

魚の抗菌タンパク質を合成するための種子および合成方法

弘前大学大学院保健学研究科
准教授 葛西 宏介

2025年 3月 6日

従来 of 抗菌物質の問題点

化学物質・抗生物質

- 化学物質は殺菌効果が高いが、環境や人体に悪影響を及ぼす
- 抗生物質は安くて殺菌効果が高いが、薬剤耐性化の問題がある

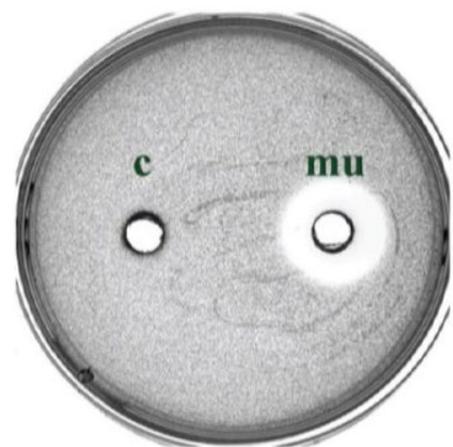
天然成分

- 天然由来の抗菌成分は、効きが悪く不安定である
- 天然物質は、配合・添加量を確保するにはコストがかかる

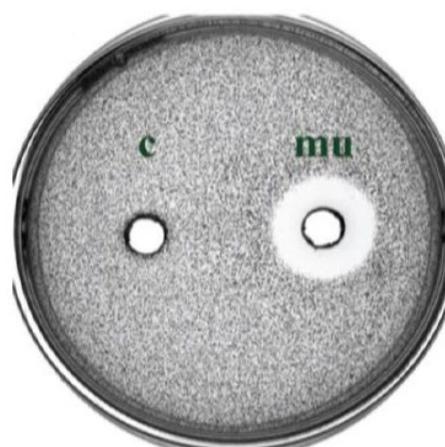
魚の粘液に含まれる抗菌タンパク質



魚の粘液に含まれる抗菌タンパク質



黄色ブドウ球菌



MRSA

Table 1. Antibacterial activity spectra of *Platichthys stellatus*-derived epidermal mucus.

Species and strains	Diameter of clear zone (mm)	Score ^a
Gram-positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i> NIHJ JC-1	8.5	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	6.3	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18.1	+++
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 87-7920	8.2	++
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 87-7927	8.3	++
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 87-7928	8.1	++
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 87-7931	8.2	++
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 87-7958	8.1	++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5.5	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.8	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC33186	2.8	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC19434	2.8	-
<i>Enterococcus faecium</i> BM4147 (<i>VanA</i> ⁺)	2.8	-
<i>Enterococcus faecalis</i> V583 (<i>VanB</i> ⁺)	2.8	-
<i>Enterococcus gallinarum</i> BM4174 (<i>VanC1</i> ⁺)	2.8	-
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	2.8	-
<i>Serratia marcescens</i>	2.8	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210001	5.7	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	2.8	-

^a Clear zone ≤ 2.8 mm. +, clear zone < 6.0 mm; ++, clear zone < 10.0 mm; + + +, clear zone ≥ 10.0 mm.

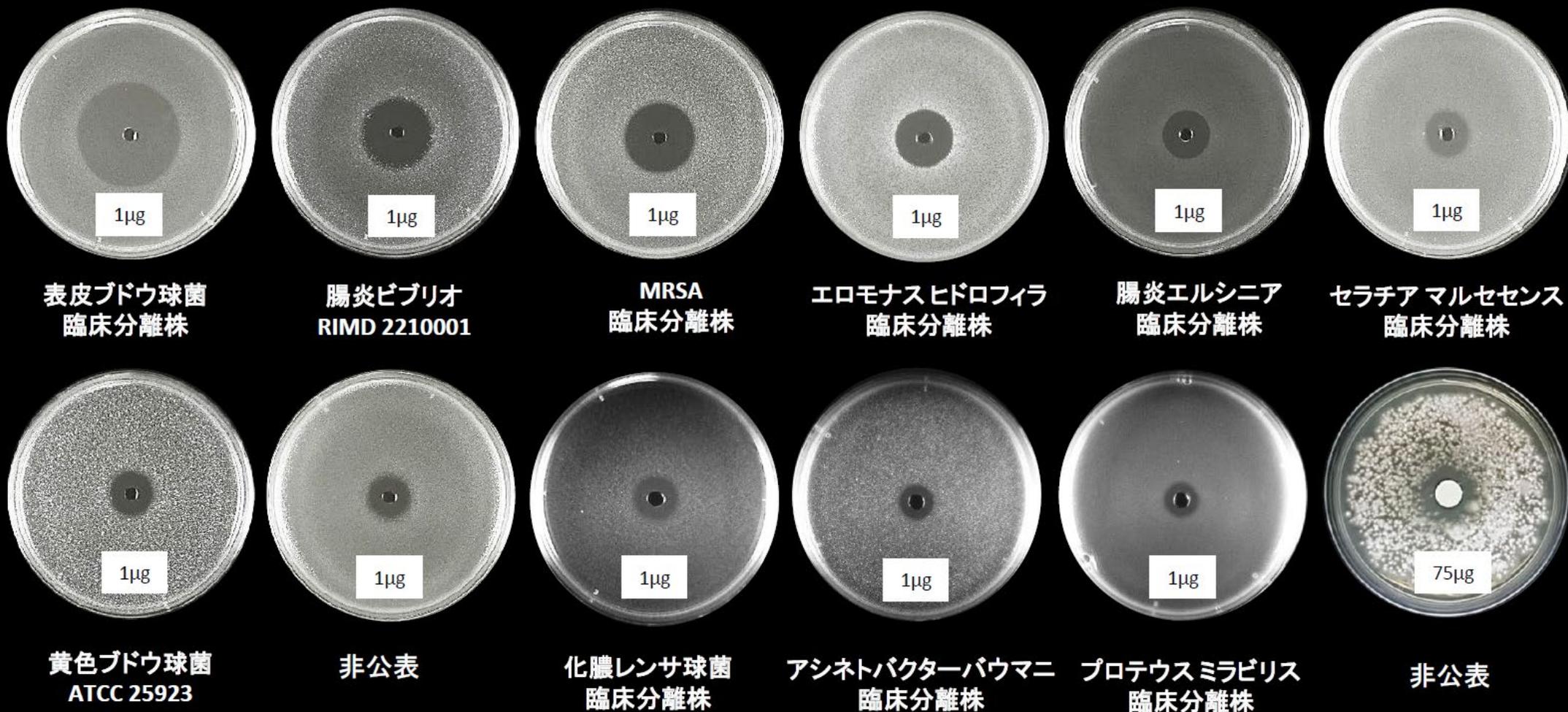
これまでの研究

```
ACAACAGGTGAGAAAGAGGA
GTTTCTCTACGGACTGCTATTGTCTTCTTTCATCAATCATTTGTGATTAATGTTTTTTCCTCCTGCAGCTTTCAGACAAG
ATGGGTGCACATGTGATGAAGTGTGAAATCTATGTTGTGAGTGTGCTGTGTTCAACAATGCCAGAGTCCAGACTGCTGCT
M G A H V M K C E I Y V V S V L L F T M S Q S Q T A A
CTCAGCTTCAGGGCACATCTGTCTGATTGTCTGGAGGACAAAGACTATCAAACGCTGCTGCAGACAGTAGAGAACGGCCTC
L S F R A H L S D C L E D K D Y Q T L L Q T V E N G L
CCGCCAATACACACACCGCCACGCTCATGTTGTTGTTGTTGGAGCTGGCATGGCTGGACTGACGGCGGCAAAGCTGCTGCAG
P P I H T P P R H V V V V G A G M A G L T A A K L L Q
GACCGAGGACACAAGGTGACCATATTAGAAGCTAGTGGTGTGGGAGGACGAGTGGAGACGTCACAGAAATGAGCAAGGC
D A G H K V T I L E A S G R V G G R V E T Y R N E Q G
TGGTACGTTGAATTGGGAGCAATGAGGATCCCATACCCATAAAAATCGTCTCTTCTCGTGGAGTTACTCAAACCTCAA
W Y V E L G A M R I P S T H K I V L F F V E L L K L K
CTCAATGAATTCATCATGACTGACCCCAACACCTTCTACCTGGTCAATGGGATAAAGAAACGGACGTTTGAAGTGAATGCT
L N E F I M T D P N T F Y L V N G I K K R T F E V N A
CACCTGACATCTGGGTATAACCTGGAGGTAACGAGAAAGGGAAGTCGGCCGACGCTGCTACAACAAGCTTTGAAG
H P D I L G Y N L E G N E K G K S A D Q L L Q Q A L K
AAGGTTAATGCTACGTTGAGGAACATGGCTGCTCTGAAGCTCTTAAGAAGTATGACCACACTGTGAAGGAATATCTG
K V N V Y V E E H G C S E A L K K Y D H Y T V K E Y L
AAAACAGAAGGTGGTTTGGCTCAGAAGCCGTGAGGATGATCGGAGACTTGCTCAACGAAGAGAGCCTCATGTACACAGCG
K T E G G L S S E A V R M I G D L L N E E S L M Y T A
CTGACTGAGATCTACGACCAGACTGATATCAGTGACAACGACGCTGACTTTGAAATAACTGGTGGGTCGGACCTTCTC
L T E M I Y A D Q T T D I S D N D V Y F E I T G G S D L L
CCCAACGCTTTACACAACAACTGAAGGCCCTGCTCTCTGAACCTCAGGGTGAAGCGTATCAGCCGCTCAGAGACAGGT
P N A L H K Q L K A P A L L N S R V K R I S R S E T G
GTCTTCATATCGTACCAGAAGACAACAATCCTCTCTGACCGACCTAGAGGCTGACGACGCTGCTGTAACCCACAACC
V F I S Y Q K D K Q S S L T D L E A D A V L V T T T T
AAAGCAGCCCTGTTTCACTGACTTTGATCCACCTCTCCCATTTAAAAGATGGAGGCCCTGAGGGTGGTCCACTATGACAGC
K A A L F I D F D P P L P I K K M E A L R V V H Y D S
TCCACAAAATCATCCTCACCTTCAGTGAGAAGTCTGGGAGAGGGACGGCATCAAAGGAGGGAAGAGCATCACCGACAGG
S T K I I L T F S E K F W E R D G I K G G K S I T D R
CCCTCTCGTTTTTACTACTATTCCAGCCACAGTTTCCAAATCAAGGACATCGGCGTCTCTCGGCTTCTACACCTGGTCT
P S R F I Y Y S S H S F Q I K D I G V L L A S Y T W S
GACGATTCCTCTCTCTTGGAGCGACTGACGAAGACCTGAAAGAGCTGGTTCTGGGAGATTAGCTGCGATCCACGGGA
D D S L L F L G A T D E D L K E L V L G D L A A I H G
GAGTACGTCGGTCTCTGTCACAGGGTGGTGGTGAAGAAGTGGAGCTGGATCCCTACAGCCTGGGCGCCTTCTGCTCTC
E Y V R S L C T G V V V K K W S L D P Y S L G A F A L
TTCACACCTACCAACACCTGGAGTACTCTAAGGAGCTCTTTAAAAGTGAAGGACGCTTCACTTTGCTGGTGAACACACC
F T P Y Q H L E Y S K E L F K S E G R L H F A G E H T
GGCTTCCCTCAGCCTGGATCGAGACAGCTATGAAAATGGAATCAGAGCTGCTACCAGCATCTATAGCAATCTGCTTGT
G F P H A W I E T A M K T G I R A A T S I Y S N L L D
GTCTCCACCAACAAGAGACGAATTCGAGCCATCACATCTGAATAGATCACTATCCTTGTACTTCACTTGTGTTAAGGGAA
V S T Q T R D E F *
ATCTTTATAATTTGTAATCACTTAATTTTTTACATTTATTCATTTGAATGCAGATGTTGACATTTGGGCTTGAATTAGTG
ACTTGTCTGTTTTCTATGCTTTTCTTAATCTGGACACAATCGATGGTGTGTTACGCTTTTATCTGTTACACGGGCT
ACATACATGGAAGATTTTACCTGTTCAAATGTTTCTTTCATATTCTATAAACACAATTAGGGTTAAGTATGTAATCTGA
TTAATTTGAGTGTGCATTAATTTCTATAATTTGAATCCAAAAA
```

- 粘液を加熱すると抗菌活性が消失するため、タンパク質が抗菌物質であると予想
- 粘液から抗菌タンパク質を単離
- アミノ酸配列解析・遺伝子解析を実施完全長遺伝子配列を決定
1566塩基対・522残基
- データベース解析の結果、L-amino acid oxidaseと類似構造
- ヌマガレイの学名からpsLAAO1と命名

魚の粘液に含まれる抗菌タンパク質

- 様々な病原性微生物に対して強い抗菌作用を示す



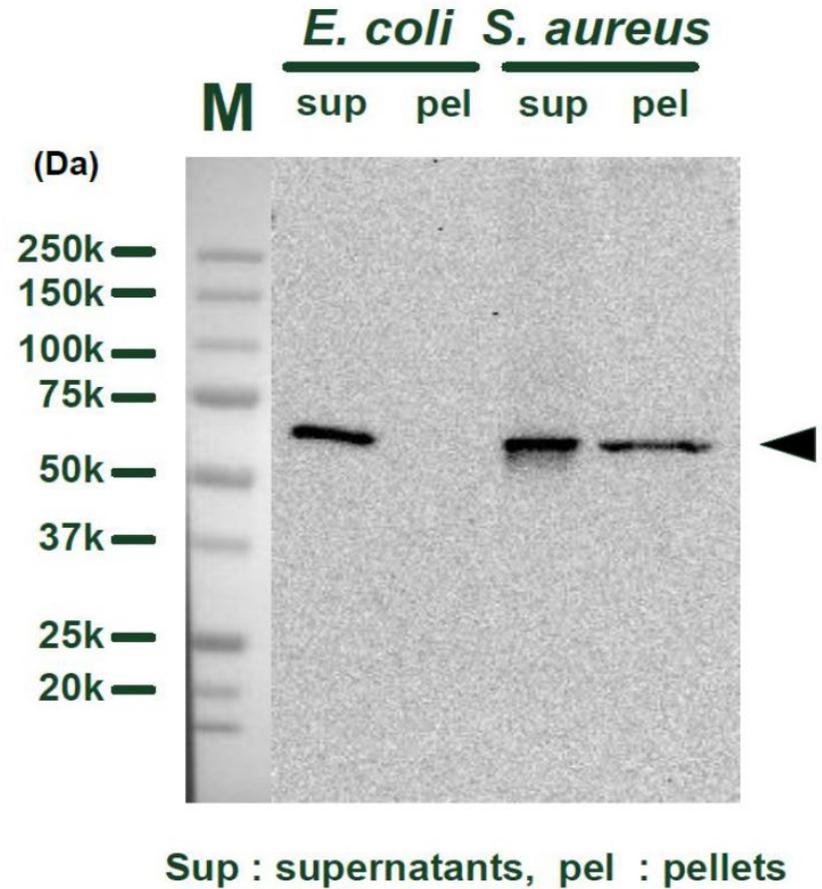
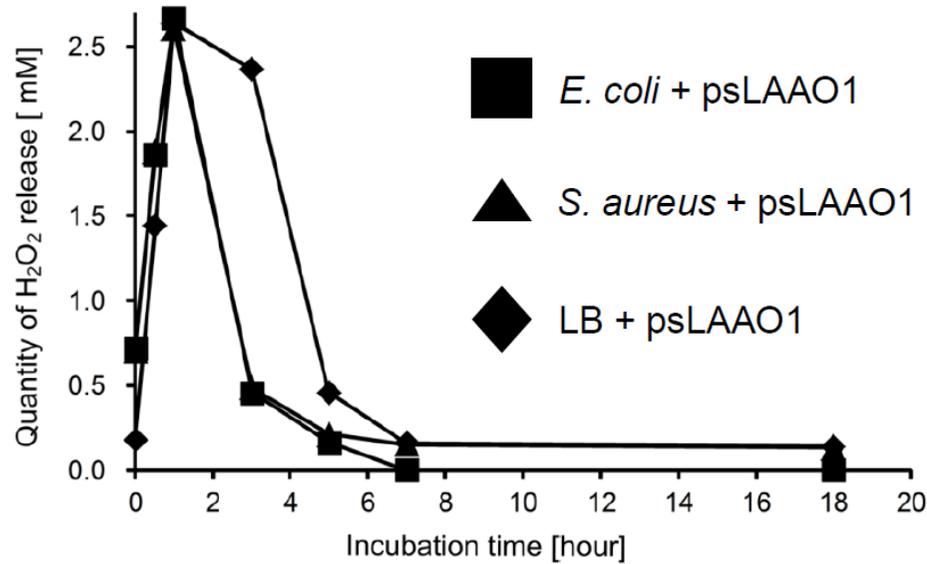
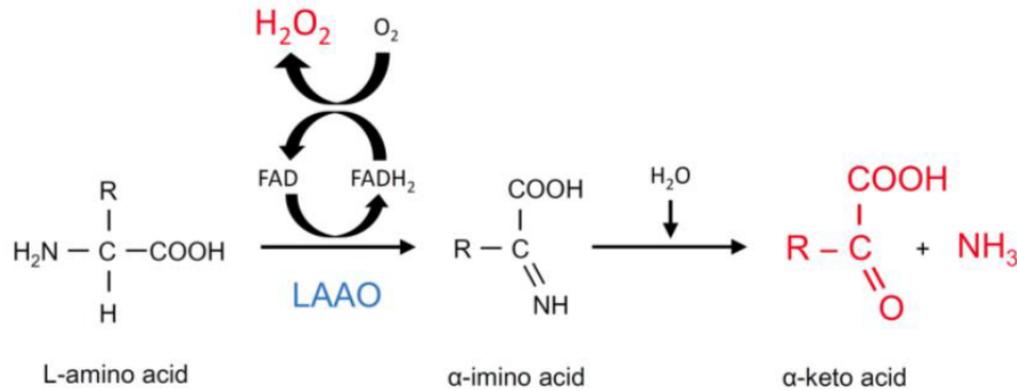
発育阻止帯形成試験（寒天内拡散法）60mm シャーレ、菌量： 1×10^6 CFU/mL、穴直径：3.4mm *ディスク法

最小発育阻止濃度(MIC) 単位: $\mu\text{g/mL}$

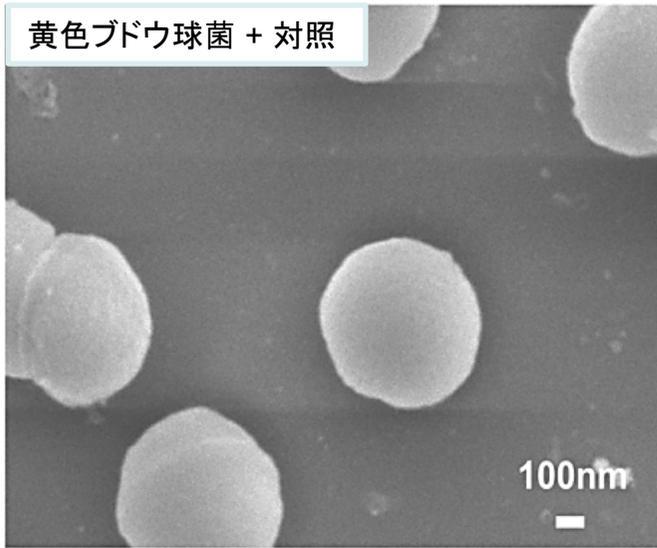
	本物質	ペプチド系抗生物質			非ペプチド系抗生物質			抗菌ペプチド				
	psLAAO1	Polymyxin B	Teicoplanin	Vancomycin	Ampicillin	Doripenem	Ciprofloxacin	β -Defensin 1	β -Defensin 3	SMAP29	HNP-1	LL-37
表皮ブドウ球菌	0.078	12.5	0.10 - 3.13	0.78	0.39	0.016	0.39	-	-	0.5	-	56
黄色ブドウ球菌	0.63	12.5 - 50	0.05 - 0.78	0.39 - 0.78	0.05	0.016	0.1 - 0.2	1	0.5	2.5	0.5	>32
M R S A	0.31	-	0.10 - 0.78	0.78	125	-	>100	0.5	25	-	2.5	3
大腸菌	>80	3.13	-	>100	2.5 - 5	0.016	0.006 - 0.025	8	0.5	2.8	2	30
腸炎ビブリオ	0.16	-	-	-	-	-	0.03 - 0.121	-	-	-	-	-
腸炎エルシニア	1.25	-	-	-	-	0.063	-	-	-	-	-	-
文献・参考資料	<u>Kasai 2015</u>	*	*	*	*	*	*	<u>Bolatchiev 2020</u>	<u>Bolatchiev 2020</u>	<u>Shin 2001</u>	<u>Bolatchiev 2020</u>	<u>Turner 1998</u>

* Yamaguchi et al. Nationwide surveillance of parenteral antibiotics containing meropenem activities against clinically isolated strains in 2006 Jpn. J. Antibiotics 60(6) 344-377 (2007),

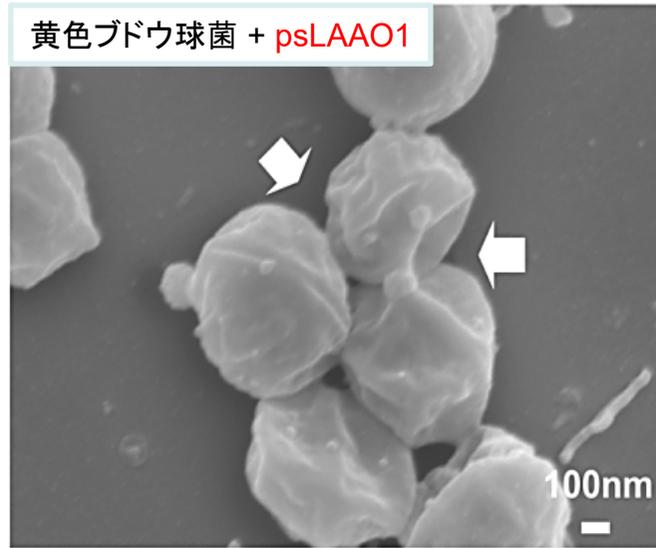
抗菌メカニズム



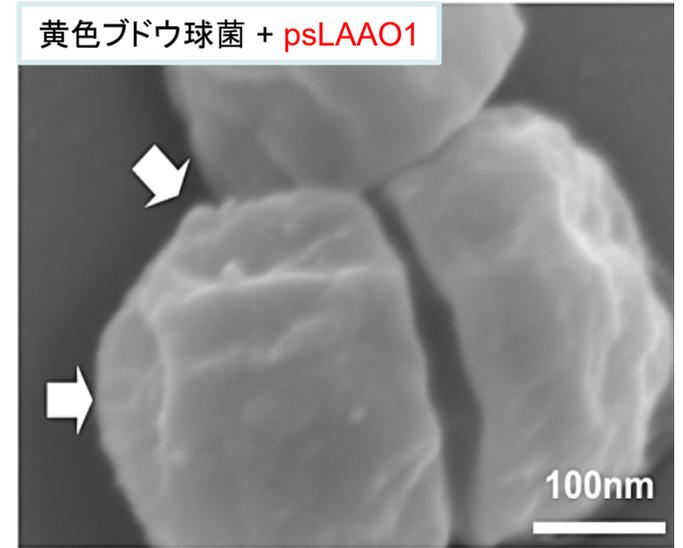
走査型電子顕微鏡像



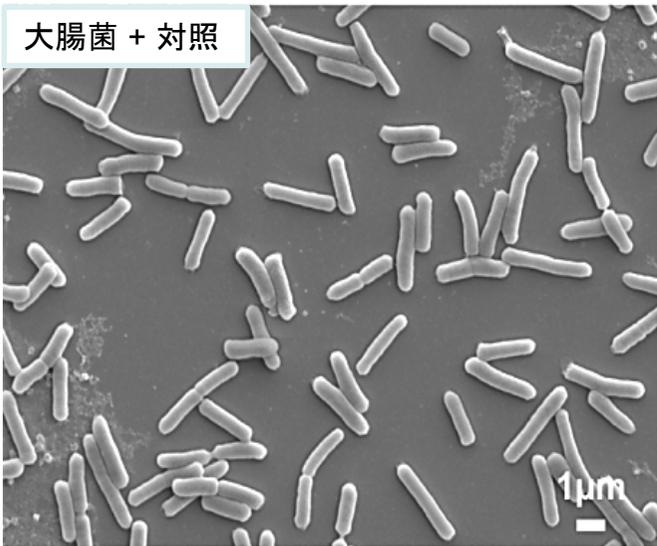
X 40,000



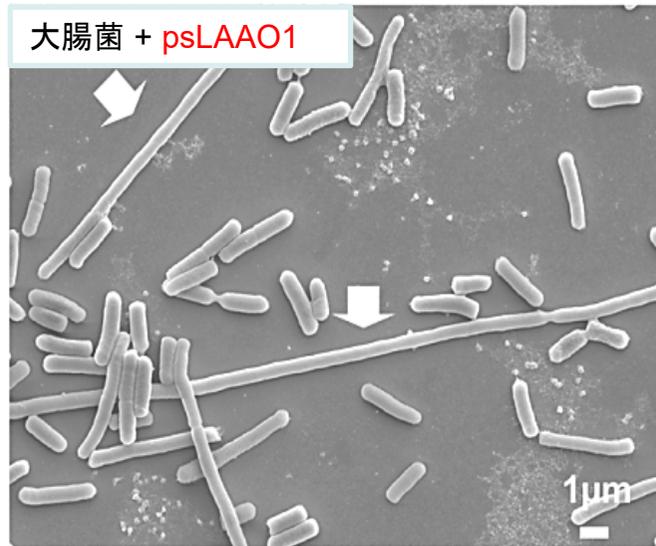
X 40,000



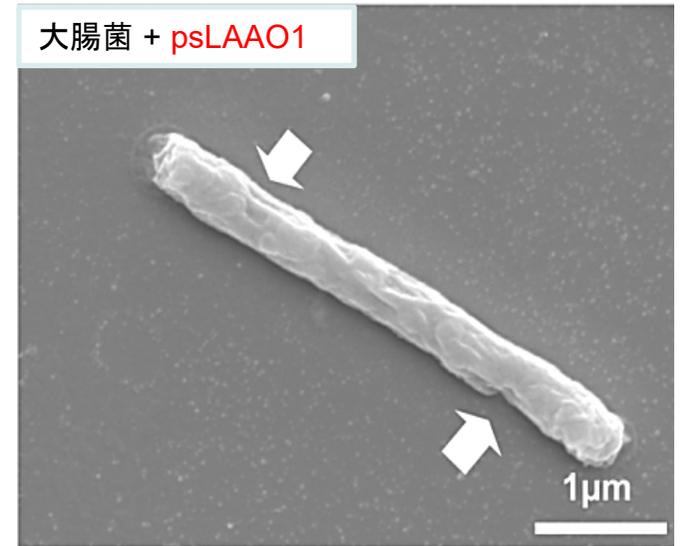
X 100,000



X 5,000



X 5,000

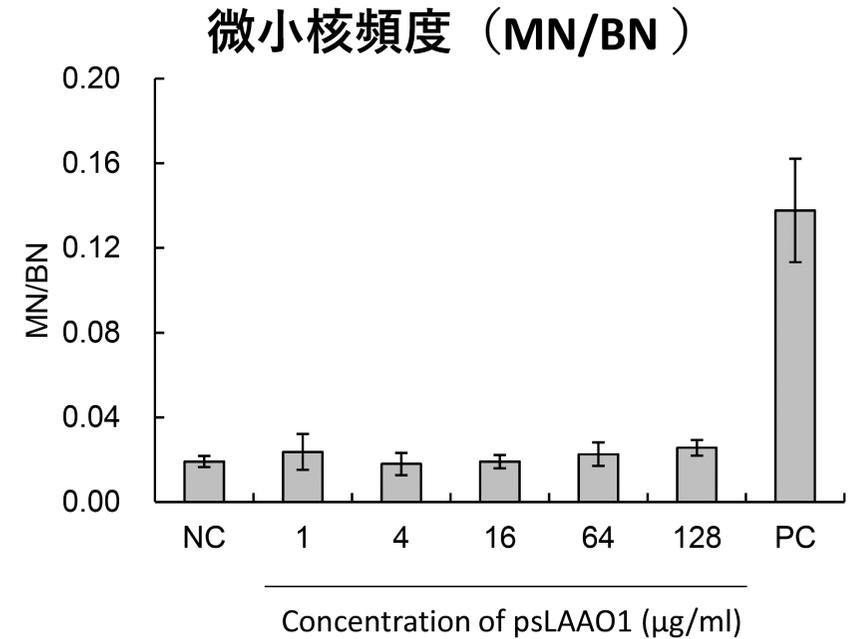
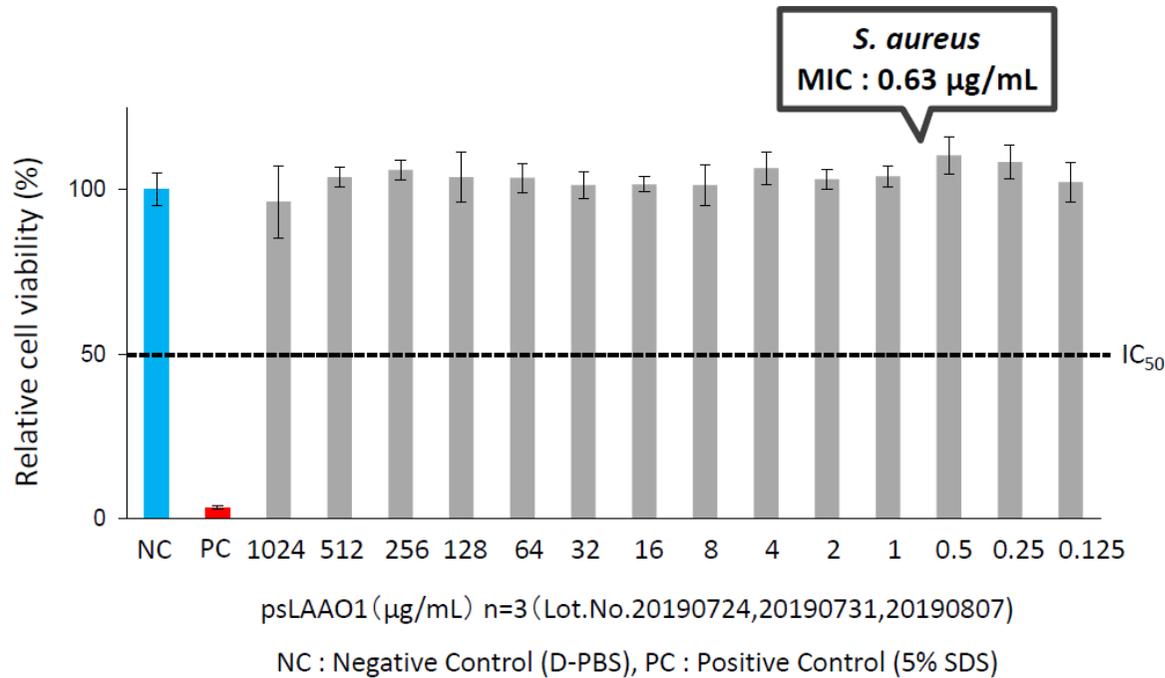


X 25,000

細胞毒性試験(動物実験の代替手法)

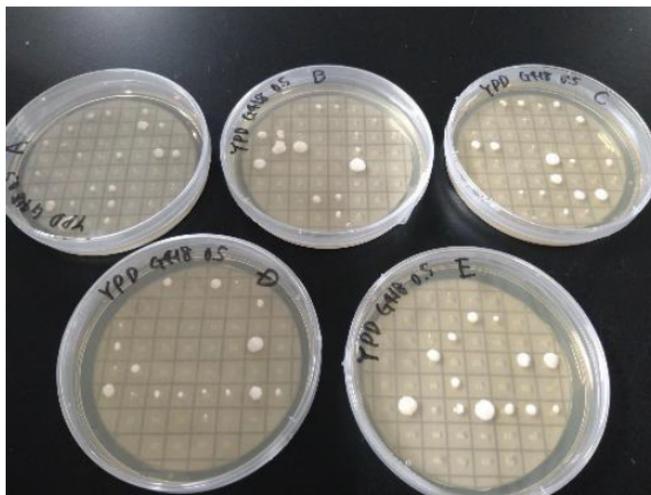
正常皮膚三次元組織モデル

チャイニーズハムスター卵巣細胞



NC: negative control (vehicle)
PC: positive control (200 ng/ml MMC)
Mean ± 95% CI

合成方法(従来技術)



メタノール資化酵母
(*Pichia pastoris*)

酵母ゲノムに抗菌タンパク質の遺伝子を導入



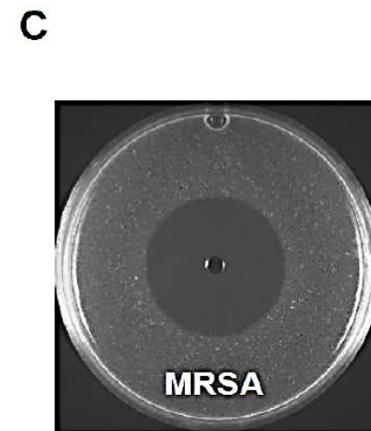
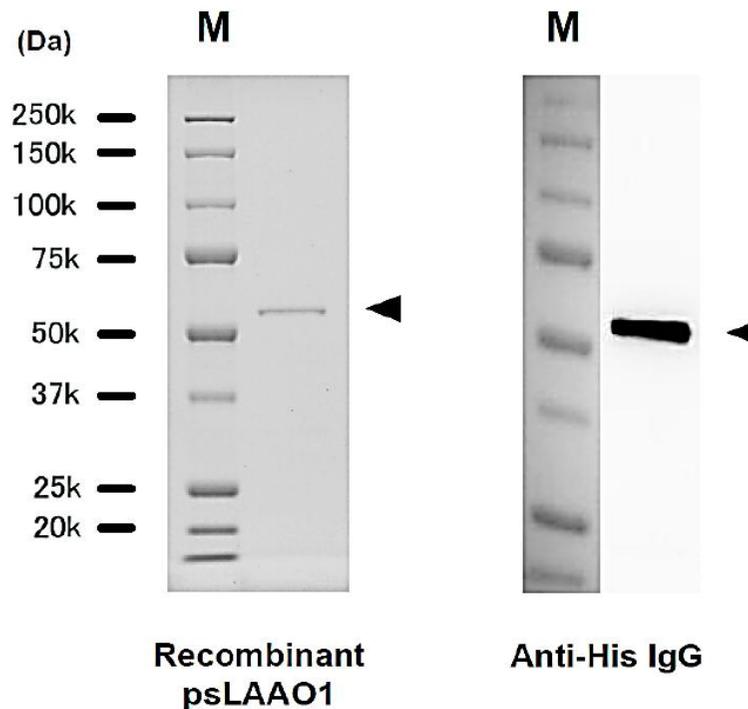
組換え酵母を作製
(保存)



前培養・発現誘導
(6日間)



カラム精製
(1.5日)



Antibacterial assay

約1週間

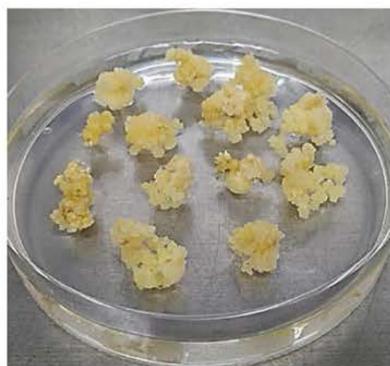
合成方法(新技術)



① イネ種子



② カルス誘導



③ イネカルス



④ アグロバクテリウム感染



⑤ 培養・遺伝子挿入



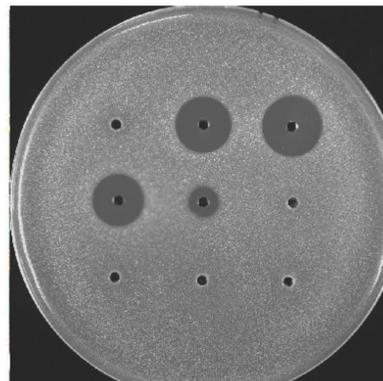
⑥ 薬剤耐性カルス選抜



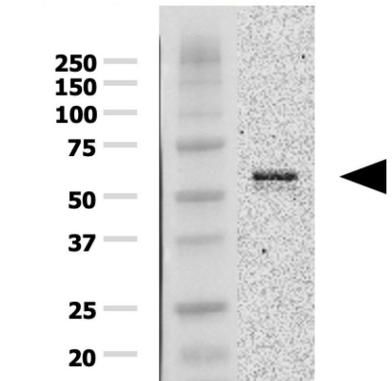
⑦ 選抜カルス



⑧ 破碎



⑨ 抗菌試験 (MRSA)



⑩ ウエスタンブロット

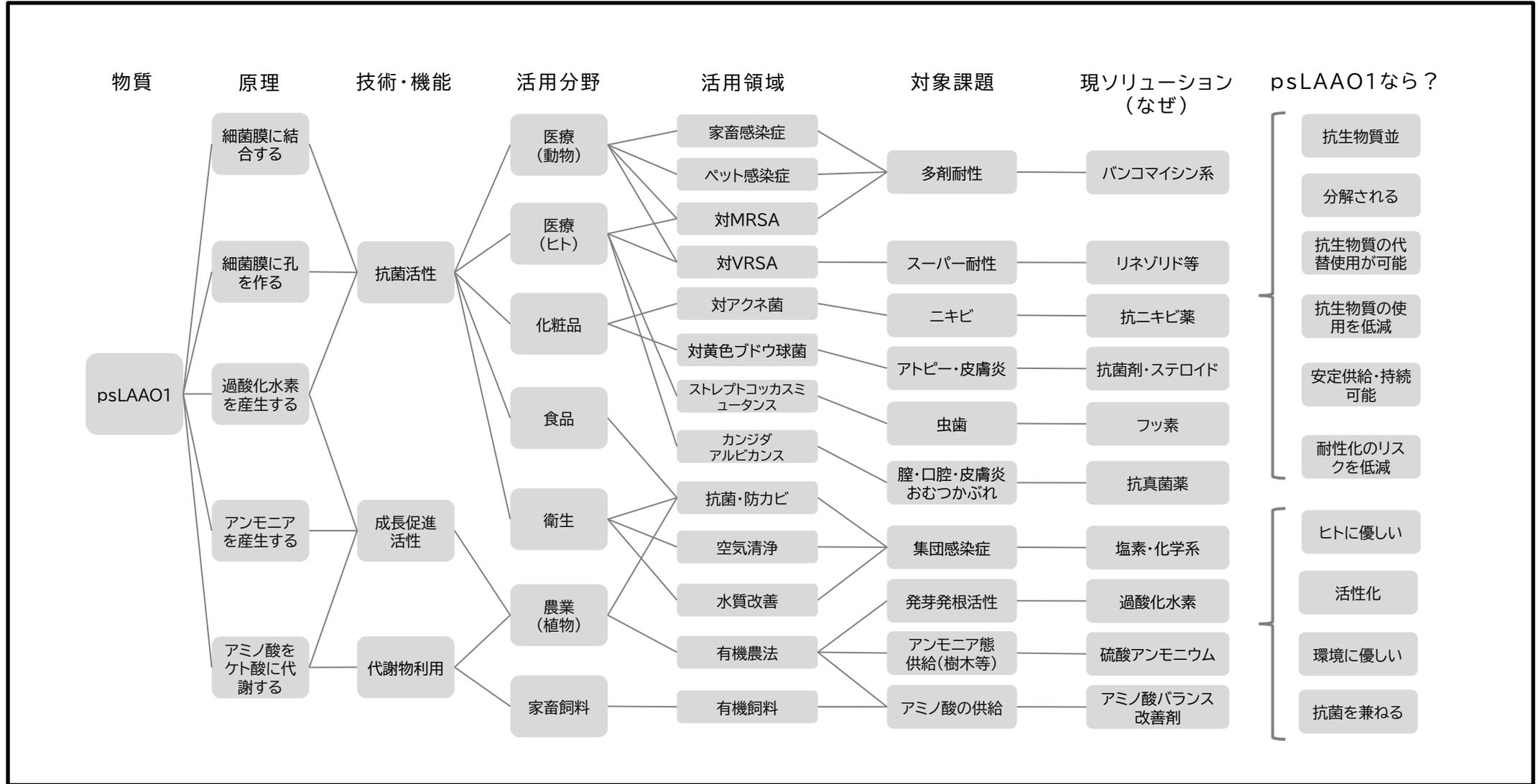
- カルスを液体中で破碎するだけで、抗菌タンパク質が取れる
- バクテリアを使った方法の1/100のコストで合成が可能
- イネカルスで合成する方法で特許申請(特願2024-218818)

新技術の特徴・従来技術の比較

- 魚の粘液由来天然抗菌成分を植物で大量生産が可能
- 酵母1Lと同等の合成収量で1/100のコスト低減が可能
- 巨大プラントが必要なく製造ラインのスマール化が可能
- 気候変動に影響がなく安定供給が可能
- 乱獲による生態系破壊がない



想定される用途(アイディエーション)



想定される製品：抗生物質の代替使用

- 化粧品(医薬部外品)：ローション・化粧水・乳液・パック・パッチ
- 医薬品：外用剤・パッチ
- ペット用品：外用剤・パッチ 家畜飼料：給餌配合
- 介護用資材：褥瘡・汗ふき・カテーテル洗浄
- アンモニア肥料・バイオ燃料(過酸化水素)



実用化に向けた課題

- タンパク質合成について次世代種子(トランスジェニック第2世代)から回収が可能なところまで確認済みであり、企業ニーズに応じたサンプル試験の実施が必要。
- 大量生産に向けた量産化方法の検討を行い、更なる低コスト化を目指す。

企業への期待

- 新規の抗菌成分を探索している企業との共同研究を希望。
- 植物工場や製品化の技術を持つ企業との共同研究を希望。
- アグリ分野への応用として、農薬事業等を実施している企業との共同研究を希望

企業への貢献、PRポイント

- 本技術を使って製造する抗菌タンパク質は、抗生物質の代替が可能のため、安価に量産することでより抗生物質の使用量削減に貢献できる。
- 本技術の導入にあたり必要な安全性実験を行うことで科学的な裏付けが可能。
- 本格導入にあたっての植物栽培の技術指導等が可能

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称 : ヌマガレイL-アミノ酸オキシダーゼを発現する形質
転換植物
- ・ 出願番号 : 特願2024-218818
- ・ 出願人 : 国立大学法人弘前大学
- ・ 発明者 : 葛西宏介

産学連携の経歴

- 2013年-2014年 JST A-STEP事業探索タイプに採択
- 2019年-2020年 JST A-STEP事業機能検証フェーズに採択
- 2019年-2020年 化粧品関連企業と共同研究実施
- 2020年-2021年 JST A-STEP事業トライアウトタイプに採択
- 2021年- 化粧品・食品原料企業と共同研究実施
- 2024年-2025年 JST START事業 みちのくアカデミア発スタートアップ共創プラットフォームGapファンド獲得

お問い合わせ先

**国立大学法人弘前大学
研究・イノベーション推進機構
産学官連携相談窓口**

TEL: 0172-39-3176

FAX: 0172-39-3921

e-mail: ura@hirosaki-u.ac.jp