

## ミミズ細胞を用いた全く新しいバイオ医薬品生産宿主の開発

長岡工業高等専門学校 物質工学科 赤澤真一

バイオ医薬品である糖尿病治療薬インスリンは、遺伝子組換え大腸菌により生産されているが、一般的にバイオ医薬品・動物性タンパク質を原核生物である大腸菌で生産することは翻訳後修飾が無いことにより困難である。そのため、酵母やカビ、昆虫細胞等様々な異種遺伝子発現系が長い年月をかけて開発されてきた。しかしながら、昆虫細胞と動物細胞の間には操作・コスト面で大きな壁が存在するため、この壁を越えるあるいは間を埋める宿主が求められており、多様な用途に対応出来る宿主の整備が叫ばれている。そこで我々は、ミミズ個体・細胞を使用した全く新しい動物性タンパク質生産系の開発に着手し、これまでにミミズ個体及び細胞の形質転換系を開発し、ミミズ個体で腎性貧血治療薬ヒトエリスロポエチンタンパク質の検出に成功している。しかしながらミミズ細胞では未だ実施出来ておらず、ミミズ細胞によるタンパク質生産性や細胞の増殖能等も未だ不明で細胞株も樹立されていない。そこで本研究ではこれらの課題を解決し、物質生産宿主としてのミミズ細胞のポテンシャルを明らかにする事で、ミミズ細胞の新規宿主化を目指す。

クチナーゼ Cut190 の PET 分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究

京都府立大学大学院生命環境科学研究科 織田 昌幸

共同研究者：河合 富佐子（岡山大学）、村木 直樹（東レリサーチセンター）

### 【要旨】

*Saccharomonospora viridis* AHK190 由来クチナーゼ（Cut190）は、ポリエチレンテレフタレート（PET）に対して高い分解活性を持ち、その活性や熱安定性は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で上昇する。本酵素は、PET の分解に必須なガラス転移温度付近で高活性を有しているが、これまでに得た各種変異体の結晶構造に基づき、より高機能な変異体を創製する。そのために、PET 様基質や遷移状態アナログとの複合体の結晶構造解析を行い、PET 認識機構から得られる情報を活用する。NMR や熱測定による安定性や分子間相互作用解析、計算化学的手法によるシミュレーション解析など、網羅的に構造生物学的研究を進めているが、酵素の機能発現における構造基盤、特に  $\text{Ca}^{2+}$  結合に伴う動的構造変化の寄与を解明し、機能向上に活用する。高機能化変異体の実用化を目指し、PET 分解における界面活性剤添加の効果や、高温、高圧下での反応条件などを検討する。さらに分析酵素としての応用を目指し、エステル結合を含む各種複合高分子に対する反応産物を解析して、高分子の組成や構造の情報を得る手法としての有用性を検証する。

## 【研究企画題目】

青枯病菌クオラムセンシング機構を標的にしたトマト萎凋病の予防・治療薬の開発

## 【所属・氏名】

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・甲斐建次

## 【要旨】

青枯病菌はナス科の農作物に感染し、萎凋病を引き起こす重要病害菌である。トマトとナスでの被害が特に大きい。本研究企画では、青枯病菌の病原性を制御する菌密度依存の遺伝子発現機構であるクオラムセンシング（QS）を阻害する化合物から、トマト青枯病の「治療薬」を開発する。青枯病菌は糸状菌内に寄生し、悪環境に耐える仕組みを持ち、この感染過程においても、QS 機構が重要であることを見出している。本研究企画ではさらに、潜在的な青枯病菌感染への「予防薬」という概念を提唱し、QS 阻害剤を使ってそれを実現する。QS 阻害剤 PQI 類の開発に成功し、それらの *in vitro* における QS 阻害能を詳細に解析した。PQI 類は、各種バイオアッセイで強い QS 阻害効果を示した。さらに、RNA-Seq を用いた網羅的な発現解析により、PQI 類は QS 欠損株で生じる遺伝子発現プロファイルを再現していることを確認した。加えて、植物体を用いた試験においても、QS 阻害効果に起因した発病抑制効果を示すことを確認した。したがって、達成目標の 1 つである「治療薬」開発に成功したと言える。

タイトル：

環境調和型プロセスにより脱脂米糠から回収・精製された完全アレルギーフリータンパク質及び機能性リン化合物の機能性食品原材料としての用途開発・市場導入に関する研究（中間報告）

演者：

渡辺 昌規（ワタナベ マサノリ）

要旨：

演者らが開発した等電点沈殿・電解水処理を組み合わせた新規タンパク質回収・精製技術（IP-EWT法）は、米油製造事業所等で著量副生する脱脂米糠（DFRB）から高栄養価・完全アレルギーフリー等の機能性を有するタンパク質、機能性有機リン化合物であるフィチン（フィチン酸）の双方を単一プロセスで同時に回収することが可能である。現在までに、本法により回収・精製されたタンパク質、リン化合物の食品用素材、機能性食品等への応用展開は行われていない。そこで本研究では、本法により回収・精製された、タンパク質、リン化合物成分の用途開発の基盤となりうる、上記DFRB由来タンパク質、リン化合物の高収率・高度精製技術の開発と当該技術により回収・精製されたタンパク質の食品機能諸特性について検討を実施した。その結果、IP-EWT法における脱塩処理、抽出・回収条件の最適化ならびに、フィチン酸を含有するリン回収画分のプロテアーゼ・電解水処理により、70%を超えるタンパク質、フィチン酸含有画分の取得をそれぞれ可能にした。現在、上記タンパク質の食品機能諸特性（溶解性、乳化特性、発泡特性、粘弾特性、ゲル強度）について、現在検討中である。

## 「微生物の低栄養性に必須なアルデヒド脱水素酵素の工学的利用」

静岡大学大学院総合科学技術研究科  
吉田 信行

*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素・窒素・硫黄源を全く含まない無機塩培地に良好に生育する超低栄養性細菌である。本菌はそれぞれの栄養源を大気中から取り込んでいると予想している。本研究の目的は、本菌の低栄養生育において高発現し、かつ必須であるアルデヒド脱水素酵素遺伝子(*aldA*)の工学的利用である。*aldA* に関しても興味深い結果が得られているが、今回の中間報告では、研究の過程で見いだした新たな知見について紹介する。

N9T-4 株が低栄養生育する際には、上記 *aldA* 以外にメタノール脱水素酵素をコードする *mnoA* が高発現する。発現量はむしろ *mnoA* の方が高い傾向にあるが、その破壊株が親株と同程度の生育を示していたので、これまでは *aldA* を中心に研究を展開してきた。しかしながら昨年、*mnoA* 破壊株を改めて構築し直したところ、低栄養条件での生育が劣ることを見いだした。そこで、改めて各遺伝子領域について精査したところ、ゲノム上の *aldA*~*mnoA* 間に、低栄養生育に重要であることが予想される遺伝子がいくつか見つかった。今回はそれらの機能について報告する。

## 筋分化を誘導する乳酸菌オリゴ DNA の生体内作用の実証

高谷 智英 (信州大学農学部)

超高齢化社会では、加齢性・疾患性の筋萎縮による運動機能の低下が、健康寿命に大きな影響を及ぼしている。骨格筋の恒常性は、筋芽細胞（筋前駆細胞）の増殖と分化によって維持されるが、様々な要因で筋芽細胞の分化能は減弱する。この課題を解決するため、我々は、筋分化を強力に促進する乳酸菌オリゴ DNA 「myoDN」 の応用可能性について研究を進めてきた。

myoDN の生体内作用を実証する病態モデルとして、糖尿病性筋萎縮症と、がん悪液質（カヘキシー）に着目した。健常者と比べて糖尿病患者の筋芽細胞では分化能が低下するが、myoDN 投与によりこれを改善することができる。また、がん細胞の培養上清は筋芽細胞の分化を阻害するが、myoDN 存在下では、がん分泌物による筋分化阻害がキャンセルされる。このように myoDN は、糖尿病やカヘキシーが合併する筋萎縮を予防・治療に資する分子として期待される。さらに臨床的な観点から、myoDN の合成コストの低減、および摂取後の吸収効率や安定性の向上を目指し、myoDN の短縮化にも取り組んでいる。最終報告では、これらの成果について発表する。

## セルロースナノファイバー生産のための温泉微生物生態系エンジニアリング

春田伸（首都大学東京・理・生命）

高温アルカリ硫黄泉では、70～80℃の温泉水中に淡灰色の微生物被膜が観察される。この微生物被膜を構成する微生物群集では、硫化水素をエネルギー源として酸素呼吸し、二酸化炭素を原料にセルロースを合成している。本研究では、温泉微生物群集が生産するセルロースの特性を解析するとともに、その生産機能を最大限に引き出す方策の開発を目指した。

温泉地において、温泉水の水深や流速の異なるさまざまな場所から微生物群集を採取し解析した結果、嫌気性菌および好気性窒素固定細菌の存在割合とセルロース量に関連性が見られ、セルロース生産には微好気条件が重要であると考えられた。実験室で至適生産条件を探したが、酸素供給量が多いと生産性が著しく低下し、少なすぎるとセルロース分解が進むなど、条件決定は困難であった。物理化学的指標だけでなく、群集の構成種を指標にした生物モニタリング制御がセルロース生産に必要であると考えられた。また、温泉微生物被膜からセルロースを抽出し解析したところ、酢酸菌が生産するバクテリアセルロースと比較して、温泉細菌のセルロース繊維は太く長いことが分かった。本研究ではその特性を活かした加工法の検討も進めた。

# 「社会を豊かにするための事業を作る」

## ちとせグループの取組みと考え方

藤田 朋宏

ちとせグループ 創業者 兼 最高経営責任者

内閣官房 イノベーション政策強化推進のための有識者会議 バイオ戦略有識者

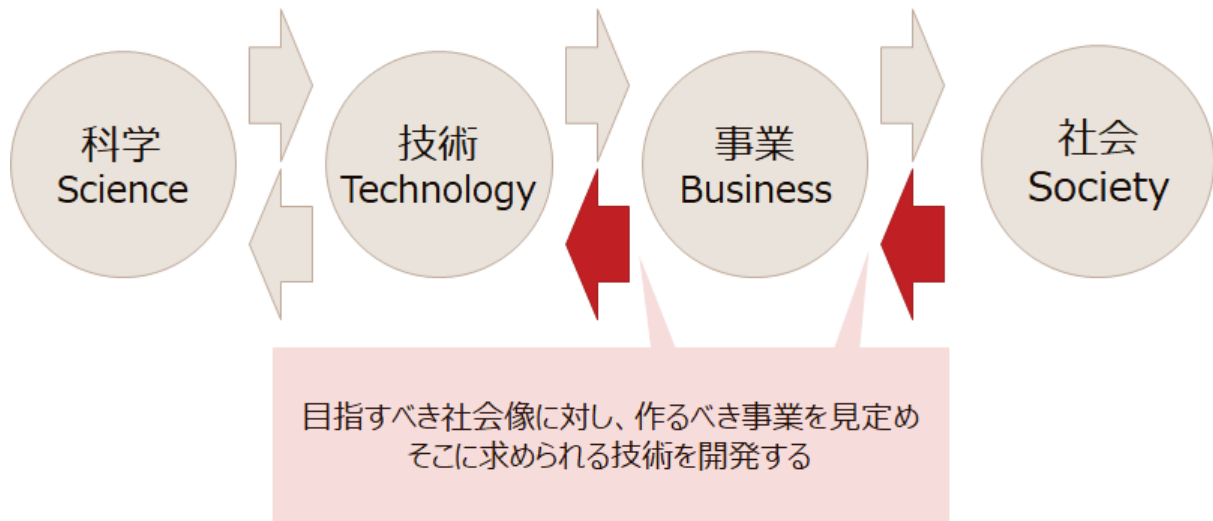
現在の産業構造は、全ての産業が化石資源を基点として組み上げられている。しかし、この化石資源消費型の社会が続く限り、人類が千年先の未来まで豊かな生活を続けることは不可能である。ちとせグループでは、こうした化石資源中心の消費型社会からバイオマス資源基点の循環型社会に変えることで、「千年先まで人類が豊かに暮らせる地球を残す」ための活動を続けている。

具体的には、バイオ技術を活用することで、現在の産業構造から生じる様々な社会課題の解決に取り組んでいる。例えば、藻類スピルリナの生産によりタンパク質危機の解決に貢献する「株式会社タベルモ」や、世界最高レベルのバイオ医薬品生産用細胞の開発を通じてバイオ医薬品開発に貢献する「株式会社ちとせバイオロジクス」など、現在までに日本、シンガポール、マレーシア、ブルネイに合計9つの事業体を設立し、国内外で精力的に活動している。

ちとせグループでは社会課題ごとにプロジェクトを立ち上げ、そのプロジェクトを事業として展開するための器として事業体を設立する体制をとっている。課題解決のために必要な事業を先に定義し、そこで求められる技術を開発し、実用化可能なレベルまで技術を育てながら新たな事業を創出し、各事業体を通してバイオ技術シーズを社会に実装することを目指している。



このように、ちとせグループは事業構造から逆算した技術開発のもと、新たな事業を作り続けてきた。新規事業の創出という、技術の存在から事業化へ繋げることが前提とされがちだが、ちとせグループの取組みや考え方はその逆の視点を基本としている。



本講演では、バイオ技術を活用しながら事業を作り続けてきたちとせグループの取組みについて、いくつかのプロジェクト事例とともに紹介する。

## 講師略歴

バイオサイエンス博士

東京大学大学院農学生命科学研究科修了後、アクセンチュアを経てちとせ研究所の経営を皮切りに、日本と東南アジアに合計11社のバイオベンチャーを設立。

千年後の人類から見た21世紀初頭の人類が何をしておくべきかという視点で、バイオベンチャー企業群“ちとせグループ”を運営しながら、先端のバイオ技術を事業に変え社会に提供するより良い方法を模索している。

昨年2月に、内閣官房 イノベーション政策強化推進のための有識者会議 バイオ戦略有識者に就任。

## ユーグレナの研究開発戦略～研究開発テーマを社会に実装させるための思考法～

鈴木 健吾（株式会社ユーグレナ、執行役員 研究開発担当）

ユーグレナは、和名をミドリムシの名前で親しまれている微細藻類の一種で、淡水の湖沼などに生息する単細胞真核藻類である。50種類以上が知られるユーグレナのうち、ユーグレナグラシリス（*Euglena gracilis*, 図1）は50年以上も前からモデル生物として利用されてきたが、細胞内に含有される幅広い栄養素、およびユーグレナに含有される特徴的なβ-グルカンであるパラミロン（図2）の機能性から食品素材としての産業利用も検討されてきた（文献1）。この古くから実施されてきたユーグレナ応用利用のための研究を活用し、2005年に株式会社ユーグレナが設立され、ユーグレナ大量培養技術の画一を経て、食品素材としての生産、販売を中心に事業展開してきた（文献2）。



図1 ユーグレナの光学顕微鏡画像

ユーグレナは豊富な栄養素を含むことと同時に、特定条件下で油脂を高い割合で蓄積することが知られており、その仕組みも古くから研究対象とされてきた。それらの研究の成果により、周囲に酸素がない条件において、細胞内に蓄積したパラミロンを

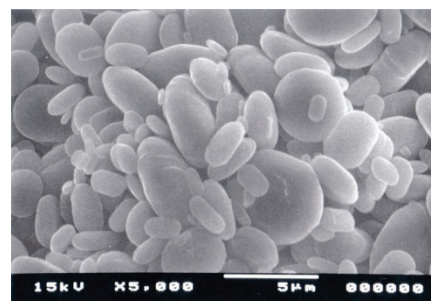


図2 パラミロンの電子顕微鏡画像

分解してエネルギーを獲得し、その反応における不要なものをワックスエステルという油脂の形で蓄積していることが明らかになっている。この現象はユーグレナ独特の発酵として、ワックスエステル発酵と名付けられている。ユーグレナの蓄積するワックスエステルはバイオ燃料の原料として適しているとされることから、バイオ燃料生産にも利用が検討され技術開発が進んでいる。

ユーグレナをバイオ燃料の原料として利用するためには、生産コストを抑える必要があり、廃棄される二酸化炭素や廃熱、排水などの利用が検討されてきた。研究室内での試験、及び小規模商業生産のデータを元にした試算はこれまで多数実施されてきたが、火力発電所等で培養面積が1,000 m<sup>2</sup>を超えるような大きなスケールでの実証は行なわれたことがなかった。このため、株式会社ユーグレナは2016年から、間伐材を燃やす火力発電（木質バイオマス発電）を行う多気バイオパワーにおいて、実証試験「バイオ燃料用藻類生産実証プロジェクト」を実施した。当該試験は、発電所で発生する二酸化炭素やボイラー温水を隣のユーグレナ培養設備（図3）に供給する培養試験であり、3年間のプロジェクト期間で低コスト大量生産の方法を確かめた。



図3 三重県多気町の発電所と培養槽

上記の成果にとどまらず、2019年にはさらに研究を発展させる形で、三重県多気町と多気バイオ

パワーを運営する株式会社中部プラントサービス、及び株式会社ユーグレナの間で、共同事業体「もっとバイオ多気」の設立協定を結んだ。共同事業ではユーグレナから燃料画分を取って残ったタンパク質を餌として活用することなどが研究構想の一部であり、これを元に魚介類養殖など新たな多気ブランドの開発に3年間取り組むことを計画している。株式会社ユーグレナは、沖縄県の竹富島での車エビを養殖において同様の検討を実施した経験があり、そのノウハウを活用して開発を進展させる予定である

これまで株式会社ユーグレナは、早くからユーグレナの燃料化を視野にさまざまな研究開発に取り組んできた。バイオジェット燃料に関しては、2010年5月より研究開発を開始し、大学や企業との共同研究や政府支援プロジェクトへの参画を通して、燃料用ユーグレナの培養技術などの開発を進めてきた。2019年には横浜市に燃料製造のための実証プラントを竣工し、今後はバイオジェット燃料フライト実現を目指す産官学コンソーシアムである「次世代航空燃料イニシアティブ」および「2020年東京オリンピック・パラリンピック協議大会に向けたバイオジェット燃料の導入までの道筋検討委員会」にも参加し、関係各所との協議・情報交換や意見提言を行っていく予定である。



図4 燃料実証製造プラント（横浜市）

## 引用文献

1. Nakashima, Ayaka, et al. "β-Glucan in foods and its physiological functions." *Journal of nutritional science and vitaminology* 64.1 (2018): 8-17.
2. Suzuki, Kengo. "Large-scale cultivation of *Euglena*." *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. Springer, Cham, 2017. 285-293.

## 講師略歴

2003年 東京大学農学部生物システム工学専修卒業

2005年 株式会社ユーグレナ創業（研究開発担当の執行役員として現任）

2006年 東京大学大学院農学生命科学研究科修士課程修了

2016年 東京大学大学院 博士(農学) 学位取得

2018年 理化学研究所 微細藻類生産制御技術研究チーム チームリーダー就任（兼任）

2019年 北里大学大学院 博士(医学) 学位取得

マレーシア工科大学 マレーシア日本国際工科院 客員教授就任（兼任）

東北大学 未来型医療創造卓越大学院プログラム 特任教授（兼任）

# 特殊ペプチド創薬イノベーション、創始から未来へ

菅 裕明（東京大学大学院理学系研究科、教授）

医薬品開発の主流は長い間有機小分子薬剤であったが、標的タンパク質へ高い特異性をもつ抗体が近年盛んに開発され、上市されている。副作用が少なく薬理効果の高い抗体は、有機小分子薬剤に代わる薬剤として非常に期待が高い反面、標的タンパク質が細胞表面分子や分泌分子に限られるため、応用範囲が限定される。さらに、免疫毒性や生産コストが高いことも、患者への負担を高めている。

そういった中、タンパク製剤に代わる次世代薬剤として、有機小分子薬剤なみの低い分子量をもつ第3の医薬品開発の期待が高まっている。菅らは、特異性が高く、生理活性の高い特殊ペプチドを迅速且つ確実に発見できる RaPID (Random peptide integrated discovery) システムを開発した。RaPID システムは、菅らが独自に開発した人工 RNA 酵素「フレキシザイム」と大腸菌再構築無細胞リボソーム翻訳系を組み合わせた FIT システムに、mRNA ディスプレイを組み合わせて構築された。本システムは、mRNA を鋳型として、特殊ペプチドを自在かつ簡便に翻訳合成し、活性種を迅速にスクリーニングする技術である。この技術を駆使することで、特殊ペプチドのライブラリー化も極めて容易に達成でき、感染症を含む様々な疾患原因タンパク質に対する特殊ペプチドの薬剤探索が可能となった。本講演では、この技術開発に至った経緯、特殊環状ペプチドの医薬品に向けた実例等、将来ビジョンを含めた最近の進展を紹介する。また次世代バイオロジクス(ネオバイオロジクス)についても紹介する。

## References

- K. Sakai; T. Passioura; H. Sato; K. Ito; H. Furuhashi; M. Umitsu; J. Takagi; Y. Kato; H. Mukai; S. Warashina; M. Zouda; Y. Watanabe; S. Yano; M. Shibata; H. Suga\*; K. Matsumoto; "Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor" **Nature chemical biology**, 15, 598-606 (2019)
- M. Nawatha; J.M. Rogers; S.M. Bonn; I. Livneh; B. Lemma; S.M. Mali; G.B. Vamiseti; H. Sun; B. Bercovich; Y. Huang; A. Ciechanover; D. Fushman; H. Suga\*; A. Brik; "De novo macrocyclic peptides that specifically modulate Lys48-linked ubiquitin chains." **Nature chemistry**, 11(7):644-652 (2019)
- A. Kawamura, M. Münzel, T. Kojima, C. Yapp, B. Bhushan, Y. Goto, A. Tumber, T. Katoh, O.N. King, T. Passioura, L.J. Walport, S.B. Hatch, S. Madden, S. Müller, P.E. Brennan, R. Chowdhury, R.J. Hopkinson, H. Suga\*, C.J. Schofield "Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides" **Nature Communications**, (2017) Apr. 6, 14773.
- H. Yu, P. Dranchak, Z. Li, R. MacArthur, M.S. Munson, N. Mehzabeen, N.J. Baird, K.P. Battalio, D. Ross, S. Lovell, C.K. Carlow, H. Suga\*, J. Inglese, "Macrocyclic peptides delineate locked-open inhibition mechanism for microorganism phosphoglycerate mutases" **Nature Communications**, (2017) Apr. 3, 14932.
- Y. Matsunaga, N.K. Bashiruddin, Y. Kitago, J. Takagi, H. Suga\* "Allosteric inhibition of a semaphorin 4D receptor plexin B1 by a high affinity macrocyclic peptide", **Cell Chemical Biology**, 23, 1341-1350 (2016).
- K. Ito; K. Sakai; Y. Suzuki; N. Ozawa; T. Hatta; T. Natsume; K. Matsumoto; H. Suga\* "Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds" **Nature Communications**, 6, 6373 (2015).

## 講師略歴

1994年マサチューセッツ工科大学 PhD。1994年から1997年マサチューセッツ総合病院・ハーバード大学医学部博士研究員。1997年から2002年ニューヨーク州立バッファロー大学 Assistant Professor、2002年から2003年同大 Tenured Associate Professor。2003年から東京大学先端科学技術研究センター助教授、2005年から教授。2010年から同大大学院理学系研究科教授。主な専門分野は、ケミカルバイオテクノロジー。受賞歴は、2001年内閣府産学官連携功労者表彰「日本学術会議会長賞」、2002年日本化学会学術賞、2014年日本ペプチド学会赤堀メモリアル国際アワード、2015年科学技術分野の文部科学大臣表彰「科学技術賞・研究部門」、2016年読売テクノフォーラム・ゴールドメダル賞、ドイツ・マックスバーグマン・ゴールドメダル賞、日本イノベーター大賞特別賞、2017年名古屋メダルシルバー、2019年アメリカペプチド学会 Vincent du Vigneaud Award、他。2006年ペプチドリーム社創業、2012年東証マザーズ上場、2015年東証一部上場、2016年日本ベンチャー大賞内閣総理大臣賞他受賞多数、2018年に社外取締役退任。2017年ミラバイオロジクス社創業、取締役。