

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 2 号

2021 年度

目次

- ・スマート創薬に向けたバイオリアクタプラットフォーム技術の開発
～多様な酵素触媒の活性を持続可能にするシャペロニン包括固定化技術～

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 澤井淳

スマート創薬に向けたバイオリアクタプラットフォーム技術の開発 ～多様な酵素触媒の活性を持続可能にするシャペロニン包括固定化技術～

研究者名：応用バイオ科学科 小池 あゆみ

1. 研究の目的

医薬品、化成品、農薬、食品に利用する有機化合物（ファインケミカルズ）の構造は複雑化し、合成開発の期間や研究費用が膨大になる課題がある。酵素反応は複雑な化合物も異性体なく合成し、温和な反応条件ですすむ環境に優しい技術である。しかし、酵素は環境変化で変性しやすく、このことは酵素利用における決定的弱点である。本研究では、分子内空洞に多様な酵素を内包することが可能なシャペロニン GroEL を基板に固定化し、その固定化シャペロニンに目的酵素を内包させることで間接的固定化を簡便に行う方法の開発に取り組む。多様な固体表面に対する生体分子の固定化技術はライフサイエンス分野の中核技術の1つであり、機能を維持した状態で効率よく固定化することが求められているが、酵素毎の直接固定化方法の検討が必要であることに加え、多くの場合その機能が低下する可能性が高い。本方法では、個々の酵素毎の直接固定化方法の検討が不要となり、固定化による変性或化学的修飾による酵素の機能低下がないため、多様な酵素を対象とした汎用性のあるバイオリアクタプラットフォームが構築できると考えている。更に、シャペロニンのタンパク質再生能力により、自己修復可能な保存性の高い持続的バイオリアクタプラットフォームを開発し、新規物質生産のためのチップ開発を目指している。

2. 研究の必要性及び従来の研究

代表的酵素の固定化技術のうち、主となるのは物理吸着で、簡便ではあるが、酵素の向きを制御できず不活性化してしまう可能性もあり、また酵素の脱離も生じるため、高い機能維持が実現できない問題がある。包括法では、酵素の固定化量の再現性に問題があり、また基質が膜内を拡散してしまう為に、測定時間がかかるという課題がある。一方、担体結合法は既に医療用、食物用、環境計測用にと開発が進められているが、酵素分子の官能基を利用して直接基板に固定するため、酵素分子が化学的に変化して活性が低下するという課題がある。また、固定化した酵素と固体表面との相互作用により立体構造変化の障害が生じてその機能が低下する場合もある。そこで、ストレプトアビジン-ビオチンやヒスチジンタグ-Ni-NTA、グルタチオン-GST (Glutathione S-Transferase) など生体分子の特異的な相互作用を利用して、酵素ととを結合させる手法もいろいろと報告されている。

さらに機能的な生体分子固定化法のために、生体分子と固定化基材表面との直接的な相互作用を緩和させる目的で、介在タンパク質をクッション材として挿入した例もある。

Protein Data Bank (PDB) に登録された 10 万件を超えるタンパク質から①安定でコンパクトな構造をもち、②構造がシンメトリックであり、③末端の位置がアフィニティタグやタンパク質の連結に適していることを指標にクッションタンパク質候補を検索し、いくつかの候補分子を見出している。

シャペロニンを経験した酵素固定の『足場』として酵素固定化チップに応用した研究はこれまでにない。シャペロニンはその空洞内に別のタンパク質を閉じ込めるが、閉じ込められたタンパク質は空洞内では化学的修飾もなく、固定もされていない。また、シャペロニン内には広範囲のタンパク質が内包できるため、シャペロニンの固定化技術さえ確立できれば内包酵素の種類による検討が必要ない。さらにシャペロニンの本来の機能から、内包したタンパク質を変性しないよう守るだけでなく、変性後に修復できると期待でき、酵素固定化技術の新しい基盤分子として期待できる。

3. 期待される効果

本研究は、以下の点で技術的優位性が期待できる。

- ① 酵素活性持続性：シャペロニン複合体の開閉時間制御法を見出し、長時間維持変異体ライブラリーを保有している。
- ② 酵素反応効率：シャペロニンに内包した酵素は、放出されなくても酵素触媒反応でき、生成物遊離が可能である。
- ③ 固定化酵素の多様性：シャペロニンは推定で 60kDa までの大きさの多様なタンパク質、化合物、直径 8 nm までの金属ナノ粒子を内包可能である。
- ④ 変性酵素再生能：シャペロニンは変性した酵素の再生を介助する性質をもつ。
- ⑤ メンテナンス効果：キレート剤の添加で Mg^{2+} を除くと、内包物をシャペロニンから強制的に放出できるため、シャペロニンの足場は再利用し、継続使用で傷んだ酵素は放出して新しい酵素と入れ替えるメンテナンスができる。

4. 研究の経過及び結果・評価

複合体寿命が 12 日に延長された GroEL^{D52, 398A} 変異体、およびリング開口部に Cys 残基が挿入された GroEL^{E308C} 変異体を用いて、ガラスとマイカの表面に GroEL を単層に固定する条件を検討した。1 μ M GroEL^{D52, 398A} を 15 分または 5 分間静置したガラスとマイカ表面には、GroEL 粒子が一面に結合して観察できた。5 分間静置に比べて 15 分静置したガラス表面では、積層した GroEL 画像が観察された。GroEL^{D52, 398A} の濃度が 0.1 μ M では、ガラス、マイカともに GroEL の結合は疎であったが、5 分間静置を 2 回繰り返すことで、ガラス表面に均等に結合させることができた (図 1)。平均試料高は 10 nm 前後で、乾燥により GroEL 結晶構造の値 (高さ 18 nm、幅 14 nm) より小さくなったと考えられた。

次に、GroEL に内包された酵素活性の安定性をロダネーゼを用いて検証した。1 μ M

GroEL、2 μM Rhodanese、25 mM Na₂S₂O₃、250 mM Glucose を HKM Buffer に添加し、15 分間 60°C で熱処理した後、2 μM GroES、1 mM ATP を添加して、0~6 日間反応液を 5 μL ずつ分取し、ロダネーゼ活性を測定した。その結果、GroEL を加えた反応液では 6 日後もロダネーゼ活性を保持したが、加えていないものは 80 時間まで徐々に活性が低下し、それ以降はほとんど活性を失った (図 2 A)。30 分間の熱処理後の残存活性においても、GroEL への内包下では 50°C まではほとんど活性に変化はなく、GroEL への内包による酵素の安定化が証明できた (図 2 B)。

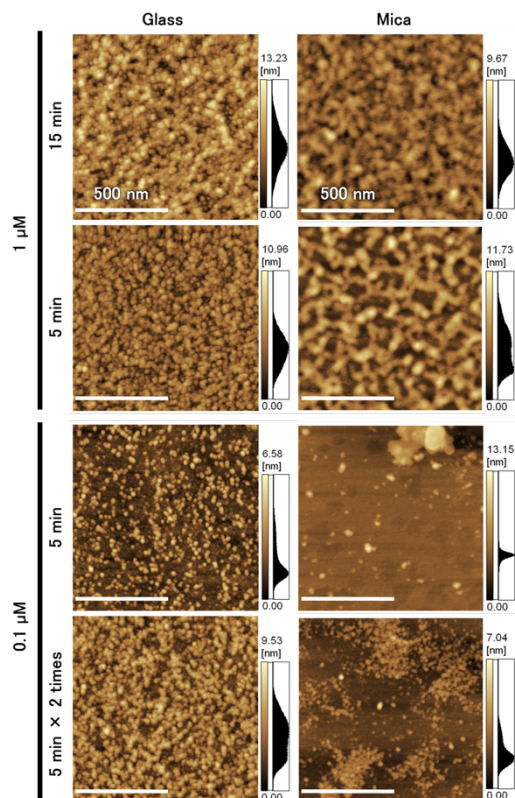


図1 固体基材表面 GroEL の SPM 観察像

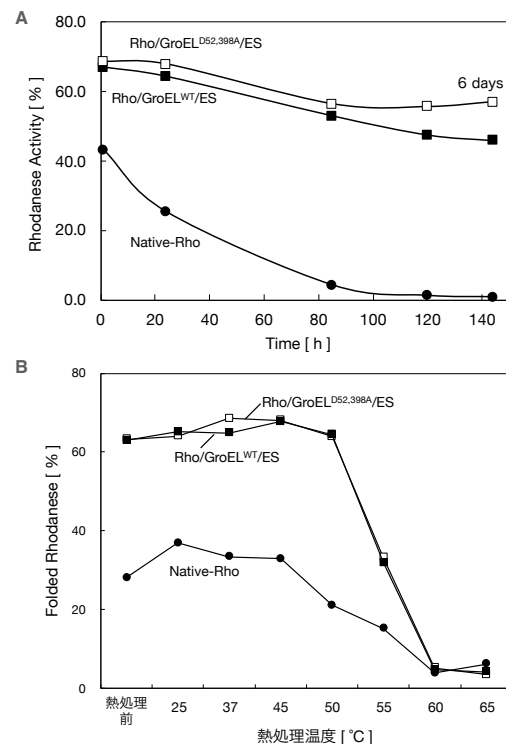


図2 GroELに内包したロダネーゼの安定性

(A) ロダネーゼ活性の経時変化
(B) 熱処理後のロダネーゼ活性

5. 今後の計画

GroEL^{D52,398A} をガラスおよびマイカ表面に一層で結合する至適条件を決定した。今後は、ロダネーゼを平板固定 GroEL に内包し酵素活性を測定するとともに、その際の酵素安定性が、固定の有無で変化するかどうか検証する。

6. 研究成果の発表

論文発表

1. Yoda H., Koike-Takeshita A., TEM and STEM-EDS evaluation of metal nanoparticle encapsulation in GroEL/GroES complexes according to the reaction mechanism of

chaperonin., *Microscopy*, 70(3), 289-296 (2021)

学会発表

1. 増田 恵, 野村 弥南, 村越 のどか, 義原 千花歩, 小池 あゆみ, GroELに対するコシヤペロニンの互換性を決定する結合強度, 第21回日本蛋白質科学会年会, オンライン, 2021年6月
2. 義原 千花歩, 加賀美 奈音, 増田 恵, 小澤 秀夫, 丹羽 達也, 田口 英樹, 小池 あゆみ, 熱ストレスにより誘導されるGroELのリン酸化部位の同定と動的構造変化予測, 第94回日本生化学会大会, オンライン, 2021年11月
3. 義原 千花歩, 小澤 秀夫, 丹羽 達也, 田口 英樹, 小池 あゆみ, 熱ストレスにより誘導される GroEL のリン酸化と動的構造変化予測, 第10回日本生物工学会東日本支部コロキウム, オンライン, 2022年3月10日(ポスター賞受賞)
3. 前川 真純, 右田 恵, 依田 ひろみ, 玉腰 雅忠, 小池 あゆみ, *Thermus thermophilus* IV型線毛複合体のATP加水分解酵素に誘導される構造変化と機能解析, 第44回日本分子生物学会年会, 現地(神奈川), 2021年12月2日
4. 前川 真純, 右田 恵, 依田 ひろみ, 玉腰 雅忠, 小池 あゆみ, *Thermus thermophilus* IV型線毛複合体のタンパク質間相互作用の解析, 第10回日本生物工学会東日本支部コロキウム, オンライン, 2022年3月10日

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 高村岳樹

1. 研究の目的（以下タイトルは、11 ポイント、MS ゴシック）

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するとともに、いくつかの炭素素材の有用性について検討した。

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

いくつかのナノ炭素素材について検討を行った。用いたものはナノコロイドグラフェン、蛍光性グラフェン、ナノダイヤモンドであり、いずれも市販のものを用いた。用いた細胞は CHL 細胞である。このうち、ナノコロイドグラフェンは細胞毒性が強く、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度での投与により、細胞が 80 % 程度死滅した。しかしながらそれ以上の濃度の投与においても 80 % 以上の細胞死は観測されなかった。蛍光性グラフェンは、サイズが大きいため、細胞内への侵入は観測されなかった。しかしながら、細胞に対する毒性は有しており、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の濃度で約半数の細胞が死滅した。一方、ナノダイヤモンドは両者の化合物の中間に位置する細胞毒性能力を示した。用いたナノダイヤモンドでは約 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での半数致死値を示したが、1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では 80% 以上が生存しており、その間での細胞処理は可能であることがわかった。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、細胞へ投与したところ、オリゴヌクレオチドは細胞質全体に分布し、一部核の周辺に集積する様子が観測された。このため、ナノダイヤモンドは細胞内へ侵入することが可能であることがわかった。またナノグラフェンの細胞毒性は、そのメカニズムが不明であるため、より詳細な検討が必要となる。さらの今後ナノダイヤモンドの分散性などを調整することでより扱いやすい担体となることが期待される。

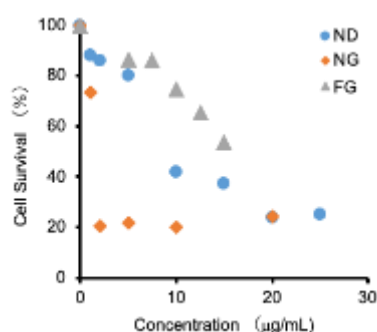


図 ナノ炭素素材の細胞毒性

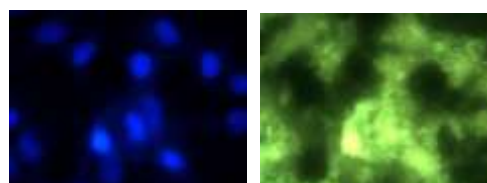


図 蛍光性オリゴヌクレオチド担持ナノダイヤモンドの細胞内送達

5. 今後の計画

細胞内へ適したナノ炭素素材の選出が可能となった。またオリゴヌクレオチドを十

分に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) Hiroaki Kaneko, Shin-ichi Ishiwata, Yeon Jae Bae, Takeji Takamura-Enya, Genetic characteristics and phylogeography of the habitat generalist mayfly *Ecdyonurus yoshidaei* (Ephemeroptera: Heptageniidae) in the Japanese archipelago, *Entomological Research* 51(5):38-250.
- (2) Hiromi Yoda, Kazuya Abe, Hideya Takeo, Takeji Takamura-Enya, Ayumi Koike-Takeshita, Application of image recognition techniques for automated micronucleus detection in the in vitro micronucleus assay. *Genes and Environment* (submitted)
- (3) Takuma Kobayashi, Takeshi Toyoda, Yuya Tajima, Shinji Kishimoto, Yuta Tsunematsu, Michio Sato, Kohei Matsushita, Takanori Yamada, Yuko Shimamura, Shuichi Masuda, Masako Ochiai, Kumiko Ogawa, Kenji Watanabe, Takeji Takamura-Enya, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Noriyuki Miyoshi
- (4) *o*-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. *Chemical research in toxicology* 34(3): 912-919

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：管理栄養学科 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、バイオフィルムを形成し食中毒・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・感染症予防につながり、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＋バイオフィル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处理を行い、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バイオフィルム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

従来の寒天平板の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

昨年度（2022 年）は、濾紙（0.3, 0.45 μm）を利用して、細孔中を通した 3 次元的条件下での、*Campylobacter jejuni* の運動性の評価方法の確立が達成出来た(図 1)。今年度は、その評価方法を用いて、*C. jejuni* の運動性の阻害物質をスクリーニングすることを目的とした。ただし、コロナ禍により、0.45 μm 孔径の滅菌用フィルターの需要が逼迫し、入試困難となった。そこで、今年度は 0.3μm 孔径のろ紙のみを用いて行った。

対象物質として、エッセンシャルオイルであるタイムチモールとオレガノワイルドを使用した。エッセンシャルオイルを無水エタノール（1 mL）に溶解後、滅菌水で希釈して 50 %水溶液を調製した。供試菌として *C. jejuni* ATCC 29428 を使用した。約 10⁵ CFU/mL に調製した菌液を CCDA 培地に塗布し、培養（微好気条件、37℃, 48 h）した。形成したコロニーの上に 0.3 μm のニトロセルロース製のろ紙を 1 枚のせた。シャーレの蓋に調製したオレガノワイルドまたはタイムチモール水溶液を染み込ませた 10 mm 径 のペーパーディスクをのせ、蓋をした。CCDA 培地にパラフィルムを巻くものと巻かないものを分けて作り、培養（微好気性条件、37℃, 48 h）した。培養後、CCDA 培地のろ紙上のコロニーを目視で観察した。なお、1 枚のペーパーディスクに対し 100 μL のタイムチモールおよびオレガノワイルドをそれぞれ染み込ませ、1~3 枚蓋に置いた場合を検討した。

消毒用アルコール(70%)は、培養（微好気性条件、37℃, 48 h）した *C. jejuni* のコロニーに 70 %アルコールを噴霧した。その上に 0.3 μm のろ紙を 1 枚のせ、培養（微好気条件、37℃, 48 h）した。なお、アルコールは 1 回の噴霧を 100 μL とし、1~3 回と検討した。

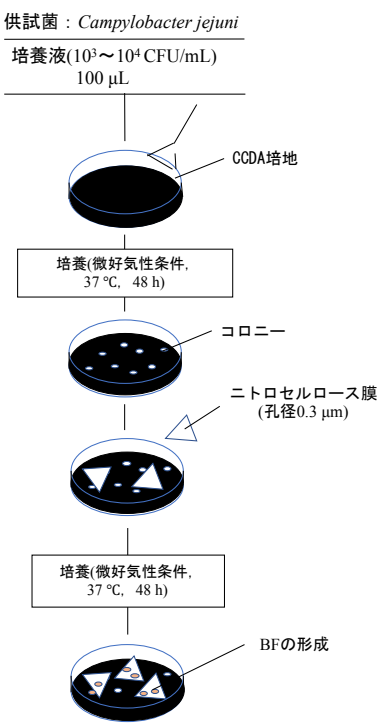


図 1 評価方法

表 1 *C. jejuni* の運動性に精油が及ぼす影響

	100μL		200μL		300μL	
	①	②	①	②	①	②
コントロール(滅菌水)	○	○	○	○	○	○
オレガノワイルド	×	○	○	×	×	×
タイムチモール	○	○	○	×	×	×

○:コロニーが形成された ①: パラフィルム有り
×:コロニーが形成されなかった ②: パラフィルム無し

表 2 *C. jejuni* の運動性に消毒用エタノール(70%)が及ぼす影響

	100μL	200μL	300μL
コントロール(滅菌水)	○	○	○
70%アルコール	○	○	○

表 1 より、コントロール全てにコロニーが形成されていることから、パラフィルムの有無は実験に影響を与えないと考えた。100 μL のタイムチモールおよびオレガノワイルドを染み込ませた場合では①, ②ともにコロニーが形成されていた。しかしながら、200 μL の場合ではパラフィルムをつけた①のみでコロニーが形成された。300 μL の場合では①, ②ともにコロニーを形成しなかった。タイムチモールおよびオレガノワイルドは、エッセンシャルオイルであり揮発して抗菌活性を示す。従って、一定の揮発濃度以上で *C. jejuni* の運動性を阻害できる可能性が示唆された。

一方、100 ~ 300 μL の 70 %アルコールを噴霧しても全てでコロニーを形成した (表 2)。これは、CCDA 培地に *C. jejuni* を生育するための十分な栄養分および水分が存在し、アルコールの作用が消失したためだと考える。従って、食品工場において噴霧しているアルコールは *C. jejuni* の運動性を阻害するには有効な手段とはいえないことが分かった。

本研究において、*C. jejuni* の運動性を阻害する物質のスクリーニングが可能であることが示唆された。

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(2021 年度)
3. 実食肉における評価 (2022 年度)

ただし、本学の学内研究資金配分の配分方針の変更により、本研究への予算は、今年度(2021 年度)をもって打ち切りとなり、本研究も中止となる。

6. 研究成果の発表

- Tsukada, H., Akimoto, T., Fukikoshi, N., Wada, R., and Sawai, J.: Antibiofilm effects of heated scallop-shell powder on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Membranes*, **12** (1) 43 (2022. 1)

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.