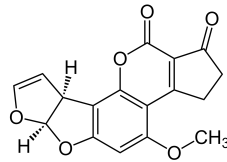


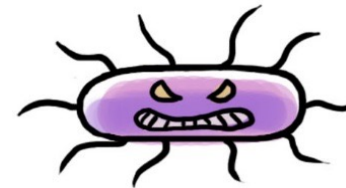
食中毒から生活者を解放する 人工抗体提示パトロール酵母



カビ毒



パトロール酵母



食中毒菌



ノロウイルス

三宅真央(画)

東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所
教授 上田 宏

2021年5月28日

背景

- 食の安全は消費者と食品業界の大きな関心事
- 近年HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)に沿った管理が食品衛生法で制度化
- 食品事業者が普通に使用できる迅速簡便安価な衛生管理技術の確立が喫緊の課題
- 大前提として、COVID-19をはじめとする感染症の簡便迅速な診断技術も求められている



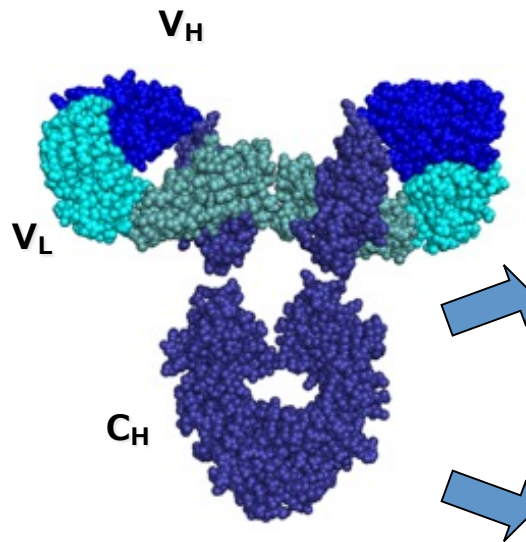
食品および環境中の病原性細菌、ウィルス、毒素などの危険物質を高感度に検出可能な”**パトロール酵母**”

従来技術とその問題点

- 既に実用化されている食品検査には、ホタル発光酵素によるATP検出法等があるが、
 - 微生物の有無のみが判定可能
 - 抗原の種類は見分けられない
 - 食品そのものの検査は難しい等の問題があった。
- また、ELISA法などの抗原検査法は手技と時間を必要とし、一般人には扱えなかった。

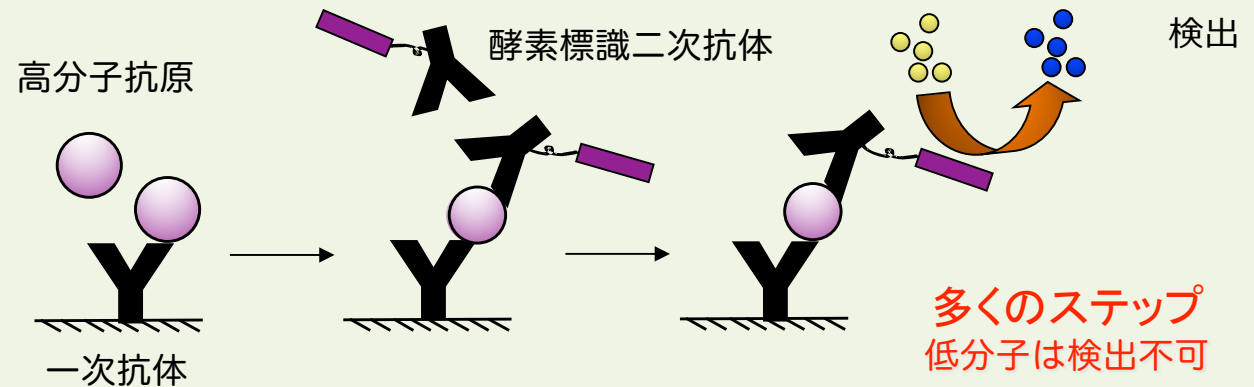
従来の免疫測定法

抗体 Antibody (Ab)

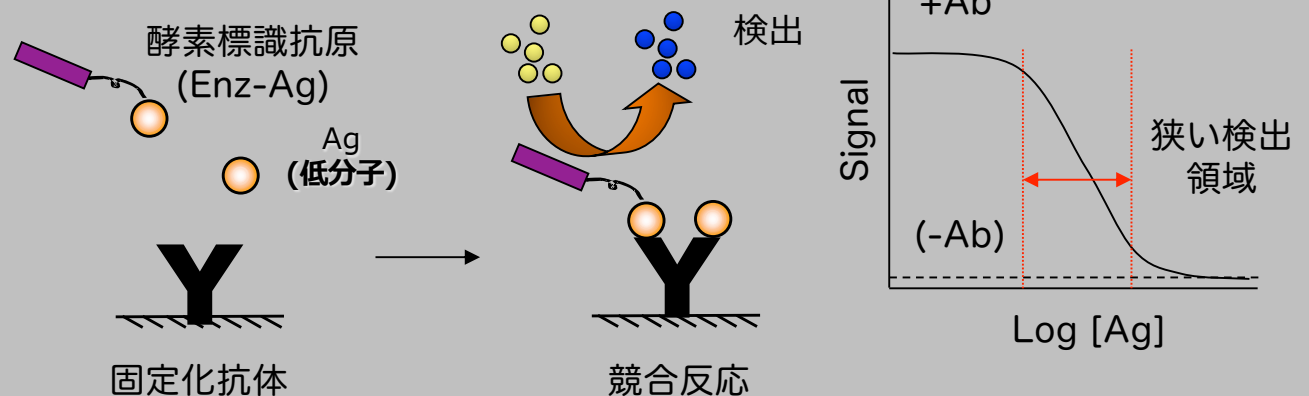


V_H : H鎖 可変(V)領域
 V_L : L鎖 可変(V)領域
 C_H : H鎖 定常(C)領域
 C_L : L鎖 定常(C)領域

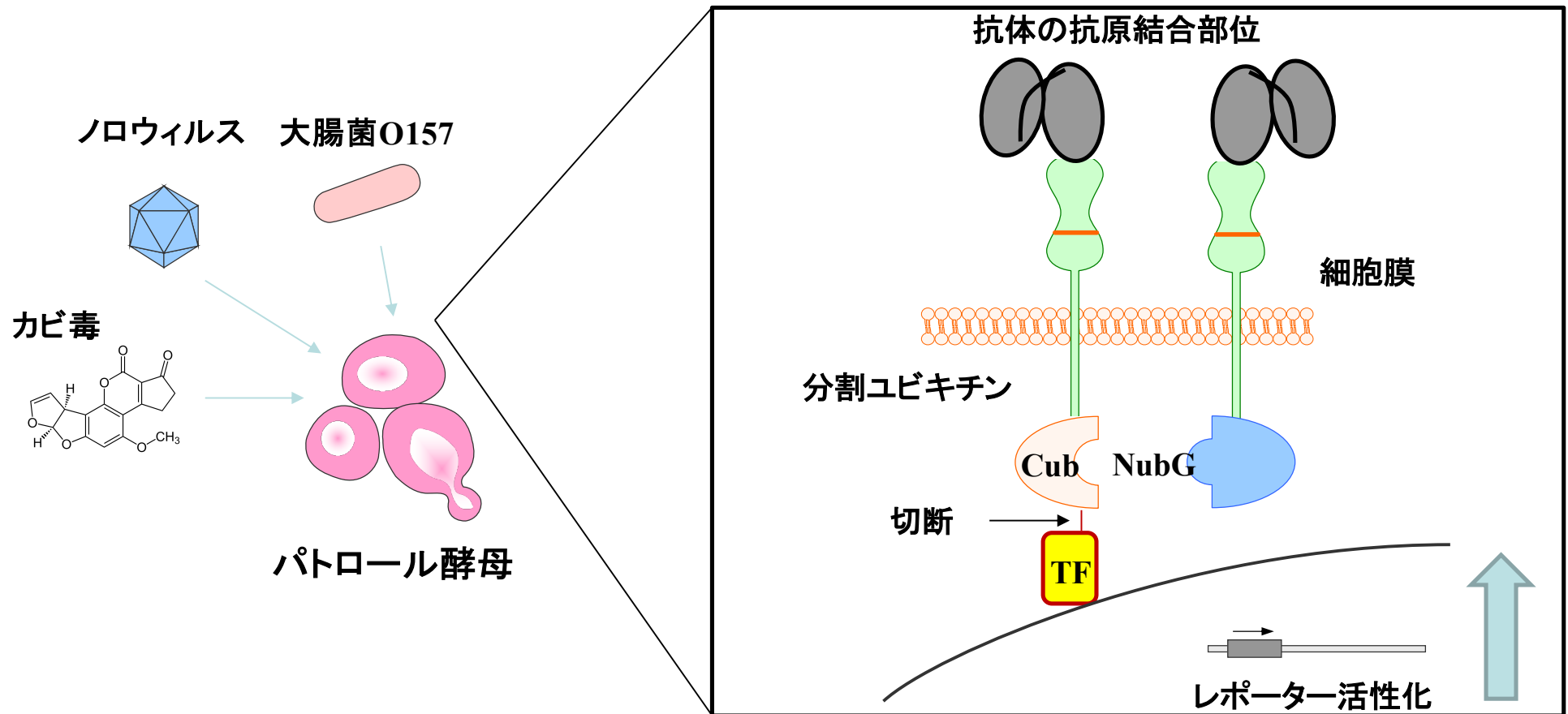
サンドイッチ酵素免疫測定 (ELISA)



競合ELISA



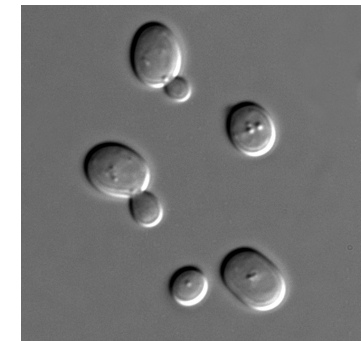
パトロール酵母とは？



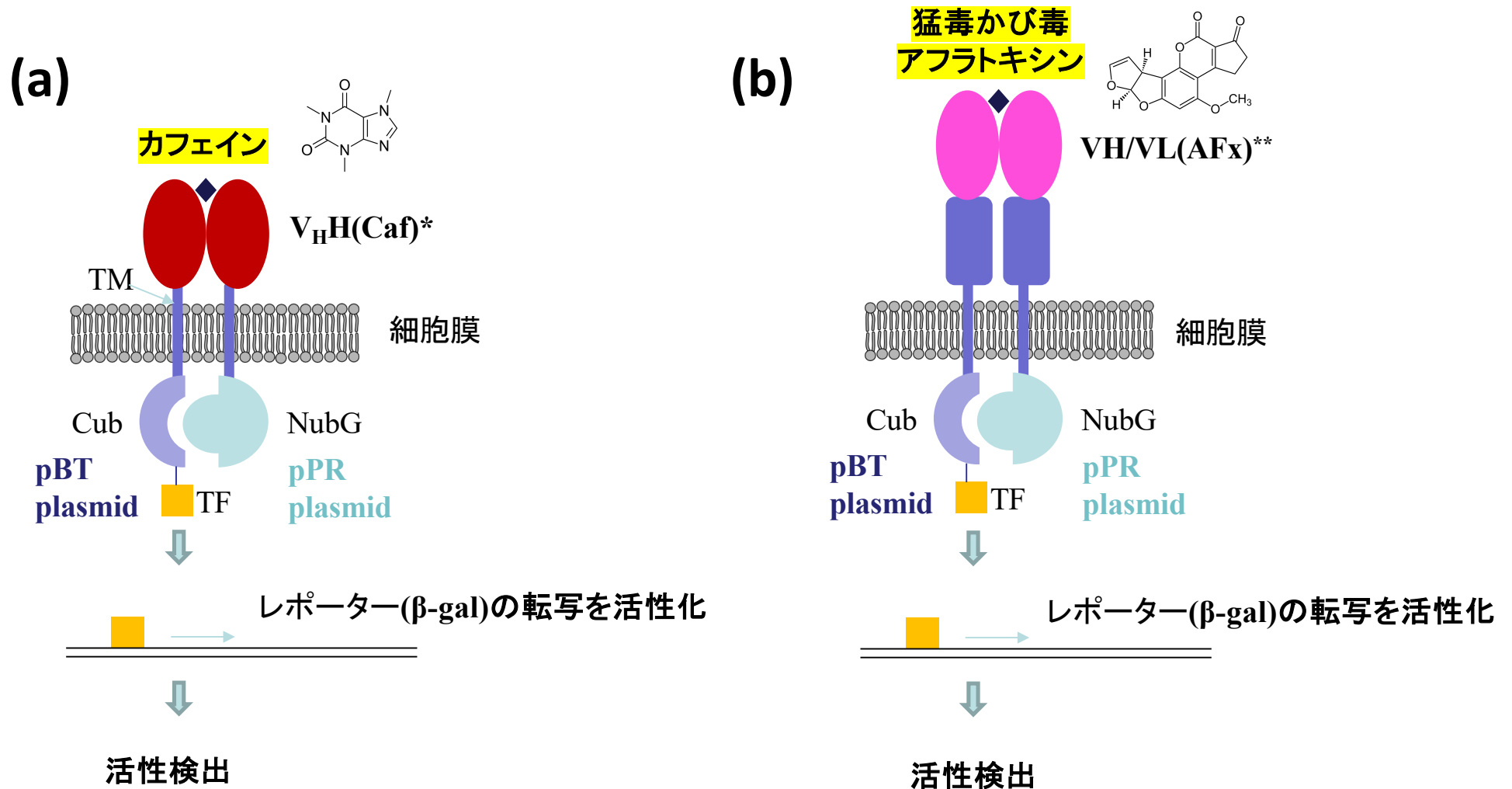
酵母細胞外からの信号を細胞内信号伝達系で増幅し、高感度化

なぜ パトロール “酵母”なのか？

- 安全なモデル生物にも関わらず、これまで生きた酵母を免疫センサー化した報告例はない
- 強固な細胞壁のため、細胞膜に抗体を提示しても菌体やウィルスタンパク質などの高分子の検出は不可能と考えられてきた
- 我々は、細胞壁の部分的なプロトプラスト化により、この“壁”を破ることに成功した(世界初)。
- すなわち、酵母の安定さ、使いやすさを維持しつつ応用範囲の広い機能化に成功した。



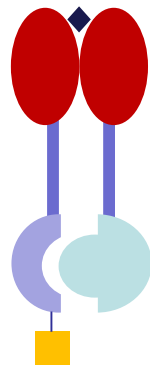
低分子認識パトロール酵母の構築



* Sonneson, G.J. & Horn, J.R. *Biochem.* **48**, 6693 (2009)

** 麻布大学 小西教授らによりクローン取得

カフェイン検出系



論文発表準備中

LOD = 24 nM Caffeine in *Coca cola*: 493 μ M

実用的感度でのカフェイン検出に成功

Grow yeast cells
with/without
caffeine



Extract cells



Mix cell extract with
 β -gal substrate

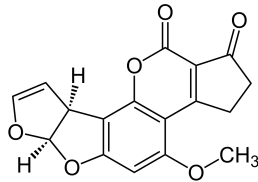


Luminescence
measurement

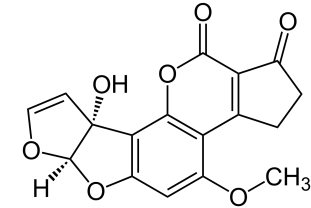


アフラトキシン(AFx)検出系

Aflatoxin B1



Aflatoxin M1



論文発表準備中

LOD = 3 pM

Worldwide regulations:

3-64 nM in food

16-160 nM in cow feed

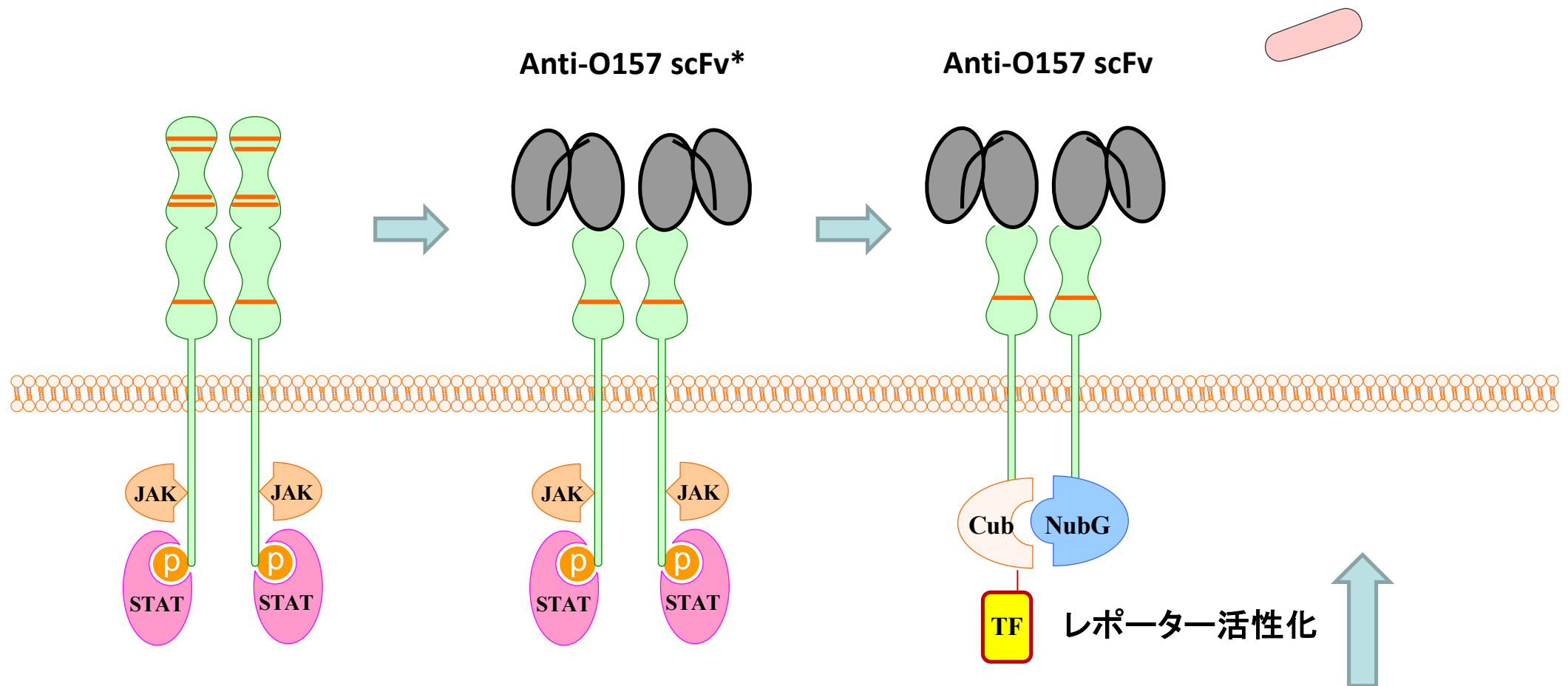
LOD = 33 pM

EU regulation: 0.15 nM

Toxic dose: 150 nM

AFxの超高感度検出に成功

高分子認識パトロール酵母の構築



*麻布大学 三宅教授・神戸薬科大学小林典裕教授ら

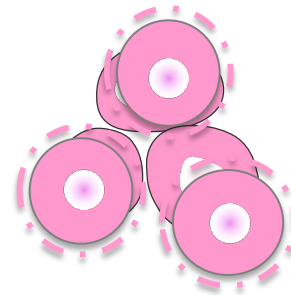
細胞壁の除去 (プロトプラスト化)

酵母細胞壁溶解酵素 Zymolyase[®] (ザイモリエイス[®])



© Nakalai-Tesque

Zymolyase処理の最適化により, 最大信号が得られる条件を検討した.
(Time, Temp., Conc.)



条件① / 条件②

腸管出血性大腸菌O157の検出

論文発表準備中

高い活性と少ない誤差でO157を検出できた

腸管出血性大腸菌O157の検出

論文発表準備中

高い活性と少ない誤差でO157の特異的検出に成功した

分泌発光レポーターによる検出

分泌型ルシフェラーゼをつかったレポーターアッセイシステム

CLuc
Secreted Luciferase
Reporter Assay Kit
for Mammal
for Yeast

ウミホタル・ルシフェリン + O₂ → オキシルシフェリン + CO₂ + Blue Light (λ_{max} = 460nm)

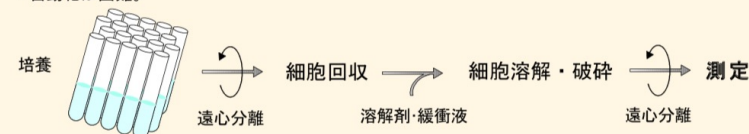
Cypridina-ルシフェラーゼ

Cypridina noctiluca

CLucタンパク質はウミホタル由来です
写真は Cypridina noctiluca です。

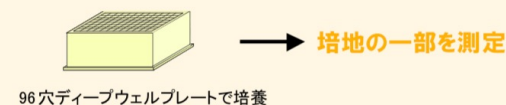
ハイスループット測定に対応（酵母）

- 従来の方法(β ガラクトシダーゼ(β -gal)、ホタルルシフェラーゼ)では・・・
- ・測定の手続きが多い。
- ・自動化が困難。



●CLucでは・・・

- ・培地のまま測定可能。
- ・96wellフォーマットに対応し、分注ロボットによるハイスループット化が可能。



論文発表準備中

カフェインの細胞破壊なしでの検出に成功！

結果のまとめ

① 低分子検出用Patrol Yeast

- ✓ Nanobodyを用いて、カフェインの実用的感度での検出に成功
- ✓ 抗体 V_H/V_L を用いて、カビ毒**AFB1/M1**の超高感度検出に成功

② 高分子検出用Patrol Yeast

- ✓ 抗原とPatrol Yeastを低濃度の**Zymolyase**存在下で反応させることで、大腸菌**O157**の特異的かつ高感度な検出に成功



適切な抗体が取得できればパトロール酵母を構築可能

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来のELISAキットは高価で測定に手間と時間を要する。
- 安全なモデル生物である酵母を免疫センサー化し、安価な製造を可能にした。
- 一度作るとランニングコスト数百円/日。
- 分泌発光レポーターによる簡便な計測が可能

想定される用途

- 本技術は、例えば食品製造ラインのモニタリングに適用することで腸管出血性大腸菌やかび毒に対する安全検査を低コスト化できるメリットが大きいと考えられる。
- 将来的には菌をカセット化し、店舗での利用も
- 上記以外に、例えば下水中のウィルス検査などに適用可能な、簡便な抗原検査システムが構築できることも期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、カフェイン，アフラトキシンと大腸菌 O157 検出系を開発済み。他の腸管出血性大腸菌・ノロウィルス検出系は未着手。
- 今後、分泌性レポーターを用いた検出系についてさらに実験データを取得し、食品検査に適用していく場合の条件最適化が必要。
- 実用化に向けて、組換え酵母細胞を系外に漏らさない技術を確立する必要がある。

企業への期待

- 検出条件の最適化のため、発酵技術を持つ食品企業等との共同研究を希望。
- また、検査技術を開発中の企業、ウィルス検出等の医療診断分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：抗体断片を含む人工受容体を細胞膜に提示した酵母とこれを用いた抗原検出法
- 出願番号：特願2020-145870
- 出願人：東京工業大学，麻布大学，神戸薬科大学
- 発明者：上田 宏，北口哲也，蘇九龍
三宅司郎，小林典裕

産学連携の経歴

- 2006年-2009年 東京大学にて富士フイルム寄付講座
- 2008年-2011年 都市エリア(千葉東葛)事業に参画
(P社と共同研究)
- 2013年-2017年 ウシオ電機と蛍光免疫測定素子
Q-bodyについて共同研究実施

お問い合わせ先

**東京工業大学
研究・産学連携本部**

TEL 03-5734-3817

FAX 03-5734-2482

e-mail sangaku@sangaku.titech.ac.jp