T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

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, 学位の種別: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)	
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. C. glutamicum 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-His6-BGPc7 株の検出	57
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	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 6-2. 参考文献	84 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: Millilitter

mM: Millimolar

nm: Nanometer

nM: Nanomolar

NTG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

OD: Optical density

PAGE: Poluacrylamide 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 µL: Microlitter µM: 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な *ど*⁽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 10⁶を超えるバリアントを含む大 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 数のバリア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

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

マイクロドロップレットとは、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、主にオイルエマルシ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) エマルションと呼ばれ、 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シ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。







ハイドロゲルカプセル



る。

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ッ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、作製したドロッ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 ロップレットを作製する手法が確立されたことから(34、マイクロドロッ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ップレットに包 括する。次にドロッ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。ドロッ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 含有するドロップレットを選択して回収する (図 1-4)。 マイクロドロッ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。

 $\mathbf{5}$



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気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 バリアント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 リアント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 あり、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 Vn 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



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 盤としたイムノセンサーである 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.
- L. Westers, D. S. Dijkstra, H. Westers, J. M. Dijl, W. J. Quax, *J. Biotehcnol.* 2006, *123*, 211.
- 4. D. Sleep, G. P. Belfield, A. R. Goodey, *Biotehcnology* 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.
- 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.
- 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.
- J. W. Choi, S. S. Yim, K. J. Jeong, *Appl. Microbiol. Biotehcnol.* **2018**, *102*, 873.
- J. Staudacher, C. Rebnegger, T. Dohnal, N. Landes, D. Mattanovich, B. Gasser, *Metab. Eng.* 2022, 70, 181.
- M. Vitikainen, H. Hyyrilainen, A. Kivimaki, V. P. Kontinen, M. Sarvas, *J. Appl. Microbiol.* 2005, 99, 363.

- 15. A. S. Robinson, V. Hines, K. D. Wittrup, *Biotehnology* **1994**, *12*, 381.
- M. Inan, D. Aryasomayajula, J. Sinha, M. M. Meagher, *Biotehnol. Bioeng.* 2006, 93, 771.
- H. Raschmanova, A. Weninger, Z. Knejzlik, K. Melzoch, K. Kovar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 105, 4397.
- Y. Kikuchi, M. Date, H. Itaya, K. Matsui, L. Wu, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7183.
- J. Hemmerich, P. Rohe, B. Kleine, S. Jurischka, W. Wiechert, R. Freudl, M. Oldiges, *Microb. Cell Fact.* 2016, *15*, 208.
- 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.

- 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.
- D. Saeki, S. Sugiura, T. Kanamori, S. Sato, S. Ichikawa, *Lab Chip*, **2010**, *10*, 357.
- A. Zinchenko, S. R. A. Devenish, B. Kintses, P. Colin, M. Fischlechner, F. Hollfelder, *Anal. Chem.* 2014, *86*, 2526.
- 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.
- C. Ma, Z. L. Tan, Y. Lin, S. Han, X. Xing, C. Zhang, J. Biosci. Bioeng. 2019, 128, 662.
- D. Yanakieva, A. Elter, J. Bratsch, K. Friedrich, S. Becker, H. Kolmar, *Sci. Rep.* 2020, *10*, 10182.
- 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. Ripphahn, K. Volkenborn, P. Skoczinski, K. Jaeger, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 110.
- 49. R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hohsaka, 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pPK10⁽⁴ 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 Hise 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-Hise-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 Hise-tag 及び BGPc7 融合 FGF9 (FGF9-Hise-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 pathway⁽⁷を経由し、TorA 分 泌シグナルがプロセ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-Hise-BGPc7 株では FGF9-Hise-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-Hise 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-Hise-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-Hise-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-Hise-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-Hise-BGPc7では本質 的に異なると考えられる。仮説として FGF9-Hise-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。

23



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-Hise-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0h時点では、YPS010/pPK10株及びYPS010/pPK10-FGF9-Hise-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22h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-Hise-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-Hise-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-Hise-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/pPK 10-FGF9-Hise-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-Hise-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. Mitsuhashi, 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)、ミニプロティアン 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。

日田ション
伸用ノフスト

Name	Features	Reference
	Corynebacterium-E. coli shuttle vector carrying	
pPK10	<i>tatABC</i> from <i>C.glutamicum</i> , pHM1519-ori, pUC-ori;	文献(4
	Kanamycin resistance	
	pPK10 derivative carrying FGF9 gene from Homo	
pPK10-FGF9-His ₆	sapiens fused with E. coli TorA secretion signal	本研究にて構築
	peptide and His ₆ -tag	
pDK10 ECE0 High	pPK10 derivative carrying FGF9 gene from Homo	
	sapiens fused with E. coli TorA secretion signal	本研究にて構築
BGPC/	peptide, His₀-tag and C-terminal sequence of BGP	

使用菌株

Name	Features	Reference
YPS010	C. glutamicum ATCC13869 derivative	文献(6
YPS010/pPK10	C. glutamicum YPS010 harboring pPK10 plasmid	本研究にて構築
-------------------------	--	---------
YPS010/pPK10-FGF9-	C. glutamicum YPS010 harboring pPK10-FGF9-	木研究にて構筑
His ₆	His₀ plasmid	本明九にて博来
YPS010/pPK10-FGF9-	C. glutamicum YPS010 harboring pPK10-FGF9-	大四次にて供知
His ₆ -BGPc7	His₀-BGPc7 plasmid	平明九にて開発

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に訓	周整した
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

フィルトレ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℃、120 rpm の条件で振どう培養した。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℃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℃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、水上で 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℃、120 rpm の条件で 1 時間の振どう培養を 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℃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 µg/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 時間振どう培養 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°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℃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ィアン 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、ローテー

ターを使用して 25℃で 1 時間混合した。混合後の溶液を 2,000 rpm、25℃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℃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℃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-Hise 及び FGF9-Hise-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。OD600 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℃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、菌体破砕 装置 (Constant Systems Ltd.)を用いて破砕した。 破砕液を 8,000 g, 4℃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℃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℃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℃で 10 分間インキュベートした。10 mM 5-TAMRA-C6 mal.を1µL 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℃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 201 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 Qbody 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 ェイカー(BIO-SAN)を用いて 1,000 rpm で 1 分間振どう混合した。その後、25℃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 µL 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、マイクロドロッ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ッ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、マイクロドロップレットは作製素材から W/O/W エマルションとハ 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、マイクロドロップレットとして W/O/W エマルションを 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 エマルションの作製 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)。





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。 マイクロドロッ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 μm 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 μm 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 µm 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 10⁷ 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 μm で、高い粒径均一性を示 した (図 3-4)。

40

表 3-1.	W/O	エマルション	作製流凍条件
入し1.		- 1/2	

溶液組成	Flowrate (µL/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10⁶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30µm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。

溶液組成	Flowrate (µL/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

表 3-2. W/O/W エマルション作製流速条件



図 3-5. W/O/W 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 3-6. W/O/W エマルションの顕鏡画像(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-Hise-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 に検出されたダブレットと呼ばれるシグナルを除去した。ダブレットは 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-Hise-BGPc7 含有 W/O/W エマルションを FCM 解析した結果、FGF9-Hise-BGPc7 封入濃度が 0 nM、30 nM、3,000 nM と増 加するのに比例して、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-Hise-BGPc7 を封入しない W/O/W エマルションと比較して、FGF9-Hise-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 封入エマルションの FCM 解析 (*n*=30,0 00)



図 3-11. Q-body 及び FGF9-His₆-BGPc7 封入エマルション顕鏡画像 (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-Hise-BGPc7 を封入してセルソーター解析を行い、内封された FGF9-Hise-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.
- 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径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 流路径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/OW 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 µL 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 ントソフトウェア (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 µM 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-Hise-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 バンドバ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。

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

表 3-3. SH800S 解析設定

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-Hise-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-Hise-BGPc7分泌生産株の混合溶液をエマルション培養し、 FGF9-Hise-BGPc7 分泌生産株のみを選択的に回収することを試みた。

54



図 4-1. W/O/W エマルション培養

4-2. W/O/W エマルションへの菌体封入濃度検討

W/O/W エマルション培養で重要な点として、複数菌体が同一のエマルションに封入 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 エマルシ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ションの割 合が増加するほど、2 つ以上の菌体が封入されたエマルシ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、空のエマルシ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シ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ションの割合は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 ションの体積は約 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 エマルションを作製し、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 てエマルシ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 エマルションの培養後顕鏡画像

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

Q-bodyを用いて、エマルシ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-Hise-BGPc7 株を培地及び Q-body と共に封入してエマルション培養を行い、48 時間培養後のエマルションの蛍光強度を測定した (図 4-4)。



図 4-4. Q-body とエマルシ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エマルシ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時間後にはエマルシ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、静置のエマルション培養では内 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シ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ション培養条件では、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ションをFCM解析した。YPS010/pPK10 株封入エマルションの解析では、まず低い蛍光強度に菌体を含まない空エマルション 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 ション由来のピークが検出された (図 4-6)。空エマルションに比べて、

YPS010/pPK10 封入エマルシ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-Hise-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-Hise-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-Hise-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-Hise-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ションの FCM 解析ヒストグラム (n=20,000)

ソート前後の W/O/W エマルションをそれぞれ 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-Hise-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)。ソート前のエマルションから回収 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、ソート後エマルションから回収した 20 株は全て YPS010/pPK10-FGF9-Hise-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-Hise-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)。





4-5. 第四章のまとめ

本章では、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、エマルションに 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、エマルションの 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-Hise-BGPc7 株を Q-body と共に封入 してエマルション培養を行った。培養後のエマルションを FCM 解析し、 YPS010/pPK10-FGF9-Hise-BGPc7 株を Q-body と共に封入 してエマルション培養を行った。培養後の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。最後に、YPS010/pPK10 株に僅かな存在比率となるように YPS010/pPK10-FGF9-Hise-BGPc7 株を混合し、エマルシ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-Hise-BGPc7 株が 選択的に回収されていることを確認し、Q-bodyとエマルシ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

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が構築できたと結論付けた。

63

4-6. 参考文献

- 1. K. Koyama, H. Hokunan, M. Hasegawa, S. Kawamura, S. Koseki, *Food Microbiol.* **2016**, *60*, 49.
- 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	AAGACAGATTATCTGCAAACGGTGTGTCG

上記オリゴヌクレオチドは Themo 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シ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ション 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。

ポアソン分布数式: P(x=k) = λ^k × e^{-λ} / 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-Hise-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℃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℃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℃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 µL 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。

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

表 4-1. PCR 反応液組成

表 4-2. PCR サイクル条件

1 st step	94℃, 8 min.
2 nd step (×30 cycles)	98℃, 10 sec.
	55℃, 30 sec.
	68℃, 2 min.

PCR 産物のアガロース電気泳動

PCR 後の溶液を 9 µL 分取し、10×Loading Dye 1 µL 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を用いてエマルシ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 とエマルシ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-Nnitrosoguanidine (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-Hise-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 3×10⁷ 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 とエマルション培養を用いたスク リーニングに供した。48 時間のエマルシ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シ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シ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ションは、対照となる非変異 YPS010/pPK10-FGF9-Hise-BGPc7 株封入エマルシ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える。エマルションの 蛍光強度は FGF9-Hise-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ションごとの FGF9-Hise-BGPc7 分泌量にばらつきが生じているこ



図 5-3. (A)ランダム変異株封入エマルシ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シ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 封入エマルション上位約 0.05%をゲーティングした。最終的に約 10⁵ 個の変異株ライ ブラリ封入エマルションをスクリーニングし、52 個のエマルションを選択回収した。続い て、回収したエマルションを 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、回収したエマルシ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. 回収エマルシ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-Hise-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-Hise-BGPc7 分泌量を示し、最も分泌量が向上した変異株は FGF9-Hise-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-Hise-BGPc7 分泌量であり、スクリーニング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-Hise-BGPc7 プラスミド上に変異が生じ、FGF9-Hise-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-Hise-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シ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、エマルシ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、エマルション 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

75

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とエマルシ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-Hise-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-Hise-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とエマルシ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-Hise-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3×10⁷個 の変異株を含むライブラリを得た。次に、Q-bodyとエマルション培養を用いて、ランダ ム変異株ライブラリから FGF9-Hise-BGPc7分泌量が向上した株のスクリーニングを行 った。約10⁵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-Hise-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
- J. Mayer, T. Knuuti, L. Baumgarten, E. Menke, L. Bischoff, B. Bunk, R. Biedendieck, *Microorganisms* 2022, 10, 777.
- K. Tsuge, Y. Sato. Y. Kobayashi, M. Gondo, M. Hasebe, T. Togashi, M. Tomita, M. Itaya, *Sci. rep.* 2015, *5*, 10655.
- 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.
- 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
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	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-Hise-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

81

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 時間振どう培養し、前培養液を得た。次いで、低吸着V底 96deep 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 ハイテク)を用いて 600 nm の波長 で測定した。

逆相 HPLC を用いた FGF9-Hise-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、マイクロドロッ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。マイクロドロップレットスクリーニングでは、ドロップレット内で 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、マイクロドロッ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ッ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 ー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 10⁵ 個の変異株をエマルション培 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 とエマルシ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とエマルシ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 10⁶ 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⁽¹⁾。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.
- 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. <u>Y. Ito</u>, R. Sasaki, S. Asari, T. Yasuda, H. Ueda, T. Kitaguchi "Efficient Microfluidic Screening Method Using a Fluorescent Immunosensor for Reco mbinant Protein Secretions" *Small*, in press, 2023.

学会発表

 (口頭発表、査読無) 〇伊藤良浩、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」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 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

90