

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発
Title(English)	
著者(和文)	伊藤良浩
Author(English)	Ito Yoshihiro
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12498号, 授与年月日:2023年6月30日, 学位の種類:課程博士, 審査員:北口 哲也,中村 浩之,西山 伸宏,和地 正明,石田 忠,中野 秀雄
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12498号, Conferred date:2023/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和五年度 学位論文

微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いた
タンパク質高生産株スクリーニング法の開発

主指導教員 北口 哲也 准教授

東京工業大学 生命理工学院

生命理工学系 ライフエンジニアリングコース

伊藤 良浩

目次

略語表

第一章「緒言」

1-1. 本研究の背景	2
1-1-1. 微生物を宿主としたバイオ医薬品タンパク質分泌生産の課題	2
1-1-2. マイクロドロップレットを用いたハイスループットスクリーニング法	4
1-1-3. バイオセンサーによる分泌タンパク質検出	6
1-1-4. Quenchbody	9
1-2. 本研究の目的	10
1-3. 本論文の概要	11
1-4. 参考文献	14

第二章「Q-body をバイオセンサーとした微生物分泌タンパク質の検出」

2-1. 緒言	19
2-2. <i>C. glutamicum</i> BGPc7 融合 FGF9 分泌生産株の構築	20
2-3. <i>C. glutamicum</i> 分泌 BGPc7 融合 FGF9 を用いた Q-body assay	22
2-4. 培養液に分泌された BGPc7 融合 FGF9 の Q-body 検出	24
2-5. 第二章のまとめ	27
2-6. 参考文献	29
2-7. 実験項	30

第三章「Q-body を用いたエマルション内タンパク質濃度の測定」

3-1. 緒言	38
3-2. W/O エマルション作製条件検討	40
3-3. W/O/W エマルション作製条件検討	42
3-4. W/O/W エマルションへのタンパク質封入試験	44
3-5. Q-body を用いた W/O/W エマルション内封タンパク質の測定	45
3-6. 第三章のまとめ	48
3-7. 参考文献	49
3-8. 実験項	50

第四章「エマルション培養と Q-body を用いたタンパク質分泌株スクリーニング法」

4-1. 緒言	54
4-2. W/O エマルションへの菌体封入濃度検討	55
4-3. Q-body とエマルション培養を用いた FGF9-His ₆ -BGPc7 株の検出	57
4-4. Q-body とエマルション培養を用いた FGF9-His ₆ -BGPc7 株の選択回収	60
4-5. 第四章のまとめ	63
4-6. 参考文献	64
4-7. 実験項	65

第五章「エマルション培養と Q-body を用いたタンパク質高分泌株のスクリーニング」

5-1. 緒言	70
5-2. NTG を変異原としたランダム変異株ライブラリの構築	70
5-3. 変異株ライブラリを用いたタンパク質高分泌生産株スクリーニング	72
5-4. スクリーニング取得変異株群の培養評価	74
5-5. 第五章のまとめ	77
5-6. 参考文献	79
5-7. 実験項	80

第六章「結論」

6-1. 結論	84
6-2. 参考文献	88

発表状況	89
------	----

謝辞	90
----	----

略語表

ABA: 4-azidobenzoic acid
Ag: Antigen
BGP: Bone Gla Protein
BGPc7: BGP C末端7アミノ酸残基
BSA: Bovine serum albumin
BSC: Back scatter
cfu: colony forming unit
CHO: Chinese hamster ovary
conc.: concentration
CV: Coefficient of Variation
Cys: Cysteine
DFHBI: 3, 5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone
DNA: Deoxyribonucleic acid
EC₅₀: Half maximal effective concentration
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
Em.: Emission
EMS: Ethyl methanesulfonate
Ex.: Excitation
F. I.: Fluorescence intensity
Fab: Antigen binding fragment
FCM: Flow cytometer
FGF: Fibroblast growth factor
FRET: Fluorescence resonance energy transfer
FSC: Forward scatter
GFP: Green fluorescent protein
His: Histidine
His₆: Hexahistidine
HPLC: High performance liquid chromatography
IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
Mal.: Maleimide
mL: Milliliter
mM: Millimolar
nm: Nanometer
nM: Nanomolar
NTG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
OD: Optical density
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS: Phosphate buffered saline
PCR: Polymerase chain reaction
PEG: Polyethylene glycol
pL: Picomolar
Q-body: Qunechbody
RNA: Ribonucleic acid
scFv: single chain fragment of variable region
SDS: Sodium dodecyl sulfate
TAMRA: Tetramethylrhodamine
TCEP: Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Trp: Tryptophan
UV: Ultra violet
 V_H : Variable region of heavy chain
W/O/W: Water-in-oil-in-water
 μ L: Microlitter
 μ M: Micromolar

第一章

緒言

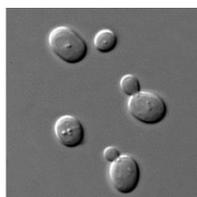
1-1. 本研究の背景

1-1-1. 微生物を宿主としたバイオ医薬品タンパク質分泌生産の課題

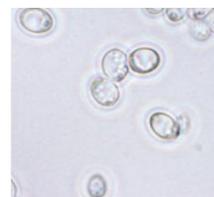
近年、抗体、アルブミン、サイトカインなどのタンパク質はバイオ医薬品あるいは医薬品素材としての需要が増大し、市場規模が拡大し続けている。これら有用なバイオ医薬品タンパク質の生産においては、製造コストが安価であること、動物由来成分を含まないといった利点から、細菌や酵母などの微生物を宿主とするタンパク質分泌生産系が広く利用されている（図 1-1）。2006 年に Date らによるグラム陽性細菌 *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) を宿主とした Human epidermal growth factor の分泌生産⁽¹⁾、2014 年に Matsuda らによる *C. glutamicum* を宿主とした抗体断片 Fab の分泌生産⁽²⁾、2006 年に Westers らによるグラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) を宿主とした Human interleukin-3 の分泌生産⁽³⁾、1990 年に Sleep らによる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした Human serum albumin の分泌生産⁽⁴⁾、2000 年に Kobayashi らによるメタノール資化性酵母 *Komagataella pastoris* (*K. pastoris*) を宿主とした Human serum albumin の分泌生産⁽⁵⁾、2018 年に Nylen らによる *K. pastoris* を宿主とした完全長抗体の分泌生産⁽⁶⁾、多くの報告がなされている。



Corynebacterium glutamicum



Saccharomyces cerevisiae



Komagataella pastoris

図 1-1. 代表的なバイオ医薬品タンパク質の微生物分泌生産宿主

一般に、バイオ医薬品タンパク質を分泌生産する産業用微生物株は、分解に関わるプロテアーゼの欠失⁽⁷⁻¹⁰⁾、転写・翻訳系に関わる因子の発現強化⁽¹¹⁻¹⁷⁾、分泌に関わる因子の発現強化⁽¹⁸⁻²⁴⁾などタンパク質生産に有用な多数の遺伝子改変を導入することで樹立される。しかしながら、一つずつ遺伝子改変を導入し、タンパク質生産における有効性を培養により評価するというサイクルを繰り返す **One-by-One** の手法 (図 1-2) では、高生産株を樹立するのに年単位の時間を要するという課題がある。

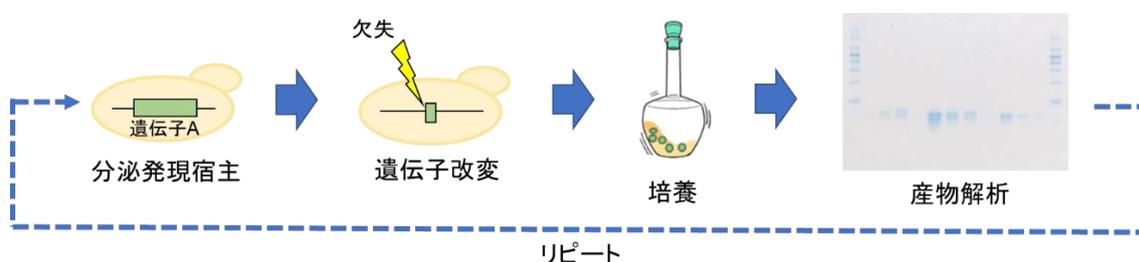


図 1-2. バイオ医薬品タンパク質高生産株の従来樹立手法

この課題を解決する方法として、遺伝子改変株の大規模ライブラリをスクリーニングして、タンパク質分泌生産量が高い株を取得する方法が挙げられる。従来の変異原処理による突然変異株ライブラリの構築に加え⁽²⁵⁾、近年のゲノム編集や長鎖 DNA 合成などの技術革新により、ターゲットとする遺伝子群から複数を同時導入した大規模な遺伝子改変株ライブラリの構築が可能となり⁽²⁶⁻³⁰⁾、これら 10^6 を超えるバリエントを含む大規模ライブラリから迅速にタンパク質高分泌株を選択することで、開発期間の大幅な短縮が期待される。一方で、試験管や 96 ウェルプレートを用いた培養では、膨大な数のバリエントを含むライブラリを評価することは困難であり、培養評価のボトルネック解消が喫緊の課題となっている。このような背景から、迅速なライブラリ評価を可能とするハイスループットスクリーニング法の確立が求められている。次節では、近年開発されているマイクロドロップレットを用いたハイスループットスクリーニング法について述べ

る。

1-1-2. マイクロドロプレットを用いたハイスループットスクリーニング法

マイクロドロプレットとは、数 μm から数百 μm 程度の粒径を持つ液滴を意味し、作製素材によって、主にオイルエマルジョンとハイドロゲルカプセルに大別される (図 1-3)³¹。前者は、その構造から **Water-in-oil-in-water (W/O/W)** エマルジョンと呼ばれ、内水相と呼ばれる水溶液とそれを囲むオイル相の二重構造を持つ。物性が大きく異なるオイル相に囲まれていることから内水相に封入された物質が漏洩しづらいこと、作製手法が確立していることが長所として挙げられる。一方で、物理的耐久性が低く、破損しやすいという短所がある。もう一方のハイドロゲルカプセルは、ゲルの殻を持つ中空のカプセル構造をしており、ゲル殻は孔状構造であることから内封した物質の拡散漏洩が生じる。また作製にゲルを固化するプロセスが必要となり、固化時の凝集などによって粒径均一なハイドロゲルカプセルの作製が難しい。これらの課題を解決すべく、現在も多くの作製方法が開発されている。長所としては、高い物理的耐久性を備えていることが挙げられる。このようにオイルエマルジョンとハイドロゲルカプセルはそれぞれ一長一短があり、アプリケーションに応じて選択して使用されている。

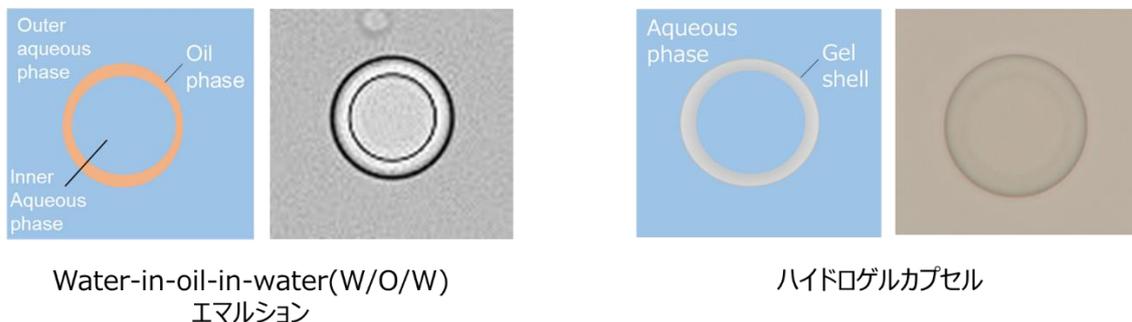


図 1-3. マイクロドロプレットの模式図及び顕鏡画像

W/O/W エマルションやハイドロゲルカプセルなどマイクロドロプレットの作製では、膜を用いて水溶液をオイル中に分散滴下する膜乳化法⁽³²⁾、あるいはボルテックスやホモジェナイザーにてオイル中に水溶液を多分散させる機械乳化法が広く用いられていたが⁽³³⁾、作製したドロプレットは粒径のばらつきが大きく、作製精度に課題があった。近年、マイクロ流体装置と微小流路を用いて、ピコリットルスケールの均一なマイクロドロプレットを作製する手法が確立されたことから⁽³⁴⁾、マイクロドロプレットを培養リアクターとして遺伝子改変株ライブラリを並列培養評価するハイスループットスクリーニング法が注目されている⁽³⁵⁻⁴⁰⁾。スクリーニング法について、以下に説明する。まず、多数の遺伝子改変株を含むライブラリをシングルセルとなるように各マイクロドロプレットに包括する。次にドロプレット内で培養を行い、菌体を増殖させて目的タンパク質を分泌生産させる。ドロプレット内で分泌されたタンパク質はバイオセンサーを用いて蛍光シグナルへと変換し、セルソーターを用いて蛍光強度を指標にタンパク質高分泌株を含有するドロプレットを選択して回収する (図 1-4)。マイクロドロプレットを用いたスクリーニング法では、従来の培養法で必要であった平板培地での単離操作や試験管などへの植菌操作が不要であること、セルソーターを用いてハイスループットに解析可能であることから、膨大な遺伝子改変株ライブラリを短期間で評価することが可能である。

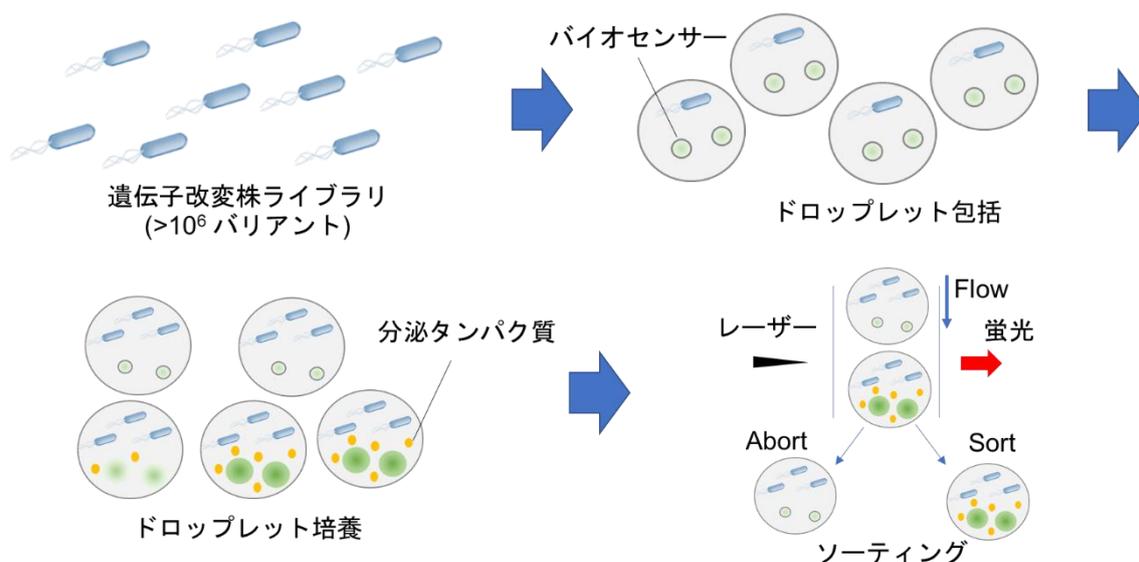


図 1-4. マイクロドロップレットとバイオセンサーを用いたスクリーニング法の概念図

マイクロドロップレット培養を用いたハイスループットスクリーニングにおいて、マイクロドロップレット作製と並んで重要な要素技術は、分泌された目的タンパク質をフローサイトメトリーで測定可能な蛍光シグナルに変換するバイオセンサーである。次節では、分泌タンパク質の検出に用いられるバイオセンサー技術について述べる。

1-1-3. バイオセンサーによる分泌タンパク質検出

バイオセンサーとは、酵素や抗体などのタンパク質、核酸、あるいは細胞などを用いて測定対象となる物質を検出、光学的なシグナルや電氣的なシグナルに変換して定量する技術である。これらのバイオセンサーは、タンパク質の検出に広く使用されており、マイクロドロップレット内の分泌タンパク質検出にも応用が進みつつある。

マイクロドロップレット培養を用いたタンパク質高分泌生産株のスクリーニング法は近年研究が始まった分野であり、報告例は少ないが数例の先駆的な研究がなされている。本節では、先行研究で用いられているバイオセンサーについて順に述べる。2017年に Abatemarco らによって Spinach と呼ばれる RNA アプタマーを用いた分泌タン

パク質の検出が報告されている⁽⁴⁵⁾。Spinach は目的タンパク質に結合する部位と GFP 発色団由来の非蛍光性分子 DFHBI と結合する部位から構成されており、目的タンパク質に結合すると構造変化を生じ、DFHBI との結合が可能となる (図 1-5)。DFHBI と結合することで緑色の蛍光を発する仕組みである。S. cerevisiae を宿主として分泌されるストレプトアビジンを Spinach を使用して検出し、分泌シグナルペプチドバリエーションのライブラリから分泌量が 3 倍に増加した株が単離されている。

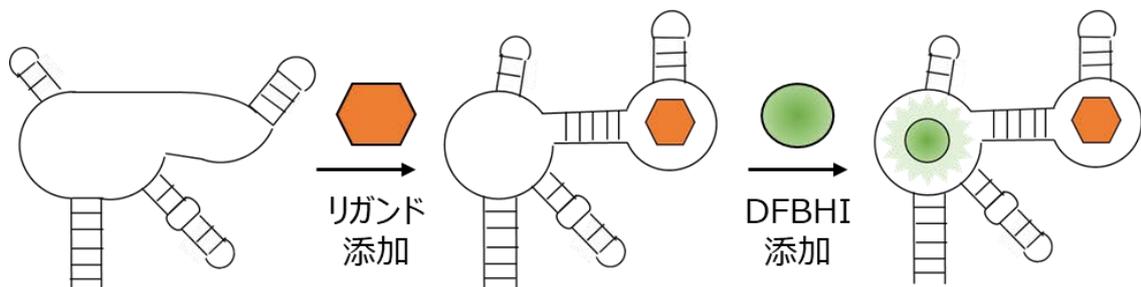


図 1-5. Spinach RNA アプタマーを用いたタンパク質検出

また、2021 年に Balasubramanian らによって、 β -glucosidase の酵素活性を利用したバイオセンシングが報告されている⁽⁴⁶⁾。分泌された β -glucosidase が消光性基質である Fluorescein Di- β -D-Glucopyranoside を加水分解することで、蛍光色素 Fluorescein が生成し、蛍光強度を指標に β -glucosidase 分泌量の多寡を判別する仕組みである (図 1-6)。この手法を用いて、C. glutamicum 突然変異株ライブラリから β -glucosidase 分泌量が 6 倍に増加した株の取得に成功している。また 2014 年に Sjostrom らによって、 α -amylase と消光性基質を用いた同様の手法で S. cerevisiae 突然変異株ライブラリから α -amylase 分泌量が 2 倍に向上した株が取得されている⁽⁴⁷⁾。

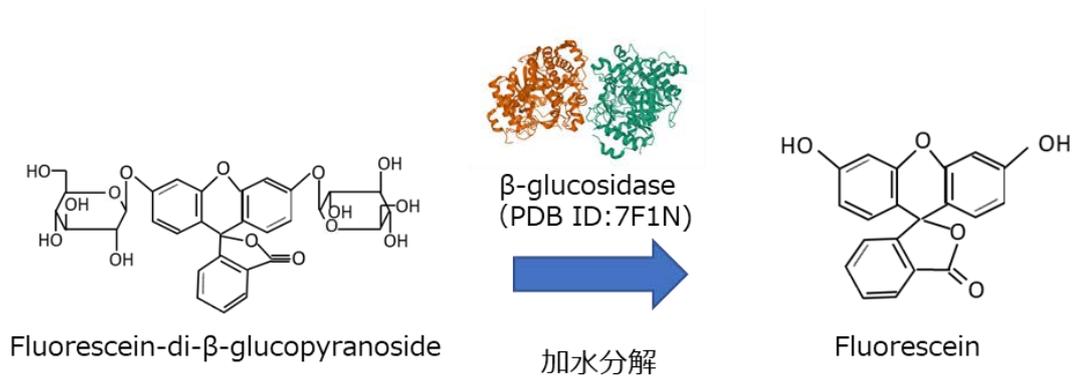


図 1-6. β -glucosidase と消光性基質を用いたバイオセンシング

その他の手法として **Split GFP** の自己会合を利用した分泌タンパク質の検出法も用いられている。緑色蛍光タンパク質 **GFP** を 1-10 番目までの β -sheet を含む大断片 **GFP1-10** と、11 番目の β -sheet を含む小断片 **GFP11** に分割し、**GFP11** を目的タンパク質に融合して分泌生産し、培養液中に添加した **GFP1-10** と自己会合することで蛍光を示す仕組みである (図 1-7)。2017 年に Knapp らによって、*B. subtilis* を宿主として分泌されるリパーゼを **Split GFP** を使用して検出し、分泌シグナルペプチドバリエーションのライブラリから分泌量が 5 倍に増加した株が単離されている⁽⁴⁸⁾。



図 1-7. Split GFP を用いた目的タンパク質の検出

上述のようにバイオセンサーを用いて、微生物がマイクロドロップレット内で分泌したタンパク質を検出する手法が複数構築されている。しかしながら、**Spinach RNA** アプ

タマーを用いたバイオセンシングは、蛍光検出のために DFHBI の添加が必要であること、検出限界が μM オーダーで分泌量の少ないタンパク質への適用は困難であるといった課題がある。また、消光性基質を用いたバイオセンシングは、ターゲットに応じた消光性基質の作製が必要であることに加え、検出タンパク質が酵素などに限定され、汎用性に欠ける。Split GFP の自己会合を用いた検出は、目的タンパク質に対して GFP 小断片及びリンカーからなる 20 アミノ酸残基を超える配列を融合する必要がある、タンパク質の生産、分泌といった挙動が配列の融合によって変化するリスクが懸念される。このような課題を解決し、より簡便かつ汎用性の高いスクリーニングを実現する新たなバイオセンサーとして、抗体を基盤としたイムノセンサーである Quenchbody (Q-body) に着目した。次節では、Q-body の作用機序及び特性について述べる。

1-1-4. Quenchbody

抗体を基盤としたイムノセンサーである Q-body は、抗体断片 scFv の V_H 鎖の N 末端に蛍光色素が修飾された構造を持ち、修飾された蛍光色素は抗体に高度に保存された Trp 残基からの光誘起電子移動によって消光される⁴⁹。抗原を添加すると Q-body は抗原と結合して構造変化を生じ、蛍光色素と Trp 残基との相互作用が弱まることで蛍光強度が増加する (図 1-8)。Q-body は抗原濃度依存的に蛍光強度が増加して目的タンパク質濃度の測定が可能であること、基質添加や洗浄操作を一切必要としない簡便なタンパク質測定法であること、抗体を基盤としているために特異性の高い nM オーダーのタンパク質の検出が可能であること、さらに数アミノ酸残基の小さな検出タグを融合することで広範なタンパク質を検出できることから、マイクロドロップレットスクリーニングにおけるバイオセンサーとして非常に有望な特性を持っていると考えられる。次節では、本研究の目的である Q-body を用いたマイクロドロップレットスク

リーニング法について述べる。

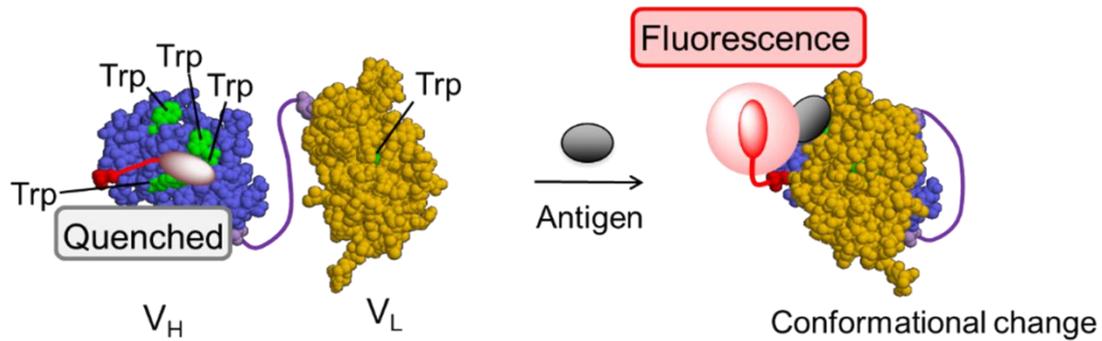


図 1-8. 抗体イムノセンサーQ-body の作用機序 (文献⁴⁹より引用)

1-2. 本研究の目的

前述のように、有用なバイオ医薬品タンパク質を分泌生産する産業微生物株の迅速な開発には、マイクロドロップレット培養とバイオセンサー技術を組み合わせたハイスループットスクリーニング法が有望と考えられる。しかしながら、これまでに構築された種々のスクリーニング法は、簡便性及び汎用性の点で課題が残されている。前節で述べたようにバイオセンサーQ-body はマイクロドロップレットスクリーニングのバイオセンサーとして有望な特性を備えており、Q-body を培地に添加するのみでマイクロドロップレット中に分泌された広範なタンパク質を蛍光シグナルとして検出し、その蛍光を指標にタンパク質高分泌株を単離するという簡便性と汎用性を兼ね備えたスクリーニング法の具現化が期待できる (図 1-9)。本研究では、Q-body とマイクロドロップレット培養を組み合わせたタンパク質高分泌株の新規ハイスループットスクリーニング法の開発、及び確立したスクリーニング法を用いたタンパク質高分泌株の取得による有用性実証の 2 点を目的として検討を行った。

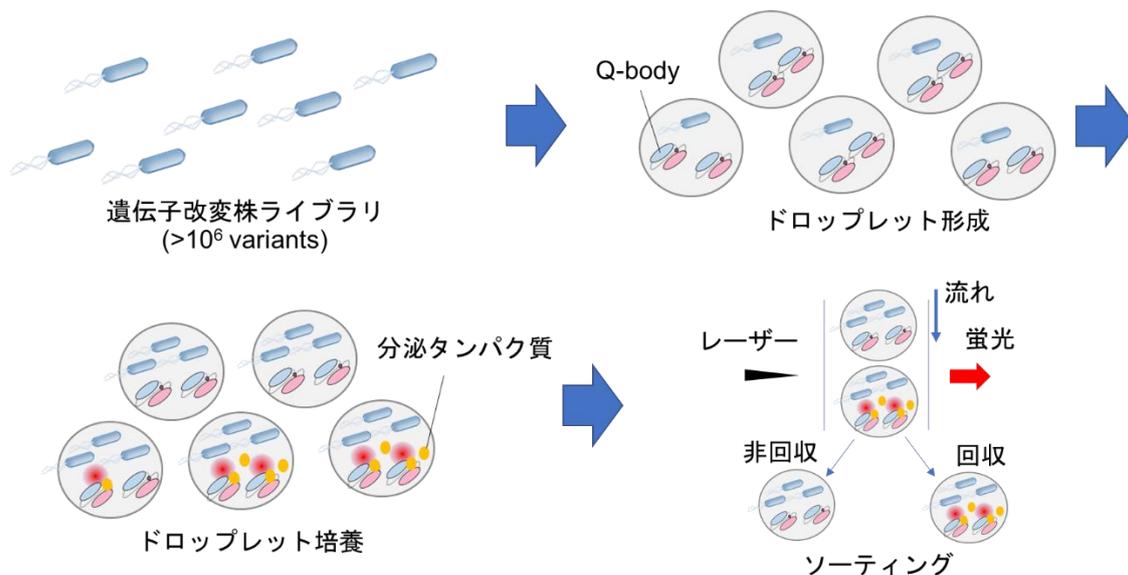


図 1-9. Q-body を用いたマイクロドロップレットスクリーニング

1-3. 本論文の概要

第一章では、バイオ医薬品タンパク質の生産における産業上の課題として、バイオ医薬品タンパク質を高分泌生産する微生物宿主株の樹立には、多数の遺伝子改変が必要であり、長期の開発が必要であることを述べた。次に、マイクロドロップレットについて概説した後、マイクロドロップレットを培養リアクターとして、大規模な遺伝子改変株ライブラリを迅速に並列評価し、タンパク質高分泌生産株を選別するスクリーニング法が上記課題に解決に有望であることを述べた。さらに、先駆的なマイクロドロップレットを用いたスクリーニング法について概説し、分泌タンパク質を検出するバイオセンサーの汎用性や簡便性の点で課題が存在していることを述べた。最後に抗体を基盤とした免疫センサーである **Q-body** について着目し、**Q-body** が備えるバイオセンサーとしての優れた特性を挙げ、**Q-body** を培地に添加するのみでマイクロドロップレット中に分泌された広範なタンパク質を蛍光シグナルとして検出し、蛍光を指標にタンパク質高分泌株を単離するという簡便性と汎用性を兼ね備えたスクリーニング法を新

たに考案した。

第二章では、Q-body をグラム陽性細菌 *C. glutamicum* が分泌生産するタンパク質を検出するバイオセンサーとして適用可能か検証した。本研究で用いる Q-body として抗 BGP scFv Q-body を選定し、エピトープである BGPc7 配列を Q-body 検出の小さなタグとして利用し、任意のタンパク質を測定可能か検討した。次いで、培養用培地に Q-body を添加して培養を行い、*C. glutamicum* が培養液中に分泌したタンパク質の検出を試みた。

第三章では、マイクロドロップレットとして Water-in-oil-in-water (W/O/W) エマルションを選定し、粒径均一性の高い W/O/W エマルション作製条件の確立を行った。次いで、Q-body を W/O/W エマルションに封入し、セルソーターを用いて Q-body の蛍光を指標にエマルション内タンパク質濃度の測定が可能か検証した。

第四章では、微生物菌株をエマルションに封入して培養し、分泌された目的タンパク質を Q-body を用いて検出、タンパク質分泌生産株を取得するスクリーニング法の基本コンセプト成立を目指した。*C. glutamicum* 対照株とタンパク質分泌生産株をエマルションに封入して培養し、Q-body の蛍光を指標にしてタンパク質分泌生産株のみを選択的に回収できるか検討した。

第五章では、Q-body とエマルション培養を用いたハイスループットスクリーニング法の有用性を実証すべく、ランダム変異株ライブラリをスクリーニングし、タンパク質分泌生産能が向上した変異株の取得を検討した。

第六章では、各章の検討で得られた結果を総括すると共に、今後の展望について述べた。

1-4. 参考文献

1. M. Date, H. Itaya, H. Matsui, Y. Kikuchi, *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *42*, 66.
2. Y. Matsuda, H. Itaya, Y. Kitahara, N. M. Theresia, E. A. kutukova, Y. A. V. Yomantas, M. Date, Y. Kikuchi, M. Wachi, *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 56.
3. L. Westers, D. S. Dijkstra, H. Westers, J. M. Diji, W. J. Quax, *J. Biotechnol.* **2006**, *123*, 211.
4. D. Sleep, G. P. Belfield, A. R. Goodey, *Biotechnology* **1990**, *8*, 42.
5. K. Kobayashi, S. Kuwae, T. Ohya, T. Ohda, M. Ohyama, K. Tomomitsu, *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *90*, 280.
6. A. Nylen, M. Chen, *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1674*, 37.
7. M. Wu, Q. Shen, Y. Yang, S. Zhang, W. Qu, J. Chen, H. Sun, S. Chen, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *40*, 589.
8. K. Tomimoto, Y. Fujita, T. Iwaki, Y. Chiba, Y. Jigami, K. Nakayama, Y. Nakajima, H. Abe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 130588.
9. D. Li, G. Fu, R. Tu, Z. Jin, D. Zhang, *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 17.
10. X. Liu, L. Meng, X. Wang, Y. Yang, Z. Bai, *Protein Expr. Purif.* **2022**, *189*, 105928.
11. K. Zhang, L. Su, X. Duan, L. Liu, J. Wu, *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 32.
12. J. W. Choi, S. S. Yim, K. J. Jeong, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 873.
13. J. Staudacher, C. Rebnegger, T. Dohnal, N. Landes, D. Mattanovich, B. Gasser, *Metab. Eng.* **2022**, *70*, 181.
14. M. Vitikainen, H. Hyrylainen, A. Kivimaki, V. P. Kontinen, M. Sarvas, *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 363.

15. A. S. Robinson, V. Hines, K. D. Wittrup, *Biotechnology* **1994**, 12, 381.
16. M. Inan, D. Aryasomayajula, J. Sinha, M. M. Meagher, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 93, 771.
17. H. Raschmanova, A. Weninger, Z. Knejzlik, K. Melzoch, K. Kovar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105, 4397.
18. Y. Kikuchi, M. Date, H. Itaya, K. Matsui, L. Wu, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 7183.
19. J. Hemmerich, P. Rohe, B. Kleine, S. Jurischka, W. Wiechert, R. Freudl, M. Oldiges, *Microb. Cell Fact.* **2016**, 15, 208.
20. J. Chen, L. Zhao, G. Fu, W. Zhou, Y. Sun, P. Zheng, J. Sun, D. Zhang, *Microb. Cell Fact.* **2016**, 15, 69.
21. J. Heinrich, C. Drewniok, E. Neugebauer, H. Kellner, T. Wiegert, *Microb. Cell Fact.* **2019**, 18, 31.
22. J. S. Cho, H. J. Oh, Y. E. Jang, H. J. Kim, A. Kim, J. Song, E. J. Lee, J. Lee, *Micrbiologyopen.* **2022**, 11, e1300.
23. J. J. Barrero, J. C. Casler, F. Valero, P. Ferre, B. S. Glick, *Microb. Cell Fact.* **2018**, 17, 161.
24. G. P. Cereghino, C. M. Stark, D. Kim, J. Chang, N. Shaheen, H. Poerwanto, K. Agari, P. Moua, L. K. Low, N. Tran, A. D. Huang, M. Nattestad, K. T. Oshiro, J. W. Chang, A. Chavan, J. W. Tsai, J. Cereghino, *Gene* **2013**, 519, 311.
25. R. D. Wood, S. G. Sedgwick, *Mutagenesis.* **1986**, 6, 399.
26. C. Ronda, L. E. Pedersen, M. O. A. Sommer, A. T. Nielsen, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 19452.

27. X. Guo, A. Chavez. A. Tung, Y. Chan, C. Kaas, Y. Yin, R. Cecchi, S. L. Garnier, E. Kelsic, M. Schubert, J. E. DiCarlo, J. J. Collins, G. M. Church, *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 540.
28. Z. Li, Z. Zhang. Y. Xu, T. Shi, C. Ye, X. Sun, H. Huang, *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11*, 343.
29. K. Tsuge, Y. Sato. Y. Kobayashi, M. Gondo, M. Hasebe, T. Togashi, M. Tomita, M. Itaya, *Sci. rep.* **2015**, *5*, 10655.
30. M. Suetsugu, H. Takada. T. Katayama, H. Tsujimoto, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 11525.
31. R. J. Tatenhove-Pel, J. A. Hernandez-Valdes, B. Teusink, O. P. Kuipers, M. Fischlechner, H. Bachmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *61*, 72.
32. T. Nakashima, M. Shimizu, *Ceramics.* **1991**, *21*, 408.
33. S. Matsumoto, H. Makino, A. Ueno, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1987**, *36*, 320.
34. D. Saeki, S. Sugiura, T. Kanamori, S. Sato, S. Ichikawa, *Lab Chip*, **2010**, *10*, 357.
35. A. Zinchenko, S. R. A. Devenish, B. Kintsjes, P. Colin, M. Fischlechner, F. Hollfelder, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2526.
36. F. Gielen, R. Hours, S. Emond, M. Fischlechner, U. Schell, F. Hollfelder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, E7383.
37. J. M. Wagner, L. Liu, S. Yuan, M. V. Venkataraman, A. R. Abate, H. S. Alper, *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 346.
38. C. Ma, Z. L. Tan, Y. Lin, S. Han, X. Xing, C. Zhang, *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *128*, 662.
39. D. Yanakieva, A. Elter, J. Bratsch, K. Friedrich, S. Becker, H. Kolmar, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10182.
40. S. Neun, P. Brear, E. Campbell, T. Tryfona, S. Becker, K. Omari, A. Wagner, P. Dupree, M. Hyvonen, F. Hollfelder, *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*,

1096.

41. A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, *Nature* **1997**, *388*, 882.
42. T. Kitaguchi, M. Oya, Y. Wada, T. Tsuboi, A. Miyawaki, *Biochem. J.* **2013**, *450*, 365.
43. V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh, S. Lukyanov, *Nat. Methods.* **2006**, *3*, 281.
44. T. Morita, A. Tanimura, A. Nezu, Y. Tojyo, *Cell Calcium.* **2002**, *31*, 59.
45. J. Abatemarco, M. F. Sarhan, J. M. Wagner, J. Lin, L. Liu, W. Hassouneh, S. Yuan, H. S. Alper, A. R. Abate, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 332.
46. S. Balasubramanian, J. Chen, V. Wigneswaran, C. H. Berthelsen, P. R. Jensen, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 668513.
47. S. L. Sjostrom, Y. Bai, M. Huang, Z. Liu, J. Nielsen, H. N. Joensson, H. A. Svahn, *Lab Chip.* **2014**, *14*, 806.
48. A. Knapp, M. Rippahn, K. Volkenborn, P. Skoczinski, K. Jaeger, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 110.
49. R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hoshaka, H. Ueda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17386.

第二章

Q-body を用いた微生物分泌タンパク質の検出

2-1. 緒言

本章では、Q-body を用いたマイクロドロップレットスクリーニング法を開発するにあたり、微生物が培養液に分泌した任意のタンパク質を Q-body を用いて検出するという基本コンセプトの成立を検討した。本研究で用いる Q-body として、2011 年に Abe らによって構築された骨代謝のマーカー Bone Gla Protein (BGP) を抗原とする蛍光色素 TAMRA 修飾抗ヒト BGP scFv Q-body (抗 BGP scFv Q-body) を選択した (図 2-1. A)¹⁾。抗 BGP scFv Q-body は、エピトープとしてヒト BGP の C 末端に位置する 7 アミノ酸残基 (BGPc7: RRFYGPV) を認識する。BGPc7 配列を検出用の小さなタグとして目的タンパク質の C 末端に付与することで、抗 BGP scFv Q-body を用いて、任意のタンパク質を検出する手法を考案した。Q-body で検出するモデルタンパク質として、サイトカインの一種であるヒト Fibroblast growth factor 9 (FGF9) を選択し²⁾、分泌生産宿主としてグラム陽性細菌 *C. glutamicum* を用いることとした (図 2-1. B)³⁾。BGPc7 配列融合が FGF9 分泌生産に与える影響、精製した BGPc7 配列融合 FGF9 の特異的かつ濃度依存的な Q-body 検出成立、培養液に分泌された BGPc7 配列融合 FGF9 の Q-body 検出が可能かの3点について詳しく調べた。

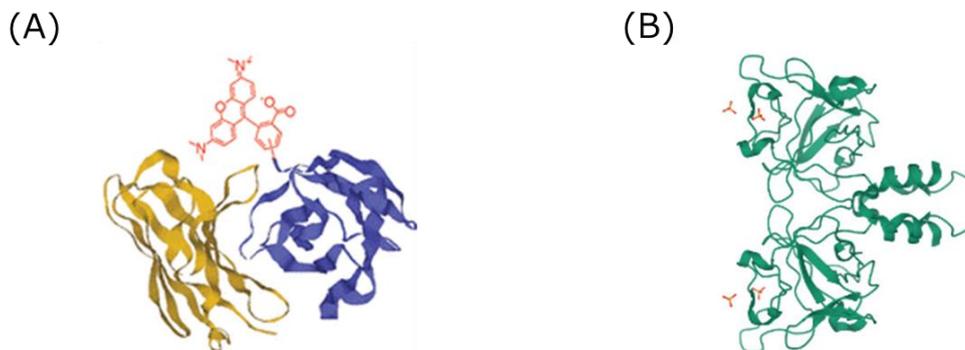


図 2-1. (A) TAMRA 修飾抗 BGP scFv Q-body 立体構造 (B) ヒト FGF9 立体構造

(PDB ID: 1IHK)

2-2. *C. glutamicum* BGPc7 融合 FGF9 分泌生産株の構築

分泌タンパク質へのタグ配列融合は、分泌量の低下や予期せぬ分解の発生、生産宿主の生育悪化などを引き起こす可能性がある。そこで、BGPc7 配列を融合した FGF9 を分泌生産する *C. glutamicum* 株を構築し、BGPc7 配列の融合が菌体生育及び FGF9 の分泌生産に与える影響を検討した。*C. glutamicum* のタンパク質分泌生産用ベクター pPK10⁴ に、ヒト成熟 FGF9 の N 末端側に *Escherichia coli* (*E. coli*) 由来 TorA 分泌シグナルペプチド⁵、C 末端側にアフィニティ精製に用いる His₆ tag 及び BGPc7 を融合発現する塩基配列を導入することでプラスミド pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 を構築し、*C. glutamicum* YPS010 株⁶ に形質転換することで分泌生産株を構築した (図 2-2)。本分泌生産株では、菌体内で生産された His₆-tag 及び BGPc7 融合 FGF9 (FGF9-His₆-BGPc7) が *E. coli* TorA 分泌シグナルによって、細菌に広く保存されている Twin-arginine translocation pathway⁷ を経由し、TorA 分泌シグナルがプロセッシングによって切断された後に菌体外に分泌される。

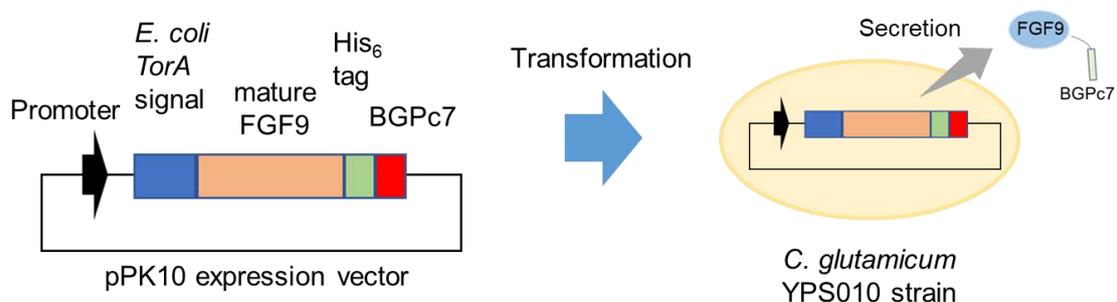


図 2-2. *C. glutamicum* FGF9-His₆-BGPc7 分泌生産株の構築

構築した YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を培養評価し、培地に含まれるグルコースが全て資化された 24 時間後の培養液の吸光度を測定することで菌体生育に与える影響を解析した。比較対象としてタンパク質を分泌生産しない

YPS010/pPK10 株、BGPc7 配列を融合しない YPS010/pPK10-FGF9-His₆ 株を同様に培養し、解析した。その結果、いずれの株も培養 8 時間及び 24 時間時点で OD600 nm の測定値に大きな差異は認められなかった (図 2-3)。このことから、FGF9 に BGPc7 配列を融合することで、菌体生育に悪影響は生じないことが確認された。

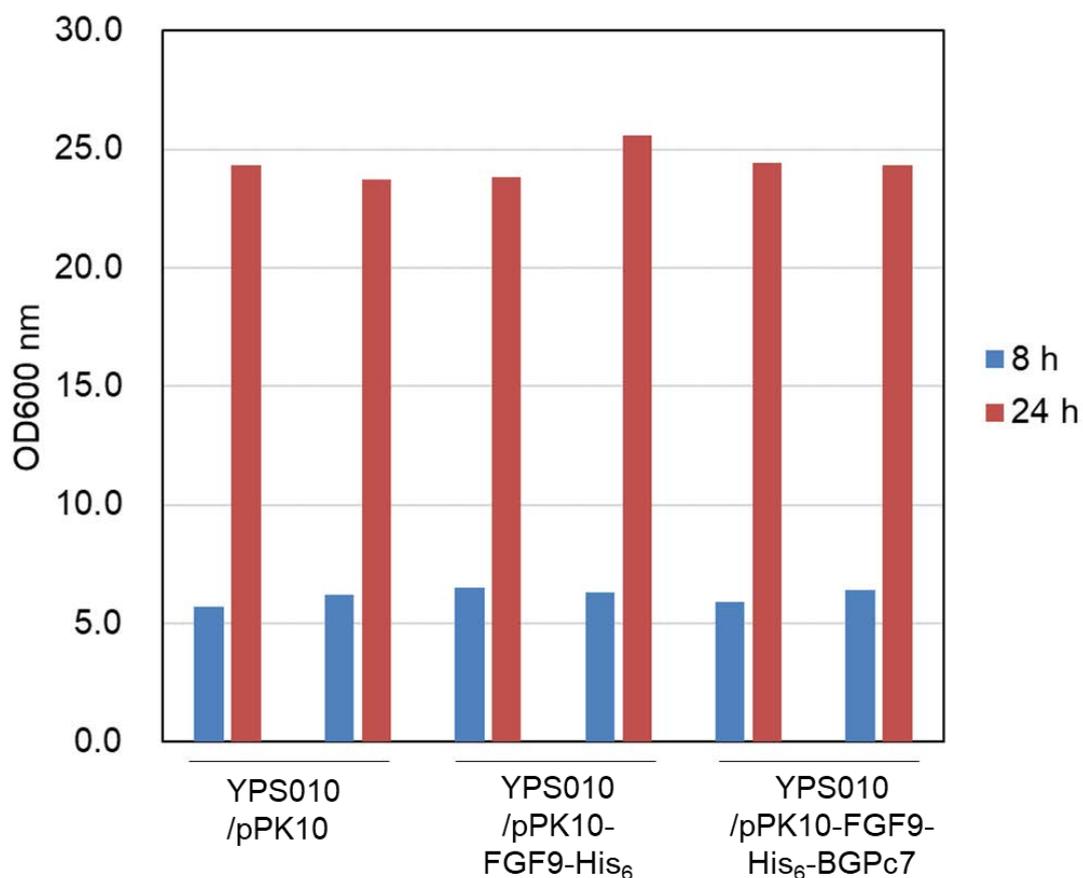


図 2-3. YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株培養液の吸光度測定 (n=2)

次に培養上清に分泌されたタンパク質の SDS-PAGE 解析を実施した。陰性対照である YPS010/pPK10 株では培養上清中にバンドが全く検出されなかったが、YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株では FGF9-His₆-BGPc7 の理論分子量であ

る 24.9 kDa 付近にバンドが検出され、FGF9-His₆-BGPc7 が分泌生産していることが示唆された (図 2-4)。また、YPS010/pPK10-FGF9-His₆ 株が分泌した FGF9-His₆ と比べて、FGF9-His₆-BGPc7 は分泌量の低下は見られず、予期せぬ分解も生じなかったことから、BGPc7 配列を FGF9 に融合することで分泌生産に悪影響を及ぼさないと結論付けた。

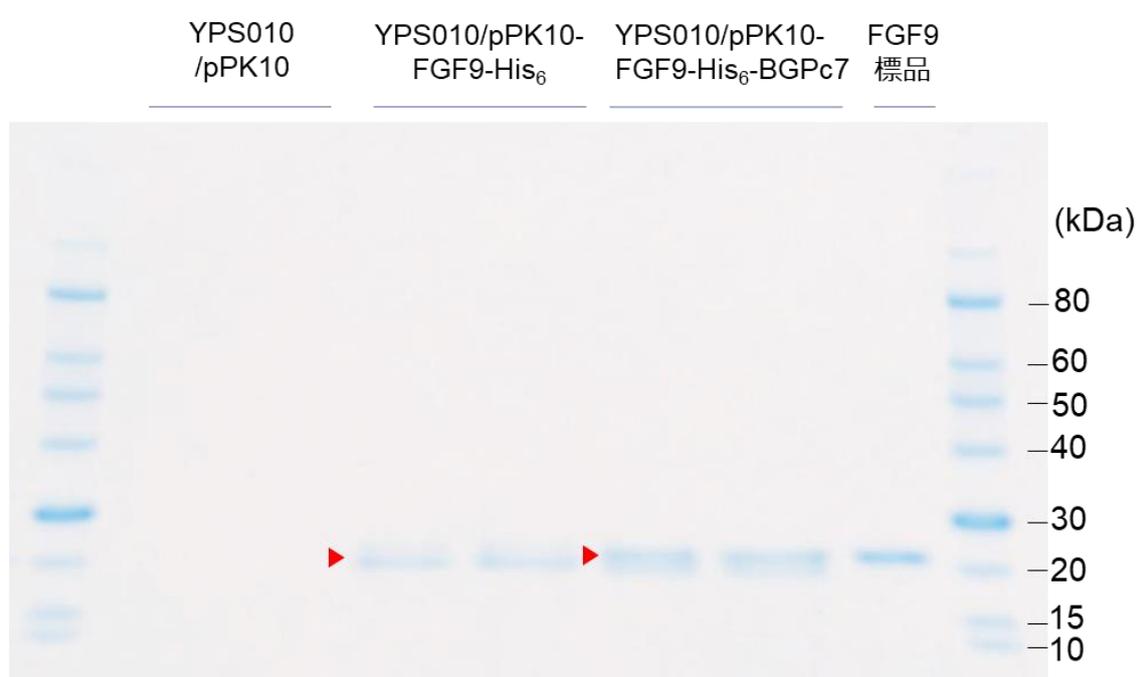


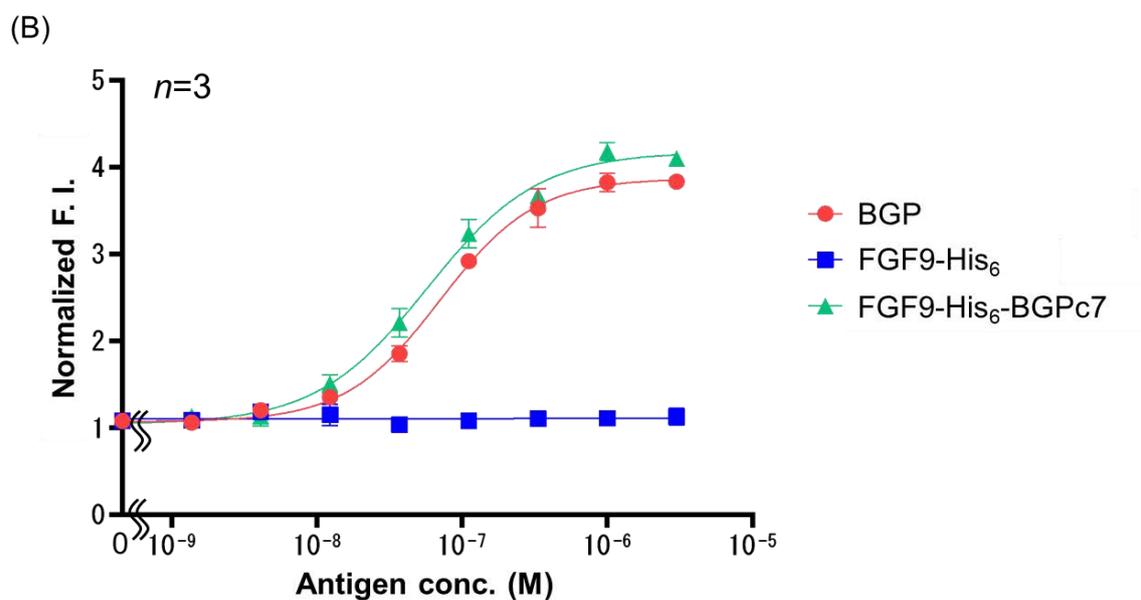
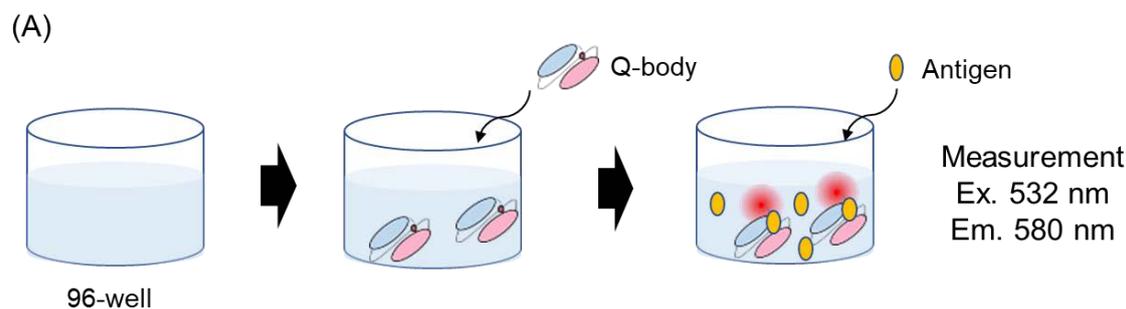
図 2-4. YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株培養上清の SDS-PAGE ($n=2$)

赤矢印は FGF9-His₆あるいは FGF9-His₆-BGPc7 と推定されるバンドを示す

2-3. *C. glutamicum* 分泌 BGPc7 融合 FGF9 を用いた Q-body assay

次に分泌生産した FGF9-His₆-BGPc7 を抗 BGP scFv Q-body を用いて、特異的かつ濃度依存的に検出可能か検証した。YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株の培養上清から Ni アフィニティ精製によって FGF9-His₆-BGPc7 を調製し、Q-body assay に供した (図 2-5. A)。比較対象として、BGPc7 配列を融合しない FGF9-His₆

を同様に調製し、標品である全長 BGP (49 アミノ酸残基、分子量: 5799)と共に用いた。まず、BGPc7 配列を持たない FGF9-His₆ では、添加濃度が増加しても Q-body の蛍光強度向上は全く認められなかった (図 2-5. B)。一方で、FGF9-His₆-BGPc7 を抗原とした際には、抗原濃度依存的な Q-body 蛍光強度向上が認められ、BGPc7 配列を検出タグとして付与することで特異的かつ抗原濃度依存的に Q-body を用いた測定が成立することが示された (図 2-5. B)。BGP 標品の測定結果では、EC₅₀ が 70 nM、ダイナミックレンジが 3.9 倍であったが、FGF9-His₆-BGPc7 では EC₅₀ が 57 nM、ダイナミックレンジが 4.1 倍と同等以上の値を示した (図 2-5. C)。FGF9-His₆-BGPc7 を抗原とした際に BGP を上回る検出感度、ダイナミックレンジを示した原因は明確ではないが、EC₅₀ の差異に関しては僅かであり、BGP と FGF9-His₆-BGPc7 の定量誤差に起因する可能性が考えられる。一方で、ダイナミックレンジに関しては定量値に差異があったとしても変化しないことから、BGP と FGF9-His₆-BGPc7 では本質的に異なると考えられる。仮説として FGF9-His₆-BGPc7 が結合した場合、BGP 結合時と比べて抗 BGP scFv Q-body が大きな構造変化を生じ、蛍光色素 TAMRA と Trp 残基との相互作用がより減弱して高い蛍光強度を示し、脱クエンチの度合いが大きいことから高いダイナミックレンジを示した可能性が考えられる。以上の結果から、BGPc7 配列を FGF9 に融合することで Q-body を用いた特異的かつ抗原濃度依存的検出が可能であることが示された。



(C)

	BGP	FGF9-His ₆ -BGPc7
EC ₅₀ (nM)	70	57
+Ag/-Ag (fold)	3.9	4.1

図 2-5. (A)Q-body assay 模式図 (B)FGF9-His₆-BGPc7 を抗原とした Q-body assay (C)BGP 及び FGF9-His₆-BGPc7 の EC₅₀ 及びダイナミックレンジ

2-4. 培養液に分泌された BGPc7 融合 FGF9 の Q-body 検出

本節では、精製タンパク質の測定ではなく、培地にあらかじめ Q-body を添加することで、*C. glutamicum* が培養液中に分泌した FGF9-His₆-BGPc7 の直接検出を試みた。培養液での目的タンパク質検出は、培養中に Q-body が菌体表面への吸着やプ

ロテアーゼによる分解などで不活化されるリスクがあること、また増殖した菌体や低分子副生物による蛍光バックグラウンドによって Q-body の蛍光検出がより困難になるなど、精製タンパク質測定に比べて難易度が高いと考えられた。前者に関しては、実験的に培養中の Q-body の安定性を解析することとし、後者に関しては、微生物培地に一般的に含有される Yeast extract やペプトンといった蛍光バックグラウンドとなる生物由来原料を除いた完全化学合成培地を用いることで対策を行うこととした。陰性対照である YPS010/pPK10 株と YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を Q-body を含有する培地に植菌して振とう培養を行い、培養開始時と 22 時間後の培養液の蛍光強度を測定した (図 2-6)。

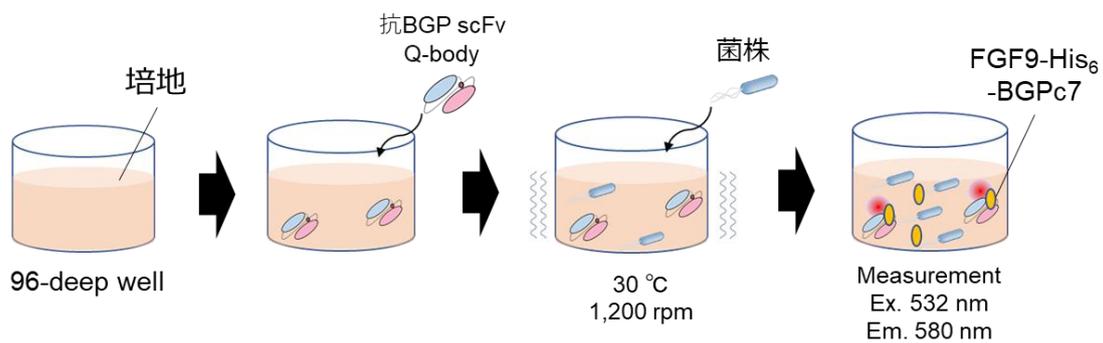


図 2-6. Q-body を用いた培養液中分泌タンパク質検出の模式図

培養 0 h 時点では、YPS010/pPK10 株及び YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株ともに、クエンチ状態の Q-body に由来する蛍光のみが検出され、蛍光強度に差異は認められなかった (図 2-7)。培養 22 h 時点では、YPS010/pPK10 株が増殖した菌体や低分子副生成物に起因すると推定される約 2 倍の蛍光強度増加に止まったのに対して、YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株では約 6 倍に蛍光強度が増加し、培養液中に分泌された FGF9-His₆-BGPc7 を Q-body が検出したことが強く示唆された。

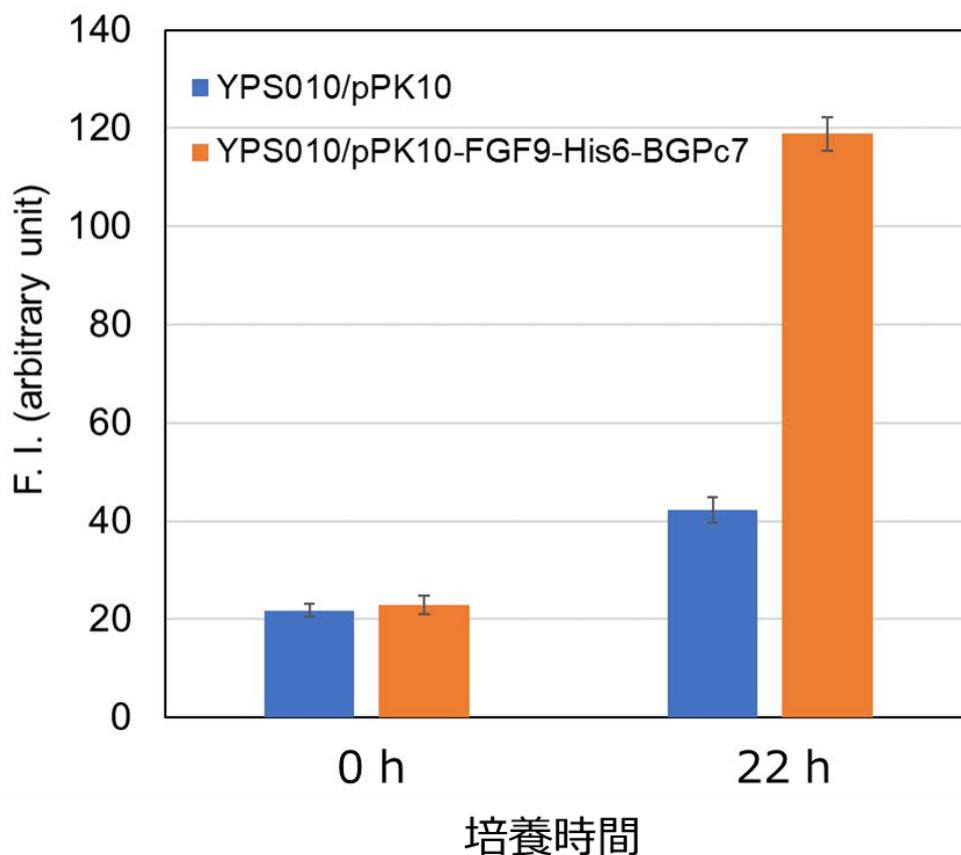


図 2-7. YPS010/pPK10-FGF9-His6-BGPc7 株培養液の経時蛍光強度測定 ($n=3$)

次に、培養液中で Q-body が安定的に保持されているか検証すべく、YPS010/pPK10-FGF9-His6-BGPc7 株の培養上清を培養 0 h、22 h で分取し、SDS-PAGE を行った後、蛍光検出した。いずれの培養上清においても、抗 BGP scFv Q-body の理論分子量 30.0 kDa 付近に単一のバンドが検出され、菌体表面への付着によるロスやプロテアーゼによる分解が生じていないと考えられた (図 2-8)。この結果から、培地に添加した抗 BGP scFv Q-body は培養を通じて安定的に保持されていることが示された。

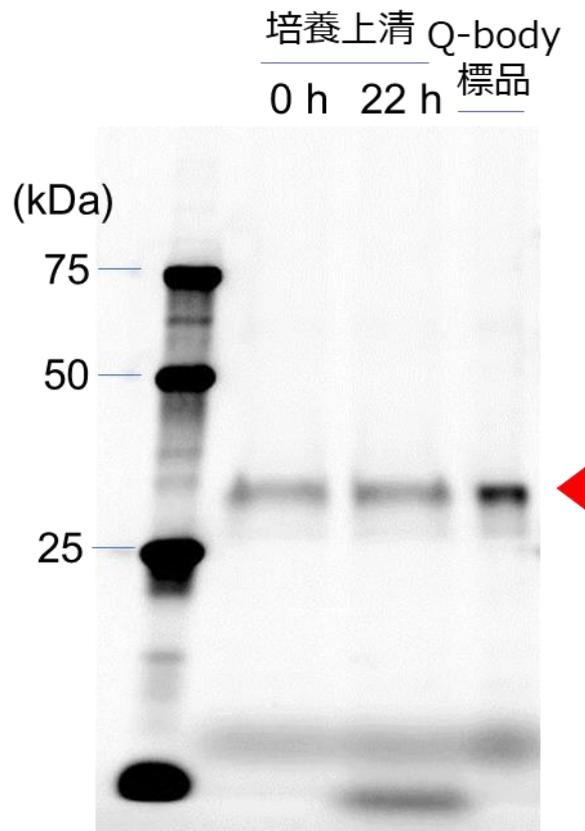


図 2-8. YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株培養上清の SDS-PAGE (蛍光検出)

赤矢印は抗 BGP scFv Q-body と推定されるバンドを示す。

2-5. 第二章のまとめ

本章では、Q-body を用いて微生物が分泌したタンパク質を検出するという基本コンセプトの成立を目的に種々の検討を行った。まず抗 BGP scFv Q-body のエピトープである7アミノ酸残基から成る BGPc7 配列を、任意のタンパク質を Q-body 検出するためのタグとして利用する検討を行った。*C. glutamicum* を宿主として、BGPc7 配列を融合した FGF9 の分泌生産を検討し、BGPc7 配列の融合が宿主の生育や FGF9 の分泌生産に悪影響を及ぼさないことを示した。次に、培養液から精製した BGPc7 配列融合 FGF9 を用いて Q-body assay を行い、BGPc7 配列を付与することで

Q-body を用いた特異的かつ抗原濃度依存的検出が可能であることを確認した。更に、Q-body を培地に添加することで、培養液中に分泌された BGPc7 配列融合 FGF9 を蛍光として検出することに成功し、Q-body が長時間の培養後も安定的に保持されていることを示した。以上の結果から、Q-body を用いて、微生物が培養液に分泌したタンパク質を測定可能であると結論付けた。

2-6. 参考文献

1. R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka, H. Ueda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17386.
2. M. Miyamoto, K. Naruo, C. Seko, S. Matsumoto, T. Kondo, T. Kurokawa, *Mol. Cell Biol.* **1993**, *13*, 4251.
3. S. Udaka, *J. Bacteriol.* **1960**, *79*, 754.
4. K. Ito, Y. Matsuda, N. Yamada, K. Kikuchi, A. Konishi, M. Kanzaki, K. Takahashi, H. Yamaguchi, A. Fujiwara, K. Miyairi, (Ajinomoto Co., Inc.), *WO2021112249A1*, **2019**.
5. V. Mejean, C. Nivol, M. Lepelletier, G. Giordano, M. Chippaux, M. C. Pascal, *Mol. Microbiol.* **1994**, *11*, 1169.
6. S. Hashiro, M. Mitsunashi, H. Yasueda, *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *128*, 255.
7. A. M. Chaddock, A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R. G. Herrmann, R. B. Klosgen, C. Robinson, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2715.

2-7. 実験項

実験材料

Human Bone Gla Protein (Sigma-Aldrich)、Human Fibroblast Growth Factor 9 (R&D systems)、Complete His-tag purification Resin (Roche)、2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad)、Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad)、XL-ladder Broad (アプロサイエンス)、ミニプロテイン TGX gel 4-15% gradient (Bio-Rad)、Precision Plus Protein WesternC standard (Bio-Rad)、Brij35 (Sigma-Aldrich)、3×FLAG peptide (Lifetein)、5-TAMRA-C₆-mal. (AAT Bioquest)

上記以外の試薬は、Sigma-Aldrich、FUJIFILM 和光純薬、純正化学、ナカライテスク、BD Difco から購入した。各種溶液や培地の調製には、超純水製造装置 Milli-Q (Merck-Millipore)で製造した超純水を用いた。

使用プラスミド

Name	Features	Reference
pPK10	<i>Corynebacterium-E. coli</i> shuttle vector carrying <i>tatABC</i> from <i>C. glutamicum</i> , pHM1519-ori, pUC-ori; Kanamycin resistance	文献 ⁴
pPK10-FGF9-His ₆	pPK10 derivative carrying FGF9 gene from <i>Homo sapiens</i> fused with <i>E. coli</i> TorA secretion signal peptide and His ₆ -tag	本研究にて構築
pPK10-FGF9-His ₆ -BGP _{c7}	pPK10 derivative carrying FGF9 gene from <i>Homo sapiens</i> fused with <i>E. coli</i> TorA secretion signal peptide, His ₆ -tag and C-terminal sequence of BGP	本研究にて構築

使用菌株

Name	Features	Reference
YPS010	<i>C. glutamicum</i> ATCC13869 derivative	文献 ⁶

YPS010/pPK10	<i>C. glutamicum</i> YPS010 harboring pPK10 plasmid	本研究にて構築
YPS010/pPK10-FGF9-His ₆	<i>C. glutamicum</i> YPS010 harboring pPK10-FGF9-His ₆ plasmid	本研究にて構築
YPS010/pPK10-FGF9-His ₆ -BGPc7	<i>C. glutamicum</i> YPS010 harboring pPK10-FGF9-His ₆ -BGPc7 plasmid	本研究にて構築

使用培地

CM2G 培地

組成

Glucose	5 g/L
Polypeptone	10 g/L
Yeast extract	10 g/L
NaCl	5 g/L

溶解後、KOHを用いてpH7.0に調整した
 平板培地作製時は、Agarを20 g/Lとなるよう加えた
 滅菌は120℃, 20分間の条件で実施した

化学合成培地

組成

Glucose	5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	6 mg/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	6 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
myo-inositol	1.6 mg/L
Pyridoxine hydrochloride	0.1 mg/L
Thiamine hydrochloride	0.1 mg/L
Biotin	0.1 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	15 µg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	76 µg/L
DL-Methionine	30 mg/L
CaCl ₂	0.6 g/L
MOPS	12.5 g/L

溶解後、KOHを用いてpH7.0に調整した
 フィльтраーションにて滅菌を行った

FGF9 分泌生産プラスミドの構築

ヒト成熟型 FGF9 (Uniprot accession number: P31371) の N 末端に *E. coli* TorA 分泌シグナルペプチド配列、C 末端に His₆-tag または His₆-tag 及び BGPc7 配列を C 末端に融合したアミノ酸配列を設計した後、*C. glutamicum* のコドン使用頻度に最適化された塩基配列に変換した。得られた塩基配列について、GenScript 社に合成及び pPK10 ベクターの制限酵素 Kpn I サイト及び BamH I サイトへのサブクローニングを委託し、プラスミドを構築した。

C. glutamicum のプラスミド形質転換

YPS010 株をグリセロールストックから CM2G 培地 3 mL を分注した試験管に植菌し、30°C、120 rpm の条件で振とう培養した。直視吸光光度計 miniphoto 518R (TAITEC) を用いて 660 nm で吸光度を測定し、0.4 以上に達した時点で培養を停止した。培養液 1 mL を 15,000 rpm、4°C の条件で 2 分間遠心分離し、上清を除いた。滅菌超純水 1 mL を加えて菌体を再懸濁した後、15,000 rpm、4°C の条件で 2 分間遠心分離し、上清を除いた。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、滅菌超純水 0.1 mL を加えて懸濁した菌体液をエレクトロコンピテントセルとして使用した。コンピテントセル溶液 100 µL にプラスミドを 100 ng 添加し、ピペットで混合した後にエレクトロポレーション用キュベット (Bio-rad) に移し、氷上で 5 分間静置した。GenePulser Xcell (Bio-rad) を用いて、1.8 kV、200 Ω の条件でエレクトロポレーションを行った後、すみやかに CM2G 培地 1 mL を加え、30°C、120 rpm の条件で 1 時間の振とう培養を実施した。培養後、カナマイシン 25 µg/mL 含有 CM2G 平板培地に塗布し、30°C にて 24 時間静置培養した。生育したシングルコロニーを形質転換体として取得した。

C. glutamicum タンパク質分泌生産株の培養評価

96-deep well plate (Thermo fisher scientific)に、カナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 CM2G 培地を 600 μL ずつ分注し、各ウェルにグリセロールから少量の菌体を植菌した。プレートシェイカー (TAITEC)を用い、30°C、1,200 rpm にて 24 時間振とう培養し、前培養液を得た。次いで、低吸着V底 96-deep well plate (住友ベークライト)にカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有化学合成培地を 600 μL ずつ分注し、前培養液を 30 μL ずつ植菌した。プレートシェイカーを用い、30°C、1,200rpm にて 24 時間培養した。培養液の吸光度は、滅菌超純水を用いて 50 倍希釈した後、分光光度計 U-3900 (HITACHI ハイテック)を用いて 600 nm の波長で測定した。

SDS-PAGE

培養上清などの溶液を、 β -メルカプトエタノールを 5%含有する 2 x Laemmli sample buffer と等量混合し、ヒートブロックを用いて 95°C で 3 分間熱処理を行って泳動用サンプルを調製した。調製したサンプルをミニプロテイン TGX gel 4-15% gradient に 10 μL アプライした。分子量マーカーとして、XL-Ladder Broad を 3 μL アプライした。泳動装置は Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-rad)を使用し、200 V、3 A、300 W 条件にて 30 分間泳動した。泳動後のゲルは、Coomassie Brilliant Blue を用いて室温で 1 時間染色した後、超純水を用いてゆるやかに振とうしながら脱色した。脱色後のゲルを Amersham Imager 600 (Cytiva)を用いて撮影した。蛍光検出を行う場合は、分子量マーカーとして Precision Plus Protein WesternC standard を 3 μL アプライし、同様に泳動を行った後、Amersham Imager 600 を用いて 520 nm の波長で励起し、605/40 nm バンドパスフィルターを用いて蛍光検出した。

C. glutamicum 培養液を用いた Ni アフィニティ精製

培養上清 1 mL に Complete His-tag purification Resin 100 μL を加え、ローター

ターを使用して 25°C で 1 時間混合した。混合後の溶液を 2,000 rpm、25°C の条件で 10 秒間遠心分離し、上清を除去した。Resin に Wash buffer (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、5 mM imidazole、pH 8.0) 0.5 mL を加えて 5 分間混合した後、2,000 rpm、25°C の条件で 10 秒間遠心分離し、上清を除去した。この洗浄操作を 5 回繰り返した。最後に、Resin に Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、250 mM imidazole、pH 8.0) 200 μL を加え 10 分間混合し、10,000 rpm、25°C の条件で 1 分間遠心分離し、目的タンパク質を含む上清を回収した。

逆相 HPLC を用いた精製 FGF9-His₆ 及び FGF9-His₆-BGPc7 の定量

TSKgel Protein C4-300 カラム (TOSOH) と高速液体クロマトグラフ Chromaster (HITACHI ハイテック) を用いた逆相 HPLC にて測定した。0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの 16-56% (v/v) のリニアグラジエント、流速 1 mL/min 条件で FGF9-His₆ 及び FGF9-His₆-BGPc7 を分析し、280 nm の波長で検出した。標品として FGF9 を 2 点検量し、サンプル中の FGF9-His₆ 及び FGF9-His₆-BGPc7 濃度を算出した。

抗 BGP scFv Q-body の調製

抗 BGP scFv の V_H 鎖 N 末端に蛍光色素修飾用の Cys 残基を含むタグ配列を有する遺伝子がコードされたプラスミドを *E. coli* Shuffle T7 express lysY に形質転換し、アンピシリン 100 μg/mL 含有 LB 平板培地にて形質転換体を選択した。得られた形質転換体をアンピシリン含有 LB 培地 4 mL を用いて 30°C、200 rpm にて終夜振とう培養した。得られた前培養液 4 mL をアンピシリン含有 LB 培地 800 mL に添加して 30°C、200 rpm にて培養した。OD_{600 nm} が 0.4 に達した時点で IPTG を終濃度 0.4 mM となるように添加し、16°C、200 rpm にて終夜振とう培養した。培養液を

8,000 g, 4°Cの条件で 10 分間遠心することで菌体を回収した。回収した菌体を TALON buffer (50 mM phosphate, 0,3 M NaCl, pH8.2) 8 mL に懸濁し、菌体破碎装置 (Constant Systems Ltd.)を用いて破碎した。破碎液を 8,000 g, 4°Cの条件で 10 分間遠心して上清を回収し、平衡化した TALON® metal affinity resin 100 µL を加えて 4°Cで 30 分間転倒混和した。続いて、ビーズを TALON® 2 mL Disposable Gravity Column (タカラバイオ)に充填し、TALON wash buffer (TALON buffer w/50 mM imidazole) 1 mL で 6 回洗浄を行った後、TALON elution buffer (TALON buffer w/500 mM imidazole)にて溶出を行って Cys タグ融合抗 BGP scFv を回収した。Cys タグ融合抗 BGP scFv を含む溶液 100 µL に、TCEP 及び EDTA をそれぞれ終濃度 2.5 mM, 10 mM で添加し、25°Cで 30 分間静置した。更に ABA を終濃度 10 mM となるように添加し、4°Cで 10 分間インキュベートした。10 mM 5-TAMRA-C₆ mal.を 1 µL 添加し、遮光した状態で室温にて 2 時間インキュベートした。インキュベート後の溶液に平衡化した FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) 40 µL を添加し、4°Cで 16 時間転倒混和した。PBS w/0.1% Brij35 1 mL で 6 回、PBS w/0.1% Tween 20 1 mL で 3 回の洗浄操作を行った後、3×FLAG peptide 150 µg/mL を含む PBS w/0.1% Tween 20 を加えて 30 分間溶出することで、抗 BGP scFv Q-body を調製した。

Q-body assay

96-well black plate (Thermo Fisher Scientific)の各ウェルに PBS w/0.2%(w/v) BSA, 0.1%(v/v) Tween 20 を 200 µL ずつ分注し、次いで 100 nM 抗 BGP scFv Q-body 溶液を 25 µL ずつ添加した。以下の各種モル濃度(30 µM、10 µM、3.33 µM、1.11 µM、0.37 µM、123 nM、41 nM、13.7 nM、4.6 nM)に PBS w/0.1%(v/v) Tween 20 で希釈した任意の抗原溶液を調製し、各ウェルに 25 µL ずつ添加した。プレートシ

エイカー(BIO-SAN)を用いて 1,000 rpm で 1 分間振とう混合した。その後、25°Cで 30 分間静置し、マイクロプレートリーダーSpectraMaxM2 (Molecular Devices)を用いて Excitation: 532 nm、Emission: 580 nm で蛍光を測定した。測定したデータは統計ソフトウェア Prism (MDF)を用いて解析した。

培養液の Q-body 測定

培地に抗 BGP scFv Q-body を終濃度 100 nM となるように添加し、上記した方法と同様に培養を行った。22 時間後の培養液を、96-well black plate に 200 μ L 分取し、マイクロプレートリーダーSpectraMaxM2 を用いて Excitation: 532 nm、Emission: 580 nm で蛍光を測定した。

第三章

Q-body を用いたエマルション内タンパク質濃度の測定

3-1. 緒言

前章では、Q-body を用いて微生物が培養液中に分泌したタンパク質の検出に適用可能であることを示した。本章では、マイクロドロプレットスクリーニング法の確立に向けた次のステップとして、Q-body を用いてマイクロドロプレットに内封されたタンパク質濃度の測定を試みた。

緒言で述べたように、マイクロドロプレットは作製素材から W/O/W エマルジョンとハイドロゲルカプセルの 2 種に大別される⁽¹⁾。いずれも一長一短があるが、本研究においては内封されたタンパク質の拡散漏洩が生じづらいという長所を持ち、高いスクリーニング精度が期待できることから、マイクロドロプレットとして W/O/W エマルジョンを採用した。近年、粒径均一性の高さから無脈動型の送液ポンプと微小な流路を持つマイクロ流体チップを組合わせたマイクロ流体装置による W/O/W エマルジョンの作製が主流となっている (図 3-1)⁽²⁾。

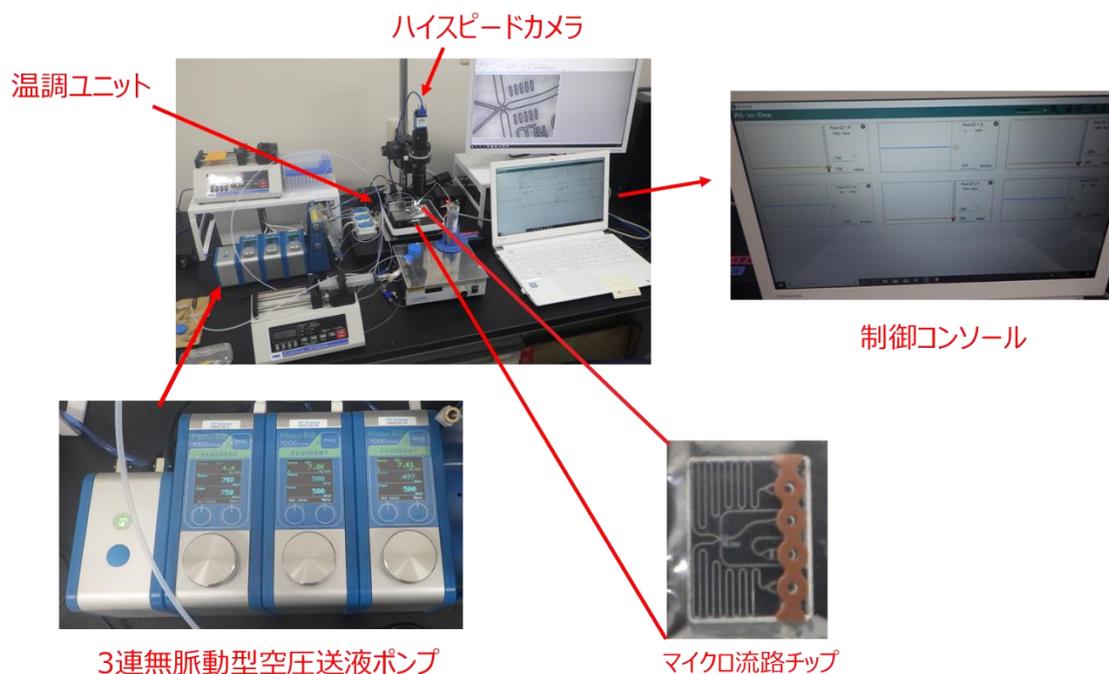


図 3-1. マイクロ流体装置概要

マイクロ流体装置を用いた W/O/W エマルションの作製は、2 段階の工程からなる。最初のステップでは、マイクロ流体チップ内の微小流路に内水相となる水溶液を送液し、別の流路から送液した界面活性剤を含むフッ素系オイルで剪断することで、微小な Water-in-oil (W/O) エマルションを形成する (図 3-2. A)。作製した W/O エマルションを回収し、フッ素系オイルとともに再度マイクロ流体チップ内の微小流路に送液し、外水相となる水溶液を別の流路から送液して剪断、オイル相で覆われた W/O/W エマルションが形成される (図 3-2. B)。

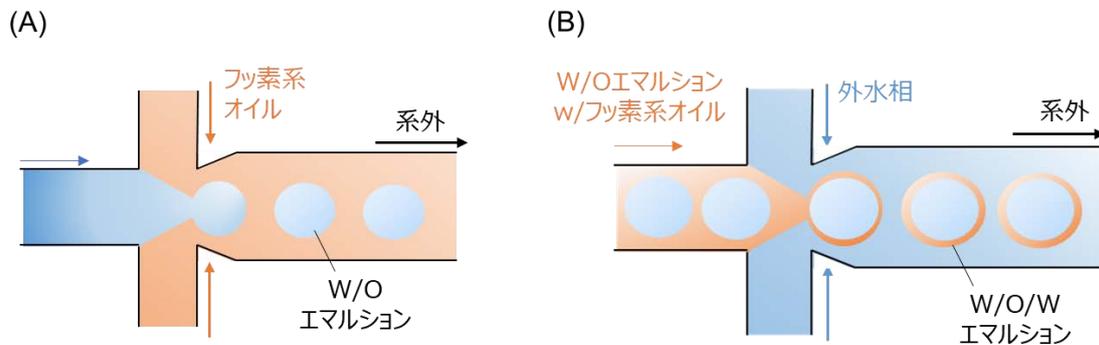


図 3-2. (A)W/O エマルション作製の模式図 (B)W/O/W エマルション作製の模式図

W/O/W エマルションの作製において重要な点として、粒径の均一性が挙げられる。マイクロドロプレットスクリーニングでは、バイオセンサーを封入した個々のエマルションの蛍光をフローサイトメトリーで検出し、その蛍光強度から各エマルションのタンパク質分泌量の多寡を判別する。フローサイトメトリーでは、エマルションの単位蛍光強度が同じであっても、体積の大きいエマルションは小さいエマルションと比較してより強い蛍光シグナルが検出される。そのため、エマルション粒径が不均一であると、エマルションごとの体積の差が検出される蛍光強度に対して強い影響を及ぼし、Q-body を用いたエマルション内タンパク質の正確な蛍光測定が困難となる。また技術的な制約として、一般的なフローサイトメーター (Flowcytometer, 以下 FCM)はノズル径が 100

μm 前後であり、 $30\ \mu\text{m}$ を超える粒径のエマルションは解析時に破損しやすいことが知られている。これらの点を踏まえて、まず粒径 $30\ \mu\text{m}$ 以下かつ粒径均一性の高い W/O/W エマルション作製条件を検討し、次いで W/O/W エマルションに Q-body を封入し、FCM を用いてエマルション内のタンパク質濃度を測定可能か詳しく調べた。

3-2. W/O エマルション作製条件検討

マイクロ流体装置を用いたエマルション作製では、マイクロ流体チップの流路径や装置構成の違いなどによって粒径均一なエマルションを作製する流速条件が異なるため、用いた装置設定ごとに最適な流速条件を設定する必要がある。本節では、第一のステップである W/O エマルションの作製条件の検討を行った。エマルション粒径は、基本的に作製に用いたマイクロ流体チップのジャンクション流路径によって決定されるため、ジャンクション流路径が $30\ \mu\text{m}$ のマイクロ流体チップを用いた。当該分野では、オイル相として低粘性で送液が容易であり、エマルションの安定化に有効な Fluorosurfactant を含有するフッ素系オイル HFE-7500 がゴールドスタンダードとして広く用いられており³、本研究においても使用した。内水相には、エマルションの安定化を目的に Tween 20 を添加することが一般的であるが⁴、Tween 20 は微生物に有害であることが知られており、スクリーニング時の菌体生育に悪影響を及ぼす可能性が考えられたため、同様にエマルションの安定化に寄与する BSA を加えた PBS を用いることとした⁵。マイクロ流体装置を用いて、上記条件での最適な流速条件の探索を行い、最終的に表 3-1 に示す流速条件を見出した。当該条件においては、安定的かつ約 10^7 エマルション/h と高生産性での W/O エマルション形成が可能であった (図 3-3)。作製された W/O エマルションは粒径が約 $28\ \mu\text{m}$ で、高い粒径均一性を示した (図 3-4)。

表 3-1. W/O エマルション作製流速条件

溶液組成	Flowrate ($\mu\text{L}/\text{min}$)
内水相 : PBS w/1%(w/v) BSA	4.2
オイル相 : HFE7500 w/2%(w/w) Fluorosurfactant	20.0

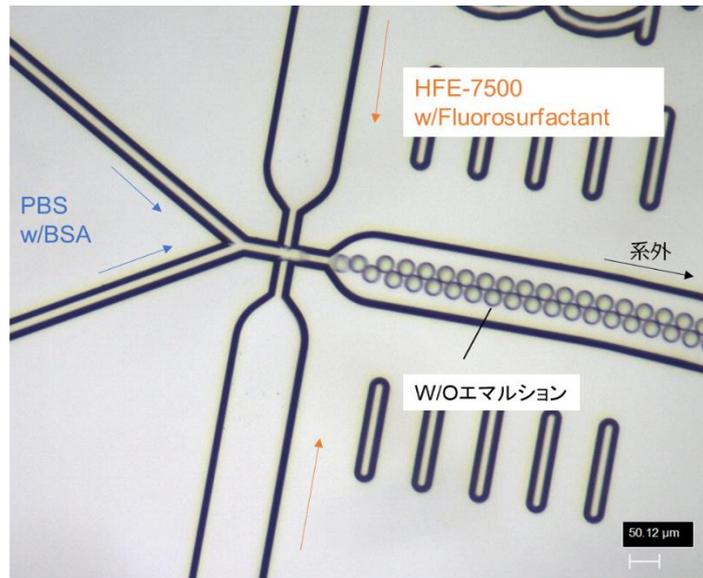


図 3-3. W/O エマルション作製時マイクロ流体チップジャンクション画像

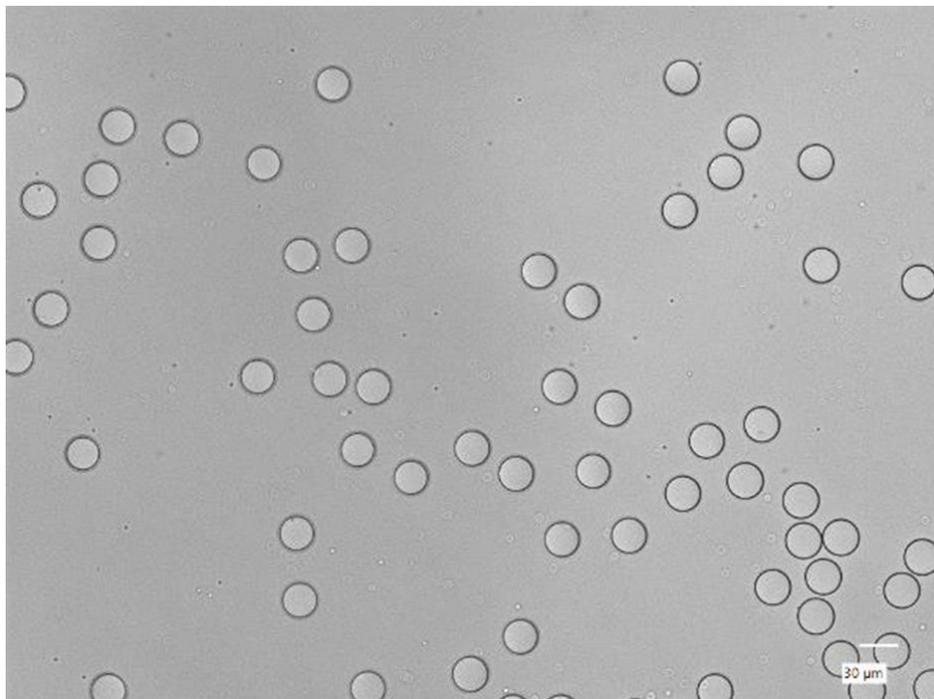


図 3-4. W/O エマルションの顕鏡画像(観察倍率: 200 倍)

3-3. W/O/W エマルション作製条件検討

続いて、第二の工程である W/O/W エマルション作製条件の検討を行った。当初、W/O エマルション作製時と同様にジャンクション流路径が 30 μm のマイクロ流体チップを用いようとしたが、インジェクションした W/O エマルションが流路内で破損する現象が見られた。原因として、流路径と W/O エマルション粒径がほぼ同じであり、流路に付着した汚れや混入した微細なプラスチック片及び繊維などに W/O エマルションが接触して破損が生じると考えられたため、ジャンクション流路径 100 μm のマイクロ流体チップを用いることとした。外水相として、エマルションの安定化への寄与が知られる界面活性剤 Kolliphor P188 及び Tween 20、増粘による剪断力向上を目的に PEG を加えた PBS を用いた^{6,7}。マイクロ流体装置を用いて、上記条件での最適な流速条件の探索を実施し、表 3-2 に示す流速条件を見出した。当該条件においては、安定的かつ約 10^6 エマルション/h と高生産性での W/O/W エマルション形成が可能であった (図 3-5)。作製された W/O/W エマルションは、顕微鏡観察で内水相が薄いオイル相に覆われた構造をしていることが認められた (図 3-6)。また、粒径平均 30 μm と目標の 30 μm 以下をおおむね満たしており、粒径 CV<1%と高い均一性を備えていた。以上より、マイクロドロップレットスクリーニングに適した粒径均一性の高い W/O/W エマルションの作製条件を確立した。

表 3-2. W/O/W エマルション作製流速条件

溶液組成	Flowrate ($\mu\text{L}/\text{min}$)
W/Oエマルション w/HFE-7500	0.4
外水相: PBS w/2%(w/v) Kolliphor P188, 1%(v/v) Tween 20, 10%(w/v) PEG	20.0

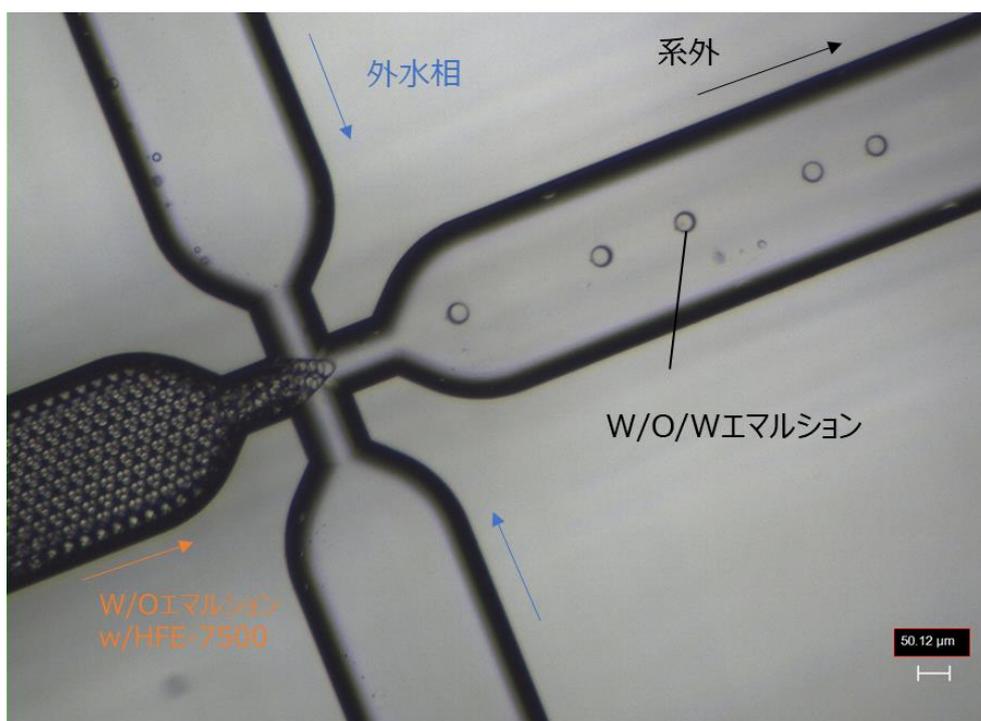


図 3-5. W/O/W エマルジョン作製時マイクロ流体チップジャンクション画像

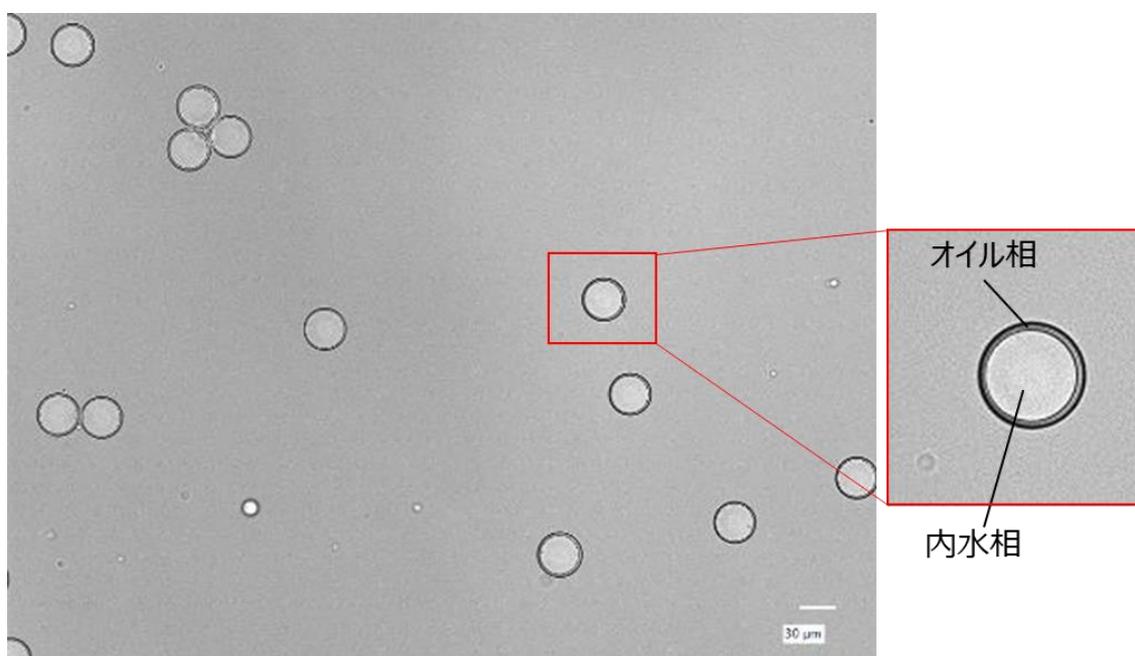


図 3-6. W/O/W エマルジョンの顕鏡画像(観察倍率: 200 倍)

3-4. W/O/W エマルションへのタンパク質封入試験

W/O/W エマルション作製条件が確立されたことから、W/O/W エマルションの内水相にタンパク質を封入し、内封したタンパク質が外部への拡散漏洩無く安定的に保持されるか検証した。具体的には、緑色蛍光タンパク質 GFP を添加した水溶液を用いて W/O/W エマルションを作製し、PBS 溶液中でエマルション培養期間を想定した 48 時間の静置を行って前後の蛍光強度の変化を観察した。静置開始時の観察から、W/O/W エマルションの内水相部分が GFP に由来する緑色蛍光を示しており、想定通りに GFP が W/O/W エマルションに内封されていることが認められた (図 3-7. A)。静置 48 時間後に再度観察を行った結果、内水相の蛍光強度に低下は見られず、内封した GFP の拡散漏洩が生じていないことが示唆された (図 3-7. B)。以上の結果から、W/O/W エマルションに内封したタンパク質は長時間安定的に保持されることが確認され、W/O/W エマルションを用いたスクリーニングにおいて、バイオセンサー Q-body 及び分泌されたタンパク質が外部漏洩するリスクは少ないと結論付けた。

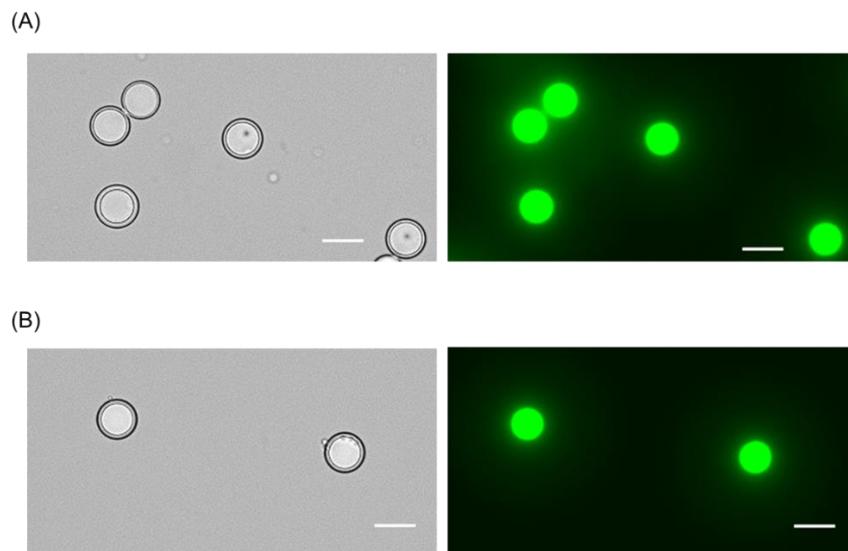


図 3-7. (A)静置開始時 W/O/W エマルション顕鏡画像 (左:明視野、右:蛍光観察)

(B)静置 48 時間後 W/O/W エマルション顕鏡画像 (左:明視野、右:蛍光観察)

白いバーは 30 μm を示す

3-5. Q-body を用いた W/O/W エマルション内封タンパク質の測定

次に、Q-body を用いた W/O/W エマルション内でのタンパク質濃度測定を検討した。具体的には、内水相に抗 BGP scFv Q-body を一定濃度、リガンドである精製 FGF9-His₆-BGPc7 を 0 nM、30 nM、3,000 nM の 3 段階の濃度で含有する W/O/W エマルションをそれぞれ作製し、セルソーターを用いて解析を実施した (図 3-8)。

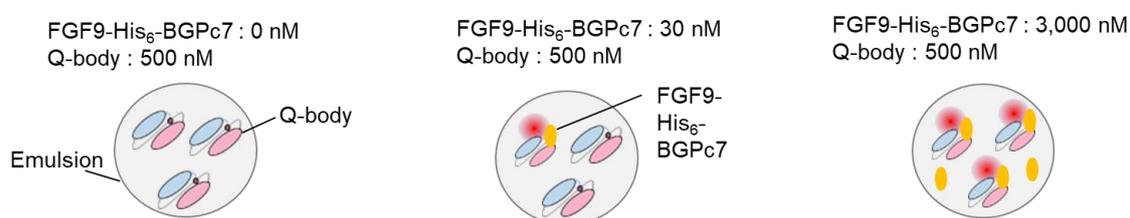


図 3-8. Q-body 及び精製 FGF9-His₆-BGPc7 封入エマルション模式図

FCM 解析のゲーティングについて述べる。まず前方散乱光 (FSC: Forward scatter)と後方散乱光 (BSC: Back scatter)を測定した。FSC は一般に測定対象の大きさを判別し、粒径が大きいほど FSC の強度が高くなる⁸⁾。また、BSC は測定対象の内部構造の複雑さを検出し、構造の複雑性が高いほどより高い BSC のシグナルが検出される。これらのパラメータを用いることで、W/O/W エマルション作製工程で混入した数 μm 程度のオイル小片と、より粒径が大きく複雑な内部構造を持つ W/O/W エマルションの集団を分離し、W/O/W エマルションのみを選択した (図 3-9. A)。次いで、FCM での蛍光検出時に偶発的に発生する 2 個の W/O/W エマルションが同時に検出されたダブルレットと呼ばれるシグナルを除去した。ダブルレットは 2 個分のエマルションに由来する高い蛍光強度を示し、蛍光強度を指標とした選択回収時にノイズとして混入する。ダブルレットの特徴として FSC の幅 (FSC-W)の値が高いことが知られており⁹⁾、FSC の高さ (FSC-H) と FSC-W を測定し、より高い FSC-W シグナルを示す

集団を除いて選択した (図 3-9. B)。このようにしてノイズを除いた後、W/O/W エマルションの蛍光強度を測定した。

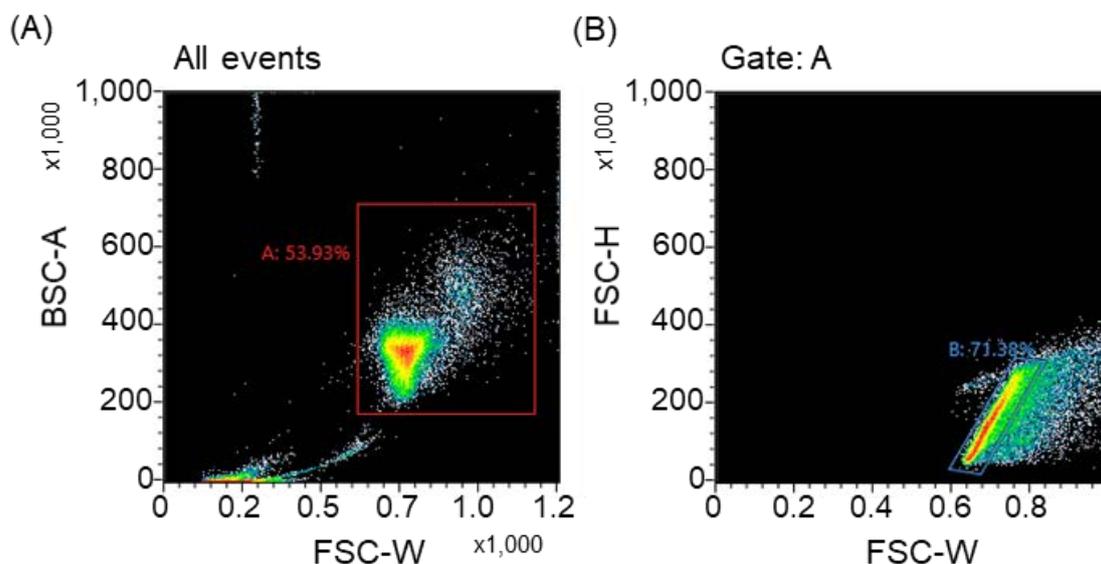


図 3-9. (A)W/O/W エマルションの FSC 及び BSC 測定 (B)FSC-W 及び FSC-H 測定によるダブレット除去

前述した手順で、Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 含有 W/O/W エマルションを FCM 解析した結果、FGF9-His₆-BGPc7 封入濃度が 0 nM、30 nM、3,000 nM と増加するの比例して、より高い蛍光強度にピークがシフトし、抗原濃度依存的な蛍光強度の向上が認められた (図 3-10)。また、顕微鏡観察においても、FGF9-His₆-BGPc7 を封入しない W/O/W エマルションと比較して、FGF9-His₆-BGPc7 封入濃度 3,000 nM の W/O/W エマルションはより高い蛍光強度を示すことが確認された (図 3-11)。以上の結果より、Q-body を封入することで、W/O/W エマルション内の目的タンパク質濃度を蛍光強度として検出可能であることが示唆された。

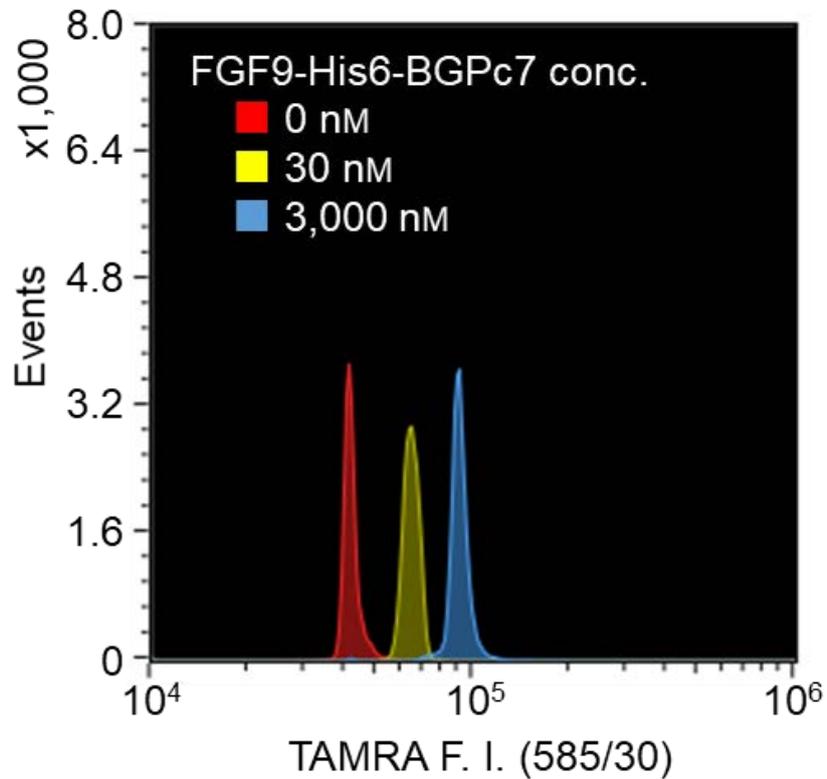


図 3-10. Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 封入エマルジョンの FCM 解析 ($n=30,000$)

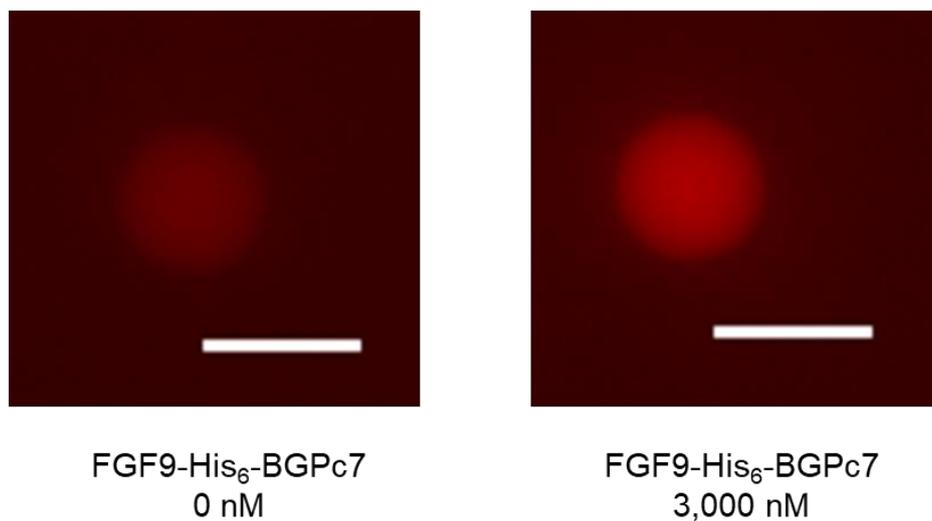


図 3-11. Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 封入エマルジョン顕鏡画像 (蛍光観察)

白いバーは 30 μm を示す

3-6. 第三章のまとめ

本章では、スクリーニングに用いるマイクロドロップレットとして、内封タンパク質の外部拡散漏洩が構造上生じにくい W/O/W エマルションを選定した。次いで、マイクロ流体装置を用いた W/O/W エマルション作製検討を行い、セルソーターでの解析に適した粒径約 30 μm かつ粒径均一性の高い W/O/W エマルション作製条件を確立した。GFP を用いた W/O/W エマルションへの封入試験を行い、内封された GFP が拡散漏洩することなく長時間保持されることを確認し、W/O/W エマルションでは内封タンパク質の漏洩リスクが少ないことを実証した。更に、W/O/W エマルションに Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 を封入してセルソーター解析を行い、内封された FGF9-His₆-BGPc7 の濃度増加に比例して、Q-body の蛍光強度が上昇することを示した。以上の結果から、Q-body を用いて W/O/W エマルション内で目的タンパク質濃度を測定可能であると結論付けた。

3-7. 参考文献

1. R. J. Tatenhove-Pel, J. A. Hernandez-Valdes, B. Teusink, O. P. Kuipers, M. Fischlechner, H. Bachmann, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *61*, 72.
2. D. Saeki, S. Sugiura, T. Kanamori, S. Sato, S. Ichikawa, *Lab Chip*, **2010**, *10*, 357.
3. J. Yan, W. C. Bauer, M. Fischlechner, F. Hollfelder, C. F. Kaminski, W. T. S. Huck, *Micromachines* **2013**, *4*, 402.
4. T. D. Dimitrova, F. L. Calderon, *Langmuir* **1999**, *15*, 8813.
5. J. Rangsansarid, K. Fukada, *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *316*, 779.
6. T. K. Law, T. L. Whateley, A. T. Florence, *J. Control. Release* **1986**, *3*, 279.
7. S. W. Lim, A. R. Abate, *Lab Chip*. **2013**, *13*, 4563.
8. 澤田純、山本拓也：「新世代フローサイトメトリー活用スタンダード」、羊土社
9. N. A. Zilmer, M. Godavarti, J. J. Rodriguez, T. A. Yopp, G. M. Lambert, D. W. Galbraith, *Cytometry*. **1995**, *20*, 102.
10. K. K. Brower, C. Crumpton, S. Klemm, B. Cruz, G. Kim, S. G. K. Calhoun, L. Nichols, P. M. Fordyce, *Lab Chip*. **2020**, *20*, 1062.

3-8. 実験項

実験材料

HFE-7500 w/2%(w/w) Fluorosurfactant (RAN Biotechnologies)、Tween 20 (ナカライテスク)、BSA (Sigma-Aldrich)、PBS (タカラバイオ)、Kolliphor P188 (Sigma-Aldrich)、PEG Mw:35,000 (Sigma-Aldrich)、GFP (Merck-millipore)、IsoFlow (BECKMAN COULTER)

マイクロ流体装置

コンプレッサー、ハイスピードカメラ、温調ユニット、3連の無脈動型空圧式ポンプ、流量センサーユニット、及び3連のマイクロ流体流量センサーを連結して構築したマイクロ流体装置を使用した。これらの構成部品はいずれも **Fluigent** から購入した。ポンプ圧力及び溶液の送液速度は、**A-i-O software (Fluigent)**を使用してデスクトップPCで制御した。

W/O/W エマルションの作製

初めに、親フッ素コーティングされた 30 μm ジャンクション流路のマイクロ流体チップ (**Blacktrace**)を使用し、内水相となる水溶液をマイクロ流体装置でマイクロ流体チップの流路に送液し、別の流路ラインから HFE-7500 w/2%(w/w) Fluorosurfactant を送液して剪断することで W/O エマルションを作製した。次に 100 μm ジャンクション流路のマイクロ流体チップ (**Blacktrace**)を使用し、調製した W/O エマルションと HFE-7500 w/2%(w/w) Fluorosurfactant をマイクロ流体装置でマイクロ流体チップの流路に送液し、別の流路ラインから PBS w/2%(w/v) Kolliphor P188, 1%(v/v) Tween 20, 10%(w/v) PEG Mw:35,000 を送液して剪断することで W/O/W エマルションを作製した。

エマルションの顕微鏡観察

作製したエマルションを 10 μ L 分取し、ディスポーザブル血球計算盤 C-Chip (NanoEnTek) にアプライした後、蛍光顕微鏡 BZ-X810 (Keyence) を用いて 200 倍の観察倍率で観察した。GFP の蛍光観察は、GFP フィルタ (Excitation: 470/40 nm, Emission: 525/50 nm) を使用した。Q-body の蛍光観察は、TRITC フィルタ (Excitation: 545/25 nm, Emission: 605/70 nm) を使用した。

エマルション粒径解析

蛍光顕微鏡 BZ-X810 を用いてエマルションの画像を撮影し、ハイブリッドセルカウンティングソフトウェア (Keyence) を用いて無作為に選択したエマルション 200 個の粒径を測定、粒径平均及び粒径 CV 値を算出した。

W/O/W エマルションへの GFP 封入試験

PBS w/1%(w/v) BSA に対して、終濃度 1 μ M となるように GFP を添加した溶液を内水相として W/O/W エマルションを作製した。調製した W/O/W エマルションを PBS 溶液に添加して室温で静置し、0 時間及び 48 時間後に W/O/W エマルションを分取して顕微鏡観察した。

Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 封入 W/O/W エマルションの作製

PBS w/1%(w/v) BSA に対して、FGF9-His₆-BGPc7 を終濃度 0 nM, 30 nM, 3,000 nM となるように添加した 3 種類の溶液をそれぞれ調製し、更に全ての溶液に抗 BGP scFv Q-body を終濃度 500 nM となるように添加した。調製した 3 種類の溶液を内水相として W/O/W エマルションを作製した。

W/O/W エマルションの FCM 解析

W/O/W エマルション 100 μL を分取し、PBS w/1%(v/v) Tween 20 500 μL に添加して FCM 解析用サンプルを調製した。調製したサンプルは SH800S (SONY) を用いて解析を行い、561 nm レーザーを用いて蛍光を励起し、585/30 nm バンドパスフィルタを用いて蛍光を検出した。シース液として IsoFlow を用いた。詳細な解析条件は、Brower らの報告⁽¹⁰⁾を参考にして調整を行い、以下の表 3-3 に示した。

表 3-3. SH800S 解析設定

Parameter	
Nozzle size	130 μm
Trigger	FSC
Threshold	0.50%
FSC gain	1
BSC gain	25.0%
TAMRA gain	40.0%
Sample pressure	9 psi
Sheath pressure	9 psi

第四章

エマルション培養と Q-body を用いたタンパク質分泌株

スクリーニング法

4-1. 緒言

前章では、**Q-body** を用いて **W/O/W** エマルション内のタンパク質濃度測定が可能であることが示唆された。本章では、微生物菌体をエマルションに封入して培養し、分泌された目的タンパク質を **Q-body** を用いて検出、タンパク質分泌生産株を選択的に回収するスクリーニング法を検討した。

本研究で用いた **W/O/W** エマルション培養の詳細な手順について述べる。まず、**Q-body** を含む培地に菌体を懸濁した溶液を内水相とし、限界希釈によってシングルセルとなるように包括した **W/O** エマルションを形成する (図 4-1)。回収した **W/O** エマルションはフッ素系オイルに浮遊しており、この状態で静置培養を実施する。培養後の **W/O** エマルションを回収し、マイクロ流体装置を用いて **W/O/W** エマルションを形成、回収した **W/O/W** エマルションをセルソーター解析に供する手順である。この手順の特徴として、**W/O** エマルションの状態で培養することが挙げられる。**W/O/W** エマルションの作製まで連続して行い、**W/O/W** エマルションの状態で培養する方法がよりシンプルなプロセスであると思われる。しかし **W/O/W** エマルションは比重が大きく水溶液に沈降しており、物理的強度の低さから振とうが難しいこともあり、微生物の生育に必要な酸素の供給が望めない。このことから、水溶液の液面に浮遊する **W/O** エマルションの状態の方がより酸素の供給が望めると考えて、**W/O** エマルションの状態で培養することとした。上述した手順を用いて、対照株と **FGF9-His6-BGPc7** 分泌生産株をそれぞれエマルション培養し、**Q-body** の蛍光強度を指標に識別可能か検討した。次いで、対照株と **FGF9-His6-BGPc7** 分泌生産株の混合溶液をエマルション培養し、**FGF9-His6-BGPc7** 分泌生産株のみを選択的に回収することを試みた。

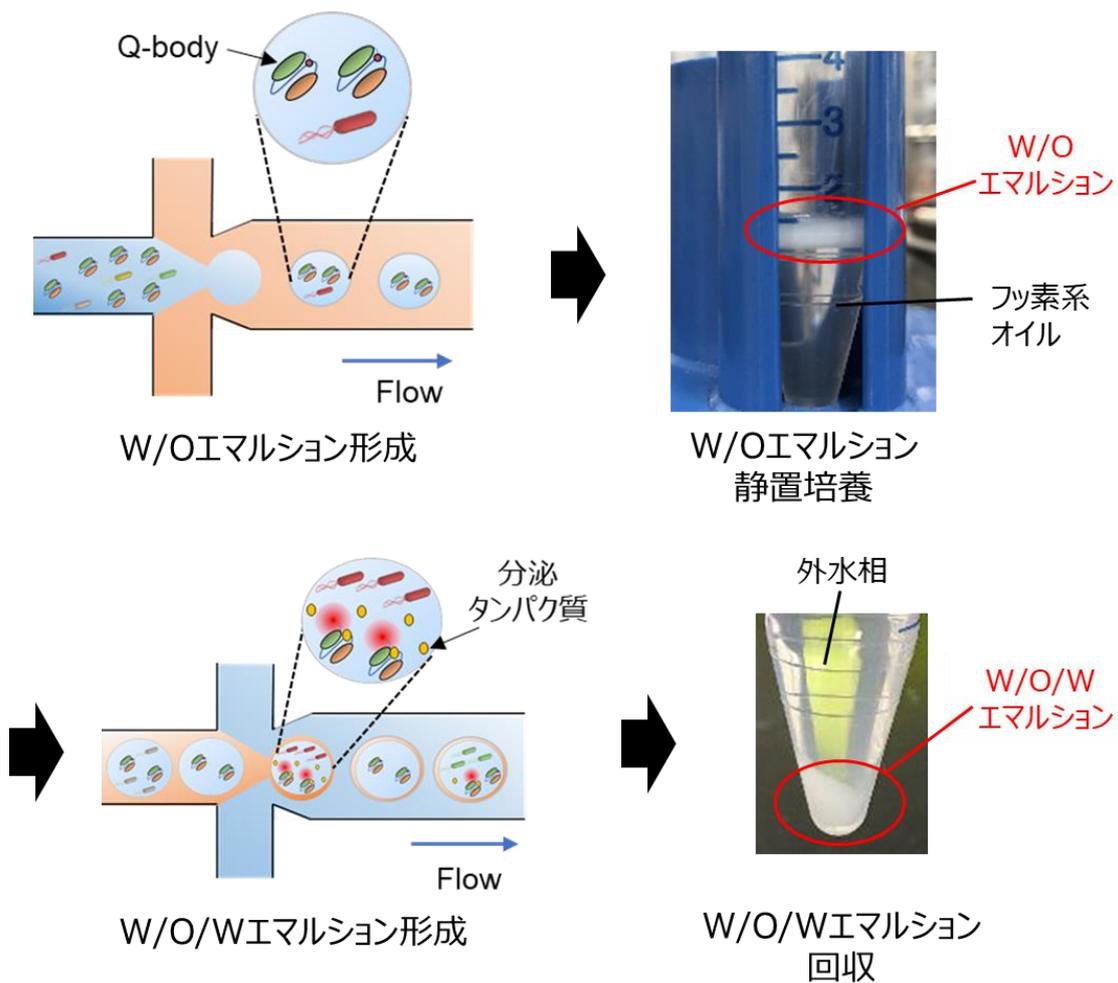


図 4-1. W/O/W エマルジョン培養

4-2. W/O/W エマルジョンへの菌体封入濃度検討

W/O/W エマルジョン培養で重要な点として、複数菌体が同一のエマルジョンに封入されてしまうと正確な培養評価が困難となるため、シングルセルとなるように菌体を封入する必要がある。前述のように、W/O/W エマルジョンへのシングルセル封入は限界希釈法を利用することを計画している。原理として、菌体を封入したエマルジョンの割合が増加するほど、2 つ以上の菌体が封入されたエマルジョンの割合が増加することが考えられる。一方で、菌体の封入率を下げると複数菌体が封入される割合は低下するが、空のエマルジョンの割合が増大し、スクリーニングのスループット性が低下するト

レードオフの関係にある。まず、最適な菌体封入率を決定すべく、ポアソン分布を用いて封入率とエマルジョン当たりの封入菌体数の関係を算出した¹⁾。算出結果から分かるように、菌体封入率を5%程度まで下げたとしても複数菌体が封入されたエマルジョンの割合は0にならないことから、スループット性とシングルセル封入率のバランスを考慮して、菌体封入率15%の条件を採用することとした(図4-2)。

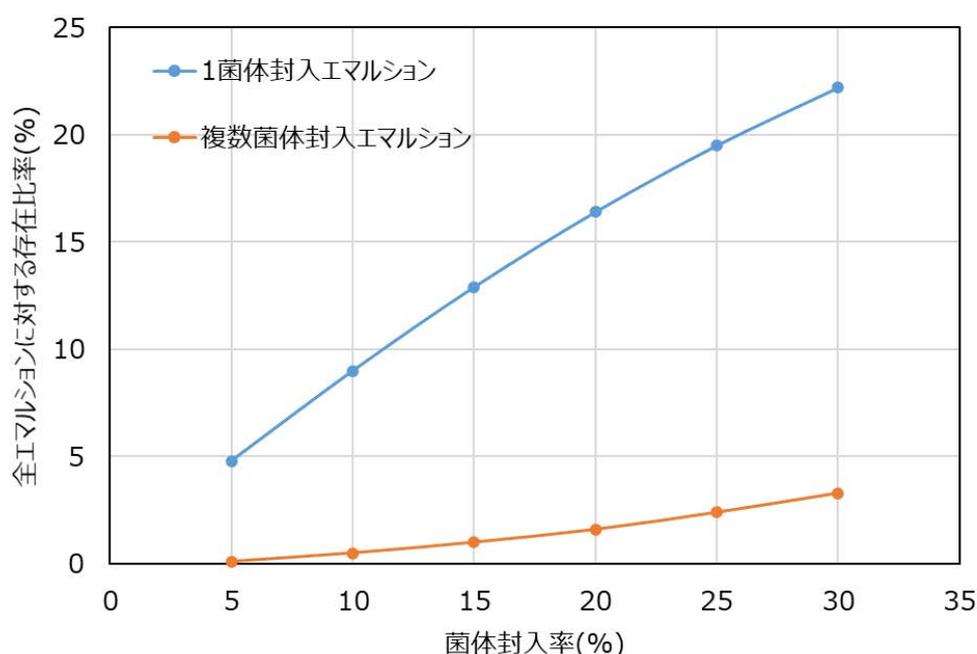


図4-2. ポアソン分布を用いた菌体封入率と封入菌体数の理論計算

次に菌体封入率15%となる菌体密度の算出を行った。粒径28 μmのW/Oエマルジョンの体積は約11.5 pLであり、ここに0.15菌体含まれることから、0.013 cells/pLの濃度の菌体溶液を用いる必要がある。吸光度を指標に当該濃度の菌体溶液を調製、W/Oエマルジョンを作製し、観察を容易とするために培養を行ってから封入率を実測した(図4-3)。菌体封入率の実測値は16%であり、ほぼ理論通りの菌体封入率であることが確かめられた。以降の実験では、0.013 cells/pL濃度の菌体溶液を用いてエマルジョンへの菌体封入を行うこととした。

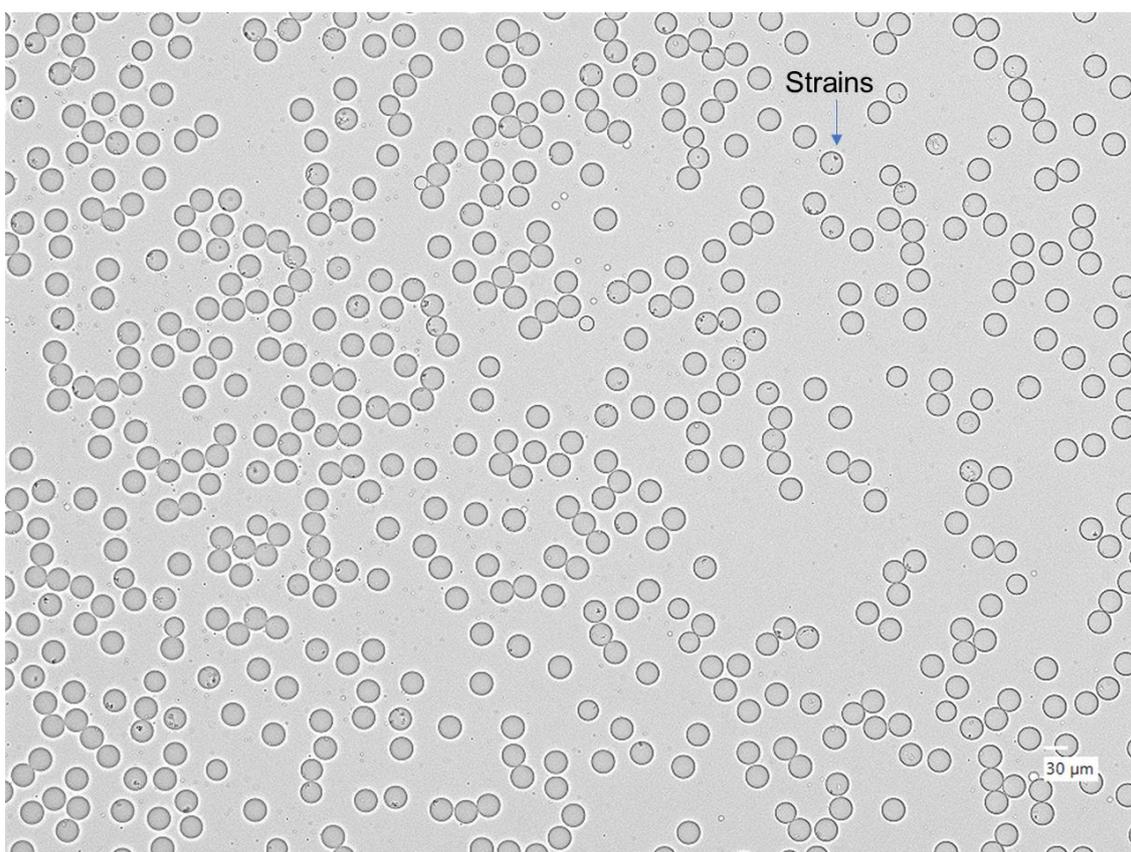


図 4-3. 菌体封入 W/O エマルジョンの培養後顕鏡画像

4-3. Q-body とエマルジョン培養を用いた FGF9-His₆-BGPc7 株の検出

Q-body を用いて、エマルジョン培養で分泌された目的タンパク質を蛍光シグナルとして検出し、対照株とタンパク質分泌生産株を識別可能か検証した。具体的には、陰性対照である YPS010/pPK10 株あるいは YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を培地及び Q-body と共に封入してエマルジョン培養を行い、48 時間培養後のエマルジョンの蛍光強度を測定した (図 4-4)。

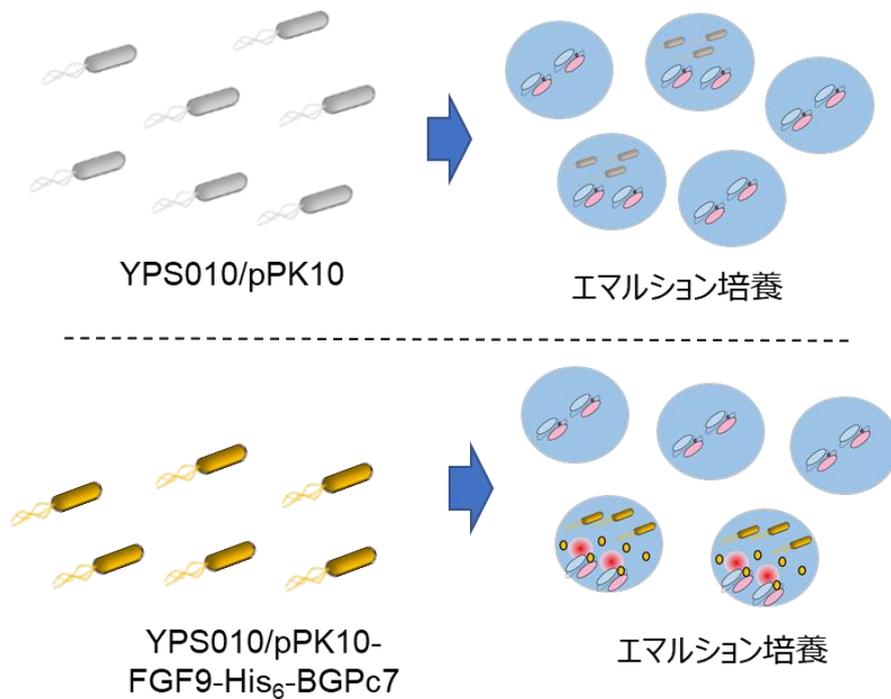


図 4-4. Q-body とエマルジョン培養を用いたタンパク質分泌株識別試験の模式図

静置培養開始時と 48 時間後の W/O エマルジョンを顕微鏡観察した結果、開始時はシングルセルであったが、48 時間後にはエマルジョン内で菌体増殖していることが認められた (図 4-5)。増殖した菌体は凝集しており、静置のエマルジョン培養では内水相の流動性が乏しく、コロニー様の増殖様式を示したと考えられた。尚、培養時間を延長しても顕微鏡観察ではエマルジョン内の菌体数に大きな変化は認められず、本研究におけるエマルジョン培養条件では、培養 48 時間までの時点で定常状態に達していると考えられた。次に培養後のエマルジョンを FCM 解析した。YPS010/pPK10 株封入エマルジョンの解析では、まず低い蛍光強度に菌体を含まない空エマルジョンに由来するピークが検出され、より高い蛍光強度に YPS010/pPK10 株を含むエマルジョン由来のピークが検出された (図 4-6)。空エマルジョンに比べて、YPS010/pPK10 封入エマルジョンが高い蛍光強度を示した原因は、増殖した菌体や培養で産生した低分子化合物に起因する蛍光バックグラウンドの増加によるものと考え

えられた。YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株封入エマルションの解析では、同様に空エマルションに由来するピークと菌体を含むエマルションに由来するピークの2本のピークが検出された。YPS010/pPK10 株封入エマルションに由来するピークと比較して、YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株封入エマルションに由来するピークはより高い蛍光強度を示したことから、エマルション培養においても Q-body の蛍光強度を指標にして対照株とタンパク質分泌生産株を識別可能であった。

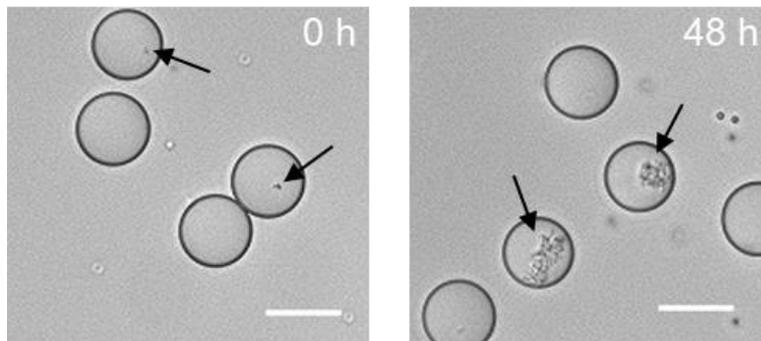


図 4-5. エマルション培養開始時及び 48 時間後の顕鏡画像

黒矢印は菌体、白いバーは 30 μm を示す

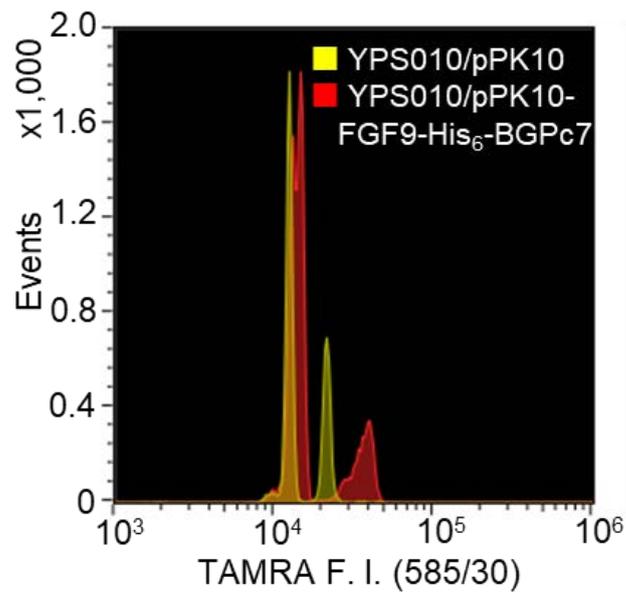


図 4-6. 培養後エマルションのセルソーター解析ヒストグラム ($n=20,000$)

4-4. Q-body とエマルション培養を用いた FGF9-His₆-BGPc7 株の選択回収

次に、陰性対照である YPS010/pPK10 株に対して、YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を 50:1 の比率となるように混合した菌体溶液を調製し、Q-body を用いたエマルション培養を行って YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株のみを選択的に回収できるか検証した (図 4-7)。

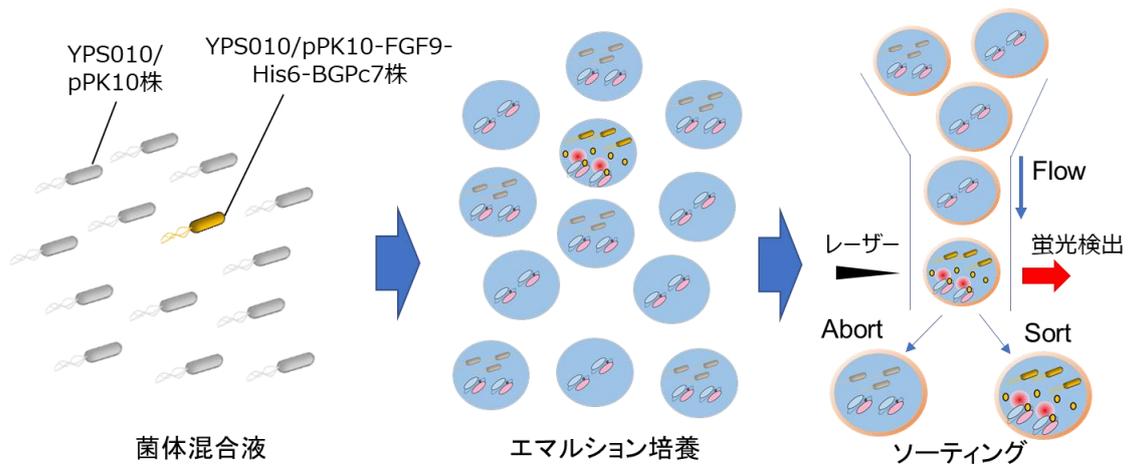


図 4-7. FGF9-His₆-BGPc7 分泌生産株ソーティング試験の模式図

培養後のエマルションをセルソーター解析した結果、2本の大きなピークが検出され、蛍光強度が低い最も大きなピークは菌体を含まない空エマルションに由来、より蛍光強度が高いピークは YPS010/pPK10 株を含むエマルションに由来すると推定された (図 4-8)。更に高い蛍光強度に小さなピークが認められ、このピークが僅かな存在比率の YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を含むエマルションと考え、ソーティングを行って回収した。

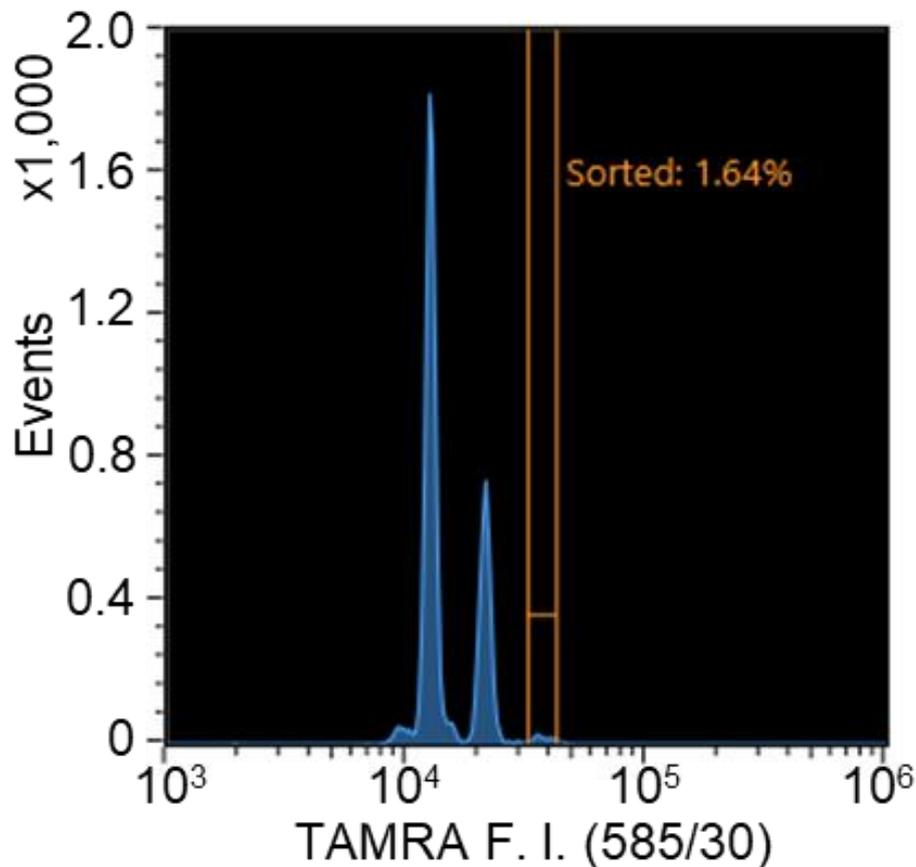


図 4-8. 菌体混合液封入エマルジョンの FCM 解析ヒストグラム ($n=20,000$)

ソート前後の W/O/W エマルジョンをそれぞれ CM2G 平板培地に塗布し、コロニー形成させることで内封された菌体を回収した。ソーティングによって YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株が選択的に回収されているかを解析すべく、分泌生産ベクターのクローニングサイト前後にアニールするプライマーセットを用いてコロニーPCRを行い、増幅産物のサイズから菌株を同定した (図 4-9)。ソート前のエマルジョンから回収した 20 株は、増幅産物サイズからいずれも YPS010/pPK10 株であると同定されたのに対し、ソート後エマルジョンから回収した 20 株は全て YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株と同定され、Q-body の蛍光シグナルを指標に僅かに存在する FGF9-His₆-BGPc7 分泌生産株を選択的に回収することに成功した (図 4-10)。

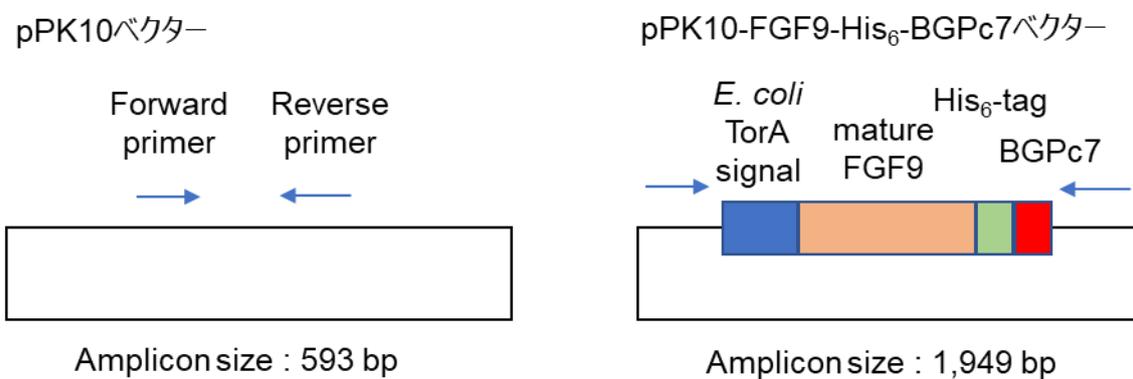


図 4-9. コロニーPCR によるエマルション回収菌株の同定

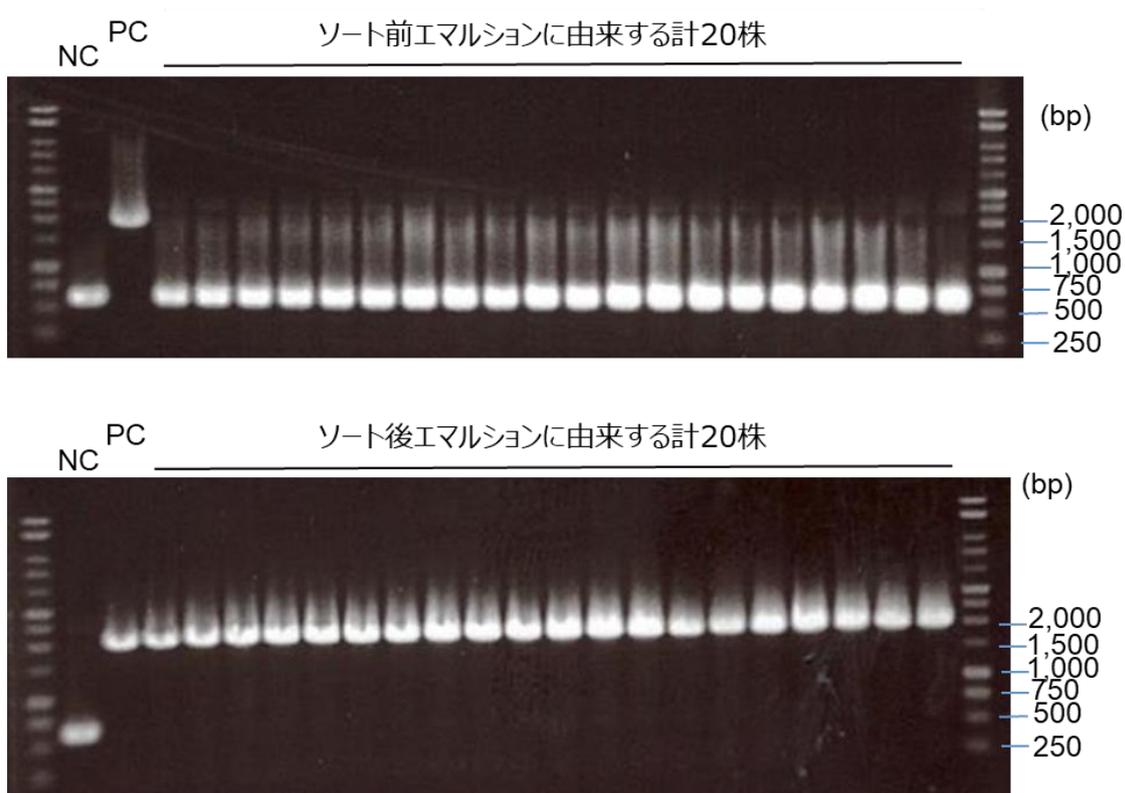


図 4-10. エマルション回収菌株コロニーPCR 産物のアガロース電気泳動

NC: YPS010/pPK10 株、PC: YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株

4-5. 第四章のまとめ

本章では、**Q-body** とエマルジョン培養を用いたタンパク質分泌株スクリーニングの基本コンセプト成立に向けた種々の検討を実施した。初めに、エマルジョンに **C. glutamicum** 菌体がシングルセルとして封入される菌体密度の決定を行った。ポアソン分布を用いてシングルセル封入に適した菌体封入率を **15%** と選定、エマルジョンの体積から菌体封入率が **15%** となる菌体密度を算出し、実証実験を行って菌体封入率の実測値が **16%** と想定通りであることを確認した。次いで、対照である **YPS010/pPK10** 株、**YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7** 株を **Q-body** と共に封入してエマルジョン培養を行った。培養後のエマルジョンを **FCM** 解析し、**YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7** 株封入エマルジョンがより高い蛍光強度を示したことから、**Q-body** を用いてエマルジョン培養で分泌されたタンパク質を検出可能であることが認められた。最後に、**YPS010/pPK10** 株に僅かな存在比率となるように **YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7** 株を混合し、エマルジョン培養の後に蛍光強度を指標にソーティングを行った。ソート後に **YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7** 株が選択的に回収されていることを確認し、**Q-body** とエマルジョン培養を用いてタンパク質分泌株を選択的に回収できることを示した。以上の結果から、微生物菌体をエマルジョンに封入して培養し、分泌された目的タンパク質を **Q-body** を用いて検出、タンパク質分泌生産株を選択的に回収するスクリーニング法が構築できたと結論付けた。

4-6. 参考文献

1. K. Koyama, H. Hokunan, M. Hasegawa, S. Kawamura, S. Koseki, *Food Microbiol.* **2016**, *60*, 49.
2. K. K. Brower, C. Crumpton, S. Klemm, B. Cruz, G. Kim, S. G. K. Calhoun, L. Nichols, P. M. Fordyce, *Lab Chip.* **2020**, *20*, 1062.

4-7. 実験項

実験材料

KOD FX DNA Polymerase (TOYOBO)、BenchTop 1kb DNA Ladder (Promega)、Agarose S (ニッポン・ジーン)、50×TAE (ニッポン・ジーン)、10× Loading Dye (Promega)、GelGreen (Biotium)

その他の試薬に関しては前章までと同じである。

使用プラスミド

第二章と同じである。

使用菌株

第二章と同じである。

使用培地

第二章と同じである。

使用オリゴヌクレオチド

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
pPK10-Forward	CACTAAGGCGTTGTTTGATAATGATTCCTCG
pPK10-Reverse	AAGACAGATTATCTGCAAACGGTGTGTCTCG

上記オリゴヌクレオチドは Thermo Fisher Scientific より購入した。

ポアソン分布を用いた菌体封入率とエマルジョン封入菌体数の相関計算

ポアソン分布の下記数式に対して、菌体封入率を λ として 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 の各値を代入し、 $k=1$ の場合の計算値を 1 菌体が封入されたエマルジョン

の割合、 $k=2$ 以上の場合の計算値を合算して複数菌体が封入されたエマルションの割合として算出した。

$$\text{ポアソン分布数式: } P(x=k) = \lambda^k \times e^{-\lambda} / k!$$

W/O/W エマルションの作製

第三章と同様にして行った。

W/O エマルションの菌体封入率算出

1%(w/v) BSA を含有する化学合成培地に *C.glutamicum* YPS010/pPK10-FGF9-His6-BGPc7 株の菌体を懸濁して内水相とし、W/O エマルションの作製を行った。シングルセルの状態では観察が難しいため、30°Cで16時間の静置培養を行った後、蛍光顕微鏡 BZ-X810 (Keyence)を用いて観察倍率 200 倍にて観察を行った。100 個の W/O エマルションを解析して菌体が封入されているエマルションの割合を算出し、菌体封入率とした。

エマルション培養

1%(w/v) BSA、100 nM 抗 BGP scFv Q-body 及びカナマイシン 25 µg/mL を含有する化学合成培地を用いて、吸光度を指標に *C.glutamicum* 菌体密度が 0.013 cells/pL となるように懸濁した溶液を内水相として、W/O エマルションを作製した。作製した W/O エマルションは回収して HFE-7500 w/2%(w/w) Fluorosurfactant 2 mL を分注した 50 mL ポリプロピレンチューブに添加し、インキュベーター MIR-154-PJ (PHCbi)を用いて 30°Cにて 48 時間静置培養を行った。培養後の W/O エマルションを回収し、W/O/W エマルション作製に供した。

エマルションの顕微鏡観察

第三章と同様にして行った。

W/O/W エマルションの FCM 解析

第三章と同様にして行った。

W/O/W エマルションのソーティング

第三章に記載した方法と同様に、SH800S (SONY) を用いて W/O/W エマルションの蛍光を測定した後、蛍光ヒストグラム上で回収対象とするエマルションを含むピークを選択した。ソーティングは Brower らの報告⁽²⁾を参考に Single cell purity モードで実施し、PBS w/2%(w/v) Kolliphor P188, 1%(v/v) Tween 20 2.5 mL を分注した 5 mL ラウンドチューブに回収した。回収したエマルションを含む溶液全量を CM2G 平板培地に塗布し、クリーンベンチ中で完全に乾燥させた後、インキュベーターを用いて 30°C で 24 時間培養し、コロニーを形成させることで菌体を回収した。

コロニーPCR

表 4-1 に示す組成の KOD FX DNA polymerase を含む溶液 30 μ L に、滅菌つまようじを用いて CM2G 平板培地上からコロニーを少量かき取って懸濁した。PCR は表 4-2 に示す条件にて、サーマルサイクラー ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて実施した。

表 4-1. PCR 反応液組成

	添加量
2×PCR buffer for KOD FX	12.5 μ L
2mM dNTPs	10 μ L
10pmol/ μ L pPK10-Forward primer	1 μ L
10pmol/ μ L pPK10-Reverse primer	1 μ L
KOD FX DNA polymerase (1.0U/ μ L)	1 μ L
Distilled water	4.5 μ L
Total	30 μ L

表 4-2. PCR サイクル条件

1 st step	94°C, 8 min.
2 nd step (\times 30 cycles)	98°C, 10 sec. 55°C, 30 sec. 68°C, 2 min.

PCR 産物のアガロース電気泳動

PCR 後の溶液を 9 μ L 分取し、10×Loading Dye 1 μ L と混合した後、0.8%(w/v) アガロースゲルに全量アプライした。電気泳動装置 Mupid-exU (タカラバイオ)と TAE バッファーを用いて 100 V で 30 分間泳動を行った。泳動後のアガロースゲルは核酸蛍光染色試薬 Gelgreen を用いて染色し、ゲル撮影装置 FAS-V (日本ジェネティクス) を用いて検出及び撮影を行った。

第五章

エマルション培養と Q-body を用いた
タンパク質高分泌株のスクリーニング

5-1. 緒言

前章では、**Q-body** を用いてエマルジョン内で分泌されたタンパク質を検出し、タンパク質分泌生産株を選択的に回収するというスクリーニング法を確立した。本章では、確立した **Q-body** とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法を用いて、遺伝子改変株ライブラリからハイスループットにタンパク質分泌能が向上した菌株の取得することで、スクリーニング法の有用性実証を検討した。

タンパク質高分泌株のスクリーニングに供する遺伝子改変株ライブラリの構築方法として、分泌シグナル配列ライブラリ^{1,2} や多数の遺伝子をプラスミド上にランダムに連結したコンビナトリアルライブラリ^{3,4} などが知られているが、本研究では大規模ライブラリの構築が容易な突然変異誘発によるランダム変異株ライブラリを構築し、スクリーニングに用いることとした。微生物における突然変異誘発法として、**N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)** や **Ethyl methanesulfonate (EMS)** などの変異原を用いた化学処理^{5,6}、放射線や **UV**、あるいはプラズマの照射による変異導入が広く用いられている⁷⁻⁹。本章では **NTG** を変異原とした化学処理によって、ランダム変異株ライブラリを構築する。そして、そのライブラリに対して **Q-body** の蛍光強度を指標にスクリーニングを行い、タンパク質分泌能向上が期待される変異株群を取得する。そして、その変異株群を培養して再評価し、タンパク質分泌生産能が本当に向上しているかについて解析した。

5-2. NTG を変異原としたランダム変異株ライブラリの構築

初めに **NTG** を変異原とした突然変異誘発条件の検討を行った。一般に変異原を用いた化学処理による突然変異誘発では、生存率を指標として変異導入の頻度を推定する。化学処理時間に比例して、生存率は低下し、生存した菌体にはより多くの突然変異が生じる。しかしながら、突然変異導入頻度が高くなると、菌体増殖に関わる遺

伝子群への変異などによる生育阻害など意図せぬ形質が付与されるリスクが増加することから、適切な生存率を設定する必要がある。本節では、Arshad らの報告⁵を参考に生存率が 1-10%の範囲となる NTG 処理条件を探索した。YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株を NTG で化学処理し、経時の Colony forming unit (cfu)を測定して生存率を算出した (図 5-1)。

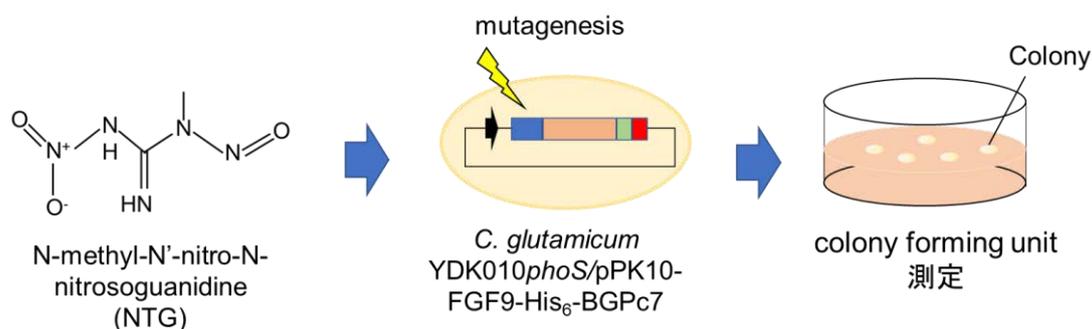


図 5-1. NTG を用いた化学変異処理の模式図

NTG 処理時間に比例して生存率は低下し、処理時間 40 分から 60 分の間で生存率が 10%を下回り、90 分の時点で生存率は 0%となった。処理時間 60 分時点の生存率は約 3.6%と目標の 1-10%を満たしていたことから、処理時間 60 分で作製したランダム変異株ライブラリをスクリーニングに用いることとした。また、ライブラリには cfu から約 3×10^7 個の変異株が含まれると推定され、ハイスループットスクリーニングに供するに十分なサイズのライブラリであることが確認された。

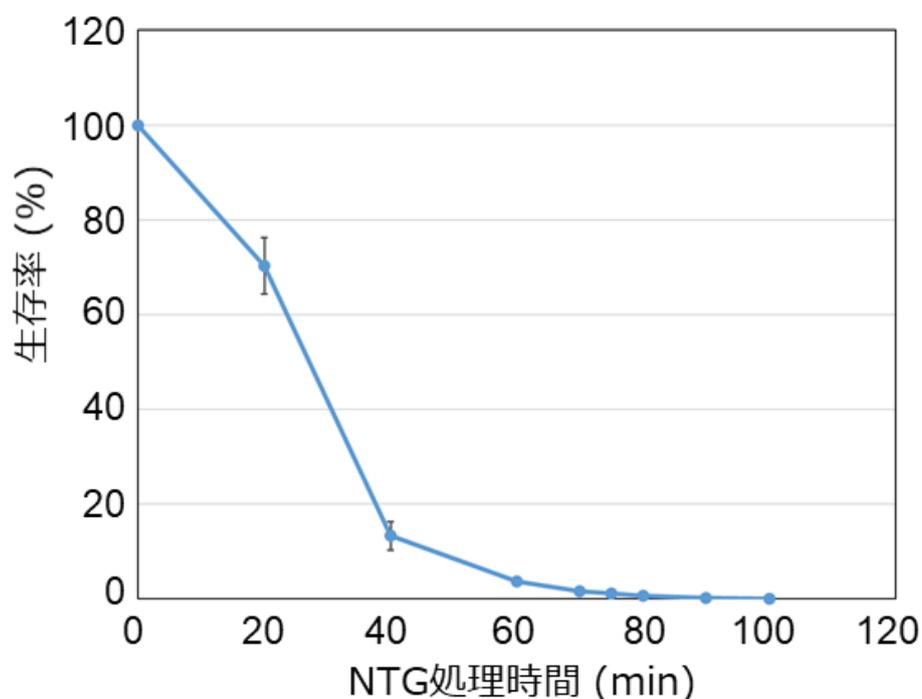


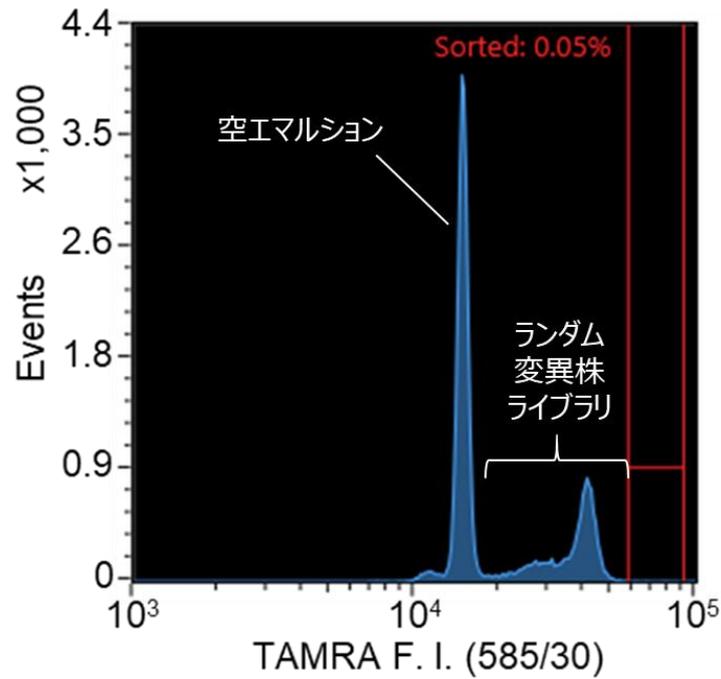
図 5-2. NTG 化学処理における経時の生存率 ($n=3$)

5-3. 変異株ライブラリを用いたタンパク質高分泌生産株スクリーニング

前節で構築したランダム変異株ライブラリを Q-body とエマルジョン培養を用いたスクリーニングに供した。48 時間のエマルジョン培養を行った後、FCM を用いて解析を行った。低い蛍光強度に菌体を含まない空エマルジョンに由来するピーク、より高い蛍光強度に変異株ライブラリ封入エマルジョンに由来するピークが検出された (図 5-3. A)。変異株ライブラリ封入エマルジョンは、対照となる非変異 YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPC7 株封入エマルジョンと比べてブロードなピークを形成した (図 5-3. B)。突然変異導入では、タンパク質分泌量の向上に寄与する変異に加えて、意図せぬ変異によってタンパク質分泌生産能が低下した株が出現すると考えられる。エマルジョンの蛍光強度は FGF9-His₆-BGPC7 分泌量を反映しており、ブロードなピークの形成から変異によってエマルジョンごとの FGF9-His₆-BGPC7 分泌量にばらつきが生じているこ

とが示唆された。

(A)



(B)

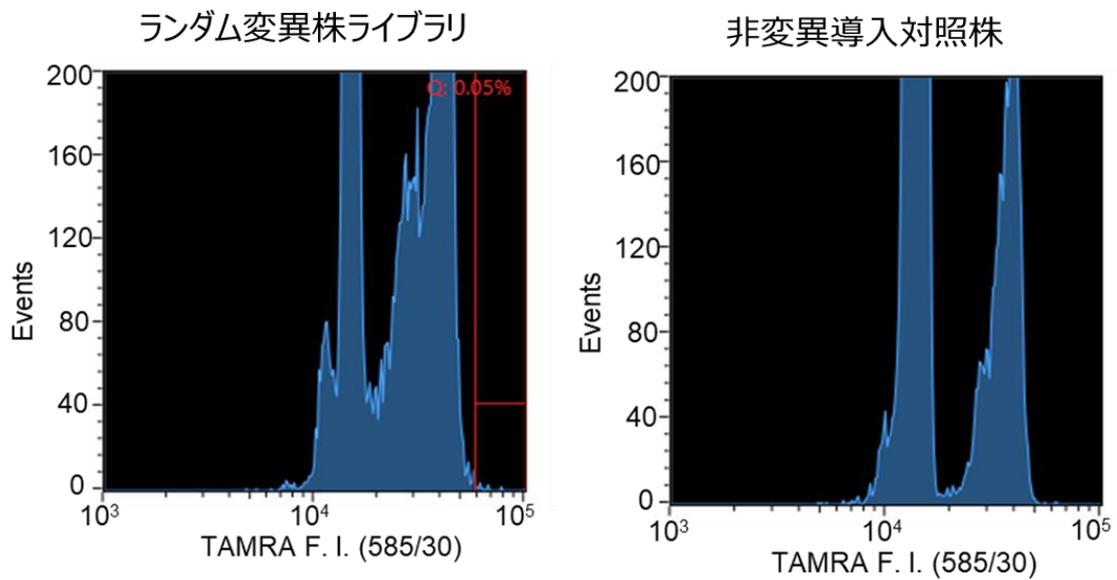


図 5-3. (A)ランダム変異株封入エマルジョンのセルソーター解析ヒストグラム ($n=100,000$)、(B)セルソーター解析ヒストグラム拡大図 (左:ランダム変異株ライブラリ、右:非変異導入対照株)

非変異導入株封入エマルジョンよりも高い蛍光強度を示すランダム変異株ライブラリ封入エマルジョン上位約 0.05%をゲーティングした。最終的に約 10^5 個の変異株ライブラリ封入エマルジョンをスクリーニングし、52 個のエマルジョンを選択回収した。続いて、回収したエマルジョンを CM2G 平板培地に塗布し、コロニー形成を行った。平板培地上では 49 個のコロニーが観察され、回収したエマルジョン数と概ね一致し、スクリーニングの過程で深刻な細胞死などは生じていないと考えられた (図 5-4)。



図 5-4. 回収エマルジョンの平板培地塗布によるコロニー形成

5-4. スクリーニング取得変異株群の培養評価

次に、スクリーニングで回収した変異株の FGF9-His₆-BGPc7 分泌量が増加しているか検証すべく、培養評価を行った。ソート後の変異株のうち 24 株を培養に供し、対照となる非変異導入 YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株、ランダム変異株ライブ

ラリから無作為に選択した 24 株を併せて培養した。培養液に分泌された FGF9-His6-BGPc7 を逆相 HPLC にて定量した結果、ソート後の変異株 24 株中 17 株で対照を上回る FGF9-His6-BGPc7 分泌量を示し、最も分泌量が向上した変異株は FGF9-His6-BGPc7 蓄積が 406 µg/mL と対照株の 135 µg/mL に比べて約 3 倍に向上した (図 5-5)。一方で、無作為に選択した変異株 24 株では殆どが対照と同等以下の FGF9-His6-BGPc7 分泌量であり、スクリーニングによって有意に分泌生産能が向上した変異株が選択されていることが認められた。突然変異誘発時に染色体上ではなく pPK10-FGF9-His6-BGPc7 プラスミド上に変異が生じ、FGF9-His6-BGPc7 の意図せぬ構造変化などで分泌量増加した可能性が考えられたが、DNA シーケンシングによって分泌生産能が向上した変異株群はプラスミド上に変異を生じていないことが確認され、染色体上に生じた変異によって FGF9-His6-BGPc7 分泌量が増加したと考えられた。

また、ソート後の変異株の一部では、FGF9-His6-BGPc7 分泌量の低下が認められた。培養液の吸光度を測定すると、これらの変異株は著しく低い値であり、菌体生育が低下していることが判明した (図 5-6)。緒言で述べたように、突然変異導入では、意図せぬ変異によって菌体生育の悪化を招くことがある。ソート後の培養評価で使った培地は、より正確な培養評価を行うためにエマルジョン培養培地に比べてグルコースの濃度が高く、到達菌体量が高くなる。そのため、変異によって何らかの栄養要求性が付与され、エマルジョン培養では培地によって充足されていたが、ソート後の培養評価ではグルコース以外の成分量は増量されていないため、必要量が不足して深刻な菌体生育の悪化を招いた可能性が考えられた。産業的なタンパク質分泌生産は、攪拌式の大型培養槽を用いて菌体を大量増殖する条件で実施するため、エマルジョン培養を用いたランダム変異株のスクリーニングでは、このような培養に適さない株が含まれる可能性を考慮し、ソート後の培養評価にて慎重に選別する必要があると考えら

れる。一方で、分泌シグナルペプチドライブラリや多数遺伝子がプラスミド上に連結されたコンビナトリアルライブラリなど、改変ターゲットを選択するデザインされたライブラリを用いたスクリーニングでは、上記の課題は生じないことが推察され、今後更なる検証が必要と思われた。

以上の結果から、Q-body とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法を用いて、膨大なランダム変異株ライブラリから有意に FGF9-His₆-BGPc7 分泌量が向上した変異株を取得することに成功し、確立したスクリーニング法がタンパク質高分泌生産株の取得に有効である事を示した。

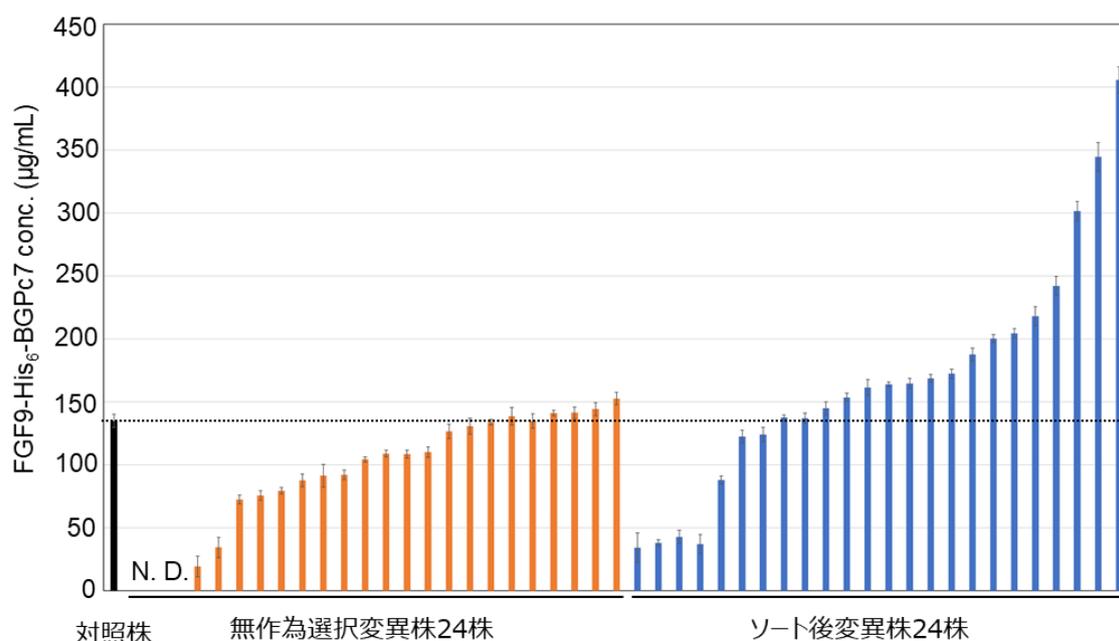


図 5-5. ソート後変異株培養液に分泌された FGF9-His₆-BGPc7 濃度(n=3)

黒点線は対照株の FGF9-His₆-BGPc7 濃度を示す。N.D.は FGF9-His₆-BGPc7 濃度が検出限界以下であったことを示す。

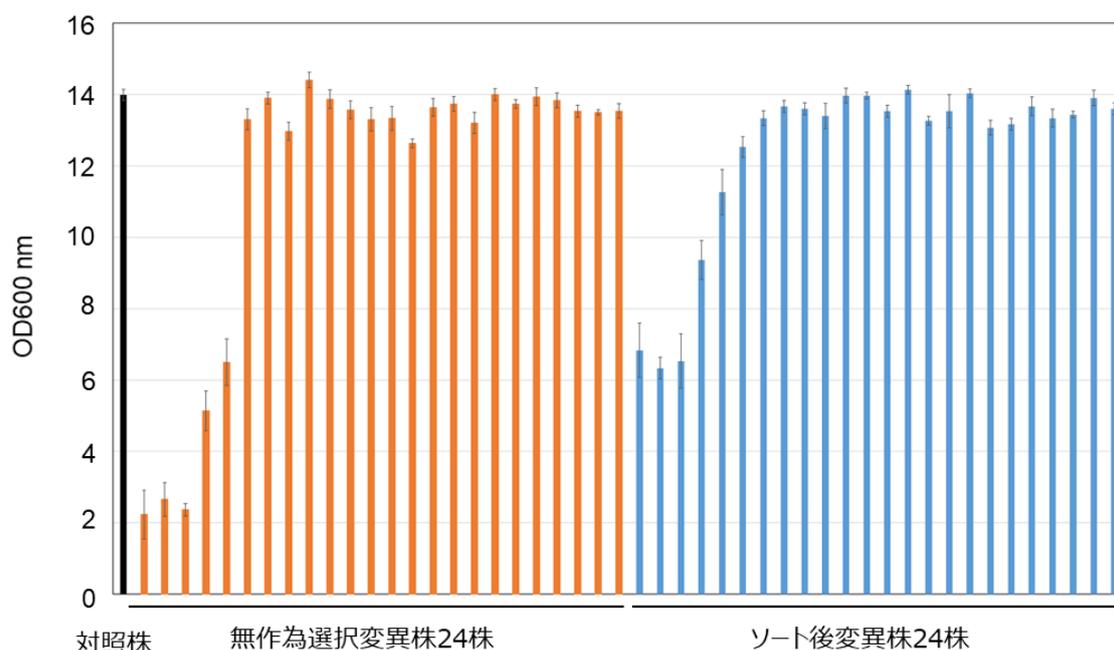


図 5-6. ソート後変異株培養液の吸光度 ($n=3$)

5-5. 第五章のまとめ

本章では、Q-body とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法の有用性を実証すべく、タンパク質高分泌生産株の取得を検討した。初めに、スクリーニングに供するライブラリを調製すべく、YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株に対して NTG を用いた突然変異誘導を行い、ランダム変異株ライブラリの構築を検討した。生存率を指標に変異処理時間を決定し、変異処理 60 分の条件で、生存率 3.6%かつ約 3×10^7 個の変異株を含むライブラリを得た。次に、Q-body とエマルジョン培養を用いて、ランダム変異株ライブラリから FGF9-His₆-BGPc7 分泌量が向上した株のスクリーニングを行った。約 10^5 変異株を Q-body の蛍光強度を指標にスクリーニングし、上位約 0.05 に当たる 49 株を選択回収した。最後に、ソート後変異株群の培養評価を実施し、変異導入前の対照株と比べて有意に FGF9-His₆-BGPc7 分泌量が向上していることが認められ、最大で約 3 倍に分泌量が向上した株の取得に成功した。以上の結果から、

Q-body とエマルジョン培養を用いたハイスループットスクリーニング法は、タンパク質分泌生産能が向上した菌株の迅速な選別が可能であり、本スクリーニング法の有用性が実証された。

5-6. 参考文献

1. J. Hemmerich, P. Rohe, B. Kleine, S. Jurischka, W. Wiechert, R. Freudl, M. Oldiges, *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 208
2. J. Mayer, T. Knuuti, L. Baumgarten, E. Menke, L. Bischoff, B. Bunk, R. Biedendieck, *Microorganisms* **2022**, *10*, 777.
3. K. Tsuge, Y. Sato, Y. Kobayashi, M. Gondo, M. Hasebe, T. Togashi, M. Tomita, M. Itaya, *Sci. rep.* **2015**, *5*, 10655.
4. M. Suetsugu, H. Takada, T. Katayama, H. Tsujimoto, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 11525.
5. R. Arshad, S. Farooq, S. S. Ali, *Ann. Microbiol.* **2010**, *60*, 645.
6. B. J. Kilbey, *Methods Cell Biol.* **1975**, *12*, 209.
7. L. H. Breimer, *Br. J. Cancer.* **1988**, *57*, 6.
8. J. D. Hall, D. W. Mount, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1981**, *25*, 53.
9. Z. Zhang, X. Zhang, H. Li, L. Wang, C. Zhang, X. Xing, C. Bao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5387.

5-7. 実験項

実験材料

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (FUJIFILM 和光純薬)

その他の試薬に関しては前章までと同じである。

使用プラスミド

前章までと同じである。

使用菌株

前章までと同じである。

使用培地

化学合成培地

組成	
Glucose	25 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	6 mg/L
MnSO ₄ ·5H ₂ O	6 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
myo-inositol	1.6 mg/L
Pyridoxine hydrochloride	0.1 mg/L
Thiamine hydrochloride	0.1 mg/L
Biotin	0.1 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	15 µg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	76 µg/L
DL-Methionine	30 mg/L
CaCl ₂	0.6 g/L
MOPS	12.5 g/L

溶解後、KOHを用いてpH7.0に調整した
フィルトレーションにて滅菌を行った

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine を変異原とした突然変異誘導

YPS010/pPK10-FGF9-His₆-BGPc7 株をカナマイシン 25 µg/mL 含有 CM2G 培地 4 mL に植菌し、30°C、120 rpm で終夜振とう培養した。3,000 rpm、25°Cで 5 分間の遠心分離を行い、上清を除いた。20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 5 mL で再懸濁し、3,000 rpm、25°Cで 5 分間の遠心分離を行い、上清を除いた。20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 8 mL で再懸濁し、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine を 300 µg/mL となるように添加した。0, 20, 40, 60, 70, 75, 80, 90, 100 分の時点で溶液を 500 µL 分取し、15,000 rpm、25°Cで 2 分間遠心分離して上清を除いた。次いで、20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 500 µL で再懸濁し、15,000 rpm、25°Cで 2 分間の遠心分離を行い、上清を除いた。この洗浄操作を合計 3 回実施した。20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 500 µL で再懸濁し、溶液の一部を 20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0)を用いて 10⁵ 倍希釈した後、カナマイシン 25 µg/mL 含有 CM2G 培地に塗布し、30°Cで 24 時間静置培養して cfu を算出した。処理時間 0 分のサンプルの cfu を 100%として生存率を算出した。残った菌体懸濁液は、カナマイシン 25 µg/mL 含有 CM2G 培地 4 mL に全量混合し、30°C、120 rpm で終夜振とう培養した。培養液を 40%(v/v) グリセロール溶液と等量混合してグリセロールストックを作製した。

W/O/W エマルションの作製

前章までと同様にして行った。

エマルション培養

前章までと同様にして行った。

W/O/W エマルションの FCM 解析

前章までと同様にして行った。

W/O/W エマルションのソーティング

前章までと同様にして行った。

ソート後変異株の培養評価

96-deep well plate (Thermo fisher scientific)に、カナマイシン 25 µg/mL 含有 CM2G 培地を 600 µL ずつ分注し、各ウェルに平板培地で生育したコロニーを滅菌つまようじで少量かき取って植菌した。プレートシェイカー (TAITEC)を用い、30℃、1,200 rpm にて 24 時間振とう培養し、前培養液を得た。次いで、低吸着V底 96-deep well plate (住友ベークライト)にカナマイシン 25 µg/mL 含有化学合成培地を 600 µL ずつ分注し、前培養液を 30 µL ずつ植菌した。プレートシェイカーを用い、30℃、1,200 rpm にて 48 時間培養した。培養液の吸光度は、滅菌超純水を用いて 50 倍希釈した後、分光光度計 U-3900 (HITACHI ハイテック)を用いて 600 nm の波長で測定した。

逆相 HPLC を用いた FGF9-His₆-BGPc7 の定量

第二章と同様にして行った。

第六章

結論

6-1. 結論

バイオ医薬品タンパク質の製造においては、コストが安価であること、動物由来成分を含まないことなどの利点から微生物分泌生産系が広く用いられている。しかしながら、バイオ医薬品タンパク質を高分泌生産する微生物株の樹立には、プロテアーゼ欠失や翻訳、転写に関わる因子の発現強化など多くの遺伝子改変の導入が必要であり、従来の手法では開発期間が長期に及ぶことが課題であった。この課題を解決する手法として、マイクロドロプレットを培養リアクターとした並列培養評価により、大規模な遺伝子改変株ライブラリからタンパク質高分泌生産株を迅速に選別するスクリーニング手法が注目されている。マイクロドロプレットスクリーニングでは、ドロプレット内で分泌されたタンパク質をバイオセンサーによって蛍光シグナルに変換する必要があり、種々のバイオセンサー技術が構築されているが、これまでの先駆的な研究では、バイオセンサーの汎用性及び検出の簡便性に課題があるのが実情であった。本研究では、マイクロドロプレットスクリーニングにおける新たなバイオセンサーとして、測定の簡便さ及び汎用性の高さから抗体ベースのイムノセンサー**Q-body**が有望であると考え、**Q-body**を用いたマイクロドロプレットスクリーニング法の確立を目指した。

本論文第二章では、微生物が分泌生産したタンパク質を検出するバイオセンサーとして**Q-body**が適用可能であることを様々な検討から実証した。本研究のバイオセンサーとして抗BGP scFv **Q-body**を選択し、エピトープである7アミノ酸残基から成るBGPc7配列を**Q-body**検出用の小さなタグとして、モデルターゲットであるFGF9に融合し、**Q-body**を用いて抗原濃度依存的に検出できることを示した。次いでグラム陽性細菌 *C. glutamicum* を宿主としてBGPc7配列融合FGF9分泌生産株を構築し、培養液中においても**Q-body**を用いた検出に成功した。**Q-body**は培養を通じて分解や不活化されることなく、安定的に保持されており、微生物培養に用いるバイオセンサ

一として優れた特性を備えていることが認められた。

第三章では、マイクロドロップレットスクリーニングのもう一方のコア技術であるマイクロドロップレットの作製条件を確立し、**Q-body** を用いたマイクロドロップレット内におけるタンパク質濃度の判別を目指した。本研究におけるマイクロドロップレットとして、内封したタンパク質の外部漏洩が生じにくい **W/O/W** エマルションを選定した。マイクロ流体装置とマイクロ流路チップを用いた作製検討を行い、**FCM** 解析に適した粒径約 **30 μm** の **W/O/W** エマルションを粒径均一性高く作製する条件を確立した。次いで、**Q-body** の蛍光を指標に、**BGPc7** 配列融合 **FGF9** を 3 段階の濃度で封入した **W/O/W** エマルションをそれぞれ明確に識別することに成功し、エマルション内においても **Q-body** を用いた抗原濃度依存的な検出が可能であることを実証した。

第四章では、**Q-body** とエマルション培養を用いたタンパク質分泌生産株スクリーニング法の構築を目指した。初めにポアソン分布を用いて、*C. glutamicum* 菌体をシングルセルとしてエマルションに封入する菌体密度を決定した。次いで、対照株及び **BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌生産株を **Q-body** と共に封入してエマルション培養を行い、**BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌生産株封入エマルションがより高い蛍光強度を示したことから **Q-body** を用いて、エマルション培養で分泌されたタンパク質を検出可能であることが認められた。最終的に、対照株に僅かな存在比となるように **BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌生産株を混合し、エマルション培養を行い、**Q-body** の蛍光を指標に選別回収を試みた。回収後の菌株を同定し、**BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌生産株のみが回収されていることが確認され、エマルション培養と **Q-body** を用いてタンパク質分泌生産株を選択的に回収するスクリーニング法を確立した。

第五章では、確立したスクリーニング法の有用性を実証すべく、タンパク質分泌生産能が向上した菌株の取得を検討した。BGPc7 配列融合 FGF9 分泌生産株を変異処理することでランダム変異株ライブラリを調製し、約 10^5 個の変異株をエマルジョン培養した後、Q-body の蛍光を指標に分泌生産能が向上した変異株をスクリーニングした。回収した変異株を培養により再評価したところ、有意に BGPc7配列融合 FGF9 分泌量が増加した変異株が取得されていることが認められ、最大で分泌量が 3 倍に増加していた。この結果から、Q-body とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法によって、膨大なサイズのライブラリから迅速にタンパク質高分泌生産株を取得可能であることが示された。

本研究で確立したバイオセンサーQ-body とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法は、小さなタグ配列の融合で広範なタンパク質に適用可能かつ、Q-body を培地に加えるのみで分泌されたタンパク質の検出が可能であり、高い汎用性と簡便性を兼ね備えている。また約 10^6 個の菌株を 3 日間でスクリーニング可能であり、極めて高いスループット性を併せ持っている。本スクリーニング法を用いて、本研究で用いたランダム変異株ライブラリのみならず、分泌シグナルペプチドライブラリなど様々なライブラリを評価することで、より効率的なタンパク質高分泌生産株の取得が期待される。また、本スクリーニング法の原理は、CHO 細胞など哺乳類細胞を宿主としたタンパク質高分泌株樹立にも応用可能であると考えられ、適用宿主の拡大が期待される。

更なる改良が期待される点としては、バイオセンサーのダイナミックレンジが挙げられる。本研究で用いた Q-body のダイナミックレンジは約 5 倍であったが、近年、FRET を利用したより高いダイナミックレンジを備えた Q-body が開発されており、このような Q-body を用いることでスクリーニング精度の更なる向上が見込まれる⁴⁾。また、蛍光標識されたプローブやコイルドペプチドを用いて様々な抗体を迅速に Q-body 化する技

術も開発されており^{1,2}、これらの技術を応用することで目的タンパク質に結合する抗体を Q-body 化し、タグを使用しないインタクトな分泌タンパク質の検出が実現される。

今後、本研究で確立したスクリーニング法を、微生物を宿主とするバイオ医薬品タンパク質の開発に応用することで、タンパク質を高分泌する工業用微生物株の開発期間の大幅な短縮が期待される。これにより、需要が高まっている様々なバイオ医薬品タンパク質の安価な供給に貢献できると考えている。

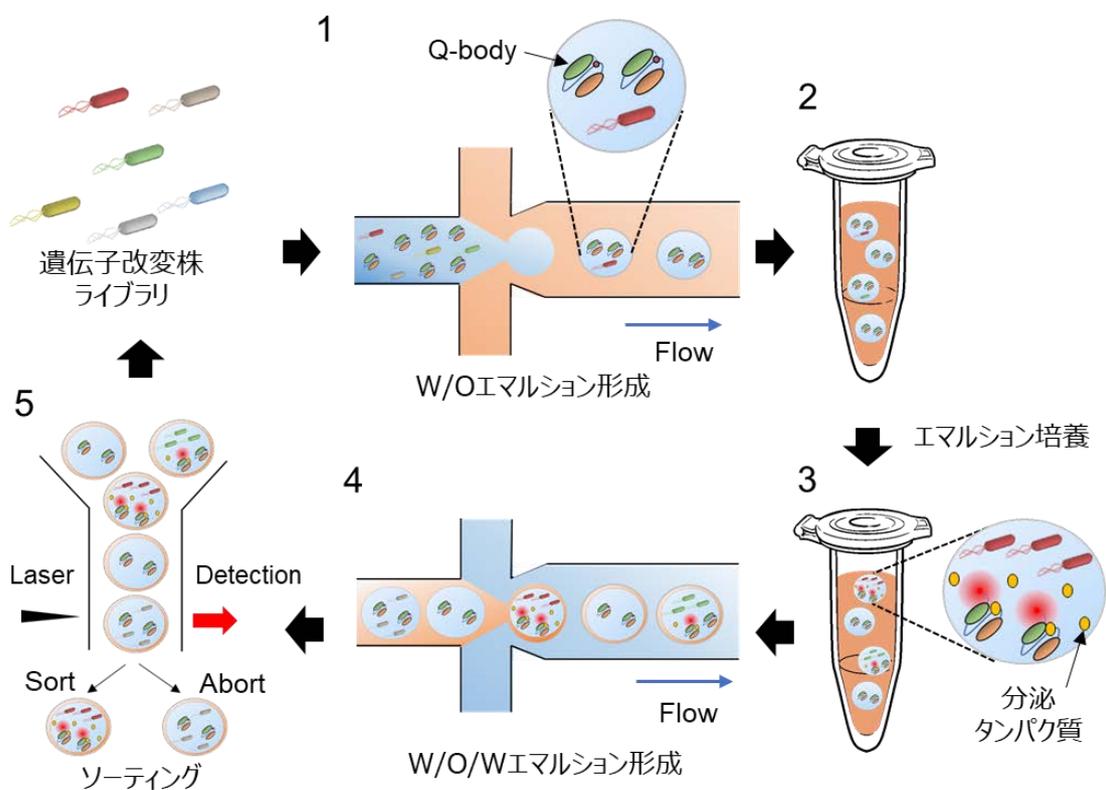


図 6-1. 本研究で確立したスクリーニング法

6-2. 参考文献

1. T. Yasuda, A. Inoue, T. Kitaguchi, H. Ueda, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 8206.
2. J. Dong, C. Miyake, T. Yasuda, H. Oyama, I. Morita, T. Tsukahara, M. Takahashi, H.-J. Jeong, T. Kitaguchi, N. Kobayashi, H. Ueda, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 165, 112425.

発表状況

原著論文

1. Y. Ito, R. Sasaki, S. Asari, T. Yasuda, H. Ueda, T. Kitaguchi “Efficient Microfluidic Screening Method Using a Fluorescent Immunosensor for Recombinant Protein Secretions” *Small*, in press, 2023.

学会発表

1. (口頭発表、査読無) ○伊藤良浩、佐々木隆一、朝里さやか、北口哲也、上田宏
「微小ドロプレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発」第74回日本生物工学会大会、4A03-04、オンライン開催、2022年10月

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方に ご指導ご鞭撻を賜りました。

常日頃より、適切な御助言と暖かい激励を賜りました指導教官の北口哲也准教授に心から感謝いたします。

研究を推進するにあたり、熱心な御指導御鞭撻を頂きました上田宏教授に厚く御礼申し上げます。

実験結果に対して、数多くの御助言を頂いた Zhu Bo 助教に深く感謝いたします。

抗 BGP scFv Q-body を提供頂きました安田貴信助教に心より御礼申し上げます。

マイクロドロップレット技術に関する知識を御教授頂いた大阪大学大学院基礎工学研究科 境慎司教授に心から感謝致します。

常日頃より、御指導御助言を賜りました味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 野崎博之氏、朝里さやか氏、佐々木隆一氏に厚く御礼申し上げます。

Corynebacterium glutamicum 菌株及び遺伝子操作ツールを分譲頂いた味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 菊池慶実博士、松田吉彦博士に心より御礼申し上げます。

研究生生活を支援してくださいました秘書の鋤柄麻美氏に深く感謝します。

最後に、公私にわたり励ましと助言を与えて頂いた上田北口研究室の皆様に心より感謝します。

2023年1月10日

伊藤 良浩