

神奈川工科大学

バイオメディカル研究センター

研究報告

第 1 号

2020 年度

目次

- ・ シャペロニンを利用した多様な培養細胞に使えるゲノム編集技術の開発

応用バイオ科学科 小池 あゆみ

- ・ バーチャル・リアリティを活用した新規分子標的型薬物送達システムの構築と制御
～ナノマテリアルを用いた分子送達におけるタンパク質性カプセルの評価と生体応用～

応用化学科 高村 岳樹

- ・ カンピロバクター・ジェジュニの新たな運動性評価方法の開発と
運動阻害薬および阻害方法のスクリーニング

管理栄養学科 管理栄養士 澤井 淳

シャペロニンを利用した多様な培養細胞に使えるゲノム編集技術の開発

研究者名：応用バイオ科学科 小池 あゆみ

1. 研究の目的

シャペロニン GroEL/GroES を使って細胞核へ核酸とゲノム編集に必要な酵素を送達する技術を開発することを目的としている。

これまでの研究で、大腸菌の GroEL/GroES 複合体の内部空洞に薬剤やタンパク質を閉じ込めて、細胞核へ輸送するための DDS（ドラッグデリバリーシステム）キャリアとして応用する技術を構築した。GroEL/GroES 複合体の空洞の蓋の役割をしている GroES の解離は、GroEL に結合した ATP が加水分解して ADP になるまでの時間（野生型 GroEL で約 8 秒）が制御している。このため、ATP の γ リン酸近傍に配置されたアミノ酸の変異体によってシャペロニン複合体の開閉時間を 8 秒から 12 日まで様々に延長したシャペロニン変異体ライブラリーを作製した。さらに、GroEL の 2 つの反応槽を片方ずつ制御して蓋することで、2 種類の内包物を別々に閉じ込めて、1 分子 GroEL の 2 つの空洞に異なる物質を閉じ込めることも可能にした。

本研究では、これまでに確立したシャペロニンを薬剤キャリアとして利用するための技術を用いて、多様な培養細胞へ応用が可能なゲノム編集技術の開発に取り組む。ゲノム編集技術は、生物が持つ遺伝子の中の目的とする場所を高い精度で切断すること等により、特定の遺伝子が担う形質を改良することができる技術として近年、国内外で研究開発が急速に進み注目されている。代表的な CRISPR-Cas9 システムを利用して DNA に二本鎖切断を導入するためには、Cas9 タンパク質（DNA 切断酵素）と、ガイド RNA の共発現が必要となる。これらをベクターに組み込み共発現するための商品も入手可能だが、必ずしも細胞内でうまく両者を発現できる訳ではない。シャペロニンは 2 つの空洞をもち、それぞれに異なる物質を内包できるため、複数種の要素を運ぶのに都合が良い。また、短時間で核へ送達し、一定時間の後に内包物を放出できることから、細胞内での遺伝子発現を介さずにゲノム編集が実現できる輸送ツールとして有望と考えられる。

2. 研究の必要性及び従来の研究

薬物の薬理効果は、特定の標的部位に薬物分子が結合し作用することによって発現されるため、薬理効果を十分に発揮するためには、必要な量を望みの時間に標的部位に送達することが重要である。薬物自身にそれらの性質を持たせることは難しく、脂質や高分子を用いたキャリアに放出制御性や標的指向性を付与する手法が試みられている。薬物送達システム（DDS）に用いられるキャリアとしては、細胞のエンドサイトーシス機能を利用して薬剤を封入したリポソームを取り込ませる研究例が多く行われている。

リポソームを DDS キャリアとして使用するためには、膜受容体へ結合するリガンド、細胞表面に露呈するタンパク質を認識する抗体を備えるなど、細胞に認識させる部分はタンパク質に担わせる手段が挙げられる。薬物送達キャリアは、毛細血管を通過できるサイズであり且つ均一な大きさであることが望ましいところ、リポソームは粒径を均一に調整することが困難であるという課題がある。また、受容体を認識担体として結合すると粒径が大きくなり毛細血管の通過等の点で問題が生じる可能性がある。更に、効率的な受容体結合も簡単ではないし、容易な開閉制御が困難である。そのため、リポソームに代わる DDS キャリアの技術開発が求められている。

シャペロニン (GroEL/GroES) は広く生物に存在するタンパク質で、生体内でストレス等で生じた変性タンパク質を空洞内に閉じ込めて凝集から保護し、さらに立体構造を再生して機能を回復させ、細胞内に放出する役割を担っている。これまで我々は、GroEL/GroES が行う「閉じ込め、保護し、放出する」反応サイクルを制御し、さらに生体の局所に「届ける」ための機能を付与し、薬物キャリアとして利用するための研究を行ってきた。シャペロニンを薬物送達キャリアとして遺伝子工学的に改変している事例は世界的にも報告はない。シャペロニンの 2 つの空洞に異なる物質を制御して内包させるためには、シャペロニンの反応機構について詳細な理解が必要である。核酸と酵素を 1 つの複合体内に内包し送達する技術は、核酸医療や細胞医薬のための細胞改変、ゲノム編集に応用できる技術となることが期待できる。

3. 期待される効果

薬剤が核内で放出され生理活性が現れることを解析し、加水分解時間の異なる GroEL 変異体を用いて薬剤効果が現れる時間の制御も可能となれば、ゲノム編集に限らず細胞形質の改変や DDS、遺伝子治療などの有用なツールとなる。

ゲノム編集は、近年急速に発展した遺伝子改変技術で、農水畜産物の品種改良や遺伝子治療などへの応用が可能であり、大きな期待が寄せられている。本研究は、ゲノム編集そのもののメカニズムに改変を加えるものではなく、その技術展開に汎用性や簡便性を付与するツールとなり得るものである。また、本研究は、ゲノム編集に限らず分子生物学分野において広く応用展開できる可能性を持つ。

4. 研究の経過及び結果・評価

核酸を輸送する際の問題点は、細胞内に入った後で分解されてしまうことである。DNA あるいは RNA をシャペロニンへ内包することで分解を防げると考え、核酸内包シャペロニン複合体を作製し、核輸送の評価を行なった。プラスミド DNA を Label IT MFP488 を用いて標識し、余剰の蛍光色素を G50 Microspin Purification Columns を用いて除去した。電気泳動したポリアクリルアミドゲルの蛍光観察により、核酸が蛍光標識されていることを確認した。二酸化ケイ素ナノ粒子 (5-20 nm)

または金ナノ粒子（5 nm）に蛍光標識核酸を結合し、蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光標識核酸が結合したナノ粒子を Cy3 標識した GroEL と混合し、その後、1mM ATP 存在下で GroES^{N-PTD/AhR} と複合体を形成し、終濃度 0.5 μ M になるよう CHL 細胞に投与した。投与してから 4.5 時間後の細胞観察で、核酸を内包したシャペロニン複合体を投与した細胞では細胞内に核酸とタンパク質のそれぞれの蛍光を検出できたが、核酸のみを投与した細胞は細胞内に核酸の蛍光は検出しなかった。このことから、シャペロニン複合体は内包した核酸を維持したまま、細胞内に送達したことが示されたが、送達効率が低いため、細胞への添加条件や細胞種間差の有無を含め検証し、総合的に核送達率向上のための改善検討が必要である。また、シャペロニン空洞内壁に正電荷を持つアミノ酸を提示する変異を導入することで、ナノ粒子を用いずにシャペロニン複体内に核酸を係留できる可能性を検討している。

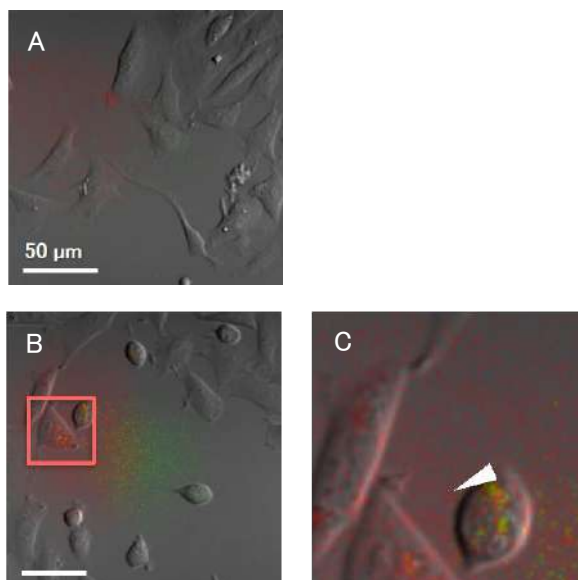


図1 核酸結合ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の CHL 細胞投与

(A) 核酸結合二酸化ケイ素ナノ粒子

(B) (C) 核酸結合二酸化ケイ素ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体

5. 今後の計画

GroEL^{D52, 398A}/GroES のフットボール型複合体の 2 つの空洞は、1 つめの空洞に ADP を用いて GroES を結合させ、後からもう片方の空洞に ATP を用いて GroES を結合させると、異なる物質をそれぞれの空間に順番に閉じ込めることが可能である。ゲノム編集に必要となる 2 種の化合物（分子）を 1 分子のシャペロニンカプセルに内包した GroEL、GroES、核酸、タンパク質からなる四者複合体の形成を行う。

6. 研究成果の発表

1. 増田恵, 村越のどか, 依田ひろみ, 小池あゆみ, Asp73 と Asp420 は酵母ミトコンドリ

ア Hsp60 の ATP 加水分解に重要な役割を果たすー 材料分析室利用研究成果, その
XXXI (1) -, 神奈川工科大学研究報告.B, 理工学編, 45, 27-33 (2021).

2. 加賀美 奈音, 増田 恵, 丹羽 達也, 田口 英樹, 小池 あゆみ

Thermus thermophilus GroEL の熱ストレスにより誘導されるリン酸化部位の同定, 第
93 回日本生化学会大会 (オンライン開催), 2020. 9. 14-16.

3. 依田ひろみ, 安倍和弥, 武尾英哉, 高村岳樹, 小池あゆみ

画像認識技術を利用した小核計測アプリケーションの開発, 日本環境変異原学会第 49 回
大会 (Web 発表), p. 90, 2020. 11. 26-27

4. 右田 恵, 前川 真純, 依田 ひろみ, 玉腰 雅忠, 小池 あゆみ

Thermus thermophilus IV型線毛複合体のATPase 誘導による立体構造変化, 第 43 回日本
分子生物学会年会 (オンライン開催), 2020. 12. 1-3

5. 前川 真純, 右田 恵, 依田 ひろみ, 小池 あゆみ

ATPase に誘導される *Thermus thermophilus* IV 型線毛複合体の構造変化, 第 9 回 日本
生物工学会 東日本支部コロキウム (オンライン開催), 2021. 3. 5

バーチャル・リアリティを活用した新規分子標的型薬物送達システムの構築と制御

～ナノマテリアルを用いた分子送達におけるタンパク質性カプセルの評価と生体応用～

研究者名：応用化学科 氏名 高村岳樹

1. 研究の目的

炭素素材系の材料であるフラーレンやナノダイヤモンドを担体として用いる薬物輸送の研究はこれまでも広く行われてきており、それらの効果の有効性は大いに示されて来たが、これらをもちいた応用研究はこれまで限定されている。例えば、アミノ化されたフラーレンを遺伝子輸送担体として用い、効果的に実験動物のがんを縮小させる例やナノダイヤモンドに抗がん剤であるドキソルビシンを吸着させた系での抗がん作用の生体内持続性の延長効果などの今後の治療応用に期待される研究成果が報告されている。特にナノダイヤモンドはその表面にいくつかの官能基を有しており、それらを制御することで、イオン性の化合物を表面に担持できる利点を有している。そこで、遺伝子送達の第一の系として蛍光性オリゴヌクレオチドに着目し、その細胞内送達について検討した

2. 研究の必要性及び従来の研究

遺伝子治療に用いられる遺伝子送達の系においては、現在、多くの研究が行われているものの、その方法論はウィルスにターゲットとなる遺伝子を組み込ませるもの、リポソームまたは合成ポリマーミセルなどに限られている。中でも界面活性剤ペプチドがマイクロ RNA (miRNA) の担体として用いられている系はその有用性から国内においてすでにその複合体を用いた治験が開始されている。遺伝子治療においては、遺伝子 (DNA または RNA) が、体内を送達中に DNase や RNase などの加水分解酵素により破壊されるのを防ぐ必要があり、この目的のために、多くの提案がなされている。一方で、任意の遺伝子を局所的に送達する技術はこれまでに報告例が極めて少ない。一方で、これらの研究の応用展開は極めて限定的であり、その一因としては「水溶性薬剤」としての利用の限界であると考えられる。すなわちナノ炭素化合物の水溶性の低さが、動物実験を用いた *in vivo* の実験を行う際の障壁となっている。

3. 期待される効果

ナノ炭素化合物のいくつかは蛍光性物質の蛍光発光を減弱させることが知られている。そのため、短鎖 DNA に蛍光ラベルをもちいた FISH 法 (蛍光オリゴヌクレオチドを用いた細胞内の遺伝子発現解析) が可能である。また同様の手法を用いて細胞内の遺伝子発現の抑制 (RNA 干渉) について検討を行う。一方でナノ炭素化合

物の表面修飾と遺伝子送達効率の関連性については、これまでに明快な結論が得られていないため、いくつかの修飾体を用意して、それらの細胞内送達の効率について、その関連性を明らかにする。手始めにはナノダイヤモンドを用いて、その生理条件での吸着様式の解明や、表面修飾（アミノ酸修飾など）による、吸着定数の変化などの基礎的なデータを提供する。ナノ炭素化合物の遺伝毒性（細胞障害性）については不明な点も多くその検討を合わせて行う。

4. 研究の経過及び結果・評価

ナノダイヤモンドに蛍光性オリゴヌクレオチドを吸着させ、細胞内へ搬送可能か検討を行った。用いたナノダイヤモンドはゼータ電位（+）と（-）のものをを用いた。まずナノダイヤモンドのみを投与した際の細胞毒性について検討した結果 50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度から CHL/IU 細胞に対して毒性が現れることを確認した。この濃度はゼータ電位に関わらず同様であった。

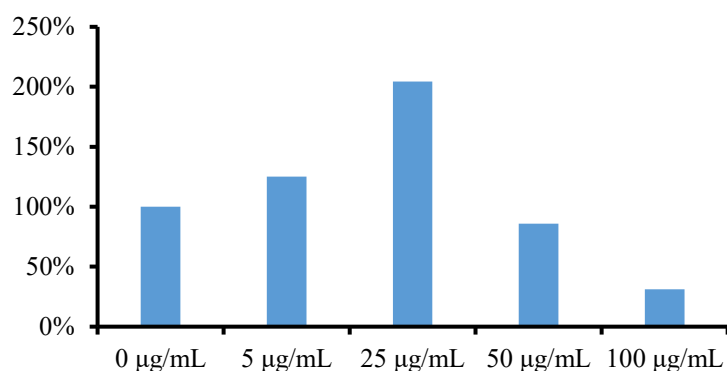


図1 ND $\zeta(-)$ の細胞毒性

次にナノダイヤモンド分散液（2 mg/mL ）に蛍光性オリゴヌクレオチド（10 μM ）を添加し、24時間放置後、遠心分離で回収したオリゴヌクレオチド吸着ナノダイヤモンドを CHL/IU 細胞に投与した。ナノダイヤモンドには調整したオリゴヌクレオチド（100nM）の約20%が吸着されていると計算された。細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡下で観察した（図2）。ナノダイヤモンドが系中に分散されるため広く蛍光が観察されたが、ナノダイヤモンドが細胞内に取り込まれている細胞も観察された。蛍光標識物質として、FAM と TAMRA を用いたが TAMRA で標識したオリゴヌクレオチドのほうが取り込まれている細胞像が多く観察された。一方で、取り込みが確認されている細胞は丸い形状をしているものが多く、ND を取り込んだ細胞に対して障害が生じている可能性を示している。今回用いたオリゴヌクレオチドは37塩基（FAM）および40塩基（TAMRA）のランダム配列を使用しているが、細胞死はオリゴ配列に影響される可能性も考えられた。

図2 FAM 標識オリゴヌクレオチド吸着ナノダイヤモンドの細胞内送達

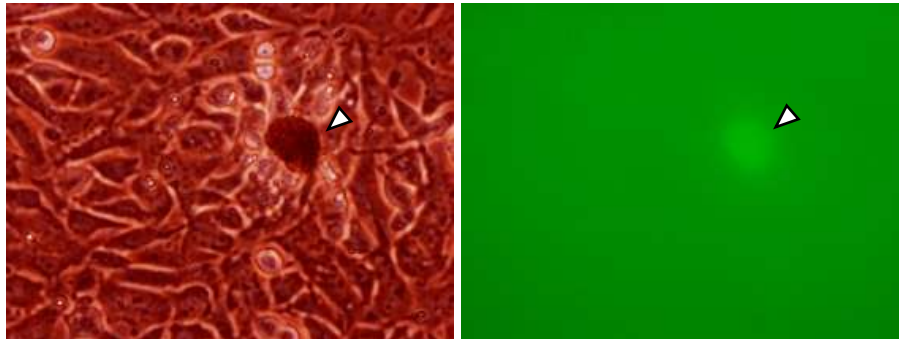
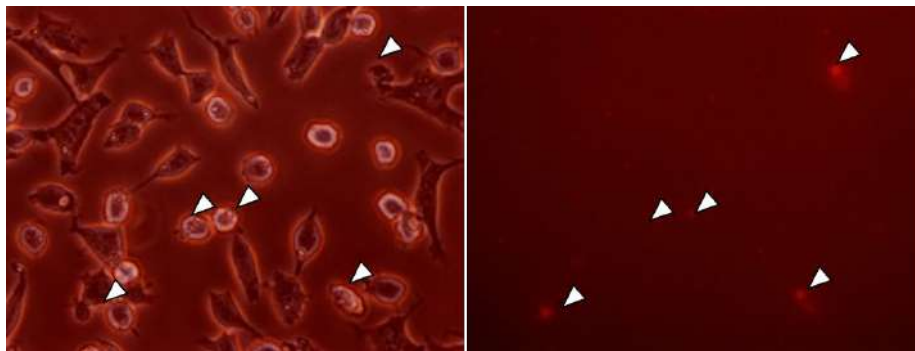


図3 TAMRA 標識オリゴヌクレオチド吸着ナノダイヤモンドの細胞内送達



5. 今後の計画

細胞内へオリゴヌクレオチドを送達できることが明らかとなったため、RNAi 効果などの機能性のオリゴヌクレオチドの送達を試みる。また、タンパク質性カプセルを用いた核内送達についても検討を行う。

6. 研究成果の発表

1. Takeshima H, Niwa T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Iida N, Wakabayashi M, Nanjo S, Abe M, Sugiyama T, Kim YJ, Ushijima T. J TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation. Clin Invest. 2020 Oct 1;130(10):5370-5379. doi: 10.1172/JCI124070.
2. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2020 Jul 20;33(7):1907-1914. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00098.

3. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-*N*⁴-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021 Mar 15;34(3):912-919. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00536. Epub 2021 Feb 15.
4. 三崎 健太郎, 高村 岳樹, 高野 裕久, 井上 健一郎 上皮細胞における抗原下生体応答増強活性に対する検出法の確立と多環芳香族化合物 への適用 日本環境変異原学会第 49 回大会 (沼津)
5. 小林 琢磨, 田島 悠也, 豊田 武士, 岸本 真治, 松下 幸平, 山田 貴宣, 小川 久美子, 渡辺 賢二, 高村 岳樹, 戸塚 ゆ加里, 若林 敬二, 三好 規之 *o*-Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索 日本環境変異原学会第 49 回大会 (沼津)
6. 依田 ひろみ, 安部 和弥, 武尾 英哉, 高村 岳樹, 小池 あゆみ 画像認識技術を利用した小核計測アプリケーションの開発 日本環境変異原学会第 49 回大会 (沼津)

カンピロバクター・ジェジュニの新たな運動性評価方法の開発 と運動阻害薬および阻害方法のスクリーニング

研究者名：管理栄養士 澤井淳

1. 研究の目的

細菌性食中毒においてカンピロバクターの発生件数は現在 1 位であり、効果的な対策が見つかっていない。カンピロバクターは熱や乾燥に対する耐性は低いものの、微好気性細菌であるため、高い運動性により表面から表面近傍の食品内部に移動し、バイオフィームを形成し食中毒・感染症の原因となる。そのため本菌が表面から食品内部への移動を抑制することが、極めて重要な食中毒・感染症予防になり、つまるところ、カンピロバクターの運動性を阻害することがキーポイントとなる。本研究では、従来の 2 次元での細菌の運動性評価ではなく、濾紙を利用し食肉・食材中への移動を想定した細孔中での 3 次元的条件下での運動性＋バイオフィーム形成能の評価方法の確立を第一の目的とする。そして、この評価方法を利用し、カンピロバクターの運動性の阻害に有効な天然抗菌物質および濃度、また物理的非加熱手法のスクリーニングを行う。さらに、実際の食肉を利用して、食肉表面にカンピロバクターを塗布し、天然抗菌物質および物理的処理を行い、運動性が阻害できるかどうか検討し、カンピロバクターの新たな制御手法を提示することを最終目的とする。

2. 研究の必要性及び従来研究

カンピロバクターは両端に鞭毛を持ち、活発に運動する菌である。この高い運動性が食品内部への移動を可能としている。しかし食中毒・感染症の元となる環境中でのカンピロバクターの運動性の研究は、決して多くない。特にその運動性は寒天平板上での 2 次元での泳動能力のみで評価されている¹⁻³⁾。この評価では菌が寒天平板上で形成したコロニーが大きければ、2 次元的に広範囲に泳ぐことができ、運動性が高いこととなる。しかし、食品は 3 次元の構造であり、表面の毛穴や細胞のすき間、微細な傷の中を泳動し食品内部に入り込んで BF を形成する能力を評価しなければ、実際の食品への感染能力の評価をすることはできない。大腸菌や枯草菌なども鞭毛を有し高い泳動能力を持っている。これらの菌との 2 次元での相対的な評価だけでは、カンピロバクターの食品への侵入および現在の食中毒の拡大は説明できない。カンピロバクターの運動特性を食品中への移動を想定した系において、運動の方向性や細孔中などの 3 次元な条件下での運動性をどのように評価し、カンピロバクターの制御に繋げるかということが必要とされている。

3. 期待される効果

従来の寒天平板を使用に加えフィルターを使用し 3 次元の運動性と BF 形成を評価出来る新しい技術を開発する。こうした新しい技術は菌を死滅させるという従来の評価だけで

なく、運動性を阻害するという新たな制御方法を提示し、微生物制御および食品衛生分野全体に波及効果をもたらすと期待される。

4. 研究の経過及び結果・評価

今年度は、コロナ禍による前期期間の入構制限に加え、管理栄養士養成課程における臨地実習（前期の予定が10月に移行）、11月末に卒業論文提出が重なり、実験データの取得は非常に困難であった。その中で、1年目「カンピロバクターの運動性の評価方法の開発」に取り組んだ結果を以下に示す。

CCDA 平板に形成した *C. jejuni* のコロニー上に、滅菌済みのろ紙（pore size: 0.3 μ m）を置き2日間培養した(図1)。コロニー上でろ紙の色が変わり、ろ紙上にコロニーが形成されていた。このときのBFをSEM観察した。図2Aは未使用のろ紙であり、poreが明確に観察された。図2Bがろ紙の上のBFを観察したものである。細胞外物質と菌体が繋がっており、濾紙のporeが覆われているのが分かる。同様な *C. jejuni* のBFをJoshua et al. (2006) も観察している⁴⁾。このろ紙上のBF部分を白金耳で軽く掻き取り、グラム染色し顕微鏡観察すると、らせん状の桿菌が確認された。これは、*C. jejuni* が寒天表面からporeを通り抜けろ紙表面まで移動し、さらに増殖しBFを形成していることを意味する。また、pore sizeが0.3 μ mのニトロセルロース膜でも同様に *C. jejuni* の移動が確認され、BFを形成した。pore sizeが0.2 μ mでは移動は観察されなかった。一方、大腸菌および枯草菌では0.45 μ mのpore sizeのろ紙でもBFの形成は観察されなかった。以上より、本手法は、*C. jejuni* 特有の運動性の評価方法として、極めて有効であり、1年目の目標はほぼ達成できたと言える。

次に、セルロース膜（厚さ：140 μ m、孔径：0.3 μ m）を1枚～15枚まで積み重ねて、移動距離を測定したところ、1枚～10枚の厚さで膜表面にBFがみられた。1～10枚目までのろ紙表面に形成されていたBFから釣菌し、グラム染色したところ、*C. jejuni* が確認できた。したがって、*C. jejuni* はセルロース膜を10枚厚（1400 μ m）まで垂直移動が可能であることが分かった。

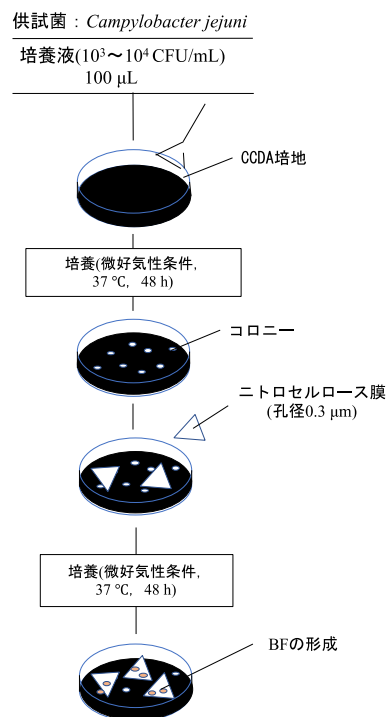


図1 評価方法

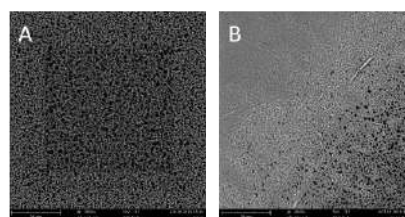


図2 *C. jejuni* BFのSEM画像
A: ろ紙 B: *C. jejuni* BF

5. 今後の計画

本研究のタイムテーブルは以下の通りである。

1. カンピロバクターの運動性の評価方法の開発（2020 年度）
2. 運動性を阻害する天然抗菌物質および物理的処理方法のスクリーニング
3. 実食肉における評価

2021 年度においては

- 1) カンピロバクターの運動を阻害する天然物質の MIC 測定

天然抗菌物質としては、ポリフェノール、ナイシン、ポリリジン、焼成貝殻カルシウム、エッセンシャルオイル等を想定している。*C. jejuni* に対する最少発育阻止濃度（MIC をボルトン選択培地で測定し、使用濃度の目安とする。

- 2) 物理的手法

電氣的な処理として、パルス処理、プラズマ処理、紫外線処理等を行う。

- 3) スクリーニング

1), 2) の処理を行う。運動性の評価として、本年度開発した手法を用いる。ろ紙上に移動して BF を形成できるかどうか、重ねたろ紙の何枚目までの距離を移動できるかで評価する。以上より、処理の効果を濃度、移動距離、BF の形成能から判定することが可能と考える。

6. 研究成果の発表

コロナ禍でつたため、学会等も中止となっており、研究成果の発表は行うことができなかった。

文献

- 1) Kodaka, H., Armfield, A. Y., Lombard, G. L., and Dowell, V. R. (1982) Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *Journal of Clinical Microbiology*, **16**, 948-952.
- 2) Szymanski, C. M., King, M., Haardt, M., and Armstrong, G. D. (1995) *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, **63**, 4295-4300.
- 3) Karim, Q. N., Logan, R. P., Puels, J., Karnholz, A., and Worku, M. L. (2017) Measurement of motility of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* by real time computer tracking using the Hobson BacTracker. *Journal of Clinical Pathology*, **51**, 623-628.
- 4) Joshua, G.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V., and Wren, B.W. (2006) Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **152**, 387-396.