

## 自己紹介

機関名：聖マリアンナ医科大学

所属：医学部 微生物学

研究テーマ：抗微生物薬の送達手法開発

研究内容：

1. 人工多機能性ポリペプチドの創成
2. 疾患細胞内情報伝達のセンシング技術の開発

理-生物化学出身。製剤学のテクノロジーである薬物送達システムの方法論を探究したく、生物化学工学の技術を駆使して抗微生物薬・抗癌薬に対する新奇ドラッグデザイン手法を開拓し、アカデミア発のアイデアとして社会に発信しています。特にペプチド・タンパク質性医薬や遺伝子・細胞医薬など次世代医薬品として最近ニーズが高まってきているバイオ医薬品のシーズを生み出す基礎研究開拓に主眼を置き、ケミストならではの化学的発想を取り入れながら、薬物の分子設計から合成、細胞および動物試験系による薬効評価までを実施しています。

## 実験

私達は分子量 10~130 kDa の人工エラスチンタンパク質（正確には繰り返し配列を有するエラスチン様ポリペプチド：以後、ELP と略記）<sup>1-5</sup> を遺伝子工学的的手法により分子設計し、大腸菌を宿主としたタンパク質発現生産を実施しています。ELP は自身の無毒性と大腸菌との好相性のため、培養液 1L から 200 mg 超の収量が見込め、物性解析から細胞実験、動物実験までの一連の基礎研究に必要なグラムオーダーのリコンビナントを短時間で調製できます。これは、(1) 多くの ELP が IPTG による発現誘導無し（もしくは 0.1 mM 程度の低濃度 IPTG 存在下）で、T7 プロモーターからの漏れによる発現に依存した 37°C での終夜培養が可能であること、(2) ELP の温度応答性を利用したクロマト操作不要の簡便な大量精製が可能であること、に起因します。したがって、私達の実験系においては、破碎すべき大腸菌細胞壁およびゲノム量が通常よりもはるかに高濃度となります。ここでは一例として、超音波破碎に Sonifier SFX150/250 を使用して、約 800 アミノ酸残基から成る分子量約 65kD の ELP を発現・精製した結果を紹介します。

[材料の調製および超音波破碎]

- ・ 出発物質：pET24a-ELP を形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株のグリセロールストック
- ・ 37°C 終夜培養の大腸菌を遠心分離により集菌  
(反復回分培養により 15L 分を分注・確保)

→ リン酸緩衝液(pH 7.2)に再懸濁して液体窒素で急速凍結後、-80°C 保存

(菌体濃度：1L 終夜培養液から回収した菌体/10 mL リン酸緩衝液)

- ・ 一部の大腸菌懸濁液ストックを融かし、ディスポ遠沈管およびアルミ製カップに分注して表 1 に示す 4 つの異なる条件で超音波処理を実施。

表 1. Sonifier SFX150/250 を使用した超音波処理条件

実験 ID#	1	2	3	4
機器名	SFX150	SFX250		
(kHz)	(40 kHz)	(20 kHz)		
マイクロチップ /ホーン径	1/8"マイクロチップ (3.2 mm)			1/2"ホーン (12.7 mm)
大腸菌懸濁液 (mL)	3 mL		6 mL	20 mL
Amplitude 値	70%	35%	70%	60%
振幅 (P-P)	68 $\mu$ m	69 $\mu$ m	133 $\mu$ m	90 $\mu$ m
発振間隔	1 sec ON / 2 sec OFF			
全発振時間	6 min	3 min		4 min
目的物の収率 <sup>*1</sup>	~100%	90%	50%	100%

<sup>\*1</sup> 実験 ID4 での大腸菌懸濁液 1mL あたりの収量を便宜上 100%と定義

## 20kHz/40kHz の大腸菌破碎効果

実験 ID1~3 はマイクロチップを使用して実施しました。比較のため、私達の通常スケールの 1/10 量 (20 mL 大腸菌懸濁液) を処理した実験 (実験 ID4) で得られた情報を元に、大腸菌液 1mL あたりの収量を算出してこれを 100%と定義し<sup>\*1</sup>、マイクロチップを使用した各 3 つの収率を比較しました。発振時間等の条件を最適化する必要がありますが、20kHz/40kHz のどちらを用いても菌体液 10mL 程度であれば、タンパク質精製に必要な細胞壁およびゲノムの破碎は可能であると思われました。図 1 に示すように、4 つの異なる条件で大腸菌を破碎し、精製した最終産物の純度はほぼ同等でした。また、ELP 固有の活性である可逆的な相転移能および相転移温度も同一でした。

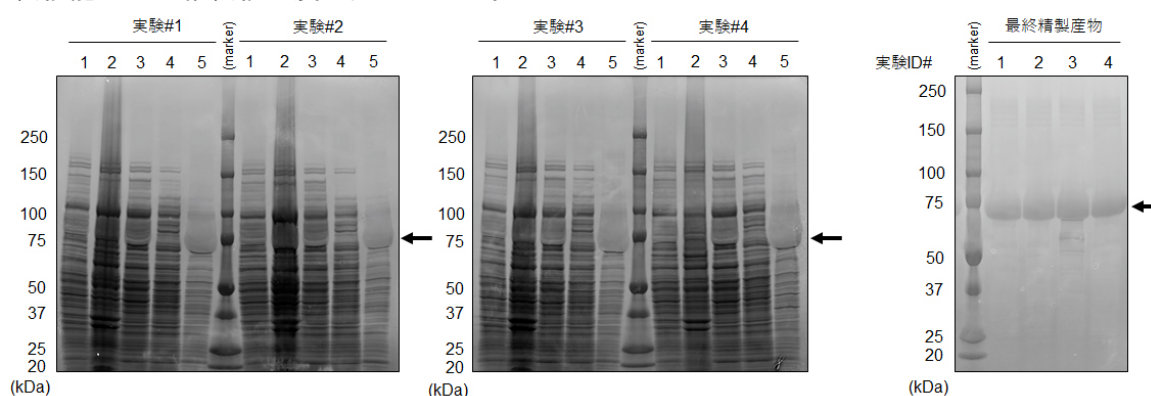


図 1. 人工エラスチンタンパク質 ELP の発現と精製の実例

ELP を pET24a にクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) に形質転換した。IPTG 非存在下 37°C で終夜培養して大腸菌を回収して SDS-PAGE に展開し、その後ゲルを銅染色した。超音波破碎により目的タンパク質は細胞質画分 (可溶性画分) に存在し、ELP の温度応答性を利用した精製法により、高純度に精製されたことがわかる。最左および中央のゲルのレーン 1~5 はそれぞれ、全細胞画分、不溶性画分、細胞質画分、粗精製で除去された画分、粗精製画分を、←は目的産物 ELP を示す。

今回はマイクロチップ使用下での大腸菌懸濁液容量と全発振時間の最適化はしていません。超音波処理の後半ではマイクロバブルの発生が認められましたので、今回の 3mL (or 6mL) の破碎には全発振時間は 1min 少々で十分であったかもしれません。

### 超音波ホモジナイザーを使用した感想

超音波処理前後の溶液の粘度、透明度、色の変化等を指標にして経験的に実験条件を決定しています。培養時間を一定にしても大腸菌に発現させる目的タンパク質により菌数が異なるため、(1) 超音波破碎に供する懸濁液の菌体濃度を固定し（私達の系では、1L 終夜培養液から回収した菌体を 10 mL のリン酸緩衝液で再懸濁）、(2) 出力ワット数、(3) 処理時間を同一設定にしても、超音波処理後の溶液の状態が異なり一抹の不安を抱きながら実験を進めていました。これが、今回 BRANSON 社の Sonifier SFX250 機購入の動機でした。

Sonifier SFX250 機には、直近まで使用していた国内製 K 社の超旧型機には無い、3つの魅力があります。大腸菌を宿主としたタンパク質発現生産において、超音波処理法を適用して大腸菌破碎とタンパク質の抽出をする際には、超音波処理により発生する熱により目的タンパク質が変性する可能性があるため、常に氷上・氷中で操作するのが一般的です。1つ目の魅力は、Sonifier SFX250 機は大腸菌懸濁液中に入れる棒状の温度センサーを搭載しており、超音波処理中の昇温の程度をリアルタイムに確認することができることです。また、処理に要した超音波エネルギーがジュール (J) 値として与えられるため、パイロット実験により決定した破碎条件で達成されるジュール値を加えるように処理時間をコントロールできることです。量的調製のために同じまたは類似の実験を繰り返し行う際に威力を発揮しており、これが2つ目の魅力です。3つ目は、マイクロチップの装着により数 mL の系でも適用が可能であることです。少容量実験の場合、これまでは国内製 S 社の破碎機を使用していましたが、Sonifier SFX250 機 1 台で幅広い容量への対応が可能になりました。

(私達の ELP に関する参考文献)

1. Asai, D. et al. *Biomaterials*, **33**, 5451-5458 (2012)
2. Xu, X. et al. *Biomacromolecules*, **13**, 2315-2321 (2012)
3. Liu, W. et al. *Cancer Res.*, **72**, 5956-5965 (2012)
4. Mukerji, R. et al. *Biomaterials*, **79**, 79-87 (2016)
5. Asai, D. et al. *Acta Biomater.*, **64**, 116-125 (2017)