であり、UV 光照射によって水溶性化することが分かっている(論文投稿中)。

本研究では、UV 光照射によって産生する代謝物を詳細に解析することで iNylon の光分解メカニズムの解明を試みた。アミド結合やピロリドン環を持つ化合物の光劣化に関する過去の報告例を基に、UV 光によって iNylon ユニット近傍のアミド性アミン隣接炭素原子が酸化反応を受ける経路を予想し、その妥当性を確かめるために UV 光照射によって生成する代謝物を LC-MS 等を用いて詳細に分析した。検討の結果、予想通りアミド性アミン隣接炭素原子が酸化されている証拠を見出し、この光酸化を引き金とした主鎖切断や開環反応によって水溶性化することを明確にできた。また本経路に立脚した酸化剤処理を施した場合にも、iNylon は汎用ナイロンよりも容易にモノマーにまで分解されることを見出した。

さらに、実環境下にて速やかな劣化を受ける分子組成の iNylon 誘導体を見出すことにも成功した(Graphical Abstract の図参照)。実験は鹿児島海域にて実施し、およそ 6 か月間の実環境暴露によって 66%の重量減少が確認された。土壌中および淡水中にて行った同様の環境暴露試験では 10%程度の重量減少にとどまったことから、海洋中にて優先して生分解を受けることも分かった。ナイロン誘導体を実環境下にて速やかに劣化・分解を受けることを目視でも確認できた初めての例である。ナイロンは生分解を受けないというこれまでの常識を覆す結果であり、今回の検討によって iNylon が海洋プラスチックゴミ問題を解決する次世代の生分解性ナイロンとして有望な素材の一つとなり得ることを確かなものにできたと考えている。

技術開発成果の社会実装に向けて

著者らはこれまでに見出したナイロンの BMR 技術や iNylon 素材を早期に社会実装し、社会的価値・経済的価値を生み出させたいと考えています。これら研究成果を利用してみたい産官学関係者の皆様からの問い合わせをお待ちしています。社会実装に向けて是非一緒に技術開発を進めませんか？

文 献

- 1) Shiraishi Y. *et al.*, *PLoS One*, **20**, e0318641 (2025).
- 2) Jandang S. *et al.*, *Sci. Total Environ.*, **954**, 176210 (2024).
- 3) Ando S *et al.*, *ChemRxiv.*, (2025.06.12 公開), doi:10.26434/chemrxiv-2025-cbmb0

液体描画技術による細胞シート上への バイオフィルムマニピュレーション

宮内 麻衣^{1*}・谷口 英嵩¹・井之上 一平² 田中 祐圭¹

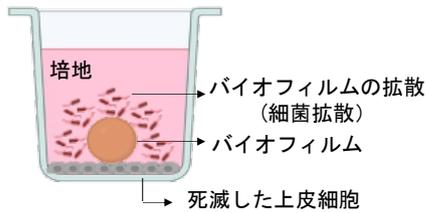
¹東京科学大学物質理工学院, ²サントリーグローバルイノベーションセンター

〒226-8503 横浜市緑区長津田町 4259 東京科学大学物質理工学院

Tel: 045-924-5567 Fax: 045-924-5567

E-mail: tanaka.m@mct.isct.ac.jp

共培養モデル作成の課題

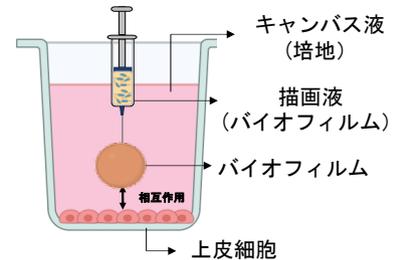


- ・バイオフィルムの一部や内包された細菌が拡散
- ・全ての上皮細胞の死滅を引き起こす

本研究



液体描画装置



- ・液体描画技術によって、液滴の拡散を制御できる
- ・この技術を活用し、バイオフィルムの拡散を抑える

要旨

腸内などに形成されるバイオフィルム感染症の治療法を探索するには、生体環境を模倣したバイオフィルムとヒト細胞の共培養モデルの構築が不可欠である。しかし、従来の手法ではバイオフィルムと共培養する過程で、上皮細胞全体が死滅してしまうという課題があった。そこで本研究では、液体描画装置によりバイオフィルム懸濁液をヒト細胞培養シート上の任意の位置に正確に配置する手法を確立した。これにより、上皮細胞全体を損なうことなく、特定部位に限ってバイオフィルムを形成・培養することが可能となり、生きた腸上皮細胞との共培養モデルの構築に成功した。本技術により、バイオフィルム由来の生理活性分子が、健全な腸上皮細胞に局所的に及ぼす影響を詳細に解析できると考えられる。これは、腸内微生物叢を標的とした次世代型感染症治療法や健康維持技術の開発に向けた新たな研究基盤の構築につながると期待される。

1. はじめに

近年、米国で毎年 50 万人以上がバイオフィルム感染症で死亡しているとされ、深刻な問題となっている。バイオフィルムは、細菌が分泌する細胞外マトリクスにより形成される三次元構造を持ち、内包された細菌

やその生成物がヒト細胞に毒性を示すことで感染症を引き起こす。また、バイオフィルムはこの細胞外マトリクスが障壁となることで、薬剤に対して高い耐性を示すため、新たな治療法や適切な抗生物質投与条件を定めるプラットフォームの開発が強く求められている。これを実現するには、生体内環境に近いバイオフィルムとヒト細胞の共培養モデルの構築が不可欠である。従来の技術では、ヒト細胞への過剰な毒性発現を抑制するために、抗生物質などの外的制御因子を導入した共培養モデルが用いられてきたが¹⁾、生理的妥当性や汎用性に課題があった。

近年、溶液の密度や粘性を制御することで、液中に他の液滴を正確に配置・維持できる液体描画技術が開発されている²⁾。そこで本研究では、この液体描画技術を活用し、培養液やバイオフィルム懸濁液の粘性・密度を制御することで、より生体環境に近いバイオフィルム-ヒト細胞共培養モデルの構築を目指した。

2. 方法・結果

(1) 液中の任意の座標に微生物懸濁液を安定的に配置するための条件検討

2 種の増粘剤を異なる濃度で添加した溶液中に、微生物をドット形状に配置して一晚培養し、初期の配置

した位置からの移動距離を画像解析で評価した。

その結果、低濃度の増粘剤を用いた条件では、微生物懸濁液が沈降した。一方で、適正濃度では微生物が安定してその場にとどまり、微生物を安定的に配置可能な濃度条件であることが示された(図1)。



図1. 増粘剤濃度による液滴位置変化(12時間後)

(2) 微生物懸濁液による三次元構造デザイン

ダイヤモンド状の三次元構造を液体描画技術で描画した後に、上方向及び横方向から撮像し、構造の安定性や微生物の増殖を評価した。

その結果、一晚経過後もダイヤモンド構造は安定に保持されていた(図2)。また、吐出流量を維持してノズルの移動速度を遅くすることで、吐出量の増加により線の太さが増し、輪郭の鮮明な構造が形成された。また当該条件での微生物の生育も確認された。

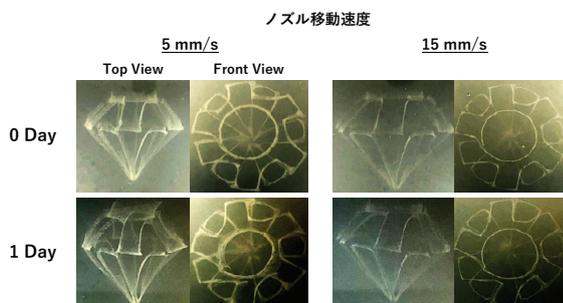


図2. 液中描画によるダイヤモンド構造の保持とノズル速度による視認性の変化

(3) バイオフィルムの配置

1. 6.7%グルコース添加LB培地に緑膿菌懸濁液を0.1%接種し、25℃で4日間静置培養してバイオフィルムを形成した。このバイオフィルムをシリンジに充填し、(1)で最適化した溶液中に配置して、移動距離を画像解析で評価した。

一晚経過後も(2)での結果と同様に、バイオフィルムは移動せずその場にとどまり、液体中にバイオフィルムを任意の位置に配置・保持することに世界で初めて成功した(図3)。

(4) ヒト細胞上のバイオフィルム配置

Galcein-AM と SYTOX Blue で染色したヒト皮膚線維

芽細胞上にバイオフィルムを配置し、ヒト細胞の生細胞および死細胞の状態を評価した。

配置直後は、多くのヒト細胞の形が紡錘形であったが、4時間後には、バイオフィルムを配置した領域においてのみ、丸みを帯びた形の細胞が多く観察されバイオフィルムによる影響を部位特異的に受けていることが示唆された(図3)。

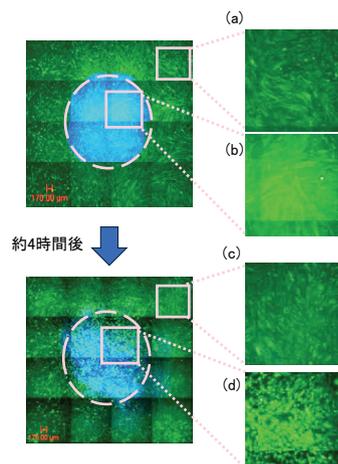


図3. ヒト細胞上へのバイオフィルム空間配置によるヒト細胞の形態変化

- (a) バイオフィルム非配置領域 (0時間)
- (b) バイオフィルム配置領域 (0時間)
- (c) バイオフィルム非配置領域 (4時間)
- (d) バイオフィルム配置領域 (4時間)

3. 考察

バイオフィルムを配置した領域の直下に存在するヒト細胞の形態変化が確認された。これは、バイオフィルムに内包された緑膿菌や細胞外マトリックス成分が細胞に傷害を与えている可能性を示している。一方で、周辺の細胞には影響が認められなかったことから、ヒト細胞上の任意の位置でバイオフィルムの影響を評価できる可能性が示唆された。

4. 今後の展望

本研究では、液体描画技術を用いて、ヒト皮膚線維芽細胞シート上へ緑膿菌バイオフィルムを配置し、細胞の応答を確認することができた。この共培養モデルは、抗生物質添加なしに周辺細胞の状態を維持しつつ、バイオフィルム形成阻害活性を評価する *in vitro* モデルとして有用であり、バイオフィルム感染症に対する新たな治療法の開発に貢献する可能性がある。

5. 参考文献

- 1) Horstmann, J.C., *et al.*: *ACS infect. Dis.*, 8, 137-149. (2022)
- 2) Inoue, I., *et al.*: *Journal of Food Engineering.*, 357, 111555. (2023)

イソフラボンに誘引されるダイズ根圏細菌叢の系統・機能解析

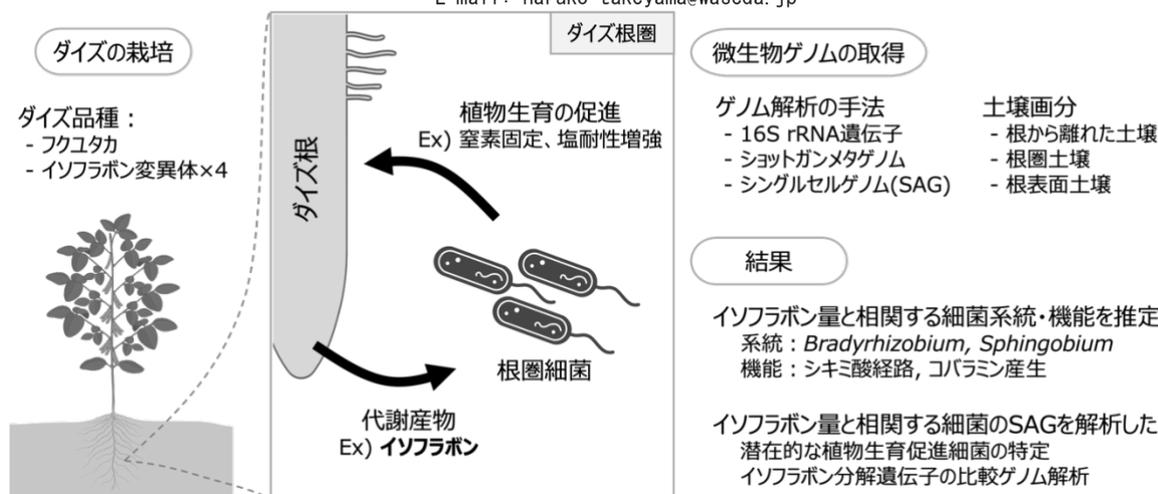
佐久間 紘大¹・木伏 真子¹・西川 洋平^{2,3}・細川 正人^{1,2,4}・

穴井 豊昭⁵・杉山 暁史⁶・竹山 春子^{1,2,4*}

¹早稲田大学先進理工学研究科, ²早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構, ³産総研・バイオものづくり研究センター, ⁴早稲田大学先進生命動態研究所, ⁵九州大学大学院農学研究院, ⁶京都大学生存圏研究所
〒162-0041 東京都新宿区鶴巻町 513 120-5 号館 115 室 早稲田大学先進理工学研究科

Tel: 03-5272-1289

E-mail: haruko-takeyama@waseda.jp



植物は代謝産物を土壤中に放出することで、植物の生育を促す有用細菌を含む根圏細菌叢を形成する。それら有用細菌を農業環境に応用し持続的な効果を得るためには、植物代謝産物と土壌細菌との関係性を理解する必要がある。本研究では、ダイズイソフラボンとダイズ根圏細菌の関係性の解明を目指し、ダイズ根圏細菌のゲノム解析を行った。機械学習等を用いた解析の結果、イソフラボン量に伴って存在量に変化する細菌の系統・機能を特定した。また、イソフラボン分解遺伝子の株ごとの保有パターンの違いを明らかにした。これらの知見は、土壌定着性の高い微生物資材の確立に繋がる。

1. はじめに

植物は代謝産物を根から土壤中に放出し、土壌細菌を誘引・忌避することで根圏細菌叢を形成する。根圏細菌の中には植物生育促進根圏細菌 (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) が含まれており¹⁾、植物の生育補助や病害抑制の観点から、持続可能な農業に向けた微生物資材への応用が期待されている。一方で、これらの資材は土壌環境への定着の低さが課題である。そこで、植物代謝産物と土壌細菌の関係に関する知見を深め、土壌環境への定着性の高い微生物を選抜することが求められる。

本研究では、実環境下において、ダイズの主要代謝産物であるイソフラボンと根圏細菌の関係性を解析した。イ

ソフラボン合成過程に遺伝子変異を持つ変異体ダイズを栽培し、根圏における細菌叢とイソフラボン量を測定した。土壌細菌叢のゲノム解析より、イソフラボンと関連する細菌の系統や機能を調査した。また、根圏細菌のシングルセルゲノム (Single Amplified Genome, SAG) を取得し、イソフラボン関連細菌におけるイソフラボン分解遺伝子の有無や PGPR の株ごとの保有遺伝子の違いを調査した。

2. 材料・方法

(1) ダイズの栽培と土壌画分の取得

2023年に佐賀大学圃場にて、フクユタカと、イソフラボン合成過程に遺伝子変異を持つ4つの変異体 (K01, K19, K29, qMGly) の計5種のダイズを栽培した。5つの成長段階 (三葉期、五葉期、七葉期、開花期、登熟

期)においてダイズ植物体および根から離れた土壌を採取した。根に緩く付着した土壌を根圏土壌、根に密接に付着した土壌を根表面土壌として取得した。

(2) 土壌細菌の配列情報の取得

各土壌画分から微生物 DNA を抽出し、16S rRNA 配列とショットガンメタゲノム配列を取得した。

マイクロ流体デバイスを用いた液滴作成技術により根表面土壌および根圏土壌から細菌を一細胞レベルで液滴内に分離し、SAG を取得した²⁾。

(3) イソフラボン含有量の測定

5 つの成長段階におけるダイズ根内のイソフラボン含有量を、液体クロマトグラフタンデム質量分析計で測定した。また、三葉期における根圏土壌のイソフラボン含有量を、HPLC を用いて解析した。

3. 結果・考察

(1) 根内部と根圏土壌におけるイソフラボン含有量

根内部および根圏土壌におけるイソフラボンの総量や組成は、ダイズ品種間で異なった。また、根内部のイソフラボンの総量はダイズの成長と共に増加した。

(2) イソフラボンによるダイズ細菌叢の変動

登熟期における根表面土壌の細菌叢組成は、ダイズ品種間で異なった。これより、イソフラボンがダイズの細菌叢を変化させることが示された (図 1)。

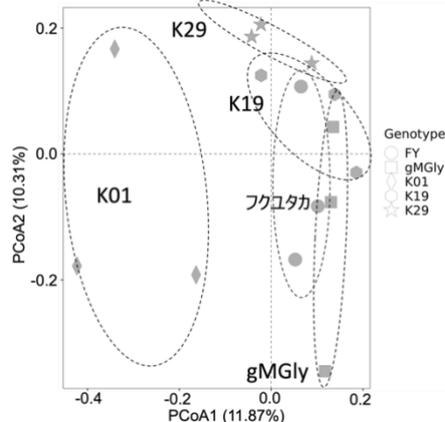


図 1. 細菌叢組成の類似度 (登熟期・根表面土壌)

(3) イソフラボンと関連する細菌系統・機能

根内部のイソフラボン含有量の増加に伴い、根表面土壌における *Bradyrhizobium* 属や *Novosphingobium* 属の細菌が増加した。前者は根粒を形成して窒素固定を行うダイズ共生細菌であり、後者は植物体の塩ストレス耐性強化等の効果を示す PGPR である。

イソフラボン含有量に対して、機能グループ (KEGG Orthology) のメタゲノム中の相対存在量を Random Forest 回帰することで、回帰に対する寄与率が高い機能遺伝子を特定した。その結果、シキミ酸経路やコバラミン産生に関わる機能遺伝子とイソフラボンとの関

連性が示唆された。シキミ酸はイソフラボンの前駆体であるフェニルアラニンの産生に関わり、コバラミンは窒素固定に関わる分子である。このように、ダイズのイソフラボン産生の補助やダイズ-根圏細菌の相互作用の補助に関わる機能が、イソフラボンと関連する細菌の機能として検出された。

(4) SAG を用いたイソフラボン関連細菌の解析

SAG からイソフラボン分解遺伝子群³⁾を検出した結果、*Sphingobium* 属を含む 8 属 40 個の細菌を潜在的なイソフラボン代謝細菌として特定した。*Sphingobium* 属はトマトの代謝産物に誘引される細菌であるが、ダイズイソフラボンとの関連は未報告であった。

また、イソフラボンをダイズとの共生開始シグナルとして用いる *Bradyrhizobium* 属細菌では、イソフラボン分解遺伝子群の保有パターンが株ごとに異なった (図 2)。これらの細菌はイソフラボン含有量に相関して存在量が増加することから、分解遺伝子群の保有パターンの多様性は、株ごとのダイズ根圏環境への定着性が異なる可能性を示唆している。

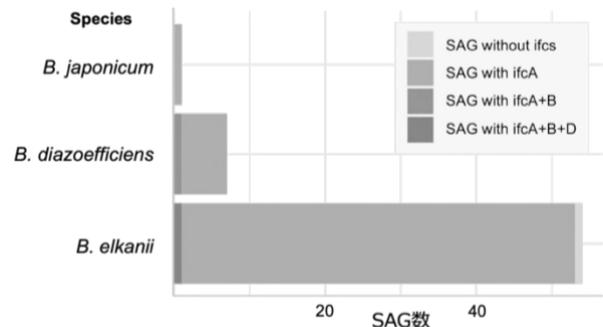


図 2. *Bradyrhizobium* 属 SAG での分解遺伝子の分布

4. 今後の展望

本研究では、ダイズ根圏細菌のゲノム解析により、イソフラボンとの関連性や植物への有益性を推定した。今後は、特定した細菌のイソフラボンへの反応やダイズの生育に与える影響を、実験等により調査する予定である。

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 (JPJ009237、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 の一部は BioRender.com で作成した。

文献

- 1) Kifushi, M. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **137**, 429–436 (2024)
- 2) Nishikawa, Y. et al., *ISME Commun.*, **2**, 1 (2022)
- 3) Aoki, N. et al., *ISME Commun.*, **4**, 1 (2024)

膨潤性と細胞接着性を併せ持つマイクロファイバーによる動物細胞の効率的かつ高密度な固定化とエクソソーム生産への応用

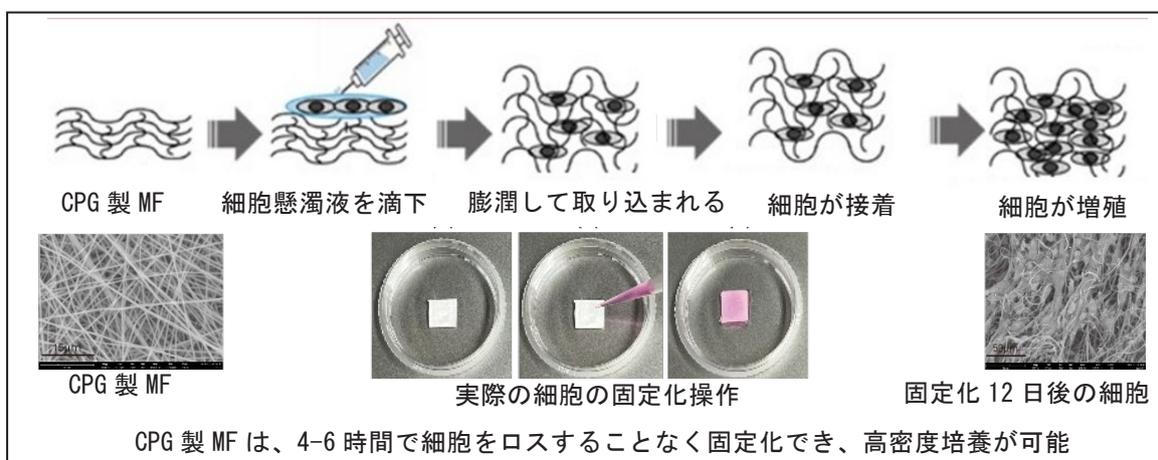
塩見 尚史*・張 朋飛・中塚 修志・熊谷 和夫・松山 秀人

神戸大学先端膜工学研究センター

〒657-8501 神戸市灘区六戸台町 1-1 先端膜工学研究拠点

Tel: 078-803-6610

E-mail: n-shiomi@people.kobe-u.ac.jp



要旨

酢酸セルロース、ポリケトン、ゼラチンの混合物を電界紡糸することで、細胞懸濁液の吸収性と細胞結合性の両者に優れた新しいマイクロファイバーを作製した。このマイクロファイバーに血管内皮細胞を固定化すると、供給された細胞は損失なく迅速に固定化されて増殖し、動物細胞の高密度の細胞固定化とエクソソームの迅速な連続生産が可能だった。

はじめに

エクソソームは、細胞から分泌される小胞体で、細胞間のコミュニケーションを担っている。近年、エクソソームには抗炎症作用、アトピー性皮膚炎への治療効果、アンチエイジング効果、心疾患や神経系疾患の改善などの非常に多くの効果があることがわかってきた。エクソソームは、(1) 倫理的な障壁が低い、(2) 他家細胞でも免疫原性が低い、(3) 滅菌や保存が容易などの利点があり、細胞を用いた再生医療に代わる治療法として現在期待されている。一方、エクソソームの生

産技術はまだ十分ではなく、培地中に分泌されるエクソソームの量は少ないため、高密度の細胞を用いた高濃度生産が必要である。マイクロファイバー (MF) は、表面積と空隙が広いいため、細胞固定化担体として期待できるが、MF 内部に細胞を固定化することは難しく、高密度培養の固定化担体としてほとんど用いられていない。そこで、本研究では、動物細胞の高密度培養に最適な MF を開発し、それをエクソソームの生産に応用することを目的に研究を行なった¹⁻²⁾

方法

疎水製高分子の酢酸セルロース (CA)、ポリケトン (PK)、ポリスチレン (PS)、ポリ乳酸 (PLA)、エチレンービニルアルコール共重合体 (EVOH)、エチレンー酢酸ビニル共重合体 (EVA) を溶媒に溶かし、エレクトロスピンニング装置により MF を作製し、得られた MF の親水性と膨潤性を調べた。さらに、10%FBS を含有する DMEM を用いて、4mg の MF 断片にマウス血管内皮細胞 TKD2 (1×10^5 個) を播種し、細胞の固定化実験を行った。固定化

された細胞数は、WST-8 キットにより測定した。また、CA, PK, ゼラチン(GEL)の混合物からなるMF (CPG 製 MF) を作製し、TKD2 細胞の固定化量とエクソソームの生産量を調べた。エクソソームの生産には、FBS のかわりに Exo-FBS (Exosome-Depleted FBS) を用い、培地当たりのエクソソームの総粒子数はナノサイトにより算出した。

結果および考察

1. 疎水性高分子の MF への細胞の取り込みと固定化

疎水性の合成高分子の MF シートの親水性と水分保持能を調べた。その結果、6 種類の MF の中で、EVOH、CA、PK は MF 内に水分を取り込んだ。また、CA、PK、EVOH には膨潤性と水分保持能があり、特に EVOH と CA が水分保持に優れていた。

次に、これら MF に TKD2 マウス血管内皮細胞の懸濁液を取り込ませた。その結果、EVOH、PK、CA のほとんどの細胞は MF に取り込まれた (図 1 a)。この MF を 96 ウェルのプレートで培地交換しながら培養した。取り込まれた細胞の大半は一度 MF から漏れ出してしまい、一部の MF に取り込まれた細胞により増殖した (図 1 b)。

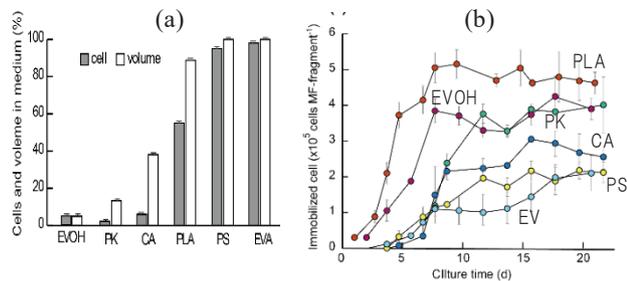
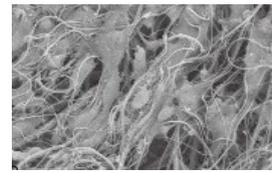
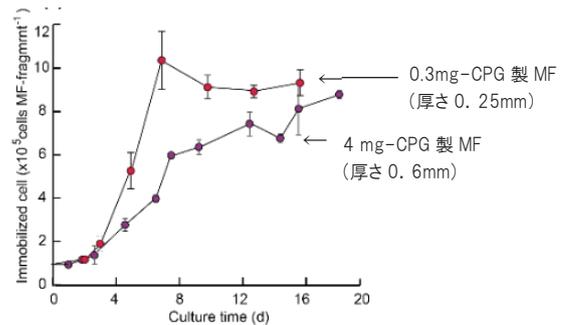


図 1 MF への細胞懸濁液の取り込みと増殖。a) MF に細胞懸濁液を加えたときに取り込まれなかった細胞数と培地量の割合 (%), b) MF に取り込まれた細胞の増殖 (1x10⁵ 個供給; 4mg の MF 当たりの細胞数)

2. 膨潤性と細胞接着性を有する新規ナノファイバーによる細胞の固定化とエクソソームの生産

ゼラチン(GEL)、PK、CA をブレンドした新規の CPG 製 MF を作製した。CA と PK は膨潤性と親水性、ゼラチンは強い細胞接着性の役割をしている。この CPG 製 MF 断片 (4mg) を用いて、TKD2 細胞の固定化を行なった。細胞懸濁液を滴下して吸収させ、4 時間放置して細胞を接着し、さらに培地を追加して 16 時間放置することで細胞をより強く固定化した。その後、この MF を 48 ウェルのプレートで培養した (図 2) その結果、播種した細胞はほとんど MF 断片から抜け落ちることなく、ナノファイバー内部に固定化されて増殖した。また、膜厚が薄い MF 断片 (0.3mg) を用いて同様の実験を行

なった結果、10 日後の固定化量は 3.3 × 10⁹ 個/g (6 × 10⁷ 個/mL-MF) の高密度固定化が可能であった (図 2)。



4 mg-CPG 製 MF 培養 12 日め

図 2 CPG 製 MF に固定化した時の細胞数と SEM

さらに固定化してから 20 日後、MF に固定化した細胞を用いてエクソソームの連続生産を行なった。MF 断片当たりの ExoFBS-DMEM 培地量と培地交換時間を変えながら、約 1 か月連続回分培養を行った (図 3)。その結果、培地当たりの MF 断片を増やすと、それに伴ってエクソソーム量も増え、最大で培地 1mL 当たり 7 × 10¹⁰ 個までエクソソーム量を高めることができた。

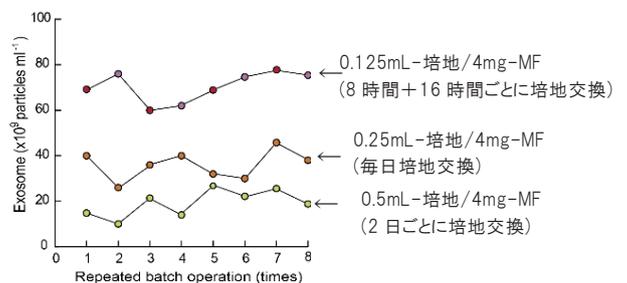


図 3 CPG 製 MF に固定化した時の固定化細胞によるエクソソームの生産。

結論

本研究で開発した CPG 製 MF は、短時間で細胞をロスすることなく固定化でき、高密度培養が可能であることから、エクソソームの生産だけでなく、細胞シートなど医療分野でのさまざまな応用が期待される。

文献

- 1) Shiomi N. *et al.* Biotech Let **47**, 40 (2025)
- 2) 塩見尚史他 特願 2025-004827 号

DO Jump 法—簡便な k_La 測定法の開発

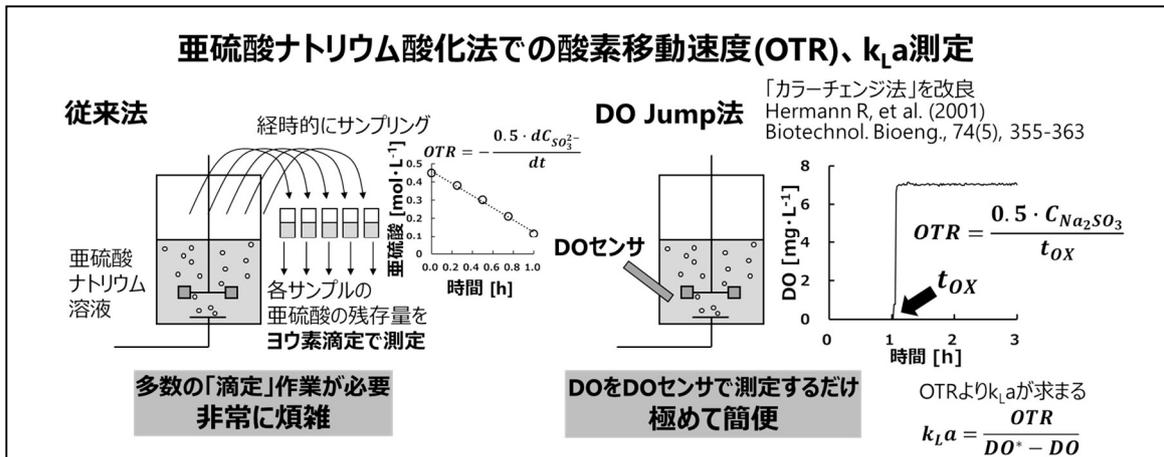
嘉悦 佳子・卯津羅 淳子・石井 伸佳*

長瀬産業株式会社

〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷 2-2-3

Tel: 078-992-3164 Fax: 078-992-3192

E-mail: nobuyoshi.ishii@nagase.co.jp



培養装置の酸素移動速度 (OTR) および k_La を測定する手法として、古くから「亜硫酸ナトリウム酸化法」が用いられているが、煩雑な操作(ヨウ素滴定)を要する難点がある。より簡便な手法として、亜硫酸の酸化に伴う pH 変化を pH 指示薬で捉える「カラーチェンジ法」があるが、pH の変化は条件によっては緩やかであり、必ずしも正確な測定ができない。そこで、カラーチェンジ法を改良して DO センサを用いる手法 (DO Jump 法) を開発し、その妥当性を確認した。

1. はじめに

酸素供給は好氣的培養における生産性を支配する最重要事項であるにも関わらず、未だにその測定や予測には課題がある。OTR および k_La の測定法の一つである「亜硫酸ナトリウム酸化法」は、幾つかの利点(大きな k_La を測定可能、フラスコのような通気・排気の無い装置でも測定可能など)があるにも関わらず、ヨウ素滴定の作業が煩雑で熟練を要するため、必ずしも日常的に用いられていない。

亜硫酸が酸化されて減少する速度は亜硫酸が消失するまでほぼ一定であり、初発で添加した亜硫酸が全て酸化されるのに要する時間を測定すれば、添加した亜硫酸濃度より OTR を求められる。この反応では硫酸が生成し、更に亜硫酸自体にバッファー効果があるため、亜硫酸が消失した時点で pH が大幅に低下する。Hermann ら¹⁾はこれに着目して「カラーチェンジ法」を開発した。この手法では、亜硫酸ナトリウム水溶液に pH 指示薬を添加したうえで酸素供給し、溶液を動画カ

メラにて経時的に撮影する。色の変化が記録された時点を亜硫酸の消失時間とする。サンプリング・滴定が不要であり、非常に簡便な方法と言える。なお、pH センサを使用可能な培養装置であればカメラ撮影も不要であり、更に実施が容易である。しかし、pH 変化は条件によっては緩やかで時間的な幅があり、亜硫酸の消失時間が必ずしも正確に同定できない場合がある。

亜硫酸が消失すると酸素が溶液にほぼ吸収されなくなり、溶存酸素濃度 (DO) が増大しはじめる。そこで、pH に代わって DO の変化を指標とすることで、亜硫酸の消失時間をより正確に同定できる可能性があると考え、DO に着目した OTR 測定法の開発を行った。

2. 材料と方法

2.1 亜硫酸ナトリウム水溶液

窒素ガスで脱気したイオン交換水に $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亜硫酸ナトリウム、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸銅 (II) 五水和物を溶解して調製した。

2.2 ジャーファーマンターでの測定

3L 容ジャーファーマンター (BMS-03NP3:ABLE) に 1.5L の亜硫酸ナトリウム水溶液を入れ、37°Cにて 1vvm で空気を通気した。攪拌速度は 300~900 rpm とした。経時的に採取したサンプルの亜硫酸濃度をヨウ素滴定法で測定し、OTR を算出した。また、排気ガス酸素濃度 ($C_{G,02}$) から OTR を求めた。更に、DO を経時的に測定し、DO が急激に上昇し始めるまでの時間より、カラーチェンジ法と同じ計算方法¹⁾で OTR を求めた(以降、本手法を「DO Jump 法」と呼ぶ)。

2.3 フラスコでの測定

500mL 容バツフル付き三角フラスコに 50mL の亜硫酸ナトリウム水溶液を入れ、37°Cにて 160rpm で回転振盪時の DO と $C_{G,02}$ を測定した。測定にはそれぞれ振盪培養リアルタイムモニタリングシステム (SFR vario LG1: PreSens)、非破壊・非接触酸素濃度計 (OXY-4 SMA: PreSens) を使用した。DO Jump 法で OTR を求めた。

3. 結果と考察

3.1 DO、pH の経時変化の比較

ジャーファーマンターで攪拌速度 900rpm にて試験時の DO、pH を図 1 に示す。pH の変化と比べて DO の変化は急激であり、DO に着目すれば、ほぼ一意に亜硫酸消失時点を同定できることが明らかとなった。

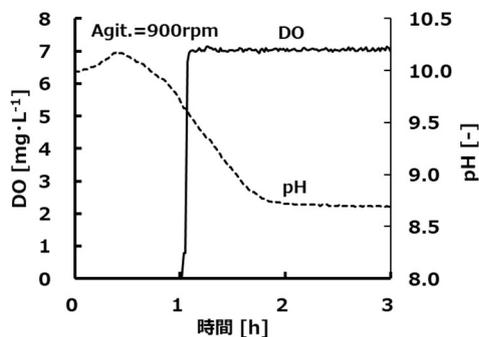


図 1. ジャーファーマンター試験中の DO、pH

3.2 DO Jump 法の妥当性検証

ジャーファーマンターにて、3 つの手法で求めた OTR の比較を図 2 に示す。いずれの値もよく一致し、DO Jump 法によってヨウ素滴定法や排気ガス分析法と同等の OTR 測定値を得られることが確認された。

3.3 各種条件での DO、 $C_{G,02}$

図 2 の試験実施時の DO、 $C_{G,02}$ 測定値 (いずれも DO Jump が生じるまでの平均値)、及びこれらと図 2 の OTR を用いて求めた k_{La} を表 1 に示す。亜硫酸ナトリウム酸化法では、得られた OTR より k_{La} を算出する際に $DO=0$ 、 $C_{G,02}$ =大気濃度 (21.0%) を仮定するのが慣例だが、これ

らの仮定は必ずしも妥当ではないと考えられた。

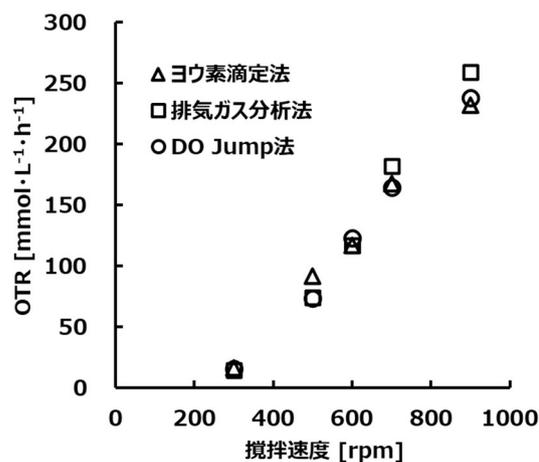


図 2. 滴定法、排気ガス分析法、DO Jump 法の比較

表 1. ジャーファーマンター試験時の DO、 $C_{G,02}$ 、 k_{La}

攪拌 [rpm]	300	500	600	700	900
DO [$mg \cdot L^{-1}$]	0.17	0.35	0.49	0.47	0.03
$C_{G,02}$ [%]	20.5	18.5	18.5	15.4	11.8
k_{La} [h^{-1}]	74	394	675	1105	1911

3.4 フラスコの OTR および k_{La}

フラスコについて DO Jump 法で測定した OTR は $76 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。また、OTR、DO、 $C_{G,02}$ の測定値より求めた k_{La} は 472 h^{-1} であった。表 1 の結果と比較すると、フラスコ振盪時の k_{La} を再現するジャーファーマンターの攪拌速度は 519 rpm と割り出された。

4. 今後の展望

亜硫酸ナトリウム酸化法で求めた k_{La} は実際の培養中の k_{La} よりかなり大きくなるということが知られる²⁾。主な原因は溶液の pH が高いためであり¹⁾、Hermann らはリン酸塩をバッファーとして添加した上で pH=8 としている¹⁾。今後は溶液条件を調整することで実際の培養時に近い k_{La} を得られるよう手法を改善したい。

文献

- Hermann R, et al: *Biotechnol Bioeng*, **74**:355-363, (2001)
- 長森英二, 他: *化学工学論文集*, **49**:142-148, (2023)

謝辞

「カラーチェンジ法」は名古屋工業大学・加藤禎人教授に試験方法の詳細をご教示頂いた。

本研究の成果は NEDO (国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構) の助成事業 (JPNP22021) の結果得られたものである。

3D シェーカーを利用したマルチスループット多臓器生体模倣

システムの開発ならびにその有用性検証

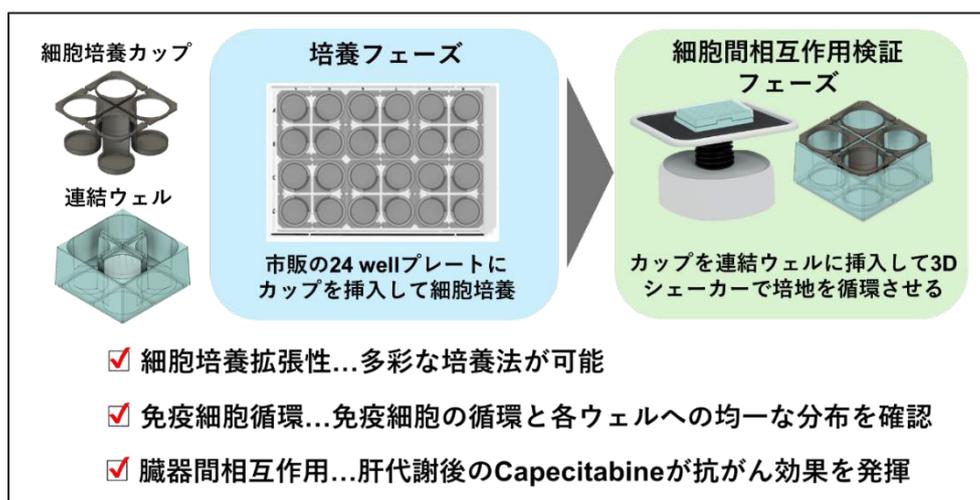
吉富 廉*・杉浦 慎治

産総研・細胞分子工学研究部門

〒305-0395 茨城県つくば市東 1-1-1

Tel: 050-3522-3360

E-mail: yoshitomi.ren@aist.go.jp



複数臓器生体模倣システム（複数臓器 MPS）は、従来の動物実験に代わり臓器間の相互作用を *in vitro* で再現する系である。しかしながら、現在の複数臓器 MPS の多くは、システムが複雑であることや同時処理できるサンプル数が限られるという課題を抱えている。本研究では、これらの問題を解決するため、3D シェーカーを用いた培地循環システムを用いた簡便な複数臓器 MPS デバイスを開発した。本デバイスは、細胞培養カップと連結ウェルという2つから成り、シンプルでありながら複数の実験を同時に実行できる高いスループット性を実現している。本デバイスは従来の2次元培養からスフェロイド培養まで幅広い培養手法に対応し、細胞培養インサートの使用も可能である。また、免疫細胞の循環や臓器間相互作用の詳細な検証が実現されたことから、ユーザーフレンドリーでありながら多様な実験条件に適応できるシステムとなっている。

1. はじめに

近年、倫理的観点からの懸念の高まりや、種間差に起因する実験結果の人体への外挿に限界があることから動物の使用を削減する方向へ国際的に進んでいる⁽¹⁾。こうした背景から、臓器間の相互作用を *in vitro* で再現する複数臓器生体模倣システム（複数臓器 MPS）が注目を集めている。しかしながら、従来の複数臓器 MPS は複雑な組み立てや特殊なポンプシステムなど

が必要であるため操作が困難であることや、ロースループットであるなど課題も多く存在する⁽²⁾。

本研究では、これらの課題を解決することを目的として、3D シェーカーの傾斜・回転運動を培地循環の駆動源とする簡便な複数臓器 MPS デバイスを開発し、その基本的な有用性検証を行った。

2. デバイスの概要

本研究で開発したデバイスは、4つの独立した細胞培養部を有する「細胞培養カップ」とカップを流路によって相互に接続する「連結ウェル」の2つで構成させる。デバイスの特徴は図1に示した。実験手順は、培養段階に応じて二つのフェーズに分けて実施される。細胞の独立培養を行う段階では、連結培養カップを市販の24ウェルプレートに挿入し、カップ上で各細胞種の培養を独立したウェルで実施する。この段階では、各細胞種が最適な条件下で培養される。続く臓器間相互作用の検証段階では、細胞が既に接着している細胞培養カップを連結ウェルに装着し、3Dシェーカーの制御された回転運動によって培地の効率的な循環を実現する。この循環メカニズムにより、生体内における臓器間相互作用の再現が可能となる。

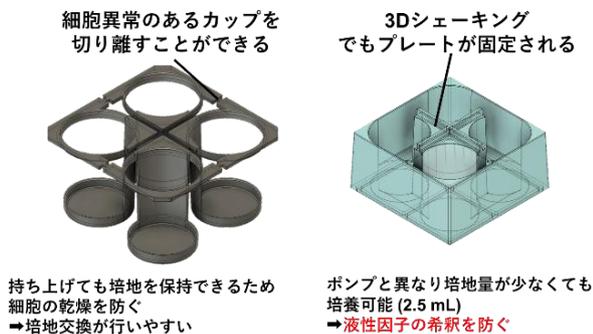


図1 デバイスの形状とその特徴

3. 方法

まず、培養方法の拡張性として、様々な培養形態への対応可能性を検証した。次に、免疫細胞の循環効率について、免疫細胞が各ウェル間で均一に循環し、適切な分布を示すかどうかを定量的に解析した。最後に臓器間相互作用について、肝細胞において代謝され抗がん作用を示すプロドラッグであるカペシタビンを用いた実験系を構築し、その有効性を検討した。この実験では、肝細胞による薬物代謝と代謝産物による他の細胞への作用を同時に観察した。

4. 結果と考察

開発したデバイスは、二次元培養およびスフェロイド培養を含む広範囲な培養手法に対応することが確認された。さらに、セルカルチャーインサートの収容も可能であり、より複雑な培養系の構築にも対応できることが明らかとなった。

免疫細胞の循環評価においては、各ウェルに対して均一な循環が達成されることが定量的に確認された。この結果は、免疫応答の評価や炎症反応の解析におい

て、本デバイスが有効であることを示している。

臓器間相互作用の評価では、単純に流路を連結しただけの静的な方法と比較して、3Dシェーカーによる動的な培地循環を行った場合には、有意により強い抗がん作用が観察された(図2)。この結果から、培地循環が薬物の代謝と作用において重要な役割を果たしていることを示唆された。

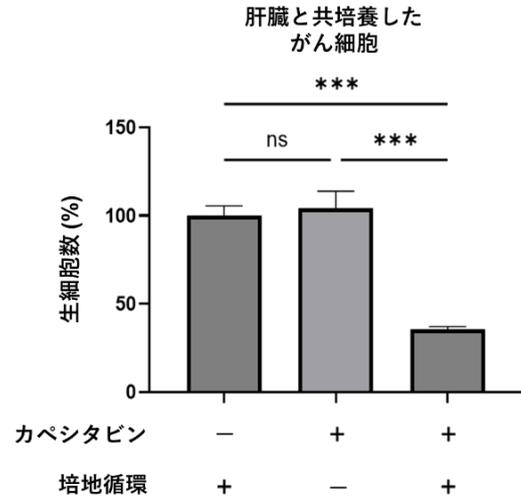


図2 プロドラッグを用いた臓器間相互作用の検証

5. 今後の展望

本研究で開発した多臓器生体模倣アッセイ系による複数の評価項目の同時測定というアプローチは、薬物開発や機能性食品研究における新たなスタンダードとなる高い可能性を有している。このシステムの導入により、従来手法では困難であった、より生体に近い条件での効果評価が簡便に実現可能となる。

さらに、本システムの活用は、創薬プロセスの効率化と成功率向上に大きく貢献することが期待される。特に、初期段階での薬物候補の絞り込みや、副作用の早期発見において、その価値は計り知れない。

今後の研究では、より多様な臓器の組み合わせや、疾患モデルの構築への応用展開が期待される。

文献

1. Wadman, M.: FDA no longer has to require animal testing for new drugs, *Science*, **379**, 127-128 (2023).
2. Samantasinghar, A. et al.: Revolutionizing Biomedical Research: Unveiling the Power of Microphysiological Systems with Advanced Assays, Integrated Sensor Technologies, and Real-Time Monitoring, *ACS Omega*, **10**, 9869-9889 (2025)

ホップ栽培における バイオ炭施用が及ぼす影響について

沓掛 登志子・今堀 莉子・杉村 哲・善本 裕之*

キリンホールディングス株式会社 R&D 本部 飲料未来研究所
〒236-8628 神奈川県横浜市鶴見区生麦 1-17-1 テクノビレッジセンター3F

Tel: 080-2379-6821 Fax: 045-521-6343

E-mail: hyoshimoto@kirin.co.jp



要旨

ホップはビールの原料の一つで、その栽培に伴う温室効果ガス (Green House Gas, 略して GHG) の排出が地球温暖化の原因の一つとされている。キリングループは、脱炭素社会の実現を目指し、環境再生型農業の可能性を探索しつつ、気候変動の緩和に取り組んでいる。この一環として、岩手県遠野市でホップ栽培時にバイオ炭を施用し、化学的・物理的・生物学的に影響を評価した。その結果、ホップ栽培時にバイオ炭施用することで、ホップの生育促進、毬花重量の増加、及びアーバスキュラー菌根菌の増加の傾向が見られた。ホップへのバイオ炭施用は GHG 排出量の削減に貢献するだけでなく、生育や根圏の土壌微生物の菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

1. はじめに

ビールの原材料の一つであるホップは、アサ科のつる性多年生植物であり、ビールの苦味や香りを生み出す。ホップを含む農作物から発生する温室効果ガス (GHG) は、地球温暖化の原因の一つであり、排出量削減が求められている。バイオ炭は生物資源を低酸素状態で加熱して作られた炭化物であり、100 年以上の炭素貯留能を持つため GHG 排出量削減に用いられる¹⁾。また、土壌改良や環境保全、植物と共生する有益な土壌微生物の住処となることも期待されている²⁾。本研究では、岩手県内の未利用バイオマス (林地残材) を活用し、バイオ炭施用がホップに及ぼす影響を化学的・物理的・生物学的に調査した。

2. 材料と方法

岩手県遠野市のホップ圃場にて、バイオ炭施用の有無が及ぼす影響について、2024 年 4 月から 9 月まで調査を行った。使用したバイオ炭は、岩手県内の未利用バイオマス (林地残材) から作製したバイオ炭を谷地林業から購入し、ホップ圃場に撒いた後、トラクターですき込んだ (図 1)。定植から 5 年以上経過したホップに対してバイオ炭施用し、芽生え期 (4 月)、栄養成長期 (6 月)、生殖成長期 (8 月) のホップの生育状況を観察すると共に、ホップの周辺土壌および根圏をサンプリングし、化学的・物理的分析を行った。また、生物学的には次世代シーケンサーを用いて、16S・ITS で細菌・真菌を解析し、土壌微生物の菌叢変化を調査した。



図 1. ホップ圃場へのバイオ炭施用作業

3. 結果と考察

ホップ栽培においてバイオ炭を施用することで、土壌の pH の上昇が見られた。また、カリの増加が確認された(図 2)。

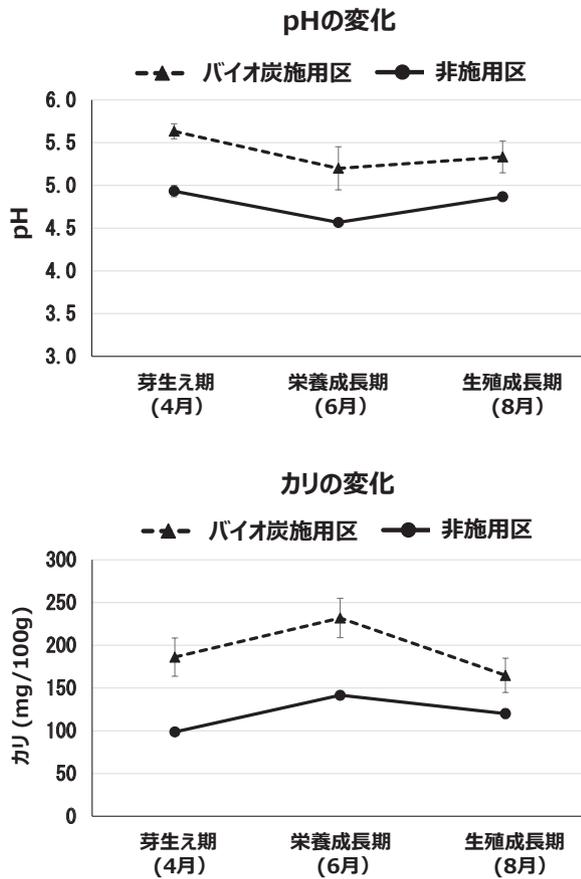


図 2. 土壌への化学的変化

バイオ炭施用区と非施用区でホップの生育を観察したところ、バイオ炭施用区の生育は、芽生え期(4月)から、非施用区と比較して促進されていた(図 3)。収穫後の穂花 100 個あたりの重量を測定したところ、バイオ炭施用区の方が約 2 割増加の傾向が見られた。

土壌微生物の菌叢解析結果から、16S を用いた細菌の菌叢の大きな変化は見られなかった。ITS を用いた真菌の菌叢解析結果においても、栄養成長期(6月)ま

では大きな変化が見られなかった。しかしながら、生育成長期(8月)になると、バイオ炭施用区の根の内部において、アーバスキュラー菌根菌と推定される菌叢が増加している可能性が示唆された(図 4)。

土壌微生物と植物との共生関係の重要性が示唆されており、アーバスキュラー菌根菌がバイオ炭で増殖し、ホップと共生することで、生育の促進や穂花重量の増加傾向に繋がった可能性も考えられる。



図 3. ホップ生育状況の違い(収穫前 9 月)

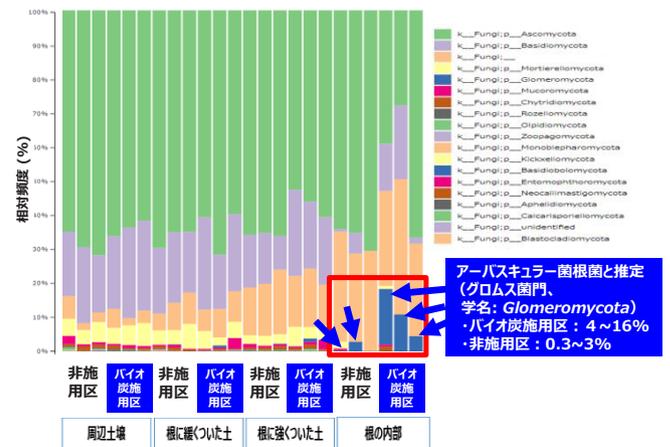


図 4. 土壌微生物の菌叢(生殖成長期 8 月)

4. 今後の展望

今回の結果より、ホップへのバイオ炭施用は GHG 排出量の削減に貢献するだけでなく、生育や根圏の土壌微生物の菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。キリンググループは、これらの研究を通して、脱炭素社会の実現を目指し、環境再生型農業の可能性を探索しつつ、気候変動の緩和に取り組んでいきたい。

5. 文献

- 1) 岸本文紅, バイオ炭の農業利用と脱炭素~国内外の動向と今後の展望. 日本 LCA 学会誌, 18:36-42 (2022) .
- 2) 農研機構・福井県・立命館大, バイオ炭の農業利用事例とその活用ガイドブック (2025) .

ゲノム編集による効率的な品種開発を支援する AI の開発

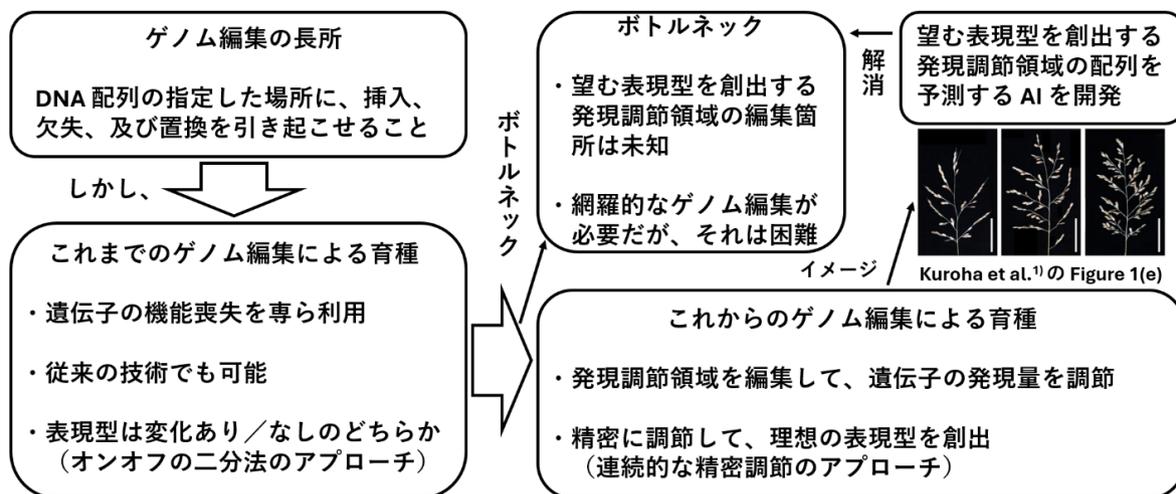
小谷野 仁^{1*}・黒羽 剛¹・吉田 均¹

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構

〒305-0856 茨城県つくば市観音台 1-31-1

Tel: 029-838-7169

E-mail: koyano.hitoshi119@naro.go.jp



要旨. 本稿では、ゲノム編集を用いた効率的な育種を支援するために開発した、望む表現型を創出する発現調節領域の編集箇所を予測する AI について報告する。

はじめに

近年、新規の技術であるゲノム編集を用いた品種開発の効率化が強く期待されている。しかし、現在、育種でゲノム編集を用いて行われているのは「遺伝子の機能喪失による表現型の改良」であり、これは、従来の技術である遺伝子ノックアウトでも可能であったことである。DNA 配列の指定した場所に挿入、欠失、及び置換を引き起こせるゲノム編集の長所を育種で活かすことにより、目的の形質に関与する遺伝子の発現調節領域にゲノム編集を行って、その「発現量を精密に調節し、望む表現型を創出」できないだろうかという考えが出て来る。遺伝子の機能のオンオフではなく、発現量の精密調節により新たに表現型を創出できるならば、品種の可能性は広がる。

しかし、遺伝子の発現調節領域に網羅的なゲノム編集を行って、大量のゲノム編集個体を出し、表現型を調節していくのは、費用や時間の点で困難である。「所望の表現型を実現するには、その形質に関与する遺伝子の発現調節領域のどこをどう編集すれば良いのか分からない」ことが、現在、ゲノム編集が育種でそ

のポテンシャルを発揮できない理由となっている。そこで、望む表現型を実現する発現調節領域の編集箇所を効率的に同定するため、発現調節領域の変異配列とそれらの下での表現型のデータに基づいて学習し、新規の変異配列の下での表現型を予測する AI の開発に取り組んだ。

ゲノム編集育種支援 AI

本研究で開発した AI は、表現型を予測したい変異配列が、基準とする配列（ゲノム編集による変異の導入部位に包含関係がある配列または野生型配列）から Levenshtein 距離に関してどれだけ離れているかによって、その変異配列の下での表現型が、基準配列の下での表現型からどれだけ変化するかを見積もる、という基本原理に、次の 4 つのヒューリスティクスを加えたアルゴリズムに従って、予測値を計算する。

ヒューリスティクス 1. ゲノム編集によって同じ長さの変異を導入した場合でも、発現調節領域のどの部位を編集したかによって、表現型の変化分は異なるという事実、Levenshtein 距離における編集費用を用いて対応する。編集費用の初期推定値として、発現調節領域の塩基保存度を取り、次に、開発した塩基保存度の書き換えアルゴリズムに従って、訓練データセットにおける予測誤差をできるだけ小さくするよう、学

習に利用できる配列と表現型の情報を使って、塩基保存度 (Levenshtein 距離の編集費用) を書き換える。

ヒューリスティクス 2. 発現調節領域に長いゲノム編集を施した時の表現型の変化分が、それより短い編集を施した時の表現型の変化分と変わらないという現象が観察される。これは、ある長さのゲノム編集により、転写因子の結合しやすさが底打ちするためであると推測される。本研究の AI は、基本の予測量の代わりに、この現象に対応した予測量を用いる条件(不等式)を学習し、予測方法を使い分ける。

ヒューリスティクス 3. ここまで述べてきた予測方法は、予測値の信頼できる上界と下界を設定できる変異配列に対しては、非常に高い精度の予測値を返すが、そうでない変異配列に対しては、既存の他の方法より誤差の大きい予測値を返すことがある。本研究の AI は予測値の上界と下界の信頼度を評価し、信頼度がある水準より低いと判定される時、上述の方法ではなく、既存の他の方法からの予測値を返す。

ヒューリスティクス 4. 幾つかの遺伝子の発現調節領域の変異配列と表現型の組のデータを保持している時、新規の遺伝子の発現調節領域の変異配列の下での表現型の予測に、保持するデータを利用したいという欲求が出て来る。発現調節領域にどれだけの長さの変異を導入するかと、それによって遺伝子の転写量や表現型がどれだけ大きく変化するかに対応は、遺伝子によって異なるため、単純にやったのでは上手くいかないが、他の遺伝子からのデータが、新規の遺伝子に関する予測精度を改善すると期待される場合がある。本研究の AI は、この場合を定式化した不等式のパラメータの値を学習し、新規の遺伝子に対してこの不等式が成り立つならば、他の遺伝子からのデータを利用して、それに関する予測精度を強化するように動く。

イネゲノム編集への応用

イネの *TAW1* と *SD1* 遺伝子の発現調節領域のゲノム編集による変異配列と表現型の組のデータ¹⁾を用いて、前節で述べた AI に学習させ、予測精度を調べた。*TAW1* と *SD1* はそれぞれイネの着粒数と草丈を制御する遺伝子であり、表現型としてそれぞれ 1 次枝梗数当たりの 2 次枝梗数と草丈に着目した。実験で得られている配列と表現型の組の数は、*TAW1* では 27 組、*SD1* では 8 組である。ゲノム編集育種で AI が学習に使えるデータの数は、AI の文脈で見て非常に少なく、通常 10 個程度であると思われる。試した既存の方法の中では、スペクトルカーネルと組み合わせた SVR の予測精度が最も高く、1 点除外交差検証による平均相対予測誤差は、*TAW1* において 0.3364、*SD1* において 0.1926 であった。一方、前節で述べた AI の平均相対予測誤差は、*TAW1* において 0.1287、*SD1* において 0.0461 であった。

コンピューターの中で変異配列を表す文字列を次々に生成し、それらを開発した AI に入力して、それらの

下での表現型の予測値を計算させることにより、望む表現型を創出する変異配列を予測できる。現在、望む表現型が入力された時、それを実現すると予測される配列をある確かさの基準で順序付けして出力するように AI を拡張している。

まとめと今後

期待の大きなゲノム編集であるが、育種分野では、現在そのポテンシャルを発揮できずにいる。本研究では、ゲノム編集を用いた効率的な育種の支援を目的として、望む表現型を創出するための、遺伝子の発現調節領域の編集箇所を予測する AI の開発に取り組んだ。現時点ではゲノム編集は育種の主要な道具ではないが、多くの可能性を秘めている。そこで、ゲノム編集を用いて品種開発を行ってみたいと考えている育種研究者を対象に、本稿で述べた AI が動くウェブプラットフォーム DNA Sequence Designer を開発しており (図 1)、完成し次第、公開する予定となっている。

図 1. ゲノム編集育種支援ウェブプラットフォーム DNA Sequence Designer

謝辞. 本研究は、イノベーション創出強化研究推進事業 (応用研究ステージ)「近傍保存配列 CNS のゲノム編集による作物遺伝子発現の精密調整技術の多様な作物への展開」(01005AB1) (令和 4 年度から令和 6 年度)の支援の下で実施された。

文 献

- 1) Kuroha, T., Lombardo, F., Iwasaki, W. M., Chechetka, S., Kawahara, Y., Yoshida, A., Makino, T., and Yoshida, H.: *Plant Biotechnol. J.*, **23**(7), 2667–2669 (2025).

毛包オルガノイドを用いたセロトニンの発毛促進効果の理解

景山 達斗^{1,2}・福田 淳二^{1,2*}

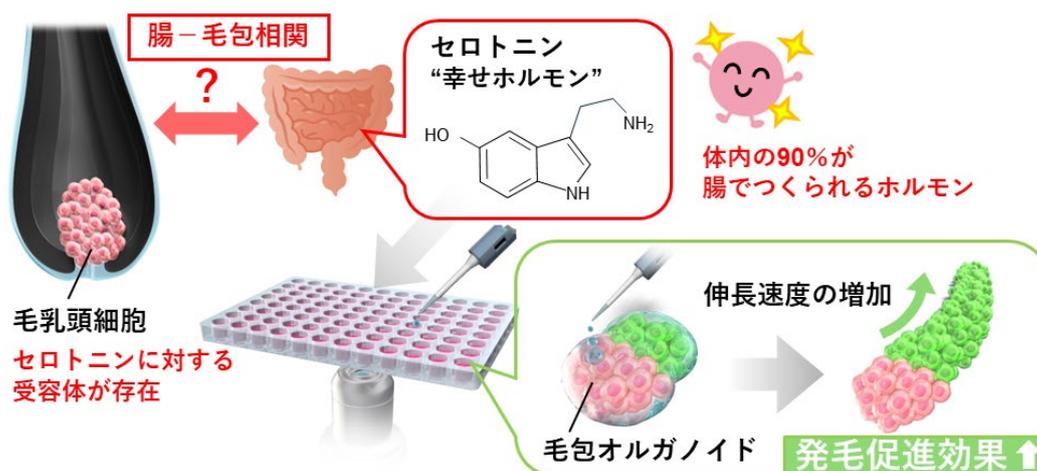
¹ 神奈川県立産業技術総合研究所, ² 横浜国立大学大学院工学研究院

〒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



腸は「第二の脳（または心臓）」とも言われるように、体のあらゆる臓器・組織と密接な関係にある。例えば、腸内環境を改善することで、抗うつなどのメンタルヘルスや免疫力の向上につながる。また、腸内環境が肝臓や胃腸、筋肉の恒常性維持に関わることも明らかになっている。近年、腸内環境の乱れが脱毛を引き起こすことも明らかになり、「腸-毛包相関」を理解するための研究開発が世界的に注目されている。本研究では、体内の約90%が腸で産生されるホルモンである「セロトニン」に着目し、セロトニンが毛包に与える効果を評価した。すなわち、独自の毛包オルガノイド評価系を用いて、セロトニンの発毛促進効果とその作用メカニズムを解析した。本研究により、腸-毛包相関の理解が深まり、新たな脱毛治療法の開発が加速することが期待される。

1. はじめに

セロトニンは、精神の安定や胃腸の恒常性を制御する上で重要な役割を果たすホルモンとして知られ、幸福感を与える作用もあることから“幸せホルモン”とも呼ばれる。このセロトニンは、おもに腸で産生され体内を循環するため、腸-他臓器相関を媒介する因子としても注目されている。最近の研究において、腸内環境の変化が発毛に影響することが明らかになってきた一方で、セロトニンが毛包に与える作用はほとんど理解されていない。本研究では、毛包オルガノイドを用いて、セロトニンの発毛促進効果を検証した。

2. 方法と結果

近年、我々は毛包の生命現象を理解するための評価系として、毛包オルガノイドを開発した^{1), 2)}。このモデルでは、毛の伸長や毛包のメラノソーム輸送などを細胞レベルでリアルタイムに観察することができる。また、発毛促進成分（ミノキシジルやオキシトシン）に応答して、オルガノイドから伸長する毛の長さが伸長することから、毛の長さを指標に発毛/脱毛因子の有効性を解析できる^{2) 3)}。

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、セロトニン添加培地で 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、セロトニンの作用メカニズムを理解するために、毛包の根元に存在する毛乳頭細胞に対して、セロトニン受容体の免疫染色を行うとともに、セロトニン添加に伴い発現上昇する遺伝子群について、RT-PCR および RNA-seq 解析を行った。また、毛髪研究分野で信頼性が高い評価モデルである、ヒト毛包のオーガカルチャーモデルを用いて、セロトニンの発毛促進作用を再検証した。さらに、セロトニンシグ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

セロトニンの添加により、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)。ヒト毛包を用いたオーガカルチャーモデルにおいても、毛幹の伸長促進を確認しており (図 2)、セロトニンが毛包に与える作用を裏付ける結果が得られている。詳細に解析を行うと、毛乳頭細胞はセロトニン受容体を有しており、セロトニンに反応した毛乳頭細胞は、毛母細胞の増殖を促進する成長因子 (VEGF や FGF10) の発現を増加させた。すなわち、作用メカニズムとして、セロトニンが毛乳頭細胞の持つセロトニン受容体に結合し、この毛乳頭細胞が成長因子の産生を増加させたことで、発毛促進がみられた可能性が考えられる。

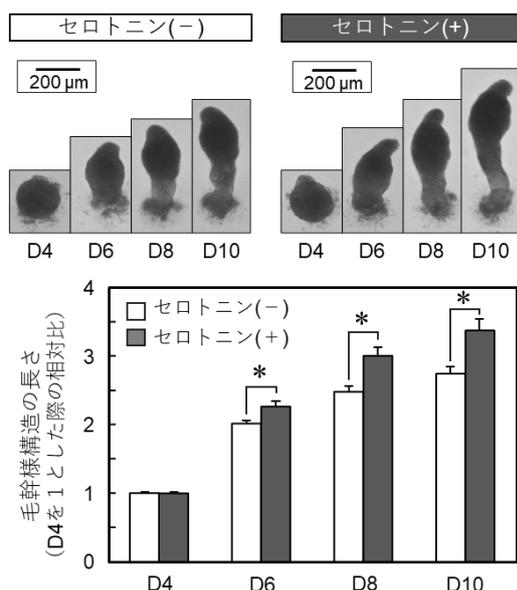


図 1 毛包オルガノイドを用いたセロトニンの評価、顕微鏡写真 (上) と毛幹長の定量結果 (下)

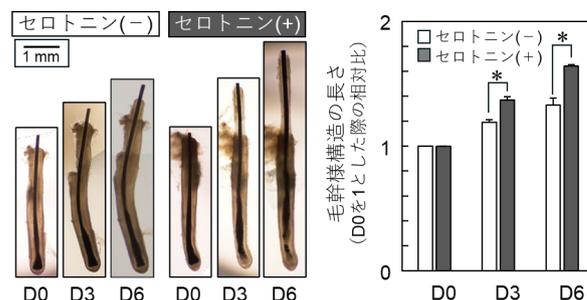


図 2 オーガカルチャーモデルを用いたセロトニンの評価、顕微鏡写真 (左) と定量結果 (右)

セロトニン受容体をターゲットとした薬剤の一つに、片頭痛の治療薬として開発されたスマトリプタンがある。この薬剤を毛包オルガノイドに添加して発毛促進効果を検証した結果、スマトリプタンの添加により、オルガノイドの毛幹様構造の長さが有意に増加した。セロトニン投与時と同様に、成長因子の発現増加を確認しており、類似した作用メカニズムが考えられる。今後、脱毛症の動物モデルを用いたより詳細な解析が必要であるが、本研究により、セロトニン受容体をターゲットとした薬剤を、プロドラックとして育毛・発毛剤分野に応用できる可能性が示唆された。

4. 結論

本研究では、セロトニンが毛包に作用し、発毛を促す可能性を明らかにした。今後、セロトニンを介した腸-毛包相関の可能性を検証するためには、動物モデルや Organ on a chip を用いたより詳細な解析が必要であろう。また、セロトニンは脱毛症治療に向けた新たなターゲットとなる可能性があり、腸内のセロトニン産生を増加させる食品やセロトニンシグナルの活性化を伴う発毛剤の開発といった応用研究も期待される。これらの解析を着実に進めることで、この分野の発展に貢献していきたい。

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).

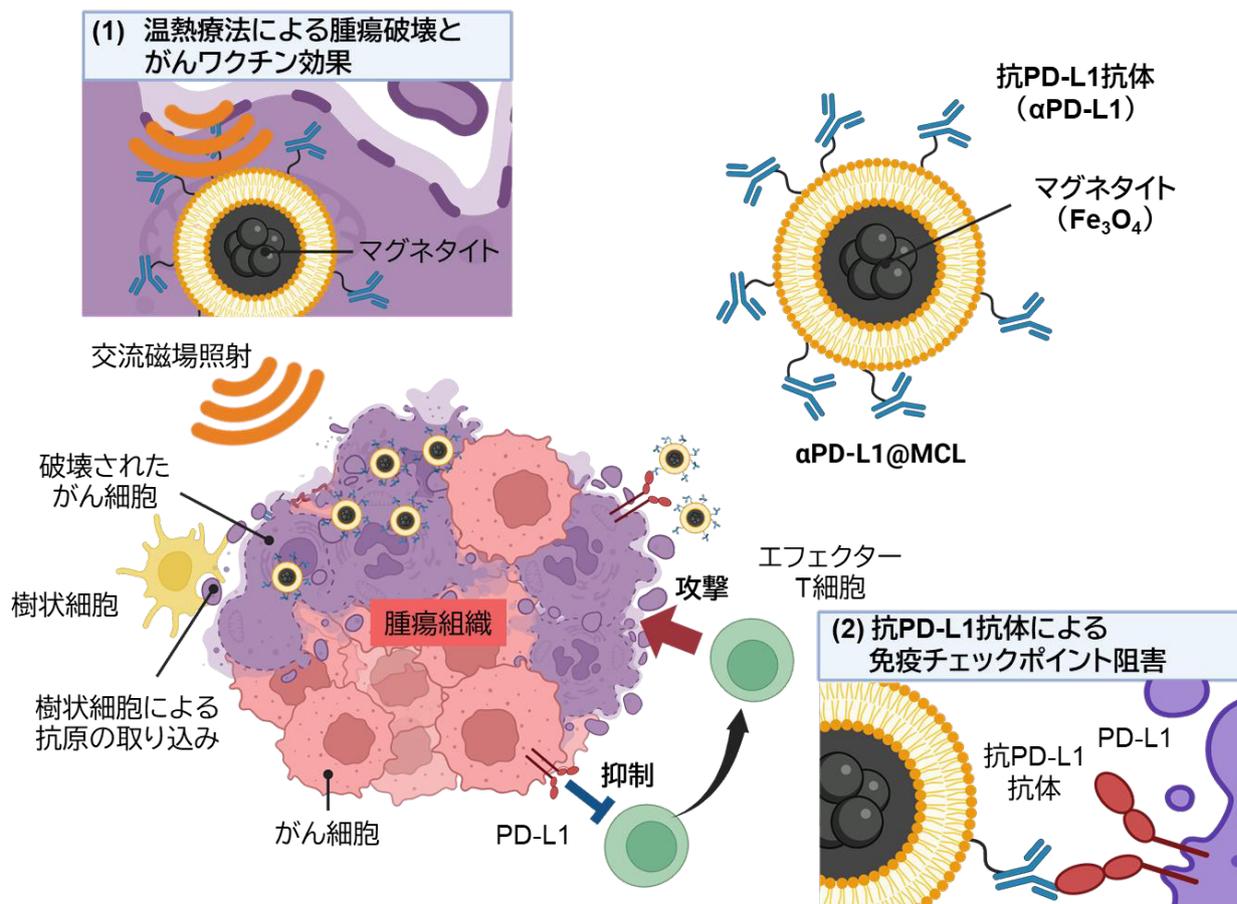
免疫チェックポイント阻害剤担持型磁性ナノ粒子を用いた膀胱がん温熱療法

齊藤 凜太郎¹・金子 真大¹・権田 将一²・河合 憲康²・井藤 彰^{1*}

¹名古屋大学大学院工学研究科, ²名古屋市立大学大学院医学研究科
〒464-0863 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



膀胱がんは再発率が高く、再発を繰り返すうちにがんが進行する恐れがある。進行した膀胱がんに対しては膀胱全摘出が標準治療とされているが、患者の負担の大きさが課題である。我々は、磁性ナノ粒子を用いた温熱治療に基づき、膀胱の温存が可能な治療法を開発できるのではないかと考えた。本研究では、抗体医薬である免疫チェックポイント阻害剤を担持した磁性ナノ粒子 (αPD-L1@MCL) を開発した (上図)。開発した粒子を腫瘍組織に導入し、交流磁場を照射すること温熱治療を行った。本治療法は、マウス膀胱がんの皮下移植モデルに対して高い治療効果を示し、抗腫瘍免疫誘導による再発防止効果が示唆された。さらに、マウス膀胱へのがん移植モデルに対しても腫瘍の成長抑制効果が認められた。

1.はじめに

膀胱がんは治療後の転移・再発の可能性が高く、再発を繰り返すうちに腫瘍が筋層まで浸潤する。こうした浸潤性膀胱がんの治療は膀胱の全摘除が基本とされており、患者のQOL低下が問題となっている。本研究では、膀胱の温存が可能な治療法の開発のため、磁性ナノ粒子を用いた温熱療法に注目した。磁性ナノ粒子を用いた温熱療法は、交流磁場照射下で発熱する磁性ナノ粒子を腫瘍組織に送り込み、43°C以上に加温することで細胞死を誘導する。熱により破壊されたがん細胞は抗原を放出し、抗腫瘍免疫を誘導する。このように温熱療法は、熱による細胞死誘導と抗腫瘍免疫の誘導という二つの機構から治療効果を発揮する。しかし、多くのがん細胞は免疫チェックポイント分子であるPD-L1を介して免疫細胞の働きを抑制するため、抗腫瘍免疫が抑制されてしまう。そこで本研究では、免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-L1抗体を担持した磁性ナノ粒子 α PD-L1@MCLを開発した。マウス膀胱がんMB49細胞の皮下移植モデルおよび膀胱内移植モデルに対して、 α PD-L1@MCLを用いた温熱治療の効果を検証した。

2.方法

マレイミド基が修飾されたカチオン性リン脂質膜でマグネタイト(Fe_3O_4)ナノ粒子を被覆した。このナノ粒子と、トラウト試薬によりチオール基を修飾した抗PD-L1抗体(α PD-L1)を反応させることで、 α PD-L1@MCLを作製した。

C57BL/6マウスの皮下または膀胱にMB49細胞を移植し、皮下移植モデルおよび膀胱腫瘍モデルを作製した。皮下移植モデルでは腫瘍体積が 50 mm^3 を超えた時点で治療を開始した。 α PD-L1@MCLを腫瘍に直接注射し、腫瘍表面温度を43°Cまたは46°Cに保ちながら交流磁場を30分間照射することで温熱治療を行った。治療を3回行う群では2日後、4日後にも温熱治療を行った。また、完治したマウスに対して再度MB49細胞を移植するリチャレンジ実験を行い、腫瘍形成の有無を追跡した。膀胱内移植モデルでは、移植した日をDay0としてDay5に治療を開始した。 α PD-L1@MCLを、尿道を介して膀胱内へ注入し、43°Cまたは46°Cに加温する治療を1日おきに3回行い、2週間後に膀胱重量を測定することで治療効果を評価した。

3.結果

皮下移植モデルに対して温熱治療を行ったところ、いずれの治療群においても無治療群と比べて腫瘍体積が縮小する傾向が認められた(図1)。43°Cで温熱治療を行った場合、治療回数が1回と3回の群でいずれも5匹中4匹の腫瘍が完全退縮した。一方で、46°Cで温熱治療を行った場合、治療を1回行った群で腫瘍の完全退縮は1匹にとどまったが、3回治療を行った群では5匹全ての腫瘍が完全退縮した。完治したマウスに対してリチャレンジ実験を行ったところ、いずれのマウ

スにおいても腫瘍の形成は認められず、温熱治療による抗腫瘍免疫の誘導が示唆された。

また、膀胱内移植モデルにおいても治療後の膀胱重量の減少から、温熱療法後の腫瘍退縮が示唆された。

(図2)。膀胱腫瘍モデルでは43°C治療群において膀胱重量がより大きく減少し、6匹中1匹のマウスで腫瘍の完全退縮が確認された。

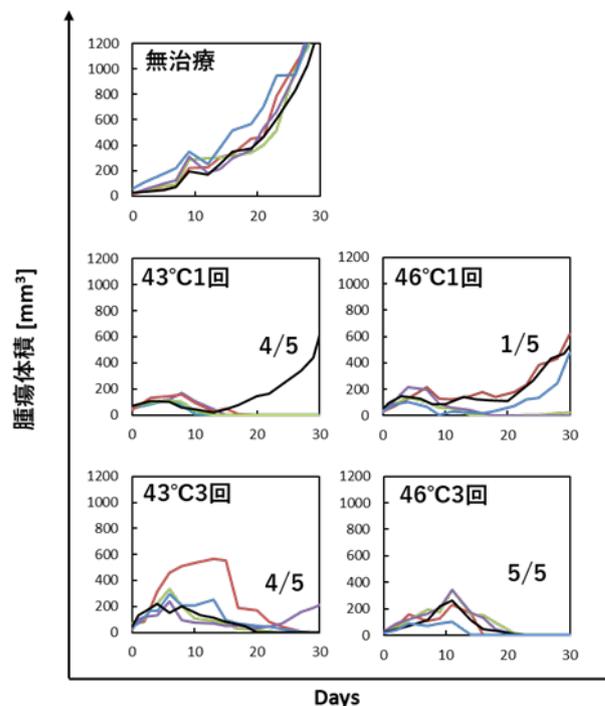


図1 温熱治療開始から30日間の腫瘍体積推移。それぞれの線はそれぞれのマウスの腫瘍体積を表し、右下に完治した匹数を示す。

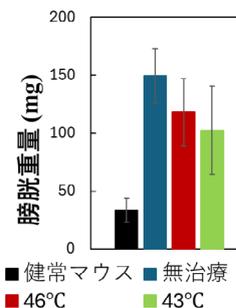


図2 MB49細胞移植から2週間後における膀胱重量。

4. 結論と今後の展望

抗PD-L1抗体を担持した磁性ナノ粒子を用いた治療により、皮下移植モデルおよび膀胱内移植モデルにおいて高い治療効果を得ることに成功した。これらの結果から、 α PD-L1@MCLを用いた温熱療法は腫瘍組織のみを標的にしつつ膀胱の温存が可能な新規治療法として有望であることが示唆された。

マイクロマニピュレーションシステムを用いた スフェロイドの空間的細胞特性の解析

田中健二郎^{1*}、酒井蓮¹、中島亮太²、嵯峨山功幸²、長谷川信二²、

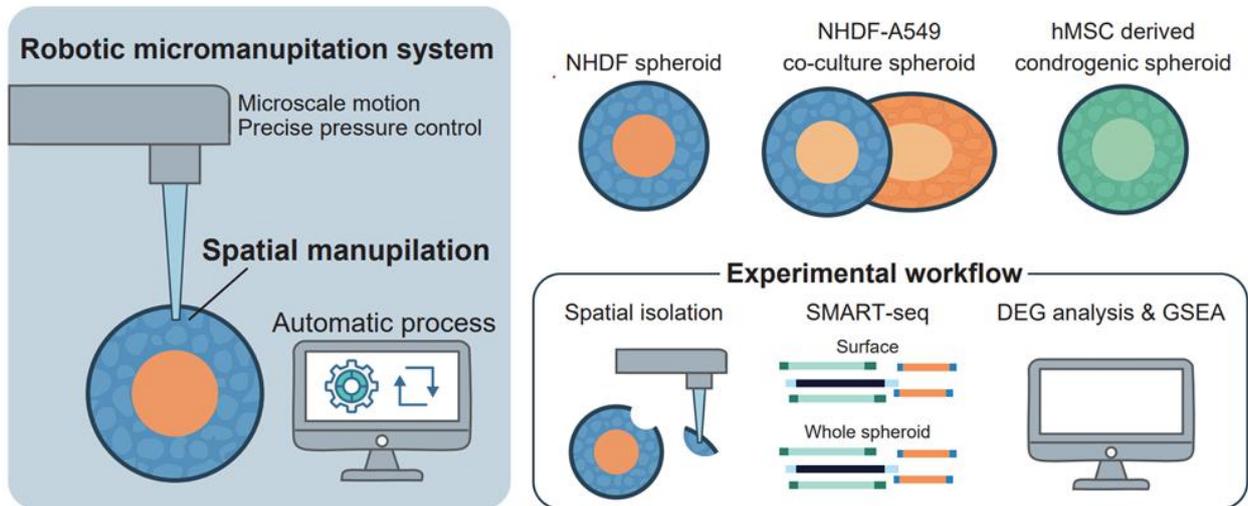
田中伸明²、尾崎学士²、加藤竜司^{1, 3}

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科, ²日本精工株式会社, ³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: tanaka.kenjiro.d1.f.mail.nagoya-u.ac.jp



要旨

三次元組織モデルとして広く活用されているスフェロイドやオルガノイドは、生体組織の微小環境を模倣する優れたシステムであり、創薬や再生医療など多様な分野で応用が進んでいる。これらの三次元構造体は、培養条件下において酸素や栄養因子、分化シグナル等の濃度勾配を形成し、これにより内部と表層で細胞の代謝状態や機能的特性が大きく異なることが知られている。こうした空間的な不均一性は、組織モデルの機能再現性や製品としての均質性に直結する重要な因子であるが、従来の手法では構造体を破壊的に処理することなく、特定部位に限定して細胞情報を取得する技術には限りがある。

本研究では、ロボット工学と微細操作技術を融合することで、三次元構造体の特定領域から生きた細胞を選択的に抽出できる新たなプラットフォームを開発した。本システムは、マイクロメートルオーダーでの空間分解能を有するキャピラリ制御機構をもつため、細胞構

造体の表層を対象とした非破壊的かつ再現性の高い細胞採取を可能とするものである。

本技術を複数の三次元細胞モデルに適用し、採取した細胞に対して RNA シーケンス解析を行った結果、構造体内部における空間的位置に依存した遺伝子発現の偏りが認められた。また、がん細胞と線維芽細胞を含む多成分系においては、細胞間の相互作用に起因する機能的変容が抽出された細胞群から同定され、空間依存的に発現される分子プロファイルを解析した。

本研究で開発した技術は、三次元培養モデルに内在する空間的多様性の理解をし、再生医療製品や組織工学材料の品質評価において、より高度な設計指針の構築に資する新たな解析基盤を提供するものである。

本文

スフェロイドやオルガノイドなどの三次元細胞構造体は、生体組織の微小環境を模倣し得る *in vitro* モデルとして、創薬および再生医療の分野において広く

応用されている¹⁾。これらの構造体内部では、酸素や栄養因子の拡散制限により濃度勾配が形成され、それに伴い細胞の代謝状態や機能に空間的な不均一性が生じることが知られている²⁾。

しかし、従来の解析技術では、構造体内部の特定領域に存在する細胞の情報を選択的かつ非破壊的に取得することが困難であった。一般的な遺伝子発現解析では、構造体全体を酵素処理や機械的手法で解離し、単細胞に分散させる必要があるため、細胞が元来存在していた空間的位置情報が失われてしまう。また、空間的トランスクリプトミクス³⁾や多光子顕微鏡⁴⁾などの手法も存在するが、いずれも固定・切片化された標本が対象であり、生細胞の機能的・動態的評価には適さない。加えて、空間解像度や測定できる分子情報にも制限がある。

方法

本研究では、ロボティクスと微細操作技術を組み合わせることで、三次元構造体内の特定領域から生細胞を非破壊かつ選択的に採取可能なマイクロマニピュレーション装置を新たに開発した。本装置は、0.1 μm 単位での制御が可能な電動マニピュレーター、三方向からの光学観察系、圧力制御可能な吸引ユニットを搭載し、スフェロイド表層からの高精度な細胞採取を実現する。

この技術を、正常線維芽細胞(NHDF)、肺がん細胞(A549)スフェロイド、それら2種のスフェロイドを融合させた融合スフェロイド(NHDF-A549 coculture spheroid)、ならびに軟骨分化誘導間葉系幹細胞スフェロイド(hMSC-Chondro spheroid)に適用し、SMART-seqによるRNAシーケンス解析を実施した。

結果と考察

単一細胞種からなるスフェロイドにおいても、酸素消費関連遺伝子などが表層において有意に高発現する傾向が確認された。さらに、異種細胞融合スフェロイドでは、線維芽細胞領域においてがん細胞との間接的相互作用に起因すると考えられる遺伝子発現変容が観察された。加えて、hMSC由来スフェロイドでは、分化の進行に応じた空間的な発現勾配が明瞭に認められた。これらの結果は、本技術により構造体を保持したまま、スフェロイドの表層領域の細胞情報を取得できることを示しており、空間的細胞状態の可視化に有効であることが示唆された。

今後の展望

本技術は、三次元培養モデルに内在する空間的な細胞状態の多様性を解析するための新しい手段である。採取後もスフェロイドの生存性が保持されるため、時

間経過に伴う連続的な空間評価や、前後比較によるダイナミクス解析が可能である。再生医療製品の品質管理や組織工学における空間設計の最適化にも応用が期待される。

今後は、RNAシーケンス以外のアッセイ技術との組み合わせや、リアルタイム非破壊計測技術との統合を通じて、より高次元な空間情報の取得が可能となる。また、装置の自動化やAIによる画像認識との融合により、高精度かつ汎用的なスフェロイド解析プラットフォームとして発展させることも視野に入れている。

本技術は、三次元組織モデルの高度利用を支える空間解析基盤として、再生医療およびバイオものづくり分野への貢献が期待される。

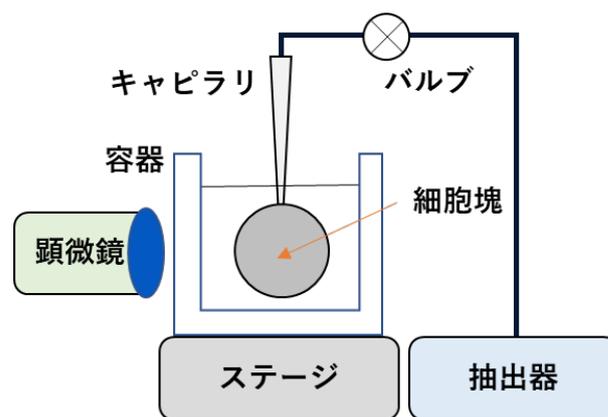


図1 装置の概要

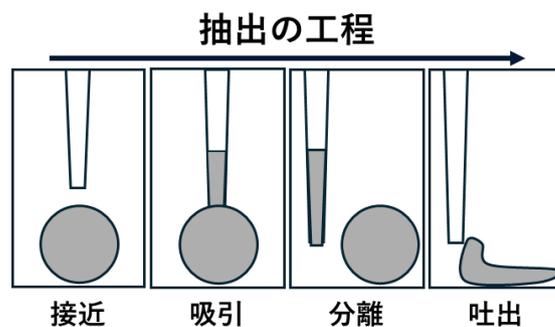


図2 抽出の工程

参考文献

- Cardoso, B. D. *et al.*: *Adv. Healthc. Mat.*, **12**, 2202936–2202936 (2023)
- Wu, R. W. *et al.*: *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **45**, 103975–103984 (2024)
- Lim, H. J. *et al.*: *BMC Genomics*, **26**:47 (2025)
- Priwitaningrum, D. L. *et al.*: *Drug Deliv. Transl. Res.*, **13**, 1470–1483 (2023)

嗅覚受容体の応答を指標にした実臭気の知覚抑制

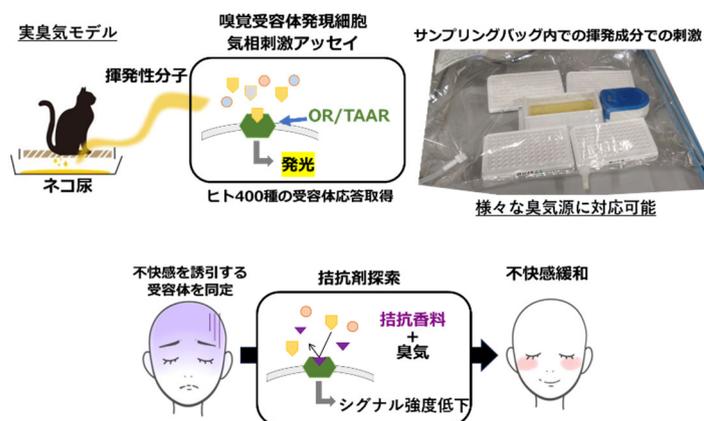
福谷 洋介^{1*}・金牧 怜奈^{1,2}・岸上 佳保里²・齋藤 芽生¹

¹東京農工大学大学院工学府生命工学専攻, ²エステー株式会社

〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16 東京農工大学大学院工学研究院

Tel: 042-388-7793 Fax: 042-388-7479

E-mail: fukutani@cc.tuat.ac.jp



哺乳類の嗅覚受容体 (odorant receptors, ORs) は、匂い分子を認識する高感度かつ選択的なセンサーとして機能し、複雑な臭気の知覚に重要な役割を果たしている。我々はこの嗅覚受容体を匂い応答の指標として活用し、実臭気に対して効果的な知覚抑制技術を開発した。今回モデル臭気とした、ネコ尿臭は複数の揮発性化合物が混在するため、臭気源となる化合物の特定や分離は困難である。そこで、培養細胞を用いた気相刺激アッセイにより、ネコ尿臭に反応する嗅覚受容体を網羅的に解析した。GC-MS 解析との併用により、猫尿の主な悪臭成分の1つがトリメチルアミン (TMA) であると特定した。さらに、TMA に強く反応する受容体として、ヒトの TAAR5 (trace-amine-associated receptor 5) を同定した。数百種に及ぶ候補化合物から新規の TAAR5 アンタゴニストを探索し、既知の拮抗剤を上回る効果を有する複数の化合物を発見した。これらの化合物は、TAAR5 発現細胞におけるネコ尿臭反応を顕著に低下させるだけでなく、ヒト官能評価試験においても、悪臭強度の有意な低下と快適性の向上を示した。本研究は、実臭気そのものを用いた嗅覚受容体反応の解析が、複雑臭気における匂い知覚の理解と制御に直結することを示した。個々の成分の単離・精製に依存せず、実臭気に対する「受容体反応指標」を活用することで、複雑な悪臭の抑制や快適性向上のための新たな香料開発戦略の可能性を示唆する。

背景・目的

生物は常に環境中の匂いや香りを感じながら生活している。匂い分子は数十万種類以上存在し、それらの組み合わせによって多様な匂いが構成される。匂い分子には芳香族化合物や揮発性の高い物質が多く含まれるが、明確な定義は存在しない。嗅覚の起点となる分子センサーである嗅覚受容体 (Olfactory receptor; OR) が反応し得る分子は、すべて匂い分子の候補とみなすことができる。OR は G タンパク質共役型受容体の一種であり、ヒトには約 400 種類が存在する。空気中に漂う匂い分子に対して、各 OR が示す分子反応の組み合わせによって、私たちの「匂いの感じ方」が構築

されていると考えられている⁽¹⁾。このように分子が混在する環境下で特定の匂いを知覚するには、その匂いに特異的かつ強く反応する OR の存在が極めて重要である⁽²⁾。本研究では、実際の匂い環境 (実臭気) に対して反応する OR を同定し、その OR の反応を変化させる拮抗分子を探索することで、匂い知覚の制御に向けた技術基盤の構築を目指す。

結果と考察

1. ネコ尿臭に反応する嗅覚受容体の同定

試験に用いたネコ尿は、家庭用のシステムトイレを用いて回収した。ネコ尿の臭気強度には日によるバラ

つきが大きく見られたため、異なる採取日の尿を混合し、臭気のばらつきを平均化した試料を作製した⁽³⁾。この試料を用いて、ヒト嗅覚受容体に対する応答スクリーニングを実施した。スクリーニングには、cAMP 応答型のルシフェラーゼセンサーGloSensor を用い、生細胞におけるリアルタイムの発光変化を指標とした気相刺激アッセイを採用した⁽⁴⁾。その結果、TAAR5 (trace-amine associated receptor 5) が、ネコ尿の臭気強度と相関する応答を示した⁽³⁾。

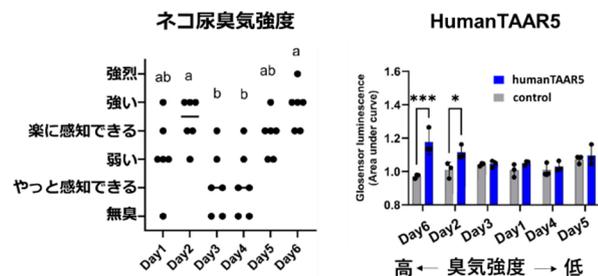


図 1. ネコ尿の臭気強度と受容体応答試験
左) ネコ尿の臭気強度のバラつき、
右) ヒト TAAR5 のネコ尿揮発ガスに対する応答

TAAR5 は、トリメチルアミン (TMA) などの低分子アミンに反応することが知られており⁽⁵⁾、GC-MS 解析によりネコ尿中に TMA が含まれていることを確認した。これにより、TMA がネコ尿の悪臭成分の一つであることが明らかとなった。しかし、TMA 単独とネコ尿の匂いの感じ方には違いがあり、他の悪臭成分も関与している可能性が高い。

2. 拮抗香料の探索

TAAR5 の応答を抑制する拮抗香料 (アンタゴニスト) を探索するため、約 400 種の候補香料をスクリーニングした。各香料を TAAR5 発現細胞に添加し、気相からネコ尿を刺激した結果、2 段階のスクリーニングを経て、既知のアンタゴニストよりも高い抑制作用を示す新規の拮抗香料を同定した⁽³⁾。

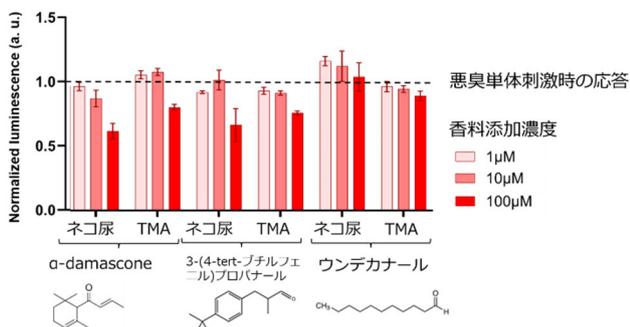


図 2. TAAR5 のアンタゴニスト候補の一部
ネコ尿および TMA に対する応答を 1 とし、各香料添加時の相対応答値を示す。

3. 官能評価による効果検証

TAAR5 の応答を抑制する香料について、ヒトによる感覚的消臭試験 (官能評価) を実施した。ネコ尿と香料の飽和ガスをそれぞれ別のサンプリングバッグ内で調製し、両者を混合して試験用の臭気ガスとした。その結果、TAAR5 の応答抑制作用を示した香料の中に、ネコ尿やトリメチルアミン (TMA) の臭気強度を低減する効果があることが確認された (図 3)⁽³⁾。

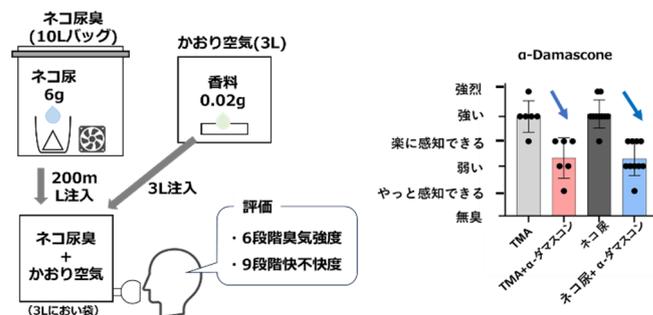


図 3. 感覚的官能評価試験
左) 混合臭気調整方法
右) α ダマスコンによるネコ尿臭気の抑制効果

結論

本研究により、嗅覚受容体発現細胞を用いた実臭気応答の評価を通じて、匂いに反応する受容体の同定と、それを標的とした拮抗香料の探索が可能であることを示した。このスキームは、匂いの知覚を制御する分子を同定する新たなアプローチとなる。今回は悪臭対策としてネコ尿をモデルとしたが、今後は化粧品、食品、飲料など様々な分野に応用可能であり、匂いに関わる研究開発への幅広い展開が期待される。

文 献

- 1) Trimmer C, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. **116**(19):9475-9480. (2019)
- 2) Fukutani Y et al., *Curr Biol*. **33**(11):2235-2245. e4. (2023)
- 3) Kanemaki R. et al., *Int J Mol Sci*. **26**(4):1566. (2025)
- 4) Kida H. et al., *Nat Commun*. **9**(1):4556 (2018)
- 5) Wallrabenstein I et al., *PLoS One*. **8**(2):e54950. (2013)

電子密度トポグラフィーで見出した等価な Fab 領域による 抗原蛋白質認識における順序性の可能性

松本 崇¹、佐藤 瑛美²、小藺 拓馬²、北村 亮¹、佐藤 孝¹、長谷川 智一¹、神田 浩幸¹、

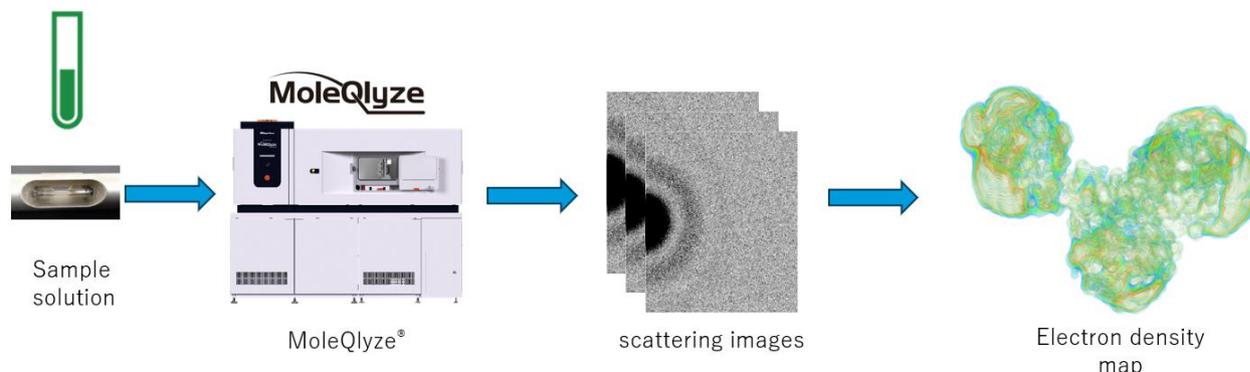
殿塚 隆史²、西河 淳²

¹株式会社リガク, ²東京農工大学 応用生物化学科

〒196-8666 東京都昭島市松原町 3-9-12

Tel: 042-545-8166 Fax: 042-545-8158

E-mail: t-matumo@rigaku.co.jp



要旨

医薬品開発においては、標的分子の立体構造情報が重要な役割を果たす。中でも抗体は、柔軟な hinge 領域により Fab および Fc 領域が連結された構造を有し、分子全体として高い動態性を示す。この性質により、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の適用が難しく、これまでに PDB に登録されている抗体構造の多くは、Fab あるいは Fc などの断片構造に限られている。

本研究では、弊社にて開発した、溶液中における分子の形状および運動性を可視化可能な電子密度トポグラフィー (EDT) を、発現・精製したモノクローナル抗体およびその抗原蛋白質との複合体に適用した。

はじめに

医薬品開発における分子設計や最適化の過程では、標的分子の立体構造情報が極めて重要な役割を担っている。しかし、抗体分子は柔軟な hinge 領域を介して Fab と Fc が連結されており、高い可動性を有する。こ

のため、結晶構造解析に加え、単粒子解析による構造決定も困難であり、高次構造に基づく抗体設計や品質評価には多くの制約が存在している。

抗体の hinge 領域由来の柔軟性により、Fab 領域は一般に高い自由度を持ち、互いに独立して運動することが知られている。この構造的特徴は、空間的に離れた抗原エピトープを同時に認識・結合しうる可能性を示唆するものでもある。一方で、抗体が二つの Fab 領域を用いて抗原を認識する際の結合順序については、いまだ明確な理解には至っていない。

もし、溶液中における抗体の構造や動態を直接観察できる技術が実用化されれば、Fab 領域の柔軟性やその動的挙動を可視化し、これまで明らかにできなかった抗原認識の機構に新たな視点を与えることが可能となるだろう。これにより、Fab の結合順序性やその基盤となる構造的要因の解明が進み、抗体の機能性・特異性・適応性に関する理解を一層深めることが期待される。こうした知見は、抗体医薬の設計および最適化において重要な手がかりとなり、今後の治療戦略に

も大きな影響を与える可能性がある。

本稿では、電子密度トポグラフィ（EDT）による分子投影法を用い、結晶化・凍結・固定化・標識化といった従来の前処理を必要とせず、溶液中に存在する抗体分子の形状および動態をそのままの状態を観察するアプローチについて紹介する。マウスモノクローナル抗体（IgG1）およびその抗原タンパク質との複合体に対して本手法を適用した結果、これまで報告のなかったFab領域の運動性の違いを観察するとともに、抗原との結合に順序性がある可能性を明らかにした。

結果と考察

溶液中のマウスモノクローナル抗体（IgG1）を電子密度トポグラフィ（EDT）により観察した結果、Y字型構造が明瞭に観察された（図1）。この構造は、二つのFab領域が上方に展開した状態に相当すると考えられる。抗体分子内の二つのFabは、化学的には同一のアミノ酸配列から構成されており、一般には溶液中で等価な運動性を示すと考えられてきた。また、抗原との結合に関しても、同等の親和性を持つものと広く認識されている。

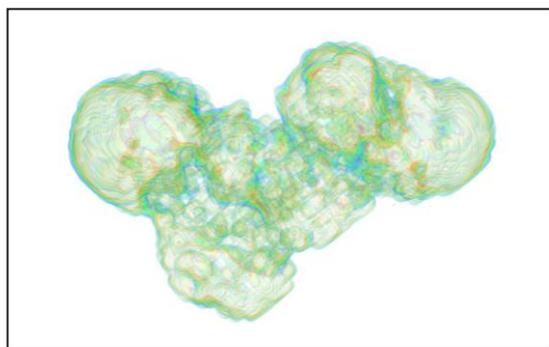


図1. 溶液中マウス IgG1 の電子密度

本研究では、Fab領域の運動性に着目し、EDTにより詳細に観察を行った。その結果、二つのFabは異なる運動性を示すことが明らかとなった（図2）。Fab間で運動性に差異が認められることは、それぞれのFabが異なる構造的役割を担っている可能性を示唆しており、抗原認識・結合性にも影響を及ぼす可能性がある。これまで、全長抗体分子の溶液中での構造的動態と、それに基づく抗原結合能に関する直接的な観察例はほとんど報告されていない。そこで本研究では、同IgG1抗体と標的抗原との複合体を調製し、ゲルろ過によりメインピークを分離した後、そのフラクションを用いてEDTを用いた観察を実施した。

その結果、図3に示すように、片側のFab領域のみに抗原が結合している状態を捉えることに成功した。結合していないもう一方のFab（図3赤矢印）を観察したところ、顕著な運動性は認められなかった。抗原

結合前の抗体においては、図2に示すようにFab間で運動性に差がみられることから、運動性の高いFabが優先的に抗原と結合し、運動性の低いFabは結合しにくい可能性が示唆される。

この結果は、Fabの運動性が抗原の認識および結合において重要な役割を果たしており、それがFabの結合順序性を決定づけている可能性を示すものである。

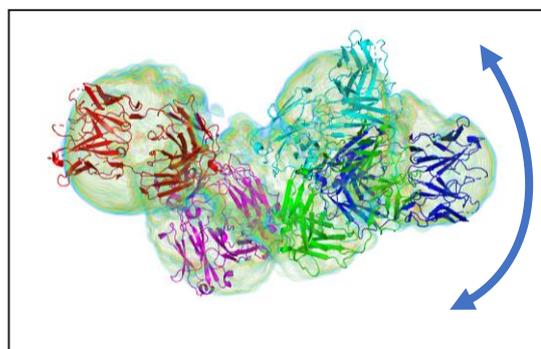


図2. 溶液中マウス IgG1 の電子密度へ PDB ID=1HZH の Fab と Fc 構造の重ね合わせ

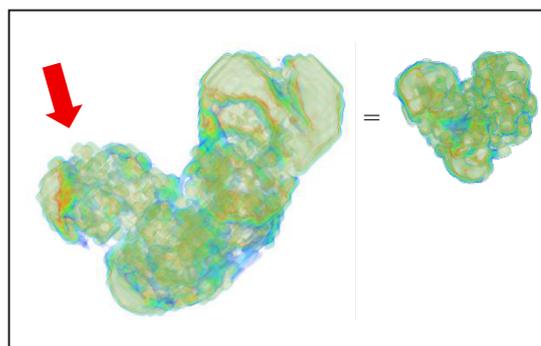


図3. 溶液中マウス IgG1-抗原蛋白質複合体の電子密度

今後の展望

今回のEDTによる観察により、抗体が抗原に対して示す結合の順序性を捉えることができた。従来の構造解析手法では、結晶化や凍結などにより分子を固定化する必要があったが、EDTでは溶液中の分子をそのまま観察できるため、これまで困難であった溶液中における分子の形状や動態といった動的側面に、新たな視点から迫ることが可能となった。こうしたアプローチは、分子認識機構に対する理解を一層深める手がかりとなると期待される。今後は、本手法をより多様な分子に適用し、その汎用性と有効性をさらに検証していきたい。

細胞膜透過性改善技術による 天然ペプチド化合物の潜在的生理活性の探索

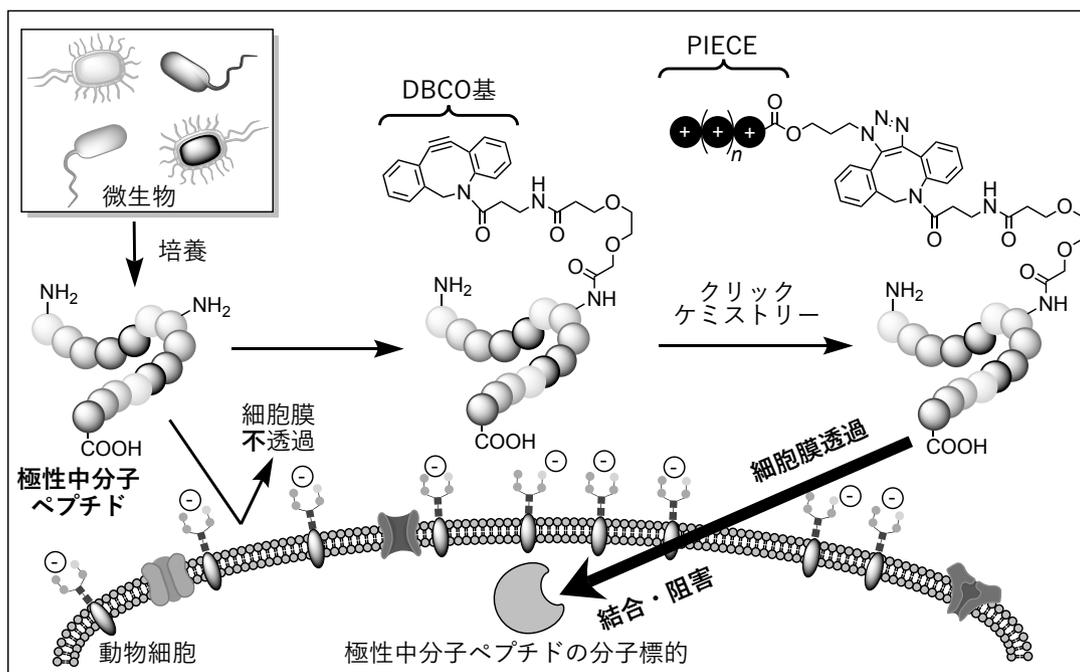
兼田 康平・鈴木 海渡・小倉 知也・長谷部 文人・丸山 千登勢・濱野 吉十*

福井県立大学大学院・生物資源学研究所

〒910-1195 福井県永平寺町松岡兼定島 4-1-1 福井県立大学大学院・生物資源学研究所

Tel: 0776-68-8171 Fax: 0776-60-6015

E-mail: y-hamano@g.fpu.ac.jp



要旨

近年の微生物ゲノム解析によって、微生物は多種多様な中分子ペプチドを生産する可能性が示された。しかし、分子量 1,000 を超える中分子ペプチドの多くは細胞膜を透過しないため、従来の生物活性を指標とした創薬シード探索では十分に探索しきれていない。本研究では、当研究室が開発した PIECE (polycationic isopeptides entering cells) を用いた細胞膜透過性改善技術 (PIECE 法という) を適用した中分子ペプチドの生物活性を検証した。バシトラシン (BAC: 分子量 1,422) とダプトマイシン (DAP: 分子量 1,620) は天然中分子ペプチドの代表化合物である。これら中分子ペプチドは、細胞膜を透過できないため動物細胞に対しては全く毒性を示さない。しかし PIECE 法を適用した BAC と DAP は、動物細胞の細胞内に送達し、アポトー

シスによる細胞死を誘導した。これは、中分子ペプチドの細胞膜透過性を改善させることで新しい生理活性を検出できた初めての成功例といえる。さらに、PIECE 法を利用することで放線菌培養液から動物細胞に対して細胞毒性を示すペプチドを同定した。

本文

近年の微生物ゲノム解析によって、微生物は予想以上に多種多様な中分子ペプチド (分子量 1,000~3,000 程度) を生産する可能性が示された。しかし、分子量 1,000 を超える中分子ペプチドの多くは細胞膜を透過しないため、従来の生物活性を指標とした創薬シード探索では十分に探索しきれていない。特に、極性の高い中分子ペプチド (極性中分子ペプチド) は細胞膜を全く透過しないため、未開拓な創薬資源と言える。すなわち、極性中分子ペプチドの細胞膜透過性を網羅的

に改善する実用的な技術を開発できれば、新しいタイプの創薬シードを獲得できるはずである。

そこで本研究において、最近我々が開発した「化合物の細胞膜透過性を改善する実用的なポリカチオン修飾技術 (PIECE 法)」を活用し、生理活性を示す極性中分子ペプチドを微生物から探索する技術開発に挑戦した。

塩基性アミノ酸を主成分とするポリカチオン性ペプチドは、分子量が 1,000 を超えるにも関わらず、優れた細胞膜透過性を示すことから細胞膜透過性ペプチド (CPP) と呼ばれる。極性中分子ペプチドを CPP でポリカチオン修飾できれば、その細胞膜透過性を改善させることができる。しかし、ポリカチオン修飾するための CPP には反応基 (アジド基など) を有機化学的に導入する必要があるが、また、CPP の合成も固相有機合成法に頼るしかない。CPP の高価な製造コストは、この種の研究における大きな障壁であったが、我々は最近、放線菌由来の天然ポリカチオン化合物である ϵ -ポリ-L- α -リジン (ϵ -P α L) 「図 1A」、および、 ϵ -オリゴ-L- β -リジン (ϵ -O β L) 「図 1B」が従来型 CPP に代わる究極的低コスト CPP として利用できることを見出した¹⁾。 ϵ -P α L と ϵ -O β L は、イソペプチド結合の繰り返し構造であるため PIECE (polycationic isopeptides entering cells) と命名し、PIECE を用いた細胞膜透過性改善技術を PIECE 法と呼ぶことにした。

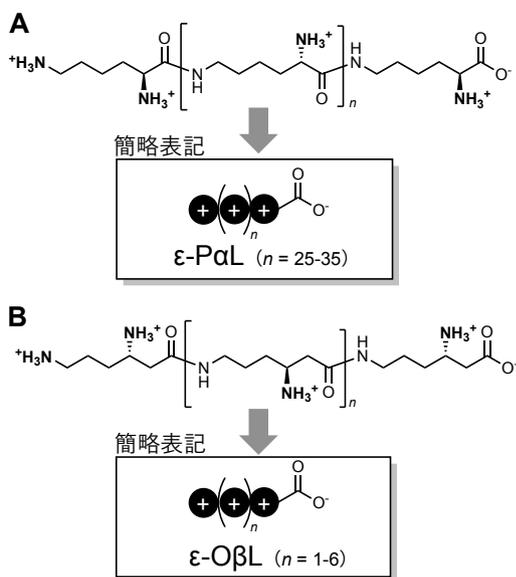


図 1. PIECE の化学構造と簡略表記

次に、PIECE 法によって実際に中分子ペプチドを動物細胞内に送達させることで新しい生理活性を見出すことができるか検証した。

バシトラシン (BAC: 分子量 1,422) とダプトマイシン (DAP: 分子量 1,620) は微生物によって生産される

天然中分子ペプチドの代表化合物である。これら中分子ペプチドは、抗菌活性を示すが、動物細胞の細胞膜を透過できないため動物細胞に対しては全く毒性を示さない。しかし PIECE 法にてポリカチオン修飾した ϵ -P α L-BAC と ϵ -O β L-BAC、そして、 ϵ -P α L-DAP と ϵ -O β L-DAP は、動物細胞の細胞内に送達しアポトーシスによる細胞死を誘導した「図 2」。

この研究成果は、中分子ペプチドの細胞膜透過性を改善させることで新しい生理活性を検出できた初めての成功例といえる。さらに、放線菌培養液から PIECE 法によるポリカチオン修飾依存的に動物細胞に対して細胞毒性を示すペプチドを新たに同定することができた。

標的分子への選択性が高い中分子ペプチドは次世代型創薬モダリティとして期待されているが、高分子医薬と同様に低い細胞膜透過性が大きな課題になっている。PIECE 法がこの課題を一挙に解決し、中分子創薬の開発スピードを加速させることを期待している。

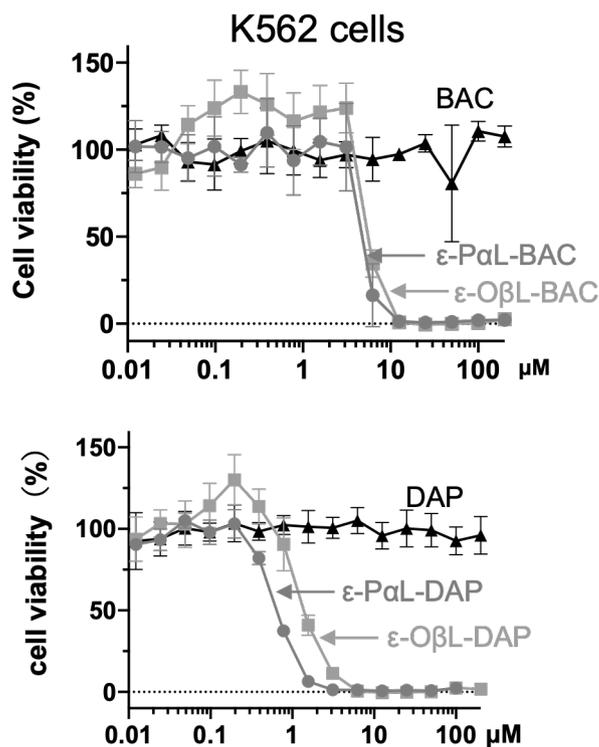


図 2. K562 細胞における PIECEBAC と DAP 細胞毒性

文 献

- 1) Takeuchi, Y., Ushimaru, K., Kaneda, K., Maruyama, C., Ito, T., Yamanaka, K., Ogasawara, Y., Katano, H., Kato, Y., Dairi, T., and Hamano, Y. *Commun. Biol.*, **5**, 1-14 (2022).

第77回(2025年)日本生物工学会大会トピックス集

2025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>