

研究アイデアの概要

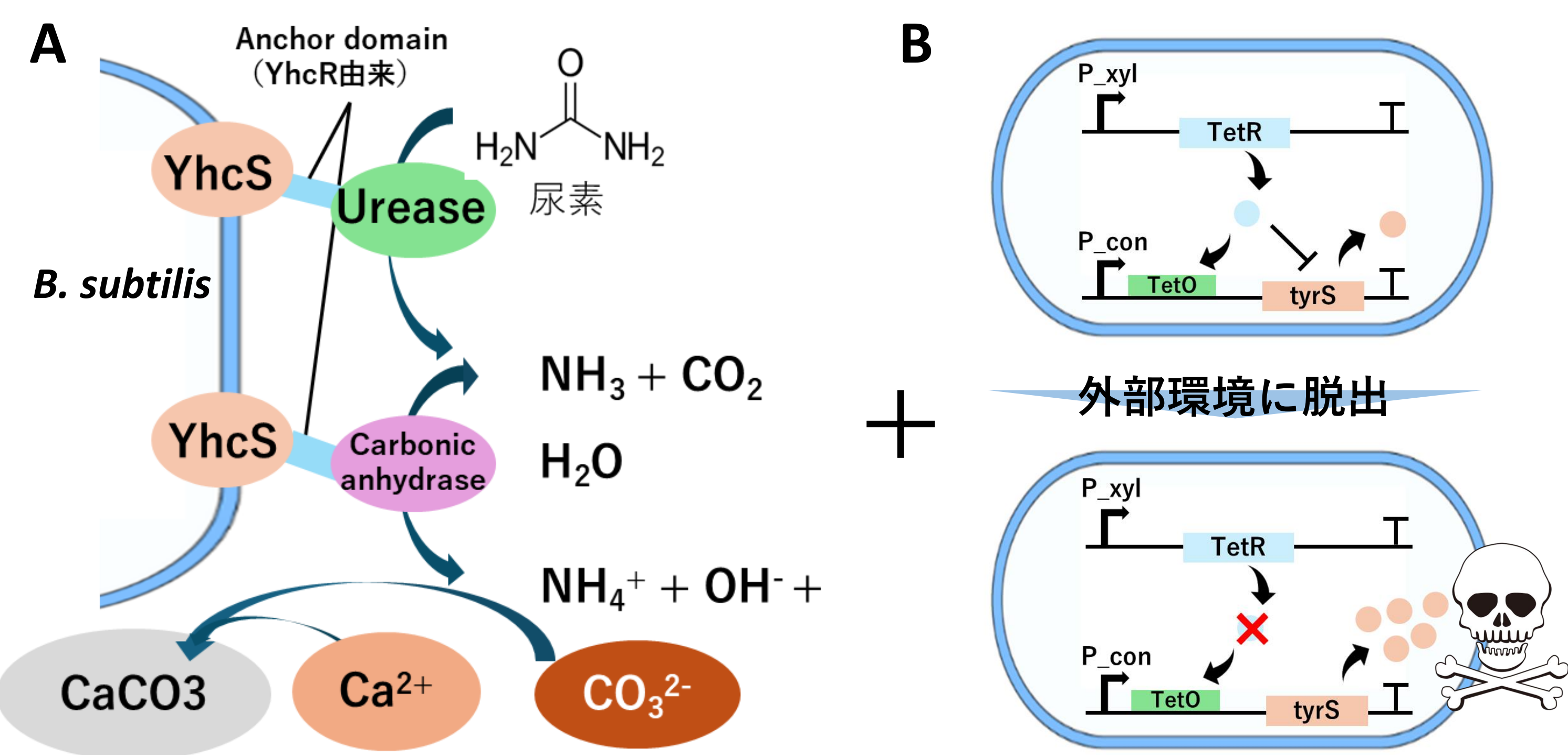


Fig.1 アイデアの基盤となる二つのモジュール。A: 酵素を表面呈示した*B. subtilis*によるMICP。B: コンクリートから脱出したときに起動するキルスイッチ。

芽胞を形成しコンクリート内で生存可能な*B. subtilis*に遺伝子組み換えを施し、尿素分解による炭酸カルシウム生成（MICP）を細菌表面で行わせる。これにより細胞表面でpH上昇が起こるため、酸性条件に弱い細菌を保護しながらMICPを実行できるのではないかな。

さらに変異に強い堅牢なキルスイッチを搭載することで、バイオセーフティを確保しながら酸性条件でコンクリートを自己修復する細胞モジュールを構築できるのではないかな。

各モジュールの説明

1. 尿素分解反応を触媒するMICP触媒酵素の表面呈示

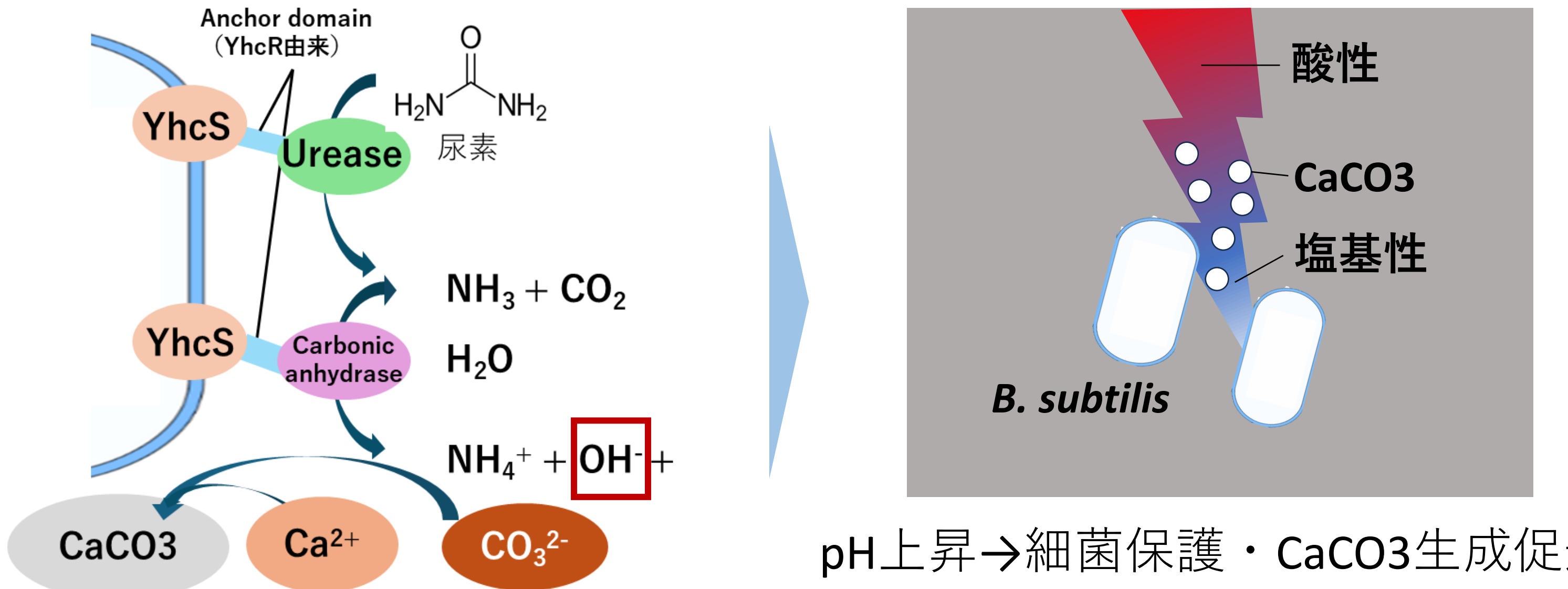


Fig.3 酵素を表面呈示した*B. subtilis*による、尿酸分解反応を利用したMICP。高pH（≒コンクリート）に適応した細菌は低pHに弱い^[5]

1. 塩基を生成する尿素分解MICPの利用
2. *B.subtilis*における酵素の表面呈示技術^[6]を利用し、低pHで機能するUrease^[7]、およびCarbonic anhydraseを表面呈示

尿素分解 → pH上昇 → 細菌の生存 & CaCO₃生成促進

MICP触媒酵素を表面呈示する利点：

- ・ 基質と直接接触するため、細胞内発現よりも高い反応速度
- ・ 細胞外での高pH環境作製による細胞の保護・沈着反応促進

研究の新規性と今後の展望

尿素分解によるMICPと酵素の表面呈示機構の融合が本アイデアの最も大きな新規性である。これにより、既存技術の課題であった細胞の保護を実現し、酸性条件において迅速にMICPを行うことが期待される。加えて、遺伝子変異に強いキルスイッチと組み合わせることにより、バイオセーフティを確保しながら酸性条件下でコンクリートを修復する細胞システムを実現できると考える。この技術は下水道のみならず、温泉街や酸性雨が問題となる地域におけるコンクリート修復への利用が期待される。

今後の実験計画としては、以下の5段階を考えている。

1. 免疫染色法を用いた酵素の表面呈示の検証^[6]
2. 数理モデルを利用したpH変化のシミュレーション
3. 分光光度計を利用した酵素活性の測定^{[7][9][10]}
4. キルスイッチの作製と性能検証
5. キレート滴定、X線回折、SEM観察を利用したCaCO₃測定^{[11][12]}

背景と既存手法の課題

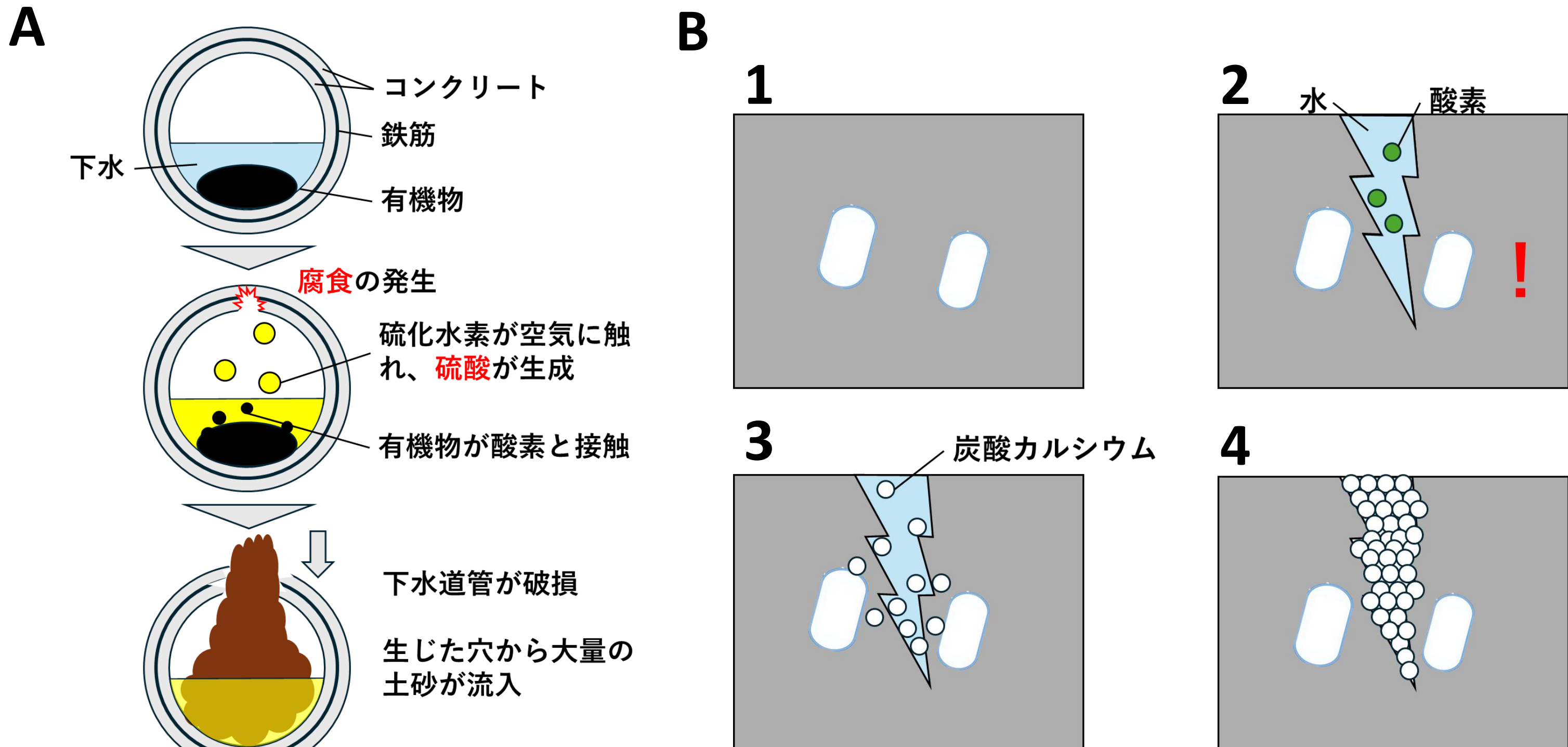


Fig.2 A: 下水管の硫酸腐食と陥没事故が起こる機構^[4]。B: 微生物によるMICPの作動機序。コンクリートにひび割れが入ると細菌が活動し(2)、ひび割れを埋める(3)と休眠する(4)^[4]。

コンクリートの劣化は下水道において深刻かつ緊急の問題である。硫酸腐食に起因する下水管破損は年間約2600件の陥没事故の原因であり、20年後には40%が耐用年数を超過する^[2]。

既存技術には様々な課題がある。表面塗装により耐酸性を高める技術は、塗装に1か月近くの長い時間と手間^[3]を要し、作業に硫化水素中毒の危険性をはらむ。MICPを利用した既存のコンクリート修復技術は、利用する細菌が酸性に弱く下水道のような低pH環境で利用できない^[4]。

2. 変異に強いキルスイッチの導入^[8]

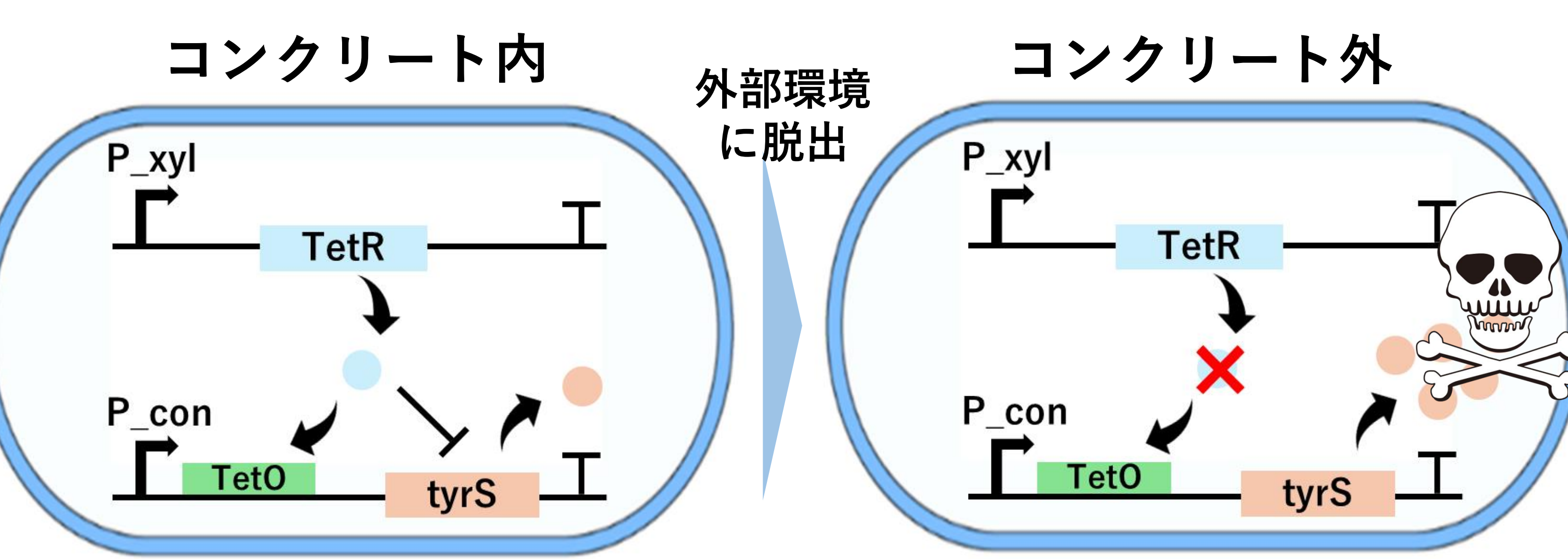


Fig.4 生存に必要な遺伝子（tyrS）を利用したキルスイッチの作動機序。生存に必要な遺伝子（e.g. tyrS）をゲノムからノックアウトし、コンクリートに自然環境にない物質（e.g. tyrS）を混ぜ込む。

1. コンクリート内に細菌がいるとき
 1. 生存に必要な遺伝子の発現が抑制
 2. 遺伝子はleakyに発現し、適量が保たれ細胞は生存
2. コンクリート外に細菌が脱出したとき
 1. 生存に必要な遺伝子の発現が抑制されない
 2. 遺伝子が過剰発現 → 細胞毒性 → 死滅

利点：変異に強く、遺伝子のどの部分に変異しても細胞が死滅

参考文献

1. 塚脇亮太. (2025). 埼玉道路陥没事故、硫酸発生・気温上昇・軟弱地盤...複合要因が地中深くの異変は把握困難. 産経新聞：産経ニュース. <https://www.sankei.com/article/20250201-HOQAJRY33VPXZFKQD2DQLGJIA4/>
2. 国土交通省 水管理・国土保全局 下水道事業課. (2023). 令和5年度下水道管路メンテナンス年報.
3. 大日本塗料株式会社. (2024). レジガード・レジライニング防食システム 下水道コンクリート施設の防食工法.
4. Basilisk(n.d.), 自己治癒コンクリート. <https://basilisk.co.jp/a/faq>
5. Wilks, J. C., Kitko, R. D., Cleeton, S. H., Lee, G. E., Ugwu, C. S., Jones, B. D., BonDurant, S. S., & Slonczewski, J. L. (2008). Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 981–990. <https://doi.org/10.1128/aem.01652-08>
6. Liew, P. X., Wang, C. L. C., & Wong, S. (2011). Functional Characterization and Localization of a *Bacillus subtilis* Sortase and Its Substrate and Use of This Sortase System To Covalently Anchor a Heterologous Protein to the *B. subtilis* Cell Wall for Surface Display. *Journal of Bacteriology*, 194(1), 161–175. <https://doi.org/10.1128/jb.05711-11>
7. Liu, Q., Chen, Y., Yuan, M., Du, G., Chen, J., & Kang, Z. (2017). A *Bacillus paralicheniformis* Iron-Containing Urease Reduces Urea Concentrations in Rice Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). <https://doi.org/10.1128/aem.01258-17>
8. Kato, Y., & Mori, H. (2024). Genetically stable kill-switch using “demon and angel” expression construct of essential genes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1365870>
9. コスモバイオ株式会社, 尿素測定アッセイ (Urea Assay Kit) https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cbl-20140718-5.asp?entry_id=13058
10. James, P., Isupov, M. N., Sayer, C., Saneei, V., Berg, S., Lioliou, M., Kotlar, H. K., & Littlechild, J. A. (2014). The structure of a tetrameric α-carbonic anhydrase from *Thermovibrio ammonificans* reveals a core formed around intermolecular disulfides that contribute to its thermostability. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 70(10), 2607–2618. <https://doi.org/10.1107/s1399004714016526>
11. Harris, D., Ummadi, J. G., Thurber, A. R., Allau, Y., Verba, C., Colwell, F., Torres, M. E., & Koley, D. (2020). Real-time monitoring of calcification process by *Sporosarcina pasteurii* biofilm. *Analyst*, 145(14), 4827–4835. <https://doi.org/10.1039/D0AN00497B>
12. Hoffmann, T. D., Paine, K., & Gebhard, S. (2021). Genetic optimisation of bacteria-induced calcite precipitation in *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01704-1>