

土壤浄化微生物のスクリーニングに向けたアクアリアクターの開発

東京農工大学 工学部 特任講師 内田 紀之

1. 研究概要

微生物を利用した重金属などの土壤汚染物質の除去は、安価で環境負荷をかけない浄化法として大きな注目を集めている。例えば、これまでダイオキシンなどの有機塩素系化合物を分解する微生物が見出され、実用化が進められている。しかしながら、人体に対して高い有害性を持つ重金属をはじめとする様々な汚染物に対して浄化を行える微生物の探索は今なお挑戦的な課題である。本研究では、重金属に対する浄化能が期待されている微生物の遺伝子変異体ライブラリーを利用した、重金属が除去可能な微生物のスクリーニングの実現に向け、全て水系からなり、重金属の検出が可能な **Water-in-water** マイクロドロプレット（アクアリアクター）の開発を目指した（図 1）。これが実現されれば、微生物ライブラリーをアクアリアクター内に単一微生物ごとに区画化し、フローサイトメトリーなどのデバイスによってドロプレット内における重金属の量によって網羅的に解析し得る。

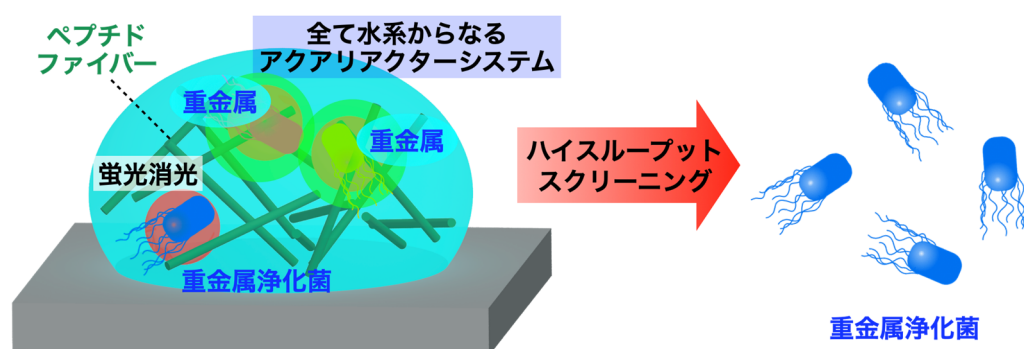


図1 アクアリアクターを利用した汚染浄化菌の
ハイスループットスクリーニングの概念図

親水性の高分子であるデキストラン（DEX）とポリエチレングリコール（PEG）の混合水溶液中を攪拌すると、液液相分離（LLPS）ドロプレットが形成される。LLPS ドロプレットは重金属を始めとする、様々な小分子が移動可能な界面を形成し、生体高分子が DEX 相に集積させることができ、バイオリアクターとして有用である。しかし、LLPS の界面張力は極めて低く、溶液中におけるドロプレットの自由拡散により、容易に融合する(図 2B)。最近研究者は、自己集合性ペプチドファイバーを LLPS ドロプレット分散液に混合すると、高い安定性を持ったアクアリアクターが作成できることを明らかにしている(図 2A,C、特願 2023-181844)。本研究課題では、重金属に応答して蛍光を発するアクアリアクターを開発し、重金属除去微生物のスクリーニングへの応用を目指した。これまで、研

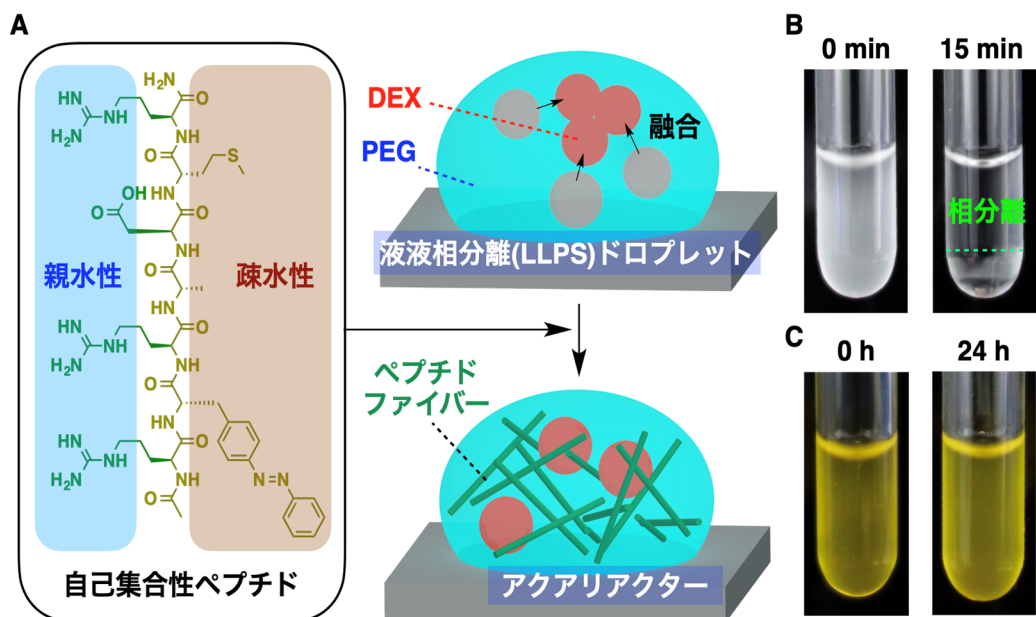


図2 自己集合性ペプチドを利用したアクアリアクター作成 (A) と、ペプチド添加前後における LLPS の安定性評価 (B,C)

研究者は既に自己集合性ペプチドと、LLPS を利用したアクアリアクター材料開発に予備的に成功している。この知見において、アクアリアクターは高い安定性を示すと同時に、フローサイトメトリーによる解析が可能であった。また、材料の高い生体適合性と物質移動性により、微生物をアクアリアクター内で長時間培養することが可能であると共に、外部から輸送された分子に対する生体反応が起こることが明らかになっていた (図3)。

2. 本研究課題のアクアリアクターの特徴

マイクロドロプレットを利用した生体分子のスクリーニングは、高いハイスル

ープット性を有することから、極めて有用な技術であり、これまで Water-in-Oil(W/O)ドロプレットなどがスクリーニングに利用されてきた。しかし、従来の W/O ドロプレットの場合、水相のリアクター内部がオイル相によって外部環境から隔離されている。このため、実用的に重要な、酸素が含まれる好気的な環境下における微生物の培養や、小分子の界面移動が必要なスクリーニングが実質的に不可能であった。このような課題を解決する

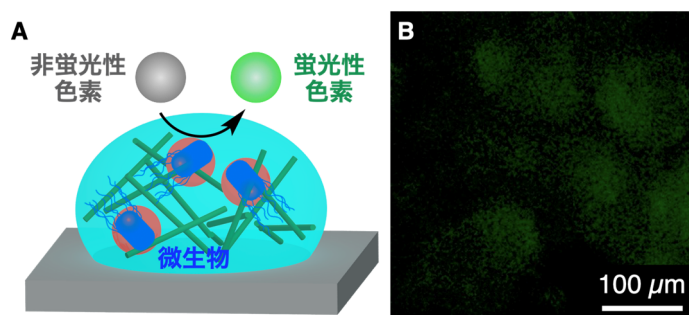


図3 アクアリアクターの微生物リアクター (A) としての利用とその際の蛍光顕微鏡画像 (B)

材料として、分子が界面を自由に移動できる LLPS ドロプレットの利用が提案されていたものの、LLPS が本質的に抱える、低い安定性を解決する材料はこれまで実現されてこなかった。本研究課題のアクアリアクターは、LLPS ドロプレットに自己集合性ペプチドを混合するという簡便な手法で調整できることに加え、高い安定性、生体適合性、物質輸送性、流動性を兼ね備えた理想的なマイクロドロプレットであり、従来のスクリーニング技術を刷新させる材料である（図 4）。前述のアクアリアクターの特徴を利用することで、微生物だけでなく様々な細胞・微生物種の実験に応用可能な材料である。また、全てが水系であるという性質を利用することで、広く市販されている粒子解析装置であるフローサイトメトリーを利用したスクリーニングが可能であり、高い実用性を有する技術である。また、重金属による汚染土壌の対策として、これまでコストが高い掘削除去が主に用いられてきたが、本研究によるバイオレメディエーションが実現すれば、コストを大幅に減少させた、次世代土壌浄化技術となりえる。

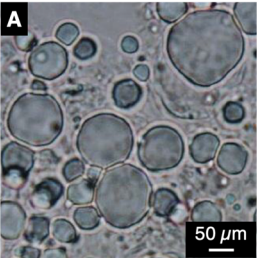
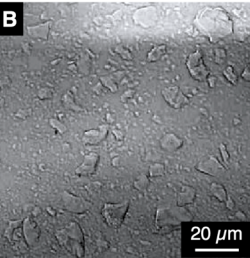
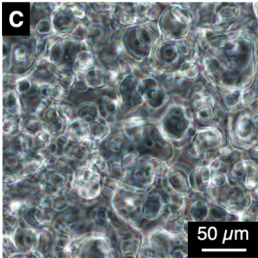
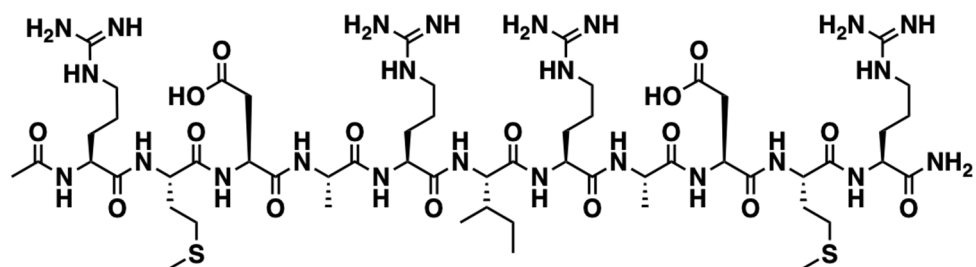
	W/Oエマルジョン (従来法)	マイクロゲル (従来法)	アクアリアクター (本研究課題)
	A	B	C
調整簡便性	△	✗	✓
生体親和性	△	△	✓
小分子の 界面移動	✗	△	✓
フローサイト による解析	✗	✗	✓

図 4 汎用的にマイクロリアクターとして利用される W/O ドロプレット (A)、
マイクロゲル (B) と本研究課題のアクアリアクター (C) における
顕微鏡写真とその特徴の比較

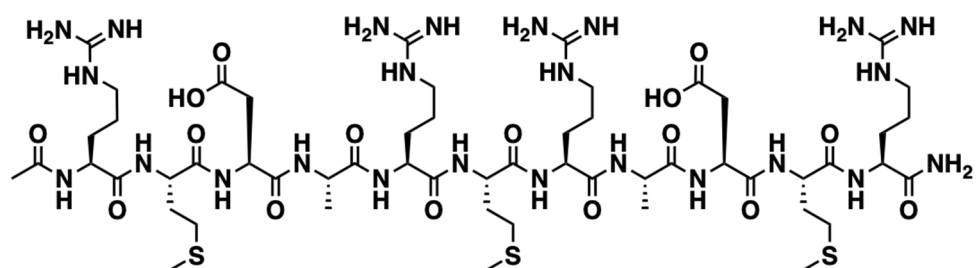
3. 実験結果

自己集合性ペプチドの構造最適化

A



ペプチドA



ペプチドB

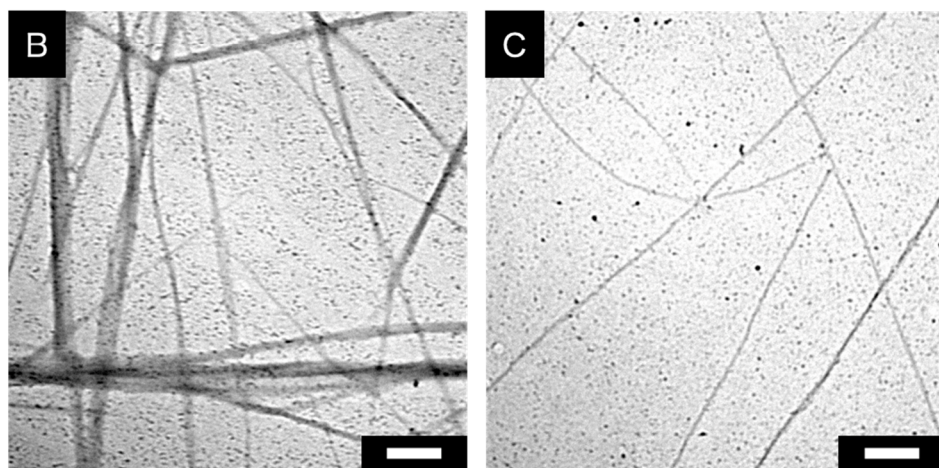


図5 自己集合性ペプチドの分子構造 (A)、水中で超分子ファイバーを形成しているペプチドA (B)、及びペプチドB (C) の透過型電子顕微鏡画像

まず、アクアリアクターの機能向上を視野に入れ、自己集合性ファイバーの構造最適化を行った。本課題では親水性残基と疎水性残基が交互に配置された、2種類の両親媒性ペプチドを開発した(図5A)。これらのペプチドは疎水性部分の効果によって二重化し、それが水素結合によって一次的に集合化することでナノファイバーを形成することが期待

される。実際、作成されたサンプルを透過型電子顕微鏡によって観察したところ(図 5B,C)、どちらの場合もナノファイバーが形成されていることが確認された (Biomacromolecules 2024, 25, 3499-3506.)。

自己集合性ペプチドを利用したアクアリアクターにおける内部の蛍光化

次に、アクアリアクターを利用したスクリーニングシステムを構築するため、アクアリアクター内部に取り込まれたものを蛍光検出するシステムの開発を行なった。まず、モデルケースとしてアクアリアクターの液滴部分に多く局在するデキストランを Cy5 によって蛍光ラベル化した。アクアリアクターを共焦点顕微鏡によって観察したところ、実際にアクアリアクター内部が選択的に蛍光ラベル化されていることが確認された (特願 2023-18184、PCT2023-016741)。さらに、これをマイクロ流路に流し、蛍光顕微鏡によって観察したところ、外部に流れているシース液と混ざることなく、流路を流れることが観察された (図 6)。

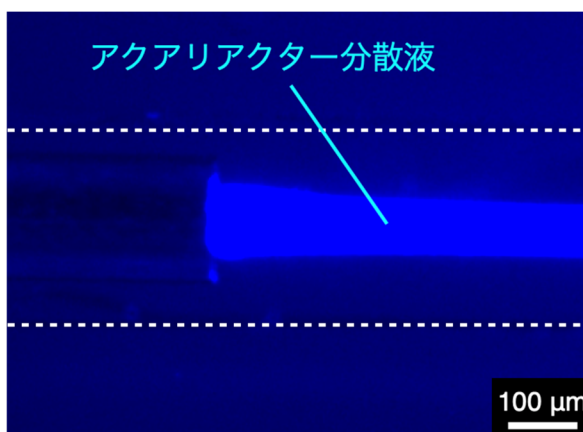


図 6 蛍光ラベルされたアクアリアクターをマイクロ流路に流した際の蛍光顕微鏡画像

4. 今後の展望

本研究課題では、アクアリアクターの開発に向け、最適化された自己集合性ペプチドの開発に成功した。さらに、今後はアクアリアクター内部における重金属を濃縮する微生物を探索し、土壌浄化へと応用する予定である。

謝辞

本研究は「公益財団法人 JFE21 世紀財団」の研究助成のサポートによって進めさせて頂きました。この場をお借りして御礼申し上げます。

関連する研究成果論文：

(1)

A Structurally Robust Phospholipid Microtube Constructed by Membrane Phase Separation as a Scaffold for *on-tube* Characterization of Membrane-Bound Proteins

Noriyuki Uchida*, Ryu Ishizaka, Anju Kawakita, Hiroshi Ueno, Hiroyuki Noji, Rinshi S. Kasai, Takeshi Yokoyama, Saburo Kurihara, Tomoki Noguchi, Go Watanabe, Ayaka Iwasaki, Itsuki Ajioka, Kazuyoshi Muranishi, Ken Yoshizawa, Shingo Kanemura, Masaki Okumura, Takahiro Muraoka*

J. Am. Chem. Soc. **2025**, *147*, 41706–41716.

(2)

NMR study on assemblies of Technol PG with surfactants

Toru Tasaka, **Noriyuki Uchida***, Hiroki Hamada*

Nat. Prod. Commun. **2025**, *17*, DOI: 10.1177/1934578X221144567.

(3)

A photoresponsive hybrid of viruses and supramolecular peptide fibers for multi-dimensional control of patterning and infection

Atsuya Yaguchi, **Noriyuki Uchida***, Daiki Miura, Go Watanabe, Hirotugu Hiramatsu, Itsuki Ajioka, Chinbat Enkhzaya, Shunto Itani, Tomokazu Saito, Takahiro Muraoka*

Angew. Chem. Int. Ed. **2025**, *64*, e202508528.

(4)

Thermal responses and cell adhesive properties of glycosylated jigsaw-shaped self-assembling peptides

Yoshika Hara, Ken Yoshizawa, **Noriyuki Uchida***, Takahiro Muraoka* *Pep. Sci.* **2025**, *117*, e24392.

(5)

Stimuli-responsive, self-regulating assembly of chiral colloids for robust size and shape control

Shuxu Wang, Louis Kang, Péter Salamon, Xiang Wang, **Noriyuki Uchida**, Fumito Araoka, Takuzo Aida, Zvonimir Dogic Yasuhiro Ishida* *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 9891.

(6)

Transdermal delivery of paclitaxel-anionic nanoparticles to epidermis layer, pterostilbene, and pterostilbene glycoside, and their application for treatment of skin cancer and wrinkle

Hiroki Hamada*, Daisuke Uesugi, Kohji Ishihara, Ryusuke Hosoda, Kei Shimoda, Atsuhito Kuboki, **Noriyuki Uchida**, Yuya Kiriake

Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. **2024**, *13*, 1-7. DOI: 10.20546/ijcmas.2024.1304.001

(7)

ROS-responsive methionine-containing amphiphilic peptides impart enzyme-triggered phase transition and antioxidant cell protection

Yoshika Hara,† Ken Yoshizawa,† Atsuya Yaguchi, Hirotsugu Hiramatsu, **Noriyuki Uchida***, Takahiro Muraoka*

Biomacromolecules **2024**, *25*, 3499-3506.

(8)

Hybridization of tannic acid with Technol PG liposomes

Toru Tasaka, Hiroki Hamada*, **Noriyuki Uchida***

Nat. Prod. Commun. **2024**, *19*, DOI: 10.1177/1934578X241253719.

(9)

Activator of KAT3 histone acetyltransferase family ameliorates the low latent inhibition in a neurodevelopmental disorders model, syntaxin 1A abraded mice

Takahiro Nakayama*, Akash Kumar Singh, **Noriyuki Uchida**, Toshiyuki Fukutomi, Yasuo Terao, Hiroki Hamada, Takahiro Muraoka, Eswaramoorthy Muthusamy, Tapas Kumal Kundu, Kimio Akagawa

Cell Rep. **2024**, *43*, 114101.

関連特許：

(1)

特願 2024-100713・村岡貴博；内田紀之；野地博行・有機物の濃縮方法、有機物の検出方法、及び有機物の濃縮に用いるためのキット・国立大学法人東京農工大学・2024/6/21

(2)

特願 2024-081283・村岡貴博；内田紀之；吉澤憲・ベシクル結合性化合物及びその使用・国立研究開発法人科学技術振興機構・2024/5/17

(3)

特願 2024-28329・内田紀之；村岡貴博；石坂龍・リン脂質構造体の形態制御方法およびリン脂質構造体・国立大学法人東京農工大学・2024/2/28

(4)

特願 2024-28328・内田紀之；村岡貴博；石坂龍・両親媒性化合物、リン脂質構造体、およびリン脂質構造体の製造方法・国立大学法人東京農工大学・2024/2/28