

福井特産物の再生医療への利用

事業責任者： 寺田 聡 (工学研究科・准教授)

代表学生： 奥本 光軌 (工学研究科・博士前期課程 1 年)

概 要	
	<p>現在の急速なバイオテクノロジー技術の発展を承け、動物細胞培養や、酵素を代表とする生体高分子を利用した産業開発が進んでいる。そこで、本事業では、これら分野に、福井の特産物である絹由来のセリシンやラクキョウ多糖フルクタンなどを活用しようとして、次の活動を行った。</p> <p>(1) 技術講習会の開催 再生医療などに福井産物を利用したい人に対し、基礎的な技術を伝授した。また、下記の調査研究の成果を報告した。</p> <p>(2) 調査研究 細胞培養について、現状を調査研究した。</p> <p>(3) 開発研究 実際に、福井の特産物を利用して、研究開発を実施した。</p>
関連キーワード	セリシン、フルクタン、再生医療、酵素、細胞凍結保存

事業の背景および目的

バイオ関連領域では、技術が大いに進歩した結果、これまで実施できなかった多くの新しい技術が発展しつつある。とくに細胞の分化誘導の技術が進んだ結果、幹細胞を基盤とした再生医療が注目されている。これは、幹細胞を大量に培養／増幅し、その後に目的の細胞に分化誘導し、患者の欠損した組織と置き換えるもので、特に iPS 細胞に関して、大いに期待されている。これ以外にも、生体高分子を用いたセンシングや治療薬としての利用などが注目されており、とくに酵素が有用である。

そのような背景の中で、われわれは、これら分野に福井特産品を利用し、これら分野の発展を実現するとともに、福井地域の産業強化に貢献しようと考えた。すなわち、細胞培養の培地には牛血清など哺乳動物由来因子が利用されているが、人畜共通感染症が懸念される。そのため、哺乳動物以外の、植物や昆虫、水産物などを利用した細胞培養技術が期待されている。また、酵素など生体高分子の活用もなされているが、タンパク質などは不安定で失活しやすく、その安定化を高めることが期待されている。そこで、本グループでは、細胞培養や生体高分子の安定化に、福井の特産物を活用しようと考えた。

事業の内容および成果

細胞培養や生体高分子の安定化に、福井の特産物である絹由来のセリシンやラクキョウ多糖フルクタンなどを活用しようとして、次の活動を行った。

(1) 技術講習会の開催

地域内で、再生医療や酵素応用に際して、福井の産物を利用したいと考えている人に対して、細胞培養方法など基礎的な技術を伝授した。また、下記の調査研究の報告を行った。

(2) 調査研究

細胞培養について、現状を調査研究した。具体的には、岐阜県で開催されたセミナーと、札幌で開催された学会に参加した。

(3) 開発研究

実際に、福井の特産物を利用して、細胞培養や生体高分子の安定化に寄与できるか実験を行い、検証を行った。以下、生体分子の安定化についての検討を示す。

開発研究の成果

【緒言】

酵素は独自の立体構造を持ち、加熱や pH などさまざまな要因により構造が破壊され、活性が損なわれる。これを防ぐために牛血清アルブミン（以下、BSA）などが酵素安定化剤として添加されることが多い。酵素は多様な領域で使用されているおり、特に臨床検査の診断薬として広く利用されている。しかしながら、BSA は人獣共通感染症のリスクがあり、医療機関では利用が制限される。そこで、BSA に代わる酵素安定化剤として、ラッキョウから得られる多糖フルクタンの利用を考えた。フルクタンは水に易溶で、取り扱いが容易である。すでに二糖のトレハロースに酵素保護効果が知られており、同じ糖類であることから有効性を期待した。本研究では、酵素を加熱あるいは酸性条件にさらす際にフルクタンが共存した場合、これら変性から酵素を保護し、活性を持続させることができるか検討した。

【実験方法の概要】

フルクタンの酵素保護作用については、次のように検討した。HRP (Peroxidase, from Horseradish, Wako) を、恒温層で加熱あるいは酸性緩衝液中で 10 分間処理し、変性させた。処理に際し、酵素溶液中にフルクタンを共存させ、冷却/あるいは中性に戻した後に酵素活性を測定することで、保護効果を評価した。酵素活性は OPD (o-Phenylenediamine, Wako) と過酸化水素を含む基質溶液で酵素反応させ、490 nm の吸光度で評価した。

リパーゼに対するフルクタンの阻害作用は、次のように検討した。ヒゲカビ由来のリパーゼ (Wako) を用い、4-MUO (4-methyl umbelliferyl oleate, Wako) の加水分解反応における蛍光強度 (Ex = 360 nm、Em = 460 nm) を測定することで活性を評価した。

【検討 1 HRP に対するフルクタンの保護効果：加熱】

図 1 のように、55℃ と 60℃ の加熱に際しフルクタンを共存させることで V_{max} の低下が抑制され、HRP に対して保護効果を示した。また 65℃ の加熱でもフルクタンの保護作用は認められたが、70℃ での失活はほとんど抑制できなかった。

【検討 2 HRP に対するフルクタンの保護効果：酸変性】

図 2 のように、pH 2 で処理すると HRP の残存活性は 40% になるが、フルクタンの共存で活性低下が抑制され、56% の活性を維持していた。

【検討 3 フルクタンのリパーゼに対する阻害】

Lineweaver-Burk の逆数プロットに基づいて K_m や V_{max} を求めたところ、 V_{max} は阻害剤フルクタンの濃度に比例し、さらにその K_m/V_{max} の値は、フルクタンの濃度によらずほぼ等しかった。このことから阻害は「不競合阻害」と考えられる。

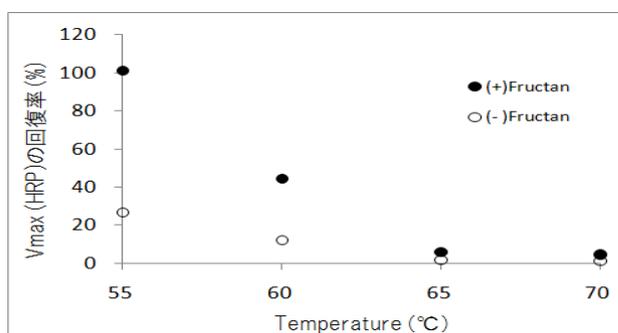


図 1. フルクタンによる HRP の V_{max} の回復率

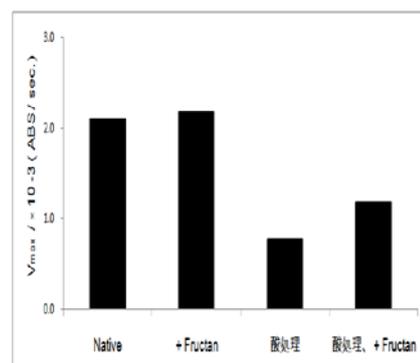


図 2. pH 2 でのフルクタンの HRP の活性保護