

2016 (平成 28 年度)

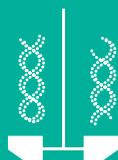
## 第 68 回

# 日本生物工学会大会 講演要旨集

会 期 2016 年 9 月 28 日 (水) ~ 30 日 (金)

会 場 富山国際会議場  
(富山市大手町 1 番 2 号)

ANA クラウンプラザホテル富山  
(富山市大手町 2 番 3 号)



公益社団法人 日本生物工学会

# 第68回 日本生物工学会大会プログラム (2016)

## 一般講演・シンポジウム

会期 2016年9月28日(水)～30日(金)  
会場 富山国際会議場(富山市大手町1番2号)  
ANAクラウンプラザホテル富山(富山市大手町2番3号)

## 授賞式典・受賞講演

日時 2016年9月28日(水) 9:00～11:15  
会場 富山国際会議場 3階 メインホール(A会場)  
(生物学奨励賞・アジア若手賞の講演日程については大会日程表をご覧ください)

## 懇親会

日時 2016年9月28日(水) 18:30～20:30  
会場 ANAクラウンプラザホテル富山 3階 鳳

## ランチョンセミナー

期間 2016年9月28日(水)～30日(金)  
会場 富山国際会議場 3階 A会場  
ANAクラウンプラザホテル富山 3階 C, D, E会場

## 展示会

期間 2016年9月28日(水)～30日(金)  
会場 富山国際会議場 3階 展示会会場(ホワイエ)

## 英語論文の書き方セミナー

日時 2016年9月28日(水) 16:00～17:30  
会場 富山国際会議場 2階 B会場

## 生物工学若手研究者の集い(若手会) 総会・交流会 2016

日時 2016年9月29日(木) 18:30～20:30  
会場 ANAクラウンプラザホテル富山 3階 鳳

公益社団法人 日本生物工学会

TEL. 06-6876-2731 FAX. 06-6879-2034

E-mail: [info@sbj.or.jp](mailto:info@sbj.or.jp)

<http://www.sbj.or.jp>

## 目 次

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| 大会日程表                                 | (3)   |
| 会場案内図                                 | (5)   |
| 実行委員会担当者表                             | (8)   |
| 受賞者一覧                                 | (9)   |
| ポスター発表日程・演題番号表・講演番号の見方                | (10)  |
| プログラム                                 |       |
| 第1日目 授賞式・受賞講演, シンポジウム, 一般講演           | (11)  |
| 第2日目 受賞講演, シンポジウム・招待講演, 若手会口頭発表, 一般講演 | (27)  |
| 第3日目 一般講演 (午前), シンポジウム, 一般講演 (午後)     | (46)  |
| 要旨                                    |       |
| 第1日目 受賞講演                             | (77)  |
| シンポジウム                                | (79)  |
| 一般講演                                  | (91)  |
| 第2日目 受賞講演                             | (141) |
| シンポジウム・招待講演                           | (143) |
| 一般講演                                  | (169) |
| 第3日目 一般講演 (午前)                        | (219) |
| シンポジウム                                | (265) |
| 一般講演 (午後)                             | (279) |
| 人名索引                                  | (323) |
| キーワード索引                               | (340) |
| ランチョンセミナープログラム                        | (355) |
| ランチョンセミナー要旨                           | (357) |

2016年9月1日(木)～11月24日(木)まで  
大会HP (<http://www.sbj.or.jp/2016/abstract/>)  
で講演要旨集E-PUB版のダウンロードが可能です。



# 大会日程表

| 会場   | 9月28日(水)                  |                    |   |                      |             |
|--|---------------------------|--------------------|---|----------------------|-------------|
|  | 午前<br>9:00-11:15          | 昼<br>11:45-12:45   | 午後  |                      |             |
|  |                           |                    | 13:30-15:30   | 16:00-18:00          | 18:30-20:30 |
| A会場<br>(国際会議場3階)   | 授賞式・受賞講演(功労賞, 生物工学賞, 功績賞) | [L]タカラバイオ株式会社      | [S]培養計測技術の最近のトピックス【本部企画】  |                      |             |
| B会場<br>(国際会議場2階)   |                           |                    | [S]生物工学研究者の生命情報との向き合い方～バイオインフォマティクス入門から応用へ～   | 英語論文の書き方セミナー(～17:30) |             |
| C会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                           | [L]株式会社島津製作所       | [IS]Toward Sustainable Palm Oil Industry Coexisting with Environmental and Biodiversity Conservation  |                      | 懇親会         |
| D会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                           |                    | [IS]Biotechnology of Enzymes in Aldoxime-Nitrile Pathway from Microorganisms, Plants and Animals (ERATO Asano Active Enzyme Molecule Project) |                      |             |
| E会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                           | [L]株式会社エービー・サイエックス | [S]遺伝子改変技術によるセルエンジニアリングの革新:産業応用に向けて   |                      |             |
| ポスター会場I<br>(国際会議場2階)<br>ポスター会場II<br>(ANAクラウンプラザ3階 ASUKA) |                           |                    |   | ポスター発表               |             |

| 会場   | 9月29日(木)   |                            |                  |  |             |
|--|--|----------------------------|------------------|--|-------------|
|  | 午前<br>9:00-11:00(～11:30)   | 昼<br>11:45-12:45           | 午後               |  |             |
|  |  |                            | 13:00-13:20      | 13:30-15:30                            | 16:00-18:00 |
| A会場<br>(国際会議場3階)   | [S]学会活動が先導する実用化研究・技術～学会は産官学の出会いの場となるか～   | 代議員会<br>(11:40-12:45)      | 受賞講演<br>(江田賞)    | [S]有用微生物の農作物への新しい展開とその将来像              |             |
| B会場<br>(国際会議場2階)   | [S]植物代謝工学研究最前線～新産業創出に向けて～  |                            |                  | [S]バイオエンジニアリングにおける分析科学の新たな展開           | 若手会口頭発表     |
| C会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    | [IS]Artificial Molecular Design to Create "Neobiological Molecules" (～11:30)<br>協賛:AMED「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」       | [L]株式会社シクロケムバイオ            | 受賞講演<br>(照井賞)    | [S]2D/3Dプリンタを用いる細胞操作の可能性               | 若手会総会・交流会   |
| D会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    | [IS]Japan-Korea Joint Symposium "Advancements in Medical Engineering Using Nano- and Micro-biotechnology" (～11:30) | [L]アジレント・テクノロジー株式会社        | 受賞講演<br>(アジア若手賞) | [IS]10th Japan-Korea Biomass Symposium |             |
| E会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    | [S]新規な核酸関連酵素の開発とその産業応用   | [L]ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 | 受賞講演<br>(斎藤賞)    | [S]微生物の潜在能力に注目した有用二次代謝産物の「ものづくり」戦略     |             |
| ポスター会場I<br>(国際会議場2階)<br>ポスター会場II<br>(ANAクラウンプラザ3階 ASUKA) |  |                            |                  | ポスター発表                                 |             |

| 会場   | 9月30日(金)         |                            |  |             |
|--|------------------|----------------------------|--|-------------|
|  | 午前<br>9:00-11:00 | 昼<br>11:30-12:30           | 午後   |             |
|  |                  |                            | 13:00-15:00  | 15:30-17:30 |
| A会場<br>(国際会議場3階)   |                  | [L]東ソー株式会社                 | [S]酒類製造における革新技術【本部企画】  |             |
| B会場<br>(国際会議場2階)   |                  |                            | [S]生命ビッグデータの利活用による生物工学のイノベーション   |             |
| C会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                  | [L]サーモフィッシュサイエンスティフィック株式会社 | [IS]Gap Filling of Metabolic Pathway and Application to Producing Valuable Compounds |             |
| D会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                  |                            | [S]和食の機能性のメカニズム～生活習慣病予防, 腸内細菌へのインパクト～  |             |
| E会場<br>(ANAクラウンプラザ3階)                                    |                  | [L]日本ウォーターズ株式会社            | [S]セルフリー(無細胞)タンパク質合成技術の新展開   |             |
| ポスター会場I<br>(国際会議場2階)<br>ポスター会場II<br>(ANAクラウンプラザ3階 ASUKA) | ポスター発表           |                            |  | ポスター発表      |

S: シンポジウム IS: 国際シンポジウム L: ランチョンセミナー



## 会場への交通案内

### 【JR富山駅より】

市内電車（セントラム）…約7分 駅構内の「路面電車富山駅」→「国際会議場前」下車  
 バス…約5分「城址公園前」下車 徒歩3分  
 タクシー…約5分  
 徒歩…城址大通りを南へ約15分

### 【富山空港より】

タクシー…約20分  
 バス（空港連絡バス）…約25分 「総曲輪（そうがわ）」下車 徒歩2分

### 【高速道路（北陸自動車道）より】

富山ICより約10～15分 国道41号線を富山駅方面に北上

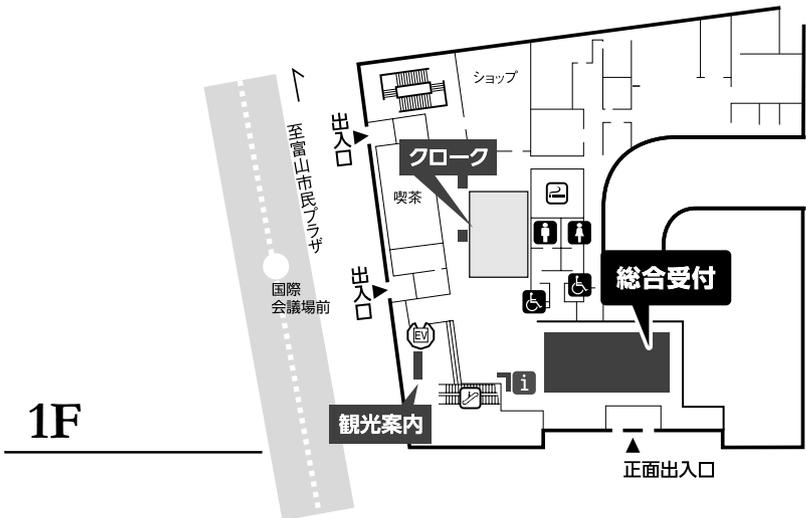
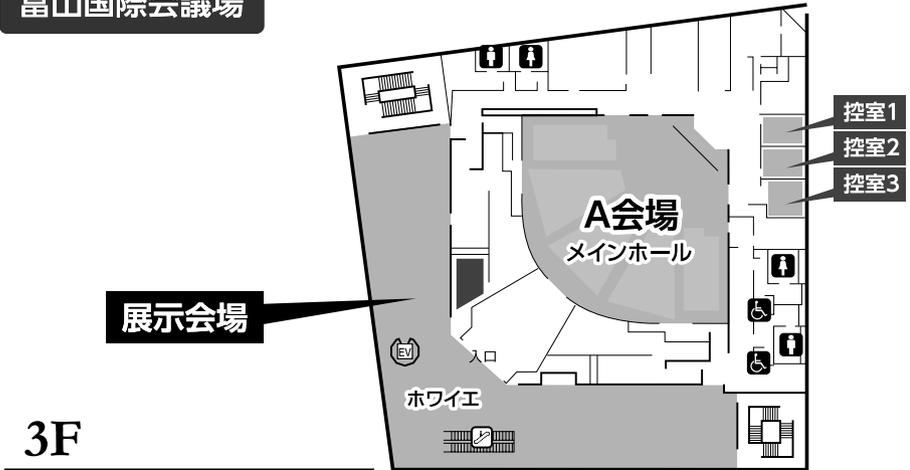
## 会場案内図



# 会場案内

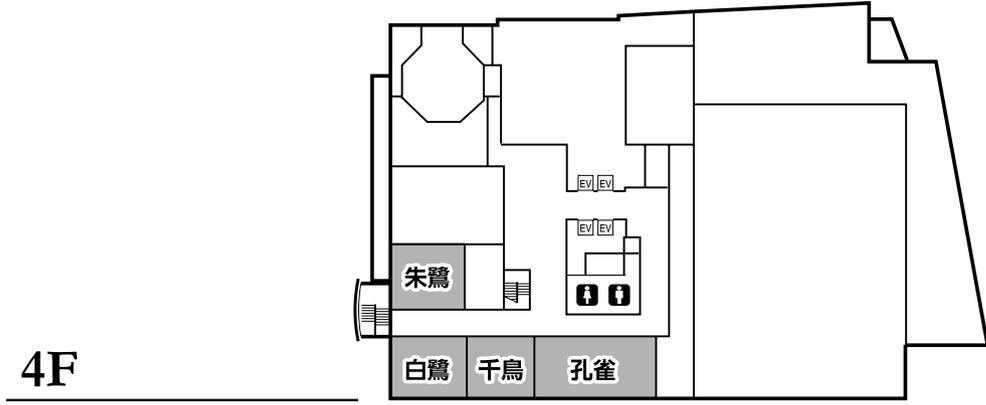
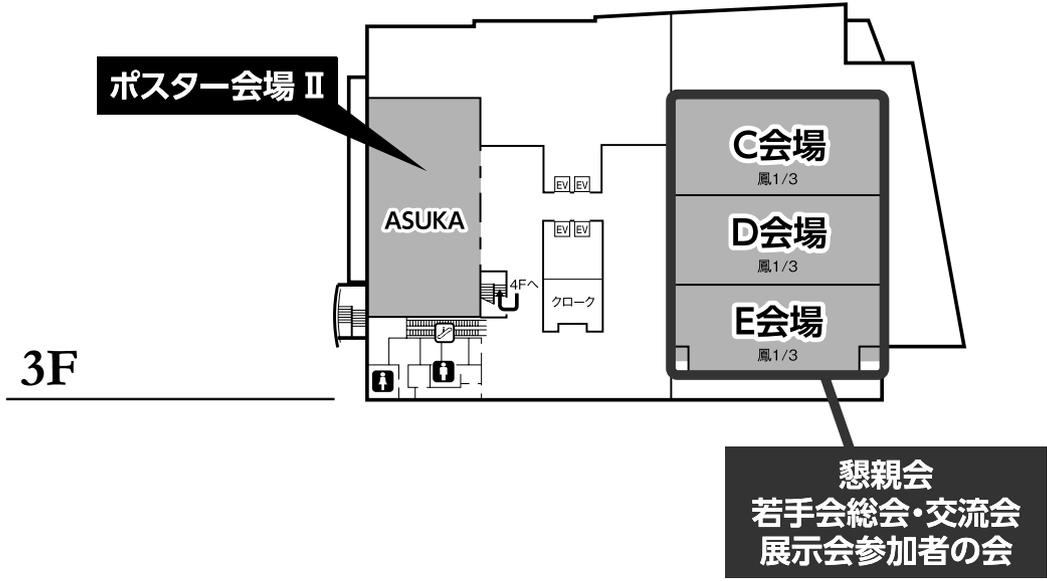
【富山国際会議場】

## 富山国際会議場



【ANAクラウンプラザホテル富山】

**ANAクラウンプラザホテル富山**



## 第68回日本生物工学会大会（2016）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

|           |  |
|-----------|--|
| 実行委員長     | 伊藤 伸哉  |
| 総務        | ○木元 久・西島 謙一・戸田 弘   |
| 会計        | ○内田 博之・牧野 祥嗣・小谷 真也   |
| 広報        | ○清水 一憲・戸田 弘  |
| プログラム     | ○本多 裕之・中野 秀雄・伊藤 伸哉・金原 和秀・堀 克敏・中川 智行・西島 謙一・田丸 浩・岩崎 雄吾・加藤 竜也・清水 一憲・加藤 竜司・金岡 英徳・兒島 孝明 |
| 会場        | ○三宅 克英・末 信一郎・濱野 吉十・野崎 功一・仁宮 一章・松崎 千秋・馬場 保徳   |
| シンポジウム    | ○中野 秀雄・朴 龍朱・本多 裕之・伊藤 伸哉・中川 智行・堀 克敏・中村 剛  |
| 受付        | ○富田 昌弘・河原崎 泰昌・牧野 祥嗣  |
| 授賞式       | ○金原 和秀・近藤 徹弥・加藤 竜也   |
| 展示・ポスター   | ○鈴木 徹・加藤 康夫・吉田 豊和・星野 一宏・里村 武範  |
| 懇親会       | ○高木 昌宏・櫻井 明彦・米田 英伸   |
| クローク      | ○田口 悟朗・高橋 裕里香・高野 真希  |
| 若手交流会     | ○小柳 喬・清水 一憲・加藤 竜司・戸田 弘   |
| ランチョンセミナー | ○田丸 浩・嶋村 隆・大久保 勉・山口 庄太郎・伊藤 伸哉  |
| 会議室       | ○戸田 弘  |
| 顧問        | 浅野 泰久・飯島 信司・宇多川 隆  |

# 日本生物工学会 2016年度 受賞者

去る5月19日、理事会が開催され、本年度の受賞者が決定しましたのでお知らせ申し上げます。

- 第35回 生物学賞 園元 謙二 (九州大学大学院農学研究院・教授)  
「アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究」
- 第10回 生物学功績賞 本多 裕之 (名古屋大学大学院工学研究科・教授)  
「短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究」
- 第10回 生物学功労賞 坂口 正明 (サントリースピリッツ (株) 商品開発研究部・スペシャリスト)  
「産学連携活動の新規提案と推進による学会の活性化」
- 第10回 生物学功労賞 松井 和彦 (味の素 (株) 研究開発企画部 兼 コーポレート戦略部・上席理事)  
「産学連携活動の活性化策の検討と企画・運営」
- 第49回 生物学奨励賞 (江田賞) 伊藤考太郎 (キッコーマン (株) 研究開発本部・チームリーダー)  
「しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来グルタミンナーゼに関する研究」
- 第52回 生物学奨励賞 (斎藤賞) 松浦 友亮 (大阪大学大学院工学研究科・准教授)  
「セルフリータンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の開発」
- 第39回 生物学奨励賞 (照井賞) 河原 正浩 (東京大学大学院工学系研究科・准教授)  
「キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用」
- 第25回 生物学技術賞  
該当者なし
- 第13回 生物学アジア若手賞 (Young Asian Biotechnologist Prize) Dr. Choowong Auesukaree (Mahidol University, Thailand)  
Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants
- 第5回 生物学アジア若手研究奨励賞 (The DaSilva Award) Dr. Uschara Thumarat (Prince of Songkla University, Thailand)  
Biochemical characterization and molecular engineering of recombinant cutinases and carboxylesterase from a thermophilic actinomycete, *Thermobifida alba* AHK119
- 第24回 生物学論文賞
  - 1) 古屋 俊樹\*・下島 洋・木野 邦器 (早稲田大学, \*現, 東京理科大学)  
Alteration of the substrate specificity of cytochrome P450 CYP199A2 by site-directed mutagenesis
  - 2) 高木 博史<sup>1</sup>・橋田 恵介<sup>1</sup>・渡辺 大輔<sup>1</sup>・那須野 亮<sup>1</sup>・大橋 正孝<sup>2</sup>・伊波 朋哉<sup>3</sup>・鼠尾まい子<sup>3</sup>・塚原 正俊<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>奈良先端科学技術大学院大学, <sup>2</sup>奈良県産業振興総合センター, <sup>3</sup>株式会社バイオジェット)  
Isolation and characterization of awamori yeast mutants with L-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol
  - 3) Mohamed Ali Abdel-Rahman<sup>1,2</sup>・Yaotian Xiao<sup>1</sup>・田代 幸寛<sup>1</sup>・Ying Wang<sup>1</sup>・善藤 威史<sup>1</sup>・酒井 謙二<sup>1</sup>・園元 謙二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九州大学, <sup>2</sup>Al-Azhar University, Egypt)  
Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression
  - 4) 稲生 崇規\*・河邊 佳典・山城 拓郎\*\*・亀山雄二郎\*\*\*・汪 雪・井藤 彰・上平 正道  
(九州大学, \*現, テバ製薬, \*\*現, 日医工, \*\*\*現, 医薬品医療機器総合機構)  
Improved transgene integration into the Chinese hamster ovary cell genome using the Cre-loxP system
  - 5) 佐藤 俊輔・丸山 裕之・藤木 哲也・松本 圭司\*  
(株)カネカ, \*現, 大阪大学大学院工学研究科 カネカ基盤技術協働研究所)  
Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a co-substrate
  - 6) 南畑 孝介\*・前田 泰一\*\*・山口 哲志・石原 亘\*\*\*・石渡 晟\*\*\*\*・高森 智史\*\*\*\*\*・山平 真也・長棟 輝行  
(東京大学, \*現, 九州大学, \*\*現, (株)キッコーマン, \*\*\*現, (株)長瀬産業, \*\*\*\*現, (株)グリコ, \*\*\*\*\*現, (株)ユニリーバー)  
Photosensitizer and polycationic peptide-labeled streptavidin as a nano-carrier for light-controlled protein transduction
- 第5回 生物学学生優秀賞 (飛翔賞)
  - 1) Ellen (東北大学)  
「大腸菌のK取込み輸送体の解析」
  - 2) 西川 洋平 (早稲田大学)  
「マイクロドロップレットによる単一微生物からの効率的な全ゲノム増幅法の開発」
  - 3) 劉 秋実 (名古屋大学)  
「ウイルス表層機能ペプチドを提示する細胞質内送達用ナノキャリアの開発」
  - 4) 石井 友理 (関西学院大学)  
「酢酸菌を宿主とした効率的タンパク質発現系の構築」
  - 5) 白米 優一 (愛媛大学)  
「ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸バイオシステムの新たな生理機能と応用に関する研究」
  - 6) 安達 桂香 (九州大学)  
「Clostridiales 目細菌群のクオラムセンシングとクオラムクエンチングに関する研究」

# ポスター発表日程・演題番号表

ポスター発表日：9月28日（水）～30日（金）（各演題掲示時間は9月28日（水）・29日（木）は10：00～18：00、30日（金）の午前のセッションは29日（前日）の18：15～翌30日11：00、同日午後のセッションは11：15～17：30まで）

会場：ポスター会場Ⅰ（国際会議場2階）、ポスター会場Ⅱ（ANAクラウンプラザホテル3階 ASUKA）

発表・討論時間：（1～2日目）奇数番号 16:00～17:00

偶数番号 17:00～18:00

（3日目午前）奇数番号 9:00～10:00

偶数番号 10:00～11:00

（3日目午後）奇数番号 15:30～16:30

偶数番号 16:30～17:30

## 演題番号の見方

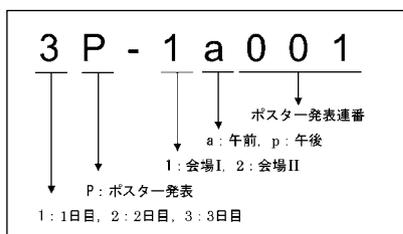
例：1P-1p015（第1日目 会場Ⅰ 午後 015番のパネル）

| 分野                      | Session   | 第1日目(9月28日)    | 第2日目(9月29日)    | 第3日目(9月30日) 午前 | 第3日目(9月30日) 午後 |
|-------------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1. 遺伝学、分子生物学および遺伝子工学    | 1. Genetics, Molecular biology, and Gene engineering      |                |                |                |                |
| 1a 分類, 系統, 遺伝学          | 1a Taxonomy, phylogenetics                                |                |                | 3P-1a001～1a008 |                |
| 1b 遺伝子工学                | 1b Genetic engineering                                    |                |                | 3P-1a009～1a033 | 3P-1p001～1p029 |
| 2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学  | 2. Enzymology, Protein engineering, and Enzyme technology |                |                |                |                |
| 2a 酵素学, 酵素工学            | 2a Enzymology, enzyme                                     | 1P-1p001～1p024 | 2P-1p001～1p015 | 3P-1a034～1a043 | 3P-1p035～1p057 |
| 2b タンパク質工学              | 2b Proteins   | 1P-1p025～1p038 | 2P-1p016～1p027 | 3P-1a044～1a053 | 3P-1p058～1p068 |
| 2c 抗体工学                 | 2c Antibody engineering                                   |                | 2P-1p028～1p037 | 3P-1a054～1a063 |                |
| 3. 代謝生理学・発酵生産           | 3. Metabolism and Fermentation production                 |                |                |                |                |
| 3a 発酵生理学, 発酵工学          | 3a Fermentation physiology, fermentation technology       | 1P-1p039～1p054 | 2P-1p038～1p054 | 3P-1a064～1a074 | 3P-1p069～1p077 |
| 3b 代謝工学                 | 3b Metabolic engineering                                  | 1P-1p055～1p068 | 2P-1p055～1p068 | 3P-1a075～1a087 |                |
| 3c オミクス解析               | 3c Omics technology                                       |                |                | 3P-1a088～1a097 | 3P-1p078～1p086 |
| 4. 醸造・食品工学              | 4. Brewing and Food technology                            |                |                |                |                |
| 4a 醸造学, 醸造工学            | 4a Brewing, brewing technology                            | 1P-1p069～1p083 | 2P-1p069～1p082 |                |                |
| 4b 食品科学, 食品工学           | 4b Food science, food technology                          | 1P-1p084～1p101 | 2P-1p083～1p099 |                |                |
| 5. 環境バイオテクノロジー          | 5. Environmental biotechnology                            |                |                |                |                |
| 5a 環境浄化, 修復, 保全技術       | 5a Bioremediation   | 1P-1p102～1p113 | 2P-1p100～1p113 |                |                |
| 5b 環境工学, 廃水処理技術         | 5b Environmental technology, wastewater treatment         |                |                | 3P-1a098～1a113 | 3P-1p099～1p111 |
| 5c バイオマス, 資源, エネルギー工学   | 5c Biomass, bioreource and energy engineering             | 1P-1p114～1p131 | 2P-1p114～1p131 | 3P-1a114～1a131 | 3P-1p112～1p129 |
| 6. 生物化学工学               | 6. Biochemical engineering                                |                |                |                |                |
| 6a 生物化学工学               | 6a Biochemical engineering                                |                | 2P-2p132～2p140 |                | 3P-2p132～2p154 |
| 6b 培養工学                 | 6b Cell culture engineering                               |                |                |                | 3P-2p155～2p167 |
| 6c バイオプロセス              | 6c Bioprocess engineering                                 |                | 2P-2p141～2p150 |                | 3P-2p168～2p177 |
| 7. 植物バイオテクノロジー          | 7. Plant cell technology                                  |                |                |                |                |
| 7a 植物細胞工学, 組織培養, 育種工学   | 7a Plant cell / tissue engineering                        |                |                |                | 3P-1p030～1p034 |
| 8. 動物バイオテクノロジー          | 8. Animal cell technology                                 |                |                |                |                |
| 8a 生体医用工学               | 8a Biomedical engineering                                 | 1P-2p132～2p143 |                |                |                |
| 8b セル&ティッシュエンジニアリング     | 8b Cell and tissue engineering                            | 1P-2p144～2p166 | 2P-2p151～2p180 |                |                |
| 9. バイオ情報                | 9. Bioinformation technology                              |                |                |                |                |
| 9a 生体情報工学, バイオインフォマティクス | 9a Bioinformatics   |                |                |                | 3P-1p087～1p097 |
| 9b システムバイロロジー           | 9b Systems biology  |                |                |                | 3P-1p098       |
| 10. 分析計測化学              | 10. Analytical chemistry and Measuring devise             |                |                |                |                |
| 10a バイオセンシング, 分析化学      | 10a Biosensing and analytical chemistry                   | 1P-2p167～2p182 |                |                |                |
| 10b センサー, 計測工学          | 10b Sensors and monitoring devices                        | 1P-2p183～2p187 |                |                |                |
| 11. 生体関連化学              | 11. Biofunctional chemistry                               |                |                |                |                |
| 11a 生合成, 天然物化学          | 11a Biosynthesis, natural organic chemistry               |                |                | 3P-2a132～2a154 |                |
| 11b 有機化学, 高分子化学         | 11b Organic chemistry, polymer chemistry                  |                |                | 3P-2a155       |                |
| 12. 生体分子工学              | 12. Biomolecular engineering                              |                |                |                |                |
| 12a 核酸工学                | 12a Nucleic acid engineering                              |                | 2P-2p181～2p183 |                |                |
| 12b ペプチド工学              | 12b Peptide engineering                                   |                |                | 3P-2a156～2a170 |                |
| 12c 脂質工学                | 12c Lipid engineering                                     |                |                | 3P-2a171～2a175 |                |
| 12d 糖鎖工学                | 12d Glycoengineering                                      |                | 2P-2p184～2p187 |                |                |
| 13. 生物工学若手研究者の集い(若手会)   | 13 Young Researchers Committee for Biotechnology          |                |                | 3P-2a176～2a184 |                |

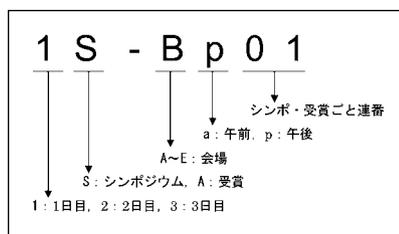
\*若手会が選定した博士後期課程学生によるポスター発表です。第2日(29日)16:00～18:00にB会場(富山国際会議場2階)で口頭発表も行われます。

## 各種講演番号の見方

### 一般講演



### 受賞講演・シンポジウム



# 第1日（9月28日）

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です。

| 開始時間 | 講演番号 | 演題 | 発表者氏名（所属）<br>○印は講演者を示す |
|------|------|----|------------------------|
|------|------|----|------------------------|

## 授賞式・

### 受賞講演（生物工学功労賞，生物工学賞，生物工学功績賞）

富山国際会議場 3階 A会場（メインホール）（9:00～11:15）

授賞式（9:00～9:50）

|       |         |                                      |   |
|-------|---------|--------------------------------------|---|
| 9:00  |         | 会長挨拶                                 |   |
| 9:05  |         | KSBB 会長挨拶                            |   |
| 9:10  |         | 名誉会員，功労会員推戴                          |   |
| 9:20  |         | 各賞授賞                                 |   |
| 10:00 | 1A-Aa01 | 〈生物工学功労賞〉<br>産学連携活動の新規提案と推進による学会の活性化 | ○坂口 正明（サントリースピリッツ）  |
| 10:05 | 1A-Aa02 | 〈生物工学功労賞〉<br>第10回生物工学功労賞受賞にあたって      | ○松井 和彦（味の素）   |
| 10:15 | 1A-Aa03 | 〈生物工学賞〉<br>アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究 | 座長：五味 勝也<br>○園元 謙二 <sup>1,2</sup> （ <sup>1</sup> 九大院・農， <sup>2</sup> 九大・バイオアーク） |
| 10:50 | 1A-Aa04 | 〈生物工学功績賞〉<br>短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究      | 座長：木野 邦器<br>○本多 裕之（名大院・工）   |

## シンポジウム（午後の部）

### 培養計測技術の最近のトピックス【本部企画】

富山国際会議場 3階 A会場（メインホール）（13:30～15:30）

|       |         |                     |  |
|-------|---------|---------------------|--|
| 13:30 |         | はじめに                | 児島 宏之<br>座長：児島 宏之                      |
| 13:35 | 1S-Ap01 | 人工光型植物工場の課題と将来性     | ○古在 豊樹（植物工場研究会（特定非営利活動法人））<br>座長：富田 悟志 |
| 14:05 | 1S-Ap02 | 再生医療のための細胞操作および培養技術 | ○福田 淳二（横国大院・工）                         |
| 14:35 |         | 休憩                  |  |

座長：安原 貴臣

- 14:55 1S-Ap03 キャピラリー電気泳動－質量分析計（CE/MS）を用いた抗体産生の評価  
 ..... ○東條 繁郎（ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ）
- 15:25 おわりに  
 ..... 佐久間 英雄

### 生物工学研究者の生命情報との向き合い方～バイオインフォマティクス入門から応用へ～

富山国際会議場 2階 B会場（特別会議室）（13:30～15:30）

- 13:30 はじめに  
 ..... 蟹江 慧  
 座長：牧野 智宏
- 13:32 1S-Bp01 遺伝疫学データに基づく DNA メチル化と生活習慣病の関係  
 ..... ○中柄 昌弘<sup>1</sup>, 市原 佐保子<sup>2</sup>, 山本 健<sup>3</sup>, 大中 佳三<sup>4</sup>, 松原 達昭<sup>5</sup>, 横田 充弘<sup>6</sup>  
 ( <sup>1</sup>名大病院・先端医療, <sup>2</sup>三重大院・地域イノベーション学, <sup>3</sup>久留米大・医・医化学,  
<sup>4</sup>九大院・医・老年医学, <sup>5</sup>愛知学院大・歯・内科学, <sup>6</sup>愛知学院大・歯・ゲノム情報応用診断学 )  
 座長：牧野 智宏
- 13:55 1S-Bp02 高速 DNA シークエンシングとバイオインフォマティクスを駆使した転写制御ネットワーク解析  
 ..... ○兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学）  
 座長：牧野 智宏
- 14:18 1S-Bp03 アミノ酸物性指標を用いたペプチドインフォマティクスの可能性  
 ..... ○蟹江 慧<sup>1</sup>, 伊藤 圭祐<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>3</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>静岡県大院・薬食生命, <sup>3</sup>名大院・工 )  
 座長：牧野 智宏
- 14:41 1S-Bp04 バイオ産業におけるメタボロームデータの利活用  
 ..... ○緒方法 親（日本バイオデータ）  
 座長：牧野 智宏
- 15:04 1S-Bp05 ヒト常在性ビフィズス菌種と宿主との親和性について  
 ..... ○小田 卷 俊孝<sup>1</sup>, 堀米 綾子<sup>1</sup>, 菅原 宏祐<sup>1</sup>, 南 淳一<sup>2</sup>, 阿部 文明<sup>2</sup>, 清水 金忠<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>森永乳業 基礎研, <sup>2</sup>森永乳業 素材研 )
- 15:27 おわりに  
 ..... 兒島 孝明

### Toward Sustainable Palm Oil Industry Coexisting with Environmental and Biodiversity Conservation 〈国際シンポジウム〉

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C会場（13:30～15:30）

- 13:30 Keynote  
 ..... Kenji Sakai  
 座長：Kenji Sakai
- 13:35 1S-Cp01 Promotion of green economy with palm oil industry for biodiversity conservation in Malaysia  
 ..... ○Yoshihito Shirai  
 (Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

座長：Kenji Sakai

- 13:55 1S-Cp02 Process integration and zero emission system in the palm oil mill  
 .....○Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>, Yoshihito Shirai<sup>2</sup>  
 (1 Dept. Bioprocess Tech., Faculty of Biotech., Univ. Putra Malaysia,  
 2 Dept. Biol. Functions Eng, Grad. Sch. Life Sci. Sys. Eng., Kyushu Inst. Tech.,)

座長：Kenji Sakai

- 14:15 1S-Cp03 Utilization of oil palm biomass for acetoin production using engineered *Escherichia coli*  
 .....○Mohd Zulkhairi Mohd Yusoff<sup>1,2</sup>, Hironaga Akita<sup>1</sup>, Nobutaka Nakashima<sup>3,4</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,3</sup>  
 (1 Res. Inst. Sustainable Chem. AIST, 2 Dept. Bioprocess Technol, UPM, 3 Bioproduction Res. Inst. AIST,  
 4 Dept. of Biological Information, Tokyo Inst. Technol.)

座長：Yoshihito Shirai

- 14:30 1S-Cp04 Waste biotransformation and accelerating recycle in oil palm industry  
 .....○Yukihiro Tashiro<sup>1</sup>, Clament Chin Fui Seung<sup>1</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>  
 (1 Fac. Agr., Kyushu Univ., Japan, 2 Universiti Putra Malaysia, Malaysia)

座長：Yoshihito Shirai

- 14:50 1S-Cp05 Bacterial community analysis as a tool in assessing the pollution due to palm oil mill effluent  
 .....○Norhayati Ramli<sup>1</sup>, Siti Suhailah Sharuddin<sup>1</sup>, Diana Mohd-Nor<sup>1,2</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>,  
 Yoshihito Shirai<sup>2</sup>, Toshinari Maeda<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>3</sup>  
 (1 Dept. of Bioprocess Technol., Fac. Biotechnol Biomol. Sci., UPM,  
 2 Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., 3 Fac. Agric., Kyushu Univ.)

座長：Yoshihito Shirai

- 15:10 1S-Cp06 Effects of land-use gradient changes on biodiversity in tropical rainforest of Borneo  
 .....○Charles Vairappan<sup>1</sup>, Tin- Hoe Seng<sup>1</sup>, Jaya Seelan<sup>1</sup>,  
 Kishneth Palaniveloo<sup>1</sup>, Yukihiro Tashiro<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>2</sup>  
 (1 ITBC, Univ. Malaysia Sava, 2 Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Biotechnology of Enzymes in Aldoxime-Nitrile Pathway from Microorganisms, Plants and Animals**  
 <ERATO Asano Active Enzyme Molecule Project 国際シンポジウム>

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 D 会場 (13:30~15:30)

座長：Yasuhisa Asano

- 13:30 1S-Dp01 Access and use of fern hydroxynitrile lyase for biocatalysis  
 .....○Anton Glieder<sup>1</sup>, Elisa Lanfranchi<sup>2</sup>, Margit Winkler<sup>2</sup>, Karl Gruber<sup>3</sup>, Thea Pavkov-Keller<sup>3</sup>  
 (1 NAWI, Inst. Mol. Biot., Graz. Univ. Tech., 2 ACIB GmbH, Graz, 3 Inst. Mol. Biosc., Univ. Graz)

座長：Yasuhisa Asano

- 14:10 1S-Dp02 Hydroxynitrile lyases and enzymes related to mandelonitrile metabolism in plants and animals  
 .....○Yuko Ishida<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup> (1 Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., 2 ERATO, JST)

座長：Yasuhisa Asano

- 14:35 1S-Dp03 Engineering nitrile hydratase by salt-bridges and disulfide-bridges  
 .....○Huimin Yu<sup>1,2,3</sup>, Song Jiao<sup>1,2</sup>, Ji Yang<sup>1,2</sup>, Jing Zhang<sup>1,2</sup>, Jie Chen<sup>1,2</sup>, Zhongyao Shen<sup>1</sup>  
 (1 Dept. Chem. Eng., Tsinghua Univ., China, 2 Key Lab Indust. Biocatal., ME., China,  
 3 Cent. Synt. Syst. Biol., Tsinghua Univ., China)

座長：Yasuhisa Asano

- 15:05 1S-Dp04 Aldoxime dehydration in the (bio)synthesis of nitriles  
 .....○Richard Metzner<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
 (1 Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., 2 ERATO, JST)

## 遺伝子改変技術によるセルエンジニアリングの革新：産業応用に向けて

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場 (13:30~15:30)

|       |         |   |
|-------|---------|---|
| 13:30 |         | はじめに<br>..... 河原 正浩<br>座長：河原 正浩   |
| 13:33 | 1S-Ep01 | ゲノム編集の最新方法論<br>..... ○佐久間 哲史 (広島大院・理)<br>座長：河原 正浩   |
| 13:52 | 1S-Ep02 | iPS 細胞での効率的なゲノム編集を目指した CRISPR ツールボックス<br>..... ○堀田 秋津 <sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 京大・CiRA, <sup>2</sup> 京大・iCeMS)<br>座長：河原 正浩 |
| 14:11 | 1S-Ep03 | ゲノム操作工学によるバイオ医薬品高生産細胞株構築技術の開発<br>..... ○河邊 佳典, 上平 正道 (九大院・工)<br>座長：河邊 佳典  |
| 14:30 | 1S-Ep04 | 細胞の遺伝子改変による創薬プラットフォームの開発<br>..... ○河原 正浩 (東大院・工)<br>座長：河邊 佳典  |
| 14:49 | 1S-Ep05 | 遺伝子改変技術を支援するベクターの開発と疾患治療の実用化<br>..... ○峰野 純一 (タカラバイオ株式会社 CDM センター)<br>座長：河邊 佳典  |
| 15:08 | 1S-Ep06 | 遺伝子治療の安全性評価—ゲノム編集技術の応用における留意点—<br>..... ○佐藤 陽治 (国立医薬食衛研)  |
| 15:27 |         | おわりに<br>..... 河邊 佳典   |

## 一般講演

富山国際会議場 2階ポスター会場 I (16:00~18:00)

### 【酵素学, 酵素工学】

|       |          |  |
|-------|----------|--|
| 16:00 | 1P-1p001 | 進化工学的手法を用いた立体選択的カルボニルレダクターゼの熱安定性・有機溶媒耐性の向上<br>..... ○小野 智博 <sup>1</sup> , 井上 瑞葉 <sup>1</sup> , 岡野 憲司 <sup>1</sup> , 出来島 康方 <sup>2</sup> , 川端 潤 <sup>2</sup> , 本田 孝祐 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 阪大院・工, <sup>2</sup> 三菱化学科学技術研究セ)  |
| 17:00 | 1P-1p002 | <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 のメタノール脱水素酵素のアイソザイムに関する研究<br>..... ○一小路 貴士 <sup>1</sup> , 矢野 裕之 <sup>1</sup> , 中川 智行 <sup>2</sup> , 谷 明生 <sup>3</sup> , 田中 三男 <sup>1</sup> , 三井 亮司 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 岡山理大・理, <sup>2</sup> 岐阜大・応生科, <sup>3</sup> 岡山大・資源植物科研) |
| 16:00 | 1P-1p003 | <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 による植物生理活性物質の分泌と植物共生<br>..... ○田中 美知留, 矢野 裕之, 田中 三男, 三井 亮司 (岡山理大・理)  |
| 17:00 | 1P-1p004 | <i>Aspergillus aculeatus</i> 由来 FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼホモログの機能解析<br>..... ○岡 修司, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科)  |
| 16:00 | 1P-1p005 | <i>Cordyceps militaris</i> 由来リボヌクレオチドレダクターゼの発現及び機能解析<br>..... 小島 康弘 <sup>1</sup> , ○加藤 竜也 <sup>1,2</sup> , 朴 龍洙 <sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 静大・農, <sup>2</sup> 静大グリーン科学技術研)  |
| 17:00 | 1P-1p006 | <i>Aspergillus oryzae</i> 由来 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリック特性<br>..... ○渡部 昭, 佐藤 陽子, 五味 勝也 (東北大院・農)  |
| 16:00 | 1P-1p007 | 超好熱性アーキアにおける NAD <sup>+</sup> 熱分解産物の代謝機構<br>..... ○蜂須賀 真一 <sup>1</sup> , 佐藤 喬章 <sup>1,2</sup> , 跡見 晴幸 <sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 京大院・工, <sup>2</sup> JST, CREST)  |

- 17:00 1P-1p008 病原菌由来 S46 ペプチダーゼの酵素学的諸性質の解明  
 .....○伊藤 康広<sup>1</sup>, 鈴木 義之<sup>1</sup>, 志田 洋介<sup>1</sup>, 阪本 泰光<sup>2</sup>, 田中 信忠<sup>3</sup>, 小笠原 渉<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>長岡技科大, <sup>2</sup>岩手医科大・薬, <sup>3</sup>昭和大・薬)
- 16:00 1P-1p009 *Burkholderia* 属細菌由来アセチルコリンエステラーゼ組換え体の諸性質解析と農薬検出系への応用  
 .....○北村 智彬<sup>1</sup>, 藤本 拓哉<sup>1</sup>, 泊 直宏<sup>2</sup>, 山本 佳宏<sup>2</sup>, 鶴岡 直樹<sup>3</sup>, 茂里 康<sup>4</sup>, 渡部 邦彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>京府大院・生命環境, <sup>2</sup>京産技研, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>産総研・健康工学)
- 17:00 1P-1p010 麹菌由来イソプリメベロース生成酵素を用いた新奇オリゴ糖の生産  
 .....○松沢 智彦, 矢追 克郎 (産総研・生物プロセス)
- 16:00 1P-1p011 GH5\_8 マンナーゼの熱安定化メカニズムの解明  
 .....○熊谷 祐也<sup>1,2</sup>, 裏地 美杉<sup>1</sup>, Wan Kun<sup>1</sup>, 奥山 正幸<sup>2</sup>, 木村 淳夫<sup>2</sup>, 畑中 唯史<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>岡山生物研, <sup>2</sup>北大院・農)
- 17:00 1P-1p012 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来不溶性グルカンの細菌型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼによる加水分解  
 .....○矢野 成和<sup>1</sup>, 難波 孝行<sup>2</sup>, 玉木 友理<sup>2</sup>, 残間 寿美香<sup>1</sup>, 今野 博行<sup>1</sup>, 立木 隆<sup>3</sup>, 若山 守<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>山形大院・理工, <sup>2</sup>山形大・工, <sup>3</sup>立命館大・生命科学)
- 16:00 1P-1p013 A structurally novel chitinase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus chitonophagus*  
 .....○Tamotsu Kanai<sup>1,2</sup>, Ayumi Horiuchi<sup>1</sup>, Mehwish Aslam<sup>1</sup>, Haruyuki Atomi<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>CREST, JST)
- 17:00 1P-1p014 *Streptomyces thermodiastaticus* 由来耐熱、好酸性キチナーゼの諸性質の検討  
 .....○武 慶太郎<sup>1</sup>, 藤木 英寿<sup>1</sup>, Suyotha Wasana<sup>2</sup>, 高木 一好<sup>1</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>立命館大院・生命科学, <sup>2</sup>Dept. of Ind. Biotechnol., Grad. Agro-ind, Prince of Songkla Univ.,)
- 16:00 1P-1p015 *Streptomyces* 属放線菌由来の 2 つの  $\beta$ -D-ガラクトフラノシダーゼの比較  
 .....○松永 恵美子<sup>1</sup>, 八色 奈央<sup>1</sup>, 豊田 早紀<sup>1</sup>, 岡 拓二<sup>2</sup>, 樋口 裕次郎<sup>1</sup>, 竹川 薫<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>崇城大・生物生命)
- 17:00 1P-1p016 *Bacillus* 属細菌由来ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の諸性質の解析  
 .....○松藤 仁美, 樋口 裕次郎, 竹川 薫 (九大院・生資環)
- 16:00 1P-1p017 *Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来マルトリオース生成アミラーゼ L191R 変異酵素の X 線結晶構造解析  
 .....○残華 智子, 西村 重徳, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科・応生科)
- 17:00 1P-1p018 ハイマンノース型糖鎖を有する *Aspergillus glaucus* MA0196 由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析  
 .....○竹中 慎治<sup>1</sup>, 林 理希<sup>1</sup>, 仙波 弘雅<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>1</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>, 土居 幹治<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大院・農・応生, <sup>2</sup>マルトモ)
- 16:00 1P-1p019 *Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A および Fae1B の酵素特性  
 .....○間宮 愛, 粟冠 真紀子, 木村 哲哉, 粟冠 和郎 (三重大院・生資)
- 17:00 1P-1p020 酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチンおよび *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成  
 .....○原 良太郎<sup>1</sup>, 北辻 早希<sup>2</sup>, 山縣 海<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>早大・理工研, <sup>2</sup>早大・先進理工)
- 16:00 1P-1p021 ヒスチジン水酸化酵素の特性解析と組換え大腸菌による 3-ヒドロキシヒスチジン生産  
 .....○中島 悠太<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研)
- 17:00 1P-1p022 リジン水酸化酵素発現大腸菌を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの開発  
 .....○木内 愛海<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 山縣 海<sup>1</sup>, 三宅 良磨<sup>3,4</sup>, 川端 潤<sup>3,4</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研, <sup>3</sup>三菱化学科学技術研究センター, <sup>4</sup>エーピーアイコーポレーション)
- 16:00 1P-1p023 シトクロム P450 BM3 と補酵素再生系の近接配置による酵素反応  
 .....○島山 真由美<sup>1</sup>, 野北 昂志<sup>1</sup>, 北岡 卓也<sup>2</sup>, 一瀬 博文<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>九大院・農)
- 17:00 1P-1p024 固定化酵素を利用したバニリン合成  
 .....○古屋 俊樹<sup>1,2</sup>, 黒岩 麻里<sup>1</sup>, 木野 邦器<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>東理大・理工)

## 【タンパク質工学】

- 16:00 1P-1p025 タンパク質工学と代謝系改変によるコリン応答転写スイッチの超高感度化  
..... ○鈴木 紳一郎, 星野 孝幸, 河合 (野間) 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔 (千葉大院・工)
- 17:00 1P-1p026 タンパク質工学による *Talaromyces cellulolyticus* 由来セロビオハイドロラーゼの耐熱化  
..... ○蒲池 沙織, 井上 宏之, 松鹿 昭則, 星野 保, 石川 一彦 (産総研)
- 16:00 1P-1p027 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における新規ポリ-ADP リボース加水分解酵素の生理的役割  
..... ○渡邊 美紀, 宮地 雄大, 平野 滯, 山本 竜也, 志水 元亨, 加藤 雅士 (名城大・農)
- 17:00 1P-1p028 Endocytic Transport of Amyloid beta-42 in the presence of Oxidized Derivatives of Cholesterol  
..... ○Neha Sharma<sup>1</sup>, KeangOK Beak<sup>1</sup>, Huong Thi Thanh Phan<sup>2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>Hanoi Natl Univ. of Educ.)
- 16:00 1P-1p029 嗅覚受容体の匂い分子応答に対するシトクロム P450 の効果  
..... ○浅川 賢史<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, Savangsuksa Aulaphan<sup>1</sup>, 松波 宏明<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, Duke Univ. Medical center)
- 17:00 1P-1p030 カイコ - B m N P V バクミド発現系で発現させたブタ由来リラキシン関連因子の効率的精製と構造解析  
..... ○石崎 真章<sup>1</sup>, 加藤 竜也<sup>1,2</sup>, Park Sungjo<sup>3</sup>, Terzic Andre<sup>3</sup>, 高坂 哲也<sup>1</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・農・応生化, <sup>2</sup>静大グリーン科技研, <sup>3</sup>メイヨー医科大)
- 16:00 1P-1p031 ケラチン分解酵素の機能不明 C 末端ドメインの機能解析  
..... ○杉田 慎之助, 大政 健史, 古賀 雄一 (阪大院・工)
- 17:00 1P-1p032 プレバチルスによる細胞内タンパク質の可溶性発現  
..... ○植野 陽平, 花方 寛, 宮内 明 (ヒゲタ醤油研)
- 16:00 1P-1p033 *Cupriavidus* 属細菌由来ベンゼンジオキシゲナーゼの発現及び機能解析  
..... ○鳥袋 美波<sup>1</sup>, 浜口 慎也<sup>1</sup>, 渡邊 仁<sup>1</sup>, 野口 恵一<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>農工大・機器分析セ)
- 17:00 1P-1p034 アミノ酸モノオキシゲナーゼ変異体の合理的設計  
..... ○森 裕太郎, 白井 智量, 近藤 昭彦 (理研・バイオマス)
- 16:00 1P-1p035 *Geobacter* 属細菌由来還元的脱ハロゲン化酵素の異種発現系構築と補因子の再構成  
..... ○中村 龍貴, 野島 良太, 養王田 正文 (農工大院・工)
- 17:00 1P-1p036 新規抗マラリア薬標的タンパク質、PfERC の結晶化用試料の調製  
..... ○平岡 修<sup>1</sup>, 坂本 沙祐里<sup>2</sup>, 洲崎 悦子<sup>1,2</sup>, 杉山 成<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>就実大・薬, <sup>2</sup>就実大院・医療薬, <sup>3</sup>阪大院・理)
- 16:00 1P-1p037 麹菌由来の両親媒性タンパク質 ハイドロフォービンの機能評価  
..... ○安藤 祐人<sup>1</sup>, 中野 宏軌<sup>1</sup>, 石倉 幹大<sup>1</sup>, 陶山 友彰<sup>2</sup>, 藤田 夏美<sup>2</sup>, 中島 春紫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>明治大院・農, <sup>2</sup>明治大・農)
- 17:00 1P-1p038 小胞体内在分子シャペロン Calnexin と PDI ファミリータンパク質間相互作用の解析  
..... ○中尾 仁美, 迫野 昌文 (富山大院・理工)

## 【発酵生理学, 発酵工学】

- 16:00 1P-1p039 *Lactococcus lactis* における高温下での Cit 生産メカニズムの解明  
..... ○山本 恵理, 渡部 玲子, 古市 圭介, 浅見 幸夫 (明治・食機能科学研)
- 17:00 1P-1p040 新たな芳香族アミン化合物の発酵生産系の構築  
..... ○生井 智仁<sup>1</sup>, 榊尾 俊介<sup>2</sup>, 茂本 亮輔<sup>1</sup>, 高谷 直樹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系)

- 16:00 1P-1p041 コリスミ酸ピルビン酸リアーゼ発現コリネ型細菌を用いたプロトカテク酸の生産  
 ..... ○岡井 直子<sup>1</sup>, 三好 孝則<sup>2</sup>, 竹嶋 康誠<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>3</sup>,  
 吉田 健一<sup>1</sup>, 桑原 広明<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>4</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大・科技, <sup>2</sup>帝人, <sup>3</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>4</sup>神戸大院・工 )
- 17:00 1P-1p042 酢酸発酵における酢酸菌の膜結合型アルデヒド脱水素酵素 AldFGH の役割  
 ..... ○福成 聖也<sup>1</sup>, 新納 俊<sup>1</sup>, 児玉 知大<sup>1</sup>, 松谷 峰之介<sup>2</sup>,  
 片岡 尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師 寿治<sup>1,2,3</sup>, Theeragool Gunjana<sup>4</sup>, 松下一 信<sup>1,2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学, <sup>3</sup>山口大・中高温微セ, <sup>4</sup>カセサート大・理 )
- 16:00 1P-1p043 *Corynebacterium glutamicum* の耐熱性における浸透圧の影響  
 ..... ○村田 龍太郎<sup>1</sup>, Nawarat Nantapong<sup>2</sup>, 松谷 峰之介<sup>1</sup>, 片岡 尚也<sup>1,3,4</sup>, 薬師 寿治<sup>1,3,4</sup>, 松下一 信<sup>1,3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>スラナリー工科大, <sup>3</sup>山口大・農, <sup>4</sup>山口大・中高温微セ )
- 17:00 1P-1p044 アミノ酸と C<sub>4</sub>-ジカルボン酸が酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の耐熱性に与える影響  
 ..... ○中西 里菜<sup>1</sup>, 松谷 峰之介<sup>1</sup>, 片岡 尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師 寿治<sup>1,2,3</sup>, 松下一 信<sup>1,2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>山口大・農, <sup>3</sup>山口大・中高温微セ )
- 16:00 1P-1p045 酸素抑制条件下におけるコリネ型細菌の糖消費速度と細胞内酸化還元レベルの相関  
 ..... ○柘植 陽太<sup>1,2</sup>, 植松 君夫<sup>1</sup>, 山本 省吾<sup>1</sup>, 須田 雅子<sup>1</sup>, 乾 将行<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>RITE, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>奈良先端大・バイオ )
- 17:00 1P-1p046 PHB 蓄積時の *Halomonas* sp. KM-1 の代謝物解析  
 ..... ○松下 功<sup>1</sup>, 盤若 明日香<sup>1</sup>, 西村 拓<sup>1</sup>, 坪田 潤<sup>1</sup>, 河田 悦和<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>大阪ガス, <sup>2</sup>産総研 )
- 16:00 1P-1p047 Thermophilic ethanol fermentation by genetically engineered *Moorella thermoacetica*  
 ..... Rahayu Farida, Auto Kawai, Yuki Iwasaki, Akihisa Kita, Takahisa Tajima, Junichi Kato,  
 ○Yutaka Nakashimada  
 ( Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ. )
- 17:00 1P-1p048 根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* における D-ピペコリン酸代謝経路の解析  
 ..... ○堀木 雅文, 日比 慎, 高橋 里美, 小川 順 (京大院・農)
- 16:00 1P-1p049 *Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸過酸化能発現メカニズム  
 ..... ○佐々木 大樹<sup>1</sup>, 石川 森夫<sup>1</sup>, 鈴木 敏弘<sup>1</sup>, 今井 健太郎<sup>1</sup>, 吉田 将也<sup>1</sup>,  
 山本 有紀<sup>1</sup>, 松原 拓哉<sup>1</sup>, 兼崎 友<sup>2</sup>, 吉川 博文<sup>2,3</sup>, 貝沼 (岡本) 章子<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東京農大・応生科・醸造, <sup>2</sup>東京農大・ゲノムセ, <sup>3</sup>東京農大・応生科・バイオ )
- 17:00 1P-1p050 静置発酵で醸造した米酢に含まれるポリアミン類  
 ..... ○加藤 彩織<sup>1</sup>, 赤坂 直紀<sup>2</sup>, 石井 友理<sup>1</sup>, 佐古田 久雄<sup>2</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>関西学院大院・理工, <sup>2</sup>マルカン酢 )
- 16:00 1P-1p051 ブタノール生産菌におけるリファンピシン耐性変異株の特性解析  
 ..... ○信木 公介, 清 啓自, 川嶋 草平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一  
 ( 東農大院・農 )
- 17:00 1P-1p052 *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産における最適培養系の構築  
 ..... ○野中 大輔<sup>1</sup>, 森田 峻秀<sup>2</sup>, 清 啓自<sup>2</sup>, 中島 敏明<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境 )
- 16:00 1P-1p053 *Citrobacter braakii* TB-96 株におけるバイオディーゼル廃グリセロールからの 1,3-PD 収率の向上  
 ..... ○森田 峻秀, 清 啓自, 野中 大輔, 瀬田 幸平, 鈴木 敏弘, 中島 敏明  
 ( 筑波大院・生命環境 )
- 17:00 1P-1p054 ギ酸による高 1,3-プロパンジオール生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株の増殖抑制  
 ..... ○清 啓自<sup>1</sup>, 森田 峻秀<sup>1</sup>, 野中 大輔<sup>2</sup>, 瀬田 幸平<sup>1</sup>, 中島 敏明<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大 )

## 【代謝工学】

- 16:00 1P-1p055 低 Ca 環境でもメタノールに生育できる *Methylobacterium zatmanii* のメタノール脱水素酵素の性質について  
 .....○Wang Lun<sup>1</sup>, 菅沼 宗矢<sup>1</sup>, 谷 明生<sup>2</sup>, 早川 享志<sup>1</sup>, 中川 智行<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>岐阜大・応生科, <sup>2</sup>岡山大・資源植物科)
- 17:00 1P-1p056 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 由来 REE 依存型メタノール脱水素酵素の酵素化学的諸性質  
 .....○菅沼 宗矢<sup>1</sup>, 王 倫<sup>1</sup>, 日比野 歩美<sup>1</sup>, 三井 亮司<sup>2</sup>,  
 谷 明生<sup>3</sup>, 海老原 章郎<sup>1</sup>, 早川 享志<sup>1</sup>, 中川 智行<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>岐阜大・応生科, <sup>2</sup>岡山理大・理, <sup>3</sup>岡山大・資源植物科)
- 16:00 1P-1p057 ナイロンオリゴマー分解菌 *Arthrobacter* sp. KI72 における 6-アミノヘキサノ酸代謝系の同定  
 .....○竹原 一起<sup>1</sup>, 谷本 悠樹<sup>1</sup>, 藤井 翼<sup>1</sup>, 加藤 太一郎<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>鹿児島大院・理工)
- 17:00 1P-1p058 代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産  
 .....○片岡 尚也<sup>1,2,3</sup>, Vangnai Alisa S.<sup>4</sup>, 薬師 寿治<sup>1,2,3</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学, <sup>3</sup>山口大・中高温微セ, <sup>4</sup>チュラロンコン大)
- 16:00 1P-1p059 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のヒドロゲナーゼ機能の解析  
 .....○井上 達也<sup>1</sup>, 平野 伸一<sup>2</sup>, 松本 伯夫<sup>2</sup>, 石井 正治<sup>1</sup>, 新井 博之<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大院・農生科, <sup>2</sup>電中研)
- 17:00 1P-1p060 硫黄代謝関連遺伝子の改変による大腸菌のシステイン発酵生産性の向上  
 .....○河野 祐介<sup>1</sup>, 仲谷 豪<sup>2</sup>, 西口 みゆ<sup>2</sup>, 鶴岡 愛<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>, 大津 巖生<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大・国際産学連携本部, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)
- 16:00 1P-1p061 大腸菌 *nudH* 遺伝子の機能解析とシステイン発酵生産への応用  
 .....○石井 寛子<sup>1</sup>, 鶴岡 愛<sup>2</sup>, 河野 祐介<sup>1</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>, 大津 巖生<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大・国際産学連携本部, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)
- 17:00 1P-1p062 大腸菌における硫黄源のカタボライト抑制機構の解明  
 .....○西口 みゆ<sup>1</sup>, 城山 真恵加<sup>1</sup>, 河野 祐介<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>1</sup>, 大津 巖生<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>筑波大・国際産学連携本部)
- 16:00 1P-1p063 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 におけるチオ硫酸酸化代謝の解析  
 .....○小倉 一将<sup>1</sup>, Dahl Christiane<sup>2</sup>, 三本木 至宏<sup>3</sup>, 新井 博之<sup>1</sup>, 石井 正治<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大院・農生科, <sup>2</sup>Inst. Microbiol. Biotechnol., Univ. Bonn, <sup>3</sup>広島大院・生物圏)
- 17:00 1P-1p064 代謝経路解析に基づく定常期にコハク酸を生産する大腸菌の開発  
 .....○戸谷 吉博, 白木 孝典, 清水 浩 ( 阪大院・情報)
- 16:00 1P-1p065 *Shewanella* 属細菌において新たに発見された CRP/cAMP 制御系の生理機能とその制御機構の解明  
 .....○笠井 拓哉, 高妻 篤史, 渡邊 一哉 ( 東薬大院・生科)
- 17:00 1P-1p066 メバロン酸生産大腸菌の細胞内代謝状態の定量的な評価  
 .....○永井 暉, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩 ( 阪大院・情報)
- 16:00 1P-1p067 バイオプロセス効率化に向けた合成クオラムセンシングと代謝トグルスイッチによる大腸菌表現型の可塑的制御  
 .....○相馬 悠希<sup>1</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>九大・生医研, <sup>2</sup>九大院・農)
- 17:00 1P-1p068 メタボリックトグルスイッチを用いた  $\gamma$ -アミノ酪酸生産  
 .....○藤原 由梨<sup>1</sup>, 中川 拓弥<sup>2</sup>, 鶴野 圭悟<sup>3</sup>, 相馬 悠希<sup>4</sup>, 花井 泰三<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>九大・農, <sup>2</sup>九大院・生資環, <sup>3</sup>九大院・農, <sup>4</sup>九大・生医研)

## 【醸造学, 醸造工学】

- 16:00 1P-1p069 ストレス環境におけるアルコール発酵力の改善を目指した酵母 *RIM15* 遺伝子のプロモーター改変  
 .....○渡辺 大輔<sup>1</sup>, 金子 亜紀江<sup>2</sup>, 杉本 幸子<sup>1</sup>, 大貫 慎輔<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>1</sup>, 大矢 禎一<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>東大院・新領域)

- 17:00 1P-1p070 清酒酵母の機能性アミノ酸蓄積変異株の分離と醸造特性の解析  
 ..... ○大橋 正孝<sup>1</sup>, 渡辺 大輔<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>奈良産振セ・バイオ・食品グループ, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)
- 16:00 1P-1p071 *VID24* 遺伝子変異の接合型を指標としたリング酸高生産酵母の育種  
 ..... ○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 秦 洋二 (月桂冠・総研)
- 17:00 1P-1p072 光トラッピング細胞融合法を用いた融合酵母によるホエー由来醸造飲料の開発  
 ..... ○山畑 直樹<sup>1</sup>, 田口 耕造<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>立命館大院・生命科学, <sup>2</sup>立命館大院・理工)
- 16:00 1P-1p073 酢酸イソアミル高生産酵母における *ATF1* 発現制御機構  
 ..... ○大原 佑介, 猿渡 通代, 高橋 俊成, 山田 翼, 末野 和男 (菊正宗酒造)
- 17:00 1P-1p074 国酒酵母の特異性  
 ..... ○森谷 千星, 門倉 利守, 金井 里紗, 義盛 光代, 安藤 周輝,  
 数岡 孝幸, 中山 俊一, 竹田 正久, 田中 尚人, 鈴木 健一朗  
 (東農大応生科・醸造)
- 16:00 1P-1p075 ピルビン酸低減清酒酵母 TCR7 の異数性染色体と醸造特性  
 ..... ○田口 誠我<sup>1</sup>, 澤田 和敬<sup>3,4</sup>, 浜島 弘史<sup>2</sup>, 赤尾 健<sup>5</sup>,  
 野口 秀樹<sup>6</sup>, 豊田 敦<sup>6</sup>, 藤山 秋佐夫<sup>6,7</sup>, 北垣 浩志<sup>2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>佐賀大・農, <sup>3</sup>鹿児島大院・連農科,  
<sup>4</sup>佐賀県工技セ, <sup>5</sup>酒総研, <sup>6</sup>遺伝学研, <sup>7</sup>総研大・遺伝)
- 17:00 1P-1p076 超音波照射下における酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖促進機構の解明  
 ..... ○江口 夏帆, 胡 宏海, 野口 明德, 小柳 喬 (石川県立大院・生資環・食品)
- 16:00 1P-1p077 有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析  
 ..... ○山元 翔太<sup>1</sup>, 清 啓自<sup>1</sup>, 久保田 恵理<sup>2</sup>, 兼崎 友<sup>2</sup>,  
 矢嶋 俊介<sup>2</sup>, 門倉 利守<sup>1</sup>, 鈴木 健一朗<sup>1</sup>, 中山 俊一<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東農大・応生科・醸造, <sup>2</sup>東農大・ゲノムセ)
- 17:00 1P-1p078 香氣成分改変焼酎開発のための酵母の探索及び育種  
 ..... ○蕪 卓弥, 山本 佳奈子, 西森 大貴, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一  
 (東農大・応生科・醸造)
- 16:00 1P-1p079 酵母における TTC 還元に関与する因子の特定  
 ..... ○田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一 (東農大院・農)
- 17:00 1P-1p080 清酒麹菌 *A. oryzae* 由来 *DocpO* の酒質特性と ACP アイソザイム遺伝子の発現  
 ..... ○山下 伸雄, 玉田 佳大, 浅井 拓也, 明石 貴裕 (白鶴酒造)
- 16:00 1P-1p081 白麹菌グリコシルセラミドがヒト表皮角化初代培養細胞の皮膚バリア機能の遺伝子発現に及ぼす影響の解析  
 ..... ○藤川 彩美<sup>1</sup>, 阪本 真由子<sup>1</sup>, 松永 陽香<sup>1</sup>, 酒谷 真以<sup>1</sup>, 尾上 貴俊<sup>2</sup>,  
 北村 整一<sup>2</sup>, 鏑田 仁人<sup>2</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 戸田 修二<sup>3</sup>, 北垣 浩志<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>佐賀大・農, <sup>2</sup>東洋新薬, <sup>3</sup>佐賀大・医)
- 17:00 1P-1p082 沖縄県の自然界から採取した黒アスペルギルス菌の分子系統解析  
 ..... 伊勢 孝太郎<sup>1</sup>, 鼠尾 まい子<sup>1</sup>, 東 春奈<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>2</sup>, 外山 博英<sup>3</sup>, ○塚原 正俊<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>バイオジェット, <sup>2</sup>日大・生資科, <sup>3</sup>琉球大・農)
- 16:00 1P-1p083 清酒オリゴペプチドに関与する米グルテリントタンパク質の米粒内局在解析  
 ..... ○高橋 圭, 河野 弘美, 奥田 将生 (酒総研)

### 【食品科学, 食品工学】

- 17:00 1P-1p084 植物エキス発酵飲料に含まれるアミノ酸  
 ..... ○川添 直樹, 山森 昭, 岡田 秀紀 (大高酵素・総研)
- 16:00 1P-1p085 大豆可溶化のための大豆ボディ構造体に関する研究  
 ..... ○橋本 恭兵, 笠井 尚哉 (阪府大院・生環科)

- 17:00 1P-1p086 未熟練 QDA パネリストによる官能評価値のフードメタボロミクスへの運用の提案  
..... ○富尾 紋子<sup>1</sup>, 早川 文代<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup> 農研機構・食品研)
- 16:00 1P-1p087 メタボローム解析による GABA 含有発酵乳に含まれるユニークな代謝産物の探索  
..... ○萩 達朗, 小林 美穂, 野村 将 (農研機構・畜産部門)
- 17:00 1P-1p088 パン生地発酵過程における代謝産物変化  
..... ○中村 敏英, 富田 理, 齋藤 勝一 (農研機構・食品研)
- 16:00 1P-1p089 麴甘酒とその乳酸発酵物のメタボローム解析  
..... ○倉橋 敦<sup>1</sup>, 小黑 芳史<sup>1</sup>, 西脇 俊和<sup>2</sup>, 小林 和也<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 八海醸造・研究開発, <sup>2</sup> 新潟農総研・食研セ)
- 17:00 1P-1p090 乳酸発酵甘酒の水溶性成分および揮発性成分のプロファイル解析  
..... ○富田 理, 齋藤 勝一, 中村 敏英 (農研機構・食品研)
- 16:00 1P-1p091 酒類を対象とした LC/MS による多成分解析  
..... ○中西 豪<sup>1</sup>, 行平 大地<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 島津製作所, <sup>2</sup> ライフィクス)
- 17:00 1P-1p092 固相誘導体化法を用いた黒コショウの GC/MS メタボローム解析  
..... ○恩田 浩幸<sup>1</sup>, 杉立 久仁代<sup>2</sup>, 佐々野 僚一<sup>3</sup>, 松尾 俊介<sup>3</sup>, 佐川 岳人<sup>1</sup>, 福崎 英一郎<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup> エスビー食品, <sup>2</sup> アジレント・テクノロジー, <sup>3</sup> アイステイサイエンス, <sup>4</sup> 阪大院・工・生命先端)
- 16:00 1P-1p093 短期熟成試験味噌中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の精製および解析  
..... ○北川 学<sup>1</sup>, 多田 孝清<sup>2</sup>, 山田 南実<sup>1</sup>, 春野 玲弥<sup>2</sup>, 東 隆行<sup>2</sup>, 小池 祥悟<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> マルコメ, <sup>2</sup> KRI)
- 17:00 1P-1p094 ポリアミン高含有納豆製造に向けた大豆品種の比較  
..... ○小林 和也, 堀井 悠一郎, 渡辺 聡 (新潟農総研・食研セ)
- 16:00 1P-1p095 S-アデノシルメチオニン高生産清酒酵母における肝細胞保護作用  
..... ○信田 亮太<sup>1</sup>, 金井 宗良<sup>2</sup>, 藤井 力<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 八海醸造・研究開発, <sup>2</sup> 酒総研)
- 17:00 1P-1p096 乳酸菌と酵母で発酵させた風味の良い液性ぬか床の開発  
..... ○小野 浩, 西尾 翔子, 岩谷 和輝, 小澤 幸央, 河本 哲宏 (東海漬物)
- 16:00 1P-1p097 小麦ふすまの各種長時間・複セルラーゼ処理  
..... ○柴田 晃, 笠井 尚哉 (阪府大院・生環科)
- 17:00 1P-1p098 酸味受容体(ASICs)タンパクをセンサーとした電気生理学的アッセイ法による酸味抑制物質のスクリーニング  
..... ○玉村 朋大<sup>2</sup>, 柴田 泰宏<sup>1</sup>, 塚本 義則<sup>2</sup>, 鶴川 眞也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 名市大院・医, <sup>2</sup> 中部大院・応生)
- 16:00 1P-1p099 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する免疫賦活能を有する菌体外多糖  
..... ○松崎 千秋<sup>1</sup>, 早川 あすか<sup>1</sup>, 松本 健司<sup>2</sup>, 加藤 紀彦<sup>3</sup>, 山本 憲二<sup>1</sup>, 久 景子<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup> 石川県大・生物資源研, <sup>2</sup> 石川県大・生資環, <sup>3</sup> 京大院・生命, <sup>4</sup> 日東薬品工業)
- 17:00 1P-1p100 原料および発酵方法の異なるビール中の代謝物および香気成分の分析  
..... ○杉立 久仁代<sup>1</sup>, 関口 桂<sup>1</sup>, 行平 大地<sup>2</sup>, 中村 貞夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> アジレント・テクノロジー, <sup>2</sup> ライフィクス)
- 16:00 1P-1p101 腸管 IgA 産生を増強する *Lactobacillus antri* の細胞壁成分の解析  
..... ○寅本 拓<sup>1</sup>, 山崎 思乃<sup>2</sup>, 國澤 純<sup>3</sup>, 片倉 啓雄<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup> 関西大院・理工, <sup>2</sup> 関西大・化生工, <sup>3</sup> 医薬健栄研)

### 【環境浄化, 修復, 保全技術】

- 17:00 1P-1p102 セシウム蓄積細菌の探索およびセシウム蓄積変異株の作成  
..... 吉岡 潤一, 渡辺 剛, 松本 貴良, ○林 秀謙 (前工大・工)
- 16:00 1P-1p103 線虫を用いた土壌中の Cs 吸収菌の回収プロセスの構築  
..... ○合田 亮<sup>1</sup>, 伊藤 みさご<sup>1</sup>, 星 英之<sup>2</sup>, 倉橋 健介<sup>3</sup>, 徳本 勇人<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪府大院・工・化工, <sup>2</sup> 阪府大院・現シス, <sup>3</sup> 阪府大高専)

- 17:00 1P-1p104 嫌気発酵菌を利用した  $^{137}\text{Cs}$  含有バイオマスの除染  
 .....野本 健太<sup>1</sup>, 伊藤 みさご<sup>1</sup>, 合田 亮<sup>1</sup>, 星 英之<sup>2</sup>, 倉橋 健介<sup>3</sup>, ○徳本 勇人<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪府大院・工・化工, <sup>2</sup> 阪府大院・現シス・環境共生科学, <sup>3</sup> 阪府大高専 )
- 16:00 1P-1p105 カリウム輸送タンパクの人工進化によるセシウム蓄積微生物の創出  
 ..... ○加藤 創一郎<sup>1,2</sup>, 金田 祥宜<sup>1</sup>, 福田 あかね<sup>1</sup>, 北川 航<sup>1,2</sup>, 曾根 輝雄<sup>1</sup>, 浅野 行蔵<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 北大院・農, <sup>2</sup> 産総研・生物プロセス )
- 17:00 1P-1p106 放射性セシウム汚染作物からのセシウム溶出特性とウシルーメン微生物処理・ナノ磁性粒子による除染  
 ..... ○馬場 保徳<sup>1,2</sup>, 日尾 彰宏<sup>2</sup>, 並木 禎尚<sup>3</sup>, 多田 千佳<sup>2</sup>,  
 福田 康弘<sup>2</sup>, 三宅 克英<sup>1</sup>, 齋藤 雅典<sup>2</sup>, 中井 裕<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 石川県大・資源研, <sup>2</sup> 東北大院・農, <sup>3</sup> 了徳寺大・健康 )
- 16:00 1P-1p107 トンネル掘削残土埋立地滲出水のヒ素高蓄積植物によるヒ素除去技術の開発  
 ..... ○黄 毅<sup>1,2</sup>, 宮内 啓介<sup>1</sup>, 菅野 弘樹<sup>1</sup>, 高橋 太雅<sup>1</sup>, 菅原 一輝<sup>2</sup>, 水戸 光昭<sup>3</sup>,  
 成瀬 美樹<sup>4</sup>, 中村 真理子<sup>4</sup>, 門間 聖子<sup>4</sup>, 井上 千弘<sup>2</sup>, 遠藤 銀朗<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 東北学院大・工, <sup>2</sup> 東北大院・環境, <sup>3</sup> 仙台市交通局, <sup>4</sup> 応用地質(株) )
- 17:00 1P-1p108 大腸菌により異種発現した海綿由来シリカ重合酵素の自己集合体形成と機能評価  
 ..... ○中島 一紀, 小栗 秀俊, 川崎 了 ( 北大院・工 )
- 16:00 1P-1p109 大気浄化型壁面緑化における土壤環境の解析  
 ..... ○久保田 謙三, 天保 美咲, 河目 裕介, 西部 洋晴 ( 大和ハウス工業 )
- 17:00 1P-1p110 環境汚染物質 1,4-ジオキサン分解微生物の探索  
 ..... ○佐藤 駿<sup>1</sup>, 高田 真由<sup>2</sup>, 山田 綾華<sup>2</sup>, 倉根 隆一郎<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 中部大院・応生, <sup>2</sup> 中部大・応生 )
- 16:00 1P-1p111 1,4-ジオキサン分解細菌の炭素資化能評価  
 ..... ○小池 至人<sup>1</sup>, 久田 一輝<sup>1</sup>, 黒田 真史<sup>1</sup>, 池 道彦<sup>1</sup>,  
 角田 翼<sup>2</sup>, 井上 大介<sup>2</sup>, 清 和成<sup>2</sup>, 山本 哲史<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪大院・工, <sup>2</sup> 北里大・医, <sup>3</sup> 大成建設 )
- 17:00 1P-1p112 金属腐食に及ぼす硫酸還元菌およびメタン菌の影響  
 ..... ○平野 伸一, 長岡 亨, 松本 伯夫 ( 電中研 )
- 16:00 1P-1p113 環境単離株 FT01 の新規金属腐食メカニズムの解析  
 ..... ○渡辺 宏紀<sup>1</sup>, 稲葉 知大<sup>3</sup>, 宮野 泰征<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 筑波大院・生命環境, <sup>2</sup> 秋田大・理工, <sup>3</sup> 産総研・環境管理 )

### 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 17:00 1P-1p114 人工プロモーターを用いたセルロース系バイオエタノール生産に資する遺伝子組換え酵母の開発  
 ..... ○藤森 一浩, 小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一 ( 産総研 )
- 16:00 1P-1p115 ペントースリン酸経路遺伝子発現の最適化による C5C6 糖同時発酵酵母の ethanol 生産性の向上  
 ..... ○小林 洋介<sup>1</sup>, 藤森 一浩<sup>1</sup>, 佐原 健彦<sup>1</sup>, 鈴木 俊宏<sup>2</sup>, 蒲池 沙織<sup>2</sup>,  
 松鹿 昭則<sup>2</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>, 扇谷 悟<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 産総研・生物プロセス, <sup>2</sup> 産総研・機能化学 )
- 17:00 1P-1p116 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与  
 ..... ○松崎 浩明, 上田 賢一, 山崎 新平, 秦野 琢之 ( 福山大・生命工 )
- 16:00 1P-1p117 サイクリック加水分解法: 新たなバイオエタノール生産工程の確立に向けて  
 ..... ○オリベイラ サヌエ, 大島 淳 ( 長浜バイオ大院・バイオ )
- 17:00 1P-1p118 低コストバイオ燃料開発に向けた、セルロース系資源作物からの非破壊糖取出しを目指して  
 ..... ○米倉 円佳<sup>1</sup>, 青木 直大<sup>2</sup>, 廣瀬 竜郎<sup>3</sup>, 大杉 立<sup>2</sup>, 近藤 聡<sup>1</sup>, 大音 徳<sup>4</sup>  
 ( <sup>1</sup> トヨタ自動車・バイオ・緑化研, <sup>2</sup> 東大院・農生科,  
<sup>3</sup> 農研機構・中央農研, <sup>4</sup> トヨタ自動車・未来研 )

- 16:00 1P-1p119 草本系バイオマス由来ヘミセルロース強力分解菌の探索  
 ..... ○湯下 佳和<sup>1</sup>, 田中 沙季<sup>2</sup>, 松本 帆南<sup>2</sup>, 倉根 隆一郎<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>中部大院・応生, <sup>2</sup>中部大・応生)
- 17:00 1P-1p120 特異的にナノセルロース分解を行う微生物の単離  
 ..... ○高橋 仁志, 大槻 隆司 (山梨大院・医工農・生環)
- 16:00 1P-1p121 草本バイオマスを利用したグルコース生産  
 ..... ○荒木 希和子, 久保 幹 (立命館大・生命)
- 17:00 1P-1p122 発酵熱を利用した熱溶菌性糸状菌からのグルコース生産  
 ..... ○中井 貴久, 森 慶太, 荒木 希和子, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 16:00 1P-1p123 バイオマス細胞壁分解への放線菌フェルラ酸エステラーゼの添加効果  
 ..... ○裏地 美杉, 万 クン, 畑中 唯史 (岡山県生科総研)
- 17:00 1P-1p124 バイオマスと熱溶菌糸状菌を用いたエネルギー生産ルートの確立  
 ..... ○西澤 尚樹, 久保 幹, 荒木 希和子 (立命館大院・生命科学)
- 16:00 1P-1p125 固定化酵母 *Candida magnoliae* を用いたキシリトールの微生物生産  
 ..... ○姜 林涛, 堀内 淳一, 熊田 陽一 (京工繊大院・工学)
- 17:00 1P-1p126 *Kluyveromyces marxianus* におけるキシリトール脱水素酵素の補酵素特異性改変による効果  
 ..... ○鈴木 俊宏<sup>1</sup>, 橋本 智代<sup>1</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>, 松鹿 昭則<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>広島大院・先端物質)
- 16:00 1P-1p127 キシリトール資化性を導く変異型 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株を用いた発酵解析  
 ..... ○谷 龍典, 田口 久貴, 赤松 隆 (崇城大院・工)
- 17:00 1P-1p128 Gas sparging affects acetic acid fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica*  
 ..... ○Harifara Rabemanolntsoa, Piradee Jusakulvjit, Shiro Saka  
 (Dept. Socio-Environ. Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)
- 16:00 1P-1p129 嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* を基盤とした植物バイオマスからの水素ガス生産方法の検討  
 ..... 関 兵馬<sup>1</sup>, 吉田 稜<sup>2</sup>, 三縄 由希子<sup>1</sup>, 粟冠 真紀子<sup>1</sup>, ○木村 哲哉<sup>1</sup>, 粟冠 和郎<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>三重大・生資)
- 17:00 1P-1p130 灌漑用水条件の異なるエジプト産ホホバ種子中の代謝物の変動解析  
 ..... ○藤波 友樹<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1</sup>, Hegazy Adel<sup>2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>近畿大院・生物理工・生工, <sup>2</sup>Univ. Sadat City, Egypt)
- 16:00 1P-1p131 Effect of alkalinity on dry anaerobic digestion of Swine manure in a prototype cylindrical digester  
 ..... ○Hesborn Andole Ondiba, Weiwei Huang, Wei Cai,  
 Ziwen Zhao, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang  
 (Univ. Tsukuba)

ANA クラウンプラザホテル富山 3階ポスター会場 II (ASUKA) (16:00~18:00)

【生体医用工学】

- 17:00 1P-2p132 **B型肝炎ウイルス及びバイオナノカプセルの初期感染機構の解析**  
 ..... ○劉 秋実, 曾宮 正晴, 黒田 俊一 (阪大・産研)
- 16:00 1P-2p133 様々な抗体を提示可能なバイオナノカプセルによる能動的標的化 DDS ナノキャリアの開発  
 ..... ○立松 健司, 李 昊, 飯嶋 益巳, 黒田 俊一 (阪大・産研)
- 17:00 1P-2p134 炎症性疾患治療を指向したマクロファージ機能制御剤の基礎評価  
 ..... ○戸井田 力<sup>1</sup>, 藤田 聡史<sup>1</sup>, 姜 貞勲<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>2</sup>国立循環研セ)
- 16:00 1P-2p135 細胞内薬剤デリバリーのための光溶解性トランスフェリン凝集体の開発  
 ..... ○山口 哲志<sup>1</sup>, 石渡 晟<sup>2</sup>, 南畑 孝介<sup>2</sup>, 山平 真也<sup>1</sup>, 岡本 晃充<sup>2</sup>, 長棟 輝行<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>東大院・工)

- 17:00 1P-2p136 担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布の解明  
 ..... ○鈴木 貴弘<sup>1</sup>, 森田 健太<sup>1</sup>, 西村 勇哉<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大・自科・研究環 )
- 16:00 1P-2p137 イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討  
 ..... ○威 蟠<sup>1</sup>, 天野 由貴<sup>2</sup>, 切田 勝久<sup>2</sup>, 太田 誠一<sup>1</sup>, 伊藤 大知<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大院・医, <sup>2</sup>東大院・工 )
- 17:00 1P-2p138 酸化還元応答性ハイドロゲルを基材とする細胞組織体の形成と機能評価  
 ..... ○神谷 典穂<sup>1,2</sup>, 内藤 翔乃<sup>1</sup>, 香川 元気<sup>1</sup>, 森山 幸祐<sup>3</sup>, 若林 里衣<sup>1</sup>, 南畑 孝介<sup>1</sup>, 後藤 雅宏<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>九大院・工, <sup>2</sup>九大・未来化セ, <sup>3</sup>九大・先端研 )
- 16:00 1P-2p139 治療効果を有する肝臓構築を目指して  
 ..... ○白木川 奈葉, 坂本 裕希, 木村 遥奈, 井嶋 博之 (九大院・工)
- 17:00 1P-2p140 Polymer2 を用いた HEK293 細胞の新しい 3D 培養法構築  
 ..... ○金木 達朗<sup>1</sup>, 林 寿人<sup>1</sup>, 川原 浩治<sup>2</sup>, 西野 泰斗<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>日産化学工業, <sup>2</sup>北九州高専 )
- 16:00 1P-2p141 磁力を利用した *in vitro* 三次元がんモデル：がん細胞浸潤挙動の半自動解析法の開発  
 ..... ○清水 一憲<sup>1</sup>, 山本 修平<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・予防早期医療創成セ )
- 17:00 1P-2p142 3次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪への分化とマイクロティッシュの作製  
 ..... ○宮本 義孝<sup>1,2</sup>, 池内 真志<sup>1</sup>, 野口 洋文<sup>3</sup>, 八木 透<sup>4</sup>, 生田 幸士<sup>1</sup>, 林 崇治<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>名大院・医, <sup>3</sup>琉球大・医, <sup>4</sup>東工大院・情報理工 )
- 16:00 1P-2p143 正常血圧条件下におけるかん流培養を可能とする多層血管モデルの作製と評価  
 ..... ○木下 敬太, 山田 真澄, 関 実 (千葉大院・工)

### 【セル&ティッシュエンジニアリング】

- 17:00 1P-2p144 CHO 細胞を用いた抗体生産プロセスにおける糖鎖構造解析  
 ..... ○森下 明彦<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2</sup>, 大政 健史<sup>3</sup>, 秦 信子<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>株式会社 Ig-M, <sup>2</sup>徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup>阪大院・工 )
- 16:00 1P-2p145 細胞集塊挙動によるヒト間葉系幹細胞の心筋方向への分化指向性誘導  
 ..... ○小川 祐樹, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 17:00 1P-2p146 維持培養および胚様体形成期間中の培地がヒト iPS 細胞の心筋分化誘導に与える影響  
 ..... ○澤登 美空, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋 (山梨大院・総研部)
- 16:00 1P-2p147 ノコダズール処理によるヒト iPS 細胞の心筋分化誘導  
 ..... ○山口 千尋, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋 (山梨大院・総研部)
- 17:00 1P-2p148 タンパク質マイクロファイバーの高効率作製とその細胞培養系への応用  
 ..... ○平松 久卓, 堀 綾香, 矢嶋 祐也, 山田 真澄, 関 実 (千葉大院・工)
- 16:00 1P-2p149 細胞の自己集合化誘導コーティング剤 (CAT) を用いたスキャホールドフリー軟骨リングの簡易作製  
 ..... ○岩井 良輔<sup>1</sup>, 根本 泰<sup>2</sup>, 中山 泰秀<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>岡山理大・技科研, <sup>2</sup>株式会社ブリヂストン, <sup>3</sup>国循セン研・生体医工 )
- 17:00 1P-2p150 細胞膜内面の *in vitro* 解析を指向した細胞膜シートの開発  
 ..... ○泉田 森<sup>1</sup>, 山口 哲志<sup>2</sup>, 三澤 龍志<sup>1</sup>, 山平 真也<sup>1</sup>, 河原 正浩<sup>1</sup>,  
 鈴木 智子<sup>3</sup>, 高木 智子<sup>3</sup>, 佐藤 香枝<sup>3</sup>, 長棟 輝行<sup>1</sup>, 岡本 晃充<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東大院・工, <sup>2</sup>東大・先端研, <sup>3</sup>日本女子大・理 )
- 16:00 1P-2p151 酸素透過性マイクロウェルアレイチップを用いた毛包原基の大量調製  
 ..... ○景山 達斗<sup>1</sup>, 吉村 知紗<sup>2</sup>, 片岡 健<sup>3</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>横国大, <sup>3</sup>岡山理大・理 )

- 17:00** 1P-2p152 マイクロ光造形法と生体適合性金めっき法を用いた立体細胞シートの作製  
 ……○小林 優香<sup>1</sup>, Cordonier Christopher E.J.<sup>2</sup>, 永瀬 史憲<sup>1</sup>, 本間 英夫<sup>2</sup>, 丸尾 昭二<sup>1</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>  
 (1横国大院・工, 2関東学院大・工)
- 16:00** 1P-2p153 スフェロイド積層型バイオ 3D プリンターにより作製した3次元組織についての培地成分・分泌代謝物の一斉分析  
 ……○森 翔太郎<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup> (1金沢大院・自科, 2金沢大・新学術)
- 17:00** 1P-2p154 スフェロイド積層型バイオ 3D プリンターを用いた毛細血管様構造を有する3次元組織の作製  
 ……○和田 亜樹<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup> (1金沢大院・自科, 2金沢大・新学術)
- 16:00** 1P-2p155 新規 CHO 細胞株の樹立  
 ……○岩間 千草<sup>1,5</sup>, 増田 兼治<sup>2,5</sup>, 窪田 みち<sup>1,5</sup>, 堀内 貴之<sup>1,5</sup>, 野中 浩一<sup>2,5</sup>, 上平 正道<sup>3,5</sup>, 大政 健史<sup>4,5</sup>  
 (1株式会社ちとせ研究所, 2第一三共株式会社, 3九大院・工, 4阪大院・工, 5次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)
- 17:00** 1P-2p156 CHO 安定遺伝子座への抗体遺伝子逐次導入による安定高生産株の構築  
 ……○山名 良正<sup>1,2</sup>, 成田 純也<sup>2</sup>, 近藤 雅子<sup>1,2</sup>, 大竹 敦子<sup>1,2</sup>, 鈴木 恵介<sup>1,2</sup>, 河邊 佳典<sup>3</sup>, 上平 正道<sup>3</sup>  
 (1TOTO・総研, 2MAB 組合, 3九大院・工・化工)
- 16:00** 1P-2p157 CRIS-PITCh 法を用いたノックイン CHO 細胞の作製  
 ……○小松 真也<sup>1</sup>, 河邊 佳典<sup>2</sup>, 小松 将大<sup>2</sup>, 井藤 彰<sup>2</sup>, 佐久間 哲史<sup>3</sup>, 中村 崇裕<sup>4</sup>, 山本 卓<sup>3</sup>, 上平 正道<sup>1,2</sup>  
 (1九大院・シス生科, 2九大院・工, 3広島大院・理, 4九大院・農)
- 17:00** 1P-2p158 Cre-loxP による逐次遺伝子組込み法における生産 CHO 細胞株構築の迅速化  
 ……○羽田 毅<sup>1</sup>, 河邊 佳典<sup>1</sup>, 汪 雪<sup>1</sup>, 井藤 彰<sup>1</sup>, 山名 良正<sup>2</sup>, 近藤 雅子<sup>2</sup>, 上平 正道<sup>1</sup>  
 (1九大院・工・化工, 2TOTO・総研)
- 16:00** 1P-2p159 CHO 細胞における安定染色体の遺伝子地図作成と CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ターゲットによる抗体生産株の構築  
 ……○吉富 耕太<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1阪大院・工, 2徳大院・生物資源産業, 3MAB 組合)
- 17:00** 1P-2p160 染色体異数性を持つ抗体生産 CHO 細胞の網羅的遺伝子発現解析  
 ……○田中 翔<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 緒方 法親<sup>3,4</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1阪大院・工, 2徳大院・生物資源産業, 3MAB 組合, 4日本バイオデータ)
- 16:00** 1P-2p161 バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株樹立  
 ……○山野 範子<sup>1,2</sup>, 大政 健史<sup>2,3</sup> (1徳大院・生物資源産業, 2MAB 組合, 3阪大院・工)
- 17:00** 1P-2p162 CHO 細胞を用いたサメ由来重鎖抗体の分泌発現コンストラクトの検討  
 ……○野村 嘉紀<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 香川 悠馬<sup>4</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1阪大院・工, 2徳島大院・生物資源, 3MAB 組合, 4徳島大院・先端技科)
- 16:00** 1P-2p163 Tret1 遺伝子導入による CHO 細胞の抗体凝集抑制と細胞増殖能の改善  
 ……○原田 涼之介<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 黄川田 隆洋<sup>4,5</sup>, 小出 静代<sup>3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1阪大院・工, 2徳大院・生物資源産業, 3MAB 組合, 4農研機構, 5東大院・新領域)
- 17:00** 1P-2p164 免疫系 T 細胞の成熟化シグナルと温感  
 ……○藪内 里実<sup>1</sup>, 大久保 由布<sup>1</sup>, 白 京玉<sup>1</sup>, 星野 邦秀<sup>1,2</sup>, 辻野 義雄<sup>1,2</sup>, 下川 直史<sup>1</sup>, 高木 昌宏<sup>1</sup>  
 (1北陸先端大・マテリアル, 2高砂香料工業株式会社)
- 16:00** 1P-2p165 卵白タンパク質特異的糖鎖改変システムの開発  
 ……森脇 脩一郎, 奥寄 雄也, 浅井 聖也, 土田 将大, ○金岡 英徳, 西島 謙一, 飯島 信司  
 (名大院・工)
- 17:00** 1P-2p166 ニワトリ IFITM の抗ウイルス機能の解析  
 ……奥寄 雄也, 木溪 俊介, 金岡 英徳, ○西島 謙一, 飯島 信司 (名大院・工)

## 【バイオセンシング, 分析化学】

- 16:00 1P-2p167 LC-MS ならびに HPLC-ELSD を用いたアルギン酸不飽和オリゴ糖と DEH の検出  
 ..... ○藤井 玲央奈<sup>1,5</sup>, 三宅 英雄<sup>1,5</sup>, モリ テツシ<sup>2,5</sup>, 田中 礼士<sup>1,5</sup>, 高木 俊幸<sup>3,5</sup>,  
 吉川 裕之<sup>4,5</sup>, 黒田 浩一<sup>3,5</sup>, 植田 充美<sup>3,5</sup>, 柴田 敏行<sup>1,5</sup>  
 (1三重大院・生資, 2早大・理工, 3京大院・農, 4阪大院・工, 5JST・CREST)
- 17:00 1P-2p168 自動プレカラム誘導体化法を利用した HPLC によるアミノ酸のキラル分離  
 ..... ○熊谷 浩樹 (アジレント・テクノロジー)
- 16:00 1P-2p169 LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発  
 ..... ○紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎 (阪大院・工)
- 17:00 1P-2p170 LC-TOFMS を用いた D, L-アミノ酸を含む生理活性アミン類の一斉分析法の開発  
 ..... ○谷口 百優, 紺屋 豊, 福崎 英一郎 (阪大院・工)
- 16:00 1P-2p171 ヘモグロビン A<sub>1c</sub> とレクチン AAL の結合に対する温度の影響  
 ..... ○加畑 真人<sup>1</sup>, 長谷 英理菜<sup>1</sup>, 小林 夕香<sup>2</sup>, 上野 泰<sup>2</sup>, 吉宗 一晃<sup>1</sup>  
 (1日大・生産工, 2J-オイルミルズ・商品開発研究所)
- 17:00 1P-2p172 新規プロテイン A カラムによる免疫グロブリンの迅速定量  
 ..... ○大森 俊昂, 藤井 智, 奥村 晴美, 荒木 康祐, 中谷 茂 (東ソー)
- 16:00 1P-2p173 インスリン存在下における膵β細胞インスリン分泌応答の連続測定  
 ..... ○重藤 元<sup>1,2</sup>, 小野 拓人<sup>3</sup>, 黒田 章夫<sup>3</sup>, 舟橋 久景<sup>1</sup>  
 (1広島大学・サステナセ, 2広島大・グローバルキャリアセ, 3広島大院・先端物質)
- 17:00 1P-2p174 ITO 電極による深海底堆積物由来ストレプトマイセス属微生物の電気回収  
 ..... ○小山 純弘<sup>1</sup>, 西 真郎<sup>1</sup>, 長野 由梨子<sup>1</sup>, 能木 裕一<sup>1</sup>, 秦田 勇二<sup>2</sup>, 坪内 泰志<sup>1</sup>  
 (1海洋研究開発機構, 2埼玉工大・工・生命環境化学)
- 16:00 1P-2p175 Paper-based colorimetric biosensor for antibiotics targeting bacterial protein synthesis  
 ..... Duyen Tran, ○Hideyuki Matsuura, Kazuki Ujiie, Misa Muraoka, Kazuo Harada, Kazumasa Hirata  
 (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)
- 17:00 1P-2p176 デジタル PCR によるサンゴ共生微生物由来 16S rRNA 遺伝子数の精密定量  
 ..... ○竹田 裕貴<sup>1</sup>, 細川 正人<sup>2</sup>, 西川 洋平<sup>1</sup>, 小川 雅人<sup>1</sup>,  
 伊藤 通浩<sup>1</sup>, 須田 彰一郎<sup>3</sup>, 中野 義勝<sup>4</sup>, 竹山 春子<sup>1</sup>  
 (1早大・先進理工, 2JST・さきがけ, 3琉球大・理, 4琉球大・熱帯生物圏研究セ)
- 16:00 1P-2p177 ピコリットル容量の微小液滴を用いた単一微生物からの網羅的な全ゲノム増幅  
 ..... ○西川 洋平<sup>1</sup>, 細川 正人<sup>2,3</sup>, 小川 雅人<sup>1</sup>, 竹山 春子<sup>1,3</sup>  
 (1早大院・先進理工・生医, 2JST・さきがけ, 3早大・ナノライフ創研)
- 17:00 1P-2p178 ヒト皮膚表面における発汗代謝物と微生物分布の可視化  
 ..... ○筒井 聡志<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (1横市大院・生命医, 2理研, 3名大院・生命農学)
- 16:00 1P-2p179 センシング分子を最密充填状態で精密に整列固定化する二次元膜の開発  
 ..... ○飯嶋 益巳, 黒田 俊一 (阪大・産研)
- 17:00 1P-2p180 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによるセイヨウワサビペルオキシダーゼ測定法  
 ..... ○西矢 芳昭<sup>1</sup>, 坂井 華美<sup>1</sup>, 井原 弘絵<sup>1</sup>, 泊 直宏<sup>2</sup>, 山本 佳宏<sup>2</sup>, 谷 敏夫<sup>3</sup>  
 (1摂南大・生命科学, 2京都市産技研, 3バイオエックス)
- 16:00 1P-2p181 自然環境中における気象変動と化学プロファイルの統合的データマイニング  
 ..... ○伊達 康博<sup>1,2</sup>, 篠 阿弥宇<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (1理研・CSRS, 2横市院・生医, 3名大院・生命農)
- 17:00 1P-2p182 噴流圧力による培養細胞の力学特性評価  
 ..... ○田中 信行<sup>1</sup>, 高原 順子<sup>1</sup>, 粟津 茜<sup>1</sup>, 春園 嘉英<sup>2</sup>, 那須 博光<sup>2</sup>, 田中 陽<sup>1</sup>  
 (1理研・生命システム, 2北川鉄工所)

### 【センサー、計測工学】

- 16:00** 1P-2p183 ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を用いたノロウイルスの迅速検出  
 .....○竹村 謙信<sup>1</sup>, Adegoke Oluwasesan<sup>2</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>, 鈴木 哲朗<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化, <sup>2</sup>静岡大グリーン科技研, <sup>3</sup>浜医大・医・医学科)
- 17:00** 1P-2p184 Alloyed L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS quantum dots of two internal structures  
 ..... Oluwasesan Adegoke, ○Enoch Y. Park (Res. Inst. Green Sci. Technol.)
- 16:00** 1P-2p185 抗体相補性決定領域に基づいた揮発性爆発化合物の特異的ペプチドプローブの開発  
 .....○武藤 正記<sup>1,2</sup>, 矢内 健太郎<sup>1,2</sup>, 田中 祐圭<sup>1,2</sup>, 上田 宏<sup>3</sup>,  
 Wang Jin<sup>2,4</sup>, 小野寺 武<sup>2,4</sup>, 都甲 潔<sup>2,5</sup>, 大河内 美奈<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東工大・物質理工, <sup>2</sup>JST・ImPACT, <sup>3</sup>東工大・化学生命科学研究,  
<sup>4</sup>九大・味覚・嗅覚センサ研究開発セ, <sup>5</sup>九大院・シス情)
- 17:00** 1P-2p186 DNA staining nanoparticles for nucleus imaging  
 .....○Chi-Hsien Liu, Min-Han Tsao, Soubhagya Laxmi Sahoo  
 (Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Uni)
- 16:00** 1P-2p187 イメージング質量顕微鏡の食品科学への応用  
 .....○新聞 秀一 (阪大院・工)

## 英語論文の書き方セミナー

### アクセプトされる英語論文の書き方セミナー：英語論文投稿における査読対策

富山国際会議場 2階 B 会場（特別会議室）（16:00～17:30）

講師：西川 マリ（Mary Nishikawa）（カクタス・コミュニケーションズ株式会社）

主催：生物工学教育委員会・英文誌編集委員会

協力：英文校正エディテージ（カクタス・コミュニケーションズ株式会社）

## ランチョンセミナー

### 1LA1 タカラバイオ株式会社

富山国際会議場 3階 A 会場（メインホール）（11:45～12:45）

### 1LC2 株式会社島津製作所

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C 会場（11:45～12:45）

### 1LE3 株式会社エービー・サイエックス

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場（11:45～12:45）

## 第2日 (9月29日)

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です。

| 開始時間  | 講演番号    | 演 題  | 発表者氏名 (所属)<br>○印は講演者を示す |
|---|---------|--|-------------------------|
| <b>受賞講演 (生物工学奨励賞 (江田賞・斎藤賞・照井賞),<br/>生物工学アジア若手賞)</b> |         |  |                         |
| <b>富山国際会議場 3階 A 会場 (メインホール) (13:00~13:20)</b>       |         |  |                         |
| 13:00   | 2A-Ap01 | <b>&lt;生物工学奨励賞 (江田賞)&gt;</b><br>しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来のグルタミンナーゼに関する研究<br>..... ○伊藤 考太郎 (キッコーマン)   | 座長：吉田 聡                 |
| <b>ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場 (13:00~13:20)</b>       |         |  |                         |
| 13:00   | 2A-Ep01 | <b>&lt;生物工学奨励賞 (斎藤賞)&gt;</b><br>セルフリータンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の開発<br>..... ○松浦 友亮 (阪大院・工)   | 座長：福崎 英一郎               |
| <b>ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C 会場 (13:00~13:20)</b>       |         |  |                         |
| 13:00   | 2A-Cp01 | <b>&lt;生物工学奨励賞 (照井賞)&gt;</b><br>キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用<br>..... ○河原 正浩 (東大院・工)   | 座長：大政 健史                |
| <b>ANA クラウンプラザホテル富山 3階 D 会場 (13:00~13:20)</b>       |         |  |                         |
| 13:00   | 2A-Dp01 | <b>&lt;生物工学アジア若手賞&gt;</b><br>Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants<br>..... ○Choowong Auesukaree <sup>1</sup> , Chuenchit Boonchird <sup>2</sup> , Satoshi Harashima <sup>3</sup> ,<br>Prayad Pokethitiyook <sup>1</sup> , Maleeya Kruatrachue <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> Dept. Biol., Fac. Sci., Mahidol Univ., <sup>2</sup> Dept. Biotechnol., Fac. Sci., Mahidol Univ.,<br><sup>3</sup> Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.) | 座長：跡見 晴幸                |

## シンポジウム（午前の部）

### 学会活動が先導する実用化研究・技術 ～学会は産官学の出会いの場となれるか～

富山国際会議場 3階 A会場（メインホール）（9:00～11:00）

- 座長：中澤 昌美
- 9:00 2S-Aa01 ものづくり系工学会での産官学連携  
.....○辻川 正人（阪府大・URA セ）  
座長：大橋 正孝
- 9:30 2S-Aa02 バイオテクノロジーは地域産業に変革をもたらすか!!  
.....○山本 佳宏（京都市産技研 バイオ）  
座長：岩木 宏明
- 10:00 2S-Aa03 機能性食品素材としての酒粕発酵物とショウガ麴の開発  
.....○渡辺 敏郎（園田学園女子大・食物栄養）  
座長：小高 敦史
- 10:30 2S-Aa04 酵母「101H」の開発と泡盛の商品化～シンポジウムから発信した奈良の研究シーズと沖縄の産業  
ニーズ～  
.....○高木 博史（奈良先端大・バイオ）

### 植物代謝工学研究最前線～新産業創出に向けて～

富山国際会議場 2階 B会場（特別会議室）（9:00～11:00）

- 9:00 はじめに  
..... 村中 俊哉  
座長：田口 悟朗
- 9:05 2S-Ba01 テルペノイドの代謝多様性と遺伝子ディスカバリー  
.....○關 光, 福島 エリ オデット, 村中 俊哉（阪大院・工）  
座長：田口 悟朗
- 9:25 2S-Ba02 植物代謝研究に役立つ相関ネットワーク解析（金平糖解析）  
..... 萬年 一斗<sup>1</sup>, 尾形 善之<sup>2</sup>, ○鈴木 秀幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>（公財）かずさ DNA 研・バイオ研究開発, <sup>2</sup>大阪府大・生命環境)  
座長：岡澤 敦司
- 9:45 2S-Ba03 高増殖するタケ培養細胞の物質生産への応用可能性：合理的代謝フロースイッチングによるタケ懸濁細胞のヒドロキシ桂皮酸アミド生合成経路の改変  
.....野村 泰治<sup>1</sup>, 荻田 信二郎<sup>1,2</sup>, ○加藤 康夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>富山県大・生工研セ, <sup>2</sup>県大広島・生命科学)  
座長：岡澤 敦司
- 10:05 2S-Ba04 高度機能分化した植物組織培養の物質生産への活用 -可能性と課題-  
.....○大西 昇, 大川 博志, 間宮 幹士（キリン・基盤研）  
座長：村中 俊哉
- 10:30 2S-Ba05 植物と微生物：イソキノリンアルカロイド生産の展望  
.....○佐藤 文彦（京大院・生命）
- 10:55 おわりに  
..... 村中 俊哉

## Artificial Molecular Design to Create “Neobiological Molecules”

〈国際シンポジウム〉

協賛：AMED 「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C会場 (9:00~11:30)

|       |         |   |
|-------|---------|---|
| 9:00  |         | Opening remarks<br>..... Yuji Ito<br>座長：Yuji Ito  |
| 9:02  | 2S-Ca01 | Engineering by proxy: Monobody-mediated control of enzyme specificity and activity<br>..... Shohei Koide <sup>1,2</sup><br>( <sup>1</sup> Perlmutter Cancer Center, New York Univ Langone Medical Center,<br><sup>2</sup> Dept Biochem & Mol Biol, Univ of Chicago)<br>座長：Yuji Ito          |
| 9:27  | 2S-Ca02 | Application of next-generation sequencing to antibody engineering<br>..... Aerin Yoon, Sanghoon Lee, Soohyun Kim, Duck-kyun Yoo, Hyroi Kim, Junho Chung<br>(Seoul National University College of Medicine)<br>座長：Yuji Ito   |
| 9:52  | 2S-Ca03 | Self-assembling supramolecular nano-architectures created from <i>de novo</i> protein nano-building blocks<br>..... Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, Ryoichi Arai (Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)   |
| 10:07 | 2S-Ca04 | 〈招待講演 (韓国生物工学会)〉<br>Marine-derived biosilicification: Silica-forming proteins and their applications<br>..... Mi Ran Ki, Ki Baek Yeo, Sung Ho Kim, Jong Ki Kim, Kho My Nguyen, Van Pham, Seung Pil Park<br>(Dept. Biotechnol. and Bioinfo. Sch. Sci. Tech., Korea Univ.)<br>座長：Ryoichi Arai |
| 10:27 | 2S-Ca05 | cDNA display method and its applications for in vitro selection of functional peptides<br>..... Naoto Nemoto<br>(Grad. Sch. Sci. & Eng., Saitama Univ.)<br>座長：Ryoichi Arai  |
| 10:47 | 2S-Ca06 | RNA as a promising biopolymer to generate neobiological structures and functions<br>..... Yoshiya Ikawa (Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)  |
| 11:07 | 2S-Ca07 | 〈招待講演 (韓国生物工学会)〉<br>Biomolecule building blocks for memory device development<br>..... Hyun Ho Lee<br>(Myongji University)  |
| 11:27 |         | Closing remarks<br>..... Ryoichi Arai   |

## Japan-Korea Joint Symposium “Advancements in Medical Engineering Using Nano- and Micro-biotechnology”

〈国際シンポジウム〉

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 D会場 (9:00~11:30)

|      |         |  |
|------|---------|--|
| 9:00 |         | Opening remarks<br>..... Enoch Y. Park<br>座長：Enoch Y. Park                                       |
| 9:05 | 2S-Da01 | NanoBiosensors for biomedical applications<br>..... Eiichi Tamiya (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.) |

座長：Enoch Y. Park

- 9:20** 2S-Da02 Nanobioelectronic device toward biocomputing system  
 .....○Jeong-Woo Choi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea,  
<sup>2</sup>Reserach Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)  
 座長：Enoch Y. Park
- 9:40** 2S-Da03 Biomedical application of microfluidic device with low cost flow control  
 .....○Yuzuru Takamura (Sch. Mater. Sci., JAIST)
- 10:00** Break
- 座長：Eiichi Tamiya
- 10:10** 2S-Da04 Formation of cellular sticker on extracellular matrix network and its potential medical application  
 .....○Kwanwoo Shin<sup>1,2</sup>, Youhwan Kim<sup>1,2</sup>, Serin Lee<sup>1,2</sup>, Keelyong Lee<sup>1,2</sup>, Sojung Nam<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Chemistry and Inst. of Biol. Interf., Sogang Univ., Korea,  
<sup>2</sup>Research Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)  
 座長：Eiichi Tamiya
- 10:30** 2S-Da05 Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip  
 .....○Tatsuhiko Ozawa, Hiroyuki Kishi, Atsushi Muraguchi  
 (Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Pharm. Sci., Univ. Toyama)  
 座長：Eiichi Tamiya
- 10:50** 2S-Da06 A soft microfluidic device as an in vitro model for studying mechanobiology of tubular organs  
 .....Hyeonji Yu<sup>1,2</sup>, Dongwon Kang<sup>1,2</sup>, Kwangin Shin<sup>1</sup>, Minji Hwang<sup>1,2</sup>, ○Jungwook Kim<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea,  
<sup>2</sup>Res. Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Korea)
- 11:10** 2S-Da07 <招待講演（韓国生物工学会）> 座長：Eiichi Tamiya  
 Aptamer-based strategies for biosensing and switching of DNA polymerase  
 .....○Hyun Gyu Park  
 (Dept. Chem. Biomol. Eng., Korea Adv. Inst. Sci. Technol.)
- 11:25** Closing remarks  
 .....Eiichi Tamiya

### 新規な核酸関連酵素の開発とその産業応用

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場 (9:00~11:00)

座長：保川 清

- 9:00** はじめに  
 ..... 藤原 伸介  
 座長：藤原 伸介
- 9:10** 2S-Ea01 新規 3 酵素の組み合わせによる cDNA 合成技術の開発  
 ..... ○保川 清 (京大院・農)  
 座長：藤原 伸介
- 9:30** 2S-Ea02 デジタル PCR の高感度化と臨床診断への応用  
 ..... ○柳原 格, 名倉 由起子, 吉村 芳修 (大阪母子保健総合医療セ研)  
 座長：藤原 伸介
- 9:45** 2S-Ea03 CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術開発から学ぶこと  
 ..... ○石野 良純 (九大院・農)  
 座長：保川 清
- 10:05** 2S-Ea04 核酸分解酵素の組み合わせによる迅速なゲノム合成手法の開発  
 ..... ○板谷 光泰 (慶應大先端生命研)

座長：保川 清

- 10:25 2S-Ea05 Point of care testing を志向した多項目遺伝子検査  
 ..... ○佐野 創太郎, 兼崎 祐介, 宮本 重彦 (カネカ)  
 座長：保川 清
- 10:40 2S-Ea06 簡便な遺伝子検出法「NASBA - 核酸クロマト法」の原理とその応用  
 ..... ○宇治家 武史, 林 司 (カインソ)  
 座長：藤原 伸介
- 10:55 おわりに (総括)  
 ..... 保川 清

## シンポジウム (午後の部)

### 有用微生物の農作物への新しい展開とその将来像

富山国際会議場 3階 A 会場 (メインホール) (13:30~15:30)

- 13:30 はじめに  
 ..... 高木 忍  
 座長：高木 忍
- 13:35 2S-Ap01 植物病害に対する微生物農薬の研究開発の現状および今後の展望  
 ..... ○吉田 重信 (農研機構・中央農研)  
 座長：安枝 寿
- 14:05 2S-Ap02 植物の免疫システムと共棲微生物を介した環境適応  
 ..... ○西條 雄介, 晝間 敬 (奈良先端大・バイオ)  
 座長：松山 彰収
- 14:30 2S-Ap03 水生植物由来 PGPB の作用機構と農作物への利用可能性  
 ..... ○森川 正章, 三輪 京子 (北大院・環境)  
 座長：石井 正治
- 14:55 2S-Ap04 *Trichoderma asperelloides* SKT-1 株のイネ種子消毒剤としての開発と企業化  
 ..... ○渡辺 哲 (クミアイ化学工業株式会社)
- 15:25 おわりに  
 ..... 石井 正治

### バイオエンジニアリングにおける分析科学の新たな展開

富山国際会議場 2階 B 会場 (特別会議室) (13:30~15:30)

- 13:30 はじめに  
 ..... 座古 保  
 座長：座古 保
- 13:34 2S-Bp01 新たな分析試薬としての二重鎖 DNA 担持ナノ粒子  
 ..... ○前田 瑞夫 (理研・前田バイオ工学)
- 14:04 2S-Bp02 <招待講演 (韓国生物工学会)> 座長：座古 保  
 Separation efficiency of DNA-protein conjugates via free-solution capillary electrophoresis  
 ..... ○Jong-In Won, Dong Hyun Kim (Dept. Chem. Eng., Hongik Univ., Korea)

座長：座古保

- 14:24 2S-Bp03 人工アロステリック酵素の創出による各種高感度ホモジニアス免疫測定法の開発  
 ..... ○上田 宏<sup>1</sup>, 蘇 九龍<sup>1</sup>, 董 金華<sup>1</sup>, 岩井 宏徒<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>東工大・化生研, <sup>2</sup>東大院・工 )
- 14:42 2S-Bp04 臨床検査におけるバイオ分析技術の実用化  
 ..... ○村上 淳 (アークレイ)  
 座長：上田 宏
- 15:12 2S-Bp05 非天然糖を用いた糖タンパク質品質管理系の機能解析  
 ..... ○迫野 昌文 (富山大院・理工)
- 15:28 おわりに  
 ..... 迫野 昌文

### 2D/3D プリントを用いる細胞操作の可能性

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C 会場 (13:30~15:30)

座長：境 慎司

- 13:30 2S-Cp01 Tissue Engineering のためのバイオプリンティングの戦略と今後の課題  
 ..... ○中村 真人<sup>1</sup>, 杉本 和之<sup>1</sup>, 塚本 佳也<sup>1,2</sup>, 吉田 真人<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山大院・理工, <sup>2</sup>阪大院・生命機能 )
- 13:55 2S-Cp02 細胞運動を評価する遺伝子導入細胞マイクロアレイ  
 ..... ○藤田 聡史 (産総研・バイオメディカル)  
 座長：藤田 聡史
- 14:01 2S-Cp03 インクジェットプリンティングの細胞凍結保存への応用  
 ..... ○秋山 佳丈 (信州大・繊維)  
 座長：藤田 聡史
- 14:08 2S-Cp04 西洋わさび由来ペルオキシダーゼによる架橋反応を利用した 3D バイオプリンティング  
 ..... ○境 慎司<sup>1</sup>, 田谷 正仁<sup>1</sup>, 中村 真人<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>阪大院・基礎工, <sup>2</sup>富山大院・理工 )
- 14:15 2S-Cp05 バイオ分野へのインクジェット技術の応用  
 ..... ○山口 修一 (株式会社マイクロジェット)  
 座長：秋山 佳丈
- 14:40 2S-Cp06 細胞の微小環境制御に基づいた組織工学  
 ..... ○松崎 典弥, 明石 満 (阪大院・工・応化)  
 座長：中村 真人 (司会)
- 15:05 パネルディスカッション  
 ..... パネリスト (全発表者)

### 10th Japan-Korea Biomass Symposium

〈国際シンポジウム〉

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 D 会場 (13:30~15:30)

座長：Yutaka Tamaru

- 13:30 2S-Dp01 Bioenergy and chemicals from sustainable biomass resources  
 ..... Hah Young Yoo, Dong Sup Kim, Ju Hun Lee, Soo Kweon Lee, ○Seung Wook Kim  
 (Dept. Chem. Biological Eng., Korea Univ)

座長：Yutaka Tamaru

- 14:00 2S-Dp02 Isolation of biorefinery enzymes for brown macroalgae degradation from bacterial metagenome  
 .....○Tetsushi Mori<sup>1</sup>, Mami Takahashi<sup>1</sup>, Yumiko Yamada<sup>1</sup>, Toshiyuki Shibata<sup>2</sup>, Toshiyuki Takagi<sup>3</sup>,  
 Reiji Tanaka<sup>2</sup>, Hideo Miyake<sup>2</sup>, Kouichi Kuroda<sup>3</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>3</sup>, Haruko Takeyama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup> Fac. Sci. and Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup> Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>3</sup> Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

座長：Yutaka Tamaru

- 14:30 2S-Dp03 Biological saccharification by anaerobic thermophilic bacteria  
 .....○Akihiko Kosugi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup> JIRCAS, <sup>2</sup> Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

座長：Yutaka Tamaru

- 15:00 2S-Dp04 Designer microbes equipped with nano-scale protein complexes  
 ..... Jeong Eun Hyeon, ○Sung Ok Han  
 (Dept. Biotechnol., Korea Univ.)

### 微生物の潜在能力に注目した有用二次代謝産物の「ものづくり」戦略

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場 (13:30~15:30)

- 13:30 はじめに  
 ..... 荒川 賢治  
 座長：荒川 賢治
- 13:35 2S-Ep01 抗生物質の濃度依存的現象「抗生物質ホルミシス」の理解と応用  
 ..... ○保坂 毅 (信州大・バイオメディカル研)  
 座長：荒川 賢治
- 13:57 2S-Ep02 Application of advanced NMR techniques for analysis of actinobacterial metabolism  
 .....○Dana Ulanova, Masashi Tsuda  
 (Dept. Mar. Resour. Sci., Fac. Agric. Mar. Sci., Kochi Univ.)  
 座長：荒川 賢治
- 14:19 2S-Ep03 多価不飽和脂肪酸合成酵素の機能解析  
 ..... 林 祥平<sup>1</sup>, ○佐藤 康治<sup>2</sup>, 氏原 哲朗<sup>3</sup>, 大利 徹<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup> 北大院・総合化学, <sup>2</sup> 北大院・工, <sup>3</sup> 協和発酵バイオ)  
 座長：大利 徹
- 14:41 2S-Ep04 物質生産を志向した未利用遺伝子の発掘と宿主の改変  
 ..... ○鮒 信学 (静県大・食栄)  
 座長：大利 徹
- 15:03 2S-Ep05 放線菌二次代謝生合成・制御系の合理的改変による休眠二次代謝の発掘  
 ..... ○荒川 賢治 (広島大院・先端物質)
- 15:25 おわりに  
 ..... 大利 徹

### 若手会口頭発表

富山国際会議場 2階 B 会場 (特別会議室) (16:00~18:00)

若手会が選定した博士後期課程学生による口頭発表です。

(ポスター 3P-2a176~184 参照)

## 一般講演

富山国際会議場 2階ポスター会場 I (16:00~18:00)

### 【酵素学, 酵素工学】

- 16:00** 2P-1p001 高基質親和性を有する好熱性光合成細菌由来サルコシノキシダーゼ  
..... ○竹本 淳一, 山本 眞知, 加納 周作, 中野 祥平, 西矢 芳昭 (摂南大・生命科学)
- 17:00** 2P-1p002 ピルビン酸オキシダーゼ/酢酸菌キナーゼ法による実用的 ATP 再生法  
..... ○北岡 本光, 西本 完 (農研機構)
- 16:00** 2P-1p003 高比活性 L-グルタミン酸オキシダーゼの異種発現と酵素学的性質  
..... ○林 優花<sup>1</sup>, 野本 健斗<sup>1</sup>, 長南 圭介<sup>1</sup>, 酒瀬川 信一<sup>2</sup>, 杉森 大助<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福島大・共生システム理工, <sup>2</sup>旭化成ファーマ)
- 17:00** 2P-1p004 FMO 法と QM/MM 法による D-アミノ酸オキシダーゼの反応機構の理論的検討  
..... ○阿部 幸浩<sup>1</sup>, 庄司 光男<sup>2</sup>, 浅野 泰久<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>東洋紡, <sup>2</sup>筑波大学・計算科学研究セ, <sup>3</sup>富山県大・生工研セ)
- 16:00** 2P-1p005 アミノアシルプロリン合成におけるピロフォスファターゼの効果と菌体反応系での生産  
..... ○鈴木 伸<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研)
- 17:00** 2P-1p006 Fatty acyl-AMP リガーゼを利用した脂肪酸アミド合成法の開発  
..... ○平井 健吾<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研)
- 16:00** 2P-1p007 ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) 由来メタロプロテアーゼの遺伝子クローニング  
..... ○福田 泰久, 大庭 将矢, 藤井 謙吾, 白坂 憲章 (近畿大・農)
- 17:00** 2P-1p008 エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの非触媒領域の酸化が及ぼす基質特異性への影響  
..... ○東海 彰太<sup>1</sup>, 有馬 二郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院・連農, <sup>2</sup>鳥取大・農)
- 16:00** 2P-1p009 *Brevundimonas diminuta* 由来のコバルト依存性 L-アミノ酸アミダーゼの X 線結晶構造解析  
..... ○米田 英伸<sup>1</sup>, 泉 厚志<sup>2</sup>, 浅野 泰久<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>富山県大・工, <sup>2</sup>JST, ERATO)
- 17:00** 2P-1p010 黄麹菌 D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ(DamA)の機能解析とアミノリシス反応に対する溶媒の影響  
..... 森田 (松下) 真由美, 服部 領太, 鈴木 聡, ○楠本 憲一 (農研機構 食品研究部門)
- 16:00** 2P-1p011 *Candida antarctica* lipase A の組換え大腸菌での菌体外生産  
..... ○服部 菜月, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾 (名大院・生命農学)
- 17:00** 2P-1p012 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析  
..... ○長谷 成記<sup>1</sup>, 中山 久之<sup>1</sup>, 小坂 恵<sup>2</sup>, 玉田 太郎<sup>3</sup>, 上村 一雄<sup>1</sup>, 金尾 忠芳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山大院・環境生命, <sup>2</sup>岡山大院・自科, <sup>3</sup>国立量子科技研)
- 16:00** 2P-1p013 *Pseudomonas cichorii* 由来組換え D-タガトース 3-エピメラーゼを用いたデオキシケトヘキソースのエピ化反応  
..... ○熊谷 拓也<sup>1</sup>, 吉原 明秀<sup>2</sup>, 秋光 和也<sup>2</sup>, フリート ジョージ W.J.<sup>3</sup>, 何森 健<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>香川大学院 農学研究科, <sup>2</sup>香川国際希少糖研究教育機構, <sup>3</sup>オックスフォード大学)
- 17:00** 2P-1p014 ナイロン加水分解酵素のサブユニット会合と熱安定化機構の解析  
..... ○伊東 雅人<sup>1</sup>, 衣笠 凌<sup>1</sup>, 羽田 圭吾<sup>1</sup>, 大塚 裕斗<sup>1</sup>, 竹原 一起<sup>1</sup>, 重田 育照<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県立大学・工・応化, <sup>2</sup>筑波大・計算科学研究センター)
- 16:00** 2P-1p015 有機溶媒中でのナイロンの酵素分解  
..... ○岡崎 秀明, 伊東 雅人, 生越 大輔, 竹原 一起, 武尾 正弘, 根来 誠司  
(兵庫県大院・工)

## 【タンパク質工学】

- 17:00 2P-1p016 インフルエンザウイルス A (H5N1)由来のヘマグルチニンと受容体結合解析  
 ..... ○鹿島 諒人<sup>1</sup>, 吉田 佐和子<sup>1</sup>, 尾形 慎<sup>2</sup>, 宮崎 剛重<sup>1,3</sup>, 加藤 竜也<sup>1,3</sup>, 朴 龍洙<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup> 静大院・農・応生化, <sup>2</sup> 福島高専, <sup>3</sup> 静大グリーン科学技術研 )
- 16:00 2P-1p017 **Functional analysis of Kup transport system in *Escherichia coli***  
 ..... ○Ellen, Naomi Hoshi, Yi-Hsin Su, Kei Nanatani, Shin Hamamoto, Nobuyuki Uozumi  
 (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)
- 17:00 2P-1p018 *Serratia marcescens* type 1 secretion system による HasA 分泌機構の解明  
 ..... ○山下 純平<sup>1</sup>, 小出 (吉田) 静代<sup>2</sup>, 中西 智美<sup>1</sup>, 市原 拓巳<sup>1</sup>, 辻 明彦<sup>2,3</sup>, 大森 謙司<sup>4</sup>, 湯浅 恵造<sup>2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup> 徳島大院・先端技科, <sup>2</sup> 徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup> 徳島大・生物資源, <sup>4</sup> 名大院・創薬科学 )
- 16:00 2P-1p019 接着性ナノファイバータンパク質 AtaA の分泌を促進するタンパク質 TpgA の発見  
 ..... ○吉本 将悟, 石川 聖人, 廣重 竜太, 鈴木 淳巨, 堀 克敏 (名大院・工)
- 17:00 2P-1p020 オオミジンコにおける組換えタンパク質の卵への輸送系の確立  
 ..... ○辻 勇祐, 加藤 泰彦, 渡邊 肇 (阪大院・工)
- 16:00 2P-1p021 小胞体内在分子シャペロン存在下におけるアミロイドベータの凝集挙動解析  
 ..... ○北内 健太, 迫野 昌文 (富山大院・理工)
- 17:00 2P-1p022 ドラッグデリバリーを目指したシャペロニン GroEL/ES 複合体の応用  
 ..... ○依田 ひろみ, 高村 岳樹, 小池 あゆみ (神奈川工大院, 工, 応用バイオ)
- 16:00 2P-1p023 静電相互作用による小分子-タンパク質共結晶の作製  
 ..... ○塚本 啓介<sup>1</sup>, 南畑 孝介<sup>2</sup>, 安達 基泰<sup>3</sup>, 清水 瑠美<sup>3</sup>, 黒木 良太<sup>4</sup>, 長棟 輝行<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 東大院・工, <sup>2</sup> 九大院・工, <sup>3</sup> 量研機構, <sup>4</sup> 原子力機構 )
- 17:00 2P-1p024 N 末端ペプチドタグによる難発現タンパク質発現増大効果の応用と機構解析  
 ..... ○加藤 晃代, 中野 秀雄 (名大院・生命農学)
- 16:00 2P-1p025 超安定化二量体新規人工蛋白質 Super WA20 (SUWA)の創製と自己組織化蛋白質ナノブロック複合体構築  
 ..... ○木村 尚弥, 小林 直也, 新井 亮一 (信州大・繊維)
- 17:00 2P-1p026 金属結合人工タンパク質の構造解析  
 ..... ○鎌田 健一<sup>1</sup>, Voet Arnout<sup>2</sup>, Tama Jeremy<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 横浜市大院・生命医科学, <sup>2</sup> Dept. Chem., KU Leuven. )
- 16:00 2P-1p027 イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼの内毒素中和メカニズムの解明  
 ..... ○落合 秋人, 渡邊 和史, 菅井 寛, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)

## 【抗体工学】

- 17:00 2P-1p028 スプライシング因子過剰発現による B 細胞株における抗体遺伝子変異の増強  
 ..... ○太田 愛美, 西山 由美子, 清水 俊雄, 植月 英智, 川口 祐加,  
 仲尾 祐輝, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹  
 (岡山大院・自科)
- 16:00 2P-1p029 *Serratia marcescens* type 1 secretion system を用いた大腸菌による 1 本鎖抗体分泌系の構築  
 ..... ○浜垣 秀平<sup>1</sup>, 高木 大地<sup>2</sup>, 市原 拓巳<sup>2</sup>, 辻 明彦<sup>3</sup>, 大森 謙司<sup>4</sup>, 湯浅 恵造<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup> 徳島大院・先端技科, <sup>2</sup> 徳島大・工, <sup>3</sup> 徳島大・生物資源, <sup>4</sup> 名大院・創薬科学 )
- 17:00 2P-1p030 CHO 細胞における PD1a4 の抗体産生に及ぼす影響  
 ..... ○小松 圭<sup>1</sup>, 公文 健人<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2</sup>, 大政 健史<sup>3</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 農工大院・工, <sup>2</sup> 徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup> 阪大院・工 )
- 16:00 2P-1p031 新規抗体-酵素融合タンパク質(Zipbodyzyme)の開発  
 ..... ○中野 秀雄, 森 昭博, 加藤 晃代, 兒島 孝明 (名大院・生命農学)
- 17:00 2P-1p032 細胞表面 FIA 法とイムノチャンバーを用いる抗体高分泌細胞の 1 細胞育種  
 ..... ○良元 伸男, 黒田 俊一 (阪大・産研)

- 16:00** 2P-1p033 ファージ提示法を利用した CDR 模倣ペプチドライブラリーの構築  
 ..... ○柳沢 美貴, 二井手 哲平, 服部 峰充, 中澤 光, 熊谷 泉, 梅津 光央  
 (東北大院・工)
- 17:00** 2P-1p034 シガトキシン 2 に対するウサギモノクローナル抗体の取得  
 ..... ○森下 しおり, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄 (名大院・生命農学)
- 16:00** 2P-1p035 蛍光免疫センサー Quenchbody によるがん抗原タンパク質 HER2 の検出  
 ..... ○岡 裕也<sup>1</sup>, 鄭 熙陳<sup>2</sup>, 董 金華<sup>2</sup>, 上田 宏<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>東工大・化生研)
- 17:00** 2P-1p036 抗体の足場構造への変異導入が特異性に与える影響  
 ..... ○中山 純一<sup>1</sup>, 服部 峰充<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 金子 美華<sup>2</sup>, 加藤 幸成<sup>2</sup>, 熊谷 泉<sup>1</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>東北大院・医)
- 16:00** 2P-1p037 抗体ダイレクトクローニング法による組換え抗体の樹立  
 ..... ○加藤 三恵子<sup>1</sup>, 羽生 義郎<sup>2</sup> (<sup>1</sup>バイオピーク, <sup>2</sup>産総研)

### 【発酵生理学, 発酵工学】

- 17:00** 2P-1p038 好熱菌発酵産物を給与したブタにおける腸内乳酸菌叢の変化  
 ..... ○吉川 翔太<sup>1</sup>, 宮本 浩邦<sup>1,2,3</sup>, 須田 互<sup>2,4</sup>, 新名 俊行<sup>5</sup>,  
 井藤 俊行<sup>5</sup>, 大野 博司<sup>6</sup>, 服部 正平<sup>4,7</sup>, 児玉 浩明<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>千葉大院・融合, <sup>2</sup>慶応大・医, <sup>3</sup>サーマス, <sup>4</sup>東京大院・新領域,  
<sup>5</sup>京葉プラントエンジニアリング, <sup>6</sup>理研・IMS, <sup>7</sup>早稲田大院・先進理工)
- 16:00** 2P-1p039 Bioluminescence and electrochemical activities of *Vibrio fischeri* in batch and continuous cultures  
 ..... ○Hyung Joo Kim<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>,  
 Hak Jin Song<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>, Wu-Young Jeong<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)
- 17:00** 2P-1p040 麹菌におけるタンパク質高発現システムの構築  
 ..... ○佐藤 伊純, 山崎 将太郎, 出村 拓, 加藤 晃 (奈良先端大・バイオ)
- 16:00** 2P-1p041 土壌から分離した油脂高生産菌 *Rhodospiridium paludigenum* 1164 株の評価  
 ..... ○真野 潤一, 橘田 和美, 北岡 本光 (農研機構・食研)
- 17:00** 2P-1p042 *Pseudozyma antarctica* 由来リパーゼを利用したマンノシルエリスリトールリピッド高生産技術の開発  
 ..... ○雑賀 あずさ<sup>1</sup>, 小池 英明<sup>2</sup>, 福岡 徳馬<sup>1</sup>, 山本 周平<sup>3</sup>, 岸本 高英<sup>3</sup>, 森田 友岳<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>東洋紡(株)・敦賀バイオ)
- 16:00** 2P-1p043 酸素供給が Sophorolipid 生産に与える影響  
 ..... ○生越 克典, 三輪 秀和, 平田 善彦 (サラヤ株式会社)
- 17:00** 2P-1p044 油糧酵母 *Pseudozyma hubeiensis* を用いたグルコース・キシロース・アラビノース同時発酵  
 ..... ○谷村 あゆみ<sup>1</sup>, 高島 昌子<sup>2</sup>, 杉田 隆<sup>3</sup>, 遠藤 力也<sup>2</sup>,  
 大熊 盛也<sup>2</sup>, 岸野 重信<sup>1</sup>, 島 純<sup>4</sup>, 小川 順<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>理研・BRC-JCM, <sup>3</sup>明葉大・薬, <sup>4</sup>龍大・農)
- 16:00** 2P-1p045 *Moniliella megachiliensis* の浸透圧ストレス適応における ROS 産生とポリオール生成  
 ..... ○岩田 悠志<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>1,2</sup>, 荻原 淳<sup>1,2</sup>, 春見 隆文<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>日大・生資科, <sup>2</sup>日大院・生資科・生資利用)
- 17:00** 2P-1p046 PUT4 遺伝子導入酵母株の脂肪酸組成の変化  
 ..... ○三木 健夫, 村松 昇 (山梨大院・医工総)
- 16:00** 2P-1p047 醸造酵母ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子破壊株の清酒醸造特性  
 ..... ○富本 和也, 赤尾 健, 福田 央 (酒総研)
- 17:00** 2P-1p048 高濃度エタノールストレスによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母 *BTN2* の解析とその応用  
 ..... 加藤 沙枝, 山内 雪菜, ○井沢 真吾 (京工織大院・工芸科学)

- 16:00 2P-1p049 高濃度バニリンストレスによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母 *VIE1* の解析  
..... ○Nguyen Trinh TM, 石田 陽子, 井沢 真吾 (京工織大院・工学科学)
- 17:00 2P-1p050 花酵母による廃牛乳を基質とした高機能微生物タンパク (SCP) 生産  
..... ○大塚 光雄<sup>1</sup>, 清 啓自<sup>1</sup>, 茂野 俊也<sup>2</sup>, 中島 敏明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>つくば環微研)
- 16:00 2P-1p051 *N*-アセチルグルコサミン資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* の特性解析  
..... ○猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦 (神戸大院・科)
- 17:00 2P-1p052 酵母表層への酵素立体的配置技術の開発  
..... ○黒野 浩幹, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦 (神戸大院・科)
- 16:00 2P-1p053 定量プロテオミクスを用いた出芽酵母中心代謝安定化機構の解析  
..... ○松田 史生, 富田 淳美, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 17:00 2P-1p054 抗生物質生産株の新規な固/液界面スクリーニング法  
..... ○小田 忍, 林 優佑, 大澤 果穂, 大箸 信一 (金工大・ゲノム研)

### 【代謝工学】

- 16:00 2P-1p055 大腸菌を用いたコリスミ酸派生化合物合成プラットフォームの開発  
..... ○野田 修平, 白井 智量, 近藤 昭彦 (理研・環境資源)
- 17:00 2P-1p056 低温菌シンプル触媒におけるアスパラギン酸生産  
..... ○羅 宮臨風, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一 (広島大院・先端物質)
- 16:00 2P-1p057 シンプル酵素触媒構築を目指した低温菌における鉄誘導型プロモーターの探索  
..... ○土井 和博, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一 (広島大院・先端物質)
- 17:00 2P-1p058 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の発酵生産収率向上のための大腸菌の代謝工学的改変  
..... ○濱野 雄大<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>,  
片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科,  
<sup>4</sup>長岡技科大, <sup>5</sup>日大・生資科, <sup>6</sup>農工大院・工, <sup>7</sup>森林総合研)
- 16:00 2P-1p059 BGL 提示大腸菌に適した代謝改変戦略を用いたセロビオースからのプトレシン生産  
..... ○田中 勉, 西川 弘樹, 近藤 昭彦 (神戸大院・工)
- 17:00 2P-1p060 メバロン酸生産大腸菌株の定常期における代謝状態の解明  
..... ○増田 亜美, 戸谷 吉博, 徳山 健斗, 坂野 聡美, 吉川 勝徳, 清水 浩  
(阪大院・情報)
- 16:00 2P-1p061 *in silico* 代謝シミュレーションと実験室進化実験の統合によるコハク酸高生産大腸菌の構築  
..... ○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 17:00 2P-1p062 イソプロパノール生産向上のための代謝システムの数理解析  
..... ○藤田 純孝<sup>1</sup>, 濱田 浩幸<sup>2</sup>, 岡本 正宏<sup>2</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>九大院・農)
- 16:00 2P-1p063 糖代謝系遺伝子の破壊による *Citrobacter freundii* IFO13545 のバイオ凝集剤生産の改善  
..... ○柏 雅美<sup>1</sup>, 宮本 弘毅<sup>1</sup>, 池本 啓史<sup>1</sup>, 木村 和幸<sup>2</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>(株)兵庫分析センター)
- 17:00 2P-1p064 *Synechocystis* sp.PCC 6803 の暗・嫌気条件でのカリウムイオン添加による有機酸生産への影響  
..... ○川村 優樹, 上田 紗季子, 小山内 崇 (明治大・農)
- 16:00 2P-1p065 出芽酵母の *PHO13* 欠損はアセトアルデヒド耐性を強化する  
..... ○高木 哲史, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大・応生科)
- 17:00 2P-1p066 Thiamine: an important factor for acetaldehyde tolerance in the budding yeast  
..... ○Annisyia Zarina Putri, Nodoka Kubota, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

- 16:00 2P-1p067 *Pichia methanolica* グルコース抑制解除株を用いた AOD アイソザイムの発現制御機構の解析  
 ..... ○土井 遼平, 蓮實 涼子, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大・応生科)
- 17:00 2P-1p068 イソブタノール生産酵母の構築: オルガネラ局在の検討  
 ..... ○森田 啓介<sup>1</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>, 伊田 賢吾<sup>3</sup>, 石井 純<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>3</sup>, 清水 浩<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪大院・情報, <sup>2</sup> 神戸大・自科・研究環, <sup>3</sup> 神戸大院・工 )

### 【醸造学, 醸造工学】

- 16:00 2P-1p069 純米酒中の  $\alpha$ -EG 生産の研究  
 ..... ○橋本 弓加<sup>1</sup>, 徳田 耕二<sup>2</sup>, 尾関 健二<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 金工大・ゲノム研, <sup>2</sup> 車多酒造 )
- 17:00 2P-1p070 ビール醸造における各種糖質添加の影響  
 ..... ○木本 裕, 山根 健司, 藤本 佳則, 小川 浩一 (日本食品化工・研究所)
- 16:00 2P-1p071 LC/MS による非ラベル化遊離アミノ酸分析法の確立と清酒酵母の系統によるアミノ酸取込の違い  
 ..... ○清野 珠美, 廣岡 青央 (京都市産技研)
- 17:00 2P-1p072 難消化性澱粉分解活性を有する酵素の高温登熟障害米消化能について  
 ..... ○伊藤 俊彦, 野口 巧実, 大友 敬太郎, 大阪 朝美, 藤田 直子, 橋爪 克己  
 (秋田県立大・生資科)
- 16:00 2P-1p073 GC×GC-TOFMS で取得した揮発性成分プロファイルと清酒の「押し味」の相関解析  
 ..... ○玉田 佳大<sup>1</sup>, 西村 泰央<sup>2</sup>, 大東 功承<sup>1</sup>, 西本 遼<sup>1</sup>, 浅井 拓也<sup>1</sup>, 山下 伸雄<sup>1</sup>, 明石 貴裕<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 白鶴酒造, <sup>2</sup> LECO ジャパン )
- 17:00 2P-1p074 清酒メタボロームへの原料米品種、精米歩合、酵母菌株の影響  
 ..... 小里 孟<sup>1,2</sup>, 梅尾 美幸<sup>1</sup>, 平田 章悟<sup>1,2</sup>, 矢澤 彌<sup>1</sup>, 織田 健<sup>1</sup>, ○岩下 和裕<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 酒総研, <sup>2</sup> 広島大院・先端物質 )
- 16:00 2P-1p075 日本酒の醸造における酵母のメタボロームデータを利用した発酵呼吸状態の推定  
 ..... ○藤丸 裕貴, 門脇 真史, 佐藤 友哉, 田口 誠我, Jannatul Ferdouse, 澤田 和敬, 北垣 浩志  
 (佐賀大・農)
- 17:00 2P-1p076 醤油の特徴香成分である 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone の生合成に関わる酵素遺伝子の同定  
 ..... 上原 健二, ○渡部 潤, 茂木 喜信, 月岡 祐一郎 (ヤマサ醤油)
- 16:00 2P-1p077 様々な醸造食品に含まれるグリコシルセラミド量の測定  
 ..... ○阪本 真由子, 宮川 幸, 松永 陽香, 酒谷 真以, 藤川 彩美, 北垣 浩志  
 (佐賀大・農)
- 17:00 2P-1p078 *Zymomonas mobilis* を用いたホエーを原料とするエタノール発酵および食酢醸造の検討  
 ..... ○荻山 大輝, 若山 守 (立命館大院・生命科学)
- 16:00 2P-1p079 紫芋焼酎粕を原料としたデザートソースの開発と機能性  
 ..... ○多賀 直彦<sup>1</sup>, 岩下 小太郎<sup>2</sup>, 越智 大起<sup>2</sup>, 椛田 聖孝<sup>1</sup>, 村田 達郎<sup>1</sup>,  
 芝田 猛<sup>1</sup>, 荒木 朋洋<sup>1</sup>, 安田 伸<sup>1</sup>, 松田 靖<sup>1</sup>, 本田 憲昭<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 東海大・農, <sup>2</sup> 東海大院・農 )
- 17:00 2P-1p080 黒糖焼酎の香気に及ぼす蒸留法の影響  
 ..... ○島田 麻里奈<sup>1</sup>, 落合 佑香<sup>2</sup>, 吉崎 由美子<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>2</sup>, 二神 泰基<sup>2</sup>, 玉置 尚徳<sup>2</sup>, 高峯 和則<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 鹿児島大院・農, <sup>2</sup> 鹿児島大・農 )
- 16:00 2P-1p081 芋焼酎醪中に生息している乳酸菌に関する研究  
 ..... ○宮川 博士, 小境 敏揮, 鈴木 恵利香, 河野 邦晃, 岩井 謙一, 高瀬 良和  
 (霧島酒造)
- 17:00 2P-1p082 酸素・水素安定同位体比に基づく清酒の産地識別  
 ..... ○栗林 喬<sup>1</sup>, 城 斗志夫<sup>2</sup>, 金桶 光起<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 新潟県醸造試, <sup>2</sup> 新潟大・農 )

## 【食品科学, 食品工学】

- 16:00 2P-1p083 *Pediococcus pentosaceus* の持つ免疫賦活作用  
..... 山田 康伸, 今井 伸二郎, ○西野 智彦 (東京工科大・応生)
- 17:00 2P-1p084 伝統的発酵食品の製造工程における細菌混入経路の次世代シーケンスによる解析  
..... ○鈴木 市郎<sup>1,2</sup>, 白 至桓<sup>1</sup>, 杉田 龍兵<sup>3</sup>, Nakamura Gouvea Natalia<sup>1</sup>, 武田 稔<sup>1</sup>, 小泉 淳一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横国大院・工,<sup>2</sup>横国大・リスク共生,<sup>3</sup>横国大・理工)
- 16:00 2P-1p085 pH 非調整型の培養系ヒト腸管モデルの確立  
..... ○佐々木 建吾<sup>1</sup>, 佐々木 大介<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>, 大澤 朗<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション,<sup>2</sup>神戸大・自科・研究環)
- 17:00 2P-1p086 農産品から単離した乳製品用乳酸菌の多機能性評価  
..... ○高屋 朋彰<sup>1</sup>, 根来 雄哉<sup>2</sup> (<sup>1</sup>小山高専・物質,<sup>2</sup>小山高専専攻科・物質)
- 16:00 2P-1p087 和歌山県日高地方の紀州なれずしの細菌叢の解析  
..... ○川瀬 貴斗, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大・応生科)
- 17:00 2P-1p088 液体表面培養したカバノアナタケが生産する生理活性物質の評価  
..... ○高柴 則子<sup>1</sup>, 藏本 彩加<sup>1</sup>, 米田 任伸<sup>2</sup>, 櫻井 明彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井大院・工,<sup>2</sup>福井大・工)
- 16:00 2P-1p089 孢子形成過程を回避した酵母の人為的有性生殖法  
..... ○福田 展雄<sup>1</sup>, 石井 純<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>, 本田 真也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル,<sup>2</sup>神戸大院・イノベ)
- 17:00 2P-1p090 麹菌によるアクリル酸分解の研究  
..... ○尾関 健二<sup>1</sup>, 河上 春樹<sup>1</sup>, 久保 廣海<sup>1</sup>, 上杉 大智<sup>1</sup>, 坪井 宏和<sup>2</sup>, 坊垣 隆之<sup>2</sup>, 岩井 和也<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>金工大・ゲノム研,<sup>2</sup>大関・総研,<sup>3</sup>UCC 上島珈琲・イノベーションセンター)
- 16:00 2P-1p091 パルミチン酸誘導性炎症に対する白麹抽出物の抗炎症効果  
..... ○大城 沙織<sup>1</sup>, 神戸 悠輝<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>1</sup>, 吉崎 由美子<sup>1</sup>, 宮田 篤郎<sup>2</sup>, 高峯 和則<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>鹿大院・農,<sup>2</sup>鹿大院・医歯)
- 17:00 2P-1p092 アメフラシ消化液より単離したフロロタンニン結合蛋白質、EHEP の特性解析  
..... ○辻 明彦, 桑村 修司, 湯浅 恵造 (徳島大院・生物資源産業学研究部)
- 16:00 2P-1p093 統計的実験計画法を用いた乳酸菌生産のためのアレルゲンフリー培地の最適化  
..... ○ターナー ピーター<sup>1</sup>, 小川 博<sup>1</sup>, 阿部 吉邦<sup>1</sup>, Cabrera-Ostertag Ignacio<sup>2</sup>, Menton John<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>セントラル科学貿易,<sup>2</sup>Kerry, WI, USA)
- 17:00 2P-1p094 R- $\alpha$  リポ酸処理したラット肝がん細胞の経時的メタボローム解析  
..... ○生田 直子<sup>1</sup>, 近本 啓太<sup>2</sup>, 浅野 雄哉<sup>2</sup>, 横川 遥香<sup>2</sup>, 寺尾 啓二<sup>3</sup>, Rimbach Gerald<sup>4</sup>, 松郷 誠一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・医,<sup>2</sup>金沢大院・自科,<sup>3</sup>(株)シクロケム,<sup>4</sup>Inst. Hum. Nutri. Food Sci. Kiel Univ.)
- 16:00 2P-1p095 新規食品機能性成分コリンエステル類の抗高血圧作用  
..... ○中村 浩蔵<sup>1,2</sup>, 山口 翔平<sup>2</sup>, 渡辺 旭<sup>1</sup>, 小山 正浩<sup>2</sup>, 猪狩 直樹<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>信州大院・農,<sup>2</sup>信州大・農,<sup>3</sup>大和薬品 (株))
- 17:00 2P-1p096 Optimization of polysaccharides extraction from *Inonotus obliquus* using subcritical water technology  
..... ○Xi Yuan, Hongyi Sun, Zhenya Zhang (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 16:00 2P-1p097 メリンジョ由来グネチン C の抗動脈硬化作用  
..... ○関根 由璃子<sup>1</sup>, 宮崎 均<sup>2</sup>, 吉田 滋樹<sup>2</sup> (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境,<sup>2</sup>筑波大・生命環境系)
- 17:00 2P-1p098 *Lactococcus lactis* のナイシン高生産株スクリーニング系の開発  
..... ○三田 麻友華<sup>1</sup>, 山本 理奈<sup>1</sup>, 大島 悟<sup>2</sup>, 依田 伸生<sup>2</sup>, 山崎 思乃<sup>1</sup>, 片倉 啓雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>関西大・化生工,<sup>2</sup>明治)
- 16:00 2P-1p099 白米ペプチド由来睡眠ホルモン合成酵素活性化因子の同定  
..... ○畑中 唯史<sup>1</sup>, 守谷 智恵<sup>2</sup>, 川上 賀代子<sup>2</sup>, 藤田 明子<sup>3</sup>, 川上 晃司<sup>3</sup>,  
下田 博司<sup>4</sup>, 裏地 美杉<sup>1</sup>, 万 ケン<sup>1</sup>, 坪井 誠二<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岡山生物研,<sup>2</sup>就実大薬,<sup>3</sup>(株)サタケ,<sup>4</sup>オリザ油化(株))

## 【環境浄化, 修復, 保全技術】

- 17:00 2P-1p100 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のホウ酸走化性に関わる新規センサータンパク質の解析  
..... ○緋田 安希子, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一 (広島大院・先端物質)
- 16:00 2P-1p101 *Ralstonia solanacearum* の twitching motility 阻害剤の探索  
..... ○伊達 修平 (広島大院・先端物質)
- 17:00 2P-1p102 *Rhodococcus* 属細菌を用いたヒ素検出システムの構築  
..... ○富田 尚樹<sup>1</sup>, 荒井 佑哉<sup>2</sup>, 佐藤 舜<sup>2</sup>, 庄司 有理<sup>2</sup>,  
平間 知之<sup>1</sup>, 福田 雅夫<sup>3</sup>, 遠藤 銀朗<sup>2</sup>, 宮内 啓介<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東北学院大院・工・環境建設工, <sup>2</sup>東北学院大・工, <sup>3</sup>長岡技科大)
- 16:00 2P-1p103 海洋生物試料からの好氣的セレン酸還元性微生物の分離と培養  
..... ○阪口 利文<sup>1,2</sup>, 内田 菜月<sup>1</sup>, 馬越 智也<sup>2</sup>, 岡村 好子<sup>3</sup>, 石川 輝<sup>4</sup>, 田口 和典<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>県大広島・生命科学, <sup>2</sup>県大広島・環境科学, <sup>3</sup>広島大院・先端物質, <sup>4</sup>三重大院・生資)
- 17:00 2P-1p104 ジノテフランが微生物生態系に及ぼす影響評価  
..... ○伊藤 秋実, 脇屋 香, 狩山 美沙紀, 小橋 興次, 坂上 吉一, 早坂 大亮, 森 美穂  
(近畿大・農)
- 16:00 2P-1p105 ネオニコチノイド系農薬のイミダクロプリドが微生物生態系に及ぼす影響評価  
..... ○脇屋 香, 伊藤 秋実, 狩山 美沙紀, 小橋 興次, 坂上 吉一, 早坂 大亮, 森 美穂  
(近畿大・農)
- 17:00 2P-1p106 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化  
..... ○高 未麗<sup>1</sup>, 村澤 友紀恵<sup>2</sup>, 松村 吉信<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>関西大院・理工, <sup>2</sup>関西大・化生工, <sup>3</sup>関西大・ORDIST)
- 16:00 2P-1p107 炭化水素分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 を活性化させる共生微生物の探索  
..... ○野濱 元輝, 荒木 希和子, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 17:00 2P-1p108 ノニルフェノールモノオキシゲナーゼ遺伝子を用いたビスフェノール S の分解  
..... ○近成 直斗<sup>1</sup>, 栗岡 純平<sup>1</sup>, 田村 亮太<sup>1</sup>, 加藤 太一郎<sup>2</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>鹿児島大学大学院理工学研究科)
- 16:00 2P-1p109 *Penicillium* sp. CHY-2 株による模擬汚染土壌中の 4-tert-ブチルフェノール分解特性  
..... ○小野寺 瑠依, 梅本 穂乃香, 矢島 由佳, 張 俗喆 (室工大院・工・環境創生)
- 17:00 2P-1p110 抗がん剤フルオロウラシルの分解挙動と細胞毒性残存性の検討  
..... ○岡山 真哉, 前田 憲成 (九工大院・生体工)
- 16:00 2P-1p111 *Dehalococcoides* 共生微生物の獲得とトリクロロエテン嫌氣的脱塩素化への利用  
..... ○會田 悠人<sup>1</sup>, 池上 健太郎<sup>1</sup>, 矢木 修身<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>東京大学)
- 17:00 2P-1p112 シアン分解能を有する *Pedobacter* 属細菌の単離と解析  
..... ○寺田 彩音<sup>1</sup>, 小松 大祐<sup>2</sup>, 西村 実<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>株式会社アイ・エス・ソリューション)
- 16:00 2P-1p113 富栄養汽水性佐鳴湖からのアンモニア酸化細菌の単離および特性解析  
..... ○杉山 和哉<sup>1</sup>, 工藤 勇人<sup>1</sup>, 田代 陽介<sup>1</sup>, 二又 裕之<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・工, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)

## 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 17:00 2P-1p114 土壌環境中のリン供給に対する微生物と金属元素の影響解析  
..... ○蔣 天翼, 荒木 希和子, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 16:00 2P-1p115 土壌中の金属成分と微生物活性の関係解析  
..... ○Niamatullah Sidiq, 荒木 希和子, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)

- 17:00 2P-1p116 アカテガニが示すバイオマス分解活性の解析  
 ..... 裏佳織<sup>1</sup>, 知田 真之介<sup>1</sup>, 馬場 保徳<sup>1</sup>, 柳井 清治<sup>2</sup>, ○三宅 克英<sup>1</sup>  
 (1 石川県大・生物資源研, 2 石川県大・生資環)
- 16:00 2P-1p117 茹で麵排水への酵素剤添加による固形成分への凝集・沈降性付与機構の解明  
 ..... ○渡辺 昌規<sup>1</sup>, 西山 航生<sup>1</sup>, 塩野 忠彦<sup>2</sup>, 楠 信行<sup>3</sup>  
 (1 山形大院・農, 2 広島県立総合技術研究所・食品, 3 くすのき厨房 (株))
- 17:00 2P-1p118 ジスプロシウム高吸収能を示す酵母の探索  
 ..... 晃佑 垣田, ○岸田 正夫 (阪府大院・生環科)
- 16:00 2P-1p119 酵母における酸耐性・塩耐性付与遺伝子の解析と分子育種による耐性強化  
 ..... ○松鹿 昭則<sup>1,2</sup>, 鈴木 俊宏<sup>1</sup>, 根宜 香奈子<sup>1</sup>, 橋本 智代<sup>1</sup>, 五島 徹也<sup>3</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>  
 (1 産総研・機能化学, 2 広島大院・先端物質, 3 酒総研)
- 17:00 2P-1p120 Process simulation for efficient acetic acid production from nipa sap  
 ..... ○Dung Van Nguyen<sup>1</sup>, Pinthep Sethapokin<sup>2</sup>, Harifara Rabemanolontsoa<sup>1</sup>,  
 Eiji Minami<sup>1</sup>, Haruo Kawamoto<sup>1</sup>, Shiro Saka<sup>1</sup>  
 (1 Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.,  
 2 On leave from King Mongkut's Instit. Technol. Ladkrabang to Kyoto Univ.)
- 16:00 2P-1p121 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の効率的培養法の確立  
 ..... ○松岡 友洋<sup>1</sup>, 新谷 政己<sup>2</sup>, 金原 和秀<sup>2</sup>, 吉田 信行<sup>2</sup>  
 (1 静大・工, 2 静大院)
- 17:00 2P-1p122 *Serratia marcescens* において 2,3-ブタンジオール生産性を増大させる変異の解析  
 ..... ○張 琳<sup>1</sup>, 大槻 隆司<sup>1</sup> (1 山梨大学・医工農・生環, 2 山梨大学・医工農・生環)
- 16:00 2P-1p123 大腸菌グルコース燃料電池の出力向上を目指した糖代謝と呼吸鎖の改変  
 ..... ○福井 早紀<sup>1</sup>, 駒 大輔<sup>2</sup>, 大本 貴士<sup>2</sup>, 尾島 由紘<sup>1</sup>, 東 雅之<sup>1</sup>  
 (1 阪市大院・工, 2 大阪市工研)
- 17:00 2P-1p124 好熱菌発酵産物ならびに電子供与体としての有機物添加時における硝酸態窒素減少と菌叢解析  
 ..... ○荒岡 亮祐<sup>1</sup>, 井藤 俊行<sup>2</sup>, 宮本 浩邦<sup>3,4</sup>, 児玉 浩明<sup>1,3</sup>  
 (1 千葉大・園芸, 2 京葉プラントエンジニアリング, 3 千葉大院・融合, 4 サーマス)
- 16:00 2P-1p125 窒素除去を目的とした微生物燃料電池の単離菌を用いた評価  
 ..... ○荒井 雄貴, 井上 千弘, 須藤 孝一 (東北大院・環境)
- 17:00 2P-1p126 蓄電性 Mackinawite の充放電前後における結晶構造解析  
 ..... ○由井 嵐士<sup>1</sup>, 鈴木 湊<sup>2</sup>, 安藤 翔太<sup>3</sup>, 田代 陽介<sup>1</sup>, 小暮 敏博<sup>4</sup>, 二又 裕之<sup>1,2,5</sup>  
 (1 静大・創科技院, 2 静大院・自然科学系教育学部,  
 3 静大・工, 4 東大院・理学系研究所, 5 静大・グリーン研)
- 16:00 2P-1p127 微生物燃料電池アノード電極上の微生物群集細胞内代謝解析  
 ..... ○佐々木 大介<sup>1</sup>, 佐々木 建吾<sup>1</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
 (1 神戸大院・科学技術イノベーション, 2 金沢大・新学術創成研究機構)
- 17:00 2P-1p128 メタノール原料からの共重合ポリヒドロキシアリカン酸生合成に向けた *Methylobacterium extorquens* AM1 の代謝改変  
 ..... ○海野 源人, 折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭 (東工大院・生命理工)
- 16:00 2P-1p129 脂質系バイオマスからの中鎖ホモポリヒドロキシアリカン酸の生合成とその物性解析  
 ..... ○廣江 綾香<sup>1,2</sup>, 石井 大輔<sup>2,3</sup>, 加部 泰三<sup>4</sup>, 岩田 忠久<sup>2,3</sup>, 田口 精一<sup>5</sup>, 柘植 丈治<sup>1,2</sup>  
 (1 東工大院・総理工, 2 JST・CREST, 3 東大院・農生科, 4 JASRI, 5 北大院・工)
- 17:00 2P-1p130 3HHx を高含有率で含む共重合ポリエステル遺伝子組換え水素細菌による CO<sub>2</sub> からの生合成  
 ..... ○森 舜也<sup>1</sup>, 丸尾 浩希<sup>1</sup>, 折田 和泉<sup>2</sup>, 福居 俊昭<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
 (1 近大院・産理工・生環化, 2 東工大院・生命理工)
- 16:00 2P-1p131 *Ralstonia eutropha* 代謝改変株による糖質およびグリセロールからのポリヒドロキシアリカン酸共重合体の生合成  
 ..... Zhang Mengxiao, 折田 和泉, 中村 聡, ○福居 俊昭 (東工大・生命理工学院)

## ANA クラウンプラザホテル富山 3階ポスター会場 II (ASUKA) (16:00~18:00)

## 【生物化学工学】

- 17:00 2P-2p132 CRISPR/Cas を用いた高耐久性酵母の創製  
..... ○三ツ井 良輔, 山田 亮祐, 荻野 博康 (阪府大院・工)
- 16:00 2P-2p133 糸状菌の細胞内共生を利用した新規高機能株構築法確立への試み  
..... ○角田 貴一, 高野 真希, 星野 一宏 (富山大院・理工)
- 17:00 2P-2p134 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ AdmA, AdmB の炭素源飢餓条件での役割  
..... ○小林 拓嗣, 大岩 達郎, 前田 浩, 竹内 道雄, 山形 洋平 (農工大院・連農)
- 16:00 2P-2p135 微細藻類加水分解液の 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸発酵培地への適用  
..... ○野口 愛<sup>1</sup>, Htet April N<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>,  
片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 本多 了<sup>1</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科,  
<sup>4</sup>長岡技科大, <sup>5</sup>日大・生資科, <sup>6</sup>農工大院・工, <sup>7</sup>森林総合研)
- 17:00 2P-2p136 酸性条件下における寒天平板培養法の問題点の把握と SCF 法の利用  
..... ○高野 力<sup>1</sup>, 安田 竜馬<sup>2</sup>, 村山 晃一<sup>3</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境, <sup>3</sup>フタムラ化学)
- 16:00 2P-2p137 試料の有効な前処理と SCF 法の組み合わせによる新規微生物の培養化  
..... ○長谷川 智弘<sup>1</sup>, 村山 晃一<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>フタムラ化学)
- 17:00 2P-2p138 SCF 法を用いた植物試料からの新規微生物の培養と評価 (第 2 報)  
..... ○小林 和輝<sup>1</sup>, 村山 晃一<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>フタムラ化学)
- 16:00 2P-2p139 最少量の低毒性イオン液体で前処理したバイオマスからの糖化・発酵生産プロセスの開発  
..... ○志津田 有成<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>,  
片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科,  
<sup>4</sup>長岡技科大, <sup>5</sup>日大・生資科, <sup>6</sup>農工大院・工, <sup>7</sup>森林総合研)
- 17:00 2P-2p140 遺伝子組換え大腸菌を用いたフェニル乳酸生産に影響を与える遺伝子の発現解析  
..... ○宮川 寛規<sup>1</sup>, 川口 秀夫<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 老沼 研一<sup>3</sup>, 高谷 直樹<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>3</sup>筑波大院・生命環境)

## 【バイオプロセス】

- 16:00 2P-2p141 組換えタンパク質発現時における共発現 LEA ペプチドの発現条件の最適化  
..... ○池野 慎也, 岩水 岳教 (九工大院・生体工)
- 17:00 2P-2p142 転写因子改変放線菌を用いた異種タンパク質生産  
..... ○柏木 紀賢<sup>1</sup>, 西岡 雅都<sup>1</sup>, 廣瀬 修一<sup>2</sup>, 曾田 匡洋<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>長瀬産業・ナガセ R&D センター, <sup>3</sup>神戸大院・工)
- 16:00 2P-2p143 グラム陰性菌由来のファイバータンパク質による微生物の固定化と表層提示技術の統合  
..... ○中谷 肇, 小原 優季, 堀 克敏 (名大院・工)
- 17:00 2P-2p144 ボロン酸ゲルによる希少ヘキソースの新規分離法の確立  
..... ○後藤 成暁<sup>1</sup>, 十川 直也<sup>1</sup>, 野崎 智帆<sup>1</sup>, 吉原 明秀<sup>2</sup>, 森本 兼司<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>香川大学院 農学研究科, <sup>2</sup>香川大学国際希少糖研究教育機構)
- 16:00 2P-2p145 PEG 鎖長の異なる光分解回収型 PEGylation 試薬の合成と評価  
..... ○金兵 知毅<sup>2</sup>, 山口 哲志<sup>1</sup>, 塩田 英史<sup>2</sup>, 岡本 晃充<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>東大院・工)

- 17:00 2P-2p146 抗体精製用プロテイン A クロマトグラフィー担体の高機能化  
 .....○西八條 正克<sup>1,2</sup>, 鴻池 史憲<sup>1,2</sup>, 荻原 侑莉恵<sup>1,2</sup>, 中野 喜之<sup>1,2</sup>, 船木 正大<sup>1,2</sup>, 水口 和信<sup>1,2</sup>  
 (1カネカ, 2MAB 組合)
- 16:00 2P-2p147 低分子化抗体精製用アフィニティークロマト担体の開発  
 .....○村田 大<sup>1,2</sup>, 吉田 慎一<sup>1,2</sup>, 荻原 侑莉恵<sup>1,2</sup>, 西八條 正克<sup>1,2</sup>, 船木 正大<sup>1,2</sup>, 水口 和信<sup>1,2</sup>  
 (1カネカ, 2MAB 組合)
- 17:00 2P-2p148 Fc レセプターを用いた抗体分析用アフィニティ分離剤による糖鎖改変抗体の解析  
 .....○山中 直紀, 寺尾 陽介, 田中 亨, 朝岡 義晴,  
 青木 大, 西山 しづか, 大江 正剛, 井出 輝彦  
 (東ソー)
- 16:00 2P-2p149 抗体及び低分子化抗体精製向け新規プロテイン L アフィニティー充てん剤の機能評価  
 .....○田中 亨, 小林 秀峰, 荒木 康祐, 中谷 茂 (東ソー)
- 17:00 2P-2p150 光応答性マイクロウェル法を用いた細胞の選別  
 .....○高木 理沙<sup>1</sup>, 山口 哲志<sup>2</sup>, 柳原 昇一<sup>3</sup>, 田端 和仁<sup>1</sup>, 野地 博行<sup>1</sup>, 飯野 亮太<sup>4</sup>, 岡本 晃充<sup>1,2</sup>  
 (1東大院・工, 2東大・先端研, 3阪大産研, 4分子研)

### 【セル & ティッシュエンジニアリング】

- 16:00 2P-2p151 Analysis of cell migratory dispersion through spatial measurement of nucleus density  
 .....○Ziyu Chen, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
- 17:00 2P-2p152 糖尿病性腎症における細胞外マトリクスの早期変遷解析  
 .....○赤塚 愛里<sup>1</sup>, 村澤 裕介<sup>2</sup>, 王 碧昭<sup>1</sup> (1筑波大院・生命環境, 2国立長寿医療セ)
- 16:00 2P-2p153 ラット骨髄培養細胞における時計遺伝子 *Per2* 発現の振動開始位相の解析  
 .....切明 研人<sup>1</sup>, 深浦 恵梨<sup>1</sup>, ○藤原 政司<sup>1</sup>, 西出 真也<sup>2</sup>, 本間 さと<sup>2</sup>, 本間 研一<sup>2</sup>, 高木 睦<sup>1</sup>  
 (1北大院・工, 2北大院・医)
- 17:00 2P-2p154 軟骨再生用間葉系幹細胞のマイクロキャリアによる増殖  
 .....○天笠 翼<sup>1</sup>, 高橋 伊織<sup>1</sup>, 目良 恒<sup>2,3</sup>, 脇谷 滋之<sup>3</sup>, 高木 睦<sup>1</sup>  
 (1北大院・工, 2新潟大・魚沼基幹病院, 3武庫女大・健スポ)
- 16:00 2P-2p155 デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた位相差解析によるガン細胞識別  
 .....○高木 睦, 倉島 つぐみ (北大院・工)
- 17:00 2P-2p156 動物細胞の機能変化を利用したクロム検出  
 .....○小川 亜希子, 保坂 浩章, 田中 雄士 (鈴鹿高専)
- 16:00 2P-2p157 マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛制御関連遺伝子の発現解析  
 .....○西川 麻裕, 森 英樹, 原 正之 (阪府大院・理)
- 17:00 2P-2p158 凍結保護剤を用いない瞬間凍結保存法における保存期間の細胞生存率への影響  
 .....○篠瀬 真人<sup>1</sup>, 上野 明<sup>2</sup>, 山口 修一<sup>2</sup>, 秋山 佳丈<sup>1</sup>  
 (1信州大院・理工学, 2株式会社マイクロジェット)
- 16:00 2P-2p159 iPS 細胞技術を利用した機能的ヒト NKT 細胞の大量培養とがん免疫療法モデル  
 .....○山田 大輔, 伊豫田 智典, 谷口 克, 藤井 眞一郎, 古関 明彦 (理研 統合生命医科学)
- 17:00 2P-2p160 ボツリヌス菌由来 Hemagglutinin を用いたヒト iPS 細胞の高密度懸濁培養法の確立  
 .....○山本 陸<sup>1</sup>, 都倉 知浩<sup>1,2</sup>, Nath Suman Chandra<sup>1</sup>, 金 美海<sup>1</sup>, 紀ノ岡 正博<sup>1</sup>  
 (1阪大院・工, 2藤森工業)
- 16:00 2P-2p161 単一集塊でのヒト iPS 細胞培養における高密度化の限界についての検討  
 .....○植野 真伍, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 17:00 2P-2p162 クローン培養系を用いたヒト iPS 細胞培養中に生じる不均質性の解明  
 .....○近藤 伸彦, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)

- 16:00 2P-2p163 紫外線照射コラーゲンゲル上で培養した脳毛細血管内皮細胞におけるインテグリン遺伝子の発現解析  
..... ○土岐 麻菜, 佐藤 綾香, 森 英樹, 原 正之 (阪府大院・理)
- 17:00 2P-2p164 ポリアミド繊維上における神経幹細胞/前駆細胞の接着と三次元的な伸展  
..... ○森 英樹, 藤田 雅徳, 原 正之 (阪府大院・理)
- 16:00 2P-2p165 光増感反応で生じた活性酸素種がラット間葉系幹細胞の分化へ及ぼす影響  
..... 城田 裕介, 森 英樹, ○原 正之 (阪府大院・理)
- 17:00 2P-2p166 脛βスフェロイドの遠心充填による立体組織作製  
..... ○大西 希咲, 榎本 詢子, 福田 淳二 (横国大院・工)
- 16:00 2P-2p167 ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞を用いた没食子酸エピガロカテキンの機能性評価  
..... ○清水 康子<sup>1</sup>, 大貫 喜嗣<sup>1</sup>, 河野 高德<sup>2</sup>, 卯川 裕一<sup>2</sup>, 堤坂 裕子<sup>2</sup>, 望月 和樹<sup>1</sup>, 黒澤 尋<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大院・総研部, <sup>2</sup>株式会社・伊藤園・中央研究所)
- 17:00 2P-2p168 筋収縮力測定マイクロデバイスの開発と筋萎縮モデルへの応用  
..... ○弦間 里歩<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 後藤 友規<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・予防早期医療創成セ)
- 16:00 2P-2p169 アプタマー修飾オリゴペプチド層を用いた選択的な細胞のキャッチ&リリース  
..... ○榎本 詢子<sup>1</sup>, Gautieri Alfonso<sup>2</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup> (<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>ミラノ工科大)
- 17:00 2P-2p170 3次元ゲル培養からの形態情報による細胞塊選抜システムの開発  
..... ○渋谷 真結<sup>1</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 田村 磨聖<sup>3</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 松井 裕史<sup>4</sup>, 杉浦 慎治<sup>3</sup>,  
金森 敏幸<sup>3</sup>, 柳沢 真澄<sup>5</sup>, 佐藤 琢<sup>3</sup>, 高木 俊之<sup>3</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>産総研, <sup>4</sup>筑波大, <sup>5</sup>エンジニアリングシステム)
- 16:00 2P-2p171 GFP 陰性造影法による生細胞の構造計測技術の開発  
..... ○田中 正太郎, 高桑 雄一 (東女医大・医・生化学)
- 17:00 2P-2p172 培養上清成分のインプロセス・モニタリングによる細胞非侵襲的なヒト iPS 細胞の未分化性の評価  
..... ○豊田 健一<sup>1</sup>, 鈴木 崇<sup>1</sup>, 畑林 邦忠<sup>2</sup>, 平丸 大介<sup>1</sup>, 高橋 雅俊<sup>1</sup>, 加川 健一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>島津製作所, <sup>2</sup>東京エレクトロン 革新技術企画室)
- 16:00 2P-2p173 畳み込みニューラルネットワークによる C2C12 細胞分化の識別  
..... ○新岡 宏彦<sup>1</sup>, 浅谷 学嗣<sup>2</sup>, 大東 寛典<sup>2</sup>, 田川 聖一<sup>1</sup>, 三宅 淳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・基礎工, <sup>2</sup>阪大 基礎工)
- 17:00 2P-2p174 細胞画像情報を用いた凍結ストレスに対する幹細胞品質変化の評価  
..... ○松本 恵<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>2</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1</sup>, ○加藤 竜司<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大院・創薬科学)
- 16:00 2P-2p175 ヒト iPS 細胞の継代培養中発生する逸脱細胞の簡便な除去法の構築  
..... ○金 美海, 松原 佳史, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 17:00 2P-2p176 プラズマ照射活性化培地を用いた残存未分化ヒト iPS 細胞の選択的除去  
..... ○長島 拓則<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 松本 凌<sup>1</sup>, 田中 宏昌<sup>2</sup>,  
水野 正明<sup>3</sup>, 吉川 史隆<sup>4</sup>, 堀 勝<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・未来社会創造機, <sup>3</sup>名大病院, <sup>4</sup>名大院・医, <sup>5</sup>名大・予防早期医療創成セ)
- 16:00 2P-2p177 密着結合タンパクの機能特性に基づいた網膜毒性の新規 in vitro 毒性評価系の構築  
..... Xie Yucheng, 金 美海, ○紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 17:00 2P-2p178 ナノニードルアレイを用いたビメンチン陽性癌細胞分離技術の開発  
..... ○松本 雄太<sup>1</sup>, 清水 桂太<sup>1</sup>, 飯嶋 益巳<sup>3</sup>, 黒田 俊一<sup>3</sup>, 中村 史<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>3</sup>阪大・産研・生体分子反応科学)
- 16:00 2P-2p179 人工骨格筋組織の収縮力測定による薬剤評価系の構築  
..... ○池田 一史<sup>1</sup>, 井藤 彰<sup>2</sup>, 今田 隆介<sup>2</sup>, 河邊 佳典<sup>2</sup>, 上平 正道<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・シス生科, <sup>2</sup>九大院・工)
- 17:00 2P-2p180 アルギン酸カルシウム犠牲層を用いたゼラチンハイドロゲルの3次元構築  
..... ○伊野 浩介<sup>1</sup>, 横川 裕紀<sup>1</sup>, 珠玖 仁<sup>2</sup>, 末永 智一<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・環境, <sup>2</sup>東北大院・工, <sup>3</sup>東北大・WPI-AIMR)

### 【核酸工学】

- 16:00 2P-2p181 人工 mRNA スイッチによるヒト内在性タンパク質の検知  
 ..... ○川崎 俊輔<sup>1,2</sup>, 藤田 祥彦<sup>2</sup>, 齊藤 博英<sup>2</sup> (<sup>1</sup>京大院・医, <sup>2</sup>京大・CiRA)
- 17:00 2P-2p182 代謝物と RNA の 2 入力に应答する AND ゲートリボザイムの開発  
 ..... ○内藤 卓人, 井川 善也, 松村 茂祥 (富山大院・理工)
- 16:00 2P-2p183 グループ I リボザイムの集積制御による RNA ナノ構造の選択的形成と活性評価  
 ..... ○大井 宏紀<sup>1</sup>, 藤田 大介<sup>1</sup>, 鈴木 勇輝<sup>2,3</sup>, 杉山 弘<sup>2,3</sup>, 遠藤 政幸<sup>2,3</sup>, 松村 茂祥<sup>1</sup>, 井川 善也<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山大院・理工, <sup>2</sup>京大 iCeMS, <sup>3</sup>京大院・理)

### 【糖鎖工学】

- 17:00 2P-2p184 フコース結合型糖鎖合成に関わる酵素群をノックアウトした CHO-K1 細胞の構築  
 ..... ○岩崎 将士, 三崎 亮, 大橋 貴生, 藤山 和仁 (阪大・生工国際セ)
- 16:00 2P-2p185 成熟糖鎖合成を促進する糖鎖修飾改変植物体の作出  
 ..... ○佐藤 圭悟<sup>1</sup>, 弓岡 仁美<sup>1,2</sup>, 磯山 純子<sup>1</sup>, 土肥 浩二<sup>1</sup>, 大橋 貴生<sup>1</sup>, 三崎 亮<sup>1</sup>, 藤山 和仁<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪大・生工国際セ, <sup>2</sup>大阪成蹊短大・栄養)
- 17:00 2P-2p186 糖転移酵素 GnTI 遺伝子発現抑制による植物型糖鎖構造の改変  
 ..... 土肥 浩二<sup>1</sup>, ○弓岡 仁美<sup>1,2</sup>, 磯山 純子<sup>1</sup>, 菊池 輝美<sup>1</sup>, 藤山 和仁<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪大・生工国際セ, <sup>2</sup>大阪成蹊短大・栄養)
- 16:00 2P-2p187 均一な糖鎖構造を有する抗体 Fc 領域の生産と解析  
 ..... ○千葉 靖典<sup>1</sup>, 高橋 佳江<sup>1</sup>, 岩城 隼<sup>2,3</sup>, 石田 秀樹<sup>2,3</sup>, 松崎 祐二<sup>2,3</sup>, 平林 淳<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>産総研・創薬基盤, <sup>2</sup>東京化成工業, <sup>3</sup>次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

## ランチョンセミナー

### 2LC1 株式会社シクロケムバイオ

ANA クラウンプラザホテル富山 3 階 C 会場 (11:45~12:45)

### 2LD2 アジレント・テクノロジー株式会社

ANA クラウンプラザホテル富山 3 階 D 会場 (11:45~12:45)

### 2LE3 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

ANA クラウンプラザホテル富山 3 階 E 会場 (11:45~12:45)

# 第3日 (9月30日)

太字の一般講演は今年度の生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者の発表です。

| 開始時間                           | 講演番号     | 演 題  | 発表者氏名 (所属)<br>○印は講演者を示す |
|--------------------------------|----------|--|-------------------------|
| <b>一般講演 (午前の部)</b>             |          |  |                         |
| 富山国際会議場 2階ポスター会場1 (9:00~11:00) |          |  |                         |
| <b>【分類, 系統, 遺伝学】</b>           |          |  |                         |
| 9:00                           | 3P-1a001 | モンゴル国から分離した酵母の多様性及び <i>Metschnikowia</i> 属 2 新種の生育特性と脂質生産能<br>..... ○Jambaldorj Ulziichimeg <sup>1</sup> , 山崎 敦史 <sup>1</sup> , Balijinova Tsetseg <sup>2</sup> , 安藤 勝彦 <sup>1</sup> , 鶴海 泰久 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> NITE・NBRC, <sup>2</sup> モンゴル科学院・生物研究所)     |                         |
| 10:00                          | 3P-1a002 | 鹿児島県及び山口県で分離した油脂酵母 <i>Lipomyces</i> 属及び油脂生産能について<br>..... ○山崎 敦史, 川崎 浩子 (NITE・NBRC)  |                         |
| 9:00                           | 3P-1a003 | 歯周病原性細菌 <i>Eikenella corrodens</i> の新規溶血因子の同定<br>..... ○島谷 雅文 <sup>1</sup> , 高原 沙里 <sup>1</sup> , 阿座上 弘行 <sup>1,2,3</sup><br>( <sup>1</sup> 山口大・農, <sup>2</sup> 山口大院・創成科学・農学系, <sup>3</sup> 山口大・中高温微セ)   |                         |
| 10:00                          | 3P-1a004 | MALDI-TOF MS を用いたバイオマーカーによる <i>Acinetobacter</i> 属細菌の高精度識別<br>..... ○下平 潤, 則武 ちあき, 野口 正宏, 上條 知昭, 川崎 浩子 (NITE・NBRC)   |                         |
| 9:00                           | 3P-1a005 | MALDI-TOF MS を用いた <i>Aspergillus flavus</i> とその類縁菌の迅速同定法のための前処理最適化<br>..... ○上條 知昭, 下平 潤, 川崎 浩子 (NITE・NBRC)  |                         |
| 10:00                          | 3P-1a006 | 生分解性プラスチック分解系状菌 B47-9 株のゲノム解析と同定<br>..... ○山下 (鯨島) 結香 <sup>1</sup> , 小坂橋 基夫 <sup>1</sup> , 小池 英明 <sup>2</sup> , 佐藤 豊三 <sup>1</sup> ,<br>森脇 丈治 <sup>1</sup> , 雑賀 あずさ <sup>2</sup> , 森田 友岳 <sup>2</sup> , 北本 宏子 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 農研機構, <sup>2</sup> 産総研)   |                         |
| 9:00                           | 3P-1a007 | 青枯病菌に感染する Viunalikevirus, RP15 の単離と解析<br>..... ○川崎 健 <sup>1</sup> , 三原 知子 <sup>2</sup> , 緒方 博之 <sup>2</sup> , 藤江 誠 <sup>1</sup> , 山田 隆 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 広島大院・先端物質, <sup>2</sup> 京大・化研)   |                         |
| 10:00                          | 3P-1a008 | 畑土壌微生物叢の解析<br>..... ○小西 智之 <sup>1</sup> , 坂井 沙織 <sup>2</sup> , 海野 智史 <sup>2</sup> , 橋本 賢一 <sup>2</sup> , 川崎 寿 <sup>2</sup><br>( <sup>1</sup> 電機大院・先科技, <sup>2</sup> 東電大・工・環境化)   |                         |
| <b>【遺伝子工学】</b>                 |          |  |                         |
| 9:00                           | 3P-1a009 | コリネ型細菌における乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 <i>ldhA</i> の発現制御機構の解析<br>..... ○豊田 晃一 <sup>1</sup> , 乾 将行 <sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> RITE・バイオ, <sup>2</sup> 奈良先端大・バイオ)   |                         |
| 10:00                          | 3P-1a010 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> によるグルタミン酸生産に対するストレスの影響<br>..... ○尾形 駿介 <sup>1</sup> , 齊藤 正輝 <sup>2</sup> , 吉川 勝徳 <sup>2</sup> , 古澤 力 <sup>3</sup> , 清水 浩 <sup>2</sup> , 平沢 敬 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 東工大・生命理工学院, <sup>2</sup> 阪大院・情報, <sup>3</sup> 理研・生命システム) |                         |
| 9:00                           | 3P-1a011 | ピペリジン分解菌の分離と分解系遺伝子の解析<br>..... ○山本 泰誠, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛 (関西大 化学生命工)   |                         |

- 10:00 3P-1a012 大腸菌 *tolC* 欠損株が酸感受性を示す機構の解析  
..... ○神田 健, 安彦 弦太, 岩井 伯隆, 和地 正明 (東工大・生命理工学院)
- 9:00 3P-1a013 *Bacillus* 属由来酵素の PHA モノマー供給能解析  
..... ○木原 崇博<sup>1</sup>, 廣江 綾香<sup>1</sup>, 水野 康平<sup>2</sup>, 柘植 丈治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大 院・総理工, <sup>2</sup>北九州高専)
- 10:00 3P-1a014 枯草菌の *iolH* がイノシトール代謝において果たす生理的意義  
..... ○松本 明日香<sup>1</sup>, Reuss Daniel<sup>2</sup>, 田中 耕生<sup>3</sup>, 石川 周<sup>1</sup>, 竹中 慎治<sup>4</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>Dept. General Microbiology, Gottingen Univ.,  
<sup>3</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>4</sup>神戸大院・農・生命機能)
- 9:00 3P-1a015 *Bacillus* 属細菌のシリカ蓄積メカニズムの解析  
..... ○池田 丈<sup>1</sup>, 田中 達也<sup>1</sup>, 中川 美樹<sup>2</sup>, 本村 圭<sup>1</sup>, 廣田 隆一<sup>1</sup>, 黒田 章夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大・工)
- 10:00 3P-1a016 Negative chemotactic response toward maleate in *Ralstonia solanacearum*  
..... ○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)
- 9:00 3P-1a017 メタン酸化細菌の細胞内レドックス状態の可視化  
..... ○石川 聖人<sup>1,5</sup>, 田中 裕也<sup>2</sup>, 田中 謙也<sup>3</sup>, 木村 恒太<sup>3</sup>, 加藤 創一郎<sup>4,5</sup>, 中西 周次<sup>5</sup>, 堀 克敏<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>阪大・基礎工, <sup>3</sup>阪大院・基礎工, <sup>4</sup>産総研・生物プロセス, <sup>5</sup>阪大・太陽エネ研)
- 10:00 3P-1a018 植物生長促進細菌によるシロイヌナズナの生長促進作用メカニズムの解析  
..... ○中岡 知規<sup>1</sup>, 澤田 祥子<sup>2</sup>, 大浦 麻里<sup>1</sup>, 田中 雄也<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・生物理工, <sup>2</sup>近畿大・生物理工)
- 9:00 3P-1a019 R-IVET 法によるマウス消化管特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の同定  
..... ○石神 夏実<sup>1</sup>, 河口 礼佳<sup>1</sup>, 平等 清夏<sup>1</sup>, 阪中 幹祥<sup>2</sup>, 横田 篤<sup>1</sup>, 吹谷 智<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・農・微生物生理学, <sup>2</sup>石川県立大院・生資環)
- 10:00 3P-1a020 ビフィズス菌プロモーターの機能解析  
..... ○小酒井 智也<sup>1</sup>, 野村 泉<sup>2</sup>, 鈴木 徹<sup>2</sup> (<sup>1</sup>岐阜大院・応生・応生, <sup>2</sup>岐阜大・応生・応生)
- 9:00 3P-1a021 転写因子の競合デザインによる Half-adder 回路のコンパクト設計  
..... ○湯本 達弥, 佐伯 和哉, 河合 (野間) 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔 (千葉大院・工)
- 10:00 3P-1a022 異なる環境試料からの新規自己伝達性プラスミドの取得  
..... ○仲田 裕貴, 金原 和秀, 新谷 政己 (静大・創科技院)
- 9:00 3P-1a023 納豆菌由来 pLS20cat を用いた新規プラスミドベクターシステムの開発  
..... ○宮野 恵<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>2</sup>, 石川 周<sup>1</sup>, 竹中 慎治<sup>3</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>3</sup>神戸大院・農・生命機能)
- 10:00 3P-1a024 新規抗生物質の開発に向けた微生物群集の単離培養を伴わないスクリーニング手法の確立  
..... ○山元 奈緒, 中島 信孝 (東工大 院・生命理工)
- 9:00 3P-1a025 *Tricholoma matsutake* NBRC30605 株の De novo 解析および糖質分解酵素遺伝子の特定  
..... ○大沼 広宜<sup>1</sup>, 福田 泰久<sup>2</sup>, 白坂 憲章<sup>2</sup> (<sup>1</sup>近畿大院・農, <sup>2</sup>近畿大・農)
- 10:00 3P-1a026 絨毛虫テトラヒメナを用いたセルラーゼ生産ベクターの確立  
..... ○海老原 哲男<sup>1,2</sup>, 増田 光平<sup>2</sup>, 遠藤 浩<sup>2</sup>, 仁宮 一章<sup>3</sup>, 小田切 正人<sup>4</sup>, 守屋 繁<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>名大・遺伝子, <sup>2</sup>金沢大院・自科, <sup>3</sup>金沢大・環日本海域環境研究セ, <sup>4</sup>理化学研究所 基幹研究所)
- 9:00 3P-1a027 CRISPR-PCS 法を基盤とした酵母染色体の多様な操作技術の開発  
..... ○笹野 佑<sup>1</sup>, 長澤 宏器<sup>1</sup>, 木村 駿太<sup>1</sup>, Kaboli Saeed<sup>1</sup>,  
中井 大志<sup>1</sup>, 村山 亮太<sup>1</sup>, 杉山 峰崇<sup>1</sup>, 原島 俊<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>崇城大・生物生命)
- 10:00 3P-1a028 DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術  
..... ○池内 暁紀<sup>1</sup>, 中村 里沙<sup>1</sup>, 田中 秀典<sup>1</sup>, 村本 伸彦<sup>1</sup>, 中村 隆宏<sup>2</sup>, 太田 邦史<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>豊田中研, <sup>2</sup>東大院・総合文化)
- 9:00 3P-1a029 メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の改良 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集  
..... ○沼本 穂, 前川 裕美, 金子 嘉信 (阪大院・工)

- 10:00 3P-1a030 CRISPR Cas9 system による遺伝子組み換え *Schizosaccharomyces pombe* を用いた有機酸生産  
..... ○高山 征也, 尾崎 愛子, 山口 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦 (神戸大院・工)
- 9:00 3P-1a031 マンノシルエリスリトールリビッド生合成に関わるアシル転移酵素破壊株の作製  
..... ○吉田 優太, 小西 正朗 (北見工大)
- 10:00 3P-1a032 ミトコンドリア局在配列のモデル化から考察するタンパク質局在シグナル配列の膜認識仮説  
..... ○鈴木 絢子<sup>1,2</sup>, 徳田 茜<sup>1</sup>, 星田 尚司<sup>1</sup>, 赤田 倫治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学・化学系, <sup>2</sup>現)大分大・工)
- 9:00 3P-1a033 酵母においてメタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写因子 Hap 複合体の機能解析  
..... ○小田 沙織<sup>1</sup>, 由里本 博也<sup>2</sup>, 阪井 康能<sup>2</sup> (<sup>1</sup>鳥取大・工, <sup>2</sup>京大院・農)

### 【酵素学, 酵素工学】

- 10:00 3P-1a034 *Geobacillus stearothermophilus* 由来マレートデヒドロゲナーゼの反応性考察と機能改変  
..... ○下澤 勇弥, 西矢 芳昭 (摂南大・生命科学)
- 9:00 3P-1a035 *Aspergillus oryzae* RIB40 ギ酸オキシダーゼの Phe510 は FAD 修飾と酵素活性に寄与する  
..... ○岩越 亮汰, 田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之 (福井大院・工)
- 10:00 3P-1a036 エステラーゼを生産する環境細菌の単離  
..... ○奥野 圭祐<sup>1</sup>, 橋本 明里<sup>2</sup>, 鳥居 誉<sup>2</sup>, 前田 真美<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・生物理工, <sup>2</sup>近畿大・生物理工)
- 9:00 3P-1a037 *Ruminiclostridium josui* の制限酵素 *RjoI* の性質と *R. josui* の形質転換  
..... ○汪 亜運 (三重大院・生資)
- 10:00 3P-1a038 細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が保有するキチン代謝に関与する遺伝子群の解析  
..... ○佐藤 弘晃, 松山 友香, 田口 悟朗, 野川 優洋, 下坂 誠 (信州大・繊維)
- 9:00 3P-1a039 Biosynthesis of 2-*epi*-5-*epi*-valiolone by *in vitro* synthetic biology approach  
..... ○JianJiang Zhong<sup>1</sup>, Song-Yan Huang<sup>2</sup>, Y.-H. Percival Zhang<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., <sup>2</sup>State Key Lab. Bioreactor Eng., Sch. Bioeng., East China Univ. Sci. Technol., <sup>3</sup>Dep. Biol. Syst. Eng., Virginia Tech)
- 10:00 3P-1a040 *Falsirhodobacter* sp. alg1 由来のアルギン酸リアーゼを用いたアルギン酸単糖の調製  
..... ○村瀬 祥光<sup>1</sup>, 柴田 敏行<sup>1</sup>, モリ テツシ<sup>2</sup>, 田中 礼士<sup>1</sup>, 植田 充美<sup>3</sup>, 三宅 英雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>早大・理工学術院, <sup>3</sup>京大院・農)
- 9:00 3P-1a041 シトクロム P450 の活性化において外来電子伝達タンパク質を利用するための戦略  
..... 鈴木 里沙, ○平川 秀彦, 長棟 輝行 (東大院・工)
- 10:00 3P-1a042 ナノ空間反応場を利用した 1 分子 DNA 増幅システムの構築  
..... 松浦 俊一<sup>1</sup>, 馬場 知哉<sup>2</sup>, 千葉 真奈美<sup>1</sup>, ○角田 達朗<sup>1</sup>, 山口 有朋<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・化学プロセス, <sup>2</sup>遺伝研・系統生物, <sup>3</sup>JST・さきがけ)
- 9:00 3P-1a043 持続的酵素反応プロセスを実現する酵素-メソポーラスシリカ複合体の開発  
..... ○松浦 俊一<sup>1</sup>, 池田 丈<sup>2</sup>, 千葉 真奈美<sup>1</sup>, 角田 達朗<sup>1</sup>, 黒田 章夫<sup>2</sup>, 山口 有朋<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・化学プロセス, <sup>2</sup>広島大院・先端物質, <sup>3</sup>JST・さきがけ)

### 【タンパク質工学】

- 10:00 3P-1a044 静電相互作用を駆動力とした迅速なストレプトアビジンの結晶化  
..... ○南畑 孝介<sup>1</sup>, 安達 基泰<sup>2</sup>, 清水 瑠美<sup>2</sup>, 黒木 良太<sup>3</sup>, 長棟 輝行<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・工, <sup>2</sup>量研機構, <sup>3</sup>原子力機構, <sup>4</sup>東大院・工・化生, <sup>5</sup>東大院・工・バイオエンジニアリング)
- 9:00 3P-1a045 ホモ二量体化モジュールの導入による細胞内タンパク質間相互作用検出の高感度化  
..... ○鹿島 大揮, 河出来 時, 長棟 輝行, 河原 正浩 (東大院・工)

- 10:00 3P-1a046 カニ殻堆肥由来“*Cellulosimicrobium* sp.NTK2”の結晶性キチン分解能と分解酵素の生産  
..... ○仁木 大輔, 西川 康太, 藤村 夏紀, 有馬 二朗 (鳥取大・農)
- 9:00 3P-1a047 細胞増殖を効率的に誘導するチロシンモチーフのスクリーニング  
..... ○梅根 輝来人, 長棟 輝行, 河原 正浩 (東大院・工)
- 10:00 3P-1a048 動物細胞内で強制発現させたがん抗原タンパク質の細胞内凝集機構の解析  
..... ○正元 晃平, 新土居 奈緒美, 本荘 知子, 二見 淳一郎 (岡山大院・自科)
- 9:00 3P-1a049 Hek293 細胞を用いた全長がん抗原タンパク質の網羅的調製条件の最適化  
..... ○大川 祐也, 新土居 奈緒美, 本荘 知子, 二見 淳一郎 (岡山大院・自科)
- 10:00 3P-1a050 カイコ発現系を利用した抗体および膜タンパク質調製の試み  
..... ○柴田 真実<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 加藤 昌彦<sup>2</sup>, 長屋 英和<sup>2</sup>, 眞田 英明<sup>2</sup>, 熊谷 泉<sup>1</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・工・バイオ工, <sup>2</sup>シスメックス株式会社)
- 9:00 3P-1a051 原核生物における J タンパク質による Hsp90 と Hsp70 の協同的シャペロン作用の仲介と機能調節  
..... ○仲本 準 (埼玉大院・理工・分子)
- 10:00 3P-1a052 カチオン化法による Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) タンパク質の細胞導入と核内転写活性の評価  
..... ○中野 智貴<sup>1</sup>, 曳野 隆之<sup>1</sup>, 曾 芳琴<sup>1</sup>, 西尾 知樹<sup>1</sup>, 二見 淳一郎<sup>2</sup>, 二見 翠<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山理大・工, <sup>2</sup>岡山大院・自科)
- 9:00 3P-1a053 昆虫嗅覚受容体発現酵母を利用した迅速な匂い分子検出システムの基盤構築  
..... ○福谷 洋介<sup>1,2</sup>, 田中 良拓<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>農工大・院工・生命工, <sup>2</sup>農工大・工・生命工)
- 【抗体工学】**
- 10:00 3P-1a054 抗原結合に伴う抗体の構造変化の解析  
..... ○岡本 優太<sup>1</sup>, 野田 勝紀<sup>1</sup>, 福井 希一<sup>1</sup>, 内山 進<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>岡崎統合バイオサイエンスセ)
- 9:00 3P-1a055 高感度免疫検査への利用を目指した材料親和性ペプチド融合単鎖抗体の高密度配向固定  
..... ○谷端 怜奈<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>デンカ, <sup>3</sup>デンカ生研)
- 10:00 3P-1a056 テンプレートスイッチ反応と懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応法を用いた抗体 cDNA 迅速合成システムの開発  
..... ○松原 悠紀<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup> (<sup>1</sup>富山大院・理工学教育部, <sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)
- 9:00 3P-1a057 免疫検査の高感度化を目指した Whole 抗体の配向固定化条件の検討  
..... ○神吉 菜摘<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>デンカ, <sup>3</sup>デンカ生研)
- 10:00 3P-1a058 Expression and refolding of antigen-binding fragments (Fab) with the leucine zipper in *E. coli*.  
..... ○Panwad Ritthisan, Teruyo Ojima-Kato, Satomi Nagai, Takaaki Kojima, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
- 9:00 3P-1a059 DNA ハイブリダイゼーションを用いる抗体固定化技術の開発とイムノクロマトの高性能化  
..... ○岡林 雪乃<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 犬飼 忠彦<sup>4</sup>, 川瀬 三雄<sup>4,5</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>デンカ, <sup>3</sup>デンカ生研, <sup>4</sup>TBA, <sup>5</sup>東北大学医工学研究科)
- 10:00 3P-1a060 形質細胞内発現抗体を利用した抗原特異的モノクローナル抗体新規単離法(FIXAA)の開発  
..... ○塚本 薫<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup> (<sup>1</sup>富山大院・理工学教育部, <sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)
- 9:00 3P-1a061 取得困難な修飾部位特異的モノクローナル抗体の新規効率的作製法の開発  
..... ○藤 聡志<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup> (<sup>1</sup>富山大院・理工学教育部, <sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)

- 10:00 3P-1a062 低分子抗体—薬物複合体開発：リジン残基側鎖の化学反応へ界面活性剤が及ぼす影響  
 ..... ○服部 修平<sup>1</sup>, 服部 峰充<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 二井手 哲平<sup>1</sup>,  
 松永 淳<sup>2</sup>, 李 宣和<sup>2</sup>, 大江 知行<sup>2</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>東北大院・薬 )
- 9:00 3P-1a063 次世代抗体医薬を目指した立体構造特異的モノクローナル抗体の作製およびその評価  
 ..... ○磯崎 勇志, 三浦 広己, 湊元 幹太, 富田 昌弘 (三重大院・工)

### 【発酵生理学, 発酵工学】

- 10:00 3P-1a064 菌体外  $\beta$  グルカンを生産する *Aureobasidium pullulans* の網羅的遺伝子発現解析  
 ..... ○内山 博文<sup>1,4</sup>, 岡部 満康<sup>3</sup>, 道羅 英夫<sup>2</sup>, 加藤 竜也<sup>2</sup>, 朴 龍洙<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>静大・創科技院, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>アウレオ, <sup>4</sup>アウレオサイエンス )
- 9:00 3P-1a065 イオンビーム変異法による耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 発酵変異株の構築  
 ..... ○山下 聖樹<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>1</sup>, 畑下 昌範<sup>2</sup>, 星野 一宏<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山大院・理工, <sup>2</sup>若狭湾エネ研 )
- 10:00 3P-1a066 亜臨界前処理したオカラの霊芝菌糸体発酵及び抽出した多糖類の評価  
 ..... ○官 羽, 張 振亜 (筑波大院・生命環境)
- 9:00 3P-1a067 Polysaccharides Production from Solid-state Co-fermentation of Okara and Pretreated Corn Straw  
 ..... ○Yue Guan, Zhenya Zhang (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 10:00 3P-1a068 Effects of heating treatment and fermentation on antioxidative compound of tempe  
 ..... ○Dewi Kusumah<sup>1</sup>, Isamu Maeda<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., <sup>2</sup>Fac. Agric., Utsunomiya Univ. )
- 9:00 3P-1a069 糸状菌 *Aspergillus terreus* によるデンプン系バイオマスからのイタコン酸の直接生産  
 ..... ○清 菜都実<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>2</sup>, 畑下 昌範<sup>3</sup>, 星野 一宏<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工, <sup>3</sup>若狭湾エネ研 )
- 10:00 3P-1a070 二形性調節因子による酵母化 *Mucor circinelloides* の構築および好氣的 Ethanol 生産  
 ..... ○岩倉 遼, 高野 真希, 星野 一宏 (富山大院・理工)
- 9:00 3P-1a071 海洋性 *A.thiooxidans* SH 株の末端酸化酵素の解析  
 ..... ○上村 一雄, 吉野 永里子, 金尾 忠芳 (岡山大院・環境生命)
- 10:00 3P-1a072 自然界からのアラキドン酸含有脂質蓄積緑藻株のスクリーニング  
 ..... ○加藤 康夫<sup>1</sup>, 木野 貴仁<sup>1</sup>, 米田 有紗<sup>1</sup>, 野村 泰治<sup>1</sup>, 萩田 信二郎<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山県大・生工研七, <sup>2</sup>県大広島・生命科学 )
- 9:00 3P-1a073 好熱性新菌種 *Bacillus hisashii* N11<sup>T</sup> 株の経口給与がマウスに及ぼす抗肥満効果  
 ..... ○岩田 菖子<sup>1</sup>, 須田 互<sup>2,3</sup>, 福田 真嗣<sup>4</sup>, 大野 博司<sup>4</sup>, 服部 正平<sup>2,5</sup>, 児玉 浩明<sup>1</sup>, 宮本 浩邦<sup>1,3,6</sup>  
 ( <sup>1</sup>千葉大院・融合, <sup>2</sup>東京大院・新領域, <sup>3</sup>慶應大・医, <sup>4</sup>理研・IMS, <sup>5</sup>早大・先進理工, <sup>6</sup>サーマス )
- 10:00 3P-1a074 発酵食品からのデンプン資化性乳酸菌の分離と諸性質の検討  
 ..... ○山本 脩幾 (立命館大院・生命科学)

### 【代謝工学】

- 9:00 3P-1a075 糸状菌 *Aspergillus niger* 有機酸輸送体遺伝子破壊株によるシュウ酸生産  
 ..... ○吉岡 育哲, 上田 由佳, 小林 慶一, 桐村 光太郎 (早大・先進理工・応化)
- 10:00 3P-1a076 デンプンからの直接乳酸生産に資する麹菌でのピルビン酸代謝関連酵素の欠損  
 ..... ○笹倉 直也<sup>1</sup>, 若井 暁<sup>2</sup>, 浅井 菜々実<sup>2</sup>, 堤 浩子<sup>3</sup>, 秦 洋二<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・イノベ, <sup>3</sup>月桂冠・総研 )
- 9:00 3P-1a077 三種セルラーゼ共・強発現麹菌によるセルロースからのコウジ酸生産  
 ..... ○若井 暁<sup>1</sup>, 浅井 菜々実<sup>1</sup>, 荻野 千秋<sup>2</sup>, 堤 浩子<sup>3</sup>, 秦 洋二<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大院・イノベ, <sup>2</sup>神戸大院・工, <sup>3</sup>月桂冠・総研 )

- 10:00 3P-1a078 アーキアを利用した炭化水素生産  
 ..... ○佐藤 喬章<sup>1,3</sup>, 福家 翼<sup>1</sup>, Jha Savyasachee<sup>1</sup>, Tansengco Myra<sup>2</sup>, 跡見 晴幸<sup>1,3</sup>  
 (1京大院・工, 2Dept. Sci. & Technol., ITDI, 3JST・CREST)
- 9:00 3P-1a079 二相培養法によるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の脂肪酸生産性の向上  
 ..... ○加藤 明宏<sup>1</sup>, 高谷 信之<sup>1,2</sup>, 鶴瀬 和秀<sup>1</sup>, 前田 真一<sup>1,2</sup>, 小俣 達男<sup>1,2</sup>  
 (1名大院・生命農学, 2JST CREST)
- 10:00 3P-1a080 藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 代謝改変株の増殖特性と光合成特性  
 ..... ○林原 加代子<sup>1</sup>, 広川 安孝<sup>2</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup>, 村上 明男<sup>1</sup>  
 (1神戸大・自科・研究環, 2九大院・農)
- 9:00 3P-1a081 *Euglena gracilis* における一次代謝産物の変化  
 ..... ○富田 結美子, 吉岡 和政, 小山内 崇 (明治大・農)
- 10:00 3P-1a082 プロモーター変更による合成代謝経路導入シアノバクテリアの 1,3-propanediol 生産性向上  
 ..... ○広川 安孝<sup>1,2</sup>, 牧 佑紀<sup>1,2</sup>, 花井 泰三<sup>1,2</sup> (1九大院・農, 2JST・CREST)
- 9:00 3P-1a083 合成代謝経路を導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 による isopropanol 生産  
 ..... ○山下 泰一, 広川 安孝, 花井 泰三 (九大院・農)
- 10:00 3P-1a084 桔梗抽出液により白色脂肪細胞から誘導したベージュ脂肪細胞の特性  
 ..... ○塩見 尚史, 伊藤 茉莉絵, 渡邊 桂子 (神戸女学院大・人間科学)
- 9:00 3P-1a085 Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxy-2-Methylbutyrate)の生合成  
 ..... ○中崎 瞳, 古館 祥, 廣江 綾香, 柘植 丈治 (東工大院・総理工)
- 10:00 3P-1a086 *Clostridium perfringens* の毒素発現を制御する内在性クオラムクエンチングの実態解明  
 ..... ○安達 桂香<sup>1</sup>, Ravindra Pal Singh<sup>1</sup>, 大谷 郁<sup>2</sup>, 園元 謙二<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>1</sup>  
 (1九大院・農, 2ミヤリサン製薬)
- 9:00 3P-1a087 腸内共生微生物代謝に注目した魚類飼料応答解析法の構築  
 ..... ○坂田 研二<sup>1</sup>, 坪井 裕理<sup>1</sup>, 朝倉 大河<sup>1,2</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (1理研 CSRC, 2横市院・生医, 3名大院・生命農)

### 【オミクス解析】

- 10:00 3P-1a088 メタボロミクスによる大腸菌による 1-ブタノール生産における重要因子の解明  
 ..... ○中島 広裕<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, Liao James C.<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
 (1阪大院・工, 2Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)
- 9:00 3P-1a089 Rational and efficient selection of gene targets for strain improvement using metabolomics approach  
 ..... ○Sastia Putri<sup>1</sup>, Toshiyuki Ohtake<sup>1</sup>, James C. Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
 (1Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., 2Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)
- 10:00 3P-1a090 メタボローム解析を用いた大腸菌のバイオ燃料耐性関連物質の探索  
 ..... ○阿知和 弘樹, Theo Shao Thing, Sastia Prama Putri, 福崎 英一郎 (阪大院・工・生命先端)
- 9:00 3P-1a091 南極産担子菌酵母 *Mrakia blollopis* の低温ストレス反応  
 ..... ○辻 雅晴 (国立極地研究所)
- 10:00 3P-1a092 代謝物解析を用いた微生物におけるメチルクエン酸回路の分布の検討  
 ..... ○田部井 仁美, 宮越 俊一 (群馬高専)
- 9:00 3P-1a093 ラビリントチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索  
 ..... ○渡邊 研志<sup>1,3</sup>, Arafiles Kim Hazel V.<sup>1</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>,  
 田島 誉久<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 中島田 豊<sup>1,3</sup>, 秋 庸裕<sup>1,3</sup>  
 (1広島大院・先端物質, 2広島大院・工, 3JST・CREST)
- 10:00 3P-1a094 Metabolic profiling of *Drosophila melanogaster* metamorphosis  
 ..... ○Thuy An Phan Nguyen<sup>1</sup>, Masamitsu Yamaguchi<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
 (1Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., 2Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

- 9:00 3P-1a095  $^{13}\text{C}$  代謝フラックス解析法を用いた動物培養細胞の NADPH ターンオーバー速度の計測  
 ..... ○岡橋 伸幸<sup>1</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>, 河野 晋<sup>2</sup>, 高橋 智聡<sup>2</sup>, 清水 浩<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪大院・情報, <sup>2</sup> 金沢大・がん進展制御研 )
- 10:00 3P-1a096 D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発  
 ..... ○中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎 ( 阪大院・工 )
- 9:00 3P-1a097 イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析による陰イオン性代謝物分析手法の開発  
 ..... 和泉 自泰<sup>1</sup>, 高橋 政友<sup>1</sup>, 鈴木 隆弘<sup>2</sup>, 押川 清孝<sup>1</sup>,  
 木村 元一<sup>2</sup>, 坂本 茂<sup>2</sup>, 松本 雅記<sup>1</sup>, ○馬場 健史<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 九大・生医研, <sup>2</sup> サーモフィッシャー )

### 【環境工学, 廃水処理技術】

- 10:00 3P-1a098 アルボサイクリン生産放線菌を用いた微生物農薬の開発  
 ..... ○大池 達矢<sup>1</sup>, 前田 みのり<sup>2</sup>, 松川 哲也<sup>1,2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1,2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 近畿大院・生物理工・生物工, <sup>2</sup> 近畿大・生物理工・生物工 )
- 9:00 3P-1a099 *Streptomyces* sp. KT 株の微生物農薬としての可能性  
 ..... ○前田 みのり<sup>1</sup>, 大池 達矢<sup>2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>, 松川 哲也<sup>1,2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1,2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 近畿大・生物理工・生物工, <sup>2</sup> 近畿大院・生物理工・生物工 )
- 10:00 3P-1a100 燻炭が *Bacillus* 属細菌 IA 株の生育を促進するメカニズムの解明  
 ..... ○江邊 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司 ( 近畿大院・生物理工・生物工 )
- 9:00 3P-1a101 ウレアーゼ生産菌の分離とそれを利用した土の強度改良効果  
 ..... ○米光 裕<sup>1</sup>, 高山 陽加<sup>1</sup>, 林 和幸<sup>2</sup>, 西本 真琴<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 和歌山高専・物質, <sup>2</sup> 和歌山高専・環境都市 )
- 10:00 3P-1a102 リングレース担体を用いた固定床一槽式アナモックプロセス  
 ..... ○上野 嘉之<sup>1</sup>, 多田 羅 昌浩<sup>1</sup>, 柴田 晴佳<sup>1</sup>, 石川 秀<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 鹿島・技術研, <sup>2</sup> 鹿島・エンジ本部 )
- 9:00 3P-1a103 有機酸資化性細菌を用いたメタン発酵廃液中の有機酸除去  
 ..... ○中井 昇太<sup>1,2</sup>, 高橋 宏和<sup>1,2</sup>, 三浦 豊和<sup>1,2</sup>, 秋 庸裕<sup>1,2</sup>, 中島 田 豊<sup>1,2</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 広島大院・先端物質, <sup>2</sup> 科学技術振興機構, <sup>3</sup> 広島大院・工 )
- 10:00 3P-1a104 自家発酵熱型高温好気処理における主要細菌の体系的フィードバック分離と諸特性解析  
 ..... ○福井 諒, 朝倉 侑弥, 田代 幸寛, 酒井 謙二 ( 九大院・農 )
- 9:00 3P-1a105 ラボスケールでの自家発酵熱型高温好気処理によるし尿の液肥化における諸要因の影響  
 ..... ○朝倉 侑弥, 河野 祥尚, 程 慧君, 田代 幸寛, 酒井 謙二 ( 九大院・農 )
- 10:00 3P-1a106 複合微生物系であるコンポスト化で接種した微生物を生かして使う温度制御  
 ..... 平井 秀平, ○中崎 清彦 ( 東工大・環境社会理工 )
- 9:00 3P-1a107 生物ろ過槽由来 Mn 酸化細菌群集の培養と硝酸濃度の影響  
 ..... ○飯田 早紀<sup>1</sup>, 鈴木 市郎<sup>1</sup>, 三好 萌栄子<sup>1</sup>, 杉田 龍兵<sup>2</sup>, 武田 穰<sup>1</sup>, 小泉 淳一<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 横国大院・工, <sup>2</sup> 横国大・理工 )
- 10:00 3P-1a108 新規シデロフォアのスクリーニングと廃水からのニッケル回収への利用  
 ..... 保里 明日香<sup>1,2</sup>, 坪田 洗一郎<sup>1</sup>, 袋布 昌幹<sup>1</sup>, ○篠崎 由紀子<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 富山高専, <sup>2</sup> 長岡技科大 )
- 9:00 3P-1a109 トランスクリプトーム解析による *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝関連遺伝子群の推定  
 ..... ○櫻井 紫乃, 黒田 真史, 池 道彦 ( 阪大院・工 )
- 10:00 3P-1a110 酵母の細胞表層多糖の改変と金属吸着  
 ..... ○高橋 大地, 松川 真弓, 尾島 由紘, 東 雅之 ( 阪市大院・工・化生系 )
- 9:00 3P-1a111 *Rhodococcus* sp. Br-6 による複数の酸化還元メディエーターを介した臭素酸還元  
 ..... ○藤屋 寛子, 玉井 奈生子, 天知 誠吾 ( 千葉大・園芸 )

- 10:00 3P-1a112 硫黄酸化細菌を利用したタンゲステン含有コンクリート中のタンゲステンの迅速分析  
 ..... ○杉尾 剛<sup>1</sup>, 杉尾 理恵<sup>1</sup>, 根岸 敦規<sup>2</sup>, 井川 秀樹<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>杉尾化学合成独立栄養細菌研, <sup>2</sup>安藤ハザマ・技研, <sup>3</sup>日本ヒューム・技研)
- 9:00 3P-1a113 化学物質の微生物に対する毒性を評価するフロー式蛍光計測システムの開発  
 ..... ○櫻井 琢磨, 新谷 政己, 木村 元彦, 金原 和秀 (静大・創科技院)

### 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 10:00 3P-1a114 海洋底泥中における共生系アルギン酸分解メカニズムの解明と揮発性脂肪酸生産への応用  
 ..... ○喜多 晃久<sup>1,3</sup>, 三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 秋 庸裕<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>,  
 田島 誉久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>, 西尾 尚道<sup>1</sup>, 中島田 豊<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大院・工・エネ環, <sup>3</sup>JST・CREST)
- 9:00 3P-1a115 Alginate degradation product of anaerobic bacterium supports growth of oleaginous thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp.  
 ..... ○Kim Hazel V. Arafiles<sup>1</sup>, Yuri Eramoto<sup>1</sup>, Kenshi Watanabe<sup>1</sup>, Akihisa Kita<sup>1</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>,  
 Takahisa Tajima<sup>1</sup>, Yukihiro Matsumura<sup>2,3</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)
- 10:00 3P-1a116 コーンコブ糖化液中の発酵阻害物質に耐性を示す酵母のスクリーニング  
 ..... ○石田 奨, 荒川 知子, 加藤 勇太, 小西 正朗 (北見工大)
- 9:00 3P-1a117 高セルロース含有コーンコブ残渣を原料とした同時糖化発酵による D-乳酸の効率的生産  
 ..... ○谷口 麻菜美, 堀内 淳一, 熊田 陽一 (京工繊大院・工芸科学)
- 10:00 3P-1a118 ビフェニル/PCB 分解細菌のリグニン由来芳香族化合物代謝酵素の探索と同定  
 ..... ○渡邊 崇人<sup>1</sup>, 藤原 秀彦<sup>2</sup>, 末永 光<sup>3</sup>, 木村 信忠<sup>3</sup>,  
 廣瀬 遵<sup>4</sup>, 二神 泰基<sup>5</sup>, 後藤 正利<sup>6</sup>, 古川 謙介<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>京大・生存研, <sup>2</sup>別府大・食物栄養, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス,  
<sup>4</sup>宮崎大・工, <sup>5</sup>鹿大・農, <sup>6</sup>佐賀大・農)
- 9:00 3P-1a119 リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産  
 ..... ○菊地 晟弘<sup>1</sup>, 杉田 晴佳<sup>1</sup>, 顔 昊<sup>1</sup>, 高橋 健司<sup>2,3</sup>, 上村 直史<sup>2,3</sup>, 政井 英司<sup>2,3</sup>, 園木 和典<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>弘前大院・農生, <sup>2</sup>長岡技科大院・工, <sup>3</sup>ALCA, JST)
- 10:00 3P-1a120 酵素糖化残渣リグニンを原料としたリグノモノマーの生産とその生物変換への応用  
 ..... ○落合 芋葉子<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)
- 9:00 3P-1a121 酵素糖化残渣リグニンを硬化剤として用いたエポキシ樹脂の合成  
 ..... ○井上 優里<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)
- 10:00 3P-1a122 リグノセルロース系バイオマスのみからなるノボラックフェノール樹脂の合成  
 ..... ○山岡 幸太郎<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)
- 9:00 3P-1a123 林地残材糖化液を原料とした乳酸発酵生産  
 ..... ○荒井 隆益<sup>1</sup>, 池 正和<sup>2</sup>, 小杉 昭彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>国際農研セ, <sup>2</sup>農研機構・食総研)
- 10:00 3P-1a124 乳酸デヒドロゲナーゼを異種発現する白色腐朽菌による木質バイオマスからの乳酸生産  
 ..... ○加古 博子<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)
- 9:00 3P-1a125 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による木質バイオマスからの水素産生  
 ..... ○曾我 亜由美<sup>1</sup>, 高橋 沙綾<sup>1</sup>, 有本 美沙<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大・グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)

- 10:00 3P-1a126 *Clostridium cellulovorans* および *Clostridium beijerinckii* の共培養系によるシュガービートパルプからの有用物質生産  
 ..... 川出 雄二郎<sup>1</sup>, ○富田 寿男<sup>1</sup>, 岡崎 文美<sup>1</sup>, López-Contreras Ana M.<sup>2</sup>, 田丸 浩<sup>1,3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>Wageningen UR・Food Biobased Res., <sup>3</sup>三重大・新産業, <sup>4</sup>三重大・生命支セ)
- 9:00 3P-1a127 Effect of Cassava Pulp Supplement on 1,3-propanediol Production by *Clostridium butyricum*  
 ..... Waraporn Apiwatanapiwat<sup>1,2</sup>, Pilanee Vaithanomsat<sup>2</sup>, ○Akihiko Kosugi<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Kasetsart Univ, <sup>3</sup>JIRCAS)
- 10:00 3P-1a128 乾式法を用いた下水汚泥と稲わらの混合消化における稲わらの効果と微生物叢の解析  
 ..... ○野澤 太朔, 張 振亜, 雷 中方 (筑波大院・生命環境)
- 9:00 3P-1a129 雑草を原料とした高 C/N 比メタン発酵における微生物群構成種の単離  
 ..... ○松田 修平, 大槻 隆司 (山梨大院・医工総)
- 10:00 3P-1a130 褐藻の耐塩半連続メタン生産における固形分添加量増加による過負荷の影響  
 ..... ○三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 喜多 晃久<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 秋 庸裕<sup>1,3</sup>,  
 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 田島 誉久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>, 中島田 豊<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大院・工・エネ環, <sup>3</sup>JST・CREST)
- 9:00 3P-1a131 海洋性メタン発酵モデルの構築  
 ..... ○矢野 友寛<sup>1,3</sup>, 三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 喜多 晃久<sup>1,3</sup>, 田島 誉久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>,  
 秋 庸裕<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 中島田 豊<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大院・工・エネ環, <sup>3</sup>JST・CREST)

ANA クラウンプラザホテル富山 3階ポスター会場 II (ASUKA) (9:00~11:00)

【生成, 天然物化学】

- 10:00 3P-2a132 *Citrobacter* 属細菌におけるキトサン様バイオ凝集剤の多糖化・分泌関連遺伝子の探索  
 ..... ○武尾 正弘<sup>1</sup>, 池本 啓史<sup>1</sup>, 宮本 毅弘<sup>1</sup>, 木村 和幸<sup>2</sup>, 柏 雅美<sup>1</sup>, 加藤 太一郎<sup>3</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>(株)兵庫分析センター, <sup>3</sup>鹿児島大院・理工)
- 9:00 3P-2a133  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分子構造に関する一考察  
 ..... 栗田 あかね<sup>1</sup>, 中野 太一<sup>1</sup>, 高橋 良輔<sup>2</sup>, 北村 進一<sup>2</sup>,  
 山口 良弘<sup>1,3</sup>, 荻田 亮<sup>1,4</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>, ○藤田 憲一<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>阪市大院・理, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>阪市大・複合先端, <sup>4</sup>阪市大・健康・研セ)
- 10:00 3P-2a134 polygodial の殺真菌活性における液胞膜障害の意義  
 ..... ○荻田 亮<sup>1,3</sup>, 近藤 拓也<sup>1</sup>, 山口 良弘<sup>1,2</sup>, 藤田 憲一<sup>1</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>阪市大院・理, <sup>2</sup>阪市大・複合先端, <sup>3</sup>阪市大・健康研セ)
- 9:00 3P-2a135 ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA<sup>Ala</sup> 依存型ペプチド合成酵素の機能解析  
 ..... ○松田 貫暉<sup>1</sup>, 丸山 千登勢<sup>1</sup>, 橋本 絢子<sup>2</sup>, 新家 一男<sup>3</sup>, 濱野 吉十<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>福井県大・生物資源, <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>産総研)
- 10:00 3P-2a136 抗生物質 BD-12 生成に関与する N-メチル基転移酵素の機能解析  
 ..... ○新倉 春香<sup>1</sup>, 丸山 千登勢<sup>1</sup>, 新家 一男<sup>2</sup>, 濱野 吉十<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>福井県大・生物資源, <sup>2</sup>産総研)
- 9:00 3P-2a137 *Photobacterium profundum* 由来エイコサペンタエン酸合成酵素の異種宿主発現  
 ..... ○中 真以<sup>1</sup>, 林 祥平<sup>1</sup>, 佐藤 康治<sup>2</sup>, 氏原 哲朗<sup>3</sup>, 大利 徹<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>北大院・総合化学, <sup>2</sup>北大院・工, <sup>3</sup>協和発酵バイオ)
- 10:00 3P-2a138 多価不飽和脂肪酸合成酵素におけるタンデムアシルキャリアプロテインの機能解明  
 ..... ○林 祥平<sup>1</sup>, 佐藤 康治<sup>2</sup>, 氏原 哲朗<sup>3</sup>, 大利 徹<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>北大院・総合化学, <sup>2</sup>北大院・工, <sup>3</sup>協和発酵バイオ)

- 9:00 3P-2a139 Cyclophenin 類を viridicatin 類へと変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と精密機能解析  
..... ○岸本 真治, 石川 格靖, 山田 陽香, 平山 裕一郎, 渡辺 賢二 (静岡県大・薬)
- 10:00 3P-2a140 *Penicillium purpurogenum* における PP-V 生産と細胞内アンモニウム濃度の関連性  
..... ○小嶋 涼<sup>1</sup>, 新居 鉄平<sup>1</sup>, 春見 隆文<sup>1,2</sup>, 荻原 淳<sup>1,2</sup>, 渡邊 泰祐<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大院生資研究科・生資利用, <sup>2</sup>日大・生資科)
- 9:00 3P-2a141 *Penicillium purpurogenum* における citrinin 生産能の評価  
..... ○荻原 淳<sup>1,2</sup>, 茂木 美樹<sup>2</sup>, 小嶋 涼<sup>2</sup>, 新居 鉄平<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>1,2</sup>, 春見 隆文<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・生資科, <sup>2</sup>日大院・生資科・生資利用)
- 10:00 3P-2a142 休眠型天然物生合成遺伝子を利用した機能性新規物質の探索とその生合成解明  
..... ○恒松 雄太, 山本 剛, 横山 葵, 岸本 真治, 渡辺 賢二 (静大薬)
- 9:00 3P-2a143 *Cordyceps sphecocephala* による蛍光物質の生産およびその特性評価  
..... ○藤澤 祐哉<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>2</sup>, 星野 一宏<sup>2</sup> (<sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工)
- 10:00 3P-2a144 卵菌による長鎖多価不飽和脂肪酸生産  
..... ○吉田 磨仁<sup>1</sup>, 松下 貴子<sup>1</sup>, 東條 元昭<sup>2</sup>, 永峰 賢<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・地環科, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>ロム)
- 9:00 3P-2a145 メラニン生成キー酵素チロシナーゼの抑制物質の微生物からのスクリーニングとその細胞毒性  
..... ○倉地 亜子, 塚本 義則, 車 炳允 (中部大院・応生)
- 10:00 3P-2a146 *Pseudomonas* sp. C8 株が生産する増殖抑制物質の特定とその生産機構  
..... ○鈴木 研志<sup>1</sup>, アズワニ ファティマ<sup>2</sup>, 犬塚 友麻<sup>3</sup>, 本荘 雅宏<sup>4</sup>, 田代 陽介<sup>3</sup>, 二又 裕之<sup>1,3,5</sup>  
(<sup>1</sup>静大・創科技院, <sup>2</sup>プトラ マレーシア大, <sup>3</sup>静大院・工, <sup>4</sup>静大・工, <sup>5</sup>静大・グリーン研)
- 9:00 3P-2a147 フェニルプロパノイド類の抗酸化能力と構造との相関関係  
..... ○横川 遥香, 松郷 誠一 (金沢大院・自科)
- 10:00 3P-2a148 *Cordyceps sphecocephala* を用いた新規神経突起伸長物質の生産およびその特性評価  
..... ○西川 絢, 高野 真希, 星野 一宏 (富山大院・理工)
- 9:00 3P-2a149 放線菌 *Streptomyces rochei* 生合成制御系変異株の二次代謝プロファイル解析  
..... 岩國 美由季, 高橋 譲, 鈴木 敏弘, 木梨 陽康, ○荒川 賢治 (広島大院・先端物質)
- 10:00 3P-2a150 粘液細菌 *Sorangium cellulosum* の分離と有用物質の探索  
..... ○木村 義雄 (香川大・農)
- 9:00 3P-2a151 新規抗菌物質 demethyl-L-681,217 の単離とその生合成  
..... ○小谷 真也<sup>1</sup>, 菅井 翔吾<sup>1</sup>, 小牧 久幸<sup>2</sup>, 逸見 光<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・農, <sup>2</sup>NBRC, <sup>3</sup>農研機構)
- 10:00 3P-2a152 ジスプロシウムで惹起される巨大菌のポリ- $\gamma$ -グルタミン酸増産現象と関連遺伝子分析  
..... ○白米 優一<sup>1</sup>, 松村 歩梨<sup>2</sup>, 荻内 誠<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>愛媛大院・連合農, <sup>2</sup>高知大・農)
- 9:00 3P-2a153 新規分離培養手法を用いた海綿由来の有用化合物産出菌の探索  
..... ○町田 光史<sup>1</sup>, Dawoon Jung<sup>2</sup>, 青井 謙輝<sup>2</sup>, 中尾 洋一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>早大院・先進理工・化・生化, <sup>2</sup>広島大・ISSD)
- 10:00 3P-2a154 Visualization of toluene-degrading *Pseudomonas putida* using fluorescent *in situ* hybridization (FISH)  
..... ○Hak Jin Song<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>,  
Wu-Young Jeong<sup>1</sup>, Sang Hyun Lee<sup>1</sup>, Yung-Hun Yang<sup>1</sup>, Hyung Joo Kim<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

### 【有機化学, 高分子化学】

- 9:00 3P-2a155 細胞親和性電子伝達ポリマーを介した生細胞への電子注入  
..... ○金子 真大<sup>1</sup>, 石川 聖人<sup>2</sup>, 加藤 創一郎<sup>3</sup>, 橋本 和仁<sup>4</sup>, 中西 周次<sup>5</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・工, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>産総研, <sup>4</sup>物質材料機構, <sup>5</sup>阪大・太陽エネセ)

## 【ペプチド工学】

- 10:00 3P-2a156 切断リンカーを利用した細胞内機能性ペプチド探索系の確立  
 .....○小崎 一功<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 松本 凌<sup>1</sup>, 田邊 智哉<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,2</sup>  
 (1名大院・工・生物機能, 2名大・予防早期医療創成セ)
- 9:00 3P-2a157 短鎖ペプチドの物理化学特徴に基づく長鎖機能性ペプチドの探索とデザイン  
 .....○岩田 晋明<sup>1</sup>, 久米 暁子<sup>1</sup>, 河合 駿<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>2</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,3</sup>  
 (1名大院・工, 2名大院・創薬科学, 3名大・予防早期医療創成セ)
- 10:00 3P-2a158 AuNP-tag を用いた生体分子修飾による金ナノ粒子の高機能化  
 .....○的場 晴香<sup>2</sup>, 前原 康秀<sup>1</sup>, 重森 陽士郎<sup>2</sup>, 石田 尚之<sup>2</sup>, 今村 維克<sup>2</sup>, 今中 洋行<sup>2</sup>  
 (1岡山大・工, 2岡山大院・自科)
- 9:00 3P-2a159 病原性微生物を対象としたプログラム細胞死誘導物質の探索  
 .....○大田 悠里<sup>1,2</sup>, 宮本 龍樹<sup>1,2</sup>, 横田 垂紀子<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>, 野田 尚宏<sup>1,2</sup>  
 (1早大・先進理工, 2産総研・バイオメディカル)
- 10:00 3P-2a160 気生微細藻類 *Vischeria helvetica* 由来プロテアーゼによって生成した カゼインオリゴペプチドの ACE 阻害活性  
 ..... ○井上 悠希, 油井 信弘, 阿部 克也 (工学院大・先進工・生化)
- 9:00 3P-2a161 環状ペプチド enterocin NKR-5-3B の生合成における環状化部位アミノ酸残基の影響  
 .....○善藤 威史<sup>1</sup>, 杉野 春貴<sup>1</sup>, Perez Rodney Honrada<sup>1</sup>, 石橋 直樹<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>1</sup>, 園元 謙二<sup>1,2</sup>  
 (1九大院・農, 2九大・バイオアーク)
- 10:00 3P-2a162 金ナノ粒子合成に寄与する二機能性ペプチドのキャラクタリゼーション  
 .....○田中 祐圭<sup>1,2</sup>, 大河内 美奈<sup>1,2</sup> (1東工大・物質理工学院, 2JST・ImPACT)
- 9:00 3P-2a163 ペプチド修飾ポアセンサによる微生物検出  
 .....○大河内 美奈<sup>1,2</sup>, イルファ ハヌン ハルリサ<sup>1</sup>, 武藤 正記<sup>1,2</sup>, 田中 祐圭<sup>1,2</sup>,  
 横田 一道<sup>2,3</sup>, 筒井 真楠<sup>2,3</sup>, 谷口 正輝<sup>2,3</sup>, 川合 知二<sup>2,3</sup>  
 (1東工大・物質理工学院, 2ImPACT, 3阪大・産研)
- 10:00 3P-2a164 大豆タンパク質由来カチオン性ペプチドの抗菌・抗炎症・創傷治癒活性の解析  
 ..... ○齊藤 健吾, 野本 貴史, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)
- 9:00 3P-2a165 アミノ酸置換によるコメ抗菌ペプチドの抗炎症活性の増強とその機構の解明  
 ..... ○豊田 竜, 金子 陽徳, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)
- 10:00 3P-2a166 アミノ酸置換によるコメ抗菌ペプチドの創傷治癒活性の増強とその機構の解明  
 ..... ○生江 俊樹, 豊田 竜, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)
- 9:00 3P-2a167 ローヤルゼリー酵素加水分解物からの生理活性ペプチドの精製と同定およびその機能解析  
 ..... ○平塚 祐也, 川部 純弥, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)
- 10:00 3P-2a168 大豆タンパク質酵素加水分解物からの生理活性ペプチドの精製と同定およびその機能解析  
 ..... ○野田 悠輔, 川部 純弥, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)
- 9:00 3P-2a169 コメ糠タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製と同定およびその生理活性の解明  
 ..... ○谷口 正之, 亀田 光裕, 落合 秋人, 田中 孝明 (新潟大・自然研)
- 10:00 3P-2a170 納豆水抽出物中のカチオン性ペプチドの精製と同定およびその生理活性の解析  
 ..... ○野本 貴史, 幡本 晃太, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之 (新潟大・自然研)

## 【脂質工学】

- 9:00 3P-2a171 マイクロ流路による water-in-oil エマルジョンの調製  
 ..... ○池田 奈央, 岩上 千華, 伊藤 伸哉, 牧野 祥嗣 (富山県大・工)

- 10:00 3P-2a172 蜂の子に含まれるグリコシルセラミドの免疫細胞に対する活性の解析  
 ..... ○酒谷 真以<sup>1</sup>, 濱 侑紀<sup>2</sup>, 松永 陽香<sup>1</sup>, 藤川 彩美<sup>1</sup>, 門脇 真史<sup>1</sup>,  
 鶴田 裕美<sup>3</sup>, 吉賀 豊司<sup>1</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 柘植 圭介<sup>3</sup>, 北垣 浩志<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>株式会社正栄, <sup>3</sup>佐賀工技セ )
- 9:00 3P-2a173 局所麻醉薬による膜ラフト模倣構造熱安定性の低下  
 ..... ○菅原 恒, 下川 直史, 高木 昌宏 (北陸先端大・マテリアル)
- 10:00 3P-2a174 浸透圧印加による荷電脂質膜の張力誘起相分離  
 ..... ○山本 遼太, 下川 直史, 高木 昌宏 (北陸先端大・マテリアル)
- 9:00 3P-2a175 リン脂質組成非対称リポソームにおける膜内外層間相互作用と相分離挙動  
 ..... ○大井 克仁, 下川 直史, 高木 昌宏 (北陸先端大・マテリアル)

### 【生物工学若手研究者の集い（若手会）】

以下の9演題は若手会が選定した博士後期課程学生によるポスター発表です。

第2日（29日）16:00~18:00にB会場で口頭発表も行われます。

- 10:00 3P-2a176 振盪フラスコ培養中の気相および液相のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>の挙動解析  
 ..... ○高橋 将人, 青柳 秀紀 (筑波大院・生命環境)
- 9:00 3P-2a177 組換え大腸菌を用いたラムノースを出発基質とする1-プロパノール発酵生産  
 ..... ○松原 充, 浦野 信行, 鳴滝 藍, 山田 尚平, 片岡 道彦 (阪府大院・生環科)
- 10:00 3P-2a178 精製プロセスを伴わない低分子抗体の定量的薬効・蛋白質間相互作用スクリーニング  
 ..... ○杉山 在生人<sup>1</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 浅野 竜太郎<sup>2</sup>, 二井手 哲平<sup>1</sup>, 服部 峰充<sup>1</sup>, 熊谷 泉<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>農工大・工 )
- 9:00 3P-2a179 油脂生産と菌体内油脂回収に適した *Lipomyces* 酵母のスクリーニング  
 ..... ○柳場 まな<sup>1</sup>, 正木 和夫<sup>2</sup>, 南アルプス市<sup>3\*</sup>, 長沼 孝文<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>山梨大院・医工総・生命, <sup>2</sup>(独)酒類総研, <sup>3</sup>南アルプス市 )  
 \*著者からの希望により自治体名を記載しています。
- 10:00 3P-2a180 ミジンコにおける2Aペプチドを用いたバイシストロニック発現システムの構築  
 ..... ○熊谷 仁志, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邊 肇 (阪大院・工)
- 9:00 3P-2a181 核酸医薬原料となるヌクレオシドアナログ生産に有用な微生物触媒の探索と機能解析  
 ..... ○光川 侑輝, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順  
 (京大院・農)
- 10:00 3P-2a182 スイホウガンによる抗原特異的な抗体生産系の開発  
 ..... ○額田 夏生<sup>1</sup>, アヴシャル 恵利子<sup>1</sup>, 中井 沙織<sup>1</sup>, 都築 祥子<sup>1</sup>, 田丸 浩<sup>1,2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>三重大・生命支セ, <sup>3</sup>三重大・新産業 )
- 9:00 3P-2a183 生体制御分子硫酸体の生理機能評価技術開発  
 ..... ○下平 武彦<sup>1</sup>, 黒木 勝久<sup>1</sup>, Liu Ming-Cheh<sup>2</sup>, 榎原 陽一<sup>1</sup>, 水光 正仁<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>宮崎大院・農工総合, <sup>2</sup>トレド大・薬 )
- 10:00 3P-2a184 mRNA から構成される多入力 microRNA 応答性人工遺伝子回路の構築  
 ..... ○松浦 理史<sup>1,2</sup>, 藤田 祥彦<sup>2</sup>, 齊藤 博英<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・医, <sup>2</sup>京大・iPS細胞研 )

## シンポジウム（午後の部）

### 酒類製造における革新技術【本部企画】

富山国際会議場 3階 A会場（メインホール）（13:00～15:00）

- 13:00 はじめに  
 ..... 堤 浩子  
 座長：堤 浩子
- 13:03 3S-Ap01 未利用資源のエネルギーを利用した焼酎製造  
 ..... ○奥村 隆享（霧島酒造）  
 座長：堤 浩子
- 13:26 3S-Ap02 清酒醸造を支える酵母開発技術  
 ..... ○中原 克己, 稲橋 正明（日本醸造協会）  
 座長：堤 浩子
- 13:49 3S-Ap03 泡盛の商品展開における基盤研究の活用  
 ..... ○塚原 正俊（バイオジェット）  
 座長：山田 修
- 14:12 3S-Ap04 酒類製造における革新技術；まるごと果実瞬間凍結粉碎浸漬製法 Freeze-Crush-Infusion (FCI)  
 ..... ○藤原 裕之（サントリースピリッツ）  
 座長：山田 修
- 14:35 3S-Ap05 研究開発の知見を生産技術に活用する事例紹介  
 ..... ○伊藤 義訓（アサヒビール・研究開発本部）
- 14:58 おわりに  
 ..... 安原 貴臣

### 生命ビッグデータの利活用による生物工学のイノベーション

富山国際会議場 2階 B会場（特別会議室）（13:00～15:00）

- 13:00 はじめに  
 ..... 富田 因則  
 座長：石井 一夫
- 13:05 3S-Bp01 グローバル化時代と地球温暖化に適した晩生コシヒカリのNGS解析に基づく開発  
 ..... ○富田 因則<sup>1</sup>, 岩瀬 雄大<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>（<sup>1</sup>静岡大・グリーン科学技術研究所, <sup>2</sup>農工大）  
 座長：石井 一夫
- 13:21 3S-Bp02 網羅的遺伝子発現情報から重要遺伝子群を選択する方法の確立  
 ..... ○小林 拓嗣<sup>1</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 有江 力<sup>3</sup>, 山形 洋平<sup>1,3</sup>  
 （<sup>1</sup>農工大院・連農, <sup>2</sup>農工大院・農学系ゲノム人材育成プログラム, <sup>3</sup>農工大院・農）  
 座長：石井 一夫
- 13:36 3S-Bp03 Understanding the gene control mechanism of physiological disorders in mangosteen using RNA-seq  
 ..... ○Deden Derajat Matra<sup>1,2,4</sup>, Toshinori Kozaki<sup>3</sup>, Kazuo Ishii<sup>3</sup>, Eiichi Inoue<sup>4</sup>  
 （<sup>1</sup>Plant Prod. Div., Dept. Agro. Hort., Fac. Agric., Bogor Agricultural Univ., <sup>2</sup>United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Coll. Agric., Ibaraki Univ.）

- 座長：富田 因則
- 13:52 3S-Bp04 担子菌ウシグソヒトヨタケ子実体形成過程の Strand-specific RNA-seq 解析  
 .....○村口 元<sup>1</sup>, 梅澤 究<sup>2</sup>, 新倉 舞<sup>2</sup>, 吉田 誠<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 酒井 杏匠<sup>3</sup>,  
 志水 元亨<sup>3</sup>, 中堀 清<sup>4</sup>, Choi Cindy<sup>5</sup>, Ngan Chew Yee<sup>5</sup>, Lindquist Erika<sup>5</sup>, Lipzen Anna<sup>5</sup>,  
 Tritt Andrew<sup>5</sup>, Haridas Sajeet<sup>5</sup>, Barry Kerrie<sup>5</sup>, Grigoriev Igor V.<sup>5</sup>, Pukkila Patricia J.<sup>6</sup>  
 ( <sup>1</sup>秋田県大院・生資, <sup>2</sup>農工大院・農, <sup>3</sup>名城大院・農,  
<sup>4</sup>岡山大院・自科, <sup>5</sup>JGI, <sup>6</sup>Dept. Biol., Univ. North Carolina)  
 座長：富田 因則
- 14:08 3S-Bp05 昆虫のバキュロウイルスに対する抵抗性メカニズムの解明  
 .....○岩田 賢人<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 水谷 哲也<sup>3</sup>, 大松 勉<sup>3</sup>,  
 長井 誠<sup>3</sup>, 齋藤 康将<sup>1</sup>, 井上 真紀<sup>1</sup>, 仲井 まどか<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>農工大・農学系ゲノム人材育成プログラム,  
<sup>3</sup>農工大・国際家畜感染症防疫研究教育センター)  
 座長：富田 因則
- 14:23 3S-Bp06 材料の異なる堆肥の生物脱臭効果および微生物叢に関する研究  
 .....○北村 里香<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 前田 勇<sup>3</sup>,  
 飯郷 雅之<sup>3</sup>, 黒倉 健<sup>3</sup>, 岩淵 和則<sup>4</sup>, 齋藤 高弘<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>宇都宮大・バイオセ, <sup>2</sup>農工大, <sup>3</sup>宇都宮大・農, <sup>4</sup>北大院・農)  
 座長：富田 因則
- 14:39 3S-Bp07 機械学習システムによる人工知能の生物工学への応用  
 .....○石井 一夫<sup>1</sup>, 古崎 利紀<sup>1</sup>, 中村 和敬<sup>2</sup>, 當仲 寛哲<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>USP 研究所)
- 14:55 おわりに  
 ..... 石井 一夫

### Gap Filling of Metabolic Pathway and Application to Producing Valuable Compounds 〈国際シンポジウム〉

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C 会場 (13:00~15:00)

- 座長：Tomohiro Tamura
- 13:00 3S-Cp01 Discovery of valuable genes by massive sequencing and time lapse analysis of environmental RNAs  
 .....○Nobutaka Nakashima, Yuya Nakamura (Sch. Life Sci. Technol.)  
 座長：Nobutaka Nakashima
- 13:12 3S-Cp02 Transcriptome and translome of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2)  
 .....○Byung-Kwan Cho  
 (Dept. Biol. Sci., KAIST, South Korea)  
 座長：Nobutaka Nakashima
- 13:36 3S-Cp03 Genome-mining based natural product discovery  
 .....○Pei-Yuan Qian  
 (Division of Life Science and Environmental Science Programs, Hong Kong University of Science and  
 Technology)  
 座長：Nobutaka Nakashima
- 14:00 3S-Cp04 Current Status of CBD and Nagoya Protocol on ABS, including the Synthetic Biology  
 .....○Mutsuaki Suzuki (National Institute of Genetics)  
 座長：Tomohiro Tamura
- 14:12 3S-Cp05 Prediction and identification of sequences coding for orphan enzymes  
 .....○Takuji Yamada (Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

座長：Takuji Yamada

- 14:36 3S-Cp06 Elucidation of gene regulatory network by structural equation modelling  
 .....○Sachiyo Aburatani  
 (AIST)

### 和食の機能性のメカニズム～生活習慣病予防、腸内細菌へのインパクト～

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 D 会場 (13:00～15:00)

- 13:00 はじめに  
 ..... 北垣 浩志  
 座長：北垣 浩志
- 13:05 3S-Dp01 日本食の健康機能性  
 ..... ○都築 毅 (東北大院・農)  
 座長：北垣 浩志
- 13:30 3S-Dp02 アジア人の食と腸内細菌叢の関連性  
 ..... ○中山 二郎<sup>1</sup>, 本田 倫子<sup>2</sup>, Kisuse Juma<sup>2</sup>, 百田 理恵<sup>2</sup>, 田中 優<sup>2</sup>, 園元 謙二<sup>1</sup>, Lee Yuan-Kun<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大院・生資環, <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Natl. Univ. Singapore)
- 13:55 休憩  
 ..... 座長：中山 二郎
- 14:00 3S-Dp03 麹菌プロテアーゼの腸内細菌叢への影響  
 ..... ○加藤 範久 (広島大院・生物圏)  
 座長：中山 二郎
- 14:25 3S-Dp04 麹グルコシルセラミドの腸内細菌叢への影響  
 ..... 藤川 彩美<sup>1</sup>, 佐藤 友哉<sup>1</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 柳田 晃良<sup>2</sup>,  
 光武 進<sup>1</sup>, 永尾 晃治<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>3</sup>, ○北垣 浩志<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>佐賀大・農, <sup>2</sup>西九州大学, <sup>3</sup>九大院・農)  
 座長：中山 二郎
- 14:45 3S-Dp05 麹グリコシルセラミド分解物の PPAR への影響  
 ..... ○浜島 弘史, 光武 進, 北垣 浩志 (佐賀大・農)
- 14:55 おわりに  
 ..... 中山 二郎

### セルフリー（無細胞）タンパク質合成技術の新展開

ANA クラウンプラザホテル富山 3階 E 会場 (13:00～15:00)

- 13:00 はじめに  
 ..... 松浦 友亮  
 座長：松浦 友亮
- 13:02 3S-Ep01 ヒト因子由来無細胞タンパク質合成系の開発と応用  
 ..... ○町田 幸大<sup>1,2</sup>, 重田 友明<sup>1</sup>, 今高 寛晃<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>理研・ライフサイエンス)  
 座長：松浦 友亮
- 13:25 3S-Ep02 昆虫嗅覚受容体の機能的再構成系の構築と匂いセンサへの応用  
 ..... ○櫻井 健志, 光野 秀文, 神崎 亮平 (東大・先端研)  
 座長：松浦 友亮
- 13:48 3S-Ep03 再構成型無細胞タンパク質合成システムを利用した新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定  
 ..... ○清水 義宏, 鳴海 良平, 上田 泰己 (理研・生命システム)

- 座長：清水 義宏
- 14:11 3S-Ep04 セルフリータンパク質合成系を用いた特殊ペプチド創薬  
 ..... ○窪田 規一 (ペプチドリーム株式会社)
- 座長：清水 義宏
- 14:34 3S-Ep05 無細胞合成抗原を用いた抗膜タンパク質抗体作製技術  
 ..... ○竹田 浩之, 澤崎 達也 (愛媛大・PROS)
- 14:57  
 ..... 清水 義宏

## 一般講演 (午後の部)

富山国際会議場 2階ポスター会場 I (15:30~17:30)

### 【遺伝子工学】

- 15:30 3P-1p001 慢性皮膚疾患である乾癬関連遺伝子群の酵母を利用した解析  
 ..... ○辻 竜海 (山口大学院 創成科学研究科 化学系専攻)
- 16:30 3P-1p002 高温耐性酵母 *Ogataea polymorpha* による乳酸生産  
 ..... ○杉山 峰崇<sup>1</sup>, 加藤 謙斗<sup>1</sup>, 深谷 健<sup>1</sup>, 橋本 晋弥<sup>1</sup>, 笹野 佑<sup>1</sup>, 金子 嘉信<sup>1</sup>, 原島 俊<sup>2</sup>  
 (1 阪大院・工, 2 崇城大・生物生命)
- 15:30 3P-1p003 Expression of an AT-biased *Rhizopus* glucoamylase gene in *Aspergillus oryzae*  
 ..... ○Dalia Zaouil, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
 (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)
- 16:30 3P-1p004 Cas9 タンパク質を用いた麹菌のゲノム編集技術の開発  
 ..... ○嶋本 孝平<sup>1,2</sup>, 齊藤 亮太<sup>1</sup>, 和田 悠作<sup>3</sup>, 織田 健<sup>1</sup>, 奥田 将生<sup>1,2</sup>, 岩下 和裕<sup>1,4</sup>  
 (1 酒総研, 2 広島大院・生物圏, 3 ファスマック, 4 広島大院・先端物質)
- 15:30 3P-1p005 非相同末端結合に関与する遺伝子破壊株における麹菌の TALENs を用いたゲノム編集  
 ..... ○水谷 治<sup>1</sup>, 荒添 貴之<sup>2</sup>, 利田 賢次<sup>1</sup>, 林 梨咲<sup>1</sup>, 大里 修一<sup>2</sup>,  
 佐久間 哲史<sup>3</sup>, 山本 卓<sup>3</sup>, 桑田 茂<sup>2</sup>, 山田 修<sup>1</sup>  
 (1 酒総研, 2 明治大院・農, 3 広島大院・理)
- 16:30 3P-1p006 HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 生産菌における生産性向上 UV 変異株の変異点解析  
 ..... ○伊東 広哉<sup>1,3</sup>, 松井 真<sup>1</sup>, 熊谷 俊高<sup>2,3</sup>, 町田 雅之<sup>3,4</sup>, 柴田 孝<sup>1,3</sup>  
 (1 アステラス製薬, 2 ファームラボ, 3 TRAHED, 4 産総研)
- 15:30 3P-1p007 麹菌マルトーストランスポーター MalP 分解に関わる CreD-HulA 間の相互作用解析  
 ..... ○多田 日菜子, 田中 瑞己, 平本 哲也, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)
- 16:30 3P-1p008 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制関連因子 CreB の細胞内局在解析  
 ..... ○一瀬 桜子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)
- 15:30 3P-1p009 麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解におけるカルボキシ末端領域の関与  
 ..... ○田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)
- 16:30 3P-1p010 糸状菌の鉄恒常性維持を担う転写因子 HapX のシステインリッチ領域の機能解析  
 ..... ○村田 俊輔, 小森 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士 (名城大・農)
- 15:30 3P-1p011 *Aspergillus aculeatus* セルラーゼ誘導発現における *sepM* 遺伝子破壊の影響  
 ..... ○津村 亮輔, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科)
- 16:30 3P-1p012 *Aspergillus aculeatus* におけるセルロース系バイオマス分解酵素生産調節因子の探索  
 ..... ○白柳 英俊, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科)
- 15:30 3P-1p013 *Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁 alpha-1,3-グルカンの二次代謝物生産に及ぼす影響  
 ..... ○張 斯来, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)

- 16:30 3P-1p014 麹菌のアミラーゼ生産に関与する転写因子 MalR の核局在シグナル変異体の機能解析  
..... ○今野 友維, 鈴木 空太, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)
- 15:30 3P-1p015 麹菌のプロテアーゼ低生産および細胞壁構成因子破壊による異種タンパク質生産量への影響  
..... ○新庄 梨沙, 渡邊 崇健, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也 (東北大院・農)
- 16:30 3P-1p016 有用糸状菌 *Trichoderma reesei* 日本型変異株の網羅的表現型解析  
..... ○平沢 大樹<sup>1</sup>, 志田 洋介<sup>1</sup>, 田代 康介<sup>2</sup>, 久原 哲<sup>2</sup>, 小笠原 渉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長岡技科大, <sup>2</sup>九大院・農)
- 15:30 3P-1p017 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有するセスキテルペン合成酵素の同定および機能解析  
..... ○笠場 将太<sup>1</sup>, 北岡 卓也<sup>2</sup>, 一瀬 博文<sup>2</sup> (<sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>九大院・農)
- 16:30 3P-1p018 超好熱性アーキア由来ヘリカーゼの PCR 反応への影響  
..... ○川戸 克展<sup>1</sup>, 秀瀬 涼太<sup>1</sup>, 保川 清<sup>2</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>関西学院大院・理工, <sup>2</sup>京大院・農)
- 15:30 3P-1p019 ランダム変異による超好熱菌糖代謝変異株の単離と解析  
..... ○東 健弘<sup>1</sup>, 二石 涼平<sup>1</sup>, 折田 和泉<sup>1</sup>, 中村 聡<sup>1</sup>, 今中 忠行<sup>2</sup>, 福居 俊昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大・生命理工学院, <sup>2</sup>立命館大・生命科学)
- 16:30 3P-1p020 光化学系 II 耐熱性 D1/D2 タンパク質と D1 プロセシングプロテアーゼの中温性シアノバクテリアでの発現  
..... 鶴田 開生, 田中 誠, 原口 典久, 中山 泰宗, 長濱 一弘, ○松岡 正佳  
(崇城大・生物生命)
- 15:30 3P-1p021 水面浮遊性微細藻類 FFG039 株における遺伝子組換え技術の確立  
..... ○櫻井 美季<sup>1</sup>, 野島 大佑<sup>1</sup>, 若田 裕一<sup>2</sup>, 細川 隆史<sup>2</sup>, 邑上 健<sup>2</sup>, 吉野 知子<sup>1</sup>, 田中 剛<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>富士フィルム株式会社)
- 16:30 3P-1p022 シマミミズ *Eisenia fetida* を用いた異種遺伝子発現系の構築  
..... ○町田 悠, 伊佐 猛, 土田 喜野, 赤澤 真一 (長岡高専・物質工)
- 15:30 3P-1p023 Heterologous Gene Expression as A tool to Obtain Some Chemical Compound from Bifidobacteria  
..... ○Hend Altaib<sup>1</sup>, Izumi Nomura<sup>2</sup>, Tohru Suzuki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Fac. Appl. Biol. Gifu Univ., <sup>2</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)
- 16:30 3P-1p024 SUMO2 変異体ライブラリからの HER2 親和性選択  
..... ○河上 佳奈, 伊藤 春佳, 伊藤 伸哉, 牧野 祥嗣 (富山県大・工)
- 15:30 3P-1p025 大腸菌による抗結核薬 D-サイクロセリンの高レベル異種生産  
..... ○熊谷 孝則<sup>1</sup>, 小澤 智紀<sup>2</sup>, 青田 達明<sup>1</sup>, 谷本 桃子<sup>2</sup>, 的場 康幸<sup>1</sup>, 野田 正文<sup>1</sup>, 杉山 政則<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>広大院・医歯薬保健学, <sup>2</sup>広大・薬)
- 16:30 3P-1p026 認知症を引き起こす神経変性疾患原因タンパク質の酵母を用いた凝集性解析  
..... ○浦野 大樹<sup>1</sup>, 鈴木 絢子<sup>1,2</sup>, 星田 尚司<sup>1</sup>, 赤田 倫治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学・化学系, <sup>2</sup>現大分大・工・応化)
- 15:30 3P-1p027 シャペロン共発現がポリヒドロキシアルカン酸分子量へ与える影響  
..... ○南部 友香<sup>1</sup>, 百武 真奈美<sup>2</sup>, 廣江 綾香<sup>1</sup>, 柘植 丈治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>理研・バイオマス)
- 16:30 3P-1p028 *Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの遺伝子クローニングと大量発現  
..... ○鳥居 誉<sup>1</sup>, 奥野 圭祐<sup>2</sup>, 朝倉 紗也栞<sup>1</sup>, 大浦 麻里<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大・生物理工, <sup>2</sup>近畿大院・生物理工)
- 15:30 3P-1p029 蛍光タンパク質を利用した白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の交配技術開発  
..... ○近藤 旺次郎<sup>1</sup>, 隅谷 友紀<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)

## 【植物細胞工学, 組織培養, 育種工学】

- 16:30 3P-1p030 Identification of beta-amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis*  
 .....○Keita Tamura<sup>1</sup>, Hikaru Seki<sup>1</sup>, Hideyuki Suzuki<sup>2</sup>, Mareshige Kojoma<sup>3</sup>, Toshiya Muranaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Kazusa DNA Res. Inst., <sup>3</sup>Fac. Pharm. Sci., Health Sci. Univ. Hokkaido)
- 15:30 3P-1p031 キク科 *Flaveria* 属形質転換系と遺伝子発現誘導系の確立  
 .....○岡 美慧, 谷口 幸美, 宗景 ゆり (関西学院大院・理工)
- 16:30 3P-1p032 (講演中止)
- 15:30 3P-1p033 シロイヌナズナのディフェンシンに関する組換えタンパク質の調製と解析  
 .....○角谷 茜, 柳川 大樹, 今井 博之 (甲南大院・自然科学・生物)
- 16:30 3P-1p034 土壌肥沃度指標に基づく薬用植物の有機栽培  
 .....○山崎 透<sup>1</sup>, 荒木 希和子<sup>1</sup>, 上野 省一<sup>2</sup>, 久保 幹<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>立命館大院・生命科学, <sup>2</sup>ノエビア・研究開発部)

## 【酵素学, 酵素工学】

- 15:30 3P-1p035 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来ギ酸オキシダーゼにおける Tyr99, Phe405 の役割  
 .....○田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之 (福井大院・工)
- 16:30 3P-1p036 ラン藻 *Synechocystis* の乳酸脱水素酵素の生化学解析  
 .....○伊東 昇紀, 竹屋 壮浩, 小山内 崇 (明治大・農)
- 15:30 3P-1p037 海洋細菌由来マルチ銅オキシダーゼを用いた塩基性色素の脱色  
 .....○海老原 京太<sup>1</sup>, 吉川 潤<sup>2</sup>, 堀口 博文<sup>2</sup>, 天知 誠吾<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>千葉大院・園芸, <sup>2</sup>合同酒精(株))
- 16:30 3P-1p038 サルコシンオキシダーゼの L-チオプロリンに対する反応性評価  
 .....○岡島 奨, 吉田 知左, 西矢 芳昭 (摂南大・生命科学)
- 15:30 3P-1p039 超好熱古細菌由来 glycerol 代謝酵素の酵素活性調整の分子機構  
 .....○古賀 雄一, 高野 築, 小西 佳菜子, 小林 淳, 大政 健史 (阪大院・工)
- 16:30 3P-1p040 D-サイクロセリン生合成に関わる新規ヘムタンパク質 DcsA の構造と性質  
 .....○的場 康幸<sup>1</sup>, 古川 裕貴<sup>1</sup>, 柳澤 幸子<sup>2</sup>, 宇田 成利<sup>1</sup>, 熊谷 孝則<sup>1</sup>, 小倉 尚志<sup>2</sup>, 杉山 政則<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>広島大院・医歯薬保健, <sup>2</sup>兵庫県大院・生命理)
- 15:30 3P-1p041 イオン液体による酵素の耐熱化 : 安定化剤、反応溶媒への展開  
 .....○金子 恒太郎, 河合 功治 (ミヨシ油脂)
- 16:30 3P-1p042 クマモリシンのカルシウムイオン結合部位特異的変異体の作製と熱安定性の解析  
 .....○洲鎌 勇太<sup>1</sup>, 尾山 廣<sup>2</sup>, 伊東 昌章<sup>1</sup> (<sup>1</sup>沖縄高専, <sup>2</sup>摂南大・理工)
- 15:30 3P-1p043 Toxin-antitoxin 分子認識機構 : 病原菌由来 RNA インターフェレンスの特異的認識配列の同定  
 .....横田 亜紀子<sup>1</sup>, 宮本 龍樹<sup>1,2</sup>, 大田 悠里<sup>1,2</sup>, 常田 聡<sup>2</sup>, ○野田 尚宏<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>2</sup>早大・先進理工)
- 16:30 3P-1p044 合成生物学的手法により構築したシアノバクテリアによる CO<sub>2</sub> からバイオエチレンへの変換効率に関する研究  
 .....○神藤 定生<sup>1</sup>, 林 茉依<sup>2</sup>, 細田 晃文<sup>2</sup>, 田村 廣人<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>名城大・理工, <sup>2</sup>名城大・農)
- 15:30 3P-1p045 ジアホラーゼ内包硫化カドミウムナノ粒子の作製と水系/非水系における特性評価  
 .....○安田 信幸, 油井 信弘, 阿部 克也 (工学院大・先進工・生化)
- 16:30 3P-1p046 D-erythro-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの機能解析および光学分割への応用  
 .....○柴野 可菜, 長野 弘幸, 横田 篤, 和田 大 (北大院・農・微生物生理学)
- 15:30 3P-1p047 *Pseudomonas nitroreducens* 由来  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究  
 .....○佐野 千晴, 岡住 脩平, 今岡 大士, 若山 守 (立命館大院・生命科学)

- 16:30** 3P-1p048 *Exiguobacterium acetylicum* 由来ポリ乳酸分解活性を有するプロテアーゼの精製と諸特性解析  
..... ○田所 花菜, 杉森 大助 (福島大院・理工)
- 15:30** 3P-1p049 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの精製と特徴  
..... ○竹屋 壮浩, 小山内 崇 (明治大・農)
- 16:30** 3P-1p050 *Flavobacterium aquatile* 由来  $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase 遺伝子の発現  
..... ○中越 麻里菜, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司 (阪府大院・生環科・応生科)
- 15:30** 3P-1p051 ジペプチド Val-Gly 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼのクローニングと精製および諸性質の検討  
..... ○田中 貴大<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup> (<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)
- 16:30** 3P-1p052 ジペプチド Trp-His 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼの精製と諸性質の検討  
..... ○牧 慶子<sup>1</sup>, 田中 貴大<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)
- 15:30** 3P-1p053 L-アミノ酸エステラーゼによるイミダゾールペプチドの酵素合成に関する研究  
..... ○小塩 茂々子<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)
- 16:30** 3P-1p054 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が有する GH134 ファミリーに属する糖質加水分解酵素の生理学的役割の解明  
..... ○新沢 祐大<sup>1</sup>, 酒井 杏匠<sup>1</sup>, 木本 紗蘭<sup>1</sup>, 嶺澤 美帆<sup>1</sup>, 望月 麻衣<sup>1</sup>, 神藤 定生<sup>2</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>名城大・理工)
- 15:30** 3P-1p055 糸状菌および放線菌由来 GH134 に属する  $\beta$ -1,4-マンナーゼの機能解析と活性部位残基の探索  
..... ○木本 紗蘭<sup>1</sup>, 酒井 杏匠<sup>1</sup>, 新沢 祐大<sup>1</sup>, 嶺澤 美帆<sup>1</sup>, 山田 みゆき<sup>1</sup>, 望月 麻衣<sup>1</sup>, 神藤 定生<sup>2</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>名城大・理工)
- 16:30** 3P-1p056 好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース加水分解酵素の酵素的特徴  
..... ○渡辺 輝彦, 檜村 佳奈, 桐村 光太郎 (早大・先進理工・応化)
- 15:30** 3P-1p057 *Aspergillus niger* NRRL 328 由来 III 型ポリケタイト合成酵素の機能解析  
..... ○丸海老 純也, 渡邊 昭太郎, 小林 慶一, 桐村 光太郎 (早大・先進理工・応化)

### 【タンパク質工学】

- 16:30** 3P-1p058 嗅覚受容体膜輸送機構の解明に向けた RTP の機能構造解析  
..... ○玉木 良平<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, 池上 健太郎<sup>1</sup>, 松波 宏明<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>デューク大・メディカルセンター)
- 15:30** 3P-1p059 Selfassembling supramolecular nanostructures created by *de novo* extender protein nanobuilding blocks  
..... Naoya Kobayashi<sup>1</sup>, Kouichi Inano<sup>1</sup>, Takaaki Sato<sup>1</sup>, Keisuke Miyazawa<sup>2</sup>, Takeshi Fukuma<sup>2</sup>, Michael H. Hecht<sup>3</sup>, ○Ryoichi Arai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Dept. of Chem., Princeton Univ.)
- 16:30** 3P-1p060 カイコ由来糖転移酵素 GnTII 及び GalT オルソログの機能解析  
..... ○宮下 龍之介<sup>1</sup>, 宮崎 剛亜<sup>1,2</sup>, 加藤 竜也<sup>1,2</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>静大・創科技学院, <sup>2</sup>静大・グリーン科技研)
- 15:30** 3P-1p061 乳酸オキシダーゼのタンパク質工学による基質特異性の改変  
..... ○比留田 美咲, 西矢 芳昭 (摂南大院 生命科学)
- 16:30** 3P-1p062 N 末端蛍光標識抗体プローブを用いた抗原の蛍光検出  
..... ○福永 圭佑<sup>1</sup>, 渡邊 貴嘉<sup>1</sup>, Novitasari Dian<sup>1</sup>, 阿部 亮二<sup>2</sup>, 大橋 広行<sup>2</sup>, 芳坂 貴弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北陸先端大・マテリアル, <sup>2</sup>ウシオ電機)

- 15:30 3P-1p063 脂肪酸アシル-ACP 還元酵素の *in vivo* 迅速活性評価法の開発  
 ..... ○林 勇樹, 新井 宗仁 (東大院・総合文化)
- 16:30 3P-1p064 シグナル伝達分子の特異的活性化を目的とした新規受容体の開発  
 ..... ○Kongkrontong Tatphon, 長棟 輝行, 河原 正浩 (東大院・工)
- 15:30 3P-1p065 細胞死シグナルを利用したタンパク質間相互作用阻害分子選択法の開発  
 ..... ○江口 晃弘, 長棟 輝行, 河原 正浩 (東大院・工)
- 16:30 3P-1p066 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の機能を利用した GFP のシリカへの固定化  
 ..... ○小林 大起<sup>1</sup>, 天野 太郎<sup>2</sup>, 有馬 二郎<sup>1</sup>, 清水 克彦<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>鳥取大・農, <sup>2</sup>鳥取大院・農, <sup>3</sup>鳥取大産学)
- 15:30 3P-1p067 CutA1 及び VHH 抗体を利用した高感度バイオセンシングシステムのデザイン  
 ..... ○伊達 弘輝, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行 (岡山大院・自科)
- 16:30 3P-1p068 アクセサリータンパク質を標的とした抗センダイウイルス薬の開発  
 ..... ○小田 康祐, 的場 康幸, 入江 崇, 坂口 剛正 (広大院・医歯薬保健学)

### 【発酵生理学, 発酵工学】

- 15:30 3P-1p069 4-aminocinnamic acid の発酵生産システムの構築  
 ..... ○皆川 一, 榊尾 俊介, 周 勝敏, 高谷 直樹 (筑波大・生命環境)
- 16:30 3P-1p070 光学活性ジカルボン酸モノアミド生産に有用な新規微生物イミダーゼ  
 ..... ○間中 千尋, 光川 侑輝, 志澤 宏明, 日比 慎, 高橋 里美, 小川 順  
 (京大院・農)
- 15:30 3P-1p071 タンデム酵素反応を利用した S-アルキルシステインスルフォキシド生産のためのバイオプロセス  
 開発  
 ..... 日比 慎, ○松岡 智里, 飯星 貴幸, 小園 祥子, 高橋 里美, 小川 順  
 (京大院・農)
- 16:30 3P-1p072 出芽酵母における褐藻類由来糖質 (アルギン酸とマンニトール) の代謝機序  
 ..... 松岡 史也<sup>1</sup>, 柏原 貴幸<sup>1</sup>, 平山 誠<sup>1</sup>, 田中 秀樹<sup>1</sup>,  
 佐藤 潤季<sup>1</sup>, 橋本 渉<sup>1</sup>, 村田 幸作<sup>2</sup>, ○河井 重幸<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>摂南大・理工)
- 15:30 3P-1p073 Effect of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production  
 ..... ○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 16:30 3P-1p074 Semi-continuous anaerobic digestion under illumination condition for mitigating ammonia inhibition  
 ..... ○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Haoyuan Gao, Yingnan Yang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 15:30 3P-1p075 バイオマスを原料としたフェニルプロパノイドの発酵生産  
 ..... ○佐々倉 有麻<sup>1</sup>, 榊尾 俊介<sup>2</sup>, 高谷 直樹<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大)
- 16:30 3P-1p076 Study on the intermittent illumination to mitigate ammonia inhibition under mesophilic condition  
 ..... ○Haoyuan Gao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 15:30 3P-1p077 Development of bioprocess with designed biomass: Design of rice straw hydrolysate for efficient butanol  
 production without carbon catabolite repression  
 ..... ○Tao Zhao<sup>1</sup>, Yukihiro Tashiro<sup>1</sup>, Takuya Noguchi<sup>1</sup>, Jin Zheng<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Univ. Sci. Technol. Beijing, <sup>3</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)

## 【オミクス解析】

- 16:30 3P-1p078 実験室進化とオミクス解析によるイソプロパノール耐性大腸菌の育種  
 ..... ○堀之内 貴明<sup>1</sup>, 酒井 亜希<sup>1</sup>, 田辺 久美<sup>1</sup>, 古澤 力<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 理研・生命システム, <sup>2</sup> 東大院・理)
- 15:30 3P-1p079 Widely targeted metabolic profiling for improvement of 1-butanol-producing *Synechococcus elongatus*  
 ..... ○Artnice Mega Fathima<sup>1</sup>, Walter Lavina<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, James Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup> Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)
- 16:30 3P-1p080 酢酸菌 *Komagatacibacter europaeus* 由来転写因子 Lrp の標的遺伝子の網羅的探索  
 ..... ○石井 友理<sup>1</sup>, 赤坂 直紀<sup>2</sup>, 佐古田 久雄<sup>2</sup>, 秀瀬 涼太<sup>1</sup>, 阿部 達明<sup>3</sup>,  
 兼崎 友<sup>4</sup>, 石川 森夫<sup>3</sup>, 貝沼 (岡本) 章子<sup>3</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 関西学院大院・理工, <sup>2</sup> マルカン酢, <sup>3</sup> 東京農大・応生科醸造, <sup>4</sup> 東京農大・ゲノムセンター)
- 15:30 3P-1p081 担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成初期に発現するタンパク質の探索およびその機能解析につ  
 いて  
 ..... ○酒井 杏匠<sup>1</sup>, 相島 奈央<sup>1</sup>, 村口 元<sup>2</sup>, 吉田 誠<sup>3</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 名城大院・農, <sup>2</sup> 秋田県立大・生物資源, <sup>3</sup> 東京農工大・農)
- 16:30 3P-1p082 メタボロミクスに基づく *Saccharomyces cerevisiae* の連続培養におけるエタノール生産の低減  
 ..... ○井村 誠<sup>1</sup>, 岩切 亮<sup>1</sup>, 馬場 健史<sup>2,3</sup>, 福崎 英一郎<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup> 興人ライフサイエンス, <sup>2</sup> 九大・生医研, <sup>3</sup> 阪大院・工)
- 15:30 3P-1p083 ゲノミクスとトランスクリプトミクスを用いた麹菌変異株の変異点の同定と解析  
 ..... ○吉村 太郎<sup>1,2</sup>, 和田 洋樹<sup>1,2</sup>, 松田 俊文<sup>2</sup>, 佐藤 敦史<sup>1</sup>,  
 小川 真弘<sup>1,3</sup>, 松島 健一朗<sup>1</sup>, 小山 泰二<sup>1,3</sup>, 伊藤 考太郎<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> キッコーマン, <sup>2</sup> キッコーマン食品, <sup>3</sup> 野田産研)
- 16:30 3P-1p084 バイオ医薬生産に向けた CHO 細胞培養情報データ解析システムの構築  
 ..... ○許 漢修, 荒木 通啓, 蓮沼 誠久, 河野 愛子, 近藤 昭彦 (神戸大院・科学技術イノベーション)
- 15:30 3P-1p085 ハッサク葉のストレス応答反応における二次代謝物質の変動解析  
 ..... ○伊佐木 芳<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1,2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 近畿大院・生物理工・生物工, <sup>2</sup> 近畿大・附属農場)
- 16:30 3P-1p086 和食固有素材摂食による生体応答プロファイリング  
 ..... 益田 静香<sup>1</sup>, ○嶋 秀明<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>2,3</sup>, 篠 阿弥宇<sup>2</sup>,  
 梶川 瑞穂<sup>1</sup>, 井上 能博<sup>1</sup>, 石戸 聡<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>2,3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup> 昭和薬大・薬, <sup>2</sup> 理研・環境資源科学研究セ, <sup>3</sup> 横浜市大院・生医, <sup>4</sup> 名大院・生命農学)

## 【生体情報工学, バイオインフォマティクス】

- 15:30 3P-1p087 *Staphylococcus aureus* に注目したアトピー性皮膚炎の重症化メカニズムの理解  
 ..... ○沖野 風沙<sup>1</sup>, 稲垣 瑞穂<sup>1</sup>, 佐藤 綾子<sup>1</sup>, 澤野 博之<sup>1</sup>, 坪内 美美香<sup>1</sup>,  
 林 将大<sup>2</sup>, 田中 香お里<sup>2</sup>, 兼崎 友<sup>3</sup>, 吉川 博文<sup>3</sup>, 鈴木 徹<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 岐阜大・応生科, <sup>2</sup> 岐阜大・生命科学総合研究支援センター, <sup>3</sup> 東農大・応生科)
- 16:30 3P-1p088 *Aspergillus* section *Flavi* の比較ゲノム解析  
 ..... ○佐藤 敦史<sup>1</sup>, 松島 健一朗<sup>1</sup>, 伊藤 考太郎<sup>1</sup>, 服部 正平<sup>2,3</sup>, 光山 統泰<sup>4</sup>  
 ( <sup>1</sup> キッコーマン, <sup>2</sup> 東大院・新領域, <sup>3</sup> 早大・先進理工, <sup>4</sup> 産総研)
- 15:30 3P-1p089 糖質系高分子に対する分子動力学計算のためのパラメーター設定支援プログラム  
 ..... ○園部 智彩<sup>1</sup>, 矢部 誠<sup>2</sup>, 上田 一義<sup>1</sup>, 近藤 敬子<sup>3</sup>, 片平 正人<sup>3</sup>, 武田 穰<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 横国大院・工, <sup>2</sup> 横浜市大院・生命医科, <sup>3</sup> 京大・エネルギー理工研)
- 16:30 3P-1p090 Effect of d-and l-menthol on stability of membrane heterogeneity  
 ..... ○Pooja Gusain<sup>1</sup>, Kunihide Hoshino<sup>1,2</sup>, Yoshio Tsujino<sup>1,2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup> Takasago International Corporation)

- 15:30 3P-1p091 ディープラーニングを用いた生体分子解析  
 ..... ○三宅 淳, 金下 裕平, 浅谷 学嗣, 東 侑之介, 田川 聖一, 新岡 宏彦  
 (阪大院・基礎工)
- 16:30 3P-1p092 シェルスクリプトを用いたパラレルモンテカルロ法の構築と生物学への応用  
 ..... ○石井 一夫<sup>1</sup>, 中村 和敬<sup>2</sup>, 當仲 寛哲<sup>2</sup> (<sup>1</sup>農工大・農,<sup>2</sup>USP 研)
- 15:30 3P-1p093 糖残基を指標とする抗菌性化合物探索のためのゲノム情報解析ツールの開発  
 ..... ○木村 明音, 笹川 真稚, 市川 夏子, 藤田 信之 (NITE・NBRC)
- 16:30 3P-1p094 アンチセンス核酸による配列特異的な殺菌  
 ..... ○木野 裕太, 中島 信孝 (東工大院・生命理工)
- 15:30 3P-1p095 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索  
 ..... ○中村 祐哉<sup>1</sup>, 森 宙史<sup>1</sup>, 黒川 顕<sup>2</sup>, 中島 信孝<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東工大院・生命理工,<sup>2</sup>東工大・地球生命研)
- 16:30 3P-1p096 細胞画像情報解析による抗がん剤プロファイリング技術の開発  
 ..... ○河合 駿<sup>1</sup>, 岡田 法大<sup>1</sup>, 湯澤 勝浩<sup>2</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>,  
 清田 泰次郎<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>名大院・創薬科学,<sup>2</sup>名大院・工,<sup>3</sup>ニコン)
- 15:30 3P-1p097 乳化を指標とした細胞壁形成阻害剤の新規スクリーニング法の検討  
 ..... ○根路 銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之 (阪市大院・工・化生系)

### 【システムバイオロジー】

- 16:30 3P-1p098 海洋微生物群集による有機化合物の変換過程：NMR を用いた網羅型解析  
 ..... ○内宮 万里央<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 坪井 裕理<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>理研 CSRS,<sup>2</sup>横市大院・生命医,<sup>3</sup>名大院・生命農)

### 【環境工学, 廃水処理技術】

- 15:30 3P-1p099 フローサイトメーターを用いた、長期冷蔵保存した海水中における微生物細胞の膜損傷状態の評価  
 ..... ○高橋 裕里香<sup>1</sup>, 古澤 之裕<sup>2</sup>, 島 俊郎<sup>1</sup>, 西田 洋巳<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山県大・工,<sup>2</sup>富山県大・教養)
- 16:30 3P-1p100 家庭内使用タオルに生息する細菌によるバイオフィーム形成の解析  
 ..... ○諸星 知広, 池谷 謙太, 池田 宰 (宇都宮大院・工)
- 15:30 3P-1p101 テレフタル酸分解菌の取得とその性質  
 ..... ○中島 鈴佳<sup>1</sup>, 野中 大輔<sup>1</sup>, 森田 穂<sup>1</sup>, 内堀 孝博<sup>3</sup>, 清 啓自<sup>2</sup>, 中島 敏明<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大,<sup>2</sup>筑波大院・生命環境,<sup>3</sup>パナック工業)
- 16:30 3P-1p102 *P. pseudoflava* および *P. palleronii* による芳香族化合物の生物分解に関する研究  
 ..... ○中屋 江梨花, モタカトラ ベンカテスワーレディ, 矢島 由佳, 張 倬喆 (室工院・工・環境創生)
- 15:30 3P-1p103 高濃度脂肪酸を効率的に分解する酵母の単離と挙動解析法の検討  
 ..... ○仲山 真美, 綾部 里美 (SG ラボラトリー)
- 16:30 3P-1p104 産業用リパーゼによる新規コポリエステルの生分解  
 ..... ○廣田 泰志<sup>1</sup>, 川西 琢也<sup>1,2</sup>, 滝口 昇<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>金沢大院・自科,<sup>2</sup>金沢大・理工)
- 15:30 3P-1p105 都市排水を利用した微細藻類のバイオ燃料生産に向けた新規候補株の探索  
 ..... ○星川 優美子<sup>1</sup>, 野島 大佑<sup>1</sup>, 高野 博幸<sup>2</sup>, 田中 剛<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>農工大・工,<sup>2</sup>太平洋セメント)
- 16:30 3P-1p106 *Pelomonas saccharophila* MRB3 によるコウキクサ成長促進効果の検討  
 ..... ○加地 由季子<sup>1</sup>, 黒田 真史<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 池 道彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪大院・工,<sup>2</sup>産総研・生物プロセス)

- 15:30 3P-1p107 環境中の微生物群集がコウキクサの成長に及ぼす影響の評価  
 ..... ○黒田 真史<sup>1</sup>, 石澤 秀紘<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 森川 正章<sup>3</sup>, 池 道彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪大院・工, <sup>2</sup> 産総研・生物プロセス, <sup>3</sup> 北大院・環境 )
- 16:30 3P-1p108 FISH 法と定量 PCR 法による国内下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌の探索  
 ..... ○新田見 匡<sup>1</sup>, 庄司 仁<sup>2</sup>, 野口 愛<sup>3</sup>, 押木 守<sup>4</sup>,  
 黒田 真史<sup>5</sup>, 金田一 智規<sup>6</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>, 栗栖 太<sup>7</sup>  
 ( <sup>1</sup> 横国大院・工, <sup>2</sup> 成蹊大・理工, <sup>3</sup> 金沢大・理工, <sup>4</sup> 長岡高専・環境都市,  
<sup>5</sup> 阪大院・工, <sup>6</sup> 広島大院・工, <sup>7</sup> 東大院・工 )
- 15:30 3P-1p109 Development of P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> thin film modified by polyethylene glycol for water treatment  
 ..... ○Qiansu Ma, Zetao Dong, Qi Zhu, Xiaohong Hu, Yingnan Yang  
 ( Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba )
- 16:30 3P-1p110 Improvement of silver modified TiO<sub>2</sub> solar-light-driven photocatalyst by hydrothermal method  
 ..... ○Zhu Qi, Xiaohong Hu, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
 ( Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba )
- 15:30 3P-1p111 Inactivation of *Escherichia coli* using P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst under LED irradiation  
 ..... ○Na Liu, Qi Zhu, Ruida Xiao, Yingnan Yang  
 ( Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba )

### 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 16:30 3P-1p112 気生微細藻類 *Vischeria helvetica* の脂質生合成を制御するストレス応答 シグナル伝達  
 ..... ○油井 信弘, 阿部 克也 ( 工学院大・先進工・生化 )
- 15:30 3P-1p113 低温・弱光において生育可能な気生微細藻類の探索と特徴づけ  
 ..... ○西田 章弘, 油井 信弘, 阿部 克也 ( 工学院大・先進工・生化 )
- 16:30 3P-1p114 塩ストレス下におけるウキクサデンプン合成代謝の特徴とそのデンプン増産への応用  
 ..... ○高木 航平, 李 彦, 遠山 忠, 森 一博 ( 山梨大院・医工総 )
- 15:30 3P-1p115 Effects of photocatalytic pretreatment on *Chlorella vulgaris* to enhance biohydrogen production  
 ..... ○Mishma Silvia Stanislaus<sup>1</sup>, Qi Zhu<sup>1</sup>, Chenyu Zhao<sup>1</sup>, Nobuaki Negishi<sup>2</sup>, Yingnan Yang<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup> AIST )
- 16:30 3P-1p116 オイル高蓄積海洋珪藻 *Fistulifera solaris* におけるオイルボディタンパク質の解析  
 ..... ○野島 大佑, 吉野 知子, 田中 剛 ( 農工大院・工 )
- 15:30 3P-1p117 明暗周期下で効率的に油脂を生産するための海洋性緑藻培養技術の開発  
 ..... ○藤原 悠右<sup>1</sup>, 加藤 悠一<sup>1</sup>, 賀 詩欣<sup>2</sup>, 蓮沼 誠久<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup> Harbin Institute of Technology, China )
- 16:30 3P-1p118 海藻由来好熱菌を用いた海藻分解プロセスの検討  
 ..... 藤井 健太<sup>1</sup>, 奥中 淳平<sup>2</sup>, 富永 有里絵<sup>1</sup>, 八木 寿梓<sup>3</sup>, ○大城 隆<sup>1</sup>, 鈴木 宏和<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 鳥取大院・工・化生応工, <sup>2</sup> 鳥取大・工・生応工, <sup>3</sup> 鳥取大・工・GSC )
- 15:30 3P-1p119 ミトコンドリア電子伝達系制御によるユーグレナ低酸素下ワックスエステル生産の調節  
 ..... ○中澤 昌美<sup>1,2</sup>, 太田 剛志<sup>1</sup>, 石川 孝博<sup>2,3</sup>, 上田 光宏<sup>1</sup>,  
 阪本 龍司<sup>1</sup>, 乾 博<sup>2,4</sup>, 中野 長久<sup>1</sup>, 宮武 和孝<sup>1,5</sup>  
 ( <sup>1</sup> 阪府大院・生環科, <sup>2</sup> JST・CREST, <sup>3</sup> 島根大院・生資料,  
<sup>4</sup> 阪府大院・総リハ, <sup>5</sup> 帝塚山学院大・人間科 )
- 16:30 3P-1p120 ラン藻スピルリナからの高生産エタノール変換プロセスの開発  
 ..... ○藍川 晋平<sup>1</sup>, 猪熊 健太郎<sup>1</sup>, 若井 暁<sup>1</sup>, 佐々木 建吾<sup>1</sup>, 蓮沼 誠久<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 神戸大院・イノベ, <sup>2</sup> 神戸大院・工 )

- 15:30** 3P-1p121 藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 *hox* 遺伝子変異株のコントロールされた培養条件における有機酸生産  
 ..... ○中島 満晴<sup>1</sup>, 飯嶋 寛子<sup>1</sup>, 白井 智量<sup>2</sup>, 岡本 真美<sup>2</sup>,  
 蓮沼 誠久<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2,3</sup>, 平井 優美<sup>2</sup>, 小山内 崇<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 明治大・農, <sup>2</sup> 理研・CSRS, <sup>3</sup> 神戸大院・工 )
- 16:30** 3P-1p122 Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides*  
 ..... ○Dung Pham Khanh<sup>1</sup>, Atsushi Miyata<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Harutake Yamazaki<sup>2</sup>, Kazuo Masaki<sup>3</sup>,  
 Kazuki Mori<sup>4</sup>, Kosuke Tashiro<sup>4</sup>, Satoru Kuhara<sup>4</sup>, Hiroaki Takaku<sup>2</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> Nagaoka Univ. Technol., <sup>2</sup> Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.,  
<sup>3</sup> NRIB, <sup>4</sup> Fac. Agric., Kyushu Univ. )
- 15:30** 3P-1p123 II-VI 族化合物半導体結晶を合成する光合成細菌のスクリーニング  
 ..... ○清水 稜, 富永 依里子, 岡村 好子 ( 広島大院・先端物質 )
- 16:30** 3P-1p124 ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した大腸菌を用いた無機-バイオハイブリッド光触媒による水からの水素製造  
 ..... ○本田 裕樹<sup>1</sup>, 渡邊 源規<sup>1</sup>, 萩原 英久<sup>1,2</sup>, 伊田 進太郎<sup>1,2</sup>, 石原 達己<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup> 九大カーボンニュートラル・エネルギー国際研, <sup>2</sup> 九大院・工 )
- 15:30** 3P-1p125 光合成細菌と枯草菌の共培養による酸素ガス共存下の窒素固定  
 ..... ○前田 勇, 久下沼 匠 ( 宇都宮大院・農 )
- 16:30** 3P-1p126 Is Archaeorhodopsin a powerful photosensitizer of the TiO<sub>2</sub> based solar energy conversion system ?  
 ..... ○Luomeng Chao<sup>1</sup>, Gang Dai<sup>2</sup>, Xiong Geng<sup>3</sup>, Tatsuo Iwasa<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup> Grad. Sch. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan,,  
<sup>2</sup> Coll. Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China,  
<sup>3</sup> Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan )
- 15:30** 3P-1p127 銀ナノ粒子・ボロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の暗所と可視光照射下におけるカビ胞子に対する殺菌効果  
 ..... ○深野木 伸太<sup>1</sup>, 宮崎 愛<sup>1</sup>, 山本 幸次郎<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 近大院・産理工・生環化, <sup>2</sup> 伊都研 )
- 16:30** 3P-1p128 銀ナノ粒子・ボロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の暗所と可視光照射下における病原細菌殺菌効果  
 ..... ○宮崎 愛<sup>1</sup>, 深野木 伸太<sup>1</sup>, 山本 幸次郎<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 近畿大院・産理工・生環化, <sup>2</sup> 伊都研 )
- 15:30** 3P-1p129 銀ナノ粒子・ボロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の近赤外光照射下における殺菌効果  
 ..... ○山本 幸次郎<sup>1</sup>, 深野木 伸太<sup>1</sup>, 宮崎 愛<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> 近畿大院・産理工・生環化, <sup>2</sup> 伊都研 )

### ANA クラウンプラザホテル富山 3階ポスター会場 II (ASUKA) (15:30~17:30)

#### 【生物化学工学】

- 16:30** 3P-2p132 LAL 固定化ビーズを用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用 (第3報)  
 ..... ○猪瀬 陽加<sup>1</sup>, 飯島 綾<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 筑波大・生物資源, <sup>2</sup> 筑波大院・生命環境 )
- 15:30** 3P-2p133 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析  
 ..... ○大瀧 賀也<sup>1</sup>, 飯島 綾<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> 筑波大・生物資源, <sup>2</sup> 筑波大院・生命環境 )
- 16:30** 3P-2p134 Development of a novel co-culture-cell bioreactor system for bioethanol production from rice straw  
 ..... ○Yu-Kuo Liu, Yi-Chieh Lee  
 ( Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., ChangGung Univ., Taiwan, ROC )

- 15:30 3P-2p135 有機溶媒非耐性菌による疎水性物質生産を目的とした隔壁二相培養系の提案  
..... ○滝口 昇<sup>1</sup>, 穴田 侑也<sup>2</sup>, 川西 琢也<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>金沢大・理工, <sup>2</sup>ダイト株式会社)
- 16:30 3P-2p136 負電荷脂質を含む生体模倣膜での多価カチオン添加による相分離構造形成  
..... ○古田 一夢, 下川 直史, 高木 昌宏 (北陸先端大・マテリアル)
- 15:30 3P-2p137 タンパク質のアミロイド化を利用した機能性材料の開発  
..... ○大島 立樹<sup>1</sup>, 迫野 昌文<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工)
- 16:30 3P-2p138 バイオナノカプセルとリポソームの複合粒子による *in vivo* での抗腫瘍効果  
..... ○西村 勇哉<sup>1</sup>, 鈴木 貴弘<sup>2</sup>, 森田 健太<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>神戸大院・工)
- 15:30 3P-2p139 ショウジョウバエ株化神経細胞 BG2-c6 を用いたアミロイドβ神経細胞毒性評価  
..... ○山下 涼太<sup>1</sup>, 板田 鉄平<sup>1</sup>, 中川 裕之<sup>2</sup>, 上井 幸司<sup>1</sup>, 徳楽 清孝<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>室工大院・工・環境創生, <sup>2</sup>福岡大・理・地球圏科学)
- 16:30 3P-2p140 Fish-killing activities and possible toxic factors of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*  
..... Daekyung Kim<sup>2</sup>, Kichul Cho<sup>2</sup>, ○Tatsuya Oda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Jeju Center, KBSI, Korea)
- 15:30 3P-2p141 *Corynebacterium glutamicum* を用いたヘミセルロース系バイオマスからのカダベリン生産  
..... ○今尾 健太, 山口 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦 (神戸大院・工)
- 16:30 3P-2p142 カバノアナタケの液体表面培養による抗酸化物質の生産  
..... ○藏本 彩加, 高柴 則子, 櫻井 明彦 (福井大院・工)
- 15:30 3P-2p143 σ 因子欠損放線菌の 3,4-AHBA 生産への影響  
..... ○釜我 圭<sup>1</sup>, 柏木 紀賢<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション)
- 16:30 3P-2p144 固定化フォトバイオリクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオール生産  
..... ○端 瞭太<sup>1,2</sup>, 堀内 淳一<sup>1,2</sup>, 熊田 陽一<sup>1,2</sup>, 広川 安孝<sup>2,3</sup>, 花井 泰三<sup>2,3</sup>, 村上 明男<sup>2,4</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>九大院・農, <sup>4</sup>神戸大院・工)
- 15:30 3P-2p145 Sortase A を用いた大腸菌体内での代謝酵素の連結とその影響  
..... ○松本 拓也<sup>1</sup>, 田中 勉<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大院・科イノ, <sup>2</sup>神戸大院・工)
- 16:30 3P-2p146 黄麹菌 hydrophobin-cutinase 間相互作用における hydrophobin N 末端側の寄与  
..... ○田中 拓未<sup>1</sup>, 深谷 愛衣<sup>2</sup>, 佐藤 大貴<sup>1</sup>, 對馬 裕誠<sup>1</sup>, 上原 健二<sup>1</sup>, 高橋 徹<sup>3</sup>, 阿部 敬悦<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・農, <sup>2</sup>東北大・農・応生化, <sup>3</sup>東北大・未来研)
- 15:30 3P-2p147 腸内有用細菌のストロンチウム除去特性の解析 (第2報)  
..... ○遠藤 輪, 青柳 秀紀 (筑波大院・生命環境)
- 16:30 3P-2p148 模擬微小重力培養が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析と利用 (第2報)  
..... ○長谷川 文香, 青柳 秀紀 (筑波大院・生命環境)
- 15:30 3P-2p149 大腸菌フロック上での組換えタンパク質固相発現系の構築  
..... ○尾島 由紘<sup>1</sup>, 布上 翔太<sup>2</sup>, 東 雅之<sup>1</sup>, 田谷 正仁<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>阪市大院・工・化生系, <sup>2</sup>阪大院・基礎工)
- 16:30 3P-2p150 菌体表面疎水性とバイオフィーム形成量との関係解明  
..... ○谷川 絢美<sup>1</sup>, 小田 忍<sup>2</sup>, 大箸 信一<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>金工大・工, <sup>2</sup>金工大・ゲノム研)
- 15:30 3P-2p151 変異原性ヌクレオシド dP による細胞死誘発に関与する遺伝子の特定と, その集積によって構築された高効率ネガティブ選択系  
..... ○河合 (野間) 繁子, 佐伯 和哉, 湯本 達弥, 斎藤 恭一, 梅野 太輔 (千葉大院・工)
- 16:30 3P-2p152 LEA peptide - confer tolerance to salinity and temperature in *E.coli*.  
..... ○Nishit Pathak, Shinya Ikeno (Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)
- 15:30 3P-2p153 凝集性酵母における新規な阻害剤耐性機構の解明  
..... ○糸見 明穂<sup>1</sup>, 紀平 和枝<sup>1</sup>, Kahar Prihardi<sup>1</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション)

- 16:30 3P-2p154 ストロンチウムがツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響の解析  
 ..... 山下 綾子<sup>1</sup>, ○中村 真由<sup>2</sup>, 望月 玲於<sup>1</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生物資源)

### 【培養工学】

- 15:30 3P-2p155 強化平板法と発育遅延解析法を併用した「固液培地生存性差分(DiVSaL)法」による微生物の新規損傷菌数評価  
 ..... ○岩田 吏世<sup>1</sup>, 坂元 仁<sup>2</sup>, 土戸 哲明<sup>2</sup>, 古田 雅一<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>阪府大院・工, <sup>2</sup>阪府大・21 科研機構・微研研セ)
- 16:30 3P-2p156 大腸菌細胞質内における *ssrA* タグ認識プロテアーゼ活性評価のためのレシオメトリックセンサーの開発  
 ..... ○坂元 仁<sup>1,2</sup>, 古田 雅一<sup>1,2,3</sup>, 土戸 哲明<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>阪府大・21 科研, <sup>2</sup>阪府大・放研セ, <sup>3</sup>阪府大院・工・量子)
- 15:30 3P-2p157 細胞間相互作用を利用した新規微生物制御法の開発  
 ..... ○勝亦 雄太, 豊福 雅典, 小川 和義, 野村 暢彦 (筑波大院・生命環境)
- 16:30 3P-2p158 白色腐朽菌によるマンガンペルオキシダーゼの高効率生産に向けた pH シフト条件の検討  
 ..... ○嶋田 亮, 森本 康介, 櫻井 明彦 (福井大院・工)
- 15:30 3P-2p159 イオンビーム照射によるリグニンペルオキシダーゼ高生産株の育種  
 ..... ○三木 紀彦<sup>1</sup>, 杉浦 康友<sup>1</sup>, 畑下 昌範<sup>2</sup>, 櫻井 明彦<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>福井大院・工, <sup>2</sup>若狭エネ研)
- 16:30 3P-2p160 新規酢酸耐性酵母 KS47-1 株における耐性機構に関する基礎検討  
 ..... ○加藤 勇太, 荒川 知子, 石田 奨, 小西 正朗 (北見工大)
- 15:30 3P-2p161 酵母 *Kluyveromyces marxianus* によるキシロース条件下でのタンパク質分泌生産  
 ..... ○星田 尚司<sup>1,3,4</sup>, 木寺 研太<sup>1</sup>, 瀧下 竜太<sup>2</sup>, 藤岡 経久<sup>1</sup>, 深川 泰紀<sup>2</sup>, 赤田 倫治<sup>1,3,4</sup>  
 ( <sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>山口大・工, <sup>3</sup>山口大・中高温微生物セ, <sup>4</sup>山口大・生命医工セ)
- 16:30 3P-2p162 CHO 細胞培養における予測制御技術を応用したグルコース濃度制御法  
 ..... 生田目 哲志<sup>1</sup>, 中村 幸弘<sup>1</sup>, 伊崎 文晃<sup>1</sup>, 平野 明成<sup>1</sup>, ○下田 聡一郎<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>2</sup>  
 ( <sup>1</sup>横河電機・イノベーションセンター, <sup>2</sup>阪大院・工)
- 15:30 3P-2p163 軟培養面によるヒト iPS 細胞増殖への影響  
 ..... ○堀江 正信<sup>1</sup>, 藤田 英明<sup>2,3</sup> ( <sup>1</sup>京大・RIRC・生化工, <sup>2</sup>理研・生命システム, <sup>3</sup>阪大・免疫)
- 16:30 3P-2p164 コロニー形態情報解析を用いた iPS 細胞における培養工程の評価  
 ..... ○吉田 啓<sup>1</sup>, 長坂 理紗子<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 清田 泰次郎<sup>2</sup>,  
 古江-楠田 美保<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>4</sup>, 本多 裕之<sup>4</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>ニコソ, <sup>3</sup>医薬基盤研究所, <sup>4</sup>名大院・工)
- 15:30 3P-2p165 神経分化工程の非破壊評価に向けた細胞画像情報解析法の開発  
 ..... ○藤谷 将也<sup>1</sup>, Binti Huddin Noor Safika<sup>2</sup>, 河合 駿<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>,  
 清田 泰次郎<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>ニコソ)
- 16:30 3P-2p166 Muse 細胞の非侵襲的・迅速な濃縮法の開発  
 ..... ○江橋 具<sup>1,3</sup>, 富田 悠一<sup>2</sup>, 吉田 健祐<sup>3</sup>, 山地 秀樹<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>2</sup>神戸大・工, <sup>3</sup>神戸大院・工)
- 15:30 3P-2p167 遺伝子導入による皮膚細胞から肺細胞への分化転換  
 ..... ○二宮 直登<sup>1,2,3</sup>, 野口 隆明<sup>1</sup>, 関根 麻莉<sup>1</sup>, 道上 達男<sup>2</sup>, 浅島 誠<sup>3</sup>, 王 碧昭<sup>1</sup>, 栗崎 晃<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>東大院・総合文化, <sup>3</sup>産総研)

## 【バイオプロセス】

- 16:30 3P-2p168 コリネ型細菌によるパラアミノ安息香酸の高生産  
 .....○久保田 健<sup>1</sup>, 渡邊 彰<sup>1</sup>, 須田 雅子<sup>1</sup>, 小暮 高久<sup>1</sup>, 平賀 和三<sup>1</sup>, 乾 将行<sup>1,2</sup>  
 ( <sup>1</sup>RITE・バイオ, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)
- 15:30 3P-2p169 ピルビン酸高生産大腸菌を利用したピルビン酸の生産  
 .....○秋田 紘長<sup>1</sup>, 中島 信孝<sup>2,3</sup>, 星野 保<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>東工大院・生命理工, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス)
- 16:30 3P-2p170 Pyruvate decarboxylase 遺伝子を発現した微生物によるシンナムアルデヒドからの光学活性ジオールの生産  
 .....○大竹 遥, 關谷 悠介, 井野口 諒太, 根岸 佑香里, 宮越 俊一 (群馬高専)
- 15:30 3P-2p171 有機溶媒耐性菌を宿主とした SMO-LSADH 共発現システムによる光学活性エポキシド生産  
 .....○戸田 弘<sup>1</sup>, 小柳 喬<sup>2</sup>, 榎本 俊樹<sup>2</sup>, 伊藤 伸哉<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup>富山県大・生工研セ, <sup>2</sup>石川県大・生資環)
- 16:30 3P-2p172 単細胞生物用液/液界面バイオリアクターによるシトロネロールの変換  
 .....○石川 麻子<sup>1</sup>, 小田 忍<sup>2</sup>, 大箸 信一<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>金工大院・工, <sup>2</sup>金工大・ゲノム研, <sup>3</sup>金工大・ゲノム研)
- 15:30 3P-2p173 Biotransformation of 3'-hydroxydaidzein by *Escherichia coli* expressing *O*-methyltransferase  
 .....○Te-sheng Chang, Xin-Yi Huang, Ya-Ting Tsai, Dong-Sheng Wang  
 (Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan)
- 16:30 3P-2p174 インドアイ (マメ科) からの固体藍染料の微生物  
 .....○常盤 豊<sup>1</sup>, 角 寿子<sup>2</sup>, 世嘉良 宏斗<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>グリーン・プロダクツ・ラボ, <sup>2</sup>北の藍染織工房, <sup>3</sup>沖縄県工技セ)
- 15:30 3P-2p175 好気発酵による (*R*)-3-ヒドロキシ酪酸生産  
 .....○世嘉良 宏斗<sup>1</sup>, 花城 隆二<sup>1</sup>, 合田 雅浩<sup>1</sup>, 照屋 盛実<sup>1</sup>, 楽 隆生<sup>2</sup>, 常盤 豊<sup>3</sup>  
 ( <sup>1</sup>沖縄県工技セ, <sup>2</sup>甲南化工, <sup>3</sup>グリーン・プロダクツ・ラボ)
- 16:30 3P-2p176 デザインドバイオマス研究: 好熱性乳酸菌による混合糖代謝系の解析とエナジーケーンからの高効率乳酸生産  
 .....○沼口 真緒<sup>1</sup>, Tan Jiaming<sup>1</sup>, Abdel-Rahman Mohamed Ali<sup>1,2</sup>,  
 田代 幸寛<sup>1</sup>, 善藤 威史<sup>1</sup>, 酒井 謙二<sup>1</sup>, 園元 謙二<sup>1,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>Al-Azhar University, <sup>3</sup>九大・バイオアーク)
- 15:30 3P-2p177 *Settatia* 属細菌による BDF 廃液代謝に対する pH の影響  
 .....○内山 佳祐<sup>1</sup>, 川西 琢也<sup>1,2</sup>, 滝口 昇<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・理工)

## ランチョンセミナー

### 3LA1 東ソー株式会社

富山国際会議場 3階 A会場（メインホール）（11:30～12:30）

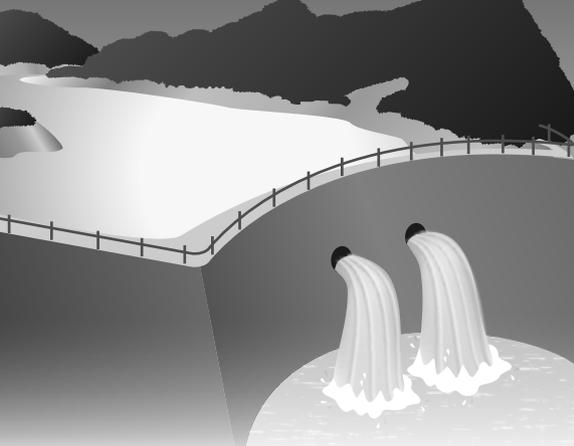
### 3LC2 サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

ANAクラウンプラザホテル富山 3階 C会場（11:30～12:30）

### 3LE3 日本ウォーターズ株式会社

ANAクラウンプラザホテル富山 3階 E会場（11:30～12:30）





# 9月28日 (水)

## 授賞式・受賞講演 (9:00 ~ 11:15)

富山国際会議場 3階 A会場 (メインホール)

授賞式 (会長挨拶, KSBB 会長挨拶, 名誉会員・功労会員推戴, 各賞授賞)

### 〈生物工学功労賞 受賞挨拶〉

受賞者 坂口 正明 (サントリースピリッツ)

産学連携活動の新規提案と推進による学会の活性化 1A-Aa01 p. 77

### 〈生物工学功労賞 受賞挨拶〉

受賞者 松井 和彦 (味の素)

第10回生物工学功労賞受賞にあたって 1A-Aa02 p. 77

### 〈生物工学賞 受賞講演〉

受賞者 園元 謙二 (九大院・農)

アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究 1A-Aa03 p. 78

### 〈生物工学功績賞 受賞講演〉

受賞者 本多 裕之 (名大院・工)

短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究 1A-Aa04 p. 78

## シンポジウム (13:30 ~ 15:30)

富山国際会議場 3階 A会場, 2階 B会場 / ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C,D,E会場

|  |                   |       |
|--|-------------------|-------|
| 培養計測技術の最近のトピックス【本部企画】  | 1S-Ap01 ~ 1S-Ap03 | p. 79 |
| 生物工学研究者の生命情報との向き合い方<br>～バイオインフォマティクス入門から応用へ～   | 1S-Bp01 ~ 1S-Bp05 | p. 80 |
| Toward Sustainable Palm Oil Industry Coexisting<br>with Environmental and Biodiversity Conservation  | 1S-Cp01 ~ 1S-Cp06 | p. 83 |
| Biotechnology of Enzymes in Aldoxime-Nitrile Pathway from Microorganisms,<br>Plants and Animals (ERATO Asano Active Enzyme Molecule Project) | 1S-Dp01 ~ 1S-Dp04 | p. 86 |
| 遺伝子改変技術によるセルエンジニアリングの革新：<br>産業応用に向けて   | 1S-Ep01 ~ 1S-Ep06 | p. 88 |

## 一般講演 ポスター掲示時間 (10:00 ~ 18:00)

ポスター会場 I : 富山国際会議場 2階

ポスター会場 II : ANA クラウンプラザホテル富山 3階 ASUKA

|                    |                |        |
|--------------------|----------------|--------|
| 酵素学, 酵素工学          | 1P-1p001 ~ 024 | p. 91  |
| タンパク質工学            | 1P-1p025 ~ 038 | p. 97  |
| 発酵生理学, 発酵工学        | 1P-1p039 ~ 054 | p. 100 |
| 代謝工学               | 1P-1p055 ~ 068 | p. 104 |
| 醸造学, 醸造工学          | 1P-1p069 ~ 083 | p. 108 |
| 食品科学, 食品工学         | 1P-1p084 ~ 101 | p. 111 |
| 環境浄化, 修復, 保全技術     | 1P-1p102 ~ 113 | p. 116 |
| バイオマス, 資源, エネルギー工学 | 1P-1p114 ~ 131 | p. 119 |
| 生体医用工学             | 1P-2p132 ~ 143 | p. 123 |
| セル&ティッシュエンジニアリング   | 1P-2p144 ~ 166 | p. 126 |
| バイオセンシング, 分析化学     | 1P-2p167 ~ 182 | p. 132 |
| センサー, 計測工学         | 1P-2p183 ~ 187 | p. 136 |

1A-Aa01 産学連携活動の新規提案と推進による学会の活性化

○坂口 正明  
(サントリースピリッツ)  
Masaaki\_Sakaguchi@suntory.co.jp

この度は第10回生物工学功労賞を受賞させて頂き、身に余る光栄に存じております。功労賞にご推薦、ご支援いただきました五味会長をはじめ関係各位に深く感謝しております。2001年～2009年関西支部委員として企画担当や副支部長、2009年～2013年理事、2013年～現在監事を拝命し、日本生物学会の活動を務めてまいりました。関係した主な学会活動について振り返ってみたいと思います。

1. 産学連携活動の推進  
飯島会長の時代(2009～2011年)から日本生物学会の重点方針の中に「学から産へ」という目標が示され、「産」を意識した活動を本格的に実施するようになりました。2009年の名古屋大会では、「酒造業者との交流会」を行い、2010年の宮崎大会では、本部企画として「醸造」、「培養・計測」、「産学連携」の3テーマでシンポジウムを実施し、また展示業者との交流会を行いました。企業にも役立つ学会活動を基本方針として意識し、活動をするを打ち出し、「産」活性化の機運が高まっております。

2011年～2013年産学連携委員会の委員長に柳副会長、幹事長に坂口が就任し、原島会長、理事各位との自由討論を重ね、産学連携活動の課題について議論を行いました。(1)学会での産学連携活動とは(2)産・学のニーズをどのように反映するか(3)産・学の出会いの場を育成するには(4)教育での産学連携が可能か(5)産官の若手の学会活動への参加をするにはなどの問題意識を具現化するために、産学連携活動の基本骨格とその達成のための新規提案と推進を行いました。その具体的な内容は、

- ・本部企画シンポジウム(醸造、培養・計測、産学連携)の継続
- ・【新規】産学技術研究会2回/年の定例化
- ・【新規】教育活動生物工学基礎教育セミナー(1回/年)、産業界からの非常勤講師派遣の斡旋

などの活動推進、新規提案・実践により産学連携活動、日本生物学会活動の活性化を考案いたしました。

2012年7月に実施いたしました第1回産学技術研究会(サントリー研修所)に参加した学生より原稿用紙2枚の手紙を頂きました。「産業界からの発表を聴いて、今まで学業や就活で落ち込んでいたが、自分なりの界を固めることができ、背中を押して下さった」などについて書かれており、その後希望する食品分野への就職もできたとのことでした。

産学連携活動の真の目標は、知識を授けることはほんの一部に過ぎず、人づくり(人間形成)であることを強く感じました。また参加者からの温かいご支援、協賛を頂きました。

2. 生物工学懇話会、特別講演の活性化  
生物工学懇話会や日本生物学会大会の特別講演において、幅広い内容での産業界からの演者・テーマを推薦したことにより、参加者の学会への意識向上、活性化につながったのではないかと思います。

「ホンダのDNA：挑戦・創造・革新」(元ホンダ技研・小林三郎)、「脳とイノベーション」(脳科学・茂木健一郎)、「気づき力がヒット商品を生む」(商品コンセプト研究・小山良朗)、「はやおぶさ」が挑んだ人類初の往復宇宙旅行、その7年の歩み」(JAXA・川口淳一郎)など大会ではなかなか聴けない興味深いテーマと演者であったとの声を頂きました。

産業界の実践的な講演は、たいへん面白くわかりやすい、学会の雰囲気が変わってきている、産からの提案が多くなっているなどの声を多くの先生、学生や産業界会員から頂きました。プロフェッショナルな実践者からの講演は、迫力がありました。

3. 学会行事へのサポート  
90周年記念行事、生物学会年次大会などの運営、学会行事などへ積極的なサポートをいたしました。企業の学会への貢献については、各社の文化の違いによってさまざまであると考えております。日本生物学会は、賛助会員106社の協力もあり、日本生物学会財政の大きなウエイトを占めており、産業界からの協力がなかったら長期的な活動が成り立ちません。このような状況の中、産学連携活動の会場などの提供において可能な支援をさせていただき、産学の一層の交流に繋がったのではないかと思います。

4. JABEE 活動の推進  
生物学会派遣のJABEE委員として、徳島大学、崇城大学の審査を実施し、JABEE活動を実施いたしました。大学教育の中に産感覚が少しでも伝わればとの思いで、審査員を担当させていただき、大学の抱えている「あるべき姿」について提案をさせて頂きました。

以上、主な学会活動を振り返りましたが、これら活動の推進において、学会会員各位、学会役員・事務局、産業界・大学各位の皆様から絶大なご支援を賜り、感謝しております。会員の著名な先生から「これからは日本生物学会への今以上の貢献をお願いいたします」と激励のメッセージを頂き、まだまだ現役の身でもあり微力ながら今後の学会発展のために協力を継続していきたいと思っております。また、学会活動を通じて広範囲な産学の専門家や学生と関係できることに楽しみにしております。

最後になりますが、過分な賞を頂き心より感謝申し上げます。

Activation of the SBJ by the new action and promotion of university-industry collaboration

○Masaaki Sakaguchi  
(Suntory Spirits Ltd.)

Key words university-industry collaboration, activation, new action and promotion

1A-Aa02 第10回生物工学功労賞受賞にあたって

○松井 和彦  
(味の素)  
kazuhiko\_matsui@ajinomoto.com

この度は第10回生物工学功労賞をいただくことになり、身に余る光栄と存じております。大阪大学工学部醸酵工学科在学中に日本生命中之島研修所で開催された日本醸酵工学会の年次大会のスライド映写係りとしてアルバイトをさせていただいたことが、本学会との繋がりの端緒となりました。研究室の先輩が発表される姿を見て、いつかは自分もと思ったことが記憶に残っています。1981年に大学院工学研究科醸酵工学専攻前期課程を修了し、味の素(株)に入社後、本学会の正会員となり、情報収集の目的で何度か年次大会に参加させていただき、一度だけですが口頭発表もさせていただきました。また、共著者として学会英文誌に投稿させていただいたこともありますが、学会本部や支部の活動には直接的にも間接的にも関わることもなく、年会費だけは支払う、ごく普通の正会員のままで経過してまいりましたところ、2009年の春に、突然、本学会事務局から、学会理事を引き受けていただきたいとの連絡がありました。どうしたものかと上司に相談したところ、お引き受けして少しは学会に貢献するようなこともしなさいとの指導があり、また、任期は2年ということでしたので、お引き受けすることにしました。飯島会長、原島会長、園元会長の下で、産学連携担当の理事を務めさせていただき、様々な方々との出会いがあり、これまでにない経験をさせていただき、気がつけば6年が経過してまいりました。今振り返ると、不思議な縁があって、ある日突然、新たに進む道への門戸が開き、その道を縁として歩いてきた6年であつたように思います。山村雄一元大阪大学総長の「天命を待って人事を尽くす」という言葉が頭を過つたことがありました。理事会では、学会の将来構想や活性化策について盛んに議論が交わされる6年間でありますが、産学連携の活性化も課題の一つでした。産学連携担当の理事の方々と共に年次大会における本部企画シンポジウムの企画・運営に取り組み、また、2011年度、2012年度は柳産学連携委員会委員長、坂口幹事のリーダーシップの下、産学連携活動の新たな活性化策(生物工学産学技術研究会と生物工学基礎教育セミナーの開催、大学等への非常勤講師の斡旋等)の検討に当たり、柳委員長の「継続は力なり」という方針を引き継ぎ、2013年度、2014年度は倉橋産学連携委員会委員長の下、幹事として上記本部企画シンポジウムや年2回の生物工学産学技術研究会、年1回の生物工学基礎教育セミナーを継続開催いたしました。学会本部の産学連携活動のホームページの改訂や大学等への非常勤講師の斡旋等にも取組みました。また、国際交流担当としての役割もいただき、横田国際担当理事のリーダーシップの下、学会本部主催の国際シンポジウム(SBJシンポジウム)のコンセプト立案に関与し、第1回、第2回のSBJシンポジウム実行委員会委員としての企画・運営にも関わらせていただきました。上記のような取組みが継続実施できたことは、各取組みの内容の検討や実行に、実に多くの産業界やアカデミアの方々に積極的に関わっていただいたからだと思っております。改めて関わっていただいた方々に厚く感謝申し上げます。

日本生物学会は生物を研究対象として、実学、知・技の実用化を志す者が集う、切磋琢磨の場であると思います。産学連携担当の理事を務める中で思っていたことは、交流がなければ連携も生まれえないということでした。会員の方にとって、年次大会や本学会主催の様々な交流の場は、情報収集や研究ネットワークの拡大の場として、或いは新たな連携を生む場として機能しているのだらうと思います。生物工学産学技術研究会では実に多くの学生の方々に参加いただきました。懇親会では、学生の方々と企業の方々が熱心に話されている姿を何度も見かけました。本学会主催の交流の場は、自らのキャリアの振り返りや新たな道に進むきっかけの場にもなっているのかもしれないと思つた次第です。今後とも、本学会が益々発展し、社会に貢献することを祈念するとともに、本学会を介して様々なステークホルダー間の交流が活発になることを期待しております。

最後になりますが、この度の功労賞受賞に際しまして、これまでご指導、ご支援いただいた多くの方々に心から御礼申し上げます。

Acceptance speech - Meritorious Service Award

○Kazuhiko Matsui  
(Ajinomoto Co., Inc.)

Key words industry-academia collaboration

## 1A-Aa03 アプローチをデザインするスマート発酵工学の基盤研究

○園元 謙二<sup>1,2</sup>

(1)九大院・農, (2)九大・バイオアーク)

sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

この度の生物工学賞の受賞は、ご指導頂きました多くの先生方、共同研究者、研究室のスタッフと学生諸氏など、すべての皆様のご協力の賜物であり、篤く御礼申し上げます。

私の最初の研究歴は、酵素工学の分野で、バイオリアクターの反応素子としての生体触媒の開発に関する生物工学的研究である。次は、生命体としての発酵微生物を扱う発酵工学の研究である。これらの職歴【工学部（工業化学）と農学部（応用微生物学）】と研究歴【酵素工学と微生物工学】において、生物工学をカバーする多くの研究分野（メタボローム、代謝工学、酵素工学、バイオインフォマティクス、システム生物学など）における研究“アプローチ”の修得を意識してきた。そして、単位操作である、微生物のスクリーニング・育種から培養・発酵法（プロセス）の確立・制御、ダウンストリームにおいて、異なる研究分野の視点を取り入れてきた。最近の研究に、これら研究“アプローチ”を“デザイン”する発酵工学の新たなコンソーシアム“スマート発酵工学”がある。

## (1) 乳酸発酵を活用した植物バイオマスのカスケード利用

乳酸発酵によって種々のバイオマスから生産される乳酸ラセミ体や酢酸は、安定性、貯蔵性、輸送性に優れており、腐敗微生物によるバイオマス分解に伴う炭素損失を防ぐことができる上、フィードストックとしての利用が可能である。これら有機酸を利用し、*Clostridium* 属細菌の代謝転換に伴うブタノール生産を効率よく行うことができるサルベージ合成に初めて成功した（第16回&第21回生物工學論文賞など）。また、乳酸からピルビン酸への反応にNAD<sup>+</sup>非依存的な乳酸脱水素酵素の存在（第21回論文賞）やメタボローム解析によって乳酸や酢酸からブタノールへのカーボン流束を初めて証明した（第21回論文賞など）。

## (2) 動的代謝モデル化と律速代謝経路の理論的推定

代謝モデルは代謝解析や発酵プロセスの最適化などに有効なツールである。化学量論式より構成される静的代謝モデルは代謝フラックス解析に広く用いられているが、代謝ダイナミクスを予測することはできない。そこで、代謝解析ツールを用いて、発酵の動的代謝モデル化および感度解析による律速代謝経路の特定を行った。キシロースの乳酸発酵では、ホモおよびヘテロ発酵の2つの代謝経路がキシロース濃度に依存したが、ピルビン酸代謝の Pyruvate dehydrogenase, Pyruvate-formate lyase, Lactate dehydrogenase がキー代謝経路と予測でき、実験的にも証明した。また、ブタノール発酵では、酪酸の再利用経路がブタノール生産に重要な影響を与えることがわかった。これらの成果は、実験非依存的にターゲット遺伝子を予測でき、代謝工学分野に与える影響は大きい。

## (3) デザインドバイオマス研究、そしてスマート発酵工学への展開

デザインドバイオマスを「発酵微生物の能力が最大限利用できるようにデザインされた適合物質」と定義した。従来研究では、最初に発酵原料に用いるバイオマスを決定した後、優秀微生物の分離・育種や優秀微生物による効率的発酵プロセスの構築を行う。デザインドバイオマス研究では、これまで得られてきた様々な知的財産物・技術（優秀微生物や効率的発酵プロセス）に適するように基質の探索や改変を行い、それらデザインドバイオマスによる「適応型発酵プロセス」の構築を目指すものである。具体的な成果として、炭素源ヘキソースとしてグルコースを使用せず、バイオマスの糖化プロセスでのグルコースによる生産物酵素阻害、および発酵プロセスでのカーボンカタボライト抑制（CCR）を同時に解決した（第22回論文賞など）。

構築した「適応型発酵プロセス」の例として、ブタノール発酵だけでも、CCRを回避した回分・流加発酵（第22回論文賞）、Cell-recyclingによる高密度連続発酵、逐次添加流加発酵（第21回論文賞）、pH-stat流加発酵、“Living cell”を導入した回分・連続ブタノール生産プロセス（第16回論文賞など）を開発した。また、L-乳酸発酵では、同様にCCRを回避した流加発酵（第24回論文賞）並びに究極の無殺菌開放発酵を実現した。さらに、乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築にも成功した（第17回論文賞、第18回生物工學技術賞）。

一方、微生物利用の出発点とも言える微生物のスクリーニングでは、律速代謝の予測および無殺菌発酵のアプローチを導入した。すなわち、CCRの回避予測となるセロビオース・キシロース資化能と好熱性に着目した結果、優れた適合乳酸菌の分離に成功した。また、これまでのいくつかの研究分野（代謝工学、メタボローム、システム生物学、酵素工学など）に加えて、このように獲得した適合微生物の特性に合う適合植物の創出（糖化効率の向上やセルロース含量の調整など）と検証を植物育種学研究者との積極的なコラボも伴うデザインドバイオマス研究を含め、“基盤とする発酵工学と他分野の研究アプローチをデザインする”【スマート発酵工学】の構築に邁進している。

## Basic study on smart fermentation technology by designed approaches

○Kenji Sonomoto<sup>1,2</sup>

(1)Fac. Agric., Kyushu Univ., (2)Bio-Arch., Kyushu Univ.)

**Key words** smart fermentation technology, designed biomass, butanol, optically pure lactic acid

## 1A-Aa04 短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究

○本多 裕之

(名大院・工)

honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

10数年前よりペプチドの多様性に魅了され、細胞やタンパク質・酵素に作用することで機能性食品素材あるいは医薬品原薬として利用価値のある機能性短鎖ペプチドの探索を進めると共にターゲット分子との相互作用に関する学理の探索を目指している。さらにその相互作用を積極的に活用して従来にない新機能を発現させる研究を行っている。以下に概要を簡潔に述べる。

## 【細胞／タンパク質相互作用による機能性ペプチドの探索】

Fmoc 固相合成法で、配列の異なるペプチドを活性化セルロース膜上にスポット合成し、機能性ペプチド探索を行った。アンジオテンシンに結合する血圧降下ペプチド VVIVIVY、乳酸菌接着・凝集ペプチド (QRCVNLQA)、がん免疫ペプチド (GYPVTNAVI)、Aβ 神経毒軽減ペプチド (KIILLI)、抗体 Fc 領域認識ペプチド (NKFRGKYK) など、短鎖ながら高い親和性を示すペプチドの探索に成功した。また紫外線照射で解裂・遊離できるフォトリンカーを合成し、アミラーゼ阻害ペプチド RHWYRYRW の探索にも成功した。さらに細胞アッセイができるシステムを構築し、細胞死誘導ペプチド CNSCWSKD、開葉系幹細胞選択性ペプチド (NLLPG, ALNGR, VRYR) (同他学協会 2) なども探索した。

## 【配列情報解析による相互作用に関する学理の探索】

なぜその配列が高結合活性を示すのかを明らかにすることが分子認識の学理の深化につながる。ランダムペプチドライブラリーを合成し、ターゲット分子との相互作用の強弱を捉え情報解析することで、高結合活性が得られる配列の特徴を、ルール（相互作用に関する学理）として抽出した。例えば胆汁酸に結合することを作用原理とするコレステロール吸収阻害ペプチドでは、「N 末端 4 残基目のアミノ酸のサイズが大きく、4 残基目のタンパク質安定化指標が大きいため胆汁酸結合活性が高い」という学理が得られた。いろいろなターゲット分子に対して特徴の異なる分子認識が生まれていると考えられる。ライブラリーサイズをどこまで広げれば様々な分子認識に対してロバストな探索法になるのかを明らかにする必要がある。そこで 20 種類のアミノ酸を疎水度と電荷で 4 グループに分けて合成する方法を考案した。この方法では 4 残基では原理的に 256 種類のペプチドライブラリーで良い。得られたデータを主成分分析で解析することで認識に重要な主成分も得られた（未発表データ）。

## 【ペプチド間相互作用に基づく分析プローブ用ペプチド (Peptide Beacon) の開発】

アンジオテンシン結合ペプチドに銀微粒子結合機能があることを発見し、アンジオテンシンの有無により色調変化する分子プローブになることを明らかにした。抗体 Fc 領域認識ペプチドでも同様の分子プローブなることを明らかにした。さらにターゲット分子とペプチドの相互作用を積極的に活用した新機能の発現を目指して、分子プローブのデザインをおこなった。モデルとなるターゲット分子として IgG 認識ペプチド (NKFRGKYK) を蛍光標識し、これと強く相互作用するペプチドを探索した。この親和性ペプチドにクエンチャー分子を連結し、両者をタンデムに配置したところ、抗体の有無に応じて蛍光強度が変化するという新機能を発現した分子プローブが開発できた。抗体検出感度は 250nM であり簡易計測に使用可能である（同他学協会 12）。

## 【細胞内導入特性の発現と可溶性ペプチドライブラリーを用いた細胞内機能性ペプチドの探索】

上記のペプチドはいずれも細胞外で機能するペプチドである。ペプチドの細胞内導入に関しては Cell Penetrating Peptide (CPP) が知られている。しかし、CPP を使って細胞内に導入できるペプチドはまだ特定されていない。そこで活性化セルロース膜にまず上記のフォトリンカーを結合し、CPP としてオクタアルギニン (R8) を合成した後、トリペプチドを合成、蛍光色素ラベルも施して、細胞内導入可能な可溶性ペプチドライブラリーを構築した。全 8000 種類のトリペプチドのうち 31 種類を合成し細胞アッセイシステムを使って HeLa 細胞に導入可能なペプチドを調べたところ、約 1/4 の 8 ペプチドは導入困難であった。それらのペプチドを疎水度と等電点で整理したところ明らかな特性の偏りが示され、細胞内導入のルール（学理）が特定できた。上記の細胞内導入可能なペプチドライブラリーを使って、実際にミトコンドリアのチャネルタンパクに結合して細胞死を誘導するペプチドの探索をおこなった。8 残基ペプチド LNLISLKF は 20 分以内にミトコンドリアのカルシウム放出が確認できその後アポトーシスすることがわかった（未発表データ）。

## 【おわりに】

機能性ペプチドは、食品素材、医薬品原薬として、また新しい分析プローブとしての可能性があり、その探索法の確立が望まれる。我々は固相合成法での結合強度情報に配列情報処理を組み合わせて、その一つの方法を提言している。ディスプレイ法に代わる、あるいはその欠点を相補する方法として認知され、今後ますます多くの機能性ペプチドの探索につながることを期待したい。

## Provision of new function for short-chain peptide

○Hiroyuki Honda

(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** functional peptide, screening, informational analysis

**1S-Ap01 人工光型植物工場の課題と将来性**

○古在 豊樹  
 (植物工場研究会 (特定非営利活動法人))  
 kozai@faculty.chiba-u.jp

人工光型植物工場 (以下、植物工場) における野菜などの生産技術に関する現状と今後の技術革新の方向性について述べる。2016年2月現在、商業的に生産販売している植物工場の数は200弱であり、2009年以降増加傾向にある。生産コストの内訳は、原価償却費30%、電気料金25%、人件費25%、その他20%程度と言われている。環境制御、その見える化、労働作業性、生産物の品質、生産化管理全般などに関する技術レベルは高いとは言えず、今後改善すべき点が多い。最近、LEDランプの性能向上により30%以上の節電が可能になり、また、光質制御による野菜・薬用植物の機能成分向上の研究開発が進んでいる。筆者らは、植物工場栽培室への資源投入速度と植物生産速度などを連続計測して、投入資源利用効率の見える化システムを開発している。以上の動きから、今後5年前後で生産コストの半減と生産速度の50%向上の実現が見えてきている。最後に、世界の植物工場事情に関して紹介する。

**1S-Ap02 再生医療のための細胞操作および培養技術**

○福田 淳二  
 (横浜大院・工)  
 fukuda@ynu.ac.jp

生体内の細胞は、血球系の細胞以外は壁付着性細胞であり、材料への接着状態がその細胞の機能や増殖、アポトーシスなどの運命決定に重大な影響を及ぼすことが知られている。本講演では、材料表面の微細加工や表面修飾技術を利用した細胞操作技術について紹介する。特に、フォトリソグラフィーなどの微細加工技術を用いて作製したウェルアレイ基板と、これを利用した肝細胞、iPS細胞、毛髪原基などへの応用について具体的に紹介する。また、我々は電気化学反応を利用した細胞の接着・脱着の動的な制御技術を確立し、これを再生医療のための細胞操作へと応用してきた。この技術には、金電極表面に結合して自己組織化し、密な単分子層を形成するオリゴペプチドの設計も含まれる。この技術の最大の特長は、比較的素早く細胞を脱離できることであり、立体臓器の構築においてこの特徴を利用したいくつかの方法を考案してきた。例えば、肝細胞や心筋細胞シートからの脱離・積層化、細胞の位置あるいは種類特異的な選別技術、血管構造の形成技術である。特に血管構造の形成技術では、肝細胞へ分化させたiPS細胞をスフェロイド化し、血管構造の周囲に包埋することで、血管構造を含む立体的な肝臓組織の構築に取り組んでいる。これらの細胞操作と計測技術を組み合わせることで、生体システムを解析できる基盤技術へと展開できる可能性がある。

**Issues and perspectives of plant factory with artificial lighting**

○Toyoki Kozai  
 (Japan Plant Factory Association (NPO))

**Key words** plant factory, Resource use efficiency, cost reduction, Rate variable control

**Manipulation and 3D culture of cells for regenerative medicine**

○Junji Fukuda  
 (Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

**Key words** tissue engineering, liver regeneration

## 1S-Ap03 キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE/MS) を用いた抗体産生の評価

○東條 繁郎  
(ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ)  
tojo@humanmetabolome.com

メタボローム解析は、唯一細胞内と培地両者を評価できるオーム解析であるため、生物を用いた生産系を評価する手段として大変有効な解析手法です。生命現象の理解の深度化に対する要求性の高まりに応える手段として、測定機器の発達によって一斉網羅解析 (オーム解析) が可能になりました。主要なオーム解析方法として DNA を解析対象としたゲノム、RNA を解析対象としたトランスクリプトーム、タンパク質を解析対象としたプロテオーム、代謝産物を解析対象としたメタボロームがあります。

オーム解析登場以前では、DNA・RNA・タンパク質・代謝産物を各々部分的に注目して解析が行われてきましたが、オーム解析により細胞・組織全体を対象として解析が行われるようになり、これまでの研究では注目されてこなかった部分、重要な要素を担っている事が明らかになってきています。

代謝物を解析することで得られた結果は、各段階の反応の結果である事。また、代謝物は生命現象に対して直接的な原因である可能性が高いと考えられています。さらに、解析対象物質数が少ないこと、各代謝物に対する過去からの知見の蓄積がある事から解釈が容易です。

弊社が主に使用している CE-MS は、キャピラリー電気泳動装置 (CE) と質量分析計 (MS) を組み合わせた物で水溶性代謝産物を測定することを得意としています。生体中の代謝物の多くが水溶性代謝物であるため、CE-MS による解析は生体内の代謝物を観察する上で最も適した解析方法だと考えられます。CHO 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞) を用いて医薬用抗体が産生されます。これは、単純なタンパク質 (例えば、インシュリン) などであれば、大腸菌や酵母を用いて現在は産生されていますが、抗体のように糖鎖がその認識に必要な場合には、高等動物の細胞を用いる必要があります。

商業ベースで既に売上上位に位置する抗体医薬品ですが、その製造過程の発展の余地は十分にある事と考えられています。

メタボローム解析は、培地・細胞内両者を評価することが出来る唯一のオーム解析です。その為、各段階の細胞と培地を測定することで、細胞内の細胞の状態と培地での代謝物の過不足を確認する事により容易に細胞内で何が起きているのか・生産系の中でどの反応が律速の段階になっているのかを確認する事が出来るため基礎培地及びフィードの改良の為のヒントを得ることが出来ます。本シンポジウムでは、CHO 細胞と培地のメタボローム解析の一例として、徳島大学の教授・鬼塚先生と弊社との共同研究の成果を一例として発表します。細胞を用いた物質生産の際に生産効率を低下させる要因の一つに細胞の凝集があります。大政研究室では、この細胞凝集を防ぐ手段として培地にトレハロースまたは NaCl を添加することを見出しました。さらに、凝集を防いだ結果、CHO 細胞の生存日数の増加とそれに伴う抗体産生能の増加が確認されました (1)。そこで、CE-MS を用いて細胞内と培地を測定することで生存日数と抗体産生能の増加のメカニズムについて代謝の方面から解析を行いました。

その結果、通常培地では急速にグルコースの消費とそれに伴う乳酸の生産が起こった結果、培養後期にエネルギー不足による細胞死が起きているのに対して、トレハロースや NaCl を添加し細胞凝集を防いだ結果、グルコースの取り込み速度の低下が起こり、グルコースの消費速度が低下した結果、培養後期までエネルギー状態が維持されたために、通常培地で観察されるような早い期間での細胞死が引き起こされず生存期間の増加に繋がったと考えられます (2)。これらの結果は、細胞と培養上清の両者を測定することで代謝物の出入りを観察する事が出来ること。他のオーム解析は、全て相対面積値での結果報告になりますが、メタボローム解析では一部の代謝物に関しては、濃度定量を行うことが可能であるためより正確に結果を評価することが出来ます。

さらにこの濃度定量が可能であると言う事は、測定結果がそのまま培地改良に用いる事が出来ますので、使い勝手の良い培地改良ツールとして使うことが出来ます。

以上のように、CE-MS を用いた CHO 細胞の抗体産生能に対する評価は、他のオーム解析では出来ない細胞内と培地と両者を比較検討する事でより詳細に生産状態を確認すること出来るため、生産中の細胞の状態の確認及び培地の確認が出来ると、培地の最適化を行う上での強力なツールになり得ると考えます。

(1) Onitsuka M J Biosci Bioeng. 2014 May;117(5):632-8.

(2) Badsha MB J Biosci Bioeng. 2016 Jul;122(1):117-24

## Evaluation of antibody production using a capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE / MS)

○Shigeo Tojo  
(Human Metabolome Technologies)

**Key words** metabolic analysis, CHO cell, medium, antibody

## 1S-Bp01 遺伝疫学データに基づく DNA メチル化と生活習慣病の関係

○中村 昌弘<sup>1</sup>, 市原 佐保子<sup>2</sup>, 山本 健<sup>3</sup>, 大中 佳三<sup>4</sup>, 松原 達昭<sup>5</sup>, 横田 充弘<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>名大病院・先端医療,<sup>2</sup>三重大院・地域イノベーション学,<sup>3</sup>久留米大・医・医化学,<sup>4</sup>大院・医・老年医学,<sup>5</sup>愛知学院大・歯・内科学,<sup>6</sup>愛知学院大・歯・ゲノム情報応用診断学)  
mnakatochi@med.nagoya-u.ac.jp

2型糖尿病や心筋梗塞、肥満、メタボリックシンドロームといった生活習慣病の患者数は年々増加の一途を辿っており、これらの疾患発症リスクを低減するための方策が求められてきている。そのためには、これらの疾患の発症メカニズムの解明及び、発症を予測するリスクマーカーの同定が急務である。生活習慣病の発症は、食生活や運動習慣、喫煙、飲酒等の環境因子と遺伝因子の相互作用によって生じると考えられ、これらの因子を同定するために、これまでに多数の遺伝疫学研究が行われてきた。近年、マイクロアレイや次世代シーケンサーにより一度に数十万種以上の塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) を測定可能になってからは、これらを活用したゲノムワイド関連研究 (Genome-wide association study, GWAS) が実施されるようになり、生活習慣病と関連する遺伝子や SNP が多数同定されてきた。しかしながら多くの生活習慣病において、現在までに報告された SNP で説明できる遺伝因子は 10% 未満と非常に少ない。そのような中、遺伝子の発現や動きは、DNA のメチル化を初めとする後天的ゲノム修飾を受けて決定されることが明らかになってきた。この様な DNA メチル化サイトの変動が生活習慣病の発症に影響を及ぼすならば、今後の予防医学に重要な情報になると考えられる。本講演では、遺伝疫学のデータ、特に DNA メチル化情報を用いた疾患発症メカニズム解明のアプローチについて紹介する。

我々はこれまでに地域住民を対象としたコホート集団北名古屋ゲノム疫学研究 (Kita-Nagoya genomic epidemiology study, KING study) を構築し、一般の健診情報以外にもレジスチン、アディポネクチン等のバイオマーカー、SNP アレイ、DNA メチル化アレイ (Illumina HumanMethylation450) を測定してきた。本 DNA メチル化アレイは、ヒトの DNA 配列中に存在する 45 万カ所以上のシトシン塩基における DNA メチル化状態を一度に測定できるマイクロアレイである。我々は福岡コホート研究 (Fukuoka cohort study) との共同研究により、複数のエピゲノムワイド関連研究 (Epigenome-wide association study, EWAS) を実施し、生活習慣病と DNA メチル化の関係について興味深い知見を得てきた。EWAS は非常に有用な研究方法であるものの、非常に多くの DNA メチル化サイトから探索を行うため、偽陽性も多い。本講演では、複数の例を紹介しながら、EWAS における解析方法、解釈の仕方を概説したい。

DNA メチル化状態は年齢や喫煙の環境因子により大きく変動させられる事が報告されている。我々のデータにおいても最初にこれらの因子との関連を調査を行い、有意な DNA メチル化サイトが確認された。特に喫煙については、ある DNA メチル化サイトにおいて禁煙者の DNA メチル化状態は非喫煙者と喫煙者の中間の状態を示していた。これは、禁煙の効果が DNA メチル化を介して観察できると期待でき、生活習慣改善評価のモデルケースになり得ることを示唆している。

次に、生活習慣病のリスクマーカーとして考えられているタンパク質 レジスチンに着目し、後天的ゲノム修飾である DNA メチル化が血漿中のレジスチン濃度調節に如何なる影響を及ぼすか検討した。男性 192 例を対象とした血漿レジスチン濃度の EWAS の結果、DNA メチル化サイト cg02346997 がゲノムワイド有意水準に到達し、負の関連を示した ( $\beta = -0.270 \pm 0.041$ ,  $p = 6.02 \times 10^{-10}$ )。このサイトはレジスチンタンパク質をコードする *RETN* 遺伝子のプロモーター上に位置している。レジスチンは主に単球で発現していることから、1202 名分の単球由来の公開データを基に評価した所、cg02346997 は、単球における *RETN* 遺伝子発現量とも負の関連を示した ( $-0.298 \pm 0.016$ ,  $4.23 \times 10^{-79}$ )。更に、KING study において SNP アレイとの統合解析を実施した結果、cg02346997 は、*RETN* のプロモーターに位置する SNP rs3219175 のマイナーアレル数と負の関連を示した ( $\beta = -0.396 \pm 0.043$ ,  $p = 4.43 \times 10^{-17}$ )。これまで SNP rs3219175 のマイナーアレルは、血中のレジスチン濃度と強い正の関連を示すことが報告されてきた。しかしながら、これらの SNP が如何にしてレジスチン濃度を調節しているかは明らかでなかった。SNP 情報、エピゲノム情報を統合的に解析した今回の結果から、SNP rs3219175 は近隣のメチル化サイトにおける DNA メチル化状態を介して発現量を調節し、その結果、血中レジスチン濃度を調節している可能性を示した。最後に現在進行中の研究として、健常者と心筋梗塞を対象に、心筋梗塞の発症に関係する DNA メチル化サイトの探索についても紹介したい。我々は、ゲノムワイド有意水準 ( $p < 1.0 \times 10^{-7}$ ) に到達した DNA メチル化サイトの特定に成功した。この DNA メチル化サイトの近隣には冠動脈疾患と強い関連のある遺伝子が存在していることから、心筋梗塞発症の新たなメカニズム解明に寄与する事が期待できる。現在、この DNA メチル化サイトを含めより詳細な解析を進めている。

これらの結果から、DNA メチル化サイトは、生活習慣や生活習慣病の発症、更にはそのリスクマーカーの全てと関わりが確認できた。DNA メチル化サイトに注目したより詳細な研究は、最終的に生活習慣病の予知・予防に繋がれると期待できる。

## Relation between lifestyle disease and DNA methylation based on genetic and epidemiological data

○Masahiro Nakatochi<sup>1</sup>, Sahoko Ichihara<sup>2</sup>, Ken Yamamoto<sup>3</sup>, Keizo Ohanaka<sup>4</sup>, Tatsuaki Matsuura<sup>5</sup>, Mitsuhiro Yokota<sup>6</sup>  
(<sup>1</sup>Nagoya Univ. Hosp., <sup>2</sup>Grad. Sch. Regional Innov. Stud., Mie Univ., <sup>3</sup>Sch. Med., Kurume Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Med., Kyushu Univ., <sup>5</sup>Sch. Dent., Aichi Gakuin Univ., <sup>6</sup>Sch. Dent., Aichi Gakuin Univ.)

**Key words** epigenetic, DNA methylation, genetic epidemiology, lifestyle disease

## 1S-Bp02 高速 DNA シークエンシングとバイオインフォマティクスを駆使した転写制御ネットワーク解析

○児島 孝明, 中野 秀雄  
(名大院・生命農学)  
kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

高速 DNA シークエンシングは、サンガー法などの従来の DNA 配列解析法に比べて圧倒的なスループットでのデータ取得を可能とし、現在様々な分野で広く利用されている。一方で、これによって得られる配列データが膨大であるが故、その扱いに苦慮されている方が生物工学研究者の中でも存外多いのではないだろうか。バイオインフォマティクス初心者の方々もその例に漏れず、試行錯誤を重ねながら膨大な配列データと向き合い、その可視化や有用情報の抽出を試みてきた。本講演では、高速 DNA シークエンシングを用いた糸状菌由来転写因子による転写制御ネットワーク解析をケーススタディとしてビッグデータとの向き合い方を紹介したい。

転写因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合し、遺伝子の発現を制御するタンパク質群の総称であり、体内の様々な機能に関与している。この転写制御機構の全貌解明を目的として、現在様々な形のアプローチがなされている。とりわけクロマチン免疫沈降法 (ChIP) と高速 DNA シークエンシングを組み合わせた ChIP-Seq は、ゲノム上の転写因子結合部位を直接的かつ網羅的に解析する手法として広く用いられている。しかしながらこの手法は、培養ステップを必要とする点に加え、過剰発現された転写因子の結合のみを指標とする為、細胞内では本来結合しない擬陽性の配列を選択するリスクを孕む。一方、標的転写因子発現株及びその欠損株より調製した mRNA を高速 DNA シークエンシングによって解析を行う RNA-Seq は、転写因子によって発現制御される遺伝子 (Differentially Expressed Gene, DEG) を網羅的に同定することができる。しかし、この RNA-Seq によって検出される発現変動は、標的転写因子の間接的な影響による一種の解析ノイズも含む為、検出 DEG が実際に標的転写因子に直接制御される遺伝子か判別することも極めて困難とされる。

我々は、高速 DNA シークエンシングを利用した 2 種類の転写因子制御部位の網羅的解析技術、Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq) と RNA-Seq を融合させた転写因子による転写制御機構の新規網羅的解析システムの確立に成功した。gSELEX-Seq は *in vitro* で濃縮選択したゲノム上の標的転写因子結合領域の情報を、RNA-Seq は培養細胞より回収した mRNA ライブラリーから各遺伝子の発現量の情報をそれぞれ出力する。これにより、本手法は標的転写因子によって *in vitro*, *in vivo* 両解析系に内包する解析ノイズを除去でき、直接的に発現制御される遺伝子の検出を可能とする。

この解析システムを用いて *Aspergillus nidulans* における糖代謝遺伝子群の転写活性化因子 AmyR の結合部位のゲノムワイド解析を試みた。*A. nidulans* ゲノムライブラリーを調製し、AmyR を用いた gSELEX を 3 ラウンド実施した。これによって得られた選択 DNA プールの配列を高速 DNA シークエンサーによって解析し、総計約 10 Gb の配列データを取得した。このデータを基にバイオインフォマティクス解析を実施し、AmyR の結合モチーフの抽出及び AmyR 結合活性を示す候補プロモーター配列リストの作成を行った。

また、*A. nidulans* 野生株及び AmyR 欠損株を培養し、これらの細胞由来の mRNA をそれぞれ調製した。この mRNA ライブラリーを高速 DNA シークエンサーによって解析し、取得した総計約 2.5 Gb の配列データをバイオインフォマティクス解析に供した。その結果、AmyR による発現制御を受ける既知の 8 遺伝子のうちの 7 遺伝子を含む 41 種類の遺伝子において、AmyR 依存的な発現変動が検出された。

次に、gSELEX-Seq より得られた候補プロモーター下流に位置する遺伝子と RNA-Seq より得られた発現変動遺伝子の積集合をとったところ、上記の 7 遺伝子を含む 23 種類の遺伝子が検出された。これらは、AmyR 結合領域を上流に保持し、かつ AmyR 依存的にその発現レベルが変動することから、AmyR によって直接的に発現制御を受ける遺伝子であることが強く示唆された。これらの結果から、gSELEX-Seq と RNA-Seq 及びバイオインフォマティクスを駆使した本解析パイプラインは、標的転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子を高精度に検出するトランスクリプトーム解析法であると考えられる。

### Transcriptional regulation analysis by using high-throughput DNA sequencing and bioinformatics

○Takaaki Kojima, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** transcriptome, *Aspergillus nidulans*, high-throughput screening, bioinformatics

## 1S-Bp03 アミノ酸物性指標を用いたペプチドインフォマティクスの可能性

○蟹江 慧<sup>1</sup>, 伊藤 圭祐<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>3</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>静農大院・薬食生命, <sup>3</sup>名大院・工)  
kanie-k@ps.nagoya-u.ac.jp

ペプチドはアミノ酸 20 種類が組み合わせることによって構成されており、数個から数十個がペプチド結合でつながった分子である。ペプチドはタンパク質に比べ分子量が小さいにも関わらず、体内の多くの生理作用を司るシグナル分子として機能している。高血圧症やアルツハイマー病などの疾患に関わるものから、大豆ペプチドやゴマペプチドなどの食品分野に応用されているもの、細胞接着や分化維持など組織工学分野で研究されているものなど、様々な分野で注目されている。このような多くの機能や分野で注目されているペプチドであるが、その配列の多様性は非常に多岐にわたる。ペプチドは 20 種類のアミノ酸で構成されるため、2 残基では 400 種類、3 残基では 8,000 種類であるが、10 残基ともなると 10 兆種類を超え、組み合わせの数が分子の長さとともに爆発的に増大する。このため、未だ発見されていない新たな機能を持ったペプチドが存在する可能性が高い分子であるとも言える。

我々は、機能性ペプチドの網羅的探索を行うため、ペプチドアレイを用いた探索を行ってきた。ペプチドアレイは、Ronald Frank が 1992 年に開発した手法であり [1]、セルロースメンブレン上に任意のペプチド配列を任意の位置に Fmoc 固相合成で合成することができる。ペプチドアレイは、抗体認識部位を特定するエピトープマッピングをするために従来使用されていた。我々は更にその適用範囲を広げ、タンパク質結合ペプチド [2]、金属結合ペプチド [3]、細胞死誘導ペプチド [4]、細胞接着ペプチド [5] など、多数の機能性ペプチドをペプチドアレイにより探索してきた。しかし、ペプチドアレイの最大の問題点は、その網羅数の少なさである。機能性ペプチド探索には、ファージディスプレイ法、ピーズディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などが存在し、それらのバリエーションが 10<sup>7</sup> オーダーほどであるのに対し、ペプチドアレイは 1 実験で得られるバリエーションが 10<sup>3</sup> オーダーほどと、非常に少ない。

そこで我々は、ペプチドアレイと情報処理解析を用いた効率的かつルール化可能な、新規手法を考案し研究を進めてきている。他のペプチド探索手法と比較した、ペプチドアレイ法の利点には、①任意のペプチドを合成することが可能な点、②ネガティブデータを取得することが可能な点が挙げられ、これらの利点をうまく活用することで、ペプチドアレイの網羅性を上げようとした。この 2 つの利点は、ペプチド探索と情報処理解析を組み合わせた上で非常に重要で、①は情報処理解析で得られたルールやモデルに対し、任意のペプチドを合成できることは、ルール・モデルの実証を容易化できる。また②は、情報処理解析にはデータのバリエーションが必要となり、ポジティブデータだけの解析だけでは、ルール・モデルづくりが困難になる。以上より、ペプチドアレイデータは、情報処理解析手法との組み合わせとの相性が良いと考えられる。

ペプチドを情報処理するためには、配列データであるペプチドを情報化(数値化)しなくてはならない。我々は、ペプチドの最小単位であるアミノ酸に着目し、アミノ酸の性質を数値化することを目標とした。アミノ酸の性質としては、疎水性、電荷、サイズなどが存在し、これらは全て数値化データとして存在している。京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンターが提供しているゲノムネットに、アミノ酸インデックス (AAindex: <http://www.genome.jp/aaindex/>) はデータベース化されており、我々はその情報を用い、ペプチドの数値化に用いた。具体的には、報告されている 544 種類の AAindex から、独立した 13 指標を用い解析に使用している。本講演では、ペプチドアレイデータを中心にアミノ酸指標を用いたペプチドインフォマティクスの事例(小分子、細胞、トランスポーター)を紹介する。

[1] Tetrahedron. 1992;48(42):9217-9232.

[2] Biochem Biophys Res Commun. 2004;315(1):22-9.

[3] Acta Biomater. 2010;6(6):2301-6.

[4] Biochem Biophys Res Commun. 2007;362(4):1063-8.

[5] J Biosci Bioeng. 2006;101(6):485-95.

### Possibility of peptide informatics by using amino acid index

○Kei Kanie<sup>1</sup>, Keisuke Ito<sup>2</sup>, Hiroyuki Honda<sup>3</sup>, Ryuji Kato<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** peptide array, peptide informatics, amino acid index

## 1S-Bp04 バイオ産業におけるメタボロームデータの利活用

○緒方法親  
(日本バイオデータ)  
norichik@nbiodata.com

メタボロームデータの取得・解析は、高速 DNA シークエンス技術の登場以前より実施されてきた。近年高速 DNA シークエンス技術の普及により、ゲノム比較解析や遺伝子発現変動解析の実施が容易になったため、それらのデータと組み合わせたメタボロームデータの利活用が進められてきている。本発表では、バイオ産業での利用を目的とした研究例を取り上げながら、各種網羅的データを組み合わせる手法について議論する。

ここで扱うメタボロームデータとは、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 (<http://humanmetabolome.com/>) が提供しているような、キャピラリー電気泳動-質量分析法によって得たデータを指す。キャピラリー電気泳動-質量分析法によって得られたデータは、既知の化合物データベースとの照合によって帰属され、分析した試料中に、どの化合物がどれだけ含まれていたのかを示すデータに変換される。従ってメタボロームデータは、試料中に含まれる未知の成分を解明したい場合よりも、試料中に含まれる既知の成分の量について分析したい場合に利点が多い。演者の経験では、バイオ産業、特に微生物を用いた製造に関連して試料の科学的な分析を行なう場合、未知の成分について扱いたい場面はほとんどなく、解糖系をはじめとする良く研究された化合物の量を扱う場面が多かった。

メタボローム解析を行なって試料中に含まれる既知の化合物の量を分析する時の興味の対象は、生体内でどのような反応が起きている、もしくは起きていないのかということである。例えばバイオエタノールの製造において、微生物が消費した原料のうち、最終的にエタノールとして得られるものの割合を増大させることがニーズとして想定できる。このとき微生物の内部で起きている現象は、既知の化合物の反応の連鎖によって説明可能であり、それぞれの反応の速度や規模に興味がある。

メタボローム解析では多数の化合物について量の情報が得られるが、微生物内部の反応の速度や規模に興味がある場合において、複数の試料メタボロームデータに基づく個々の化合物の量の変動にはどのような意味があるだろうか。ここで問題になるのは、個々の化合物の量が互いに独立でないことである。微生物内部の任意の化合物の量が少ないということは、代謝パスウェイ上で任意の化合物より上流にある化合物の量が不足することによって引き起こされうると同時に、任意の化合物を基質とする代謝パスウェイ上で下流にあたる化合物への変換速度・規模の増大によって引き起こされう。従って、試料間の比較において化合物量の単純な大小関係は、解明したい生命現象について限られた情報しか提供しない。また、技術的な問題として、分析機器の精度向上に伴って多数の検体について多数のデータが得られることで、どのような比較においても統計上の有意差が得られてしまうことも挙げられる。

バイオ産業においてメタボロームデータを利活用するためには、微生物内部で起こる酵素反応の速度・規模に関連したデータに変換することが望ましい。具体的な方法としては、測定によって得られたメタボロームデータを、代謝パスウェイ上の基質-生成物の関係性に帰属することが挙げられる。基質-生成物の関係性に帰属させることにより、それぞれの反応について基質と生成物の量の比を求めることができる。現在のメタボロームデータではそれぞれの化合物について絶対濃度を示すことは困難であるが、複数の試料間で任意の反応について基質と生成物の量の比を比較する場合には、絶対濃度が不要でない。それぞれの基質-生成物の関係性を繋ぐ酵素について、変異の有無や遺伝子発現量のデータを取得することは、高速 DNA シークエンス技術を用いて実施可能であり、そのようにして網羅的データを組み合わせることで、分析対象試料の特徴を迅速に抽出することができる。

シンポジウムでは、メタボロームデータとゲノムデータを組み合わせた解析例、メタボロームデータとトランスクリプトームデータを組み合わせた解析事例を紹介する。特に、公共のデータベースや公共の解析ツール等を活用した、今すぐ誰にでも利用可能な方法を紹介したい。

## Application of Metabolome Analyses in Bio-industry

○Norichika Ogata  
(Nihon BioData Corp.)

**Key words** metabolome, total metabolite pool analysis, genome, transcriptome

## 1S-Bp05 ヒト常在性ビフィズス菌種と宿主との親和性について

○小田巻 俊孝<sup>1</sup>, 堀米 綾子<sup>1</sup>, 菅原 宏祐<sup>1</sup>, 南 淳一<sup>2</sup>, 阿部 文明<sup>2</sup>, 清水 金忠<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>森永乳業 基礎研, <sup>2</sup>森永乳業 素材研)  
t-odamak@morinagamilk.co.jp

人間の腸内には数百種類、数百兆個もの細菌が棲息しており、宿主の健康維持に大きく関与している。なかでも我々は健康な乳幼児の腸内に *Bifidobacterium* 属細菌、所謂ビフィズス菌が非常に多く生息していることから、このビフィズス菌が乳幼児、ひいては宿主の健康を維持するために重要な役割を担っているのではないかと仮説を立証すべく、1960年代から研究を開始した。その結果、数多くの研究からビフィズス菌の有用性が示され、今や善玉菌の代表格として多くの機能性食品に用いられるようになった。

*Bifidobacterium* 属の細菌は現在 50 種程度に分類されているが、主にヒト腸管から検出されるビフィズス菌は 10 菌種程度であり、乳児と成人で棲息する菌種も異なっている。各菌種はそれぞれの生息環境に適応することで独自の進化を遂げてきた結果、ヒトにはヒト特有の、動物には動物特有の菌種が生息するようになったのではないかと推測されるが、その理由は十分明らかにされていない。我々はヒトの腸内環境に適応進化してきたと考えられるヒトに生息するビフィズス菌種 Human-Residential *Bifidobacteria* (HRB) がヒトとの相性もよく健康素材として優れているのではないかと考えに基づき 1970 年代より製品に活用してきたが、科学的な根拠を持ってヒトとの親和性の高さを長年証明できずにいた。

今回我々は、バイオインフォマティクスを活用することでこれら菌種間の本質的な差を見出せるのではないかと考え、始めにプロバイオティクスとしても幅広く利用されている HRB である *B. longum* と *B. breve*、および nHRB である *B. animalis* の 3 菌種の計 49 株について比較ゲノム解析を実施した。その結果、HRB と nHRB との間には炭水化物代謝や葉酸等のビタミン産生能力に大きな違いがあることが示唆され、特に乳児腸管に棲息する HRB (乳児型 HRB) には、母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖 (Human Milk Oligosaccharide, HMO) の代謝関連遺伝子が多く分布していることが示された。そこで数菌株を用いて HMO 特有の基本骨格であるラクト-N-テトラオース(LNT)およびラクト-N-ビオース(LNB)に対する資化能を *in vitro* 試験で確認後、HRB 及び nHRB の計 37 株を用いて、実際に母乳中での増殖性を確認した。母乳には 6~7% の乳糖が含まれていることから、作業仮説としては、すべてのビフィズス菌種が増殖するものの、HRB の増殖が nHRB よりも速い、というものであった。実際、乳児型 HRB は母乳中に良く増殖を示した一方で、成人型 HRB や nHRB では予想に反しほとんどの株が増殖を示さないどころか、検出限界値以下まで菌数が低下した。そこで母乳に含まれている抗菌活性物質に対する耐性を確認したところ、他の哺乳類よりもヒトの母乳で特に濃度が高いと言われているリゾチームに対し、乳児型 HRB は高い耐性を示した一方で、nHRB が低い濃度のリゾチーム存在下で生育が抑制されたことから、母乳での増殖性とリゾチーム耐性が良く相関していたことが判明した。以上より、HMO の代謝能に加えてリゾチームへの耐性機構を獲得した乳児型 HRB は、母乳との親和性を高めることで乳児腸管という特殊な環境に高度に適応してきたと考えられた。

本講演ではこれら結果に付随して、バイオインフォマティクスによる腸内菌叢解析や整腸作用に関する研究成果についても紹介できればと考えている。

High compatibility of Human-Residential *Bifidobacteria* (HRB) with host

○Toshitaka Odamak<sup>1</sup>, Ayako Horigome<sup>1</sup>, Hirosuke Sugahara<sup>1</sup>, Junichi Minami<sup>2</sup>, Fumiaki Abe<sup>2</sup>, Jin-zhong Xiao<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Next Generation Sci. Inst., Morinaga Milk Ind., <sup>2</sup>Food Ingredients & Techno. Inst., Morinaga Milk Ind.)

**Key words** bifidobacterium, microbial flora, human milk oligosaccharide, lysozyme

**1S-Cp01 Promotion of green economy with palm oil industry for biodiversity conservation in Malaysia**

○Yoshihito Shirai  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)  
shirai@life.kyutech.ac.jp

Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) is an international collaborative research program supported by JST and JICA targeting global issues and involving partnership between researchers in Japan and developing countries.

The purpose of our SATREPS project, "PROMOTION OF GREEN ECONOMY WITH PALM OIL INDUSTRY FOR BIODIVERSITY CONSERVATION IN MALAYSIA" is to encourage any green economy by using excess energy and biomass rationally wasting from palm oil mills, resulting in achieving zero-discharge of palm oil mill effluent (POME). And the environment around the mill can be maintained under good conditions, resulting in not disturbing biodiversity thereabouts. Our zero-discharge means that no waste but only valued products can come out from the mills. We have already set up our pilot-plants which compose of three elements, a POME treatment system, Yamasen-bio-charcoal oven and bio-compost production systems in Keningau Palm Oil Mill SDN. BHD. (KPOM) in Sabah. In the POME treatment system, we are investigating the effect of the denatured oil in the condensed water from a sterilization process of FFB to reduce drastically the COD source in the POME in advance and much facilitating the POME treatment.

Here we are challenging to examine how much the POME treatment would affect the biodiversity of the environment nearby by checking the microbial biodiversity in the water and the soil. Finally we will consider the effect of the zero-discharge on the microbial biodiversity from the mill by using treated water both from our pilot plants and ponds for POME treatment of the mill.

At the same time, we consider any value chains from the excess biomass and energy to encourage the modernization of palm oil industry to promote more economy and employment. For example, the separated denatured oil should be any raw materials chemicals and liquid fuels. The sludge after the POME treatment is so far just waste. However, we have confirmed that compost with higher and the same quality of compost can be produced from the sludge and empty fruit bunch (EFB) and more income can be obtained<sup>1</sup>. On the other hands we have developed several new technologies to provide new materials including nano-composites, which would be considered as one of the highest value-added products. Then we can considered any feasible and optimum business models based on our results including micro-composites, bio-charcoal and bio-compost. We shall be pleased to discuss with anybody from the business sectors in this occasion.

## Reference

1. A. Mohd Ali et al. Journal of Cleaner Production 91, 96-99 (2015).

**1S-Cp02 Process integration and zero emission system in the palm oil mill**

○Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>, Yoshihito Shirai<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Bioprocess Tech., Faculty of Biotech., Univ. Putra Malaysia,  
<sup>2</sup>Dept. Biol. Functions Eng, Grad. Sch. Life Sci. Sys. Eng., Kyushu  
Inst. Tech.,)  
alihas@upm.edu.my

This paper describes the international collaborative research and development initiatives to develop a modern palm oil mill incorporating innovative and clean technologies, with the production of value-added products from the oil palm biomass. The biogas captured from the anaerobic treatment ponds is converted to green electricity for grid connection, with a high fit-in tariff. The anaerobic sludge is co-composted with the empty fruit bunch to produce an organic fertilizer with high nutrient content, which can partially substitute the chemical fertilisers in the oil palm plantation. The final effluent to be discharged to the river is treated with activated carbon produced from the oil palm biomass, which makes it clean enough to be recycled back to the palm oil mill. With these strategies and process integration in place, the palm oil mills can be modernised and improved, towards achieving a zero emission system.

**Promotion of green economy with palm oil industry for biodiversity conservation in Malaysia**

○Yoshihito Shirai  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

**Key words** palm oil, biomass, microbial community

**Process integration and zero emission system in the palm oil mill**

○Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>, Yoshihito Shirai<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Bioprocess Tech., Faculty of Biotech., Univ. Putra Malaysia, <sup>2</sup>Dept. Biol.  
Functions Eng, Grad. Sch. Life Sci. Sys. Eng., Kyushu Inst. Tech.,)

**Key words** palm oil mill, oil palm biomass, zero emission

**1S-Cp03 Utilization of oil palm biomass for acetoin production using engineered *Escherichia coli***

○Mohd Zulkhairi Mohd Yusoff<sup>1,2</sup>, Hironaga Akita<sup>1</sup>, Nobutaka Nakashima<sup>3,4</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,3</sup>  
 (1Res. Inst. Sustainable Chem. AIST, 2Dept. Bioprocess Technol, UPM, 3Bioproduction Res. Inst. AIST, 4Dept. of Biological Information, Tokyo Inst. Technol.)  
 mohdzulkhairi-yusoff@aist.go.jp

A zero emission concept for promotion of green economy with palm oil industry has been proposed for an international collaboration between universities, government agencies and industries in Malaysia and Japan under umbrella of SATREPS. The project framework is to develop a technology on biomass utilization for other value-added products. Malaysia is second-largest palm oil producer in the world. As a leading industry in world's oil production, palm oil industry has left behind a huge amount of biomass from its plantation and milling activities as compared to other types of agricultural biomass. This industry becomes establish from time to time due to the world requirement on palm oil product. The plantation area for palm oil has gradually increased from 0.5 million hectares in early 1970s up to 4.5 million hectares in 2006. Moreover, the dry biomass was generated more than 80 million tonnes in 2010, and this value is expected to be increased up to 110 million tonnes in 2020. The huge amount of these biomass causes environmental problem, and subsequently increases the cost of waste management.

The palm oil industry generates abundant of solid biomass such as oil palm fronds (OPF), empty fruit bunch (EFB) and mesocarp fiber (MF). In plantation area, OPF are regularly produced during the harvesting of fresh fruit bunches and pruning of palm tree. OPF are left in the plantation for nutrient recycling and soil preservation. Meanwhile, huge amount of the EFB, which is dumped at the mill or mulching at the plantation area. For MF, it is burnt in a boiler for power generation in the mill. However, MF is inefficiently utilized due to power generated is more than enough for the energy required. Thus, we proposed the utilization of MF for the efficient conversion to acetoin, which is used as flavor enhancer and fragrance agent in cosmetic industry.

In this study, we performed pretreatment method for sugar extraction from MF through chemical-free approach by using hydrothermal pretreatment method. The hydrothermal treatment condition was determined based on effect of temperature and retention time. The 75 g of pretreated mesocarp fibre was used as substrate for enzymatic hydrolysis. The glucose and xylose concentrations in the hydrolysate were reached 32-35 g · L<sup>-1</sup> and 3-6 g · L<sup>-1</sup>, respectively. Subsequently, we produced acetoin using hydrolysate from MF as the carbon source with engineered *Escherichia coli*. This engineered *E. coli* is not requiring antibiotics to maintain plasmid and artificial inducers for gene expression. To enhance the acetoin productivity of the engineered *E. coli*, the effects of temperature, initial pH culture, stirrer speed and airflow rate were investigated with reagent-grade glucose and xylose. As a result, the productivity was 1.5-fold higher than under the standard condition, which suggested that acetoin production could be improved through optimization. Under optimal culture condition, about 2 g · L<sup>-1</sup> acetoin was produced using hydrolysate from mesocarp fibre as the carbon source without supplemented glucose, xylose or yeast extract.

**Utilization of oil palm biomass for acetoin production using engineered *Escherichia coli***

○Mohd Zulkhairi Mohd Yusoff<sup>1,2</sup>, Hironaga Akita<sup>1</sup>, Nobutaka Nakashima<sup>3,4</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,3</sup>  
 (1Res. Inst. Sustainable Chem. AIST, 2Dept. Bioprocess Technol, UPM, 3Bioproduction Res. Inst. AIST, 4Dept. of Biological Information, Tokyo Inst. Technol.)

**Key words** Oil palm biomass, Mesocarp fiber, *Escherichia coli*, Acetoin

**1S-Cp04 Waste biotransformation and accelerating recycle in oil palm industry**

○Yukihiro Tashiro<sup>1</sup>, Clament Chin Fui Seung<sup>1</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>  
 (1Fac. Agr., Kyushu Univ., Japan, 2Universiti Putra Malaysia, Malaysia)  
 tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq), or informally called the golden crop is currently the most potent plantation crop in Malaysia. Its glossy goldish fruits yield two valuable vegetable oils after processing, contributing to the generation of high income for both the industry and country. Accompany by the drastically increment of oil palm planting areas and yield improvement of planting material benefit from the plant breeding programme, waste biomass generated from oil palm industry had simultaneously increased. In field, two main waste biomasses are identified as oil palm frond (OPF) generated from daily pruning activity and oil palm trunk (OPT) during the replanting cycles. In the palm oil mill, both solid and liquid wastes are generated from the processing and oil extraction activities of fresh fruit bunch (FFB). These include empty fruit bunch (EFB), mesocarp fiber, palm kernel shell and cake, decanter cake and palm oil mill effluent (POME).

Composting is one of the techniques use by the industry for handling wastes that are originally produced from the processing of FFB. This technique uses a biothermal process generated by indigenous microorganisms undergoing fermentation and degradation of organic matters contained in the waste biomass. However, the conventional composting method is rather slow and less functional due to its nature high carbon to nitrogen ratio. In addition, POME remains the major waste temporarily stored in mills that potentially increase the treatment cost and environmental risk. The new composting plant introduced under the SATREPS project by Japanese government has likely provided useful techniques in handling the above mentioned problems. Co-composting of EFB-POME not only drastically reduced both the biomass and effluent wastes; it also shortened the composting period and lowered the carbon to nitrogen ratio, making it suitable to be used as organic amendment for application in field.

We further aim to transform the co-composted product into functional compost that is capable of promoting plant growth via the potential indigenous bacteria which proliferating in the co-composted product. Several highly multifunctional plant growth promoting (PGP) bacterial isolates with combination of PGP activities such as: solubilization of phosphorus (P), potassium (K) and silicon (Si); and production of siderophore (Fe), ammonia (NH<sub>3</sub>), and auxin (IAA) were isolated and identified in the EFB-POME co-compost. In addition, several bacterial isolates with moderate to strong antifungal activity against *Ganoderma boninense* (ACCT ® 204074TM), the causal pathogen of basal stem rot disease in oil palm were also isolated and demonstrated. Interestingly, many of the bacterial isolates exhibiting strong xylan and carboxymethyl cellulose degradation ability also showed moderate to strong in vitro antifungal activity against *G. boninense*. The presence of these bacteria in the co-compost suggests their major contribution in accelerating the composting period to as short as 40 days, with combination of POME that was rich in nitrogen content that finally bring down the carbon to nitrogen ratio (C/N) somewhere around 12 as previously reported.

Agrochemical contributes the highest variable production cost in oil palm industry and excessive use of these chemicals could cause substantial environmental and ecological damage. This urges the industry to find alternative sources for maintaining yield and controlling plant disease. The introducing of the EFB-POME co-compost has retransformed the oil palm industry in handling wastes simultaneously producing a kind of value-added compost that could substitute for the agrochemical function after undergo biotransformation by PGP and composting bacteria. We believe the results showed by this study could catalyst the implementation of co-composting plant by more oil palm companies, hence accelerating recycle of waste produced in oil palm industry. Thus, sustainable biomass production and utilization and the triple bottom line goal or the concept of 3Ps (people, planet and profits) for sustainable agriculture could be achieved.

**Waste biotransformation and accelerating recycle in oil palm industry**

○Yukihiro Tashiro<sup>1</sup>, Clament Chin Fui Seung<sup>1</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>  
 (1Fac. Agr., Kyushu Univ., Japan, 2Universiti Putra Malaysia, Malaysia)

**Key words** multi-functional bacteria, Plant growth promoting bacteria, co-compost, palm oil

**1S-Cp05 Bacterial community analysis as a tool in assessing the pollution due to palm oil mill effluent**

○Norhayati Ramli<sup>1</sup>, Siti Suhailah Sharuddin<sup>1</sup>, Diana Mohd-Nor<sup>1,2</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>, Yoshihito Shirai<sup>2</sup>, Toshinari Maeda<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. of Bioprocess Technol., Fac. Biotechnol Biomol. Sci., UPM, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)  
 yatiramli@upm.edu.my

Malaysia is ranked as the second largest producer of palm oil in the world. The major problem in this industry is the production of a highly polluting wastewater known as palm oil mill effluent (POME). POME is considered as the most harmful waste generated from palm oil processing industry if the waste was not properly treated. In Malaysia, 85% of palm oil mill used the ponding system as their preferable treatment method for POME, which later will be discharged into the nearby river. Numerous studies have shown that bacterial population are highly dynamic and can differ strongly in their response to resource availability such as organic carbon, nitrogen and phosphorus. Hence, the loss or changes of microbial diversity is considered a major threat because of its important for ecosystem functions. To date, little is known about microbial communities involved in the polluted river due to POME, either their structural and functional diversity or their response to environmental constraints. Therefore, this study aims to identify and compare the bacterial community structure and function present in the effluent-receiving river located near palm oil mill. The PCR-DGGE and Illumina Miseq have been used in analysing the microbial community structures, whereas the nucleic acid double staining (NADS) assay based on flow cytometry has been used in assessing the microbial community function. The findings demonstrated a significant difference of microbial community present in the upstream and downstream part of the effluent-receiving river water, in relation with the changes of the physicochemical properties. Hence, it is believed that the microbial community that play a key role in biogeochemical processes caused by POME final discharge has the potential to be used as indicator microorganism capable of indicating contamination caused by POME.

**Bacterial community analysis as a tool in assessing the pollution due to palm oil mill effluent**

○Norhayati Ramli<sup>1</sup>, Siti Suhailah Sharuddin<sup>1</sup>, Diana Mohd-Nor<sup>1,2</sup>, Mohd Ali Hassan<sup>1</sup>, Yoshihito Shirai<sup>2</sup>, Toshinari Maeda<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. of Bioprocess Technol., Fac. Biotechnol Biomol. Sci., UPM, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** microbial community, palm oil mill effluent, PCR-DGGE, Illumina Miseq

**1S-Cp06 Effects of land-use gradient changes on biodiversity in tropical rainforest of Borneo**

○Charles Vairappan<sup>1</sup>, Tin- Hoe Seng<sup>1</sup>, Jaya Seelan<sup>1</sup>, Kishneth Palaniveloo<sup>1</sup>, Yukihiro Tashiro<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>ITBC, Univ. Malaysia Sava, <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)  
 csv@ums.edu.my

Tropical forests regulate regional and global climate, provide a wide range of ecosystem services to over a billion people, and support close to 50% of flora and fauna. The island harbours an estimated 14,423 plants and 1640 vertebrate species, of which 28% are endemic and 534 species are considered to be threatened with extinction. The extent of forest in Borneo declined by 16.8x106 ha from 1973 to 2010 because of logging and ENSO-induced wildfires. Previously, timber extraction resulted in gradient degradation of habitat from primary forest to secondary forest, which further degraded, fragmented and cleared for agricultural purposes, primarily for the monocultures of oil palm. Hence, it has caused dramatic changes on the population and species diversity in tropical forest in Borneo. In the effort of accessing the impact of alteration in land use gradient, we have carried out the study on community and diversity of species, focusing on microorganism, vertebrates, and invertebrates. To date, we found that land use conversion has significantly altered the diversity and community structure of various organisms.

**Effects of land-use gradient changes on biodiversity in tropical rainforest of Borneo**

○Charles Vairappan<sup>1</sup>, Tin- Hoe Seng<sup>1</sup>, Jaya Seelan<sup>1</sup>, Kishneth Palaniveloo<sup>1</sup>, Yukihiro Tashiro<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>ITBC, Univ. Malaysia Sava, <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** biodiversity, bacterial consortium, palm oil, forest soil

**1S-Dp01 Access and use of fern hydroxynitrile lyase for biocatalysis**

○Anton Glieder<sup>1</sup>, Elisa Lanfranchi<sup>2</sup>, Margit Winkler<sup>2</sup>, Karl Gruber<sup>3</sup>,  
Thea Pavkov-Keller<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>NAWI, Inst. Mol. Biot., Graz. Univ. Tech., <sup>2</sup>ACIB GmbH, Graz,  
<sup>3</sup>Inst. Mol. Biosc., Univ. Graz)  
a.glieder@tugraz.at

Hydroxynitrile lyase enzymes (HNLs) catalyze the synthesis of chiral cyanohydrins, key building blocks for pharmaceuticals and agrochemicals. HNLs are a heterogeneous class of enzymes because a number of different protein folds with distinct catalytic sites are known today [1]. We determined the amino acid sequence of a new HNL with yet another protein fold and an unprecedented active site from a fern species (*Davallia teyermanii*). First, transcriptome data from a normalized cDNA library was acquired. Next, peptide fragments were identified via a Blue Native PAGE coupled HNL activity assay combined with LC-MS/MS sequencing [2]. The new enzyme (DtHNL) is not related to any known HNL and is the first described HNL with a Bet v1 fold based on its high-resolution x-ray structure. Interestingly, it is also a unique protein within the Bet v1 superfamily because its catalytic triad is distinct to other described catalytic triads of HNL enzymes.

DtHNL revealed to be a versatile enzyme for biocatalysis as it shows high specific activity, tolerance for low pH, high expression levels in *E. coli* and *P. pastoris* and excellent selectivity for the production of R-cyanohydrins. Its utility for the synthesis of several cyanohydrins was demonstrated in typical biphasic conditions, giving almost full substrate conversion to cyanohydrins with good to excellent enantioselectivities [3].

Acknowledgements: This project is financed by the European Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement no. 289646 (Kyrobio) and has been supported by the Austrian BMWF, BMVIT, SFG, Standortagentur Tirol, Government of Lower Austria and ZIT through the Austrian FFG-COMET-Funding Program.

[1] Winkler M, et al. Comprehensive Chirality, Synthetic methods VI, vol. 7. Amsterdam: Elsevier; 2012. P. 350-71.

[2] Lanfranchi E, et al. Curr. Biotechnol. 2015;4:111-117.

[3] Lanfranchi E, et al., manuscript in preparation

**Access and use of fern hydroxynitrile lyase for biocatalysis**

○Anton Glieder<sup>1</sup>, Elisa Lanfranchi<sup>2</sup>, Margit Winkler<sup>2</sup>, Karl Gruber<sup>3</sup>,  
Thea Pavkov-Keller<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>NAWI, Inst. Mol. Biot., Graz. Univ. Tech., <sup>2</sup>ACIB GmbH, Graz, <sup>3</sup>Inst. Mol. Biosc.,  
Univ. Graz)

**Key words** bioconversion, lyase, enzyme production, crystallographic study

**1S-Dp02 Hydroxynitrile lyases and enzymes related to mandelonitrile metabolism in plants and animals**

○Yuko Ishida<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>ERATO, JST)  
y-ishida@pu-toyama.ac.jp

Cyanohydrins are valuable building blocks for synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. In industrial biotechnology, hydroxynitrile lyase (HNL) is considered as one of the important biocatalysts, which is able to enantioselectively produce the cyanohydrins in mild conditions. Since the biotechnology has required more efficient and stable enzymes, we have to develop the better enzyme(s) using rational protein engineering. However, speed of the consecutive improvement may be insufficient to satisfy our demands. Therefore, discovery of the enzyme(s) with new structure is indispensable, coming up with the new ideas and strategies to apply them in the industry.

In plants and animals HNL plays a role in decomposition of stored cyanohydrins, causing release of hydrogen cyanide in their defense system. Number of the species on the earth and in the ocean is estimated as 11 million. The prediction gave us the idea that unexplored plants and animals possess our interest enzymes. In this presentation, I will introduce our exploration of following HNLs and mandelonitrile oxidase (MOX) from plants and animals.

1. Intensive screening of 163 plant species identified 7 new HNLs (Asano et al, 2005). Although specific activity of them were not superior to that of the industrial HNL from the almond (*PaHNL*), the HNL derived from the passion fruit, *Passiflora edulis* (*PeHNL*), showed an enantiomeric excess (ee) of 99% in biphasic system of diisopropyl ether. It had a molecular mass of 14.4 kDa, which is the smallest HNL among reported HNLs (Ueatrongchit et al, 2010). We expect that the HNL will be a suitable model molecule for protein engineering.

2. Cyanogenic millipedes use hydrogen cyanide as a defense chemical, which is decomposed from mandelonitrile through HNL. We isolated HNL from the invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis* (ChuaHNL). Its pH and temperature stabilities were comparable to those of *PaHNL*. The specific activity was 5 times higher than that of *PaHNL*, indicating that the ChuaHNL has the highest specific activity among reported HNLs. Furthermore, it was able to synthesize (*R*)-mandelonitrile from benzaldehyde and potassium cyanide with an ee of 99% in aqueous condition (Dadashpour et al, 2015). This HNL will be a biocatalyst to spur the industrial synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals in the next generation.

3. Mandelonitrile oxidase (ChuaMOX) was identified during study of mandelonitrile metabolism in the millipede. It stoichiometrically consumes the oxygen and catalyzes the synthesis of benzoyl cyanide and hydrogen peroxide from (*R*)-mandelonitrile, and was newly classified into mandelonitrile:oxygen oxidoreductase (EC 1.1.3.-). To apply this enzyme to industrial biotechnology, it is necessary to expand its substrate specificity using protein engineering. On the basis of its localization, ChuaMOX is a unique component of the suicide defense system in the millipede species (Ishida et al, 2016).

**Acknowledgements**

All studies in this presentation were collaborated with Drs. A. H.-Kittikun, Y. Kuwahara, K. Tamura K, N. Doi, T. Ueatrongchit, M. Dadashpour, T. Yamaguchi, K. Yamamoto, A. Ina, Y. Ichiki, T. Ohmiya, and M. Morita.

**References**

Asano Y, Tamura K, Doi N, Ueatrongchit T, H-Kittikun A, Ohmiya T (2005) Screening for new hydroxynitrilases from plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 2349-2357

Dadashpour M, Ishida Y, Yamamoto K, Asano Y (2015) Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 112: 10605-10610

Ishida Y, Kuwahara Y, Dadashpour M, Ina A, Yamaguchi T, Morita M, Ichiki Y, Asano Y (2016) A sacrificial millipede altruistically protects its swarm using a drone blood enzyme, mandelonitrile oxidase. *Scientific Reports* In press

Ueatrongchit T, Tamura K, Ohmiya T, H-Kittikun A, Asano Y (2010) Hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis*: Purification, characteristics and application in asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 456-465

**Hydroxynitrile lyases and enzymes related to mandelonitrile metabolism in plants and animals**

○Yuko Ishida<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>ERATO, JST)

**Key words** hydroxynitrile lyase, mandelonitrile oxidase, *Passiflora edulis*, *Chamberlinius hualienensis*

**1S-Dp03 Engineering nitrile hydratase by salt-bridges and disulfide-bridges**○Huimin Yu<sup>1,2,3</sup>, Song Jiao<sup>1,2</sup>, Ji Yang<sup>1,2</sup>, Jing Zhang<sup>1,2</sup>, Jie Chen<sup>1,2</sup>, Zhongyao Shen<sup>1</sup><sup>1</sup>(Dept. Chem. Eng., Tsinghua Univ., China, <sup>2</sup>Key Lab Indust. Biocatal., ME., China, <sup>3</sup>Cent. Synt. Syst. Biol., Tsinghua Univ., China)  
yuhm@tsinghua.edu.cn

Stability intensification of multimeric enzymes is of great importance for industrial biocatalysis. Various strategies have been utilized to improve the enzyme stability, among which salt-bridges and disulfide bond bridges are effective and focused in this work. Nitrile hydratase (NHase) is a double-subunit enzyme widely used for industrial production of acrylamide from acrylonitrile. Using NHase as a model enzyme, salt-bridges and disulfide-bridges were introduced to rationally improve its stability. The deformation-prone thermal-sensitive regions of NHase were first identified by MD simulation and RMSF calculation, and each terminus was found the most instable "short-board" region. Therefore, the stabilized salt-bridge interactions in the thermophilic NHase were transferred into the corresponding thermal sensitive regions of mesophilic NHase-TH. Results showed that a C-terminal salt-bridge was powerful for stability intensification with unreduced activity, through triggering global changes of the salt bridge networks in the engineered NHase. Further, some salt-bridge based circular oligo-peptides were designed and introduced into N-/C-terminal regions of NHase as a universal "stability-enhanced tag". Significantly enhanced stability/activity was observed in the diverse engineered NHases as expected. Interface of different subunits is another "short-board" region causing thermal instability of enzymes. Introducing rigid disulfide-bridges into the interface give a probable way to remarkably improve the enzyme stability. But the difficulty is the balance between flexibility and rigidity of the structure of NHase. Assisted by molecular simulation, interface disulfide bonds of NHase were designed and engineered NHases were constructed. A mutant NHase with significantly enhanced stability and unreduced activity was obtained and overexpressed in *R. ruber* cells. Catalyzed by resting cells of the engineered *R. ruber* containing the engineered NHase, high titer of acrylamide were obtained in both lab-scale and industrial-scale. This work is supported by the National Key Basic Research Project 973 (No. 2013CB733600) and National Natural Science Foundation of P. R. China (No. 21476126).

**Engineering nitrile hydratase by salt-bridges and disulfide-bridges**○Huimin Yu<sup>1,2,3</sup>, Song Jiao<sup>1,2</sup>, Ji Yang<sup>1,2</sup>, Jing Zhang<sup>1,2</sup>, Jie Chen<sup>1,2</sup>, Zhongyao Shen<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>(Dept. Chem. Eng., Tsinghua Univ., China, <sup>2</sup>Key Lab Indust. Biocatal., ME., China, <sup>3</sup>Cent. Synt. Syst. Biol., Tsinghua Univ., China)**Key words** nitrile hydratase, stability, salt bridge, disulfide bond**1S-Dp04 Aldoxime dehydration in the (bio)synthesis of nitriles**○Richard Metzner<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>(Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>ERATO, JST)  
metzner@pu-toyama.ac.jp

In recent years, the production of fine chemicals and pharmaceuticals relying on the use of toxic reagents, e.g. cyanide salts, have become the focus of process development not only from an ecological but also economic point of view. Apart from methodologies to remove toxic materials from downstream processing, substitution of the corresponding reagents by less toxic or easier-to-handle compounds is a common approach. Some examples include the use of primary carboxylic amides and their dehydration by trifluoroacetic anhydride, or the dehydration of aldoximes with oxalyl dichloride in the presence of catalytic amounts of triphenylphosphine oxide. But also in nature, this concept of generating organic nitriles from other C-N functional groups is present. The discovery of an aldoxime-nitrile pathway in *Bacillus* sp. OxB-1 by Asano and Kato represented the first biocatalytic analog to the previously mentioned aldoxime dehydration.<sup>[1]</sup> The catalyst in this case is a redox-active iron(II) heme protein, which enables a formal elimination of water, giving a reaction with a perfect atom economy. It was later determined that these aldoximes are biosynthesized from aromatic amino acids by several oxidation steps, thus offering an access route from amino acids towards nitriles. In contrast to this bacterial transformation, a recent study from Yamaguchi *et al.* also showed that plant metabolism can use P450 enzymes and NADPH to dehydrate aldoximes.<sup>[2,3]</sup> Although only four aromatic amino acids are abundant in nature, the substrate specificity of these aldoxime dehydratases (Oxd) is surprisingly broad. Numerous synthetic aryl-, arylalkyl-, and heteroaryl-aldoximes were successfully converted to their respective nitriles in both aqueous and binary solvents. In addition, it was recently discovered that these enzymes also exhibit enantioselectivity for 2-arylpropionaldoximes.<sup>[4]</sup> Although it is common for biocatalysts to have an enantiopreference, the complexity of diastereomeric chiral *E/Z*-aldoximes, a low thermodynamic barrier for *E/Z*-isomerization and low enantioselectivity for *Z*-aldoximes concealed this valuable property in previous studies. By decreasing the free enthalpy of the biotransformation, the inherent *E/Z*-isomerization was suppressed and an excellent enantioselectivity for *E*-aldoximes identified, with up to 98% ee for the synthesis of (*S*)-2-phenylpropionitrile. Apart from the selectivity of these enzymes, a major bottleneck is the rather low substrate concentration of currently 5-20 mM, corresponding to about 1-3 g/L, which is still far from an industrial application. Although there have been industrial processes using aldoxime dehydratases for the production of achiral or racemic fragrance nitriles,<sup>[5]</sup> the current aim is a general application of these useful biocatalysts in asymmetric synthesis. This presentation will therefore include ongoing research with several methodologies to surpass these limitations by the use of binary solvent systems and heterologous catalysis with immobilized aldoxime dehydratases.

We gratefully acknowledge the extensive work on the plant cytochrome P450 aldoxime dehydration by Dr. Takuya Yamaguchi and the preparation of His-tagged OxdB by Dr. Yufeng Miao. We also would like to thank SpinChem AB (Umea, Sweden) and Enginzyme AB (Stockholm, Sweden) for technical support regarding a rotating-bed reactor system (RBR) and immobilization resins for our enzymes. This study was supported by the Exploratory Research for Advanced Technology Program of the Japan Science and Technology Agency.

- [1] Y. Asano, Y. Kato, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *158*, 185-190.  
[2] Y. Miki, Y. Asano, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 6828-6836.  
[3] T. Yamaguchi, K. Noge, Y. Asano, *Plant. Mol. Biol.* **2016**, *91*, 229-239.  
[4] R. Metzner, S. Okazaki, Y. Asano, H. Gröger, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 3105-3109.  
[5] A. Patesi, W. Siegel, K.-U. Baldenius, *Int. Pat. Appl. WO/2013135601*, **2012**.

**Aldoxime dehydration in the (bio)synthesis of nitriles**○Richard Metzner<sup>1,2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>(Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>ERATO, JST)**Key words** aldoxime dehydratase, cytochrome P450, immobilization, asymmetric synthesis

## 1S-Ep01 ゲノム編集の最新方法論

○佐久間 哲史

(広島大院・理)

tetsushi-sakuma@hiroshima-u.ac.jp

次世代の遺伝子改変技術であるゲノム編集は、近年急速な発展を遂げ、基礎生物学分野はもちろん、医歯薬学、農水畜産学、細胞工学、微生物工学、環境工学など、あらゆる生命科学関連研究において必須の研究手法となりつつある。ゲノム編集では、任意のゲノム領域に DNA 二本鎖切断を導入し、内在の修復機構を利用することで、遺伝子のノックアウトやノックイン、染色体操作（広域欠失や逆位、重複、転座など）が可能となる。更に、DNA 配列そのものには傷を入れず、DNA やヒストンの化学修飾のみを改変することで、遺伝子座特異的に転写を調節するエピゲノム編集技術の開発も盛んに進められている。現在では、最も簡便かつ汎用性の高いゲノム・エピゲノム編集ツールとして CRISPR-Cas9 が広く利用されているが、より特異性を高めたバリエーションや標的配列の制限を緩和させたバリエーション、別種のバクテリア由来のサイズの小さい Cas9 など、Cas9 の改良が続々と進められている他、Cas9 とは異なるタンパク質（Cpf1 や Argonate など）を利用するシステムも報告されており、ゲノム編集ツールの進化速度は増すばかりである。また、低分子化合物を用いて DNA 二本鎖切断の修復機構をコントロールし、遺伝子ノックインの効率を高める試みや、従来利用されてきた相同組換えとは異なる修復経路を利用した遺伝子ノックイン法、従来法では合成が著しく困難であった長鎖一本鎖 DNA を容易に調整して遺伝子ノックインに利用する手法、またそれぞれ別々に利用されてきた二本鎖 DNA と一本鎖 DNA を組み合わせて遺伝子ノックインのドナーとして供する手法など、様々なゲノム編集操作の高度化も著しい。このように、ゲノム編集の技術開発は、生命科学研究史上、類を見ないほど日進月歩で進んでおり、またその重要性は日増しに高まっている。一方で、あまりの進展速度の速さゆえ、現状を把握しきれない研究者が多いのもまた事実である。本講演では、ゲノム編集の原理と応用について、演者による研究開発の経緯を交えながら、基礎情報から最新の研究動向に至るまでを俯瞰的に概説する。本講演がゲノム編集の最新方法論を理解するの一助となれば幸いである。

## Current methodologies of genome editing

○Tetsushi Sakuma

(Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words genome engineering, TALEN, CRISPR-Cas9

## 1S-Ep02 iPS 細胞での効率的なゲノム編集を目指した CRISPR ツールボックス

○堀田 秋津<sup>1,2</sup>

(京大・CiRA, 京大・iCeMS)

akitsu.hotta@cira.kyoto-u.ac.jp

iPS 細胞は多種多様な疾患患者から樹立することができ、旺盛な増殖能力と分化多能性を持つために、細胞レベルでのヒト病態学へと幅広く応用されている。これと並行して、近年の TALEN や CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の革新的な技術発展により、ヒト iPS 細胞での精密な遺伝子改変が可能となってきた[Hotta and Yamanaka, Annu Rev Genet, 2015 | Li et al., Methods, 2016]。TALEN および CRISPR はどちらも非常に効率的なゲノム編集ツールであるが、約半分を反復配列が占めるヒトゲノムにおいて、どこをターゲットにするかに応じて DNA 切断パターンや遺伝子変異の修復戦略が大きく変わってくる。我々はまず、ターゲット部位の特異性を担保するために、ヒトゲノム中での特異性の高い領域を可視化したデータベースや、切断部位前後の微小相同領域(MMEJ, Microhomology Mediated End Joining)を介した切断パターンの予測プログラム in silico Genome Editing Tools (iGEATs: <https://apps.cira.kyoto-u.ac.jp/igeats/>)を開発し、ゲノム編集を効率的かつ正確に作用させられるよう検討を重ねてきた。次に、ゲノム編集技術を遺伝子変異修復へと応用するため、先天性単一遺伝子疾患の中でも重症を呈する Duchenne 型筋ジストロフィーの原因遺伝子変異修復を試みた[Hotta A, J Neuromuscul Dis, 2015]。患者の皮膚線維芽細胞からエピソーム法を用いて iPS 細胞を樹立し、ジストロフィン遺伝子の変異を修復すべく、適切な長さのエクソンを一つ飛ばしてタンパク質の読み枠を元に戻すエクソスキッピング法や、数塩基の挿入欠損により読み枠を元に戻すフレームシフト法、そして欠損エクソンをノックインで修復する手法などの検討を行った。これらの修復 iPS 細胞を骨格筋細胞へと分化させると、期待通り修復ジストロフィンタンパク質の発現が回復していることを確認した。ゲノム編集はターゲット以外の部位を切断して変異を導入してしまうオフターゲットが最大の懸念事項である[Shida K et al., Int J Mol Sci, 2015]。我々はオフターゲット切断に伴う副作用変異の有無を検証するために、それぞれの修復 iPS 細胞において核型解析、CNV コピー数解析、およびエクソーム配列解析を行い、何れも致命的な変異は検出されなかった[Li et al., Stem Cell Reports, 2015]。今後、ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療を実現するためには、遺伝子修復 iPS 細胞を分化させて移植する生体外(ex vivo)遺伝子治療や、患者の体内で直接ゲノム編集を行う生体内(in vivo)遺伝子治療といったアプローチを検討していく必要がある。

このように CRISPR-Cas9 システムは非常に簡便かつ効率的なゲノム編集ツールであるが、ターゲット配列に PAM 配列とマッチする DNA 配列が必要であり、ターゲット部位選択の最大の障壁の一つである。一般的には"NGG"配列を PAM として認識する化膿性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*, Sp)由来の CRISPR-Cas9 が最も広く使われているが、それ以外にもこれまでに様々な細菌種から CRISPR 配列が同定されており、それぞれ違う PAM 配列を認識することが知られている。我々は Sp 由来 Cas9 の他、種々の CRISPR システムの DNA 切断活性を検討し、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, Sa)由来 Cas9 やアシタミノコッカス (*Acidaminococcus* sp., As)由来 Cpf1 はヒト細胞で高い切断活性を示すものの、髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* (Nm)由来とサーモフィラス菌 *Streptococcus thermophilus* (St)由来 Cas9 はほとんど切断活性が無いことを見いだした。様々な CRISPR ツールを使い分けることで、ターゲット可能な領域を増やすことができ、DNA 変異タイプに応じた使い分けが今後、益々重要となる。我々の取り組むヒト細胞でのゲノム編集の効率化方法も紹介したい。

## CRISPR toolbox towards efficient genome editing in patient iPS cells

○Akitsu Hotta<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>CiRA, Kyoto Univ., <sup>2</sup>iCeMS, Kyoto Univ.)

Key words genome engineering, CRISPR, iPS cells, gene therapy

**1S-Ep03 ゲノム操作工学によるバイオ医薬品高生産細胞株構築技術の開発**○河邊 佳典, 上平 正道  
(九大院・工)

kawabe@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

バイオ医薬品の中でも特に注目されている抗体医薬は、糖鎖付加などの翻訳後修飾や適切なフォールディングができる動物細胞により生産されており、中でもチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が生産ホストとしてよく用いられている。CHO 細胞による抗体医薬品生産では、プラットフォーム化が進められており、細胞株構築から細胞培養、分離精製、さらには製剤化までの流れが確立されている。しかし、生産における最上流プロセスとなる細胞株構築では、通常、DHFR-MTX 法や GS-MSX 法をはじめとする遺伝子増幅処理が、高生産細胞株構築のために行われている。しかし、その方法は確立されてはいるものの、未知メカニズムによるところもあるため、数多くの細胞の中から、労力と時間をかけて製造に適した導入遺伝子の高生産細胞株の選抜が行われている。そのため、高品質の生産物を安定的に高生産する細胞を迅速かつ確実に構築する技術の開発が望まれている。

我々はこれまで、部位特異的遺伝子導入法として組換え酵素 Cre と変異 *loxP* を用いて、CHO 細胞染色体にあらかじめ組み込んだ *loxP* 部位に酵素依存的に目的遺伝子を繰り返し導入できる部位特異的遺伝子多重化法、逐次遺伝子組み込みシステム（AGIS）を開発してきた。システムの有効性をレポーター遺伝子で実証し、目的遺伝子を組換え抗体遺伝子発現ユニットとした場合、導入した発現ユニット数に応じた抗体生産量の増加が見られた。Cre-RMCE による AGIS においては、3 種類の独立して組換え反応が可能な変異 *loxP* を使用していたため、各組み込み段階での効率が異なっていた。AGIS に関わる変異 *loxP* の数を 2 種類に減らすことで、逐次組み込みに用いる変異 *loxP* を限定でき、組み込み反応をよりシンプルにした AGIS を開発し、AGIS での組み込み効率を安定化させることができた。また、AGIS における目的遺伝子の組み込み効率を高めるために、AGIS に適した変異 *loxP* を探索したところ、組み込み効率および反応特異性の高く、AGIS に適用可能な変異 *loxP* を、これまでに報告がない配列を含めて決定することができた。

本演題では、これらの研究成果や、発現ユニットの最適化や逐次遺伝子組み込みによる生産細胞株構築の迅速化法、人工ハイブリッドレトロウイルスを用いた Cre/*loxP* による特定部位への遺伝子導入法など我々の最近の取り組みを紹介するとともに、今後の展望について議論したい。

**1S-Ep04 細胞の遺伝子改変による創薬プラットフォームの開発**○河原 正浩  
(東大院・工)

kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

細胞で様々な機能を発揮するタンパク質の構造や機能の理解は、ゲノミクス、プロテオミクスの時代を経て急速に進展し、人工タンパク質のデザインも行えるようになってきた。一方、近年の遺伝子工学的技術のめざましい進展により、遺伝子改変によって機能性細胞を意のままに創製できる時代となってきた。これらの知見や技術を利用し、細胞の遺伝子改変技術を開業プラットフォームの確立に結び付けられれば、既存の開業開発の幅を広げることができ産業応用上有用であろう。

演者らは、創薬開発の普遍的なターゲットともいえるタンパク質間相互作用を、生きた哺乳動物細胞で簡便に検出できる手法の開発を目指した。そこで注目したのが、増殖シグナルを伝達するサイトカイン受容体である。サイトカイン受容体はリガンドを受容したのち、複数の受容体鎖が近接することでキナーゼを活性化させ、シグナルを伝達する。この動作原理を応用すれば、標的タンパク質間の相互作用に応じて増殖シグナルを伝達する人工受容体が創製でき、その結果、細胞増殖の有無をリードアウトとした簡便な検出系が実現できると考えた。

この概念を利用して、創薬の重要なターゲットである膜タンパク質に対する抗体を取得する系を構築したり。この系では、サイトカイン受容体 gp130 の細胞外ドメインを標的膜タンパク質抗原で置換した人工受容体遺伝子を構築し、細胞に導入して発現させる。この細胞に小分子リガンド依存的に二量体化する改変抗体遺伝子をさらに導入し、分泌発現させると、抗原特異的抗体であれば人工受容体に結合し、小分子リガンド依存的に細胞増殖を誘導するであろうという発想である。実際に、標的膜タンパク質抗原として癌抗原 ErbB2 を用いて実験したところ、ErbB2 特異的抗体クローンを用いた場合に小分子リガンド依存的な細胞増殖を誘導でき、また高親和性抗体発現細胞を大部分の低親和性抗体発現細胞との混合物から濃縮することができた。

また、前出の概念を利用して、細胞内のタンパク質間相互作用を検出する系も構築した<sup>2)</sup>。この系では、相互作用を検出したい二種類の標的タンパク質をそれぞれ増殖因子受容体 c-kit の細胞内ドメインに連結した人工受容体を細胞質で共発現させる。標的タンパク質間相互作用が生じたときには c-kit 細胞内ドメインが二量体形成により活性化され、増殖シグナルを伝達するであろうと考えた。実際に、相互作用することが知られている FKBP12 と FRB 変異体、あるいは MDM2 の N 末端ドメインと pDI ペプチドのペアを標的タンパク質として用いて実験したところ、いずれの相互作用も細胞増殖をリードアウトとして検出できた。また、高親和性ペプチド発現細胞を大部分の低親和性ペプチド発現細胞との混合物から濃縮することができた。本講演ではこれらの研究成果を報告するとともに、今後の展望についても議論したい。

1) Miura, T. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1113-1123 (2016).2) Mabe, S. *et al.*, *Sci. Rep.* **4**, 6127 (2014).**Generation of high-producer CHO cells using accumulative gene integration system**○Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira  
(Fac. Eng., Kyushu Univ.)**Key words** CHO cells, Cre-*loxP*, accumulative gene integration, targeted integration**Development of drug discovery platforms based on genetic engineering of cells**○Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)**Key words** protein-protein interaction, signal transduction, screening

## 1S-Ep05 遺伝子改変技術を支援するベクターの開発と疾患治療の実用化

○峰野 純一  
(タカラバイオ株式会社 CDMセンター)  
minenoj@takara-bio.co.jp

1990年11月、米国NIHに於いてアデノシンデアミナーゼ欠損重症複合免疫不全症(ADA-SCID)に対する世界で初めての遺伝子治療が実施され、1995年北海道大学で同じくADA-SCIDに対する日本で初めての遺伝子治療が実施された。当社は1995年に、レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞やT細胞への遺伝子導入効率を飛躍的に高める補助剤「レトロネクチン」を開発し、遺伝子治療への取り組みが始まった。1999年、フランスINSERMにて、X連鎖重症複合免疫不全症に対する正常IL-2受容体 $\gamma$ 鎖遺伝子をCD34陽性細胞に導入して自家移植する遺伝子治療が実施され、際立った成功を収めたが、その後自家移植した患者にT細胞白血病が発症、レトロウイルスベクターを用いた幹細胞遺伝子治療の危険性が指摘され、SIN型レトロウイルスベクターなどレトロウイルスベクターの改良やレンチウイルスベクターなど安全性の高いベクターの開発が進められた。iPS細胞を樹立するため山中が最初に使用した遺伝子導入ベクターはレトロウイルスベクターであった。その後、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、センダイウイルスベクターなど遺伝子導入ベクターが順次使用したiPS細胞の樹立が試みられていった。さらにcre-lox系による挿入遺伝子の抜き取り、エピソームベクターなど、既存の遺伝子導入方法、制御方法を用いてより効率が高く安全性の高いiPS細胞樹立方法が開発されていった。2012年に重症または多発性の肺炎を伴うリポ蛋白リパーゼ欠損症(LPL欠損症)に対する遺伝子治療薬が、2015年にメラノーマに対する遺伝子治療薬が、それぞれEMA(欧州医薬品審査庁)とFDA(アメリカ食品医薬品局)により承認され、グローバル製薬企業も開発に名乗りを上げ、実用化にしのぎを削っている。遺伝子改変T細胞を用いたがん免疫細胞療法はT細胞に遺伝子を導入してその細胞傷害性を利用して治療する療法で、近年、HLA class I分子上に提示されたがん抗原を特異的に認識するT細胞受容体(TCR)遺伝子をキラーT細胞に導入して患者に輸注するex vivo 遺伝子治療(TCR遺伝子治療)で多くの有効性が報告されている。また、細胞表面に存在する抗原を認識する一本鎖抗体(ScFv)から成るキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)遺伝子をキラーT細胞に導入するex vivo 遺伝子治療(CAR-T)も積極的に行われ、ALLやCLLで効果を上げている。2013年、SCIENCE誌の「ブレイクスルー・オブ・ザ・イヤー2013」にがん免疫療法が選ばれ、免疫チェックポイント阻害抗体に加えてCARを用いた遺伝子治療が取り上げられた。この様に、遺伝子治療の歴史は安全で高効率のベクター開発の歴史でもあり、その経験と知識は再生医療やゲノム編集など、遺伝子改変を伴う技術に浸透している。近年注目を集めているアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)は、低い免疫原性・非病原性であるため安全性が高いベクターとして遺伝子治療への有用性が報告され、LPL欠損症の遺伝子治療製剤や、最近国内で実施されたAADC欠損症の遺伝子治療に使用されている。我々はT細胞を用いたがん免疫細胞療法の実用化のため、治療用遺伝子を効率的に発現するベクターの開発に着手、TCRに於いてはT細胞の内在性のTCR $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖を減じて目的とするがん抗原特異的TCR遺伝子を効果的に発現するベクター、CARに於いては新規細胞内ドメインを持つベクターの開発を行ってきた。がん抗原NY-ESO-1特異的TCRを用いた固形がんに対する遺伝子治療臨床試験、抗CD19 CARを用いた非ホジキンリンパ腫に対するCAR遺伝子治療臨床研究の支援を実施しているが、これらT細胞を用いたがん免疫細胞療法の実用化をめざし、1) 治療用遺伝子を効率的に発現するベクターの開発、2) 患者への負担を低減するため成分採血ではなく少量採血(全血50~100 mL)から遺伝子改変T細胞を $10^9$ 超の大量調製する技術の開発、3) 高タイトルガンマレトロウイルスベクターの開発、ベクター及びその産生マスターセルバンクのGMP製造、4) 閉鎖系システムを用いた遺伝子改変T細胞の作製方法の開発とGMP製造、5) LAM-PCRや挿入遺伝子コピー数測定など、遺伝子改変細胞投与後の患者モニタリングのための品質試験方法の開発とバリデーション、6) ウイルスベクターのGMP製造施設及び、遺伝子導入細胞のGMP調製施設(セルプロセッシングセンター: CPC)のデザイン、建設、品質管理システムの構築、等を進めてきた。本講演では、がん免疫細胞療法を中心に、ベクター開発と遺伝子治療実用化への取り組みと成果に関して紹介したい。

### Vector development to assist gene engineering technology and trial for disease treatment

○Junichi Mineno  
(Takara Bio Inc., CDM center)

**Key words** gene therapy, TCR, chimeric antigen receptor, vector

## 1S-Ep06 遺伝子治療の安全性評価—ゲノム編集技術の応用における留意点—

○佐藤 陽治  
(国立医薬食衛研)  
yoji@nihs.go.jp

遺伝子治療は、致死的・重篤で治療法に乏しい先天性疾病等の根治的治療法となる可能性があり、大きな期待が寄せられている。特に、近年進展が著しいゲノム編集技術の遺伝子治療への応用は、今後急激に開発が進むことが予想される。この際、当然ながら、ゲノム編集を利用した遺伝子治療の安全性の評価方法を確立するとともに、安全性判断基準に関するガイダンス・コンセンサスを並行して構築することが必須となる。

ゲノム編集は次世代遺伝子治療として臨床応用の期待も大きい、まだ開発初期段階の先端技術であり、安全性が確立されたものとはいえない。特に、問題とされるのがオフターゲット効果である。オフターゲット効果とは、染色体の標的外の部位で遺伝子挿入やゲノム編集が起こることにより生理的に重要な目的外遺伝子の機能が破壊されたり、発がん遺伝子等の望ましくない遺伝子が活性化される効果のことであり、ハザード(危険因子)の一つと考えられ、その評価法の開発が望まれている。オフターゲット効果の解析アプローチとしては、塩基配列検索技術が有効と考えられ、その開発および解析結果に基づいたゲノム編集技術応用遺伝子治療の安全性評価のガイダンスの作成等、安全性確保のための基盤の形成が課題である。

オフターゲット効果の他に、一般的に遺伝子治療においては、生殖細胞への遺伝子導入の可能性や非増殖性ウイルスベクターが増殖性を獲得する可能性などが安全性上の懸念事項として挙げられる。また、ウイルスベクターを直接患者に投与する遺伝子治療(in vivo 遺伝子治療)の場合には、ウイルスベクターの体外への排出とモニタリングが大きな課題となる。体外で遺伝子導入を行った細胞を患者に投与する場合(ex vivo 遺伝子治療)には、再生医療等安全性確保法が定義する「細胞加工物」としての品質・安全性の確保も求められる。なお、いずれの場合であっても、先端的医療(=経験の乏しい医療)であるという観点から、遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップの実施とリスクマネジメントプランの策定が重要とされている。

### Points to Consider for the Safety of Gene Therapy Products and Genome Editing Technologies

○Yoji Sato  
(Natl. Inst. Health. Sci.)

**Key words** gene therapy, genome editing, safety

**1P-1p001 進化工学的手法を用いた立体選択的カルボニレダクターゼの熱安定性・有機溶媒耐性の向上**

○小野 智博<sup>1</sup>, 井上 瑞葉<sup>1</sup>, 岡野 憲司<sup>1</sup>, 出来島 康方<sup>2</sup>, 川端 潤<sup>2</sup>, 本田 孝祐<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>三菱化学科学技術研究セ)  
tomohiro\_ono@bio.eng.osaka-u.ac.jp

「背景と目的」

*Ogataea minuta* 由来カルボニレダクターゼ(OCR1)は位置・立体選択的なケト基の還元反応を触媒し、医薬品合成前駆体として有用なキラルアルコール生産酵素として産業利用されている。通常、酵素反応は水中で行われるがOCR1の基質の中には水に溶けにくいものがあるため、これらの難水溶性基質を水系反応相に溶かし込むために、dimethyl sulfoxide (DMSO)やエタノールのような親水性の有機溶媒が用いられる場合がある。本研究では進化工学的手法によりOCR1の有機溶媒耐性ならびに熱安定性の向上を試みたので報告する。

「方法」

有機溶媒としてDMSO、OCR1の基質として2,2,2-trifluoroacetophenone (TFAP)を用いた。野生型OCR1を鋳型としてエラープロオンPCRを行い大腸菌の形質転換を行うことで変異型OCR1のライブラリを構築した。変異型OCR1を発現させた組換え大腸菌のコロニーをメンブランフィルターに写し取り、60% (v/v) DMSOに浸して50℃で2時間インキュベートした。その後OCR1によるシクロヘキサノール酸化反応とMTTの還元による呈色反応をカップリングさせることにより、OCR1活性のハイスループットなスクリーニングを行った。この方法により約40000株のライブラリから15株が選別された。これらの株からOCR1粗酵素液を調製し、50% (v/v) DMSO存在下で50℃でインキュベートした後のTFAPに対する残存活性を評価した。活性測定の結果V166Aの変異を持ったOCR1が最も高い活性を示した。野生型OCR1とV166A変異体を用いて酵素の熱および有機溶媒への耐性を比較した。この結果、主に熱ストレスへの耐性の変化がV166A変異体の安定性向上に寄与していることが明らかになった。現在、V166A変異体を用いた難水溶性ケト化合物の変換試験を実施中である。

**Improvement of the thermal and organic-solvent tolerance of an enantioselective carbonyl reductase by directed evolution**

○Tomohiro Ono<sup>1</sup>, Mizuha Inoue<sup>1</sup>, Kenji Okano<sup>1</sup>, Yasumasa Dekishima<sup>2</sup>, Hiroshi Kawabata<sup>2</sup>, Kohsuke Honda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>MCRG)

**Key words** carbonyl reductase, thermal stability, organic-solvent tolerance, directed evolution

**1P-1p002 *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素のアイソザイムに関する研究**

○一小路 貴士<sup>1</sup>, 矢野 裕之<sup>1</sup>, 中川 智行<sup>2</sup>, 谷 明生<sup>3</sup>, 田中 三男<sup>1</sup>, 三井 亮司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山理大・理, <sup>2</sup>岐阜大・応生科, <sup>3</sup>岡山山大・資源植物科研)  
rmitsui@dbc.ous.ac.jp

【目的】*Methylobacterium* 属は植物に生育促進物質を供給することにより植物からのメタノールの放出を促し、葉上の優勢種として共生している。植物の発芽から生長に伴い *Methylobacterium* 属は複数のメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)を使い分けて土壌から葉上へと移行していることが考えられる。本研究で用いている *M. extorquens* AM1 のMDH はゲノム中にCa<sup>2+</sup>を補欠因子とする *mxoF1* とLa<sup>3+</sup>, Ce<sup>3+</sup>等のランタノイドを補欠因子とする *xoxF1* と機能未知の *xoxF2* が存在している。La<sup>3+</sup>やCe<sup>3+</sup>は一般的な土壌中にも広く存在していることが報告されている。私たちは *M. extorquens* AM1 が培地中のLa<sup>3+</sup>濃度に応じて *xoxF1* の発現量をコントロールしており、La<sup>3+</sup>濃度が極めて低い場合のみ *MxaF1* を発現することを報告してきた。葉上にはLa<sup>3+</sup>やCe<sup>3+</sup>は土壌と比較すると極めて少なく、ランタノイドが土壌と葉上を検知するシグナルとなっていると推測される。そこで今回は *Methylobacterium* 属の植物との共生に各MDHが果たす役割を明らかにすることを目的として *XoxF2* に着目して解析を行ったので報告する。

【方法・結果】*XoxF2* の役割を明らかにするため *XoxF1* と同様に His-tag が付与されるように設計した株を作製し、発現をRT-qPCR、発現産物をウェスタンブロットにより確認した。その結果、メタノールを炭素源とした場合、*xoxF1* も *xoxF2* も La<sup>3+</sup>の添加により誘導を受けることが明らかになった。しかし、炭素源としてコハク酸を用いた場合、*XoxF1* はLa<sup>3+</sup>を添加することで発現が確認できるのに対し、*XoxF2* はLa<sup>3+</sup>を添加しても発現しなかった。このことから *XoxF2* はLa<sup>3+</sup>とメタノールの共存下で発現することが明らかになった。

**Expression analyses of lanthanides-dependent methanol dehydrogenases in *M. extorquens* AM1.**

○Takashi Ichikoji<sup>1</sup>, Hiroyuki Yano<sup>1</sup>, Tomoyuki Nakagawa<sup>2</sup>, Akio Tani<sup>3</sup>, Mitsuo Tanaka<sup>1</sup>, Ryoji Mitsui<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., <sup>2</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., <sup>3</sup>IPSR., Okayama Univ.)

**Key words** *Methylobacterium extorquens* AM1, methylophilic, methanol dehydrogenase, plant symbiotic bacteria

**1P-1p003 *Methylobacterium extorquens* AM1 による植物生理活性物質の分泌と植物共生**

○田中 美知留<sup>1</sup>, 矢野 裕之<sup>1</sup>, 田中 三男<sup>1</sup>, 三井 亮司<sup>1</sup>  
(岡山理大・理)  
rmitsui@dbc.ous.ac.jp

【目的】*Methylobacterium* 属は環境中に普遍的に見いだされる細菌であるが、近年植物との共生関係を有していることに注目が集まっている。*Methylobacterium* 属は植物より放出されるメタノールを得て生育する一方で、オーキシンやサイトカイニンといった植物ホルモンを生産することにより植物の生長促進を促し、葉上優勢種として共生関係を構築している。私たちはこれまでに *Methylobacterium* 属の植物生長に寄与する化合物として酸化還元酵素の補酵素でもあるPQQに着目して研究を進めてきた。今回新たに *Methylobacterium* 属が生産する植物生理活性物質の候補としてポリアミンに着目したので報告する。

【方法・結果】*Methylobacterium* 属は土壌中に存在するLa<sup>3+</sup>やCe<sup>3+</sup>等のランタノイドを生育環境シグナルとして利用していると考えている。PQQは *M. extorquens* AM1 を用いてメタノールを炭素源とした場合、葉上環境を意図してLa<sup>3+</sup>非存在下で培養すると培養液中に分泌されるが、土壌環境を意図するLa<sup>3+</sup>濃度が高い条件下で培養を行った場合はほとんど菌体外に分泌されないことを明らかにしてきた。今回PQQ同様プロトリンなどのポリアミンが植物との共生に関与していることを推定し、*M. extorquens* AM1 のポリアミン分泌にかかわることが推定されるポリアミンパーミターゼ(PPase)に着目した。メタノールを炭素源として培養した菌体のPPase遺伝子発現量をRT-qPCRを用いて測定し、コハク酸を用いて培養した菌体と比較した。この結果、PPase遺伝子はメタノールにより誘導されていることが明らかになった。現在PQQ合成系遺伝子と同様にLa<sup>3+</sup>濃度がPPase遺伝子の発現に影響を与えるのか、またPPaseの発現が見られる培養条件下で菌体外にポリアミン分泌を行っているのか検討中である。

**Production of physiologically active plant substances by *M. extorquens* AM1 for plant symbiosis.**

○Michiru Tanaka, Hiroyuki Yano, Mitsuo Tanaka, Ryoji Mitsui  
(Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

**Key words** *Methylobacterium extorquens* AM1, methylophilic, polyamine, plant symbiotic bacteria

**1P-1p004 *Aspergillus aculeatus* 由来 FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼホモログの機能解析**

○岡 修司, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪大院・生環科)  
oka24@baseball.zaq.jp

【目的】自己血糖値測定に使用される酵素センサに応用可能な酵素としてFAD型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)が注目されている。FAD-GDHは数種の *Aspergillus* 属において菌体外酵素として生産されることが報告されている。我々は *Aspergillus aculeatus* においてゲノム情報からFAD-GDH遺伝子と相同性の高い二つのホモログ遺伝子 (*gdha*, *gdhb*) が存在していることを見いだした。特にGDHAは一次配列のホモロジー解析からFAD-GDHとFAD型グルコースオキシダーゼの中間に位置しており、他の *Aspergillus* 属が有するFAD-GDHと異なった性質を有している可能性が考えられた。そこでこれら二つの遺伝子を発現させ、発現産物の酵素学的性質を検討することを目的とした。

【方法及び結果】*A. aculeatus* のゲノムから *gdha*, *gdhb* を取得し、推定されるシグナル配列、イントロンを除去した領域をPCRにより増幅した。得られた遺伝子を大腸菌発現ベクター pET20b に発現産物のC末端側に His-tag が付加されるよう挿入したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。形質転換体を15℃にて培養し、SDS-PAGEにより発現産物を確認したところ、ほとんどの発現産物が不溶性画分に分離されたが、可溶性画分にGDH活性が確認された。GDHAは *Aspergillus* 属の他のFAD-GDHと同様に糖鎖が付加されることが予想されるが、今回糖鎖が付加されない大腸菌において活性を検出することができた。現在 *gdhb* について大腸菌での発現を検討中であり、両遺伝子の *A. oryzae* を宿主とした発現についても報告予定である。

**Functional analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase homologues from *Aspergillus aculeatus***

○Shuji Oka, Shuji Tani, Junichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Aspergillus aculeatus*, FAD-dependent glucose dehydrogenase

### 1P-1p005 *Cordyceps militaris* 由来リボヌクレオチドレダクターゼの発現及び機能解析

小島 康弘<sup>1</sup>, ○加藤 竜也<sup>1,2</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大グリーン科学技術研)  
 park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】冬虫夏草属に属する *Cordyceps militaris* (サナギタケ) は抗腫瘍作用・免疫調節作用などの生理活性を示すコルジセピンを産生する。コルジセピンは冬虫夏草菌のみ産生することが認められており、アデノシンのリボース部分の3'位の水酸基が水素に置換された構造である。しかし、コルジセピンの生合成経路は未だ判明していないが、リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) によってアデノシン二リン酸 (ADP) のリボースの3'位の水酸基が水素に置換され、3'-dADP を生成し、それに続く脱リ酸化酵素との反応によりコルジセピンが合成されると推測されている。本研究では、*C. militaris* NBRC9787 由来の RNR の ADP から 3'-dADP への触媒反応について解析を行った。

【方法・結果】*C. militaris* 由来 RNR は二つのサブユニット (CmR1, CmR2) から成る酵素であるため、pCold I ベクター (TaKaRa) を用いて RNR 発現用ベクター、pCold I-RNR CmR1 及び pCold I-RNR CmR2 を構築し、大腸菌 BL21 による発現を行った。特に CmR1 については、大腸菌由来シャペロン GroES-GroEL との共発現によりその可溶性を向上させた。発現された CmR1 および CmR2 を精製して、ADP と反応させて HPLC により生成物の解析を行った。この結果、ADP から 2'-dADP への生成は確認されたが、3'-dADP の生成は確認できなかった。このことから *C. militaris* NBRC9787 由来の CmR1 および CmR2 から成る RNR は RNR 活性を有していることは認められたものの、コルジセピン生合成には直接関与しないと考えられた。

### Expression and functional analysis of ribonucleotide reductase of *Cordyceps militaris*

Yasuhiro Kojima<sup>1</sup>, ○Tatsuya Kato<sup>1,2</sup>, Enoch Y. Park<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**Key words** *Cordyceps militaris*, Ribonucleotide reductase, Cordycepin

### 1P-1p006 *Aspergillus oryzae* 由来 D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) のアロステリック特性

○渡部 昭, 佐藤 陽子, 五味 勝也  
 (東北大院・農)  
 gomi@biochem.tohoku.ac.jp

【目的】乳酸脱水素酵素(LDH)では、バクテリア由来の一部のL-LDHがホモ4量体構造をとりフルクトース1,6-ビスリン酸(FBP)によるアロステリック制御を受けることが非常に多く解析されているが、D-LDHに関しては一部のバクテリアの酵素を除いてそのアロステリック特性の解析はほとんど行われていない。先に我々は、乳酸の効率的な生産を目指し、麹菌ゲノム解析情報を利用して *Aspergillus oryzae* から D-LDH 遺伝子を探出し大腸菌で高発現させ、その酵素学的諸性質を報告した(1)。今回は、本酵素のアロステリック特性について調べたので報告する。

【結果と考察】先に報告した *A. oryzae* 由来の D-LDH は、SDS-PAGE, Blue Native PAGE 及びゲルろ過法を用いた解析からホモ6量体であると推定された(1)ため、本酵素についてアロステリック特性の有無について解析した。基質(ピルビン酸)、補酵素(NADH)のみを反応系に含む場合の活性を100%とした際の相対活性は、1mM FBP の存在下では133%まで賦活化された。また、FBP によるアロステリック制御を受ける *Thermus aquaticus* や *Lactobacillus casei* の L-LDH がクエン酸や  $Mn^{2+}$  のような金属イオンによって活性化されることから、本酵素についても解析したところ1mM クエン酸の存在下で本酵素は165%まで活性が上昇し、1mM の  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  の存在下で各々149%、150%の相対活性を示した。この結果から、*A. oryzae* 由来の D-LDH は FBP、クエン酸、 $Mg^{2+}$  及び  $Ca^{2+}$  によってヘテロトロピックな活性化を受けることが明らかとなった。このように、真菌類由来の D-LDH がバクテリアのアロステリック制御型 L-LDH のエフェクター因子である FBP やクエン酸によって活性化される例は初めてであり、本酵素の FBP、クエン酸の有無によるピルビン酸を基質とした基質飽和曲線も解析し報告する。

(1) 渡部ほか、2016年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p53

### Allosteric function of homohexameric D-lactate dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*

○Akira Watanabe, Yoko Sato, Katsuya Gomi  
 (Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, D-lactate dehydrogenase, D-lactic acid, allosteric

### 1P-1p007 超好熱性アーキアにおける NAD<sup>+</sup>熱分解産物の代謝機構

○蜂須賀 真一<sup>1</sup>, 佐藤 喬章<sup>1,2</sup>, 跡見 晴幸<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>京大院・工, <sup>2</sup>JST, CREST)  
 atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】超好熱菌を含めた全ての生物にとって、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) は酸化(還元)酵素の反応において重要な補因子の一つである。しかし、NAD<sup>+</sup>は高温で不安定であり、分解されやすいことが知られている。そのため超好熱菌のような高温環境で生育する生物は、生体内の NAD<sup>+</sup>濃度を維持するような機構や、NAD<sup>+</sup>の熱分解産物を代謝するような機構を有すると考えられる。そこで本研究では、至適生育温度が85℃である、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象として、NAD<sup>+</sup>の熱分解に対応する機構を解明することを目的とした。

【実験・結果】まず、85℃において NAD<sup>+</sup>を熱処理し、その分解産物を解析した。その結果、NAD<sup>+</sup>の熱分解産物が nicotinamide および ADP-ribose であることを同定した。そこで、この ADP-ribose を代謝する可能性のある酵素を *T. kodakarensis* のゲノム上から探索したところ、その候補として ADP-ribose pyrophosphatase (ADPR-PPase) と推定される TK2284 遺伝子を見出した。ADPR-PPase は一般に、ADP-ribose を ribose 5-phosphate (R5P) および AMP に分解する酵素である。そこで TK2284 組換え型タンパク質を調製し、ADP-ribose を含めた様々なヌクレオチド二リン酸誘導体に対して基質特異性を検討したところ、ADP-ribose および ADP-glucose に対して有意な活性を示した。この2つの基質に対して、速度論的解析を行ったところ、ADP-ribose に対する  $k_{cat}/K_m$  値は ADP-glucose に対する値よりも約53倍高いことが示された。よって、TK2284 タンパク質の生理的基質は ADP-ribose である可能性が高いと考えられた。以上の結果から、高温環境に生育する本菌において、NAD<sup>+</sup>の熱分解から ADP-ribose が生じてしまい、それを TK2284 タンパク質が再利用可能な R5P や AMP に分解していることが予測される。

### Metabolism dealing with thermal degradation of NAD<sup>+</sup> in hyperthermophilic archaea

○Shin-ichi Hachisuka<sup>1</sup>, Takaaki Sato<sup>1,2</sup>, Haruyuki Atomi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>JST, CREST)

**Key words** hyperthermophile, NAD<sup>+</sup>, ADP-ribose, thermal degradation

### 1P-1p008 病原菌由来 S46 ペプチダーゼの酵素学的諸性質の解明

○伊藤 康広<sup>1</sup>, 鈴木 義之<sup>1</sup>, 志田 洋介<sup>1</sup>, 阪本 泰光<sup>2</sup>, 田中 信忠<sup>3</sup>, 小笠原 渉<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>長岡技科大, <sup>2</sup>岩手医科大・薬, <sup>3</sup>昭和大大・薬)  
 owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景と目的】当研究室は、これまでに *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来の peptidase family S46 に属する dipeptidyl aminopeptidase BII (PmDAP BII) の立体構造と切断メカニズムの構造機能相関を初めて明らかにした。S46 ペプチダーゼの基質 P1 認識残基として、アミノ酸 675 番目(PmDAP BII)が見出されており、G/R/S の3種のアミノ酸が普遍的に保存されている。Gが保存されているグループ(Gタイプ)のPmDAP BIIは脂肪族、芳香族および塩基性アミノ酸に特異的である。一方、同じくGタイプの菌周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 dipeptidyl peptidase7(PgDPP7)はPmDAP BIIの基質特異性に加え、酸性アミノ酸に対して特異性を示すことから、アミノ酸 675 番目の他に基質特異性へ関与する残基の存在が示唆された。そこで本研究では、Gタイプの基質特異性を決定するメカニズムの完全解明を目指し、PmDAP BII と PgDPP7 に加え、Gタイプの多剤耐性日和見菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 SmDPP7 の酵素学的諸性質の解析を行うことで、新たな基質特異性決定残基の解明を目指した。

【結果】発現用ベクターは、大腸菌に対してコドン使用頻度最適化した全合成遺伝子 pgdpp7 および smdpp7 を pET22b(+)に導入し、PgDPP7 と SmDPP7 の発現および精製に成功した。そして、新たに SmDPP7 の基質特異性が DAP BII の基質特異性に加え、プロリン特異性の保持を明らかにした。さらに、PmDAP BII の立体構造と PmDAP BII、PgDPP7 および SmDPP7 のマルチプルアライメント解析の併用により、S1 ポケットにおいて PgDPP7 だけが4残基(A670/G673/D674/T684)を保存していた。推定した4残基は、PgDPP7のみが保持する酸性特異性の要因と推測し、変異酵素解析を行う予定である。また、DAP BII で報告されているプロリンのイミド結合切断能について、PgDPP7 および SmDPP7 で解析中である。

### Enzymatic characterization of S46 peptidase from pathogenic bacteria

○Yasuhiro Ito<sup>1</sup>, Yosiyuki Suzuki<sup>1</sup>, Yosuke Sida<sup>1</sup>, Yasumitsu Sakamoto<sup>2</sup>, Nobutada Tanaka<sup>3</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>2</sup>Sch. of Pharm., Iwate Med. Univ., <sup>3</sup>Sch. of Pharm., Showa Univ.)

**Key words** Dipeptidyl peptidase, substrate specificity, family S46

**1P-1p009 Burkholderia 属細菌由来アセチルコリンエステラーゼ組換え体の諸性質解析と農薬検出系への応用**

○北村 智彬<sup>1</sup>, 藤本 拓哉<sup>1</sup>, 泊直宏<sup>2</sup>, 山本 佳宏<sup>2</sup>, 鶴岡 直樹<sup>3</sup>, 茂里 康<sup>4</sup>, 渡部 邦彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>京府大院・生命環境, <sup>2</sup>京産技研, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>産総研・健康工学)  
 kwatanab@kpu.ac.jp

**【背景・目的】** 既存の農薬検出器は高コストかつ操作が煩雑であるため、より安価で簡便な検出系開発が急がれている。本研究では、動物由来以上に安価で機能改変容易な微生物由来アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を用いて、農薬による阻害性を指標とした定量的検出系の開発を試みている。これまでに AChE 産生菌の *Burkholderia* 属細菌 Para-1 株を単離し、AChE とその遺伝子の研究を行っているが、元菌株は AChE 産生量が少ないため、大腸菌発現系を用いた組換え体 AChE (rAChE) の大量発現を行い、諸性質の解析と農薬検出器への応用を試みた。

**【方法・結果】** Para-1 株由来 AChE は 57.5 kDa で動物由来 AChE とは約 30% の一次配列相同性があり、Ser-Glu-His の活性残基とオキシアニオンホール形成が共通するなど、酵素機能と構造が類似すると予想された。一方動物由来 AChE とは異なり、一次配列内に 10 個もの Cys 残基を保持していた。また大腸菌発現では、培養温度 25℃ 以下で可溶化し、Para-1 株と比べ約 200 倍の活性を示した。この大腸菌無細胞抽出液を 2 種のクロマトグラフィー (DEAE-cellulose, Superdex 200) に供し、rAChE を電気泳動的に均一に精製した。rAChE 0.02 μg/mL を 37℃、5 min 処理すると活性が約 90% 減少したが、50 倍濃度 BSA 添加で約 90% の活性が維持されたため、rAChE の安定性には温度とタンパク質濃度が重要であると判った。また rAChE の  $K_m$  は 0.36 mM と元菌株由来 AChE と同等で、有機リン農薬 (methamidophos)、カルバメート農薬 (propoxur) に対する  $K_i$  もそれぞれ 0.079 mM、0.74 mM と動物由来 AChE と同値だったため、農薬検出系への応用に rAChE が動物由来 AChE の代替酵素になると示唆された。現在、農薬検出系デバイス、ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) を用いた農薬濃度分析への応用を進めると共に、rAChE 安定化に向けた変異体作製も試みている。

**Studies of acetylcholinesterase from *Burkholderia* sp. Para-1 for simple pesticides analyzer**

○Chiaki Kitamura<sup>1</sup>, Takuya Hujimoto<sup>1</sup>, Naohiro Tomari<sup>2</sup>, Yoshihiro Yamamoto<sup>2</sup>, Naoki Tsuruoka<sup>3</sup>, Yashushi Shigeri<sup>4</sup>, Kunihiro Watanabe<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch., Life Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., <sup>2</sup>KITC, <sup>3</sup>BRI. AIST, <sup>4</sup>Health Res. Inst., AIST)

**Key words** *Burkholderia* sp., acetylcholinesterase, residual pesticides, ISFET

**1P-1p010 麹菌由来イソプリメベロース生成酵素を用いた新奇オリゴ糖の生産**

○松沢 智彦, 矢追 克郎  
 (産総研・生物プロセス)  
 matsuzawa-tomohiko@aist.go.jp

麹菌の生産するイソプリメベロース生成酵素はキシログルカンオリゴ糖の非還元末端からイソプリメベロース ( $\alpha$ -D-Xylp-(1,6)-D-Glcp) を遊離するユニークな酵素であり、我々は本酵素をコードする遺伝子 (*ipeA*: isoprimeverose producing enzyme A) を真核微生物において初めて同定することに成功した。IpeA の基質特異性を調べたところ、本酵素はキシログルカンオリゴ糖の非還元末端のイソプリメベロースユニットを厳密に認識し、グルカン主鎖を加水分解してイソプリメベロースを遊離することが明らかになった。そのため、非還元末端にキシロース側鎖のないキシログルカンオリゴ糖や、キシロース側鎖にさらにガラクトースなどの糖が付加したキシログルカンオリゴ糖には作用できない。また、IpeA は加水分解活性だけでなく、高い糖転移活性も有していることが明らかになり、本酵素を用いることでキシログルカンオリゴ糖にイソプリメベロースユニットを転移し、非天然型の新奇オリゴ糖を生産できることが明らかになった。

**Production of novel oligosaccharides using *Aspergillus oryzae* isoprimeverose producing enzyme**

○Tomohiko Matsuzawa, Katsuro Yaoi  
 (BRI. AIST)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, oligosaccharide, xyloglucan, transglycosylation

**1P-1p011 GH5\_8 マンナーゼの熱安定化メカニズムの解明**

○熊谷 祐也<sup>1,2</sup>, 裏地 美杉<sup>1</sup>, Wan Kun<sup>1</sup>, 奥山 正幸<sup>2</sup>, 木村 淳夫<sup>2</sup>, 畑中 唯史<sup>1</sup>  
 (岡山生物研,<sup>2</sup>北大院・農)  
 hatanaka@bio-ribs.com

**【背景と目的】** 一次構造からマンナーゼは主に Glucoside Hydrolase Family (GH) 5 および 26 に分類される。GH5 はサブファミリー (GH5\_X) が提唱されており、マンナーゼは GH5\_7, 8, 10 および 17 に分類される。GH5\_8 は actinobacteria, firmicutes および proteobacteria 由来のタンパク質から構成される。これまでに 4 種類の放線菌マンナーゼの性状解析を行ってきた。これらは actinobacteria 内の異なる分枝に属し、すべてカルシウムイオン (Ca) により熱安定性が上昇する。本研究は一部の配列に共通した Ca による熱安定化の分子機構の解明に加え、GH5\_8 タンパク質における熱安定化メカニズムについて考察した。

**【方法】** 放線菌 *Streptomyces thermolilacinus* 由来マンナーゼ (StMan) は大腸菌を宿主とし組換えタンパク質として作製した。点変異体は PCR によって作製した。Ca との結合定数は ITC により求めた。タンパク質配列は CAZy database より取得し、neighbor-joining 法により系統樹を作製した。マンナンに対する酵素活性は 3,5-ジニトロサリチル酸法により求めた。

**【結果と考察】** StMan のループ 7 にある 4 つのアミノ酸 (Gly276, Asp283, Pro284 および Glu286) が Ca の結合に関与し、熱安定性の上昇に関わることが分かった。ループ 6 の Ser247 およびループ 7 の Asp279 は水素結合を形成する。これらの Ala 変異体は Ca 結合能を有し、親酵素よりも弱いが Ca による熱安定性の上昇も保持していた。親酵素と変異酵素の Ca が無い場合の熱安定性は変わらないことから、ループ間の水素結合が熱安定化に必須であった。水素結合の形成は StMan と同じ分枝のタンパク質だけに保存されており、他の 3 種類のマンナーゼには見られなかった。また一次構造からループ 7 への Ca 結合メカニズムは GH5\_8 に広く存在する可能性が示された。

**Mechanism of thermal stability in GH5\_8 mannanases**

○Yuya Kumagai<sup>1,2</sup>, Misugi Uraji<sup>1</sup>, Kun Wan<sup>1</sup>, Masayuki Okuyama<sup>2</sup>, Atsuo Kimura<sup>2</sup>, Tadashi Hatanaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Res. Ins. Biol. Sci., (RIBS) Okayama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

**Key words** actinomycetes, glycoside hydrolase, thermostability, phylogenetic analysis

**1P-1p012 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来不溶性グルカンの細菌型  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼによる加水分解**

○矢野 成和<sup>1</sup>, 難波 孝行<sup>2</sup>, 玉木 友理<sup>2</sup>, 残間 寿美香<sup>1</sup>, 今野 博行<sup>1</sup>, 立木 隆<sup>3</sup>, 若山 守<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>山形大院・理工, <sup>2</sup>山形大・工, <sup>3</sup>立命館大・生命科学)  
 shige-y@yz.yamagata-u.ac.jp

**【背景と目的】** 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* は、スクロースを炭素源とした時、菌体外に不溶性グルカンを生産する。この不溶性グルカンは、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合と  $\alpha$ -1,3-グルコシド結合から構成されており、グルカンスクラーゼの糖転移反応によって生成される。不溶性グルカンは、真菌、あるいは細菌由来デキストラナーゼによって加水分解されることは知られているが、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを用いた検討は十分に行われてこなかった。本研究では、*Bacillus circulans* KA-304 の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを用いて、不溶性グルカンの加水分解を行い、加水分解産物を分析することを目的とした。

**【方法】** 不溶性グルカンは、*L. mesenteroides* の培養液から調製した。*L. mesenteroides* はスクロースを炭素源に改変した MRS 培地で 2 日間培養し、遠心分離することで不溶性グルカンを回収した。得られた不溶性グルカンは、蒸留水で 2 回洗浄し、凍結乾燥した。*B. circulans* KA-304 の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼは、大腸菌発現系を用いて生産した。

**【結果と考察】** 不溶性グルカン (1%) 含む反応液に、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (0.3mg/ml) を添加して加水分解反応を行った結果、約 1.5 mM の還元糖が遊離することを確認した。同基質をデキストラナーゼで加水分解した場合は、約 16 mM の還元糖が遊離した。 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼによる加水分解産物を分析したところ、グルコース、ニゲロース、ニゲロトリオースとニゲロテトラオースが含まれていた。以上の結果から、不溶性グルカンの主鎖は  $\alpha$ -1,6-グルコシド結合から構成されているが、長鎖の  $\alpha$ -1,3-グルコシド結合のみからなる分枝も存在することが確認できた。さらに本研究では、デキストラナーゼ処理とアルカリ抽出処理したグルカンを調製し、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼによる加水分解反応を行った。

**Hydrolysis of insoluble glucan from *Leuconostoc mesenteroides* by bacterial  $\alpha$ -1,3-glucanase**

○Shigekazu Yano<sup>1</sup>, Takayuki Nanba<sup>2</sup>, Yuri Tamaki<sup>2</sup>, Sumika Zanma<sup>1</sup>, Hiroyuki Konno<sup>1</sup>, Takashi Tachiki<sup>3</sup>, Mamoru Wakayama<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Yamagata Univ., <sup>3</sup>Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** *Leuconostoc mesenteroides*, insoluble glucan, alpha-1, 3-glucanase

### 1P-1p013 A structurally novel chitinase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus chitonophagus*

○Tamotsu Kanai<sup>1,2</sup>, Ayumi Horiuchi<sup>1</sup>, Mehwish Aslam<sup>1</sup>, Haruyuki Atomi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>CREST, JST)  
atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

A structurally novel chitinase, *Tc-ChiD*, was identified from *Thermococcus chitonophagus*, a hyperthermophilic archaeon that can grow on chitin as the sole organic carbon source. The gene encoding *Tc-ChiD* contains regions corresponding to a signal sequence, two chitin-binding domains and a putative catalytic domain. This catalytic domain shows no similarity with previously characterized chitinases, but resembles an uncharacterized protein found in the mesophilic anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*. Recombinant *Tc-ChiD* protein was produced in *Escherichia coli*. Enzyme assays using *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) oligomers indicated that *Tc-ChiD* can hydrolyze GlcNAc oligomers longer than (GlcNAc)<sub>4</sub>. Chitinase assays using colloidal chitin suggested that *Tc-ChiD* is an exo-type chitinase that releases (GlcNAc)<sub>2</sub> or (GlcNAc)<sub>3</sub>. Analysis using GlcNAc oligomers modified with *p*-nitrophenol suggested that *Tc-ChiD* recognizes the reducing end of chitin chains. In *T. chitonophagus*, another chitinase ortholog that is similar to *Thermococcus kodakarensis* chitinase, *ChiA*, is present that can degrade chitin from the non-reducing ends. Therefore, the presence of multiple chitinases in *T. chitonophagus* with different modes of cleavage may contribute to its unique ability to efficiently degrade chitin.

### A structurally novel chitinase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus chitonophagus*

○Tamotsu Kanai<sup>1,2</sup>, Ayumi Horiuchi<sup>1</sup>, Mehwish Aslam<sup>1</sup>, Haruyuki Atomi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>CREST, JST)

**Key words** chitinase, archaea, hyperthermophile, chitin

### 1P-1p014 *Streptomyces thermodiastaticus* 由来耐熱、好酸性キチナーゼの諸性質の検討

○武慶太郎<sup>1</sup>, 藤木英寿<sup>1</sup>, Suyotha Wasana<sup>2</sup>, 高木一好<sup>1</sup>, 若山守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大学・生命科学, <sup>2</sup>Dept. of Ind. Biotechnol., Grad. Agro-ind, Prince of Songkla Univ.)  
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

**【目的】**キチンはN-アセチルグルコサミンがβ-1,4結合した、セルロースに次いで豊富な生物資源である。キチナーゼ(EC.3.2.1.14)は、キチンの加水分解を触媒する酵素であり、キチン含有資源の分解に利用されている。通常キチン処理は高温かつ極端なpH条件下で行われることから、キチンの分解に使用する酵素には、厳しい環境に耐性を持つものを使用した方が有利である。本研究では、中度好熱性細菌である *Streptomyces thermodiastaticus* がキチンを唯一の炭素源として培養した場合に生産する数種類のキチン分解酵素のうちキチナーゼ1(Chi1)を精製し、精製酵素の諸性質を検討した。

**【方法・結果】**キチンを唯一の炭素源とした培地で *S. thermodiastaticus* を培養し、培養上清をろ過して粗酵素液を得た。この粗酵素液を弱陰イオン交換カラムおよび強イオン交換カラムを用いて精製し、Chi1の精製酵素を得た。Chi1はpH 5.5で活性が最大になり、pH 1.5から6.0までの範囲で最大活性の80%以上の活性を示した。また、各pHで処理した酵素を最適pHで反応させた結果、pH 1.5から9.0までの広い範囲で80%以上の残存活性を示した。Chi1は65℃で最大の活性を示し、同温度で3時間処理した後でも、100%の残存活性を示した。Chi1は食塩に対する安定性も高く、10% (w/v) 食塩存在下で90%以上、15% (w/v) 食塩存在下でも87%の残存活性を示した。

### Thermostable and acidic chitinase from *Streptomyces thermodiastaticus*

○Keitaro Take<sup>1</sup>, Hidehisa Fujiki<sup>1</sup>, Wasana Suyotha<sup>2</sup>, Kazuyoshi Takagi<sup>1</sup>, Mamoru Wakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>Dept. of Ind. Biotechnol., Grad. Agro-ind, Prince of Songkla Univ.,)

**Key words** chitinase, thermostable enzyme, acid tolerance, *Streptomyces*

### 1P-1p015 *Streptomyces* 属放線菌由来の2つのβ-D-ガラクトフラノシダーゼの比較

○松永恵美子<sup>1</sup>, 八色奈央<sup>1</sup>, 豊田早紀<sup>1</sup>, 岡拓二<sup>2</sup>, 樋口裕次郎<sup>1</sup>, 竹川薫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>崇城大・生物生命)  
takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

*Aspergillus* 属など一部の糸状菌の糖鎖の末端やガラクトマンナン(GM)の側鎖には1個ならびに複数個のガラクトフラノース(GalF)が結合している。β-D-ガラクトフラノシダーゼ(GalF-ase)はこのGalFのグリコシド結合を加水分解して、遊離させることができる酵素であり、糖鎖中のGalFの機能及び構造解析を行うために重要な酵素である。我々はGalF-aseを生産する放線菌(JHA19)を単離し、そのゲノム配列を決定して本酵素の同定に成功した。さらに、本酵素がGalF特異的な新奇酵素であることを明らかにした(Matsunaga et al. PLOS ONE e0137230 2015)。我々はJHA19株以外にも別の放線菌JHA26株の培養液中にも、高いGalF-ase活性を見出した。そこでJHA26株の全ゲノム塩基配列を決定し、JHA19 GalF-aseと相同性の高い遺伝子を検索した。その結果、JHA26株も *Streptomyces* 属放線菌に属していること、またゲノム中の1遺伝子がGalF特異的なGalF-aseであることがわかった。そこでJHA19とJHA26由来のGalF-aseの比較を行った。両酵素の諸性質に関しては大きな違いはなかったが、JHA19 GalF-aseがJHA26酵素よりも比較的熱に安定であることがわかった。また、JHA19 GalF-aseはC末端側にAbfBドメインを持つことに対し、JHA26 GalF-aseはN末端側にP14ドメインを持つことがわかった。JHA26 GalF-aseのP14ドメインを除去しても、pNP-GalF及び *Aspergillus fumigatus* から調製したGMに対する酵素活性は変化しなかったことから、P14ドメインは本酵素活性に重要ではないことがわかった。

### Comparison of two β-D-galactofuranosidases from *Streptomyces* species

○Emiko Matsunaga<sup>1</sup>, Nao Yairo<sup>1</sup>, Saki Toyota<sup>1</sup>, Takuji Oka<sup>2</sup>, Yujiro Higuchi<sup>1</sup>, Kaoru Takegawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

**Key words** beta-galactofuranose, beta-galactofuranosidase, *Streptomyces* sp., *Aspergillus* sp.

### 1P-1p016 *Bacillus* 属細菌由来ピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の諸性質の解析

○松藤仁美, 樋口裕次郎, 竹川薫  
(九大院・生資環)  
takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* が生産する糖タンパク質のN-結合型糖鎖には、酸性糖鎖として非還元末端のガラクトースにピルビン酸が付加されたピルビン酸化ガラクトース(PvGal)が存在する。分裂酵母においてPvGalの生合成に関与する新奇ピルビン酸転移酵素について明らかにしたが、分裂酵母のPvGal代謝機構や、他の生物のPvGal含有糖鎖を分解する酵素に関する報告はこれまで全くない。そこで本研究では、土壌微生物の中からPvGal含有糖鎖を分解する酵素の探索を行い、PvGal含有糖鎖分解酵素の諸性質について明らかにすることを目的とした。

酵素検出用の基質として4-nitrophenyl(pNP)-β-PvGalを使用した。pNP-β-PvGalはpNP-β-Galと分裂酵母のピルビン酸転移酵素Pvg1pをPEP存在下で反応させ、HPLCにより反応液から精製した。約200種の土壌サンプルの培養液を粗酵素液としてpNP-β-PvGalと反応させたところ、最終的に *Bacillus cereus* と近縁なグラム陽性1細菌の菌体内にpNP-β-PvGalからpNPを遊離する酵素活性を確認した。次に、酵素反応液を薄層クロマトグラフィーで解析したところ、本菌の酵素はpNP-β-PvGalをpNPとPvGalとに分解する新奇な酵素であることが示唆された。本菌の全ゲノム配列の解析を行ったところ、全推定ORFの中から、候補遺伝子を大腸菌内で生産し酵素活性を測定した結果、GH1に属するarylphospho-β-glucosidaseに相同性が高い1遺伝子がpNP-β-PvGal分解酵素活性を有していることが分かった。本酵素の諸性質を調べたところ、本酵素はpNP-β-PvGal分解活性を示すが、pNP-β-Gal、pNP-β-Glc、pNP-β-Xyl分解活性も有していた。さらに、分裂酵母野生株菌体に本酵素を作用させることで、酸性糖鎖に吸着する試薬であるアルシアンブルーの吸着量の減少が確認され、分裂酵母菌体表層のN-結合型糖鎖にも作用する可能性が示唆された。

### Identification and characterization of enzymes required for the degradation of pyruvylated galactose-containing oligosaccharides from *Bacillus* sp.

○Hitomi Matsufuji, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa  
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

**Key words** glycosidase, *Bacillus* sp., pyruvylated galactose

**1P-1p017 *Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼ L191R 変異酵素の X 線結晶構造解析**

○残華 智子, 西村 重徳, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪府大院・生環科・応生科)  
monger@biochem.osakafu-u.ac.jp

**【背景と目的】** *Kitasatospora* sp. MK-1785 株が生産するマルトトリオース生成アミラーゼ (G3Amy) は澱粉から特異的にマルトトリオース (G3) を生成する alpha-アミラーゼである。本酵素は加水分解活性のみならず高い糖転移活性を有している。糖転移反応における糖受容体として水酸基を有する化合物を認識できるため、G3 配糖体合成酵素としても応用が期待される。本研究では糖転移反応効率の向上を目指し作製された多数の変異体の中から、加水分解に対する糖転移活性が最も上昇した変異体 L191R のアポ型と生成物 G3 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析から明らかにした。

**【方法】** 分泌シグナル (M1~A33) および触媒ドメイン (A34~Y489) をコードする G3Amy 遺伝子を発現ベクター pTrc99A に挿入し、大腸菌を形質転換することで G3Amy (L191R) 遺伝子を発現発現させた。発現産物をペリプラズム面分より精製後、ポリエチレングリコールを含む沈殿剤を用いた Sitting drop 法によって結晶化を行った。この結晶を用いて Spring-8 にて回折強度データを収集し、X 線結晶解析を行った。

**【結果】** 変異体 L191R のアポ型と、G3 複合体の立体構造をそれぞれ分解能 1.7 Å、1.8 Å で得た。G3 複合体ではサブサイト-3 から -1 に G3 が観察され R191 の側鎖ははっきりと見ることができなかったが、アポ型では R191 は Subsite -2、-3 付近に存在するにも関わらず、側鎖は Subsite +1 方向を向いていた。変異を導入した R191 以外に、アポ型、G3 複合体ともに WT との構造の違いはみられなかった。L191R となることで糖転移活性が増大する理由として、R191 側鎖が活性部位近傍で糖受容体と相互作用している可能性が考えられた。

**Crystal structure analysis of maltotriose-forming amylase L191R mutant from *Kitasatospora* sp. MK-1785**

○Tomoko Zanka, Sigenori Nishimura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** maltotriose, maltooligosaccharide-forming amylase, crystal structure analysis

**1P-1p018 ハイマンノース型糖鎖を有する *Aspergillus glaucus* MA0196 由来アスパルティックプロテアーゼの特性解析**

○竹中 慎治<sup>1</sup>, 林 理希<sup>1</sup>, 仙波 弘雅<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>1</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>, 土居 幹治<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農・応生, <sup>2</sup>マルトモ)  
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

**【目的】**

我々は、かつお節のかび付けに伴う色相変化の機構を明らかにすることを目的とし、かび付けに用いられる *Aspergillus* 属の生成する脱色因子 (アスパルティックプロテアーゼ) の特性解析を行った<sup>1,2)</sup>。その中で、*A. glaucus* MA0196 は多量の糖鎖を有するアスパルティックプロテアーゼを分泌することを見出し、その諸性質を報告した<sup>3)</sup>。同酵素には多量の糖鎖が付加していることが明らかとなったが、その詳細な構造や意義は解明されていない。そこで、糖鎖の構造解析、同酵素遺伝子のクローニングと発現を行った結果、既報の酵素にない性質を見出したので、それを報告する。

**【方法および結果】**

MY20 培地<sup>1)</sup>にて MA0196 株を培養し、培養上清から各種クロマトグラフィーによりプロテアーゼを単一に精製した。PNGase F や Endo H 処理によって本酵素の分子量は 240 kDa 前後 (ゲル濾過法) から 42 kDa (SDS-PAGE) に減少した。BlotGlyco のマニュアルに従って糖鎖の切断・精製・ラベル化を行い、LCMS-IT-TOF 分析と GlycoMod による検索結果から N 型糖鎖として (GlcNAc)<sub>n</sub>-(Man)<sub>3</sub>-(Man)<sub>n</sub> (n=1-6) を見出すことができた。続いて、プロテアーゼ遺伝子のクローニングを行い、糖鎖をもたない組換えプロテアーゼを *Pichia pastoris* にて高発現させた。MA0196 株由来プロテアーゼと組換えプロテアーゼの特性比較したところ、脱色活性、至適温度・pH などについては相違が見られなかったが、糖鎖を有する親株酵素は水活性がより低い条件下でも高い活性を示した。1) J. Sci. Food Agric. 93:1349-1355, 2013. 2) J. Sci. Food Agric. (2016, DOI: 10.1002/jsfa.7688) 3) 第 66 回生化学学会大会 (北海道、2P-053、2014)。

**Characterization of high-mannose type aspartic protease from *Aspergillus glaucus* MA0196**

○Shinji Takenaka<sup>1</sup>, Lihui Lin<sup>1</sup>, Hironori Senba<sup>1</sup>, Kosei Tanaka<sup>1</sup>, Ken-Ichi Yoshida<sup>1</sup>, Mikiharu Doi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dep. Agrobiol., Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ., <sup>2</sup>Marutomo Co., Ltd.)

**Key words** *Aspergillus glaucus*, aspartic protease, high mannose enzyme, N-linked oligosaccharides

**1P-1p019 *Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A および Fae1B の酵素特性**

○間宮 愛, 栗冠 真紀子, 木村 哲哉, 栗冠 和郎  
(三重大院・生資)  
sakka@bio.mie-u.ac.jp

**【背景と目的】** 細菌や真菌類が持つフェルラ酸エステラーゼは、ヘミセルロース内に存在するフェルラ酸のエステル結合を加水分解し、他の細胞壁分解酵素の多糖類へのアクセスを増強すると言われている。一方、フェルラ酸には抗酸化作用があり、血圧降下、血糖値低下などの作用を有するため、生活習慣病の予防・改善への利用が期待される。本研究では、*Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A および Fae1B を発現・精製し、その酵素特性を明らかにした。

**【方法、結果および考察】** *R.josui* の *fae1A* と *fae1B* 遺伝子にコードされる酵素はいずれもシグナルペプチド配列を有し、糖質エステラーゼファミリー 1 の触媒モジュール (CE1)、ファミリー 6 の糖質結合モジュール (CBM6)、ドックリンモジュールから成るモジュラー酵素であり、両者のアミノ酸配列の相同性は 61% である。Fae1A および Fae1B の発現用プラスミド構築にはベクターとして pET-28a(+) $\Delta$ N-His を使い、シグナルペプチドを除いた *fae1A* と *fae1B* 遺伝子領域をそれぞれ導入した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-R1PL 株に導入し Fae1A と Fae1B を発現し、HisTrap カラムを用いて精製した。至適温度や至適 pH および熱安定性や pH 安定性はフェルラ酸エチルを基質として測定した。その結果、Fae1A と Fae1B の至適温度 50°C、至適 pH 6.5、熱安定性は 30°C~45°C の範囲で安定であった。pH 安定性について、Fae1A は pH 6.5~pH 9.0 の範囲で、Fae1B は pH 6.5~pH 8.0 の範囲で安定であった。Fae1A は pNP-フェルラ酸を分解したが (比活性 2.6U/mg-protein)、Fae1B は活性を示さなかった。また、両酵素は天然基質である小麦ふすまに対して分解活性を示し、フェルラ酸や p クラマル酸などのヒドロキシケイ皮酸を遊離した。遊離するフェルラ酸量は、キシラナーゼの共存により増加した。

**Characterization of ferulic acid esterases Fae1A and Fae1B derived from *Ruminiclostridium josui*.**

○Ai Mamiya, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka  
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

**Key words** feruloyl esterase, *Ruminiclostridium josui*, xylanase

**1P-1p020 酵素法によるアルギニンからの 3-ヒドロキシオルニチン および *trans*-3-ヒドロキシプロリンの合成**

○原 良太郎<sup>1</sup>, 北辻 早希<sup>2</sup>, 山縣 海<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・理工研, <sup>2</sup>早大・先進理工)  
ryo\_h@aoni.waseda.jp

**【目的】** 2-オキソグルタル酸依存型アミノ酸水酸化酵素は、アミノ酸側鎖の炭素に対して位置・立体選択的にヒドロキシ基を導入可能とする。化学的な観点から、当該酵素反応は炭素-水素結合を官能基の介在なしに新たな結合へ直接変換でき、効率の良い反応として関心が寄せられている。近年、我々を含めて当該酵素群の精力的なスクリーニングにより、多様なヒドロキシアミノ酸の工業的生産プロセスが報告されている。しかし、この酵素群では得られない化合物も多い。そこで本研究では、水酸化に続く酵素反応を導入することにより、これら化合物に対するユニークな合成プロセスの開発を試みた。

**【方法・結果】** *Streptomyces* sp. 由来アルギニン水酸化酵素、*Mesorhizobium loti* 由来アルギナーゼおよびオルニチンシクロデアミナーゼの各遺伝子を大腸菌で発現させ、当該酵素を用いた反応系において *trans*-3-ヒドロキシプロリン (Hyp) を合成する 3 段階の反応プロセスを検討した。はじめに、水酸化酵素によりアルギニンから 3-ヒドロキシアルギニンを得た。次に、アルギナーゼを作用させて 3-ヒドロキシアルギニン (3-hArg) を 3-ヒドロキシオルニチン (3-hOrn) に変換した。さらに、オルニチンシクロデアミナーゼによって 3-hOrn を環化することで *trans*-3-Hyp の合成を確認した。続いて、各反応系を最適化し、酵素の速度論的解析を実施した。その結果、アルギナーゼの 3-hArg に対する  $k_{cat}$  はアルギニンと比較して 1/20 であったのに対し、オルニチンシクロデアミナーゼの 3-hOrn に対する  $k_{cat}$  はオルニチンと比べて 1/28000 と大幅に低かった。この結果から、本反応プロセスのボトルネックは環化反応であることが示され、これは *trans*-3-Hyp 合成における律速性と一致した<sup>1)</sup>。

1) Hara, R., et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 243-253 (2016).

**Multi-enzymatic synthesis of 3-hydroxyornithine and *trans*-3-hydroxyproline from arginine**

○Ryotaro Hara<sup>1</sup>, Saki Kitatsuji<sup>2</sup>, Kai Yamagata<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** 3-hydroxyornithine, *trans*-3-hydroxyproline, hydroxylase, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

### 1P-1p021 ヒスチジン水酸化酵素の特性解析と組換え大腸菌による3-ヒドロキシヒスチジン生産

○中島 悠太<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工,<sup>2</sup>早大・理工研)  
kkino@waseda.jp

【目的】ヒドロキシヒスチジン (HyHis) は抗がん剤プレオマイシンなどの構造中に見られ、医薬品原料として期待される化合物である。我々は、遊離 L-ヒスチジンを位置・立体選択的に水酸化し、HyHis に変換可能な 2-オキソグルタル酸依存型 2-ヒスチジン水酸化酵素を見出し、当該酵素を用いる合成法は、安価に供給可能な L-ヒスチジンを原料として利用でき、効率的であるため、工業的に有意な手法と成り得る。本研究では、当該酵素の特性解析および生成物の同定を行い、菌体反応系による HyHis の効率的生産プロセスの開発を目指した。

【方法・結果】*Sulfobacillus thermotolerans* 由来ヒスチジン水酸化酵素遺伝子を His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で高発現させ、Ni<sup>2+</sup>アフィニティーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製酵素反応において、L-ヒスチジンから HyHis を生成する最適反応条件を検討した。本酵素は 35°C、pH 7.5 において最大活性を示し、5-35°C、pH 6.0-8.5 の範囲で安定的に活性を維持した。NMR により生成物の構造解析を行い、HyHis が 3-HyHis であることを確認した。さらに、当該ヒスチジン水酸化酵素を高発現させた大腸菌を用いて菌体反応を実施したところ、L-ヒスチジンから高い収率で 3-HyHis 合成を達成することができた。

1) 原ら、2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集 p.103 (演題番号 1P-058)

### Characterization of histidine hydroxylase and production of 3-hydroxyhistidine by *Escherichia coli*

○Yuta Nakajima<sup>1</sup>, Ryotaro Hara<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** 3-hydroxyhistidine, hydroxylase, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

### 1P-1p022 リジン水酸化酵素発現大腸菌を利用したヒドロキシリジン生産プロセスの開発

○木内 愛海<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 山縣 海<sup>1</sup>, 三宅 良磨<sup>3,4</sup>, 川端 潤<sup>3,4</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工,<sup>2</sup>早大・理工研,<sup>3</sup>三菱化学科学技術研究センター,<sup>4</sup>エーピーアイコーポレーション)  
kkino@waseda.jp

【目的】ヒドロキシリジン (HYL) は医薬品原料として工業的に有用な化合物である。我々はこれまでに塩基性アミノ酸水酸化酵素であるクラバミン合成酵素 (CAS)<sup>1</sup> とアルギニン 3-水酸化酵素 (VioC)<sup>2</sup> における基質の構造類似性に着目して、ゲノム情報を利用したアミノ酸水酸化酵素の探索を行い、リジン 3S-水酸化酵素 2 種類、リジン 4R-水酸化酵素 4 種類の計 6 種類のヒドロキシリジン水酸化酵素を取得している<sup>3</sup>。本研究では、これらリジン水酸化酵素の特性解析、およびリジンからの 3S-HYL および 4R-HYL 生産を検討した。

【方法・結果】リジン 3S-水酸化酵素およびリジン 4R-水酸化酵素の計 6 種類の酵素遺伝子をそれぞれ His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で高発現させ、当該酵素の活性に対する温度と pH の影響をみた。各酵素の最適反応条件は 15-40°C、pH 6.0-9.0 の範囲にあった。また、リジン以外に対する基質特異性を検討したところ、リジン 3S-水酸化酵素は 5R-HYL、リジン 4R-水酸化酵素は 5R-HYL および 3S-HYL に対しても活性を有することを明らかにした。これらを踏まえ、リジン水酸化酵素遺伝子をそれぞれ高発現させた大腸菌を用いた菌体反応により HYL の生産性を比較した。その結果、3S-HYL 生産では *Kineococcus radiotolerans* NBRC 101839<sup>9</sup> 由来リジン 3S-水酸化酵素、4R-HYL 生産では *Niastella koreensis* NBRC 106392<sup>1</sup> 由来リジン 4R-水酸化酵素を用いた際に最も収率が高く、リジンをほぼ完全に変換した。

1) *Biochemistry*, 29, 6499-6508 (1990).  
2) *ChemBioChem*, 5, 1274-1277 (2004).  
3) 原ら、2014 年度日本生物工学会大会講演要旨集 p.43 (演題番号 1P-104)

### Production of hydroxylysine by whole cell reaction of *Escherichia coli* expressing lysine hydroxylase

○Aimi Kiuchi<sup>1</sup>, Ryotaro Hara<sup>2</sup>, Kai Yamagata<sup>1</sup>, Ryoma Miyake<sup>3,4</sup>, Hiroshi Kawabata<sup>3,4</sup>, Kuniki Kino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>3</sup>Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, <sup>4</sup>API Corporation)

**Key words** hydroxylysine, lysine hydroxylase, dioxygenase

### 1P-1p023 シトクロム P450 BM3 と補酵素再生系の近接配置による酵素反応

○畠山 真由美<sup>1</sup>, 野北 昂志<sup>1</sup>, 北岡 卓也<sup>2</sup>, 一瀬 博文<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・生資環,<sup>2</sup>九大院・農)  
ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

【緒言】*Bacillus megaterium* 由来の cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) は、ヘムドメインと還元酵素ドメインからなる一原子酸素添加酵素である。P450 BM3 は長鎖脂肪酸の水酸化を行うことが知られているが、変異導入により短鎖脂肪酸やアルカンへの位置・立体特異的な水酸化能を持つため、有用物質生産の触媒ツールとしての利用が期待される。しかし、P450 BM3 を利用した触媒反応を生体外で行うには補酵素である NAD(P)H の供給が必要となり、実用化への障壁となっている。本研究では、NADH 再生系である Glycerol dehydrogenase (GLD) を NADH 駆動型の P450 BM3 (W1046A) と近接場に配置することにより P450 BM3 反応系への効率的な NADH の供給を試みた。2 種類の酵素を近接場へ配置する手法として *Staphylococcus aureus* 由来の Sortase A (SrtA) により 2 種類の酵素を連結する手法と、*Clostridium thermocellum* 由来のコヘシンドックリン相互作用を利用した手法を用いて比較を行った。

【方法と結果】*S. aureus* の SrtA 遺伝子、C 末端に SrtA の認識配列を付加した *Escherichia coli* DH5α 由来 GLD、N 末端にペントグリシンを付加した P450 BM3 (W1046A) をそれぞれ pET22 ベクターへ導入し、*E. coli* BL21 (DE3) star を宿主として発現、精製を行った。また、*C. thermocellum* のコヘシン領域を連結した GLD、ドックリン領域を連結した P450 BM3 (W1046A) も pET22 ベクターへ導入し、発現、精製を行った。精製したそれぞれの酵素を近接場へ配置し、酵素活性を測定した。

### Sequential enzymatic reaction catalyzed by self-assembled cytochrome P450 BM3 and glycerol dehydrogenase

○Mayumi Hatakeyama<sup>1</sup>, Takashi Nogita<sup>1</sup>, Takuya Kitaoka<sup>2</sup>, Hirofumi Ichinose<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour. Environ. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** cytochrome P450, sortase A, cohesin, cofactor regeneration

### 1P-1p024 固定化酵素を利用したバニリン合成

○古屋 俊樹<sup>1,2</sup>, 黒岩 麻里<sup>1</sup>, 木野 邦器<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工,<sup>2</sup>東理大・理工)  
tfuruya@fuji.waseda.jp

【目的】フレーバーやフレグランスとして有用なバニリンはバニラビーンズからの抽出により得られるがその量は限られており、代替製法として微生物や酵素を利用したバイオプロセスに関心が寄せられている。これまでに、バイオマス資源のフェルラ酸を原料としたバニリン合成が試みられているが、既報の経路は補酵素を必要とするためその供給が高生産を阻む一因となっている。我々はこれまでに、補酵素非依存性の脱炭酸酵素と酸化酵素からなる新規バニリン合成経路を設計し、これらの酵素を発現させた組換え大腸菌を利用してバニリンを合成可能なことを実証している<sup>1,2</sup>。本研究では、補酵素非依存性の特徴を生かし、固定化酵素によるバニリンの効率的合成について検討した。

【方法・結果】脱炭酸酵素および酸化酵素の陰イオン交換樹脂への吸着について検討したところ、両酵素とも Sepabeads EC-EA に活性を保持した状態で固定化できた。二段階目の酸化酵素はイソオイゲノールをバニリンに変換する活性も有するため、まずイソオイゲノールからのバニリン合成について検討した。その結果、固定化により酵素の安定性が向上し、10 回の繰り返し利用で 6.8 mg (1 ml スケール) のバニリンが生成した。フェルラ酸を原料とした場合、固定化した脱炭酸酵素と酸化酵素からなるカステド反応で、4-ピニルグアヤコロールを中間体としてバニリンを合成可能なことも明らかにした。

本研究の一部は、Novozymes Japan Research Fund 2016 の事業として実施した。  
1) T. Furuya, M. Miura, K. Kino, *ChemBioChem*, 15, 2248 (2014).  
2) T. Furuya, M. Miura, M. Kuroiwa, K. Kino, N. Biotechnol., 32, 335 (2015).

### Biotechnological production of vanillin using immobilized enzymes

○Toshiki Furuya<sup>1,2</sup>, Mari Kuroiwa<sup>1</sup>, Kuniki Kino<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

**Key words** oxygenase, decarboxylase, immobilized enzyme, vanillin

## 1P-1p025 タンパク質工学と代謝系改変によるコリン応答転写スイッチの超高感度化

○鈴木 紳一郎, 星野 孝幸, 河合 (野間) 繁子, 斎藤 恭一, 梅野 太輔  
(千葉大院・工)  
umeno@faculty.chiba-u.jp

現在使われている遺伝子転写誘導系は、糖の誘導体や抗生物質など、高価な合成化合物を誘導物質として用いるものが多く、これが有価物質の発酵生産などへの利用をコスト面で阻んできた。また、食品生産プロセスなどへの展開を鑑みて、低価格だけでなく、安全で消費者イメージの良い化合物を誘導剤とした新しい遺伝子発現系の開発が望まれている。

本研究室では、卵黄成分として知られる栄養素コリンにตอบสนองする誘導系の進化デザインをおこなってきた (Saeki, *et al.*, ACS Synth. Biol., 2016 : doi: 10.1021/acssynbio.5b00230)。大腸菌の浸透圧応答系の一部である BetI/betO 系を実験室内「進化」させ、コリンにより任意の遺伝子を高い on/off 比で制御できる発現誘導系を作製した。ただし、この発現系には、誘導に比較的高い濃度 (~10 mmol/L) のコリンを要するという難点があった。そこで、大腸菌のコリン代謝の操作による高感度化を目指した。

まず、Bet プロモータの下流にコリントランスポータ BetT を追加配置した。このポジティブループ形成による細胞毒性はみられず、誘導系のコリン感度だけが 200 倍向上した。更に、コリンをグリシンペタインへと代謝する内在経路をゲノム上の *betA* 遺伝子欠損によって遮断したところ、コリンへの応答感度が更に 20 倍向上した。こうして都合 4,000 倍の高感度化を施すことによって、任意のタンパク質遺伝子や代謝経路の発現を、わずか数  $\mu\text{mol/L}$  のコリンの投入によって S/N 比高くオンオフできるようになった。本講演では、こうして創った完成系の Bet 誘導系のアセチルコリンや  $\beta$  メチルコリンなどに対する応答挙動などについても報告する。

### Hypersensitive choline-induced transcriptional switch constructed by protein engineering and metabolic modification

○Shinichiro Suzuki, Takayuki Hoshino, Shigeko Kawai-Noma, Kyoichi Saito, Daisuke Umeno  
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** induction system, directed evolution, synthetic biology, transcriptional factor

## 1P-1p026 タンパク質工学による *Talaromyces cellulolyticus* 由来セロビオハイドロラーゼの耐熱化

○蒲池 沙織, 井上 宏之, 松鹿 昭則, 星野 保, 石川 一彦  
(産総研)  
kazu-ishikawa@aist.go.jp

**【目的】**再生可能資源である木質系バイオマスの利用に関し、酸糖化などと比べて、(1)室温付近での糖化によりエネルギー使用量の削減が可能、(2)過分解が起らないことによる糖収率の向上、といった利点から、酵素糖化法の開発が主流となっている。これまでに、様々な構成成分を持つ木質系バイオマスの完全糖化に必要とされるコア酵素群が明らかとなっている。そのため我々は、雑菌汚染の回避や、反応効率の向上、および、酵素の再利用を通じたシステムの効率化を目指して、コア酵素群の耐熱化を行っている。中でも、結晶性セルロースを分解することのできるセロビオハイドロラーゼ (CBHI) は、糖化反応において重要な酵素である。今回は、セルラーゼ生産糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* 由来 *TcCBHI* の耐熱化について報告する。

**【方法・結果】**既知構造情報から、*TcCBHI* のホモロジーモデリングを行った。得られた立体構造情報を用いて、耐熱性糸状菌 *Rasamsonia emersonii* 由来の耐熱性 CBHI と構造比較することにより、立体構造的に、タンパク質耐熱化に寄与すると考えられる変異導入部位および残基を導き出した。各種変異プラスミドを作製し、*T. cellulolyticus* を形質転換した後、デンプン誘導により、菌体外に各種変異型 *TcCBHI* を分泌させた。培養液上清を回収し、硫酸沈殿および各種クロマトグラフィーによる精製を経たのち、耐熱性評価を行った。pNP-Lactose を基質に用いた活性測定および蛍光色素を用いた熱変性温度測定の結果から、有意な変異を 4 か所同定した。これらの各変異をまとめて導入した改良型 *TcCBHI* を作製し、評価した結果、野生型と比べて変性温度が約 8°C 上昇し、比活性を維持したまま、至適温度および残存活性についても向上させることに成功した。

### Protein engineering of cellobiohydrolase from *Talaromyces cellulolyticus* for thermostability

○Saori Kamachi, Hiroyuki Inoue, Akinori Matsushika, Tamotsu Hoshino, Kazuhiko Ishikawa  
(JAIST)

**Key words** protein engineering, thermostability, cellobiohydrolase, *Talaromyces cellulolyticus*

## 1P-1p027 糸状菌 *Aspergillus nidulans* における新規ポリ-ADP リボース加水分解酵素の生理的役割

○渡邊 美紀, 宮地 雄大, 平野 滯, 山本 竜也, 志水 元亨, 加藤 雅士  
(名城大・農)  
mkato@meijo-u.ac.jp

### 【目的】

ポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は、タンパク質の翻訳後修飾の一種で、エビジェネティクス制御などに関与することが明らかになっている。PAR の分解に関与する酵素として、ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) が知られている。PARG は、高等真核生物では高度に保存されているが、糸状菌のゲノム中には既知の PARG と同源性を示す遺伝子は確認されなかった。そこで本研究では、候補遺伝子からリコンビナントタンパク質を調製・機能解析することにより、糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し、さらに、その生理的役割を明らかにすることを目的とした。

### 【方法・結果】

*A. nidulans* のゲノム中からスクレオチドを基質にすると考えられる *parg* 候補遺伝子を 7 種選抜し、リコンビナントタンパク質を調製後、PARG 活性を測定した。そのうち 1 種に  $\text{Mg}^{2+}$  依存的な PAR の分解活性が検出された。さらに、精製タンパク質と PAR の反応生成物を LC-MS/MS にて解析したところ、ADP-リボースが検出された。これらの結果から、このタンパク質が PARG 活性を有することが明らかになり、これを fungal PARG (fPARG) と命名した。次に、fPARG の *in vivo* の機能を解析するため、*parg* 候補遺伝子の遺伝子破壊株 *Δparg* を作製し、PAR の分解活性、細胞内局在性、DNA 損傷剤等に対する影響を検討した。*Δparg* 株では PAR の分解活性が顕著に低下していた。また、fPARG は主に核に局在していた。DNA 損傷剤に対する影響を検討したところ、野生株に比べて *Δparg* 株は DNA 損傷剤に対して感受性を示した。以上の結果から、糸状菌では fPARG が PARG として機能しており、DNA 修復に関与していることが明らかになった。

### Functional roles of novel poly (ADP-ribose) hydrolase in *Aspergillus nidulans*

○Miki Watanabe, Yuta Miyachi, Mio Hirano, Tatsuya Yamamoto, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato  
(Meijo Univ. Agric.)

**Key words** *Aspergillus nidulans*, poly (ADP-ribose), poly (ADP-ribose) glycohydrolase

## 1P-1p028 Endocytic Transport of Amyloid beta-42 in the presence of Oxidized Derivatives of Cholesterol

○Neha Sharma<sup>1</sup>, KeangOK Beak<sup>1</sup>, Huong Thi Thanh Phan<sup>2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>Hanoi Natl Univ. of Educ.)  
takagi@jaist.ac.jp

**Introduction:** Aggregation of amyloid beta in misfolded form results into formation of amyloid plaques in the brain that eventually leads to Alzheimer's disease. When newly translated proteins reach to Endoplasmic reticulum (ER) in misfolded form, they cause fatal stress to the organelle known as ER stress. It was previously reported that even externally added A $\beta$ -42 could cause ER stress. Herein, we proposed that this ER stress could be due to endocytic vesicular transport. In the past research, we found that 7-ketocholesterol (7-keto) enhanced the association of A $\beta$ -42 with the cell membrane though its presence could not result in the endocytic transport. We had focused on the involvement of 25-hydroxycholesterol (25-OH), raft, ER and cytoskeleton in the present study.

**Results and discussion:** We studied the interaction and endocytic transport of A $\beta$ -42 in the Jurkat cells in the presence of oxysterols. Endocytic transport could be observed exclusively in case of 25-OH though interaction of A $\beta$ -42 was strong at surface of membrane in 7-keto containing cells. After the intracellular transport, A $\beta$ -42 was observed to reach ER which could possibly be microtubule-dependent.

**Conclusion:** 25-OH Cholesterol is important factor in the endocytic transport of externally added A $\beta$ -42 in T cells. Thus, this study will further the understanding about the pathogenesis of neurodegenerative diseases which happens to affect human brain in aged people.

### Endocytic Transport of Amyloid beta-42 in the presence of Oxidized Derivatives of Cholesterol

○Neha Sharma<sup>1</sup>, KeangOK Beak<sup>1</sup>, Huong Thi Thanh Phan<sup>2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>Hanoi Natl Univ. of Educ.)

**Key words** amyloid beta, ER stress, Endocytosis, oxysterol

## 1P-1p029 嗅覚受容体の匂い分子応答に対するシトクロム P450 の効果

○浅川 賢史<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, Savangsuksa Aulaphan<sup>1</sup>, 松波 宏明<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, Duke Univ. Medical center)  
yohda@cc.tuat.ac.jp

生物の嗅覚機構の解明には匂い分子をリガンドとする嗅覚受容体(OR)の機能解明が重要であるが、ORを実験細胞に発現させてもその匂い分子応答を完全には再現できていない。近年嗅粘液中のシトクロム P450(CYP)がORの匂い分子応答を変化させることが示唆された。本研究ではCYPを介したORの匂い分子応答の機能解明を目的とした。HEK293T細胞にシグナル伝達因子が導入されたHana3A細胞に、MOR161-2とマウス嗅上皮由来CYPを共発現させ、MOR161-2のアセトフェノン応答の変化を調べた。アセトフェノン添加培地で培養したCYP発現細胞の培養上清をGC-MSにより分析し、培地成分の変化を調べた。その結果CYP1a2発現細胞はアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝することによってMOR161-2のアセトフェノン応答を増大させることを明らかにした。in vivoでもCYPがORの匂い分子応答に関与することを示すため、マウスがアセトフェノンを嗅いで活性化されるORの数がCYP阻害剤の導入により変化するか調べた結果、CYPの阻害がMOR161-2のアセトフェノン応答を低減させることを示した。以上より、in vitroとin vivoの双方向のアプローチによって、CYPがMOR161-2のアセトフェノンへの応答に関与していることを明らかにした。さらに他のORおよびCYPについても解析を進めており、本発表ではこれらの結果についても合わせて報告する。

### Effect of cytochrome P450 on the response of olfactory receptors by conversion of odorants

○Mavashi Asakawa<sup>1</sup>, Yosuke Fukutani<sup>1</sup>, Aulaphan Savangsuksa<sup>1</sup>, Hiroaki Matsunami<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, Duke Univ. Medical center)

**Key words** odorant response, cytochrome P450, HEK293T cell, in situ hybridization

## 1P-1p030 カイコ・BmNPVバクミド発現系で発現させたブタ由来リラキシン関連因子の効率的精製と構造解析

○石崎 真章<sup>1</sup>, 加藤 竜也<sup>1,2</sup>, Park Sungjo<sup>3</sup>, Terzic Andre<sup>3</sup>, 高坂 哲也<sup>1</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・農・応生化,<sup>2</sup>静大グリーン科技研,<sup>3</sup>メイヨー医科大)  
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】ブタ精巣で発見されたリラキシン関連因子 (Insulin-like peptide 3: INSL3) は造精機能維持や精子生理に関与し精子の運動能の向上等、家畜の受胎率向上への活用が期待されている。しかし、生体から単離出来るINSL3はごく微量であるため、生体からの調製は困難である。そこで、INSL3の量産を目指してカイコ・バクミド発現系を用いたINSL3の発現を行ったところ、活性体を精製することに成功した<sup>1</sup>。しかし、従来法では精製効率が低かったため、本研究ではカイコ体液から新たなINSL3精製法について検討した。また精製した組換えINSL3について、結合様式を調べ、カイコの翻訳後修飾が哺乳動物と類似であることを明らかにした。

【方法・結果】ブタ精巣由来INSL3遺伝子をカイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入することで組換え BmNPV バクミドを構築し、カイコ幼虫に注射して発現させた。発現させたタンパク質は体液から回収した。得られた体液に対し、3倍量の1M塩酸を加えて酸処理を行い、遠心分離により沈殿を取り除いた。得られた塩酸処理上清を5M水酸化ナトリウムで中和すると再度沈殿が生じたため、遠心分離により再度沈殿を取り除いた。この中和上清からAnti-DDDDK-tagアフィニティ精製した。1ステップカラムのクロマトグラフィーで純度90%の組換えINSL3が得られ、従来法に比べ、収量が約5倍改善された。nanoLC-ESI-MS/MSによるジスルフィド結合解析を行ったところ、88%の組換えINSL3が正常なジスルフィド結合を有しており、大部分が活性体であることが示唆された。

<sup>1</sup>第67回日本生物工学会大会講演要旨集 p. 248

### Efficient purification and structural analysis of boar insulin-like peptide 3 expressed in silkworms

○Masaaki Ishizaki<sup>1</sup>, Tatsuya Kato<sup>1,2</sup>, Sungjo Park<sup>3</sup>, Andre Terzic<sup>3</sup>, Tetsuya Kohsaka<sup>1</sup>, Enoch Y. Park<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Mayo Clinic coll. Med.)

**Key words** Silkworm, BmNPV, Insulin-like peptide, Mass spectrometry

## 1P-1p031 ケラチン分解酵素の機能不明C末端ドメインの機能解析

○杉田 慎之助, 大政 健史, 古賀 雄一  
(阪大院・工)  
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】好熱性細菌 *Fervidobacterium islandicum* 由来のプロテアーゼ Islandisin はケラチン分解能を持つ酵素である。本酵素はサチライシン型のプロテアーゼであるが、活性ドメインのC末端に2つの機能未知ドメイン(SD1, SD2)を有する。これらは他のケラチン分解酵素にも保存されており、ケラチン分解に関与していると推測される。またSD1は抗体IgGの抗原認識部位であるFv領域と類似のβサンドイッチ構造をしており、基質との相互作用に関係するドメインの可能性がある。SD1, SD2の機能を解明することを目的とし、本研究ではSD1, SD2の組換え発現系を構築し、そのケラチンに対する吸着性の有無を調べた。

【方法】Islandisin 遺伝子からSD1, SD2単独またはSD1とSD2両方をコードする部分をPCRにより増幅し、各々をpET25bベクターにクローニングした。*E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)を形質転換し、得られた形質転換体から目的タンパク質の調製を行った。難溶性の粉末ケラチンに調製したドメイン溶液を加え、30分静置した後、ケラチン画分と非結合画分に分けSDS-PAGEに用い、ケラチンとの結合アッセイの前後でドメインタンパク質の量的変化を観察した。

【結果・考察】ケラチンとの結合アッセイを行う前のサンプルでは、各々のドメインタンパク質がメジャーバンドとして観察されたが、結合アッセイ後ではSD1が殆ど観察されなかった。また、SD1+SD2においてもタンパク質量の減少が確認されたが、SD2のみでは変化は見られなかった。結合アッセイ前後でのバンドの減少は、ケラチンとの相互作用により非結合画分から取り除かれたことを意味する。このことから、SD1のケラチンとの吸着性の存在が示唆された。本発表では結合の詳細と酵素学的意義を明らかにする。

### Functional analysis of C-terminal domain of the keratin-degrading enzyme

○Shinnosuke Sugita, Takeshi Omasa, Yuichi Koga  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** serine protease, thermophile, binding, keratin

## 1P-1p032 プレバチルスによる細胞内タンパク質の可溶性発現

○植野 陽平, 花方 寛, 宮内 明  
(ヒゲタ醤油研)  
y-ueno@higeta.co.jp

【背景】組換えタンパク質の発現には様々な発現系が用いられている。その選択にあたっては、細胞内タンパク質の発現には細胞内発現系、分泌タンパク質の発現には分泌発現系を用いることで発現成功率を高めることができると考えられている。細胞内発現系としては大腸菌発現系 (以下、大腸菌) が多く用いられているが、目的とするタンパク質によっては不溶化したり発現量が低かったりするなどの問題が起こりうる。一方でプレバチルス発現系 (以下、プレバチルス) は主に分泌発現系として用いられているが、これまでのところ細胞内発現系としては注目されておらず有用性は明らかでなかった。そこで今回は、プレバチルスを細胞内発現宿主として利用し、大腸菌では不溶化するタンパク質の可溶性発現が可能であるかどうかを試験することにした。

【実験と結果】好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の細胞内タンパク質のうちいくつかは大腸菌で発現させると不溶化することが知られていた。これらのタンパク質をコードする遺伝子をプレバチルス用ベクター pBICの開始コドン直下に導入し、菌体内に発現させたところ、可溶性画分に目的タンパク質が確認された。この結果から、プレバチルスが細胞内発現系として利用できるだけでなく、大腸菌では発現困難だったタンパク質の可溶性発現も可能であることが示された。発表ではこれらの結果を示すとともに、プレバチルスで可溶性発現が可能である理由についても考察したい。

### Successful Expression of Intracellular Proteins as Soluble Form by *Brevibacillus* Expression System

○Yohei Ueno, Hiroshi Hanagata, Akira Miyauchi  
(R & D Dept., Higeta Shoyu)

**Key words** *Brevibacillus choshinensis*, *Escherichia coli*, recombinant protein, inclusion body

## 1P-1p033 *Cupriavidus* 属細菌由来ベンゼンジオキシゲナーゼの発現及び機能解析

○鳥袋 美波<sup>1</sup>, 浜口 慎也<sup>1</sup>, 渡邊 仁<sup>1</sup>, 野口 恵一<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>農工大・機器分析セ)  
 yohda@cc.tuat.ac.jp

ベンゼンによる土壤地下水汚染浄化方法として、微生物によるベンゼン生分解を利用したバイオレメディエーションが期待されている。微生物中で、ベンゼンはまず水酸化され、複数の中間代謝物を経て TCA 回路に取り込まれる。この生分解経路の中で、ベンゼンの水酸化反応を行う触媒酵素がベンゼンジオキシゲナーゼ (BeDO) である。BeDO は、水酸化酵素のオキシゲナーゼと電子伝達酵素のレダクターゼやフェレドキシンから構成され機能していることが分かっているが、詳細な構造や反応機構は不明である。本研究では、ベンゼン分解機構の解明を目指し、当研究室で単離に成功したベンゼン分解活性を持つ *Cupriavidus* 属細菌由来の BeDO 構成因子の機能構造解析を行うことを目的とした。BeDO の構成因子であるオキシゲナーゼ  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニット、レダクターゼ、フェレドキシンを大腸菌で可溶性画分へ発現させ、精製した。各構成因子の活性や機能について、レダクターゼの紫外可視吸光スペクトル測定を行った結果、補因子 FAD の導入と [2Fe-2S] クラスタ形成が確認された。また、NADH にレダクターゼを添加し、NADH の極大吸収 340 nm とレダクターゼの極大吸収 450 nm における吸光度変化を測定した結果、NADH とレダクターゼ間での電子伝達が観察された。さらに BeDO の水酸化活性測定を行ったところ、経時的に増加するピークが検出され、酵素反応によりベンゼンがピロガロールまで水酸化された可能性が考えられた。

### Expression and functional characterization of benzene dioxygenase from *Cupriavidus* sp.

○Minami Shimabukuro<sup>1</sup>, Shinya Hamaguchi<sup>1</sup>, Hisashi Watanabe<sup>1</sup>, Keiichi Noguchi<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Instr. Anal. Center, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** oxygenase, flavoprotein, reductase

## 1P-1p034 アミノ酸モノオキシゲナーゼ変異体の合理的設計

○森 裕太郎, 白井 智量, 近藤 昭彦  
 (理研・バイオマス)  
 akihiko.kondo@riken.jp

植物の光合成によって固定化された CO<sub>2</sub> を炭素源として生産されるバイオマスからの物質生産を可能にするバイオリファインリーは、資源枯渇問題に大きく寄与することから、精力的に研究が進められている技術分野である。これまで、物質生産菌に異種由来の酵素を導入することで、目的化合物の生合成を達成した報告が多くなされている。こうした中で、酵素に改変を加えることにより、新規の人工代謝経路 (野生型酵素では本来基質として認識しない化合物を標的とする触媒反応経路) を構築し、目的化合物を生産する技術の確立が強く望まれている。ここで鍵となるのは、目的とする反応を触媒するような酵素変異体と、如何にして合理的に設計するかとなる。

本研究では、目的化合物として acetonitrile (AcN) に注目し、大腸菌を用いた AcN 生産のための酵素変異体の合理的設計について検討する。標的酵素として、amino acid *N*-monooxygenase (AaNMo) を選択した。AaNMo は特定のアミノ酸に対して水酸化の脱炭酸反応を触媒し、オキシム化合物を生産する酵素である。シアノアミノ酸代謝経路においては、次に脱水酵素によりニトリル化合物へと変換される。この時、alanine を出発基質とすることで、AcN を最終生成物とする人工代謝反応を構築することができる。そこで今回、AcN 生成のための酵素変異体設計として、天然の AaNMo の基質特異性について検討し、活性中心のアミノ酸残基と比較を行った。まず AaNMo をコードする遺伝子を pET22b(+)-vector に挿入し、大腸菌 C41 (DE3) 株へと形質転換を行った。IPTG での誘導後、発現検討を行った。この時、N 末端の膜貫通ドメインを欠損させることで、可溶体として AaNMo を獲得することに成功した。次に得られた AaNMo について、各アミノ酸を基質とした活性測定を行い、ホモロジーモデリングにより作成した立体構造との比較を行った。

### Rational design of engineered amino acid *N*-monooxygenase

○Yutaro Mori, Tomokazu Shirai, Akihiko Kondo  
 (BMEP, RIKEN)

**Key words** P450, acetonitrile, mutants

## 1P-1p035 *Geobacter* 属細菌由来還元的脱ハロゲン化酵素の異種発現系構築と補因子の再構成

○中村 龍貴, 野島 良太, 養王田 正文  
 (農工大院・工)  
 masafumi.yohda@yohda.net

ハロゲン呼吸細菌は、有機ハロゲン化合物の分解によってのみエネルギーを獲得する。このハロゲン化合物の分解を行うのが、還元的脱ハロゲン化酵素 (RDase) である。RDase は、Fe-S クラスタとコリノイドを有する表在性膜タンパク質であることが明らかとなっている。しかしながら、ハロゲン呼吸細菌が嫌気性細菌であり大量培養が困難なことや、RDase の酸素感受性が高く、活性型の RDase の獲得が困難なことから、詳細な研究は進んでない。そこで本研究では、テトラクロロエテン (PCE) 還元的脱ハロゲン化酵素 (PceA) の異種発現系の構築、活性型 PceA 獲得のための補因子再構成法の確立及び PceA の機能解析を試みた。

PCE 分解能を有する微生物混合培養系のメタゲノムから *Geobacter lovleyi* KB1 株由来 *pceA* と高い相同性を有する遺伝子をクローニングし、N 末端側にトリガーファクター融合タグを付加した TF-PceA として大腸菌で発現させた。発現した TF-PceA を尿素変性し、好気条件にて Ni Chelating カラムで精製した。精製産物を嫌気条件下に移し、補因子の添加と尿素の除去を行い、リフォールディングと補因子の再構成を行った。

酵素活性の有無を調べるため、再構成した TF-PceA に PCE (基質/電子受容体) と Ti(III)-citrate (電子供与体) を添加し、ガスクロマトグラフィーで解析した。PCE の減少に伴って、TCE および *cis*-DCE のピークの増加が確認された。また、吸収スペクトルを測定したところ、Fe-S クラスタおよびコリノイドに由来するピークが検出された。このことから、TF-PceA に補因子が結合し、活性が得られた可能性が示唆された。

これは、RDase 及び補因子を有する嫌気性タンパク質の獲得方法のプラットフォームになることが期待される。発表では、RDase の獲得法や機能解析についての最新の結果についても報告する。

### Heterologous expression and cofactor reconstitution of reductive dehalogenase from *Geobacter* sp.

○Ryuki Nakamura, Ryota Nojima, Masafumi Yohda  
 (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** reductive dehalogenase, protein expression, protein refolding, bioremediation

## 1P-1p036 新規抗マラリア薬標的タンパク質、PfERC の結晶化用試料の調製

○平岡 修<sup>1</sup>, 坂本 沙祐里<sup>2</sup>, 洲崎 悦子<sup>1,2</sup>, 杉山 成<sup>3</sup>  
 (就実大・薬,<sup>2</sup>就実大院・医療薬,<sup>3</sup>阪大院・理)  
 hiraoka@shujitsu.ac.jp

マラリアは、ハマダラカの吸血により媒介される *Plasmodium* 属の原虫感染により引き起こされる感染症である。現在、感染地域では薬剤耐性マラリア原虫が発生し、新しい作用機序を有する新規抗マラリア薬の開発が急務となっている。我々は、これまでに環状過酸化構造を有するユニークな新規抗マラリア薬候補化合物 N89 が薬剤耐性原虫にも有効であり、*in vitro*, *in vivo* で優れた抗マラリア活性を示すことを見出し、N89 固定化カラムクロマトグラフィーによりマラリア原虫のライセートから N89 標的タンパク質、PfERC (小胞体局在性カルシウム結合タンパク質) を同定したことをすでに報告した。さらに、X 線結晶構造解析を行う目的で、*E. coli* BL21 株を用いて PfERC をマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として細胞内に発現させたのち、アミロースカラムクロマトグラフィーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、ほぼ単一になるまで精製し、N89 および Ca イオンとの特異的相互作用を観察し報告した。しかしながら、C 末の分解物の混入が精製過程を複雑にし、収率が低下する問題が生じたため、発現条件を精査してきた。今回、C 末分解物の混入を防ぐために N 末端側の MBP タグに加えて C 末端側にも His タグを導入して発現精製を試みたところ、これまで発現産物が単一の単量体 (分子量 40 kDa) として存在していると思われてきたが、実際は 2 種類の単量体の混合物であることが確認された。さらにゲル過解析により単量体のみならず分子量 500 kDa 以上の会合体の存在が確認され、全部で 3 種類の発現産物が存在していることがわかった。そこで、それぞれについて精製および特性解析を行い、結晶化用試料としての良否を考察したのでここに報告する。

### Expression of malarial endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein for crystallization

○Osamu Hiraoka<sup>1</sup>, Sayuri Sakamoto<sup>2</sup>, Etsuko Suzuki<sup>1,2</sup>, Shigeru Sugiyama<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Sch. Pharm., Shujitsu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Clinic. Pharm., Shujitsu Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** protein expression, *Plasmodium falciparum*, crystallization

### 1P-1p037 麹菌由来の両親媒性タンパク質 ハイドロフォービンの機能評価

○安藤 祐人<sup>1</sup>, 中野 宏軌<sup>1</sup>, 石倉 幹大<sup>1</sup>, 陶山 友彰<sup>2</sup>, 藤田 夏美<sup>2</sup>, 中島 春紫<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>明治大院・農, <sup>2</sup>明治大・農)  
harushi@isc.meiji.ac.jp

ハイドロフォービンは、糸状菌・担子菌が生産する両親媒性の分泌タンパク質であり、気液界面において自己集合し、強固な重合体を形成する。分子量は8-15 kDaと低分子量であり、特徴的なパターンで保存された8つのCys残基を有するが、アミノ酸配列のパターンは多様であり、さまざまな機能が見出されている。ハイドロフォービンは物質表面のぬれ性の変換、各種物質を乳化・相間移動させるバイオサーファクタントとしての利用、免疫回避能を活用した薬剤輸送など、さまざまな応用利用が期待されている。

これまでに筆者らは、麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン *hypA-D* について解析を行っており、気中菌糸または分生子に部位特異的に発現することを明らかにしている。一般にハイドロフォービンは強い吸着性のため大量生産・精製が困難である。そこで筆者らが独自に構築したタンパク質高生産の麹菌宿主を用い、各種のハイドロフォービン遺伝子を発現させることにより生産・精製を試みた。得られた精製タンパク質について、ハイドロフォービンとしての機能性の評価・比較を行ったので報告する。

#### Functional analysis of Hydrophobins: amphiphilic protein produced by *Aspergillus oryzae*.

○Yuto Ando<sup>1</sup>, Hiroki Nakano<sup>1</sup>, Kandai Ishikura<sup>1</sup>, Tomoaki Suyama<sup>2</sup>, Natsumi Fujita<sup>2</sup>, Harushi Nakajima<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>2</sup>Sch. Agric., Meiji Univ.)

**Key words** hydrophobin, biosurfactant, *Aspergillus oryzae*

### 1P-1p038 小胞体内在分子シャペロン Calnexin と PDI ファミリータンパク質間相互作用の解析

○中尾 仁美, 迫野 昌文  
(富山大院・理工)  
msakono@eng.u-toyama.ac.jp

【背景と目的】分子シャペロン calnexin (CNX), calreticulin (CRT) は小胞体内でのタンパク質品質管理機構における中心的なタンパク質として知られている。CNX, CRT は PDI (Protein disulfide isomerase) ファミリータンパク質である ERp57 と複合体を形成し、協同的に糖タンパク質フォールディングの補助を行うと考えられているが、近年、ERp57 以外のタンパク質と分子シャペロンが相互作用することが複数報告された。本研究では、CNX と相互作用を行う PDI ファミリータンパク質の探索を目的とし、相互作用解析に向けた網羅的スクリーニング法の開発を行った。

【方法】PCR 及び制限酵素を用いて HaloTag 融合 CNX (Halo-CNX) プラスミドベクターを作製した。大腸菌による Halo-CNX 融合タンパク質の発現、及び、ヒスタグ精製を行い、HaloTag タンパク質の固定場となる Halo リガンドを有するセファロースビーズ (粒子) を用いて Halo-CNX 固定粒子を作製した。同様に CNX を融合していない HaloTag タンパク質を固定した粒子を調製し、コントロールとして用いた。Halo-CNX 粒子を用いたプルダウン実験を、ERp57 及び PDI タンパク質を用いて行った。プルダウン後、溶液から単離した粒子に結合した ERp57, PDI を SDS-PAGE で評価した。

【結果と考察】プルダウン実験の結果、ERp57 では CNX 固定粒子においてのみ ERp57 の推定分子量位置にバンドが認められた一方、PDI においてはバンドが示されなかった。このことから、ERp57 は CNX と相互作用し、PDI は相互作用しないことが示唆された。いずれの結果も既報と一致しており、スクリーニング手段としての融合タンパク質によるプルダウンは有効であると考えられる。今後、他の PDI ファミリータンパク質に適応し、網羅的相互作用解析を行っていく。

#### Analysis of protein-protein interaction between ER chaperone calnexin and PDI family protein.

○Hitomi Nakao, Masahumi Sakono  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** Calnexin, Protein disulfide isomerase, ERp57, Protein-protein interaction

### 1P-1p039 *Lactococcus lactis* における高温下での Cit 生産メカニズムの解明

○山本 恵理, 渡部 玲子, 古市 圭介, 浅見 幸夫  
(明治・食機能科学研)  
eri.yamamoto@meiji.com

【背景】*Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) は、アルギニン (Arg) を細胞内に取り込み、シトルリン (Cit) を経てオルニチン (Orn) を生産するアルギニンデヒドロゲナーゼ経路を有し、生育至適温度では、ほとんどの株が培地中の Arg を Orn に変換する。一方、*Lc. lactis* を生育に適さない高温下で培養すると、多くの株は Arg の代謝能自体が低下するものの、一部の株は Cit を高濃度に生産することを確認している。しかし、この一部 *Lc. lactis* 株で見られる高温下での Cit 生産メカニズムは明らかになっていない。

【目的】*Lc. lactis* における高温下での Cit 生産メカニズムを解明する。

【方法】(1)高温下での Cit 生産能が高い株と低い株について、アルギニンデヒドロゲナーゼ経路に関わる酵素の遺伝子を解読し、推定されるアミノ酸配列を比較した。(2)高温下における細胞膜の状態を、蛍光色素である SYTOX green を用いて検証した。(3)高温下での Cit 生産能が低い株にナイシンを添加し、Cit 生産能の変化を検証した。(4)高温下での Cit 生産能が高い株について、ナイシン遺伝子の欠損株を作出した。

【結果】(1)高温下での Cit 生産能と、アルギニンデヒドロゲナーゼ経路に関わる酵素のアミノ酸配列に、関連性は確認出来なかった。(2)高温下での Cit 生産能が高い株の細胞膜に、高温下でのみ孔が形成されることを確認した。(3)ナイシンの添加により、Cit 生産能が向上した。(4)ナイシン遺伝子の欠損により、高温下での高 Cit 生産能が失われた。

【結論】一部の *Lc. lactis* における高温下での高い Cit 生産能は、自身の生産するナイシンによって細胞膜に孔が形成され、その孔を介して Cit が細胞外に拡散することで生じることが示された。

#### Elucidation of the mechanism of L-Citrulline production by *Lactococcus lactis* under high temperature

○Eri Yamamoto, Reiko Watanabe, Keisuke Furuichi, Yukio Asami  
(Food Sci. Res. Lab. R&D Div. Meiji Co., Ltd)

**Key words** *Lactococcus lactis*, nisin, gene knockout, amino acid

### 1P-1p040 新たな芳香族アミン化合物の発酵生産系の構築

○生井 智仁<sup>1</sup>, 榊尾 俊介<sup>2</sup>, 茂本 亮輔<sup>1</sup>, 高谷 直樹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生命環境系)  
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景】芳香環にアミノ基が直接結合した芳香族アミン化合物は、ポリイミドなど的高性能ポリマーの原料となることから、産業上有用な化合物である。これらを植物バイオマス原料として発酵生産することができれば、脱石油型、循環型社会の構築に貢献すると期待される。しかし、芳香族アミン化合物は一般に微生物に対する毒性が強いことが知られており、微生物により生産できるものはまだ少ない。本研究では、これらの化合物の発酵生産系の構築を目指しており、これまでに種々の芳香族アミン化合物を、微生物を用いて生産することに成功してきた。本研究では、発酵生産が可能な芳香族アミン化合物の種類を増やすことにより、バイオポリマーの産業上での利用可能性をさらに高めることを目的とする。

【方法・結果】*Pseudomonas fluorescens* が持つ *papABC* は、芳香族アミン化合物の一種である 4-アミノフェニルアラニン(4-APhe)の生産に関わる遺伝子であることを示した。この遺伝子を発現させた大腸菌に、さらに、各種の aromatic amine decarboxylase, phenylpyruvate decarboxylase 遺伝子を導入したところ、グルコースを原料として 4-aminophenylethylamine や 4-aminophenylacetate といった芳香族アミンを生産することができた。また、4-APhe の代謝に関与すると推定される機能未知の遺伝子を *papABC* を発現させた大腸菌に導入し、得られた組換え大腸菌を、4-APhe 生産条件下で培養した。この培養液を HPLC を用いて分析したところ、*papABC* のみを発現させた大腸菌では見られない化合物が含まれていた。この化合物は新規の 4-APhe 誘導体であると期待される。

#### Construction of the bacterial fermentation system for new aromatic amine compound

○Tomohito Namai<sup>1</sup>, Shunsuke Masuo<sup>2</sup>, Ryosuke Shigemoto<sup>1</sup>, Naoki Takaya<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Faculty of Life & Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** aromatic amine, fermentation, biopolymer

## 1P-1p041 コリスミ酸ビルビン酸リアーゼ発現コリネ型細菌を用いたプロトカテク酸の生産

○岡井直子<sup>1</sup>, 三好孝則<sup>2</sup>, 竹嶋康誠<sup>1</sup>, 田中耕生<sup>3</sup>, 吉田健一<sup>1</sup>, 桑原広明<sup>2</sup>, 荻野千秋<sup>4</sup>, 近藤昭彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大・科技, <sup>2</sup>帝人, <sup>3</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>4</sup>神戸大院・工) okai@port.kobe-u.ac.jp

**[目的]** 化石資源は有限であり、化成品原料・プラスチック原料のバイオマスからの生産が望まれる。本研究ではポリマー原料となる芳香族化合物を、糖を原料として微生物発酵生産することを目的とし、プロトカテク酸 (3,4-ジヒドロキシ安息香酸, PCA) の生産を行った。PCA は化成品やポリマーの原料、抗酸化剤として有用な化合物である。PCA はコリネ型細菌において4-ヒドロキシ安息香酸から変換され有機酸へと代謝されるが本来菌体外生産はされない。そこでコリスミ酸から4-ヒドロキシ安息香酸への反応を触媒するコリスミ酸ビルビン酸リアーゼ (CPL) をコリネ型細菌芳香族アミノ酸生産株に導入し、糖からコリスミ酸を経るプロトカテク酸の生産系を構築した<sup>(1)</sup>。今回グルコースの逐次添加による PCA 発酵生産について報告する<sup>(2)</sup>。

**[方法と結果]** 大腸菌由来コリスミ酸ビルビン酸リアーゼ遺伝子 (ubiC) を *C. glutamicum* Phe 生産株 (ATCC21420) に導入した F(UbiC)株を用いた。本株をグルコースを用い 30℃ で好氣的に培養し、24 時間毎にグルコースを添加して菌体外の芳香族化合物を定量した。また宿主株についてゲノム部分配列を決定し PCA 代謝経路について解析を行った。*C. glutamicum* F(UbiC)株は pH7.5 において 50g/l グルコースから 615mg/l の PCA を生産した。フェドバッチ反応では 50g/l グルコースの初期添加により 24 時間で 550mg/l、その後 24 時間毎の糖添加により 117g/l グルコースから 1140mg/l の PCA を 96 時間で生産した。また宿主株は単独で PCA を生産することができ、ゲノム上には PCA 代謝クラスターが保存されていたが取り込み系の変異が示唆された。

**[謝辞]** 本研究は文部科学省先端融合プログラム「バイオプロダクション次世代農工連携拠点」の一環として行われたものである。

- 1) 第 65 回大会要旨集(1P-117).  
2) Appl. Microbiol. Biotechnol., 100(1), 135-145(2016).

### Production of Protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing Chorismate:pyruvate lyase

○Naoko Okai<sup>1</sup>, Takanori Miyoshi<sup>2</sup>, Yasunobu Takeshima<sup>1</sup>, Kosei Tanaka<sup>3</sup>, Ken-ichi Yoshida<sup>1</sup>, Hiroaki Kuwahara<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>4</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Kobe Univ., <sup>2</sup>Teijin Ltd., <sup>3</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, protocatechuic acid, chorismate pyruvate lyase

## 1P-1p042 酢酸発酵における酢酸菌の膜結合型アルデヒド脱水酵素 AldFGH の役割

○福成聖也<sup>1</sup>, 新納俊<sup>1</sup>, 児玉知大<sup>1</sup>, 松谷峰之介<sup>2</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師寿治<sup>1,2,3</sup>, Theeragool Gunjana<sup>4</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学, <sup>3</sup>山口大・中高温微セ, <sup>4</sup>カセサート大・理) seiya.41.21@gmail.com

**[目的]** 酢酸発酵は酢酸菌によるエタノールの酸化によっておこなわれる。生化学的な解析から、この過程は、酢酸菌の細胞質膜に存在する 2 つの膜結合型酵素、アルコール脱水酵素 (ADH) と *aldFGH* 遺伝子にコードされるアルデヒド脱水酵素 (ALDH) によって触媒される連続的な酸化反応によると考えられている。すなわち ADH によってエタノールがアセトアルデヒドに酸化され、ALDH によってアセトアルデヒドが酢酸に酸化されると考えられるが、遺伝学的な証拠は乏しい。私たちはその膜結合型 ALDH に着目し、遺伝学的また生理学的な解析を行った。

**[方法・結果]** *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株の ALDH の触媒サブユニットをコードする *aldH* 遺伝子破壊株を構築した。この株はエタノールを含まない培地において対照株と同様の生育を示したが、エタノールを含む酢酸発酵条件下での生育が悪く、酢酸の生成が著しく低下した。*aldH* 遺伝子をプラスミドで相補することで、生育や酢酸発酵能は回復した。*aldH* 株の細胞懸濁液のオキシダーゼ活性は対照株と差がなく、細胞膜懸濁液のオキシダーゼ活性は、*aldH* 株は対照株に比べわずかに低下した。第 2 の ALDH 遺伝子の存在が示唆され、本菌のゲノム情報を精査したところ、*aldFGH* とは別の ALDH として *aldSLC* 遺伝子を見出した。*aldH* 株と対照株の細胞膜懸濁液を用いアセトアルデヒドに対する親和性を調べたが差は見られなかった。しかし、酢酸発酵条件下と非酢酸発酵条件下で生育させた対照株では、アセトアルデヒドに対する親和性に差が見られた。酢酸発酵条件下では AldFGH が、非酢酸発酵条件下では AldSLC が主要な ALDH となること示唆され、両条件下での *aldFGH* と *aldSLC* の転写量を RT-PCR により調べた。*aldFGH* に変化は見られず、*aldSLC* の転写産物が酢酸発酵条件下で低下したため、上記の仮説を支持する結果を得た。

### Role of a membrane-bound aldehyde dehydrogenase in the acetic acid fermentation with *Acetobacter* sp

○Seiya Fukunari<sup>1</sup>, Shun Nina<sup>1</sup>, Tomohiro Kodak<sup>1</sup>, Minenosuke Matsutani<sup>2</sup>, Nagoya Kataoka<sup>1,2,3</sup>, Toshiharu Yakushi<sup>1,2,3</sup>, Gunjana Theeragool<sup>4</sup>, Kazunobu Matsushita<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>RCTMR, Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>Fac. Sci., Kasetsart Univ.)

**Key words** *Acetobacter pasteurianus*, aldehyde dehydrogenase, vinegar fermentation

## 1P-1p043 *Corynebacterium glutamicum* の耐熱性における浸透圧の影響

○村田 龍太郎<sup>1</sup>, Nawarat Nantapong<sup>2</sup>, 松谷 峰之介<sup>1</sup>, 片岡 尚也<sup>1,3,4</sup>, 薬師 寿治<sup>1,3,4</sup>, 松下一信<sup>1,3,4</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>スラナリー工科大, <sup>3</sup>山口大・農, <sup>4</sup>山口大・中高温微セ) kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

**[背景と目的]** *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸やリジンなどのアミノ酸生産菌として知られており、産業的なアミノ酸発酵に広く利用されている。このアミノ酸発酵を行う際、発酵熱や機械熱、外気温の上昇に伴い発酵槽内の温度上昇が引き起こされるが、この温度上昇は菌の生育や生産効率の低下を招く。そこで耐熱性を有する菌株を用いることで、生産の安定や冷却コストの削減などが期待できる。我々は耐熱性を有する菌株の育種と耐熱性機構の解明を目指しており、これまでにタイで分離された耐熱性株の有効利用<sup>1)</sup>、活性酸素種の抑制因子(酵素)の重要性<sup>2)</sup>について報告している。今回、*C. glutamicum* の耐熱化、さらに高温生育と浸透圧との関係を解析した。

**[方法と結果]** *C. glutamicum* の標準株である KY9002 株を高温適応育種することにより、その生育限界温度が 2℃ 上昇した耐熱化株 c-2D 株を獲得した。この野生株と耐熱化株において、培地中へのカリウムやソルビトールなどの浸透圧物質の添加による影響を検証したところ、共に高温での生育の向上が確認された。また、タイで単離された耐熱性をもつ N24 株及び温度感受性の KY9714 株においても同様の結果が得られた。さらに高温生育時の細胞内カリウム濃度を測定すると、低浸透圧(通常培養)下で KY9002 株は温度上昇に伴い細胞内カリウム濃度の低下が確認されたが、c-2D 株では維持されていた。一方、高浸透圧条件下では KY9002 株においても細胞内カリウム濃度が高く維持されていたことが示された。以上の結果から、高温での生育低下の一因が少なくとも細胞内カリウムイオンの流出に起因しており、その流出を防ぐことで耐熱性を獲得していることが示唆された。現在、高温生育時におけるカリウムイオン流出の要因について解析を進めている。

- 1) 農芸化学会(2015), 2A21p14, 2) 生物工学会(2014), 1p-114

### Effect of osmotic pressure on thermo-tolerance in *Corynebacterium glutamicum*

○Ryutaro Murata<sup>1</sup>, Nantapong Nawarat<sup>2</sup>, Minenosuke Matsutani<sup>1</sup>, Naoya Kataoka<sup>1,3,4</sup>, Toshiharu Yakushi<sup>1,3,4</sup>, Kazunobu Matsushita<sup>1,3,4</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Suranaree Univ Tech., <sup>3</sup>Fac. Agric., Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>RCTMR, Yamaguchi Univ.)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, thermo-tolerance, osmotic pressure, potassium

## 1P-1p044 アミノ酸と C<sub>4</sub>-ジカルボン酸が酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の耐熱性に与える影響

○中西 里菜<sup>1</sup>, 松谷 峰之介<sup>1</sup>, 片岡 尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師 寿治<sup>1,2,3</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>山口大・農, <sup>3</sup>山口大・中高温微セ) nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

**[背景と目的]** 耐熱性の微生物は発酵生産時の温度制御の管理の簡便化や冷却コストの削減等が見込まれ、発酵産業への貢献が期待される。食酢生産に利用可能な酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 は 37℃ でも酢酸を生産し、蓄積された酢酸に対して耐性を持つ。我々は以前、SKU1108 株の高温適応育種を酢酸発酵条件下で行い、3 つの耐熱化株を取得した。特に 38.5℃ から段階的に温度を上げて適応育種し、40℃ で単離された TH-3 株は、高温での酢酸発酵能が優れていた。次世代シーケンサーにより、取得された耐熱化株 TH-3 の変異を解析し、少なくともアミノ酸輸送体、C<sub>4</sub>-ジカルボン酸輸送体とウリジリル転移酵素 PII の遺伝子に起こった変異が耐熱性に関与することが判明した(1)。本研究では、TH-3 に生じていた変異と耐熱性獲得機構との関連を理解するために、アミノ酸や C<sub>4</sub>-ジカルボン酸の培地への添加が本菌に与える影響を調べた。

**[方法と結果]** 終濃度 0.2% の 19 種アミノ酸、0.1% チロシン、そして 10 mM C<sub>4</sub>-ジカルボン酸をそれぞれ添加した培地を用いて、酢酸発酵条件下、37℃、40℃ において、SKU1108 の振とう培養を行った。コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、Gln, Arg, Ala, Asp, Asn, Thr, Lys, His の添加が高温で SKU1108 の生育と酢酸生成能を向上させた。そのなかでも、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、Gln, Arg, Ala, Asp は、高温での生育を TH-3 並みに上昇させた。現在、高温での生育を向上させたアミノ酸、C<sub>4</sub>-ジカルボン酸を対象に、本研究で耐熱性への関与が明らかとなっている輸送体との関係を調査している。また、対象としているアミノ酸、C<sub>4</sub>-ジカルボン酸がどのような機構で耐熱性に寄与するかを明らかにすべく、発酵時における代謝産物の変化を解析している。

### 引用文献

- (1) Matsutani et al. (2013), J. Biotech., 165, 109-119.

### Effect of amino acids and C<sub>4</sub>-dicarboxylates on thermotolerance of *Acetobacter pasteurianus*

○Rina Nakanishi<sup>1</sup>, Minenosuke Matsutani<sup>1</sup>, Naoya Kataoka<sup>1,2,3</sup>, Toshiharu Yakushi<sup>1,2,3</sup>, Kazunobu Matsushita<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>RCTMR, Yamaguchi Univ.)

**Key words** *Acetobacter pasteurianus*, thermal adaptation, fermentation, thermotolerance

### 1P-1p045 酸素抑制条件下におけるコリネ型細菌の糖消費速度と細胞内酸化還元レベルの相関

○柘植 陽夫<sup>1,2</sup>, 植松 君夫<sup>1</sup>, 山本 吾吾<sup>1</sup>, 須田 雅子<sup>1</sup>, 乾 将行<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>RITE, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>奈良先端大・バイオ)  
 inui@rite.or.jp

コリネ型細菌はアミノ酸生産菌として工業的に広く利用されているグラム陽性細菌である。本菌は酸素抑制条件下で反応することで著量の有機酸を生産し、代謝工学的改変を施すことにより、各種アミノ酸も高生産する。物質生産においては目的産物の収率に加えて、原料の消費速度も重要なファクターである。本研究では酸素抑制条件下におけるグルコース消費速度の向上を目的に、グルコース消費速度と細胞内の酸化還元レベルとの関係を調べた。初めに添加することでグルコース消費速度が向上するピルビン酸や炭酸水素ナトリウムを加えると、細胞内の NADH/NAD<sup>+</sup> 比は著しく低下した。次に様々なグルコース消費速度を示す、野生株や各種遺伝子 (Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), Lactate dehydrogenase (LDH), Malate dehydrogenase (MDH)) の欠損株の NADH/NAD<sup>+</sup> 比を測定したところ、グルコース消費速度と逆相関の関係を示した。そこで NADH/NAD<sup>+</sup> 比を強制的に低下させるため、NADH dehydrogenase 遺伝子 (*ndh-II*) をそれぞれの株で高発現したところ、野生株、PEPC 遺伝子欠損株と MDH 遺伝子欠損株で NADH/NAD<sup>+</sup> 比の低下とともに、グルコース消費速度がそれぞれ 26%、28%、230%増加した。LDH 遺伝子欠損株では NADH/NAD<sup>+</sup> 比は低下したが、顕著なグルコース消費速度の向上は見られなかった。最後に大規模な代謝改変をして作製した乳酸高生産株でも同様に *ndh-II* の高発現を行った結果、グルコース消費速度は 8%増加し、それに伴い乳酸生産量も 7%増加した。本手法は酸素抑制条件下におけるコリネ型細菌の物質生産において、グルコース消費速度を向上させるための汎用的な利用が期待できる。

#### Glucose consumption rate critically depends on redox state in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation

○Yota Tsuge<sup>1,2</sup>, Kimio Uematsu<sup>1</sup>, Shogo Yamamoto<sup>1</sup>, Masako Suda<sup>1</sup>, Masayuki Inui<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>RITE, <sup>2</sup>InFiniti, Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAISt)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, Redox state, Glucose consumption rate, NADH dehydrogenase

### 1P-1p046 PHB 蓄積時の Halomonas sp. KM-1 の代謝物解析

○松下 功<sup>1</sup>, 盤若 明日香<sup>1</sup>, 西村 拓<sup>1</sup>, 坪田 潤<sup>1</sup>, 河田 悦和<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>大阪ガス, <sup>2</sup>産総研)  
 imatsu@osakagas.co.jp

(目的) Halomonas sp. KM-1 は、好気条件下で PHB を蓄積し、酸素供給を制限することで PHB を 3-ヒドロキシ酪酸に分解し、菌体外に放出する。私達は、Halomonas sp. KM-1 が PHB を蓄積する際の菌体内の代謝の挙動を明らかにする目的で、代謝物を網羅的に調べた。  
 (方法) 培養は 3L フェルメンターを用いて、炭素源としてグルコース、窒素源として硝酸、もしくは尿素を用いて、流加培養により約 30 時間培養を行った。培養開始から継続的にサンプリングを行い、菌体を破砕後、菌体内物質を抽出して、GC-MS により分析を行った。  
 (結果) 好気条件下で PHB が徐々に蓄積するにつれて、4-アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン酸の蓄積が顕著に見られ、Halomonas sp. KM-1 は、TCA 回路の  $\alpha$  ケトグルタル酸から分岐する GABA 回路を保有することがわかった。Halomonas sp. KM-1 は、窒素源の欠乏条件下で PHB を生産することが知られているが、窒素源の NH<sub>3</sub> が 4-アミノ酪酸、グルタミン酸として蓄積して NH<sub>3</sub> の生体利用が抑制されることで、PHB の蓄積が引き起こされることが示唆された。

#### Metabolite analysis of Halomonas sp. KM-1 accumulating PHB

○Isao Matsushita<sup>1</sup>, Asuka Hannya<sup>1</sup>, Taku Nishimura<sup>1</sup>, Jun Tubota<sup>1</sup>, Yoshikazu Kawata<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Osaka Gas Co., Ltd., <sup>2</sup>AIST)

**Key words** *Halomonas*, poly(3-hydroxybutyrate), GABA, L-glutamate

### 1P-1p047 Thermophilic ethanol fermentation by genetically engineered *Moorella thermoacetica*

Rahayu Farida, Auto Kawai, Yuki Iwasaki, Akihisa Kita, Takahisa Tajima, Junichi Kato, ○Yutaka Nakashimada  
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)  
 nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

The use of thermophilic bacteria for ethanol fermentation will facilitate the recovery of ethanol, since aqueous ethanol readily vaporizes at temperatures above 50 °C, making possible continuous distillation of ethanol. Furthermore, thermophilic bacteria have higher growth and metabolic rates than mesophilic bacteria, and the risk of microbial contamination is lower. In this context, since thermophilic acetogen *Moorella* spp can grow at 55 ~ 60 °C and ferments 1 mol of glucose to 3 mol of acetate, *Moorella* spp. are promising candidates for thermophilic ethanol fermentation. Thus we attempted to construct ethanol transformants of *Moorella thermoacetica*. Ethanol was produced from acetyl-CoA in a two-step reaction by aldehyde dehydrogenase (ALDH) and alcohol dehydrogenase. However, the activity of ALDH was extremely low in *M. thermoacetica*. Furthermore, most of acetyl-CoA is converted to acetate by phosphotransacetylase and acetate kinase. Therefore, to delete the acetate pathway and enhance the ALDH, 2 phosphotransacetylase genes (*pdu11*, 2) were disrupted and promoter enhanced *aldh* (aldehyde dehydrogenase gene) was inserted on the genome by homologous recombination. Consequently, we successfully constructed ethanol transformants of *M. thermoacetica*. The transformants ( $\Delta$ *pdu11::aldh*) ferments 120 mM glucose to 210 mM ethanol (ethanol yield was 87.5 %) in 72 h at 55 °C in batch culture. Furthermore, we succeeded thermophilic ethanol fermentations with distillation in fed-batch culture.

#### Thermophilic ethanol fermentation by genetically engineered *Moorella thermoacetica*

Rahayu Farida, Auto Kawai, Yuki Iwasaki, Akihisa Kita, Takahisa Tajima, Junichi Kato, ○Yutaka Nakashimada  
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** ethanol fermentation, thermophilic, biomass, acetate

### 1P-1p048 根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* における D-ピペコリン酸代謝経路の解析

○堀木 雅文, 日比 慎, 高橋 里美, 小川 順  
 (京大院・農)  
 ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

環状イミノ酸であるピペコリン酸はタンパク質非構成性であるが、自然界に広く分布していることが知られている。また、その誘導体として抗生物質など様々な生理活性物質が知られており、これらの物質の生合成におけるピペコリン酸の変換経路に関する研究が行われている。さらにエナンチオマーである L-ピペコリン酸と D-ピペコリン酸に関して生理的な役割の違いも示唆されている。この様に自然界におけるピペコリン酸代謝を解明することは生理学的に重要な意義がある。L-ピペコリン酸の代謝に関しては、L-2-アミノアジピン酸を経由してグルタミン酸に至る経路が詳細に解析されている。これに対して、D-ピペコリン酸は根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* によって分解されることが報告されているが、その代謝経路や関連酵素は未だに解明されていない。本研究において根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 株が D-ピペコリン酸を単一炭素源として生育することを見出した。また、PLP 阻害剤としてアミノオキシ酢酸を添加した休止菌体反応においては、D-ピペコリン酸より変換された 2-アミノアジピン酸が蓄積することが観察された。ゲノム配列解析結果から USDA110 株は既知の L-ピペコリン酸代謝関連酵素を保持しておらず、今回発見された D-ピペコリン酸代謝は新規酵素群により行われている可能性が高いと考えられる。現在、USDA110 株における D-ピペコリン酸代謝関連酵素を特定することを目的として研究を進めている。

#### D-Pipecolic acid metabolism in a leguminous bacteria *Bradyrhizobium diazoefficiens*

○Masafumi Horiki, Makoto Hibi, Satomi Takahashi, Jun Ogawa  
 (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** D-pipecolic acid, leguminous bacteria, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, D-amino acid

## 1P-1p049 *Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸過酸化能発現メカニズム

○佐々木 大樹<sup>1</sup>, 石川 森夫<sup>1</sup>, 鈴木 敏弘<sup>1</sup>, 今井 健太郎<sup>1</sup>, 吉田 将也<sup>1</sup>, 山本 有紀<sup>1</sup>, 松原 拓哉<sup>1</sup>, 兼崎 友<sup>2</sup>, 吉川 博文<sup>2,3</sup>, 貝沼 (岡本) 章子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京農大・応生科・醸造, <sup>2</sup>東京農大・ゲノムセ, <sup>3</sup>東京農大・応生科・バイオ)  
okamoto@nodai.ac.jp

【目的】食酢醸造用酢酸菌 *Acetobacter aceti* および *Acetobacter pasteurianus* は、いずれも生じた酢酸を菌体内で完全酸化する酢酸過酸化能を示す。その一方で、両種の基幹代謝経路は大きく異なっており、過酸化時の代謝経路も両者で異なっている可能性が示唆された。演者らはこれまでに、TCA サイクルにおいてスクシニル-CoA からコハク酸への変換をバイパスするアセチル-CoA ヒドロラーゼ (AarC) が、両種に共通して酢酸過酸化に重要な役割を有することを明らかにしている。<sup>1)</sup>今回、その他の TCA サイクル周辺経路の関与について検討を行い、*Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸過酸化のメカニズムに関する知見を得たので報告する。

【方法および結果】*A. aceti* および *A. pasteurianus* について、エタノール培養時における基幹代謝経路構成因子の転写挙動解析を RNA-seq 法で行った。その結果、AarC と同様に、酢酸のアセチル CoA への変換に関与するアセチル-CoA シンターゼ (Acs) が、両種ともに酢酸過酸化時に高発現することを確認した。しかし、本因子の破壊株について、エタノール存在下での生育挙動を比較したところ、両種ともに *aarC* の破壊で見られたような酢酸過酸化能の欠失<sup>2)</sup>は示さなかった。以上より、*Acetobacter* 属酢酸菌については、Acs は共通して酢酸過酸化時に高発現するものの、過酸化能発現においては AarC が第一義的な役割を担っていることが強く示唆された。

1) 今井ら (2015) 第 67 回日本生物工学会 講演要旨集, pp. 121.

## Study on acetate overoxidation mechanism in the genus *Acetobacter*

○Daiki Sasaki<sup>1</sup>, Morio Ishikawa<sup>1</sup>, Toshihiro Suzuki<sup>1</sup>, Kentaro Imai<sup>1</sup>, Masaya Yoshida<sup>1</sup>, Yuki Yamamoto<sup>1</sup>, Takuya Matsubara<sup>1</sup>, Yu Kanesaki<sup>2</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>2,3</sup>, Akiko Okamoto-Kainuma<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., <sup>2</sup>Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., <sup>3</sup>Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

**Key words** *Acetobacter*, acetic acid fermentation, acetate overoxidation, acetyl-CoA synthetase

## 1P-1p050 静置発酵で醸造した米酢に含まれるポリアミン類

○加藤 彩織<sup>1</sup>, 赤坂 直紀<sup>2</sup>, 石井 友理<sup>1</sup>, 佐古田 久雄<sup>2</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>関西学院大院・理工, <sup>2</sup>マルカン酢)  
fujiwara-s@kwansai.ac.jp

ポリアミン(PA)は、老化抑制、抗炎症作用、記憶・学習改善等の生理活性作用を有している。特に、哺乳類において大・小腸では正常な腸管機能を維持する上で極めて重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。しかし大腸腸管内 PA 濃度は加齢に伴い減少し、その結果炎症性疾患のリスクが著しく高まるため、腸管内の PA 濃度の適正化は老年期における QOL の向上において必須である。PA は日本の伝統的な発酵食品に高濃度で含まれる事が知られており<sup>2)</sup>、日本人が長寿たる所以と考えられる。PA の高蓄積には、原料となるタンパク質源や種々の発酵食品生産微生物の代謝と相関があると考えられる。我々は日本の伝統調味料である食酢に注目し、様々な食酢の PA 成分を調べた。特に食酢製造に関与する原料と微生物が PA 成分に与える影響を精査した。発酵方法では通気発酵法と静置発酵法の違いに注目した。さまざまな食酢の PA 成分を、高速液体クロマトグラフ及びガスクロマトグラフを用いて行い検証したところ、特に静置発酵法による米酢に PA が著量含まれていた。分析に供した米酢の中にはアグマチンを高含有する事例も認められた。米酢製造では、黄麹菌による原料米の液化・糖化、出芽酵母によるアルコール発酵及び酢酸菌による酢酸発酵の工程が必要である。伝統的な静置発酵で醸造された米酢には独特な風味があり、PA 特有のアミン臭は顕在化しない。今回の結果は静置発酵法で作られた米酢の機能性食品としての可能性を示す。

1) Kibe et al. 2014. Sci.Rep 4:4548.

2) Okamoto et al. 1997. Biosci. Biotech. Biochem. 61:1582-1584.

## Highly-concentrated agmatine and other polyamines contained in the rice vinegar

○Saori Kato<sup>1</sup>, Naoki Akasaka<sup>2</sup>, Yuri Ishii<sup>1</sup>, Hisao Sakoda<sup>2</sup>, Shinsuke Fujiwara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansai Gakuin Univ., <sup>2</sup>Marukan Vinegar Co., Ltd.)

**Key words** polyamine, agmatine, rice vinegar, *Acetobacter pasteurianus*

## 1P-1p051 ブタノール生産菌におけるリファンピシン耐性変異株の特性解析

○信木 公介, 清 啓自, 川嶋 草平, 門倉 利守, 鈴木 健一郎, 中山 俊一  
(東農大院・農)  
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】ブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 の至適発酵温度は 30℃でありそれ以上の培養温度ではブタノール生成量が著しく低下するが、RNA ポリメラーゼ阻害剤であるリファンピシン耐性を指標としより高温域でも発酵可能な変異株 RIFR91 株 (以下 RIFR91) を取得している。稲わらを基質としてセルロース分解菌と RIFR91 を混合培養したところ、高温域での発酵能を獲得するとともに、RIFR91 は親株である N1-4 と比較して 1.5 倍高いブタノール生成量 (9.6 g/L) を示した。本研究では、この向上したブタノール生産量の原因を解明することを目的とした。

【方法・結果】グルコースを炭素源とした TYA 培地において 30℃で 24 時間培養した培養上清を限外濾過により粗酵素を取得した。RIFR91 のタンパク濃度は親株よりも 1.6 倍高くタンパクの分泌量が多いことが示唆された。得られた粗酵素に対して、稲わら分解に関与する xylanase, xylo-glucanase, exo-glucanase 活性を測定したところ、RIFR91 の活性はそれぞれ 1.5、1.3、10.2 倍高かった。粗酵素を LC-MS/MS によるショットガン解析に供した結果、β-xylanase, β-glucanase, glycosyl hydrolases family 39 と推定されるタンパク等が RIFR91 においてのみ検出された。以上の結果より、RIFR91 の混合培養におけるブタノール生成量の向上は、ヘミセルラーゼやセルラーゼ分泌量の向上に起因していることが示唆された。

## Characterization of rifampicin resistant mutant of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4

○Kosuke Nobuki, Keiji Kiyoshi, Souhei Kawasima, Toshimori Kadokura, Kenitiro Suzuki, syuniti Nakayama  
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

**Key words** cellulase, mutant, butanol, *Clostridium*

## 1P-1p052 *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産における最適培養系の構築

○野中 大輔<sup>1</sup>, 森田 峻秀<sup>2</sup>, 清 啓自<sup>2</sup>, 中島 敏明<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境)  
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【目的】現在、化石燃料の代替燃料として、バイオディーゼル燃料 (以下 BDF) が注目されている。しかし、BDF 生産の副産物である廃グリセロールは、廃棄物としてコストをかけて処分されている。そこで、BDF の利用性向上のために、微生物による廃グリセロールを基質とした 1,3-プロパンジオール (以下 1,3-PD) 発酵生産を検討した。1,3-PD は、近年ポリエステルや化粧品原料などとして需要が高まっており、今後大きな市場になると予測されている。これまでに、当研究室はグリセロール資性 1,3-PD 高生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株を取得している。本研究では、この TB-96 株の 1,3-PD 生産性の向上を目的とし、培養系の構築、及び最適培養条件の検討を行った。

【結果】先行研究において、TB-96 株は温度 30℃、pH8、純グリセロール逐次添加が 1,3-PD 生産の最適条件であるとわかっていて、上記の条件で培養を行い、48 時間で 51.1 g/l の 1,3-PD 生産を達成した。また、このとき 15 時間で最大 2.67 g/l/h と高い 1,3-PD 生産性を示した。更なる 1,3-PD 生産性の向上を目的として、これまで検討をしていなかった前培養条件の検討を行った。これまで前培養は、pH 調整なしで、batch 培養を行っており、菌体が定常期であった 24 時間で植菌していた。これを、pH で一定にした Fed-batch 培養を行い、菌体に対数増殖期である 9 時間で植菌を行った。その結果、Fed-batch 培養では 9 時間で最大 3.4 g/l/h の 1,3-PD 生産性を示した。今後は更なる TB-96 株の 1,3-PD 高生産性を目的とした、細胞の固定化や連続培養系の構築を行っていきたい。本研究は、JST,ALCA の一環として行われた。

## Construction of optimal culture system of 1,3-propanediol production from waste glycerol by *Citrobacter braakii* TB-96

○Daisuke Nonaka<sup>1</sup>, Takahide Morita<sup>2</sup>, Keiji Kiyoshi<sup>2</sup>, Toshiaki Nakajima-Kambe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** 1,3-propanediol, *Citrobacter*, glycerol, biodiesel fuel

## 1P-1p053 *Citrobacter braakii* TB-96 株におけるバイオディーゼル廃グリセロールからの 1,3-PD 収率の向上

○森田 峻秀, 清 啓自, 野中 大輔, 瀬田 幸平, 鈴木 敏弘, 中島 敏明  
(筑波大院・生命環境)

nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【背景・目的】現在、化石燃料の代替エネルギーとしてバイオディーゼル燃料(BDF)が注目されている。BDFは植物油などを原料とする脂肪酸メチルエステルであり、その利用は地球温暖化抑制に効果的であるとされる。しかし、BDF生産において副生する廃グリセロールは高アルカリ性かつ不純物を含むため、再利用が困難であり、コストをかけて処分されている。今後、BDFの増産に伴い廃処理コストは増大すると見込まれる。従って、廃グリセロールの有効利用及びBDF生産のコスト削減のため、これを基質とした有用物質の発酵生産が注目されている。そこで本研究では、ポリマー原料やアクリル酸の前駆体として利用される、1,3-プロパンジオール(1,3-PD)の廃グリセロールからの生産を検討することとした。我々はこれまでにグリセロール資化性の1,3-PD高生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株を環境中から単離した。本研究ではTB-96株による廃グリセロールからの1,3-PD生産及び収率の向上を目的とした。

【方法・結果】先行研究において、TB-96株の最適1,3-PD生産条件(pH8, 温度30℃)で純グリセロールの逐次添加培養を行った結果、培養開始48時間で1,3-PD生産50.1g/Lを得た。同様の条件及び培養法で、基質として未精製の廃グリセロールを使用した場合においても48時間で30.0g/Lの1,3-PD生産量を達成した。一方、この時主副産物である乳酸の消費グリセロールあたりの収率は0.33 mol/molであり、純グリセロールを基質とした際の乳酸収率(0.13 mol/mol)を大きく上回った。グリセロールを基質とした際の、乳酸の生産は、補酵素のNADHを1,3-PD生産と競合することが知られている。そのため、1,3-PDの収率向上には乳酸生産系の制御が効果的であると考えられた。本研究はJST, ALCAの一環として行われた。

### Improvement of 1,3-PD yield from glycerol-containing biodiesel waste by *Citrobacter braakii* TB-96

○Takahide Morita, Keiji Kiyoshi, Daisuke Nonaka, Kohei Seta, Toshihiro Suzuki, Toshiaki Nakajima-Kambe  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** 1,3-propanediol, glycerol, *Citrobacter*, biodiesel waste

## 1P-1p054 辛酸による高1,3-プロパンジオール生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株の増殖抑制

○清 啓自<sup>1</sup>, 森田 峻秀<sup>1</sup>, 野中 大輔<sup>2</sup>, 瀬田 幸平<sup>1</sup>, 中島 敏明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大)

nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

### 【背景】

グリセロールはバイオディーゼル生産における主な副産物で、その処分がバイオディーゼル生産の課題の1つとなっている。*Citrobacter braakii* TB-96株はグリセロールから1,3-プロパンジオール(以下1,3-PD)を対数増殖期に盛んに生産し、24時間で48g/Lの1,3-PDを生産する高1,3-PD生産菌である。しかし、その増殖は培養15時間で停止し、菌数(OD<sub>580nm</sub>)は低下し始める。同時に1,3-PD生産も低下するためこの増殖停止がTB-96株の最大1,3-PD生産量の頭打ちの一因と考えられた。そこで、本研究ではTB-96株の1,3-PD生産量増大のため、増殖停止要因の特定を目指した。

### 【方法・結果】

TB-96株が培養15時間以降に死滅しているかを確認するため、菌数と生菌数としてコロニー形成数(以下CFU)を測定した。その結果、菌数とCFUは同時に低下を始め、菌数の減少は死滅に起因することが示唆された。次に、最適培地(酵母エキス、リン酸カリウム、pH 8.0)で発酵産物による影響を検討した。その結果、TB-96株の副産物で24時間で25g/L生産する辛酸存在下で細胞増殖速度は低下し、23g/L以上では増殖できなかった。しかし、この時CFUは減少せず、増殖抑制のみで死滅には至らなかった。これまでに培地の酵母エキス量を増大すると菌数低下の開始が遅延することが判明しており、酵母エキスにより辛酸の毒性を抑制している可能性が考えられた。そこで、最適培地とPBS(-)で辛酸の添加有無でCFUの変化を測定した。最適培地では辛酸添加の有無に関わらず、初発以上のCFUを維持し続けた。一方、PBS(-)では1.5時間で辛酸添加なしでは初発と同等のCFUであったが、辛酸添加ありでCFUは急落した。以上より、TB-96株の増殖抑制と死滅は副産物の辛酸に起因すると考えられ、その毒性は酵母エキスの成分により抑制されることが示唆された。本研究はJST, ALCAの一環として行われた。

### Growth inhibition of high 1,3-propanediol producing bacteria *Citrobacter braakii* strain TB-96 by formic acid

○Keiji Kiyoshi<sup>1</sup>, Takahide Morita<sup>1</sup>, Daisuke Nonaka<sup>2</sup>, Kohei Seta<sup>1</sup>, Toshiaki Nakajima-Kambe<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Univ. Tsukuba)

**Key words** *Citrobacter braakii*, growth inhibitor, 1,3-propanediol, formic acid

## 1P-1p055 低Ca環境でもメタノールに生育できる *Methylobacterium zatmanii* のメタノール脱水素酵素の性質について

○Wang Lun<sup>1</sup>, 菅沼 宗矢<sup>1</sup>, 谷 明生<sup>2</sup>, 早川 享志<sup>1</sup>, 中川 智行<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大・応生科, <sup>2</sup>岡山大・資源植物科研)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】*Methylobacterium* 属細菌はメタノールを唯一の炭素源として生育できるメチロトロフ細菌である。近年、*Methylobacterium* 属細菌がCaの代わりに軽希土類に依存したメタノール生育能力を持つことが見いだされ、その鍵酵素が軽希土類を補因子とする新規なメタノール脱水素酵素(MDH)であることが明らかとなった。また、Caと軽希土類であるLaが共存するとLa-MDHが支配的に誘導され、Caと重希土類の場合は、Ca-MDHが優先的に誘導されることがすでに報告されている1)。しかし、低Ca環境下ではどのようなMDHが機能するかこれまで報告がない。私たちは、低Ca環境下でも生育可能なメチロトロフ細菌 *M. zatmanii* GM41 株をスクリーニングし、そのメタノール生育の特徴を観察してきた2)。今回、低Ca環境下で生育したGM41株からMDHを精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】*M. zatmanii* GM41株は、*M. extorquens*が生育できないような低Ca環境でも十分なメタノール生育を示す。低Ca環境で生育したGM41株から無細胞抽出液を調製し、硫酸沈殿(70%)、Butyl TOYOPEARL 6050SおよびHitrap SPカラムクロマトグラフィーを行い、MDHを精製した。SDS-PAGEおよびPMF解析から、精製酵素は約60kDaのαサブユニットと10kDaのβサブユニットからなるMxaFI型MDHであることが明らかとなった。MDHの比活性は0.112 U/mgであり、最適温度は50℃であった。K<sub>m</sub>値は0.160 mM、V<sub>max</sub>は0.125 U/mgであった。

1) Vu HN *et al.* (2016) *J Bacteriol.* 198:1250-1259.

2) 王 倫ら (2015) 第67回日本生物工学会大会要旨集. 2P-107.

### Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium zatmanii* grown on methanol with low Ca environment

○Lun Wang<sup>1</sup>, Soya Suganuma<sup>1</sup>, Akio Tani<sup>2</sup>, Takashi Hayakawa<sup>1</sup>, Tomoyuki Nakagawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., <sup>2</sup>IPSR, Okayama Univ.)

**Key words** *Methylobacterium zatmanii*, methanol dehydrogenase, MxaFI

## 1P-1p056 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 由来 REE 依存型メタノール脱水素酵素の酵素化学的諸性質

○菅沼 宗矢<sup>1</sup>, 王 倫<sup>1</sup>, 日比野 歩美<sup>1</sup>, 三井 亮司<sup>2</sup>, 谷 明生<sup>3</sup>, 海老原 章郎<sup>1</sup>, 早川 享志<sup>1</sup>, 中川 智行<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大・応生科, <sup>2</sup>岡山理大・理, <sup>3</sup>岡山大・資源植物科研)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】レアアース(REE)とは周期表第3族スカンジウム(Sc)、イットリウム(Y)およびランタン(La)からルテチウム(Lu)までの17種類の金属の総称である。これらの金属種は土壌に一般的に存在しているが、その生物への影響はあまり解明されていない。近年、REEを補因子とするメタノール脱水素酵素(MDH)が *Methylobacterium* 属細菌や根粒菌 *Bradyrhizobium* 属細菌などの植物共生細菌から見いだされた。*Methylobacterium* 属細菌はREE依存型MDHの他にもCa依存型MDHを持っているが、REE存在下では優先的にREE依存型MDHが発現することが報告されている。さらに、通常メタノール生育を行わない *Bradyrhizobium* 属細菌もREEの存在下ではメタノール生育が可能となることからREEと植物共生細菌のメタノール資化には密接な関わりがあることが示唆されている。しかし *Bradyrhizobium* 属細菌由来のREE依存型MDHの酵素化学的諸性質はこれまで詳細に解析されていない。本研究では *B. diazoefficiens* の持つREE依存型MDHの酵素化学的性質を解明し、根粒菌のメタノール生育におけるREEの役割を解明することを目的とする。

【方法・結果】メタノール/Ce培地に生育したUSDA110株から無細胞抽出液を調製し、硫酸沈殿(70%)、Butyl TOYOPEARL 6050SおよびHitrap SPカラムクロマトグラフィーを行い、Ce依存型MDHをSDS-PAGEにて単一バンドになるまで精製した。精製酵素は64kDaのサブユニットからなる単量体で、補因子としてCeを保持していた。Ce-MDHの比活性は13.2 U/mg、最適温度は35℃であった。K<sub>m</sub>値は67.2 μM、V<sub>max</sub>は12.9 U/mgであった。この結果は *M. extorquens* AM1由来のNd-MDHとほとんど変わらず、*B. diazoefficiens* においてもCe-MDHによって十分なメタノール生育を示すものと考えられる。よって、根粒菌においてはREEがメタノール生育に必須因子であることが示唆された。

### Characterization of REE-dependent methanol dehydrogenase from *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110

○Soya Suganuma<sup>1</sup>, Lun Wang<sup>1</sup>, Ayumi Hibino<sup>1</sup>, Ryoji Mitsui<sup>2</sup>, Akio Tani<sup>3</sup>, Akio Ebihara<sup>1</sup>, Takashi Hayakawa<sup>1</sup>, Tomoyuki Nakagawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., <sup>3</sup>IPSR, Okayama Univ.)

**Key words** *Bradyrhizobium diazoefficiens*, methanol dehydrogenase, rare earth elements

## 1P-1p057 ナイロンオリゴマー分解菌 *Arthrobacter* sp. K172 における 6-アミノヘキサノ酸代謝系の同定

○竹原 一起<sup>1</sup>, 谷本 悠樹<sup>1</sup>, 藤井 翼<sup>1</sup>, 加藤 太郎<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県大院・工,<sup>2</sup>鹿児島大院・理工)  
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

### <目的>

*Arthrobacter* sp. K172 はナイロンオリゴマー(6-アミノヘキサノ酸環状/直鎖状オリゴマーの総称)を単一炭素源/窒素源として生育する。本微生物が保持する3種類の酵素(NylA/NylB/NylC)により、同オリゴマーは6-アミノヘキサノ酸まで分解されるが、これより下流の代謝経路は解明されていない。モノマー以降の代謝系は、不要ナイロンからの有用物質への変換や、バイオマスからのナイロン原料の生産への応用が期待できる。本研究では6-アミノヘキサノ酸代謝経路の同定を目的として検討を行った。

### <方法および結果>

4-アミノ酪酸代謝経路との類似性から、6-アミノヘキサノ酸はアミノトランスフェラーゼによりアジピン酸セミアルデヒドに変換され、その後デヒドロゲナーゼによりアジピン酸へと変換されると予測した。アミノトランスフェラーゼについては4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼの配列を、デヒドロゲナーゼについてはNADP<sup>+</sup>依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼの配列をクエリとして、*Arthrobacter* sp. K172 ドラフトゲノム配列において相同性のある遺伝子(各々、*nylD*, *nylE* と命名)を探索した。各候補遺伝子をPCRで増幅し、ゴールドショットクレンジングベクター(pCold I)に組み込み、大腸菌より高発現したタンパク質をHis-tag 融合タンパク質として精製した。6-アミノヘキサノ酸をアミノ基供与体とし、ピルビン酸またはグリオキシル酸をアミノ基受容体として酵素反応を行い、生成物をTLCで検出した。その結果、アラニン、グリシンが検出され、NylD は6-アミノヘキサノ酸アミノトランスフェラーゼであると同定した。また、NADP<sup>+</sup>を補酵素として、アジピン酸セミアルデヒドからアジピン酸への変換活性を有する酵素(NylE)を同定した。以上より、6-アミノヘキサノ酸は、まずNylDによりアジピン酸セミアルデヒドへ、次いでNylEによりアジピン酸へ変換されると結論した。

### Metabolic pathway of 6-aminohexanoate in nylon oligomer-degrading bacterium.

○Ikki Takehara<sup>1</sup>, Yuuki Tanimoto<sup>1</sup>, Tsubasa Fujii<sup>1</sup>, Dai-ichiro Kato<sup>2</sup>, Masahiro Takeo<sup>1</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

**Key words** 6-aminohexanoate, *Arthrobacter*, metabolism

## 1P-1p058 代謝改変した大腸菌による好気培養条件での酪酸生産

○片岡 尚也<sup>1,2,3</sup>, Vangnai Alisa S.<sup>4</sup>, 薬師 寿治<sup>1,2,3</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学, <sup>3</sup>山口大・中高温微生物, <sup>4</sup>チュラロンコン大)  
nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

**【背景・目的】**酪酸は、食品香料やプラスチックの原料といった用途を持つ、産業的に広く利用されている炭素数4の直鎖脂肪酸である。生物学的な酪酸生成は、*Clostridium* 属細菌や代謝改変された大腸菌により報告されているが、その多くが酸素を絞った好気および嫌気培養条件でのもので、好気培養条件での報告例はほとんど存在しない。そこで本研究では、好気培養条件における酪酸生成およびその生産性の評価を目的に設定し、研究に着手した。

**【方法・結果】**我々は以前、好気培養条件で機能するブタノール合成代謝経路を報告した(1, 2)。その際、少量ではあるが酪酸の生成が確認され、これは、報告したブタノール合成代謝経路が、酪酸生成に利用可能であることを示唆していた。そこで、ブタノール合成代謝経路を改変することで新規な酪酸合成代謝経路を設計し、大腸菌内で構築した。構築株を用いて167 mMのグルコースを含む発酵培地で24時間好気的に培養したところ、24.2 mMの酪酸生成が確認され、設計した酪酸合成代謝経路が、好気培養条件で機能することが明らかになった。現在、造成した組換え大腸菌による酪酸の生産性を評価するべく、培養条件の検討による生産の効率化に取り組んでいる。

1. Kataoka et al., *J. Biotechnol.*, 204: 25-32 (2015).
2. Kataoka et al., 第65回日本生物工学会大会, 2P-117 (2013).

### Butyrate production under aerobic growth conditions by metabolically engineered *Escherichia coli*

○Naoya Kataoka<sup>1,2,3</sup>, Alisa S. Vangnai<sup>4</sup>, Toshiharu Yakushi<sup>1,2,3</sup>, Kazunobu Matsushita<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Faz. Agric., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>RCTMR, Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>Chulalongkorn Univ.)

**Key words** butyrate, *Escherichia coli*, synthetic metabolic pathway

## 1P-1p059 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 のヒドロゲナーゼ機能の解析

○井上 達也<sup>1</sup>, 平野 伸一<sup>2</sup>, 松本 伯夫<sup>2</sup>, 石井 正治<sup>1</sup>, 新井 博之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・農生科, <sup>2</sup>電中研)  
amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

**【背景及び目的】**ヒドロゲナーゼは一般的に酸素感受性である。そのため、水素細菌には好気性(至適酸素濃度数%)のものが多く、*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 株は高酸素濃度条件下(酸素濃度30%以上)においても生育可能な好熱性水素細菌である。*H. thermophilus* TK-6の近縁種 *Aquifex aeolicus* が3つのヒドロゲナーゼ Hydrogenasel, II, III を有しているのに対して、本菌はそれぞれのホモログ (Hup1, Hup2, Hyn) に加えて、4つ目のヒドロゲナーゼ Hox を有している。これまでにトランスクリプトーム解析の結果から、*hox*, *hup1* が酸素濃度に依らず恒常発現しており、高酸素濃度条件下では特に *hox* の転写量が上昇することが明らかとなっている。よって Hox が本菌に特徴的な高酸素濃度での増殖に関与することが推定されるが、その役割は不明確である。そこで、本研究では *hox* 遺伝子破壊株の解析を通じて Hox が本菌の増殖に果たす役割を推定することを目的とした。

**【方法及び結果】**これまでに、我々のグループにおいて作成された遺伝子破壊株  $\Delta hox$  株と  $\Delta hup1$  株、および野生株を一定の酸素濃度条件下 (10, 20, 30, 40%) で培養を行い、それぞれの増殖を評価した。その結果、 $\Delta hox$  株は酸素濃度30%で増殖遅延が生じ、40%において完全に増殖が抑制された。その一方で、野生株および  $\Delta hup1$  株は今回試験した酸素濃度範囲においては同様の増殖挙動を示し、高酸素濃度40%においても増殖は維持された。よって、本菌の高酸素濃度条件下での特徴的な増殖には Hox が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、本菌が有する主要なヒドロゲナーゼについて高酸素濃度条件下での活性評価を進めている。本発表では前述の結果と合わせ、本菌の増殖過程における各ヒドロゲナーゼの役割について考察を行う。

### Studies on the functions of hydrogenases in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○Tatsuya Inoue<sup>1</sup>, Shin-ichi Hirano<sup>2</sup>, Norio Matsumoto<sup>2</sup>, Masaharu Ishii<sup>1</sup>, Hiroyuki Arai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>CRIEPI)

**Key words** hydrogen-oxidizing bacteria, hydrogenase

## 1P-1p060 硫黄代謝関連遺伝子の改変による大腸菌のシステイン発酵生産性の向上

○河野 祐介<sup>1</sup>, 仲谷 豪<sup>2</sup>, 西口 みゆ<sup>2</sup>, 鶴岡 愛<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>, 大津 厳生<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大・国際産学連携本部, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
ohtsu.iwao.fm@u.tsukuba.ac.jp

### 【背景・目的】

大腸菌は、硫酸イオン (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) またはチオ硫酸イオン (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) から、生育に必須のL-システインを合成する二つの硫黄同化経路を有している。従って、チオ硫酸経路上の *cysM* 遺伝子の欠損株は、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>を単一硫黄源として生育できないが、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>では生育できる。これに対し、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>があっても、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>が同時に存在すると *cysM* 欠損株が生育できない現象(チオ硫酸リプレッション、TSR)を我々は見いだしている。そのメカニズムは不明であるが、遺伝子スクリーニング実験の結果、この現象には *nudH* 遺伝子 (mRNA 分解に関与する酵素) が必要であることも見いだしている。そこで、本研究では、この遺伝子のシステイン発酵生産に対する効果を明らかにすることを目的とした。

### 【方法・結果】

まず、システイン生産の硫黄源として、高価だが生産性の高い「チオ硫酸塩」と安価だが生産性の低い「硫酸塩」、その両方が存在する条件下でシステイン発酵生産を行った。その結果、*nudH* 遺伝子を破壊したシステイン生産大腸菌株 (システイン合成系強化株) では、硫酸塩からのシステイン生産量が約2倍に増加した。この結果は、*nudH* 遺伝子がSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>同化の抑制に寄与する上記の事実とも整合している。これを踏まえ、システイン生産を向上させることが分かっている *yciW* 遺伝子と *gshA* 遺伝子の破壊もさらに加えた変異株を用いて、炭素源および硫黄源を流加するジャーファーメンター培養に供したところ、16 g/Lのシステイン生産に成功した。本発表では、これらのプロセスやその効果について紹介・議論したい。なお、本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

### Enhancement of cysteine production using *Escherichia coli* by sulfur metabolic gene engineering

○Yusuke Kawano<sup>1</sup>, Takeshi Nakatani<sup>2</sup>, Ai Tsuruoka<sup>2</sup>, Miyu Nishiguchi<sup>2</sup>, Hiroshi Takagi<sup>2</sup>, Iwao Ohtsu<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>International Innov. Interface Organization, Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Escherichia coli*, cysteine biosynthesis, fermentation, sulfur metabolism

## 1P-1p061 大腸菌 *nudH* 遺伝子の機能解析とシステイン発酵生産への応用

○石井 寛子<sup>1</sup>, 鶴岡 愛<sup>2</sup>, 河野 祐介<sup>1</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>, 大津 厳生<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・国際産学連携本部, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
 ohtsu.iwao.fm@tsukuba.ac.jp

【背景と目的】大腸菌は生育に必須のシステイン (Cys) を生合成する、硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) を利用する硫酸経路とチオ硫酸イオン ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) を利用するチオ硫酸経路という二種類の硫黄同化経路を有する。当研究グループはこれまでに、チオ硫酸経路上の *cysM* 遺伝子 (S-スルホシステイン合成酵素) を欠損させた株が硫酸塩を単一硫黄源とした場合は生育するが硫酸塩とチオ硫酸塩が同時に存在する条件下では生育できない現象 (チオ硫酸リプレッション) を見いだしている。さらに  $\Delta\text{cysM}\Delta\text{X}$  二重欠損株ライブラリーを用いたスクリーニング実験の結果、硫酸塩+チオ硫酸塩条件下で生育可能な  $\Delta\text{cysM}\Delta\text{nudH}$  二重欠損株を取得した。*nudH* 遺伝子は RNA 5'ピロホスホドリン酸をコードしており mRNA の分解に関与する事が報告されているが、硫黄代謝との関連は不明である。そこで本研究では *nudH* 遺伝子の機能解析と Cys 発酵生産への効果を明らかにする事を目的とした。

【方法・結果】*nudH* 遺伝子の硫黄代謝との関連や機能を明らかにする為、*nudH* 遺伝子の転写調節因子の探索や *nudH* 下流遺伝子の硫黄代謝への影響の検証、野生株と *nudH* 欠損株の硫酸イオン輸送活性の比較やマイクロアレイによる発現比較解析などを実施した。これらの実験結果から、*nudH* 欠損株は硫酸塩単一硫黄源条件下で、既知の S-スルホシステインを経由するチオ硫酸経路とは異なる経路を用いる事によりチオ硫酸イオンからの Cys 合成が促進されている可能性が示唆された。さらに *nudH* 欠損株を用いた Cys 発酵試験の結果、*nudH* 欠損株は野生株と比較して 1.4 倍の Cys 生産量を示した。さらに当研究グループがこれまでに Cys 生産性が向上することを見いだしている *yciW* 遺伝子欠損も組み合わせた  $\Delta\text{nudH}\Delta\text{yciW}$  株は野生株と比較して 2 倍の Cys 生産量を示した。なお、本研究は農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行った。

### Functional analysis of the *nudH* gene in *Escherichia coli* and its application to cysteine production

○Hiroko Ishii<sup>1</sup>, Ai Tsuruoka<sup>2</sup>, Yusuke Kawano<sup>1</sup>, Hiroshi Takagi<sup>2</sup>, Iwao Ohtsu<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>International Innov. Interface Organization, Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Escherichia coli*, cysteine, sulfur, catabolite repression

## 1P-1p062 大腸菌における硫黄源のカタボライト抑制機構の解明

○西口 みゆ<sup>1</sup>, 城山 真恵加<sup>1</sup>, 河野 祐介<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>1</sup>, 大津 厳生<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>筑波大・国際産学連携本部)  
 ohtsu.iwao.fm@tsukuba.ac.jp

【背景】大腸菌は硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) を取り込みシステインシンターゼ A (CysK) によってシステイン (Cys) を合成する硫酸経路と、チオ硫酸イオン ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) を取り込みシステインシンターゼ B (CysM) によって Cys を合成するチオ硫酸経路の二つの Cys 生合成経路が存在する。Cys は細胞内毒性が高いため厳密に制御されており、(1)Cys によるフィードバック阻害と(2)Cys 合成に関与する遺伝子群を活性化する転写因子 CysB による制御が知られている。こうした背景の中、私たちは環境中に  $\text{SO}_4^{2-}$  と  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  が同時に存在すると、大腸菌は  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  から Cys を合成する「チオ硫酸リプレッション (TSR)」を備えていることを発見した。しかし、そのメカニズムは不明である。

【方法・結果】そこで、炭素源や窒素源のカタボライトリプレッションと同様に硫黄源のカタボライトリプレッション TSR もトランスポーターによる制御ではないかと考えた。大腸菌は唯一の  $\text{SO}_4^{2-}$  のトランスポーターであり  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  も輸送する CysPTWA と、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  を特異的に輸送する YeeED の 2 つの輸送経路を有している。私達は、*yeeE* 欠損株が野生株や *cysM* 欠損株と同様に TSR を受けるのに対し、*cysA* 欠損株は TSR を受けないことを見出した。CysPTWA 経路の場合細胞内に  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  として取り込まれるが、YeeED 経路の場合  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  は硫黄転移酵素 YeeD により亜硫酸イオンへと変換して細胞内に取り込まれる点で異なる。次に、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  が TSR 解除の原因であるかどうかを検証した。MBP タグを付加した MBP-CysB と DIG 標識した *cysP* フラグメントを用いて、硫酸ナトリウムまたはチオ硫酸ナトリウム条件下でゲルシフトアッセイを行った。ゲルシフトアッセイの結果、硫酸ナトリウム条件下と比較するとチオ硫酸ナトリウム条件下のバンドが減少した。これより、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  が存在すると、CysB が CysPTWA オペロンのプロモーターに結合できなくなる事が判明した。

### Functional Analysis of Sulfur catabolite repression in *Escherichia coli*

○Miyu Nishiguchi<sup>1</sup>, Maeka Shiroyama<sup>1</sup>, Yusuke Kawano<sup>2</sup>, Hiroshi Takagi<sup>1</sup>, Iwao Ohtsu<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, <sup>2</sup>International Innov. Interface Organization, Univ. Tsukuba)

**Key words** *Escherichia coli*, cysteine, fermentation, sulfur metabolism

## 1P-1p063 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 におけるチオ硫酸酸化代謝の解析

○小倉 一将<sup>1</sup>, Dahl Christiane<sup>2</sup>, 三本木 至宏<sup>3</sup>, 新井 博之<sup>1</sup>, 石井 正治<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東大院・農生科, <sup>2</sup>Inst. Microbiol. Biotechnol., Univ. Bonn, <sup>3</sup>広島大院・生物圏)  
 amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は伊豆の峰温泉付近の土壌から単離された好熱性絶対独立栄養性の水素細菌である。本菌は水素またはチオ硫酸をエネルギー源とし、二酸化炭素を唯一の炭素源として生育する。当研究室では今までに、本菌が元素硫黄を中間生成物としたチオ硫酸の酸化代謝を持つことを明らかにしている。本菌の硫黄代謝関連遺伝子破壊株は作成されているが、その表現型解析は十分に為されていない。そこで本研究では、遺伝子破壊株の表現型解析を中心として、*H. thermophilus* における硫黄代謝関連遺伝子の生理学的機能解明を目的とした。

本研究では野生株、遺伝子破壊株の生育をとりながら、培養液中の各種硫黄化合物濃度を測定し、チオ硫酸培養条件下における硫黄化合物の挙動を明らかにした。チオ硫酸を酸化する遺伝子の破壊株では生育の遅延、培養液中の元素硫黄の蓄積が確認されたことから、これらの酵素がチオ硫酸からのエネルギー獲得に関与することが示唆された。

硫黄代謝においては、硫黄化合物のキャリアタンパク質が重要な役割を果たす。ロダネーゼはその一種であり、*H. thermophilus* でも 2 つの遺伝子が存在する。本研究では 3 種類の破壊株 ( $\Delta\text{rhd1}$ ,  $\Delta\text{rhd2}$ ,  $\Delta\text{rhd1}\Delta\text{rhd2}$ ) の生育および硫黄化合物量の変化を測定した。 $\Delta\text{rhd1}$  株では野生株と比較して、チオ硫酸の消費が促進されたことから、*rhd1* の破壊は本菌の代謝に影響を与えることが示唆された。 $\Delta\text{rhd2}$  株の表現型の変化は見られず、また  $\Delta\text{rhd1}\Delta\text{rhd2}$  株の表現型は  $\Delta\text{rhd1}$  株と同様の結果となった。

以上の結果から、既往の研究で硫黄代謝に関わるとされた遺伝子が *in vivo* においても重要な働きをすることが示唆された。今後、各酵素の詳細な解析を進めるとして *H. thermophilus* における硫黄代謝の全容を詳らかにしていく予定である。

### Analyses of thiosulfate-oxidizing metabolism in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○Kazumasa Ogura<sup>1</sup>, Christiane Dahl<sup>2</sup>, Yoshihiro Sambongi<sup>3</sup>, Hiroyuki Arai<sup>1</sup>, Masaharu Ishii<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Inst. Microbiol. Biotechnol., Univ. Bonn, <sup>3</sup>Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

**Key words** hydrogen-oxidizing bacteria, metabolism, sulfur metabolism, *Hydrogenobacter thermophilus*

## 1P-1p064 代謝経路解析に基づく定常期にコハク酸を生産する大腸菌の開発

○戸谷 吉博, 白木 孝典, 清水 浩  
 (阪大院・情報)  
 shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

### 【背景と目的】

微生物を用いた増殖非運動型の物質生産では、原料を菌体合成に使用しないですむため、高い目的物質の収率が期待できる。代謝経路の化学量論モデルを用いたシミュレーションに基づく改変は効果的なアプローチであるが、増殖非運動型の物質生産のための方法は存在しなかった。我々は、代謝フラックスの取りうる範囲に着目することで、定常状態を維持するには目的物質の生産が不可欠になるように代謝経路を設計する手法 (Solution space design [SSDesign]) を開発した。本発表では、大腸菌によるコハク酸生産について、定常期での生産に有効な遺伝子破壊を予測し、その効果を検証した。

### 【結果】

大腸菌の中核代謝経路の化学量論モデルを用いて SSDesign を実行した結果、*pykA*, *pykF*, *sfcA*, *pntAB*, *sthA* の遺伝子破壊、もしくは *pykA*, *pykF*, *sfcA*, *maeB*, *zwf* の遺伝子破壊により、定常期に 1 mol/mol 以上の収率でコハク酸を生産することが予測された。そこで、大腸菌 BW25113 株を親株として、これらの多重遺伝子破壊株 (SSD-01 と SSD-02) を構築し、定常期におけるコハク酸の収率を評価した。まず、細胞を増やすため、各菌株をグルコースを炭素源とする合成培地で好気培養した。増殖停止後の細胞を回収し、10 g/L のグルコースと炭酸水素ナトリウムを加えた合成培地に再懸濁し、微好気条件下で培養を継続した。定常期におけるコハク酸収率は、親株の 0.15 mol/mol に対して、SSD-01 株では 0.34 mol/mol、SSD-02 株では 0.40 mol/mol に増加した。遺伝子破壊によりコハク酸収率は向上したものの、設計通りの収率は実現できておらず、これは予測に用いたモデルに含まれていない代謝経路が働いたことを示唆している。モデルに含まれる代謝経路を検討することで、より高精度な予測と設計を実現する。

### Metabolic pathway engineering of *Escherichia coli* for succinate production during stationary phase

○Yoshihiro Toya, Takanori Shiraki, Hiroshi Shimizu  
 (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

**Key words** metabolic engineering, metabolic pathway modification, *Escherichia coli*, succinate

## 1P-1p065 *Shewanella* 属細菌において新たに発見された CRP/cAMP 制御系の生理機能とその制御機構の解明

○笠井 拓哉, 高妻 篤史, 渡邊 一哉  
(東葉大院・生科)  
kazuyaw@toyaku.ac.jp

【背景】cAMP receptor protein (CRP) は多くの細菌に保存されている転写因子であり、cAMP と複合体を形成して標的遺伝子の転写を活性化させる。CRP/cAMP 制御系の生理機能は大腸菌において調べられており、糖代謝のカタボライト抑制に関与することが知られている。しかし CRP は糖を代謝できない多くの環境細菌にも保存されており、これらの細菌における CRP/cAMP 制御系の役割には不明な点が多い。そこで本研究では糖を代謝できない環境細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 株の CRP/cAMP 制御系の生理機能とシグナル伝達経路の解明を目的とした。MR-1 株では CRP は嫌気呼吸等の異化代謝の制御に関与することが知られている。本発表では本株において新たに発見された cAMP 濃度調節因子と CRP/cAMP 制御系の生理機能について報告する。

【結果】cAMP 分解酵素をコードすると予想された遺伝子の破壊株 (*AcpdA*) を作製し、cAMP 濃度を測定した結果、*AcpdA* 株は野生株 (WT) の約 3 倍の cAMP を蓄積していた。この結果から、CpdA が MR-1 株における重要な cAMP 濃度調節因子であることが示された。*AcpdA* 株の生育特性を調べた結果、乳酸最少培地 (LMM) において、本株の増殖は WT よりも著しく低下することが明らかとなった。この原因を探索するため *AcpdA* 株のトランスクリプトーム解析を行った結果、本株ではメチオニン、S-アデノシルメチオニン (SAM) およびヒスチジン合成遺伝子の発現量が著しく減少していることが判明した。これら 3 つの化合物を LMM へ添加すると、*AcpdA* 株の増殖は大幅に改善された。以上の結果からこれらの化合物の合成は cAMP 濃度の上昇によって抑制されることが明らかとなり、CRP/cAMP 制御系は異化代謝に加え、同化代謝の制御にも関与することが示唆された。今後は CRP/cAMP 制御系が同化代謝を制御する分子機構を明らかにしていく予定である。

### Novel physiological function of CRP/cAMP-dependent regulatory system in *Shewanella oneidensis* MR-1.

○Takuya Kasai, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe  
(Grad. Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

**Key words** *Shewanella oneidensis* MR-1, cAMP, metabolism, signal transduction

## 1P-1p067 バイオプロセス効率化に向けた合成クオラムセンシングと代謝トグルスイッチによる大腸菌表現型の可塑的制御

○相馬 悠希<sup>1</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>九大・生医研, <sup>2</sup>九大院・農)  
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】微生物による高効率の物質生産プロセスを実現するには、宿主表現型の適切な改変が必要であるが、プロセス全体を通じて最適な表現型は必ずしも均一ではない。例えば、菌体増殖に重要な TCA 回路は、様々な物質生産の前駆体となる Acetyl-CoA を消費するため、菌体増殖と物質生産に最適な表現型は互いに相反する。宿主が自らの菌体密度を感知して対立する表現型を可塑的に制御できれば、菌体増殖と物質生産の双方を最大化できる。我々はこれまで、大腸菌による Isopropanol (IPA) 生産をモデルケースとして、誘導剤添加に伴って TCA 回路を遮断し、余剰の代謝流を IPA 生産経路に誘導する事で「菌体増殖型表現型」から「IPA 生産型表現型」へと制御する代謝トグルスイッチ (MTS) を構築している。本研究では、MTS による表現型制御を大腸菌による自律的な菌体密度感知と遺伝子発現制御によって誘導するために、*Vibrio fischeri* 由来のクオラムセンシング機構である lux システムの大腸菌での再構成に取り組んだ。

【方法・結果】lux システムでは LuxI より合成される Acyl homoserine lactone (AHL) が菌体増殖と連動して環境中に拡散し、これを LuxR が感知して複合体を形成し、P<sub>lux</sub> プロモータ下流の遺伝子発現を誘導する。MTS による表現型制御を最適な菌体密度で自律的に誘導するには、lux システムによって遺伝子発現が誘導される菌体密度を適宜調整する必要がある。そこで、P<sub>lux</sub> の両端に lacO 配列を導入することで AHL-LuxR 複合体との結合を LacI リプレッサーの立体障害で制限できる P<sub>lux</sub>lacO プロモータを構築し、IPTG 濃度に依存して遺伝子発現誘導が開始される菌体密度を調整可能な合成 lux システムを構築した。これを MTS と統合することで、培養開始時に添加する IPTG 濃度に依存して様々な菌体密度で自律的に表現型を制御する IPA 生産大腸菌の構築に成功した。

### Phenotypic control by synthetic quorum sensing and metabolic toggle switch for efficient bioprocess

○Yuki Soma<sup>1</sup>, Taizo Hanai<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, quorum sensing, toggle switch, TCA cycle

## 1P-1p066 メバロン酸生産大腸菌の細胞内代謝状態の定量的な評価

○永井 暉, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩  
(阪大院・情報)  
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【研究背景】メバロン酸は化成品の原料となる炭素数 6 の有機酸である。これまでに *Enterococcus faecalis* 由来の生合成経路遺伝子を導入した大腸菌が構築され、グラムスケールの発酵生産が報告されている。本研究ではさらなる代謝改変に向けた知見を得るために、大腸菌メバロン酸生産株の細胞内代謝物濃度を絶対定量し、代謝状態を熱力学的に評価することを試みた。

【方法と結果】大腸菌 MG1655 株の染色体に  $\lambda$ DE3 遺伝子を組み込んだ Moc 株と、*E. faecalis* 由来の *mvaES* 遺伝子を強発現した ES 株を、非標識または [<sup>13</sup>C] グルコースを含む M9 培地で回分培養した。フィルター法および冷メタノール法でクエンチ、回収した菌体からクロロホルム-メタノール-水法で代謝物を抽出した。[U-<sup>13</sup>C] グルコース培地で培養した菌体由来の抽出液と、非標識培地由来の菌体の抽出液に混合したサンプルを液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS/MS) とガスクロマトグラフ (GC-MS) を用いて測定した。各代謝物の非標識体と [U-<sup>13</sup>C] 標識体のピーク面積比から、代謝物濃度を正確に定量した。

【結果と考察】*E. faecalis* 由来の *mvaES* 遺伝子を導入した大腸菌 ES 株を M9 培地で回分培養したところ、メバロン酸比生産速度、対糖取率はそれぞれ  $2.75 \pm 0.07$  mmol/gDW/h、 $26.01 \pm 0.02\%$  だった。ES 株およびコントロール株 (Moc 株) から細胞内代謝物を抽出し、絶対濃度を定量した。両株で FBP が最も高含量だった ( $26.90 \pm 0.00$  および  $22.00 \pm 0.00$  mmol/gDW/h)。また、ES 株では解糖系とクエン酸回路の代謝物濃度が Moc 株に比べて有意に減少していた。絶対濃度からギブス自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) を算出した結果、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路の反応の  $\Delta G$  が 0 に近く、Moc 株と ES 株間で大きな差異は認められなかった。

### The quantitative rating of intracellular metabolism in mevalonate-producing *Escherichia coli*

○Hikaru Nagai, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu  
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

**Key words** intracellular metabolites, *Escherichia coli*, absolute quantification, mevalonate

## 1P-1p068 メタボリックトグルスイッチを用いた $\gamma$ -アミノ酪酸生産

○藤原 由梨<sup>1</sup>, 中川 拓弥<sup>2</sup>, 鶴野 主悟<sup>3</sup>, 相馬 悠希<sup>4</sup>, 花井 泰三<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>九大・農, <sup>2</sup>九大院・生資環, <sup>3</sup>九大院・農, <sup>4</sup>九大・生医研)  
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は、ストレス低減作用などを有するため食品添加物や医薬品に利用されるほか、高強度バイオプラスチックの原料として注目されている。従来、GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) を強発現させた大腸菌などの高密度菌体以前駆体であるグルタミン酸を外部添加するバイオコンバージョンで生産されてきた。近年、コスト軽減を目指して、より安価な基質であるグルコースからの発酵生産手法が開発されている。GABA 発酵では菌体増殖に重要な TCA 回路の中間代謝物である  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) からグルタミン酸合成を経由して GABA を生産するため、菌体増殖と GABA 生産が互いに競合して生産性低下を招く。GABA 発酵の効率化には、この競合関係を解消し、菌体増殖と生産性の双方を担保する必要がある。本研究では、大腸菌による GABA 発酵において、TCA 回路の他、GABA 生産と競合する様々な代謝流を発酵過程の任意のタイミングで遮断し、代謝流を GABA 生産経路に転換するためのメタボリックトグルスイッチ (MTS) の開発に取り組んだ。

【方法・結果】GABA 生産との競合反応として、 $\alpha$ -KG からのスクシニル CoA 合成を触媒する *sucA*、イソクエン酸からのグリオキシル酸合成を触媒する *aceA* に着目し、これらの発現を制御する人工遺伝子回路を構築した。回路は IPTG 添加によって P<sub>1</sub>lacO<sub>1</sub> 下流の *tetR* が発現すると、P<sub>1</sub>tetO<sub>1</sub> 下流の *sucA*, *aceA* の発現が抑制され、同時に GABA 生産系遺伝子群 (*pyc*, *gdhA*, *gadB*) が発現する設計とした。同回路を  *$\Delta$ sucA  $\Delta$ aceA* 株に導入して MTS 株とし、GABA 生産系遺伝子群のみを導入したコントロール株と GABA 生産性を比較した。培養開始後 3 h に 0.1 mM IPTG を添加した MTS 株は、コントロール株と比較して最終体密度が約 0.7 g-DWCW/L 低下したものの、比生産速度が 7.6 倍に向上し、GABA 生産量は 4.4 倍 (3.2 g/L) に向上した。

### Production of gamma-aminobutyric acid by metabolic toggle switch

○Yuri Fujiwara<sup>1</sup>, Takuya Nakagawa<sup>2</sup>, Keigo Tsuruno<sup>3</sup>, Yuki Soma<sup>4</sup>, Taizo Hanai<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>4</sup>Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, GABA, synthetic biology, toggle switch

## 1P-1p069 ストレス環境におけるアルコール発酵力の改善を目指した酵母 *RIM15* 遺伝子のプロモーター改変

○渡辺 大輔<sup>1</sup>, 金子 亜紀江<sup>2</sup>, 杉本 幸子<sup>1</sup>, 大貫 慎輔<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>1</sup>, 大矢 禎一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>東大院・新領域)  
ohya@k.u-tokyo.ac.jp

【背景】我々は以前に、清酒酵母きょうかい7号および近縁株が示す高いアルコール発酵力の主要な原因として、Greatwall ファミリープロテインキナーゼをコードする *RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異を同定した<sup>1,2)</sup>。しかしながら、*Rim15p* は、アルコール発酵の調節だけでなくストレス応答においても重要な役割を果たしているため、その機能欠損は、清酒もろみよりも厳しい発酵環境では不利に働く可能性がある。そこで本研究では、アルコール発酵力とストレス耐性を兼ね備えた株を創出するために、*RIM15* 遺伝子の 5'-UTR 領域に、糖新生遺伝子 *PCK1* のプロモーター配列を挿入した。

【結果】プロモーター改変株は、グルコースの豊富な発酵前半では *RIM15* 遺伝子の発現を抑制し、ストレスが強くなる発酵後半に *RIM15* 遺伝子の発現を誘導した。その結果、単独の回分発酵試験（グルコース 20%）では、*RIM15* 遺伝子破壊株よりも高い生存率を維持しながらも、同程度の発酵速度を示すことができた。さらに、繰り返し回分発酵試験（グルコース 20%、10 回繰り返し）や高グルコース条件における回分発酵試験（グルコース 40%）では、*RIM15* 遺伝子破壊株を上回る高い発酵速度を示した。以上の結果から、アルコール発酵調節とストレス応答の両方を司る *RIM15* 遺伝子のプロモーター改変の有効性を新たに示すことができた。

1) *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 4008-4016 (2012)  
2) *Appl. Environ. Microbiol.*, 82: 340-351 (2016)

### Promoter engineering of the *Saccharomyces cerevisiae RIM15* gene for improvement of alcoholic fermentation rates under stress conditions

○Daisuke Watanabe<sup>1</sup>, Akie Kaneko<sup>2</sup>, Yukiko Sugimoto<sup>1</sup>, Shinsuke Ohnuki<sup>2</sup>, Hiroshi Takagi<sup>1</sup>, Yoshikazu Ohya<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAISt, <sup>2</sup>Grad. Sci. Frontier Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** alcoholic fermentation, stress response, *RIM15*, promoter engineering

## 1P-1p070 清酒酵母の機能性アミノ酸蓄積変異株の分離と醸造特性の解析

○大橋 正孝<sup>1</sup>, 渡辺 大輔<sup>2</sup>, 高木 博史<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>奈良産振セ・バイオ・食品グループ, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
ohashi-masataka@office.pref.nara.lg.jp

【背景と目的】我々は清酒の消費低迷を打破するために、ユニークな清酒酵母の開発を目指している。これまでの研究で、遺伝子組換え体を用いずにエタノール生産性の高い清酒酵母を分離する過程で、アルコール性疲労の抑制や肝臓の働きを助けるなどの機能性を有するオルニチンを細胞内に高蓄積する変異株を分離することに成功した。オルニチンを高生産する清酒酵母を用いた醸造によって、新たなコストをかけることなく、機能性を有するオルニチンを多く含む清酒や酒粕を製造することが期待できる。

そこで、本研究では、得られた変異株を用いて清酒の小仕込み試験を行い、醸造特性を解析するとともに、清酒や酒粕中のオルニチン量を測定した。

【方法及び結果】協会酵母 901 号を EMS 変異処理後、プロリンアナログのアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を含有する SD 寒天培地で生育できる株を分離した。次に、各株を SD 液体培地で 2 日間培養後、細胞内のプロリン含量をアミノ酸アナライザーで測定し、親株よりも 5 倍以上蓄積した株を選抜した。さらに、寒天培地でのスポット試験によって、親株よりもエタノール耐性の高い 4 株を選抜した。興味深いことに、これら変異株のうち 3 株では親株の 7.3~13.3 倍ものオルニチンを細胞内に蓄積していた。これら変異株を用いて、総米 200g の小仕込み試験を 15℃、一段仕込みで行った。その結果、これら 3 株の発酵能は、親株と有意な差はなく、エタノール含量も親株より上回った。また、細胞内にオルニチンを最も多く蓄積する変異株で醸造した清酒中には親株の 2.4 倍、また酒粕中には親株の 3 倍のオルニチンをそれぞれ含むことが判明した。

### Isolation of Japanese sake mutants that accumulate a functional amino acid and analysis of their fermentation profiles

○Masataka Ohashi<sup>1</sup>, Daisuke Watanabe<sup>2</sup>, Hiroshi Takagi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Nara Pref. Inst. Ind. Dev., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAISt)

**Key words** Japanese sake yeast, a functional amino acid accumulation

## 1P-1p071 *VID24* 遺伝子変異の接合型を指標としたリンゴ酸高生産酵母の育種

○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 秦 洋二  
(月桂冠・総研)  
negoro@gekkeikan.co.jp

【目的】清酒中のリンゴ酸は呈味に寄与する重要な成分であり、これまでに様々なリンゴ酸高生産酵母が育種されている。最近我々は、コハク酸ジメチル (DMS) 感受性を指標に取得したリンゴ酸高生産酵母 K-901H において、*VID24* の変異 (*p.G131R*) が高生産となる要因であることを報告した<sup>1)</sup>。K-901H は二倍体であり *VID24* 変異をヘテロ接合型に有することから、この変異は優性もしくは半優性であると推測した。今回、*VID24* 変異の接合型が表現型に与える影響を検証し、得られた知見を利用してリンゴ酸生成能を更に増強させる育種法の開発を行った。

【方法と結果】遺伝子組換えにより *VID24* 変異をヘテロ接合型あるいはホモ接合型として二倍体酵母に導入し、得られた株を DMS 感受性試験と清酒醸造試験に供した。その結果、変異型 *VID24* のコピー数に応じて DMS 感受性とリンゴ酸生成能が増加したことから、*VID24* 変異は半優性の形質であると考えられた。次に、遺伝子組換えを用いずに、K-901H を親株として *VID24* 変異がホモ接合型となった株の取得を試みた。ヘテロ接合性の消失を促進させる紫外線照射、DMS 含有培地におけるナイスタチン濃縮、および YM10 培地でのリンゴ酸生成能の評価を組み合わせることで、ホモ接合型株 (K-901H×2) を得た。清酒醸造試験において、K-901H と K-901H×2 のリンゴ酸濃度はそれぞれ 0.53 g/l および 1.19 g/l であったが、一方でエタノール生成は同程度であった。以上より、*VID24* 変異の接合型を指標にリンゴ酸生産能が異なる実用清酒酵母を育種することができた。

1) H. Negoro *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 121(6), 665-671 (2016)

### Breeding of high malate-producing diploid sake yeast with a homozygous mutation in the *VID24* gene

○Hiroaki Negoro, Atsushi Kotaka, Kengo Matsumura, Yoji Hata  
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

**Key words** malic acid, *VID24*, Homozygous mutation, Diploid sake yeast

## 1P-1p072 光トラッピング細胞融合法を用いた融合酵母によるホエー由来醸造飲料の開発

○山畑 直樹<sup>1</sup>, 田口 耕造<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学, <sup>2</sup>立命館大院・理工)  
wakayama@sk.ritsumeikan.ac.jp

【背景・目的】ホエーの成分は主にラクトース（乳糖）であり他にタンパク質、ミネラル、脂肪などが含まれる。チーズ生産時の主な副産物として大量に生産されるため、ホエーの工業的利用法が求められている。乾燥したホエーは 75% が炭水化物であるにもかかわらず、バイオエタノールの原料として利用し始めたのは最近である。原因として、ラクトースを資化できる微生物の種類が少ないことと、資化できたとしても発酵効率が悪く少量のエタノールしか生産できないことが挙げられる。例えば、チーズから単離された酵母の一種である *Kluyveromyces lactis* はラクトースを資化できるが、エタノール生産量は 4 v/v% 程度であり、醸造時間も 1 週間と時間がかかる。また、エタノール生産能が高く醸造用酵母としても広く利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はラクトースを資化することができない。そこで本研究では、ラクトース資化性の酵母とエタノール生産能の高い酵母を細胞融合させることで、両方の形質をもったハイブリッド酵母を作製することを目的とした。

【方法・結果】

1. 発酵試験 (目的: 親株の発酵特性を調べる。) 培地は 20 v/v% グルコースを含む YPD 培地を用いた。K. *lactis* は 3.3 v/v% のエタノールを生産し、S. *cerevisiae* は 12.2 v/v% のエタノールを生産した。
2. プロトプラスト化 (目的: 細胞同士を融合させるための条件検討を行う。) プロトプラスト化前後の細胞数を血球計算盤により測定し、最適なプロトプラスト化条件を定めた。
3. スクリーニング (目的: 親株と融合株を選別する方法を確立する。) 二種の親株の糖資化性、糖発酵性、エタノール耐性、安定生育温度を調べることで、親株と融合株とを分ける方法を考案した。単一炭素源としてラクトースを用いて 37℃ で培養すれば親株は生育せず、融合株だけが生育する。

### Production of fermented beverages made from whey by fused yeast using optical trapping method

○Naoki Yamahata<sup>1</sup>, Kozo Taguchi<sup>2</sup>, Mamoru Wakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. and Eng., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, cell fusion, Whey

1P-1p073 酢酸イソアミル高生産酵母における *ATF1* 発現制御機構

○大原 佑介, 猿渡 通代, 高橋 俊成, 山田 翼, 末野 和男  
(菊正宗酒造)  
y-ohara@kikumamasune.co.jp

酢酸イソアミルは主要な吟醸香の成分であり、酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase) により生成される。AATase をコードする *ATF1* の発現は不飽和脂肪酸により抑制されるので、酢酸イソアミルを高生産させるには原料米の精白度を高める必要がある。我々は低コストでフルーティーな清酒醸造を目指し、オーレオバジジン A 耐性を示す酵母変異株の中から、低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを親株の 2 倍以上生成する酵母変異株 (*hia* 株) を 4 株選抜した。清酒小仕込み試験の結果、製成酒の官能評価が最も高かった *hia1* 株では親株に比べ AATase 活性および *ATF1* 発現量が増加しており、培養時にリノール酸を添加してもそれらの低下は認められなかった。さらに *hia1* 株の全ゲノム解析を行った結果、*ATF1* の転写活性化因子である *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser706\*) が生じていることが明らかとなった。今回は、この変異型 *MGA2* が *ATF1* の発現制御に及ぼす影響について報告する。*hia* 株 4 株は独立した選抜により得られたため、同一クローンではない。4 株のゲノム DNA を等量ずつ混合後、全ゲノム解析を行った結果、出現頻度が 100% の SNP は *MGA2* (Ser706\*) のみであった。これは、得られた 4 株全ての *MGA2* に同様のホモ接合型ナンセンス変異が生じていることを示している。そこで、正常な *MGA2* または変異型 *MGA2* を BY4743 *dmg2* 株に導入し、*ATF1* の発現を調べたところ、変異型 *MGA2* の導入により *ATF1* の発現量が増加した。培養時にリノール酸を添加すると、正常な *MGA2* 導入株では *ATF1* の発現量が低下したが、変異型 *MGA2* 導入株では *ATF1* の発現量は低下するものの、リノール酸を添加しない場合の正常な *MGA2* 導入株と同レベルであった。以上の結果より、*MGA2* のナンセンス変異 (Ser706\*) が不飽和脂肪酸による *ATF1* 発現抑制を解除する一因であると考えられる。

Regulation of *ATF1* expression in yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity

○Yusuke Ohara, Michiyo Sawatari, Toshinari Takahashi, Tasuku Yamada, Kazuo Sueno  
(Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, *MGA2*, *ATF1*, isoamyl acetate

## 1P-1p074 国酒酵母の特異性

○森谷 千星, 門倉 利守, 金井 里紗, 義盛 光代, 安藤 周輝,  
数岡 孝幸, 中山 俊一, 竹田 正久, 田中 尚人, 鈴木 健一朗  
(東農大応生科・醸造)  
kadokura@nodai.ac.jp

【目的】国酒である清酒、焼酎、泡盛の醸造に使用される清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母を、当研究室では国酒酵母と呼んでいる。これら国酒酵母は The YEASTS, 5th Edit.において、*Saccharomyces cerevisiae* の synonym とされている。しかし、The YEASTS, 5th Edit. の key to species では、必ずしも *S. cerevisiae* には同定されず、分類学的に矛盾が生じている。また、これまでに提唱してきた当研究室での独自の指標では、清酒酵母は他の *Saccharomyces* 属との区別が可能であり、国酒酵母においてもそれぞれ特徴的な性質があることが考えられる。そこで本報告では、当研究室の独自の指標により国酒酵母について比較検討した。

【方法および結果】平成 27 年度本大会同様に、清酒酵母 *S. sake25* 株、焼酎酵母 31 株 (1964 年分離株 28 株)、泡盛酵母 16 株 (1964 年分離株 13 株) を用いて、独自の指標の一部であるビタミン欠培地での増殖、33°C におけるメレジトースの資化性、カリウム欠培地での増殖、SDS-PAGE による GAPDH アイソザイムパターンの比較、AWA1 遺伝子断片の有無、rDNA による分子系統学的解析を行った。国酒酵母は、世界的な酵母の分類学においては *S. cerevisiae* であるが、*S. cerevisiae* および *Saccharomyces sensu strict* とは区別することが可能であり、国酒酵母である清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母はそれぞれで特異性を有するものと考えられた。

## Species specificity of Japanese kokushu yeast

○Chise Moriya, Toshimori Kadokura, Risa Kanai, Mitsuyo Yoshimori, Shuki Ando, Takayuki Kazuoka, Syunichi Nakayama, Masahisa Takeda, Naoto Tanaka, Kenichiro Suzuki  
(Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

**Key words** sake yeast, shochu yeast, awamori yeast, taxonomy

## 1P-1p075 ビルビン酸低減清酒酵母 TCR7 の異数性染色体と醸造特性

○田口 誠我<sup>1</sup>, 澤田 和敬<sup>3,4</sup>, 浜島 弘史<sup>2</sup>, 赤尾 健<sup>5</sup>, 野口 秀樹<sup>6</sup>,  
豊田 敦<sup>6</sup>, 藤山 秋佐夫<sup>6,7</sup>, 北垣 浩志<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>佐賀大・農, <sup>3</sup>鹿児島大院・連農科, <sup>4</sup>佐賀県工  
技セ, <sup>5</sup>酒総研, <sup>6</sup>遺伝学研, <sup>7</sup>総研大・遺伝)  
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

## 【背景と目的】

近年、消費者のアルコール離れが進む中で低アルコール清酒市場は数少ない成長市場である。当研究室では低アルコール清酒の製造に適した清酒酵母として、オフフレーバーの原因となるビルビン酸の残存を防ぐ清酒酵母 TCR7 の育種を行った。TCR7 は、協会 7 号酵母の突然変異株で、ビルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤である  $\alpha$  トランスシアンノ桂皮酸の耐性を指標として選抜したものであったが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで、そのゲノムを次世代ゲノムシーケンサー HiSeq2500 で解析したところ、11, 14 番染色体が参照株の染色体の 1.5 倍のシグナル量を示し、異数性を持つことが示唆された。このことから TCR7 の real time PCR を用いたゲノム解析と清酒小仕込み後の醗中の有機酸解析を行い、異数性染色体とビルビン酸低減性との関係性を調べた。

## 【方法・結果】

異数性染色体が醗中のビルビン酸の低減に影響を与えているかを調べるにあたって遺伝的バックグラウンドを揃えるために TCR7 の一倍体を取得する必要があった。まず一倍体取得実験を行ったところ 46 株取得することに成功した。次にこれらのゲノムを real time PCR で解析を行った結果、ある TCR7 一倍体株では 11 番染色体上にある遺伝子 ZRT3 が、参照株よりも 2.17±0.07 倍増加していたことから、この株の 11 番染色体が 1 本から 2 本になっていると考えられた。さらに、TCR7 一倍体株を用いて小仕込みを行ったところ、2 本の異数性染色体を持つ一倍体株では、1 本のみ異数性染色体を持つ一倍体株よりも醗中のビルビン酸濃度が低い傾向にあった。これらの結果から、異数性染色体の本数と醗中のビルビン酸濃度に関係性があることが示唆された。

## Aneuploidy of pyruvate-underproducing sake yeast TCR7

○Seiga Taguchi<sup>1</sup>, Kazutaka Sawada<sup>3,4</sup>, Hiroshi Hamajima<sup>2</sup>, Takeshi Akao<sup>5</sup>,  
Hideki Noguchi<sup>6</sup>, Atushi Toyoda<sup>6</sup>, Asao Fujiyama<sup>6,7</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agri. Saga Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Saga Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agri. Sci.  
Kagoshima Univ., <sup>4</sup>Ind. Technol. Center Saga, <sup>5</sup>NRIB, <sup>6</sup>NIG, <sup>7</sup>Grad. Univ. Adv.  
Stud.)

**Key words** sake yeast, genome, pyruvate, NGS

1P-1p076 超音波照射下における酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の増殖促進機構の解明

○江口 夏帆, 胡 宏海, 野口 明徳, 小柳 壽  
(石川県立大院・生資環・食品)  
koyataka@ishikawa-pu.ac.jp

味噌、醤油、アルコール飲料などの製造において最も多くの時間が割かれるのは、酵母による発酵工程であり、生産性向上のための時間短縮化が求められている。近年、超音波による微生物の増殖・代謝促進が報告されているが、本技術による発酵促進技術のさらなる発展のためにはメカニズム解明が不可欠である。本研究ではこれまで、超音波照射に伴う酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株及び K-7 株の生理状態の変化について精緻に調べており、DNA マイクロアレイにより 37 遺伝子について両酵母株に共通した発現量変動を確認している。Real-time PCR 解析により両株の変動遺伝子の詳細を調べた結果、細胞膜合成遺伝子 (*INO1*, *OPB3*) や、細胞壁マンノプロテイン遺伝子 (*CWP1/DAN1/TIR*) が特徴的に発現変動していること、これらの発現変動の特徴が高圧・低温条件下で培養した酵母と共通していることから、同条件下と類似したストレスが細胞壁・膜に与えられたと考えられた。

高圧・低温条件下での酵母増殖阻害の一因として細胞膜の流動性低下によるアミノ酸、特にトリプトファンの取り込み阻害が報告されているが、超音波照射した酵母には同現象は認められず逆に増殖促進が起こっていることから、類似したストレスを受けながらも細胞応答に相違があることが確かめられた。また、細胞周期をフローサイトメトリーにより経時的に測定したところ、超音波照射した酵母細胞は定常期到達までの時間が短縮していることが示唆された。現在、細胞の環境適応の要である細胞膜の状態を調べるため、細胞膜の脂肪酸組成を解析中である。

Elucidation of the growth stimulation mechanism of ultrasound-irradiated *Saccharomyces cerevisiae*.

○Kaho Eguchi, Honghai Hu, Akinori Noguchi, Takashi Koyanagi  
(Dept. Food Sci., Ishikawa Prefectural Univ.)

**Key words** ultrasound irradiation, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, growth stimulation

**1P-1p077 有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析**

○山元 翔太<sup>1</sup>, 清 啓自<sup>1</sup>, 久保田 恵理<sup>2</sup>, 兼崎 友<sup>2</sup>, 矢嶋 俊介<sup>2</sup>,  
門倉 利守<sup>1</sup>, 鈴木 健一<sup>1</sup>, 中山 俊一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東農大・応生科・醸造, <sup>2</sup>東農大・ゲノムセ)  
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】酒質の多様化を目的とし、清酒酵母 K901 を親株に呼吸阻害剤である 2,4-dinitrophenol(DNP)に耐性を示し有機酸生成量に顕著な差がみられる変異株を取得している。中でも DNPR89 の YM10 培地における有機酸生成量は親株である K 901 と比較してリンゴ酸は 29.4%、コハク酸は 61.4%、酢酸は 41.3% に低下した。本研究では RNA-seq 法により網羅的に転写量を比較解析することで DNPR89 の低有機酸生成機構の解明を試みた。

【方法・結果】最も有機酸生成量が多い培養 36 時間の転写量を比較した。酢酸合成に関して、細胞質においてアセトアルデヒドを酢酸に変換する *ALD6*(Aldehyde dehydrogenase)の DNPR89 における転写量は親株と比較して 46.8% に低下しており、その酵素活性も 61.7% に低下していた。また、ミトコンドリアにおいてアセトアルデヒドを酢酸に変換する *ALD4* の発現量も 44.6% に低下しており合成に関与する遺伝子群の転写量の減少が確認された。一方、酢酸代謝に関連した酢酸を Acetyl CoA に変換する *ACSI* と *ACS2*(Acetyl-coA synthetase)の転写量もそれぞれ 67.7%、59.5% に低下していた。酢酸を唯一の炭素源とした時の DNPR89 の生育能を調べたところ、親株と比較して顕著に生育能が低下していた。以上のことから、酢酸生成能の低下は活発な酢酸代謝の結果ではなく、酢酸の生合成能の低下によることが推察された。同様にリンゴ酸とコハク酸の低生成機構についても合わせて報告する。

**Global expression analysis of low organic acid producing mutant derived from Kyokai 901**

○Shota Yamamoto<sup>1</sup>, Keiji Kiyoshi<sup>1</sup>, Eri Kubota<sup>2</sup>, Yu Knesaki<sup>2</sup>, Shunsuke Yazima<sup>2</sup>,  
Tosimori Kadokura<sup>1</sup>, Kenichiro Suzuki<sup>1</sup>, Shunichi Nakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept.Ferment,Sci., Tokyo Univ. Agric., <sup>2</sup>Genome Res.Center,Tokyo Univ.Agric)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, organic acid, RNA-seq

**1P-1p078 香気成分改変焼酎開発のための酵母の探索及び育種**

○蕪 卓弥, 山本 佳奈子, 西森 大貴, 門倉 利守, 鈴木 健一,  
中山 俊一  
(東農大・応生科・醸造)  
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】焼酎の香気成分は原料由来の成分と酵母が生成する成分が主であるため、多様な酵母を用いて醸造することで焼酎の酒質の多様化が期待される。清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母、ワイン酵母はアルコール・有機酸生成能等で異なる性質を示すため、生成する香気成分にも差異がある可能性が高い。そのためこれらの醸造酵母を使用することで異なる香気を示す焼酎の醸造が可能になることが期待される。さらに、これらの醸造酵母の育種によりその特徴を伸ばすことが可能であることも予想される。そこで本研究では新規で多様な香気を示す醸造酵母の取得を目的としその選別と育種を行った。

【結果】焼酎・泡盛・清酒・ワイン醸造に用いられる酵母の中からクエン酸耐性能力が高い 12 株を選別し芋焼酎の小仕込試験後、香気成分の測定及び官能評価により酒質を比較した。香気成分量について主成分分析したところ醸造酵母群によって香気成分の生成パターンが異なり、異なる醸造酵母を用いることによって多様な香気成分の芋焼酎が醸造可能であることが明らかになった。また用いた株の中で最も香気成分量が少なかった SH4 株を用いた場合、香気成分量の多かった他の醸造酵母と比較して官能評価において素晴らしい香りがするという評価を多く得た。このことは香気成分量が少ないことで原料由来の香りを引き出すことができることを示唆している。そこで SH4 を親株とし 2,4-Dinitrophenol 耐性を指標とし香気成分低減変異株を取得した。その結果、ethyl acetate、isobutyl alcohol、phenylethyl acetate、β-phenylethylalcohol が減少した株は官能評価において SH4 よりも芋の香りが強かった。以上の様に、様々な醸造酵母や育種株を用いることで多様な酒質を示す焼酎醸造が可能であることが示された。

**Isolation and breeding of yeast showing different aroma component in shochu brewing**

○Takuya Kabura, Kanako Yamamoto, Hirotaka Nisimori, Tosimori Kadokura,  
Kennitrou Suzuki, Syunniti Nakayama  
(Dept.Ferment,Sci., Tokyo,Univ.Agric)

**Key words** shochu, *Saccharomyces cerevisiae*

**1P-1p079 酵母における TTC 還元に関与する因子の特定**

○田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一, 中山 俊一  
(東農大・農)  
s3nakaya@nodai.ac.jp

【目的】還元されることで赤色を呈する TTC(2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride) 染色試験とは、生体の代謝活性を測定する試験方法の一つであり、醸造分野においては酵母の識別等で利用されている。TTC 染色性はミトコンドリア活性の指標でもあるが、酵母において TTC 還元に関与する酵素は明らかにされていない。そこで本研究では、特に電子伝達系の遺伝子群を標的とし遺伝子破壊株を取得することで TTC 還元を担う酵素の解明を目的とした。

【結果】 TTC 染色性を示さない実験室酵母 BY4741 に *URA3* を導入した株 BY4741U は赤色を呈することから、*URA3* の相補により TTC 染色性が向上することを明らかとした。この BY4741U を親株とし、電子伝達系に関与する遺伝子群を破壊したところ Complex III のサブユニットである *COR1*、Complex IV のサブユニットである *COX4* の破壊株において TTC 染色性を失ったことから、これら電子伝達系の酵素が TTC 染色性に関与することが明らかとなった。また、BY4741U を親株とした *COR1* 破壊株と *COX4* 破壊株における Complex III、Complex IV の酵素活性を比較したところ、*COR1* 破壊株における Complex IV の酵素活性は低下していなかったのに対して、*COX4* 破壊株における Complex III の酵素活性は低下していた。以上のことから、TTC は Complex IV で還元され電子伝達系の活性が低下することでも染色性が低下することが示唆された。

**Identification of enzymes related to TTC reduction in yeast**

○Junpei Tanaka, Toshimori Kadokura, Kenichiro Suzuki, Shunichi Nakayama  
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, TTC staining, gene disruption, mitochondria

**1P-1p080 清酒麹菌 *A. oryzae* 由来 *ΔocpO* の酒質特性と ACP アイソザイム遺伝子の発現**

○山下 伸雄, 玉田 佳大, 浅井 拓也, 明石 貴裕  
(白鶴酒造)  
yamashita@hakutsuru.co.jp

【背景・目的】実用清酒麹菌 *A. oryzae* より酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) の一つであるカルボキシペプチダーゼ O をコードする遺伝子 *ocpO* を欠失させた株を取得した結果、米麹の ACP 力価は親株の約 1/3 に大きく減少した。その酒質について一部報告したが<sup>1)</sup>、製成酒のアミノ酸は減少したものの、ACP 力価のよりに大きな変化ではなかった。この現象を解明するための実験を行うとともに、*ΔocpO* 株由来の製成酒の官能特性を含めた酒質を詳細に評価することにした。

【方法・結果】液体培養および固体培養(製麹)において、対数増殖期の菌体より RNA を抽出し、発現解析を行ったところ、ACP アイソザイムをコードする *ocpA* が固体培養特異的に突出して発現していた。また *ocpB* も野生型の *ocpO* よりも発現量が高い傾向にあった。このことが *ocpO* を破壊しても、醗中のカルボキシペプチダーゼ活性がそれほど低下せず、アミノ酸が生成する要因ではないかと推察した。この点について検討を行うとともに、*ΔocpO* で醸成した清酒のジペプチド分析の他、味覚センサー等を用いた官能評価を行った。

1)山下ら：日本生物工学会 2015 年度大会

**Brewing characteristics of *ocpO* disruptants from *A. oryzae* and expressions of carboxypeptidase genes**

○Nobuo Yamashita, Yoshihiro Tamada, Takuya Asai, Takahiro Akashi  
(Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd.)

**Key words** acid carboxypeptidase, sake, *Aspergillus oryzae*

**1P-1p081 白麹菌グリコシルセラミドがヒト表皮角化初代培養細胞の皮膚バリア機能の遺伝子発現に及ぼす影響の解析**

○藤川 彩美<sup>1</sup>, 阪本 真由子<sup>1</sup>, 松永 陽香<sup>1</sup>, 酒谷 真以<sup>1</sup>, 尾上 貴俊<sup>2</sup>, 北村 整一<sup>2</sup>, 鏑田 仁人<sup>2</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 戸田 修二<sup>3</sup>, 北垣 浩志<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大・農, <sup>2</sup>東洋新薬, <sup>3</sup>佐賀大・医)  
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

【背景と目的】 麹を含んだ発酵食品などの素材は日本で長年保湿剤、化粧品として安全に使われてきた経験があるが、どの成分が保湿に寄与しているかはわかっていなかった。一方、我々は麹を形成する白麹菌 *Aspergillus kawachii* に独自のグリコシルセラミド(GC)が多量に含まれていることを見出してきた<sup>1)</sup>。これまでに白麹菌由来の GC を含む弱アルカリ耐性脂質画分が、ヒト表皮角化初代培養細胞のバリア機能を改善することを確認している。本研究では、GC 単体由来する効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】 白麹菌を液体培養した後クロロホルム・メタノール溶液で脂質を抽出した。抽出物からシリカゲルクロマトグラフィー及び HPLC を用いて GC を精製し、ヒト表皮角化初代培養細胞 (PromoCell, Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) adult, single donor) に添加した。細胞を 48 時間培養した後、RNA を抽出精製し、定量 real time PCR により遺伝子発現を測定した。

【結果と考察】 白麹菌 GC20 $\mu$ g/mL の添加群では、無添加群と比較して表皮のタイトジャンクション形成に関与する遺伝子 OCLN と脂質の輸送に関与する遺伝子 ABCA12 がそれぞれ平均して 1.4 倍、1.5 倍の充進した発現量を示した (n=6, p<0.05)。この結果は、白麹菌 GC が皮膚のバリア機能を改善する可能性を示唆している。今後は GC 以外の複雑成分が皮膚バリア機能に及ぼす影響についても着目し、研究を進めていきたい。

1) J. Agric. Food Chem., 60 (46), 11473-82 (2012)

**The effect of glycosylceramide from *Aspergillus kawachii* on the barrier function of human skin cells**

○Ayami Fujikawa<sup>1</sup>, Mayuko Sakamoto<sup>1</sup>, Haruka Matsunaga<sup>1</sup>, Mai Sakatani<sup>1</sup>, Takatoshi Ogami<sup>2</sup>, Seiichi Kitamura<sup>2</sup>, Masahito Tsubata<sup>2</sup>, Hiroshi Hamajima<sup>1</sup>, Shuji Toda<sup>3</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Saga Univ., <sup>2</sup>Toyoshinyaku Co., Ltd., <sup>3</sup>Fac. Med., Saga Univ.)

**Key words** skin barrier, glycosylceramide, *Aspergillus kawachii*

**1P-1p082 沖縄県の実験室から採取した黒アスペルギルス菌の分子系統解析**

伊勢 孝太郎<sup>1</sup>, 鼠尾 まい子<sup>1</sup>, 東 春奈<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>2</sup>, 外山 博英<sup>3</sup>,  
○塚原 正俊<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>バイオジェット, <sup>2</sup>日大・生資科, <sup>3</sup>琉球大・農)  
tsuka@biojet.jp

【背景と目的】 黒麹菌は、沖縄県の特産品である泡盛の醸造を支える重要な微生物である。我々は、黒麹菌株の違いによる泡盛品質への影響の解析や新たな泡盛黒麹菌の開発と共に、黒麹菌の由来や地域特性の解明による泡盛振興を目指した取り組みを進めている。近年、黒麹菌は *Aspergillus luchuensis* として再分類され *A. niger* とは別種であることが明確に示された (Yamada et al., J. Biosci. Bioeng., 112, 233-237, 2011)。今回、黒アスペルギルス菌の詳細な分子系統解析が可能な手法について検討し、沖縄県の実験室から採取した複数の黒アスペルギルス菌株を対象とした解析を行った。

【方法・結果】 泡盛黒麹菌株、および沖縄県各地より単離した黒アスペルギルス菌株から DNA を抽出し、断片化、ライブラリー作成を行い、次世代シーケンサー Miseq (イルミナ) による全ゲノム情報を得た。得られたリードについて *A. luchuensis* NBRC4314 株をリファレンスとしてマッピングを行い、それぞれの菌株の情報も抽出した。まず、ITS や  $\beta$ -tubulin など複数遺伝子を対象として解析したところ、*A. luchuensis* および *A. niger* の分別ができたものの、*A. luchuensis* 内での違いはほとんど検出できなかった。次に、ミトコンドリア DNA の全長約 30K 塩基を対象とした解析を行ったところ、*A. luchuensis* をいくつかのグループに分けることができた。さらに、ゲノムの全 SNP を対象とした解析を行ったところ、*A. luchuensis* 間の詳細な差異を検出することができた。これらの手法を用いて、沖縄県の実験室から採取した黒麹菌群を解析した結果、複数のグループに分けられることが明らかとなった。

**Molecular phylogenetic analysis of the black *Aspergillus* strains isolated from the field in Okinawa**

Kotaro Ise<sup>1</sup>, Maiko Nezu<sup>1</sup>, Haruna Azuma<sup>1</sup>, Taisuke Watanabe<sup>2</sup>, Hirohide Toyama<sup>3</sup>,  
○Masatoshi Tsukahara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Biojet, <sup>2</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

**Key words** *Aspergillus luchuensis*, *Awamori*, fungus, phylogenetic analysis

**1P-1p083 清酒オリゴペプチドに関する米グルテリンタンパク質の米粒内局在解析**

○高橋 圭, 河野 弘美, 奥田 将生  
(酒総研)  
k.takahashi@nrib.go.jp

**【背景と目的】**

清酒を含む醸造酒はジペプチド・トリペプチドを中心に様々な低分子オリゴペプチドを含んでおり、呈味や生理機能に影響を与える可能性が期待されている。特に清酒には、ビールやワインと比べて豊富で多様なジペプチドが含まれることが分かっている(文献 1)。我々の最近の研究から、吟醸酒の特定の低分子オリゴペプチドは、吟醸香の認知と相関し(文献 2)、吟醸酒の品質の高さと相関することが分かってきた(文献 3)。

一方、清酒の低分子オリゴペプチドは、原料米のグルテリンタンパク質のアミノ酸配列を大きく反映することも示唆されている(文献 1)。グルテリンは複数種類の遺伝子から成り、米タンパク質の約 50~60% をも占め、しかも消化酵素による分解を受けやすい性質から、醸造微生物の栄養状態及び清酒のオリゴペプチド組成に大きく影響すると考えられるため、米グルテリンの米品種やイネ栽培環境、或いは精米歩合による変動・影響を調べることは、醸造学の観点から重要である。そこで本研究では、米グルテリンタンパク質の米粒内局在・分布について明らかにすることを目的とした。

**【方法と結果】**

2009~2012 年度に収穫した米 7 品種を用い、米の外側から内側まで 4 つに分画した米粉末に対し、5 種類の抗グルテリン抗体を用いたイムノプロットにより発現強度を解析した他、イネ(山田錦・日本晴)開花後 17 日目の未成熟米について、免疫蛍光染色により米粒内の局在を解析した。その結果、概ね米の内側に比べて米の外側に多い順から GluA, GluB-4/5, GluB-1, GluD, GluC-1 であり、グルテリンサブタイプによって蓄積場所が異なることが明らかとなった。

文献 1 J Chromatogr. A 1242, 17-25 (2012); 文献 2 JBB 121, 274-280 (2016); 文献 3 PLoS ONE 11(3): e0150524 (2016)

**Localization of seed storage proteins in rice grain; Evidence for glutelin subtype-dependent localization**

○Kei Takahashi, Hiromi Kohno, Masaki Okuda  
(National Research Institute of Brewing)

**Key words** Japanese sake, oligopeptide, rice protein, distribution

**1P-1p084 植物エキス発酵飲料に含まれるアミノ酸**

○川添 直樹, 山森 昭, 岡田 秀紀  
(大高酵素・総研)  
date-lab@ohtakakohso.co.jp

【目的】 植物エキス発酵飲料 (FPE) は数十種の植物原料等からシロ糖の浸透圧を利用してエキスを抽出し、酵母や乳酸菌等により 37℃ で 180 日以上発酵・熟成させて製造した飲料である。この FPE 製造に関わる発酵微生物は製造環境中に定着しており、特に植物エキスの抽出工程時に自然に取り込まれるよう調整されている。FPE の機能性について調査したところ、FPE 投与によるラットの生涯飼育試験において寿命延長効果を示し、さらに白血病の自然発症率も減少した<sup>1)</sup>。また幾つかの抗酸化物質が存在し、ラットのアルコール性胃粘膜障害の抑制効果を有することを明らかにした<sup>2)</sup>。近年では十数種のオリゴ糖の存在も確認され、そのうち数種は新規オリゴ糖であった<sup>3)</sup>。この様に FPE には未解明な機能性物質が存在する可能性が示唆され、様々な視点から研究を行っている。本研究では FPE に存在するアミノ酸に着目し調査を行った。

【方法と結果】 FPE は SP-Toyopearl 650M を用いたイオン交換により単糖類を除去した後、吸着画分を濃縮しアミノ酸含有試料を得た。この試料を OPA および Dabsyl-Cl を用いて誘導体化し、HPLC によりアミノ酸分析を行った。OPA による HPLC 分析の結果、数種のアミノ酸のピークが検出され、D-alanine の溶出時間と一致するピークも確認された。また、両誘導体化法により GABA と溶出時間が一致するピークも確認された。GABA はすでに機能性が知られており、また D 体のアミノ酸もその機能性が近年注目されている。これらの FPE 中に含まれているアミノ酸類が、FPE における味質や機能性の一端を担っている可能性が示唆されたので、その生成量や生成過程、さらには未同定のピーク等も現在調査中である。

- 1) 阿部ら、第 38 回日本実験動物学会 (1991) 札幌
- 2) 岡田ら、日本栄養・食糧学会誌 58. 209 - 215 (2005)
- 3) Okada et al., Carbohydr Res., 345, 414-418 (2010)

**Amino acid in fermented beverage of plant extracts**

○Naoki Kawazoe, Akira Yamamori, Hideki Okada  
(Gen. Inst. Ohtakakohso Co., LTD.)

**Key words** amino acid, D-alanine, GABA, fermented beverage of plant extracts

## 1P-1p085 大豆可溶化のための大豆ボディ構造体に関する研究

○橋本 恭兵, 笠井 尚哉  
(阪府大院・生環科)  
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

大豆は良質な脂質やタンパク質を豊富に含み、世界生産量は3億トン以上にもなる非常に重要な食品・発酵・飼料素材である。しかしながら、大豆自体の構成組織やその特徴は十分に解明されておらず、未だ十分な食品・発酵・飼料素材としての利用がなされていない。大豆細胞を構成する組織の中でも大豆ボディ構造体(DBCSS)はオイルボディやプロテインボディを貯蔵する最も主要な構成組織であり、主に膠着性のタンパク質からなり、強アルカリ条件下でないと可溶化されないことからその利用が困難であった。そこでDBCSSの組織の解明と中性から酸性域での可溶化酵素やその生産菌の探索を試みた。DBCSSは生大豆を単細胞化処理(オートクレーブ121℃、20分間)後、選抜されたセルラーゼ(合同酒精製GODO-TCF)、ペクチナーゼ(Novozymes製Pectinex Ultra SP-L)を用いた1次細胞壁、2次細胞壁の可溶化除去、脱脂を行い、分離調製し、これを用いた探索によってDBCSSに対し中性域で組織の約50%~70%程度の可溶化活性を持つ市販プロテアーゼ(GENENCOR製Protex 7L)を見出した。また、分解抵抗性組織解明のために、生大豆、脱脂大豆及び豆乳より調製したDBCSSおよびその分解残渣を用いてアミノ酸分析、熱分解マスペクトル分析、酵素反応の位相差顕微鏡観察などを行い組織の解明を試みた。DBCSSの主要成分はタンパク質であったが、中性プロテアーゼ処理、アルカリプロテアーゼ処理、アルカリ抽出処理の段階ごとに残存アミノ酸量が減少することが判明し、熱分解マスペクトル分析では特にアルカリ抽出処理残渣に脂肪族系のフラグメントが確認された。また、完全可溶化達成のための、脱脂大豆由来DBCSS中性プロテアーゼ残渣を用いて可溶化に伴うハロ観察による抵抗性DBCSS可溶化酵素生産菌の探索など、更に検討を行っている。

## Studies on body complex for solubilization of soybean seed

○Kyohei Hashimoto, Naoya Kasai  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** soybean, protein

## 1P-1p086 未熟練 QDA パネリストによる官能評価値のフードメタボロミクスへの運用の提案

○富尾 紋子<sup>1</sup>, 早川 文代<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup>農研機構・食品研)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】QDA法(Quantitative Descriptive Analysis: 定量的記述分析法)は、食品の二次機能を定量的に表現するための優れた方法の一つである。近年、QDAとメタボローム情報との相関の解析から、食品のおいしさに関わる品質特性成分を探る試みがなされている。しかし、QDAの確立にはパネリストの習熟やパネリスト間のバラツキを抑えるためのキャリブレーションなどを行う必要がある。多大な時間と労力を要する。本研究は習熟訓練途上のQDAパネリストによるバラツキのある官能評価値の有効運用法を検討した。

## 【材料と方法】

植物工場で栽培したミニトマト8品種を用いた。9名のパネリストにより24項目の官能評価項目について150点満点の評価値をつけた。GCMSによる低分子水溶性成分の網羅的分析によりメタボローム情報を得た。多変量解析にはPCA、ピアソン相関等を試行した。

【結果と考察】本研究で用いた官能評価値はQDA法の訓練途中の試し評価の値である。また、評価には各パネリストが別個体のミニトマトを食している。そのため、ミニトマト品種間よりもパネリスト間(またはミニトマト個体間)でのバラツキが大きく平均値を代表値として用いる妥当性に疑問が生じたため、数値の選抜法、外れ値の規定の基準について考察した。さらに、官能評価値を順位に換算して品種間の差を表現することを試みた。順位換算によって情報量は減少するが、品種間の差の表現においては解析品質の向上が示唆された。当該解析法により熟練途上のQDAパネリストのデータであっても一定のレベルでフードメタボロミクスに運用できる可能性が示された。

## Suggestion for operation of sensory value generated by unskilled QDA panelists to food metabolomics

○Ayako Tomio<sup>1</sup>, Fumiyo Hayakawa<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Food Research Institute, NARO)

**Key words** metabolomics, sensory evaluation, mini-tomato

## 1P-1p087 メタボローム解析による GABA 含有発酵乳に含まれるユニークな代謝産物の探索

○萩 達朗, 小林 美穂, 野村 将  
(農研機構・畜産部門)  
thagi@affrc.go.jp

【背景と目的】発酵乳の製造過程で、乳酸菌によるカゼイン分解や乳酸発酵などによって多種多様な代謝産物が生み出されるが、発酵に用いる乳酸菌の種類によって発酵乳中の代謝産物の量や種類が異なる。そのため、発酵乳の品質評価や機能性物質の探索を目的として、様々な発酵乳をターゲットとしてその中に含まれる物質の同定が進められている。本研究では、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)を生産する *Lactococcus lactis* を用いて GABA を多く含むユニークな発酵乳を作製し、GABA 発酵乳に含まれる代謝産物をメタボローム解析で明らかにすることとした。

【方法】GABA を生産しない乳酸菌 *L. lactis* 01-1 株と GABA 生産菌 01-7 株をスキムミルク培地に接種し、30℃・48 時間培養して発酵乳を製造した。なお、01-1 株のみで製造した発酵乳をコントロールとした。GABA 含有発酵乳とコントロールに含まれる代謝産物を CE-TOFMS で解析し、代謝パスウェイとの照合を行ったほか、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性ペプチドを探索するとともに、各発酵乳の ACE 阻害活性を調べた。

【結果と考察】コントロール発酵乳と比較し、GABA 含有発酵乳には GABA 以外にオルニチンが23倍多く含まれていた。これは、アルギニンからシトルリンを経てオルニチンが生産されるアルギニンデイミナーゼ経路によるものと考えられる。また、GABA 含有発酵乳ではクエン酸が完全に代謝され、その代謝産物と考えられるオキソグルタル酸の量が数倍増加していた。ペプチドについては、ラクトリペプチドとして知られる Val-Pro-Pro をはじめ、ACE 阻害活性を有していると推定されるペプチドが GABA 含有発酵乳に多く含まれており、それを反映するように、GABA 発酵乳中の ACE 阻害活性はコントロールよりも高い傾向であった。なお本研究は、「SIP(次世代農林水産業創造技術)委託研究」(農研機構)によって実施された。

## Metabolomics approach to screening for unique metabolites in GABA-rich fermented milk

○Tatsuro Hagi, Miho Kobayashi, Masaru Nomura  
(NILGS)

**Key words** *Lactococcus lactis*, GABA, fermented milk, metabolome

## 1P-1p088 パン生地発酵過程における代謝産物変化

○中村 敏英, 富田 理, 齋藤 勝一  
(農研機構・食品研)  
nakamrto@affrc.go.jp

【背景・目的】パン作りにおいて、パン酵母による生地の発酵は非常に重要な工程であり、製品の品質(香りや膨らみ等)に大きな影響を与える。これまでにパン生地の代謝産物を網羅的に且つ経時的に解析した報告はない。そこで発酵過程のパン生地中の揮発性成分および水溶性成分の変動について明らかにするために、経時的にメタボローム解析を行った。また、生地の発酵は短すぎても長すぎても膨らみが悪くなり、発酵完了のタイミングを判断することは難しい。パン生地発酵過程における代謝産物の変化と焼成パンの比容積との相関が明らかになれば、発酵完了のタイミングを客観的に判断できる可能性もあると考えられる。

【方法・結果】パン生地は通常の発酵工程およびガス抜きをしない工程で作成し、それぞれの生地を経時的にサンプリングして解析を行った。水溶性成分については、パン生地を凍結乾燥、メタノール水溶液抽出の後、減圧乾固したものを重水に溶解し NMR スペクトルの測定を行った。その結果、水溶性成分については経時的な変化はみられたが、ガス抜きの影響は経時変化に比べて小さいことが示された。また、パン生地の揮発性成分については、パン生地を専用バイアルに入れ、短時間の加熱処理後にヘッドスペース部分の成分を SPME ファイバーで捕集して GC/MS で測定した。揮発性成分については経時的な変化以外にも焼成パンの比容積と相関がみられる代謝産物を確認することができた。

## Changes of metabolites in the dough during fermentation

○Toshihide Nakamura, Satoru Tomita, Katsuchi Saito  
(NRFI)

**Key words** dough fermenton, SPME-GC/MS, <sup>1</sup>NMR, metabolomics

## 1P-1p089 麹甘酒とその乳酸発酵物のメタボローム解析

○倉橋 敦<sup>1</sup>, 小黒 芳史<sup>1</sup>, 西脇 俊和<sup>2</sup>, 小林 和也<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>八海醸造・研究開発, <sup>2</sup>新潟農総研・食研セ)  
 a.kurahashi@hakkaisan.jp

【目的】我が国の伝統的米発酵飲料である麹甘酒は、その栄養価の高さから「飲む点滴」と言われている。しかしながら、その含有成分に関する研究は意外に少なく、網羅的な解析の例はない。そこで、麹甘酒の含有成分の把握を目的としてメタボローム解析を行った。さらに、甘酒の風味及び成分改質を目的に乳酸菌発酵株 (*Lactobacillus sakei* UONUMA) を用いて乳酸発酵した試料についても解析を行ったので併せて報告する。本株は、新潟県魚沼地域の雪室で保存した発酵食品から分離され、低温でも速やかに増殖でき酸の生成が少ないという特徴を有する<sup>1)</sup>。

【方法】麹甘酒は、精米歩合 60% 米から製麹した麹と水のみを用いて作製した。この麹甘酒に、乳酸菌発酵株を接種して適当な pH となった時点で殺菌し、これを麹甘酒の乳酸発酵物とした。これらについて、イオン性代謝産物を CE-TOFMS によって、脂溶性代謝産物を LC-TOFMS によって網羅的に検出した。

【結果】CE-TOFMS 及び LC-TOFMS による分析の結果、甘酒で 353 物質、乳酸発酵甘酒で 324 物質が検出され、そのうち甘酒だけで検出された物質が 11、乳酸発酵甘酒だけで検出された物質が 13 あった。一般に言われるように糖はグルコースが主成分であり、アミノ酸やビタミン B 群が豊富であることを再確認した。その他にも有機酸、脂肪酸、核酸、アミン、ジペプチド等の組成を明らかにした。また、乳酸発酵によりシトルリンやオルニチン、細胞膜構成成分と考えられるオレイン酸やリノレン酸が増加した。さらに、セロトニンを含めていくつかの物質が新生しており興味深い結果を得た。本解析によって、麹甘酒とその乳酸発酵物の基盤的情報が得られ、麹甘酒の栄養機能性解析を進める上で重要な知見となった。

1) 新規乳酸菌およびこの乳酸菌を利用した発酵食品の製造方法、新潟県、特許第 5577559 号 (2014)

## Metabolomics of amazake using rice koji and its lactic acid fermentation products

○Atsushi Kurahashi<sup>1</sup>, Yoshifumi Oguro<sup>1</sup>, Toshikazu Nishiwaki<sup>2</sup>, Kazuya Kobayashi<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>R&D center, Hakkaisan Brewery Co., Ltd., <sup>2</sup>Food Res. center, Niigata Agricultural Res. Inst.)

**Key words** amazake, koji, lactic acid fermentation, *Lactobacillus sakei*

## 1P-1p090 乳酸発酵甘酒の水溶性成分および揮発性成分のプロファイル解析

○富田 理, 齋藤 勝一, 中村 敏英  
 (農研機構・食品研)  
 s.tomita@affrc.go.jp

【背景・目的】甘酒は日本固有の伝統的発酵飲料である。甘酒は栄養価に優れ、夏季の健康維持を助ける食品として古くから親しまれてきた。現在も各地の醸造企業において甘酒が製造されているが、近年では甘酒をさらに乳酸発酵させた新規飲料が開発されている。乳酸の爽やかな風味を付与するだけでなく、保存性の向上や、乳酸菌とその発酵産物による健康増進効果も期待できる。本研究では乳酸発酵甘酒の成分プロファイルを明らかにし、既存の製品間での特徴解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】試料として乳酸発酵甘酒 10 点と、比較対象として甘酒 7 点を用いた。これらの pH はそれぞれ 3.1-3.9 および 5.0-5.7 であり、甘味・酸味や香気に違いが認められた。これらの試料について NMR 解析により低分子水溶性成分、SPME-GC/MS 解析により揮発性成分のメタボローム解析を行った。水溶性成分については、大部分の糖類は残存していることや、甘酒と同様に多数のアミノ酸が含まれることが確認された。また製品間には、乳酸、酢酸、エタノール、GABA、オルニチンなどのシグナル強度の差が認められ、使用された乳酸菌の種や株による違いが表れていると考えられた。揮発性成分のプロファイルについては、製品間の原料や製造環境に相関すると考えられる特徴が第一に表れた。酒粕が使用されている製品からは脂肪酸エチルエステルが強く検出され、一部の製品からは樽香を構成する成分が検出された。また、乳酸発酵甘酒には遊離脂肪酸類が甘酒に比べて多い傾向がみられ、乳酸発酵により生じた可能性が考えられた。その他に検出された成分についても製品間でピーク強度は異なり、原料となる甘酒と乳酸菌株との組み合わせなど、製造工程の違いの影響を受けていることが予想された。

## NMR- and GC/MS-based metabolic profiling of amazake fermented by lactic acid bacteria

○Satoru Tomita, Katsuchi Saito, Toshihide Nakamura  
 (Food Res. Inst., NARO)

**Key words** lactic acid fermentation, metabolomics, NMR, SPME-GC/MS

## 1P-1p091 酒類を対象とした LC/MS による多成分解析

○中西 豪<sup>1</sup>, 行平 大地<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>島津製作所,<sup>2</sup>ライフイクス)  
 naka@shimadzu.co.jp

【背景と目的】食品分野におけるメタボローム解析の手法は、食品の品質を定量的に評価する、また食品の風味や旨味と関連している食品中成分を探し出すという目的においても有効である。本研究ではビールやワインといった酒類を対象として、トリプル四重極型 LC/MS による 97 成分の一斉分析を行い、得られた分析データに対して、主成分分析 (PCA) および階層的クラスター解析 (HCA) による評価を試みた。分析対象としたのは、食品中に含まれるアミノ酸・有機酸・ヌクレオシドであり、5 種類のビール系飲料における特徴的な成分の特定、また産地・ブドウ品種の異なるワインでの多成分解析を検討した。

【方法】5 種類のビール系飲料は脱気してから、またワインはそのまま試料として内部標準物質を添加して、さらに限外濾過フィルター (MWCO 3 kDa) による除タンパク質を行った。回収した濾液を 200 倍に希釈して、超高速液体クロマトグラフ Nexera および LCMS-8060 による 97 成分の一斉分析を実施した。また得られた MRM データに対しては、Traverse MS ソフトウェアを用いたピーク同定作業を行い、内部標準物質に対する面積比を基にして PCA および HCA を実施した。

【結果】一斉分析の結果、5 種類のビールからはアミノ酸、有機酸、核酸関連物質など 58 成分が確認されており、これらの面積比を基にして PCA・HCA を実施した。PCA の結果からは、5 種類のビールが score plot 上でうまく分類されることを確認した。またビールを特徴づける成分として、proline や BCAA、ヌクレオシドなどの化合物が loading plot 上で確認された。さらに 5 種類のビールを対象に HCA を実施したところ、大きく 3 つのグループに分類されることを確認した。またワインに対しては得られた分析結果を基に、産地・ブドウ品種の違いを PCA・HCA によって確認することができた。

## Multicomponent analysis by LC/MS for the components in alcoholic beverages

○Tsuyoshi Nakanishi<sup>1</sup>, Daichi Yukihira<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Shimadzu Corp., <sup>2</sup>Reifyes Inc.)

**Key words** mass spectrometry, food, metabolomics, statistical analysis

## 1P-1p092 固相誘導体化法を用いた黒コショウの GC/MS メタボローム解析

○恩田 浩幸<sup>1</sup>, 杉立 久仁代<sup>2</sup>, 佐々野 僚一<sup>3</sup>, 松尾 俊介<sup>3</sup>, 佐川 岳人<sup>1</sup>, 福岡 英一郎<sup>4</sup>  
 (<sup>1</sup>エスピー食品, <sup>2</sup>アジレント・テクノロジー, <sup>3</sup>アイスティサイエンス, <sup>4</sup>阪大院・工・生命先端)  
 hiroyuki\_onda@sbfoods.co.jp

【目的】近年、メタボローム解析手法を用いた食品の品質評価が盛んに行われるようになってきている。特に、アミノ酸などの揮発性成分を誘導体化した GC/MS 分析は広く普及している。メタボローム解析を行う際に用いられる前処理手法として Bligh & Dyer 法が用いられるが、多検体の試料を同時に処理する上では、抽出および誘導体化の工程には長時間を要することが問題点であった。しかし最近では、固相カラム上で短時間かつ容易に誘導体化を行う固相誘導体化法も提唱されている。そこで本研究では、固相誘導体化法を黒コショウのメタボローム解析に適用すべく検討を行った。黒コショウは広く普及している香辛料の一つである。しかしながら、これまで黒コショウの代謝物に着目したメタボローム研究は行われていなかった。

【実験方法・結果】試料には、インド産黒コショウを使用した。そして Bligh & Dyer 法と固相誘導体化法の両手法で前処理を行い、アミノ酸および有機酸に焦点を絞って GC/MS 分析を実施した。固相誘導体化法については、Bligh and Dyer 法で採用されている抽出法に併せて、アセトニトリル水溶液 (アセトニトリル: 水 = 8 : 2) による抽出も行い比較分析を行った。その結果、アセトニトリル水溶液抽出を行った後に固相誘導体化を行った場合、安定的にアミノ酸および有機酸を検出することができ、Bligh and Dyer 法と同等の結果となった。また、アセトニトリル水溶液による抽出の影響で、Bligh and Dyer 法では検出できないピペリンなどの疎水性物質も検出が可能であった。よって、アセトニトリル水溶液抽出と固相誘導体化法を組み合わせることで、黒コショウのメタボローム解析が、迅速かつ容易にできる可能性が示唆された。

## Analysis of the components in Black pepper using in-SPE derivatization method for GC-MS metabolome analysis

○Hiroyuki Onda<sup>1</sup>, Kuniyo Sugitate<sup>2</sup>, Ryoichi Sasano<sup>3</sup>, Syunsuke Matsuo<sup>3</sup>, Takehito Sagawa<sup>1</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>4</sup>  
 (<sup>1</sup>S&B foods Inc., <sup>2</sup>Agilent Technologies Japan, Ltd., <sup>3</sup>AiSTI SCIECE co., <sup>4</sup>Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

**Key words** Black pepper, metabolome analysis, in-SPE derivatization method

## 1P-1p093 短期熟成試験味噌中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害物質の精製および解析

○北川 学<sup>1</sup>, 多田 孝清<sup>2</sup>, 山田 南実<sup>1</sup>, 春野 玲弥<sup>2</sup>, 東 隆行<sup>2</sup>,  
小池 祥悟<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>マルコメ, <sup>2</sup>KRI)  
manabu\_kitagawa@marukome.co.jp

【背景と目的】2015年の国民健康・栄養調査によると日本人男性の約7割、女性の約5割(年齢40~74才)が高血圧(140/90 mmHg以上)であると報告されている。高血圧治療のターゲットとして血圧上昇に関与するアンジオテンシン I 変換酵素(ACE)の阻害が挙げられ、味噌にも ACE 阻害物質が存在することが報告されている。これまでに我々は、味噌の製法を最適化することにより、ACE 阻害活性を強化した短期熟成試験味噌を作製した。しかし、短期熟成試験味噌中の ACE 阻害物質については不明であった。そこで本研究では、短期熟成試験味噌から ACE 阻害成分の精製を行い、その解析を実施した。

【方法】短期熟成試験味噌および一般熟成味噌(信州味噌)を水抽出し、得られた抽出液を限外濾過により30kDa以上、10-30kDa、3-10kDa、3kDa以下に分離し、ACE 阻害活性を測定した。更に逆相クロマトグラフィーを用いて精製し、得られた活性画分について、LC-Q-MS/MS分析、LC-TOF-MS分析、NMR分析を実施した。

【結果】短期熟成試験味噌、一般熟成味噌それぞれの限外濾過により得られた3kDa以下の画分は、共に他の画分と比較して高い ACE 阻害活性を示した。さらに、3kDa以下の画分を逆相クロマトグラフィーで分離した結果、活性画分について ACE 阻害活性が報告されているジペプチド AY、GY、SY、FY、IY、GW、AW の存在が確認された。また、短期熟成試験味噌中の ACE 阻害活性が最も高い画分について NMR 分析を実施した結果、ゲンチオビオース配糖体などの新規活性成分が含有されていることが示唆された。現在、その作用機序や詳細な構造について解析を行っている。

### Purification and characterization of Angiotensin I Converting Enzyme inhibitor from short-term fermented Miso

○Manabu Kitagawa<sup>1</sup>, Takakiyo Tada<sup>2</sup>, Minami Yamada<sup>1</sup>, Remi Haruno<sup>2</sup>,  
Takayuki Azuma<sup>2</sup>, Shogo Koike<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Marukome Co., Ltd., <sup>2</sup>KRI Inc.)

**Key words** Miso, Angiotensin I Converting Enzyme inhibitor, LC-MS, NMR

## 1P-1p094 ポリアミン高含有納豆製造に向けた大豆品種の比較

○小林 和也, 堀井 悠一郎, 渡辺 聡  
(新潟農総研・食研セ)  
kobayashi.kazuya@pref.niigata.lg.jp

【背景と目的】ポリアミン(PA)は生命活動に必須のポリカチオンであり、多くの生物にはスペルミジン(Spd)及びスペルミン(Spm)並びにジアミンのプトレッシン(Put)が遍在している。また、これまでの先行研究から PA の健康機能性面にも関心が高まっており、PA 高含有食品の開発が求められている。PA は大豆に豊富に含まれており、大豆加工品の中でも納豆は PA 量が特に高いことが明らかになっている。しかしながら、大豆品種と納豆中 PA 量との関係は、十分に検討されていない。そこで本研究では、PA 高含有納豆製造のために大豆品種と納豆中 PA 量に関する調査を行った。

【方法】PA 高含有大豆品種の選抜と原料大豆と納豆中 PA 量の関係を確認するために、16品種(国産14品種・外国産2品種)とこれらの大豆を用いて製造した納豆の PA 量を測定した。さらに、PA 高含有大豆品種を決定するために、9品種の国産大豆(n≥3)を対象に PA を定量した。PA はサンプルから5%トリクロロ酢酸水溶液を用いて抽出し、分離カラムに TSKgel polyaminepak (東ソー製)、誘導体化試薬に o-フタルアルデヒドを用いたポストカラム HPLC 法により定量した。

【結果及び考察】16品種の大豆を分析した結果、各大豆品種が固有の PA 組成を有しており、PA を顕著に含有する品種も確認された。また、大豆と納豆中 PA 量との間で高い相関(R値: Put: 0.96, Spd: 0.95 及び Spm: 0.94)を示し、納豆中 PA 量は原料の大豆に大きく依存することが明らかになった。さらに、国産大豆9品種を分析し、「ナカセンナリ」が PA 高含有品種であることを明らかにした。なお、本研究は、「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の一部として行った。

### Comparison of soybean cultivars for enhancement of the polyamine contents of natto, the fermented soybean using *Bacillus subtilis* (natto)

○Kazuya Kobayashi, Yuichiro Horii, Satoshi Watanabe  
(Food Res. center, Niigata Agricultural Res. Inst.)

**Key words** polyamine, natto, fermented soybean, soybean

## 1P-1p095 S-アデノシルメチオニン高生産清酒酵母における肝細胞保護作用

○信田 亮太<sup>1</sup>, 金井 宗良<sup>2</sup>, 藤井 力<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>八海醸造・研究開発, <sup>2</sup>酒総研)  
shinada@hakkaisan.jp

【目的】S-アデノシルメチオニン(SAM)は、肝機能障害における治療効果が確認されている化合物であり、微生物の中でも酵母が、その中でも清酒酵母が高生産することが知られている。我々は、温度感受性清酒酵母のスクリーニングの過程で SAM 高生産株を単離したので、その酵母の肝細胞保護作用について検討を行った。

【方法】スクリーニングで得た温度感受性株を SAM 高生産培地である O-培地および D-培地で培養し、増殖性および菌体内 SAM 量を測定した。ヒト肝腫瘍由来細胞 HepG2 細胞を用いて、エタノール障害における清酒酵母抽出物の保護作用を検討した。保護作用に関しては、TNF-α 産生抑制と感受性抑制について検討した。取得した同一菌株を使用して、SAM を高生産させた菌体(SAM 菌体)と、ほとんど生産していない菌体(Control)の酵母抽出液を調製した。これらの抽出液を HepG2 細胞に添加して、TNF-α 産生抑制ならびに感受性試験を行った。TNF-α 感受性試験は、ルシフェラーゼアッセイを用いて TNF-α 感受性抑制能(NF-κB 活性抑制効果)を検証した。

【結果】変異処理を施した約5,000株の内、37℃で生育できなかった温度感受性株4株を選抜した。さらに、この中から SAM を高生産し、かつ親株と同程度の生育を示した菌株1株を選抜した。この菌株を SAM 高生産株として肝機能保護作用試験に供試した。TNF-α 産生抑制については、SAM 菌体および Control とともに菌体の濃度依存的に TNF-α の産生が抑制された。TNF-α 感受性抑制については、SAM 菌体、Control とともに低濃度域では同等の抑制効果であったが、高濃度域では SAM 菌体の方が抑制効果が高く、エタノール障害における保護作用が認められた。また、清酒酵母が生産する SAM 以外の何らかの物質にも保護作用があると考えられた。

### Hepatocyte protective effect in S-adenosylmethionine high productive sake yeast strain

○Ryota Shinada<sup>1</sup>, Muneyoshi Kanai<sup>2</sup>, Tsutomu Fujii<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>R&D Center, Hakkaisan Brewery Co., Ltd., <sup>2</sup>NRIB)

**Key words** S-adenosylmethionine, sake, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

## 1P-1p096 乳酸菌と酵母で発酵させた風味の良い液性ぬか床の開発

○小野 浩, 西尾 翔子, 岩谷 和輝, 小澤 幸央, 河本 哲宏  
(東海漬物)  
ono-hir@kyuchan.co.jp

ぬか漬の漬床であるぬか床は野菜を漬け込むことで乳酸菌、酵母による発酵が進む。ぬか床製法は経験的な手法によるものが多く、安定して量産化することが難しいため、現在ほとんど工業化されていない。我々は発酵ぬか床を量産化・工業化することを目的に研究を進めた。

我々は発酵ぬか床を量産化するために脱脂米ぬかを水に懸濁、酵素処理した液性米ぬかを作成し、ここにスターターとして乳酸菌と酵母を添加、発酵させ、液性ぬか床を作製する方法を考案した。

液性ぬか床製造に使用する乳酸菌と酵母を選抜するために、発酵したぬか床から分離した乳酸菌、酵母を液性米ぬかにて24℃、48時間発酵後、理化学分析、官能評価を行った。その結果、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum*、酵母 *Pichia kudriavzevii* を選抜した。この2菌種により風味の良い液性ぬか床が作製出来ることが分かった。

乳酸菌 *L. plantarum* と酵母 *P. kudriavzevii* で発酵させた液性ぬか床の香り成分を GC-MS により分析した結果、乳酸菌と酵母を共培養することにより、2-Methylpropanoic acid、3-Methylbutanoic acid が検出された。これらの成分は液性ぬか床の独特の香りに関与していると考えられ、乳酸菌、酵母の単独培養では検出されなかったことから、乳酸菌と酵母の相互作用によって生成されると考えられた。

### Development of tasty liquid-nukadoko fermented with lactic acid bacteria and yeast

○Hiroshi Ono, Shoko Nishio, Kazuki Iwaya, Yukio Ozawa, Tetsuhiro Kawamoto  
(Tokai Pickling)

**Key words** nukadoko, lactic acid fermentation, lactic acid bacteria, yeast

## 1P-1p097 小麦ふすまの各種長時間・複セルラーゼ処理

○柴田 晃, 笠井 尚哉  
(阪府大院・生環科)  
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

<背景>小麦ふすまは、小麦粒の表皮部分であり、少なくとも6層からなり、小麦粉製粉時に生成されるほか、醤油製造時のように、小麦粒そのままが発酵原料として使用される場合には発酵物中に残っている。この場合には、小麦ふすまを除いて小麦粒の澱粉やタンパク質が利用されるが、どの程度まで糖化利用されたかは十分に解明されていない。また、小麦ふすまは、植物繊維として各種加工食品にも利用されているほか、バイオマス利用でも関心が持たれ、従来セルラーゼによる糖化も報告されているが、そのほとんどが、1日以内の検討であり、澱粉も残存していることから、十分な検討はされていないと考えられる。そこで、本研究では、各種のセルラーゼを用いて、長時間の糖化を行なうと共に、セルラーゼ再糖化も行い、糖化できる量を検討した。また本結果を利用して、醤油製造時の小麦ふすまに残る糖化物量も評価した。

<方法と結果>小麦ふすまは、供与された小麦粉製造時に生成されるものを洗浄し使用した。検討に用いたセルラーゼは、食品加工用セルラーゼ23種類を用い、3日間45℃0.05M酢酸緩衝液pH5.0中で酵素反応を行った。セルラーゼ再反応は、1回目のセルラーゼ処理において、これまでにダイズをよく分解し、コーヒードン活性も有するトリコデルマ起源セルラーゼで処理を行なった小麦ふすまに、更に23種のセルラーゼを再度酵素反応させた。その結果、セルラーゼ糖化は、1日目では完全に作用せず、3日目まで徐々に作用した。また、再糖化でもさらに反応し、糖化量は同様に徐々に3日目まで増加した。多くのセルラーゼでこの現象は認められたが、1種のセルラーゼでは、1回目3日間では糖化が終了し、2回目以降ほとんど糖化しないものがあった。このことは、本酵素処理を用いた醤油製造小麦の残存糖化量の評価に利用可能であり、その評価も行った。

## Long and multiple cellulases digestion of wheat bran

○Akira Shibata, Naoya Kasai  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** wheat bran, cellulase

## 1P-1p098 酸味受容体(ASICs)タンパクをセンサーとした電気生理学的アッセイ法による酸味抑制物質のスクリーニング

○玉村 朋大<sup>2</sup>, 柴田 泰宏<sup>1</sup>, 塚本 義則<sup>2</sup>, 鶴川 真也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名市大院・医, <sup>2</sup>中部大院・応生)  
mitsukamoto@isc.chubu.ac.jp

近年、日本では食の欧米化等に伴って生活習慣病に対する懸念が益々深まりつつある。このような中、近年食酢の長期的摂取(15ml/day×10weeks)により、血清中のトリグリセリドや内臓脂肪の低下、血圧の低下効果等がヒト介入試験で検証されており、食事を通しての食酢の日常的な接種が生活習慣予防において有効な手段に取り上げられている。しかしながら、食酢特有の刺激性的酸味が要因となって食酢の日常的な摂取が広く実践されているとはいえない状況にある。そこで、我々はこの生活習慣病に大きな効果のある食酢の食事を通しての日常的な摂取をより可能にする手段としての酸味を抑制する安心・安全な物質の開発を目的として、酸味受容体(ASICs: Acid Sensing Ion Channels)タンパクをセンサーとする電気生理学的アッセイ法を用いて酸味抑制物質の自然界からのスクリーニングを試みた。方法としては、アフリカツメガエル卵母細胞にhuman ASICsのcRNAをインジェクションし、卵母細胞にASICsを発現させたものを電気生理学的にタンパク質の活性を確認した。その結果、カテキン類の一部にASICsの活性を抑制する物質2種類(サンフェノンBG-3及びカメラリアエクス30S-OP)を確認することができたので報告する。

## Screening of Substances Repressing Sour taste using Electrophysiological Assay with ASICs

○Tomohiro Tamamura<sup>2</sup>, Yasuhiro Shibata<sup>1</sup>, Yoshinori Tsukamoto<sup>2</sup>, Shinya Ugawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med., Nagoya City Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

**Key words** acid sensing ion channels

1P-1p099 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する免疫賦活能を有する菌体外多糖

○松崎 千秋<sup>1</sup>, 早川 あすか<sup>1</sup>, 松本 健司<sup>2</sup>, 加藤 紀彦<sup>3</sup>, 山本 憲二<sup>4</sup>, 久 景子<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>石川県大・生物資源研, <sup>2</sup>石川県大・生資源, <sup>3</sup>京大院・生命, <sup>4</sup>日東薬品工業)  
chiaki@ishikawa-pu.ac.jp

## 目的

プロバイオティクスの有用性の一つに、粘膜免疫に重要なイムノグロブリンA(IgA)の産生誘導が挙げられる。本研究では乳酸菌173株のスクリーニングにより、IgA産生を強く誘導する*Leuconostoc mesenteroides* NTM048株を見出している(J Appl Microbiol 116, 980-989, 2014)。本研究では、このNTM048株の菌体外多糖(EPS)の、免疫賦活剤としての可能性を明らかにするため、マウス生体試験によって粘膜免疫系および全身免疫系への影響を検証するとともに、インフルエンザウイルス感染防御における有効性を検討した。

## 方法

NTM048株の産生するEPSを0, 0.05, 0.1, 0.5, 1%添加した飲水をBALB/cAマウスに42日間摂取させ、EPS投与の免疫系に対する効果を検証した。すなわち腸管粘膜におけるIgA産生誘導能を明らかにするために糞中IgA量を測定し、全身免疫系への影響を明らかにするために脾臓T細胞のポピュレーション解析を行った。また、インフルエンザウイルス抗原(H1N1)特異的IgAの産生誘導能を、*in vitro*で抗原にて免疫感作したバリエル細胞を用いて測定した。

## 結果

EPS投与後35日以降の糞中IgA量において、0.1, 0.5, 1%投与マウスに有意な上昇( $P < 0.05$ )が認められた。また投与後42日のマウス脾臓リンパ球をFACS解析したところ、0.5, 1%投与マウスにおけるヘルパーT細胞の割合の有意な上昇( $P < 0.05$ )と、1%投与マウスにおけるCD4陽性ヘルパーT細胞の割合の有意な上昇( $P < 0.01$ )が認められた。H1N1抗原に対する有効性試験においては、EPS添加培地で培養したバリエル細胞において、EPS無添加より有意に高い( $P < 0.01$ )H1N1抗原特異的IgAの産生が認められた。これらの結果より、本EPSは腸管粘膜免疫系および全身免疫系の賦活効果が期待できると共に、インフルエンザウイルスなどの病原体からの感染防御に有効であることが示唆された。

Immunomodulating activity of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048

○Chiaki Matsuzaki<sup>1</sup>, Asuka Hayakawa<sup>1</sup>, Kenji Matsumoto<sup>2</sup>, Toshihiko Katoh<sup>3</sup>, Kenji Yamamoto<sup>1</sup>, Keiko Hisa<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., <sup>2</sup>Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ., <sup>4</sup>Nitto Pharm. Ind.)

**Key words** probiotics, exopolysaccharide, lactic acid bacteria

## 1P-1p100 原料および発酵方法の異なるビール中の代謝物および香气成分の分析

○杉立 久仁代<sup>1</sup>, 関口 桂<sup>1</sup>, 行平 大地<sup>2</sup>, 中村 貞夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>アジレント・テクノロジー, <sup>2</sup>ライフィクス)  
kuniyo\_sugitate@agilent.com

【目的】ビールは世界で広く飲まれている嗜好性飲料であり、多くの醸造元が存在するが、地域や原料、発酵方法などによって全く異なる風味を醸し出している。今回は、ビールの原料および発酵方法が製品に与える影響を調べるため、香气成分および代謝物の測定を試みた。これらの成分はいずれもGC/MSを用いて分析することが可能であり、ビールを構成する成分を網羅的に把握することで、商品開発や品質管理に役立てることが可能だと考えられる。

【方法】原料や発酵方法の異なる数種類のビールをサンプルとした。アミノ酸、有機酸、核酸などの代謝物は、Captive ND Lipidsを用いたタンパク質と脂質を除去し、乾固した後に、メトキシ化およびトリメチルシリル化を行いGC/MSおよびGC/MS/MS分析に供した。香气成分分析は固相マイクロ抽出法(SPME法)を用いた。カラムに導入された成分は1本のカラムで分離した後、スプリッターを用いて1:1に分岐し、GC/MSおよび臭気閾値の低い硫黄化合物を選択的に測定できる化学発光硫黄検出器(SCD)での同時検出を行なった。

【結果】香气成分、代謝物とも、検出したピークを主成分分析したところ、第一主成分で原料の違い、第二主成分で発酵方法の違いをグループ分けすることができた。また、興味深いことにビールメーカーによっては発酵方法が異なっても検出される代謝成分は似た傾向にあるビールが存在し、共通の原料を使用していることが示唆された。しかしながら、上面発酵と下面発酵では明らかにビールの風味が異なり、上面発酵のビールの方が爽やかでフルーティな香りを持つものが多い。SCD分析では揮発性硫黄化合物であるジメチルスルフィド、硫化水素、メタンチオール、メチルチオアセテートなどが検出されたが、これらの成分は上面発酵ビールでは濃度が低かったため、硫黄化合物の香りに与える影響は大きいと考えられた。

## Analysis of flavor compounds and metabolites in beer of different ingredients and fermentation

○Kuniyo Sugitate<sup>1</sup>, Katsura Sekiguchi<sup>1</sup>, Daichi Yukihiro<sup>2</sup>, Sadao Nakamura<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Agilent Technologies Japan, <sup>2</sup>Reifys)

**Key words** beer, flavor compounds, metabolites, GC/MS

## 1P-1p101 腸管 IgA 産生を増強する *Lactobacillus antri* の細胞壁成分の解析

○寅本 拓<sup>1</sup>, 山崎 思乃<sup>2</sup>, 國澤 純<sup>2</sup>, 片倉 啓雄<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>関西大院・理工, <sup>2</sup>関西大・化生工, <sup>3</sup>医薬健康研)  
 katakura@kansai-u.ac.jp

【背景・目的】IgA は、腸管において病原体の粘膜上皮細胞への定着を阻止するため、その産生は感染症の予防に効果的である。我々は、腸管リンパ組織であるパイエル板の細胞を用いた評価系から、*Lactobacillus antri* の高い IgA 産生増強作用を示し、さらにその作用が樹状細胞上の Toll-like receptor (TLR) 2 を介していることを明らかにしている。本研究では、TLR2 のリガンドとなる菌体成分の特定を目的に、IgA 産生増強作用を担う *L. antri* の細胞壁成分の解析を行った。

【方法】乳酸菌は MRS 培地で 37℃、24 時間培養して、生理食塩水で洗浄し、70% エタノールで殺菌した後、減圧乾燥して実験に供与した。IgA 産生増強作用の評価には、マウス腸管から調製したパイエル板細胞を用いた。パイエル板細胞に菌体あるいは菌体成分を添加して 4 日間培養し、培養上清中の IgA 濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果】菌体を超音波破碎すると、処理時間が長くなるに伴い、IgA 産生増強作用が低下したことから、本菌株による IgA 産生増強には菌体の構造が重要であることが示唆された。そこで、菌体の構造を保持したまま、SDS 溶液による煮沸処理後、アクトナーゼによる除タンパク、メタノールおよびクロホルムによる脱脂、核酸分解酵素による除核酸を順次行い、各細胞壁成分を除去したフラクションの IgA 産生の増強能を測定した。その結果、クロホルムによる脱脂処理により IgA 産生増強作用が低下し、逆にクロホルム抽出物には IgA 産生増強作用が認められた。一方で除タンパクや除核酸の影響は認められなかった。さらにリポペプチドなどの細胞壁脂質を菌体表面に露出させる効果があると考えられる溶菌酵素で菌体を処理すると、IgA 産生増強作用が強まった。これらのことから、*L. antri* の細胞壁の脂質成分が TLR2 に結合して IgA 産生を増強していると考えられた。

### Analysis of cell wall components of *Lactobacillus antri* that enhance intestinal IgA production

○Taku Toramoto<sup>1</sup>, Shino Yamasaki-Yashiki<sup>2</sup>, Jun Kunisawa<sup>2</sup>, Yoshio Katakura<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., <sup>2</sup>Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., <sup>3</sup>NIBIOHN)

**Key words** lactic acid bacteria, IgA, cell wall components, TLR2

## 1P-1p102 セシウム蓄積細菌の探索およびセシウム蓄積変異株の作成

吉岡 潤一, 渡辺 剛, 松本 貴良, 林 秀謙  
 (前工大・工)  
 h-hayashi@maebashi-it.ac.jp

【背景と目的】2011 年 3 月の福島第一原発事故により環境中に多量の放射性セシウムが放出され、環境中からのセシウム除去が必要である。一部の細菌が菌体内にセシウムを取り込むことが知られており、取り込まれたセシウムは負電荷を持つポリリン酸と結合し、セシウムの毒性が弱まることで菌体内に蓄積すると考えられている。本研究はセシウム蓄積能が高い放線菌の選抜を行い、それらの菌株から菌体内のポリリン酸量の増加した変異株の作成を行い、セシウム蓄積能を強化した放線菌の取得を目指す。

【方法】NBRC より提供を受けた放線菌のスクリーニング株(RD 株)を 1 mM CsCl を含む液体培地で培養を行った。菌体を回収し、乾燥重量を測定後、菌体を濃硝酸より加熱溶菌させ、原子吸光測定によりセシウム量を測定し、蓄積量を算出した。さらに高蓄積能株についてはチオストレプトン耐性変異株の取得を行った。チオストレプトン耐性変異株は菌体内のポリリン酸量を増加する可能性がある。チオストレプトンを添加した平板培地に菌株を塗布し、生育した菌株をチオストレプトン耐性変異株とした。これらの耐性変異株についても菌体内のセシウム蓄積量の測定を行った。

【結果及び考察】RD 株のセシウム蓄積能の測定を行ったところ、最高で 74 μmol/g(dry weight)であった。以前に報告した RD 株で最も高い蓄積能を示した菌株は *Dietzia timorensis* で約 200~300 μmol/g であったので、今回の RD 株の蓄積能は低い傾向にある。また、セシウム蓄積能が高い *D. timorensis* を使用してチオストレプトン耐性変異株の取得を行ったところ、セシウム蓄積量が増加した変異株を取得した。今後、これらの変異株の菌体内ポリリン酸量の測定を行う予定である。

### The search of cesium accumulation bacteria and the construction of cesium accumulation mutant.

Junichi Yoshioka, Go Watanabe, Takara Matsumoto, 〇Hidenori Hayashi  
 (Fac. Eng., Maebashi Inst. Technol.)

**Key words** actinomycetes, cesium, accumulation

## 1P-1p103 線虫を用いた土壤中の Cs 吸収菌の回収プロセスの構築

○合田 亮<sup>1</sup>, 伊藤 みさご<sup>1</sup>, 星 英之<sup>2</sup>, 倉橋 健介<sup>3</sup>, 徳本 勇人<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪府大院・工・化工, <sup>2</sup>阪府大院・現シス, <sup>3</sup>阪府大高専)  
 tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

福島第一原発事故により広範囲に放射性物質が拡散した。その中で <sup>137</sup>Cs は土壤中に長く滞留すると言われている。一方、土壤中の一部の微生物には <sup>137</sup>Cs 吸収能があることが知られている。さらに、土壤中の *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、様々な微生物を捕食できる。そこで本研究では、光忌避等の習性により安易に回収できる *C. elegans* を用いた土壤中の <sup>137</sup>Cs 吸収菌回収プロセスの構築を研究目的とした。

Cs 吸収菌には、*Rhodococcus erythropolis* CS98 株 (*R. erythropolis*) を用いた。CsCl を添加した線虫培養専用の NGM 寒天培地上に、前培養した *R. erythropolis* 培養液を塗布し、ここへ *C. elegans* を置いた。一方、*R. erythropolis* のみを培地に塗布したもの、または *C. elegans* のみを培地上に置いて培養したものを比較検討に用いた。培養実験は、好気条件下、25℃で、培養時間を 9 日間とした。検討の結果、*R. erythropolis* だけを培養した場合に、良好なコロニー形成が見られた。両者を培地上で共培養させると、*C. elegans* だけを培養した条件における増殖挙動に比べて、*C. elegans* が大量に増殖しており、この結果は、*C. elegans* が *R. erythropolis* を捕食していることを示唆すると考えられる。次に、*C. elegans* が培養後に体内に吸収した Cs 量を測定した。ろ紙上で回収した *C. elegans* を硝酸溶液中に投入し、90℃に加熱して Cs を溶出させ、希釈液の Cs 濃度を ICP-MASS で測定した。その結果、*R. erythropolis* が培地中から吸収した Cs を、*C. elegans* が体内に蓄積できることが明らかとなった。

### Development of a process for the recovery of Cs accumulating bacteria in soil using *C. elegans*

○Ryo Goda<sup>1</sup>, Misago Ito<sup>1</sup>, Hidenobu Hoshi<sup>2</sup>, Kensuke Kurahashi<sup>3</sup>, Hayato Tokumoto<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Environ. Syst. Sci., Grad. Sustainable Syst. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>Osaka Pref. Univ. Colle. Technol.)

**Key words** *Caenorhabditis elegans*, Radioactive substances, bioremediation

## 1P-1p104 嫌気発酵菌を利用した <sup>137</sup>Cs 含有バイオマスの除染

野本 健太<sup>1</sup>, 伊藤 みさご<sup>1</sup>, 合田 亮<sup>1</sup>, 星 英之<sup>2</sup>, 倉橋 健介<sup>3</sup>, 〇徳本 勇人<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪府大院・工・化工, <sup>2</sup>阪府大院・現シス・環境共生科学, <sup>3</sup>阪府大高専)  
 tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

福島第一原発事故で周囲に拡散した <sup>137</sup>Cs は、降雨により森林や山地で循環すると言われており、<sup>137</sup>Cs 含有バイオマスが大量に発生している。そこで、バイオマスの嫌気発酵分解に関わる菌が、<sup>137</sup>Cs を吸収することができれば、<sup>137</sup>Cs 含有バイオマスの減容化、除染が同時に達成できるプロセスが構築できるのではないかと考えた。本研究では、嫌気発酵菌叢に CsCl を投与し培養した菌叢を解析し、菌叢内で優勢化する微生物種を探索した。

消化発酵汚泥を 2 mL、可溶化でんぷんを 2 g/L、CsCl を 0, 10, 50, 100 mg/L となるように加えて総量 5 mL で封入した。その後、嫌気条件下、37℃で 6 日間静置培養を行い、培養期間中は、メタン生成量を測定した。実験の結果、対照以外の条件では、嫌気発酵の最終生成物であるメタンの生成量が増加することがわかった。このことから、CsCl 存在下において、嫌気発酵は阻害されないことが示唆された。さらに、培養 1, 2, 4, 6 日目に採取した培養液を遠心分離し得られた固相を硝酸で溶解し、Cs 濃度を測定した。その結果、対照では検出されなかった Cs が、CsCl を投与した培養条件における固相から検出されたため、Cs は液相から固相に移行することが分かった。また、PCR-DGGE 法で菌叢構造の解析を行った。その結果、CsCl を投与した条件と対照を比較すると、バンドパターンが変化した。よって、消化発酵汚泥は CsCl 存在下で菌叢構造が変化することが分かった。さらに、構成菌種の解析を行うと、対照と比較して、*Tepidibacter* 属が菌叢内で特に優勢化したことが明らかになった。以上より、消化発酵汚泥は、CsCl 存在下で培養すると、*Tepidibacter* 属が菌叢内で優勢化し、Cs を吸収する主要な菌である可能性が高いことがわかった。

### Decontamination of <sup>137</sup>Cs Containing-Biomass Using Anaerobic Bacteria

Kenta Nomoto<sup>1</sup>, Misago Ito<sup>1</sup>, Ryo Goda<sup>1</sup>, Hidenobu Hoshi<sup>2</sup>, Kensuke Kurahashi<sup>3</sup>, 〇Hayato Tokumoto<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Environ. Syst. Sci., Grad. Sustainable Syst. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>Osaka Pref. Univ. Colle. Technol.)

**Key words** Anaerobic fermentation, Decontamination, <sup>137</sup>Cs

## 1P-1p105 カリウム輸送タンパクの人工進化によるセシウム蓄積微生物の創出

○加藤 創一郎<sup>1,2</sup>, 金田 祥宜<sup>1</sup>, 福田 あかね<sup>1</sup>, 北川 航<sup>1,2</sup>,  
曾根 輝雄<sup>1</sup>, 浅野 行蔵<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・農, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス)  
s.katou@aist.go.jp

セシウム (Cs) の放射性同位体は核廃棄物等に由来する放射能汚染の主要な原因物質である。生物を使った Cs 回収は低コスト・低環境負荷という観点から注目されている。実際にある種の植物や微生物に Cs 蓄積能が確認されているが、これらの生物は Cs と性質が類似するカリウム (K) の輸送系を介して非特異的に Cs を取り込んでいるに過ぎない。そのため K が Cs よりも多い環境では Cs の取り込みは格段に低下してしまう。大腸菌は 3 種の K 輸送系 (Kup, Kdp, Trk) を持ち、そのうち Kup にのみ非特異的 Cs 輸送活性が確認されている。しかし Kup の Cs 輸送活性・親和性は K に対するものの 1/10 以下にすぎない。本研究では大腸菌の Kup タンパクを人為的に進化させ、高い Cs 輸送活性・親和性を持つ変異型 Kup を作製・選抜し、大腸菌に高い Cs 取り込み能を付与させることを試みた。エラープロシオン PCR 法によりランダムに変異が導入された大腸菌 Kup 遺伝子断片を増幅し、ベクターに組み込んだのち大腸菌 Kup 欠損株に形質転換した。異なる変異型 Kup を発現する大腸菌株を約 3 万株回収しライブラリーを作製した。細胞内への Cs の取り込みが K 欠乏条件において大腸菌の生育を促進する、という知見に基づき、変異株ライブラリーを K 欠乏・Cs 存在下で集積培養した。その結果、K 欠乏・Cs 存在下で有意に増殖が改善する C1 株、C2 株を得ることができた。この 2 株は K+10 μM、Cs+10-100 μM の条件下で、大腸菌野生株と比較して最大で 46 倍の Cs+取り込み能を示した。C1 には E80G、C2 には D283N、T374A および T512A のアミノ酸置換が確認された。2 菌株共に酸性アミノ酸に変異が入っていることから、陽イオンの認識に関与することが知られている酸性アミノ酸が Cs+に対する親和性・特異性にも寄与していることが示唆された。現在、得られた変異型 Kup の Cs+および K+輸送活性の詳細な速度論的解析を進めている。

### Construction of cesium-accumulating bacteria by molecular evolution of a potassium transporter

○Souichiro Kato<sup>1,2</sup>, Yoshiki Kanata<sup>1</sup>, Akane Fukuda<sup>1</sup>, Wataru Kitagawa<sup>1,2</sup>,  
Teruo Sone<sup>1</sup>, Kozo Asano<sup>1</sup>, Yoichi Kamagata<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>BRI. AIST)

**Key words** cesium, potassium, transporter, molecular evolution

## 1P-1p106 放射性セシウム汚染作物からのセシウム溶出特性とウシルーメン微生物処理・ナノ磁性粒子による除染

○馬場 保徳<sup>1,2</sup>, 日尾 彰宏<sup>2</sup>, 並木 禎尚<sup>3</sup>, 多田 千佳<sup>3</sup>, 福田 康弘<sup>3</sup>,  
三宅 克英<sup>1</sup>, 齋藤 雅典<sup>2</sup>, 中井 裕<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>石川県大・資源研, <sup>2</sup>東北大院・農, <sup>3</sup>了徳寺大・健康)  
ybaba@ishikawa-u.ac.jp

### 【背景・目的】

放射性セシウム (以下、rCs) に汚染された作物は、フィルムやシートで覆われて屋外に保管されている。焼却処理を進めることのできない地域では、経年劣化や野生動物の活動により外装フィルムが破損しはじめ、環境への rCs の再拡散が懸念される。本研究では、生産年度の異なる汚染作物の rCs 溶出特性を調査し、その除染方法を検討した。

### 【材料・方法】

生産年度 (2010、2012、2014 年) の異なる牧草もしくは稲わら (1300~30000 Bq/kg) を供試した。作物体における放射性物質の分布は、イメージングプレート (IP) に感光させたのち Typhoon FLA 7000 による画像解析で確認した。除染処理は、汚染作物を細断もしくは粉砕し、酸、アルカリあるいはウシルーメン微生物処理を行ったのち、溶出した rCs をナノ磁性除染剤により回収した。rCs の測定には、2480WIZARD ガンマカウンターあるいは Ge 半導体検出器を使用した。

### 【結果・考察】

汚染作物の rCs の水による抽出率 (一晚浸漬) は、2011 年 3 月のフォールアウトを受けた作物で低く (5%程度)、原発事故後の 2012・2014 年に生産された作物では高い (60%程度) 傾向がみられた。これらに、酸、アルカリもしくはウシルーメン微生物処理を行った結果、溶出率の最大値はフォールアウトを受けた作物で 20%、それ以外で 95%程度にまで向上し、溶出した rCs はナノ磁性除染剤でほぼ 100%回収された。フォールアウトを受けた作物の溶出率の低い要因は、水素爆発由来の難溶性 rCs 粒子 (Adachi et al. (2013)) を直接溶びたものと考察された。IP による画像解析の結果はこれを支持した。一方、2012 年以降に生産された作物は、本処理により放射線量を大幅に低減できることが示唆された。

### Cesium elution properties of a radiation-polluted biomass and cesium recovery by using cattle rumen microbes and nano magnetic particle.

○Yasunori Baba<sup>1,2</sup>, Akihiro Hio<sup>2</sup>, Yoshihisa Namiki<sup>3</sup>, Chika Tada<sup>2</sup>,  
Yasuhiro Fukuda<sup>2</sup>, Katsuhide Miyake<sup>1</sup>, Masanori Saito<sup>2</sup>, Yutaka Nakai<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Biore. Biotech., Ishikawa Pref. Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>3</sup>Fac. Hlth. Sci., Ryotokujii Univ.)

**Key words** rumen bacteria, nano magnetic particle, radiation-polluted biomass, cesium recovery

## 1P-1p107 トンネル掘削残土埋立地地下水のヒ素高蓄積植物によるヒ素除去技術の開発

○黄 毅<sup>1,2</sup>, 宮内 啓介<sup>1</sup>, 菅野 弘樹<sup>1</sup>, 高橋 太雅<sup>1</sup>, 菅原 一輝<sup>2</sup>,  
水戸 光昭<sup>3</sup>, 成瀬 美樹<sup>4</sup>, 中村 真理子<sup>4</sup>, 門間 聖子<sup>4</sup>, 井上 千弘<sup>2</sup>,  
遠藤 銀朗<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北学院大・工, <sup>2</sup>東北大院・環境, <sup>3</sup>仙台市交通局, <sup>4</sup>応用地質(株))  
nklocalking@gmail.com

交通路線整備等のためのトンネル掘削残土等には土壤環境基準を上回るヒ素や重金属が含まれていることがある。したがって建設掘削残土の再利用および埋立処分には細心の注意が必要である。また、基準値以上のヒ素等を含む残土埋立地等から発生する地下水は適切に処理を行った後に放流される必要がある。トンネル等の掘削残土埋立地の地下水に含まれるヒ素の既存の除去方法として吸着・イオン交換法や凝集沈殿法があるが、一般に浄化コストが高くまた大量の二次廃棄物が発生することが問題である。本研究では、これらに代わる低コストのヒ素除去方法としてヒ素高蓄積植物を用いたファイトエクストラクションによる浄化技術を開発することを目的として、仙台市のトンネル掘削残土埋立地にヒ素高蓄積植物モエジマシダの水耕栽培処理のパイロットプラントを設置し、pH 9 前後のアルカリ性でかつ環境基準値を超えるヒ素 (20~25 ppb) を含む実地埋立地地下水からヒ素を除去する現地実験を行った。このシダ水耕栽培処理プラントに水理学的滞留時間 1.13 日で約 3 ヶ月間埋立地地下水を連続的に通水し、地下水原水および水耕栽培処理水を 0.45 μm メンブレンフィルターで濾過後に ICP-MS でヒ素濃度を測定したところ、処理水のヒ素濃度は環境基準値である 10 ppb 以下に浄化できた。また、pH も環境基準値範囲である 8.3 程度まで低下させることができた。その間にモエジマシダの羽片および根の旺盛な伸長も確認され、このシダの羽片には高濃度(最大で約 1500 mg/kg)のヒ素を蓄積されたことが確認できた。

### Technology development for arsenic removal from soil dumping site drainage by hyperaccumulator plant

○Yi Huang<sup>1,2</sup>, Keisuke Miyauchi<sup>1</sup>, Hiroki Kanno<sup>1</sup>, Taiga Takahashi<sup>1</sup>,  
Kazuki Sugawara<sup>2</sup>, Mitsuaki Mito<sup>3</sup>, Haruki Naruse<sup>4</sup>, Mariko Nakamura<sup>4</sup>,  
Mariko Monma<sup>4</sup>, Chihiro Inoue<sup>2</sup>, Ginro Endo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Tohoku Gakuin Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ.,  
<sup>3</sup>Transp. Bureau. Sendai. City, <sup>4</sup>OYO Co., Ltd.)

**Key words** Drainage from soil dumping site, biological arsenic removal from contaminated water, arsenic hyperaccumulator plant *Pteris vittata*, hydroponics treatment

## 1P-1p108 大腸菌により異種発現した海綿由来シリカ重合酵素の自己集合体形成と機能評価

○中島 一紀, 小栗 秀俊, 川崎 了  
(北大院・工)  
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【背景・目的】 シリカテインは海綿動物のガラス骨格中に含まれる酵素であり、温和な条件下でシリカの重合を触媒する。しかし、シリカテインは、疎水性ドメインを有し、水溶液中で多量体を形成するため不溶化・沈殿しやすい性質をもつ。シリカテインを工学的分野に応用するためには、シリカテインの自己集合体形成と機能について解明する必要がある。本研究では、大腸菌を用いた異種発現によりシリカテインを作製し、リフォールディング操作により可溶化後、シリカテインの自己集合体形成と酵素機能について調査を行った。

【方法】 大腸菌発現用にコドン最適化した *Suberites domuncula* 由来シリカテイン遺伝子挿入した pCold 発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。形質転換体を前培養後、IPTG 添加によりシリカテインの発現誘導を行い、15°C で 24 h 培養した。菌体破砕後、沈殿画分のインクルージョンボディを回収した。変性剤 (6 M 尿素) を用いてタンパク質を可溶化し、グルタチオンを含むリフォールディング溶液を外液として透析を行うことでシリカテインのリフォールディングを行った。作製したシリカテインとシリカ源であるテトラエトキシシラン (TEOS) を混合し、振とうすることでシリカの重合を行った。【結果】 pCold 発現ベクターを用いた低温発現誘導により、シリカテインが過剰発現されることを確認した。また、発現したシリカテインは大部分が不溶性画分に存在することを確認した。リフォールディングを行うことでシリカテインの可溶化に成功したが、リフォールディング後のタンパク質溶液をしばらく静置すると、徐々に自己集合体を形成して凝集体となることが明らかとなった。また、可溶化した状態のシリカテインがシリカ重合活性を有することを確認した。

### Self-assembly and functional analysis of silica-polymerizing enzyme from sponge expressed in *E. coli*

○Kazunori Nakashima, Hidetoshi Oguri, Satoru Kawasaki  
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

**Key words** biomineral, silica, self-assembly, refolding

## 1P-1p109 大気浄化型壁面緑化における土壌環境の解析

○久保田 謙三, 天保 美咲, 河目 裕介, 西部 洋晴  
(大和ハウス工業)  
kenzo-k@daiwahouse.jp

## 【背景・目的】

近年、建築物の意匠性や緑視率の向上などを目的に、建築物の壁面に植栽を設ける「壁面緑化」の導入事例が増えている。著者らは鋼製フレームに土壌を充填し、この土壌に植栽する方式の壁面緑化技術を開発してきた。この方式では単に植栽のための土壌基盤を大きくとれるだけでなく、土壌に強制的に通気する機構を付与できる特徴がある。通気によって植栽の根圏環境を改善すると共に、土壌をバイオフィルターのように取り扱うことで、大気汚染物質を浄化することが可能である。これまでに本方式の壁面緑化が自動車から排出される窒素酸化物(NO<sub>x</sub>)を低減できることを確認している。そこで、約2年間にわたって連続的に一般道の大気を通気した場合に、植栽や土壌環境がどのように変化するかについて解析することとした。

## 【方法】

壁面緑化の試験体は断面積: 10 m<sup>2</sup>×土壌厚: 150 mm とし、このうち4 m<sup>2</sup>分には通風機構を設けた(=浄化部)。浄化部には、敷地に隣接する一般道(通行台数: 約1,400 台/日)から大気を導入した。通風量は約90 m<sup>3</sup>/h、通気線速度は40 mm/sec とした。1ヶ月おきに植栽の生育を確認すると共に、浄化部および非浄化部から土壌を採取し、炭素、窒素、リン、カリウムなどの成分濃度、総細菌数、および物質循環に関わる微生物活性を評価した。測定期間は2014年5月~2016年3月までの約2年間とした。

## 【結果】

浄化部と非浄化部で植栽を比較すると、通気を行った浄化部の方が若干生育が良かった。一方、土壌中の各種成分濃度や総細菌数、微生物活性には浄化部と非浄化部で顕著な差がなく、年間を通して同じような変動を示した。これらの結果から、大気を土壌に連続的に通気することで、植栽の生育が若干促進されるが、土壌中の各種成分濃度や微生物には大きな影響がないと考えられた。

## Analysis of soil environment in the green wall system which can purify air pollution

○Kenzo Kubota, Misaki Tempo, Yusuke Kawame, Yosei Nishibe  
(Daiwa House Industry Co., Ltd.)

**Key words** green wall, air pollution, soil environment

## 1P-1p110 環境汚染物質 1,4-ジオキサン分解微生物の探索

○佐藤 駿<sup>1</sup>, 高田 真由<sup>2</sup>, 山田 綾華<sup>2</sup>, 倉根 隆一郎<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>中部大院・応生, <sup>2</sup>中部大・応生)  
silverspoongoldfork@gmail.com

背景: 1,4-ジオキサンは平成21年11月に水質汚濁防止法が改定され、公共水域、地下水での基準値(0.05mg/l)と新たに制定された。さらに、国際がん研究機構によりクラス2B(人に対する発がん性が疑われる)カテゴリに分類されている。現在は、ほとんどが反応・抽出用溶剤として利用され、処理にはオゾン+UVによる分解除去が行われているが、処理コストが高いなど問題点を抱えている。

目的: 1,4-ジオキサンをより安価なコスト及び低環境負荷を目指して、特に現行法の活性汚泥法に組み込める分解微生物の探索を行うことを目的とした。

方法及び結果: 1,4-ジオキサン含有平板培地を用いてスクリーニングを行い、単離を行った。単離した1,4-ジオキサン減少率をTOC計にて測定した。その結果を報告する。

## Screening of environmental pollutants, 1,4-dioxane, degrading microorganism(s)

○Takashi Sato<sup>1</sup>, Mayu Takada<sup>2</sup>, Ayaka Yamada<sup>2</sup>, Ryuitiro Kurane<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., <sup>2</sup>Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

**Key words** 1,4-dioxane

## 1P-1p111 1,4-ジオキサン分解細菌の炭素資化能評価

○小池 至人<sup>1</sup>, 久田 一輝<sup>1</sup>, 黒田 真史<sup>1</sup>, 池 道彦<sup>1</sup>, 角田 翼<sup>2</sup>, 井上 大介<sup>2</sup>, 清 和成<sup>2</sup>, 山本 哲史<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>北里大・医, <sup>3</sup>大成建設)  
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】1,4-ジオキサンは工業的に広く使用されている反面、毒性を有し、発がん性の可能性が指摘されている有害物質であり、1,4-ジオキサン含有産業廃棄物の不法投棄による地下水汚染の対策技術の確立が求められている。本研究では、1,4-ジオキサン汚染地下水のバイオレメディエーション技術の確立を目指し、1,4-ジオキサン分解細菌を特異的に増殖させる炭素源の探索を行った。

【実験方法・結果】7菌株の1,4-ジオキサン分解細菌、及び活性汚泥について、13種類の炭素源の資化性の評価を行った。グリオキシル酸、グリコール酸、エチレングリコール、フェノール、1,4-ブタンジオール、1-ブタノール、グルコース、及び酢酸は活性汚泥により資化されたため、非特異的に環境細微生物によって資化されるものと考えられた。一方、ジエチレングリコールは、*Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190, *Rhodococcus aetherivorans* JCM14343 による資化は認められなかったものの、他の1,4-ジオキサン分解細菌は全て資化能を示し、特に *Mycobacterium* sp. D6, *Pseudonocardia* sp. D17 は良好な増殖を示した。グリオキサルは、JCM14343 株でのみ資化が認められ、活性汚泥を含めて他の菌株では資化が認められなかった。以上より、1,4-ジオキサン分解細菌を特異的に増殖させる基質として、ジエチレングリコール及びグリオキサルが見出された。これらの基質を、浄化現場に導入する分解細菌や土着性の分解細菌の特性を考慮して適切に利用することで、効率的なバイオレメディエーションを達成できるものと期待される。

## Studies on growth substrates specific for 1,4-dioxane-degrading bacteria

○Keito Koike<sup>1</sup>, Kazuki Hisada<sup>1</sup>, Masashi Kuroda<sup>1</sup>, Michihiko Ike<sup>1</sup>, Tsubasa Tsunoda<sup>2</sup>, Daisuke Inoue<sup>2</sup>, Kazunari Sei<sup>2</sup>, Norifumi Yamamoto<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Sch. Med., Kitasato Univ., <sup>3</sup>Taisei Corp.)

**Key words** 1,4-dioxane, Specific substrate, bioremediation, groundwater

## 1P-1p112 金属腐食に及ぼす硫酸還元菌およびメタン菌の影響

○平野 伸一, 長岡 亨, 松本 伯夫  
(電中研)  
s-hirano@criepi.denken.or.jp

【背景及び目的】近年、微生物反応が急速な腐食、設備劣化を引き起こす「微生物腐食」が報告されている。鋼材設備保全のため適切な腐食対策が必要であるが、その基盤となる腐食を誘引する微生物種やその腐食メカニズムなどの情報が不足している。我々のグループではこれまでに、嫌気環境試料より獲得した腐食性微生物群集が炭素鋼表面で形成するバイオフィルムの微生物叢解析を実施し、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* やメタン菌 *Methanofollis liminatans* に近縁の微生物種が腐食に関与することを明らかにしている。そこで、本研究では硫酸還元菌及びメタン菌の腐食における役割を明らかにするために、複数種の硫酸還元菌およびメタン菌を対象とし、単独もしくは2種(硫酸還元菌+メタン菌)共存条件での腐食活性を評価することを目的とした。

【方法及び結果】硫酸還元菌3種 *D. vulgaris*, *D. alaskensis*, *Desulfovibrio* sp (単離株)、メタン菌3種 *M. liminatans*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanococcus maripaludis* を対象とし、それぞれ単独及び複合条件下での腐食試験を実施した。腐食試験は炭素鋼片(SS400, 8 mm 角)1枚を浸漬したVM-1培地に硫酸還元菌及びメタン菌を摂取し、嫌気条件下30°Cで1カ月培養を行った(無菌区、単独培養試験区、混合培養試験区それぞれn=12)。腐食活性と微生物作用の相関を明らかにするため、0, 3, 7, 21, 28 日目に各条件3本の試料を開封後、炭素鋼片を取り出し、炭素鋼片の重量測定を行った。その結果、1組の硫酸還元菌/メタン菌の組み合わせにおいて、単独培養条件に対して約5倍の腐食による炭素鋼片の重量減少が観察された。複合条件下では単独条件下では観察されないバイオフィルムの形成が見られており、本発表ではバイオフィルム内での2種の量比などから推定される腐食促進メカニズムについて考察する。

## Influence of sulfate reducing bacteria and methanogens on metal corrosion

○Hirano Shin-ichi, Nagaoka Toru, Matsumoto Norio  
(CRIEPI)

**Key words** corrosion, carbon steel, sulfate reducing bacteria, methanogen

**1P-1p113 環境単離株 FT01 の新規金属腐食メカニズムの解析**

○渡辺 宏紀<sup>1</sup>, 稲葉 知大<sup>2</sup>, 宮野 泰征<sup>1</sup>, 尾花 望<sup>2</sup>, 野村 暢彦<sup>1</sup>  
 (1)筑波大院・生命環境, (2)秋田大・理工, (3)産総研・環境管理)  
 nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

微生物金属腐食は微生物の活動が主要因子とされる金属腐食で、常温・中性環境においても金属材料が大きな腐食損傷を受ける場合がある。よって、その理解と防止が求められている。先行研究において千葉県富津湾から単離された微生物 FT01 はステンレス片(SUS303)に対して有効な付着性を示す。さらに、共焦点顕微鏡を用いた観察ではステンレス表面に立体的なバイオフィームを形成し、その下では金属腐食が生じていることが明らかとなった。また、ゲノム情報より FT01 は既知の金属腐食性細菌の特徴を持たないことが明らかとなった。そこで、本研究では FT01 の金属腐食メカニズムの解明を目的とした。鉄イオンを抜いた海水模倣培地での培養では、通常の海水模倣培地での培養に比べてステンレス表面上のバイオフィーム量が増加することが CV 染色を用いたバイオフィーム定量により明らかとなった。興味深いことにバイオフィームの増加に伴って、バイオフィーム下の腐食がより大きく促進されることが顕微鏡観察により明らかとなった。この結果から、バイオフィームの形成量の増加が腐食の進行に大きな影響を与えていることが予想される。現在は FT01 のバイオフィーム形成因子に関して詳細な解析を行っている。

**Analysis of microbiologically influenced corrosion by FT01**

○Hiroki Watanabe<sup>1</sup>, Tomohiro Inaba<sup>2</sup>, Yasuyuki Miyano<sup>1</sup>, Nozomu Obana<sup>2</sup>, Nobuhiko Nomura<sup>1</sup>  
 (1)Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, (2)Grad. Sch. Eng. Akita University, (3)Res. Inst. Environ. Manage. Technol., AIST)

**Key words** biofilm, Microscopy, Microbially Influenced Corrosion

**1P-1p114 人工プロモーターを用いたセルロース系バイオエタノール生産に資する遺伝子組換え酵母の開発**

○藤森 一浩, 小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一  
 (産総研)  
 k-fujimori@aist.go.jp

【背景・目的】従来、出芽酵母において、外来遺伝子発現には PGK1 や TDH 3 などの解糖系遺伝子のプロモーターが用いられてきたが、同時糖化発酵 (SSF) プロセスにおいては、これらのプロモーターは xylose 代謝遺伝子の発現には決して最適なわけではない。なぜならば、SSF プロセスは、酸素制限下、糖化酵素の最適温度が通常 50℃ 以上のため酵母にとっては比較的高温、雑菌汚染対策のため低 pH など、酵母にとっては非常にストレスフルな環境であると考えられる。そこで、glucose/xylose を糖源とするエタノール発酵プロセスに適した人工プロモーターをデザインし、各種発酵試験によりその性能を検証した。

【方法・結果・考察】Zid & O'Shea (Nature, 2014)らが明らかにした、glucose 飢餓状態で高い発現量を示し、細胞質移行およびリボソーム占有率の高い遺伝子群の中から、上記のような背景を踏まえて HSP ファミリー遺伝子に着目した。中でも有望な遺伝子として HSP26 をベースに、その他の HSP ファミリー遺伝子のストレス応答に関与すると思われる cis-elements を最適化したものを一定間隔で配置した。転写開始点を含む 5'-UTR に相当する部分は HSP26 を用いたが、Kozak 配列は出芽酵母に最適化した。さらに、glucose 存在下で XI 遺伝子発現を向上させるために glucose-repression (負の制御) に関与する転写因子の結合配列を除去した。領域置換 37、挿入 9、削除 33、移動 1 の合計 80 ステップの改良によりデザインされた 480 bp の人工塩基配列を pSynSR480 と名づけ、合成した。pSynSR480 より XI を発現制御する遺伝子発現カセットを AUR 部位に染色体導入した組換え酵母を作成し、YPD X 擬似糖化液、SSF によりエタノール発酵性能を検証したところ、コントロール pPGK1 に比べ xylose 消費速度、ethanol 生産性が著しい向上した。

**Design of the artificial promoter SynSR480 for production of bio-ethanol from cellulosic biomass**

○Kazuhiro Fujimori, Yosuke Kobayashi, Takaehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Yoichi Kamagata  
 (AIST)

**Key words** ethanol, promoter, expression, *Saccharomyces cerevisiae*

**1P-1p115 ペントースリン酸経路遺伝子発現の最適化による C5C6 糖同時発酵酵母の ethanol 生産性の向上**

○小林 洋介<sup>1</sup>, 藤森 一浩<sup>1</sup>, 佐原 健彦<sup>1</sup>, 鈴木 俊宏<sup>2</sup>, 蒲池 沙織<sup>2</sup>, 松鹿 昭則<sup>2</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>, 扇谷 悟<sup>1</sup>, 鎌形 洋一<sup>1</sup>  
 (1)産総研・生物プロセス, (2)産総研・機能化学)  
 k-fujimori@aist.go.jp

【目的】*Saccharomyces cerevisiae* は、xylose を効率良く資化することができないが、xylose 代謝遺伝子を導入することにより、ペントースリン酸経路 (PPP) および解糖系を介して ethanol を生産することが可能になる。しかし、ethanol 生産性向上ためには PPP の代謝フローの改善が必要である。また、同時糖化発酵 (SSF) プロセスにより ethanol 生産を行う場合、より高い温度条件下で ethanol 生産を行う必要がある。これまでの研究で、我々は、XR/XDH 導入株において、xylose を唯一の炭素源とする培地を用いた高温条件の発酵試験で、*S. cerevisiae* の代わりに耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来の PPP 遺伝子に着目し、4 種類すべての PPP 遺伝子を挿入した株が最も高い xylose 消費速度・ethanol 生産性を示すことを明らかにした。そこで、本研究では、SSF プロセスに適した遺伝子組換え酵母の開発のために、xylose 代謝遺伝子として XI を導入した株における PPP 遺伝子の発現強化・代謝改善について検討を行った。

【方法・結果】XR/XDH または XI を導入した *S. cerevisiae* IR-2 haploid 株の PHO13 領域に PPP 遺伝子を相同組み換えによって挿入した株を 85 g/L glucose, 35 g/L xylose を含む培地を用いて 36℃ 条件下で発酵試験を行った。その結果、XI 導入株は、XR/XDH 導入株よりも 1.2 倍高い ethanol yield を示した。また、PHO13 を欠損させると、xylose 代謝はむしろ低下した。そこで、XI 導入株の GPD2 領域に各種 PPP 遺伝子を挿入した株を作成し、発酵試験を行った。その結果、KmRKII と ScTKL1 のみを高発現する株が最も高い ethanol productivity を示すことを明らかにした。また、コントロール株 (*gpd2Δ*) に比べ、xylose 消費速度は約 2 倍に向上した。

**Optimization of the pentose phosphate pathway genes in simultaneous hexose and pentose fermentation**

○Yosuke Kobayashi<sup>1</sup>, Kazuhiro Fujimori<sup>1</sup>, Takehiko Sahara<sup>1</sup>, Toshihiro Suzuki<sup>2</sup>, Saori Kamachi<sup>2</sup>, Akinori Matsushika<sup>2</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,2</sup>, Satoru Ohgiya<sup>1</sup>, Yoichi Kamagata<sup>1</sup>  
 (1)BRI, AIST, (2)ISC, AIST)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation, pentose phosphate pathway, xylose isomerase

**1P-1p116 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与**

○松崎 浩明, 上田 賢一, 山崎 新平, 秦野 琢之  
 (福山大・生命工)  
 matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている。しかし、食糧となる糖・デンプン系バイオマスの利用は、食糧不足や食糧の価格高騰を招く。本研究では、アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により、セルロース系バイオマスからのバイオエタノールの生産を目指している。当研究室の過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル (CM)・セルラーゼ (CMC1) や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来の β-グルコシダーゼ (BGL1) の生産能を付与したが、セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった。エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた。そこで、BGL1 及び細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ (*cenA*) とエキソ型セルラーゼ (*cex*) の 3 種のセルラーゼ生産能の付与を検討した。まず、*cenA* 遺伝子と *cex* 遺伝子を *GAP* プロモーター、*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP* ターミネーターとの間に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型 *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した。また、*BGL1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pHM1062 を構築した。pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は、コンゴレッド染色と p-NPG 活性によりセルラーゼと β-グルコシダーゼを分泌生産していることが確認できた。しかし、セルラーゼ活性は低いと考えられた。さらに、*CMC1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体は CM セルロースを基質としてグルコース (または CM グルコース) を生じた。

**Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae***

○Hiroaki Matsuzaki, Ken-ichi Ueda, Shinpei Yamasaki, Takushi Hatano  
 (Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

**Key words** cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

## 1P-1p117 サイクリック加水分解法：新たなバイオエタノール生産工程の確立に向けて

○オリベイラ サスエ、大島 淳  
(長浜バイオ大院・バイオ)  
a\_ohshima@nagahama-i-bio.ac.jp

**【背景と目的】**従来のバイオエタノール製造は、糖やデンプンを多く含む食糧となるバイオマスから製造されており、食糧不足や価格競争を引き起こすと危惧されている。一方で、バイオエタノールは重油等の液体燃料と混合することが可能であるなどといった理由から、需要は年々高まっており、増産は必要不可欠であると考えられている。しかし現在、バイオエタノール製造に関する大きな問題点はその生産コストである。

本研究ではバイオエタノール生産におけるコスト削減のための研究を行った。研究材料として未利用植物資源の中でも、ブラジルで生産量が多いサトウキビの搾りかすであるバガスに注目した。比較的安価で行うことのできる酸加水分解法を利用し、安価で自力稼働可能な新たなバイオエタノール生産工程の確立を目指した。

**【方法】**前処理としてバガスを粉砕し、半導体工場から廃棄される  $H_2SO_4$  を用いて、特注圧力釜 (200°C, 15.3 気圧) において酸加水分解を行った。この条件下におけるバガスの最適反応条件を決定し、回収するグルコースが過分解を起こさないために段階的に加水分解を行う方法、サイクリック加水分解法を用いてグルコースを回収した。最後に出芽酵母を用いてアルコール発酵を行い、さらに濃縮・蒸留を経てバイオエタノールを回収した。

**【結果と考察】**回収したグルコースが希硫酸によって過分解がおこりにくい新たな高温高压での製造方法「サイクリック加水分解法」を確立できた。反応条件 20 min,  $[H_2SO_4]$  50 mM におけるバガスの乾燥重量当たりの糖化率は 5 cycle で約 23% となった。ブラジルで発生されるバガスの 1/4 をこの方法を利用し、バイオエタノールを製造すると、得られるバイオエタノール量の理論値は約 407 万トンであり、18.5% の増産が期待できる。

### Cyclic Hydrolysis: Advanced System for Next Generation of Bio-Ethanol Producing

○Sanuê Oliveira, Atsushi Ohshima  
(Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.)

**Key words** bio-ethanol, acid hydrolysis, ethanol fermentation, bagasse

## 1P-1p118 低コストバイオ燃料開発に向けた、セルロース系資源作物からの非破壊糖取出しを目指して

○米倉 円佳<sup>1</sup>, 青木 直大<sup>2</sup>, 廣瀬 竜郎<sup>3</sup>, 大杉 立<sup>2</sup>, 近藤 聡<sup>1</sup>, 大音 徳<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>トヨタ自動車・バイオ・緑化研,<sup>2</sup>東大院・農生科,<sup>3</sup>農研機構・中央農研,<sup>4</sup>トヨタ自動車・未来研)  
madoka\_yonekura@mail.toyota.co.jp

### 【背景と目的】

バイオ燃料として、食糧と競合しないバイオマス由来のエタノールが注目されているが、セルロースを原料としたエタノール発酵では、糖化のコストが課題となっている。一方、植物から光合成産物である糖 (ショ糖および単糖) を、非破壊で連続的に取り出せれば、直接エタノール発酵が出来、コスト削減につながることを考えられる。そこで植物から人工的に、非破壊で糖を取出す技術の開発を行った。

### 【方法】

植物からの糖取出し方法として、排水液 (溢液) を用いることを試みた。排水は、根における水分吸収が活発で且つ葉の気孔が閉じている場合に、葉内の主に細胞間隙の水が排水組織を通して滲出する現象である。一方 SWEET として知られる糖トランスポーターは、糖を細胞外に排出する活性を持ち、モデル植物シロイヌナズナでは Clade I から IV に分類される全 17 種類の *ASWEET* 遺伝子が知られる。

そこでモデル植物シロイヌナズナを用い、SWEET 遺伝子を過剰発現することで、排水液中に糖を排出させ、排水液として糖を取り出すことを試みた。

### 【結果】

シロイヌナズナで、SWEET 遺伝子を過剰発現した結果、Clade III の SWEET 遺伝子過剰発現時のみ、高糖濃度の排水液が得られた。シロイヌナズナにシロイヌナズナ由来 *ASWEET12* 遺伝子を過剰発現した場合は単糖当量で平均 6 mM、イネにイネ由来 *OSWEET13* 遺伝子を過剰発現した場合は単糖当量で平均 185 mM の糖濃度の排水液が得られた。Clade III SWEET 遺伝子の共通アミノ酸配列を元に設計した、人工 SWEET 遺伝子の導入によっても、単糖当量で平均 21 mM の糖濃度の排水液が得られた。

### Aiming to extract sugars nondestructively from cellulosic crops for low cost biofuel

○Madoka Yonekura<sup>1</sup>, Naohiro Aoki<sup>2</sup>, Tatsuro Hirose<sup>3</sup>, Ryu Ohsugi<sup>2</sup>, Satoshi Kondo<sup>1</sup>, Chikara Ohto<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Biotech. & Afforestation Lab., Toyota Motor Corp., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, <sup>3</sup>CARC, NARO, <sup>4</sup>Future Proj. Div., Toyota Motor Corp.)

**Key words** cellulosic biomass, saccharification, biofuel, sugar extraction

## 1P-1p119 草本系バイオマス由来ヘミセルロース強力分解菌の探索

○湯下 佳和<sup>1</sup>, 田中 季季<sup>2</sup>, 松本 帆南<sup>2</sup>, 倉根 隆一郎<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>中部大院・応生,<sup>2</sup>中部大・応生)  
rkurane@isc.chubu.ac.jp

**【目的】**現在、バイオエタノールの原材料として利用されているものとしては、とうもろこしやサトウキビなどの糖化が簡単なもので、これらは第 1 世代バイオエタノールと呼ばれている。これらは食物のとの競合がおこり、作物の価格上昇が問題となっている。一方、セルロース系バイオマスとして容易で安定して収集可能な草本系・木質系バイオマスが注目を集めている。これらは第 2 世代バイオエタノールと呼ばれている。これらの資源の糖化法としては現在化学的手法により行われているが、強酸・高温条件下で行われるため、収率の低下や高コスト化などの問題となっている。これに変わる糖化技術として酵素糖化法が注目されている。この手法を用いることにより、科学的手法よりも低コストかつ高効率に草本系・木質系バイオマスを分解することができる。本実験では草本系ヘミセルロースに着目し、ヘミセルロース高分解菌の探索を行った。

**【方法】**菌株は自然界よりスクリーニングを行い、各菌株から酵素液を作成した。それらを水洗した粗粉砕稲わらおよび、キシランに加え糖度を測定した。糖度測定は DNS 法及び、ソモギーネルソン法を用いた。分解活性をもとに高分解菌を単離した。

**【結果】**スクリーニングの結果ヘミセルロースを強力に分解すると思われる菌株を取得できた。その菌株の特徴や生産する酵素についての報告を行う。

### Newly isolated microorganism that secretes hemicellulose rapidly saccharifying enzymes on milled herbal biomass.

○Yoshikazu Yushita<sup>1</sup>, Saki Tanaka<sup>2</sup>, Honami Matsumoto<sup>2</sup>, Ryuichiro Kurane<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., <sup>2</sup>Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

**Key words** hemicellulose, saccharification, xylose

## 1P-1p120 特異的にナノセルロース分解を行う微生物の単離

○高橋 仁志, 大槻 隆司  
(山梨大院・医工農・生環)  
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

**【背景・目的】**ナノセルロース(NC)は、セルロースを物理的あるいは化学的に処理することでナノサイズになったセルロースの総称である。NC はセルロースが原料であるため、自然界では微生物によって通常のセルロース(WC)繊維と同様に分解されるであろうと考えられていた。我々は各種土壌を微生物源として NC に接種し、継代したところ、WC を分解しないが、NC を特異的に分解する微生物群を見出した。本研究では NC 分解微生物群から NC 分解菌を単離することを目的とした。

**【方法・結果】**本研究ではセルロースナノウィスカーを NC として用いた。各微生物群の継代培養に従い、Sporensen 培地あるいは YEC 培地を用いて、1% WC 又は NC を含む寒天培地を調製し、NC 分解微生物群を塗布して、好気条件下あるいは嫌気条件下で培養した。その結果、好気条件下の YEC 培地において NC の分解によるクリアゾーン形成が認められたコロニーを画線分離し、単離株を得た。

1% NC または WC を含む YEC 液体培地に単離株を植菌し、30°C で 60 日間振盪培養した。15 日ごとに培養液を採取し、酸性デタージェント処理を経て、フェノール硫酸法により NC 及び WC の残存量を定量した。その結果、単離株は NC を分解するが、WC を分解しないことが示された。

単離株を同定するために 16S rRNA 領域の遺伝子配列決定を行った。BLAST 検索の結果からは *Cellulosimicrobium* 属細菌由来配列と 100% の一致がみられた。しかし既知の種とは生理学的特徴がかなり異なっており、単離株は新種の細菌である可能性が高いと考えられた。

単離株による NC 分解の様式に興味もたれることから、現在、単離株の分泌酵素の精製、および NC 分解産物の調査を進めている。

### Isolation and characterization of the bacterium specifically degrading cellulose nanowhisker

○Hitoshi Takahashi, Takashi Ohtsuki  
(Dept. Life Environ. Sci., Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Univ. Yamanashi)

**Key words** cellulose nanowhisker, isolation, degradation, *Cellulosimicrobium*

**1P-1p121 草本バイオマスを利用したグルコース生産**

○荒木 希和子, 久保 幹  
(立命館大・生命)  
kiwakosa@fc.ritsumeikai.ac.jp

【背景と目的】 雑草は人間の活動範囲に旺盛に繁茂する草本植物の総称であり、資源として未利用な草本バイオマスである。一方、バイオエタノールは再生可能エネルギーとして利用されつつあるが、主な原料が作物であるため、食糧と競合しないバイオマスの探索が課題となっている。バイオエタノールの原料として雑草を利用することができれば、除草管理としても効果的である。また、*Fusarium* sp.72-1 (以下 72-1 株) は木質由来のバイオマスに旺盛に生育し、55℃の熱を加えると自己溶解し、グルコースを生産する糸状菌である。草本バイオマスを 72-1 株の培地としたグルコース生産方法を確立できれば、効率的かつ低コストにエネルギー生産を行うことができると考えられる。本研究では、糸状菌バイオマスを介したグルコース生産に適した雑草を探索することを目的とし、草本種の特性と糸状菌を介したグルコース生産効率の関係を調べた。【方法】 四季ごとに大学敷地内で旺盛に生育する草本を採取し、植物体に含まれる成分を分析した。また、72-1 株によるグルコース生産能を調べるため、粉末化した草本に 72-1 株を植菌し、30℃で 9 日間培養を行った。【結果と考察】 成分分析の結果、草本種によって成分量が異なり、特に窒素の含有量が大きく異なっていることがわかった。中でもマメ科植物では窒素量が高く、秋に採取したアレチノスズビトハギ (*Desmodium paniculatum*) の窒素量は 68,340 mg/kg だった。また、同種であっても成分量は季節により変化した。全ての草本種で 72-1 株が生育し、アレチノスズビトハギにおいて最大濃度 4.05 g/L のグルコースが生産された。このことから、72-1 株は窒素含有量が高いマメ科の植物に旺盛に生育する傾向にあり、特に成長時期の植物がグルコース生産に適していることが示唆された。

**Glucose production using biomass of wild herbaceous plants**

○Kiwako S. Araki, Motoki Kubo  
(Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** energy production, glucose, heat lytic filamentous fungi, herbaceous biomass

**1P-1p122 発酵熱を利用した熱溶菌性糸状菌からのグルコース生産**

○中井 貴久, 森 慶太, 荒木 希和子, 久保 幹  
(立命館大・生命科学)  
kubo@sk.ritsumeikai.ac.jp

【背景・目的】 植物由来のバイオマスは食料と競合しないバイオエタノールの原料である。しかし、植物由来のバイオマスの糖化には多くのエネルギーが必要であることが課題である。*Fusarium* sp. 72-1 (以降、72-1 株) は植物由来のバイオマスを基質として生育し、55℃の熱を加えることで自己溶解して細胞壁由来のグルコースを放出する熱溶菌性糸状菌である。72-1 株を用いることで植物由来のバイオマスを穏やかな条件下でグルコースに変換する手法が確立されている。本研究では、72-1 株を自己溶解させるための熱源として微生物の活動によって発生する発酵熱に着目し、72-1 株の自己溶解に必要な熱エネルギーを削減することで、さらにエネルギー効率よくグルコースを生産する手法を検討した。【方法・結果】 小麦フスマ 100 g に対して水を 60 g 加えた固体培地で 72-1 株を 10 日間培養した。培養後、72-1 株の菌体を培地ごと真空断熱式の保温容器に移し替え、綿栓をして室温で 24 時間静置した。処理中の発酵熱の発生による温度変化と、72-1 株の自己溶解に伴ったグルコース生産の経時変化を調べるため、2 時間おきに保温容器内の温度、培地中のグルコース量および 72-1 株の菌体量の測定を行った。この結果、保温容器内の温度が、72-1 株からの発酵熱によって実験開始から 4 時間の時点で 55℃に達し、その前後の時間帯に 72-1 株の菌体量の減少とグルコース量の増加が著しいことがわかった。グルコースの最大生産量は実験開始から 8 時間の時点で 58.3 mg/g medium であることが明らかになった。一方、同じサンプルを外から 55℃の熱を加える従来の手法で処理した場合に得られたグルコース量は 52.5 mg/g であった。外部からの加温を必要とせず発酵熱を利用して 72-1 株からグルコースを生産する手法で、加温を必要とする従来の手法と同程度のグルコースを生産できた。

**Glucose production from heat lytic fungi by heat of decomposition**

○Takahisa Nakai, Keita Mori, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** glucose, heat of decomposition, heat lytic fungi

**1P-1p123 バイオマス細胞壁分解への放線菌フェルラ酸エステラーゼの添加効果**

○裏地 美杉, 万 ケン, 畑中 唯史  
(岡山県生科総研)  
hatanaka@bio-ribs.com

【目的】 放線菌由来フェルラ酸エステラーゼ (FAE, R18 および R43) は、植物細胞壁からフェルラ酸 (FA) を加水分解することができる酵素であり、米糠などの未利用バイオマスからの FA 抽出に効果を示す。また、植物バイオマス利用の重要なプロセス、細胞壁分解にも有用である可能性がある。今回、放線菌 FAE の植物細胞壁分解への有用性を評価するため、脱脂米糠、トウモロコシ穂軸、サトウキビバガス等のイネ科植物バイオマスを材料とし、FAE と放線菌由来糖加水分解酵素処理による糖類の生産を分析した。【方法と結果】 粉砕した各バイオマスに、0.1M トリスマレイン酸バッファー (pH7.0) を添加後、99℃で 5 分間加熱した。冷却後、R18 および R43、また糖加水分解酵素として放線菌キシラナーゼ、アラビノフラノシターゼを混合し、40℃で 24 時間振とうした。さらに、遠心分離によって上清を回収し、HPLC にて分析した。脱脂米糠およびサトウキビバガスを材料とした場合、六炭糖から構成される 3-6 糖のオリゴ糖の生成量が FAE の添加によって増加した。一方、トウモロコシ穂軸からは、五炭糖で構成される 2 糖の生成が、FAE の添加によって著しく増加した。サトウキビバガスからの FA 抽出には、FAE と糖加水分解酵素の共処理が最も効果が見られ、この結果は脱脂米糠のものと同じであった。また、今回用いた放線菌キシラナーゼは、人工基質  $\rho$ -ニトロフェニルセロビオシドに分解活性を示した。材料としたバイオマスによって、六炭糖もしくは五炭糖のオリゴ糖が生成したのは、放線菌キシラナーゼの基質となる細胞壁構造中のセルロースおよびキシロース含量比が異なるためと考えられる。また、サトウキビバガスや脱脂米糠の細胞壁においては、FAE が糖加水分解酵素類と協動的に働くことで、細胞壁分解が促進され、FA のみならず、セルロース由来糖類の生産が向上すると考えられた。

**Degradation of biomass cell walls by using *Streptomyces feruloyl* esterase**

○Misugi Uraji, Kun Wan, Tadashi Hatanaka  
(Res. Inst. Biol. Sci., Okayama Pref.)

**Key words** *Streptomyces*, biomass, feruloyl esterase

**1P-1p124 バイオマスと熱溶菌性糸状菌を用いたエネルギー生産ルートの確立**

○西澤 尚樹, 久保 幹, 荒木 希和子  
(立命館大・生命科学)  
kubo@sk.ritsumeikai.ac.jp

【背景・目的】 食料と競合しないバイオマスとして、農作物として利用されない植物由来のバイオマスが注目されているが、多くは難分解性物質を多く含むため、現在ではエネルギー資源として再利用されていない。当研究室が単離・同定した *Fusarium* sp.72-1 (以下、72-1 株) は植物由来のバイオマスを基質とし旺盛に生育する。この菌株は熱を加えることで自己溶解し、細胞壁由来のグルコースを放出するため、この性質を利用して従来の糖化法よりも温和な条件下で糖化することが可能である。したがって、得られた糖をエタノールに変換することで、バイオマスと糸状菌由来のエネルギー生産ルートを確立することができる。本研究では、バイオマスと熱溶菌性糸状菌から得られたグルコースを原料とし、エタノールを生産することを目的とした。【方法・結果】 清酒酵母のエタノール生産能を確かめるため、グルコース濃度を調整した酵母用完全液体培地に清酒酵母培養液を植菌し、酵母培養装置でアルコール発酵させた。培養後のエタノール量を測定したところ、グルコース濃度 400 g/l のときに最大であった。また、グルコース濃度 10 g/l の系でもエタノールが得られ、低濃度のグルコースでもアルコール発酵が可能であった。次に、熱溶菌性糸状菌から得られたグルコースを用いて、清酒酵母でアルコール発酵を行った。小麦ふすま培地で静置培養した 72-1 株を熱処理し、熱溶菌溶液を酵母培養装置にいれ清酒酵母培養液を植菌してアルコール発酵させた。培養後、得られた上清を減圧蒸留し、蒸留液を HPLC を用いて定性・定量を行った結果、エタノールの生成が確認できた。100 g のバイオマスから得られたグルコースは 7.14 g であり、そこから生産されたエタノールは 15.3 mL であった。以上より、バイオマスと熱溶菌性糸状菌由来のグルコースからのエタノール生成方法が確立された。

**Established ethanol production roots from biomass and heat lytic fungi**

○Naoki Nishizawa, Motoki Kubo, Kiwako S. Araki  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** ethanol fermentation, filamentous fungi, *Fusarium*, *Saccharomyces cerevisiae*

**1P-1p125 固定化酵母 *Candida magnoliae* を用いたキシリトールの微生物生産**

○姜 林涛, 堀内 淳一, 熊田 陽一  
(京工織大院・工芸科学)  
horiuchi@kit.ac.jp

【目的】本研究室では未利用バイオマスを原料としたバイオプロセスによるキシリトール生産を検討している。これまで、キシロース資化性酵母 *Candida magnoliae* を用い、コーンコブを原料としたキシリトールの効率的生産について報告してきたが、実用化のためには更なる効率化が必要である。そこで生産コストの低減を目的にプロセスの連続化を進めることとし、固定化 *Candida magnoliae* による高効率なキシリトール生産プロセスの検討を行った。

【実験方法及び結果】バイオマスとしてコーンコブを用いた。粉碎したコーンコブを 1.5%  $H_2SO_4$  により、121°C、60min の条件で加水分解・ろ過後中和し、キシロース濃度 22 g/L~25 g/L の加水分解液を得た。*C. magnoliae* をアルギン酸ナトリウムで包括固定化したところ、良好な増殖が認められたため、この固定化菌体をエアリフト型バイオリクターに有効容量の 10% 充填し、温度 30°C、PH7.0 の条件で回分培養及び繰り返し回分培養を行うと共に、酸素移動速度 (OTR) 条件がキシリトール生産に及ぼす影響を検討した。その結果、OTR=2.56mmol- $O_2$ /L・h の OTR 条件において収率 0.65g-xylitol/g-xylose、生産性 0.27g/L・h で繰り返し回分培養を行うことが可能で、菌体固定化の有用性が示唆された。現在、固定化菌体を用いた連続培養を実施中である。

【参考文献】 1) 堀内淳一；化学工学,77,12,845-848(2013)

**Microbial production of xylitol using immobilized yeast *Candida magnoliae***

○Lintao Jiang, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

**Key words** immobilization, xylitol, repeated batch culture, airlift bioreactor

**1P-1p126 *Kluyveromyces marxianus* におけるキシリトール脱水素酵素の補酵素特異性改変による効果**

○鈴木 俊宏<sup>1</sup>, 橋本 智代<sup>1</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>, 松鹿 昭則<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>広島大院・先端物質)  
a-matsushika@aist.go.jp

バイオマスからのエタノール生産には、糖化反応と発酵反応を同時に行うことが生産コスト削減の観点から望まれる。この同時糖化発酵には糖化酵素の反応温度領域(40°C以上)で発酵が可能な高温耐性酵母が必要となる。高温耐性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は同時糖化発酵に用いる有望な酵母として期待されているが、キシロース発酵能は十分ではない。前回大会では、*K. marxianus* のキシロース還元酵素(XR), キシリトール脱水素酵素(XDH), キシリロースリン酸化酵素(XK)を *K. marxianus* で過剰発現させることで野生型株よりもキシロース発酵能が向上することを報告したが、キシロース消費速度は依然として低い。そこで、本研究では *K. marxianus* のキシロース消費速度の向上を目的とした。*Saccharomyces cerevisiae* において、補酵素特異性を  $NAD^+$  要求性から  $NADP^+$  要求性に改変した *Scheffersomyces stipitis* XDH(変異型 XDH)を過剰発現させることでエタノール収率が向上することが報告されている。補酵素として  $NAD^+$  を使用する *K. marxianus* XDH の補酵素認識領域と *S. stipitis* XDH における領域との保存性が高かったため、*S. stipitis* 変異型 XDH における変異と同様の変異を *K. marxianus* XDH に導入することによって、*K. marxianus* XDH の補酵素特異性を  $NAD^+$  要求性から  $NADP^+$  要求性に変更した。そして、この *K. marxianus* 変異型 XDH を *K. marxianus* で過剰発現させた結果、30°C でのキシロース消費速度(0.47 g/L)は、変異導入前と比較して 4.7 倍増加した。さらに、40°C でのキシロース消費速度(0.89 g/L)は、30°C と比べて 1.8 倍増加した。これらの結果から、*K. marxianus* XDH の補酵素特異性を改変することで、キシロース消費速度を顕著に向上させることに成功した。

**Alteration of coenzyme specificity in a xylitol dehydrogenase from *Kluyveromyces marxianus***

○Toshihiro Suzuki<sup>1</sup>, Tomoyo Hashimoto<sup>1</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,2</sup>, Akinori Matsushika<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>ISC, AIST, <sup>2</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** *Kluyveromyces marxianus*, xylose fermentation, coenzyme specificity, bioethanol

**1P-1p127 キシリトール資化性を導く変異型 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株を用いた発酵解析**

○谷 龍興, 田口 久貴, 赤松 隆  
(崇城大院・工)  
akamatsu@bio.sojo-u.ac.jp

【目的】キシロース資化性組換え *S. cerevisiae* 株からキシロース資化能が向上した Hex<sup>+</sup>株 SCB38 を構築し、次世代シーケンサと遺伝解析でその原因遺伝子を特定している。また、キシリトール資化性 Xyl<sup>+</sup>変異体を分離し、*gal80* が原因遺伝子であること、*GAL2* 発現が資化に必要であること、Gal2 はキシリトール輸送を行うこと等を明らかにしている。そこで、キシリトール資化性株のキシロースやキシリトール培地での発酵を行い、補酵素やその回転とエタノール生産との関係を調べる。【方法と結果】20 g/L キシロースまたはキシリトール培地 pH 5.0 を用い、嫌氣的もしくは好氣的に、初発細胞濃度( $A_{600}$ )が 20、温度 30°C で発酵を行った。グルコース、キシロース、キシリトール、グリセロール、エタノール濃度は HPLC で測定した。*gal80Δ* 株の嫌氣的発酵で、キシリトール培地のキシリトールは、培養 100 時間後でも 15.6 g/L 残存したが、キシロース培地のキシロースは 12 時間で消費し、エタノールは培養とともに増加して 100 時間後に 5.6 g/L となり、キシリトールは 25 時間までは増加して 7.3 g/L に、その後、徐々に減少して 6.5 g/L になった。一方、好氣的培養で、キシリトール培地のキシリトールは 50 時間で 90% 弱が消費し、100 時間後には全て消費した。エタノールは 50 時間までは徐々に増加して 4.2 g/L となり、その後、減少した。キシロース培地のキシロースは 12 時間ではほぼ消費し、12 時間まではエタノール(5.4 g/L)もキシリトール(3.4 g/L)も増加するが、その後減少した。親株や *TDH3p-GAL2* 株などの発酵を解析した結果も併せ、Xyl1 の補酵素要求性 ( $NADPH$  もしくは  $NADH$ )、Xyl2 の補酵素要求性  $NAD^+$ 、Xyl2 反応後に生じる  $NADH$  の  $NAD^+$  への酸化とキシリトール消費との関係や Xyl1 反応後に生じるキシリトールがなぜ蓄積するのかなどを考察する。

**Xylose and xylitol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strains leading to xylitol assimilation**

○Tatsunori Tani, Hisataka Taguchi, Takashi Akamatsu  
(Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, xylitol, D-xylose, fermentation

**1P-1p128 Gas sparging affects acetic acid fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica***

○Harifara Rabemanolontsoa, Piradee Jusakulvijit, Shiro Saka  
(Dept. Socio-Environ. Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)  
rabemanolontsoa.harifara.5c@kyoto-u.ac.jp

A novel process to produce ethanol via acetic acid fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica* (*C. thermoacetum*) has been developed for the valorization of lignocellulosic biomass with improved carbon conversion efficiency. To optimize the process, the effects of gas conditions on acetic acid fermentation of glucose and cellobiose by the co-culture of anaerobic *C. thermocellum* and *M. thermoacetica* were investigated in 500 mL fermenters. Sparging with external  $CO_2$  showed the highest acetic acid yield which was above the theoretical maximum, indicating that the external  $CO_2$  was also fermented to acetic acid. This creates an overestimation of the products from the actual substrate and an erring material balance. When  $N_2$  was sparged with the same flow-rate as  $CO_2$ , almost no acetic acid could be produced and the microorganisms showed minor growth which could mean that the purged  $N_2$  might have inhibited the cells. On the other hand, when fermentation was accomplished without gas sparging but with  $N_2$  in the headspace, reasonable acetic acid near the theoretical maximum was obtained and the microorganisms could grow properly. From these results, it became clear that to obtain accurate mass balance and realistic acetic acid yield using *C. thermocellum* and *M. thermoacetica*, the ideal gas condition is  $N_2$ , without sparging. This fermentation system would support the progress towards efficient acetic acid-based ethanol production from lignocellulosics.

**Gas sparging affects acetic acid fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Moorella thermoacetica***

○Harifara Rabemanolontsoa, Piradee Jusakulvijit, Shiro Saka  
(Dept. Socio-Environ. Energy Sci., Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)

**Key words** acetic acid, *Clostridium thermocellum*, *M. thermoacetica*,  $CO_2$  fixation

**1P-1p129 嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* を基盤とした植物バイオマスからの水素ガス生産方法の検討**関 兵馬<sup>1</sup>, 吉田 稜<sup>2</sup>, 三縄 由希子<sup>1</sup>, 粟冠 真紀子<sup>1</sup>, 〇木村 哲哉<sup>1</sup>, 粟冠 和郎<sup>1</sup>(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>三重大・生資)

t-kimura@bio.mie-u.ac.jp

次世代クリーンエネルギーの水素ガスをバイオマスから微生物によって直接生産することを究極の目的として、当研究室保有の中温菌 *Clostridium paraputrificum* M21 を中心としたシステムの構築をめざしている。C. paraputrificum M21 はデンプンやキチンなどを炭素源として短時間で増殖し水素ガスを高生産するが、豊富な植物細胞壁を分解出来ない。そこで、植物細胞壁分解性の嫌気性細菌と組み合わせる植物バイオマスから直接水素ガスを効率的に生産する検討を行った。まず、植物細胞分解性の嫌気性菌 *Ruminiclostridium josui*, *Ruminiclostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium* の単独培養によるガス生産性を調べたが、これらは C. paraputrificum と比較して水素ガス生産性が低かった。そこで、C. paraputrificum の生育温度 45℃において生育の早かった R. josui との組み合わせを考えた。ハンゲートチューブで前培養した C. paraputrificum M21 と R. josui を、ボールミルセルロース 1g を炭素源とする GS 改変培地 90 mL に 10mL 添加し、45℃で培養して水上置換法でガスを回収した。C. paraputrificum 単独では生育せず、R. josui は 10 日でボールミルセルロースを完全分解し 14 mL の水素ガスを生産した。一方、C. paraputrificum と R. josui を共存培養したところ、10 日間の培養でほとんどセルロースを分解して 81 mL の水素ガスを生産した。R. josui 単独では乳酸の生産が多かったのに対して、共存培養では酪酸が増えていた。共存培養液中の DNA 解析から両株の増殖が示された。

**Bio-hydrogen gas production from plant biomass by anaerobic bacterium *Clostridium paraputrificum***Hyoma Seki<sup>1</sup>, Ryo Yoshida<sup>2</sup>, Yukiko Minawa<sup>1</sup>, Makiko Sakka<sup>1</sup>, 〇Tetsuya Kimura<sup>1</sup>, Kazuo Sakka<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>2</sup>Fac. Bioresour., Mie Univ.)**Key words** *Clostridium paraputrificum*, hydrogen production, biomass, *Ruminiclostridium josui***1P-1p130 灌漑用水条件の異なるエジプト産ホホバ種子中の代謝物の変動解析**〇藤波 友樹<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1</sup>, Hegazy Adel<sup>2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1</sup>(<sup>1</sup>近畿大院・生物理工・生工, <sup>2</sup>Univ. Sadat City, Egypt)

kajiyama@waka.kindai.ac.jp

【目的及び背景】ホホバ (*Simmondsia chinensis*) は乾燥や塩ストレスに強く、不毛な土地でも生育可能なアメリカ南部原産の植物である。その種子中には、有用な代謝物であるホホバオイルやシモンドシン類を含んでおり、その商業的価値の高さから現在では世界各地で栽培されている。一方で、国土の 96% が砂漠地帯であるエジプトでは、新規農業として、既存の水資源と競合しない下水処理水などの未利用水を用いたホホバの大規模栽培が検討されている。しかしながら、灌漑用水条件がホホバの代謝物にどのような影響を与えるのか等を調査した研究は未だに報告されていない。本研究では、灌漑用水条件の異なるエジプトの 5 つの地域で栽培されたホホバの種子中のホホバオイルとシモンドシン類を分析し、多変量解析を行うことにより、灌漑用水条件と代謝物の関係について調査することを目的とした。

【方法及び結果】灌漑用水条件 (塩濃度、重金属濃度等) の異なるエジプトの 5 つの地域 (Luxor, Ismailia, Sinai, 6th October, Cairo) で栽培されたホホバの種子をそれぞれ破砕後、ヘキサソおよび 80% アセトニトリル水溶液にて順次抽出し、それぞれ GC/MS 及び LC/MS に供して、ホホバオイルおよびシモンドシン類の分子種の同定と定量を行った。得られた分析結果を主成分分析に供することにより、各灌漑条件で特徴的な代謝パターンについて考察した。その結果、塩濃度や重金属濃度はホホバオイルの総量よりも組成に影響する一方で、シモンドシン類においてはこれらは総量と組成の両方に影響することが明らかとなった。

**Variability analysis of metabolites in Egyptian jojoba seeds cultivated on various irrigation conditions**〇Tomoki Fujinami<sup>1</sup>, Tetsuya Matsukawa<sup>1</sup>, Adel Hegazy<sup>2</sup>, Shin'ichiro Kajiyama<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Biol. Oriented. Sci. Technol., Kindai Univ., <sup>2</sup>Univ. Sadat City, Egypt)**Key words** jojoba, GC/MS, LC/MS, PCA**1P-1p131 Effect of alkalinity on dry anaerobic digestion of Swine manure in a prototype cylindrical digester**

〇Hesborn Andole Ondiba, Weiwei Huang, Wei Cai, Ziwen Zhao, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang

(Univ. Tsukuba)

zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Anaerobic digestion (AD) is one of the best sustainable technologies for energy production and recovery from organic solid wastes. Little information is available on how to use alkalinity index to control and manage dry AD. This study aims to test the feasibility of using alkalinity to manage dry AD system for swine manure treatment and clarify its effect on the stability and efficiency of the newly-developed prototype cylindrical digester system.

Swine manure was collected from a pig farm in Ibaraki. A prototype cylindrical digester with a diameter of 40 mm and length of 1000 mm (1.3 liters) was designed, fabricated and operated under mesophilic conditions (38℃). Total solids (TS) was adjusted to 15% before feeding into the digester. The alkalinity of manure was increased by 3000 g/L using sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>) with the raw swine manure as the control (E<sub>0</sub>). Biogas components were quantified by gas chromatography machine.

Only one peak appeared on day 5 in the biogas production for the E<sub>0</sub> experiment which almost ceased on day 18. The E<sub>1</sub> experiment exhibited two biogas peaks, i.e. on day 10 (38.64 ml/g-VS<sub>reduced</sub>/d) and day 26 (33.34 ml/g-VS<sub>reduced</sub>/d), and its biogas production lasted for 35 days. This difference is most probably attributable to the high alkalinity in E<sub>1</sub> that stabilized the digestion process and minimized the influence of pH variations on methanogenesis. In comparison to 235 liters of biogas produced from E<sub>0</sub>, 60% increase in biogas production was detected in E<sub>1</sub> (377 liters).

**Effect of alkalinity on dry anaerobic digestion of Swine manure in a prototype cylindrical digester**

〇Hesborn Andole Ondiba, Weiwei Huang, Wei Cai, Ziwen Zhao, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang

(Univ. Tsukuba)

**Key words** alkalinity, dry anaerobic digestion, swine manure, cylindrical digester**1P-2p132 B 型肝炎ウイルス及びバリオナノカプセルの初期感染機構の解析**

〇劉 秋実, 曾宮 正晴, 黒田 俊一

(阪大・産研)

askinomi101044@sanken.osaka-u.ac.jp

【背景】バリオナノカプセル (BNC) は、B 型肝炎ウイルス (HBV) のヒト肝臓特異的感染機構を担う外皮 L タンパク質を出芽酵母で発現することにより得た直径約 50 nm の中空ナノ粒子であり、DDS ナノキャリアとして開発されている (山田, Nat Biotech 2003; 曾宮と黒田, ADDR 2015)。現在、HBV 受容体として低親和性の HSPG (heparan sulfate proteoglycan) と高親和性の NTCP (Nataurocholate co-transporting protein) が同定されているが、HBV や BNC の細胞内侵入及びエンドソーム脱出における役割は不明である。

【目的】HBV/BNC の細胞内侵入過程における HBV 受容体 HSPG 及び NTCP の役割を解明する。

【方法及び結果】ヒト肝癌由来細胞 HepG2 (NTCP 陰性、HSPG 陽性、HBV 感染不可) と NTCP 発現 HepG2 (HBV 感染可) を用いて、蛍光標識した BNC、Myr-BNC (NTCP に結合するミリスチル化 BNC; HBV モデル) 及び HBV 表面抗原粒子 (HBsAg; ミリスチル化 L タンパク質を含む) の細胞内取り込みをフローサイトメトリー及び共焦点レーザー顕微鏡により解析した。その結果、上記粒子は NTCP 非依存的に細胞内に取り込まれ、ヘパリン添加により完全に阻害された。また、NTCP アンタゴニストである Myr-47 ペプチド (L タンパク質 N 末端部分) は、NTCP 発現の有無と関わらず、上記粒子の細胞内取り込みを阻害した。なお、上記粒子の細胞内局在に大きな差は認められなかった。以上の結果は、HBV、BNC 及び Myr-BNC は、細胞表面 NTCP とは無関係に HSPG 依存的に細胞内侵入することを示している。従来、NTCP と相互作用すると考えられてきた Myr-47 ペプチドが、HSPG または未知の HBV 受容体とも相互作用する可能性が示唆された。さらに、HBV 感染成立に NTCP が必須なことから、エンドソーム内 NTCP が少なくとも HBV のエンドソーム脱出に関与していると考えられた。

**Elucidation of early infection machinery of hepatitis B virus and bio-nanocapsule**

〇Qiushi Liu, Masaharu Somiya, Shun'ichi Kuroda

(ISIR, Osaka Univ)

**Key words** bio-nanocapsule, hepatitis B virus, heparan sulfate proteoglycan, Nataurocholate cotransporting polypeptide

## 1P-2p133 様々な抗体を提示可能なバイオナノカプセルによる能動的標的化 DDS ナノキャリアの開発

○立松 健司, 李 昊, 飯嶋 益巳, 黒田 俊一  
(阪大・産研)  
kenji44@sanken.osaka-u.ac.jp

バイオナノカプセル (BNC) は、B 型肝炎ウイルスの高度なヒト肝臓特異的感染機構を担う同ウイルス外皮 L タンパク質を出芽酵母細胞内で発現して得た中空ナノ粒子で、内封薬物を肝臓特異的に送達できる薬物送達 (DDS) ナノキャリアである (山田ら, *Nat. Biotech.* 2003)。また、BNC はリポソーム等の従来型 DDS ナノキャリアと複合体形成して、BNC 由来の能動的標的化能、免疫機構から逃れるステルス化能、そして細胞質内送達能を付与できることが明らかになっている (曾宮ら, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015)。これまでに、L タンパク質のヒト肝臓認識部位を Protein A 由来の IgG Fc 領域結合 Z ドメインのタンデム分子に置換した ZZ 提示型 BNC (ZZ-BNC) を作製し、抗体特異性により生体内の任意部位への DDS にも成功してきた。しかしながら、Z ドメインに結合できる抗体種は限られており ZZ-BNC の応用範囲が限定されていた。本研究では、Protein A より幅広い抗体種と結合可能な Protein L や Protein G の抗体結合ドメインのタンデム分子を提示する BNC 3 種類を ZZ-BNC と同様で作製した (Protein G 由来タンデム分子提示 BNC, GG-BNC; Protein L 由来タンデム分子提示 BNC, LL-BNC; Protein L/Protein G 分子提示 BNC, LG-BNC)。LL-BNC、LG-BNC は直径 30 - 40 nm の粒子構造を呈していたが、GG-BNC は粒子形成しなかった。これまでに抗上皮成長因子 (EGF) レセプター抗体を提示する ZZ-BNC は、EGF レセプターを高発現するヒト扁平上皮癌由来 A431 細胞にエンドサイトーシスで取り込まれたので、LL-BNC、LG-BNC についても同様の検討を行った (立松ら, *Acta Biomaterialia* 2016)。本発表では、抗体特異性による能動的標的化 DDS ナノキャリアにおける LL-BNC、LG-BNC の可能性を論じる。特に、LL-BNC、LG-BNC により初めて達成された画期的な能力について紹介したい。

### An active-targeting DDS nanocarrier using bio-nanocapsule displaying various type of immunoglobulins

○Kenji Tatematsu, Hao Li, Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda  
(Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ.)

**Key words** drug delivery system, antibody, virus, transfection

## 1P-2p134 炎症性疾患治療を指向したマクロファージ機能制御剤の基礎評価

○戸井田 力<sup>1</sup>, 藤田 聡史<sup>1</sup>, 姜 貞勲<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>2</sup>国立循環研セ)  
toita-r@aist.go.jp

我々の生体防御に炎症反応が不可欠であるが、炎症性細胞やこれらが産生する生理活性分子群の異常亢進は心筋炎、大腸炎など炎症性疾患を引き起こす。炎症性疾患の組織には、多くのマクロファージ (M1 型) が浸潤しており、炎症性メディエータの産生を通じて直接的・間接的に疾患の悪性化に関与している。マクロファージは周辺環境の変化に応じて、容易にその性質が変換される。すなわち、炎症性マクロファージ (M1 型) と抗炎症性マクロファージ (M2 型) に大別され、互いに相反した性質を示す。健康者では、M1 型と M2 型のバランスが制御されているが、炎症性疾患患者では M1 型が亢進しており炎症系が破綻した状態である。

生体内において、アポトーシス細胞が細胞表面にホスファチジルセリン (PS) を露出すると、マクロファージは PS を認識し貪食する。貪食の際、PS がマクロファージの受容体に結合することで、マクロファージを M1 型から M2 型に変換する。我々はこの現象に着目し、アポトーシス細胞を模倣したリポソームを作製した。本研究では、ホスファチジルコリン、PS から構成されるリポソーム (PSL) を薄膜水相法により調製し実験に使用した。調製した PSL は約 300 nm であり、アニオン性の PS に起因する負の表面電荷を示した。PSL を種々の培養細胞 (HepG2, HeLa, NIH-3T3) およびマクロファージ (RAW264.7) に添加し、PSL の取込みを評価したところ、RAW264.7 細胞に選択的に取り込まれることが明らかとなった。リポ多糖 (LPS) により RAW264.7 細胞を刺激すると、炎症性サイトカインの産生量の増大が認められたが、PSL 添加により減少した。PSL は種々の炎症性疾患の治療に有望である。

### Development of macrophage-targeted nanomedicine for inflammatory disease treatment

○Riki Toita<sup>1</sup>, Satoshi Fujita<sup>1</sup>, Jeong-Hun Kang<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., AIST, <sup>2</sup>NCVC)

**Key words** drug delivery system, drug carrier, inflammation, macrophage

## 1P-2p135 細胞内薬剤デリバリーのための光溶解性トランスフェリン凝集体の開発

○山口 哲志<sup>1</sup>, 石渡 晟<sup>2</sup>, 南畑 孝介<sup>2</sup>, 山平 真也<sup>1</sup>, 岡本 晃充<sup>2</sup>, 長棟 輝行<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>東大院・工)  
yamaguchi@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp

体内や体表の疾患部位でのみ光照射によって薬剤を活性化する光線力学的療法 (photo dynamic therapy: PDT) が、肺癌や加齢黄斑変性など幅広い疾患の治療に実用化されている。現在、PDT に利用されるのは、光照射によってラジカルを発生する薬剤であり、主に細胞死を誘導して治療効果を得る。一方、疾患の中には、原因となる細胞を殺すのではなく、薬剤を用いて生体本来のシステムを活性化または補助することで治療できるものも多い。そこで、光照射によって、望みの部位のみに任意の薬剤を送達する技術が求められている。我々はこれまでに、ビオチン化した光分解性保護基でタンパク質を修飾し、ストレプトアビジン (SA) を用いて架橋することによって光溶解性のタンパク質凝集体を創る方法を開発し、報告してきた。このタンパク質凝集体は、望みのタイミングに望みの場所で光照射によって溶かし、タンパク質を大量に放出できる。本研究では、細胞表面の受容体を介して自発的に細胞内に取り込まれる鉄イオン輸送タンパク質、ヒトトランスフェリン (Tf) を薬剤担体として用い、薬剤修飾 Tf の光依存的な溶解を介して薬剤の細胞内デリバリーを光制御する方法を開発した。モデル薬剤として、評価のしやすいドキシリジン (Dox) を用い、Dox 修飾 Tf の放出による細胞へのアポトーシス誘導を指標に本技術を評価した。その結果、毒性のない微弱な光を用いて、光選択的なアポトーシス誘導が確認できた。今後、他の薬剤のデリバリーも評価する必要があるが、原理的に PDT へ応用可能な新しい薬剤デリバリー技術が開発できた。

### Photolytic transferrin aggregates for controlled intracellular release of drugs

○Satoshi Yamaguchi<sup>1</sup>, Akira Ishiwatari<sup>2</sup>, Kosuke Minamihata<sup>2</sup>, Shinya Yamahira<sup>1</sup>, Akimitsu Okamoto<sup>2</sup>, Teruyuki Nagamune<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>RCast, Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** protein

## 1P-2p136 担癌マウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の生体内分布の解明

○鈴木 貴弘<sup>1</sup>, 森田 健太<sup>1</sup>, 西村 勇哉<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大・自科・研究環)  
akondo@port.kobe-u.ac.jp

### 【目的および方法】

日本人の死因の第一位であるがんの治療の確立は人類にとって長年の課題である。近年、放射線によるがん治療のひとつとして、すい臓がんなどの低酸素腫瘍に対して放射線感受性を増大させつつ、周囲の正常組織へのダメージを最小限に抑える、放射線増感治療の研究が行われている。本研究グループでは、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子をポリアクリル酸 (PAA) 修飾、および過酸化水素処理したポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子 (PAA-TiO<sub>x</sub>) を用いた放射線増感治療に着目している。これまで、PAA-TiO<sub>x</sub> と放射線の併用による治療効果が担癌マウスを用いた *in vivo* 系において確認されている。本研究では PAA-TiO<sub>x</sub> の更なる有効性の向上のために、粒子のマウス生体内分布の解明及び、腫瘍への受動的粒子蓄積について検討した。

### 【結果】

ICP-AES 分析の結果から、肝臓では経時的に Ti 含有量が増加、腫瘍では経時的に Ti 含有量が減少したことが確認された。また、過酸化水素処理をしていない PAA-TiO<sub>2</sub> においても同様の結果が得られたことから、この結果は Ti ナノ粒子の特性に依るものだと考えられる。従って、ナノ粒子を腫瘍内に留まらせて、治療効果を向上させるには、腫瘍を特異的に認識する機能を粒子に付与させる必要があると考えられる。この結果を踏まえ、腫瘍に過剰発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的結合する抗 EGFR 抗体を結合させることで更なる粒子の特異性向上を目指していく。今後の予定として、上記の腫瘍標的能を付与した粒子を作製した後に、PAA-TiO<sub>x</sub>-抗 EGFR 抗体における生体内分布の解明を行い、有効性の向上を検証する。

### Biodistribution of poly-acrylic acid conjugated peroxide titanium nanoparticles in xenograft mouse models

○Takahiro Suzuki<sup>1</sup>, Kenta Morita<sup>1</sup>, Yuya Nishimura<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>1</sup>, Akihiko Kondou<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., <sup>2</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

**Key words** mouse, biodistribution, titanium dioxide, nanoparticle

## 1P-2p137 イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸鉄イオン架橋ハイドロゲルによる腹膜癒着防止効果の検討

○威 蟠<sup>1</sup>, 天野 由貴<sup>2</sup>, 切田 勝久<sup>2</sup>, 太田 誠一<sup>1</sup>, 伊藤 大知<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>東大院・医, <sup>2</sup>東大院・工)  
 taichi@m.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】腹膜癒着は外科手術において深刻な問題であり、癒着によって不妊症や腸閉塞などが問題として挙げられる。既存のゲル状態癒着防止材として、Intergel は一度市場に出回ったが、腹腔内の鉄イオン濃度の上昇とハイドロゲルの長期残存によって重篤な炎症を引き起こし、現在はすべて生産中止され、現在臨床で用いられているヒアルロン酸ゲル状態癒着防止材は存在しない。本研究では、低濃度の鉄イオンによって架橋されたイミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸(HA-IDA)ハイドロゲルの開発と癒着防止効果の評価を目的とした。

【方法】イミノ二酢酸(IDA)を HA のグルクロン酸部位のカルボキシル基にアミド結合を介してコンジュゲーションした HA-IDA を合成した。その後、NMR により IDA の修飾を確認した。また、架橋に必要な Fe<sup>3+</sup>濃度の検討を行った後、HA-IDA の毒性を評価するため、MTT アッセイを行った。さらに、in vivo ではラット盲腸擦過・腹壁切除癒着モデルにおける腹膜癒着防止効果の検討を行った。

【結果】NMR によって、HA-IDA の合成を確認できた。IDA は鉄イオン (III) と高い錯体形成能を持つ、イオン交換基である。FeCl<sub>3</sub> 水溶液で架橋した所、HA-IDA/Fe<sup>3+</sup>ハイドロゲルの弾性率は HA を鉄イオンで架橋した HA/Fe<sup>3+</sup>の弾性率より高く、また HA-IDA は HA に比べ低い濃度の鉄イオンによってハイドロゲルを形成できることが確認された。また、HA-IDA/Fe<sup>3+</sup>ハイドロゲルは in vitro で低毒性を示した。ラット盲腸擦過モデルにおいて、HA-IDA/Fe<sup>3+</sup>ハイドロゲルは、1 週間後の開腹時に腹腔内残留をすることなく、さらに、無処置のコントロールや、同じく鉄イオンで架橋したコハク酸修飾キトサンハイドロゲルなどと比較したところ、腹膜癒着形成を低減する効果を示した。

### The prevention of peritoneal adhesions by ferric ion-crosslinked hydrogels of hyaluronic acid modified with iminodiacetic acids.

○Pan Qi<sup>1</sup>, Yuki Amano<sup>2</sup>, Katsuhisa Kirita<sup>2</sup>, Seiichi Ohta<sup>1</sup>, Taichi Ito<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** peritoneal adhesion, hyaluronic acid, iminodiacetic acid, hydrogel

## 1P-2p138 酸化還元応答性ハイドロゲルを基材とする細胞組織体の形成と機能評価

○神谷 典穂<sup>1,2</sup>, 内藤 翔乃<sup>1</sup>, 香川 元気<sup>1</sup>, 森山 幸祐<sup>3</sup>, 若林 里衣<sup>1</sup>, 南畑 孝介<sup>1</sup>, 後藤 雅宏<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>九大院・工, <sup>2</sup>九大・未来化セ, <sup>3</sup>九大・先導研)  
 nori\_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

高分子ハイドロゲルは、物質透過性や高含水率といった生体組織との類似性より、細胞培養基材やドラッグデリバリーシステム用のキャリアーとして広く利用されている。合成高分子を主成分としたハイドロゲルは、その高分子ネットワーク中に生体活性物質等の有用物質を組み込むための分子設計、即ち、目的に応じた機能化が可能である。当研究グループは、最近、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の酵素触媒反応を介した新たなハイドロゲル作製法を確立した。本手法では、チオール基 (SH 基) が修飾された分岐型高分子、HRP、そして HRP の基質となる小分子フェノール誘導体を混合することで、常温、中性 pH、反応時間 30 分程度で、ジスルフィド結合を架橋点としたハイドロゲルが得られる。本手法の鍵は、系中の SH 基の自己酸化により生じる僅かな過酸化水素を使って HRP 触媒反応が進行する点にあり、過酸化水素による細胞のダメージを最小化できる点にある。従って、上記の成分を含むゾル溶液と、細胞懸濁液を混合し、しばらく放置することで、生細胞をハイドロゲル中に簡便に包括することができる。さらに、得られたゲル骨格は還元剤の添加により崩壊するため、細胞の回収が可能である。

本研究では、細胞接着性を示さない PEG-SH のみからなるハイドロゲル中で細胞包括培養を行い、細胞組織体 (スフェロイド) の形成を試みた。HepG2 細胞を用いた包括培養の基礎検討の結果、基材となる PEG 濃度に依存して異なるサイズ (直径 30 ~ 70 μm 程度) のスフェロイドの形成が確認された。さらに、還元剤の添加によりハイドロゲルを崩壊し、回収されたスフェロイドの機能を評価したところ、肝細胞特異的な機能を有することを確認した。

### Redox-responsive hydrogels as potent matrices for cell spheroid formation

○Noriho Kamiya<sup>1,2</sup>, Shono Naito<sup>1</sup>, Genki Kagawa<sup>1</sup>, Kosuke Moriyama<sup>3</sup>, Rie Wakabayashi<sup>1</sup>, Kosuke Minamihata<sup>1</sup>, Masahiro Goto<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ., <sup>2</sup>CFC, Kyushu Univ., <sup>3</sup>Inst. Material. Chem. Eng.)

**Key words** cell immobilization, hydrogel, biomaterial, peroxidase

## 1P-2p139 治療効果を有する肝臓構築を目指して

○白木川 奈菜, 坂本 裕希, 木村 遥奈, 井嶋 博之  
 (九大院・工)  
 shirakigawa@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

肝臓は代謝の中心臓器であり、重篤な肝不全患者に対する根本的な治療法は移植しかなく、慢性的なドナー不足が問題となっている。これに対して我々は、移植用のドナー肝臓を人工的に構築すべく、臓器工学的肝臓の構築に取り組んでいる。

血管構造を有する足場材料 (脱細胞化肝臓) を用いて臓器規模の血管網の構築を行い、血管網周囲に対して細胞周囲環境を整えた肝細胞を配置し、細胞増殖・血管新生により、肝臓構築を目指している。治療効果のある肝臓構築の達成には、細胞を立体的に配置した後、肝機能を発現させることが重要である。その為、肝機能発現に向けた組織構築の最適化が重要となる。

本研究では、構築した肝組織体の肝機能評価を目指し、肝不全モデルラットの構築とそれに対する血液体外循環を構築し、肝組織体を適用することでその機能評価に取り組んだ。

吸入麻酔下のラットに対して、右葉に温虚血を施した後、中葉、左葉、尾状葉を切除した。温虚血の時間依存的にラットの生存率が低下し、右葉を組織学的に評価したところ、内部において肝細胞の壊死と再生に向けた細胞分裂が観察された。また、血中成分を評価したところ、アンモニア、ALT、AST の上昇が見られ、肝不全状態を再現されていることが示唆された。

ラットの頸動脈から血液を引き出し、頸静脈に戻すという血液体外循環系を構築した。これを前述の肝不全モデルラットに対して施し、構築した肝組織体を適用することで、肝組織体の機能評価を試みた。その結果、構築した肝組織体が治療に対して有効なことが期待された。

以上の結果から、肝組織体の構築のための評価系の構築が期待された。今後は本評価系を用いて、肝組織構築法の最適化を行い、移植可能な肝臓構築を目指す。

### Construction of organ engineered-liver which will be effective for clinical treatment

○Nana Shirakigawa, Hiroki Sakamoto, Haruna Kimura, Hiroyuki Ijima  
 (Fac. Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** liver regeneration, decellularization, whole organ engineering, liver failure rat

## 1P-2p140 Polymer2 を用いた HEK293 細胞の新しい 3D 培養法構築

○金木 達朗<sup>1</sup>, 林 寿人<sup>1</sup>, 川原 浩治<sup>2</sup>, 西野 泰斗<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>日産化学工業, <sup>2</sup>北九州高専)  
 kanaki@nissanchem.co.jp

【背景と目的】昨年の本会において、細胞を接着させる機能を有しかつ不溶性のナノファイバー様基材である Polymer2 を見出し、Polymer 2 に MDCK 細胞を接着させた新しい 3D 培養法について報告した。今回、ヒト糖鎖型タンパクの生産に用いられている HEK293 細胞の 3D 培養法について検討したので報告する。

【方法】Polymer 2 (0.003%~0.03%) を市販の各 HEK293 培養用培地に添加し、50ml ミニリアクターと組み合わせて HEK293 細胞の静置培養あるいは攪拌培養を試みた。培養後の生細胞数は Cell Titer -Glo 法による ATP 値として、また培養上清中の IFNβ 値は ELISA 法にて測定した。【結果と考察】HEK293 細胞を培地のみ (未添加条件) で培養すると巨大な細胞凝集塊を形成し、凝集塊の形成は HEK293 細胞に対する懸濁培養用培地を用いても同様に観察された。一方、Polymer2 を添加した培地では、HEK293 細胞が培養液中に分散するだけでなく Polymer2 ファイバーへ吸着している形態が観察された。また未添加条件に比べて良好な細胞増殖性を示し、その増殖効果はミニリアクターを攪拌することでさらに増強した。さらにヒト IFNβ を強制発現する HEK293 細胞を用いた試験でも Polymer 2 添加による増殖促進効果を認め、培養上清に分泌するヒト IFNβ 量は未添加条件と比較して約 3 倍の値を示した。以上の結果から、Polymer2 による 3D 培養法は、HEK293 細胞におけるヒト糖鎖型タンパク生産に有用である可能性が示唆された。

### New 3D culture system of HEK293 cells using Polymer2

○Tasuro Kanaki<sup>1</sup>, Hisato Hayashi<sup>1</sup>, Hiroharu Kawahara<sup>2</sup>, Taito Nishino<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Nissan Chemical Industries, <sup>2</sup>Dept. Mat. Sci. Chem. Eng., KCT)

**Key words** HEK293, 3D culture, protein vaccine

**1P-2p141 磁力を利用した *in vitro* 三次元がんモデル：がん細胞浸潤挙動の半自動解析法の開発**

○清水一憲<sup>1</sup>, 山本修平<sup>1,2</sup>, 本多裕之<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・予防早期医療創成セ)  
 honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

**【背景と目的】** がんの浸潤・転移機構解明のため、微小環境におけるがん細胞と周辺細胞、特に血管内皮細胞との相互作用解析が進められている。我々はこれまでに、磁性ナノ粒子と剣山状磁性デバイスを用いた磁気細胞マイクロターニング法を開発し、血管内皮細胞ネットワークへのがん細胞の浸潤挙動を評価できる *in vitro* 三次元がんモデルの構築に成功している[1]。しかし、解析が非常に煩雑であったため、多条件アッセイへの応用が困難であった。そこで本研究では、がん細胞浸潤挙動を半自動的に定量解析するプログラムを作成し、複数種のがん細胞や抗がん剤を用いた多条件アッセイに応用した。

**【方法】** 赤色蛍光標識した正常ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、血管様ネットワークを形成させ、緑色蛍光標識したがん細胞塊を、アレイ状に配置し、蛍光顕微鏡画像を取得した。がん細胞塊と最も近い HUVEC との間の重心間距離を半自動計測し、同時にがん細胞塊の伸展度 (周囲長) を計測して、がん細胞の HUVEC ネットワークへの浸潤を評価した。重心間距離に対してがん細胞塊の伸展度をプロットし、単独培養時のがん細胞塊伸展度と比べ、有意 (3SD 以上) に挙動変化した重心間距離を求めた。

**【結果と考察】** 4 種のがん細胞株を用いて実験を行った。がん細胞株に共通して HUVEC に接近するほど伸展度が大きくなったことから、がん細胞塊と HUVEC の距離ががん細胞の浸潤挙動に大きく影響することがわかった。また *in vivo* での浸潤能が高いがん細胞株ほど、HUVEC から遠い距離でも伸展することがわかった。作用機序の異なる複数の抗がん剤 (Cimetidine, Erlotinib, Paclitaxel) の作用についても実験を行った。HUVEC との距離に応じたがん細胞塊の伸展度の変化が抗がん剤ごとに大きく異なることが明らかになった。

[1] Yamamoto *et al.*, PLoS ONE (2014)

***In vitro* 3-D cancer model: a semi-automated method for quantifying cancer cell invasion**

○Kazunori Shimizu<sup>1</sup>, Shuhei Yamamoto<sup>1</sup>, Hiroyuki Honda<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>PME, Nagoya Univ.)

**Key words** magnetite nanoparticle, *in vitro* cancer model, cell-based assay, high-throughput screening

**1P-2p142 3 次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪への分化とマイクロティッシュの作製**

○宮本義孝<sup>1,2</sup>, 池内真志<sup>1</sup>, 野口洋文<sup>3</sup>, 八木透<sup>4</sup>, 生田幸士<sup>1</sup>, 林 崇治<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>名大院・医, <sup>3</sup>琉球大・医, <sup>4</sup>東大院・情報理工)  
 myoshi1230@gmail.com

**【目的】** 脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) は、多分化能を有し、脂肪組織採取時における侵襲も少なく大量に確保できることから、再生医療分野で幹細胞の供給源として注目されている。安全な細胞治療を行うためには、生体外環境下、ASCs から脂肪へ分化させ、適切な大きさ、品質のマイクロティッシュを作製する必要がある。そこで、本研究では、ASCs から脂肪への分化方法として、三次元培養デバイス TASCL によるクラスター形成からマイクロティッシュを作製したので報告する。

**【方法】** 本実験では、微細加工技術を用いて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) から成る TASCL を作製した。本デバイスには、10mm 四方の基板上に、貫通孔の上部・下部形状を自在に設計可能であり、1 枚のデバイス内に多数配置することができる。親水化処理後の TASCL を超低接着性培養皿上に設置し、所定量の ASCs 懸濁液を播種・培養した後、脂肪への分化とその機能について評価した。

**【結果】** TASCL 上でのクラスター形成から、脂肪への分化とマイクロティッシュを作製することができた。また、Oil Red O 染色より脂肪滴が観察され、細胞内のトリグリセライドも蓄積されていることから、脂肪細胞への分化が確認できた。さらに、2 次元培養と比べて、TASCL による 3 次元培養は脂肪細胞への分化を短期間で誘導することができた。

**【結論】** 3 次元培養による脂肪細胞への分化、短期間でのマイクロティッシュの作製に成功した。3 次元培養による微小内環境をデザインすることにより、より分化誘導の高効率化が期待できる。

**Adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in 3D culture (TASCL device)**

○Yoshitaka Miyamoto<sup>1,2</sup>, Masashi Ikeuchi<sup>1</sup>, Hirofumi Noguchi<sup>3</sup>, Tohru Yagi<sup>4</sup>, Koji Ikuta<sup>1</sup>, Shuji Hayashi<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>RCAST, Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Fac. Med., Univ. Ryukyus, <sup>4</sup>Grad. Sch. info. Sci. Eng., Tokyo Tech)

**Key words** 3D culture, Adipose-derived stem cell, Adipose-like Microtissues, Tapered stencil for cluster culture (TASCL)

**1P-2p143 正常血圧条件下におけるかん流培養を可能とする多層血管モデルの作製と評価**

○木下 敬太, 山田 真澄, 関 実  
 (千葉大院・工)  
 m-yamada@faculty.chiba-u.jp

**【緒言】**

生体外において作製された血管組織は、血管に関連した病態モデル、あるいは薬効評価モデルとしての応用が期待されている。これまでに血管組織作製のための様々な手法が提案されており、当研究グループでも、ハイドロゲル製の流路構造を用いることで、多層・分岐・肉厚構造を有した血管組織の作製手法を提案してきた。しかしながら、これまでに報告された多くの血管組織モデルでは、正常血圧を再現することは困難であった。そこで本研究では、シリコーン樹脂製の流路内面において血管平滑筋細胞を内包した Ba-アルギン酸ハイドロゲル層を形成させ、その内面に更に血管内皮細胞を接着させる新規手法を提案する。実際にヒトの正常血圧を印加した状態においてかん流培養を行い、血管組織の機能評価を試みた。

**【実験および結果】**

レプリカモールドニングによって BaCl<sub>2</sub> 粒子を内包した PDMS 製の流路を作製した。血管平滑筋細胞を懸濁した、細胞接着性を有する RGD 修飾アルギン酸 Na 水溶液を流路内へ導入したところ、流路内壁面において Ba-アルギン酸ハイドロゲル層が形成された。その後、血管内皮細胞を懸濁させた培養液を導入したところ、ハイドロゲル表面に細胞が接着し、培養 7 日後には細胞が単層に組織化することで、多層状の血管組織が形成された。次に、血管平滑筋細胞のみで作製した血管組織を、ヒトの正常血圧である 120 mmHg の圧力を印加した状態でかん流培養したところ、流路構造や組織は破断することなく、安定して培養が可能であった。また、機能評価としてエラスチンの免疫染色を行ったところ、圧力を印加した血管組織においてエラスチン発現量が向上している様子が観察された。今後は、多層状の血管組織において、正常血圧を印加した状態でかん流培養を行い、漏えい性などの機能評価を行う。

**Fabrication of multilayered vascular tissue models enabling perfusion culture under normal blood pressures and their characterization**

○Keita Kinoshita, Masumi Yamada, Minoru Seki  
 (Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** hydrogel, vascular tissue, perfusion culture, organ on a chip

**1P-2p144 CHO 細胞を用いた抗体生産プロセスにおける糖鎖構造解析**

○森下 明彦<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2</sup>, 大政 健史<sup>3</sup>, 秦 信子<sup>1</sup>  
 (株式会社 Ig-M, <sup>2</sup>徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup>阪大院・工)  
 shata@ig-m.biz

**【背景及び目的】**

抗体医薬品生産において、抗体の品質を管理することは非常に重要である。特に、抗体に付加される糖鎖構造は、抗体の高次構造の安定化、生理活性の調節、抗原性、体内動態に影響を及ぼすため、その詳細な解析が必要である。生産された抗体の糖鎖構造は不均一であり、その分布は宿主細胞と培養条件に影響を受けることが知られている。本研究では、抗体生産 CHO 細胞を異なる培養条件下で培養し、得られた抗体の糖鎖構造解析を行うことで、培養条件の変化が糖鎖構造に及ぼす影響を調査した。

**【方法】**

IgG1 生産 CHO 細胞を異なる培養条件下で培養し、培養上清より IgG1 を精製した。酵素消化等の方法によって、精製 IgG1 より N-結合型糖鎖、または、O-結合型糖鎖を遊離させ、その構造、及び、分布を高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、または、キャピラリー電気泳動 (CE) を用いて解析する。糖鎖を構成する単糖の組成、及び、含量の解析も同様に行う。

また、培養過程の細胞より細胞内代謝産物を抽出し、異なる培養条件下における細胞の代謝産物量を比較する。

**Characterization of oligosaccharides in antibody production process using CHO cells**

○Akiko Morishita<sup>1</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2</sup>, Takeshi Omasa<sup>3</sup>, Shinko Hata<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Ig-M Co., Ltd., <sup>2</sup>Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Chinese hamster ovary cells, Antibody, sugar chain

## 1P-2p145 細胞集塊挙動によるヒト間葉系幹細胞の心筋方向への分化指向性誘導

○小川 祐樹, 金 美海, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

幹細胞の分化誘導過程において、未分化細胞の混入や不均質な特性に由来した目的外の細胞発生による分化誘導効率の低さが問題となっている。これまで我々は、一時的な細胞集塊の伸縮を伴う遊走挙動を通して集塊内で細胞が交差することによってヒト間葉系幹細胞の分化指向性が心筋方向へ誘導されることを報告してきた。本研究では、細胞集塊挙動を利用した分化指向性制御による分化誘導について検討した。一時的な伸縮を伴う細胞集塊挙動はデンドリマー提示培養面上で分化誘導因子を添加しない10%FBS/DMEMを用いた培養で確認され、遊走促進剤であるHMG-1を培地中に添加することで継続的な細胞集塊の伸縮を伴う遊走挙動が観察され、心筋方向への分化指向性の指標となるcTnT陽性細胞比率がHMG-1を添加しない条件と比較して高くなっていることが確認された。また、細胞集塊を新たなデンドリマー面に継代することによって、細胞集塊の分散および再形成が確認され、cTnT陽性細胞比率が増加することを確認した。そこで、デンドリマー面で培養された細胞群と、HMG-1を添加した培養の後に継代培養することで、cTnT陽性細胞比率が高くなった細胞群に対し、分化誘導促進剤であるTGFβ1を添加した培地で培養したところ、TGFの添加の有無によって、どちらの細胞群でもcTnT陽性細胞比率には違いがほとんど見られなかった。しかしながら、cTnTのmRNA発現量は、デンドリマー面で培養された細胞群ではTGFによって、2.2倍上昇していたのに対し、継代によってcTnT陽性細胞比率が高くなった細胞群では、TGFによって、4.0倍上昇しており、分化指向性の誘導によって、分化の程度がより増強されやすいことが示唆された。これらの結果から、細胞集塊挙動を利用した初期の分化指向性を制御することが幹細胞の分化誘導を促進する為の新たな概念として提案することが出来る。

### Directing of differentiation propensity in hMSCs toward a cardiomyogenic lineage

○Yuuki Ogawa, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** differentiation propensity, human mesenchymal stem cells, aggregation, cell behaviors

## 1P-2p146 維持培養および胚様体形成期間中の培地がヒトiPS細胞の心筋分化誘導に与える影響

○澤登 美空, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋  
(山梨大院・総研部)  
kurohiro@yamanashi.ac.jp

### 【背景と目的】

ヒトiPS細胞由来心筋細胞は再生医療をはじめ広い分野への応用が期待されている。ヒトiPS細胞は一般的にマウスフィーダー細胞上で培養が行われるが、異種細胞の混入や細胞集団の不均一性の原因となるため、フィーダー細胞非存在下でヒトiPS細胞を維持培養(feeder-free培養)することが求められる。現在、様々なfeeder-free培養に適した培地が市販されているが、使用する培地によりヒトiPS細胞の性質が異なるという問題がある。維持培養及びEB形成時の培地の違いは、その後の分化誘導効率にも影響を与えられ、よって本研究ではfeeder-free用培地の違いがヒトiPS細胞における心筋細胞の分化誘導に及ぼす影響を明らかにした。

### 【方法】

ヒトiPS細胞(201B7, 理研BRC)を異なるfeeder-free用培地で培養した。Accutaseによりシングルセルまで分散しLipidure(96U-A)に3000 cells/wellで播種後各培地にて4日間浮遊培養し胚様体(EB)形成した。その後PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit(Thermo)のMediumA、MediumBにて合計4日間浮遊培養し、Maintenance Mediumにて8日間接着培養を行った。形成したEBの形態観察、発生した拍動性心筋細胞の割合、および心筋細胞関連遺伝子の発現解析により評価を行った。

### 【結果と考察】

維持培養およびEB形成期間中に使用するfeeder-free用培地の違いは、ヒトiPS細胞からの拍動性心筋細胞の発生形態および心筋細胞関連遺伝子の発現量に影響を及ぼし、ヒトiPS細胞を心筋細胞に分化誘導する際の維持培養やEB形成期間中の培地がその後の心筋細胞の発生に影響を与えることが示唆された。したがって効率的な目的細胞への分化誘導には維持培養及びEB形成時の培地を選択することが重要である。

### Effect of feeder-free medium type during maintenance and EB formation cultures on cardiomyocytes differentiation from human iPS cells.

○Miku Sawanobori, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa  
(Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi)

**Key words** iPS cells, maintenance culture, EB formation, cardiomyocytes

## 1P-2p147 ノコダゾール処理によるヒトiPS細胞の心筋分化誘導

○山口 千尋, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋  
(山梨大院・総研部)  
kurohiro@yamanashi.ac.jp

### 【背景と目的】

ヒトiPS細胞の品質管理においては、原材料となる細胞集団の均一化は重要である。微小管形成阻害剤であるノコダゾールによるヒトiPS細胞の細胞周期同調が可能であることが明らかになったが、ヒトES細胞においてはノコダゾールを添加すると未分化関連遺伝子の発現量が減少することが報告されている。我々はノコダゾールの特性である細胞同調によってヒトiPS細胞を均一性を高め、さらに未分化性を減少にさせることにより効率的な分化誘導が行えると考えた。本研究では、ノコダゾールの添加条件の違いがヒトiPS細胞からの心筋細胞分化に及ぼす影響について明らかにした。

### 【方法】

フィーダー細胞(SNL76/7)非存在下でヒトiPS細胞(201B7, 理研BRC)を培養した。Accutaseによりシングルセルに分散し、3000 cells/wellとなるようにLipidure(96U-A)に播種した(day 0)。4日間の浮遊培養により胚様体(EB)を形成した(day 0-4)。形成後、PSC cardiomyocytes differentiation kit medium Aおよびmedium Bにて合計4日間の浮遊培養を行った(day 4-8)。その後、8日間の接着培養を行った。ノコダゾール処理は終濃度200 ng/mLにて、前処理(day -1-0)、EB形成期間中処理(day 0-4)、および分化前処理(day 3-4)の3条件を行った。毎日顕鏡下にて細胞様相および拍動率を計測した。

### 【結果と考察】

ノコダゾール処理条件の違いが心筋分化に影響を及ぼすことが明らかになった。EB形成期間中処理では、EBの生育が抑制された。一方、分化前処理では、拍動性心筋細胞の発生時期が早くなった。以上より、ノコダゾール処理によってヒトiPS細胞の心筋細胞分化を促進できることが示唆された。

### Effect of nocodazole treatment on differentiation of human iPS cells into cardiomyocytes

○Chihiro Yamaguchi, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa  
(Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi)

**Key words** iPS cells, cardiomyocyte differentiation, nocodazole

## 1P-2p148 タンパク質マイクロファイバーの高効率作製とその細胞培養系への応用

○平松 久卓, 堀 綾香, 矢嶋 祐也, 山田 真澄, 関 実  
(千葉大院・工)  
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

### 【緒言】

細胞外基質(ECM)タンパク質を加工して作製した微小なファイバーは、線形組織の作製や細胞の伸展方向制御を可能とする細胞培養基材として期待されている。これまでにマイクロ流路を用いてタンパク質ファイバーを作製する手法は報告されているが、直径数μmの微小なファイバーの作製は困難であり、また作製速度が不十分である、といった問題があった。本研究では、微小なECMファイバーを効率的に作製するための新規手法として、パターン化ハイドロゲルファイバーを利用する手法を提案する。具体的には、ECMタンパク質を含む領域を並列的に形成したアルギン酸ハイドロゲルファイバーを作製し、タンパク質を架橋した後にアルギン酸を選択的に除去することで、直径数μmのECMファイバーが並列的に得られる。またECMファイバーの応用として、3次元環境において細胞増殖を促進する足場材料としての利用を試み、細胞の増殖挙動を評価した。

### 【実験及び結果】

微細なノズルアレイ構造を組み込んだマイクロ流路構造を作製し、ECMタンパク質を含むアルギン酸Na水溶液および含まないアルギン酸Na水溶液を連続的に導入し、ゲル化させることで、外縁部あるいは内部に8つのECM含有領域を有するハイドロゲルファイバーを作製した。続いて、ファイバーに含まれるタンパク質を架橋した後、クエン酸三ナトリウム水溶液を用いてアルギン酸を除去したところ、直径5-6μmのファイバーが効率的に得られることが確認された。また、ECMファイバーを足場材料として、細胞(HepG2細胞)とともにハイドロゲルに導入し、3次元的環境において培養を行ったところ、ファイバーを用いた場合には、細胞がファイバーに接着し効率的に増殖する様子が確認された。本研究で得られたファイバーは、3次元組織構築などの様々な細胞培養系において有用であると考えられる。

### Efficient production of ECM protein microfibers and their application to cell culture systems

○Hisataka Hiramatsu, Ayaka Hori, Yuya Yajima, Masumi Yamada, Minoru Seki  
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** extracellular matrix, microfluidic device, protein, microfiber

## 1P-2p149 細胞の自己集合化誘導コーティング剤 (CAT) を用いた スキャホールドフリー軟骨リングの簡易作製

○岩井 良輔<sup>1</sup>, 根本 泰<sup>2</sup>, 中山 泰秀<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>岡山理大・技科研,<sup>2</sup>株式会社ブリヂストン,<sup>3</sup>国循セン研・生体医工)  
iwai@rit.ous.ac.jp

**【目的】** 感染、炎症や免疫反応などの問題点から、再生医療においては人工の足場材料を用いずに細胞のみから組織を組み上げる方法の開発が望まれている。気管軟骨のようなリング形状が必要とされるような組織の作製においては、細胞印刷装置を用いた組織構築が期待されているが、装置が高価、特殊でスケールアップが困難な培養系であることなどから、製品化に際してはその生産性が課題となる。我々は、細胞の自己集合化誘導コーティング剤 (CAT) を開発した。CAT の印刷表面に細胞を播種するだけで、印刷面に接着した細胞は 1 日程度の培養で自己集合して細胞組織体が形成する。本研究では、この CAT を用いた組織作製技術を用いて軟骨リングを従来の細胞を播種するだけの培養法にて作製することを目的とした。

**【方法と結果】** 培養皿表面にシリコン板 (T: 1 mm) を貼付することで作製したリング形の溝 (D: 6-20 mm, d: 2-12 mm) に CAT 溶液を流し込み乾燥させた後、ラットの肋軟骨細胞を  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 以上の密度で播種した。細胞は播種 1 時間以内に溝底表面に接着して 200 μm 厚のリング形を形成した後、約 8-10 時間の間に一体集合・凝集化して約 2 cm 厚のリング形の凝集体を溝内側のシリコン板周囲に形成した。凝集体は 3 週間培養することで、ラットの気管軟骨と同等以上の力学的強度を有する軟骨リングへと成熟化した。また、シリコン板のサイズを調節することによって、2 mm からヒトの気管軟骨輪と同等の 15 mm まで、任意のサイズの軟骨リングを得ることが出来た。

**【結論と展望】** 従来の培養皿を用いて単に軟骨細胞を播種するだけの簡易操作にて、任意のサイズのスキャホールドフリーの軟骨リングを作製することに成功した。安全性と生産性に優れた軟骨組織の作製法になり得ると考え、軟骨リングの移植評価実験と大量作製モデルの開発を進めている。

### Preparation of scaffold-free cartilage rings using cell self-aggregation inducible surface

○Ryosuke Iwai<sup>1</sup>, Yasushi Nemoto<sup>2</sup>, Yasuhide Nakayama<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>RIT, Okayama Univ. Sci., <sup>2</sup>Dept. Chem. Products, Bridgestone Corp., <sup>3</sup>Div. Biomed. eng., NCVC)

**Key words** regenerative medicine, tissue engineering

## 1P-2p150 細胞膜内面の *in vitro* 解析を指向した細胞膜シートの開発

○泉田 森<sup>1</sup>, 山口 哲志<sup>2</sup>, 三澤 龍志<sup>1</sup>, 山平 真也<sup>1</sup>, 河原 正浩<sup>1</sup>, 鈴木 智子<sup>3</sup>, 高木 智子<sup>3</sup>, 佐藤 香枝<sup>3</sup>, 長棟 輝行<sup>1</sup>, 岡本 晃充<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東大院・工,<sup>2</sup>東大・先端研,<sup>3</sup>日本女子大・理)  
okamoto@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

細胞膜近傍には細胞の運命を司る因子が数多く存在するが、露出している細胞膜外面に比べ、細胞膜内面近傍の因子を解析する技術は限られている。遺伝子操作を使用した解析やイメージングは確立した方法だが、前者は細胞という複雑系の中で因果関係が不明確なことが多く、後者は融合発現させる蛍光タンパク質による影響を排除できない。一方、近年、人工膜上に膜タンパク質を再構成する技術が、膜近傍の生体システムを定量的に把握してその機能のための必要十分条件を確定する方法として期待されているが、複雑な膜近傍の分子システムの再構成にはいまだ程遠い。

これらを踏まえ、我々は *in vitro* 解析に使用できる「生きたままの」分子状態の細胞膜シートを開発した。具体的には、PEG 脂質を介して基板上に細胞を固定後、マイクロ流体のせん断応力によって細胞上部を瞬間的に破碎し、細胞内面を上に向けた細胞膜シートを構築した。蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡観察によって細胞膜シートの形成を確認し、後者では細胞膜裏打ち繊維を保存した均質な膜シートであることも確認した。また、光退色後蛍光回復法 (FRAP) により、膜の流動性が損なわれていないことも確認した。

次に、この膜シート上で膜タンパク質の細胞内ドメインの解析を試みた。まず、酵素認識タグ配列を細胞内ドメインに付与した GPCR に対して、酵素を用いた選択的標識が可能であることが示された。また、破碎前にリガンドを感受させた受容体について、細胞内ドメインのチロシン残基のリン酸化を抗体染色によって検出することも成功した。

本研究で開発した細胞膜シートは、細胞膜内面関連因子の解析や阻害剤スクリーニングを可能にするともに、細胞内分子システム再構成の基盤として応用することによって様々な生命システムの理解に役立つことが期待される。

### Development of cell membrane sheet for *in vitro* analysis of membrane inner surface

○Shin Izuta<sup>1</sup>, Satoshi Yamaguchi<sup>1</sup>, Ryuji Misawa<sup>1</sup>, Shinya Yamahira<sup>1</sup>,

Maahiro Kawahara<sup>1</sup>, Tomoko Suzuki<sup>1,2</sup>, Tomoko Takagi<sup>1</sup>, Kae Sato<sup>3</sup>,

Teruyuki Nagamune<sup>1</sup>, Akimitsu Okamoto<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>RCAS, Univ. Tokyo, <sup>3</sup>Fac. Sci., Japan Women's Univ.)

**Key words** cell membrane, *in vitro* analysis, cell immobilization, signal transduction

## 1P-2p151 酸素透過性マイクロウェルアレイチップを用いた毛包原基の大量調製

○景山 達斗<sup>1</sup>, 吉村 知紗<sup>2</sup>, 片岡 健<sup>3</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>横国大院・工,<sup>2</sup>横国大,<sup>3</sup>岡山理大・理)  
fukuda@ynu.ac.jp

毛髪疾患の新しい治療法として、毛髪を生み出す毛包の種 (毛包原基) を生体外で構築し、これを移植する毛髪再生医療に期待が寄せられている。毛包は胎児期において、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により、毛包原基が形成されることで発生する。これを模倣し、毛包原基を生体外で構築してヌードマウス皮下に移植すると、正常な毛が再生されることが示されている。しかし、この手法では、上皮系細胞と間葉系細胞のペレットをそれぞれ作製し、微小ゲル内に顕微鏡下で手作業で隣接配置するという手順が含まれている。ヒトの毛髪再生を考えると数万の毛包が必要であり、この手法をそのまま適用すると、多大な労力が必要となる。本研究では、独自に作製した PDMS マイクロウェルアレイチップを用いて、毛包原基を大量に作製する技術を開発した。この技術は、酸素供給の改善された環境下では、1:1 で混合した上皮系細胞と間葉系細胞が自発的に 1 つの凝集体を形成し、なおかつその内部ではそれぞれの細胞種が分離されるという現象の発見に基づいている。このため、細胞混合液を単にチップ上に播種するのみで、すべてのウェル内で毛包原基が形成され、作製した毛包原基は、ヌードマウスの皮膚に移植すると、正常な毛周期を繰り返す毛包を形成した。作製したチップは、培地表面からの酸素供給に加えて、酸素透過性の高い PDMS 膜を介した底面からの酸素供給可能である。このため、大量細胞培養で課題となる細胞の低酸素障害が抑えられ、毛包原基の大量培養を実現することができた。さらに、チップ内で均一かつ規則的に作製した毛包原基をシートとしてカラーゲルに転写した後、ヌードマウスにこのシートを移植することにより、ヌードマウス皮下に規則的な間隔で毛を再生できる可能性が示された。

### Large-scale preparation of spatially-aligned hair follicle germs on oxygen permeable microarray chip

○Tatsuto Kageyama<sup>1</sup>, Chisa Yoshimura<sup>2</sup>, Ken Kataoka<sup>3</sup>, Junji Fukuda<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Yokohama Natl. Univ., <sup>3</sup>Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

**Key words** hair follicle germ, microarray, mass culture, hair regenerative medicine

## 1P-2p152 マイクロ光造形法と生体適合性金めっき法を用いた立体細胞シート作製の開発

○小林 優香<sup>1</sup>, Cordonier Christopher E.J.<sup>2</sup>, 永瀬 史恵<sup>1</sup>, 本間 英夫<sup>3</sup>, 丸尾 昭二<sup>1</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>横国大院・工,<sup>2</sup>関東学院大・工)  
fukuda@ynu.ac.jp

**【背景と目的】** 再生医療の分野では、角膜や心臓、食道の損傷部に細胞シートを移植することで癒着や臓器そのものの機能を回復させる治療が行われている。しかしながら、内耳や歯のように移植する組織の構造が複雑である場合、その形状に合わせた細胞シートを移植することが望ましい。そこで本研究では、マイクロ光造形法により、*taylor-made* な鋳型を作製し、めっき法によって金薄膜を形成させる。そして電気化学細胞脱離法を用いることで、鋳型形状に基づいた立体的な細胞シートを作製することを目的とした。

**【方法】** 電気化学細胞脱離法に利用できる金めっき法を見出すため、光造形用樹脂でフラットな基板を作り、2 種類の金めっき法 (医療用金めっき・生体適合性金めっき) で金薄膜を形成し、細胞毒性や脱離効率などを評価した。次に、マイクロ光造形法を用いて複雑な立体構造を作製し、金めっきを行った。次に独自に開発した自己組織化オリゴペプチドを金表面に修飾した。そしてペプチド層を介して細胞を接着させた後、シート状になるまで細胞を培養した。その後、鋳型の周囲をハイドロゲルで覆い、電位を印加することで、細胞を金表面からハイドロゲル側に転写した。

**【結果と考察】** 2 種のめっき法を比較した結果、医療用金めっき法で作製した基板には細胞は接着しなかったが、生体適合性金めっき法では良好な細胞接着が観察された。また、この基板上にオリゴペプチドを介して接着したヒト繊維芽細胞は、-1.0 V(vs. Ag/AgCl) の電位を 5 分間印加することで、約 90% が脱離・回収可能であり、ほぼすべての細胞が良好に生存していることを確認した。さらに、マイクロ光造形法で作製したモデル鋳型に形成した立体細胞シートは、電位を印加し細胞を脱離させることで、内表面が細胞層に覆われた立体的な細胞シートをハイドロゲル内に構築することができた。

### 3D cell sheet engineering by using electrochemical trigger

○Yuka Kobayashi<sup>1</sup>, Christopher E.J. Cordonier<sup>2</sup>, Fuminori Nagase<sup>1</sup>, Hideo Honma<sup>2</sup>, Shoji Maruo<sup>1</sup>, Junji Fukuda<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Coll. Eng., Kanto Gakuin Univ.)

**Key words** cell sheet, stereolithography, gold plating, electrochemical cell detachment

## 1P-2p153 スフェロイド積層型バイオ3Dプリンターにより作製した3次元組織についての培地成分・分泌代謝物の一斉分析

○森 翔太郎<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)  
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

**【目的】** 従来、がん研究は培養皿上の2次元状態に展開したがん細胞を用いて行われてきた。しかし、2次元培養したがん細胞と立体構造を持つ生体内の腫瘍とは多くの点で異なる性質が見られるという問題がある。そこで、本研究では、がん細胞を含むスフェロイド(培養細胞の凝集塊)を材料としてバイオ3Dプリンターによりさらに生体内の腫瘍の性質に近い3次元がん組織の作製の検討を行った。また、現在バイオ3Dプリンターで作製した3次元組織の内部構造は組織を切断し、観察する方法が用いられている。しかし、3次元組織の作製には長い時間を要するため、切断する方法は効率が悪い。従って、本研究では質量分析機を用いて培地成分の一斉分析を行い、内部構造との関連性を検討し、非破壊的分析方法の確立も目指した。

**【方法および結果】** がん細胞(ヒト乳癌 MDA-MB-231, MCF-7)のみでは安定したスフェロイドを作製することができない。そこで、がん細胞とヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)を混合し、バイオ3Dプリンターで用いるのに適切なスフェロイド(直径400~600μmの球形)となる条件を検討した。その結果、最適な混合比および細胞の最適播種数を算出し、がん細胞を含むスフェロイドを安定して作製することができた。さらに、そのスフェロイドを用いたバイオ3Dプリンターでの積層にも成功した。また、作製した3次元組織の内部構造の評価と培地成分・細胞外代謝物の一斉分析についても報告を行う。

### Production of tissue by bio-3D printer and its non-invasive diagnosis by extracellular metabolomics

○Shotaro Mori<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Inst. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

**Key words** bio-3D printer, tumor spheroid, extracellular metabolomics

## 1P-2p154 スフェロイド積層型バイオ3Dプリンターを用いた毛細血管様構造を有する3次元組織の作製

○和田 亜樹<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)  
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

**【目的】** 近年、細胞から臓器を人工的に作製し、再生医療や創薬、臨床など様々な分野に応用する研究が注目を集めている。3次元人工組織の課題として、スキャフォールド(細胞接着用の足場材料)による副作用の排除が挙げられる。本研究では、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)と血管内皮細胞(HUVEC)の共培養により作製した、毛細血管様構造を有する直径500μmの細胞凝集塊(スフェロイド)と、バイオ3Dプリンターを用いて微小血管様構造を有するスキャフォールドフリーな3次元組織を作製することを試みる。

**【方法および結果】** NHDFとHUVECを共培養した混合スフェロイドと、混合スフェロイドの上から更にHUVECで被覆した2層スフェロイドを作製したところ、どちらのスフェロイドにおいても毛細血管様構造が確認された。また、スフェロイドの大きさや真円度、HUVECの分布について評価を行ったところ、HUVECの播種数に依存することがわかった。バイオ3Dプリンターで混合スフェロイドを用いて作製したモデル3次元組織においても、スフェロイドと同様に毛細血管様構造の形成が確認できた。

### Tissue engineering of 3D tissue with micro vascular like structure using bio-3D printer with multicellular spheroid

○Aki Wada<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Inst. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

**Key words** Bio-3D printer, Micro vascular structure, Image analysis

## 1P-2p155 新規 CHO 細胞株の樹立

○岩間 千草<sup>1,5</sup>, 増田 兼治<sup>2,5</sup>, 窪田 みち<sup>1,5</sup>, 堀内 貴之<sup>1,5</sup>, 野中 浩一<sup>2,5</sup>, 上平 正道<sup>3,5</sup>, 大政 健史<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup>株式会社ちとせ研究所, <sup>2</sup>第一三共株式会社, <sup>3</sup>九大院・工, <sup>4</sup>大院・工, <sup>5</sup>次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)  
takayuki.horiuchi@chitose-bio.com

**【背景と目的】** CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞株は、抗体医薬品などの医療用タンパク質の生産に広く用いられている。この細胞株は、1957年にPuckらによってチャイニーズハムスター卵巣組織の初代培養から樹立された上皮細胞を起源とし(1, 2)、その派生細胞株が抗体医薬品の製造に使用される。本研究ではバイオ医薬品製造用宿主への適用を目指し、新規にCHO細胞株を樹立することを目的とした。

**【方法と結果】** チャイニーズハムスターから摘出し、細断した卵巣組織片を出発材料として初代培養を行った。まず、培地・培養条件の検討によって、初代培養細胞を安定かつ大量に取得できる条件を確立した。しかし、卵巣組織からの増殖細胞には上皮細胞と線維芽細胞が混在していた。これらの初代培養細胞に関する形態と増殖能の解析過程で、それぞれの細胞は接着性に差異が認められたため、その性質を利用した線維芽細胞の選択的除去方法を確立した。上皮細胞の選択的回収と、培養・継代を繰り返すことにより、6ヶ月以上の長期継代培養を経て、独立した8ラインの細胞株の樹立に成功した。これらの新規CHO細胞株は安定に維持、継代することが可能であった。

**【参考文献】** 1. Jayapal KP, et al. (2007) *Chem. Eng. Prog.* 103:40-47.  
2. 大政 健史ほか(2015)「抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリーム のすべて」CMC 出版。

### Establishment of novel CHO cell lines

○Chigusa Iwama<sup>1,5</sup>, Kenji Masuda<sup>2,5</sup>, Michi Kubota<sup>1,5</sup>, Takayuki Horiuchi<sup>1,5</sup>, Koichi Nonaka<sup>2,5</sup>, Masamichi Kamihira<sup>3,5</sup>, Takeshi Omasa<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup>Chitose Lab. Corp., <sup>2</sup>Daiichi Sankyo Co., Ltd., <sup>3</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>5</sup>Mfg. Tech. Assoc. Biologics)

**Key words** Chinese hamster ovary, cell line establishment, production of therapeutic proteins

## 1P-2p156 CHO 安定遺伝子座への抗体遺伝子逐次導入による安定高生産株の構築

○山名 良正<sup>1,2</sup>, 成田 純也<sup>2</sup>, 近藤 雅子<sup>1,2</sup>, 大竹 敦子<sup>1,2</sup>, 鈴木 恵介<sup>1,2</sup>, 河邊 佳典<sup>3</sup>, 上平 正道<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>TOTO・総研, <sup>2</sup>MAB組合, <sup>3</sup>九大院・工・化工)  
yoshimasa.yamana@jp.toto.com

### 【背景と目的】

抗体医薬品生産用CHO細胞株には、発現安定性と高生産性が要求される。一般的に、細胞株構築はランダム挿入体の遺伝子増幅プールからのスクリーニングでなされており、安定高生産株の取得には手間と期間を要する。TOTO(株)は、CHOのhprt遺伝子座に発現ベクターを組み込むことで、安定発現株を確実に作製する技術を開発している。一方、九州大学はCre/変異LoxPによる逐次遺伝子導入システムを開発しており、ベクターを特定の遺伝子座に複数コピー導入することが可能となっている。本研究では、両技術の融合により、hprt遺伝子座へ複数コピーのベクターを逐次導入し、安定かつ高生産なCHOを作製する技術の開発を目的とした。

### 【方法】

CHOのhprt遺伝子座に、逐次導入の起点となる変異LoxP配列を相同組換えによって組み込み、逐次導入の起点となるCHO AGIS クローンを作製した。ヒト化抗体重鎖、軽鎖発現カセットを搭載した逐次導入ベクターを作製し、上記クローンにCre発現プラスミドと共導入することで逐次導入クローンを取得した。

### 【結果と考察】

hprt遺伝子座への抗体遺伝子逐次導入によって、導入コピー数に比例した抗体遺伝子mRNAの増加を確認した。また、抗体生産量もコピー数に比例して増加した。また、100PDL以上の発現安定性を確認した。

### Generation of stable and high producer CHO cell lines of recombinant antibodies by transgene integration into hprt locus using an accumulative gene integration system

○Yoshimasa Yamana<sup>1,2</sup>, Junya Narita<sup>2</sup>, Masako Kondo<sup>1,2</sup>, Atsuko Otake<sup>1,2</sup>, Keisuke Suzuki<sup>1,2</sup>, Yoshinori Kawabe<sup>3</sup>, Masamichi Kamihira<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst., TOTO Ltd., <sup>2</sup>Manufacturing Technology Association of Biologics, <sup>3</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** homologous recombination, accumulative gene integration, antibody, CHO

**1P-2p157 CRIS-PITCh法を用いたノックイン CHO 細胞の作製**

○小松 真也<sup>1</sup>, 河邊 佳典<sup>2</sup>, 小松 将大<sup>2</sup>, 井藤 彰<sup>2</sup>, 佐久間 哲史<sup>3</sup>,  
中村 崇裕<sup>4</sup>, 山本 卓<sup>3</sup>, 上平 正道<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・シス生科, <sup>2</sup>九大院・工, <sup>3</sup>広島大院・理, <sup>4</sup>九大院・農)  
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】CHO 細胞ゲノムの部位特異的な改変技術は、組換えタンパク質の高生産・高安定・高性能化に重要である。これまで比較的低い組換え効率である相同組換え法がしばしば用いられてきた。我々はこれまでに、TALENを用いて CHO 細胞の特定ゲノム領域に組換え抗体遺伝子を高効率に導入できることを報告している。本研究では、CRISPR-Cas9 システムを応用した CRIS-PITCh 法を用いて、CHO 細胞の特定ゲノムに外来遺伝子をノックインした遺伝子組換え CHO 細胞を作製した。

【方法と結果】CHO 細胞ゲノムで、比較的安定発現を示すことがわかっている、Hprt 遺伝子座を標的とした。レポーター遺伝子 (Puro 耐性ならびに DsRed 遺伝子) を、標的部周辺と相同性をもつマイクロホモロジーアーム (20 bp) で挟み、ノックイン用のドナーベクターを作製した。Hprt エキソン 2 領域ならびにマイクロホモロジーアーム部分に対するガイド RNA (gRNA) を設計し、ゲノム編集ベクター pX330 に組込んだ。ドナーベクターと pX330 を CHO-K1 細胞へリポフェクション試薬により遺伝子導入後、薬剤 (6-TG とピューロマイシン) ならびに蛍光スクリーニングで、クローンを選別した。樹立した細胞におけるゲノム DNA を PCR 法で評価したところ、選択部分の増幅が見られた。また、シークエンス解析結果から、プラスミドのバックボーンを持ち込まず、期待どおりノックインされていることがわかった。赤色蛍光強度をフローサイトメトリーで解析したところ、すべてのクローンで均一な発現を示した。本研究の一部は、経済産業省の「平成 26 年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代医薬等製造技術) の再委託事業」の支援によって行われた。

**Generation of knock-in CHO cells using CRIS-PITCh system**

○Shinya Komatsu<sup>1</sup>, Yoshinori Kawabe<sup>2</sup>, Shodai Komatsu<sup>2</sup>, Akira Ito<sup>2</sup>,  
Tetsushi Sakuma<sup>3</sup>, Takahiro Nakamura<sup>4</sup>, Takashi Yamamoto<sup>3</sup>,  
Masamichi Kamihira<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ., <sup>4</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** CHO cells, Targeted integration, genome editing tools, CRIS-PITCh

**1P-2p158 Cre-loxP による逐次遺伝子組み込み法における生産 CHO 細胞株構築の迅速化**

○羽田 毅<sup>1</sup>, 河邊 佳典<sup>1</sup>, 汪 雪<sup>1</sup>, 井藤 彰<sup>1</sup>, 山名 良正<sup>2</sup>,  
近藤 雅子<sup>2</sup>, 上平 正道<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・工・化工, <sup>2</sup>TOTO・総研)  
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】我々はこれまでに目的遺伝子をゲノム上の特定部位に逐次的に複数導入可能な、逐次遺伝子組み込みシステム (AGIS) を開発してきた。本研究では、AGIS での 2 つのドナープラスミドを一度に遺伝子導入することと、FACS で蛍光細胞をスクリーニングすることで、scFv-Fc 遺伝子が多重化された生産 CHO 細胞株構築の迅速化を試みた。

【方法】ドナープラスミドの R2 と P3R は scFv-Fc 遺伝子を有し、P3R は mCherry 遺伝子も有す。ドナープラスミドの一方 (R2) を、MC 作製用プラスミドに乗せ、MC 作製用大腸菌へ形質転換後、アラビノース誘導した (MC-R2)。EGFP 遺伝子と 2 つの scFv-Fc 遺伝子を有する細胞 (CHO/scFv-Fc×2) へ、ドナープラスミド (R2 or MC-R2, P3R) と Cre 発現ベクターを共導入し、FACS で解析・単離した。単離した細胞のゲノム DNA を PCR、定量 PCR、シークエンス解析で、scFv-Fc 発現量を ELISA 法で評価した。

【結果と考察】CHO/scFv-Fc×2 へ遺伝子導入後、FACS にて解析したところ、緑色から赤色蛍光へシフトした細胞が見られ、MC-R2 を用いた場合、R2 と比較して 10 から 20 倍高くなった。赤色陽性細胞を単離後、取得した細胞株のゲノム PCR 解析したところ、正しく反応したことを示す特異的なバンドが検出できた。また、定量 PCR 法で評価したところ、4 つの scFv-Fc 遺伝子発現ユニットが組み込まれていることを確認した。反応に関与した変異 loxP は期待したシークエンスとなっていた。培地上清中の scFv-Fc 生産量と細胞数から比生産速度を測定したところ、発現ユニット数の増加に伴って向上していることがわかった。(本研究は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合により助成を受けて実施した。)

**Generation of recombinant CHO cells using AGIS**

○Takeshi Hada<sup>1</sup>, Yoshinori Kawabe<sup>1</sup>, Xue Wang<sup>1</sup>, Akira Ito<sup>1</sup>, Yoshimasa Yamana<sup>2</sup>,  
Masako Kondo<sup>2</sup>, Masamichi Kamihira<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dep. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu U., <sup>2</sup>Res. Inst., TOTO Ltd.)

**Key words** accumulative gene integration, Cre/LoxP system, scFv-Fc

**1P-2p159 CHO 細胞における安定染色体の遺伝子地図作成と CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ターゲティングによる抗体生産株の構築**

○吉富 耕太<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 塚塚 正義<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>,  
大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>徳大院・生物資源産業, <sup>3</sup>MAB組合)  
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】バイオ医薬品に多用されている Chinese hamster ovary (CHO) 細胞は、他の生産宿主と比べて高生産株取得が困難な場合がある。CHO 細胞を用いた抗体生産株構築においては通常、外来遺伝子は染色体上の不特定な位置に導入されている (ランダムインテグレーション法)。一方近年、高生産株を効率よく構築する手段として、染色体上の標的した配列に抗体発現遺伝子を導入する遺伝子ターゲティング法が注目を集めている。しかし、染色体上の有用な領域は未だ十分には解明されていない。そこで本研究では、これまでの研究から安定な染色体と考えられる 1 番染色体に着目し、CHO 細胞ゲノムライブラリーを用いた 1 番染色体の遺伝子地図の作成、並びに、CRISPR/Cas9 システムを用いた 1 番染色体への抗体遺伝子のターゲティングを行い、抗体生産株の構築を試みた。

【実験材料及び方法】遺伝子地図は、CHO ゲノム BAC ライブラリーから 1 番染色体に対応するクローンの配列情報に基づいて作成した。CHO-K1 細胞を用いて、1 番染色体の異なる 3 領域に CRISPR/Cas9 システムを用いたリポフェクションを行い、3 種類の IgG 抗体生産細胞株を樹立した。構築した細胞株について培養を行い、比増殖速度ならびに比生産速度を評価した。

【結果及び考察】CHO 細胞の 1 番染色体の遺伝子地図を構築し、対応する計 91 個の遺伝子をマッピングした。これに基づいて 3 領域を選択し、ターゲティングベクターを構築し、トランスフェクションを行い、細胞株を構築した。1 番染色体へのターゲティングにより構築した細胞株の抗体比生産速度は、3 種類ともランダムインテグレーションにより構築した細胞株よりも約 2-9 倍高い結果が得られた。この結果より、1 番染色体において選択した領域が効率的な抗体遺伝子発現に有用な領域である可能性が示唆された。現在、再現性について検討中である。

**Construction of antibody-producing cell lines using CRISPR/Cas9 system and development of the gene map by focusing on the stable chromosome in CHO cells**

○Kota Yoshitomi<sup>1</sup>, Noriko Yamano<sup>2,3</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2,3</sup>, Yuichi Koga<sup>1</sup>,  
Takeshi Omasa<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Bioind. Tokushima Univ., <sup>3</sup>MAB)

**Key words** CHO cells, chromosome stability, CRISPR/Cas9, antibody productivity

**1P-2p160 染色体異数性を持つ抗体生産 CHO 細胞の網羅的遺伝子発現解析**

○田中 翔<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 緒方法 親<sup>3,4</sup>, 塚塚 正義<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>,  
大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>徳大院・生物資源産業, <sup>3</sup>MAB組合, <sup>4</sup>日本バイオデータ)  
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】バイオ医薬品の代表的生産宿主細胞の Chinese hamster ovary (CHO) 細胞の染色体数は、生体外での長期培養等により、不均一な分布が生じる (染色体異数性)。これまでの研究で、主な染色体数が 20 本 (通常) と 39 本の CHO-DG44 細胞を単離し、それらを宿主として IgG3 生産株を構築した結果、後者において比生産速度が約 5 倍増加することが明らかとなった<sup>1)</sup>。本研究では、主な染色体数が 20 本、39 本の DG44 由来細胞株 (SC20, SC39) とそれらを宿主とした IgG3 生産株 (IgG3-SC20, SC39) の計 4 細胞株について、網羅的遺伝子発現解析手法である (1) High Coverage Expression Profiling (HiCEP) 法、(2) mRNA-seq 法を用いて遺伝子発現パターンを解析し、CHO 細胞における染色体異数性や抗体生産に影響を及ぼす遺伝子を解明することを目的とした。

【方法】HiCEP 及び mRNA-seq は (株) メイズの受託により行った。SC20, SC39 細胞株について、細胞数当たりの  $\beta$ -actin の発現比を定量し、mRNA-seq のデータに対して細胞数補正を行った上で、染色体数の異なる細胞株間における発現量のヒストグラムを作成した。

【結果・考察】HiCEP 及び mRNA-seq 解析の結果、比生産速度の高い IgG3-SC39 は、IgG3-SC20 と比較して発現量が増加する遺伝子数よりも発現量が低下する遺伝子数が多い、宿主である SC39 と比較しても発現量が増加する遺伝子数よりも発現量が低下する遺伝子数が多い結果となった。また、ヒストグラム解析より、細胞体積当たりの SC39 及び IgG3-SC39 の遺伝子発現量は、mRNA-seq の総発現遺伝子 10063 個に対し、90% の遺伝子において SC20 のものを下回った。染色体数の多い SC39 株では細胞体積当たりの遺伝子発現量の低下が引き起こされ、これが染色体数の多い細胞における形質に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

1) Yamano et al., J. Biosci. Bioeng., (in press) 2016

**Transcriptome analysis of antibody-producing CHO cells with chromosome aneuploidy**

○Sho Tanaka<sup>1</sup>, Noriko Yamano<sup>2,3</sup>, Norichika Ogata<sup>3,4</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2,3</sup>,  
Yuichi Koga<sup>1</sup>, Takeshi Omasa<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Bioind. Tokushima Univ., <sup>3</sup>MAB, <sup>4</sup>Nihon BioData Corp.)

**Key words** Chinese hamster ovary cells, Chromosomal aneuploidy, HiCEP, mRNA-seq

## 1P-2p161 バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター肺組織からの無血清馴化不死化細胞株樹立

○山野 範子<sup>1,2</sup>, 大政 健史<sup>2,3</sup>  
 (1)徳大院・生物資源産業,<sup>2</sup>MAB組合,<sup>3</sup>阪大院・工)  
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景及び目的】**チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞(CHO)細胞は、組換えタンパク質の高度な翻訳後修飾が可能、無血清馴化培養が可能等の理由より、タンパク質医薬品生産宿主細胞として多用されている上皮細胞様の細胞株である。CHO細胞を宿主細胞としたバイオ医薬品は、現在の売上世界上位10医薬品の中の6品目抗体医薬品など多数の品目が上市され、CHO細胞に基づく培養方法、無血清培養、工業生産、安全性確認のプラットフォームが確立している。そこで本研究は、従来のCHO細胞よりさらに高増殖、かつ高生産性のチャイニーズハムスター由来の新規高生産宿主細胞の開発を目的とし、肺由来の細胞株を樹立した。

**【方法】**初代培養は、1mm角に刻んだチャイニーズハムスター肺組織をIMDM培地(20%血清)中に静置し行った。増殖してきた細胞を継代により維持し、血清濃度を順次低下させることにより、市販のCHO無血清培地に馴化させ、純度試験を行った。樹立した無血清浮遊培養細胞へのGFP発現ベクターの導入効率は、フローサイトメーターにより評価した。また、抗体(IgG1)発現ベクターを導入し、安定発現株を構築した。

**【結果及び考察】**チャイニーズハムスター肺組織より取得した初代培養細胞は、主に線維芽細胞様の形態を示した。細胞は400日以上継続培養、また、凍結融解が可能であることを確認した。動物由来成分を含まない合成培地による無血清浮遊馴化培養に成功し、CHO-K1細胞よりも増殖の速い、 $0.066\text{ h}^{-1}$ の比増殖速度を得た。樹立した細胞株は、無菌試験、マイクロプラズマ否定試験、in vitro ウイルス試験を通過し、その安全性を確認した。遺伝子導入法の検討により、50%以上の効率でGFP発現ベクターの導入が可能となった。現在、構築した抗体生産株について細胞の安定性と生産性の評価を行っており、新たな生産宿主細胞としての展開が期待される。

### Establishment of the serum-free adapted immortalized cell line from Chinese hamster lung

○Noriko Yamano<sup>1,2</sup>, Takeshi Omasa<sup>2,3</sup>  
 (1)Grad. Sch. Biosci. Bioind., Tokushima Univ.,<sup>2</sup>MAB,<sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Chinese hamster, cell line development, fibroblast, serum-free culture

## 1P-2p162 CHO細胞を用いたサメ由来重鎖抗体の分泌発現コンストラクトの検討

○野村 嘉紀<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 香川 悠馬<sup>4</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1)阪大院・工,<sup>2</sup>徳島大院・生物資源,<sup>3</sup>MAB組合,<sup>4</sup>徳島大院・先端技科)  
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景】**サメ由来重鎖抗体 Immunoglobulin New Antigen Receptor(IgNAR)はタンパク質変性剤を多く含む環境下でも非常に高い構造安定性を示すことからバイオテクノロジーへの応用が期待されている。現在、抗体医薬生産においてChinese Hamster Ovary(CHO)細胞を宿主とした生産プラットフォームが確立しているため、応用を見据えたIgNAR生産においてもCHO細胞を宿主細胞とした生産系が望ましい。IgNARは6つのIgドメイン(Vドメイン、C1-C5ドメイン)で構成されており、構造安定性と分泌生産能が高い領域のみを同定できれば、有用領域のみを利用したIgNAR型新規低分子抗体の開発が可能になると考えられる。そこで本研究ではCHO細胞を発現宿主とし、IgNAR各発現コンストラクトの分泌能を検討した。

**【方法】**Nurse Shark由来IgNARを3領域に分割し、C末端にヒトIgG1-Fc領域を融合したVC1-Fc、C2C3-Fc及びC4C5-Fc発現ベクターをCHO細胞へ遺伝子導入した。培養上清からProtein A スピンカラムを用いた精製、SDS-PAGE及びELISAにより、各発現コンストラクトの分泌能を検討した。

**【結果・考察】**構築した全てのIgNAR発現コンストラクトにおいて培地への分泌が確認されたが、VC1-Fc及びC4C5-Fcの分泌生産量は約0.15 mg/mLに対し、C2C3-Fcは0.05 mg/mL程度と低い分泌量であった。SDS-PAGEでは同程度の分子量をもつ3つのコンストラクトのうち、C2C3-Fcでは配列中に2ヶ所のN型糖鎖修飾部位が存在するが、糖タンパク質に特有のスミアバンドが検出され、糖鎖の結合が推定された。以上より、C2C3-Fcの分泌量が低い原因として、糖鎖修飾過程もしくは糖鎖修飾に関連する細胞内での立体構造形成過程に問題があると考えられた。現在の結果より、CHO細胞を利用した新規IgNAR低分子抗体の開発を行う場合、VC1およびC4C5領域を利用することが分泌生産に有効であることが示唆された。

### Secretory expression of immunoglobulin new antigen receptor fragments in chinese hamster ovary cells

○Yoshiki Nomura<sup>1</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2,3</sup>, Yuma Kagawa<sup>4</sup>, Noriko Yamano<sup>2,3</sup>, Yuichi Koga<sup>1</sup>, Takeshi Omasa<sup>1,2,3</sup>  
 (1)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.,<sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Bioind. Tokushima Univ.,<sup>3</sup>MAB,<sup>4</sup>Grad. Sch. of Adv. Tech. & Sci., Tokushima Univ.)

**Key words** Immunoglobulin New Antigen Receptor, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, shark antibody, Molecular design

## 1P-2p163 Tret1 遺伝子導入による CHO 細胞の抗体凝集抑制と細胞増殖能の改善

○原田 涼之介<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2,3</sup>, 黄川 田 隆洋<sup>4,5</sup>, 小出 静代<sup>3</sup>, 古賀 雄一<sup>1</sup>, 山野 範子<sup>2,3</sup>, 大政 健史<sup>1,2,3</sup>  
 (1)阪大院・工,<sup>2</sup>徳大院・生物資源産業,<sup>3</sup>MAB組合,<sup>4</sup>農研機構,<sup>5</sup>東大院・新領域)  
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景】**抗体医薬品の製造過程において、品質や安全性の低下につながる抗体凝集の形成を抑制することが必要である。細胞培養中に発生する抗体凝集を抑制するために、我々はケミカルシヤペロン的一种であるトレハロースを培地に加える培養法を開発してきたが、添加により生じる細胞増殖能の低下を改善することが課題であった。細胞増殖能低下の原因を培地浸透圧による細胞へのストレスではないかと推測し、本研究では、ネムリユスリカ由来トレハローストランスポーター(TRET1)を抗体生産CHO細胞に導入しトレハロースに由来する浸透圧ストレス低減を試みることで、トレハロース培地を用いた凝集抑制と細胞増殖能改善の両立を目的とした。

**【方法】**CHO-HcD6及びTRET1を導入したCHO-HcD6-TRET1細胞を、それぞれコントロール培地、100mMトレハロース含有培地の二種類の培地で半回分培養を行い、培養中の生細胞濃度及び抗体濃度を測定した。また培養上清からProtein G スピンカラムを使用して抗体を精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて凝集体含有量を分析した。

**【結果・考察】**トレハロース培地ではCHO-HcD6-TRET1の最大細胞濃度はCHO-HcD6の2倍以上に増加し、浸透圧ストレスの軽減により増殖能が向上したことが示唆された。トレハロース培地における抗体の比生産速度はコントロール培養と比較して、CHO-HcD6、CHO-HcD6-TRET1共に1.3~1.4倍同程度上昇した。ゲル濾過分析の結果、トレハロース培地では凝集体・二量体のピークが減少し、培養中の凝集形成が抑制されていた。

以上の結果より抗体生産CHO細胞にTRET1を導入することで、トレハロース培地の凝集抑制能を維持しつつ細胞増殖性を改善できることが示された。今後、比生産速度の上昇や凝集抑制機構の詳細を解析するため、細胞内の凝集体量やトレハロース濃度の関連性の検討を行う。

### Suppressed antibody aggregation and improved cell growth by exogenous expression of Tret1 in recombinant CHO cells.

○Ryonosuke Harata<sup>1</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2,3</sup>, Takahiro Kikawada<sup>4,5</sup>, Shizuyo Koide<sup>3</sup>, Yuichi Koga<sup>1</sup>, Noriko Yamano<sup>2,3</sup>, Takeshi Omasa<sup>1,2,3</sup>  
 (1)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.,<sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Bioind. Tokushima Univ.,<sup>3</sup>MAB,<sup>4</sup>NARO,<sup>5</sup>Grad. Sch. Frontier Sci. Tokyo Univ.)

**Key words** Chinese hamster ovary (CHO) cells, antibody aggregation, Tret1, trehalose

## 1P-2p164 免疫系 T 細胞の成熟化シグナルと温感

○藪内 里実<sup>1</sup>, 大久保 由布<sup>1</sup>, 白 京玉<sup>1</sup>, 星野 邦秀<sup>1,2</sup>, 辻野 義雄<sup>1,2</sup>, 下川 直史<sup>1</sup>, 高木 昌宏<sup>1</sup>  
 (1)北陸先端大・マテリアル,<sup>2</sup>高砂香料工業株式会社)  
 takagi@jaist.ac.jp

**【目的】**細胞膜には、飽和脂質やコレステロールを豊富に含むラフト領域が存在し、信号伝達に重要であると考えられている。T細胞を活性化するレクチン(ConA)存在下では、ラフトが膜上で集積後、細胞骨格を介して内部へ集積することが観察された。我々はT細胞活性化には、ラフトと細胞骨格が重要と考えた。また細胞膜には、温度変化を感知するTRPチャネルが存在し、そのうちの1つであるTRPV1はカプサイシンによって活性化し、温感を感知する。そこで、T細胞を例にラフト集積機構の温度依存性とカプサイシンによる影響について調べた。

**【方法】**T細胞のラフト領域はCT-B 488、F-actinはRhodamine phalloidin、微小管はOregon Greenによる染色を行った。T細胞に温感剤としてCapsaicin、情報分子としてConAを作用させ、温度調節下で共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

**【結果】**ConA非存在下では、ラフトは温度が低いほど安定で、アクチン重合状態は温度が高いほど安定であった。このとき、微小管は細胞膜下に局在しているが観察された。ConA存在下では、ラフトの細胞内部への集積が観察でき、27℃以下ではラフトのみが集積し、27℃以上ではアクチンとラフトが細胞内部の同じ場所に集積した。このとき微小管は、すべての温度でラフトの集積時に中心体から放射線状に伸びている様子が観察された。以上の結果からラフト集積には、低温(<27℃)でのラフトのみの安定性に依存した集積と、高温(≥27℃)でのアクチンも関与した集積の2種類があると考えられ、微小管はラフト集積時に必要であると考えられた。またカプサイシン存在下では、全ての温度(23℃~37℃)でもラフト集積を起こすことからアクチンがラフトの安定性により低温でも関与しており、この事がラフトに存在すると考えられるTRPV1の温感にも関わっていると考えられた。

### Maturation of T cell and heat sensitization

○Satomi Yabuuchi<sup>1</sup>, Yufu Okubo<sup>1</sup>, Keangok Baek<sup>1</sup>, Kunihide Hoshino<sup>1,2</sup>, Yoshio Tsujino<sup>1,2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
 (1)Sch. Mat. Sci., JAIST,<sup>2</sup>TAKASAGO International Corporation)

**Key words** capsaicin, raft domain, temperature, cytoskeleton

**1P-2p165 卵白タンパク質特異的糖鎖改変システムの開発**

森脇 脩一郎, 奥崎 雄也, 浅井 聖也, 土田 将大, 岡岡 英徳,  
西島 謙一, 飯島 信司  
(名大院・工)  
kaneoka@nubio.nagoya-u.ac.jp

**【背景と目的】**

鶏卵は人類にとって重要なタンパク源であり、その高い経済性と生産性からトランスジェニックニワトリをタンパク質性医薬品生産のため生きたバイオリアクターとして利用する技術の開発が進められつつある。本研究では、次の段階として糖鎖制御による生産タンパク質の高品質化・高機能化技術の開発を目指す。糖鎖構造末端のシアル酸は生理活性に大きな影響を与えることから、シアル酸転移酵素(STs)の活性は糖鎖制御を考える上で、非常に重要である。我々はニワトリ STs の基礎的な解析を行うと同時に、トランスジェニックニワトリを作製する際に宿主への影響を最小限に抑えるため、導入遺伝子の卵白タンパク質特異的発現システムの開発を行った。

**【方法・結果】**

糖鎖構造には N-結合型と O-結合型の 2 種類があり、今回は O-結合型糖鎖形成に関わるニワトリ ST6GalNAc ファミリーの解析を行った。ニワトリ ST 遺伝子を培養細胞 (293FT cells) に強制発現し、その cell lysate を用いて 14C 標識 CMP-シアル酸の転移反応を行った。その結果、ニワトリ ST6GalNAc1/2/3 は合成糖とタンパク質(Fetuin)を基質とした場合、活性を検出できたが、ST6GalNAc4/5/6 の活性は検出できなかった。

また、卵白タンパク質特異的発現システム開発のためにニワトリリゾチームプロモーター(Plyso)の解析を行った。Plyso が持つ DNA エレメントを組み込んだヒトエリスロポエチン (hEPO) を発現するレトロウイルスベクター (pMSCV/GFP/Plyso-hEPO-WPRE) を数種類構築し、キメラニワトリを作製した。キメラニワトリの卵白タンパク質の解析を行った結果、リゾチームの輸卵管エンハンサーにより卵白タンパク質特異的な発現が誘導された。

**Glyco-engineering in chicken egg-white to produce biotherapeutic proteins**

Shuichiro Moriwaki, Yuya Okuzaki, Seiya Asai, Masahiro Tsuchida,  
○Hidenori Kaneoka, Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima  
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** transgenic chicken, glycosyltransferase, transcription

**1P-2p166 ニワトリ IFITM の抗ウイルス機能の解析**

奥崎 雄也, 木溪 俊介, 岡岡 英徳, 西島 謙一, 飯島 信司  
(名大院・工)  
nishijima@nubio.nagoya-u.ac.jp

**【背景・目的】** 生物はウイルスに対する自己防衛機構としてウイルス感染直後から働く自然免疫系を持っている。この際、インターフェロン (IFN) が抗ウイルス活性タンパク質の発現を誘導することで、感染細胞およびその周囲の細胞に抗ウイルス活性を付与する。IFITM (interferon-inducible transmembrane protein) ファミリーは、IFN により誘導される抗ウイルスタンパク質の一種であり、感染の初期ステップを妨害する活性が知られている。哺乳類ではインフルエンザウイルスをはじめ種々のウイルスに対する阻害活性が知られるが、ニワトリ IFITM の機能解析は進んでいない。そこで、ニワトリ IFITM の機能解析をめざした。

**【方法・結果】** ニワトリに存在する数種の IFITM ホモログの発現についてリアルタイム RT-PCR で解析した結果、ニワトリ IFITM3 は成鶏で発現量が高いのに対し、ニワトリ IFITM10 はニワトリ胚の特に生殖腺で発現量が高いことがわかった。次に、これらの遺伝子をクローニングし、細胞に強制発現させて局在を観察したところ、細胞膜及び細胞質への局在が観察された。一般に、IFITM はウイルス-細胞間の膜融合を阻害することが知られている。ニワトリ IFITM の膜融合阻害活性を明らかにするため、ニワトリ IFITM を一過的に発現させた細胞に対して VSV-G タンパク質を発現させて細胞の融合を観察した。VSV-G 発現細胞は短時間の酸性処理により細胞融合を起こすが、ニワトリ IFITM10 によりこの融合が抑制されることを見いだした。また、VSV-G エンベロープでシュドタイプ化したレトロウイルスをニワトリ胚線維芽細胞 (DF-1) に感染させ、感染効率を測定したところ、IFITM3 で抑制活性が確認された。

**Analysis for anti-viral function of chicken IFITMs**

Yuya Okuzaki, Shunsuke Kidani, Hidenori Kaneoka, ○Ken-ichi Nishijima,  
Shinji Iijima  
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** chicken, anti-virus

**1P-2p167 LC-MS ならびに HPLC-ELSD を用いたアルギン酸不飽和オリゴ糖と DEH の検出**

○藤井 玲央奈<sup>1,5</sup>, 三宅 英雄<sup>1,5</sup>, モリ テツシ<sup>2,5</sup>, 田中 礼士<sup>1,5</sup>,  
高木 俊幸<sup>3,5</sup>, 吉川 裕之<sup>4,5</sup>, 黒田 浩一<sup>3,5</sup>, 植田 充美<sup>3,5</sup>, 柴田 敏行<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>早大・理工, <sup>3</sup>京大院・農, <sup>4</sup>阪大院・工, <sup>5</sup>JST・CREST)  
shibata@bio.mie-u.ac.jp

**【目的】** アルギン酸は、褐藻類に最も多く含まれている多糖類である<sup>1)</sup>。本研究では、エンド型アルギン酸リアーゼ (EndoAly) と *Falsirhodobacter* sp. のエキソ型アルギン酸リアーゼ (AlyFRB)<sup>2)</sup> を用いて不飽和オリゴ糖 (AUOs) と 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) をそれぞれ調製し、LC-MS と HPLC-ELSD によりそれらの検出を試みた。

**【方法】** アルギン酸 Na 水溶液に EndoAly を加えて反応を行い、AUOs を調製した。さらに AUOs に AlyFRB のリコンビナントタンパク質を加えて反応を行い、DEH を調製した。分光光度分析と TLC を用いて分解産物の確認を行った後、LC-MS と HPLC-ELSD を用いて AUOs と DEH の検出を試みた。

**【結果】** イオンクロマトグラフィー用カラムとギ酸アンモニウム緩衝液のアイソクラティック送液を用いて LC-MS 測定を行った。AUOs の場合、TIC 上で三つのピークが検出された。MS のネガティブモードで SIM 測定を行った結果、これらは、不飽和二糖 (保持時間 4.5 分)、不飽和三糖 (保持時間 6.8 分)、不飽和四糖 (保持時間 12.1 分) であることが分かった。AlyFRB の反応液では、TIC 上で保持時間 3.2 分に顕著なピークが検出された。SIM 測定の結果、このピークの質量数は、DEH の脱プロトン化分子の質量数と一致した。HPLC-ELSD も同様、DEH と不飽和オリゴ糖の分離と検出を示すクロマトグラムが得られた。本研究は、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 CREST の支援を受けて行われた。

1) 柴田ら, 第 66 回日本生物工学会大会, 2P-135, (2014).

2) Mori, T. et al., PLoS ONE, 11, e0155537 (2016).

**Separation and detection of alginate unsaturated oligosaccharides and DEH using LC-MS and HPLC-ELSD**

○Reona Fujii<sup>1,5</sup>, Hideo Miyake<sup>1,5</sup>, Tetsushi Mori<sup>2,5</sup>, Reiji Tanaka<sup>1,5</sup>,  
Toshiyuki Takagi<sup>3,5</sup>, Hiroyuki Yoshikawa<sup>4,5</sup>, Kouichi Kuroda<sup>3,5</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>3,5</sup>,  
Toshiyuki Shibata<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>5</sup>CREST, JST)

**Key words** LC-MS, HPLC-ELSD, Alginate unsaturated oligosaccharides, 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid

**1P-2p168 自動プレカラム誘導体法を利用した HPLC によるアミノ酸のキラル分離**

○熊谷 浩樹  
(アジレント・テクノロジー)  
hiroki\_kumagai@agilent.com

**【目的】** HPLC によるアミノ酸のキラル分離は主に、キラル固定相を用いる方法と、アミノ酸のジアステレオマーを逆相分離する方法により行われている。多種類のアミノ酸を同時にキラル分離する場合は、ジアステレオマーを逆相分離する方法が有利であり、UHPLC やコアシェル型充填剤の利用により精度の高い高速分析が可能となっている。本研究では、コアシェル型充填剤による分離能と分析速度の向上、およびオートサンブラによるプレカラム誘導体法の自動化について検討し、食品中の L-および D-アミノ酸の分離への適用を試みた。

**【方法】** HPLC システムは Agilent 1290 Infinity II LC System に蛍光検出器を接続して使用した。L-および D-アミノ酸の誘導体法は、OPA と *N*-isobutyl-L-cysteine により蛍光誘導体法とジアステレオマー形成を同時に行った。反応はオートサンブラのインジェクタプログラム機能を利用して自動で行った。分離カラムには、高速・高分離が期待できるコアシェル型充填剤 Agilent Poroshell HPH-C18 を使用した。

**【結果と考察】** 高機能オートサンブラを利用することで、1 級アミノ酸のプレカラム蛍光誘導体法とジアステレオマー形成を同時に自動で行えることが確認できた。その結果、ジアステレオマーを利用するキラル分離を簡便かつ精度よく行うことができた。また、コアシェルカラムにより、迅速で効率の良い分離が可能であることがわかった。さらに、食酢などの食品中のアミノ酸のキラル分析に適用し、良好な結果を得ることができた。

**Pre-column derivatization-HPLC method for enantioseparation of amino acids**

○Hiroki Kumagai  
(Agilent Technologies)

**Key words** amino acid, enantiomer, HPLC

**1P-2p169 LC-TOFMS を用いた非誘導体化アミノ酸鏡像体の高速一斉分析法の開発**

○紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎  
(阪大院・工)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景と目的】**

Glycine を除くタンパク質構成アミノ酸はいずれも不斉炭素を持ち、鏡像体 (L-体と D-体) が存在するが、自然界での存在比は L-体に大きく偏っている。両者は旋光性以外の物理化学的性質が全く同一なため、L-アミノ酸の大量存在下、微量の D-アミノ酸を分離・検出することは技術的に難しい。そのため、高等生物の生体内からは D-アミノ酸は検出されず、L-アミノ酸のみが存在すると長い間考えられてきた。

しかし近年の分析技術の進歩に伴い、ヒトを含む様々な高等生物においても D-アミノ酸の存在が明らかとなり、食品や医療をはじめ様々な分野で D-アミノ酸が注目・研究されるようになった。だが、従来の分析法では誘導体化処理が必要であったり、鏡像体分離能やスループットが不十分といった問題があり、簡便で高速・高分離能を有する分析法の開発が期待されている。

20 種類のタンパク質構成アミノ酸の側鎖は、性質が多岐 (親水/疎水性、酸/塩基性、脂肪族、環状等) にわたるため、鏡像体分離を考慮しなくとも、一斉分析するには高いレベルのクロマト分離技術が要求される。よって、さらに鏡像体分離も同時に達成することは、非常に高難度の課題といえる。我々は、誘導体化処理を必要としないアミノ酸鏡像体の一斉分析法の開発を試みた。

**【方法と結果】**

キラルカラム (CROWNPAK CR-I : ダイセル) と LC-TOFMS (Nexera : 島津, TripleTOF 5600 : AB SCIEX) を用い、良好なクロマトが得られる LC 条件を検討した。その過程において、通常用いられる逆相モードではなく、SILIC モードで分析することにより、鏡像体が良好に分離することを発見した。その結果、Glycine および第二級アミンの Proline を除く 18 種類の鏡像体は、10 分間のアイソクラティック分析でありながら全てベースライン分離するという、従来法をはるかに凌ぐ高速一斉分析法の開発に成功した。

**Development of simultaneous analytical method for underivatized chiral amino acids using LC-TOFMS**

○Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** D-amino acid, enantioseparation, LC-TOFMS

**1P-2p170 LC-TOFMS を用いた D, L-アミノ酸を含む生理活性アミノ酸類の一斉分析法の開発**

○谷口 百優, 紺屋 豊, 福崎 英一郎  
(阪大院・工)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Glycine を除く全てのタンパク質構成アミノ酸は不斉炭素を持ち、光学異性体である L-体と D-体に分類されるにも関わらず、自然界に存在するアミノ酸のほとんどは L-アミノ酸である。そのため、多くの生物は特異的に L-アミノ酸を利用していると考えられ、D-アミノ酸は重要視されてこなかった。

しかし、アミノ酸の光学異性体を分離分析する技術の向上によって D-アミノ酸が高等生物や植物、食品など自然界に広く存在し、その機能や旨味は L-体とは大きく異なることが明らかとなった。そのため、アミノ酸分析において光学異性体を考慮する必要性が認識され始めたが、光学異性体である D-アミノ酸と L-アミノ酸は旋光性以外の物理化学的性質が等しく、また、試料中の D-アミノ酸は L-アミノ酸に対して一般に極微量であるため、D-アミノ酸類の分離及び検出は難しく、高分離能かつハイスループットな分析法は存在しなかった。

そこで、本研究では、当研究室で開発した Glycine および二級アミン Proline を除くタンパク質構成アミノ酸 18 種の光学異性体を分離分析することが可能な LC-TOFMS 法をさらに発展させ、食品中微量 D-アミノ酸の定量分析を可能とするために、分析条件の最適化を行った。その結果、タンパク質構成アミノ酸 18 種の光学異性体について、完全分離および一斉分析を 10 分で達成した。次に、構築した分析系の定量性を回収率や検量線の直線性によって評価した結果、信頼性の高い定量分析を行うことが可能であることが示された。さらに、当該分析法の特徴から、タンパク質構成アミノ酸だけでなく様々なアミン類を対象とした一斉分析が可能であると考えられた。そこで、標準溶液を用いて主要代謝に関わるアミン類の分析を行い、それらの分離度を評価した。その結果、非タンパク質構成アミノ酸やアミン類 100 種以上を含めた一斉分析が可能であることが示された。

**Development of simultaneous analytical method for amines including D, L-amino acids using LC-TOFMS**

○Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, Eiichiro Fukusaki  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** D-amino acids, enantioseparation

**1P-2p171 ヘモグロビン A<sub>1c</sub> とレクチン AAL の結合に対する温度の影響**

○加畑 真人<sup>1</sup>, 長谷 英理菜<sup>1</sup>, 小林 夕香<sup>2</sup>, 上野 泰<sup>2</sup>, 吉宗 一晃<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日大・生産工, <sup>2</sup>J-オイルミルズ・商品開発研究所)  
yoshimune.kazuaki@nihon-u.ac.jp

血中ヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) は、グルコース 1 分子がヘモグロビン (Hb) と非酵素的に結合した糖化ヘモグロビンの一つで、Hb に対する HbA<sub>1c</sub> の割合は糖尿病診断の重要なバイオマーカーである。現在 HbA<sub>1c</sub> はこれに特異的な抗体や酵素を用いて測定されている。我々はこれまでに糖結合性タンパク質であるレクチンの中で特にヒロチャワンタケ由来レクチン (AAL) がヘモグロビンよりも HbA<sub>1c</sub> に高い親和性を持つことを示唆した。レクチンは比較的安価で安定性も高いため、この結合を用いた HbA<sub>1c</sub> 測定法を開発を試みている。レクチン AAL を用いた HbA<sub>1c</sub> 測定では、HbA<sub>1c</sub> を ELISA プレートに固相化し、ペルオキシダーゼで標識したレクチン AAL と結合させ、TMB Peroxidase substrate system により基質を発色させて測定した。この時の洗浄液の温度を室温から 4℃にしたところ、室温の場合よりも 0.1µg の HbA<sub>1c</sub> を測定したときの吸光度が 3.3 倍程度上昇した。レクチン AAL と HbA<sub>1c</sub> との結合に対する温度の影響を調べたので報告する。

**Effect of temperature on the binding between hemoglobin A<sub>1c</sub> and lectin AAL**

○Masato Kabata<sup>1</sup>, Erina Hase<sup>1</sup>, Yuka Kobayashi<sup>2</sup>, Yasushi Ueno<sup>2</sup>, Kazuaki Yoshimune<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Coll. Ind. Technol., Nihon Univ., <sup>2</sup>R&D Div., J-OIL MILLS, Inc.)

**Key words** Hemoglobin A<sub>1c</sub>, Lectin AAL

**1P-2p172 新規プロテイン A カラムによる免疫グロブリンの迅速定量**

○大森 俊昂, 藤井 智, 奥村 晴美, 荒木 康祐, 中谷 茂  
(東ソー)  
toshitaka-ohmori-sw@tosoh.co.jp

**【緒言】**

モノクローナル抗体 (mAb) 及びその改変体はバイオ医薬品として広く用いられ、多くのバイオ医薬品企業が今後もその開発に注力すると予想されている。抗体医薬品の開発には高速かつ高精度の mAb 定量法が要求される。一方、プロテイン A は多くの抗体の Fc 領域に高い親和性を有することが知られており、プロテイン A を固定相とする充填剤・カラムは mAb の定量や精製に頻用されている。今回、我々は遺伝子組換えプロテイン A をリガンドとした HPLC 用アフィニティーカラム「TSKgel® Protein A-5PW」を開発した。本カラムは機械的強度の高い親水性架橋ポリマー粒子に、抗体に対する吸着量が高いプロテイン A を固定化した充填剤を用いているため、高流速下での mAb の迅速定量が可能になると、mAb の定量範囲が広いことが特長である。本発表では、当該カラムの特性とチャイニースハムスター卵巣 (CHO) 細胞培養液上清中の mAb の定量への適用例を紹介する。

**【結果】**

**検量線:** ポリクローナルヒト IgG (pIgG) を用い検量線を作成し、市販プロテイン A カラムと比較した。本カラムは 2 ~ 200 µg (0.1 ~ 10 g/L) の範囲で良好な直線性 (R<sup>2</sup> = 0.9996) を示した。一方、市販カラムの直線性範囲は 20 µg (1 g/L) 以下であった。

**測定流速の影響:** ヒトモノクローナル IgG1 を含む CHO 細胞培養液上清を試料とし、異なる流速 (1.0 ~ 4.0 mL/min) における検量線と比較した。流速に依らず同等の直線性 (R<sup>2</sup> ≥ 0.999) が得られた。

**カラム耐久性:** pIgG を含む CHO 細胞培養液上清を繰り返し注入し、クロマトグラム及び検量線の変化を観察した。2,000 回注入後もクロマトグラム及び検量線に顕著な変化は見られなかった。

**mAb を用いた添加回収試験:** 異なる濃度のヒトモノクローナル IgG1 を含む CHO 細胞培養液上清を測定し、回収率を求めた。0.5 ~ 5.0 g/L の範囲で 100 ~ 105% の回収率が得られた。

**Fast quantification of Immunoglobulin G by a novel Protein A analytical HPLC column**

○Toshitaka Ohmori, Satoshi Fujii, Harumi Okumura, Kosuke Araki, Shigeru Nakatani  
(Tosoh Corp.)

**Key words** HPLC, IgG, Protein A, affinity chromatography

## 1P-2p173 インスリン存在下における膵β細胞インスリン分泌応答の連続測定

○重藤 元<sup>1,2</sup>, 小野 拓人<sup>3</sup>, 黒田 章夫<sup>3</sup>, 舟橋 久景<sup>1</sup>  
 (1)広島大学・サステナセ, (2)広島大・グローバルキャリアセ, (3)広島大院・先端物質)  
 hisafuna@hiroshima-u.ac.jp

**【背景と目的】** 従来、生細胞インスリン分泌応答測定は、薬物などによる刺激により分泌されたインスリンの最終的な総量を測定する、もしくは、培地を総入れ替えしながら単位時間当たり分泌されたインスリンの量を測定することにより行われてきた。しかしインスリン分泌細胞である膵β細胞はインスリン感受性細胞でもある。これまでに自身が分泌したインスリンを受容することによりインスリン分泌を調整している可能性が示唆されているが、インスリン存在下におけるインスリン分泌挙動は未解明な部分が多い。

当研究室ではこれまでに、洗浄操作なしにインスリンを測定するためのタンパク質プローブを開発してきている。そこで本研究ではこのプローブを利用して、インスリン存在下における膵β細胞株のインスリン分泌応答の連続測定を行った。

**【方法・結果】** 発光タンパク質である Nluc、インスリン受容体標的認識部位である αCT および L1、蛍光タンパク質である YPet を融合したインスリン検出用タンパク質プローブ (NaLY) を作製した。NaLY はインスリンを認識すると構造変化を起こし、Nluc と YPet が近接すること起因する生物発光共鳴エネルギー転移シグナルを発する。膵β細胞株を培養し、本プローブを用いて培地中のインスリン濃度変化を連続測定した。インスリンを外部添加した後、グルコースで細胞を刺激した場合、インスリン分泌応答は観察されず、逆にインスリンの吸収が観察された。一方、インスリン分泌誘導薬で刺激した場合、インスリン外部添加後であってもインスリン分泌応答とそれに続くインスリンの吸収が観察された。以上の様に、インスリン存在下における生細胞インスリン分泌応答の連続測定によって、従来法では注目されてこなかった細胞応答の違いが評価可能であることが示された。

### Continuous monitoring of insulin secretion response in the presence of insulin

○Hiyama Shigetoshi<sup>1,2</sup>, Takuto Ono<sup>3</sup>, Akio Kuroda<sup>3</sup>, Hisakage Funabashi<sup>1</sup>  
 (1)ISSD, Hiroshima Univ., (2)Glob. Car. Des. Cent., Hiroshima Univ., (3)Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** BRET, insulin secretion, live cell response, living cell

## 1P-2p174 ITO 電極による深海底堆積物由来ストレプトマイセス属微生物の電気回収

○小山 純弘<sup>1</sup>, 西 真郎<sup>1</sup>, 長野 由梨子<sup>1</sup>, 能木 裕一<sup>1</sup>, 秦田 勇二<sup>2</sup>, 坪内 泰志<sup>1</sup>  
 (1)海洋研究開発機構, (2)埼玉工大・工・生命環境化学)  
 skoyama@jamstec.go.jp

**【背景と目的】** 演者らは、環境中の微生物を生きたままマイナスの微弱電位を印加した電極基板上に誘引付着させ、高周波微弱変動電位印加で剥離回収する手法を開発している。電気回収された環境微生物の菌叢解析から放線菌門微生物のバイオマスは相応量存在し、その多くが新奇微生物であることを見いだしている。本研究では、放線菌の中でも生物活性物質の大部分を生産するストレプトマイセス属に着目し、深海由来放線菌門ストレプトマイセス属微生物の選択的な電気回収の可能性と、電極基板上への付着メカニズムについて検討した。

**【方法】** 青森県下北半島東方沖水深 1180m の深海底堆積物(CK06-06)から新規に分離された 5 株の *Streptomyces* sp.、そして *S. albus* の合計 6 株を試験菌株とし、電位印加した電極基板上に胞子が付着するか調査した。また深海底堆積物から、*Streptomyces* sp. を選択的に電気回収し、寒天培地培養が可能か検討した。

**【結果】** *Streptomyces* sp. ST.28 株を 1/20 濃度の人工海水(1/20ASW)中に分散させ、ITO パターン電極の ITO 電極領域に胞子が選択的に付着するか調査した。ST.28 株胞子は -0.2V vs. Ag/AgCl の電位印加条件下、ITO 電極領域にもっとも多く選択的に付着した。1/20ASW から Mg イオンを除去すると、ITO 電極基板上に ST.28 株胞子はほとんど付着しなくなる事が明らかとなった。ST.2013-005、ST.2014-008、ST.2014-023、ST.2014-027、そして *Streptomyces albus* の 5 株についても、ST.28 株胞子と同様に ITO パターン電極の ITO 電極領域へ選択的に付着するか検討した。その結果、1/20ASW に分散させたすべての試験菌株は、-0.2V vs. Ag/AgCl の電位印加条件下で ITO 電極領域へ選択的に付着することを明らかとした。上記条件を本技術に適用することで、駿河湾の深海底堆積物から *Streptomyces* sp. 様のコロニーを多数得ることに成功した。

### Electrical retrieval of deep-sea sediments derived *Streptomyces* sp. using an ITO electrode

○Sumihiro Koyama<sup>1</sup>, Shinro Nishi<sup>1</sup>, Yuriko Nagano<sup>1</sup>, Yuichi Nogi<sup>1</sup>, Yuji Hatada<sup>2</sup>, Taishi Tsubouchi<sup>1</sup>  
 (1)JAMSTEC, (2)Dept. Life Sci. Green Chem., Saitama Inst. Technol.)

**Key words** *Streptomyces* sp., Deep-sea sediment, Electrical retrieval, ITO electrode

## 1P-2p175 Paper-based colorimetric biosensor for antibiotics targeting bacterial protein synthesis

Duyen Tran, ○Hideyuki Matsuura, Kazuki Ujiie, Misa Muraoka, Kazuo Harada, Kazumasa Hirata  
 (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)  
 hmhide@phs.osaka-u.ac.jp

Residual antibiotics present in environmental water, due to antibiotic overuse and misuse, are a serious global health concern, contributing to the emergence and spread of resistant bacteria. Thus, development of a detection method suitable for the screening of environmental water for antibiotics is an urgent need. In this study, we have focused on the development of a simple, paper-based, colorimetric biosensor for the detection of antibiotics inhibiting bacterial protein synthesis. This biosensor is based on the detection of a color change induced by β-galactosidase, which is synthesized on freeze-dried paper discs containing an in vitro transcription/translation system. When a water sample without antibiotics is applied to the paper discs, β-galactosidase can be synthesized, and it hydrolyzes a colorimetric substrate, resulting in a color change from yellow to purple. By contrast, in the presence of antibiotics, the color change can be hampered due to an inhibition of β-galactosidase synthesis. We believe that this easy-to-use and inexpensive biosensor has the potential to be used for the screening of environmental water samples for antibiotics, particularly in developing countries where resources are limited.

### Paper-based colorimetric biosensor for antibiotics targeting bacterial protein synthesis

Duyen Tran, ○Hideyuki Matsuura, Kazuki Ujiie, Misa Muraoka, Kazuo Harada, Kazumasa Hirata  
 (Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** biosensor

## 1P-2p176 デジタル PCR によるサンゴ共生微生物由来 16S rRNA 遺伝子数の精密定量

○竹田 裕貴<sup>1</sup>, 細川 正人<sup>2</sup>, 西川 洋平<sup>1</sup>, 小川 雅人<sup>1</sup>, 伊藤 通浩<sup>1</sup>, 須田 彰一郎<sup>3</sup>, 中野 義勝<sup>4</sup>, 竹山 春子<sup>1</sup>  
 (1)早大・先進理工, (2)JST・さきがけ, (3)琉球大・理, (4)琉球大・熱帯生物圏研究セ)  
 haruko-takeyama@waseda.jp

サンゴには多種の微生物が相互関係を保持しながら共生し、その組成や絶対数は、海域環境や季節に伴って変化すると考えられ、サンゴ礁域の環境評価の指標の 1 つになる可能性がある。しかし、サンゴの抽出 DNA 試料中には PCR 阻害物質や多量の夾雑 DNA が存在するため、従来の qPCR では 16S rRNA 遺伝子数の正確な定量が困難であった。一方で、ドロップレットデジタル PCR (dPCR) では、標的遺伝子の絶対数をエンドポイントでデジタル計測する。反応効率に依存せず定量を行うため、サンゴ抽出 DNA においても高精度な定量が期待できる。そこで本研究では dPCR を用いてサンゴ共生微生物由来 16S rRNA 遺伝子数を定量することを検討し、その季節変動や地点間差を評価することを目的とした。

液滴形成用マイクロ流体デバイスは Polydimethylsiloxane (PDMS) を用いて作製した。シリジポンプを用いて PCR 反応液の液滴を連続形成し、流路から回収して PCR を行った。その後顕微鏡を用いて蛍光を示す液滴数をカウントし、標的遺伝子数に換算した。サンプルとして沖縄県瀬底島周辺の 3 地点においてサンゴ(ウスエダミドリイシ: *Acropora tenuis*) を定期採取し、その抽出 DNA を用いた。

結果、dPCR では、qPCR において正確な定量が不可能な阻害物質存在濃度域においても安定的な計測が可能であった。dPCR によりサンゴ共生微生物由来する 16S rRNA 遺伝子数の季節変動、地点間差が確認され、地点間差は最大約 25 倍となった。

dPCR は PCR 阻害物質に対する高い耐性があり、qPCR では計測不能なサンプルにおいても高精度に 16S rRNA 遺伝子数を定量することが出来た。本手法により、サンゴ共生微生物数に相当する情報をサンゴコロニー単位で追跡することが可能となった。共生微生物数の情報を環境要因や菌叢情報と合わせて評価することで、両者の関連性の詳細な理解につながると期待される。

### Accurate quantification of coral associated bacteria 16S rRNA gene by digital PCR

○Hiroki Takeda<sup>1</sup>, Masahito Hosokawa<sup>2</sup>, Yohei Nishikawa<sup>1</sup>, Masato Kogawa<sup>1</sup>, Michihiro Ito<sup>1</sup>, Shoichiro Suda<sup>3</sup>, Yoshikatsu Nakano<sup>4</sup>, Haruko Takeyama<sup>1</sup>  
 (1)Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., (2)PRESTO, JST, (3)Fac. Sci., Univ. Ryukyus, (4)Tropical Biosphere Res. Center, Univ. Ryukyus)

**Key words** droplet digital PCR, microfluidic device, coral associated bacteria, 16S rRNA

## 1P-2p177 ピコリットル容量の微小液滴を用いた単一微生物からの網羅的な全ゲノム増幅

○西川 洋平<sup>1</sup>, 細川 正人<sup>2,3</sup>, 小川 雅人<sup>1</sup>, 竹山 春子<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>早大院・先進理工・生医, <sup>2</sup>JST・さきがけ, <sup>3</sup>早大・ナノライフ創研)  
 haruko-takeyama@waseda.jp

Multiple Displacement Amplification (MDA)に代表される全ゲノム増幅法により、単一微生物を対象としたゲノム解析が可能となりつつある。しかしながら、従来までの単一細胞を対象とした全ゲノム増幅では、反応液中に混入した目的外DNAの増幅により反応が阻害され、ゲノム再構成時のカバー率が低下することが問題であった。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスを用いた微小液滴作製技術を応用し、単一細胞を包埋した液滴内にて全ゲノム増幅を行う手法の開発を行った。

PDMS (Poly(dimethylsiloxane))を用いて、内部に十字構造を配したマイクロ流体デバイスを作製した。液滴成分および分散媒であるオイルをデバイス内に導入し、ピコリットル容量の液滴を毎秒約700個の割合で連続生成可能とした。また、2種の液滴を毎秒200個の割合で融合させるシステムを開発し、単一細胞を包埋した液滴と全ゲノム増幅試薬を含む液滴との融合を可能とした。モデル微生物に大腸菌を用いて液滴内での増幅を行った結果、増幅反応後の液滴内でDNA結合色素由来の蛍光が確認された。蛍光を示した液滴を分取して2次増幅を行った後、次世代シーケンサーによる解析を行った結果、80%以上のカバー率が達成された。また、本技術により得られた増幅産物では、コンタミネーションDNAに由来する増幅産物の割合が、従来法に比べて抑制されることが判明した。さらに、複数種の細胞が混在する場合においても、個々の細胞を液滴内に個別に包埋することにより、ゲノム情報がクロスコンタミネーションすることなく増幅可能であることが明らかとなった。本技術を用いることにより、理論上10000個以上の細胞に対して一度に網羅的な全ゲノム増幅を行うことが可能となった。以上の結果から、本技術は環境中の微生物を対象とした網羅的な全ゲノム解析に応用が可能であると考えられる。

### Massively parallel whole genome amplification of single bacteria using picoliter-sized droplets

○Yohei Nishikawa<sup>1</sup>, Masahito Hosokawa<sup>2,3</sup>, Masato Kogawa<sup>1</sup>, Haruko Takeyama<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>PRESTO, JST, <sup>3</sup>Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ.)

**Key words** microfluidic device, whole genome amplification, single cell

## 1P-2p178 ヒト皮膚表面における発汗代謝物と微生物分布の可視化

○筒井 聡志<sup>1</sup>, 伊達 達博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>横浜市大院・生命医, <sup>2</sup>理研, <sup>3</sup>名大院・生命農学)  
 Jun.kikuchi@riken.jp

### 【背景・目的】

ヒトを対象としたメタボミクス研究では、侵襲性の低い尿や糞便といった試料が好んで用いられる。一方で血液から即時に産生・排出される汗はより短時間の代謝変動を捉えることが期待出来るが当該研究はほとんど行われていない。そこで本研究では汗に含まれる代謝物及び汗と密接な関係があることが知られている表在微生物叢の解析を行い、汗中代謝物と表在微生物の関係性からヒトの代謝動態を可視化することを試みた。

### 【実験】

複数人のボランティアから日時・採取部位の情報とともに提供された汗試料は、独自に最適化した分析プロトコルを用いてNMRメタボミクスならびに微生物叢解析を行った。多変量解析および相関解析では、得られたデータを数値化し、フリーの統計解析ソフトウェアであるRを用いた。

### 【結果】

NMRメタボミクスによる代謝物の一斉解析の結果、汗に含まれている代謝物として、有機酸やアミノ酸を中心とする25種類以上の物質を同時に検出することが可能であった。また、微生物叢についてはProteobacteriaやActinobacteriaを始めとした多くの菌種が存在し、足と腕、顔と首では似たような微生物プロファイルを示した。さらに、代謝物データ及び表在微生物叢のデータについて多変量解析および相関解析等を行うことで個体内変動や採取部位による違いなどを可視化し、両者の関係性を明らかにした。

### Visualization for sweat metabolites and microorganism distribution on human skin surface

○Satoshi Tsutsui<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Med., Lifesci., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>CSRS, RIKEN, <sup>3</sup>Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** metabolomics, data mining, microbiome, NMR

## 1P-2p179 センシング分子を最密充填状態で精密に整列固定化する二次元膜の開発

○飯嶋 益巳, 黒田 俊一  
 (阪大・産研)  
 skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

【背景】我々は、イムノセンサー表面にIgGを最密充填状態で整列固定化するために、Fc領域を固定してFv領域を放射状に提示するバイオナノカプセル(ZZ-BNC)を足場分子として開発した。ZZ-BNCは、各種バイオセンシング(QCM, SPR, ELISA, FIA等)の検出感度や抗原結合量を著しく改善すると共に、検出用IgGの使用量を著しく減らすことができた(飯嶋ら、生物工学会誌、93(2015)248-258)。最近では、ヒトIgG1Fc融合受容体によるリガンド分子の高感度検出にもZZ-BNCは有効であることが判明した。

【目的】ZZ-BNCの粒子構造は物理的ストレスに対して堅牢性が高く、センサー基板にドーム状に結合してIgGを整列化する。しかし、基板側のZZ-BNCを構成するZZ-Lタンパク質が無駄になり、基板表面から高さ数nm以内の相互作用を検出するSPRやエリブソメトリー等では、ドーム状構造の嵩高さ(約18nm)は不利であった。そこで本研究では、ZZ-Lタンパク質を基板上二次元膜に展開することを目指した。

【方法】ZZ-BNCを界面活性剤処理してZZ-Lミセル化しZZ-L提示二次元膜の作製条件を検討した。

【結果と考察】ZZ-BNCを5% Tween 80で処理すると、ドーム構造からZZ-Lミセル(高さ約0.4nm, 直径約10.0nm)に変化した。また、ZZ-Lミセルを基板上の脂質一重膜に接触させると、同ミセルはクラスターを形成しながら二次元膜に展開した。さらに、QCMやSPRイムノセンサーに使用すると、IgG結合量及び抗原結合量はZZ-BNCに比べて約4倍上昇した。しかし、1抗体分子あたりの抗原結合能は大きく変化しないことから、ZZ-L提示二次元膜は、ZZ-BNC同様にIgGの精密整列化を達成しつつ、ZZ-BNC以上にクラスター化を促進すると考えられた。

### Reconstituted planar ZZ-L membrane for the closest packed and oriented immobilization of sensing molecules

○Masumi Iijima, Shun'ichi Kuroda  
 (ISIR, Osaka Univ.)

**Key words** Bio-nanocapsule, planar membrane, closest packed, oriented immobilization

## 1P-2p180 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタによるセイヨウワサビペルオキシダーゼ測定法

○西矢 芳昭<sup>1</sup>, 坂井 華美<sup>1</sup>, 井原 弘絵<sup>1</sup>, 泊直宏<sup>2</sup>, 山本 佳宏<sup>2</sup>, 谷 敏夫<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>摂南大・生命科学, <sup>2</sup>京都市産技研, <sup>3</sup>バイオエックス)  
 nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景および目的】イオン感応型電界効果トランジスタ(ISFET)は化学反応で生じるプロトンの増減を直接電気信号として取り出すことができるため、幅広い種類の酵素反応の計測に応用できるバイオセンサとなり得る。ISFETの応用について数多くの研究がなされたが、際立った応用例は見当たらない。バイオセンサとするには感度が十分でなく、微小な変化に対応できないとされてきたからである。この点を改良するために、われわれは信号累積型ISFET(SA-ISFET)を開発した。これは、電荷がセンサ内に蓄積できるように改良されており、測定を瞬時に複数回繰り返してデバイス内に信号を累積させ、増幅した後信号を取り出す。これにより高感度バイオセンサとしての応用が可能になった。SA-ISFETは光路長を必要とする光学測定系を使用しないので装置の小型化に向いており、低コストで測定に高い技術力を必要としないといった数多くの特長を有している。今回、基礎分析や臨床検査にて多用されるセイヨウワサビペルオキシダーゼ活性測定を検討したので報告する。

【方法および結果】ペルオキシダーゼ反応で微量プロトン量の変化を伴う系として、2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)(ABTS)を用いるシンプルな測定法を考案した。本測定法のABTSをはじめとする試薬組成および測定条件を設定し、SA-ISFETにて信号累積回数10回での測定を実施した。結果として、ペルオキシダーゼ反応による過酸化水素の定量が可能なることを確認できた。25℃にて1~2分間のアッセイが可能であり、直線性も良好であった。通常のISFETとの比較では、10回の累積測定により大幅な感度向上が見られた。また、再現性についてもバイオセンサとして問題ないレベルであった。さらに、免疫検査における標識酵素検出系としての応用を確認することができた。

### An assay method for horseradish peroxidase using signal accumulation type of ISFET

○Yoshiaki Nishiya<sup>1</sup>, Hanami Sakai<sup>1</sup>, Hiroe Ihara<sup>1</sup>, Naohiro Tomari<sup>2</sup>, Yoshihiro Yamamoto<sup>2</sup>, Toshio Tani<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Life Sci., Setsunan Univ., <sup>2</sup>Kyoto Inst. Technol., <sup>3</sup>Bio-X)

**Key words** Peroxidase, Assay, Transistor, Signal accumulation

**1P-2p181 自然環境における気象変動と化学プロファイルの統合的データマイニング**

○伊達 康博<sup>1,2</sup>, 篠 阿弥宇<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
 (1)理研・CSRS, (2)横浜市院・生医, (3)名大院・生命農)  
 jun.kikuchi@riken.jp

人類は自然環境から多種多様な生態系サービスの恩恵を享受しており、持続的に利用・開発していくためにはその環境“恒常性”を維持することが重要である。そこで我々は環境恒常性評価技術の確立を目指し、多様な自然環境における有機・無機物質群や微生物叢などのプロファイリング技術を報告してきた[1-5]。本研究では、気温や降水量等の気象変動を考慮し、上記プロファイリング技術と組み合わせることにより、自然環境を総合的に評価可能なデータマイニング法について検討した。環境中より得られたサンプル中に含まれる有機物質は、水およびメタノール等の溶媒を用いて抽出し、NMR装置を用いて計測した。得られたNMRシグナルは、当研究室において開発されたSpinAssign[6]やSpinCouple[7]等のウェブプログラムを活用してアノテーションを行った。また、無機物質群については硝酸溶液を用いて抽出し、ICP装置で計測した。得られたデータを数値化・マトリクス化し、多変量解析等を用いて有機物・無機物のプロファイリングを行うことにより、時空間的特徴抽出が可能であった。本会では、時系列分析や機械学習等の手法を取り入れることにより、気象データの変動と関連付けられた表現型のデータや有機・無機プロファイリングデータを統合的に評価可能なデータマイニング法を中心に議論したい。

[References] (1) Ogura, et al. (2015) ACS Chem. Biol., 10, 1908 – 1915, (2) Yoshida, et al. (2014) Sci. Rep., 4, 7005, (3) Wei, et al. (2015) Anal. Chem., 87, 2819 – 2826, (4) Ito, et al. (2014) Anal. Chem., 86, 1098 – 1105, (5) Asakura, et al. (2014) Anal. Chem., 86, 5425 – 5432, (6) Chikayama, et al. (2010) Anal. Chem., 82, 1653 – 1658, (7) Kikuchi, et al. (2016) Anal. Chem. 88, 659 – 665.

**Data mining based on integration of climatic and chemical variations in natural environments**

○Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Amiu Shino<sup>1</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3</sup>  
 (1)RIKEN CSRS, (2)Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., (3)Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

**Key words** NMR metabolomics, multivariate analysis, machine learning, time series analysis

**1P-2p182 噴流圧力による培養細胞の力学特性評価**

○田中 信行<sup>1</sup>, 高原 順子<sup>1</sup>, 栗津 茜<sup>1</sup>, 春園 嘉英<sup>2</sup>, 那須 博光<sup>2</sup>, 田中 陽<sup>1</sup>  
 (1)理研・生命システム, (2)北川鉄工所)  
 nobuyuki.tanaka@riken.jp

【目的】 これまでに著者らは、対象物表面を覆う液体を気体噴流により一時的に除去した際の液体の振る舞いにより、表面の濡れ性を評価する非接触濡れ性評価法を開発し、培養細胞表面の濡れ性評価に成功している。本研究では、噴流圧力に対する培養細胞の力学的耐性を明らかにすることを目的としている。【方法】 細胞培養液として、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に仔牛血清を10 v/v%およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液を1 v/v%添加したものを調製した。マウス骨格筋芽細胞株C2C12を培養液でコンフルエントになるまで培養した。細胞がコンフルエントになった細胞培養ディッシュに一定量の10v/v% DMEMを注ぎ入れ、空気噴流を用いた液体除去を行った。【結果】 液体除去を行った際の空気噴流の圧力が90 kPaを超えた際に、培養細胞がディッシュ表面から剥離したことを確認した。【考察】 非接触濡れ性評価法においては、空気噴流の圧力は最大でも20 kPa程度であり、培養細胞は十分な噴流圧力耐性を有すると考えられる。今後、噴流に対する細胞障害性について解析を行う予定である。

**Mechanical property assessment for cultivated cells by flow pressure**

○Nobuyuki Tanaka<sup>1</sup>, Junko Takahara<sup>1</sup>, Akane Awazu<sup>1</sup>, Yoshihide Haruzono<sup>2</sup>, Hiromitsu Nasu<sup>2</sup>, Tanaka Yo<sup>1</sup>  
 (1)QBiC, RIKEN, (2)KITAGAWA IRON WORKS)

**Key words** tissue engineering, sensor, mechanical property, wettability

**1P-2p183 ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を用いたノロウイルスの迅速検出**

○竹村 謙信<sup>1</sup>, Adegoke Oluwasesan<sup>2</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>, 鈴木 哲朗<sup>3</sup>  
 (1)静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化, (2)静岡大グリーン  
 科技研, (3)浜医大・医・医学科)  
 park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】 ノロウイルスは毎年多くの感染者が確認されるウイルスである。主な感染経路はヒトからヒトへの接触感染であり、感染すると発熱、嘔吐、下痢及び腹痛が症状として現れ、極めてまれにはあるがけいれんを伴う小児例や脳症などのケースも報告され、高齢者や幼児に感染した場合、重症化の可能性がある。現在治療や予防薬として直接効果のある薬剤はなく、発症した場合も対症療法で対応せざるを得ない状況である。高齢化社会が進んでいる現代社会ではノロウイルスが与える社会的影響がより高くなりつつあり、感染の拡大を防ぐために、高感度かつ迅速な検出法が求められている。本研究では蛍光性半導体ナノ粒子(quantum dot, QD)と銀-金ナノ粒子(Ag-AuNP)を用いた局所表面プラズモン共鳴蛍光増強効果によるノロウイルスの迅速検出を試みた。

【方法・結果】 QD(CdTeSeS)をホットインジェクション法により作製した。アスコルビン酸を用いてAgNO<sub>3</sub>中に加えたHAuCl<sub>4</sub>を還元し、銀ナノ粒子表面上へロッド状の金ナノ粒子を配置したAg-AuNPを作製した。L-システインを修飾した2種のナノ粒子表面に抗 Genotype II Norovirus 抗体を1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)-N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS)を用いたEDC/NHSカップリングによってコンジュゲートし、NV14-QD、NV14-Ag-AuNPとした。この検出液に被験体ノロウイルス様粒子(NV VLP)を含む溶液を加え、それぞれ5分間反応させた後に蛍光強度を測定した(励起光450 nm、蛍光636 nm)。結果として、0.54 ng/mlを検出限界として、ウイルス濃度依存的な蛍光増強が確認できた。

**Rapid detection of Norovirus using localized surface plasmon resonance (LSPR)**

○Kenshin Takemura<sup>1</sup>, Oluwasesan Adegoke<sup>2</sup>, Enoch Y Park<sup>1,2</sup>, Tetsuro Suzuki<sup>3</sup>  
 (1)Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., (2)Res. Inst. Green Sci. Technol., (3)Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

**Key words** Quantum dots, Ag-AuNPs, Norovirus, detection

**1P-2p184 Alloyed L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS quantum dots of two internal structures**

Oluwasesan Adegoke, ○Enoch Y. Park  
 (Res. Inst. Green Sci. Technol.)  
 park.enoch@shizuoka.ac.jp

The development of alloyed quantum dot (QD) nanocrystals with attractive optical properties for a wide array of chemical and biological applications is a growing research field. In this work, size-tunable engineered band gap composition-dependent alloyed and fixed-composition alloying were employed to fabricate new L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS QDs exhibiting different internal structures. Lattice parameters simulated based on powder X-ray diffraction (PXRD) revealed the internal structure of the composition-dependent alloyed Cd<sub>x</sub>Zn<sub>y</sub>TeS QDs to have a gradient nature, whereas the fixed-composition alloyed QDs exhibited a homogenous internal structure. Transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) analysis confirmed the size-confined nature and monodispersity of the alloyed nanocrystals. The zeta potential values were within the accepted range of colloidal stability. Circular dichroism (CD) analysis showed that the surface-capped L-cysteine ligand induced electronic and conformational chiroptical changes in the alloyed nanocrystals. The photoluminescence (PL) quantum yield (QY) values of the gradient alloyed QDs were 27-61%, whereas for the homogenous alloyed QDs, the PL QY values were spectacularly high (72-93%). Our work demonstrates that engineered fixed alloying produces homogenous QD nanocrystals with higher PL QY than composition-dependent alloying.

**Alloyed L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS quantum dots of two internal structures**

Oluwasesan Adegoke, ○Enoch Y. Park  
 (Res. Inst. Green Sci. Technol.)

**Key words** Quantum dots, nanocrystal, quantum yield

## 1P-2p185 抗体相補性決定領域に基づいた揮発性爆発化合物の特異的ペプチドプローブの開発

○武藤 正記<sup>1,2</sup>, 矢内 健太郎<sup>1,2</sup>, 田中 祐圭<sup>1,2</sup>, 上田 宏<sup>3</sup>,  
Wang Jin<sup>2,4</sup>, 小野寺 武<sup>2,4</sup>, 都甲 潔<sup>2,5</sup>, 大河内 美奈<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東工大・物質理工, <sup>2</sup>JST・ImPACT, <sup>3</sup>東工大・化学生命科学研究,  
<sup>4</sup>九大・味覚・嗅覚センサ研究開発セ, <sup>5</sup>九大院・シス情)  
okochi@chemeng.titech.ac.jp

**【背景と目的】**揮発性を示す 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) は代表的な爆発性化合物であり、爆発物のマーカー分子として簡便な計測が求められており、対象化合物を特異的に認識する分子プローブを検出部に修飾したセンサの開発が進められている。合成ペプチドは低分子で安定性が高く、デザイン性の高い分子プローブとして着目されているが、特異性の高いペプチドの報告は少なく課題が残されている。本研究では、抗体のアミノ酸配列を解析し、得られた抗体の相補性決定領域 (CDR) の配列に基づいた特異性の高い爆発性化合物認識プローブの開発を目指した。

**【方法】**抗 TNT 抗体産生ハイブリドーマ細胞から Total RNA を抽出し、RACE 法により増幅した目的遺伝子断片のシーケンス解析を行った。得られた CDR のアミノ酸配列をセルロースメンブレン上にスポット合成したペプチドアレイを用いて 2,4,6-trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanine conjugate (TNP-KLH) との結合アッセイを行った。結合量が高いことが示された CDR 配列に基づいてペプチドライブラリーを複製し、結合量が高いペプチド配列を検討した。競合結合法により取得したペプチドプローブの特異性について評価を行った。

**【結果】**化合物選択性の高い TNT 認識プローブの開発を目的とし、CDR のアミノ酸配列をリード配列とした TNT 認識ペプチドの設計を行った。シーケンス解析により得られた CDR 配列から最も結合力の高い配列として 14 残基の重鎖 CDR3 を取得した。選抜した重鎖 CDR3 の断片化解析を行った結果、C 末端の 2 残基を消去した配列において、結合量が 1.85 倍に増加した。さらに、競合結合法により類似物質である硝酸アミル及びトルエンに対して特異性を示すことが示された。以上の結果から、本手法により揮発性化合物に対して特異性を示すペプチドプローブの設計が可能であることが示された。

### Development of volatile explosive specific peptide probe based on complementarity determining region

○Masaki Muto<sup>1,2</sup>, Kentaro Yanai<sup>1,2</sup>, Masayoshi Tanaka<sup>1,2</sup>, Hiroshi Ueda<sup>3</sup>,  
Jin Wang<sup>2,4</sup>, Takeshi Onodera<sup>2,4</sup>, Kiyoshi Toko<sup>2,5</sup>, Mina Okochi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Chem. Tech., Tokyo Tech, <sup>2</sup>ImPACT, JST, <sup>3</sup>Lab. Chem. Life Sci.,  
Tokyo Tech, <sup>4</sup>R&D TAOS, Kyushu Univ., <sup>5</sup>Grad. Sch. Sci. Electrical Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** peptide probe, volatile explosive, anti-TNT antibody, complementarity determining region

## 1P-2p186 DNA staining nanoparticles for nucleus imaging

○Chi-Hsien Liu, Min-Han Tsao, Soubhagya Laxmi Sahoo  
(Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Uni)  
chl@mail.cgu.edu.tw

Monitoring DNA events in the nucleus continues to draw wide interest among researchers since the need of understanding biological mechanisms. However, the problems like limited diffusion rate and fluorescence quenching in the cytosols have to be overcome. Herein, magnetic nanoparticles (MNPs) were modified with fluorescent dye via covalent conjugation. The prepared MNPs were characterized by fluorescence spectrometry, transmission electron microscopy, Fourier transform infrared and photon correlation spectrometry to verify their optical and chemical properties. The effects of various parameters such as pH effect, salt effect and contact time on the adsorption isotherms of single strand DNA and plasmid DNA were investigated to understand the mechanism. The nucleus of human embryonic kidney cells and rabbit corneal epithelial cells could be labeled within 1 minute. The modified MNPs exhibited bright fluorescence and retained good magnetic properties. Biocompatibility assay revealed that the MNPs were low toxic and suitable for biomedical application. The chromosome adsorption phenomenon could be explained by using the Langmuir isotherm. Both the adsorption of ssDNA and pDNA on the MNPs obeyed the pseudo-second order kinetic model. Cellular imaging assay of the nanoparticles in two mammalian cells showed their excellent DNA targeting and chromosome imaging. The advantages such as the fluorescence and specific DNA adsorption made the MNPs promising for fluorescent labeling.

### DNA staining nanoparticles for nucleus imaging

○Chi-Hsien Liu, Min-Han Tsao, Soubhagya Laxmi Sahoo  
(Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Uni)

**Key words** nanoparticles, nucleus labeling, DNA separation, imaging

## 1P-2p187 イメージング質量顕微鏡の食品科学への応用

○新聞 秀一  
(阪大院・工)  
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

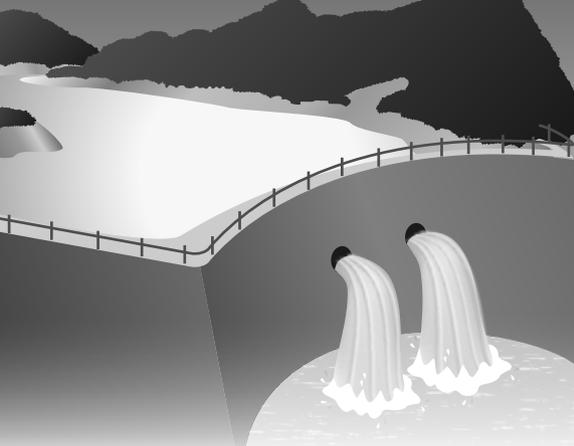
イメージング質量顕微鏡は、質量分析による試料表面の成分分析から様々な分子が可視化できるツールとして注目されている。その応用範囲は動物組織を用いた医学・生物学分野以外に広がり、食品においても「ある成分がどこに・どれだけ分布しているか」を知ることが可能である。このように、新たな技術を新たな分野へ適用することで、今後新たな視点が提供される期待がある。現在、その可能性を十分に有しているイメージング質量顕微鏡であると思うが、食品分野における応用例は報告も含め非常に少なく、どのような分子が見えてくるのかということについて議論されることも少ない。本ポスターでは、イメージング質量顕微鏡を食品分野に応用するにあたり、試料前処理法の工夫からデータ解釈までの一連の流れについて紹介し議論したい。

### Feasibility study of imaging mass microscope for food analysis

○Shuichi Shimma  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** mass microscope, imaging mass spectrometry





# 9月29日 (木)

## 受賞講演 (13:00 ~ 13:20)

富山国際会議場 3階 A会場 (メインホール) / ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C,D,E会場

### 〈生物学奨励賞 (江田賞) 受賞講演〉

受賞者 伊藤 考太郎 (キッコーマン)

しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来のグルタミナーゼに関する研究

2A-Ap01 p. 141

### 〈生物学奨励賞 (斎藤賞) 受賞講演〉

受賞者 松浦 友亮 (阪大院・工)

セルフリータンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の開発

2A-Ep01 p. 141

### 〈生物学奨励賞 (照井賞) 受賞講演〉

受賞者 河原 正浩 (東大院・工)

キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用

2A-Cp01 p. 142

### 〈生物学アジア若手賞受賞講演〉

受賞者 Choowong Auesukaree (Mahidol University, Thailand)

“Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants”

2A-Dp01 p. 142

**シンポジウム・招待講演（午前 9:00 ～ 11:00/11:30, 午後 13:30 ～ 15:30）**  
 富山国際会議場 3 階 A 会場, 2 階 B 会場 / ANA クラウンプラザホテル富山 3 階 C, D, E 会場

午 前

|  |                              |             |
|--|------------------------------|-------------|
| 学会活動が先導する実用化研究・技術～学会は産官学の出会いの場となれるか～   | 2S-Aa01 ～ 2S-Aa04            | p. 143      |
| 植物代謝工学研究最前線～新産業創出に向けて～   | 2S-Ba01 ～ 2S-Ba05            | p. 145      |
| Artificial Molecular Design to Create “Neobiological Molecules”<br>協賛：AMED「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」          | 2S-Ca01 ～ 2S-Ca07 ( ～ 11:30) | p. 147      |
| 〈招待講演（韓国生物工学会）〉  | (2S-Ca04, 2S-Ca07)           | p. 149, 150 |
| Japan-Korea Joint Symposium<br>“Advancements in Medical Engineering Using Nano- and Micro-biotechnology” | 2S-Da01 ～ 2S-Da07 ( ～ 11:30) | p. 151      |
| 〈招待講演（韓国生物工学会）〉  | (2S-Da07)                    | p. 154      |
| 新規な核酸関連酵素の開発とその産業応用  | 2S-Ea01 ～ 2S-Ea06            | p. 154      |

午 後

|  |                                   |                  |
|--|-----------------------------------|------------------|
| 有用微生物の農作物への新しい展開とその将来像                       | 2S- Ap01 ～ 2S- Ap04               | p. 157           |
| バイオエンジニアリングにおける分析科学の新たな展開<br>〈招待講演（韓国生物工学会）〉 | 2S- Bp01 ～ 2S- Bp05<br>(2S- Bp02) | p. 159<br>p. 160 |
| 2D/3D プリンタを用いる細胞操作の可能性                       | 2S- Cp01 ～ 2S- Cp06               | p. 162           |
| 10th Japan-Korea Biomass Symposium           | 2S- Dp01 ～ 2S- Dp04               | p. 165           |
| 微生物の潜在能力に注目した有用二次代謝産物の「ものづくり」戦略              | 2S- Ep01 ～ 2S- Ep05               | p. 167           |

**一般講演 ポスター掲示時間（10:00 ～ 18:00）**

ポスター会場 I：富山国際会議場 2 階

ポスター会場 II：ANA クラウンプラザホテル富山 3 階 ASUKA

|                    |                |        |
|--------------------|----------------|--------|
| 酵素学, 酵素工学          | 2P-1p001 ～ 015 | p. 169 |
| タンパク質工学            | 2P-1p016 ～ 027 | p. 173 |
| 抗体工学               | 2P-1p028 ～ 037 | p. 176 |
| 発酵生理学, 発酵工学        | 2P-1p038 ～ 054 | p. 178 |
| 代謝工学               | 2P-1p055 ～ 068 | p. 183 |
| 醸造学, 醸造工学          | 2P-1p069 ～ 082 | p. 186 |
| 食品科学, 食品工学         | 2P-1p083 ～ 099 | p. 190 |
| 環境浄化, 修復, 保全技術     | 2P-1p100 ～ 113 | p. 194 |
| バイオマス, 資源, エネルギー工学 | 2P-1p114 ～ 131 | p. 197 |
| 生物化学工学             | 2P-2p132 ～ 140 | p. 202 |
| バイオプロセス            | 2P-2p141 ～ 150 | p. 204 |
| セル&ティッシュエンジニアリング   | 2P-2p151 ～ 180 | p. 207 |
| 核酸工学               | 2P-2p181 ～ 183 | p. 214 |
| 糖鎖工学               | 2P-2p184 ～ 187 | p. 215 |

**2A-Ap01** しょうゆ醸造に寄与する麹菌由来のグルタミナーゼに関する研究

○伊藤 考太郎  
(キッコーマン)  
koito@mail.kikkoman.co.jp

グルタミナーゼは、グルタミンをグルタミン酸とアンモニアに加水分解する酵素である。グルタミン酸はしょうゆにおいて中心的な役割を果たす旨味成分である。しょうゆ中のグルタミン酸は、以下2つの経路から作られると考えられている。すなわち、(1)原料タンパク質が麹菌のタンパク分解酵素によってアミノ酸にまで分解され、原料タンパク質中に含まれるグルタミン酸が直接遊離する経路、(2)原料タンパク質の分解によって生じたグルタミンがグルタミナーゼによってグルタミン酸へと変換される経路である。麹菌由来のグルタミナーゼ活性としょうゆ調味中のグルタミン酸量との間に正の相関が見られることから、しょうゆ醸造では、麹菌由来のグルタミナーゼが重要であると古くから考えられていた。しかし、麹菌由来のグルタミナーゼは、生産量が低く、菌体に結合しており、かつ、麹菌がプロテアーゼを大量に生産するため酵素精製がとても困難であり、タンパク質側からしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを探すアプローチは難しい状況にあった。そこで、ゲノム情報を活用し、真にしょうゆ醸造に寄与するグルタミナーゼを遺伝子側から明らかにするアプローチで研究を行った。

○酵母由来の耐塩性グルタミナーゼ遺伝子の単離  
しょうゆ醸造では麹菌由来のグルタミナーゼが重要視される一方で、麹菌由来のグルタミナーゼは、耐塩性に乏しいことが知られており、しょうゆ醸造に適した耐塩性グルタミナーゼの開発も求められていた。我々は様々な微生物から耐塩性グルタミナーゼをスクリーニングした結果、*Cryptococcus* 属酵母にその活性を見出した。そのグルタミナーゼを精製し、部分アミノ酸配列を基に遺伝子を単離した。その結果、*Cryptococcus* 属酵母由来のグルタミナーゼは、既知のグルタミナーゼと相同性が低く、新しいタイプのグルタミナーゼ (Gah) であることが明らかになった。

○麹菌グルタミナーゼ遺伝子の探索、破壊株の作製およびそれを用いたしょうゆの試験

2005年に麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40株の、2011年には麹菌 *A. sojae* NBRC4239株のゲノム情報が明らかとなった。そこで、それらのゲノム配列情報を用いて、他生物種由来の既知グルタミナーゼと相同性のある遺伝子を探索した結果、麹菌 *A. sojae* のゲノム配列中には、上述の新しいタイプのグルタミナーゼ(Gah)を含め、10個のグルタミナーゼ遺伝子が存在することが判明した。これらの遺伝子の中からしょうゆ醸造でのグルタミン酸生成に寄与している真のグルタミナーゼを明らかにすることを目的に *A. sojae* を宿主として単独または多重遺伝子破壊株を作製し、それら破壊株を用いたしょうゆの試験醸造、さらに精製酵素による酵素化学的検討を行い、下記の結果を得た。

- (1) しょうゆ醸造でグルタミン酸生成に寄与するグルタミナーゼは、基質特異性の異なる4つのグルタミナーゼ (GahA, GahB, GgtA, Gls) であり、そのうち GahA, GahB, Gls は、ゲノム情報が開示されて初めて見出されたグルタミナーゼであった。
- (2) 麹菌のグルタミナーゼとして初めて報告された GtaA はしょうゆ醸造では効果が無く、グルタミナーゼ活性を持つタンパク質が必ずしもしょうゆ醸造で機能するとは限らなかった。
- (3) Gls は菌体内酵素であった。最も効果は小さかったが、しょうゆ醸造において菌体内酵素が作用することを初めて実証した。
- (4) 高グルタミン酸含有のしょうゆを得るには、我々が見出した *Cryptococcus* 属酵母由来の新規なグルタミナーゼ(Gah)と相同性の高い GahA または GahB が必須であった。
- (5) 精製酵素による機能解析の結果、GahA または GahB は、調味中で作用するのに適した性質(耐塩性や低い至適 pH など)は無かったが、遊離のグルタミンだけでなく、ペプチドのC末端に位置するグルタミンにも作用するペプチドグルタミナーゼ活性を有する特徴的なグルタミナーゼであった。*Cryptococcus* 属酵母由来の Gah もペプチドグルタミナーゼ活性を持つことを同時に明らかにし、ペプチドグルタミナーゼ・アスパラギナーゼ遺伝子として初めて同定した。
- (6) しょうゆのグルタミン酸の生成が従来考えられていた2つの経路からだけではなく、ペプチドの状態グルタミン酸に変換され、その後、ペプチダーゼにより遊離される第3の経路が存在すること、しょうゆ醸造でグルタミン酸量が高めるにはこの第3の経路が重要であることを明らかにした。

しょうゆ醸造においてより旨味を増強するために、ペプチドグルタミナーゼ活性の高い麹菌を育種することが有効であると考えられる。

**Studies on glutaminase of koji mold, which are involved in glutamate production during soy sauce fermentation.**

○Kotaro Ito  
(Kikkoman Corp.)

**Key words** *Aspergillus sojae*, soy sauce, glutaminase, L-glutamate

**2A-Ep01** セルフリータンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の開発

○松浦 友亮  
(阪大院・工)  
matsuura\_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

セルフリータンパク質合成系は、生細胞を用いないため界面活性剤や脂質存在下などの環境で、様々な人工鋳型(終止コドンレス RNA、ピューロマイシン修飾された RNA など)を用いてタンパク質合成が行える柔軟性を有する。これらの特性を利用し、種々の *in vitro* タンパク質進化工学的法が開発されてきた。一方、従来法は可溶性タンパク質のみを対象とし、一般に不溶性でありかつ、会合体を形成する膜タンパク質を対象とすることは難しかった。我々は、これまでに構築した高効率無細胞翻訳系、細胞サイズリボソーム内タンパク質合成技術を用い膜タンパク質をディスプレイする技術を再構成型セルフリータンパク質合成系と細胞サイズのリボソームを用いて構築し、これをリボソームディスプレイ法 (Liposome display) 法と名付けた。加えて、本手法が複数の異なる膜タンパク質の進化分子工学に適用可能であることを示した。本発表では、リボソームディスプレイ法とこれを用いた構築のアプローチ研究について紹介する。

***In vitro* evolution of proteins using cell-free protein synthesis system**

○Tomoaki Matsuura  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *in vitro* coupled transcription/translation, *in vitro* molecular evolutionary engineering

## 2A-Cp01 キメラ受容体による細胞運命制御系の構築とライブラリー選択への応用

○河原 正浩  
(東大院・工)  
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

近年、細胞の医療応用分野においては、iPS細胞の開発が契機となり、各種多能性幹細胞を利用した再生医療や遺伝子治療が大きくクローズアップされている。今後、バイオ産業や医療応用として展開するための課題として、治療用の細胞を医療経済的な観点も含めて効率的に調製する技術、および安全な遺伝子治療や再生医療を実現するために、移植する細胞の運命を生体外および生体内において自在に制御する技術が必要とされており、まさに生物化学工学的な視点から求められている。一方、抗体医薬や蛋白質間相互作用を標的とした創薬が近年注目されており、医療応用に有用な分子を簡便にスクリーニングできる手法の開発が求められている。

そこで本研究では、動物細胞表面に発現しており、細胞の運命を制御することが知られているサイトカイン受容体に着目し、サイトカイン受容体を工学的に改変することで特定の細胞の運命だけを選択的に制御することを考えた。まず、サイトカイン受容体のリガンド結合部位である細胞外領域を一本鎖抗体で置換し、元の受容体が認識するリガンドとは全く異なる人工的なリガンド(抗原)を認識させて情報伝達を行うという、いわば「細胞運命のスイッチ素子」を考案した。本研究における最大の特徴は、多様性を持つ抗原-抗体反応をベースとしている点であり、種々の抗原に応答するキメラ受容体を合理的にデザインできれば、増殖・分化・遊走・死などの多様な運命シグナル伝達系を複数の抗原を用いて自由に制御できる可能性がある。また、抗原として安価な物質を選べば、高価なサイトカインを用いずに目的細胞を医療経済的にも達成可能なレベルで調製する技術にもなりうる。

本技術の医療応用への大きな課題として、1)治療用細胞に近い初代培養細胞での適用、2)他の受容体ファミリー分子への適用、3)増殖以外の細胞運命の制御、が挙げられた。1)の課題に関しては、IL-2受容体(IL-2R)キメラを用いてマウス脾臓由来T細胞の増殖を、トロンボポエチン受容体(c-Mpl)キメラを用いてマウス骨髄由来造血幹細胞の増殖をそれぞれ促進することに成功し、株化細胞のみならず生体から取得した初代培養細胞にも適用できることを示した。また、2)の課題に関しては、受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する上皮成長因子受容体(EGFR)、マクロファージコロニー刺激因子受容体(c-Fms)、幹細胞因子受容体(c-Kit)、インシュリン受容体(IR)を用いたキメラ受容体を構築し、いずれも抗原依存的な増殖シグナルを伝達することを示した。この後に詳しく述べる Fas, Rank も含めると、3つの受容体ファミリーの計10種類の受容体のシグナル伝達を模倣可能であることを示した。さらに、3)の課題に関しては、c-Fms, c-Mpl キメラ受容体を用いて、抗原依存的な細胞遊走、および細胞運動制御に成功し、細胞死誘導受容体である Fas を用いたキメラ受容体によって、抗原添加によりがん細胞を細胞死誘導することにも成功した。また、増殖・死誘導型キメラを組み合わせて、増殖から死へ細胞運命を変換するユニークな系も実証した。さらに、破骨細胞分化に関わる受容体 Rank を用いたキメラ受容体をマクロファージ細胞株で発現させ、抗原依存的に破骨細胞への分化を促進することができた。従って、本研究の手法を用いて適切な受容体をエンジニアリングすることによって、増殖のみならず、遊走・死・分化の運命制御が可能であることを示した。

これらの成果を基に、細胞運命を指標としたスクリーニング系への応用を指向した研究も進めた。具体的には、増殖誘導型キメラ受容体の抗体部分をライブラリー化したキメラ受容体を発現させ、目的抗原存在下で増殖した細胞を得ることで抗原結合性抗体を選択する系の実証にも成功した。この成果は、動物細胞の増殖を指標としたユニークな抗体選択系であり、キメラ受容体を細胞質で発現させることにより細胞内抗体(intrabody)も簡便に取得できることも示した。また、受容体を抗体以外の蛋白質と融合したキメラを構築することで、細胞内での様々な蛋白質間相互作用の検出法やスクリーニング系への応用へと系を発展させつつある。今後、疾患関連蛋白質を標的とした蛋白質間相互作用阻害剤あるいは阻害ペプチド探索と、疾患医療への応用が考えられる。以上より、本研究の手法は、今後の再生医療や創薬開発に大きく貢献する生物化学工学的な基盤技術になると考えられる。

### A cell fate controlling system using chimeric receptors and its application to library screening

○Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** chimeric receptor, cell fate control, library selection

## 2A-Dp01 Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants

○Choowong Auesukaree<sup>1</sup>, Chuenchit Boonchird<sup>2</sup>, Satoshi Harashima<sup>3</sup>, Prayad Pokethitiyook<sup>1</sup>, Maleeya Kruatrachue<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biol., Fac. Sci., Mahidol Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotechnol., Fac. Sci., Mahidol Univ., <sup>3</sup>Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)  
choowong.aue@mahidol.ac.th

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has long been used in industrial ethanol production. During ethanol fermentation, yeast cells are simultaneously exposed to multiple stresses, such as high ethanol concentration, high osmotic pressure, and temperature fluctuations, which affect cell growth and viability. The understanding of molecular mechanisms required for tolerances to these stresses present during fermentation is important for successful engineering of multiple-stress resistant yeast strains, which is desirable for efficient bioethanol production. Our genome-wide study revealed that vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, which is currently known to function in maintenance of intracellular pH, is important for tolerance to several alcohols including ethanol. However, we showed that a role for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the regulation of the cell wall stress response and the prevention of endogenous oxidative stress, rather than in the intracellular pH homeostasis, is important for protecting yeast cells against ethanol stress. In addition, we found that Cu/Zn-superoxide dismutase and trehalose metabolic enzyme were required for tolerance to various stresses tested, suggesting their roles in conferring multiple-stress tolerance. Furthermore, the studies in thermotolerant *S. cerevisiae* strains suggest the roles of protein quality control system and energy metabolism in thermotolerance. In another aspect, *S. cerevisiae* is widely used as an ideal eukaryotic model organism for biological research. We used *S. cerevisiae* to investigate the toxicity of environmental pollutants such as pesticides and heavy metals. The effects of alachlor, a commonly used herbicide, on protein denaturation, induction of oxidative stress, and disturbance of cell wall and membrane integrities were explored. Moreover, we also showed the protective action of water-soluble extract from leaves of *Moringa oleifera* Lam., one of the most widely used medicinal plants, against cadmium toxicity through the reduction of intracellular reactive oxygen species and the inhibition of cadmium uptake. In conclusion, we believe that the better understanding of mechanisms underlying adaptive stress responses provides important information required for improving stress-tolerance trait of not only yeast but also the other organisms, which is desirable for increasing production yield of a number of beneficial biological products.

### Molecular mechanisms underlying yeast adaptive responses to environmental stresses and pollutants

○Choowong Auesukaree<sup>1</sup>, Chuenchit Boonchird<sup>2</sup>, Satoshi Harashima<sup>3</sup>, Prayad Pokethitiyook<sup>1</sup>, Maleeya Kruatrachue<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biol., Fac. Sci., Mahidol Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotechnol., Fac. Sci., Mahidol Univ., <sup>3</sup>Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

**Key words** stress response, ethanol fermentation, pollutant, *Saccharomyces cerevisiae*

## 2S-Aa01 ものづくり系工学会での産官学連携

○辻川 正人  
(阪府大・URAセ)  
masatot@mtr.osakafu-u.ac.jp

1. イノベーションの創出  
イノベーションがなければ日本は立ち行かない。GDPの20%近くを輸入している国として、そのための資金を得るために輸出が必要であり、多種多様なものを輸出して貿易収支はほぼ差引ゼロ。輸出額の最も多いのが自動車で全体の20%程度であるというのが基本的な現在の我が国の経済である。我が国は、原料を輸入して製品として輸出する加工貿易が宿命で、それは明治の開国当時から変わりようがない。厳しい国際競争に負けるわけにはいかない。加工技術、すなわち工業の高度化を進め続けなくてはならない。これからも自動車産業には期待するし、我が国最大手では今期の開発予算に2兆円を超す開発予算を準備しており、これまで以上の成果も期待できる。しかし、いつまでも自動車が日本を代表する商品であり続けるとはいえない。第5期科学技術計画のいう大変革時代には間断のないイノベーションの創出が求められる。

2. 産学連携の現実  
イノベーションの創出には産学連携が必須と考えられ、それはオープンイノベーションの一環として活発に議論されるようになる。平成14年、内閣府が産学官連携促進会議を発足させ、平成24年までに11回の会議を行った。平成16年からはイノベーションジャパン(大学見本市)と同時開催で大学シーズの売込みなど活発な産学連携促進活動が進められている。助成金や補助金などの産学連携促進のための多額の投資について、その評価が文部科学省と経産省の合同で進められた。平成25年度には産学連携評価モデルが多くの大学から提案され検証された。これらによって国主導の産学連携がこれほど実績の少ないものであったかが明らかとなった。

3. オープンイノベーション  
地球規模で最先端の技術や知識を組み合わせることにより、新たな価値を生み出すとするオープンイノベーションの高まりは、従来の学術的技術シーズ提案型の産学連携に加えて、課題解決型の産学連携モデルの重要性が高まることを示唆している。資源に乏しい我が国が培ってきた様々な先端技術を活かした課題解決型の産学連携を進めることにより、科学技術の成果を世界に向けて発信することは、我が国に期待される大きな役割であり、同時にそれが我が国の成長の糧であるとする産学官連携促進会議の示すところに間違いはない。しかし、実際にオープンイノベーションと呼ばれているものは、元請けが下請けに作って欲しいものを作らせることができなくなっているという現実での大企業の悲痛な叫びでもある。長いデフレの後、これまでのように元請けには下請けと一緒に技術を開発していただけるものづくりの技術者がいなくなり、世界の部品を作る技術を持つ下請けも元請けの要求をものづくりに翻訳することができなくなっている。

4. 産学連携に果たす学会の役割  
現在、内閣府がまとめ役となり省庁の垣根を取り払った形でのSIP(戦略的イノベーション創成プロジェクト)が進められている。そこでは次世代の日本の経済活動を支えるべき産業が10の課題としてあげられている。1.革新的燃焼技術、2.次世代パワーエレクトロニクス、3.革新的構造材料、4.エネルギーキャリア、5.次世代海洋資源調査技術、6.自動走行システム、7.インフラ維持管理・更新・マネジメント技術、8.レジリエントな防災・減災機能の強化、9.次世代農林水産業創造技術、10.革新的設計生産技術である。日本は技術で生きていかねばならないということがあらためて示されている。これらのうちの幾つか、30年後にも現在の日本車が担っている基幹産業としての責任を分担できるようにならなければならない。課題が示されていて産学連携による共同開発が求められている。多様な高度技術を持つ多くの企業がある。しかし、これらをイノベーションとして展開していけなくては意味がない。まとめ役は大企業であるのか。少なくとも経済産業省が描いているイノベーションのイメージは大企業から出てくるものではない。グローバルニッチトップ企業が創出すべきものである。大企業が扱えないニッチ市場である我が国でトップであるならグローバル展開できるといふイメージである。産学が顔をあわせる場として、学会に求められている役割はここにある。ものづくり系工学会として、材料を対象とする鉄鋼協会や金属学会、さらにより技術に特化した鍛造工学会や熱処理技術協会などは、多くの会員の所属は企業である。例えば日本鍛造工学会の正会員のうち85%の所属が企業である。春夏の大会だけでなく、いくつもの技術開発指向の研究会が産学連携で組織され運営されている。これらから国の大型公募に向けての共同開発グループが形成されていく。太平洋戦争後70年、敗戦の焼け野原から立ち上がった日本の工業力は1979年にはジャパン・アズ・ナンバーワンと評されるまでになった。しかし、1990年のバブル崩壊、その後の失われた20年や30年と言われるデフレ時代を生き延びた企業はそのこと自体が高い技術と生産性を持っている証拠である。日本は問わずも贅肉がそぎ落とされた強靱な産業構造を持つに至ったともいえる。オール日本でイノベーション創出への準備は整っている。学会のやるべきことは多い。

## Promotion of Industry-Government-Academia Cooperations at some Engineering Societies

○Masato Tsujikawa  
(Res. Admin. Cen., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** Joint development, cooperation with industry

## 2S-Aa02 バイオテクノロジーは地域産業に変革をもたらすか!!

○山本 佳宏  
(京都市産技研 バイオ)  
qyamay@tc-kyoto.or.jp

我が国では微生物を利用した様々な食品が生産されている。日本酒、醸造酢、漬物、味噌、醤油のような大規模工場スケールで生産されるメジャーな製品から地域の農林水産物を巧みに利用して地場企業で生産される地域特異性の高い食材、食品まで多くのバリエーションが存在する。食品産業は地域の農林水産業と密接に連携し、地方における独創的なものづくり産業として、地域経済でも大きな部分を占めている。醸造製品・食品を製造する中小企業の多くは、技術者の経験を基盤として製造担当者の伝承により製造がおこなわれてきた。一次産業従事者の減少やバブルとその崩壊による経済の混乱中、多くの企業の淘汰と再編が行われているが、地域の消費に支えられた企業の中には、コンビニエンスストア、ネット販売等の流通の変革の波に乗り、独自の販路を獲得した企業も多数存在する。また、最近では海外からのインバウンドの波に乗り、その需要を急激に拡大している例もあり、今後の海外需要が定着することで大きなビジネスチャンスをつかむ可能性も見えている。

地域産業の中核となる中小食品メーカーでは、「安全で」、「おいしく」、「特徴的」、「低コスト」な製品を求めており、加えて、流通システムへの対応として、「賞味期限の長期化」にも取り組んでいる。「安全」においては多くの製造現場では微生物、小動物の対策を高度化し、製品の微生物検査などの対策を行うことで対応を行っている。しかしながら、現在の検査は寒天平板培地を用いた分析手法であり、ジャストオンタイムの流通システムと、24時間以上を要するこの分析手法では対応できなくなっている。「おいしさ」においては、市場の嗜好に合った製品を逸早く開発し、販路を確保することで、日常生活の変化、特に食生活の洋風化に伴い、食品の嗜好も大きく変化している。バブル以後の4半世紀で、伝統的な食品も減塩化、弱酸性、無臭化など嗜好も大きく変化し、醸造製品の代表である清酒においても燗酒中心から冷酒へ変化が進み、特に特定名称酒と呼ばれるプレミアム商品の需要が伸びている。このカテゴリは冷酒中心の商品展開であり、製品に求められる特性も燗酒を中心としていたころとは全く異なるものになっている。

一方、バイオテクノロジーの進歩は著しく、微生物資源の取集においては10万株を超える微生物ライブラリーが構築され、醗酵産業の基盤が整備され、また、多種の微生物のゲノムシークエンスが明らかにされ、遺伝子と対応するタンパク質の機能、その代謝ネットワークについても徐々に明らかにしつつある。食品のおいしさは味覚、臭覚に作用する代謝成分に大きく依存しており、特に醗酵製品においては原料に含まれる成分を微生物によってより好ましい代謝物として回収することに他ならない。バイオテクノロジーの進歩とそれを支える分析技術は従来の分析方法では解析できなかった微量成分、例えばオプフレバーやジペプチド、トリペプチドのような類似性の高い有機化合物の分離定量も可能になり、食品としての品質向上、というより、より市場の要求に沿った「特徴的な」製品を醗酵工程の制御により作り出すことも夢ではなくなってきた。

今回は、地域の取り組みのケーススタディとして、平成14年度より進めてきた京都市バイオシティ構想での取り組みと平成26年度より進める京都ライフイノベーション推進戦略の中で取り組み微生物を利用した地域産業の支援について紹介する。

京都市では経済産業省から支援を受け、平成16年に京都バイオ計測プロジェクトを立ち上げ、産学官連携による産業支援を実施してきた。地域に集積する分析機器、試薬関連企業と連携したバイオ計測技術の開発と成果品である分析技術を利用した地場企業による製品開発の例を紹介する。

事例1は清酒製造用酵母開発のため開発したプロテオーム解析技術を地域研究用試薬メーカーと連携しキット化している。現在では開発した試薬キットを活用し、多数寄せられている食品異物(クリーム)分析への活用する事例を紹介する。

事例2では大学の先端研究の中で培われた分析技術を活用し、研究用試薬メーカーでキット化することで簡便な分析技術として普及することになった脂肪酸分析キットを紹介するとともに、この研究開発を進展させ、食品のおいしさを左右する基幹成分である有機酸を迅速分析する技術開発を紹介する。そしてこの技術を応用し、高付加価値清酒の生産性拡大を目指す取り組みを紹介する。

事例3では大学の先端技術で開発されたISFET半導体センサーを実用化するために、センサーに適した計測手法を開発した例を示すと同時に、この手法を進展させ、半導体センサーによる食品流通の安全を担保するための技術開発の取り組みを紹介する。

併せて、産学官連携を促進するためにJSTの支援により整備された拠点、京都バイオ計測センターのコンセプトと設備、活動状況について紹介する。この事業では産学連携、実機を使った産産、産学、学々の意見交換、連携構築のためのメンバー募集等、学界活動での利用の拡大を熱望しているところである。

## The biotechnology leads to a change in the local industry

○Yoshihiro Yamamoto  
(Applied Fermentation, Biotechnol., Kyoto Municipal Inst. Ind. Technol. Culture)

**Key words** proteome, enzyme activity, yeast, sensor

## 2S-Aa03 機能性食品素材としての酒粕発酵物とショウガ麹の開発

○渡辺 敏郎

(園田学園女子大・食物栄養)

watnb-ts@sonoda-u.ac.jp

食の欧米化が進んだことで、日本人の栄養バランスは大きく偏ってきている。食事における脂肪の割合が増え、それとともに、わが国の肥満人口は急激に増加している。なかでもメタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患の進展リスクを高めることから特に問題視されている。しかし、日本人は、食の欧米化以前ではメタボリックシンドロームに該当する人の割合は少なく、その要因として日本人は昔から発酵食品を好んで摂取してきたことが考えられた。つまり発酵食品にはこのメタボリックシンドロームの症状を改善できる成分が存在することが示唆された。日本の気候風土は発酵に適しており、特に麹菌を利用した発酵食品は清酒、味噌、醤油などバラエティーに富んでいる。なかでも麹と酵母の並行複発酵によって醸し出される清酒は適度に摂取すれば「百薬の長」と言われるほど体に良いとされている。また清酒の絞り粕である酒粕は栄養価に優れ、食物繊維も豊富な発酵食品で、近年様々な機能性が報告されている。そこで、異なる研究機関が連携して得られた革新的イノベーション事例として、再発酵処理により機能性を向上させた酒粕発酵物の商品化と麹の新しい活用法としてショウガ麹の開発について紹介する。

## 酒粕発酵物

酒粕発酵物は、酒粕を酵母で再発酵させ、米由来のレジスタントプロテインの含有量を凝縮させたものである。レジスタントプロテインとはタンパク質でありながら食物繊維様の生理機能を示す食品成分で、特に酒粕由来のレジスタントプロテインは油の吸着能が高く、一般的に油の吸着効果で定評のあるキトサンと比べても、高い効果であることが確認された。肥満を誘発させたラットによる動物実験では、酒粕発酵物を与えると腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪の重量はいずれも対照群に比べて有意に減少した。一方で、筋肉の重量は減少せず、酒粕発酵物は脂肪組織のみを低下させることが確認された。そこで、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性を測定すると、酒粕発酵物を与えるとその活性は抑制された。また抽出した脂肪組織を電子顕微鏡で観察したところ、酒粕発酵物を与えたラットの脂肪細胞は対照群に比べて細胞の肥大化抑制が確認された。酒粕発酵物の摂取により、糞重量が有意に増加し、糞中の総脂肪排泄量も有意に増加した。これは摂取した過剰の脂質を酒粕発酵物が対外に排泄させ、その結果、肥満を改善したことが考えられた。以上のことから、酒粕発酵物には肥満抑制効果があることが認められ、同時に脂質代謝改善効果もあることからメタボリックシンドロームに対応した新素材となりうることを示された。

## ショウガ麹

ショウガ麹は、原料のショウガチップを麹菌で製麹し、乾燥・粉砕後、粉末化したものである。通常、麹は穀類を原料に製麹し、発酵用途としてはデンプンを分解させるために使用することが多いので $\alpha$ -アミラーゼの活性が高い。しかし、ショウガ麹は、 $\alpha$ -アミラーゼの活性よりもプロテアーゼの活性が高く、タンパク質を分解する効果の高い素材であることが考えられた。またショウガ麹は、製麹過程においてショウガの辛味成分であるジンゲロールが体を温める効果を有するショウガオールに効率よく変換されていることも確認された。そこで、冷え性の女性被験者にタンパク質とショウガ麹を同時に摂取させることで、冷え性の改善効果を調べた。その結果、ショウガオールによる体を温める効果とショウガ麹のプロテアーゼがタンパク質を加水分解し、それが利用される際に誘導される体熱産生のダブル効果によって冷え性が改善できることが明らかとなった。

発酵食品には、まだ知られていない多くの可能性が眠っており、新しい発想や技術を活用させるとさらに優れた発酵素材の誕生が考えられる。このような革新的イノベーション開発の成功には学会等を中心とした各機関の有機的連携が必須であろう。

Development of re-fermented sake lees and ginger *koji* as functional food

○Toshiro Watanabe

(Dept. Food and Nutrition, Sonoda Women's Univ.)

Key words fermentation, sake lees, ginger, *Koji* making

## 2S-Aa04 酵母「101H」の開発と泡盛の商品化～シンポジウムから発信した奈良の研究シーズと沖縄の産業ニーズ～

○高木 博史

(奈良先端大・バイオ)

hiro@bs.naist.jp

科学者にとって、地道な研究の成果が実用化されることは大きな喜びである。最近、演者の個人的な思いである沖縄への貢献が「泡盛酵母の開発と商品化」という形で実現した。本講演では、学の立場から泡盛酵母の研究開発に関する経緯を紹介するとともに、産官学の有機的連携を生み出すための学会活動についても議論したい。

<奈良の研究シーズ> 当研究室では、ゲノム情報や遺伝解析などの基盤的知見が蓄積された実験室酵母を用いて、アミノ酸の代謝制御や生理機能に着目した新規なストレス耐性機構を解析し、得られた基礎的知見を産業酵母（パン酵母、酒類酵母、バイオエタノール酵母など）の育種に応用することを目指している。これまでに、主にセルフクロニング法によって、プロリンやアルギニンを高生産する産業酵母を作製し、ストレス耐性や発酵生産性の向上に成功している。<沖縄の産業ニーズ> 沖縄の伝統的蒸留酒「泡盛」の製造では、エタノール生産性の向上がコスト低減に直結するが、エタノールは酵母の生育と発酵を阻害し、濃厚な仕込みは酵母にとって高浸透圧の環境である。また、冷却コストの点から高温での発酵が望ましいことから、泡盛製造の効率化には、エタノール・高浸透圧・高温などのストレスに耐性を示す酵母が必要である。一方、泡盛の主要な芳香成分は酵母の発酵過程で主にアミノ酸から生成される。泡盛製造にはエタノール生産性・芳香性の高い酵母（泡盛101号）が使用されており、育種に関する研究は行われていない。従って、泡盛の酒質の向上や差別化には、アミノ酸の組成や生成量に特徴を有する酵母の育種が重要である。

<本学会大会シンポジウムの開催> 演者は平成24年度より沖縄県「琉球泡盛調査研究支援事業」に参画し、産業振興を目指した基盤研究を進めてきた。また、平成25年度本大会でシンポジウム（温故知新：沖縄の伝統蒸留酒「泡盛」の研究開発）を企画し、地方伝統産業の先端研究例として、「微生物機能を活用した新しい泡盛の開発」「熟成の科学」などの研究成果を発信するとともに、沖縄発の次世代シーケンサーによる比較ゲノム・育種への有用性と波及効果についても議論した。このシンポジウムを機に産官学の有機的連携に一層弾みがついた。

<101H酵母の開発> 清酒やパンの主要な香り成分として知られる酢酸イソアミル（i-AmOAc）とその前駆体のイソアミルアルコール（i-AmOH）は、主にロイシン（Leu）の生合成に依存して生成され、これらの含量を増加させると泡盛の酒質に影響を及ぼすことが予想される。酵母のLeu生合成経路は、*LEU4* 遺伝子がコードする $\alpha$ -イソプロピルリノゴ酸合成酵素（IPMS）の活性がLeuによるフィードバック阻害を受けることで調節されている。そこで、Leuのアナログである5,5-トリフルオロロイシン（TFL）に耐性を示す泡盛酵母の変異株を単離し、その特性を解析した。TFL耐性変異株の中から、親株（101株）に比べて細胞内のLeu濃度が高く、泡盛中のi-AmOH、i-AmOAc含量が増加し、泡盛の香味性を向上させる菌株（18-T55株）を取得した。18-T55株は*LEU4* 遺伝子上に2つのヘテロ対立変異（*LEU4*<sup>Ser542Phe</sup>、*LEU4*<sup>Ala551Val</sup>）を有しており、いずれのアミノ酸置換もTFL耐性、IPMSのフィードバック阻害解除、Leu蓄積を引き起こすことが判明した。また両残基は、IPMS内のLeu結合部位の近傍にあると予想され、置換に伴う立体障害がフィードバック阻害解除の原因であると結論づけた。本研究は泡盛酵母の育種としては初めての報告であり（Takagi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 140-147, 2015; 生物工学論文賞）、アミノ酸アナログ耐性変異株の取得が泡盛酵母の育種において有効であることが実証できた。

<実用化への道> 実機醸造を行った結果、18-T55株はアルコール生成などに問題はなく、親株の良好な特性を引き継いでいた。香り成分については、i-AmOHおよびi-AmOAcが実規模においても増加していたが、他の成分も顕著に増加しており、*LEU4* 遺伝子以外の変異によるものと考えられた。また官能評価では、フルーティーかつやや濃厚な評価が得られた。以上の結果から、18-T55株は泡盛の商業生産に活用できるとともに、親株と異なる特徴的な風味を有する泡盛醸造が可能であることから、「101H酵母」と命名した。101H酵母を用いた新たな泡盛「101H」を昨年10月に新里酒造より商品化した。プランターのよう甘さと果実のような華やかさが好評を博し、本年5月からは新商品「HYPER YEAST101」として販売を開始した。

今回のようなシーズとニーズのマッチング（実用化）には、(1)研究者自身の意欲・熱意、(2)共感者・理解者との信頼関係、(3)努力・幸運・感謝、(4)学会・論文発表などが必須であると感じている。学会活動はそのための効果的なツールであり、特に本学会は産官学連携の芽を育む場として存在価値を発揮している。最後に、夢の実現に導いていただいた研究室メンバー、バイオジェット、新里酒造、琉球大学の皆様深く感謝します。

## 101H Yeast and Awamori: Nara research seeds and Okinawa industrial needs

○Hiroshi Takagi

(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words yeast, awamori, industry-government-university

## 2S-Ba01 テルペノイドの代謝多様性と遺伝子ディスカバリー

○関光, 福島 エリ オデット, 村中 俊哉  
(大阪院・工)  
hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

構造多様性に富む植物テルペノイドは、医薬、機能性食品、香料、工業原料として重要な化合物群である。しかしながら、後述する抗マラリア薬原料のアルテミシニンのように特定の植物種の特定の部位にのみ蓄積するため生産性が低い化合物や、あるいは抗炎症剤として多用されるグリチルレチン酸のように原料植物の生産国による輸出規制のため今後の安定調達が懸念されているものもある。このような化合物の代替生産技術として、アルテミシニン前駆物質の生産ですでに実用化されているような組換え微生物での生産が挙げられるが、そのためには合成に関わる酵素遺伝子の同定が不可欠である。本発表では、トリテルペノイド、セスキテルペノイドの生合成に関わる酵素遺伝子の探索と組換え出芽酵母における有用テルペノイド生産に向けた私たちの研究について紹介したい。

テルペノイドの中で、炭素数 30 の鎖状化合物である 2,3-オキシドスクアレンを共通前駆体とするトリテルペノイドは、様々な生薬の活性成分を含む化合物グループである。トリテルペノイドの生合成においては、2,3-オキシドスクアレンを様々な様式で閉環するオキシドスクアレン環化酵素、環状トリテルペンの部位特異的な酸化反応を触媒するシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) が重要な役割を果たしている。植物では、P450 は大きな遺伝子ファミリーを形成するため特定の特化代謝産物 (あるいは二次代謝産物) の生合成に関与する分子種の特定は容易ではない。私たちは、データベース上に公開されている配列情報および次世代シーケンサーを用いた *de novo* トランスクリプトーム解析を行うことで取得した新規配列情報からの候補 P450 遺伝子マッピングと酵素機能解析を進め、異なる反応性を示す種々のトリテルペノイド生合成関連 P450 のカタログ化を進めてきた。さらに、これらの遺伝子を用いて、最重要生薬の基原植物であるマメ科のカンゾウ (甘草) が生産し、抗炎症剤として医薬、化粧品などに配合されるグリチルレチン酸や天然にはレアなトリテルペノイドの組換え酵母を用いた生産系の構築に取り組んでいる。

また、私たちは炭素数 15 のファルネシル二リン酸を共通前駆体として生成するセスキテルペノイドの生合成についても研究を進めている。アルテミシニンは、古くから漢方原料として用いられているヨモギ属植物の一種であるクソニンジン (*Artemisia annua*) が生産するセスキテルペノイドである。アルテミシニンは現在、抗マラリア薬原料として不可欠となっている。ノーベル財団のプレスリリースによると、アルテミシニンによりアフリカだけでも毎年 10 万人の命が救われており、アルテミシニンを発見した中国のトゥ・ヨウヨウ氏は 2015 年のノーベル生理学・医学賞を受賞している。興味深いことに、200 から 400 種が存在するヨモギ属の中でアルテミシニンを生産するのはクソニンジンのみとされている。私たちは、クソニンジンが有する「例外的な」アルテミシニン産生能を決定づけている遺伝的要因を明らかにすべく、クソニンジンとその他のアルテミシニン非産生ヨモギ属植物の化学的、分子生物学的な比較解析を進めた。中でも、アルテミシニン生合成経路における鍵酵素であるセスキテルペン合成酵素の ADS (アモルファジエン合成酵素) に着目し、アルテミシニン非産生種における ADS 相同遺伝子の有無、発現および酵素機能解析を行った。その結果、ミブヨモギ (*A. maritima*) およびクラムヨモギ (*A. kurramensis*) において、ADS に対して 83% のアミノ酸配列同一性を示す相同タンパクをコードする遺伝子が発現していることを見出した。これら二つの ADS 相同タンパク質について酵素機能解析を行ったところ、ファルネシル二リン酸を基質として (+)-alpha-ビザポロールを生成する新規セスキテルペン合成酵素であることが判明した。また、ニガヨモギ (*Artemisia absinthium*) からは ADS に対して 90% のアミノ酸配列同一性を示す相同タンパクをコードする遺伝子を見出した。ニガヨモギ由来 ADS 相同タンパクの酵素機能を調べたところコイズミオールと呼ばれるレアなセスキテルペンを生成する新規酵素であることが判明した。このような、高い相同性を示しながら異なる反応性を示すホモログタンパクの発見は、ADS の酵素活性制御において特に重要なアミノ酸残基を推定するうえで有用な情報をもたらすだけでなく、微生物ホストを利用した、天然にはレアな、あるいは非天然型セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成にも利用しうると考えられる。

## Genetic diversity of P450s and terpene synthases as drivers of plant terpenoid diversity

○Hikaru Seki, Ery Odette Fukushima, Toshiya Muranaka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Plant, terpenoid, biosynthesis, enzyme

## 2S-Ba02 植物代謝研究に役立つ相関ネットワーク解析 (金平糖解析)

萬年一斗<sup>1</sup>, 尾形 善之<sup>2</sup>, ○鈴木 秀幸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> (公財) かずさDNA研・バイオ研究開発, <sup>2</sup>大阪府大・生命環境)  
hsuzuki@kazusa.or.jp

演者らは、植物代謝研究におけるオミックス研究支援を目的として、相関ネットワーク解析ソフトウェア ConfeitoGUIplus の開発を行ってきた。相関係数をもとにネットワーク描画を行う点は一般的な相関ネットワーク解析と同様であるが、本ソフトウェアはネットワークの内側と外側を自動判別し、偽陰性・偽陽性を低減するように要素の再分配を行う独自のアルゴリズムを搭載している。このアルゴリズムにより、膨大な定量値テーブルから高精度なモジュール抽出が可能となっている。

ConfeitoGUIplus の最大の特徴は、あらゆるオミックス解析データが利用可能という点であり、DNA アレイ解析や次世代シーケンシング解析 (RNA-Seq 解析) によるトランスクリプトーム解析データ、質量分析機器から得られるメタボローム解析データなど、幅広いデータに適用可能である。そのため、遺伝子や代謝物のリソースが整備されていない非モデル植物の代謝研究において、最も効果を発揮するデータマイニングツールと言える。本発表では、植物代謝研究で目にする機会の多いオミックス解析データに焦点を当て、これらに対して ConfeitoGUIplus を適用した 3 件の実用例の紹介を行う。

(1) シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の遺伝子共発現解析

従来法との比較によって ConfeitoGUIplus の有用性を示すため、シロイヌナズナの公開 DNA アレイ解析データ (22,746 probes x 9,442 experiments) を用いて遺伝子共発現解析を行った。一般的に、同一生合成経路で機能する酵素遺伝子の共発現関係の抽出に比べ、生合成経路を構成する遺伝子群とそれを制御する転写制御因子との共発現関係の抽出の方が困難とされる。本発表では、脂肪族グルコシレート生合成経路を対象とし、当該経路の制御を司る転写制御因子の抽出を試みた例について述べる。ConfeitoGUIplus による網羅解析の結果、先述の 22,746 個の probe は発現パターンの類似性により 583 個のモジュールに分割された。脂肪族グルコシレートの骨格形成において重要な酵素のひとつ CYP83A1 が含まれるモジュールに着目したところ、同じく骨格形成を担う CYP79F1・CYP79F2・SOT18 などの酵素遺伝子を Myb28・Myb29 が制御する様子が示されていた。この結果は、2007 年の理研・平井らの報告内容とも合致しており、従来行われてきた遺伝子共発現解析においても ConfeitoGUIplus が遜色なく機能することが示されたと言える。

(2) ニガウリ (*Momordica charantia*) のサポニン生合成酵素遺伝子の探索

ウリ科植物の苦味配糖体サポニンは、特有な変形ラノスタン系骨格トリテルペン Cucurbitadienol の酸化を起点として構造多様性を示すことが知られている。そこで、Cucurbitadienol を酸化する P450 遺伝子の単離を効率的に行うため、遺伝子共発現解析を行った。ニガウリ由来の 10 種類の器官 (葉、茎、果実、根など) の RNA-Seq 解析を行い、既知の P450 との相同性をもとに 29,920 個の contig から 997 個まで P450 候補遺伝子を絞り込んだ。既に活性が明らかとなっている Cucurbitadienol 合成酵素 (CBS) 遺伝子と選ばれた P450 候補遺伝子の定量値テーブルを入力データとして、ConfeitoGUIplus を用いた遺伝子共発現解析を行った。その結果、McCBS 遺伝子は 4 個の P450 遺伝子とともにモジュールを形成した。酵母異種発現系を利用して、モジュールに含まれていた P450 遺伝子の活性測定を行ったところ、少なくとも 3 遺伝子については Cucurbitadienol を基質として認識することが判明した。小コストで非モデル植物の遺伝子共発現解析を実現し、その上、極めて効率的に目的遺伝子の探索が可能であることを示した好例である。

## (3) 大根おろしの呈味成分に着目した代謝物アノテーション

大根おろし独特の辛味には Glucoraphenin が関与するとされているが、食品の呈味性は非常に複雑な現象であり、ひとつの代謝物だけに到底規定できるものではない。そこで、Glucoraphenin と協調的に働く代謝物の中から新規呈味成分の探索を試みた。大根おろしの辛味は経時的に減少するという特徴を加味し、すりおろしてから時間が異なる試料からそれぞれメタノール抽出を行い、LC-MS 分析に供した。得られたメタボローム解析データを ConfeitoGUIplus で解析した結果、LC-MS 分析で検出された 2,305 ピークの中から Glucoraphenin と協調するピーク候補として 53 ピークが抽出された。Glucoraphenin ははじめとする辛味成分は、炭素・窒素・硫黄原子から成るイソチオシアネート構造が共通して見られ、この構造に起因して辛味を示すとされている。精密質量をもとに理論組成式演算を行った結果、25 ピークがイソチオシアネート構造を取り得る組成式を示し、このうち 10 ピークは代謝物データベースにも登録されていないことがわかった。これらのピークに対応する化合物が辛味を呈する可能性は極めて高く、Glucoraphenin や他の既知辛味成分と協調して、大根おろしの呈味を形成するものと推測される。

## Application of correlation network analysis software (ConfeitoGUIplus) in plant metabolism research

Kazuto Mannen<sup>1</sup>, Yoshiyuki Ogata<sup>2</sup>, ○Hideyuki Suzuki<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. R&D, Kazusa DNA Res. Inst., <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** transcriptome analysis, metabolome analysis, data mining technique, software development

## 2S-Ba03 高増殖するタケ培養細胞の物質生産への応用可能性：合理的代謝フロースイッチングによるタケ懸濁細胞のヒドロキシ桂皮酸アミド生合成経路の改変

野村 泰治<sup>1</sup>, 荻田 信二郎<sup>1,2</sup>, 加藤 康夫<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山県大・生工研セ, <sup>2</sup>県大広島・生命科学)  
 ykato@pu-toyama.ac.jp

化学合成法や抽出法に代わる有用植物二次代謝産物の生産方法として、大腸菌や酵母等の微生物宿主へ生合成遺伝子を導入し目的化合物を高生産する試みが近年盛んに行われている。遺伝子組換え操作が容易で細胞の増殖が速いことがその理由であると考えられるが、基質の添加またはその生合成系の導入の必要性や発現酵素の不溶化など、高い生産性の実現には多くの障壁を伴う。一方で、植物細胞は本来的には微生物宿主を使用する際の問題点の多くを克服でき、植物二次代謝生産には適していると考えられるが、微生物に比べて増殖が遅く遺伝子組換え操作が煩雑で時間を要することから、物質生産宿主としての利用は進んでいない。我々は植物細胞を宿主とした遺伝子組換えによる物質高生産を可能とする汎用性の高い基盤技術があれば、上記のようなデメリットを超えて宿主としての利用が進むと考え、「合理的代謝フロースイッチング」と命名したストラテジーの確立と一般化を目指している。これは宿主植物細胞における主要二次代謝系を明らかにした上で、当該生合成中間体から分岐する新たな二次代謝生合成系を遺伝子組換えにより導入することで、効率的に代謝経路を改変し目的物質の高生産に導くものである。本講演では、増殖性が高く、高効率な遺伝子組換え法や増殖/木化促進等の培養フェーズ調節法が確立されている、当研究室で樹立されたタケ（ハチク）Pn 懸濁細胞を用いて、本ストラテジーの実証実験を行った結果について発表する。

増殖促進条件および木化促進条件で培養した Pn 細胞のメタノール抽出物を逆相系 HPLC にて分析した結果、特に木化促進条件で蓄積量が増加し、クロマトグラム中ではほぼ排他的に検出されるメジャー化合物 1 種とそれに付随して増加するマイナー化合物 1 種が見出された。精製物の構造解析および化学合成標品との一致から、メジャー化合物は feruloylputrescine (FP)、マイナー化合物は *p*-coumaroylputrescine (*p*CP) であることが分かった。これらヒドロキシ桂皮酸アミドはヒドロキシ桂皮酸 CoA チオエステルと putrescine の縮合によって生合成されることから、Pn 細胞ではフェニルプロパノイド代謝系とポリアミン代謝系が極めて活発であると考えられた。そこで、これらの生合成中間体を基質とする外来の二次代謝生合成酵素の導入による「代謝フロースイッチング」の可否を検討するため、*p*-coumaroyl-CoA/feruloyl-CoA と、putrescine の生合成中間体である agmatine の縮合反応を触媒するオオムギ由来の agmatine coumaroyltransferase (ACT) 遺伝子を CaMV35S プロモーター制御下で高発現する組換え株を作製し、組換え細胞における代謝物の分析を行った。その結果、ACT 組換え株の細胞内には予想通り ACT 反応産物である *p*-coumaroylagmatine (*p*CA) と feruloylagmatine (FA) が高蓄積する一方で、Pn 細胞にもともと高蓄積していた *p*CP/FP の蓄積量は顕著に減少していたことから、*p*CP/FP 生合成系が *p*CA/FA 生合成系へと効率的にスイッチングされていることが示唆された。ACT 組換え懸濁細胞における主要代謝産物である *p*CA の生産量は、木化促進条件での培養後期に最大となり、150~350 mg/L にも達した。以上の結果から、植物培養細胞を用いた高効率物質生産系の確立における「合理的代謝フロースイッチング」の有用性が強く示唆された。

### Production of useful compounds using bamboo cultured cells by "Rational metabolic-flow switching".

Taiji NOMURA<sup>1</sup>, Shinjiro OGITA<sup>1,2</sup>, Yasuo KATO<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

**Key words** plant secondary metabolite, bamboo cultured cells, hydroxycinnamic acid amide, biosynthesis

## 2S-Ba04 高度機能分化した植物組織培養の物質生産への活用 -可能性と課題-

○大西 昇, 大川 博志, 間宮 幹士  
 (キリン・基盤研)  
 n-onishi@kirin.co.jp

植物組織培養法の本質的な特徴の 1 つは、自然界には通常出現しない植物形態を実現し得ることである。脱分化した細胞の長期培養などはその典型例であろう。同特徴は、種苗の増殖及び有用物質の生産の両分野において、長年多岐に渡る知見を生み出している。有用物質の生産については、80 年~90 年代に実用化されたムラサキ培養細胞によるシコニンの生産やチューベローズ培養細胞での多糖の生産例があり、それら技術は現在まで脈々と受け継がれ更に発展を遂げている。またミマサイコやオタネニンジンでは、培養根と言う別の形で機能分化した組織も同様に実用利用に活用されて来た。現在改めて有用物質の生産に組織培養を用いる機運が高まっているが、それは上記の優れた実用技術をベースに代謝解析や遺伝子工学等の最新技術を組合せることによって、次世代の物質生産技術の創出に繋がり得る環境が整いつつあるからである。

我々は長年、種苗の増殖に組織培養法の利用を図っている。これまでに、種々の機能分化した組織がドミナントに誘導される基本現象を把握し、得られる形態を高度化することにより複数の基幹増殖技術として確立して来た。其々の技術のベースとなった現象は以下の通りである。(1)「もやし状」の茎の高密度増殖、(2)地下茎（ストロン）形態での継続的増殖、(3)塊茎の植物体全体での形成、(4)破碎組織からの不定芽の同調的誘導、(5)不定胚の高効率での誘導。また組織の脱水等の工程により、定芽/不定芽/不定胚の生育能力が顕著に改善されることも見出した。これら一連の基本技術の保有により多様な植物種の増殖が可能となっている。一方、増殖技術の事業活用に向けては、基本技術とは別に実用的なスケールアップ法が不可欠となる。種々の方向性（培養槽の形状/サイズ/材質/他）を検討した結果、最終的にリユース可能な袋型の培養槽（内容積 8L）と周辺技術を開発し、種苗生産に求められる簡便且つ柔軟な大量培養系を実現した。

これら「機能分化した組織」を「大量/安価」に増殖し得るシステムは、有用物質への生産にも応用し得ると思われる。現在その実証に向けた各種の技術開発を進めている（農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「高度機能分化した植物組織培養による有用サボニン生産技術開発」他）。本発表では、各組織の典型的な増殖形態と袋型培養槽による大量増殖実用例を紹介し、有用物質への展開の可能性と課題について言及する。

### Application of new tissue culture methods to produce useful compounds - potential and challenge -

○Noboru Onishi, Hiroshi Okawa, Kanji Mamiya  
 (Cent. Lab. for Key Tech., Kirin Co., Ltd.)

**Key words** tissue culture, bioreactor, useful compounds

**2S-Ba05 植物と微生物：イソキノリンアルカロイド生産の展望**

○佐藤 文彦  
(京大院・生命)  
fsato@lif.kyoto-u.ac.jp

植物が産生する様々な二次代謝産物は、植物自身の防御物質等として有用であるとともに、我々にとっても医薬品等の有用化合物として有益である。一方、これらの成分の生成は特定の植物種や組織に限定されることが多く、環境要因による変動とともに、生産性の不安定性をもたらしている。従って、植物細胞の全能性の立証以来、過去 40 年以上に渡り、細胞培養や代謝工学、さらには、合成生物学的手法等、様々な方法により生産性の改善が試みられている。ここでは、モルヒネ等重要な医薬品を含むイソキノリンアルカロイドの植物細胞、ならびに、微生物における代謝工学/合成生物学研究の現状と課題を総括する。

イソキノリンアルカロイドは鎮痛薬モルヒネや抗菌整腸薬ベルベリン、あるいは抗菌剤サンギナリンなど、極めて多様な生理活性ならびに構造をもつ一群のアルカロイドである。構造的に多様ではあるが、前述のいずれの化合物も、チロシン由来のドーパミンと 4-hydroxyphenylacetaldehyde から合成されるノルコクラウリンを出発材料として合成される。これまでに、ベルベリンを高産生するオウレン培養細胞やサンギナリンを生産するハナビシソウ培養細胞等を用いて、ノルコクラウリン生合成から重要中間体レチクリン生合成に至る生合成酵素の単離や生合成酵素遺伝子の単離、さらには、レチクリンから前述のモルヒネ等多様な化合物へと分岐する生合成系が遺伝子レベルで明らかになってきている。さらに、単離された遺伝子を用いて、植物細胞での代謝工学や、合成生物学による微生物生産系が構築されてきた(文献 1)。

特に、注目される進展は、モルヒネ生合成系で唯一不明であった S-レチクリンから R-レチクリンへの変換酵素遺伝子が昨年同定されるとともに、酵母、あるいは、大腸菌系を用いて、単純な基質(グルコース)からのテバイン(モルヒネ前駆物質)の合成が報告されたことである(文献 2、3)。現在報告されている微生物でのモルフィナンアルカロイド生産性は、 $\mu\text{g/L}$  から  $\text{mg/L}$  程度であり、実用化には大幅な生産性の向上が必要であるが、植物細胞の生育の遅さと比較すると、今後の生産性の改善による微生物生産には期待がもたれる。特に、テバインを出発材料とした実用的なオピエート(人工的鎮痛剤)の合成は、現在の植物由来の製法よりより効率的な生産と考えられる。一方、植物細胞は生育が遅いとはいえ、微生物による発酵生産では困難な多様な化合物を生産する能力と高い蓄積能を有している。

以上のように、植物細胞、微生物とも、それぞれ、利点と欠点を有しており、目的化合物の実生産には、それぞれの特性を活かした生産体系の構築が不可欠である。なお、実生産においては、既存の生産物を凌駕する機能性をもつ化合物の生産が不可欠と思われる。また、モルフィナンアルカロイド生合成系を有する微生物の場合、不正利用に対する管理が必要であり、合成生物学における生命倫理の課題についても述べたい。

## 参考文献

1) Sato F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1-9 (2013), 2) Galanie S. et al., *Science* 349, 1095-1100 (2015), 3) Nakagawa A. et al. *Nat. Comm.* 7, 10390 (2016)

**2S-Ca01 Engineering by proxy: Monobody-mediated control of enzyme specificity and activity**

○Shohei Koide<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Perlmutter Cancer Center, New York Univ Langone Medical Center, <sup>2</sup>Dept Biochem & Mol Biol, Univ of Chicago)  
Shohei.Koide@nyumc.org

Over the last two decade, our group has invented and refined the monobody technology. Monobodies are synthetic binding proteins built on the scaffold of the fibronectin type III domain. From highly designed combinatorial libraries, we have generated monobodies with high potency and specificity to diverse target molecules. I will present applications of the monobody technology to controlling enzyme properties. Standard approaches for engineering enzymes modify enzymes themselves. However these approaches are often impeded by unavailability of a detailed understanding of the structure-function relationship or an appropriate high-throughput assay. We have recently developed a strategy that overcomes these limitations. In our approach, catalytic properties of enzymes are precisely modulated with monobodies directed to an unmodified enzyme. We generate monobodies that bind in the close vicinity to the active site of an enzyme but do not inhibit the catalytic activity. This strategy enriches the type of monobodies that are likely to alter the substrate specificity of the targeted enzyme, enabling us to identify "modulator" monobodies by screening a small number of candidates. Using this strategy, we successfully altered substrate specificity of two enzymes with distinct active-site architecture. Similarly, by targeting monobodies to a regulatory site, we have generated both allosteric activators and inhibitors of oncogenic kinases. Our work provides a new paradigm for engineering enzymes and expands enzyme-engineering technologies.

**Perspectives of Isoquinoline Alkaloid Production via Metabolic Engineering**

○Fumihiko Sato  
(Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

**Key words** metabolic engineering, synthetic biology, isoquinoline alkaloids, bioethics

**Engineering by proxy: Monobody-mediated control of enzyme specificity and activity**

○Shohei Koide<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Perlmutter Cancer Center, New York Univ Langone Medical Center, <sup>2</sup>Dept Biochem & Mol Biol, Univ of Chicago)

**Key words** protein engineering, directed evolution, combinatorial protein library, enzyme engineering

**2S-Ca02 Application of next-generation sequencing to antibody engineering**

Aerin Yoon, Sanghoon Lee, Soohyun Kim, Duck-kyun Yoo,  
Hyroi Kim, ○Junho Chung  
(Seoul National University College of Medicine)  
junhochung@me.com

Next-generation sequencing (NGS) is a powerful tool to analyze individual genes inside complex library. And it was a big question whether we can apply it to antibody engineering and get diverse antibody clones using the NGS data.

After bio-panning of three scFv phage libraries on antigen, we prepared plasmid DNA pool of the last round. Then we performed NGS and obtained HCDR3 sequences. Using these HCDR3 sequences we synthesized PCR primers and performed PCR to get the physical DNA of scFv clones from the plasmid DNA pool. The scFv DNA was cloned into phagemid vector and the binding activity of scFv clones was determined to compare with that of clones obtained from conventional colony selection.

Most of the antibody clones obtained using NGS showed reasonable binding activity, which was quite comparable to that of antibody clones from conventional colony selection.

In conclusion, our study demonstrated that NGS provides an effective tool for obtaining antibody clones from antibody library in a high through-put manner.

**2S-Ca03 Self-assembling supramolecular nano-architectures created from *de novo* protein nano-building blocks**

Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, ○Ryoichi Arai  
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)  
rarai@shinshu-u.ac.jp

Living organisms are maintained by various self-assembling biomolecules including proteins, nucleic acids, sugars, and lipids. The chemical reconstitution of living matter is one of the ultimate goals of chemistry, biology, and bioengineering. Molecular design to create artificial proteins that self-assemble into supramolecular complexes as “neobiological molecules” is an important step toward achieving the goal and further applications.

Recently, we described the three-dimensional structure of WA20, a *de novo* protein that forms an intermolecularly folded dimeric 4-helix bundle (so-called dimeric “nunchaku”-like structure) (Arai, R. *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2012, 116, 6789). To harness the unusual intertwined structure of WA20 for the self-assembly of supramolecular nanostructures, we created a protein nano-building block (PN-Block), called WA20-foldon as a simple and versatile nano-building block, by fusing the dimeric structure of WA20 to the trimeric foldon domain of fibrin from bacteriophage T4 (Kobayashi, N. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 11285). The WA20-foldon fusion protein was expressed in the soluble fraction in *Escherichia coli*, purified, and shown to form several homooligomeric forms. The stable oligomeric forms were further purified and characterized by a range of biophysical techniques. Size exclusion chromatography, multi-angle light scattering, analytical ultracentrifugation, and small-angle X-ray scattering (SAXS) analyses indicate that the small form (S form), middle form (M form), and large form (L form) of the WA20-foldon oligomers exist as hexamer (6-mer), dodecamer (12-mer), octadecamer (18-mer), and tetracosamer (24-mer), respectively. These findings suggest that the oligomers in multiples of 6-mer are stably formed by fusing the interdigitated dimer of WA20 with the trimer of foldon domain. Pair-distance distribution functions obtained from the Fourier inversion of the SAXS data suggest that the S and M forms have barrel- and tetrahedron-like shapes, respectively. These results demonstrate that the *de novo* WA20-foldon is an effective building block for the creation of self-assembling artificial nano-architectures.

Moreover, we designed and constructed an ultra-stabilized variant of the *de novo* dimeric protein WA20, Super WA20 (SUWA). Surprisingly, the thermal denaturation temperature of SUWA is 122 °C above the boiling point of water. Stabilized PN-Blocks using the ultra-stabilized *de novo* dimeric protein SUWA are useful for developing ultrastable nano-architectures and nano-biomaterials.

Furthermore, we designed and created *de novo* extender protein nanobuilding blocks (ePN-Blocks), constructed by fusing tandemly two *de novo* WA20 proteins with various linkers, as a new series of PN-Blocks to construct self-assembling extended and cyclized chain-like nanostructures. Also, we successfully reconstructed heteromeric complexes as quaternary structures from extender and stopper PN-Blocks by denaturation and refolding. In addition, we demonstrate that the complexes can further self-assemble into supramolecular nanostructures on mica surface as “super-quaternary structures,” suggesting further possibilities of the PN-block approach.

All these results demonstrate that the PN-Block approach using the *de novo* dimeric proteins is a powerful strategy for artificial molecular design to create self-assembling nano-architectures and supramolecular nanostructures as “neobiological molecules.”

**Application of next-generation sequencing to antibody engineering**

Aerin Yoon, Sanghoon Lee, Soohyun Kim, Duck-kyun Yoo, Hyroi Kim,  
○Junho Chung  
(Seoul National University College of Medicine)

**Self-assembling supramolecular nano-architectures created from *de novo* protein nano-building blocks**

Naoya Kobayashi, Naoya Kimura, ○Ryoichi Arai  
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

**Key words** antibody, phage display

**Key words** protein engineering, protein nanobuilding block, *de novo* protein, supramolecular nanostructure

**2S-Ca04 <招待講演 (韓国生物工学会)>****Marine-derived biosilicification: Silica-forming proteins and their applications**

Mi Ran Ki, Ki Baek Yeo, Sung Ho Kim, Jong Ki Kim,  
 Kho My Nguyen, Van Pham, ○Seung Pil Pack  
 (Dept. Biotechnol. and Bioinfo. Sch. Sci. Tech., Korea Univ.)  
 spack@korea.ac.kr

Silica with nontoxic and highly biocompatible characteristics can be applied for tissue scaffolds, drug-delivery system, biosensors and imaging. For silica synthesis, conventional methods typically require a combination of high temperatures and extreme pH and also it is difficult to prepare controlled structures. However, the discovery of the critical molecules involved in biosilicification found both in diatoms (silaffins and polyamines) and sponges (silicateins) brings out understandings about silica forming process *in vivo* and has presented a new paradigm for silica synthesis under ambient or mild conditions. The use of biosilicification machinery is based on the availability of enzymatically active recombinant proteins involved in silica formation. Recombinant silicatein (SIL), however, was expressed both in heterogeneous host systems, yielding limited quantities of the protein or inclusion body. To overcome these limitations, design of SIL or SIL-like protein should be required. In this study, two alternative silica-forming proteins are focused: CAT, hypothetical cathepsin-like protein from *Nematostella vectensis*; and SIL-like cathepsin (SLC), a mutant CAT obtained by mutating residues.

**Marine-derived biosilicification: Silica-forming proteins and their applications**

Mi Ran Ki, Ki Baek Yeo, Sung Ho Kim, Jong Ki Kim, Kho My Nguyen, Van Pham,  
 ○Seung Pil Pack  
 (Dept. Biotechnol. and Bioinfo. Sch. Sci. Tech., Korea Univ.)

**Key words** Biosilica, Silicatein, Cathepsin

**2S-Ca05 cDNA display method and its applications for *in vitro* selection of functional peptides**

○Naoto Nemoto  
 (Grad. Sch. Sci. & Eng., Saitama Univ.)  
 nemoto@fms.saitama-u.ac.jp

Evolutionary molecular engineering has successfully been applied for development and optimization of wide range of peptides/proteins, including antibody drugs and industrial enzymes. Currently, phage display is used as the most popular evolutionary molecular engineering technique to select a peptide with affinity against a target molecule, but diversity of library obtained by this technique is not so high. Hence, to expand the library size and also to introduce non-natural amino acids, *in vitro* display techniques are developed that utilize cell-free translation system.

cDNA display<sup>1</sup>, which was developed by our group based on mRNA display, is one of the most promising *in vitro* display techniques, and can create a library of 10<sup>12</sup> peptide molecules. In mRNA display, a peptide is covalently conjugated with its encoding mRNA in a ribosome via a puromycin molecule. In cDNA display, however, a peptide is linked with its corresponding cDNA by the specially designed puromycin-linker. Because DNA is much more stable than RNA, cDNA display is more favorable for selections in biological conditions. Another benefit of cDNA display is the ease of modification of displayed proteins and peptides after translation, because the displayed molecules can be immobilized on a magnetic bead using the above-mentioned linker, which allows for rapid and efficient buffer exchange.

In this symposium, I will present applications of cDNA display method to develop peptide aptamers against three different kinds of target species, 1) a G protein-coupled receptor on living cells: growth hormone secretagogue receptor (GHS-R), 2) a chemical functional group: amino-group, and 3) liposome: artificial lipid bilayer.

Traditionally, *in vitro* display techniques (e.g., ribosome display, mRNA display) have not been applied for selections using living cells because mRNA-protein complexes are not ribonuclease-resistant. With cDNA display, in contrast, we succeeded in screening a peptide library and identifying an antagonistic peptide of GHS-R<sup>2</sup>. Next, we obtained some peptide aptamers that recognize a specific functional group on a solid phase (i.e., amino group on beads or glass) from a disulfide-rich peptide library<sup>3</sup>. In addition, we recently performed *in vitro* selection to obtain peptides that bound to liposome from random peptide library (30 residues in length). After six rounds of selection, the random sequences were converged to a unique consensus amino acid sequence. The selected peptide was chemically synthesized and modified with fluorescein at C-terminus. We then examined how the peptide interacted with liposome membrane using a confocal laser scanning microscopy. Interestingly, the peptide seemed to anchor into liposome membrane with its N-terminal half. So, we fused red fluorescent protein (RFP) to the C-terminus of the liposome-binding peptide and confirmed that the peptide-RFP conjugate could also interact with liposome membrane<sup>4</sup>. These examples illustrate the practical utility of cDNA display technique as a platform to identify novel peptides with interesting features.

A part of the study was supported by JSPS KAKENHI Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas “Molecular Robotics”, Grant-in-Aid for Scientific Research (C) and the Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) Program, through the Japan Science and Technology Agency.

**References:**

1. Mochizuki, Y., *et al.*, *ACS Comb. Sci.*, 13, 478-485 (2011)
2. Ueno, S., *et al.*, *PNAS*, 109, 11121-11126 (2012)
3. Mochizuki, Y., *et al.*, *Chem Commun*, 50, 5608-5610 (2014)
4. Kobayashi, S., *et al.*, submitted

**cDNA display method and its applications for *in vitro* selection of functional peptides**

○Naoto Nemoto  
 (Grad. Sch. Sci. & Eng., Saitama Univ.)

**Key words** evolutionary molecular engineering, *in vitro* selection, cDNA display, peptide aptamer

**2S-Ca06 RNA as a promising biopolymer to generate neobiological structures and functions**

○Yoshiya Ikawa  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)  
yikawa@sci.u-toyama.ac.jp

RNAs are versatile biopolymers that act not only as DNA-like genetic materials but also have diverse functions in regulation of cellular biosystems. RNA is capable of regulating gene expression by sequence-specific hybridization. This feature allows the design of RNA-based artificial gene regulators (riboeffectors). RNA can also build complex 2D and 3D nanostructures, which afford protein-like functions (riboswitches and ribozymes) and make RNA an attractive material for nano-biotechnology.

Interactions between GNRA tetraloops and their receptors motifs are found frequently as modular units in different classes of RNA structures. Because of their functional importance, GNRA/receptor interactions have been investigated with regard to their biochemical properties and 3D structures. Artificial RNA motifs that can functionally replace the naturally occurring GNRA/receptor interactions have been isolated from RNA libraries [1,2].

By using these natural and artificial GNRA/receptor motifs, we have designed dimeric, trimeric, and tetrameric RNA nanostructures based on the *Tetrahymena* group I ribozymes, which can exhibit catalytic ability depending on controlled oligomerization. Because most of RNA-based nanostructures reported previously are unrelated to naturally occurring RNAs with modular structures, modular redesign of complex RNA structures allows us large ribozymes to be used as modular parts in RNA nanotechnology and RNA synthetic biology [3].

## References

- [1] Ishikawa, J., Fujita, Y., Maeda, Y., Furuta, H., Ikawa, Y. GNRA/receptor interacting modules: versatile modular units for natural and artificial RNA architectures. *Methods*, 54, 226-238 (2011)
- [2] Ishikawa, J., Furuta, H., Ikawa, Y. An in vitro-selected RNA receptor for the GAAC loop: modular receptor for non-GNRA-type tetraloop. *Nucleic Acids Res.*, 41, 3748-3759 (2013)
- [3] Tanaka, T., Matsumura, S., Furuta, H., Ikawa, Y. Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization. *ChemBioChem.*, accepted (2016)

**RNA as a promising biopolymer to generate neobiological structures and functions**

○Yoshiya Ikawa  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** RNA, ribozyme, RNA nanotechnology, group I intron

**2S-Ca07 <招待講演 (韓国生物工学会)>****Biomolecule building blocks for memory device development**

○Hyun Ho Lee  
(Myongji University)  
hyunho@mju.ac.kr

Conjugation of various biomolecules on nanoparticles (NPs) has recently initiated novel works in the nanoelectronic and bioelectronic device. In this presentation, bioelectronic structures using protein, short-peptide, aptamer, antibiotic, oligo-DNA conjugated semiconductor or metal NPs as charge storing elements on metal-pentacene-insulator-silicon (MPIS) floating gate device and metal-insulator-metal (MIM) resistive switching device are introduced and discussed. Particularly, highly specific molecular recognition between streptavidin-biotin, aptamer-cell membrane peptide, chromatin protein-histone protein, and complementary oligo-DNA hybridization mimicked from biological systems have been employed as formation mechanism of self-assembly monolayers (SAMs) of the NPs.

The potential outlook of this research will be a tangible progress of biomolecular electronics implemented by the interface between biomolecules and electronics. In addition, bioelectronic structures using biomolecules of neuro-molecules or neurotransmitters conjugated NPs as nanotrap elements on MIM resistive switching device are demonstrated and discussed. Neurotransmitter molecules were chemically conjugated to the NPs respectively and current/voltage (I-V) characteristics of the resistive switching were detected to show bistable and multistate electrical resistive conditions, which accomplish analog switching characteristics. Thus, the device can open up a bioelectronic device acting as memory and calculation elements simultaneously, aiming at neuromorphic device.

**Biomolecule building blocks for memory device development**

○Hyun Ho Lee  
(Myongji University)

**Key words** Nanoparticle, Memory device, Bioelectronics

**2S-Da01 NanoBiosensors for biomedical applications**

○Eiichi Tamiya  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)  
tamiya@ap.eng.osaka-u.ac.jp

Nanotechnology has come to collaborate with biotechnology. Interdisciplinary Nanobiotechnology researches have been based on nanomaterials, bionano studies and nanodivices. Nanostructured metals have been studied for the localized surface plasmon resonance (LSPR) and electrochemical biosensors. Photonic plasmon spectra are caused by the refractive index variations that result from the binding of molecules to the metal nanostructures. There are optically detectable parameters in biophotonics and biosensor devices. We have studied several types of nanostructures (*Anal.Chem.* 77, 6976, 2005, *Anal.Chem.* 79, 1855, 2007, *ACS Nano*, 3, 446, 2009, *Anal. Chem.* 82, 1221, 2010), (1) gold-capped nanostructure connecting with the core of silica nanoparticle capped by deposited gold film, (2) gold-deposited porous anodic alumina layer chip, (3) gold nanoparticles onto silicon oxide /silicon interferometric multilayer and (4) nano-pillar structures by nanoimprinted polymer materials and sputtering a thin gold layer on them. The bio-sensing of these nanostructures have been examined by monitoring the biomolecular interactions in various flexible formats. Antibody-antigen and DNA hybridization reactions were performed to detect various biomarkers, with the detection limit of picogram levels. The multi array format was constructed by a core-shell structured nanoparticle layer, which provided 300 – 1000 spots on the sensing surface (*Anal.Chem.* 78, 6465, 2006). A microfluidic biochip based on PDMS was useful for real-time analysis, rapid detection. DNA amplification process (PCR) (*Anal.Chim.Acta*, 66,111,2010) and monoclonal antibody production from hybridoma cell library can be monitored. Electrochemistry measurements connecting to LSPR chips were successfully exploited in a simultaneous detectable scheme. The binding of melittin to lipid membrane was measured using localized surface plasmon resonance, and the permeability of the lipid membrane was then assessed electrochemically as a function of melittin with the purpose of seeking a novel, sensitive detection system for peptide toxins (*Anal.Chem.* 80,1859,2008). These nanoporous structures were transferred to the cyclo-olefin polymer film surface from the porous mold by a thermal nanoimprinting process. A plasmonic substrate was fabricated by sputtering a thin layer of gold onto this nanopillar polymer structure and the refractive index response in a variety of media was evaluated. Finally, the biosensing capacity of this novel plasmonic substrate was verified by analysis of human immunoglobulin (*Anal.Chem.* 84,5494, 2012). Gold nanoparticle-antibody can be linked with new electrochemical immunoassay as GLEIA (gold linked electrochemical immunoassay). High sensitive detection of human chorionic gonadotropin (0.36 pg/mL) and insulin (0.1ng/mL) were reported (*Electroanalysis*, 20,14,2008). Antioxidative activity in food and amount of residual pesticides are also monitored by redox indicators and printable electrodes. Microbial respiration activity can be monitored by printable electrodes and mobile detector and applied to rapid measurement of microbial viable cells (*Electrochim.Acta*, 82,132,2012). Electrochemical luminescence was also studied for monitoring enzyme activity and immuno-reactions with luminol-gold nano particles (*Electrochim.Acta* 180,409,2015). Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) was also discussed with gold and silver nanoparticles interacting with bio-molecules. Gold nanoparticles were successfully delivered into single cells. Spatiotemporal measurements of SERS fingerprints suggested the dynamic molecular interactions and transformations taking place at different locations with time in cardiomyocytes (*PLoS ONE*, 6(8) e22801,2011). Raman imaging was also useful for ex vivo analysis for osteoblast differentiation. (*Scientific Reports*, 5:12529, 2015)

**NanoBiosensors for biomedical applications**

○Eiichi Tamiya  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** biosensor, nano biotechnology, immuno-assay, bioimaging

**2S-Da02 Nanobioelectronic device toward biocomputing system**

○Jeong-Woo Choi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Reserach Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)  
jwchoi@sogang.ac.kr

Nanobioelectronic devices based on hybrid biomaterial have emerged as a breakthrough with huge potentiality to generate new concepts and technologies for the development of new age electronic devices. The main concept of bioelectronics was generated from the fact that biomaterial, especially metalloproteins, can be used as a functional unit in an electronic device. Major challenges in bioelectronic field include the miniaturization, and the demonstration of various functions implemented in biomaterial to alter silicon-based electronic devices. It has been difficult to demonstrate a single molecular-based computing device in current computing system, since such silicon-based system requires complex functionality to be developed at the single molecular level. In this point of view, metalloprotein-based conceptual biomemory device was developed which demonstrated memory characteristics including 'read', 'write' and 'erase' function. Further, multi-bit memory function and nanoscale memory function are also demonstrated. Afterwards new hybrid material including metalloprotein/DNA/nanoparticle has been developed to construct bioprocessing device to achieve various functions at the single molecular level. A metalloprotein that exhibits redox property is used as a biomemory signal source, and various nanoparticles with complementary DNA and metal ions are used as input signals to acquire processed output signals. Various functions including 'information reinforcement', 'information regulation' and 'information amplification' are accomplished in this device due to various input signals. The proposed hybrid material-based bioprocessing device by the integration with neural cell should be a new type of platform for development of biomolecular-based biocomputing system.

**Acknowledgements**

This research was supported by Leading Foreign Research Institute Recruitment Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP) (2013K1A4A3055268) and by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. 2014R1A2A1A10051725).

**References**

1. Lee, T.; Kim, S.-U.; Min, J.; Choi, J. W.; *Adv. Mater.*, 2010, 22: 510.
2. Lee, T.; Yagati, A.K.; Min, J.; Choi, J. W.; *Adv. Func. Mater.*, 2014, 24: 1781.
3. El-Said, W. A.; Cho, H. -Y.; Yea, C. -H.; Choi, J. W.; *Adv. Mater.*, 2014, 26: 910.
4. Kim, T. -H.; Yea, C. -H.; Chueng, D. -S.; Yin, P. T.; Conley, B.; Dardir, K.; Pak, Y.; Jung, G. Y.; Choi, J. W.; Lee, K. -B.; *Adv. Mater.*, 2015, 27: 6356.

**Nanobioelectronic device toward biocomputing system**

○Jeong-Woo Choi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Reserach Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)

**Key words** metalloprotein, hybrid material, bioelectronics, bioprocessing device

**2S-Da03 Biomedical application of microfluidic device with low cost flow control**

○Yuzuru Takamura  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)  
takamura@jaist.ac.jp

Many microfluidic devices have been developed for biomedical application, and some of them were functionalized by fluid control on chip. Fluid controls on chip are required especially for the implementation of multi-step procedure of reaction, precise or small sample handling, self-standing chip with automated operation, etc., and these functions constitute a large part of the most attractive features of the microfluidic devices. The micro pumps and valves for those fluid control on-chip, however, request expensive technique and procedures for fabrications sometimes, which are disturbing the easy realization of these chips for practical use. Our groups are studying cost-effective fluid control on-chip. Here, we would like to introduce 3 examples of different types of them; (1) cost-effective and precise pneumatic micro pump for automated immunoassay with washing step, (2) ultra-low fluid control enabling sequential reagent deliver on-paper for full-automated ELISA, (3) low-cost highly integrated pumps and valves with electrical control PZT actuator by solution process for single-cell analysis on tissues.

For the first topic, we developed an automated compact immunoassay chip with low-cost disposable, mass-producible, postage-stamp-size microchip, for measurement of insulin and glucose from whole blood [1]. The microchip consists of five layers of air-layers, diaphragm membrane, flow layers, screen-printed electrodes and substrates. The chip can be produces in-print process and screen printing, and enables whole protocols for immunoassay including sample loading, washing, and loading of reagent for electrochemical measurement. It can measure glucose and sub-nanogram order insulin from 2  $\mu$ l whole blood, within 15-20 min without handling help.

For the ultra-low cost applications, we report a new methodological concept to automated paper-based devices for multistep sequencing of sandwich ELISA [2]. The device is fabricated on the NC membrane, and consists of several flow pathways (channel) separated by barrier-lines patterned by inkjet printer. The required reagents, such as antibodies (Abs) and substrates, were pre-spotted on the membrane at proper locations in the pathways. To use it, people put the end of the device into a sample solution, which migrates along with the channel by capillary action, then dissolves and conveys the pre-spotted reagents. The solution flows into separated channel and/or mix again in a proper timing and sequence by design of the flow-path. Finally, the multi steps of the sequence of ELISA can be performed automatically. We confirmed that a high-sensitive ELISA was successfully performed with the measurement of the human chorionic gonadotropin (hCG). The sensitivity was improved with pre-concentration setup and pH changing system integrated also by paper technique. It enables power-less measurement, with high-sensitivity by enzyme amplification, just by dipping the devices into samples, and waiting few tens minutes.

For more complex applications, we are developing on-chip lead zirconium titanate (PZT) actuators array, using solution process. This process is using functional inks which can be materials for semiconductor, insulator, conductor, structural material, and piezo-electric material, just by painting and annealing. By using these ink, we can fabricate transistor, wires, fluidic channel, sensor-s and actuators with low-cost just by printing and annealing. We already made PZT actuator by solution process with temperature less than 450 degree C, which is advantageous for integration with transistor to drive and control the actuators. By this technique, we can integrate and control thousands of valves and pumps actively on a chip. We are now planning to use this technic to develop a chip for single cells analysis on 2D plane, such as cell array, tissue surfaces, sections, and cultured cell networks.

[1] S. Shiohara, et al., *Microsystem Technologies*, 20, 273-279, 2013.

[2] A. Amara et al., *Lab on Chip*, 13, (2913), 126-135.

**Biomedical application of microfluidic device with low cost flow control**

○Yuzuru Takamura  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

**Key words** biosensor, microfluidic device, lab on paper, ELISA

**2S-Da04 Formation of cellular sticker on extracellular matrix network and its potential medical application**

○Kwanwoo Shin<sup>1,2</sup>, Youhwan Kim<sup>1,2</sup>, Serin Lee<sup>1,2</sup>, Keelyong Lee<sup>1,2</sup>, Sojung Nam<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chemistry and Inst. of Biol. Interf., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Research Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)  
kwshin@sogang.ac.kr

Spontaneous, highly ordered large-scale fibronectin networks driven by electrostatic polymer patterns are fabricated, and these precisely controlled protein connections are demonstrated. It is examined whether this scheme, universal to various fibrillar extracellular matrix proteins beyond fibronectin, collagen, and laminin, can be self-organized. These data reveal a novel bottom-up method to form anisotropic, free-standing protein networks to be used as flexible, transferrable substrates for cardiac and neuronal tissue engineering<sup>1</sup>. We demonstrated applications of these networks to template the formation of ECM composite fibers and cell patches, so-called “ECM-network based cell sheet”. Collectively, our results suggest that proteins that are endowed with  $\beta$ -sheet molecular domains and do not require external crosslinking to form insoluble fibers are capable of self-assembling into networks and that these precisely controlled connections provide a flexible, transferable substrate customized for tissue engineered cardiac and neuronal scaffolds. In this method, one of the most advantageous points is that one can use patient’s own cells to produce the patient-specific patches, while minimizing severe inflammation. Therefore, we will present our recent application, applying self-healing patches for dermatological, and organ-specific application.<sup>2</sup> Recently, we further developed to initiate the ECM fibrologenesis on lipid vesicles. We controlled the surface charge density of unilamellar lipid vesicles, and monitored the surface adsorption and network-formation of ECM proteins (collagen and fibronectin). Improved mechanical strength against osmotic pressures was carefully measured. Once the ECM network formed on the vesicle surface, the mechanical properties of liposomes were changed. We could finally mimic the living cellular properties with these minimal cell structures, artificially fabricated with ECM and lipid molecules.<sup>3</sup>

1. Seungkuk Ahn, et al., *Adv. Mater.* 27 (18), 2838-2845 (2015)

2. Youhwan Kim, et al., *Int. Neurolog J.*, 20 Suppl 1, S23-S29 (2016)

3. Kwanwoo Shin, submitted (2016)

**Formation of cellular sticker on extracellular matrix network and its potential medical application**

○Kwanwoo Shin<sup>1,2</sup>, Youhwan Kim<sup>1,2</sup>, Serin Lee<sup>1,2</sup>, Keelyong Lee<sup>1,2</sup>, Sojung Nam<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chemistry and Inst. of Biol. Interf., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Research Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Sogang Univ., Korea)

**Key words** extracellular matrix, fiber, fibronectin, Liposome

**2S-Da05 Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip**

○Tatsuhiko Ozawa, Hiroyuki Kishi, Atsushi Muraguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Pharm. Sci., Univ. Toyama)  
toz@med.u-toyama.ac.jp

Monoclonal antibodies produced by single B-cell clones are widely used in laboratory researches as well as clinical applications due to their high specificity and high affinity. Because each B-cell clone expresses an antibody with a unique antigen-binding structure and because more than  $10^9$  B-cell clones producing distinct antibodies exist in each individual, it is difficult to detect and identify antigen-specific antibody-producing B-cells whose frequencies are very rare. Hybridoma cells are conventionally produced for producing mouse monoclonal antibodies. However, production of human or rabbit hybridoma cells is difficult.

To overcome this problem, we have developed a lymphocyte-microarray chip with a large number of microwells whose size and shape just fit for capturing a single cell. The chip allows rapid and comprehensive analysis of single cells. We have utilized lymphocyte-microarray chip and developed novel system for screening antibody-secreting cells at single cell levels (immunospot array assay on a chip, ISAAC). It can detect antigen specific antibody-secreting cells from primary human or rabbit peripheral blood mononuclear cells and can produce their antigen-specific monoclonal antibodies within a week. Using ISAAC technology, we obtained many human or rabbit monoclonal antibodies that were specific to viruses, autoantigens, phosphorylated peptides, and G-protein coupled receptors. In this talk, I would like to introduce lymphocyte-microarray chip, the generation of monoclonal antibodies using the chip and the applications of the produced antibodies.

**Rapid generation of monoclonal antibodies using lymphocyte-microarray chip**

○Tatsuhiko Ozawa, Hiroyuki Kishi, Atsushi Muraguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Pharm. Sci., Univ. Toyama)

**Key words** monoclonal antibody, lymphocyte-microarray chip, ISAAC

**2S-Da06 A soft microfluidic device as an in vitro model for studying mechanobiology of tubular organs**

Hyeonji Yu<sup>1,2</sup>, Dongwon Kang<sup>1,2</sup>, Kwangin Shin<sup>1</sup>, Minji Hwang<sup>1,2</sup>,  
○Jungwook Kim<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Res. Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Korea)  
jungwook@sogang.ac.kr

Mechanobiology is a field of science at the interface of biology and engineering and focuses on the way that physical forces and changes in cell or tissues mechanics contribute to development, physiology, and pathological condition. For example, mechanobiological study on the formation of atherosclerotic plaque in arteries revealed that disturbed blood flow near geometrically complex arteries - curved, branched, or bifurcating - contributes to increases in the permeability of endothelium and the recruitment of leukocytes, which in turn make such arterial regions to be more prone to the formation of atherosclerotic plaque. A number of tubular organs exist in our body, e.g. blood and lymphatic vessels, airways of lungs, and urethra, inside which fluids flow and exert mechanical forces, e.g. hydrostatic pressure, circumferential stress, and shear stress on luminal walls. Characteristics of the mechanical force vary upon geometrical and mechanical properties of luminal walls, which may also be varied temporally during development or pathogenesis. In light of this, a development of in vitro models of tubular organs whose geometrical and mechanical properties, and hence, the forces exerted by fluids on cells comprising luminal walls can be varied systematically would be helpful in studying mechanobiology of tubular organs. Here we present the unique method to develop the soft tubular microfluidic device that recapitulates geometrical and mechanical properties, and thus the forces exerted by fluids, of vasculatures and their pathological condition. For future studies, we aim to systematically explore the effects of the forces exerted by the blood on ECs attached on the hydrogel channel.

**A soft microfluidic device as an in vitro model for studying mechanobiology of tubular organs**

Hyeonji Yu<sup>1,2</sup>, Dongwon Kang<sup>1,2</sup>, Kwangin Shin<sup>1</sup>, Minji Hwang<sup>1,2</sup>,  
○Jungwook Kim<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., Korea, <sup>2</sup>Res. Center for Sogang-Harvard Disease Biophysics, Korea)

**Key words** hydrogel, microfluidic device, mechanobiology

## 2S-Da07 <招待講演 (韓国生物工学会)>

### Aptamer-based strategies for biosensing and switching of DNA polymerase

○Hyun Gyu Park

(Dept. Chem. Biomol. Eng., Korea Adv. Inst. Sci. Technol.)  
hgpark@kaist.ac.kr

In this presentation, I will introduce several aptamer-based innovative technologies developed in my group. First, a novel DNAzyme molecular beacon strategy was developed for target-induced signal-amplifying colorimetric detection of target nucleic acids and target protein. By rationally designing enzymes for signal amplification, ultrasensitive aptasensors were developed and successfully tested in systems to detect target nucleic acids and target lysozyme with a detection limit down to 1 pM and 0.1 fM, respectively. We also probed a novel concept that target DNA can induce switching of DNA polymerase activity, which was successfully employed to identify the presence of target DNA with high levels of sensitivity and selectivity. We further developed a new strategy to modulate DNA polymerase activity in a reversible and switchable manner by utilizing specific metal ion-mediated base pairings (T-Hg<sup>2+</sup>-T and C-Ag<sup>+</sup>-C) within DNA aptamer having the inhibitory capability against DNA polymerase. These works will greatly advance aptamer-based strategies for biosensing and artificial modulation of DNA-related biological reactions.

### Aptamer-based strategies for biosensing and switching of DNA polymerase

○Hyun Gyu Park

(Dept. Chem. Biomol. Eng., Korea Adv. Inst. Sci. Technol.)

**Key words** biosensor, DNA aptamer, DNA polymerase, DNA switch

## 2S-Ea01 新規3酵素の組み合わせによるcDNA合成技術の開発

○保川 清

(京大院・農)

yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp

RNA解析の情報量はDNA解析よりも多い。例えば、トランスクリプトーム解析では同一個体でも細胞種や外部刺激が異なれば、結果が異なる。一方、RNA解析の中核をなすcDNA合成技術は1980年代から進歩しておらず、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)あるいはトリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)由来の逆転写酵素(RT)が使われ続けている。cDNA合成は、鋳型RNAがつくる二次構造およびRTの不安定性により、感度あるいは正確性(正しいヌクレオチドを取込む性能)がDNA合成に及ばない。

近年、MMLV RTにおいて、鋳型プライマーとの結合領域に存在し側鎖が負電荷を有する残基(E286、E302)が正電荷を有する残基に、分子表面に存在する疎水性残基(L435)が電荷を有する残基に、RNase H活性の触媒残基(D524)がAlaにそれぞれ置換されることにより耐熱性が向上した変異体E286R/E302K/L435R/D524A(MM4)が開発された1)。また、高い耐熱性と校正活性を有する好熱性細菌*Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ(K4pol)において、RNAとの結合でリボース2'位水酸基と立体障害を起こすと予測されたL329がAlaに置換されることにより逆転写活性を獲得した変異体K4pol<sub>L329A</sub>が開発された2)。さらに、超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*由来スーパーファミリー2のDNA/RNAヘリカーゼであるTk-EshAが、PCRで見られる非特異的増幅を軽減させることが見出された3)。我々は、MM4、K4pol<sub>L329A</sub>、Tk-EshAの組み合わせることにより、RNAの二次構造やプライマーのミスアニールをなくすことによる高感度なcDNA合成技術の開発を試みた。これまで知られているMM4、K4pol<sub>L329A</sub>、Tk-EshAの最適反応条件は異なる。我々はタグチメソッドとよばれている品質工学の技法を用いて、嘔吐型セラウス菌の毒素であるセラウリド合成遺伝子cesDのmRNA4をモデルRNAとして、16のパラメーター(MM4、K4pol<sub>L329A</sub>、Tk-EshA、dNTP、KCl、Tris-HCl、Bicine-NaOH、MgCl<sub>2</sub>、Mn(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>COOK、トレハロース、ATP、大腸菌RNA、プライマー、グリセロールの各濃度および反応温度)を最適化した。その結果、MM4だけを用いたcDNA合成と比較して、感度が100~1000倍向上した。このことから、これら新規3酵素の組み合わせがcDNA合成反応に有用であることが示唆された。この開発は独立行政法人科学技術振興機構の研究開発成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム)による成果である。

1. K. Yasukawa et al. *J. Biotechnol.* 150, 299-306 (2010)

2. S. Sano et al. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 315-321 (2012)

3. A. Fujiwara et al. *Appl. Environ. Microbiol.* in press (2016)

4. K. Yasukawa et al. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 391-396 (2009)

### Development of cDNA synthesis method with a combination of novel three enzymes

○Kiyoshi Yasukawa

(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** cDNA, reverse transcriptase, DNA polymerase, helicase

## 2S-Ea02 デジタル PCR の高感度化と臨床診断への応用

○柳原 格, 名倉 由起子, 吉村 芳修  
(大阪母子保健総合医療センター)  
itaruy@mch.pref.osaka.jp

デジタル PCR は、最近開発された技術で特にコピー数（あるいは発現量）の少ない遺伝子の検出に適している。一方、通常のリアルタイム PCR 機器で定量解析が十分にできるサンプルをデジタル PCR を用いて解析する意味は無い。デジタル PCR がその威力を発揮するのは、反応溶液中に存在する数コピーから数十コピー、せいぜい数百コピーの遺伝子を同定するような場合に限られる。またデジタル PCR の利点の一つは、通常のリアルタイム PCR と異なり絶対定量を行う際にスタンダード遺伝子の検量線を作成する必要がない。

市販されているデジタル PCR 機器には大きく 2 つの方式が採用されている。一つはドロップレットと呼ばれる微細な液滴中に 1 分子の遺伝子が入るように調整し PCR を行う方式である。Bio-Rad Laboratories 社などが採用している。他方 Thermo Fisher Scientific 社は、20,000 個のウェルに十分に希釈したサンプルを入れて PCR 反応を行い、陰性ウェル数を求め絶対定量を行う。これらいずれの方法も 1 ドロップ或いは 1 ウェル中に 1 分子の遺伝子が入ることが理想であるが、必ずしもそうはならないため、ポワソン分布などの計算により各社ソフトを用いて補正を行っている。

さて、デジタル PCR 技術の臨床応用について概説する。演者の専門の感染症の立場からすると、例えば数は少なくとも極めて病原性が高い細菌やウイルスの微量同定が可能な場合、隔離を含めた対策が取りやすい。より高感度に絶対定量できる本技術は非常に有用である。また、ウイルス疾患などで治療効果や、病状把握のため、従来は検出が困難なレベルでのウイルス量の定量は、病勢や病態を知る上でも重要である。また、次世代シーケンサーを用いた膨大なメタゲノム情報から臨床に重要な菌を抽出し、同定してゆくのは実際には経験と知識が必要でなかなか困難な作業である。次世代シーケンサーで得られたデータを補完する意味においても極微量の細菌核酸を定量できるデジタル PCR はパワフルなツールとなる。他方、デジタル PCR は、レアな変異の検出にも威力を発揮する。例えば 1 万個に 1 個の癌関連遺伝子の変異を見つけることも理論上可能である。次世代シーケンサーによる癌関連遺伝子の解析と併せて用いることにより、残存腫瘍の検索や、超早期再発の検出など、臨床に重要な情報が得られる。これらの技術応用は、今はまだ実験的な側面が多いが症例を重ねることにより、本技術のより広い臨床応用が加速するものと考えられる。

デジタル PCR の技術的な問題点について言及する。ドロップレットであれ、ウェルであれエンドポイント PCR の結果が反映される。微量 PCR 反応を如何に効率的に行い、バックグラウンドと正確に区別するかは重要である。我々は、ヘリカーゼを利用し、臨床応用を視野に入れた効率的な核酸増幅技術の開発を行ってきた。デジタル PCR は 98℃ に変性行程があるため、特に耐熱性ヘリカーゼに着目した<sup>1)</sup>。非特異的な増幅を避けるため TaqMan プローブを用い 20,000 ウェルチップを用いてデジタル PCR を行った。その結果、これまでのところ耐熱性ヘリカーゼの添加によりデジタル PCR の効率が改善される場合があることが分かってきた。遺伝子の配列によりその効果は変動したため、標的に応じた最適化は必要である。デジタル PCR 技術を臨床現場での汎用性の高い医療技術として進化させるには、多くの臨床検体を用いた検討と、さらなる高感度化（革新的な 1 分子 PCR 増幅技術の開発など）が望まれる。

(1) Fujiwara A. et al., Appl. Environ. Microbiol., 82, 3022-31 (2016)

## Digital PCR, its clinical application

○Itaru Yanagihara, Yukiko Nakura, Michinobu Yoshimura  
(Dept. Dev. Med., Res. Inst., MCH Osaka)

Key words digital PCR, helicase

## 2S-Ea03 CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術開発から学ぶこと

○石野 良純  
(九大院・農)  
ishino@agr.kyushu-u.ac.jp

生物は自らの遺伝情報の安定な維持と子孫への伝達のために、種々の DNA 代謝酵素を有する。DNA 複製、修復、組換えなどの生命の基本メカニズムを理解しようとする研究が、DNA に作用する酵素の発見に繋がり、試験管内で DNA を切り貼りする遺伝子操作技術をもたらした。生物学における技術革新である。その後、耐熱性 DNA ポリメラーゼの研究が PCR 技術の実用化に繋がり、遺伝子操作が顕著に簡便になった時に二度目の技術革新が起きた。最近脚光を浴びている RNA 誘導型ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術は、その簡便性の高さにより急速に普及し、3 度目の技術革新をもたらした。演者が 1986 年に発見した奇妙な繰り返し配列は、大腸菌のリン酸代謝制御機構の分子生物学的研究で、アルカリホスファターゼアインソザイム形成に関わる酵素の遺伝子解析の中で見つかった。1ap 酵素をコードする遺伝子の下流に、29 ヌクレオチドからなる規則正しい繰り返し配列が、32 ヌクレオチド長のスペースを挟んで 5 回繰り返し配列が、この独特の繰り返し配列が何を意味するか不明であったが、これが後に、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) と呼ばれることになる。生命科学がゲノム解析時代に入り、多くの遺伝子配列データが蓄積されたことによって、CRISPR がアーキアの大部分と真正細菌の半分に見ること、繰り返し配列に挟まれたスペーサー領域がウイルスやプラスミドなどの外来遺伝子と類似性があることがわかった、また CRISPR の近傍には保存された遺伝子クラスターが見つかり、CRISPR と関連する機能を有していると予想されて、cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) と名付けられた。こうして、CRISPR が原核生物の獲得免疫機能を担うことが予想され、それが実験的に証明された。cas は外来 DNA に対する免疫獲得と、次に同じ DNA が侵入した時にそれを切断するために必要な種々の酵素、蛋白質因子 (Cas) をコードしている。遺伝子操作のはさみの役目をする制限酵素が外来 DNA を切断して、感染から自分自身を守る機能を担うように、CRISPR-Cas の免疫系もある特定の DNA を切断することで免疫を発揮するので、その機構をゲノム上の狙った位置での切断技術に応用できることに気付いた研究者は、CRISPR-Cas を用いたゲノム編集操作を試み、見事実用的な技術開発に成功した。演者が 1986 年（論文は 1987 年）に発見した繰り返し配列は、ゲノム編集技術に応用されたことで、30 年の時を超えて思いがけなく CRISPR として有名になった。本講演では、CRISPR 発見からその応用に至るまでの軌跡を辿りながら、CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術を概説するとともに、画期的な技術開発によって核酸関連酵素研究が如何に重要であるかを議論したい。

## CRISPR/Cas9 ~from discovery of CRISPR to application for the practical genome editing~

○Yoshizumi Ishino  
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words genome, enzyme reaction, DNA binding, DNA-binding protein

**2S-Ea04 核酸分解酵素の組み合わせによる迅速なゲノム合成手法の開発**

○板谷 光泰  
 (慶應大先端生命研)  
 mita2001@sfc.keio.ac.jp

生物(細胞)は全てゲノムを保有している。ゲノムは数百から数千の遺伝子を含む DNA 高分子であり、この巨大 DNA、特に 500 kb を超える DNA を無傷で丸ごとクローニングできる宿主は枯草菌(1)と酵母(2)に限られる。現存のゲノムを丸ごと取り扱うだけでなく、新たに有用なゲノムを設計してそれを完全合成できる時代になっている。即ち生物(細胞)の生き様そのものを計画的に予測し設定することが可能になったことから、特定の遺伝子が在る(または無い)ことを前提にしたゲノムデザイン手法が今後の大きな課題である。丸ごとクローニング、ゲノム合成、そしてゲノム編集の手段は通常の遺伝子クローニング技術とは異なることが多い。我々は、枯草菌を宿主として巨大 DNA を合成するシステムを構築する道程(3)で核酸分解酵素を多用しており、「核酸合成」のために「核酸分解酵素」を使用するという一見パラドックスに見える例を紹介したい。「ゲノム設計→ゲノム合成→細胞への導入→有用細胞→ゲノム再設計→」の循環を繰り返す合成生物学的なアプローチでは時として自然に学ぶ方法論は有効である。新規な機能を持つ核酸分解酵素の必要性も含めて巨大 DNA 合成のためのツールとして核酸分解酵素の選択と応用を考えてみたい。

**【参考文献】**

- (1) Itaya, et al., PNAS, 102, pp15971-15976 (2005).
- (2) Hutchison, et al., Science, 351,(2016).
- (3) 板谷、柘植.日本生物工学会誌 91, pp319-321 (2013).

**Use of certain DNases to synthesize large-sized genome DNA**

○Mitsuhiro Itaya  
 (Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.)

**Key words** *Bacillus subtilis*, genome engineering, genome synthesis, deoxyribonucleases

**2S-Ea05 Point of care testing を志向した多項目遺伝子検査**

○佐野 創太郎, 兼崎 祐介, 宮本 重彦  
 (カネカ)  
 Sotaro.Sano@kaneka.co.jp

PCR などの核酸増幅法の開発により、核酸の分析技術は飛躍的に向上した。これらの技術を応用した遺伝子検査は、免疫的検査などに比べ相対的に高い検出性能を有しており、今では感染症検査や食品の品質検査などに不可欠な検査方法となっている。また近年、患者にとってより身近な場所(小規模医療施設やベッドサイドなど)における早期診断を志向した POCT (Point of care testing) という検査コンセプトが注目されており、遺伝子検査に関しても早期診断に資する POCT としての活用が期待されている。しかし、一般的な遺伝子検査は、煩雑な工程、長い時間、高価で大型の専用機器が必要であり、十分な設備や専門性の高い人員の確保が困難な小規模医療施設や発展途上国における普及が立ち遅れている。

当社では、遺伝子検査の簡便・迅速化技術の開発を通してこの課題解決に取り組んでおり、その中で“カネカ核酸クロマト型チップ”を開発した。核酸クロマト型チップは、ペーパークロマトグラフィーと DNA-DNA ハイブリダイゼーションの原理を応用した検出チップであり、PCR 産物を約 5 分で目視検出することができる。核酸クロマト型チップを用いた遺伝子検査においては、3'側の標的 DNA に相補的なプライマー領域と 5'側の DNA タグ領域を、非天然修飾部位で繋いだ特殊なプライマーを利用する。このプライマーを利用して PCR を行うと、DNA ポリメラーゼによる伸長反応は非天然修飾部位においてブロックされ、5'側に一本鎖の DNA タグを有する PCR 産物が得られる。これらの両末端に存在する 2 種類の DNA タグは、それぞれ検出チップや着色粒子に固定化された DNA プロローブ (DNA タグと相補的な一本鎖 DNA) と、熱制御などの特別な処理を必要とせず、室温下で選択的に結合する。つまり、このシステムによれば、一般的な PCR 産物の検出において必要な電気泳動槽や蛍光検出機を用いずに、PCR 産物をチップに展開するだけの簡便な操作で、その有無を迅速に判定することが可能である。また、DNA タグと DNA プロローブの組み合わせは理論上無数に存在するため、検出チップ上に固定化する DNA プロローブの種類や位置、着色粒子の色を変えることにより、多項目同時検査にも容易に対応可能である。

本講演においては、①DNA ポリメラーゼの鋳型認識特性を利用した核酸クロマト型チップの開発経緯、②高感度化および多項目化に関する取り組み、③核酸クロマト型チップを用いたウイルス感染症および食中毒原因菌の検査システムに関する内容を紹介します。

**Multiplex nucleic acid detection chip towards point of care testing**

○Sotaro Sano, Yusuke Kanazaki, Shigehiko Miyamoto  
 (Kaneka corp.)

**Key words** multiplex PCR, DNA polymerase, DNA chip, POCT

**2S-Ea06 簡便な遺伝子検出法「NASBA - 核酸クロマト法」の原理とその応用**

○宇治家 武史, 林 司  
(カインス)  
ujiie-t@kainos.co.jp

これまで微量な標的遺伝子を高感度に検出するために、PCR法を始めとしてNASBA法やLAMP法など様々な核酸増幅法が開発されてきた。核酸の検出法にも様々な技術があるが、標的核酸の配列情報を利用するか否かで2つに大別される。前者はハイブリダイゼーションに基づくTaqManプローブ法や核酸クロマト法などであり、後者にはゲル電気泳動法やピロリン酸マグネシウムを利用した濁度検出法が含まれる。このセッションでは、NASBA核酸増幅法と核酸クロマト法を組み合わせた遺伝子検出法技術について焦点をあて、その原理や応用例について報告する。

NASBA法は、3種類の酵素（逆転写酵素、RNase H、T7 RNA polymerase）と2種類のプライマーを用いた定温核酸増幅法である。具体的には1本鎖核酸（主にRNA）から逆転写酵素とRNase Hの作用で標的遺伝子に対するプロモーター付きのds-cDNAを形成させ、T7 RNA polymeraseによる転写反応で多量の本鎖RNAを合成する方法である。この一連の増幅反応は定温下で進行するため、ヒートブロックがあれば実施可能であり（特殊な専用機器は必要ない）、その増幅性能は10コピーの合成RNAを30-90分間で10<sup>12</sup>倍に増幅する。また、NASBA法の増幅産物が一本鎖RNAであるため、以降の検出反応にハイブリダイゼーション法を利用する場合、変性工程を省略できるメリットがある。

核酸クロマト法は、標的核酸をクロマトストリップ上でラテラルフローにより検出する技術である。その検出操作は展開液を加えた増幅産物をクロマトストリップ上で展開するだけであり、非常に簡単である。標的核酸固有の塩基配列とサンドイッチハイブリする捕捉及び標識の2種オリゴプローブを設計することで特異性の高い検出が可能である。標識オリゴプローブに着色粒子を結合することで、標的核酸の目視検出ができる。更にクロマトストリップ上の捕捉用オリゴプローブの種類を増やせば、複数の標的を1つのストリップで識別検出することも可能となる。

NASBA-核酸クロマト法の応用例として、ゲノム変異の多いRNAウイルスの1つであるノロウイルスの検出や、市中肺炎の主要な原因菌である5菌種（*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*）のMultiplex NASBA、増幅反応阻害確認用のInternal Controlとの共増幅系、短時間での検出例、二本鎖核酸への応用などを紹介する。

**NASBA – nucleic acid chromatography, a rapid and easy-to-use method for gene detection**

○Takeshi Ujiie, Tukasa Hayashi  
(KAINOS LABORATORIES, INC.)

**Key words** NASBA, nucleic acid chromatography

**2S-Ap01 植物病害に対する微生物農薬の研究開発の現状および今後の展望**

○吉田 重信  
(農研機構・中央農研)  
yoshige@affrc.go.jp

微生物農薬（ここでは微生物殺菌剤を指す）を活用した植物病害の生物的防除は、近年問題となっている薬剤耐性病原菌の出現や農薬残留の問題等を解決するための有力な病害防除手段として注目され、そのさらなる研究および製剤開発への期待が世界的規模で高まっている。しかしながら、我が国における近年の微生物農薬の販売量は、横ばいあるいは漸減の傾向となっている。我が国で微生物農薬の利用拡大が伸び悩む要因には様々なことが想定されるが、その中の一つに難防除病害である土壌伝染性病害（土壌病害）に対する開発が遅れていることが挙げられる。生産現場では土壌病害の防除に対するニーズは高い一方で現有する防除手段は限られていることから、土壌病害対策用の微生物農薬を新たに開発し防除手段の選択肢を広げることが、生産現場での問題解決を図る上で喫緊に取り組むべき課題となっている。さらに、近年の我が国の農業においては、農業従事者の高齢化等に対応するための省力化・低コスト化技術の開発がより一層求められており、病害虫防除技術分野においては、より幅広いスペクトラムを持つ農薬の開発に対する期待も高まっている。例えば、野菜・畑作に対する殺菌剤と殺虫剤のそれぞれ単独の出荷金額は、近年減少傾向であるにも関わらず、病害と虫害を一剤で防除する「殺虫殺菌剤」に該当する化学農薬の出荷額は増加傾向にある。このことは、生産者が農薬散布の省力化および低コスト化に対する高い指向性を持っていることを示唆している。すなわち、病害と虫害の一剤防除を可能とする等の幅広いスペクトラムを持つ微生物農薬を開発することは、化学農薬の低減を目指す生産者や産地に対し防除手段の選択肢の幅を広げることにつながるだけでなく、農業使用の省力化および低コスト化にも貢献でき、総合的病害虫雑草管理（Integrated Pest Management: IPM）の一層の推進に役立つことが期待できる。

こうした背景のもと、演者らの研究グループは、一般に防除が困難とされ、多くの現場で被害が深刻となっているナス科野菜の土壌病害であるトマトおよびナスの青枯病、トマト萎凋病および根腐萎凋病を対象に、将来的に微生物農薬として開発できる微生物を選抜し、その効果的な処理法の開発を目指す研究を、農林水産省のプロジェクト研究「低投入型農業のための生物農薬等新資材及びその利用技術の開発」（平成23～25年度）の中で行った。この中で、元来害虫に対し殺虫活性を示すことが知られている幾つかの微生物を用いて検討を行ったところ、細菌では *Bacillus thuringiensis*、糸状菌では *Paecilomyces tenuipes* が、トマト青枯病等の土壌病害に対しても実用性の高い抑制活性を持つことを見出し、これらを虫害と病害の両方への効果（デュアルコントロール効果）を示す微生物として活用出来る可能性を明らかにした。本講演では、微生物農薬開発の現状および本プロジェクト研究の背景に加え、上述のプロジェクト研究で得られた成果として *B. thuringiensis* および *P. tenuipes* による実際の病害発生抑制試験の成績や推定される抑制機構等について概説するとともに、これら微生物の効果的な活用への提言および実用化に向けた展望等についても触れてみたい。

**Current progress and perspectives on development of biopesticides against plant diseases**

○Shigenobu Yoshida  
(NARO/ARC)

**Key words** biopesticide, soilborne disease, *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces tenuipes*

## 2S-Ap02 植物の免疫システムと共棲微生物を介した環境適応

○西條 雄介, 晝間 敬  
(奈良先端大・バイオ)  
saijo@bs.naist.jp

植物の細胞表面には微生物の構成成分 Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP)や、自己の細胞ダメージシグナル Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP)を認識して防御応答を誘導するパターン受容体が備わっている。それにもかかわらず、植物の体表や組織内には無数の共棲微生物が病兆や防御応答を引き起こすことなく棲息しており、植物の栄養吸収や生体防御を助ける有用菌は持続的農業を推進するシーズとして高い注目を集めている。しかしながら有用菌を安定して活用するためには、宿主植物と共棲菌の相互作用を制御する仕組みに関する理解を深めることが極めて重要な位置付けにある。私たちは、野外圃場や温室で土栽培のアブラナ科植物から組織内に棲息している糸状菌を単離して、モデル植物シロイヌナズナにおいて植物の成長促進効果を指標に機能評価を進めている。炭疽病菌と極めて近縁な *Colletotrichum* 属糸状菌でありながら、顕著な植物成長促進効果を有する菌株を単離して、菌の感染生理や菌に対する宿主植物の免疫応答を調べている。その結果、宿主植物は共棲菌との間で環境条件や両者の遺伝子背景次第で運命が激変するようなダイナミックな相互作用を展開していること、並びに MAMP/DAMP 受容体を始めとする植物の免疫システムによる菌の制御が成長促進効果には必要であることを示唆する知見を得た。その他の最新の研究成果と合わせて報告する。

## 2S-Ap03 水生植物由来 PGPB の作用機構と農作物への利用可能性

○森川 正章, 三輪 京子  
(北大院・環境)  
morikawa@ees.hokudai.ac.jp

地球上のあらゆる動物や植物は微生物と共生していると言っても過言ではない。近年、ヒューマンマイクロバイオームやプラントマイクロバイオームなど網羅的に微生物叢を解析する研究も盛んに行われている。微生物にとって、植物と共生することには光合成作用でつくりだされる栄養分を享受できる利点がある。一方、植物にとって病原菌は困り者であるが、病原菌を排除したり成長を助けてくれる作用をもった有益な細菌も根粒菌をはじめ多く知られている。しかしこれまでの植物にまつわる微生物共生の研究は作物野菜や穀物あるいは樹木など土壌植物を対象とするものがほとんどであった。私たちは、いまから5年ほど前に北海道大学植物園に自生しているアオウキクサの表層から植物の成長速度をおよそ2倍に加速する付着細菌 (Plant Growth-Promoting Bacteria: PGPB, 学名 *Acinetobacter calcoaceticus* P23) を発見した。すなわち、一旦無菌化したコウキクサなどのウキクサ植物に PGPB-P23 を共生させると無菌コウキクサに比べて葉 (葉状体という) の数がどんどん増えて行く。当初この細菌は水質浄化作用を目的に高性能なフェノール分解菌として選抜してきたものであり、コウキクサと共生することで外部から栄養を与えなくても光照射条件下において持続的に分解活性を発揮できることも報告している<sup>1)</sup>。そしてあらかじめ PGPB-P23 を表層に付着優占化させたコウキクサが下水二次処理水や河川水など環境水中においても良好に生育し、野生コウキクサに比べてやはり2倍程度のコウキクサバイオマス生産速度や水質浄化速度を示すことを JST-ALCA プロジェクト研究「根圏微生物共生系を活用した高次植生バイオプロセスの開発 (近藤昭彦 PL)」において実証している。また、最近になって PGPB-P23 が生産する水生植物の成長を促進する微生物因子: PGFAC23 および、その合成に関わる遺伝子群を特定することにも成功した<sup>2)</sup>。興味深いことに、PGFAC23 はさまざまな土壌微生物が生産するインドール酢酸やシデロフォアなどの低分子の植物成長促進因子とは異なっていた。多くの外生共生細菌は植物表面などに付着する為の接着剤として細胞外多糖を分泌するが、PGPB-P23 が分泌する細胞外多糖こそが PGFAC23 であり、これがコウキクサの成長を促進しているらしい。この細胞外多糖 PGFAC23 は分子量 5,000 ダルトンを超える高分子化合物であるために植物に取り込まれることはなく、植物の表面にとどまって成長を促す刺激物質となっているのかも知れない。すなわち、細菌 PGPB-P23 を投与する方法以外に PGFAC23 を製剤化してこれを一度水槽に投入しておけばコウキクサ植物の成長を長期間にわたって促進し続けてくれる可能性がある。長い生命の歴史においてコウキクサと付着細菌 PGPB23 相互にどのようなやりとりがあって、PGFAC23 の構造にゆきつuitたのか共進化の点でも大変興味深い。

一方、PGPB-P23 を含む JST-ALCA プロジェクト研究で発見した多くの水生植物由来 PGPB は、植物に対する成長促進と同時にクロロフィル量を増大させる効果を有している。そこで作物植物についても同様の効果が見られるかについて水耕栽培レタスとイネについて試験したところ、わずかではあるが大腸菌など非成長促進細菌に比べて有意なクロロフィル量の増加が観察された<sup>3)</sup>。今後、水生植物由来 PGPB が新たな有用微生物資源として植物工場での省エネ作物生産技術などに貢献できれば幸いである。

1) Yamaga F, Washio K, Morikawa M. (2010)

Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*. *Environ. Sci. Technol.* 44(16), 6470-6474

2) 特願 2015-130895 「植物の生長を促進する方法、植物生長促進物質を製造する方法及びこれらに利用されるタンパク質」

3) Suzuki W, Sugawara M, Miwa K, Morikawa M. (2014)

Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca saliva* (lettuce).

*J. Biosci. Bioeng.* 118(1), 41-44

## Immune control of endophytic microbes in plants for stress adaptation

○Yusuke Saijo, Kei Hiruma  
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

## Functional mechanism of aquatic PGPB and its potential use for crop production

○Masaaki Morikawa, Kyoko Miwa  
(Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

**Key words** plant immunity, endophytic microbes, plant-microbe interactions

**Key words** plant growth-promoting bacteria, PGPB, *Lemna minor*, *Acinetobacter calcoaceticus* P23

## 2S-Ap04 *Trichoderma asperelloides* SKT-1 株のイネ種子消毒剤としての開発と企業化

○渡辺 哲  
(クミアイ化学工業株式会社)  
s-watanabe@kumiai-chem.co.jp

従来から、農作物の効率的な生産のため化学合成農薬が使用されてきた。近年、化学農薬をはじめとする化学合成品の環境汚染や環境負荷が社会問題として取り上げられているが、効率的な作物生産は、限られた耕地面積から作物を得て、人々の生活を支えるために重要な課題である。このような社会情勢の中、環境汚染や環境負荷を低減し、かつ効率的な作物生産を行うための一手段として、自然界に存在する微生物を利用した病害虫防除法、すなわち微生物農薬による防除が目ざされてきた。しかしながら、一般に微生物農薬は1) 効果が緩慢である。2) 対象病害虫に限られる。3) 生きた生物を利用する点から、保存安定性に欠けるため流通性に乏しい。4) 化学農薬に比べ値が高い。5) 生物-生物間の現象であるため、作用メカニズムが不明瞭である。などの問題点があるため、企業による商品化には不向きであるとされてきた。

本講演ではバイオコントロール微生物 *Trichoderma* 属糸状菌 SKT-1 株が、イネ種子伝染性病害に対して化学農薬に匹敵する防除活性を示し、且つ、その適用病害が広いことに着目し、上記の問題点を克服することで SKT-1 株の商品化に成功したことを作用メカニズム研究の結果と併せて報告する。

*Trichoderma* 属糸状菌 SKT-1 株 (以下 SKT-1 株) は、すでに報告があるようにイネ種子伝染性病害に対して化学農薬に匹敵する防除活性を有する。Biocontrol agent (以下、BCA) を“種”レベルまで同定することによって、環境生物に対する安全性の予測が可能になる。そこで SKT-1 株の SEM(scanning electron microscopy)による形態観察及び rDNA ITS のシーケンスによる菌学的同定を行ったところ、本株は *Trichoderma asperelloides* と同定された。現在までに報告されている *T. asperelloides* は、ヒト、動物及び植物に対する病原性に関する報告は一切ない。*T. harzianum* はマッシュルーム栽培における有害菌であり、さらに *T. viride* はイネに対する立枯病菌として知られているが、*T. asperelloides* は過去に植物病原菌としての報告はない。他方、BCA の生育至適温度などの生理的諸性質を明らかにすることは、高い防除活性を BCA に発揮させるための必要条件となる。そこで SKT-1 株の生育至適温度を調べたところ、一般に行われているイネの催芽温度や育苗温度 (30℃) と一致することを確認した。

さらに、SKT-1 株の効率的で安価な菌体生産のため、培地成分及び培養条件を検討することによる大量生産方法の研究を行った。また、生きた微生物である SKT-1 株の流通性向上のため、製剤組成に関する研究を行った。液体培養で得られた胞子は固体培養で得られる分生胞子とは異なり、耐久性に乏しかった。従って、保存形態は冷蔵を要するものとなったが、分生胞子に比べ低いコストで生産することができ、この液体培養によって得られた胞子を製剤化したエコホープ® (登録番号 21009 号) を商品化した。一方、固体培養でのみ得ることができる分生胞子を日本古来の麹培養法によって効率的に取得し、かつ保存安定性を向上させる製剤組成検討を行った結果、合成ゼオライトやシリカゲルなど吸水性を有する物質との組成物を完成させた。この組成物中の分生胞子はイネばか苗病に対して防除効果を示したことから、乾燥状態に置かれても発芽能力は奪われることなく安定な保存が可能となった。分生胞子の製剤組成物は先のエコホープ®に続き、エコホープ®DJ (登録番号 21902 号) として商品化した。

作用機構解析では、SKT-1 株の野生株及び REMI(restriction enzyme mediated integration)法により、レポータータンパク質である GFP(green fluorescent protein)を発現させた遺伝子組み換え体を用いることによって、SKT-1 株の主要対象病害であるイネばか苗病(*Gibberella fujikuroi*)の作用メカニズムに関する研究を行った。SKT-1 株とイネばか苗病との人工培地上での対峙培養では、イネばか苗病菌の細胞壁の溶解や、GFP タンパク質の消失が観察された。この結果は、SKT-1 株がイネばか苗病菌に対して細胞壁溶解酵素を作用させることによって、イネばか苗病菌の生長・生命活動を停止させていることを示唆した。更に、イネ種粉を用いた *in situ* 解析では、催芽時にイネ胚部位に SKT-1 株及びイネばか苗病菌の菌糸の旺盛な伸長が認められた。また、イネ胚部位上において、SKT-1 株の菌糸伸張が認められた際に、イネばか苗病菌の伸長した菌糸の切断が観察された。これは先の対峙培養における観察結果とよく一致していた。従って、SKT-1 株はイネ胚部位にてイネばか苗病菌の生長を阻害し、病害を防除していることが明らかになった。

以上、化学農薬に匹敵する防除効果を示す SKT-1 株の種の同定によって、ヒトや環境に対する安全性を予測し、また、経済的な培養方法の確立と、流通性を向上させた製剤組成物を確立することで *Trichoderma* 属糸状菌 SKT-1 株の商品化に成功した。一方、作用メカニズム解析を行うことで、本株が効率的かつ安全な BCA であることを明らかにした。以上より、*Trichoderma* 属糸状菌 SKT-1 株は微生物農薬として高い実用性を有していると考えられる。

### Development and commercialization of *Trichoderma* SKT-1, a highly effective biocontrol agent

○Satoshi Watanabe  
(Kumiai Chemical industry Co., Ltd)

**Key words** *Trichoderma* sp., rice seedborne diseases, Bakanae disease

## 2S-Bp01 新たな分析試薬としての二重鎖 DNA 担持ナノ粒子

○前田 瑞夫  
(理研・前田バイオ工学)  
mizuo@riken.jp

直径数ナノメートルから数十ナノメートルの金ナノ粒子が水に分散した溶液は赤色を呈する。これは金ナノ粒子の表面に局在化しているプラズモン(自由電子の集団振動)が可視領域の光と共鳴して、光を吸収するからである。この特性を利用して金ナノ粒子をラベル化剤として用いたバイオセンシング手法が様々な開発されている。一方、何らかの外的条件によって金ナノ粒子が集合体を形成すると、共鳴する光の波長が長波長側にシフトして、溶液は赤色から紫色ないし青色へと変化する。この金ナノ粒子の凝集に伴う色調の変化を利用して様々な分子センシングへの展開が試みられている。たとえば免疫反応や生化学反応などとカップルして金ナノ粒子の凝集が誘起されるようなシステムの設計が国内外で活発に進められてきた。最も広く使われている仕組みは粒子間を分析対象物質が橋渡しするような形、すなわち架橋反応である。我々はこれと全く異なる仕組みとして、DNA 二重らせんを担持した金ナノ粒子の非架橋メカニズムによる凝集反応を見出し、分子ないしバイオセンシングに応用することを提案してきた。すなわち、DNA 二重らせんで表面修飾した金ナノ粒子は、あるイオン強度以上で自発的に迅速に凝集する。この非架橋凝集現象は粒子の大きさと DNA の長さによらないが、DNA の二重らせん形成よりもはるかに鋭敏な温度依存性と塩濃度依存性を示す。また、粒子からみて最も外側に位置する DNA 末端にミスマッチがあると凝集は全く起こらない。このことは DNA 二重らせん末端構造の揺らぎが金ナノ粒子の分散挙動などのメソスコピックな現象へ変換・増幅されていることを意味しており、分析化学におけるナノ粒子ないしコロイド分散系の利用について新たな観点を与えるものではないかと考えている。参考文献) 宝田徹, 前田瑞夫: 分析化学, 64(1), 15-23 (2015).

### Double-stranded DNA-functionalized nanoparticles for a novel analytical reagent

○Mizuo Maeda  
(Bioengineering Lab., RIKEN)

**Key words** DNA nanomaterial, nanoparticle, SNP typing, chemical sensor

## 2S-Bp02 〈招待講演 (韓国生物工学会)〉

## Separation efficiency of DNA-protein conjugates via free-solution capillary electrophoresis

○Jong-In Won, Dong Hyun Kim  
(Dept. Chem. Eng., Hongik Univ., Korea)  
jiwon@hongik.ac.kr

As the Human Genome Project was completed, genetic information could be obtained from individuals, and this information can be widely applied to the biological fields. However, DNA sequencing or separation by conventional capillary electrophoresis with a polymer matrix has some inherent limitations, such as expense of polymer matrix and the limitation of sequencing read length. As DNA fragments have a linear charge-to-friction in free-solution, DNA fragments aren't separated by size. However, size-based separation of DNA is possible in free-solution conjugate electrophoresis if a "drag-tag" is attached to DNA fragments because it breaks linear charge-to-friction scaling. Although several research results demonstrated the feasibility of DNA separation by free-solution capillary electrophoresis (FSCE), generation of a completely monodisperse drag-tag and finding a strong as well as site-specific conjugation method between a DNA fragment and a drag-tag are still challenges. In this study, we propose an efficient FSCE method by conjugating a biologically synthesized elastin-like polypeptide (ELP) and green fluorescent protein (GFP) to DNA fragments. In this case, GFP acts as a substituted fluorescent dye as well as a drag-tag, and ELP acts as an additional drag moiety endowing high resolving power. In order to produce strong and site-specific conjugation, a methionine residue in drag-tags is replaced with an azidohomoalanine (AHA) or homopropargylglycine (Hpg), which can be conjugated specifically to a DNA fragment. Finally, the separation efficiency according to the size of drag-tags was investigated.

## Separation efficiency of DNA-protein conjugates via free-solution capillary electrophoresis

○Jong-In Won, Dong Hyun Kim  
(Dept. Chem. Eng., Hongik Univ., Korea)

**Key words** capillary electrophoresis, drag-tag, elastin-like polypeptide, green fluorescent protein

## 2S-Bp03 人工アロステリック酵素の創出による各種高感度ホモジニアス免疫測定法の開発

○上田 宏<sup>1</sup>, 蘇 九龍<sup>1</sup>, 董 金華<sup>1</sup>, 岩井 宏徒<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東工大・化生研, <sup>2</sup>東大院・工)  
ueda@res.titech.ac.jp

任意分子を検出可能なバイオセンサー酵素の実現法として、抗体ドメインの利用による人工アロステリック酵素の創出が考えられる。しかし通常、抗原の結合による抗体の構造変化(induced fit)はかなり微小であって、これまでこの変化を利用して酵素活性を制御する一般的な方法は提唱されていない。今回我々は、抗体重鎖・軽鎖可変領域  $V_H$ ,  $V_L$  が抗原依存的に会合する現象を利用し、多量体型ないし単量体型の抗原依存的アロステリック酵素の創出に成功したので報告する。

我々は以前、 $V_H$ ,  $V_L$  を会合により酵素活性が回復する  $\beta$  ガラクツシダーゼ変異体  $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\omega$  の N 末側にそれぞれ融合し、両者の会合を抗原 NP (4-hydroxy-3-nitrophenacetyl)あるいはニワトリリゾチームにより誘導することで酵素活性の向上を発光活性により高感度に検出した(OS-ECIA 法, *Anal. Chem.*, **74**, 2500, 2002)。但し本系は変異体酵素の安定性が低く、再構成により得られる酵素活性およびその変化量も低い問題があった。そこで今回、天然では 4 量体で存在する  $\beta$  グルコニダーゼ(GUS)の界面に変異を導入した 2 量体型変異体酵素  $GUS_m$  (Geddie and Matsumura, *J. Mol. Biol.*, **369**, 1052, 2007)を利用し、これをレポーターとした同様のバイオセンサー酵素  $V_H$ - $GUS_m$ ,  $V_L$ - $GUS_m$  を構築した。これらの混合物に抗原 NP を加えた所、4 量体形成によりその酵素活性は抗原不在時に比べ最大 5 倍まで増加し、さらにその信号は発色あるいは蛍光強度で容易に検出できた。興味深いことに、この活性化率は以前報告した ELISA における変化率を上回っていた。酵素の安定性も高く、本系は今後広く各種低分子の検出系に応用できる可能性がある。

これらの多量体型センサーは、二種類の検出試薬を準備する必要があり、また検出感度的に不利な可能性もある。我々は以前、抗体  $V_H$ ,  $V_L$  を大腸菌 TEM-1  $\beta$ -lactamase の円順列変異体(cpBLA)の N/C 末端にそれぞれ連結することで、抗原結合により酵素活性を制御可能な融合タンパク質 Fv-cpBLA を構築した(*Bioconj. Chem.*, **22**, 633, 2011)。しかし、その比活性  $k_{cat}$  変化は 2 倍以下に留まり、実用的な抗原検出系とは言い難かった。そこで今回、 $V_H$ / $V_L$  の界面近傍に新規 N, C 末端を移動させた円順列変異体 cp $V_H$ /cp $V_L$  (Clampbody; Cbody)を設計し、これらを構造既知の cpBLA (Guntas et al., *Chem. Biol.*, **11**, 1483, 2004)の N/C 末端にそれぞれ連結させたタンパク質 Cbody-cpBLA を構築することで、より効果的な活性制御ができないか試みた。ヒト Bone gla protein (BGP)C 末端認識抗体をもとに不溶性画分より調製した Cbody-cpBLA は抗原結合能と酵素活性を保持しており、酵素活性評価の結果、抗原を加えると有意に  $k_{cat}$  が増加した。そこで反応溶液中に適量の変性剤あるいは界面活性剤を添加したところ、 $k_{cat}$  の抗原依存性は約 4.7 倍に向上し、健康人の血液中濃度以下の 0.24 nM の抗原ペプチドを特異的に検出できた(*Bioconj. Chem.*, **27**, 868, 2016)。以上より、Cbody-cpBLA が抗原添加により酵素活性を制御可能な単量体型アロステリック (センサー)酵素であること、タンパク質の末端間距離を利用した活性制御に Clampbody が適していることが明らかとなった。今後、これらの人工アロステリック酵素の臨床診断、食品検査、環境計測等への応用が期待される。

## Development of sensitive homogeneous immunoassays by creating artificial allosteric enzymes

○Hiroshi Ueda<sup>1</sup>, Jiulong Su<sup>1</sup>, Jinhua Dong<sup>1</sup>, Hiroto Iwai<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>CLS-IIR, Tokyo Tech, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** antibody, enzyme sensor, biosensor, protein engineering

**2S-Bp04 臨床検査におけるバイオ分析技術の実用化**

○村上 淳  
 (アークレイ)  
 murakamia@arkray.co.jp

当社は、自動分析システムのバイオニアとして、長きに渡り、診断・治療・検診のための臨床検査用の機器・試薬並びに診断支援ツールの研究開発・生産・販売・アフターサポートを行ってきた。検査領域としては、糖尿病検査、尿検査、遺伝子検査、ポイントオブケア (POC) 検査といった領域を中心に事業を展開している。また、大病院・研究機関向けから、中小病院やクリニック向け、さらには患者様が自ら使用する機器まで、幅広い医療現場のニーズに応える製品を生み出してきた。これらの臨床検査システムには、例えば血糖測定においては酵素反応と電気化学反応を利用した酵素電極法など、生物工学分野の研究者には馴染みがある様々なバイオ分析技術が用いられている。しかし、これらの技術を実用化、とりわけ臨床検査分野において実際に製品化していくためには、アカデミアで行われている研究とは異なる視点での技術開発や課題解決が求められる。本講演では、当社の製品・技術や、それらに用いられているバイオ分析技術をご紹介します。また、その技術を実用化するにあたり、どのような課題が存在したのか、またそれらの課題を解決するためにどのような研究開発を行ったのかなどをご紹介します。さらに、現在研究開発を進めている技術や研究課題についても可能な範囲でご紹介したい。

**Practical application of bioanalytical methods for clinical laboratory test**

○Atsushi Murakami  
 (ARKRAY, Inc.)

**Key words** diagnostic technology, in vitro diagnostic

**2S-Bp05 非天然糖を用いた糖タンパク質品質管理系の機能解析**

○迫野 昌文  
 (富山大院・理工)  
 msakono@eng.u-toyama.ac.jp

小胞体における Calnexin (CNX)/Calreticulin (CRT) サイクルは、糖タンパク質産生の品質管理に重要な役割を果たす(Helenius et al., *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 1019)。高マンノース型糖鎖を有するフォールディングが未成熟な糖タンパク質は、分子シャペロン、糖転移酵素、糖加水分解酵素などの様々なタンパク質の仲介により、成熟した状態となる。Glucosidase I, Glucosidase II (G II)によりグライコフォームを Glc3Man9GlcNAc2(G3M9)から Glc1Man9GlcNAc2(G1M9)にトリミングされた糖タンパク質は、レクチンシャペロン CNX/CRT の基質となる。CNX/CRT から解離した糖タンパク質は、G II によるグルコースのトリミングを受ける。正常にフォールディングした糖タンパク質はゴルジ体へ輸送されるが、フォールディングが不完全な糖タンパク質は、糖転移酵素 UGGT によりグルコースの転移を受け再び CNX/CRT の基質となる。

蛍光化合物などの疎水性化合物を結合した高マンノース型糖鎖は非タンパク質化合物であるにもかかわらず、GII、UGGT、CRT などの品質管理関連タンパク質の基質として認識されることが、これまでにわかっている(Totani et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (2005) 7950; Sakono et al., *Biochim Biophys Acta* 1840 (2014) 2904)。また、UGGT による糖鎖化合物への糖転移反応における速度定数は、変性糖タンパク質を用いた時と比べても同等であることから(Sakono et al., *Biochem Biophys Res Commun* 426 (2012) 504)、合成糖鎖化合物は変性状態の糖タンパク質をミミックしていることが推察され、この糖鎖化合物は糖タンパク質品質管理機構を検討するための優れたツールであると期待される。

糖関連酵素の活性メカニズムや基質特異性を調べるために、アザ糖やデオキシ糖、チオ糖などの糖の類縁体を基質として用いる方法は、有効な手段である。特にチオ糖は、様々な糖加水分解酵素の阻害剤として効果的に機能することが報告されている(Kajimoto et al., *J Am Chem Soc* 113 (1991) 3187)。そこで、本研究では、合成糖鎖を用いて、環内酸素が硫黄に置換されたチオ糖が、小胞体関連タンパク質の働きに及ぼす影響を検討した(Sakono et al., in submitted)。UGGT の糖供与体である UDP-グルコースの類縁体である UDP-チオグルコースを化学合成し、UGGT による合成糖鎖への糖転移反応を試みた。その結果、反応効率は若干低下するものの、チオグルコースが合成糖鎖に転移することを見出した。また、産生したチオグルコース転移 G1M9 糖鎖は、ノーマルの G1M9 糖鎖と同程度に分子シャペロン CRT と相互作用することが明らかになった。一方で、CNX は、ノーマルの糖鎖に比べて大きく相互作用が低下した。この傾向は、CNX のホモログであるカルメギンにも見られた。これまで、CNX と CRT の機能的差は明らかにされておらず、このチオグルコースの結果は、両者の機能に違いがあることを示した最初の例といえる。また、チオグルコース転移 G1M9 糖鎖は、G II の基質とならず、チオグルコースの加水分解は行われなかった。したがって、チオグルコースを品質管理系に導入することで、一部の酵素機能を調整することができると考えられる。今後、チオグルコースが CNX/CRT サイクルの詳細を明らかにする有効なプローブとなると期待する。

**Analysis of glycoprotein quality control system using thio-sugar**

○Masafumi Sakono  
 (Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** glycosidase, glycosyltransferase, molecular chaperone

## 2S-Cp01 Tissue Engineering のためのバイオプリンティングの戦略と今後の課題

○中村 真人<sup>1</sup>, 杉本 和之<sup>1</sup>, 塚本 佳也<sup>1,2</sup>, 吉田 真人<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山大院・理工,<sup>2</sup>阪大院・生命機能)  
 maknaka@eng.u-toyama.ac.jp

3D プリンタは今、世界的大ブームとなり、生体組織や臓器の作製を目指したバイオプリンティングは重要キーワードのひとつとなっている。バイオプリンティングとは、あらかじめデザインした設計に基づいて生きた細胞や生体材料を適材適所配置しながら、2次元、3次元積層して生きた組織や臓器をボトムアップ的に作製する技術、およびその研究のことをいう。積層造形以外の作り方も含めてバイオファブリケーションというが、生体組織や臓器を作るための重要な医工学技術である。間違いなく再生医学のこれからを拓く研究領域である。

従来の再生医学の技術の壁を破るための戦略として、バイオプリンティングの研究は、(1)機械化、(2)デジタル化、(3)実装化、(4)3次元化を意識して進められてきた。細胞培養に伴う様々な手作業を機械の手に変え、デジタル化するのは、従来よりもはるかに高度な細胞培養・組織構築を実現するためである。また、3次元の生体組織を作る場合、内部まで細胞を含めて有意な構造を作りこむ必要がある。そこでバイオプリンティングでは生きた細胞、生体を構成する材料を、直接、適材適所あるべき場所に実装しながら3次元積層造形を行うことを目指してきた。生きた細胞は生体組織の必須材料であるが、細胞浮遊液では造形は不可能である。そこで、細胞が生きられるよう液体でありながら個体でもあるハイドロゲルが3次元化の鍵となる。装置の開発とともにゲル材料の開発が必要である。

今、バイオプリンティングは、世界で注目され、世界で3Dプリンタを使っている研究が進み始めた。しかし、バイオプリンティングの目指すところは、生きて機能する生体組織の作製である。その目的達成には、3次元適材適所配置することに加え、作った構造物を如何に培養するか、如何に組織形成を進めるかの技術開発が必要である。それらの対策を含めた設計と製作が次の課題である。

### Strategy of bioprinting for tissue engineering and next issues

○Makoto Nakamura<sup>1</sup>, Kazuyuki Sugimoto<sup>1</sup>, Yoshinari Tsukamoto<sup>1,2</sup>, Naoto Yoshida<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

**Key words** bioprinting, biofabrication, bio-artificial organ, biomaterial

## 2S-Cp02 細胞運動を評価する遺伝子導入細胞マイクロアレイ

○藤田 聡史  
 (産総研・バイオメディカル)  
 s-fujita@aist.go.jp

細胞運動(遊走)は、発生や細胞組織の恒常性維持などの様々な生理的現象において重要な役割を担っている。また、癌転移の一因子と考えられており、癌転移抑制を目指した抗がん剤開発において、そのメカニズムを詳細な理解が望まれている。本発表では、インクジェットプリンターを用いて構築する細胞運動評価用の遺伝子導入細胞マイクロアレイ(トランスフェクションマイクロアレイ:TCM)技術、及び本技術を応用した細胞運動能を指標にした関連遺伝子のスクリーニングについて紹介する。

TCMの作製において、まずDNAやsiRNAなどの核酸とカチオン性脂質の複合体であるリポプレックスをスライドガラスや細胞培養用ディッシュなどの固相面にマイクロアレイとしてプリントする。その上面に細胞を播種すると、細胞に固相面から遺伝子を取り込まれ、細胞内で遺伝子が発現した結果、細胞の表現型が変化するため、その細胞状態を解析する事で遺伝子機能の評価が可能となる。細胞運動評価用TCMでは、基板上を細胞が運動し、固相基板面のスポットからsiRNAを取り込む。siRNAが細胞運動を阻害する場合、細胞はスポット上面で運動を停止するため、画像解析による細胞の位置情報に基づいて、運動関連遺伝子のスクリーニングや評価を行う事が可能であると考え、開発を進めた。まず、TCMを用いた細胞運動評価が可能である事を確認するため、細胞運動に重要とされる複数の既知の遺伝子のsiRNAをアレイ化したTCMで実験を行った。その結果、細胞運動がアレイ化されたスポット上で停止し、画像解析により運動能を簡便に評価ができる事を確認した。続いて、細胞運動に大きく関わるとされる738種類のキナーゼをターゲットとした大規模スクリーニングを、本TCMを用いて行った。スクリーニングの結果30種類のsiRNAが細胞運動を阻害し、2種類のsiRNAが細胞運動を促進する事を見出した。

TCMは、細胞運動のみならず、様々な細胞表現型に基づいた遺伝子スクリーニングや薬剤スクリーニングに威力を発揮できる技術であり、今後さらなる創薬開発、診断、毒性評価への応用を目指して開発をすすめたい。

### Transfected cell microarray for detecting cell migration

○Satoshi Fujita  
 (Biomed. Res. Inst., AIST)

**Key words** microarray transfection, cell migration, inkjet printing

**2S-Cp03 インクジェットプリンティングの細胞凍結保存への応用**

○秋山 佳丈  
(信州大・繊維)  
aki@shinshu-u.ac.jp

細胞の凍結保存法は細胞株の長期間維持および輸送において必須の技術であり、iPS 細胞や ES 細胞の樹立によりその重要性はさらに増している。細胞凍結保存において、高い生存率を得るためには、どのように細胞を凍結させるかが重要となる。通常の培養液中で細胞を一般的な冷却速度で凍結すると、細胞内外の水分子が結晶化し、氷晶が生成される。その氷晶によって、細胞膜や細胞内小器官などの細胞構造が破壊されてしまい、融解後細胞は生存できなくなる。そのため、細胞の凍結保存において、水の結晶化を抑制しガラス化させることが重要である。このガラス化を促進するために、従来の凍結保存技術では、凍結保護剤を添加する。最も一般的な緩慢凍結法では、凍結が進むにつれて添加した凍結保護剤により細胞が脱水され、最終的に細胞内の水はガラス化される。その結果、氷晶の生成は防ぐことは出来るが、凍結保護剤自身の毒性および凍結過程における脱水により一部の細胞は壊死する。特に、霊長類 iPS 細胞などは凍結耐性が低いため、高濃度の凍結保護剤を添加し急速に凍結するガラス化法が用いられる。しかし、この場合、高濃度に添加した凍結保護剤自身の細胞毒性が問題となってくる。

そこで、著者は新たな細胞凍結保存技術として、インクジェット技術を用いた瞬間凍結による細胞凍結保存法を提案し、研究を進めている。本手法では、純水であっても、10<sup>6</sup>度/秒以上で冷却すれば、ガラス化することに着目した。すなわち、細胞懸濁液をインクジェット技術により1 nL 以下の微小液滴として、液体窒素で急速した基板の上に吐出することで、瞬間的に凍結する。これにより、細胞を含む液滴をガラス化し、凍結保護剤を用いずに細胞の凍結保存実現を目指す。当初、液滴サイズを200 pL として実験を行ったが、細胞の生存率は約15%と低かった。しかし、液滴サイズを20 pL とすることで、細胞生存率を約60%まで高めることに成功している。また、微小液滴の瞬間凍結メカニズムを解明に向けて、高速度カメラによる液滴凍結過程の観察や有限要素法による伝熱シミュレーションを行ったので、それらの結果についても紹介したい。

**Application of Inkjet printing for cryopreservation of animal cells**

○Yoshitake Akiyama  
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

**Key words** cryopreservation, inkjet printing

**2S-Cp04 西洋わさび由来ペルオキシダーゼによる架橋反応を利用した3D バイオプリンティング**

○境 慎司<sup>1</sup>, 田谷 正仁<sup>1</sup>, 中村 真人<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・基礎工,<sup>2</sup>富山大院・理工)  
sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) は、過酸化水素存在下でフェノール性水酸基同士の架橋形成反応を触媒する。我々は、これまでにこの酵素反応を経て水溶液から得られるヒドロゲルの、各種用途における生体材料としての有用性を報告してきた。本発表では、この HRP 酵素反応によりゲル化する高分子水溶液をバイオインクとして用いる 3D バイオプリンティングに関して紹介する。細胞を生きたまま構造物中に包括することのできるバイオインク材料として最も広く用いられてきたのは、アルギン酸水溶液である。バイオインク材料としてアルギン酸水溶液の有用な点は、カルシウムのような多価金属イオンを含む水溶液と接触すると瞬時にゲルが形成し、さらにそのゲル化は細胞に穏和であることである。一方で、組織体を作製するという観点からは、細胞接着性や生分解性などにおいて十分な性能を有しておらず、新たなバイオインクの開発が続けられている。HRP 酵素反応によるゲル化は、溶液中のフェノール性水酸基濃度や、HRP 濃度、過酸化水素濃度の制御によりゲル化に要する時間を制御可能である。さらに、細胞接着性や生分解性に優れるゼラチンからもフェノール性水酸基を導入することによってゲルを得ることが可能である。我々は、フェノール性水酸基を導入した高分子と HRP を溶解させた水溶液に細胞を分散させたものを1つのノズルから吐出し、もう1つのノズルからフェノール性水酸基を導入した高分子と過酸化水素を同じ場所に吐出することにより、細胞を含む三次元ヒドロゲル構造物を作製することに成功している。本技術は、これまで開発してきたさまざまな材料をインクライブラリとして利用可能であるため、機能的な組織体を作ることを目的とする 3D バイオプリンティング分野において有用なものになると期待される。

**3D bioprinting through horseradish peroxidase-mediated cross-linking**

○Shinji Sakai<sup>1</sup>, Masahito Taya<sup>1</sup>, Makoto Nakamura<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** tissue engineering, enzyme, gelation

## 2S-Cp05 バイオ分野へのインクジェット技術の応用

○山口 修一  
(株式会社マイクロジェット)  
yamaguchi2@microjet.co.jp

文字や画像の印刷に使われているインクジェット技術が、プリントドエレクトロニクス分野では、液晶ディスプレイの部品製造や薄膜塗布等に応用され、実用化されている。また、3Dプリンティング分野では、7つある造形技術の内2つがインクジェット技術を応用したものであり、インクジェット技術は、次世代のデジタルものづくり革命の本命技術として益々注目を集めている。

一方、このインクジェット技術をバイオ分野でバイオマテリアルのデジタルハンドリング技術として応用する場合、従来のプリンタに使われているインクジェット技術では、多くの課題を抱えていた。中でも液体をハンドリングするインクジェットヘッドに課題があり、プリンタ用のインクジェットヘッドに代わり、バイオ専用のインクジェットヘッドが必要とされていた。

本発表では、プリンタ用インクジェットヘッドが持つ課題点を明らかにすると共に、それらを解決したバイオ用の各種インクジェットヘッドを紹介する。さらにこれらのヘッドを用いて実用化されたスポッター、マイクロアレイヤー、1細胞プリンター (Single Cell Printer) 等のバイオ機器についても紹介する。これらの機器の例を見るまでもなく、バイオ分野の液体ハンドリング分野にも、今後大きなデジタル化の波が押し寄せるであろう。

## 2S-Cp06 細胞の微小環境制御に基づいた組織工学

○松崎 典弥, 明石 満  
(阪大院・工・応化)  
m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

【緒言】生体内において、細胞の機能 (例えば、接着、増殖、分化、生存、組織化、タンパク産生など) は、細胞外マトリックス (ECM) と呼ばれる糖タンパク質が細胞表面の微小環境を調節することで制御されている (図1上)。昨今のヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) に代表される幹細胞研究の進歩により、正常および疾患特異的なヒト細胞を研究現場で用いることが可能となってきた。しかし、“細胞も材料の一つ” とらえ、再生医療や創薬分野の基礎研究から産業まで幅広く応用するためには、生体のECMのように細胞の微小環境を調節し、その性質を自在に制御可能な革新技術の開発が重要である。我々は、細胞表面の微小環境を調節し、細胞の性質を制御可能な人工ECMとして機能する高分子ナノ薄膜を設計し、細胞の様々な機能を制御した斬新かつ独創的な研究を展開してきた。以下に概要をまとめる。

【細胞表面へのECMナノ薄膜形成と三次元組織体の構築】細胞表面の微小環境を制御するためには、生体のECMのように細胞毒性を発現しない高分子ナノ薄膜の分子設計が重要となる。これまで、細胞表面への薄膜形成に関する様々な研究が報告されている。特に、簡便かつ汎用性の高い交互積層法 (LbL法) を用いた細胞表面へのナノ薄膜形成が注目されてきた。しかし、静電相互作用を駆動力としたLbL法では、カチオン性高分子の細胞膜への強い非特異吸着により細胞毒性が発現することが課題であった。そこで我々は、静電相互作用ではなく生体高分子の分子認識を利用した新しいLbL法を考案した。ECMの成分であるフィブロネクチン (FN) は、コラーゲンやゼラチン (G) と  $0.6\text{-}5.0 \times 10^{-6}\text{ M}$  という解離定数 (Kd) で相互作用することが報告されている。従って、FNとGは、中性水溶液環境下で分子全体として弱い酸性 (アニオン性) を有しているが、その分子認識機構により、静電反発を引き起こさず相互作用し、高い生体適合性のLbL薄膜を細胞表面に形成できることを見出した。膜厚はLbL浸漬回数に依存して増加し、数nmから100nmまで制御可能であった。また、細胞の生存率は、膜厚に依存せずほぼ100%であり、細胞の増殖や接着形態、分化誘導にも影響しないことが明らかとなった。さらに興味深いことに、膜厚の増加に依存して抗炎症作用があることや、物理ストレスに対する保護機能があることも見出した。

我々は、細胞表面に形成したFN-Gナノ薄膜 (人工ECM) が、生体のECMと同様に細胞膜インテグリン分子と相互作用することで細胞-細胞間を接着させる機能があると考え、ナノ薄膜を細胞間接着層として用いた「細胞積層法」と「細胞集積法」を考案した。細胞表面に形成した少なくとも6nm以上のFN-Gナノ薄膜が接着足場として機能することを見出し、望みの細胞を望みの場所に配置して積層できることを明らかにした。さらに、毛細血管構造を導入するため、細胞集積法により臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) にてサンドイッチ培養した結果、緻密かつ均一なネットワーク構造の形成が確認された。本手法を用いて皮膚微小リンパ管内皮細胞 (NHDMC) とHUVECを共サンドイッチ培養することで、それぞれ独立した毛細血管・リンパ管網が形成された。

【インクジェットプリントによる三次元組織チップの作製と薬剤毒性試験への応用】細胞積層法で構築した積層構造体を生体組織モデルとして薬剤応答評価に応用するためには、細胞種や層数が異なる組織モデルを大量に作製する必要がある。マイクロメートルサイズの様々な組織モデルを集約した「組織チップ」が構築できれば、医薬品評価において大変有効である。そこで、インクジェットプリント装置による細胞プリントの技術開発に取り組んだ。

チップ化するためには細胞を空間に留める必要がある。本研究では、直径500 $\mu\text{m}$ 、高さ200 $\mu\text{m}$ のウェルを440個有するウェル基板を用いた。組織チップとして薬剤評価への応用を目的として、ヒト肝臓細胞 (HepG2) とHUVECのヘテロ積層組織チップの作製に取り組んだ。肝臓は肝細胞が血管に挟まれた三次元構造であるため、HepG2をHUVECで挟んだ積層構造を構築することでHepG2の代謝活性の向上が期待される。そこで、HepG2とHUVECの1-3層構造を一枚のチップの中に作製して種々の活性を評価した。肝臓機能の指標となるアルブミン産生量を評価した結果、7日間培養後において3層構造が1層構造と比較して4倍以上のアルブミンを産生することが明らかとなった。また、薬物代謝酵素の一種であるシクロムP4503A4 (CYP3A4) の産生量と活性を評価した結果、やはり3層構造が最も高い産生量と代謝活性を有していることが確認された。そこで、実際に毒性が報告されているトログリタゾン (TGZ) を用いて評価を行った。3層構造においてより低濃度でも死細胞が顕著に観察され、特にTGZが50 $\mu\text{M}$ の場合、1層構造では16%の死細胞割合であったのに対して3層構造では60% (約4倍) まで増加し、HUVECで挟んだ3層構造にすることでHepG2の薬物代謝活性が向上することが明らかとなった。本三次元肝臓組織チップは、肝臓のハイスループットな薬効・毒性評価を可能とする革新的なツールとして応用が期待される。

## Tissue engineering based on control of cell microenvironments

○Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi  
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

## Inkjet technology for bio applications

○Shuichi Yamaguchi  
(MICROJET Corporation)

**Key words** inkjet, inkjet head, single cell printer, biomaterials

**Key words** cell microenvironments, extracellular matrix, nanofilms, tissue engineering

**2S-Dp01 Bioenergy and chemicals from sustainable biomass resources**

Hah Young Yoo, Dong Sup Kim, Ju Hun Lee, Soo Kweon Lee,  
 ○Seung Wook Kim  
 (Dept. Chem. Biological Eng., Korea Univ)  
 kims@korea.ac.kr

As the world population has grown and more countries have become industrialized, demand of energy and chemical products have increased steadily. Thus, there is a great concern in exploring an alternative resource, and biomass have received attention as sustainable feedstocks for the production of alternative energy and chemicals. In past years, we have collected inedible biomass resources such as instant noodle wastes, whey, algal biomass, woods, grasses and agricultural residues etc. These biomass resources were utilized as the feedstock in the production process such as bioethanol, 2,3-butanediol, cephalosporin C, lactulose and enzymes. In this study, we would like to introduce some researches that include strain improvement, process design and development of environmental friendly production. Production of various bioproducts such as bioethanol, 2,3-butanediol, and cephalosporin C, was performed by the improved specific strain and the sugars from biomass were used as carbon sources. To improve sugar recovery from biomass, various pretreatments such as acid, alkali, proton and electron beam irradiation were applied and the effective conditions were statistically optimized. Moreover, biomass to final production was evaluated based on overall mass balance and the processes were simulated by using Super Pro Designer program. Furthermore, the hydrolysates from biomass (glucose) was also used as a fuel source of enzymatic fuel cell (EFC) system.

References:

1. X. Yang et al., *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 49, 335-349 (2015)
2. S.J. Yang et al., *Chem. Eng. J.*, 275, 227-234 (2015)
3. H.Y. Yoo et al., *Biotechnol. J.*, 10, 1894-1902 (2015)

**Bioenergy and chemicals from sustainable biomass resources**

Hah Young Yoo, Dong Sup Kim, Ju Hun Lee, Soo Kweon Lee, ○Seung Wook Kim  
 (Dept. Chem. Biological Eng., Korea Univ)

**Key words** biomass, biochemicals, biorefinery, bioprocess

**2S-Dp02 Isolation of biorefinery enzymes for brown macroalgae degradation from bacterial metagenome**

○Tetsushi Mori<sup>1</sup>, Mami Takahashi<sup>1</sup>, Yumiko Yamada<sup>1</sup>,  
 Toshiyuki Shibata<sup>2</sup>, Toshiyuki Takagi<sup>3</sup>, Reiji Tanaka<sup>2</sup>, Hideo Miyake<sup>2</sup>,  
 Kouichi Kuroda<sup>3</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>3</sup>, Haruko Takeyama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Sci. and Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)  
 moritets@aoni.waseda.jp

With the recent demand in new biomass resources for the production of biofuels, brown macroalgae recently serves as a potential candidate due to its rapid growth, high crop yield and mass-productibility. However, brown macroalgae comprises of large polysaccharides, including alginate, cellulose, hemicellulose and laminaran, comprising more than 40% of its composition that requires to be degraded before it can be used for bioethanol production. To degrade large polysaccharides for subsequent downstream process, conventional methods such as hydrolysis are utilized but in most cases these methods are complex, require high-energy consumption and are less environmental friendly. Recently, as an alternative method for polysaccharide depolymerization, the demand for the more economical and environmental friendly method using biorefinery enzymes has been highlighted. As a result, numerous discoveries of such enzymes including alginate lyases, laminarinase, amylase, cellulase etc. has been reported. In addition, recent efforts via the introduction of gene clusters encoding for enzymes involved in polysaccharide degradation into ethanologenic bacteria and yeast to establish highly talented and robust microorganisms, have further revolutionized brown macroalgae utilization. Due to the success of such systems, attempts to further isolate and search for highly potential ethanologenic hosts or more efficient biorefinery genes are underway. However, many of these attempts have been limited to microorganisms isolated using culture dependent methods. As we know, 99% of microorganisms obtained from the environment are considered as uncultivable, thus current culture dependent methods exclude the possibility of finding potential biorefinery enzymes from these microorganisms. Therefore, to further promote the discovery of novel and highly efficient enzymes for polysaccharide depolymerization, metagenomics serves as an important alternative. Thus far, our group has conducted intensive screening of various important enzymes from numerous environmental samples using metagenomic libraries established from environmental microbes. Here, we present the potential of metagenomics in the screening for highly active and efficient enzymes for macroalgae degradation and our results on the large scale screening for such enzymes against metagenomic libraries constructed from microbes isolated from 3 fermented brown algae, *Ecklonia kurome*, *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia cava* targeting the alginate degrading enzyme, alginate lyase. Using plate screening and sugar screening assays such as the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay and thin-layer chromatography (TLC), we successfully isolated approximately 70 - 100 putative genes encoding for endolytic and exolytic alginate lyases, broadly distributed among the Polysaccharide Lyase (PL) families of alginate lyases. In addition, *in silico* analysis has also allowed us to identify unique gene clusters harboring genes encoding for enzymes involved in alginate degradation. Based on this putative gene collection, protein expression and enzyme activity analysis are currently being conducted. From this work, we hope to be able to identify novel and highly efficient enzymes to further facilitate bioethanol production from macroalgae.

**Isolation of biorefinery enzymes for brown macroalgae degradation from bacterial metagenome**

○Tetsushi Mori<sup>1</sup>, Mami Takahashi<sup>1</sup>, Yumiko Yamada<sup>1</sup>, Toshiyuki Shibata<sup>2</sup>,  
 Toshiyuki Takagi<sup>3</sup>, Reiji Tanaka<sup>2</sup>, Hideo Miyake<sup>2</sup>, Kouichi Kuroda<sup>3</sup>,  
 Mitsuyoshi Ueda<sup>3</sup>, Haruko Takeyama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Sci. and Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** metagenomics, biorefinery enzymes, macroalgae

**2S-Dp03 Biological saccharification by anaerobic thermophilic bacteria**

○Akihiko Kosugi<sup>1,2</sup>  
 (JIRCAS, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
 akosugi@affrc.go.jp

Many microorganisms capable of producing cellulose and hemicellulose-degrading enzymes have been reported and characterized [1]. *Clostridium thermocellum*, an anaerobic, thermophilic, spore-forming bacterium, is the most potent cellulose-degrading bacterium known to produce cellulosomes [2]. The cellulosomes of *C. thermocellum* contain a surprisingly large variety of enzymes and show attractive enzymatic properties for the degradation of complex plant biomass. In promising attempts to enhance the hydrolytic ability of *C. thermocellum* cellulosomes, designer cellulosomes and reconstruction of recombinant cellulosomes have been studied using model and natural substrates. *C. thermocellum* produces low levels of cellulosomes compared to the high level of cellulase secretion of *Trichoderma reesei*, which can produce several functionally distinct cellulase components. Although *C. thermocellum* exhibits one of the highest observed microbial growth rates on cellulose, it produces less cellulase on a mass basis than aerobic microorganisms. As one promising cost-effective process to resolve these problems, consolidated bioprocessing relies on *C. thermocellum* to ferment substrate to desired products in one step without adding externally produced enzymes.

Here, we report on biological saccharification by *C. thermocellum* cultures supplemented with thermostable  $\beta$ -glucosidases, which we named biological simultaneous enzyme production and saccharification (BSES) [3]. BSES required no addition of cellulolytic enzymes. It can directly produce glucose from cellulosic materials due to supplementation of cellulose degrading cultures with  $\beta$ -glucosidase. Exclusive glucose accumulation of glucose occurred when *C. thermocellum* was cultured with a thermostable  $\beta$ -glucosidase under a high cellulose load. Our process is the first instance of biological saccharification with exclusive production and accumulation of glucose from lignocellulosic biomass.

To apply BSES to practical process, we screened an anaerobic thermophilic cellulolytic-xylanolytic bacteria adaptable to various lignocellulosic biomass (e.g., corn stover, rice straw, bagasse, and potato pulp). Novel an anaerobic alkalithermophilic cellulolytic-xylanolytic bacteria *Cellulosibacter alkalithermophilus* which has strong solubilization ability for untreated lignocellulosic biomass [4]. *C. alkalithermophilus* exhibited polysaccharide degradation ability broader than *C. thermocellum*. We would like to talk about BSES process using *C. alkalithermophilus* for lignocellulosic biomass. This approach may resolve a significant barrier to economical production of bio-based chemicals and fuels from lignocellulosic biomass.

[1] Lynd L, Weimer P, van Zyl W, Pretorius I.: Microbiol Mol Biol Rev 2002, 66:506-577.

[2] Bayer E, Belaich J, Shoham Y, Lamed R.: Annu Rev Microbiol 2004, 58:521-554.

[3] Prawitwong P, Waeonukul R, Tachaapaikoon C, Pason P, Ratanakhanokchai K, Deng L, Sermsathanaswadi J, Septiningrum K, Mori Y, Kosugi A.: Biotechnol Biofuels. 2013 6:184. doi: 10.1186/1754-6834-6-184.

[4] Watthanalamloet A, Tachaapaikoon C, Lee YS, Kosugi A, Mori Y, Tanasupawat S, Kyu KL, Ratanakhanokchai K.: Int J Syst Evol Microbiol. 2012 62:2330-2335.

**Biological saccharification by anaerobic thermophilic bacteria**

○Akihiko Kosugi<sup>1,2</sup>  
 (JIRCAS, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** *Clostridium thermocellum*, cellulosome, cellulosic biomass, biological saccharification

**2S-Dp04 Designer microbes equipped with nano-scale protein complexes**

Jeong Eun Hyeon, ○Sung Ok Han  
 (Dept. Biotechnol., Korea Univ.)  
 samhan@korea.ac.kr

C1, 3, 5 and 6 based carbon sources are the most abundant utilizable the natural resource. The design of enzyme and microbe is a key biological technology that can be used for C1, 3, 5 and 6 biorefinery. The design of enzyme and microbe is a useful strategy as tools in whole-cell biocatalyst systems for C1, 3, 5 and 6 biorefinery and has drawn considerable attention as an attractive strategy for bioprocess applications. Prior to fermentative production of valuable biochemical product from the C1, 3, 5 and 6 based carbon sources by microbes, the lignocellulosic materials and hydrocarbons should be absorbed and fixed by available state for use. In this study, we were assembled the functional enzyme complexes containing a recombinant scaffolding protein from *Clostridium cellulovorans* and various chimeric enzymes such as endoglucanase CelE, laccase CueO, xylanase XynB in several industrial strains such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* and *Corynebacterium glutamicum* for utilizing of lignocellulosic biomass into valuable products including ethanol and amino acids. Moreover, functional enzyme complexes were displayed on the cell surface of *C. glutamicum* to directly convert natural biomass to derived reducing sugars by synergistic hydrolysis effect. Carbon monoxide (CO) gas was successfully efficiently converted from CO to CO<sub>2</sub> by functional enzyme complexes on the cell surface of *Ralstonia eutropha* containing carbon monoxide dehydrogenase (CODH) and carbon monoxide sensing heme protein (CooA) with enhanced CO binding affinity. Also, *S. cerevisiae* was metabolically engineered to utilize glycerol as a C3 carbon source and to produce high value product such as ethanol and fatty acid ethyl ester (FAEE) from by-product such as glycerol. Also, we demonstrated the feasibility of employing *C. glutamicum* as host for ALA production and for potential biosynthesis of additional tetrapyrrole compounds, such as porphyrins and hemoproteins. These results suggest that the complexed system may be a promising strategy for C1, 3, 5 and 6 biorefinery as biological tools for production of high value biochemicals such as biofuel, bioplastics. To facilitate the widespread use of biological degradation and hydrocarbon recycling, it is necessary to develop new enzymes and novel microbes that are both effective and economical.

**Designer microbes equipped with nano-scale protein complexes**

Jeong Eun Hyeon, ○Sung Ok Han  
 (Dept. Biotechnol., Korea Univ.)

**Key words** protein engineering, metabolic engineering, bioresources, biorefinery

## 2S-Ep01 抗生物質の濃度依存的現象「抗生物質ホルミシス」の理解と応用

○保坂 毅  
(信州大・バイオメディカル研)  
thosaka@shinshu-u.ac.jp

抗生物質という言葉が誕生して70年あまりになる。その間、様々な微生物の二次代謝産物から数多くの抗生物質が見つけれられ、我々人類はそれらから多大な恩恵を受けてきた。現在では、抗がん作用等の生理活性を示す物質も抗生物質と呼ぶことがあるが、抗生物質の元来の定義は、微生物が生産し、他の微生物の生育を抑制する効果をもち、動物に対して毒性が低い化学物質とされている。いずれにしても、抗生物質と聞けば、抑制や阻害というイメージが湧いてくる。ただ、いつも疑問に思うのは、なぜ微生物は抗生物質をつくるのか、抗生物質本来の働きは何なのか、といった点である。本講演では、これらの疑問に触れながら、演者らの最近の研究成果を紹介する。

多剤耐性菌が次々と発生する中で、新たな抗生物質の発見が求められている。しかし、細菌の二次代謝産物から得られることの多い新奇抗生物質の発見数は減少の一途を辿っている。この窮地の打破に向けた重要課題の一つとして、「細菌に散在する潜在的な二次代謝能を活用するための手法の開発」があげられている。この課題は、過去十数年のゲノムプロジェクトの成果から導かれた事実、「細菌、とりわけ代表的な抗生物質生産菌である放線菌には、通常の培養では検出に到らない極低発現の二次代謝産物生合成遺伝子が予想以上に多く存在する」に基づいている。これを受けて、放線菌に散在する潜在遺伝子を機能させ、新たな抗生物質の生産に結び付ける手法の開発が、遺伝子工学や代謝工学など、様々な面から世界的に進められるようになった。これまでに、リボゾーム工学と呼ばれる斬新な手法など、我が国の研究からも抗生物質の探索に有効な手法が数多く生み出されてきた<sup>1)</sup>。

演者らは、前述した課題に取り組む中で大変興味深い知見を得た<sup>1,2)</sup>。リンコマイシン (LIN) は、リボゾームに作用してタンパク質合成を阻害する抗生物質である。放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) は、最小生育阻止濃度 (MIC) 以上の LIN 存在下で、当然ながら生育できない。一方、この放線菌は、1/80~1/2 MIC の LIN 存在下では、非存在下に比べて色素抗生物質を高生産する。つまり、低濃度の LIN 存在下において、*S. coelicolor* A3(2) は、潜在能力を発揮して、二次代謝が活性化された状態になる。演者らはこれまでに、MIC より低い濃度のリボゾーム攻撃性抗生物質に二次代謝活性化作用があることを様々な放線菌で確認してきた。抗生物質のそのような濃度依存的現象はホルミシスといえる。ホルミシスとは、ある物質が持つ作用の二相性のことで、高濃度では有害に働くが、低濃度であれば逆に有益な作用をもたらす、生物活性を刺激する現象を指す。抗生物質ホルミシスに関する研究は、Davies (プリティッシュコロロンビア大学) により先駆的に進められてきており、MIC より低濃度の抗生物質存在下で細菌の遺伝子発現が大きく変化することが実証されている<sup>3)</sup>。放線菌を対象とした分野において、抗生物質ホルミシスと表立って表現して活用した事例はさほど多くないが、演者らの成果に加えて、低濃度の抗生物質存在下で二次代謝産物の類縁体の生産パターンが変化する現象がいくつか報告されている。これらの成果は、抗生物質のホジティブな面を活用すれば、放線菌の潜在的二次代謝能を引き出せることを強く示唆している。演者らはこれまでの解析から、放線菌 *S. coelicolor* A3(2) が LIN 存在下で色素抗生物質を高生産する条件において、同菌の培養最終菌体量が LIN 非存在下に比べて多くなることも見出した。抗生物質である LIN が、放線菌の生育に対してプラスに働くことは全く予想外であった。加えて、この現象が起こる条件では、F<sub>1</sub>F<sub>2</sub>ATP 合成酵素の発現や機能が変化して、結果的に細胞内の ATP 量が高くなることも判ってきた。このことが菌体量増加の原因となっている可能性は十分に考えられる。その他には、LIN 存在下で、ABC トランスポーターや LIN の標的である 23S rRNA のメチル化酵素の発現が劇的に高くなることも明らかになった。この結果は、細胞内に LIN が蓄積しないように、かつ LIN が標的部位に作用しないようにと、細胞が LIN から逃れ生き延びようと活動している様子を如実に示している。詳細な仕組みは解析中であるが、以上のように、LIN という一つの抗生物質の作用で、放線菌の性質が大きく変化することがはっきり見えてきた。

前述した演者らの研究成果は、「抗生物質とはそもそも何か」の理解を更に難しくさせている。放線菌の二次代謝は、生合成遺伝子、基質、シグナル分子や制御因子、さらにはエネルギー源となる物質などが複雑に作用し合い、巧妙なバランスで成り立っている。そのバランスを整えるのに抗生物質が一役買っているのかもしれない。放線菌の二次代謝産物から新しい抗生物質を見つけ出す研究を更に発展させるためには、生産者である放線菌の性質のみならず、抗生物質の本質も見抜き深く理解することが、とても重要であると演者らは考えている。

<sup>1)</sup> Imai, Y. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 3869 (2015).

<sup>2)</sup> 保坂 毅: *生物工学会誌*, 94(7), in press (2016).

<sup>3)</sup> Davies, J. et al.: *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 445 (2006).

### Understanding the mechanism of the hormetic effects of antibiotics and its application

○ Takeshi Hosaka  
(ICCR, Shinshu Univ.)

**Key words** actinomycetes, secondary metabolism, antibiotics, hormesis

## 2S-Ep02 Application of advanced NMR techniques for analysis of actinobacterial metabolism

○ Dana Ulanova, Masashi Tsuda  
(Dept. Mar. Resour. Sci., Fac. Agric. Mar. Sci., Kochi Univ.)  
ulanova@kochi-u.ac.jp

Actinomycetes are potent producers of useful bioactive compounds. However, many natural products have no or low production under standard laboratory conditions. Thus, development of methods to activate or enhance such metabolite's production is important for novel compound discovery.

Many cultivation-based activation approaches have been reported. The addition of primary metabolism inhibitors at subinhibitory concentrations affects primary and/or secondary biosynthetic pathways, which can result in increased production of secondary metabolites (Crane et al., *Chem Biol*, 2012, p.1020, Imai et al. *Appl Environ Microbiol*, 2015, p.3869). In this study, we analyzed the effect of inhibitor triclosan on secondary metabolism of actinomycetes. Triclosan was added at different stages of bacterial growth and secondary metabolite production was analyzed by LC-MS and NMR profiling.

In addition, we use dynamic nuclear polarization-NMR technique for a real-time visualization of bacterial metabolism. Dynamic nuclear polarization (DNP) is a hyperpolarization technique, which enables to increase the NMR signal intensities by several orders of magnitude by transfer of spin polarization from electrons to nuclei. In this talk, we will introduce the application of this technique for analysis of actinobacterial metabolism *in vivo*. Actinobacterial cultures at mid-exponential phase of growth were fed with hyperpolarized 2-13C pyruvate and 13C-NMR spectra were recorded every 2 s starting from 0.5 s after feeding. As a result, we observed the real-time conversion of pyruvate to intermediates of primary metabolic pathways, such as citric acid cycle, etc. Moreover, time-dependent differences in individual signal maxima and decay, as well as minor signal differences were detected between individual species. In conclusion, DNP-NMR technology is a useful tool for assaying intracellular reactions in short-time scale and could be used for comparing metabolic kinetics of different actinobacteria.

### Application of advanced NMR techniques for analysis of actinobacterial metabolism

○ Dana Ulanova, Masashi Tsuda  
(Dept. Mar. Resour. Sci., Fac. Agric. Mar. Sci., Kochi Univ.)

**Key words** actinomycetes, secondary metabolism, primary metabolism, DNP-NMR

## 2S-Ep03 多価不飽和脂肪酸合成酵素の機能解析

林 祥平<sup>1</sup>, ○佐藤 康治<sup>2</sup>, 氏原 哲朗<sup>3</sup>, 大川 徹<sup>2</sup>  
 (1)北大院・総合化学, 2)北大院・工, 3)協和発酵バイオ)  
 syasu@eng.hokudai.ac.jp

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) に代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は機能性脂質と呼ばれ、様々な健康増進効果が報告されており、その需要は年々増加している。現在の主な PUFA 供給源は魚油等の海洋資源であるが、海洋資源の枯渇や安定供給が問題となっており、新たな供給源として微生物発酵が注目されている。しかしその生産性は十分ではなく、その向上が望まれている。

PUFA はある種の海洋性微細藻類や細菌により生産され、一部の菌株ではポリケチド合成酵素 (PKS) に似た構造を有するマルチドメインからなる巨大な酵素複合体である PUFA 合成酵素により行われる。また本酵素には複数の連続したアシルキャリアプロテイン (ACP) ドメインを持つという PKS には見られない特徴がある。このタンデム ACP の機能解析例として、6つの ACP を持つ原核微生物 *Shewanella japonica* 由来の PUFA 合成酵素の ACP に順次変異を導入して不活性型にした結果、不活性型ドメイン数の増加に伴い PUFA 生産性が低下することが報告されている (Jiang ら, JACS 2008, p. 6336)。

真核微細藻類である *Schizochytrium* sp. 由来 PUFA 合成酵素は OrfABC の 3 サブユニットより構成され、その OrfA 中に 9 個の連続した ACP ドメインが存在する。そこで上述の現象が真核微細藻類でも再現するか検討した。ACP ドメイン数を 4 から 11 個とした *orfA* 遺伝子を再構築し、大腸菌で異種宿主発現させ PUFA 生産性を評価した。その結果、真核微細藻類由来の酵素においても ACP ドメイン数の減少に伴い生産性は低下した。興味深いことに、ACP ドメイン数を 4 個としても生産性を保持していたことから、本 PUFA 合成酵素は幅広い ACP ドメイン数を許容できると考えられた。そこで、10 および 11 個へと増加させ生産性に対する影響を検証した。その結果、ACP ドメイン数の増加により、PUFA 生産性の向上が確認された。以上より、PUFA 合成酵素の ACP ドメイン数は、生産性を制御していると考えられた。

次に、本現象の普遍性を原核微生物由来 PUFA 合成酵素を用いて検証した。ACP ドメインを 4 個もつ *Shewanella oneidensis* 由来 PUFA 合成酵素 (PfaABCD) の ACP ドメイン数を 5、6、7、8、および 9 個に増加させ、大腸菌における異種宿主発現により PUFA 生産性を評価した。その結果、本酵素においても ACP ドメイン数の増加に伴った PUFA 生産性の向上が認められた。

以上より、PUFA 合成酵素は複数の ACP ドメインを許容可能であり、その数により PUFA 生産性が制御されていることが明らかとなり、ACP ドメイン数の増加による PUFA 生産性向上に成功した。

## Functional analysis of tandem acyl carrier protein in polyunsaturated fatty acid synthases

Shohei Hayashi<sup>1</sup>, ○Yasuharu Satoh<sup>2</sup>, Tetsuro Ujihara<sup>3</sup>, Tohru Dairi<sup>2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., 2)Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., 3)Kyowa Hakko Bio)

**Key words** polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, ACP

## 2S-Ep04 物質生産を志向した未利用遺伝子の発掘と宿主の改変

○鮎 信学  
 (静県大・食栄)  
 funa@u-shizuoka-ken.ac.jp

1907 年に John Norman Collie は、芳香族ポリケチドの生合成に根本的な規則性が存在する可能性を示唆した。1955 年、Arthur Birch は acetate hypothesis を提唱し、芳香族ポリケチドの生合成の規則性が解明された。現在、芳香族ポリケチドの生合成は、ほぼ理解されていると言っても過言ではない。しかしながら、半世紀以上前の単純な生合成反応であっても、生合成「酵素」とその反応メカニズムの多くは解明されていない。そのため、有用にも関わらず、微生物生産など、安価大量調整が達成されていない。

環構造は二次代謝産物に化学的な多様性をもたらし、多彩な生理活性の要因となっている。芳香族ポリケチドの生合成は、ポリケチド鎖生成と環形成に分けられる。ポリケチド鎖は、ポリケチド合成酵素 (PKS) により合成される。PKS は I~III 型に分類され、カビの I 型、放線菌の II 型、細菌、カビおよび植物の III 型が芳香族ポリケチドの合成を担う。ポリケチド鎖の環化は、PKS の型によって異なる。I 型 PKS では、同一ポリペプチド上の product template (PT) domain や thioesterase domain などが、II 型 PKS では subunit の環化酵素が、それぞれ環形成を担う。一方、III 型 PKS には環形成のための domain や subunit がないと考えられていた。我々は、III 型 PKS の反応に関与する環化酵素が存在すると考え、研究を開始した。

我々は、互いに相溶性が高い二種の III 型 PKS が、それぞれナフトレンとイソクマリン骨格の合成を触媒することを見出した。放線菌由来の IG64\_RS22470 は、既知 III 型 PKS、RppA (ナフトレン骨格を合成する) と相同であるのにも関わらず、閉環反応を触媒しない。閉環反応は、IG64\_RS22470 とオベロンを形成する環化酵素 (IG64\_RS22475) により RppA とは異なる様式で行われ、最終的にイソクマリン骨格を与える。最近、III 型 PKS の環形成反応を変化させる酵素、OAC (II 型 PKS の環化酵素 Tem1 の相同蛋白) が見出された。環化酵素の発見は、OAC について二例目の成果である。驚くべくことに、環化酵素 (IG64\_RS22475) は、I 型 PKS の PT domain と相同であった。PT domain は一部の I 型 PKS に特有であると考えられているが、本発見により細菌にも分布していることが明らかになった。また、イソクマリン類はカビ、地衣類、植物から見出されており、様々な生理活性を有する。本発見はイソクマリンの微生物生産に繋がる成果である。

我々は、放線菌の II 型 PKS の環化酵素 SnoaL に相同な酵素・Soce2135 を粘菌から見出した。Soce2135 は、SoceCHS1 (ナフトレン骨格合成する RppA のホモログ)、Soce2134 (aldo-keto reductase) とオベロンを形成していた。詳細な検討の結果、本オベロンは 1,8-DHN の合成を担うことが判明した。Soce2135 は脱水酵素であり、上述の環化酵素 (IG64\_RS22475) とは異なり、閉環反応には関与しなかった。予期していなかった結果ではあるが、本発見は細菌から 1,8-DHN の生合成酵素が見出された初めての例である。なお、カビにおいて、1,8-DHN を前駆体とする DHN メラニン植物への感染に必須である。本成果は全く新規なメカニズムによる、植物病原性の細菌の防除手法の開発に繋がる可能性がある。

生産生物からの収量が少ない場合、複雑な構造のため有機合成が煩雑な場合など、芳香族ポリケチドは大量調整が困難なことが多い。一方、大腸菌や放線菌の組換え体を用いた芳香族ポリケチドの異種生産が注目されている。しかしながら、大腸菌は本来、二次代謝産物を生産しないため、組換え大腸菌によるポリケチド生産では収量が少ない。また、放線菌には芳香族化合物の異化経路が存在し、組換え放線菌では芳香族ポリケチドの分解が懸念される。我々は大腸菌の一次代謝流量の増強を行い、芳香族ポリケチドの収量の劇的な改善に成功した。芳香族ポリケチドの前駆体は malonyl-CoA である。一方、malonyl-CoA は脂肪酸合成の基質でもあり、その生合成は厳格に制御されている。そこで、大腸菌 *E. coli* BL21 株の脂肪酸合成酵素 (FAS) 遺伝子 *fabH*, *fabF*, *fabB* の破壊株および *fabB/fabH*, *fabF/fabH* の二重破壊株を作製した。生体内 acetyl-CoA および malonyl-CoA 濃度を測定した結果、各 FAS 破壊株では親株よりもそれらの濃度が高かった。特に  $\Delta$ fabFH 株では、それぞれ 6 倍、45 倍濃度が親株よりも高かった。また、転写量解析の結果、各 FAS 破壊株において脂肪酸合成の正の制御因子 *fadR*, acetyl-CoA carboxylase *accABC*, FAS 遺伝子の転写量が親株よりも上昇していた。以上より、脂肪酸合成に関する酵素の転写量の上昇が malonyl-CoA 量の増大の一因であることが判明した。さらに、各 FAS 破壊株ではグリオキシル酸回路における負の転写抑制因子 *iclR* の転写量が上昇し、同回路の生合成酵素 *aceA*, *aceB* の転写が抑制されていた。グリオキシル酸回路で消費される acetyl-CoA の量が減少したことが acetyl-CoA 量の増大の原因であると推測された。

以上のように我々は、芳香族ポリケチドの生合成酵素の探索研究とその異種生産のための宿主の改良を行っている。本シンポジウムでは、上記の成果を概説し、その意義を中心に議論する。

## Biosynthesis and production of aromatic polyketides in bacteria

○Nobutaka Funa  
 (Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

**Key words** biosynthesis, *Escherichia coli*, aromatic ring compound, malonyl-CoA

**2S-Ep05 放線菌二次代謝生成・制御系の合理的改変による休眠二次代謝の発掘**

○荒川 賢治  
(広島大院・先端物質)  
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌は微生物由来二次代謝産物の7割近くを生産する有用土壌微生物である。放線菌二次代謝産物に関して、近年では生成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待される。我々が研究対象としている放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM)を生産し、3つの線状プラスミド pSLA2-L、M、S を保持している。その中でも pSLA2-L は、LC、LM 生成遺伝子の他にもこれらの制御遺伝子や構造未知の type-II 型ポリケチド (roc)・カロテノイド (crt) 生成遺伝子群も有しており、二次代謝生産と制御の相関性が興味深い。

我々は制御カスケード解析を行うに当たり、数多くの制御遺伝子変異株を取得している。とくにリプレッサー *srrB* を破壊すると LC、LM 大量生産株が取得できた。この知見は本菌の潜在的二次代謝産物のゲノムマイニングに応用可能であることを示唆している。そこで我々は、*srrB* に加えて「主要二次代謝生成」である LC、LM 生成遺伝子に対して変異を施した三重変異株 KA57 株を構築した。本株は分子式  $C_{10}H_{20}N_2O_3$  のアゾキアルケン化合物 KA57-A を蓄積した。KA57-A は親株の通常培養では検出できず、遺伝子工学による休眠二次代謝の覚醒に成功した。さらに上述の代謝物に関しては生成遺伝子が同定されおらず、それらの生成メカニズム、とりわけアゾキシ結合の形成機構は大変興味深い。標識化合物の取り込み実験により、*cis*-1-ヘキセニル基 (C1'-C6') は脂肪酸由来であり、C-1 位は酢酸の2位炭素由来であることが示唆された。一方、C2-C4 位に関しては、[2,3,3- $^3H_3$ ]DL-serine を添加したところ、KA57-A の H-4 位にのみ重水素の取り込みが認められた。また [1,1- $^2H_2$ ]1-hexylamine を添加し、常法に従って精製したところ、KA57-A の他に分離困難な夾雑物が認められた。 $^2H$ -NMR および ESI-MS 解析を行ったところ、まず  $^2H$ -NMR において  $\delta_D = 6.78, 4.14$  が検出された。前者は [1'- $^2H$ ]-KA57-A の 1' 位シグナルに対応する化学シフト値であり、ESI-MS においても同様に [M+Na] $^+$ =240 が検出された。一方、[M+Na] $^+$ =243 のピークも検出されており、分子式は  $C_{10}H_{20}^2H_2N_2O_3$  と示唆された。これは [1',1'- $^2H_2$ ]1',2'-dihydro-KA57-A に相当しており、 $^2H$ -NMR における後者の高磁場シグナルは本化合物に対応すると考えられる。重水素標識ヘキシルアミン添加時の夾雑物の蓄積は、KA57-A 生成における 1',2'-不飽和化がアゾキシ結合形成後に生じることを意味している。本発表では生成の詳細および生物活性についても言及する。

**Mining of silent secondary metabolites by altering the main biosynthetic pathways and their regulatory system in *Streptomyces* species**

○Kenji Arakawa  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** biosynthesis, *Streptomyces*, repressor, secondary metabolite

**2P-1p001 高基質親和性を有する好熱性光合成細菌由来サルコシオキシダーゼ**

○竹本 淳一, 山本 真知, 加納 周作, 中野 祥平, 西矢 芳昭  
(摂南大・生命科学)  
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景および目的】腎疾患のマーカーであるクレアチニンは、酵素法により高い精度で測定されている。クレアチニン測定酵素法は、細菌が産生する3つのクレアチニン代謝酵素、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシオキシダーゼ (Sox) によりクレアチニンを過酸化水素に導き、発色定量する。クレアチニン測定酵素法の精度を高めるためには、追従酵素である Sox の触媒効率を高め、測定反応を速やかに終点に持っていく必要がある。優れた臨床検査用酵素を開発し予防医学に貢献するという大きな目標の一環として、今回、好熱性光合成細菌由来 Sox ホモログの特性評価を行った。

【実験方法および結果】好熱性光合成細菌には、既知の Sox と 30% 台の相同性を有するタンパク質遺伝子が存在する。本遺伝子のアミノ酸配列を構造比較したところ、既知 Sox の活性中心近傍アミノ酸残基とは一部に異なる特徴が認められた。われわれは、本タンパク質が Sox であり、既知の酵素とは触媒効率に差異が見られることを期待した。本タンパク質の特性を評価したところ、サルコシニンに対する  $K_m$  値が既知酵素 (*Bacillus* 属由来) の約 1/30 と極めて高い基質親和性を有することが分かった。また、ソフトウェア MOE により構築した Sox の構造モデルを基に、変異効果を解釈した。

【結論】本 Sox はクレアチニン測定酵素法の精度向上に資するレベルの高い基質親和性を有していた。本 Sox をクレアチニン測定に応用することにより、酵素法測定の精度を更に高めることが可能となり、測定の信頼性向上に貢献することが期待される。

**sarcosine oxidase from a thermophilic photosynthetic bacterium with high substrate specificity**

○Jyunichi Takemoto, Machi Yamamoto, Syusaku Kano, Shohei Nakano,  
Yoshiaki Nishi  
(Life Sci, Setsunan Univ.)

**Key words** Creatinine assay, Sarcosine oxidase, Substrate specificity, Mutagenesis

**2P-1p002 ビルビン酸オキシダーゼ／酢酸菌キナーゼ法による実用的 ATP 再生法**

○北岡 本光, 西本 完  
(農研機構)  
mkitaoka@affrc.go.jp

キナーゼは通常その基質である ATP 高濃度下で強い基質阻害を受ける。ATP が効果であることも合わせるキナーゼ反応による物質生産を実用的に行うためには ADP から ATP を再生する系を組み合わせて用いることが必要である。ATP を再生するためには ADP-ATP と同程度以上の結合エネルギーを持つリン酸エステルからのリン酸転移を行う必要がある。実用的な ATP 再生系として例えばビルビン酸キナーゼ、クレアチン酸キナーゼ、酢酸キナーゼ、ポリリン酸キナーゼを用いる系などが報告されている。ビルビン酸オキシダーゼと酢酸キナーゼを組み合わせて用いることにより、ビルビン酸をエネルギー源として正リン酸を ATP に導入する方法について検討を行った。モデル系として、ガラクトキナーゼによるガラクトース 1-リン酸の合成を試みた。

ビルビン酸、リン酸、ガラクトースを基質とし、触媒量の ATP の存在下にビルビン酸オキシダーゼ、酢酸キナーゼ、ガラクトキナーゼを作用させることによるガラクトース 1-リン酸の生成を確認した。ビルビン酸オキシダーゼは酸素分子を基質とするため、反応速度は反応液の比気液接触面積および気相の酸素分圧の影響を受けた。ビルビン酸オキシダーゼはビルビン酸 1 分子をリン酸 1 分子の存在下に酸素酸化し、アセチルリン酸 1 分子を生成する酵素とされている。しかしながら、ビルビン酸 1 分子から生成可能なガラクトース 1-リン酸は 0.5 分子以下であった。本反応を最適化したところ 1 M のビルビン酸をエネルギー源として 400 mM のガラクトース 1-リン酸を合成することに成功した。さらに、本反応とホスホリラーゼの反応を同時に行うことにより高収率でのオリゴ糖のワンポット酵素合成が可能であることを実証した。

**Practical regeneration of ATP employing pyruvate oxidase and acetate kinase**

○Motomitsu Kitaoka, Mamoru Nishimoto  
(NARO)

**Key words** ATP regeneration, kinase, pyruvate oxidase, acetate kinase

## 2P-1p003 高比活性 L-グルタミン酸オキシダーゼの異種発現と酵素学的性質

○林 優花<sup>1</sup>, 野本 健斗<sup>1</sup>, 長南 圭介<sup>1</sup>, 酒瀬川 信一<sup>2</sup>, 杉森 大助<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福島大・共生システム理工, <sup>2</sup>旭化成ファーマ)  
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【背景・目的】既報 L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は、比活性、耐熱性、ならびに大腸菌による異種発現に関して技術的課題が残されている。そこで、これら課題を克服する LGOX の開発を目指し、スクリーニングを行った。その結果、比活性が高く、大腸菌により容易に発現できる LGOX を放線菌から見出した。本発表では、本 LGOX の精製と大腸菌による異種発現、ならびに発現酵素の酵素学的諸性質について報告する。

【方法・結果】放線菌 NT1 株菌体内から有機溶媒沈殿とカラムクロマトグラフィーにより LGOX を部分精製した。部分精製酵素は pH 6、50℃ 付近で最大活性を示し、その比活性は 11 U/mg-protein であった。本酵素は、L-グルタミン酸以外のアミノ酸には活性を示さない非常に高い基質特異性を有していた。SDS-PAGE で得られたバンドを LC-MS 解析することでペプチド配列を取得し、次世代シーケンサーにより取得した NT1 株のドラフトゲノムシーケンス中から本酵素遺伝子を推定した。推定 orf をクローニング、大腸菌発現させ、LGOX 活性を確認することで目的 LGOX 遺伝子 (2073 bp) を特定した。さらに、690 アミノ酸残基からなる本酵素の推定アミノ酸配列を決定した。本酵素のアミノ酸配列は、放線菌 monoamine oxidase や酸化 LGOX のアミノ酸配列と約 80% 以上の高い相同性を示した。pET24a と *E. coli* BL21 (DE3) を用いて NT1 株 LGOX を異種発現させた結果、可溶性画分として菌体内に発現 (比活性 4.7 U/mg-protein) させることに成功した。さらに、発現 LGOX は pH 5.1、55℃ で 45 min 活性低下が認められず、既知 LGOX のなかでも比較的高い耐熱性を持つことがわかった。

### Heterologous expression and characterization of L-glutamate oxidase with high specific activity

○Yuka Hayashi<sup>1</sup>, Kento Nomoto<sup>1</sup>, Keisuke Chonan<sup>1</sup>, Shin-ichi Sakasegawa<sup>2</sup>,  
Daisuke Sugimori<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., <sup>2</sup>Asahi Kasei Pharma Corp.)

**Key words** L-glutamate oxidase, heterologous production, high specific activity, thermostability

## 2P-1p004 FMO 法と QM/MM 法による D-アミノ酸オキシダーゼの反応機構の理論的検討

○阿部 幸浩<sup>1</sup>, 庄司 光男<sup>2</sup>, 浅野 泰久<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>東洋紡, <sup>2</sup>筑波大学・計算科学研究セ, <sup>3</sup>富山県大・生工研セ)  
yukihiro\_abe@toyobo.jp

【背景と目的】浅野らは、D-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)の R-フェニルアラニンに作用する porcine kidney D-amino acid oxidase(pkDAO)について、Y228L と R283G の 2 か所をミューテーションすることにより R-a-メチルベンジルアミンに対して基質特異性を示す酵素を合成した。DAAO の反応機構として(1)ヒドリド移動、(2)1 電子移動、(3)ポラー機構が提案されているが、詳細は解明されていない。本研究では、これら 2 種類の基質が受ける周囲の残基からの相互作用をフラグメント分子軌道(FMO)法で求め、次に反応経路を量子古典混合計算(QM/MM)法で検討した。

【計算方法】DAAO および pkDAO の結晶構造 (PDB ID: 1VE9, 3WGT) 中に基質を置き、周囲に水を配置して系を作り、20 ns 間の MD シミュレーションを行った。反応中心から半径 50 Å の球状に系を切り出して QM/MM 計算モデルとした。フラビン環と基質、およびその間に存在する水、さらに重要と思われる残基を QM 領域にとり、QM/MM (B3LYP-D3(6-31G\*)/Amber99)法で構造最適化した。酵素表面から 6 Å 内の水を残して、FMO 法により基質と周辺残基との相互作用を計算した。また、nudged elastic band (NEB)法により反応経路および遷移状態を推定した。

【結果と考察】1VE9-RPHE および 3WGT-RMBA の 2 つの系において、反応は基質の a 炭素から電子を 1 つ有した H 原子(すなわち H・として)がフラビン N5 へ移動すると同時に、基質の N 原子とフラビン C4a の間で電子の移動があることが示唆された。

### Reaction mechanism of D-amino acid oxidases revealed by FMO and QM/MM methods

○Yukihiro Abe<sup>1</sup>, Mitsuo Shoji<sup>2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>TOYOBO Co., Ltd., <sup>2</sup>CCS, Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

**Key words** D-amino acid oxidase, reaction mechanism, FMO, QM/MM

## 2P-1p005 アミノアシルプロリン合成におけるピロフォスファターゼの効果と菌体反応系での生産

○鈴木 伸<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研)  
kkino@waseda.jp

【目的】アミノアシルプロリン(Xaa-Pro)は血圧上昇抑制作用や血糖降下作用を示す有用化合物である。我々は、非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化(A)ドメインを利用することで Xaa-Pro の酵素的合成に成功している。さらに、*Deinococcus proteolyticus* MRP 由来の class III PPK2(Deipr\_1912)を用いた単一酵素による AMP からの ATP 再生系を構築し、ATP を必要とし AMP を生成する本反応への有効性を報告している。しかし、反応速度が低く Xaa-Pro 合成量が少ないことが課題であった。A ドメインによるアデニル化は基質特異性評価に用いられる ATP-PPi 交換反応に見られるように可逆的であり、過剰のピロリン酸(PPi)存在下で逆反応が進行する。本研究では、反応で生じる PPi をピロフォスファターゼ(PPase)により分解することでアデニル化を促進し、Xaa-Pro 合成速度を向上できると考えた。

【方法・結果】*Brevibacillus parabravis* IAM1032 由来 tyrocidine synthetase A の A ドメイン(TycA-A)を用いた Trp-Pro 合成に Deipr\_1912 による ATP 再生系を共役させた反応に大腸菌由来の PPase を添加した。その結果、12 時間までの反応速度が 14 倍に上昇した。さらに、反応条件の最適化により 72 時間で最大 6.2 mM の Trp-Pro 合成を達成した。予想通り PPase 添加の効果を得ることができた。本結果より、大腸菌を利用する反応では宿主由来の PPase が作用し同様の効果が得られると考えた。Xaa-Pro およびプロリンそれぞれの分解酵素遺伝子 *pepQ* および *putA* を欠損させた大腸菌にて TycA-A と Deipr\_1912 を発現させ、Trp-Pro 生産を検討した。菌体反応においても ATP 再生系の共役により AMP を初発基質とした Trp-Pro の生成が確認でき、精製酵素反応と比較して高濃度の AMP が必要ではあるが、24 時間で 6.7 mM の Trp-Pro 生産を達成した。

1) 鈴木ら, 2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集 p.103 (演題番号 1P-059)

### Effect of pyrophosphatase on aminoacyl proline synthesis and the production by whole cell reaction

○Shin Suzuki<sup>1</sup>, Ryotaro Hara<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** pyrophosphatase, aminoacyl proline, NRPS, polyphosphate kinase

## 2P-1p006 Fatty acyl-AMP リガーゼを利用した脂肪酸アミド合成法の開発

○平井 健吾<sup>1</sup>, 原 良太郎<sup>2</sup>, 木野 邦器<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>早大・理工研)  
kkino@waseda.jp

【目的】我々は、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)由来のアデニル化ドメインにおけるアミノ酸のカルボキシ基活性化機構に着目し、その反応機構においてプロリンなど求核性の高い化合物を作用させると多様なアミド化合物合成が可能であることを報告している<sup>1)</sup>。本研究では、NRPS と同様にアデニレート合成酵素スーパーファミリーに属するアシル CoA 合成酵素(ACS)に着目し、脂肪酸のアデニル化に続き、求核性の高いアミン類を作用させることで、アミド結合の形成が可能と推察し、脂肪酸アミド合成を検討した。

【方法・結果】ACS のひとつである Fatty acyl-AMP ligase (FAAL) は、細胞表面における複合脂質の生合成の開始反応を触媒し、長鎖の脂肪酸をアデニル化する *fadD* 遺伝子にコードされる<sup>2)</sup>。そこで、*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 由来の FAAL を利用した脂肪酸アミドの合成を検討した。当該酵素の基質をデカン酸(C<sub>10</sub>)とし、求核剤にプロリンを含む種々のアミンを用い、ATP および MgSO<sub>4</sub> 存在下で反応したところ、予想通り decanoyl-L-Pro をはじめ多くの組み合わせで脂肪酸アミド化合物の合成を確認した。また、脂肪酸の基質特異性を検討したところ、C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub> の脂肪酸においても同様にアミド化合物が合成可能であった。以上の結果は、NRPS のアデニル化ドメインを利用した場合と同じく、ACS による脂肪酸のアデニル化とそれに続く求核置換反応によりアミド結合形成が可能であり、簡便かつ汎用性のあるアミド化合物の新たな合成法を提案するものである。

1) 鈴木ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 4C15a08

2) Trivedi, O.A., et al., *Nature*, 428, 441-445 (2004)

### Development of fatty acid amide synthesis using fatty acyl-AMP ligase

○Kengo Hirai<sup>1</sup>, Ryotaro Hara<sup>2</sup>, Kuniki Kino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** fatty acyl-AMP ligase, acyl-CoA synthetase, fatty acid amide, amide bond

**2P-1p007 プナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) 由来メタロプロテアーゼの遺伝子クローニング**

○福田 泰久, 大庭 将矢, 藤井 謙吾, 白坂 憲章  
(近畿大・農)  
yfukuta@nara.kindai.ac.jp

**【背景と目的】**きこ類微生物の最大の特徴は、肉眼で観察可能なきこ(子実体)形成という劇的な形態変化である。近畿大学農学部、寺下らは、酸性プロテアーゼ(Pepsin)の特異的阻害剤であるS-PI(Streptomyces-Pepsin Inhibitor)を培養基に添加すると子実体の形成を促進し、メタロプロテアーゼの阻害剤であるTalopectinやPhosphoramidonを培養基に添加した場合には著しい形成阻害を示す現象を、いくつかの食用きのこにおいて発見した。本発表では*H. marmoreus*の子実体形成に関わると考えられるPhosphoramidon感受性プロテアーゼの遺伝子クローニングについて報告する。

**【方法と結果】**プナシメジ供試菌株には、*H. marmoreus* NN12株を用い、菌床栽培を行った。芽だし処理後の培養菌糸をメタロプロテアーゼ源として酵素精製を行った。N末端アミノ酸配列決定のためのプロテインシーケンス分析は、PPSQ-31B(島津製作所)を用いて解析を行い、内部配列の決定には、autoflex speed TOF/TOF-KN2(Bruker)を用いた。また、供試菌株である*H. marmoreus* NN12株のドラフトゲノム配列の決定を、次世代シーケンサーNextSeq500(illumina)を用いて行い、得られたドラフトシーケンス内でBLAST検索を行い、遺伝子配列の決定を行った。本メタロプロテアーゼ遺伝子は、Fungalysin(Peptidase M36 family)およびZn-dependent metalloprotease(亜鉛プロテアーゼ)の配列モチーフをもつプロテアーゼであることが解明された。本研究は、JSPS 科研費 26870730 及び、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 S1512004 の助成を受けたものである。

**cDNA cloning of metalloprotease gene from *Hypsizygus marmoreus***

○Yasuhisa Fukuta, Masaya Oba, Kengo Fuji, Norifumi Shirasaka  
(Fac. Agric., Kinki Univ.)

**Key words** metallo protease

**2P-1p008 エリンギ由来セリンアミノペプチダーゼの非触媒領域の酸化が及ぼす基質特異性への影響**

○東海 彰太<sup>1</sup>, 有馬 二郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鳥取大院・連農, <sup>2</sup>鳥取大・農)  
arima@muses.tottori-u.ac.jp

**【目的】**我々はエリンギから、ファミリー S9 に属する新奇セリンアミノペプチダーゼを取得した。本酵素は加水分解と拮抗してアミノリシス反応を触媒し、水系溶媒中で容易にジペプチド類を合成する。従って、本酵素の基質特異性の拡大は、様々な有用ペプチド類の合成の一手段となり得る。一方で、本酵素は過酸化水素処理により基質特異性変化が確認された。そこで本研究では、本酵素の基質認識機構の解明を目指し、この性質変化を足掛かりとして、酸化が予測されたアミノ酸残基の機能解析を行った。

**【方法及び結果】**本酵素を1%の過酸化水素で1時間酸化すると、L-Phe-pNA に対する活性は保持されたが、L-Leu-pNA に対する活性は極端に低下した。酸化処理した本酵素のMALDI-TOF MS 解析の結果、本酵素を構成するアミノ酸配列中のLeu193-Arg211が酸化部位の一つとして特定された。この領域は、触媒部位から遠く離れており、基質認識に果たす役割が未解明であるβ-プロペラドメインの一部に位置していた。そこで、特定された領域中の最も酸化されやすいと思われるMet203、及び本酵素中に存在するCysをAlaに置換し、活性に与える影響を比較検討した。その結果、CysのAla置換では、両基質に対する活性が低下したのに対して、Met203のAla置換では、L-Leu-pNAに対する活性のみが低下し、酸化処理と似た効果が観察された。さらに、本残基を酸化されにくいAlaに置換した上で、1%の過酸化水素処理による基質特異性の継時変化を検討した結果、1時間処理までL-Leu-pNAに対する活性が保持された。これらの結果から、酸化の初期段階において、Met203が優先的に酸化されることで本酵素の基質特異性変化が引き起こされると考えられた。

**Effect of oxidation of non-catalytic domain of serine aminopeptidase from *Pleurotus eryngii* on its substrate preference**

○Shota Tokai<sup>1</sup>, Jiro Arima<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>United. Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ., <sup>2</sup>Agric., Tottori Univ.)

**Key words** aminopeptidase, *Pleurotus eryngii*, substrate specificity, oxidation

**2P-1p009 *Brevundimonas diminuta* 由来のコバルト依存性 L-アミノ酸アミダーゼの X 線結晶構造解析**

○米田 英伸<sup>1</sup>, 泉 厚志<sup>2</sup>, 浅野 泰久<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>富山県大・工, <sup>2</sup>JST, ERATO)  
hkameda@pu-toyama.ac.jp

**【目的】***Brevundimonas diminuta* 由来のコバルト依存性 L-アミノ酸アミダーゼ(LAA)はL-フェニルアラニンアミド(L-Phe-NH<sub>2</sub>)などのアミノ酸アミドをL-立体選択的に加水分解する6量体酵素で、反応液中にコバルトイオンが存在するときに顕著に酵素活性が上昇する<sup>(1)</sup>。本酵素はアミノ酸アミドラセマーゼと共存させることで、ラセミアミノ酸アミドの動的光学分割による効率的なL-アミノ酸の合成に利用可能である。本研究では、LAAの高機能化のための構造情報を得ることを目的としてX線結晶構造解析を行った。

**【方法と結果】**組換え大腸菌の無細胞抽出液より硫酸分画と各種クロマトグラフィーにより精製したLAAを用いて結晶化を行った。2mM CoCl<sub>2</sub>と2mM L-Pheを含む条件でハンギングドロップ法での結晶化条件の探索を行い、良好なX線回折を与える結晶を得た。Photon Factoryの放射光を用いて回折データを収集し、*Pseudomonas putida*のロイシニアミノペプチダーゼの構造を用いた分子置換法によりLAAの2.5Å分解能の構造を決定した。本酵素の結晶はP1の非対称単位に4個の6量体分子、すなわち24個のサブユニットを含む。サブユニット当たり2個のコバルト原子がアスパラギン酸、グルタミン酸、およびリジン残基の側鎖と結合した領域が本酵素の活性中心と考えられ、コバルトイオンによって活性化された水分子により基質のアミド結合の加水分解が進行すると予想された。

(1)Komeda H, Hariyama N, Asano Y, *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) 70:412-421.

**X-ray crystallographic analysis of cobalt-dependent L-amino acid amidase from *Brevundimonas diminuta***

○Hidenobu Komeda<sup>1</sup>, Atsushi Izumi<sup>2</sup>, Yasuhisa Asano<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>JST, ERATO)

**Key words** amino acid, amidase, X-ray crystallography

**2P-1p010 黄麹菌 D-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ(DamA)の機能解析とアミノリシス反応に対する溶媒の影響**

森田(松下) 真由美, 服部 領太, 鈴木 聡, 楠本 憲一  
(農研機構 食品研究部門)  
kusumoto@affrc.go.jp

**【背景】**我々はこれまでに、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ゲノムデータベースよりD-アミノ酸特異的アミノペプチダーゼ活性を有しかつアミノリシス活性を有する遺伝子(AOR\_1124064, old locus tag AO090138000075)を見出し、D-stereoselective aminopeptidase (DamA)と名づけ、その酵素的機能解析を行った(M. Matsushita-Morita et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171:145-164, 2013)。本発表では、さらに本酵素の破壊株や過剰発現株を作製し、麹菌での機能の推定を試みた。またDamAのアミノリシス活性に着目し、ペプチド合成の最適な溶媒の検討を行った。

**【方法及び結果】***A. oryzae* RIB40 (ΔligD, ΔpyrG)株を宿主株として、上記遺伝子の破壊株と過剰発現株を作製し、各株の寒天培地で孢子形成と形態成長を比較した。その結果、対照株と比較して、破壊株と過剰発現株は大きな形態の差は見られなかった。また、DamAはD-Leu-NH<sub>2</sub>基質に対して、加水分解活性だけでなくD-Leu-D-Leu-NH<sub>2</sub>などのペプチド合成を行うアミノリシス活性を示すが、これまでにこの活性は3.0M NaClが添加された水溶液中で促進される事を明らかにしている。今回、酵素反応液中の溶媒を8種類の有機溶媒(各終濃度50%)に変えて、DamAのアミノリシス活性によるペプチド合成への影響を調べた。その結果、反応終了後の各液をTLCプレートで展開したところ、反応液中にエタノールやメタノール、ブタノール、イソプロパノールが存在すると、水溶液のみの反応液と比較して、新たなペプチドと思われる幾つかのスポットが確認できた。また、50%エタノール含有反応液は、メタノール含有反応液とはほぼ同等だが、他の6種の有機溶媒よりも多いスポットが確認でき、3.0M NaCl添加の反応液と比較しても、ペプチド合成が進むことが明らかとなった。

**Investigation of aminolytic activity for D-stereoselective aminopeptidase of *Aspergillus oryzae***

Mayumi Matsushita-Morita, Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto (NFRI)

**Key words** D-amino peptidase, aminolysis, *Aspergillus oryzae*, peptide synthesis

## 2P-1p011 *Candida antarctica* lipase A の組換え大腸菌での菌体外生産

○服部 菜月, 中野 秀雄, 岩崎 雄吾  
(名大院・生命農学)  
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】リパーゼの位置選択性を利用した油脂の加工・分析は応用上重要な技術である。現在知られているリパーゼによる油脂の位置選択的反応のほとんどは、リパーゼの *sn*-1,3-位特異性を利用したものに限定されている。その理由は、極めて厳密な *sn*-1,3-位特異性を有する酵素が知られているのに対し、厳密な *sn*-2 位特異性を有するリパーゼがないからである。担子菌類酵母 *Candida antarctica* は二種のリパーゼ A 及び B を産生するが、そのうちリパーゼ A (*Candida antarctica* lipase A, CALA) は油脂の *sn*-2 位に弱い位置選択性を示す。

本研究の最終目標は CALA を蛋白質工学的に改変し、厳密な *sn*-2 位特異性を付与することである。この目的のため、野生型 CALA 及びその変異体を簡便に調製できる発現系が必要である。そこで本研究では CALA の組換え大腸菌での細胞外発現系の構築を目指した。

【方法と結果】大腸菌用にコドン最適化した人工 CALA 遺伝子の上流に *pelB* signal 配列を付加した CALA 発現プラスミドを構築した。このプラスミドを保持した *E. coli* BL21(DE3)を用いて発現実験を行ったところ、CALA は培養上清中に検出された。培養条件を最適化した後、培養上清から CALA の精製を行ったところ、200 mL の培養上清から 2.8mg の精製 CALA を得る事ができた。精製 CALA の N 末端配列を決定し、*pelB* シグナルペプチドが正しく除去されていることを確認した。また、精製 CALA を用いてトリアシルグリセロール分解反応を行い、生成するジアシルグリセロールの異性体組成を分析したところ、組換え CALA は 2 位選択性を有することを再検証した。

## Extracellular production of *Candida antarctica* lipase A by a recombinant *Escherichia coli*.

○Nazuki Hattori, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** *Candida antarctica* lipase A, *Escherichia coli*, positional specificity, triacylglycerol

## 2P-1p012 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析

○長谷成記<sup>1</sup>, 中山久之<sup>1</sup>, 小坂 恵<sup>2</sup>, 玉田 太郎<sup>3</sup>, 上村 一雄<sup>1</sup>, 金尾 忠芳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山大院・環境生命,<sup>2</sup>岡山大院・自科,<sup>3</sup>国立量子科技研)  
tkanao@cc.okayama-u.ac.jp

【背景と目的】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二酸化炭素を唯一の炭素源とし、生育のためのエネルギーを二価鉄または還元型無機硫黄化合物を酸化することにより獲得する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。我々は、本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼ (4THase) を分離精製し、これをコードする遺伝子 (*Af-tth*) を同定した。4THase は、テトラチオン酸 ( $S_4O_6^{2-}$ ) を単体硫黄 ( $S^0$ ) とチオ硫酸 ( $S_2O_3^{2-}$ )、硫酸 ( $SO_4^{2-}$ ) に加水分解する反応を触媒する。本酵素は、*Acidithiobacillus* 属と一部の好酸性微生物からのみ活性が報告されている非常にユニークな酵素であり、その詳細な解析は酵素反応機構の解明や、本菌の硫黄代謝を理解するために必要不可欠である。本研究では組換え *Af-Tth* の結晶を用いた X-線結晶構造解析を行い、立体構造の決定と反応機構の解明など詳細な研究を行うことを目的とした。

【方法と結果】組換え大腸菌より得た *Af-Tth* の封入体を refolding することで活性型酵素を獲得し、高度に精製した後これを結晶化することに成功した。さらに Se-Met 置換した *Af-Tth* の結晶を同様に作成し、MAD 法により解析し位相を決定した。これらより得られたデータを解析した結果、*Af-Tth* 結晶は空間群  $P3_2$  であり、本酵素は Class において All beta proteins, Fold において 8-bladed beta-propeller に構造分類されることが分かった。次に反応機構を解明するために酵素-基質複合体を形成させ、X-線照射による回折像データを得た。その結果、基質のテトラチオン酸と推定される電子雲を確認することができた。本酵素では、他の多くの硫黄代謝酵素で活性中心として働く Cys 残基が基質付近で確認されなかったことから、Cys 残基が関与しない新鋭な反応機構を有することが期待できた。

## Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from iron- and sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○Naruki Hase<sup>1</sup>, Hisayuki Nakayama<sup>1</sup>, Megumi Kosaka<sup>2</sup>, Taro Tamada<sup>3</sup>, Kazuo Kamimura<sup>1</sup>, Tadayoshi Kanao<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ., <sup>3</sup>QST)

**Key words** tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

## 2P-1p013 *Pseudomonas cichorii* 由来組換え D-タガトース 3-エピメララーゼを用いたデオキシケトヘキソースのエピ化反応

○熊谷 拓也<sup>1</sup>, 吉原 明秀<sup>2</sup>, 秋光 和也<sup>2</sup>, フリート ジョージ W.J.<sup>3</sup>, 何森 健<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>香川大学院 農学研究科,<sup>2</sup>香川大国際希少糖研究教育機構,<sup>3</sup>オックスフォード大学)  
yoshihara@ag.kagawa-u.ac.jp

【目的】*Pseudomonas cichorii* ST24 由来 D-タガトース 3-エピメララーゼ (D-TE) は基質特異性の広い酵素であり、D-タガトースと D-ソルボース間の可逆的なエピ化反応を触媒するだけでなく、ケトヘキソースやケトペントースの炭素第三位のエピ化反応も触媒する希少糖生産にとって重要な酵素である。本研究では炭素第一位もしくは炭素第六位がデオキシ化されたデオキシケトヘキソースに着目し、D-TE のデオキシケトヘキソースに対する反応性を評価した。

【方法・結果】*P. cichorii* ST24 由来組換え D-TE は HiTrap Q HP, HiTrap Phenyl HP, Resource Q カラムを用いたクロマトグラフィーによって単一に精製され、単量体の分子量は 32 kDa であった。精製 D-TE を用いてデオキシケトヘキソースに対する反応性を HPLC で分析した。6-デオキシケトヘキソースに対して D-タガトースに対する比活性を 100% とした時の相対活性は、6-デオキシ-L-ソルボース 67.1%、6-デオキシ-L-タガトース 64.4%、6-デオキシ-D-タガトース 36.4%、6-デオキシ-D-ブシコース 14.1%、6-デオキシ-L-ブシコース 13.5%、6-デオキシ-D-フルクトース 6.61%、6-デオキシ-L-フルクトース 3.92%、6-デオキシ-D-ソルボース 2.87% であった。また、すべての 1-デオキシケトヘキソースに対しては僅かに活性が確認された。本酵素の D-タガトースおよび D-ブシコースに対する比活性は、それぞれ 67.0 U/mg, 42.3 U/mg であり 6-デオキシ-デオキシケトヘキソースに対する活性は決して低いものではないことを示している。また、6-デオキシケトヘキソースに対する Km を D-タガトースと比較したとき、D-タガトースに対する Km が 51mM と報告されているのに対してすべての 6-デオキシケトヘキソースではこの値を下回る結果が得られ、D-タガトースより基質親和性が高いことが示された。

## Epimerization of deoxy-ketohexoses by D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* ST24

○Takuya Kumagai<sup>1</sup>, Akihide Yoshihara<sup>2</sup>, Kazuya Akimitsu<sup>2</sup>, George W.J. Fleet<sup>3</sup>, Ken Izumori<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Kagawa Univ. Agric., <sup>2</sup>International Inst. Rare Sugar Res. Educ., Kagawa Univ., <sup>3</sup>Oxford Univ.)

**Key words** D-tagatose 3-epimerase, deoxy-ketohexose, enzymatic epimerization, *Pseudomonas cichorii*

## 2P-1p014 ナイロン加水分解酵素のサブユニット会合と熱安定化機構の解析

○伊東 雅人<sup>1</sup>, 衣笠 凌<sup>1</sup>, 羽田 圭吾<sup>1</sup>, 大塚 裕斗<sup>1</sup>, 竹原 一起<sup>1</sup>, 重田 育照<sup>2</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県立大学・工・応化,<sup>2</sup>筑波大・計算科学研究センター)  
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

【目的】ナイロン加水分解酵素 NylC は 6-アミノヘキサン酸オリゴマー、ポリアミド PA6、PA66、PA4 をエンド型で加水分解する酵素であり、前駆体として発現後、Asn266/Thr267 間で自己切断されて活性酵素となる。本酵素は同一モノマー 4 分子が会合したテトラマー構造 (D2 対称) を有する。これまで、サブユニット界面の置換により、熱変性 Tm 値が 41~88°C まで変化するのを見いだしている。本研究では、生化学的、計算科学の両面からサブユニット会合と熱安定化機構の解析を行った。

【方法および結果】耐熱性が最も高い NylC-G<sup>122</sup>Y<sup>130</sup>A<sup>36</sup>Q<sup>263</sup> (Tm=88°C) を親型酵素とし、新たな変異を導入すると、殆どの変異体で熱安定性が低下するか、或いは、細胞内での発現が見られなくなるという現象が観察された。RT-PCR による遺伝子発現量算出から、mRNA の合成は正常に行われていると判断した。NylC に対するポリクローナル抗体を用いて、免疫分析を行ったところ、変異体種により、1) 可溶画分に活性型として存在 2) 可溶画分に前駆体型として存在、3) 沈殿画分に前駆体型として存在、4) 可溶画分にフラグメントのみが存在の 4 種類の挙動を取ることが分かった。3) の状態は、モノマー間の不適切な会合による不溶性凝集体の形成、4) の状態は、細胞内のプロテアーゼによる分解を受け、フラグメント化したものと推測した。NylC 変異体の挙動を MD シミュレーションにて解析を行うと、122 位変異体のサブユニット間距離が、Tm 値の上昇に伴い近接する現象が見られた。また、フラグメントのみが存在していた GYAQQ299D 変異体では、残基間距離の経時変化において、不規則なパルスが多数存在していた。各種変異体の溶液状態での挙動を、免疫分析結果と、計算科学分析結果を合わせて考察する。

## Analysis of thermostability and subunit assembly of NylC

○Masato Itoh<sup>1</sup>, Ryo Kinugasa<sup>1</sup>, Keigo Hada<sup>1</sup>, Hiroto Ohtsuka<sup>1</sup>, Ikki Takehara<sup>1</sup>, Yasuteru Shigeta<sup>2</sup>, Masahiro Takeo<sup>1</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. of Hyogo, <sup>2</sup>Center of Comp. Sci., Univ. of Tsukuba)

**Key words** nylon, biodegradation, enzyme

**2P-1p015 有機溶媒中でのナイロンの酵素分解**

○岡崎 秀明, 伊東 雅人, 生越 大輔, 竹原 一起, 武尾 正弘,  
根来 誠司  
(兵庫県大院・工)  
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

【目的】 不要ポリマーの再資源化は循環型社会構築の観点から重要な検討課題である。合成ポリマー分解を効率化するためには、i) 分解酵素の高機能化、ii) モノマー化が容易なポリマーの探索、iii) ポリマーを溶解する有機溶媒・イオン液体中での反応などのアプローチが考えられる。特に、有機溶媒中での酵素反応は、化学処理と酵素処理の連携を容易にする。これまで、ナイロンでは、ポリマーを溶解させ、且つ、酵素反応が可能な溶媒条件は見いだされていない。本研究では、ナイロンのリサイクル処理で、エチレングリコール (EG) が用いられていることに着目し、6 ナイロンおよびその関連基質について、EG および、水混合系でのナイロン分解酵素の活性と安定性について検討した。

【方法及び結果】 ナイロン分解酵素として、親型 NylC に 4 アミノ酸置換を有し、耐熱性が最も高い G<sup>122</sup>Y<sup>130</sup>A<sup>36</sup>Q<sup>263</sup> 変異体 (T<sub>m</sub>=88°C) を用いた。基質として、6 ナイロン粉末 0.8g を EG20ml に分散させ、オイルバスを用いて 160°C で攪拌しながら溶解させた後、冷却したものをを用いた。EG を種々の割合で水と混ぜ、これに上記の基質溶解液を終濃度 5mg/ml、ナイロン分解酵素を 1mg/ml になるように加え、60°C で酵素反応を行った。経時的に反応溶液の上清 60μl をサンプリングし、遊離アミノ基の定量から分解性を評価した。EG/水混合系では、ナイロンは微粒子懸濁状態となるが、ナイロン凍結粉砕標品を直接、水に懸濁させた系に較べて、より均一に分散可能であること、EG 濃度の上昇に伴い、酵素活性は阻害されるが、10% EG 中では、水懸濁試料と比較して、分解性が約 2 倍に上昇することが分かった。

**Enzymatic hydrolysis of nylons in organic solvent**

○Hideaki Okazaki, Masato Itou, Daisuke Ogoshi, Ikki Takehara, Masahiro Takeo,  
Seiji Negoro  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

**Key words** Nylon

**2P-1p016 インフルエンザウイルス A (H5N1)由来のヘマグルチニンと受容体結合解析**

○鹿島 諒人<sup>1</sup>, 吉田 佐和子<sup>1</sup>, 尾形 慎<sup>2</sup>, 宮崎 剛亜<sup>1,3</sup>, 加藤 竜也<sup>1,3</sup>,  
朴 龍洙<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・農・応生化, <sup>2</sup>福島高専, <sup>3</sup>静大グリーン科学技術研)  
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】 インフルエンザウイルス A (H5N1)はトリ型インフルエンザウイルスであるが、変異によって受容体との結合能が変化することによるパンデミックが最も危惧されている。2 種類のインフルエンザウイルス A (H5N1) (A/Vietnam/1194/2004, A/duck/Hunan/795/2002) 由来のヘマグルチニン (HA-VT, HA-HU) は、アミノ酸配列が 97%一致しているが、HA-HU の受容体への結合能は HA-VT に比べて低い。そこで、これら HA の受容体結合能の違いを詳細に解析するために、HA-HU 変異体を作製して受容体との結合能を解析した。

【方法・結果】 HA-HU の 98 番目のアスパラギン、128 番目のアスパラギン酸、133 番目のセリン及び 160 番目トレオニンそれぞれアスパラギン酸、セリン、ロイシン及びトレオニン残基に置換した N98D、D128S、S133L 及び A160T 変異体を作製して、カイコバクミド発現系を用いて発現した。Fetuin agarose ゲルを用いて精製をして、受容体モデル糖鎖 (Neu5Aca2,3 Linker3-γPGA および Neu5Aca2,6-γPGA) を用いた ELISA によって結合能を解析した。4 つの変異体のうち、S133L 変異体と A160T 変異体において HA-HU よりも高い結合能が確認され、解離定数は HA-VT、S133L および A160T 変異体でそれぞれ  $3.2 \times 10^{-8}$ 、 $4.7 \times 10^{-8}$ 、 $1.4 \times 10^{-7}$  M であった。この結果から、HA-HU の 133 番目と 160 番目のアミノ酸残基が受容体との結合に深く関与していることが示唆された。現在、S133L と A160T の 2 つの変異を入れた変異体の受容体結合能解析を行っている。

**Analysis of the binding capability of hemagglutinins from influenza virus A (H5N1) with its receptor**

○Ryoto Kashima<sup>1</sup>, Sawako Yoshida<sup>1</sup>, Makoto Ogata<sup>2</sup>, Takatsugu Miyazaki<sup>1,3</sup>,  
Tatsuya Kato<sup>1,3</sup>, Enoch Y. Park<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Fukushima Natl. Coll. Of Technol., <sup>3</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**Key words** hemagglutinin, influenza virus, silkworm

**2P-1p017 Functional analysis of Kup transport system in *Escherichia coli***

○Ellen, Naomi Hoshi, Yi-Hsin Su, Kei Nanatani, Shin Hamamoto,  
Nobuyuki Uozumi  
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)  
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

Potassium (K<sup>+</sup>) is one of the major intracellular cations in living cells. for maintaining turgor pressure and membrane potential of cells. In *Escherichia coli*, there are four major K<sup>+</sup> uptake transport systems; TrkH, TrkG, Kdp, and Kup, which are responsible to maintain cell internal K<sup>+</sup> concentration. EcKup is considered as a prototype of Kup/HAK transporters in bacteria and plant cells. Last year, we showed that EcKup was selective for K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> over Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. In addition, Na<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> presence in the environment affected K<sup>+</sup> uptake. Here, we further characterized the EcKup transport system using K<sup>+</sup> uptake system deficient *E. coli*. We found that K<sup>+</sup> uptake by EcKup was optimum at around neutral pH condition but not acidic pH as reported by Trchounian & Kobayashi (1999). According to the membrane topology of EcKup (Sato et al., 2014), EcKup showed a long cytoplasmic side C-terminal domain. We found that cell expressing C-terminal domain truncated EcKup grew better than the cells expressing the full length EcKup in the minimal medium. In addition, truncated EcKup has slightly higher cation uptake activity, compare to full-length transporter.

**Functional analysis of Kup transport system in *Escherichia coli***

○Ellen, Naomi Hoshi, Yi-Hsin Su, Kei Nanatani, Shin Hamamoto,  
Nobuyuki Uozumi  
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

**Key words** transporter, K<sup>+</sup> homeostatis, cell membrane, *Escherichia coli*

**2P-1p018 *Serratia marcescens* type 1 secretion system による HasA 分泌機構の解明**

○山下 純平<sup>1</sup>, 小出 (吉田) 静代<sup>2</sup>, 中西 智美<sup>1</sup>, 市原 拓巳<sup>1</sup>,  
辻 明彦<sup>2,3</sup>, 大森 謙司<sup>4</sup>, 湯浅 恵造<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>徳島大院・先端技科, <sup>2</sup>徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup>徳島大・生物資源,  
<sup>4</sup>名大院・創薬科学)  
kyuasa@tokushima-u.ac.jp

【目的】 大腸菌や *Serratia marcescens* などのグラム陰性菌には数種のタンパク質分泌機構が備わっており、その 1 つである type 1 secretion system (T1SS) は ABC protein、MFP、OMP の 3 つのタンパク質で構成され、タンパク質をシグナルペプチド非依存的に 1 ステップで菌体外に分泌する。*S. marcescens* では、2 つの T1SS (Lip system; LipB-LipC-LipD, Has system; HasD-HasE-HasF) がそれぞれ LipA, HasA の選択的な分泌を行っている。ABC protein である LipB や HasD が分泌タンパク質の基質選択に関与することが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。これまでに我々は、LipB を 5 つの領域に分け、それぞれの領域を相当する HasD に置換したモザイク ABC protein を作製し、その 1 つである ABC<sub>LHLL</sub> が LipC-LipD との組み合わせにより、本来の Lip system では分泌できない HasA を分泌することが明らかになった。本研究では、HasA 認識に関わる HasD 領域 (約 150 アミノ酸) を細分化して更なる認識部位の特定を行った。【結果及び考察】 ABC<sub>LHLL</sub> の HasD 領域を LipB アミノ酸配列に部分置換し、HasA の分泌を調べた結果、HasD の a.a. 223-260 が HasA 分泌に関わることが示された。約 40 アミノ酸の中でも相同性が低い 4 アミノ酸 (LipB: <sup>258</sup>LGGW, HasD: <sup>248</sup>CGAL) に着目し、4 アミノ酸を HasD 配列に置換した LipB<sub>CGAL</sub> 及び LipB 配列に置換した HasD<sub>LGGW</sub> をそれぞれ作製し、HasA の分泌を調べた。その結果、LipB<sub>CGAL</sub>-LipC-LipD により HasA が分泌されたのに対して、HasD<sub>LGGW</sub>-HasE-TolC による分泌は認められなかった。この結果より、HasD の 4 アミノ酸 (<sup>248</sup>CGAL) が HasA の分泌に重要であることが明らかとなった。T1SS により分泌されるタンパク質は C 末端に分泌に関わる領域を持つことが報告されているため、現在、HasA の C 末端欠失変異体を作製し、分泌に関わる領域について検討しており、併せて報告したい。

**The mechanism of secretion of HasA by the *Serratia marcescens* type 1 secretion system**

○Junpei Yamashita<sup>1</sup>, Shizuyo Koide-Yoshida<sup>2</sup>, Tomomi Nakanishi<sup>1</sup>,  
Takumi Ichihara<sup>1</sup>, Akihiko Tsuji<sup>2,3</sup>, Omori Kenji<sup>4</sup>, Keizo Yuasa<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** secretory production, type 1 secretion system, *Serratia marcescens*

## 2P-1p019 接着性ナノファイバータンパク質 AtaA の分泌を促進するタンパク質 TpgA の発見

○吉本 将悟, 石川 聖人, 廣重 竜太, 鈴木 淳厚, 堀 克敏  
(名大院・工)  
khorii@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】アシネトバクテリウム属細菌 Tol 5 はバイオフィルム形成に依存せず、様々な材料表面に対し高い接着性を示す。この高い接着性は三量体型オートトランスポーターアドヘシン (TAA) のひとつである AtaA によるものである。AtaA を有用な微生物に生やして接着性を付与することにより担体に対して微生物を直接固定化できるため、新規の微生物固定化法として期待されている。しかしながら AtaA を含む TAA の分泌機構はあまりわかっておらず、異種発現において発現がうまくいかないことがあるなどの問題があった。そこで本研究では、ゲノム上で *ataA* 遺伝子のすぐ下流に位置し *ataA* 遺伝子とオペロンを形成している *tpgA* 遺伝子に注目し、その機能を調べることを目的とした。

### 【方法】

Tol 5 株を LB 培地で培養し、浸透圧ショックで破碎後、超遠心法により膜画分、ペプチドグリカン画分をそれぞれ分離した。AtaA と TpgA の相互作用は、TpgA を固定した Ni ビーズによるプルダウンアッセイで確認した。Tol 5 の *tpgA* 欠損株における AtaA の細胞表層提示量は免疫蛍光染色により、菌体の接着性はポリスチレンプレートに対する付着試験により定量した。

### 【結果と考察】

細胞画分とプルダウンアッセイにより TpgA は AtaA と相互作用して外膜にアンカリングされていることが示された。また TpgA は PGN にも結合していた。Tol 5 の *tpgA* 欠損株は AtaA の表層提示量が減少し、菌体の接着性が低下した。これらの結果は TpgA が AtaA、PGN 両者と複合体を形成し、AtaA の分泌を促進していることを示唆している。

### Discovery of a novel periplasmic protein assisting the secretion of the nanofiber protein AtaA

○Shogo Yoshimoto, Masahito Ishikawa, Ryuta Hiroshige, Atsuo Suzuki, Katsutoshi Hori  
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** autotransporter, adhesion, adhesin, protein secretion

## 2P-1p020 オオミジンコにおける組換えタンパク質の卵への輸送系の確立

○辻 勇祐, 加藤 泰彦, 渡邊 肇  
(阪大院・工)  
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

効率的なバイオ医薬品の生産技術の確立は、現代医療において必要不可欠である。しかしながら、これまで組換えタンパク質の生産に広く利用されてきた大腸菌等ではタンパク質構造が安定せず不活性になる、培養細胞では培地が高価でありランニングコストがかかる、などの課題がある。そこで新たにオオミジンコで組換えタンパク質を生産し卵に蓄積させ、その卵から回収する方法を提案する。ミジンコの卵は親個体から容易に分離可能で、卵の回収により親個体由来の夾雑タンパク質を排除した効率的な回収が期待できる。遺伝子改変によりヒト型のタンパク質修飾を持たせること、さらには飼育が簡単かつ迅速に繁殖するので安価な生産も可能である。

本研究では卵黄タンパク質前駆体ビテロジェニン (vitellogenin:Vtg) の輸送機構を利用することとした。Vtg は脂肪細胞で合成された後、血リンパに分泌され、受容型エンドサイトーシスにより卵へ取り込まれる。オオミジンコの Vtg はその N 末端に種を超えて保存された分泌シグナル配列 (Signal peptide:VtgSP) に類似した配列を持つ。一方で、同じ甲殻類の淡水エビの Vtg で特定された Vtg 受容体との相互作用領域と類似のアミノ酸配列も有する。そこでこれら 2 つの配列が *in vivo* で Vtg の輸送に関わるか否かを GFP と連結し解析した。

GFP あるいは VtgSP-GFP を発現するプラスミドを産卵直後の卵に注入した。24 時間後、GFP 発現プラスミドではプラスミドが取り込まれた特定の細胞内で局所的な蛍光が観察された。一方で VtgSP-GFP では全身で蛍光が観察され、その蛍光パターンから細胞間隙を流れる血リンパへの分泌が示唆された。受容体との相互作用領域の解析についても併せて報告する予定である。

### Establishment of the system of recombinant protein transport into the eggs in *Daphnia magna*

○Yusuke Tsuji, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Daphnia magna*, recombinant protein production, vitellogenin, signal peptide

## 2P-1p021 小胞体内在分子シャペロン存在下におけるアミロイドベータの凝集挙動解析

○北内 健太, 迫野 昌文  
(富山大院・理工)  
msakono@eng.u-toyama.ac.jp

【背景と目的】アミロイドベータ (A $\beta$ ) は 40 前後のアミノ酸から成るポリペプチドであり、モノマーペプチドからオリゴマーを経て線維状凝集体へと変化する。アルツハイマー病は、A $\beta$  線維状凝集体が脳内に蓄積することが原因で引き起こされる神経変性疾患である。これまでに、A $\beta$  ストレスにより小胞体内在分子シャペロンが発現誘導すること、また小胞体内在分子シャペロンが酸化ストレス条件下で細胞表面または細胞外へと誘導されることが報告されている。このことから、A $\beta$  酸化ストレス条件下で小胞体シャペロンが小胞体外へと誘導されることが推測される。本研究では、小胞体内在分子シャペロンによる A $\beta$  の凝集挙動への影響に関する検討を行う。

【方法】小胞体シャペロンタンパク質の DNA (カルレチキュリン (CRT)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI)、PDI ファミリータンパク質 (ERp57)) を組み込んだプラスミドを大腸菌 BL21 に形質転換し、タンパク質を発現、精製した。A $\beta_{1-42}$  およびタンパク質溶液を混合し、37°C の空気恒温槽で 24 時間インキュベートした後、チオフラビン T (ThT) 分析、Western-blot、Dot blot、透過型電子顕微鏡 (TEM) による評価を行った。

【結果と考察】ThT 分析の結果より、小胞体シャペロン (CRT、PDI、ERp57) は、濃度依存的に A $\beta$  の線維形成を抑制することが明らかになった。また、SDS-PAGE/Western-blot および Dot blot の結果において、小胞体シャペロン存在下では、A $\beta$  はモノマーの状態で存在していることが強く示唆された。さらに、TEM を用いた形態観察においても、小胞体シャペロン存在下では、A $\beta$  線維凝集体が減少していることが明らかになった。このことから、小胞体シャペロンが効果的に A $\beta$  の線維形成を抑制することが示唆された。

### Influences of ER chaperones on amyloid beta fibrillation

○Kenta Kitauchi, Masafumi Sakono  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** Alzheimer's disease, Amyloid beta, Endoplasmic reticulum, molecular chaperone

## 2P-1p022 ドラッグデリバリーを目指したシャペロン GroEL/ES 複合体の応用

○依田 ひろみ, 高村 岳樹, 小池 あゆみ  
(神奈川工大院, 工, 応用バイオ)  
koike@bio.kanagawa-it.ac.jp

【目的】シャペロン GroEL は、直径約 5 nm の空洞を 2 つ持つ 14 量体分子であり、ATP 依存的にコシャペロン GroES を結合することで、空洞入口に結合した細胞内変性タンパク質を空洞内に落とし込み、折れ畳みを補助する。ATP 加水分解活性低下型変異体 GroEL(D52/398A) は、GroEL/ES 複合体を最長 12 日間維持でき、水溶性ナノカプセルとして利用できる可能性がある。本研究では、DDS 展開を目指し、GroEL/ES 複合体の細胞導入試験を行った。

【方法】精製した GroEL(D52/398A)、核移行シグナル融合 GroES 変異体 (GroES-NAS) または野生型 GroES (GroES-WT) を用い、被内包物と共に 1 mM ATP 存在下で GroEL/ES 複合体を形成した。播種後 24 時間以上経過した CHL 細胞に、終濃度 0.05~1  $\mu$ M の GroEL/ES 複合体を添加し、所定時間細胞培養した。被内包物に変性 GFP を用いた場合は、生細胞中の GroEL/ES 複合体の局在を蛍光顕微鏡下で観察し、フラウレンまたはその誘導体を用いた場合は、細胞固定と蛍光染色を経て小核発生率を算出した。

【結果・考察】GFP を用いた実験では、GroEL/ES-WT 複合体は細胞質に留まったが、GroEL/ES-NAS 複合体は内包物を維持したまま 24 時間前後で細胞核へ到達した。フラウレンを用いた実験では、UVA 照射による小核発生率が、フラウレン誘導体を内包した GroEL/ES-NAS 複合体を添加したときに 3% まで上昇した。これらの結果から、GroEL/ES 複合体は、細胞に適用する水溶性ナノカプセルとしての利用が期待できる。

### Application of GroEL/ES Complexes for Drug Delivery System

○Hiromi Yoda, Takeji Takamura-Enya, Ayumi Koike-Takeshita  
(Dept. Appl. Chem. Biosci., Grad. Sch. Eng., Kanagawa Inst. Tech.)

**Key words** GroEL, GroES, nanocapsule, DDS

**2P-1p023 静電相互作用による小分子-タンパク質共結晶の作製**○塚本 啓介<sup>1</sup>, 南畑 孝介<sup>2</sup>, 安達 泰泰<sup>3</sup>, 清水 瑞美<sup>3</sup>, 黒木 良太<sup>4</sup>, 長棟 輝行<sup>1</sup><sup>1</sup>東大院・工, <sup>2</sup>九大院・工, <sup>3</sup>量研機構, <sup>4</sup>原子力機構  
kosukeminami@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

**【背景と目的】** タンパク質結晶は、タンパク質分子が規則的に配列した多孔質構造を有しており、X線構造解析の用途のみならず、近年では細孔内の反応場としての利用や、細孔内に様々な分子を配列することによる機能性材料としての利用が期待されている。本研究では、ストレプトアビジン(SA)の末端に正電荷あるいは負電荷を持つペプチドタグを遺伝子工学的に付与したSA組換体を互いに混合することで、静電相互作用によりSA結晶が迅速に得られることを明らかにした。本研究では、電荷を有する小分子を反対の電荷を持たせたSA組換体と混合することにより、小分子とSAの共結晶の作製を検討した。

**【実験方法】** パラフィンオイル重層下でSA組換体と電荷を有する小分子(DNA, ペプチド, デンドリマー)を混合することにより結晶化を検討した。混合後、25℃で静置し、光学顕微鏡を用いて観察した。

**【結果】** 正電荷を付与したSA(SA(+))と負電荷を持つペプチド(YD<sub>8</sub>Y)あるいはオリゴDNA(A<sub>9</sub>C<sub>9</sub>T<sub>9</sub>)を混合した溶液および、負電荷を付与したSA(SA(-))と正電荷を持つペプチド(YR<sub>8</sub>Y)を混合した溶液において、12時間静置後に結晶が観察された。また、SA(+)とデンドリマー(PAMAM, エチレンジアミンコア, -COONa, Generation=1.5)を混合した溶液および、SA(-)とデンドリマー(PAMAM, シスタミンコア, -NH<sub>2</sub>, Generation=2)を混合した溶液において、混合後、36時間において結晶が観察された。以上の結果より、静電相互作用を利用して、電荷を有する小分子とSAの共結晶が作製できることが示された。

**Co-crystallization of electrostatically charged various small molecules and streptavidin**○Keisuke Tsukamoto<sup>1</sup>, Kosuke Minamihata<sup>2</sup>, Motoyasu Adachi<sup>3</sup>, Rumi Shimizu<sup>3</sup>, Ryota Kuroki<sup>4</sup>, Teruyuki Nagamune<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ., <sup>3</sup>QST, <sup>4</sup>JAEA)**Key words** protein, co-crystallization, electrostatic interaction, streptavidin**2P-1p024 N末端ペプチドタグによる難発現タンパク質発現増大効果の応用と機構解析**○加藤 晃代, 中野 秀雄  
(名大院・生命農学)

teruyo.ojima@gmail.com

**【背景と目的】** 大腸菌や酵母は組換えタンパク質発現のために最も良く用いられているが、発現させたいタンパク質によっては、難発現である場合がある。我々のグループでは、そのような難発現タンパク質のN末端に4アミノ酸から成るSKIKペプチドタグ配列を付加することにより、タンパク質発現量を増大可能であることを見出した。そこで、本講演では、1) 検出タグとしての利用法開発および2) タグ配列付加により大腸菌発現系でタンパク質発現量が増大するメカニズム解明の2点を目的として、これまでに得られた結果を発表する。

**【方法・結果・考察】** まず、SKIKペプチドに対するウサギポリクローナル抗体を調製し、これによりSKIKタグの含まれる発現物を検出可能か検討した。本抗体を一次、HRP標識抗ウサギIgG抗体を二次抗体として発現物をdot blot法で検出した。その結果、SKIK付加発現物はネガティブコントロールに対して優位なシグナルが得られた。以上より、SKIKタグは発現向上効果に加え、検出用タグとしても使用可能であると考えられる。

次に、モデルとして大腸菌において難発現であったマウス抗体遺伝子を用い、タグ有・無で発現させたときの細胞増殖、mRNA量およびタンパク質量を測定した。発現誘導3時間~48時間の経時測定の結果、タグの有無にかかわらず大腸菌増殖速度に変化はなかった。一方、mRNAおよびタンパク質量には大きな変化が見られ、タグ有ではタグ無に対してそれぞれ1/6倍および30倍の量を示した。以上より、N末端タグ付加により、mRNAコピー数当たりの翻訳効率が著しく増大している可能性が考えられた。

**Application and analysis of an N-terminal peptide tag for improvement in the expression level of difficult-to-express proteins in *E. coli***○Teruyo Kato, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)**Key words** difficult-to-express protein, peptide tag, translation**2P-1p025 超安定化二量体新規人工蛋白質 Super WA20 (SUWA)の創製と自己組織化蛋白質ナノブロック複合体構築**○木村 尚弥, 小林 直也, 新井 亮一  
(信州大・繊維)

rarai@shinshu-u.ac.jp

これまでに、分子間フォールディング4本ヘリックス二量体を形成する“スンチャク型”構造の新規人工蛋白質(*de novo* protein) WA20を用いて、蛋白質ナノブロック(Protein Nano-building Block: PN-Block)を開発し、多様な自己組織化ナノ構造複合体の創出に成功してきた(N. Kobayashi *et al.*, *JACS*, 2015)。将来のナノ材料等への応用に向けて、本研究では、PN-Blockを構成するWA20のさらなる構造安定化を目的として、立体構造を基にした合理的設計により、疎水性コア増強等のアミノ酸変異を導入した改変新規人工蛋白質 Super WA20 (SUWA)を設計構築した。CDスペクトル測定による熱変性実験より、WA20の変性中点温度 $T_m$ は75℃であるのに対し、SUWAの $T_m$ は122℃と極めて高く、47℃もの熱安定化に成功した。また、SUWAに導入したアミノ酸変異の内の1-2残基ずつをWA20に導入した各変異体を作製し、熱変性実験より $T_m$ を算出した。その結果、各変異体の $T_m$ の増加分の和がSUWAの $T_m$ の増加分とほぼ近く、導入したアミノ酸変異が相加的に寄与して非常に高い熱安定性を獲得したことが示唆された。さらに、変性剤(GdnHCl)に対する構造安定性の比較を行ったところ、WA20の変性中点濃度は3.5 Mであるのに対し、SUWAは6 Mと非常に高く、大幅な変性剤濃度耐性の向上が明らかとなった。さらに、このSUWAを利用したPN-BlockとしてSUWA-foldonを作製し、Native PAGE, SEC-MALS, SAXS解析等を行ったところ、複数の自己組織化ナノ構造複合体の構築が示唆された。また、熱変性実験を行ったところ、これらのナノ構造複合体も構造安定性の向上が示された。以上の結果より、非常に高い熱安定性を獲得し、蛋白質ナノブロック(PN-Block)として利用可能な超安定化二量体人工蛋白質SUWAの設計開発に成功し(特許出願中)、今後、PN-Blockを用いたナノバイオ材料開発等への応用が期待される。

**Ultra-stabilized dimeric *de novo* protein SUWA for self-assembling protein nano-building blocks**○Naoya Kimura, Naoya Kobayashi, Ryoichi Arai  
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)**Key words** protein nano-building block (PN-Block), *de novo* protein design, thermal stability, hydrophobic core**2P-1p026 金属結合人工タンパク質の構造解析**○鎌田 健一<sup>1</sup>, Voet Arnout<sup>2</sup>, Tama Jeremy<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横浜市大院・生命医科学, <sup>2</sup>Dept. Chem., KU Leuven.)  
jtama@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

**【背景と目的】** 近年、数多くのタンパク質の立体構造が決定され、それらの機能が解明されてきた。タンパク質の立体構造は、水素結合をはじめとする様々な相互作用が複雑に関与することで保たれている。そしてその複雑さからコンピュータの発達した昨今でも、意図した構造の人工タンパク質をデザインすることは簡単ではないとされている。人工的にタンパク質をデザインしようとする試みは盛んに行われており、当研究室ではPizzaと呼ばれる人工タンパク質を開発した。Pizzaはコンピュータによってデザインされた、完全回転対称型の人工タンパク質であり、特定の機能はないが容易に作成でき、安定性も高い。構造解析のための結晶化も容易である。本研究ではPizzaを用いて、その機能化と構造解析を行っていく。

**【方法】** Pizzaの中心開口部にあるセリン残基をヒスチジン残基に変更した変異型Pizzaを設計、大腸菌BL21(DE3)株を使用して発現・精製を行った。その後得られたタンパク質に金属イオン(Cd, Ni, Zn)を添加し、結晶化実験を行った。そこで得られた結晶を用いてX線結晶構造解析を行い、結晶構造を決定した。併せてITC(等温滴定カロリメトリー)、AUC(超速心分析)による測定も行った。**【結果と考察】** ITC、AUCの結果から、Pizzaと金属イオンは大きな構造の変化(例えば金属イオンを介した二量化など)はせずに結合していることがわかった。結晶構造解析から、Znであればヒスチジン3残基に対してZnイオン1つをシェアした、設計通りの構造をとっていることがわかった。

**Structural analysis of artificial metal binding proteins**○Kenichi Kamata<sup>1</sup>, Arnout Voet<sup>2</sup>, Jeremy Tama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem., KU Leuven.)**Key words** artificial protein, self-assembling, computational design

2P-1p027 イネ由来  $\alpha$ -アミラーゼの内毒素中和メカニズムの解明

○落合 秋人, 渡邊 和史, 菅井 寛, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

**[目的]** 内毒素は、細菌の細胞壁を構成する主要な成分であり、グラム陰性菌のリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) とグラム陽性菌のリポテイコ酸 (Lipoteichoic acid, LTA) が知られている。内毒素は、細胞が破壊されると大量に放出され、ヒト体内に入ると、発熱、炎症、細胞や組織の損傷などの症状を誘発する。当研究室では、長い食経験を持つ米成分の新機能に着目し、これまでにイネ由来  $\alpha$ -アミラーゼ AmyI-1 が内毒素と結合して中和することを見出した。また、X線結晶構造解析などにより、それらの結合に関わる構造 (糖鎖結合部位 (SBS1, SBS2) および活性中心に存在) を見出し、本研究では、部位特異的変異導入解析により結合部位の同定を行った。また、RAW264 細胞を用いた *in vitro* における抗炎症試験を行うことにより、タンパク質医薬品としての可能性を検討した。

**[方法と結果]** AmyI-1 の各変異体は、過去に当研究室で構築した組換え AmyI-1 の大腸菌発現システムを利用して調製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた生体分子間相互作用解析により AmyI-1 と内毒素との結合を評価した。その結果、AmyI-1 は糖鎖結合部位においてのみ LPS を認識し、活性中心および糖鎖結合部位の両方において LTA を認識することが明らかになった。また、LPS に対する結合には糖鎖結合部位 SBS2 の寄与が大きく、LTA に対する結合には SBS1 の寄与が大きいことが考えられた。

AmyI-1 の抗炎症作用は、LPS により誘導された NO 産生の抑制試験により評価した。その結果、LPS により誘導された NO 産生量が AmyI-1 の濃度依存的に減少したことから、AmyI-1 は抗炎症作用を有することがわかった。

#### Elucidation of the mechanism of endotoxin neutralizing effect of $\alpha$ -amylase from *Oryza sativa*

○Akihito Ochiai, Kazuhito Watanabe, Hiroshi Sugai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** *Oryza sativa*, amylase, anti-inflammatory drug, endotoxin neutralizing

## 2P-1p028 スプライシング因子過剰発現による B 細胞株における抗体遺伝子変異の増強

○太田 愛美, 西山 由美子, 清木 俊雄, 植月 英智, 川口 祐加, 仲尾 祐輝, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹  
(岡山大院・自科)  
nkanayam@okayama-u.ac.jp

厳密な抗原特異性を持つ抗体は、近年医薬品としての応用が進んでいる。我々は抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて、*in vitro* 抗体作製システムを構築してきた。DT40 細胞の変異能力の改良は、この抗体作製技術において重要な課題である。最近、スプライシング因子 SRSF1 のアイソフォーム SRSF1-3 が DT40 細胞における抗体遺伝子への変異導入に重要な役割を果たしていることを見いだした。本研究では、SRSF1-3 の操作により DT40 細胞の変異能力を改良し、抗体取得を効率化することを検討した。SRSF1-3 を DT40-SW 細胞に過剰発現させると、野生型に比べて変異能力が上昇した。そこで、mCherry 遺伝子を抗体重鎖可変部遺伝子と置換し、mCherry-Fc タンパク質を細胞表面に提示し、かつ分泌発現できるように改変した DT40 細胞株にも同様に SRSF1-3 を過剰発現させた。mCherry 遺伝子への変異導入効率は、野生型 DT40-SW 細胞では抗体遺伝子への効率と比べて低いことが分かっていたが、SRSF1-3 を過剰発現させることにより変異導入効率を元の 3 倍程度、抗体遺伝子への導入効率と同等レベルに向上させることに成功した。現在、この方法によって多様化させた変異 mCherry ライブラリーから機能が変化した変異体の取得を試みるほか、特定の特異性を有したモノクローナル抗体遺伝子を導入した DT40 細胞においても SRSF1-3 過剰発現の効果を検証している。DT40 細胞における SRSF1-3 の過剰発現は、変異が導入されにくい標的遺伝子への変異導入の向上による抗体作製の効率化に利用できる可能性がある。

#### Enhancement of Ig somatic hypermutation in a B cell line by over-expressing a splicing factor.

○Manami Otha, Yumiko Nishiyama, Toshio Seiki, Hidetomo Uetsuki, Yuka Kawaguchi, Yuki Nakao, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu, Naomi Kanayama  
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** antibody, somatic hypermutation, splicing factor

2P-1p029 *Serratia marcescens* type 1 secretion system を用いた大腸菌による 1 本鎖抗体分泌系の構築

○浜垣 秀平<sup>1</sup>, 高木 大地<sup>2</sup>, 市原 拓巳<sup>2</sup>, 辻 明彦<sup>3</sup>, 大森 謙司<sup>4</sup>, 湯浅 恵造<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>徳島大院・先端技科, <sup>2</sup>徳島大・工, <sup>3</sup>徳島大・生物資源, <sup>4</sup>名大院・創薬科学)  
kyuasa@tokushima-u.ac.jp

**[目的]** 抗体医薬品は、副作用が少なく、高い治療効果を示すことから、非常に注目されている。抗体生産の宿主として CHO 細胞が用いられているが、膨大なコストがかかり、抗体医薬品が高価になるといった問題が生じている。宿主の代替候補の 1 つとして大腸菌が挙げられるが、分泌生産が困難であり、菌体破碎等の工程が必要になる。これまでに我々は、*Serratia marcescens* の 2 つの type 1 secretion system (TISS) (Lip system; LipB-LipC-LipD, Has system; HasD-HasE-HasF) の ABC protein である LipB と HasD の 5 つの領域をそれぞれ置換した mosaic ABC protein の研究において、その 1 つである ABC<sub>LHLL</sub> が本来の Lip system では分泌されない異種タンパク質 HasA を分泌することを見出した。本研究では、このシステムを用いて一本鎖抗体(scFv)の分泌生産について検討した。[結果及び考察] 大腸菌 DH5 株に FLAG タグを scFv の C 末端に付加させた scFv-FLAG を ABC<sub>LHLL</sub>-LipC-LipD とともに導入し、scFv の分泌を調べた。ABC<sub>LHLL</sub>-LipC-LipD によって scFv が分泌されるだけでなく、LipB-LipC-LipD、さらには LipC-LipD によっても分泌された。また、LipC、LipD の単独による分泌を調べた結果、LipC のみによって scFv が分泌されることが明らかとなり、LipC が大腸菌由来代替タンパク質と協調して scFv を分泌する可能性が考えられた。TISS によるタンパク質分泌機構では、分泌タンパク質の C 末端が分泌に関わり、特に Lip system による HasA の分泌には VAL を含む C 末端約 20 アミノ酸が重要であることが示されている。scFv-FLAG の C 末端には VAL に類似した VTV が存在するため、これを ATA に置換した scFvATA-FLAG を作製し、分泌されるか検討した。scFvATA の分泌は認められず、scFv-FLAG の分泌に C 末端 VTV が重要であることが示された。現在、分泌生産の向上に向けて、条件検討を行っており、併せて報告したい。

#### Secretion of a single-chain Fv antibody by the *S. marcescens* type 1 secretion system in *E. coli*

○Shuhei Hamagaki<sup>1</sup>, Daichi Takagi<sup>2</sup>, Takumi Ichihara<sup>2</sup>, Akihiko Tsuji<sup>3</sup>, Kenji Omori<sup>4</sup>, Keizo Yuasa<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** scFv, type 1 secretion system, secretory production, *Escherichia coli*

## 2P-1p030 CHO 細胞における PDI4 の抗体産生に及ぼす影響

○小松 圭<sup>1</sup>, 公文 健人<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, 鬼塚 正義<sup>2</sup>, 大政 健史<sup>3</sup>, 養 王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>徳島大院・ソシオ, <sup>3</sup>阪大院・工)  
masafumi.yohda@yohda.net

抗体医薬品は分子標的医薬の 1 つとして利用されている。抗体は糖鎖及び多数のジスルフィド結合を有する複雑な構造であり、6 割が CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞により産生されている。抗体高産生株の樹立は 1 細胞のスクリーニング等から行われてきたが、さらなる生産量の向上には、小胞体 (ER) における抗体の構造形成の効率化が重要であると考えられる。本研究では、CHO 細胞の ER における抗体構造形成において重要な役割を担っている ER シャペロンを特定し、その機能解析と抗体分泌の効率化への応用を目的としている。モデル細胞として Trastuzumab 産生細胞 CHO Hc6 を用いた。Tunicamycin による ER ストレス誘導下で種々の ER シャペロンの mRNA 発現量を qRT-PCR で解析したところ、ジスルフィド形成を触媒する PDI4 (protein disulfide isomerase) の発現量が增大することが分かった。そこで、合成 siRNA を用いて *pdi4* のノックダウンを行い、標的抗体の検出を行うことで培養上清、破碎後上清における抗体産生能への影響を検討した。*pdi4* mRNA 発現量を約 70% 抑制した際に細胞内において未成熟抗体の比存在量増加が確認され、抗体の構造形成に PDI4 が関わっていることが示唆された。また、*in vitro* における解析から PDI4 はモノマーで存在しており、インスリンに対する還元能を有していることが確認された。現在、更なる解析を進めており、発表では最新の結果についても交えて報告する。

#### Effect of Protein disulfide isomerase PDI4 on antibody production

○Kei Komatsu<sup>1</sup>, Kento Kumon<sup>1</sup>, Yosuke Fukutani<sup>1</sup>, Masayoshi Onitsuka<sup>2</sup>, Takeshi Omasa<sup>3</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Antibody production, Chinese hamster ovary, protein disulfide isomerase

**2P-1p031 新規抗体-酵素融合タンパク質(Zipbodyzyme)の開発**

○中野 秀雄, 森 昭博, 加藤 晃代, 兒島 孝明  
(名大院・生命農学)  
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

酵素修飾された抗体は、ELISA などの免疫検出に汎用されている。これまで抗体への酵素の付加は主に化学修飾により行われており、煩雑な実験操作が必要で、抗体一分子に対する修飾酵素分子数を制御できないという欠点がある。遺伝子的に抗体と酵素を融合すればこれらの問題を解決できるが、これまでの報告は、ほとんどが一本鎖抗体と酵素の融合に関するものであり、Fab と酵素を遺伝的に融合させた例は非常に少ない。当研究グループでは、Fab 抗体の重鎖・軽鎖それぞれの C 末端に互いに接着するペプチドロイシンジッパー(LZ)を付加することにより、大腸菌内で容易に活性体として合成できる Fab 抗体「Zipbody」を開発した。本研究では、Zipbody-酵素融合融合体を大腸菌により細胞質内で発現させ、その機能を評価した。

マウス由来抗大腸菌 O157 Zipbody にルシフェラーゼ(Luc)を融合させた Zipbody-Luc 融合体を作製し、検出抗体として ELISA を実施したところ、Luc の発光により抗原を検出することができた。一方、LZ が付加されていない同 Fab 抗体に Luc を融合したものでは、発現量は Zipbody-Luc と同等であったにも関わらず、その検出シグナルは著しく低下した。このことから、酵素活性および抗原結合活性の両方を保持する酵素標識 Fab を作製するには、LZ が必要であることが分かった。また、ウサギ由来の Zipbody に Luc を融合した Zipbody-Luc 融合体や、GFP とマウス由来 Zipbody を融合した Zipbody-GFP 融合体においても、同様の結果を得た。このことから、LZ を用いることで、様々な検出用タンパク質を遺伝的に Fab 抗体(Zipbodyzyme と名付けた)に融合することで、容易に bifunctional な抗体-酵素融合タンパク質を作製できることが示唆された。

**Development of a new format of antibody-enzyme complex(zip body)**

○Hideo Nakano, Mori Akihiro, Teruyo Kato-Ojima, Takaaki Kojima  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** antibody, enzyme, *Escherichia coli*

**2P-1p032 細胞表面 FIA 法とイムノチャンバーを用いる抗体高分泌細胞の 1 細胞育種**

○良元 伸男, 黒田 俊一  
(阪大・産研)  
skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

抗体医薬生産において、優良な Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株の選抜は重要である。従来の選抜法では、限界希釈による 1 細胞からのコロニー形成後に抗体産生能を評価するが、増殖初期から能力の低い細胞が推計学的に出現する為に大部分の細胞株候補が平均化してしまい、不確実で無駄が多い。従って、優良な細胞株を効率よく樹立するには、1 細胞単位で選抜し、その能力を維持しつつ安定的に増殖させる必要がある。本研究では、ヒト抗体産生 CHO 細胞を対象とし、大規模な細胞集団の個々の 1 細胞の抗体分泌量を非侵襲的かつリアルタイムに定量できる細胞表面 FIA 法 (CS-FIA) を行った。分泌抗体を捕捉する分子として脂質標識抗ヒト IgG 抗体を細胞表面に提示し、直径 30 μm のウェルが 84,640 個成形されたマイクロチャンバーに細胞を導入して個々の 1 細胞から分泌された抗体を直ちに自身の近傍に捕捉し、蛍光標識抗原を用いて可視化した。また蛍光を指標として自動で目的細胞を 1 細胞単離可能な全自動 1 細胞解析単離装置を併用し、抗体高産生 CHO 細胞の 1 細胞からの安定的な培養を行った。一方、抗ヒト IgG 抗体をチップ上に固相化し、分泌抗体を目的細胞を導入したチャンバー周辺に捕捉し、検出分子を用いて目的細胞を同定するイムノチャンバー法を新たに開発し、目的細胞検出の評価を行った。結果、CS-FIA の検出限界は 0.66 fg/cell と判明し、1 細胞単離した 46 細胞の抗体高分泌候補株について、増殖後に ELISA に供したところ、培養 1 週間では大部分の娘細胞が親株より高い抗体分泌能を有し、1 ヶ月後では半数程度の娘細胞が 2 倍程度の抗体分泌能を維持した。またイムノチャンバーアレイチップは CS-FIA より目的細胞の検出のダイナミックレンジが 150 倍以上であると判明し、今後、目的細胞の取りこぼしのより少ないスクリーニングができると期待された。

**Single cell-based breeding of antibody-secreting cells by using CS-FIA and immunochamber array chip**

○Nobuo Yoshimoto, Shun'ichi Kuroda  
(ISIR, Osaka Univ.)

**Key words** single-cell analysis, antibody, cell surface display, mammalian cell

**2P-1p033 ファージ提示法を利用した CDR 模倣ペプチドライブラリーの構築**

○柳沢 美貴, 二井手 哲平, 服部 峰充, 中澤 光, 熊谷 泉, 梅津 光央  
(東北大院・工)  
mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

近年、標的特異性の低さから複数の作用点を持つ低分子医薬に代わり、高い標的特異性を持つバイオ医薬が注目されている。その中で、ペプチド医薬は有機合成が可能で、かつ、進化学操作を用いて標的特異性を比較的容易に設計可能であるが、体内で分解されやすく、抗体ほどの標的特異性は設計しにくい。一方、抗体医薬は非常に高い標的特異性を持つが、その開発工程は複雑で、かつ、生物剤であるため調製にコストが掛かってしまうことが課題となっている。そこで我々は、抗体の分子認識領域(CDR)に移植可能な環状構造を持つペプチド医薬を開発することで、構造的安定性や標的特異性が十分でない場合には、抗体の CDR の 1 つへ配列を移植し、抗体医薬の開発へも繋げていくことができるプロセスの構築を目指している。

本研究では、ペプチドを移植する抗体としてラクダ抗体の可変領域断片 VHH を用いた。VHH には 3 つの CDR(1~3)が存在し、CDR1 と CDR3 は VHH の立体構造形成に関与していないことから、ペプチド移植が可能であることが報告されている。そこで、VHH の結晶構造情報から CDR1 と CDR3 を模倣可能なペプチド構造を検討した結果、ペプチド両末端にチオール基を側鎖に持つシステイン残基を持たせ、CDR1 の模倣には有機リンカー分子を介した反応を行い、CDR3 の模倣にはチオール基同士の間で行うことで、CDR を模倣した環状ペプチドを設計できることがわかった。今回は、この環状ペプチドを提示したファージライブラリーを構築し、標的分子に対して親和性を持つペプチドの取得を試みたので報告する。

**CDR-mimic peptide library on phage for step-by-step antibody construction**

○Miki Yanagisawa, Teppei Niide, Takamitsu Hattori, Hikaru Nakazawa,  
Izumi Kumagai, Mitsuo Umetsu  
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

**Key words** peptide medicines, antibody, evolution technology, phage display

**2P-1p034 シガトキシン 2 に対するウサギモノクローナル抗体の取得**

○森下 しおり, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄  
(名大院・生命農学)  
nakano@molbiotech-nagoya.org

【背景・目的】我々のグループでは、動物の末梢血から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントを無細胞タンパク質合成系にて Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する迅速なモノクローナル抗体取得法 (SICREX[single-cell RT-PCR linked in vitro expression]法)を開発し、様々な抗体の取得に取り組んでいる。本研究では、抗体の抗原決定部位のバリエーションが豊富であり、かつ免疫化や採血がマウスに比べ容易なウサギを用いた SICREX を実施し Shigatoxin2 に対する抗体取得を目的とした。

【方法と結果】まずはじめに、Shigatoxin2 の無毒変異体(E167Q)を大腸菌により組換え生産・精製した。これを抗原としてウサギ (New Zealand White rabbit) に免疫後、ウサギ末梢血より血清を得た。免疫経過 1~7 日間において抗原結合能を有する末梢血中リンパ球の存在率をフローサイトメーターを用いて継続的に測定したところ、1 日後の割合が最も高く、目的細胞が血中に多く存在していることが示唆された。さらに、抗原特異的な抗体産生細胞を効率良く回収するために、1 細胞に単離する段階で、蛍光標識した抗原と小胞体染色試薬により二重染色し、フローサイトメーターによる単離を試みた。これらの細胞から SICREX を行ったところ、PCR により遺伝子の増幅が見られたため、現在得られた抗体遺伝子の性能解析を行っている。

**Generation of rabbit anti-Shiga toxin 2 monoclonal antibody by SICREX**

○Shiomi Morishita, Teruyo Kato, Takaaki Kojima, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** rabbit, monoclonal antibody, B cell

## 2P-1p035 蛍光免疫センサー Quenchbody によるがん抗原タンパク質 HER2 の検出

○岡裕也<sup>1</sup>, 鄭熙陳<sup>2</sup>, 董金華<sup>2</sup>, 上田宏<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>東工大・化生研)  
 ueda@res.titech.ac.jp

【緒言】 蛍光色素修飾抗体 Quenchbody (Q-body) は、蛍光色素を抗体に部位特異的に修飾した免疫センサーである。修飾された色素は抗原非存在下には抗体内の抗原結合部位近傍にある Trp 残基との間に生じる光誘起電子移動によって消光 (quench) されているが、抗原結合により消光が解除され発光する。Q-body の消光は抗原濃度依存的に増大するため、標的抗原と混合させるだけで検出・測定が行える簡便かつ迅速なアッセイツールとなりうる。本研究では乳がんなどのがん細胞の膜上で過剰発現している腫瘍マーカーであるヒト上皮成長因子受容体 HER2 を Q-body を用いて検出することを目的とした。免疫組織化学法など、現在の臨床現場における HER2 検出法と比較し煩雑な手順が不要な迅速検出系となると期待される。

【方法】 抗 HER2 抗体にヒト抗体合成ライブラリ由来の Fab 断片である Fab37 を用いた。Fab37 は抗原結合部位に多くの Trp 残基を持ち、Q-body として高い性能があると期待された。大腸菌にて目的タンパクを発現させ、蛍光色素を修飾し Q-body を作製した。その後、精製 HER2 タンパク質ならびに HER2 発現細胞を用いてその性能を評価した。

【結果】 蛍光色素 TAMRA, ATTO520 で 1 箇所ラベルした Q-body を用いて、溶液中での蛍光測定において、HER2 に特異的かつ高い (それぞれ最大 2.3, 4 倍) 蛍光応答が得られた。さらにその感度 (EC50) は 1 nM 以下と、報告されている Kd 値に近い値であった。また、ATTO520 修飾 Q-body を細胞培養上清に加え 20 分間おくだけで、HER2 発現細胞のみを特異的に蛍光検出することに成功した。

【結論と展望】 Q-body を用いて HER2 発現細胞を簡便迅速に蛍光検出することに成功した。現在、Q-body の細胞内局在を評価するとともに、血清中での細胞イメージング、及び生体イメージングを目指し近赤外領域に蛍光波長を持つ色素を用いた Q-body を作製している。

### Detection of cancer cell antigen HER2 by a fluorescent immunosensor Quenchbody

○Yuya Oka<sup>1</sup>, Hee-Jin Jeong<sup>2</sup>, Jinhua Dong<sup>2</sup>, Hiroshi Ueda<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, <sup>2</sup>CLS-IIR, Tokyo Tech)

**Key words** antibody, protein engineering, biosensor, Cancer cells

## 2P-1p036 抗体の足場構造への変異導入が特異性に与える影響

○中山純一<sup>1</sup>, 服部峰充<sup>1</sup>, 中澤光<sup>1</sup>, 金子美華<sup>2</sup>, 加藤幸成<sup>2</sup>, 熊谷泉<sup>1</sup>, 梅津光央<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>東北大院・医)  
 mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

抗体分子は、相補性決定領域(CDR)で標的分子を認識し結合している。そのため、標的に対する抗体の特異性や親和性を変化させる時には、CDR へ変異を導入するのが一般的である。その中で私達は、CDR 以外の領域(足場構造)に変異が入ることで抗体の標的親和性が 20 倍向上した経験から、足場構造への変異導入は緩やかな分子認識変化を促せるのではと考えてきた。現在、私が標的としているイソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1/2 (IDH1/2) は、脳腫瘍患者の予後診断に有用なマーカーであり、特定箇所において 12 種類の変異体が存在する。その中で私たちの共同研究者は、結合性が弱いながら 6 種類の変異型 IDH1/2 を認識する抗体 (MsMab-1) の取得に成功した。私達は、この抗体の取得によって、緩やかな特異性変化を促せる変異導入法を構築できれば、分子認識が曖昧な抗体から特定の变異型 IDH1/2 に特異的な抗体の作製や 12 種類全てに親和性を持つ抗体の作製が可能でないかと考えた。そこで本研究では、「足場構造中において他の抗体配列では出現頻度が低い残基」に注目し、その残基への変異が与える MsMab-1 抗体の特異性・親和性の変化を解析した。

まず、私は抗体の変異体を迅速・簡便に調製する必要があると考え、大腸菌で発現可能な組換えタンパク質である一本鎖 Fv(scFv) を設計した。次に、膨大な抗体配列情報を有する abYsis における抗体群と MsMab-1 の Fv 部分の配列を比較して出現頻度が 1% 以下である残基に対して各々 19 種の一残基変異体を作製し、IDH1/2 ペプチドに対する結合活性評価を行った。

その結果、抗原認識に直接関わらない足場構造にありながら分子認識能に重要なアミノ酸残基と特異性向上に関与する因子が示唆されたので報告する。

### How does introducing mutations for scaffold of antibody influence specificity?

○Junichi Nakayama<sup>1</sup>, Takamitsu Hattori<sup>1</sup>, Hikaru Nakazawa<sup>1</sup>, Mika Kaneko<sup>2</sup>, Yukinari Katou<sup>2</sup>, Izumi Kumagai<sup>1</sup>, Mitsuo Umetsu<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., Tohoku Univ.)

**Key words** scaffold, MsMab-1, IDH1/2

## 2P-1p037 抗体ダイレクトクローニング法による組換え抗体の樹立

○加藤三恵子<sup>1</sup>, 羽生義郎<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>バイオピーク, <sup>2</sup>産総研)  
 mieko.kato@bio-peak.com

モノクローナル抗体は研究・診断に必須のツールであり、抗原親和性・特異性の高い抗体を、確実に短期間で作製する技術が求められている。組換え技術を用いるインビトロ抗体作製法は、従来のハイブリドーマ法に比べて、多くのクローンを短期間でスクリーニングできる等の大きな利点を持っている。しかし、膨大な抗体多様性を反映したライブラリーの構築が難しいことや、スクリーニングで得られるクローンに疑陽性が多いこと等の技術的な問題があり、実用的な抗体の樹立には未だ困難がある。我々は、これらの問題を克服するために、コロニーを用いて組換えモノクローナル抗体 (scFv) 産生クローンを短期間でスクリーニングする、抗体ダイレクトクローニング法を確立した。本方法は、抗原を免疫した動物の B 細胞から抗体遺伝子 (VH, VL) 抽出し、分泌発現ベクターに組み込み、抗体遺伝子ライブラリーを作製する。このライブラリーで大腸菌を形質転換後、コロニー形成・抗体の発現誘導・抗原抗体反応の 3 つを同時に行う。コロニーを形成させると同時に、培地中に含まれる発現誘導剤によって、陽性クローンから分泌発現された抗体が抗原コートメンブレンに捕捉される。抗体に付加した His タグを利用して、抗原に結合した抗体を検出し、陽性クローンをクローニングする。本研究では、ウサギにマウス IgG を免疫し、抗マウス IgG モノクローナル抗体を樹立し、その特異性・親和性を評価した。その結果、ハイブリドーマ法に比べて、スクリーニング規模が拡大されたことで、陽性クローンを 10 倍以上多く得られた。さらに、ウサギ等のマウス以外の動物種のモノクローナル抗体が樹立可能なことや、樹立する抗体が組換え抗体であるため、簡便に短時間で抗体の生産が可能になる等、多くの利点がある。

### Recombinant monoclonal antibodies by direct cloning method

○Mieko Kato<sup>1</sup>, Yoshiro Hanyu<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Bio-Peak Co., Ltd., <sup>2</sup>AIIST)

**Key words** scFv, monoclonal antibody, screening, colony assay

## 2P-1p038 好熱菌発酵産物を給与したブタにおける腸内乳酸菌叢の変化

○吉川翔太<sup>1</sup>, 宮本浩邦<sup>1,2,3</sup>, 須田互<sup>2,4</sup>, 新名俊行<sup>5</sup>, 井藤俊行<sup>5</sup>, 大野博司<sup>6</sup>, 服部正平<sup>4,7</sup>, 児玉浩明<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>千葉大院・融合, <sup>2</sup>慶応大・医, <sup>3</sup>サーマス, <sup>4</sup>東京大院・新領域, <sup>5</sup>京葉プラントエンジニアリング, <sup>6</sup>理研・IMS, <sup>7</sup>早稲田大院・先進理工)  
 kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】 海産資源を 70~80℃ の高温下で発酵させた飼料 (好熱菌発酵産物) は、家畜の成長促進、内臓脂肪の減少など様々な生理作用を有する [1,2]。糞便中の有機酸含量を調べたところ、動物種 (ブタ、ニワトリ) に関わらず、好熱菌発酵産物の給与によって排泄糞中の乳酸含量が低下していた [3]。この結果は、好熱菌発酵産物によって腸内の乳酸代謝に関わる細菌の種類が大きく変化していることを示唆している。そこで好熱菌発酵産物を給与したブタ (試験区) と通常のブタ (対照区) との糞便サンプル (各 n=4) を用いて、糞便中の生菌数、MRS 選択培地上で生育する乳酸菌の種類を検証した。

【実験方法】 ブタ糞便サンプルを希釈し、一般嫌気性細菌用培地である GAM 培地と乳酸菌選択培地である MRS 培地に塗抹し、培養可能な細菌を選択した。その後、選抜された細菌を rep-PCR 解析により分類し、各グループの代表菌株について 16S rRNA 遺伝子配列による簡易同定を行った。

【結果】 GAM 培地を用いた糞便中の生菌数測定では試験区/対照区間に有意な差は認められなかった。一方で、MRS 選択培地上で生育する細菌の種類には大きな違いがあり、試験区では *Lactobacillus amylovorus* が顕著に増加し、対照区で大部分を占めていた *Streptococcus alactolyticus* はほとんど検出されなかった。この結果は、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シークエンシングによる解析結果と一致していた。今後、単離された *L. amylovorus* と *S. alactolyticus* の乳酸産生能などの生化学的特徴を解析し、好熱菌発酵産物を給与された動物腸内の乳酸濃度制御の分子機構を解明していく予定である。

[1] Miyamoto et al. (2012) Res. Vet. Sci., 93:137-142

[2] 宮本浩邦, 児玉浩明 (2015) Medical Science Digest 4 月号 49-51

[3] Ito et al. (2016) J. Biosci. Bioeng. 121: 659-664

### Administration of thermophile-fermented compost modulates gut lactic acid bacterial flora in pigs

○Shota Yoshikawa<sup>1</sup>, Hirokuni Miyamoto<sup>1,2,3</sup>, Wataru Suda<sup>2,4</sup>, Toshiyuki Shinmyo<sup>5</sup>, Toshiyuki Ito<sup>5</sup>, Hiroshi Ohno<sup>6</sup>, Masahira Hattori<sup>4,7</sup>, Hiroaki Kodama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., <sup>2</sup>Med., Keio Univ., <sup>3</sup>Sermas, <sup>4</sup>Fro. Sci., Tokyo Univ., <sup>5</sup>Keiyo Plant Eng., <sup>6</sup>RIKEN IMS, <sup>7</sup>Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** probiotics, lactic acid bacteria, gut microbiota, compost

## 2P-1p039 Bioluminescence and electrochemical activities of *Vibrio fischeri* in batch and continuous cultures

○Hyung Joo Kim<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>, Hak Jin Song<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>, Wu-Young Jeong<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)  
hyungkim@konkuk.ac.kr

The bioluminescence and electrochemical activities of *Vibrio fischeri* were studied at both unsteady and steady states of growth. The cultivations were carried out using a 5 liter jar fermentor, and electrochemical signal and bioluminescence intensity were monitored. For the electrochemical measurement, a three-electrode electrochemical system was used in the presence of electrochemical mediator (2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone). In the early exponential stage of batch culture, both electrochemical signal and luminescence intensity were synchronized with the increase in bacterial number. However, from the late exponential stage of the culture, rapid decreases in signals both electrochemical signal and luminescence intensity were observed. When the electrochemical signal and luminescence intensity from *V. fischeri* were monitored in chemostat, the intensities of both signals from the bacteria were closely related with the dilution rate. These results suggest that use of chemostat for the application of *V. fischeri* based on its bioluminescence activity is reliable and therefore avoids high error generation during the bioactivity and bioluminescence measurements.

## Bioluminescence and electrochemical activities of *Vibrio fischeri* in batch and continuous cultures

○Hyung Joo Kim<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>, Hak Jin Song<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>, Wu-Young Jeong<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

**Key words** *Vibrio fischeri*, bioluminescence, electrochemical activities, three-electrode system

## 2P-1p040 麹菌におけるタンパク質高発現システムの構築

○佐藤 伊純, 山崎 将太郎, 出村 拓, 加藤 晃  
(奈良先端大・バイオ)  
kou@bs.naist.jp

麹菌は、タンパク質への糖鎖修飾が可能であり、高純度なタンパク質の精製が容易であるため、高付加価値タンパク質の生産に利用されている。導入した遺伝子の発現には、転写や翻訳といった様々なステップ全てが重要であるが、これら複数のステップが最適化された発現系は麹菌では未だ開発されておらず、各ステップを効率化することにより生産性が大きく向上する可能性がある。転写の段階において遺伝子ごとに転写される mRNA 量が大きく異なっているように、翻訳段階においても mRNA 種により翻訳されるタンパク質の量は大きく異なっている。mRNA から翻訳されるタンパク質の量は、結合するリボソームの量に大きく依存し、その結合効率も mRNA の 5'側に存在する 5'UTR (untranslated region) の配列が規定することが報告されている。本研究では、麹菌内の mRNA について、高い翻訳効率を示す mRNA を同定し、その 5'UTR を導入遺伝子発現系に活用することを目的とした。まず、リボソームの結合数により mRNA を分画する手法であるポリソーム解析と次世代シーケンサーを用いて 5'UTR を決定する CAGE 解析を組み合わせた大規模解析を行い、リボソームが多く結合している mRNA とその 5'UTR を複数同定した。次に、同定した候補 5'UTR をレポーター遺伝子と連結した発現ベクターの構築を行い、一過的に麹菌に導入し、レポーター活性を指標として、候補 5'UTR の翻訳能力の評価を行ったので報告する。

## Development of efficient transgene expression system in *Aspergillus oryzae*

○Izumi Sato, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Kou Kato  
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, transgene expression, translation, 5'-UTR

## 2P-1p041 土壌から分離した油脂高生産菌 *Rhodospiridium paludigenum* 1164 株の評価

○真野 潤一, 橋田 和美, 北岡 本光  
(農研機構・食研)  
jmano@affrc.go.jp

油脂の生産に適した微生物宿主の開発を目的として、有望な菌株を天然から探索した。土壌から収集した菌株の中で最もトリアシルグリセロールの生産性が高い株について炭素源の質化性など、生理学的特性を評価するとともに、26S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。この結果から、当該菌株を担子菌系酵母の *Rhodospiridium paludigenum* と同定した。次に、本菌株の生育特性について評価を行い、生育に最適な pH が 5、温度が 30℃であることを確認した。続いて、バフフル付きフラスコを用いて本菌株のフェドバッチ培養を行い、高密度培養条件下での油脂生産性を評価した。24 時間ごとに炭素源としてグルコースを逐次添加し、10 日間で 132 mg/mL の乾燥菌体を得た。得られた菌体からブライダイヤー法を用いて油脂を抽出し、96 mg/mL に相当する油脂を回収した。この結果から、菌体内の油脂含量は 73% と推定した。重量比での対糖収率は 15% であり、熱量換算で原料グルコースのもつエネルギーの 34% が生産物として回収されたと評価した。得られた油脂の脂質クラスは主にトリアシルグリセロールで、脂肪酸組成はパルミチン酸とオレイン酸が中心であった。本菌株は、菌体内にトリアシルグリセロールを蓄積するだけでなく、菌体外にトリアシルグリセロールとは異なる脂質を著量分泌生産することも確認された。この脂質の化学構造については、現在解析中である。

## Evaluation of a high lipid-producing strain, *Rhodospiridium paludigenum* No. 1164

○Junichi Mano, Kazumi Kitta, Motomitsu Kitaoka  
(Food Res. Inst., NARO)

**Key words** *Rhodospiridium paludigenum*, lipid

## 2P-1p042 *Pseudozyma antarctica* 由来リパーゼを利用したマンノシルエリスリトールリピッド高生産技術の開発

○雑賀 あずさ<sup>1</sup>, 小池 英明<sup>2</sup>, 福岡 徳馬<sup>1</sup>, 山本 周平<sup>3</sup>, 岸本 高英<sup>3</sup>, 森田 友岳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>東洋紡 (株)・敦賀バイオ)  
morita-tomotake@aist.go.jp

### 【背景と目的】

ジアステレオマー型マンノシルエリスリトールリピッド (MEL-B) は、担子菌系酵母 *Pseudozyma tsukubaensis* が植物油から量産する糖脂質であり、優れた保湿効果を示すことから化粧品素材として実用化されている。一方、生産効率の更なる向上が、用途拡大のための課題になっている。本研究では、*P. tsukubaensis* にリパーゼ遺伝子を導入し、植物油からの MEL-B 生産量の向上を試みた。

### 【方法】

*P. antarctica* T-34 株由来リパーゼ (CALA, CALB) の発現ベクターを作成し、*P. tsukubaensis* IE5 株に導入した。得られた遺伝子組換え株を、オリーブ油を炭素源として培養し、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で、MEL-B の生産量を定量した。

### 【結果と考察】

グルコースを炭素源とした際の CALA 導入株の培養上清のリパーゼ活性は 8.2±2.7 U/mL であり、一方、CALB 導入株および空ベクター導入株 (コントロール) ではほとんど活性が見られなかった。オリーブ油を炭素源としてリパーゼ導入株を培養した結果、CALA 導入株では菌体増殖速度がコントロールよりも早く、培養 3 日目の MEL-B 生産量も約 1.5 倍に増加した。CALB 導入株の MEL-B 生産量はコントロールと同程度であった。また、ジャーファーメンター培養においても、CALA 導入株の MEL-B 生産量はコントロールよりも高く、培地中のリパーゼ活性を高めることで、植物油からの MEL-B 生産効率を向上できることを明らかにした。今後、リパーゼ遺伝子の発現量や培養条件の最適化によって、MEL-B 生産量の更なる向上が期待される。本研究は JST の研究成果展開事業 A-STEP により実施した。

## Enhanced the productivity of diastereomeric mannosylerythritol-B using lipase from *Pseudozyma antarctica* T-34

○Azusa Saika<sup>1</sup>, Hideaki Koike<sup>2</sup>, Tokuma Fukuoka<sup>1</sup>, Shuhei Yamamoto<sup>3</sup>, Takahide Kishimoto<sup>3</sup>, Tomotake Morita<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>ISC, AIST, <sup>2</sup>BRI, AIST, <sup>3</sup>Tsuruga Inst. Technol., TOYOBO CO., LTD.)

**Key words** mannosylerythritol lipid, *Pseudozyma tsukubaensis*, lipase

## 2P-1p043 酸素供給が Sophorolipid 生産に与える影響

○生越 克典, 三輪 秀和, 平田 善彦  
(サラヤ株式会社)  
hirata@saraya.com

**【背景と目的】**Sophorolipid (SL) は糖と油から酵母の発酵によって生産される天然の界面活性剤である。現在 SL は高洗浄性と良好な生分解性を併せ持つ低起泡性界面活性剤としての性質を活かし、洗濯用洗剤や台所洗剤などに配合されている。SL の高生産時には酸素を多量に供給する必要があることがフラスコを用いた検討によって明らかとなっており、通気攪拌培養においても攪拌数や通気量などの条件が重要となることが予想される。そこで、SL の発酵生産における攪拌数や通気量の条件、従来のタービン翼から酸素供給性能に優れた新規攪拌翼 (スパーミックス: 佐竹化学機械工業株式会社) への変更を行い、SL の生産性の評価を行なった。

**【方法】** グルコースと植物油、脂肪酸を炭素源とし、100 L 発酵槽を用いて好気培養を行った。植物油、脂肪酸が検出限界以下になった時点を培養終点とした。タービン翼、攪拌数 500 rpm、通気量 36 L/min の条件を対照とし、攪拌翼や攪拌数、通気量を変更し、SL 生産性を評価した。また、CFD 解析によるポイド率分布の可視化や攪拌動力の算出を行った。

**【結果】** 攪拌翼を変更した結果、SL の生産速度が 1.4 倍に向上し、培養日数が 2 日短縮された。攪拌数を 500 rpm から 600 rpm へ増加させた結果、SL の生産速度が僅かに向上し、培養日数が 1 日短縮された。通気量を 36 L/min から 9 L/min に減少させた結果、SL の生産速度が 0.6 倍に低下し、培養日数が 2 日増加した。CFD 解析によるポイド率分布の可視化の結果、攪拌翼の変更は攪拌数を増加させることよりもポイド率分布をより均一にさせることが示唆された。また、攪拌動力の算出を行なった結果、攪拌数を 600 rpm にした条件が最も動力が大きく、攪拌翼を変更した場合が最も少なかった。以上の結果から、攪拌翼を新規攪拌翼に変更することで、低動力でより高い SL 生産が可能であることが示唆された。

## The Influence of oxygen supply condition on Sophorolipid production

○Katsunori Namakoshi, Hidekazu Miwa, Yoshihiko Hirata  
(Saraya co. LTD)

**Key words** biosurfactant, fermentation

2P-1p044 油糧酵母 *Pseudozyma hubeiensis* を用いたグルコース・キシロース・アラビノース同時発酵

○谷村 あゆみ<sup>1</sup>, 高島 昌子<sup>2</sup>, 杉田 隆<sup>3</sup>, 遠藤 力也<sup>2</sup>, 大熊 盛也<sup>2</sup>, 岸野 重信<sup>1</sup>, 島 純<sup>4</sup>, 小川 順<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>理研・BRC-JCM, <sup>3</sup>明薬大・薬, <sup>4</sup>龍大・農)  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

酵母の中には、炭素源を油脂に変換し、菌体内に蓄積するものが存在する。非可食系バイオマスから発酵生産される油脂、いわゆる第二世代バイオ燃料は、エネルギー問題等の観点から、軽油代替燃料として期待を集めている。リグノセルロース系バイオマスの糖化液には、グルコースだけでなくキシロースやアラビノースも含まれている。従って、油糧酵母を用いてリグノセルロース系バイオマスから効率的に油脂を生産するためには、キシロースおよびアラビノースをも発酵に利用することが欠かせない。さらに、培養時間短縮のため、グルコースリプレッションが起こらないことも望まれる。本研究では、リグノセルロース系バイオマスからの油脂の発酵生産を目指し、グルコース、キシロース、アラビノースを同時利用して油脂を蓄積する酵母の探索を行った。

西表島、利尻島などから分離した酵母 1189 株を対象とし、混合糖としてグルコース、キシロース、アラビノースを糖源としたモデル糖化液を用いた際の油脂蓄積能、およびそれら糖の消費能を評価した。12 株を選抜し、残存糖濃度および油脂濃度を分析した結果、混合糖を同時利用し、かつ高油脂蓄積能を示す *Pseudozyma hubeiensis* IPM 1-10 株を選抜することができた。さらに、*P. hubeiensis* IPM 1-10 株は、単一糖源よりも、混合糖源のときのほうが、糖利用率も油脂蓄積量も高かった。このことから、*P. hubeiensis* IPM 1-10 株は、混合糖を含むリグノセルロース系バイオマスからの油脂生産に有用であることが示唆された。

Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*

○Ayumi Tanimura<sup>1</sup>, Masako Takashima<sup>2</sup>, Takashi Sugita<sup>3</sup>, Rikiya Endoh<sup>2</sup>, Moriya Ohkuma<sup>2</sup>, Shigenobu Kishino<sup>1</sup>, Jun Shima<sup>4</sup>, Jun Ogawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>BRC-JCM, RIKEN, <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Meiji Pharma. Univ., <sup>4</sup>Faculty of Agric., Ryukoku Univ.)

**Key words** oleaginous yeast, fermentation, lipid, pentose

2P-1p045 *Moniliella megachiliensis* の浸透圧ストレス適応における ROS 産生とポリオール生成

○岩田 悠志<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>1,2</sup>, 荻原 淳<sup>1,2</sup>, 春見 隆文<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・生資科, <sup>2</sup>日大院・生資科・生資利用)  
iwata.hisashi@nihon-u.ac.jp

**【背景・目的】**我々は *Moniliella megachiliensis* のエリスリトール生産性向上を目的として、本菌のエリスリトール生成機構について研究を行っている。これまでに、短時間のストレス負荷において、種々のストレス負荷剤による ROS 産生が適溶質であるグリセロール及びエリスリトールの生成比に影響を与えるという結果を得た。そこで今回は、本菌にとってさらにストレス負荷が大きいと考えられる長時間培養時における ROS 産生とエリスリトール生成について解析し、エリスリトール生成の生理的意義を考察した。

**【方法】** 栄養増殖培地 (YPD) にて 0.5 M NaCl, 1.0 M グルコースの浸透圧負荷を行って 72 時間まで培養し、12 時間毎に培養菌体を回収した。それら細胞のポリオール生成量を HPLC、遺伝子発現を RT-PCR により解析した。ROS の蓄積は、細胞を蛍光試薬 DCF-DA により処理した後、マルチプレートリーダーで 528 nm の蛍光強度を測定した。

**【結果】** ROS は、NaCl やグルコースの浸透圧負荷条件下で培養 12 時間後に、ストレス負荷前と比較して約 3 倍に増加し、その後、NaCl 条件下では、細胞増殖とともに減少した。グルコース下では、細胞外グルコースの消費に伴い、72 時間後に約 4 倍増加した。一方、細胞内エリスリトール蓄積量は、*ER3* 遺伝子 (*Erythrose reductase 3*) の発現と相関性を示し、培養 36 時間で最大となった (NaCl: 120 µg/mg dry cell, グルコース: 35 µg/mg dry cell)。また、抗酸化酵素遺伝子の *SOD1*, *SOD2* は、細胞増殖や ROS 産生に応答するように発現レベルが変化した。以上のことから、本菌は浸透圧の種類により、ROS の発生动態が異なるとともに、その程度により関連遺伝子の発現を制御することでポリオール生成や細胞増殖を調節し、環境適応を図っているものと推測された。

本研究の一部は、戦略的創造研究推進事業 ALCA の助成を受けて行った。

Relationship between ROS generation and erythritol biosynthesis in osmotic stress adaptation of *Moniliella megachiliensis*

○Hisashi Iwata<sup>1</sup>, Taisuke Watanabe<sup>1,2</sup>, Jun Ogihara<sup>1,2</sup>, Takafumi Kasumi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>2</sup>Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci.)

**Key words** *Moniliella megachiliensis*, osmotic stress, ROS generation, compatible solute

## 2P-1p046 PUT4 遺伝子導入酵母株の脂肪酸組成の変化

○三木 健夫, 村松 昇  
(山梨大院・医工総)  
takemiki@yamanashi.ac.jp

**【背景と目的】** 酵母にとってプロリンは他のアミノ酸に比べて、資化され難いアミノ酸のひとつとされている。我々は、実用酵母が示すプロリン難資化性について研究を進めている。これまでに、プロリン膜輸送タンパク質をコードする PUT4 遺伝子を導入した酵母株では、プロリンの取り込み量が増大することを明らかにしている。本研究では、PUT4 株の脂肪酸組成の変化について調査を行った。

**【方法】** *S. cerevisiae* OCM-2 株 (MAT a/a, delta ura3/ura3) および本株に *PUT1*, *PUT2*, *PUT3* および *PUT4* 遺伝子を導入した株を、プロリン (0.5 g/L) を含む SD 合成培地 (150 ml) に、波長 610 nm における濁度が 0.1 になるよう接種し、28°C で静置培養した。培養後、菌体を集菌・洗浄し凍結乾燥させ、脂肪酸抽出メチル化キットおよびメチル化脂肪酸精製キット (Cat. No. 06482-04, 06482-94; ナカライテック) を用いて脂肪酸を抽出・精製した。メチル化脂肪酸試料をガスクロマトグラフィーに供し、脂肪酸構成比を測定した。

**【結果と考察】** *S. cerevisiae* OCM-2 株 (MAT a/a, delta ura3/ura3) および本株に *PUT1*, *PUT2*, *PUT3* および *PUT4* 遺伝子を導入した株の脂肪酸組成を比較した結果、プロリンを含まない SD 培地で培養した場合にはいずれの株の脂肪酸組成 (C10, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C20, C20:1) は同様であったのに対して、プロリンを含む培地で培養した場合、PUT4 遺伝子導入株で C16:1 および C18:1 の割合が低下した。この現象は、PUT4 株をプロリン含有培地で培養した場合のみ見られることから、細胞内にプロリンを多く取込んだ酵母は、何らかのストレスを受けている可能性が示唆された。

Effect of PUT4 gene transfection on fatty acid component in yeast *S. cerevisiae* OCM-2

○Takeo Miki, Noboru Muramatsu  
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

**Key words** proline, yeast, stress

## 2P-1p047 醸造酵母ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子破壊株の清酒醸造特性

○富本 和也, 赤尾 健, 福田 央  
(酒総研)  
k.tomimoto@nrib.go.jp

ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) は、DNA-ヒストン間の結合を強めることでヌクレオソームを安定化させ、多くの遺伝子の転写を抑制的に制御することが知られている。醸造酵母においても、HDAC を介した転写制御は重要と予想されるが、この観点からの報告は従来ほとんどなかった。そこで、清酒酵母 K701 を親株とし、*RPD3*・*HDA1*・*SIR2*・*HST1* の各 HDAC 遺伝子単独破壊株を作製し、それらの清酒醸造特性を確認した。その結果、*HDA1*・*SIR2*・*HST1* 破壊株では、*HDA1* 破壊株で酢酸イソアミルの増加 (1.8 倍)、酢酸の減少 (0.5 倍) が見られたが、それ以外に目立った変化は見られなかった。一方、*RPD3* 破壊株では発酵力がやや低下したものの、酢酸イソアミルの大幅な増加 (2.2 倍) が見られ、フーゼリアルアルコール・有機酸の組成も変化していた。*Rpd3p* は ~1.2 MDa の *Rpd3L* 複合体を形成することから、同複合体構成に必須の遺伝子 *DEP1*・*SDS3* 各単独破壊株を作製し、それらの清酒醸造特性も確認した。その結果、発酵力低下、フーゼリアルアルコール・リンゴ酸以外の有機酸組成の変化はいずれも *Rpd3L* 複合体の欠損が理由であることが分かった。また、フーゼリアルアルコール組成の変化については、それらの合成に関わる分岐鎖アミノ酸合成関連遺伝子の転写量が変化していることが確認された。さらに、ワイン酵母 EC1118 の *RPD3* 破壊株を作製し、清酒醸造特性を調べたところ、発酵力低下・フーゼリアルアルコール組成の変化は清酒酵母と同様であったものの、有機酸組成の変化は異なっており、酢酸イソアミルも微増に留まる等、清酒酵母と同破壊株とはやや異なる傾向を示した。以上の結果より、一部の HDAC は清酒醸造において発酵力・二次代謝産物生産に関与することが明らかとなった。

### Sake-brewing characteristic of histone deacetylase gene-disrupted yeast

○Kazuya Tomimoto, Takeshi Akao, Hisashi Fukuda  
(NRIB)

**Key words** sake yeast, histone deacetylase, *RPD3*, isoamyl acetate

## 2P-1p048 高濃度エタノールストレスによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母 *BTN2* の解析とその応用

加藤 沙枝, 山内 雪菜, ○井沢 真吾  
(京工織大院・工芸科学)  
thioredoxin@kit.ac.jp

翻訳抑制を引き起こすストレス条件下では大部分の遺伝子の発現は抑制され、耐性獲得に必要とされる一部の遺伝子のみが翻訳される「優先的翻訳」が行われる。高濃度エタノールストレス (>9% v/v) は酵母の翻訳を強く抑制するが、これまでどのような遺伝子が高濃度エタノール存在下で優先的に翻訳されているかは不明であった。今回、v-SNARE binding protein をコードする *BTN2* が高濃度エタノール存在下で優先的に翻訳されることを明らかにした。非ストレス条件下や低濃度エタノールストレス下では *BTN2* の発現はほとんど検出されなかったが、高濃度エタノール処理によって転写レベル、タンパク質レベルともに顕著に上昇した。一方、エタノールを除去すると *Btn2* タンパク質は比較的速やかに消失した。また、*BTN2* のプロモーターを用いることで、高濃度エタノールストレス下における *BTN2* 以外の遺伝子 (*CURI*, *GIC2*, *YURI*) の発現誘導に成功した。そのため、翻訳抑制によってこれまで困難であった高濃度エタノール存在下での遺伝子発現誘導が *BTN2* プロモーターによって可能となり、高濃度アルコール発酵の実現や発酵効率の改良などに同プロモーターが活用できると考えられた。また、*BTN2* のプロモーター領域内の heat shock elements (HSEs) が、エタノールによる転写活性化だけでなく優先的翻訳にも重要な役割を担う可能性が強く示唆されたため、現在の検証を行っている。さらに、*BTN2* の発現誘導における実験室酵母とワイン酵母・清酒酵母の違いについても解析中である (Yamauchi and Izawa. Prioritized expression of *BTN2* of *Saccharomyces cerevisiae* under pronounced translation repression induced by severe ethanol stress. *submitted*)。

### Yeast *BTN2* overcomes pronounced translation repression caused by severe ethanol stress

Sae Kato, Yukina Yamauchi, ○Shingo Izawa  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

**Key words** ethanol stress, mRNA flux, translation repression, *BTN2*

## 2P-1p049 高濃度バニリンストレスによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母 *VIE1* の解析

○Nguyen Trinh TM, 石田 陽子, 井沢 真吾  
(京工織大院・工芸科学)  
thioredoxin@kit.ac.jp

木質系バイオマスの糖化前処理によって生じるバニリンは酵母の生育や発酵能を阻害するため、第二世代バイオエタノールの効率的な製造を目指す上で大きな障壁となっている。また、グルコース枯渇や高濃度エタノールなどと同様に、高濃度のバニリンは翻訳抑制を酵母細胞内で引き起こす。翻訳抑制下ではストレス耐性獲得に必要とされる一部の遺伝子のみが優先的に翻訳され、大半の遺伝子は転写量が増加しても翻訳産物レベルに反映されない。そのため、通常の発現系でバニリン耐性を改善することは困難である。そこで本研究では、高濃度バニリン存在下でも優先的に翻訳される酵母遺伝子の同定とその応用に取り組んだ。機能未知の遺伝子 *VIE1* の mRNA レベルはバニリン濃度依存的に増加した。また、そのタンパク質は非ストレス条件下でほとんど検出されなかったが、高濃度バニリン存在下では顕著に増加した。加えて、*VIE1* プロモーターを用いることで、翻訳抑制を引き起こす高濃度バニリン存在下でも任意の遺伝子を効率的に翻訳・発現させることに成功した。また、バニリン同様にバイオマスの糖化前処理によって生じる発酵阻害物質のフルフラールや HMF によって *VIE1* の発現誘導が認められた。以上の結果から、*VIE1* は翻訳抑制ストレスである高濃度バニリンやフルフラール、HMF 存在下でも優先的に翻訳されることが明らかとなった。これらの発酵阻害物質存在下でも機能する *VIE1* プロモーターを用いた発現系を利用することで、酵母の発酵阻害物質に対する耐性や第二世代バイオエタノールの製造効率を改善できる可能性が強く示唆された。

### Yeast *VIE1* overcomes pronounced translation repression caused by severe vanillin stress

○TM Nguyen Trinh, Yoko Ishida, Shingo Izawa  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

**Key words** vanillin, lignocellulosic materials, translation repression, furfural

## 2P-1p050 花酵母による廃牛乳を基質とした高機能微生物タンパク (SCP) 生産

○大塚 光雄<sup>1</sup>, 清 啓自<sup>1</sup>, 茂野 俊也<sup>2</sup>, 中島 敏明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>つくば環微研)  
nakajima-toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

牛乳から搾乳して得られる生乳は、気温や天候などの気象条件により生産量が変動する。また毎日の搾乳を怠ると乳房炎になるため、牛乳生産のコントロールは難しいとされている。そのため、酪農家は急な出荷量の変化に対応が出来ないという問題がある。生産量が需要を上回った場合、牛乳は産業廃棄物として処理される。このような問題を背景に、過剰に生産した牛乳の環境に配慮した有効利用法が必要とされている。現在、有効利用法の一つに液体飼料化が挙げられるが、高い含水量の為に腐敗による影響を受けやすく、また可搬性にも問題がある。そこで本研究では牛乳を原料に酵母を用いて Single Cell Protein (SCP) 生産を行うことにより廃棄量、および廃棄処理費用の低減を目的とした。産業利用を見越しイメージの良い花から単離した酵母を牛乳で増殖させ、菌体を回収し SCP を配合飼料添加物としての商品化を最終目標としている。研究室保有の花酵母は、油脂分解酵母としてスクリーニングしたものであり、牛乳中での生育に適した株とは限らない。そのため、新規に花酵母の採取を行った。つくば市内に自生する花をサンプリング・希釈し、牛乳寒天培地、YM 培地、MRS 培地にプレインキュベーションして培養を行った。結果、6 株の乳酸菌と 4 株の酵母を得た。現在、これらの菌株の有用性を検証している。研究室保有の花酵母については、26S rRNA D1/D2 領域塩基配列を決定し、その配列を用いて帰属分類群を推定した。結果、所有している株の約半数が *Pichia anomala* と同定された。*Pichia anomala* は、油脂分解酵母と知られ、油脂系廃棄物からの SCP 生産株としての特許を取得されている。現在、SCP 生産株の絞り込みを行い、高生産かつ廃水処理能を持った花酵母の探索・組み合わせの検討を行っている。また、使用菌株の絞り込みを行う段階で菌体の栄養分析も行ってゆく。

### Production of Single Cell Protein (SCP) from waste milk by using yeasts isolated from flowers

○Mitsuo Otsuka<sup>1</sup>, Keiji Kiyoshi<sup>1</sup>, Toshiya Shigeno<sup>2</sup>, Toshiaki Nakajima<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Tsukuba Inst. of Environ. Microbiol)

**Key words** yeast, Single-Cell-Protein, milk, scp

## 2P-1p051 *N*-アセチルグルコサミン資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* の特性解析

○猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦  
(神戸大院・科)  
akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】*N*-アセチルグルコサミン (以下, GlcNAc) は, 甲殻類の殻や昆虫の外骨格, および多くの糸状菌, 酵母, 藻類の細胞壁の主要成分の1つであるキチンの主要な構成単糖である。キチンの自然界における年間生産量は  $10^{10}$ ~ $10^{11}$  トンと試算されており, セルロースに次いで豊富に存在するバイオマス資源であると考えられている。しかしながら, セルロースに比べ, キチンの利用に関する研究は進んでおらず, キチン系廃棄物のほとんどは未利用の状態にある。そのため, キチンおよびその構成単糖である GlcNAc からの微生物を利用した有用物質生産法の開発が求められている。本研究では, GlcNAc を炭素源としてバイオ燃料の一種であるエタノールを生産できる酵母 *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* の発酵特性および GlcNAc 代謝経路の解析を試みた。

【結果および考察】酵母 *S. stipitis* を用いて, 異なる通気条件で GlcNAc を炭素源とした発酵試験を行い, 通気条件がエタノール生産の及ぼす影響を検討した。その結果, この酵母が嫌気条件では理論収率の 82% という高い収率でエタノールを生産できるのに対し, 好気条件ではエタノールを全く生産しないことが明らかとなった。この特性を利用すれば, この酵母に GlcNAc からエタノール以外の有用物質を生産させることも可能になると期待される。また, この酵母の GlcNAc 代謝経路をより詳細に解析するために, CE-TOFMS を用いた代謝物解析も進めており, その結果についても報告する。

### Characterization of *N*-acetylglucosamine-assimilating yeast *Scheffersomyces stipitis*

○Kentaro Inokuma, tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo  
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

**Key words** *N*-acetylglucosamine, yeast, *Scheffersomyces stipitis*, ethanol

## 2P-1p052 酵母表面への酵素立体的配置技術の開発

○黒野 浩幹, 猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦  
(神戸大院・科)  
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景・目的】近年, 環境負荷の軽減などの理由から, 酵母を用いたバイオマスを原料とするエタノール生産が注目されている。そのコストおよびエネルギー消費の大幅な削減のためには, セルラーゼの生産, 糖化, 発酵を一度に行う統合型バイオプロセス (Consolidated Bioprocessing: CBP) の実現が必要である。我々は, セルロースの同時糖化発酵を可能とするセルラーゼ発酵酵母の細胞表面における酵素活性の向上に取り組んでいる。本研究では, 細胞表面に提示されるセルラーゼの配置に着目し, 表面提示に使用するアンカータンパクが, 提示されるタンパクの配置に及ぼす影響の解析を行った。

【結果】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の *SAG1* アンカーおよび *SEDI* アンカーを高感度緑色蛍光タンパク (EGFP) に付与することで EGFP を細胞表面に提示させ, 共焦点レーザー顕微鏡観察と免疫電子顕微鏡解析を行い, GPI アンカーによる表面提示の局在を調べた。その結果, GPI アンカーを付与している株にのみ EGFP の表面提示が確認できた。さらに *SAG1* アンカーを付与した EGFP よりも *SEDI* アンカーを付与した EGFP の方が, EGFP を細胞表面の外側に提示できることが確認された。この結果を応用し, EGFP の代わりにセルラーゼを導入したセルラーゼ表面提示酵母を構築することで, セルロース分解効率の向上が期待される。

### Development of steric positioning technology of enzymes on yeast

○Hiroki Kuroki, Kentaro Inokuma, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo  
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

**Key words** cell surface display, EGFP, immunoelectron microscopy, *Saccharomyces cerevisiae*

## 2P-1p053 定量プロテオミクスを用いた出芽酵母中心代謝安定化機構の解析

○松田 史生, 富田 淳美, 清水 浩  
(阪大院・情報)  
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は高いエタノール発酵能力を持つが, 酵素発現量が解糖系の代謝フラックスを維持するためにどのように協調して増加, 減少しているのかは明らかではない。そこで, 中心代謝に関わる酵素タンパク質をコードする遺伝子の1遺伝子破壊株の中心代謝酵素量を定量プロテオーム解析法で網羅的に測定することを試みた。

【方法】*S. cerevisiae* BY4742 株およびその1遺伝子破壊株を用いた。非標識または [ $^{13}\text{C}$ ] グルコースを含む SD 培地 (100 mL) で回分培養し, 菌体を回収後, タンパク質を抽出し, 定法に従ってトリプシン消化を行った。トリプシン消化物は nanoLC-UFMS (Prominence nano+LCMS-8040) を用いて分析した (カラム: L-column C18, 0.1\*150mm, 移動相: アセトニトリル/水/ギ酸, 流量: 400 nL/min, ESI ポジティブイオンモード, 検出: MRM)。各ペプチドの非標識体と [ $^{13}\text{C}$ ] 標識体のピーク面積比から相対タンパク量を求めた。データ解析には Skyline ver 2.5 を用いた。

【結果】対数増殖期にある野生株およびその1遺伝子破壊株の総計 31 株から, タンパク質を抽出し, 定量プロテオーム解析法を用いて 110 種の中心代謝酵素の発現量を定量した。得られた酵素発現プロファイルデータを用い, 全酵素間で発現量の相関係数を算出し, 1遺伝子破壊株間で協調して発現量が増加, 減少する酵素の共発現ネットワークを作製した。ストレス応答に関わるグローバルレギュレーター *Msn2p/Msn4p* が発現調節するトレハロース代謝酵素群がクラスターを形成していた。これらの結果から, 出芽酵母中心代謝の安定化機構としてトレハロース代謝が関与している可能性が示唆された。

### Targeted proteome analysis of the central metabolism related enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*

○Fumio Matsuda, Atsumi Tomita, Hiroshi Shimizu  
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, targeted proteome analysis, central metabolism, trehalose

## 2P-1p054 抗生物質生産株の新規な固/液界面スクリーニング法

○小田 忍, 林 優佑, 大澤 果穂, 大箸 信一  
(金工大・ゲノム研)  
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】抽出液面固定化システムを基幹とする液/液界面スクリーニングシステム<sup>1)</sup>では, 株によって中空マイクロスフェア層が崩壊する場合があるうえに, 増殖の遅い放線菌へ適用することが困難である。そこで, 難寒天平板/疎水性有機層界面でカビもしくは放線菌を増殖させて脂溶性二次代謝物を有機層中に蓄積させる固/液界面スクリーニング法を考案し, 液面固定化システムとの二次代謝物プロファイルの比較検討と抗生物質生産株のスクリーニングへの適用を図った。

【方法】修正サプロ-寒天平板/ジメチルシリコンオイル (KF-96L-1CS) 界面に増殖するカビが生産する代謝物プロファイルの比較を, 液体培養, 抽出液面固定化との間で HPLC-PDA で行った。同培養系を 6 穴マルチウエルプレートに適用し, 624 株の分離カビについて, *Pichia anomala* NBRC10213 と *Candida utilis* NBRC 0619 に対する抗真菌活性物質の生産能を調べた。

【結果】*Aspergillus niger* NBRC 32074, *Penicillium multicolor* IAM 7153, *Rhizomes oryzae* NBRC 31005, *Nemomic aenea* SF10099-1 の 4 株を寒天平板/シリコンオイルの固/液界面培養系で培養した結果, 液体培養系で水層中に生産・蓄積される代謝物とは大きく異なるプロファイルが得られたが, 抽出液面固定化システムの有機層中に蓄積される代謝物のプロファイルと概ね類似していた。上記の固/液界面培養法を抗真菌物質生産カビのスクリーニング (ペーパーディスク法) に適用したところ, *P. anomala* NBRC 10213 と *C. utilis* NBRC 0619 に対するヒット率は, それぞれ 7.9% と 3.1% であった。なお, 上記固/液界面培養系を放線菌のスクリーニングに適用した結果についても報告する。

<sup>1)</sup> Oda, S., et al., J. Antibiot., 68, 691-697 (2015).

### Novel solid-liquid interface screening system for antibiotic-producing microorganisms

○Shinobu Oda, Yusuke Hayashi, Kaho Oshawa, Shinichi Ohashi  
(Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

**Key words** interface screening system, screening, antibiotics, interface bioreactor

## 2P-1p055 大腸菌を用いたコリスミ酸派生化合物合成プラットフォームの開発

○野田 修平, 白井 智量, 近藤 昭彦  
(理研・環境資源)  
shuhei.noda@riken.jp

持続可能な社会形成のため、石油依存社会から、エネルギーや化成品を再生可能なバイオマス資源に依存したバイオリファイナー社会への変革が求められている。本研究においては特に、「菌体触媒を用いた芳香族化合物合成」に注目した。その中でも特に、芳香族アミノ酸合成経路の中間代謝物であるコリスミ酸を起点とした芳香族化合物合成プラットフォームの開発を目指した。サリチル酸を含む合計7種類の芳香族化合物、そこから派生する有機酸をターゲット化合物として定めた。本研究では、コリスミ酸周りの芳香族化合物合成の最終反応で目的化合物と同時にビルビン酸が生じることに注目し、これら芳香族化合物の合成に最適な代謝デザインを行った。

まず、L-フェニルアラニン生産大腸菌(ATCC31882)に対し、芳香族化合物合成のために重要な化合物であるホスホエノールビルビン酸を蓄積するような代謝改変を行った。続いて、細胞内での主なビルビン酸獲得反応を目的化合物合成時に制限した菌体へと改変した。創製した菌体は、試験管培養、ジャーファーマーターを用いた培養により、各化合物の生産性を評価した。

2-L ジャーファーマーターを用いたサリチル酸生産において、培養 48 時間で 11.5 g/L の生産性を達成し、グルコースからの取率は 40% (mol/mol) であった。他の化合物に関しても、試験管培養 1-3 g/L の生産性を達成した。

### Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce various chorismate derivatives

○Shuhei Noda, Tomokazu Shirai, Kondo Akihiko  
(CSRS, RIKEN)

**Key words** aromatic ring compound, *Escherichia coli*, metabolic engineering

## 2P-1p056 低温菌シンプル触媒におけるアスパラギン酸生産

○羅 宮臨風, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一  
(広島大院・先端物質)  
jun@hiroshima-u.ac.jp

【背景、目的】本研究室では低温菌を利用したシンプル酵素変換触媒の構築を進めている。低温菌は 30℃ 以上で生育不可能な菌であるため、その代謝酵素は中温での加熱により簡単に除去することができる。そのため、中温菌由来の酵素を発現させた低温菌を中温で熱処理することで物質変換に必要な酵素だけが活性を保持したまま細胞内に残される。したがって、酵素を精製することなく低コストで物質変換を行うことが可能である。これまでに低温菌にアスパルターゼを発現させたシンプル酵素触媒により、フマル酸がアスパラギン酸に効率的に変換されることを実現している。本研究では、乳酸を原料としてアスパラギン酸を生産するための低温菌シンプル触媒を目的としている。

【方法、結果】乳酸からアスパラギン酸を作り出すために四つの酵素反応を経由する経路を設計した。放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来のマリックエンザイム(malic enzyme)を低温菌 *Shewanella livingstonensis* に導入したところ、低温菌での発現が確認できなかったため、大腸菌を利用して酵素を発現・精製し、特性化した。マリックエンザイムはリンゴ酸を基質にしてビルビン酸を生成する酵素で、本研究ではその逆反応を利用したいが、精製された酵素を調べた結果、この逆反応の触媒活性が見られなかった。現在、逆反応を触媒できる酵素として、植物及び動物由来のものを候補として低温菌での発現を進めている。

### Aspartic acid production by a psychrophile-based simple biocatalyst

○Gongliefeng Luo, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Katou  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** psychrophile, enzymatic conversion, malic enzyme, aspartic acid

## 2P-1p057 シンプル酵素触媒構築を目指した低温菌における鉄誘導型プロモーターの探索

○土井 和博, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一  
(広島大院・先端物質)  
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】我々は中温菌由来の酵素を発現させた低温菌を利用したシンプル酵素触媒による効率的な変換技術の開発を行っている。本触媒では熱処理により低温菌由来の代謝酵素が失活し、目的産物を生成する中温菌由来の酵素のみが機能するため、基質を目的産物に完全に変換させることが期待できる。この特性を活かすことで中温菌由来の豊富な酵素を利用して自由な反応経路の構築が可能である。本触媒を構築するうえで現在プロモーターとして *tac* を用いている。しかし複数酵素の発現には不十分であるため、より強力なプロモーターの探索が必要である。*Shewanella frigidimarina* は鉄還元細菌であることから、本株には鉄誘導型タンパク質の発現に関わる配列があり、鉄による制御が可能ではないかと考えられる。そこで本研究では *S. frigidimarina* からクエン酸鉄 (III) による制御可能なプロモーターの探索を行った。

【方法および結果】*S. frigidimarina* にクエン酸鉄 (III) を加え、3 日間培養後、生菌数を測定したところ数倍まで増加していた。このことから鉄が増殖に何らかの影響を与えたと考えられる。そこで、クエン酸鉄 (III) を加えることでよりタンパク質の発現が高くなる遺伝子の上流配列がプロモーターとして機能するのではないかと考え、鉄誘導型高発現タンパク質の同定を行った。二次元電気泳動ならびに Nano-LC/MS を用いて同定を行ったところ、ATP synthase subunit  $\alpha$ , GTP cyclohydrolase, Malate dehydrogenase が見いだされた。これらの遺伝子上流配列を pKZ27 に挿入しプロモーター活性評価用プラスミドを構築した。現在、それらの低温菌導入株において  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる活性評価を行っている。

### Exploration of the iron-inducible promoter for the psychrophilic cell based simple biocatalysis

○Kazuhiro Doi, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Katou  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** psychrophile, promoter, iron respiration, simple biocatalysis

## 2P-1p058 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の発酵生産収率向上のための大腸菌の代謝工学的改変

○濱野 雄大<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>, 片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科, <sup>4</sup>長岡技術大, <sup>5</sup>日大・生資科, <sup>6</sup>農工大院・工, <sup>7</sup>森林総合研)  
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】近年、木質系バイオマスを原料とした有用物質の生産が活発になっている。我々は、その中でも特に、新規ポリマーの原料としての利用が期待されている 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)の生産に関する研究に注目した。既往の研究により、バイオマスから取り出すことのできる単糖であるグルコースからの組み換え大腸菌による PDC 発酵生産システムの構築には成功している。しかし、現状の大腸菌株では、PDC の取率が低いという問題点がある。そこで本研究では、さらなる遺伝子組み換えによる大腸菌の代謝工学的改変を行い、PDC の前駆体であるエリスロース-4-リン酸(E4P)とホスホエノールビルビン酸(PEP)への代謝反応の促進を行うことで PDC の効率的な生産を目指した。

【方法および結果】E4P、PEP への代謝反応を促進させる手段としては、それぞれ *tktA*、*ppsA* 遺伝子をターゲットとしてプラスミドベクターによる過剰発現を行った。加えて、PEP に関してはホスホトランスフェラーゼ系(PTS)により大量に消費されることが知られているため、PTS に関する遺伝子の 1 つである、*ptsG* 遺伝子をゲノム DNA から破壊することで、PTS による PEP の消費を抑制した。グルコースを単一炭素源とした最小培地において、*tktA*、*ppsA* 過剰発現株、*ptsG* 破壊株を用いた発酵試験を行ったところ、いずれにおいても PDC 取率は向上し、その中でも特に、*ppsA* を過剰発現し、*ptsG* を破壊した株において最も高い PDC 取率を示した。

### Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid

○Takehiro Hamano<sup>1</sup>, Kazuki Ninomiya<sup>2</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Shinya Kajita<sup>3</sup>, Eiji Masai<sup>4</sup>, Yoshihiro Katayama<sup>5</sup>, Kazuhiro Shikina<sup>6</sup>, Yuichiro Otsuka<sup>7</sup>, Masaya Nakamura<sup>1</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Bio-Appl. Syst. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>5</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>6</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>7</sup>Forestry Forest Products Res. Inst.)

**Key words** metabolic engineering, *Escherichia coli*, 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid

## 2P-1p059 BGL 提示大腸菌に適した代謝改変戦略を用いたセロビオースからのプトレシン生産

○田中 勉, 西川 弘樹, 近藤 昭彦  
(神戸大院・工)  
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

細胞表面工学及び代謝工学は、微生物を用いた物質生産において重要な技術である。微生物の表面にバイオマス分解酵素を提示することで、その微生物に対してバイオマス分解能の付与が可能となる。また、微生物の代謝を改変することで副生成物の生産を抑制し、目的生産物の収量・収率を向上させることができる。

本研究では、プトレシンを目的生産物とし、代謝改変を施すことによりグルコースからの生産量を 15mM にまで向上させた。この代謝改変株に対して BGL を提示させ、セロビオースを炭素源としてプトレシン生産を行った。その結果生産量は 4.6mM であり、グルコースに比べて低くなった。増殖速度はグルコースよりやや遅い程度であり、糖の供給が律速ではないと考えられる。一方で、この BGL 提示株を用いてグルコースからプトレシン生産を行ったところ、BGL を提示していない株と同様の増殖を示したにもかかわらず、その生産量は 4mM 程度と非常に低くなった。これより、細胞表面提示微生物に適した代謝改変が必要であることが示唆された。現在、BGL 提示株において生産量を向上させる代謝改変について検討を進めている。

### Putrescine production from cellobiose using metabolically- and cell surface engineered *E. coli*

○Tsutomu Tanaka, Hiroki Nishikawa, Akihiko Kondo  
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

**Key words** metabolic engineering, cell surface engineering, *Escherichia coli*, biomass

## 2P-1p060 メバロン酸生産大腸菌株の定常期における代謝状態の解明

○増田 亜美, 戸谷 吉博, 徳山 健斗, 坂野 聡美, 吉川 勝徳, 清水 浩  
(阪大院・情報)  
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

### 【背景と目的】

定常期の菌体を用いた物質生産は基質を細胞合成に使用しないため、増殖期に比べ高い生産収率が期待できる。本研究ではメバロン酸生産を定常期で行うことで生産性の向上を試みた。また、定常期を実現する際に制限する基質の違いが、メバロン酸の生産性や代謝状態に及ぼす影響について調べた。

### 【結果】

大腸菌 K-12 MG1655(DE3)株に *Enterococcus faecalis* 由来のメバロン酸合成経路遺伝子を導入した株を使用した。細胞の増殖に必須な栄養源である硫黄、窒素またはマグネシウム源を欠損した合成培地を用いて、定常期でメバロン酸生産株を評価したところ、増殖期に比べメバロン酸の生産性が向上した。中でも硫黄欠損条件下で最も生産性が高く、増殖期では 27%(C-mol/C-mol)であったメバロン酸の炭素収率が 61%(C-mol/C-mol)に向上した。硫黄欠損条件下では鉄-硫黄クラスターを作ることができず、これを必要とする TCA 回路中の複数の酵素が働かないことが知られている。そのため、TCA 回路から放出される CO<sub>2</sub> が減少し、より多くのアセチル CoA がメバロン酸に変換されたと考えられる。また、メバロン酸の合成には補酵素 NADPH が必要であり、この NADPH は中枢代謝で生産される。定常期でメバロン酸収率が向上した要因を明らかにするため、メバロン酸合成に必要な NADPH が中枢代謝経路のどの反応で生産されたか調査した。同位体標識基質を用いて、大腸菌における主な NADPH の生産源であるペントースリン酸経路の流束を計測した結果、ペントースリン酸経路だけでは必要な NADPH が賅っていないことが明らかになり、トランスヒドロゲナーゼ反応により NADPH が賅われていることが予想された。そこで、トランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を欠損したところ、メバロン酸生産性が低下したことから、トランスヒドロゲナーゼが NADPH の供給に寄与していることが示唆された。

### Elucidation of metabolic state of mevalonate producing *Escherichia coli* at stationary phase

○Ami Masuda, Yoshihiro Toya, Kento Tokuyama, Satomi Banno,  
Katsunori Yoshikawa, Hiroshi Shimizu  
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

**Key words** stationary phase, *Escherichia coli*, mevalonic acid, flux analysis

## 2P-1p061 *in silico* 代謝シミュレーションと実験室進化実験の統合によるコハク酸高生産大腸菌の構築

○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 清水 浩  
(阪大院・情報)  
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景と目的】** 微生物による物質生産の高度化に向け、代謝経路全体における物質収支を考慮し、増殖時の代謝状態を予測するシミュレーション技術が開発された。このシミュレーション技術を用いることで、目的物質生産に有効な遺伝子破壊戦略を *in silico* で設計できる。しかし、設計通りに遺伝子破壊を行っても、細胞の代謝状態がすぐに予測した状態に移行せず期待通りの生産性が得られない場合もある。本研究では、増殖運動型のコハク酸生産が期待される遺伝子破壊株をシミュレーション結果に基づいて構築し、更に実験室進化実験を行うことで、遺伝子破壊株の増殖速度向上に伴ってコハク酸生産性を向上させることを目的とした。

**【方法と結果】** 大腸菌のゲノムスケール代謝モデル iAF1260 (1260 遺伝子・2077 反応・1039 代謝物質) を用いて、グリセロールを基質とした増殖運動型コハク酸生産が期待できる多重遺伝子破壊候補を探索したところ、*adhE-pykAF-gldA-pflB* の 5 重遺伝子破壊株は収率 0.26 mol/mol でコハク酸を生産することが予測された。大腸菌 BW25113 株を宿主として予測された 5 遺伝子破壊株を構築し、グリセロールを単一炭素源とした合成培地で培養したところ、コハク酸生産収率は 2.8 倍向上したが、代謝シミュレーションの予測に比べて生産収率と増殖速度は低い値となった。本設計は増殖運動型の生産を戦略としているため、継代培養により増殖速度の向上した菌株を獲得し、適応的に代謝状態を予測状態に近づけることで、コハク酸収率を向上させることを試みた。構築した遺伝子破壊株において、試験管での継代培養実験を独立に 5 系列行ったところ、全ての系列において 100 世代目の進化株は進化前の遺伝子破壊株に比べて増殖速度が 2.5 倍以上に向上した。最も生産性の高い進化株では、進化前に比べてコハク酸収率は 4.3 倍向上し、0.25 mol/mol に達した。

### Adaptive laboratory evolution for *in silico* designed succinate producing *Escherichia coli*

○Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu  
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, metabolic simulation, evolutionary engineering, succinate

## 2P-1p062 イソプロパノール生産向上のための代謝システムの数理解析

○藤田 純孝<sup>1</sup>, 濱田 浩幸<sup>2</sup>, 岡本 正宏<sup>2</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>大院・生資環, <sup>2</sup>大院・農)  
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

**【背景と目的】** 当研究室は、遺伝子組み換え大腸菌の発酵機能を応用し、グルコースを出発原料としてイソプロパノール (IPA) を生産することに成功した。次に、発酵法による IPA 生産能を高めるため、IPA 生産経路内の律速段階の活性化や競合経路を抑制する方策を探っている。IPA 生産は還元力を必要とし、物質生産と細胞増殖の間で同化代謝と炭素源に関わる競合を呈する特徴がある。このような特徴を有するシステムの代謝改変候補の探索では、システム同定、システム解析、システム制御などの数理解析の適用が有効となる。そこで、本研究では、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸経路からなる系 (異化代謝) に酸化還元バランスと同化代謝を統合した新規数理モデル (提案モデル) を構築し、IPA 生産速度を増強する代謝改変候補の探索を実践した。

**【方法】** IPA 生産大腸菌を最小培地で培養し、経時的に代謝物濃度を測定した。この実験データをもとに、代謝シミュレーション用のソフトウェアである WinBEST-KIT を用いて速度式を立式し、パラメータを調整後、シミュレーションおよび感度解析に供した。

**【結果と考察】** 感度解析の結果、提案モデルを用いた数理解析は従来のモデルでは推定されなかった代謝改変候補を提案した。酸化還元バランスと同化代謝の考慮は物質生産の制御系の検証にも有用であると考えられた。

### Mathematical analysis of metabolic systems for enhancing isopropanol production

○Sumitaka Fujita<sup>1</sup>, Hiroyuki Hamada<sup>2</sup>, Masahiro Okamoto<sup>2</sup>, Taizo Hanai<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** kinetic modeling, valuable chemicals production, *Escherichia coli*, redox balance

## 2P-1p063 糖代謝系遺伝子の破壊による *Citrobacter freundii* IFO13545 のバイオ凝集剤生産の改善

○柏 雅美<sup>1</sup>, 宮本 弘毅<sup>1</sup>, 池本 啓史<sup>1</sup>, 木村 和幸<sup>2</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>兵庫県大院・工,<sup>2</sup>(株)兵庫分析センター)  
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

バイオ凝集剤は、現在普及している化学系凝集剤に比べ、環境低負荷であるが生産コストが高いために普及していない。*Citrobacter freundii* IFO13545 株は、酢酸からキトサン様バイオ凝集剤を生産するが、その生産コスト低減を目的とし、遺伝子破壊による高生産株の育種や安価な有機基質利用株の育種を行っている。本凝集剤はアミノ多糖であるため、酢酸を炭素源とした場合、糖新生からアミノ糖合成経路を経由する。そこで、本研究では、それらの経路への炭素フローの増加や逆流防止のため、解糖系 (EMP 経路、PP 経路) の遮断やアミノ糖から EMP 経路への流入遮断など、主に遺伝子破壊による凝集剤の高生産化の可能性を検討した。

既に *Citrobacter* 属細菌で確立した相同組換えによる遺伝子破壊法を用いて、IFO13545 株の 3 つ遺伝子 (フォスフォフルクトキナーゼ遺伝子、グルコサミン 6-リン酸デアミナーゼ遺伝子、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子) を破壊し、PCR 並びにサザンハイブリダイゼーションにより破壊を確認した。これらの遺伝子を単独、二重あるいは三重に破壊した遺伝子破壊株を構築し、酢酸を単一炭素源とする無機塩培地でそれらを培養し (30℃, 150 rpm)、その培養上清の凝集力価をカオリン懸濁法により評価した。その結果、単独の遺伝子破壊では顕著な凝集力価の上昇はなかったが、二重破壊株で野生株の数倍、さらに三重破壊株でその約 1.4 倍の凝集力価の上昇が確認でき、これらの遺伝子破壊が凝集剤の高生産に有効であることが示唆された。

### Improved production of biofloculant by disruption of genes related to sugar metabolism in *Citrobacter freundii* IFO13545

○Masami Kashiwa<sup>1</sup>, Koki Miyamoto<sup>1</sup>, Keisi Ikemoto<sup>1</sup>, Kazuyuki Kimura<sup>2</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup>, Masahiro Takeo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>Hyogo Analysis Center Co. Ltd.)

**Key words** biofloculant, chitosan-like biopolymer, gene disruption, *Citrobacter freundii*

## 2P-1p064 *Synechocystis* sp.PCC 6803 の暗・嫌気条件でのカリウムイオン添加による有機酸生産への影響

○川村 優樹, 上田 紗季子, 小山内 崇  
(明治大・農)  
tosanai@meiji.ac.jp

カリウムはシアノバクテリアを含む全ての生物に必須な栄養素とされている。また、シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行うバクテリアで基礎から応用までの広い範囲での研究が行われている微生物である。中でも *Synechocystis* sp.PCC 6803 の主な代謝は外部環境の状態によって変化し、暗・嫌気条件で有機酸・水素を生成する。今回はカリウムイオンがこの *Synechocystis* sp.PCC 6803 の主要な代謝を大きく変化させることを発表する。

### Counteraction effect of potassium metabolite biosynthesis ,in *Synechocystis* sp.PCC 6803

○Yuhki Kawamura, Sakiko Ueda, Takashi Osanai  
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

**Key words** *Synechocystis*

## 2P-1p065 出芽酵母の *PHO13* 欠損はアセトアルデヒド耐性を強化する

○高木 哲史, 早川 享志, 中川 智行  
(岐阜大・応生科)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

### 【目的】

アセトアルデヒド (AA) は出芽酵母のアルコール発酵時における重要な代謝中間体であるが、他の生体因子と結合してその機能を阻害する毒性化学物質として知られている。このため、代謝抑制因子である AA への耐性を強化することは、酵母の分子育種としての課題である。我々はこれまでに、NADPH を消費/供給する代謝系と、それを制御する因子が AA 耐性に重要であることを報告してきた。特に転写因子 Stb5p は、AA ストレス下で NADPH の供給源であるペントースリン酸経路 (PPP) を活性化させ、NADPH の生産を促すため AA 耐性における鍵因子である<sup>1)</sup>。しかし、Stb5p のみでは AA 耐性の制御機構を十分に説明することはできず、多様な因子によって複雑に制御されていることが推察される。本研究では、酵母の AA 耐性機構の制御に関与する他の因子の同定と、その機能解明を目的とした。

### 【方法・結果】

出芽酵母の一遺伝子欠損株ライブラリより *STB5* の欠損株を、また遺伝子網引き法を用いた *STB5* の過剰発現株を、細胞外部からの AA ストレス試験に供した。*STB5* の欠損は AA に強い感受性を示した一方で、過剰発現によって野生株よりも生育が改善することはなかった。一方、*PHO13* はその欠損により酵母のキシロース代謝系を活性化し、Stb5p の発現量を増大させる因子として、近年報告されている<sup>2)</sup>。そこで同遺伝子の一遺伝子欠損株を用いて、AA ストレス下における生育を観察したところ、野生株と比較して顕著な AA 耐性を示した。これらのことから、AA 耐性に *STB5* は必須の因子であるものの、量的依存ではないことが推察された。さらに、*PHO13* は AA 耐性機構を抑制している因子であり、AA 耐性に重要とされる NADPH 生産系への関与が示唆された。

1) Matsufuji *et al.* (2010) *J Basic Microbiol*, 50: 494-498

2) Kim *et al.* (2015) *Appl Environ Microbiol*, 81:1601-1609

### Deletion of *PHO13* in the budding yeast enhances acetaldehyde tolerance

○Tetsushi Takagi, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, acetaldehyde, Stb5p, Pho13p

## 2P-1p066 Thiamine: an important factor for acetaldehyde tolerance in the budding yeast

○Annisya Zarina Putri, Nodoka Kubota, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

【Introduction】 The budding yeast is one of the most popular microorganisms, which are widely used in several industries, such as alcohol fermentation and breadmaking. During these fermentation processes, the budding yeast synthesizes a large amount of acetaldehyde as an important intermediate in the cell. Since acetaldehyde is highly toxic compounds, the yeast needs to take care for its toxicity during fermentation step. In a previous study, Aranda and del Olmo reported that some genes, which participate in the vitamin B<sub>1</sub> (thiamine) biosynthesis, were up-regulated under acetaldehyde stress<sup>1)</sup>. Therefore, we think that thiamine may be one of the most important factors for the acetaldehyde tolerance system in the yeast. In this study, we investigated some physiological roles of thiamine for acetaldehyde tolerance in the budding yeast.

【Results & discussion】 Based on increasing of thiamine concentrations in the medium, acetaldehyde sensitivity of the yeast was recovered up to 12 μM thiamine supplementation. On the other hand, it is known that the yeast cell uptake thiamine from outside of the cell, using thiamine transporter Thi7 and Thi72. Strain *thi7Δ* showed acetaldehyde sensitivity compared with the wild type strain, although strain *thi72Δ* showed same phenotype. These facts brought us to a conclusion that the budding yeast requires thiamine under acetaldehyde stress, and thiamine has some physiological roles for acetaldehyde tolerance system in the budding yeast.

1) Aranda & del Olmo (2004) *AEM*, 70: 1913.

### Thiamine: an important factor for acetaldehyde tolerance in the budding yeast

○Annisya Zarina Putri, Nodoka Kubota, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, acetaldehyde, thiamine, Thi7

## 2P-1p067 *Pichia methanolica* グルコース抑制解除株を用いた AOD アイソザイムの発現制御機構の解析

○土井 遼平, 蓮實 涼子, 早川 享志, 中川 智行  
(岐阜大・応生科)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

### 【目的】

メチロトロフ酵母 *P. methanolica* はメタノール酸化酵素 (AOD) をコードする遺伝子を 2 コピー (*MOD1* と *MOD2*) 持ち、*MOD1* と *MOD2* がメタノールにより強力に誘導されることから、*P. pastoris* などとともに異種遺伝子発現系に広く利用されている産業用酵母である。一方、我々は AOD の発現制御の重要な要素は「メタノール誘導」と「グルコース抑制」の 2 要因であると考えてきた。AOD はグルコースが存在する場合、グルコース抑制が働き、その発現は観察されない。また、キシロースやグリセロールといった炭素源で生育した場合、AOD は一部誘導される。我々は、AOD がキシロース等の炭素源で誘導されるのは「これら炭素源で抑制がかからない」だけであり、「誘導されている」のではないと考えてきた。今回は AOD 発現制御の詳細を探るため、*P. methanolica* のグルコース抑制解除株を獲得し、そのメタノール応答について観察した。

### 【結果・考察】

*P. methanolica* の 2-DG 非感受性変異株を選抜し、グルコース抑制解除株 (RH3 株) とした。野生株はグルコース+メタノール培地に生育した場合、AOD 活性を示さなかったが、RH3 株はメタノール生育細胞と同等の AOD 活性を示し、9 種の AOD アイソザイムの誘導が観察された。一方、RH3 株は炭素源がグルコースのみの培地において *Mod1p* のみ誘導したものの、ほとんど AOD 活性を示さなかった。これまでメチロトロフ酵母の AOD の発現制御はグルコース抑制によって調整されると考えられていたため、グルコース抑制が解除された株ではメタノールが存在しなくても AOD 発現が観察されると予想していたが、グルコースのみでは AOD を誘導しなかった。つまり、キシロース等による AOD の発現はグルコース抑制がかからないのではなく、炭素源によって AOD の発現が誘導されている可能性を示している。

### Induction analysis of AOD isozymes using glucose de-repressed mutants of *Pichia methanolica*

○Ryohei Doi, Ryoko Hasumi, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** *Pichia methanolica*, alcohol oxidase, AOD isozymes, glucose repression

## 2P-1p068 イソブタノール生産酵母の構築：オルガネラ局在の検討

○森田 啓介<sup>1</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>, 伊田 賢吾<sup>2</sup>, 石井 純<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>3</sup>, 清水 浩<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・情報, <sup>2</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>3</sup>神戸大院・工)  
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の物質生産能向上に向けた代謝変化が試みられているが、細胞小器官による反応の区画化、副産物の生成等の種々の課題が存在する。本研究ではイソブタノール生産株の構築を目指し、遺伝子操作と代謝シミュレーションを組み合わせて前述の課題解決を試みた。

【方法】酵母のゲノムスケール代謝モデル (iMM904) を用いて、フラックスバランス解析に基づく代謝シミュレーションを実施した。*S. cerevisiae* YPH499 株およびピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) 欠損変異株に酢酸リチウム法でベクターを導入し形質転換体を得た。株のイソブタノール発酵能評価は 5 mL の 20 g/L グルコース SD 培地を用い、培養開始から 2 日目の培液をガスクロマトグラフィーで測定した。

【結果】イソブタノールはピルビン酸から 5 反応で生成し、酵母では前半 3 反応がミトコンドリアに存在している。PDC を欠損させたモデル iMM904 での代謝シミュレーションでは、後半 2 反応を細胞質に追加した場合イソブタノールの理論最大収率は 28% となったが、5 反応全てを細胞質かミトコンドリアに局在化すると収率を 54% と 86% まで増加できることを見出した。後半 2 反応を触媒する代謝酵素を細胞質で発現させた *S. cerevisiae* YPH499 株のイソブタノール生産収率は 0.9% と低く経路の活性化の必要性が示唆されたが、この株の細胞質にさらに前半 3 反応の代謝酵素を発現した株では収率が 1.3% に向上した。さらに PDC 欠損株に同経路を導入した株では収率が 2.9% となった。一方で後半 2 反応の代謝酵素をミトコンドリアで発現した株では収率が 2.2% となった。ミトコンドリアでのイソブタノール生産にはピルビン酸の供給が重要であると考え、ピルビン酸輸送タンパクをコードする *MPC1* 欠損株を培養した。その結果イソブタノール生産収率は 1/5 に減少し、輸送タンパクの重要性が示唆された。

### Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for isobutanol production: pathway localization in organelle

○Keisuke Morita<sup>1</sup>, Fumio Matsuda<sup>1</sup>, Kengo Ida<sup>2</sup>, Jun Ishii<sup>2</sup>, Akihiko Kondo<sup>3</sup>, Hiroshi Shimizu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. IST, Osaka Univ., <sup>2</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, isobutanol, metabolic engineering, mitochondria

## 2P-1p069 純米酒中の $\alpha$ -EG 生産の研究

○橋本 弓加<sup>1</sup>, 徳田 耕二<sup>2</sup>, 尾関 健二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金工大・ゲノム研, <sup>2</sup>車多酒造)  
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】これまでに清酒仕込では 3%、焼酎仕込および酒粕再発酵仕込では 2% を超える  $\alpha$ -EG を発酵時に製造可能であった。また  $\alpha$ -EG には、従来報告されている UV 照射による角質細胞の角化のバランスを取る荒れ肌改善効果以外に、皮膚表面の水分蒸発を抑制する速効性の保湿効果や真皮層にある線維芽細胞の細胞賦活化作用に伴う、コラーゲン生産量を増やす新規の保湿効果を報告した。また石川県産の清酒中の  $\alpha$ -EG 含量が、灘・伏見の大手ブランドの清酒より含量が多い報告をしており、今回サンプル数を増やし、純米酒製造時の  $\alpha$ -EG 量を比較し、その含量の違いは何に起因しているかを仕込み方法から解明することを目的とする。

【方法】石川県産の純米酒 14 点 (精米歩合 60-65%) と灘・伏見の大手ブランド 18 点 (精米歩合 70%) の  $\alpha$ -EG 含量の分析を HPLC により行った。また山廃酒母、速醸酒母と各酒母を用いた醪中の  $\alpha$ -EG の製造効率を比較した。その分析結果を受け速醸酒母の有無による総米 45g の小仕込を実施し、 $\alpha$ -EG の生産効率、純米酒中に残存するアミラーゼ系酵素活性を比較した。

【結果および考察】石川県産の純米酒の方が灘・伏見の大手ブランドのそれより 1.4 倍  $\alpha$ -EG を含有していることが分かった。山廃酒母と速醸酒母を比較すると、発酵日数は山廃酒母が長くなるが  $\alpha$ -EG 含量は少なくなる傾向であった。これらの酒母を用いた純米酒醪中の  $\alpha$ -EG 含量はほぼ同量で 0.9-1.0% と高くなること分かった。酒母の有無による純米酒の小仕込では酒母がある醪で  $\alpha$ -EG 量は 1.2% であり、酒母がない醪で 0.9% となり、酒母を立てる仕込が  $\alpha$ -EG を高める仕込方であることが分かった。それ以外の原因として純米酒中に残存するアミラーゼ系酵素バランスの違いについても報告する。

### Study of alfa-EG production in Junmai-shu

○Yumika Hashimoto<sup>1</sup>, Koji Tokuda<sup>2</sup>, Kenji Ozeki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., <sup>2</sup>Shata Syuzo)

**Key words** Junmai-shu, alfa-EG

## 2P-1p070 ビール醸造における各種糖質添加の影響

○木本 裕, 山根 健司, 藤本 佳則, 小川 浩一  
(日本食品化工・研究所)  
yutaka.kimoto@nissshoku.co.jp

【目的】ビール中の各種糖質の含有量・組成は、その香味や物理化学的性質を左右することが知られている。一方で、いわゆる発泡酒や新ジャンルと言われるビール系飲料では、副原料として様々な糖質が使用されている。これら糖質の使用が発酵経過、あるいはビール品質にどのような影響を及ぼすのか確認することを目的として、以下の検討を行った。

【方法及び結果】下面発酵酵母 (W-34/70) を用いて、各種糖質標品の発酵性について検討した。また麦芽に加えて、これら糖質あるいは水飴を原料として発酵前液を調整し、試醸評価を行った。一般的な発酵性糖 (フラクトース、グルコース、スクロース、マルトース) をそれぞれ原料の 3 分の 1 弱用いた結果、発酵経過や発酵後の糖組成に明確な違いは認められなかったものの、香味特徴は異なり、フラクトースではフルーティーさ、グルコースでは強い硫黄臭、マルトースでは麦芽感やコクが指摘され、スクロースはフラクトースとグルコースの中間的な特徴を示した。また、マルトースを主成分とする水飴を原料の 3 分の 2 程度使用し、その一部を非発酵性糖であるイソマルトース、パノース、ニゲロース、ゲンチオピオースを含む水飴にそれぞれ置換したところ、発酵後のエキス分は使用した水飴の組成に応じて増加し、各々に特徴的な香味を示した。発酵前液に含まれる発酵性糖および非発酵性糖について、その組成を調整することで、発酵後のビールあるいはビール系飲料の香味特徴を一定程度制御可能であることが示された。

### The effects of various sugars added in beer brewing

○Yutaka Kimoto, Kenji Yamane, Yoshinori Fujimoto, Koichi Ogawa  
(Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)

**Key words** beer, fermentable sugar, non-fermentable sugar, sulphury flavour

## 2P-1p071 LC/MSによる非ラベル化遊離アミノ酸分析法の確立と清酒酵母の系統によるアミノ酸取込の違い

○清野 珠美, 廣岡 青史  
(京都市産技研)  
kiyono@tc-kyoto.or.jp

【背景・目的】弊所ではこれまでGCによるクロロギ酸エステル化法を用いたアミノ酸分析を行っていたが、この方法にはアルギニンが検出できないという欠点があった。近年、単純な溶媒条件で、アミノ酸を誘導体化(ラベル化)せずに分離できるLC/MS専用カラムが登場した。そこで、(1)この非ラベル化アミノ酸分離カラムと弊所所有のLC/MSを用いて、遊離アミノ酸の迅速分析法を確立するため、条件検討を行った。(2)次に、この分析方法を利用して、異なる系統の清酒酵母によるアミノ酸取込の違いを調べた。

【方法】(1) LC/MSはACQUITY TQD (Waters)を、カラムはIntrada amino acid (Imtakt)を使用し、0.1%ギ酸-80%アセトニトリルと100 mMギ酸アンモニウム-20%アセトニトリルの2液によるグラジエント溶出により、各アミノ酸を分離させた。検出は、多重反応モニタリング(MRM)モードで行った。分析試料は0.1%ギ酸で適宜希釈し、0.45 μm フィルターを通過後、分析に供した。内部標準には、市販の安定同位体アミノ酸混合溶液を使用した。(2)協会酵母701号と901号を麹汁培地にて一定期間培養し、培養前後の培地中のアミノ酸分析を行い、比較した。

【結果】(1)確立した分析条件により、1試料20分でアルギニンを含む天然アミノ酸20種類を分析することが可能となった。内部標準による補正を行うことで、1-100 μMの濃度幅で良好な検量線を作成することができた。(2)一部のアミノ酸において、701号よりも901号の方が培養前後の濃度が大きく減少しており、この2種類の清酒酵母のアミノ酸取込能力が異なる可能性が示唆された。

### LC/MS analysis of amino acids without labeling and differences of amino acid intake of sake yeast

○Tamami Kiyono, Kiyoo Hirooka  
(Kyoto Municipal Inst.)

**Key words** LC/MS, amino acid, sake yeast

## 2P-1p072 難消化性澱粉分解活性を有する酵素の高温登熟障害米消化能について

○伊藤 俊彦, 野口 巧実, 大友 敬太郎, 大阪 朝美, 藤田 直子, 橋爪 克己  
(秋田県立大・生資科)  
toito@akita-pu.ac.jp

【目的】澱粉合成酵素及び澱粉分枝酵素のアイソザイム SSIIIa, BEIIb の二重欠損変異体米 (ΔSSIIIa/BEIIb) (以下#4019 と表記) は、アミロース含量 46% の超高アミロース米であり、難消化性を示す。演者らはこれまでに#4019 を基質に用いた難消化性澱粉分解酵素活性測定法を構築し、焼酎用白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) が生産する耐酸性グルコアミラーゼに高い活性を認めた。一方、イネの登熟期気温が高くなるとアミロペクチン側鎖の中鎖と長鎖が増加するとの報告がある。本研究で用いている#4019 のアミロペクチン鎖長分布も中鎖及び長鎖比率が高いことから、白麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素は高温登熟障害米の消化を促進する働きが有ると考えられる。そこで、2010 年産秋田酒こまちを高温登熟障害米試料とした醸造環境下における消化試験を行った。

【方法・結果】秋田酒こまち (50% 精米) と、焼酎用白麹菌を用いて製麹した麹に 10 mM 酢酸緩衝液を 5 倍量加えて酵素を抽出した。その後#4019 分解活性を有する酵素を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにて SDS-PAGE 上で単一となるまで精製した。次に、精製酵素を用いて、同一の水田から収穫した年度の異なる 70% 精米秋田酒こまち (2010, 2011, 2013 年産) を基質とした消化試験をした。対照には酒造用グルコアミラーゼ「アマノ」SD (天野エンザイム) を陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したのを用いた。その結果、酒造用グルコアミラーゼと比較して、#4019 分解活性を有する酵素は高温登熟障害米の澱粉を効率よく分解出来ることが示された。

### Ability of glucoamylase from *Aspergillus kawachii* in digestion of the high temperature matured rice that contain resistant starch.

○Toshihiko Ito, Takumi Noguchi, Keitaro Otomo, Tomomi Osaka, Naoko Fujita, Katsumi Hashizume  
(Dept. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ.)

**Key words** *Aspergillus kawachii*, high amylose content rice

## 2P-1p073 GC×GC-TOFMS で取得した揮発性成分プロファイルと清酒の「押し味」の相関解析

○玉田 佳大<sup>1</sup>, 西村 泰央<sup>2</sup>, 大東 功承<sup>1</sup>, 西本 遼<sup>1</sup>, 浅井 拓也<sup>1</sup>, 山下 伸雄<sup>1</sup>, 明石 貴裕<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>白鶴酒造, <sup>2</sup>LECO ジャパン)  
akashi@hakutsuru.co.jp

【背景と目的】「押し味」とは後味にごく味があってしっかりした感じの味わいのことであり、灘酒の特長とされる味わいの一つである。我々は、基本的な醸造方法や一般分析値がほぼ同一の製成酒であっても、「押し味」の強度に違いが見られることを経験的に把握している。こうした物質の違いに関連する成分が把握できれば、おいしさの追求や品質管理に有用であると期待される。これまで我々は、揮発性成分のプロファイルと「押し味」の相関解析を行ってきたが、明瞭な相関を見出すことはできなかった。そこで本研究では、GC×GC-TOFMS を用いた揮発性成分のノンターゲット分析により、揮発性成分プロファイルと「押し味」の相関解析を試みたので報告する。

【方法と結果】基本的な醸造方法や一般分析値がほぼ同一であるが「押し味」の強度に違いがある清酒サンプル 9 点を用いた。各サンプルに含まれる揮発性成分を濃縮後、固相抽出し、GC×GC-TOFMS に供した (n=3)。その結果、1686 ピークが検出され、FR 値 (検体間分散値/検体内分散比) を指標としてサンプル間の違いを評価するの有用と考えられる 121 ピークを抽出した。これら 121 ピークの分析値を説明変数、「押し味」の強度を目的変数とした PLS 回帰分析を行った。その結果、モデルの予測性能の指標である Q<sup>2</sup> 値が 0.947 となり、揮発性成分の分析値を用いた場合 (Q<sup>2</sup> 値: 0.640) と比較して高い精度のモデルが構築できた。さらに、「押し味」の強度と相関の高い成分が複数抽出可能であった。1) 灘酒研究会編「改定 灘の酒用語集」(1997)

### Correlational analysis of volatile components profiles obtained by GC×GC-TOFMS and sake taste "oshiji"

○Yoshihiro Tamada<sup>1</sup>, Yasuhisa Nishimura<sup>2</sup>, Koushou Oohigashi<sup>1</sup>, Haruka Nishimoto<sup>1</sup>, Takuya Asai<sup>1</sup>, Nobuo Yamashita<sup>1</sup>, Takahiro Akashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., <sup>2</sup>LECO Japan Corporation)

**Key words** sake, two-dimensional gas chromatography, PLS

## 2P-1p074 清酒メタボロームへの原料米品種、精米歩合、酵母菌株の影響

小里 孟<sup>1,2</sup>, 梅尾 美幸<sup>1</sup>, 平田 章悟<sup>1,2</sup>, 矢澤 彌<sup>1</sup>, 織田 健<sup>1</sup>,  
○岩下 和裕<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>酒総研, 広島大院・先端物質)  
iwashitact@nrib.go.jp

【目的】清酒中には 300 種類を超える成分が報告され、メタボロームそのものである事から当グループでも醸造酒メタボローム分析法を開発し解析を進めている。これまでに市販清酒の解析から、精米歩合と清酒メタボロームの大きな相関が見られたが、一般の清酒製造では、精米歩合が異なると製麹方法や使用酵母、発酵温度など精米歩合と連動して変化する醸造条件が多数存在する。そこで小仕込みを行って掛米精米歩合、酵母菌株などについて検討を行ってきた。今回、精米歩合の異なる米麹を製し小仕込みを行い、これまでの条件と合わせて解析を行ったので報告する。

【方法・結果】原料米は山田錦と日本晴の 2 種類で 40, 50, 60, 70% 精米とし、麹菌 RIBOIS01 株を用いて定法に従い恒温恒湿器により同条件で製麹を行った。出麹歩合は 120% とほぼ均一で、各種酵素活性を測定した後、K 7、K1801 株の 2 種類の酵母菌株を使用し小仕込みを行ない、15℃ で 20 日間発酵を行った。その後、一般成分分析、メタボローム解析を行い、以前に取得していた市販清酒および掛米の精米歩合を変えた小仕込み清酒と比較を行った。その結果、市販清酒で精米歩合との相関が見られた成分ピーク 267 個の内、掛米だけの精米歩合と相関が見られたピークが 126 個、麹米を含めた場合 146 個のピークと相関が見られ、100 個のピークが両条件で相関を示した。また、酵母菌株に相関が見られたピークは、掛米・総米それぞれ 338 個、291 個であった。しかし、原料米との相関が見られたピークについては、掛米・総米がそれぞれ 49 個と 182 個で麹米の影響が大きくなった。以上の結果から、麹米は精米歩合の違いよりも原料米品種の違いに大きな影響を与える事が明らかになった。

### Effect of rice cultivar, polishing ratio and yeast strain on sake metabolites

Hajime Kozato<sup>1,2</sup>, Miyuki Umeo<sup>1</sup>, Shogo Hirata<sup>1,2</sup>, Hisashi Yazawa<sup>1</sup>, Ken Oda<sup>1</sup>,  
○Kazuhiro Iwashita<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>NRIB, <sup>2</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** metabolome, sake, fermentation process

## 2P-1p075 日本酒の醸造における酵母のメタボロームデータを利用した発酵呼吸状態の推定

○藤丸 裕貴, 門脇 真史, 佐藤 友哉, 田口 誠我, Jannatul Ferdouse, 澤田 和敬, 北垣 浩志  
(佐賀大・農)  
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

### <背景・目的>

酸素濃度は微生物の生理状態に多大な影響を及ぼすことから、発酵産業における微生物による物質の発酵生産には酸素濃度が極めて重要な意義を持つ。しかし酸素濃度の測定には煩雑な操作、測定物の量が必要なことから、特に微小環境や局所的な酸素濃度を測定することは現在の科学技術ではできないと言っており、実際の発酵物は不均一であり、局所的な酸素濃度が重要である場合が多いにもかかわらず、そうした情報にアクセスできていない。以前の実験によりメタボローム解析を利用して酸素濃度を局所的に、かつ高い精度で推定できる可能性が示唆され、今回は実用的な手法の開発を試みた。

### <実験方法>

清酒酵母 RAK1536(K7AHis3 株)を用い、YPD10%glucose で流動パラフィンを添加して静置培養、YPG3%glycerol で振盪培養を行い、完全発酵型、完全呼吸型の酵母を用意し、それらを嫌氣的条件下で培養して次第に発酵的に移行させた。これらの細胞から親水性代謝物を抽出、誘導体化後 GC-FID で分析した。得られた代謝物データで PCA と PLS 回帰分析を行った。

### <結果・考察>

GC-FID で検出された 35 個の代謝物データを用いて PCA を行ったところ、第二主成分 (寄与率 20.2%) で完全発酵型と完全呼吸型が分離された。35 成分の内、PC2 において因子負荷量の大きかった 1 つを目的変数、残りを説明変数として PLS 回帰分析を行った。一つの潜在変数  $t$  が仮定され、完全発酵型 ( $t=0$ ) と完全呼吸型 ( $t=2$ ) を分離し、 $R^2$  値 85.3%、 $Q^2$  値 75.6% という安定した回帰式が得られた。そこで、実際に小仕込試験を行い、もろみから回収した酵母の代謝物データを作成した PLS 回帰式に当てはめられたところ、発酵型に近い ( $t=0.2\sim 0.4$ ) と判別された。今回得られた PLS 回帰式を用いることで発酵型、呼吸型酵母の判別をできることが期待される結果となった。

### The trial to estimate the redox state of yeasts using metabolome data

○Yuki Fujimaru, Masafumi Kadowaki, Tomoya Satou, Seiga Taguchi, Ferdouse Jannatul, Kazuataka Sawada, Hiroshi Kitagaki  
(Fac. Agric., Saga Univ.)

**Key words** Metabolome, PLS, PCA, GC-FID

## 2P-1p076 醤油の特徴香成分である 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone の生合成に関わる酵素遺伝子の同定

上原 健二, ○渡部 潤, 茂木 喜信, 月岡 祐一郎  
(ヤマサ醤油)  
j.watanabe@yamasa.com

**<背景と目的>** 甘いキャラメル様の香気を有する 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) は醤油の特徴香成分の 1 つであり、その強い抗酸化活性や抗腫瘍活性から機能性成分としても注目されている。我々は醤油中における同成分の強化を最終目的とし、これまでに発酵酵母非必須遺伝子破壊株コレクションから HEMF 高生産株のスクリーニングに成功している。しかし、HEMF 生合成に関与する酵素遺伝子や、HEMF の前駆体等についての全容は明らかになっておらず、HEMF 高生産を検討する上で障害となっていた。

**<方法>** イチゴ由来の 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF)/HEMF 生合成酵素のホモログを発酵酵母ゲノムデータベースから検索した。また、発酵酵母の無細胞抽出液から、HEMF 合成活性を指標として HEMF 生合成酵素を半精製し、ペプチドマスマスフィンガープリンティングにより酵素遺伝子を同定した。同定した酵素遺伝子を大腸菌で発現させ、翻訳産物である酵素を精製した。

**<結果と考察>** データベース検索及び HEMF 合成活性を指標とした精製から、発酵酵母の *YNL134C* が候補遺伝子として同定された。大腸菌で発現させた *YNL134C* 翻訳産物は、リボースとグリシンの加熱混合物とアセトアルデヒドから NADPH 依存的に HEMF を生合成した。 *YNL134C* 破壊株及び高発現株の HEMF 生産性は、それぞれ低下及び上昇したことから、 *YNL134C* 翻訳産物が HEMF 生合成に関わる酵素であると結論付けた。さらに、様々な検討から、(2E)-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (EDHMF) が HEMF の前駆体であることを確認した。以上の結果を総合すると、リボースとグリシンの加熱混合物とアセトアルデヒドから EDHMF が化学的に生成され、さらに EDHMF が *YNL134C* 翻訳産物が NADPH 依存的に還元することで HEMF が生成されると考えられた。

### Identification of an enzyme involved in the biosynthesis of HEMF in yeast

Kenji Uehara, ○Jun Watanabe, Yoshinobu Mogi, Yuichiro Tsukioka  
(Yamasa Corp.)

**Key words** HEMF, soy sauce, yeast, *YNL134C*

## 2P-1p077 様々な醸造食品に含まれるグリコシルセラミド量の測定

○阪本 真由子, 宮川 幸, 松永 陽香, 酒谷 真以, 藤川 彩美, 北垣 浩志  
(佐賀大・農)  
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

**<目的・背景>** 麹は日本で千年以上の食経験がある日本独自の食材であり、日本酒や味噌など多くの発酵食品の基盤である。我々は麹にはグリコシルセラミド (GC) が一般の食品と比べて多量に (0.2-3.0 mg/g 乾燥重量) 含まれていることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。GC には肌への塗布や経口摂取によって保湿効果をもたらすとの報告がある。また経口摂取による大腸がんの予防効果が報告されるなど、近年様々な機能性があることがわかってきている。しかし日本の醸造食品に含まれる GC の報告はなかった。そこで日本の醸造食品の機能性解明につなげることを目的とし、麹を原料とする醸造食品中の GC 量を測定した。そして醸造食品から日本人が摂取する GC が、食事全体の内どれ程の割合を占めているかを推定することとした。

**<実験方法>** 醸造食品から抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーにて分離し、染色した。染色した脂質を画像解析ソフトにて解析し GC の定量を行った。

**<結果・考察>** 味噌からは 18 $\mu$ g/g、塩麹からは 197 $\mu$ g/g、甘酒からは 20 $\mu$ g/mL の GC が確認された。一方、肉には平均 5.4 $\mu$ g/g、野菜には平均 0.64 $\mu$ g/g の GC が含まれていることが報告されている<sup>2,3)</sup>。これらのことから日本伝統の醸造食品には動物・植物由来食品と比較して多くの GC が含まれていると考えられた。日本人の食事に含まれる GC 量は 8.1-38.9mg/meal<sup>4)</sup> という報告があることから、日本人の GC 摂取に伝統的醸造食品が大きく貢献していると考えられた。これらを踏まえて日本の醸造食品の機能性について考察したい。

- 1) Takahashi et al., J. Oleo Sci., 63, 1, 15-23 (2014)
- 2) Sawada et al., Appl. Environ. Microbiol., 81(11):3688-98 (2015)
- 3) 菅原達也 日本栄養・食糧学会誌 第 66 巻第 4 号 177-183 (2013)
- 4) Yunoki et al. Biosci. Biochem., 72(1), 222-225, 2008

### Quantitation of glycosylceramide in Japanese fermented foods

○Mayuko Sakamoto, Miyuki Miyagawa, Haruka Matsunaga, Mai Sakatani, Ayami Fujikawa, Hiroshi Kitagaki  
(Fac. Agric., Saga Univ.)

**Key words** glycosylceramide, *Koji*

## 2P-1p078 *Zymomonas mobilis* を用いたホエーを原料とするエタノール発酵および食酢醸造の検討

○荻山 大輝, 若山 守  
(立命館大院・生命科学)  
wakayama@sk.ritsumeikan.ac.jp

**<目的>** ホエーはチーズ生産における副産物であり、世界中で大量に生産されている。ホエーにはラクトース、タンパク質、ミネラルといった成分が含まれるため栄養的に優れた素材である。しかし、ホエーは味が悪く、保存性も悪いことからその大部分が廃棄されている。ホエーの活用方法としては家畜の飼料としての利用、バイオエタノール生産への応用があげられるが、さらなるホエーに高付加価値を付与する活用方法が求められている。そこで、本研究ではホエーの栄養分を生かした新規食酢(ラクトー酢)を提案することで、保存性の良い高栄養食品を作ることでホエーの高付加価値化を試みた。特に、本研究では食酢醸造のエタノール生産段階で、酵母菌よりもエタノール生産速度が速いとされる *Zymomonas mobilis* を使用した。

**<方法・結果>** 脱塩ホエーと軟水を混合し加熱処理後、濾過し、ホエー液を準備した。ホエー液中に *Aspergillus oryzae* を生育させた小麦ふすまを添加し、ホエー中のラクトースおよびタンパク質を加水分解した。続いて、*Z. mobilis* を添加し、エタノール生産を行った。その後、*Acetobacter pasteurianus* を添加し、酢酸発酵を行った。酢酸発酵終了後、80℃で 30 分火入れ殺菌し、遠心した上清をラクトー酢とした。ラクトー酢中の 17 アミノ酸、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、酸度を測定した。ホエーから最大エタノール量 4.0 w/v% および最大酢酸量 3.6 w/v% の生産に成功した。ラクトー酢中の 17 アミノ酸は市販されている食酢よりも数十倍高く、酸度 4.7%、Ca<sup>2+</sup> 4.7mM、Mg<sup>2+</sup> 23mM を含む栄養価が高い食酢が得られた。また、本研究は *Z. mobilis* とホエーを利用した初めての食酢醸造である。

### Ethanol fermentation from whey using *Zymomonas mobilis* and lacto-vinegar production

○Daiki Ogiyama, Mamoru Wakayama  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** whey, *Zymomonas mobilis*, Lacto-vinegar, Fermented food

## 2P-1p079 紫芋焼酎粕を原料としたデザートソースの開発と機能性

○多賀 直彦<sup>1</sup>, 岩下 小太郎<sup>2</sup>, 越智 大起<sup>2</sup>, 柁田 聖孝<sup>1</sup>, 村田 達郎<sup>1</sup>,  
芝田 猛<sup>1</sup>, 荒木 朋洋<sup>1</sup>, 安田 伸<sup>1</sup>, 松田 靖<sup>1</sup>, 本田 憲昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東海大・農, <sup>2</sup>東海大院・農)  
ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

【背景】焼酎粕は、焼酎製造時に製品となる焼酎の約2倍量発生するため、その処理あるいは利用が求められている。紫芋焼酎粕は、鮮やかな色調、加熱により衛生的、そのまま食用可能、およびアントシアニン色素など機能性成分を豊富に含むなど、機能性食品原料として多くの利点を有している。【目的】本格焼酎“阿蘇之魂”の紫芋焼酎粕を原料とする機能性食品として、色調や粘性などを活かし簡便な方法で加工するデザートソースを開発した。本研究は、デザートソースの成分分析、およびデザートソースと原料である紫芋焼酎粕の機能性について比較検討した。【方法・結果】紫芋焼酎粕を原料としたデザートソースの製造は、焼酎粕をメッシュにかけて大きな固形分を取り除いた後、甘味料や酸味料などを加えて調味を施した。デザートソースの成分として、一般的な食品成分および精確なアルコール濃度を分析した。デザートソースおよび紫芋焼酎粕の機能特性を明らかにするために、ポリフェノールおよびアントシアニン含量を測定した。デザートソースには、紫芋焼酎粕由来の機能性成分が含まれていることが示唆された。以上から、従来は廃棄されてきた焼酎粕を食品原料として利用出来ることが示された。

## Development and function of dessert sauce using distillery wastewater from purple sweet potato

○Naohiko Taga<sup>1</sup>, Kotarou Iwashita<sup>2</sup>, Taiki Oti<sup>2</sup>, Kiyotaka Kabata<sup>1</sup>,  
Tatsuro Murata<sup>1</sup>, Takeshi Shibata<sup>1</sup>, Tomohiro Araki<sup>1</sup>, Shin Yasuda<sup>1</sup>,  
Yasushi Matsuda<sup>1</sup>, Kenshou Honda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Agric., Tokai Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Tokai Univ.)

**Key words** shochu distillery wastewater, anthocyanin, antioxidation

## 2P-1p080 黒糖焼酎の香気に及ぼす蒸留法の影響

○島田 麻里奈<sup>1</sup>, 落合 佑香<sup>2</sup>, 吉崎 由美子<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>2</sup>,  
二神 泰基<sup>2</sup>, 玉置 尚徳<sup>2</sup>, 高峯 和則<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿児島大院・農, <sup>2</sup>鹿児島大・農)  
k6943994@kadai.jp

【目的】焼酎は常圧蒸留法または減圧蒸留法で製造され、常圧蒸留で得られた焼酎は濃厚で重厚な香味となり、減圧蒸留では癖のない軽快な香味となる。これまでに黒糖焼酎の香気に及ぼす蒸留法の影響について調べられたことはない。そこで演者らは、2種類の蒸留法で得られた焼酎をGC-MSで分析し、揮発成分濃度に差が認められる成分の同定と、それらの成分の中で酒質に影響を与える揮発成分の探索を目的とした。

【方法および結果】麴米400g、麴歩合55%、汲水歩合257%の規模で黒糖焼酎の一般的な二次仕込み法に従い、仕込みを行った。黒糖焼酎もろみを2つに分けて、それぞれ常圧蒸留、または減圧蒸留を行い、焼酎サンプル(常圧黒糖焼酎および減圧黒糖焼酎)を作製した。また各焼酎サンプルに対して官能評価およびGC-MS分析を行った。官能評価の結果、常圧蒸留焼酎は穀物様の香りと濃厚な味わいが、減圧蒸留焼酎は華やかな香りと酸味が高くなった。この結果から、これまでの報告と同様に、常圧蒸留および減圧蒸留によって黒糖焼酎の風味に差異が生じることが認められた。また両焼酎をGC-MS分析した結果、34成分がピーク面積に差が認められ、この34成分のうち28成分の濃度を求めた。得られた濃度と文献に示されている匂い閾値を用いてOAV(odor active value)を算出することで、酒質に影響を有する揮発成分の同定を試みた。

## Effect of distillation method on the flavor of brown sugar shochu

○Marina Shimada<sup>1</sup>, Yuka Ochiai<sup>2</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>2</sup>, Kayu Okutsu<sup>2</sup>,  
Taiki Futagami<sup>2</sup>, Hisanori Tamaki<sup>2</sup>, Kazunori Takamine<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

**Key words** brown sugar shochu, distillation method

## 2P-1p081 芋焼酎醪中に生息している乳酸菌に関する研究

○宮川 博士, 小境 敏揮, 鈴木 恵利香, 河野 邦晃, 岩井 謙一,  
高瀬 良和  
(霧島酒造)  
hiroshi-miyagawa@kirishima.co.jp

【目的】芋焼酎醪中には麴と酵母以外にもさまざまな微生物が生息しており、その中でも特に乳酸菌は酒質に影響を及ぼす可能性が高い。そこで我々は醪中から単離した乳酸菌の生理学的性質と、酒質にどのような影響を及ぼすかを評価した。また、その乳酸菌の由来と菌数を調査し、一次および二次仕込みを持ち込まれる乳酸菌数とその時の酒質への影響を確認した。

【方法】まず発酵中の一次および二次醪中の乳酸菌数を経時的に調査した。菌を単離・同定後、生理学的性質を評価した。乳酸菌の由来調査はY-Pitを用いた拭き取り検査にて行なった。最後に、特徴ある性質を有する乳酸菌の初発添加量とその時の酒質への影響を評価した。

【結果】乳酸菌数は二次2日目に最大となり、発酵が進むに従い減少した。単離株はほとんどが桿菌である*Lactobacillus*属であり、特に*L. casei*グループはクエン酸資化能が高かった。乳酸菌は一次・二次工程それぞれから持ち込まれており、原料である米麴と芋が起因していた。単離株を同定したところ、*Leuconostoc*属などの球菌がメジャーであり、醪中の菌叢とは異なった。単離株のストレス耐性を調査した結果、桿菌は球菌と比較して格段に耐性が強く、これにより醪中へ持ち込まれた球菌は死滅し、桿菌のみが生き残ると推察された。初発菌数を $10^1 \sim 10^7$  cells/mlとして酒質への影響を調査したところ、 $10^7$  cells/mlを超えると醪中で直ちに増殖し、揮発酸度やエタノール濃度に大きな影響が表れた。 $10^6$  cells/mlにおいても若干の影響が確認されたことから、現場で焼酎造りを安定して行なうためには、乳酸菌の持ち込みを $10^4$  cells/ml以下に抑える必要があり、醪中に乳酸菌が同程度検出されても酒質への影響はなく正常な発酵が行われることが分かった。

## Studies on Lactic acid bacteria in sweet potato shochu mash

○Hiroshi Miyagawa, Toshiki Kosakai, Erika Suzuki, Kuniaki Kawano,  
Kenichi Iwai, Yoshikazu Takase  
(Kirishima Shuzo Co., Ltd)

**Key words** shochu, lactic acid bacteria, stress resistance, initial viable cells

## 2P-1p082 酸素・水素安定同位体比に基づく清酒の産地識別

○栗林 喬<sup>1</sup>, 城 斗志夫<sup>2</sup>, 金桶 光起<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>新潟県醸造試, <sup>2</sup>新潟大・農)  
kuribayashi.takashi@pref.niigata.lg.jp

【目的】近年、清酒の海外への輸出量が増加し、高品質な日本国産清酒を証明する科学的な識別法のニーズは急速に高まっている。原料・産地判別手法として注目されている安定同位体比分析は、環境要因による生体構成元素の安定同位体比の変化によって、産地情報を特定する方法であり、さまざまな飲食品への応用が期待されている。しかし、清酒では、酸素安定同位体比による清酒製造に使用された地下水の起源判別への応用が報告されている以外に、ほとんど研究がなされていない。そこで本研究では、清酒と清酒製造に使用した醸造用水中の酸素・水素安定同位体比を分析し、清酒の産地判別への可能性を検証した。【試料および分析方法】2014~2015年の間に、新潟県内の酒造場で製造された清酒(純米酒)と同酒造場の醸造用水を、それぞれ19点採取した。清酒は、安定同位体質量分計 TC/EA Delta V-ConFlo III (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて、醸造用水はキャピタリリングダウン分光分析装置 PICARRO L2120-i (Picarro 社)を用いて、それぞれの試料中の酸素・水素同位体比を測定した。

【結果】清酒の酸素・水素安定同位体比は、醸造用水のそれらと、高い相関性を持つことが明らかとなった。醸造用水によく用いられる地下水などの水の安定同位体比には、地域性があることが知られていることから、清酒中の酸素・水素安定同位体比による清酒の産地判別の可能性が示唆された。現在、この判別法が、国産清酒と海外産清酒の識別に応用可能かどうかを検討している。

## Hydrogen and oxygen stable isotope analysis for tracing the geographical origin of sake

○Takashi Kuribayashi<sup>1</sup>, Toshio Joh<sup>2</sup>, Mitsuki Kaneoke<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Niigata Pref. Inst. Brewing, <sup>2</sup>Fac. Agric., Niigata Univ.)

**Key words** sake, authentication, stable isotope, geographical origin

2P-1p083 *Pediococcus pentosaceus* の持つ免疫賦活作用

山田 康伸, 今井 伸二郎, 〇西野 智彦  
(東京工科大・応生)  
nishino@stf.teu.ac.jp

## 1. はじめに

乳酸菌は自然界に広く分布している微生物であり、プロバイオティクスとしても有用とされるが、最近では、免疫賦活作用にも注目が集まっている。食経験が豊富な漬物から乳酸菌の分離を行い、アレルギー抑制効果が高い乳酸菌を選抜することを目的とする。

## 2. 実験方法

キムチなどの発酵食品から乳酸菌を分離し、菌の形状・性状の観察を行うことでスクリーニングを行った。その後、16S rRNA 遺伝子配列を解析することで菌種同定を行った。分離された乳酸菌に対し、ELISA 法にて、炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  の産生誘導量を測定することでアレルギー抑制効果を評価した。

## 3. 結果と考察

キムチ、市販乳酸菌飲料から、*Leuconostoc* 属、*Weissella* 属、*Pediococcus* 属の乳酸菌を分離することができた。これらスクリーニングによって選抜された菌株のうち、最も高い TNF- $\alpha$  産生誘導量を示した株は、16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、*Pediococcus pentosaceus* と高い相同性を示した。

Immunostimulation activity of *Pediococcus pentosaceus*

Yasunobu Yamada, Shinjiro Imai, 〇Tomohiko Nishino  
(Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

**Key words** lactic acid bacteria, screening, allergy

## 2P-1p084 伝統的発酵食品の製造工程における細菌混入経路の次世代シーケンスによる解析

〇鈴木 市郎<sup>1,2</sup>, 白至恒<sup>1</sup>, 杉田 龍兵<sup>3</sup>, Nakamura Gouvea Natalia<sup>1</sup>, 武田 穰<sup>1</sup>, 小泉 淳一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>横国大・リスク共生, <sup>3</sup>横国大・理工)  
suz-1@ynu.ac.jp

【目的】伝統的発酵食品には様々な微生物が含まれているが、その中には人為的に添加される麹や酵母など以外に、意識せずに加わったものも存在する。それらが製造のどの過程で加わったかが解明できれば、品質や製造工程の管理などに有益である。韓国の伝統的発酵食品であるコチュジャン（辛子味噌）では、ガスが発生し製品を損なう「膨れ事故」が発生する。我々はこの原因として、製品に含まれる *Bacillus* 属細菌がガス発生に関与すること、および pH の上昇がガス発生を引き起こすことを特定した。加熱後包装した製品には、他にも様々な細菌が存在していた。そこで、コチュジャン製造の各工程や原料に含まれる細菌群の組成を次世代シーケンスで解析し、製品に含まれる各細菌が加わる経路を調査した。

【方法】製品の原料である小麦、麹、唐辛子など、および一次・二次発酵、包装工程からサンプルを採取し、DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V4 領域を PCR で増幅し、Illumina MiSeq で塩基配列を決定した。得られた配列は Qiime を用いて操作的分類単位(OTU)に分け、簡易同定を行った。優占度の高い OTU について各原料・工程サンプルでの優占度のパターンを Horn 指数で比較し、非計量 MDS でマッピングして k-mean 法でクラスタリングして、サンプルでの動態が類似するものを選別した。クラスタごとに細菌の動態をグラフで可視化した。

【結果と考察】*Bacillus* 属はいくつかのクラスターに分かれた。ガス発生の原因菌は麹と唐辛子の両方から混入していたが、別のクラスターの *Bacillus* は唐辛子からのみ混入した。他の細菌の内、*Staphylococcus* 属細菌や *Lactobacillus* 属細菌は麹から、*Enterobacter* 属細菌は唐辛子から混入していた。このように、次世代シーケンスでの菌叢解析を用いて、発酵食品の製造工程における各細菌の混入経路を特定することができた。

## Determination of contamination sources in production process of traditional fermented food by NGS.

〇Ichiro Suzuki<sup>1,2</sup>, Ji-Hwan Back<sup>1</sup>, Ryuhei Sugita<sup>3</sup>, Natalia Nakamura Gouvea<sup>1</sup>, Minoru Takeda<sup>1</sup>, Jun-ichi Koizumi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>RSC, Yokohama Natl. Univ., <sup>3</sup>Coll. Eng. Sci., Yokohama Natl. Univ.)

**Key words** traditional fermented food, contamination, next generation sequencing, *Bacillus* sp.

## 2P-1p085 pH 非調整型の培養系ヒト腸管モデルの確立

〇佐々木 建吾<sup>1</sup>, 佐々木 大介<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>, 大澤 朗<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>神戸大・内科・研究環)  
sikengo@people.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】100 兆に及ぶ細菌で構成されるヒト腸内細菌叢は宿主の健康・疾病に密接に関係していることが明らかにされ、腸内フローラのバランスを改善するために機能性食品が注目されている。食品成分の機能性評価は動物給餌実験やヒト介入試験による *in vivo* 系で行われてきたが、前者は腸内細菌叢や消化物の腸内滞留時間がヒトと異なる事、後者は倫理的制限が指摘されている。そこで我々は、反復実験や時系列での評価が可能となる *in vitro* 培養系ヒト腸管モデルを構築してきた。培養系ヒト腸管モデル中では細菌叢構成の種レベルでの多様性や酢酸・プロピオン酸・酪酸の組成が糞便のものに近似しており、既知のプロバイオティクスを添加することで *Bifidobacterium* 属の生育促進効果を評価できることを報告している。一方、盲腸から下行結腸に至るヒト腸管下部において pH が徐々に増加することが知られている。本報告において、pH の変動を再現する培養系ヒト腸管モデルを構築することを目的とした。

【方法・結果】培養器に GAM 培地を基礎培地として投入して、嫌気状態を保つために窒素・炭酸混合ガスを曝気した。初期 pH を 6.5 に調整して、健康人 8 人ずつの糞便を投入して 37℃ で 30 時間培養した。培養期間中、pH は一端 5.5-6.0 付近に減少した後に徐々に 6.5 近傍に増加していく傾向を示した。短鎖脂肪酸 (SCFA) 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定すると、培養後期には酢酸・プロピオン酸・酪酸が優先しており糞便中と同じ酢酸濃度が最も高かった。また、アミノ酸の一種であるタウリン添加の効果についても報告するつもりである。

1)2016 年度日本農芸化学会

## Construction of a fermentation system to simulate human intestinal microbiota without pH regulation

〇Kengo Sasaki<sup>1</sup>, Daisuke Sasaki<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>, Ro Osawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Kobe Univ., <sup>2</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

**Key words** microbiota, human intestine, fermentation

## 2P-1p086 農産品から単離した乳製品用乳酸菌の多機能性評価

〇高屋 朋彰<sup>1</sup>, 根来 雄哉<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>小山高専・物質, <sup>2</sup>小山高専専攻科・物質)  
tkouya@oyama-ct.ac.jp

【背景・目的】栃木県は生乳生産量全国第 2 位の畜産県である。しかし、コスト高・採算性の問題や後継者不足、生産業者の減少などから、全国の酪農家戸数や国内の生乳生産量は減少し続けている。本研究では、栃木県の地域特産品からチーズ製造に利用できる微生物を分離し、その機能性（人工消化液耐性、GABA 生産能など）を評価した。

【方法】分離源として栃木県の農産品を用いた。乳酸菌の選別・同定は、HPLC を用いた乳酸生産量の測定、X-gal を用いた乳糖分解酵素 ( $\beta$ -galactosidase) 生産能の判別、リトマスミルクを用いた乳糖分解酵素の酸凝固性評価、血液寒天培地を用いた安全性評価、および 16S rDNA 解析による微生物の同定を行った。選別した乳酸菌について、人工消化液耐性、胆汁酸耐性に及ぼす菌体外多糖 (EPS) の影響、GABA 生産性、および小腸モデル細胞 (Caco-2) を用いた腸管吸着性を評価した。

【結果・考察】14 菌株の乳酸菌を単離・同定し、乳製品製造に適した 4 菌株 (ONCT 6002 株, ONCT 6009 株, ONCT 6011 株, ONCT 6013 株) を選別した。これらの菌株は *Lactococcus lactis* や *Lactobacillus plantarum* と高い相同性を示した。次に、人工胃液 (pH 2.8, 3 h), 人工腸液 (pH 7.0, 7 h) 曝露後における生残性を評価した。その結果、選別した 4 菌株の生残性は 49-67% であり、既存の乳酸菌 (*Lactobacillus gasserii* JCM 11046) などの生残性 (8-32%) と比較して高い値であった。また、ONCT 6009 株や ONCT 6011 株は人工胃液に対する耐性が高いこと、および ONCT 6011 株の耐性には EPS が影響していることが示唆された。薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた GABA 生産能評価により、ONCT 6002 株や ONCT 6013 株は GABA 生産能を有していることが明らかとなった。現在、小腸モデル細胞 (Caco-2) を用いてこれらの菌株の腸管吸着性の評価を行っている。

## Evaluation of multifunctional dairy lactic acid bacteria isolated from agricultural products

〇Tomoaki Kouya<sup>1</sup>, Yuya Negoro<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Mater. Chem. Bioeng., Natl. Inst. Technol. Oyama Coll., <sup>2</sup>Mater. Chem. Bioeng. Adv. Crs., Natl. Inst. Technol. Oyama Coll.)

**Key words** lactic acid bacteria, dairy products, acid and bile tolerance, GABA

## 2P-1p087 和歌山県日高地方の紀州なれずしの細菌叢の解析

○川瀬 貴斗, 早川 享志, 中川 智行  
(岐阜大・応生科)  
t\_nakaga@gifu-u.ac.jp

## 【目的】

なれずしは、塩漬した魚を米飯とともに乳酸発酵させた伝統食品であり、日本各地で今なお親しまれている郷土料理である。和歌山県日高地方では、塩漬したサバを米飯の上のせ、アセの葉で包んで桶に漬け込み、重石をのせて数週間から数ヶ月発酵させたなれずしを、今なお毎年、秋祭にあわせて各家庭で作られている。これまで日本各地の様々ななれずしの発酵過程における菌叢や成分組成の解析が行われてきたが、和歌山県日高地方の紀州なれずしについて詳細な解析をした報告例はあまりない。そこで、本研究では和歌山県日高地方の家庭で作られた紀州なれずしについて解析をおこなうことにした。

## 【結果・考察】

和歌山県日高地方の家庭で2015年11月に仕込んだなれずし(仕込み期間15日)を入手し、サンプルとした。紀州なれずしは、pH3.93±0.08で、有機酸量は乳酸が985 mg/100 g、酢酸が51 mg/100 gであった。魚肉部の脂肪酸組成は生サバのものとはほぼ同様であり、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸が多く、米飯部はリノール酸の割合が高かった。一方、紀州なれずしの米飯部の乳酸菌の生菌数を観察したところ、 $3.3 \times 10^9$  cfu/gであった。さらに魚肉部の微生物群集を16S rRNAを指標に解析をしたところ、目レベルでは98.0%が *Lactobacillales*、科レベルでは *Lactobacillaceae* が85.4%、*Leuconostocaceae* が3.7%、*Streptococcaceae* が3.6%であった。また、紀州なれずしから直接12株の乳酸菌を単離し、種レベルでの同定をおこなったところ、すべて *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* と同定された。これらの結果から、紀州なれずしの主要発酵乳酸菌は *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* であり、アセの葉由来であることが推測された。

## Analysis of microbial flora in “Kisyu Narezushi” Hidaka region, Wakayama

○Takati Kawase, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa  
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, *Narezushii*, fermented food

## 2P-1p088 液体表面培養したカバノアナタケが生産する生理活性物質の評価

○高柴 則子<sup>1</sup>, 藏本 彩加<sup>1</sup>, 米田 任伸<sup>2</sup>, 櫻井 明彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井大院・工, <sup>2</sup>福井大・工)  
a\_sakura@u-fukui.ac.jp

【諸言】カバノアナタケは古くからロシアなどで民間療法に利用されてきた。その生理活性として免疫賦活や抗腫瘍などが報告されているが、天然物の存在数が少なく研究開発が進んでいない。そこで当研究室では、カバノアナタケ菌糸体の液体表面培養による生理活性物質の生産について検討してきた。本発表では、培養菌糸体のエタノール抽出物と多糖の生理活性について、*in vitro* 及び *in vivo* で評価した結果を報告する。

【方法】カバノアナタケ (*Inonotus obliquus* NY-1) を液体表面培養法(培地150 ml, 28℃)で30日間培養し、菌糸体を凍結乾燥・粉砕後にエタノールで抽出した。抽出後の菌糸体を熱水でさらに抽出し、抽出液からエタノール沈殿によって多糖を回収した。エタノール抽出物と多糖画分の酸化還元活性をORAC, SOD, ABTS, FRAP, DPPHの5つの方法で測定した。また、免疫賦活活性をマクロファージ様細胞(RAW 264)のNO生産能で測定した。さらに、これらの抽出物の延命効果を線虫(*C. elegans* N2)で評価した。線虫は各試料と餌となる大腸菌を添加した寒天培地で飼育し、線虫の生死は接触刺激に対する反射運動で判定した。

【結果・考察】エタノール抽出物はORAC法、ABTS法、DPPH法、FRAP法において約40%の酸化還元活性を示し、多糖画分よりも高い値であった。このことから、エタノールに溶解するポリフェノール類、脂質などの酸化還元物質がカバノアナタケ培養菌糸体のエタノール抽出物中にも存在すると考えられる。一方、多糖画分はリポ多糖(LPS)の30%程度の免疫賦活活性値を示した。次に、エタノール抽出物と多糖画分を添加した培地で線虫を飼育したところ、未添加よりも線虫の寿命が長くなる傾向にあった。現在エタノール抽出物をさらに分画し、各画分の酸化還元活性および線虫延命効果を評価しているところである。

Characterization of bioactive substances from *Inonotus obliquus* cultivated by liquid surface culture

○Noriko Takashiba<sup>1</sup>, Ayaka Kuramoto<sup>1</sup>, Hidenobu Yoneda<sup>2</sup>, Akihiko Sakurai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., <sup>2</sup>Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** *Inonotus obliquus*, bioactive substances, life span, *Caenorhabditis elegans*

## 2P-1p089 胞子形成過程を回避した酵母の人為的有性生殖法

○福田 展雄<sup>1</sup>, 石井 純<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>, 本田 真也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>2</sup>神戸大院・イノベ)  
nob-fukuda@aist.go.jp

出芽酵母利用の歴史は古代文明にまで遡るものであるが、現代の産業利用においても、なお優秀な菌株を育種することが重要である。交雑育種法では、接合型が異なる2種類の酵母(a型およびα型)を掛け合わせることで、新たな特性を有する優良菌株を創製する。一般に、産業用酵母は接合能を有さないa/α型の接合型であるため、まずこれらの酵母から胞子を取得して、接合能を有するa型およびα型酵母を製造する必要がある。ところが産業用酵母の多くは、胞子形成能および胞子発芽率が低いため、a型およびα型酵母を得るために多大な労力を要する。

一方で、a/α型の酵母を培養していると、極低頻度ではあるが染色体の複製異常が発生し、a型およびα型酵母が出現することが知られている。本研究では、培養液中に存在する希少なa型およびα型酵母を簡単に単離する技術を確立した。本技術は、酵母の接合型依存的にG418耐性遺伝子を発現するものであり、耐性遺伝子を有するプラスミドを標的酵母に導入し、G418含有培地中でスクリーニングを行うことでa型およびα型酵母を得ることができる。実証例の1つとして、清酒酵母に対して本技術を適用したところ、異なる親株からそれぞれa型およびα型酵母を獲得し、さらに単離した酵母を交雑させることに成功した。最後に薬剤の選択圧を除去することで、不要となったプラスミドを酵母細胞から排除した。外来遺伝子が除去されていることはPCR法により確認した。本手法においては胞子形成の必要がないため、従来は交雑育種に利用することが困難であった産業用酵母にも有効である。

## Artificial sexual reproduction for yeasts without sporulation

○Nobuo Fukuda<sup>1</sup>, Jun Ishii<sup>2</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>, Shinya Honda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., AIST, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci., Technol. Innov. Kobe Univ.)

**Key words** crossbreeding, gene expression, screening, yeast

## 2P-1p090 麹菌によるアクリル酸分解の研究

○尾関 健二<sup>1</sup>, 河上 春樹<sup>1</sup>, 久保 海廣<sup>1</sup>, 上杉 大智<sup>1</sup>, 坪井 宏和<sup>2</sup>, 坊垣 隆之<sup>2</sup>, 岩井 和也<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>金工大・ゲノム研, <sup>2</sup>大関・総研, <sup>3</sup>UCC上島珈琲・イノベーションセンター)  
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】これまでに液体抽出工程で加熱焙煎時に生成するアクリルアミド(AA)の低減化方法を検討した。アミダーゼ高生産セルフ麹菌のセルロース固定化菌体で処理することにより、コーヒー中のAAの低減化を行うことが可能であった。但しAAをより効率よく分解するためには、AAよりも麹菌での毒性が強いアクリル酸(AS)も同時に低減化が望まれ、固定化担体の繰り返し利用により、担体へのより強固な固定化麹菌の処理技術の改良も必要であった。

【方法】AS分解候補遺伝子を絞り込むために、単一炭素源としてAS濃度と時間を変化させて培養条件からの麹菌DNAマイクロ解析を行った。AS分解に関与する可能性が高い遺伝子をアミダーゼ高生産セルフ麹菌に遺伝子導入した麹菌(ASC5-4)を育種した。この育種株、アミダーゼ高生産セルフ麹菌(4 copy)、親株のRIB40でASおよびAAを添加した水およびコーヒーでの低減化試験を行った。セルロース担体(東レCAタイプ)は、乾燥状態では板状で麹菌胞子懸濁液を分散時に、立方体を形成し、この際胞子が担体内部に入り込む培地濃度、時間、温度を変化させ、胞子が発芽し菌糸がより強固な足場をしっかりと形成する条件を検討した。その後栄養培地で担体の外側まで菌糸を生育させ、菌体重量が多くなる条件および低減化試験後の再利用できる培養条件を検討した。【結果および考察】ASC5-4の麹菌は水およびコーヒーでのASの低減化効率が高くなることが分かった。またAAの低減化には特に効率が上がる現象は認められなかった。これにより育種した麹菌はAS分解に関連する遺伝子の1つであることが分かった。しかしながらアミダーゼと連動せずに別々に働き、細胞内での各酵素の局在性に問題があると考えられる。アミダーゼ高生産麹菌の繰り返し再利用の条件を確立し、セルロースの担体の廃棄処理を抑える技術開発の目的が付いた。

Study of acrylic acid degradation by *Aspergillus oryzae*

○Kenji Ozeki<sup>1</sup>, Haruki Kawakami<sup>1</sup>, Hiroumi Kubo<sup>1</sup>, Daichi Uesugi<sup>1</sup>, Hirokazu Tsuboi<sup>2</sup>, Takayuki Bogaki<sup>2</sup>, Kazuya Iwai<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., <sup>2</sup>Ozeki, <sup>3</sup>UCC)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, acrylic acid, acrylamide, immobilization

## 2P-1p091 パルミチン酸誘導性炎症に対する白麹抽出物の抗炎症効果

○大城 沙織<sup>1</sup>, 神戸 悠輝<sup>2</sup>, 奥津 果優<sup>1</sup>, 吉崎 由美子<sup>1</sup>, 宮田 篤郎<sup>2</sup>, 高峰 和則<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>鹿大院・農, <sup>2</sup>鹿大院・医歯)  
k8673711@kadai.jp

【背景と目的】我々はこれまでに、食餌性肥満モデルマウスに白麹を与えると、体重や血糖値の正常化といった、抗肥満作用があることを明らかにした。しかしながら、白麹がどのようなメカニズムで抗肥満作用を発揮するのかが明らかではない。一方、肥満において血中で増加するパルミチン酸は炎症を惹起し、肥満病態において全身の慢性炎症がインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されている。そこで本研究では、白麹抽出物がパルミチン酸による炎症の抑制を介して抗肥満効果を示す可能性を検討した。

【方法】白麹はBligh-Dyer法に従って抽出後、DMSOに溶解した。Raw264マウスマクロファージ細胞に対して、白麹抽出物添加および非添加条件下においてパルミチン酸を曝露し、炎症性メディエーター(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX2、iNOS)の遺伝子発現量をreal-time PCRで測定した。また、抗炎症効果の作用機序を調べるために、p38、JNK、NF- $\kappa$ Bそれぞれのリン酸化体の発現量に及ぼす白麹抽出物の効果をウェスタンブロッティング法で測定した。

### 【結果と考察】

パルミチン酸の曝露によってIL-1 $\beta$ とiNOSの遺伝子発現量は増加しなかったが、TNF- $\alpha$ とCOX2とIL-6の遺伝子発現量が有意に増加し、この遺伝子発現の増加は5-50  $\mu$ g/mLの濃度範囲の白麹抽出物の添加によって濃度依存的に抑制された。さらに、パルミチン酸によってリン酸化NF- $\kappa$ Bとリン酸化JNKの発現量は増加しなかったが、リン酸化p38の発現量は増加し、この増加は白麹抽出物の添加によって有意に抑制された。以上の結果から、白麹は肥満などに付随すると考えられるパルミチン酸誘導性炎症に対してp38によるシグナル経路を阻害することで抗炎症効果を持つ可能性が示唆された。

### The inhibitory activity of white koji against the palmitic acid-induced inflammation on Raw264 cells

○Saori Ohki<sup>1</sup>, Yuki Kambe<sup>2</sup>, Kayu Okutsu<sup>1</sup>, Yumiko Yoshizaki<sup>1</sup>, Atsuro Miyata<sup>2</sup>, Kazunori Takamine<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kagoshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Med. Dent., Kagoshima Univ.)

**Key words** koji, anti-inflammatory effect, palmitic acid

## 2P-1p092 アメフラシ消化液より単離したフロロタンニン結合蛋白質、EHEPの特性解析

○辻 明彦, 桑村 修司, 湯浅 恵造  
(徳島大院・生物資源産学学術部)  
tsuji.akhiko@tokushima-u.ac.jp

【目的】陸上植物は没食子酸エステル誘導体からなるポリフェノールを含むのに対し、褐藻類はフロログルシノールが縮合したフロロタンニンをポリフェノールとして含有する。これまでアラメ、クロメなどからEckol, Bieckol, Dieckolなどが同定されている。フロロタンニンはアミラーゼなど消化酵素に阻害作用があるため、血糖値上昇を防ぐための機能性成分として注目されている。また、近年、フロロタンニンの脂肪細胞分化抑制作用やがん細胞増殖抑制作用なども報告されている。昨年度の本大会において、アラメフロロタンニンはアメフラシbeta-グルコシダーゼに対して強い阻害作用を持つが、アメフラシ消化液にはフロロタンニンと特異的に結合し、その酵素阻害作用を抑制する蛋白質(EHEP, Eisenia Hydrolysis Enhancing Protein)が存在することを報告した。フロロタンニンの大量調整法はまだ確立されていないが、EHEPは機能性成分であるフロロタンニンを効率良く回収するためのツールとして使える可能性がある。今回、その特性についてさらに解析を進めた。

【結果、考察】EHEPは、25kDaのモノマーであり、ウェスタンブロットやRT-PCRにより、肝臓が主たる合成場所であることが判明した。クローニングの結果229アミノ酸を含む3つの特徴的なシステイン残基配列からなるキチン結合ドメインを有することが判明した。しかし、キチンとの結合活性はなく、フロロタンニンと特異的に反応し、不溶性の沈殿を形成した。また、フロログルシノールとも結合する。現在、等温滴定型カロリメトリーによって結合作用を解析しているため、合わせて報告したい。

### Characterization of phlorotannin-binding protein, EHEP from sea hare

○Akihiko Tsuji, Shyuji Kuwamura, Keizou Yuasa  
(Fac. Biosci. Bioindust. Tokushima Univ.)

**Key words** phlorotannin, Eisenia bicyclis, enzyme inhibitors

## 2P-1p093 統計的実験計画法を用いた乳酸菌生産のためのアレルゲンフリー培地の最適化

○ターナー ピーター<sup>1</sup>, 小川 博<sup>1</sup>, 阿部 吉邦<sup>1</sup>, Cabrera-Ostertag Ignacio<sup>2</sup>, Menton John<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>セントラル科学貿易, <sup>2</sup>Kerry, WI, USA)  
turner@cscjp.co.jp

目的: 加工程度の異なる複数の酵母エキスと、エンドウ豆、綿花、米などの原料を由来とするアレルゲンフリーのペプトンを配合して、*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*を培養するための混合培地を開発する。

方法: 開発において、バイオスクリーンCを用いたマイクロタイタースケールでの高スループット初期スクリーニング法と単体重心統計的設計の手法を用いた。最終OD値が最も高い値を示した個々の成分を選択し、それらの成分を配合した混合培地の結果もまた最大値を示した。フラスコを用いた振とう培養における最適化の第二ラウンドでは、培地成分の比率をRSM(応答局面法)計画に従って体系的に変化させて最適化を行った。最適化した混合培地は最後にpH調整機能のついたベンチトップ型バイオリアクターでバリデーションを行い、その発酵過程の最終段階でCFU/ml数を測定した。

結果: バイオリアクターを用いての比較において、最適化した培地によるバイオマスの収量は、コントロールの培地による収量よりも増加もしくは同等のレベルであった。よって、酵母エキスとペプトンの配合を最適化することによってアレルゲンフリーの培地を使用することが可能になった。

### Allergen-free culture media optimization for lactic acid bacteria production using statistical DoE

○Peter Turner<sup>1</sup>, Hiroshi Ogawa<sup>1</sup>, Yoshikuni Abe<sup>1</sup>, Ignacio Cabrera-Ostertag<sup>2</sup>, John Menton<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Central Scientific Commerce, Inc., <sup>2</sup>Kerry, WI, USA)

**Key words** lactic acid bacteria, Allergen-free culture media, media optimization, Protein hydrolysates

## 2P-1p094 R- $\alpha$ リポ酸処理したラット肝がん細胞の経時的メタボローム解析

○生田 直子<sup>1</sup>, 近本 啓太<sup>2</sup>, 浅野 雄哉<sup>2</sup>, 横川 遥香<sup>2</sup>, 寺尾 啓二<sup>3</sup>, Rimbach Gerald<sup>4</sup>, 松郷 誠一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・医, <sup>2</sup>金沢大院・自科, <sup>3</sup>(株)シクロケム, <sup>4</sup>Inst. Hum. Nutri. Food Sci. Kiel Univ.)  
s-matsugoh@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】 $\alpha$ リポ酸(LA)はエネルギー産生に関わる補酵素の一つとして作用する物質であり、R型とS型の光学異性体が存在するが、生体内ではR- $\alpha$ リポ酸(R-LA)のみが生合成されている。R-LAは熱等に対する安定性がラセミ体(DL-LA)に比べて低いため、サプリメントなどの食品にはDL-LAが配合されている場合が多い。また、LAは強い抗酸化作用を有し、種々のがん細胞に対してアポトーシスを誘導することが報告されているが、そのメカニズムについて細胞の代謝系に着目した研究例はほとんどない。そこで本研究では、LAががん細胞の代謝系に及ぼす影響を調べることを目的とし、ラット肝がん細胞を用いて、R-LAおよびDL-LA処理後の細胞内に存在する代謝物を経時的に評価した。

【方法】ラット肝がん由来のH4IIEC3細胞を16時間血清飢餓状態にしたのち、100 $\mu$ Mに調整したR-LAおよびDL-LAを添加し、0、0.5、1、3、6、12、24時間後に細胞を回収した。回収した細胞内に存在する水溶性代謝物を抽出し、GC/MSによりメタボローム解析を行った。得られたデータはタンパク量で補正した。なお、実験に用いたLA濃度では細胞毒性がないことを事前に確認した。【結果】解析の結果、LA処理したラット肝がん細胞では解糖系およびTCA回路の代謝物レベルが低いことが分かった。また、DL-LAに比べてR-LA処理した細胞では、トレオニン、グリシン、セリンなどの主に糖原性アミノ酸レベルが低かった。これらの結果から、LAは解糖及び糖新生を抑制することが示唆された。また、R-LAとDL-LAとで細胞内レベルに有意な差がある代謝物が多く存在することが分かった。

### Metabolomic study of time-course effect of R-Alpha-Lipoic Acid in H4IIEC3 Hepatocytes

○Naoko Ikuta<sup>1</sup>, Keita Chikamoto<sup>2</sup>, Yuya Asano<sup>2</sup>, Haruka Yokokawa<sup>2</sup>, Keiji Terao<sup>3</sup>, Gerald Rimbach<sup>4</sup>, Seiichi Matsugo<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Cyclochem. Co. Ltd., <sup>4</sup>Inst. Hum. Nutri. Food Sci. Kiel Univ.)

**Key words** lipoic acid, metabolomics, glyconeogenesis, H4IIEC3

**2P-1p095 新規食品機能性成分コリンエステル類の抗高血圧作用**

○中村 浩蔵<sup>1,2</sup>, 山口 翔平<sup>2</sup>, 渡辺 旭<sup>1</sup>, 小山 正浩<sup>2</sup>, 猪狩 直樹<sup>3</sup>  
 (1)信州大農・農, (2)信州大・農, (3)大和薬品(株)  
 knakamu@shinshu-u.ac.jp

**【目的】**哺乳類の神経伝達物質であるアセチルコリン(AcCh)は、自然界に普遍的に存在する。その他、プロピオニルコリン(PrCh)、ブチリルコリン(BuCh)が生体に存在することが報告されている。昨年、我々は、ソバプラウト乳酸発酵物に、これらのコリンエステル類に加えて、新規な天然コリンエステル・ラクチルコリン(LaCh)が存在することを発見した。本研究では、これらのコリンエステル類の高血圧自然発症ラット(SHR)における抗高血圧作用を検討した。**【方法】**雄性11週齢SHRへ、10<sup>-6</sup>mol/kgの用量でコリンエステル類を単回経口投与しテイルカフ法で血圧測定し降圧作用を調べた。同SHR由来胸部大動脈を用いた血管等尺性張力試験でコリンエステル類の血管拡張作用を評価した。また、雄性10-13週齢SHRの腹部大動脈に血圧センサを挿入、腎交感神経に神経電位センサを取り付け、AcChを10<sup>-6</sup>mol/kgの用量で反復経口投与し、テレメトリ法で血圧および腎交感神経活動を測定し、血圧上昇抑制作用を調べた。本研究は、信州大学動物実験委員会承認された計画に基づいて実施された。**【結果】**単回経口投与試験では、AcCh、PrCh、D-およびL-LaChで有意な降圧作用が確認され、コリンエステル類が極低用量の経口投与で生理活性を引き起こすことが明らかとなった。また、AcCh、PrCh、D-LaChには血管拡張作用が確認され、M3ムスカリン性アセチルコリンレセプター(M3mAChR)に作用することが示された。AcCh反復経口投与試験では、有意な血圧上昇抑制作用と、腎交感神経活動低下が見られた。腎交感神経活動によって放出されたノルアドレナリンは、副腎でアドレナリンに変換されて血中に放出され血圧上昇を引き起こす。本研究の結果は、経口投与されたコリンエステルがM3mAChRに作用し、神経活動を介して抗高血圧作用を引き起こしている可能性を示唆している。

**Antihypertensive effect of choline esters, novel functional ingredients in foods**

○Kozo Nakamura<sup>1,2</sup>, Shohei Yamaguchi<sup>2</sup>, Akira Watanabe<sup>1</sup>, Masahiro Koyama<sup>2</sup>, Naoki Igari<sup>3</sup>  
 (1)Grad. Sch. Agric., Shinshu Univ., (2)Fac. Agric., Shinshu Univ., (3)R & D Dept., Daiwa Pharm. Co., Ltd.)

**Key words** choline ester, antihypertension, telemetry

**2P-1p097 メリンジョ由来グネチンCの抗動脈硬化作用**

○関根 由璃子<sup>1</sup>, 宮崎 均<sup>2</sup>, 吉田 滋樹<sup>2</sup>  
 (1)筑波大院・生命環境, (2)筑波大・生命環境系)  
 yoshida.shigeki.gf@u.tsukuba.ac.jp

**【背景と目的】**動脈硬化は、体内の過剰な活性酸素種によって血管内皮細胞(EC)が傷害を受けることに起因すると考えられており、これが日本人の死因の約3割を占める心疾患、脳血管疾患の根底病変となる。このような背景から近年、活性酸素種への抵抗性やECの創傷治癒力を向上させる植物由来の抗酸化物質が注目されている。代表的なスチルベノイドであるレスベラトロール及びその二量体であるε-ビニフェリンは抗動脈硬化作用を有するが、単量体と二量体という構造の違いにより活性が異なることが報告されている。一方、健康効果が報告されているメリンジョ(*Gnetum gnetum* L.)に含まれるグネチンCはレスベラトロール二量体一種であるが、抗動脈硬化作用については明らかとなっていない。そこで本研究では、グネチンCをメリンジョ粉末から精製し、レスベラトロール及びε-ビニフェリンとその抗動脈硬化作用を比較することを目的とした。**【方法と結果】**グネチンCはメリンジョ粉末から50%EtOHで抽出し、固相抽出による分離、分取HPLCによる精製を行った。抗動脈硬化作用は、創傷治癒効果及び一酸化窒素(NO)産生量によって評価した。生物検定の結果、グネチンCは三種の化合物中で最も低濃度で高い創傷治癒効果、NO産生効果を示した。また、NO合成酵素阻害剤の添加により創傷治癒効果が抑制されたことから、スチルベノイドによる創傷治癒の促進はNO産生を介して行われることが明らかとなった。以上の結果から、生物検定に用いた三種の化合物がNO産生を介して創傷治癒を促進するという作用メカニズムは同様であったが、その活性は二量体間でも差があったことから、スチルベノイドの抗動脈硬化作用は重合度のみではなく、構造の違いにも起因していることが明らかとなった。

**Anti-atherosclerotic effect of gnetin C isolated from Melinjo (*Gnetum gnetum* L.)**

○Yuriko Sekine<sup>1</sup>, Hitoshi Miyazaki<sup>2</sup>, Shigeki Yoshida<sup>2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, (2)Faculty Life Environ. Sch., Adv. Sci. Mat. Univ. Tsukuba)

**Key words** gnetin C, resveratrol, epsilon-viniferin, endothelial cell

**2P-1p096 Optimization of polysaccharides extraction from *Inonotus obliquus* using subcritical water technology**

○Xi Yuan, Hongyi Sun, Zhenya Zhang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
 zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

[Introduction] In our previous studies, aqueous extracts of *Inonotus obliquus* (also called chaga mushroom) possessed antioxidant activity and exhibited potent anticancer ability. Recently, extracting screening anticancer active ingredients from natural vegetation using various methods has become a research hotspot all over the world. Subcritical water technology (SWT) is a burgeoning environmental technique used to be very effective to selectively extract a variety of polar or non-polar organic compounds.

**[Methods and results]**

In this study, the extraction of polysaccharides from *Inonotus obliquus* using subcritical water technology (SWT) was discussed. A Box-Behnken design (BBD) combined with response surface methodology has been employed to optimize extraction parameters (temperature, residence time and liquid-solid ratio) of SWT. Fourier transform infrared spectra confirmed its polysaccharide characterization via typical peaks. In addition, the significant in vitro antioxidant profiles of BSP were demonstrated that polysaccharides exhibited significant scavenging activity effects on ABTS and hydroxyl radicals.

**Optimization of polysaccharides extraction from *Inonotus obliquus* using subcritical water technology**

○Xi Yuan, Hongyi Sun, Zhenya Zhang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** polysaccharides, *Inonotus obliquus*, response surface methodology, antioxidant

**2P-1p098 *Lactococcus lactis* のナイシン高生産株スクリーニング系の開発**

○三田 麻友華<sup>1</sup>, 山本 理奈<sup>1</sup>, 大島 悟<sup>2</sup>, 依田 伸生<sup>2</sup>, 山崎 思乃<sup>1</sup>, 片倉 啓雄<sup>1</sup>  
 (1)関西大・化生工, (2)明治)  
 katakura@kansai-u.ac.jp

**背景・目的**

ナイシンは乳酸菌が生産するバクテリオシンの1つで、日本でも食品添加物として認可されている。ナイシン発酵液を保存料として添加する場合、食品の風味を損なわれないようにナイシンを高濃度に生産させなければならない。しかしナイシンは、あるレベルまで生産されるとそれ以上の生産が抑制され、また、乳酸菌自身が生産する乳酸によってナイシンの生産性が低下する。本研究では乳酸菌のナイシン生産性を向上させる為、高濃度のナイシン存在下でも生産抑制が起きない菌株の取得を目的とする。

**方法**

ナイシン生産株として *Lactococcus lactis* ME-550 株、ナイシンの生産性をバイオアッセイで求める為の指示菌として *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002T を用い、培養には MRS 寒天培地を用いた。

**結果**

ME-550 株に対するナイシンの最小生育阻止濃度は 8 IU/μL であったので、まず、自然突然変異によって、この濃度のナイシンに耐性のある株を、更に、12 IU/μL のナイシンに耐性を持つ株を得た。次に、培地の pH の低下を抑えた状態で指示菌の阻止円の大きさを観察するために、以下の方法を開発した。まず、生存率 1% となるように紫外線で変異処理した耐性株 10<sup>2</sup> CFU と MRS 培地で培養した指示菌 0.25 mL を含む MRS 寒天培地 10 mL をシャーレに注いで固化させた。その上に、0.4 g の炭酸カルシウムを含む MRS 寒天培地 10 mL を注いで固化させ、30℃ で 24 h 培養した。その後、炭酸カルシウムを含む上層の培地を取り除き、下層に形成された阻止円の大きさを指標にスクリーニングを行った。現在、得られた高生産株の評価を行っている。

**Development of Screening System for Nisin Production by *Lactococcus lactis***

○Madoka Mita<sup>1</sup>, Rina Yamamoto<sup>1</sup>, Satoru Oshima<sup>2</sup>, Nobuo Yoda<sup>2</sup>, Shino Yamasaki-Yashiki<sup>1</sup>, Yosio Katakura<sup>1</sup>  
 (1)Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., (2)Meiji Co., Ltd.)

**Key words** nisin, *Lactococcus lactis*, screening, bioassay

## 2P-1p099 白米ペプチド由来睡眠ホルモン合成酵素活性化因子の同定

○畑中 唯史<sup>1</sup>, 守谷 智恵<sup>2</sup>, 川上 賀代子<sup>2</sup>, 藤田 明子<sup>3</sup>, 川上 晃司<sup>3</sup>, 下田 博司<sup>4</sup>, 裏地 美杉<sup>1</sup>, 万 ケン<sup>1</sup>, 坪井 誠二<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岡山生物研, <sup>2</sup>就実大薬, <sup>3</sup>(株)サタケ, <sup>4</sup>オリザ油化(株))  
hatanaka@bio-ribs.com

[背景と目的] 寝不足の要因のひとつとして、脳内で作られる睡眠ホルモンであるメラトニン分泌リズムの異常が考えられる。メラトニンは、血中より供給される L-トリプトファンを前駆物質として、セロトニンに変換された後、セロトニン N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) とヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼにより合成される、脳内の松果体で合成される睡眠ホルモンである。これらの酵素のうち NAT が最もよく時間情報に反応し、その活性は強いリズム性を示す。つまり、NAT 活性の変動とメラトニンの合成量はほぼ対応しており、NAT はメラトニン合成の律速酵素である。本発表では、白米ペプチドに含まれる NAT 活性化因子の同定を試みたので報告する。

[結果と考察] 市販白米ペプチドを、逆相固相担体に吸着させ、40% メタノールで溶出することによって、NAT を活性化させる因子が濃縮される画分を得た。さらに、HPLC-C18 カラムによる分画を行った。評価法は、以下の通り。動物細胞用発現ベクターに、NAT 遺伝子を組み込み、COS-7 細胞に形質転換し、NAT 発現細胞 (COS/NAT 細胞) を得た。COS/NAT 細胞を 48 時間培養し、被験物質を添加し、24 時間共培養した。回収した COS/NAT 細胞を、ホモジナイズし、遠心上清を回収した。上清に含まれる NAT 活性を HPLC にて測定した。その結果、NAT 活性化因子が濃縮される画分を、イオントラップ型 LC-MS 分析にかけ、配列を同定したところ、3 種のペプチド配列を見出した。見出した配列を持つペプチドを人工合成したところ、3 種のうち 2 種のペプチドが有意に NAT 活性を上昇させることを確認した。

### Activated factors of serotonin-N-acetyltransferase in rice peptides

○Tadashi Hatanaka<sup>1</sup>, Chie Moritani<sup>2</sup>, Kayoko Kawakami<sup>2</sup>, Akiko Fujita<sup>3</sup>, Koji Kawakami<sup>2</sup>, Hiroshi Shimoda<sup>4</sup>, Misugi Uraji<sup>1</sup>, Kun Wan<sup>1</sup>, Seiji Tsuboi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>RIBS, Okayama, <sup>2</sup>Shujitsu Univ., <sup>3</sup>Satake Co. Ltd., <sup>4</sup>ORIZA OIL & FAT CHEM. Co. Ltd.)

**Key words** rice, peptide

## 2P-1p100 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のホウ酸走化性に関わる新規センサータンパク質の解析

○緋田 安希子, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一  
(広島大院・先端物質)  
jun@hiroshima-u.ac.jp

[目的] 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は土壌伝染性の植物病原菌である。現在有効な感染防除法はなく、深刻な農作物被害を引き起こしている。*R. solanacearum* は走化性を駆使して植物に感染することから、走化性の知見を応用することで新たな感染防除法が提案できているのではないかと考えた。そのためにはまず、*R. solanacearum* の走化性について詳しく知る必要がある。これまでの解析の中で、*R. solanacearum* はホウ酸に対して非常に強い走化性を示すことが偶然にも発見された。ホウ酸走化性はこれまでに報告のない走化性であり、非常に興味深い。そこで本研究では、ホウ酸走化性に関わるセンサータンパク質の特定および当該タンパク質に関する詳細な解析を行った。

[方法・結果] ゲノム情報より *R. solanacearum* は 22 種類の走化性センサータンパク質 (Mcp) を保有すると予測される。そこで、22 *mcp* 遺伝子単独破壊株ライブラリを構築し、本ライブラリによるホウ酸走化性センサーの特定を試みた。その結果、22 種類の Mcp のうち Mcp11 がホウ酸走化性に関与することが明らかとなった。ホウ酸 Mcp に関する知見はなく、Mcp11 は新規のタンパク質であるといえる。そこで、Mcp11 に関してより詳細な解析を試みた。Mcp11 のリガンド結合領域 (LBD) のみを発現・精製し、*In vitro* にて Mcp11 とホウ酸の結合を測定した。円二色性 (CD) 測定および等温滴定熱量測定 (ITC) による解析の結果、ホウ酸は Mcp11 の LBD に直接的に結合することが明らかとなった。このようにホウ酸を直接感知するタンパク質は植物病原菌に特徴的であることが Protein-BLAST の結果より示唆された。ホウ酸に対して走化性を示すことによるような意義があるのかについては現在解析中である。

### Analysis of novel sensory protein for chemotaxis to boric acid in *Ralstonia solanacearum*

○Akiko Hida, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** chemotaxis, boric acid, *Ralstonia solanacearum*, methyl-accepting chemotaxis protein

## 2P-1p101 *Ralstonia solanacearum* の twitching motility 阻害剤の探索

○伊達 修平  
(広島大院・先端物質)  
jun@hiroshima-u.ac.jp

[目的] 青枯病菌は土壌伝染性の植物病原菌であり、有効な感染防除法が必要とされている。土壌中の青枯病菌は swimming による水相中の移動および twitching による固体表面の移動を駆使して植物へ接近、感染すると報告されている。これらの運動を阻害することで、農薬に偏重しない感染防除法が可能になるかもしれない。そこで本研究では、特に twitching に着目し青枯病菌の twitching 阻害剤の探索を行った。

[結果] 供試株として MAFF106611 株を用いて、6 種類の化合物における twitching 阻害効果を解析した。その結果、D-リンゴ酸、D-酒石酸に阻害効果がみられた。D-リンゴ酸については増殖の抑制がみられたため、この twitching 阻害効果は増殖の抑制に起因していると考えられた。一方、D-酒石酸については増殖の抑制が見られなかったため、別の twitching 阻害機構が存在すると考えられる。現在、twitching 阻害の詳細な作用機序の解析を行っている。

### Study on inhibitor of twitching motility in *Ralstonia solanacearum*

○Shuhei Date  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** twitching motility, *Ralstonia solanacearum*, malic acid, tartaric acid

## 2P-1p102 *Rhodococcus* 属細菌を用いたヒ素検出システムの構築

○富田 尚樹<sup>1</sup>, 荒井 佑哉<sup>2</sup>, 佐藤 舜<sup>2</sup>, 庄司 有理<sup>2</sup>, 平岡 知之<sup>1</sup>, 福田 雅夫<sup>3</sup>, 遠藤 銀朗<sup>2</sup>, 宮内 啓介<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>東北学院大院・工・環境建設工, <sup>2</sup>東北学院大・工, <sup>3</sup>長岡技科大)  
kmiya@mail.tohoku-gakuin.ac.jp

[背景と目的] ヒ素による土壌汚染、地下水汚染は、地球規模で大きな環境問題となっており、日本においてもヒ素は検出頻度の高い汚染物質の一つである。ヒ素は 5~50 mg を摂取すると中毒症状を起こすだけでなく、数十 ppb の低濃度であっても長時間の摂取によって慢性中毒を引き起こし、発癌等の原因となる為、ヒ素による環境汚染実態の早急な解明が必要である。本研究では、生物学的なヒ素検出方法の確立を目的として、細菌を用いた高感度のヒ素検出システムの構築と検証を行った。

[実験方法] ヒ素耐性を示す細菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のヒ素耐性遺伝子群 *arsRBC* のうち、*arsR* とその上流の *arsR* 結合領域を PCR で増幅し、発光タンパク質をコードする *luxAB* の上流に挿入してレポータープラスミドを構築した。このプラスミドを *R. jostii* RHA1、*R. erythropolis* IAM1399 及びそれらのヒ素耐性遺伝子群破壊株に導入した後、さまざまなヒ酸および亜ヒ酸濃度下で培養し、濁度 (OD<sub>600</sub>) と発光量を測定した。発光量の平均値を OD<sub>600</sub> で割ったものを単位菌数あたりの発光量とした。

[結果と考察] レポータープラスミドを保持する RHA1 株、IAM1399 株、およびそれらのヒ素耐性遺伝子群破壊株はヒ酸または亜ヒ酸存在下で発光した。また、野生株に比べてヒ素耐性遺伝子群破壊株の方が感度が高いことも明らかになった。IAM1399 株のヒ素耐性遺伝子群破壊株を用いた時、環境基準である 0.01mg/L 以下のヒ素の検出が可能であった。また、培地にリン酸を加えることで亜ヒ酸とヒ酸を区別して検出できる可能性が示された。

### Arsenic detection system using *Rhodococcus* strains

○Naoki Tomita<sup>1</sup>, Yuya Arai<sup>2</sup>, Shun Sato<sup>2</sup>, Yuri Shoji<sup>2</sup>, Tomoyuki Hiramata<sup>1</sup>, Masao Fukuda<sup>3</sup>, Ginro Endo<sup>2</sup>, Keisuke Miyauchi<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tohoku Gakuin Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Tohoku Gakuin Univ., <sup>3</sup>Nagaoka Univ. Technol.)

**Key words** arsenic, biosensor, *Rhodococcus*

## 2P-1p103 海洋生物試料からの好氣的セレン酸還元性微生物の分離と培養

○阪口 利文<sup>1,2</sup>, 内田 菜月<sup>1</sup>, 馬越 智也<sup>2</sup>, 岡村 好子<sup>3</sup>, 石川 輝<sup>4</sup>, 田口 和典<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>県大広島・生命科学, <sup>2</sup>県大広島・環境科学, <sup>3</sup>広島大院・先端物質, <sup>4</sup>三重大院・生資)  
sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp

**【背景・目的】**セレンは地殻や生体構成元素として地球上の地圏・生物圏に幅広く分布する元素である。動物では生命活動の必須元素であると考えられており、特異的な代謝プロセスの存在が示唆されている。微生物においても嫌気呼吸における最終電子受容体として利用できることが判明しており、異化代謝によるセレン酸の還元から元素体セレンナノ微粒子の形成が可能である。更に、異化代謝とは異なる硫酸同化や共代謝的なプロセスによってセレン・テルルオキシアニオンを還元できる微生物の存在が明らかになってきている。そこで、本研究では陸上に比して多様な生物相、環境を有する海洋に着目し、海洋底質、海洋生物試料などから好氣的な条件下でのセレン酸還元が可能な微生物の分離と分離株の諸性質について調査した。

**【方法・結果】**本研究では三重大学練習船勢水丸による海洋調査航海で採取された様々な試料を用いて目的微生物の分離を行った。あらかじめ作製したセレン酸を含む分離培地のプレートやバイアルに採取試料を船上で素早く植菌した。その後、ラボに持ち帰り25°Cでインキュベートし、元素体セレン特有の赤色コロニーの形成を指標として目的微生物を分離した。分離後、各分離株に対して光学・電子顕微鏡による観察、生化学特性、16SrDNAに基づく分子系統解析などを調査した。また、セレン酸添加時の好氣的条件下での還元とセレンナノ微粒子の形成、各種セレン・テルルオキシアニオンに対する生育について調査した。その結果、遠州灘で採取されたサルバから *Acidovorax* 属に分類される (SSe6-1株) や東シナ海のトロールで漁獲されたカナド内蔵から (KND-1株) 好氣条件下でセレン酸の還元が認められた分離株が得られた。さらに、分離株によるセレンナノ微粒子の形成が確認され、嫌気プロセスを必要としないセレン酸の除去・回収への活用が期待された。

### Isolation of marine microbes capable of reducing selenate under aerobic condition

○Toshifumi Sakaguchi<sup>1,2</sup>, Natsuki Uchida<sup>1</sup>, Tomoya Umakoshi<sup>2</sup>, Yoshiko Okamura<sup>3</sup>, Akira Ishikawa<sup>4</sup>, Kazunori Taguchi<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima, <sup>2</sup>Dept. Environ. Sci., Pref. Univ. Hiroshima, <sup>3</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

**Key words** *Acidovorax* sp., marine microbe, selenate reduction, biomineralization

## 2P-1p104 ジノテフランが微生物生態系に及ぼす影響評価

○伊藤 秋実, 脇屋 香, 狩山 美沙紀, 小橋 興次, 坂上 吉一, 早坂 大亮, 森 美穂  
(近畿大・農)  
mori\_m@nara.kindai.ac.jp

**【背景と目的】**現在、ジノテフランを有効成分とした農薬スタークルは、植物への浸透移行性に優れ、病害虫に高い殺虫効果を発揮する殺虫剤として世界的に普及している。しかし、農薬の使用は対象とする病害虫や作物以外にも周辺の生態系に影響を及ぼすことが危惧されている。そこで本研究では屋外に人工水田を用意し、農薬未散布のコントロール区とジノテフラン散布区に分け、水田生態系において、ジノテフランが微生物にどのような影響を与えるのかを経時的に調査した。

**【方法】**幅1.2 m、長さ2.8 mの人工水田を設置し、2014年と2015年の5月から9月までの期間にそれぞれ計10回(0と2時間後、1、3、7、14、28、56、91と119日後)のサンプリングを行った。ランダムに20箇所から計2 Lの水と5箇所から計200 gの土壌を採取し、試料として用いた。各試料の細菌数と真菌数は寒天平板塗抹法により、ジノテフラン濃度はLC-MS/MSにより算出した。水試料については、COD、全リン、全窒素を測定した。

**【結果】**コントロール区とジノテフラン散布区の水と土壌試料において、細菌数および真菌数の経時変化に顕著な差は認められなかった。水質測定の結果、測定した3項目については2つの区画で有意差は認められなかった。水試料のジノテフラン濃度については、散布後2時間後が最大となり1日後、3日後に大きく減少した。土壌試料のジノテフラン濃度は、1年目と比較して2年目の全サンプリング日程で上回った。現在、各区画からの分解菌の単離を試みている。

### Impact assessment dinotefuran on the microbial ecosystem

○Akimi Ito, Kaori Wakiya, Misaki Kariyama, Kouji Kobashi, Yoshikazu Sakagami, Daisuke Hayasaka, Miho Mori  
(Fac. Agric., Kinki Univ.)

**Key words** dinotefuran, impact assessment, neonicotinoid pesticide

## 2P-1p105 ネオニコチノイド系農薬のイミダクロプリドが微生物生態系に及ぼす影響評価

○脇屋 香, 伊藤 秋実, 狩山 美沙紀, 小橋 興次, 坂上 吉一, 早坂 大亮, 森 美穂  
(近畿大・農)  
mori\_m@nara.kindai.ac.jp

**【背景と目的】**農薬は作物の品質を保証し、収量を確保するうえで必要不可欠なものとなっている。しかしながら、その生態リスク評価は、魚類ではメダカやコイ、甲殻類ではオオミジンコ、藻類ではアオミドロといったように、限られた生物種に対してのみ行われている。現在、世界で広く普及しているネオニコチノイド系農薬の中にはミツバチが大量死・大量失踪する蜂群崩壊症候群の原因と疑われているものがあり、イミダクロプリドは欧州で2013年から2年間という期限付きで使用と販売が禁止されたネオニコチノイド系農薬の一つである。本研究では、屋外に人工水田を用意し、農薬未散布のコントロール区とイミダクロプリド散布区において、微生物の数や種類にどのような影響を与えるのかを経時的に調査した。

**【方法と結果】**イミダクロプリド粒剤を5 Lの土が入った、横30 cm、縦60 cm、深さ3 cmの育苗箱一箱に終濃度が20 µg/Lになるように50gずつ散布し、イネ株に24時間暗所で浸透移行させた後、人工水田のイミダクロプリド散布区に移植した。試験期間は当該地域の農事暦に合わせ、2014年と2015年の5月下旬から10月下旬とし、その期間にそれぞれ経時的にサンプリングを行った。ランダムに20箇所から計2 Lの水と5箇所から計200 gの土壌をそれぞれ採取し、混合したものを試料として用いた。水試料と土壌試料の細菌数と真菌数を寒天平板塗抹法により算出した。イミダクロプリドの濃度は、各試料から抽出・濃縮後にLC-MS/MSで測定した。農薬未散布区とイミダクロプリド散布区を比較した結果、水試料と土壌試料の細菌数と真菌数に著しい差は認められなかった。2年目の土壌試料中のイミダクロプリド濃度は、1年目に比べて減少する速度が遅くなり、119日後も約2 µg/Lの残存がみられた。

### Impact assessment of neonicotinoid pesticide imidacloprid on the microbial ecosystem

○Kaori Wakiya, Akimi Ito, Misaki Kariyama, Kouji Kobashi, Yoshikazu Sakagami, Daisuke Hayasaka, Miho Mori  
(Fac. Agric., Kinki Univ.)

**Key words** imidacloprid, neonicotinoid pesticide, impact assessment

## 2P-1p106 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化

○高 未麗<sup>1</sup>, 村澤 友紀恵<sup>2</sup>, 松村 吉信<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>関西大院・理工, <sup>2</sup>関西大・化生工, <sup>3</sup>関西大・ORDIST)  
ymatsu@kansai-u.ac.jp

<目的>ポリカーボネート樹脂などの原料であるビスフェノール A(BPA)は、内分泌攪乱物質として生態系に悪影響を及ぼすことが危惧され、近年では水環境での合成樹脂汚染も深刻化し、これらを併せ持った対策が求められている。当研究室ではBPAを完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、BPA分解に関わる *bisdAB* がプラスミド pBAR1 にコードされていることを明らかにした。AO1株は多様な芳香族化合物も分解できる、幅広い環境汚染物質分解菌として期待される。一方、AO1株からBPA分解能を失ったAO1L株が単離され、分解能の不安定性がその活用の障害となっており、その一因にpBAR1の遺伝子構造の不安定性が予想された。本研究では次世代シーケンサーを用いてAO1株のゲノム構造を明らかにし、分解能の向上、ならびにその安定化を試みた。

<方法と結果>AO1株のゲノムDNAを次世代シーケンサー(Illumina)で解析し、断片配列をCLC Genomics Workbench(QIAGEN)で解析した結果、76 contigs、総塩基数約5.1 Mbが解明された。RAST serverで遺伝子機能を予測した結果、70遺伝子が芳香族化合物分解に関与し、新たなBPA分解関連酵素遺伝子の存在も予想された。総塩基数80,317 bpのpBAR1では67遺伝子が推定され、BPA分解関連遺伝子として *bisdAB* と *adh*, *lsd*, *bisdF*、有機塩素化合物分解に関わる *had* が確認された。また、14個のトランスポザーゼ遺伝子と21個の接合伝達に関わる遺伝子も推定され、pBAR1の約半数がDNA可動に関わるものであった。次に、BPA分解関連遺伝子を保持する組換えプラスミドをAO1株に導入し、AO1株のBPA分解能の向上を試みたが、顕著なBPA分解能の増強は確認できなかった。一方、AO1L株にこの組換えプラスミドを導入した結果、BPA分解能は回復した。今後は高発現プロモーターを用いてプラスミドを改良し、BPA分解能の向上を試みる予定である。

### Improvement on the pollutant-degradation activity of *Sphingomonas bisphenolicum* AO1.

○Miryo Koh<sup>1</sup>, Yukie Murasawa<sup>2</sup>, Yoshinobu Matsumura<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., <sup>2</sup>Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., <sup>3</sup>ORDIST, Kansai Univ.)

**Key words** bisphenol A, biodegradation, genome, *Sphingomonas*

## 2P-1p107 炭化水素分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 を活性化させる共生微生物の探索

○野濱 元輝, 荒木 希和子, 久保 幹  
(立命館大院・生命科学)  
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

**[背景と目的]** 炭化水素分解菌である *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 は難分解性長鎖シクロアルカンを唯一の炭素源として生育できる。しかし、*R. erythropolis* を用いた炭化水素汚染土壌の浄化実験では、3週間程度で菌数が減少して炭化水素分解の効率が低下し、菌数と分解能を長期間維持できないという課題がある。

これを解決する方法として生物の共生に着目した。生物には、異なる種が共存することにより、生存率や適応度が工場する共生関係が存在することが知られている。したがって微生物同士の共生によりバイオレメディエーションの効率を高められるのではないかと考えた。本研究では細菌との共生が炭化水素分解菌 *R. erythropolis* を活性化させるかを検証することを目的とした。

**[方法]** *R. erythropolis* の活性を調べるため、*Bacillus subtilis* (natto) TAKAHASHI とそれぞれ共培養実験を行った。三角フラスコに 1/10 LB 液体培地 100 mL 入れ、*R. erythropolis* と *B. subtilis* (natto) をそれぞれ  $1.0 \times 10^6$  cells/ml ずつ植菌した。また、コントロールとして *R. erythropolis* のみの  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 植菌した系を作製した。この菌液を振とう培養 (120 rpm, 30°C, 48 h) 後、さらに 1/10 LB 固体培地に 100  $\mu$ l ずつ植菌し、静置培養 (30°C, 48 h) した後に菌数を測定した。同様の実験を炭化水素分解菌である *Gordonia terrae* NDKY76A と *B. subtilis* (natto) を用いて行った。

**[結果・考察]** *B. subtilis* (natto) と共培養を行ったとき、*R. erythropolis* の菌数は  $8.2 \times 10^8$  cfu/ml となり、コントロールの菌数  $2.5 \times 10^8$  cfu/ml と比較すると共培養の方が菌数が増加したことが分かった。*G. terrae* と共培養をさせたときの菌数が  $7.0 \times 10^7$  となり共生することが分かった。これより *B. subtilis* (natto) との共生により炭化水素分解菌を活性化させることが明らかとなった。

### Searching co-bacteria to activate the capacity of *Rhodococcus erythropolis* NDKK6

○Genki Nohama, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** *Rhodococcus*, *Bacillus subtilis*

## 2P-1p108 ノニルフェノールモノオキシゲナーゼ遺伝子を用いたビスフェノール S の分解

○近成 直斗<sup>1</sup>, 栗岡 純平<sup>1</sup>, 田村 亮太<sup>1</sup>, 加藤 太郎<sup>2</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>, 武尾 正弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県大院・工, <sup>2</sup>鹿児島大学大学院理工学研究科)  
dcefr7m7@gmail.com

ビスフェノール S (BPS) は、極めて耐熱性の高いスーパーエンジニアリングプラスチックの合成原材料としてその生産量・使用量が増加しつつある。しかしながら、これまでの研究により、本物質は極めて難分解であることが知られている。我々は、内分泌攪乱物質・ノニルフェノール (NP) の分解の研究で、*Sphingomonas* 属細菌から NP モノオキシゲナーゼの遺伝子 (*nmoA*) のクローニングに成功し、この酵素が NP ばかりでなく、BPS をも分解することを明らかにした。本研究では、芳香族化合物の分解特性の異なる 3 つの *Pseudomonas* 属細菌にこの遺伝子を導入し、BPS からの代謝物の分析による分解経路の決定と宿主の代謝経路を活用した分解の改善を検討した。

まず、広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 に *nmoA* を組み込んだ組換えプラスミド pBNMOA-F をエレクトロポレーション法により *P. putida* の 3 株 (KT2440 株, MT4 株, TSN1 株) に導入した。0.2mM の BPS を含む無機塩培地ベースの菌体懸濁液を振盪培養 (30 度, 150rpm) して分解試験を実施し、その上清を HPLC 分析あるいは代謝物の分取後に <sup>1</sup>H-NMR 分析して、BPS 分解の評価と代謝物の構造を決定した。

代謝物の分析により、BPS は NP モノオキシゲナーゼにより 4 位 (あるいは 4' 位) の炭素が酸化され、炭素-硫黄結合が開裂してハイドロキノンとフェノールスルホン酸に分解されるか、あるいは NIH シフト化合物である 2,5,4'-トリヒドロキシフェニルスルホンに変換されることがわかった。この物質も同じ酵素、同じ機構でハイドロキノンとハイドロキノンスルホン酸へと分解された。一方、主要な代謝物であるハイドロキノンを分解できる TSN1 株に *nmoA* 遺伝子を導入した株は、0.2mM の BPS をハイドロキノンの蓄積なく 2 時間程度で速やかに分解できた。

### Biodegradation of Bisphenol S using a Nonylphenol Monooxygenase Gene

○Naoto Chikanari<sup>1</sup>, Junpei Kurioka<sup>1</sup>, Tamura Ryota<sup>1</sup>, Daiichiro Kato<sup>2</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup>, Masahiro Takeo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

**Key words** biodegradation, bisphenol S, hydroquinone, NIH shift

## 2P-1p109 *Penicillium* sp. CHY-2 株による模擬汚染土壌中の 4-tert-ブチルフェノール分解特性

○小野寺 瑠依, 梅本 穂乃香, 矢島 由佳, 張 倍誌  
(室工大院・工・環境創生)  
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

**[背景および目的]** アルキルフェノール類の一つである 4-tert-ブチルフェノールは、水生生物への毒性などが確認されている。4-tert-ブチルフェノールは石油の精製工程などで用いられており、石油精製工場の周辺地域では汚染水の漏れなどにより土壌汚染が発生する可能性がある。発生した汚染土壌の除去方法として、分解微生物を添加し汚染物質の除去を行うバイオオーグメンテーションがある。本研究では、*Penicillium* sp. CHY-2 株 (GeneBank accession number AB980801) を用いて模擬汚染土壌中の 4-tert-ブチルフェノール分解実験を行い、その分解能を調査した。

**[方法]** 室蘭工業大学構内の土壌を用いて調製した 4-tert-ブチルフェノール模擬汚染土壌に、*Penicillium* sp. CHY-2 株を接種した。HPLC (高速液体クロマトグラフ) により 4-tert-ブチルフェノール濃度の経時変化を測定し、CHY-2 株の 4-tert-ブチルフェノール分解能を調査した。また希釈平板法により、土壌中の細菌類および真菌類の生菌数を計測した。

**[結果]** 模擬汚染土壌中の 4-tert-ブチルフェノール濃度の経時変化を測定したところ、CHY-2 株を添加した系において、実験開始から 10 日目以降 4-tert-ブチルフェノール濃度の減少が見られ、21 日目では完全に分解された。また生菌数計測の結果より、CHY-2 株の添加は土壌中の細菌類の生菌数に影響を与えないということが確認された。本研究の結果から、CHY-2 株は模擬汚染土壌中で効果的に 4-tert-ブチルフェノールを分解するということが明らかになった。

### Degradation characteristics with *Penicillium* sp. CHY-2 in a 4-tert-butylphenol-contaminated soil

○Rui Onodera, Honoka Umemoto, Yuka Yajima, Young-Cheol Chang  
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

**Key words** biodegradation, fungus, 4-tert-butylphenol

## 2P-1p110 抗がん剤フルオロウラシルの分解挙動と細胞毒性残存性の検討

○岡山 真哉, 前田 憲成  
(九工大院・生体工)  
toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

**[背景と目的]** 近年、細胞増殖阻害を有している抗がん剤由来の化学物質が環境中で検出されており、正常な生態系に悪影響を与えることが危惧されている。世界のがん患者は増加傾向にあり、これに伴い治療に用いられる抗がん剤の使用量も増加し、抗がん剤による重篤な環境汚染が危惧される。このような環境汚染を防ぐためには、環境中における抗がん剤の生分解挙動の把握は必須であるが、これに関する研究はほとんど行われていない。本研究では、使用頻度が高く、環境中で検出されている抗がん剤フルオロウラシルを標的化合物とし、複合系微生物群の代表である下水汚泥を用いて、細胞毒性評価、生分解性評価、フッ素イオン測定と代謝物の同定を行った。

**[方法]** 1% (w/v) 下水汚泥と 10 mg/L のフルオロウラシルを混合し、30°C、120 rpm で反応させ、HPLC で生分解性評価と生成した代謝物の追跡、ならびにフッ素イオン測定を行った。また、LC-TOF-MS を用いて代謝物の構造同定を試みた。細胞毒性評価として、100 mg/L のフルオロウラシルを添加した LB 寒天培地に、希釈した下水汚泥を散布して、30°C、24 時間静置培養を行った。その後、生菌数測定を行った。

**[結果と考察]** フロロウラシルは、下水汚泥中の微生物群で代謝物に変換され、この代謝物が生成し蓄積されると、フルオロウラシルの分解速度が著しく遅くなった。このことから、この代謝物は下水汚泥中の微生物群に対して強い毒性を示していることが示唆された。また、細胞毒性評価では、フルオロウラシル含有プレート上での生菌数が、対照物と比べ約 100 倍少なかったことから、環境中の微生物群に対しても、高い細胞毒性を示すことがわかった。フッ素イオンの量は、最終的には添加したフルオロウラシル相当モル分が検出されており、無害化されていることが示唆された。

### Relationship between biodegradability and residual cytotoxicity of 5-fluorouracil, an anticancer drug

○Shinya Okayama, Toshinari Maeda  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

**Key words** anticancer drug, biodegradation, fluorine ion, cytotoxicity

## 2P-1p111 *Dehalococcoides* 共生微生物の獲得とトリクロロエテン嫌氣的脱塩素化への利用

○會田 悠人<sup>1</sup>, 池上 健太郎<sup>1</sup>, 矢木 修身<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>東京大学)  
yohda@cc.tuat.ac.jp

【目的】*Dehalococcoides* 属細菌は、土壤汚染の主要な原因物質であるクロロエテン類をエテンまで完全に嫌氣的脱塩素化できる唯一の微生物である。しかし、単独での培養が非常に困難であり分解能も低く、培養や実用化には共生菌の存在が必須である。本研究では、*Dehalococcoides* 属細菌の生育に必要な共生菌を獲得し、効率的な *Dehalococcoides* 属細菌培養系を構築し、バイオオーグメンテーションへの利用を目的としている。

【方法】*Dehalococcoides mccartyi* IBARAKI 株を含む混合培養系(1)から、シェイクアガー法により、共生菌を獲得した。これらの共生菌と *D. mccartyi* UCH-ATV1 株を混合培養した。クロロエテン類の分解はガスクロマトグラフィーによる測定で確認した。また、菌叢及びゲノム解析を、次世代シーケンサーを用いて行った。

【結果・考察】 UCH-ATV1 株は製品評価技術基盤機構と共同で単離した *Dehalococcoides* 属細菌であり、トリクロロエテンをエテンまで完全に脱塩素化可能である。本菌、単独ではクロロエテン類の分解は非常に遅いが、獲得した共生菌と混合培養を行うことで脱塩素化を促進することに成功した。この培養系の菌叢解析の結果、*Petrimonas*, *Desulfovibrio*, *Dehalococcoides*, *Clostridium* の4種類存在することが明らかとなった。また、PacBio RSII による解析データから UCH-ATV1 株の全ゲノム配列を決定できた。

(1) Yohda M. et al. Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. *J Biosci Bioeng.*

## Isolation of symbiotic microorganisms for *Dehalococcoides* and application for anaerobic dechlorination of trichloroethene

○Yuto Aita<sup>1</sup>, Kentaro Ikegami<sup>1</sup>, Osami Yagi<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Univ. Tokyo)

**Key words** bioremediation, *Dehalococcoides*, anaerobic bioremediation, trichloroethylene

## 2P-1p112 シアン分解能を有する *Pedobacter* 属細菌の単離と解析

○寺田 彩音<sup>1</sup>, 小松 大祐<sup>2</sup>, 西村 実<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>株式会社アイ・エス・ソリューション)  
ayane.terada@yohda.net

【諸言】工場等から環境中に排出されるシアン化合物(以下シアン)は、細胞内呼吸阻害を引き起こす毒性の高い物質であり、土壤・地下水汚染の原因となっている。シアンで汚染された土壤の浄化法の1つとして、微生物の生分解能を利用したバイオレメディエーションが挙げられる。特に、分解能を有する微生物を外部に培養し、汚染サイトに投入するバイオオーグメンテーション法は、確実な浄化が期待されている。そこで、本研究ではバイオオーグメンテーション法に有用なシアン分解菌を獲得することを目的とした。微生物によるシアン分解が確認されたシアン汚染地下水を対象とし、16S rRNA 及びシアン分解酵素遺伝子の解析によりシアン分解菌を同定した。更に、シアン分解菌の単離培養を試みた。

【実験方法及び結果】微生物によるシアン分解が確認されたシアン汚染地下水からゲノム DNA を精製し、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅してシーケンス解析を行った。その結果、地下水中にはシアン加水分解酵素であるニトリラーゼを有する *Pedobacter heparinus* strain DSM 2366 と 97% の相同性を有する微生物の存在が確認された。さらに、汚染地下水から精製したゲノム DNA より *Pedobacter* 属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子が PCR で増幅された。そこで、*Pedobacter* 属細菌が地下水中のシアン分解を担っていると考え、16S rRNA 遺伝子及びニトリラーゼ遺伝子を指標に、ニトリラーゼを有する *Pedobacter* 属細菌を単離した。この菌の培養液にシアン化カリウムを加えると、シアン分解が確認された。今後は、本菌の分解能を調べることで、バイオオーグメンテーションへの利用の可能性を評価する。

## Isolation and characterization of *Pedobacter* sp. which is capable of degrading cyanide

○Ayane Terada<sup>1</sup>, Daisuke Komatsu<sup>2</sup>, Minoru Nishimura<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>In Situ Solution)

**Key words** bioremediation, cyanide, *Pedobacter*, nitrilase

## 2P-1p113 富栄養汽水性佐鳴湖からのアンモニア酸化細菌の単離および特性解析

○杉山 和哉<sup>1</sup>, 工藤 勇人<sup>1</sup>, 田代 陽介<sup>1</sup>, 二又 裕之<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・工, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)  
thfutam@ipc.shizuoka.ac.jp

【背景と目的】富栄養化汽水湖の水質浄化を図る一環として、潜在的浄化能力の発現は重要である。静岡県浜松市に位置する佐鳴湖は全国有数の富栄養化汽水湖であり、これまで窒素循環に関わる微生物生態系の解析を実施した。その結果、底泥表層において脱窒および硝化微生物が最も高密度で生息していることが示された。底泥表層を用いアンモニアを基質とした動力学的解析からは  $K_s$  および  $K_i$  値がそれぞれ 0.14 mM および 2.2 mM であることが示された。佐鳴湖底泥表層において硝化微生物群は低濃度アンモニア酸化の重要な役割を担っていることが示唆された。硝化微生物生態系の理解に向け、硝化微生物の単離および特性解析を目的とした。

【方法】支持体(ポリウレタンスポンジ)を佐鳴湖底泥表層土懸濁液に浸漬し硝化微生物を付着させた。その後支持体を鉛直方向に10個連結し Down-flow Hanging Sponge リアクターを構築した。アンモニア濃度 0.4 mM 含む培地を上方から 1.0 L day<sup>-1</sup> で供給し、通気条件下で連続培養した。2.5cm 角に切り取ったスポンジから DNA を抽出し、real-time PCR によるアンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*) を定量した。DHS リアクターから抽出した液を用いて、混積平板法による硝化微生物の単離を実施した。

【結果】アーキア由来 *amoA* はおよそ  $7 \times 10^7$  copies mm<sup>-3</sup> sponge で維持された一方で、バクテリア由来 *amoA* は培養開始直後でおおよそ  $3 \times 10^3$  copies mm<sup>-3</sup> sponge であり、培養 202 日目でおおよそ  $3 \times 10^6$  copies mm<sup>-3</sup> sponge まで増加した。16S rRNA 遺伝子を用いた相同性解析より、単離株は *Brevibacterium* および *Xanthobacteraceae* に 99% の相同性を示した。また、*amoA* の保有およびアンモニアの消費が確認された一方で、亜硝酸および硝酸の検出は確認されなかった。現在、単離株の動力学的解析を進めている。

## Isolation and characterization of ammonia-oxidizing bacteria from eutrophied brackish Lake Sanaru

○Kazuya Sugiyama<sup>1</sup>, Yuto Kudo<sup>1</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** eutrophication, nitrifying bacteria, brackish lake, Down-flow Hanging Sponge reactor

## 2P-1p114 土壤環境中のリン供給に対する微生物と金属元素の影響解析

○蔣 天翼, 荒木 希和子, 久保 幹  
(立命館大院・生命科学)  
kubo@sk.ritsumeikai.ac.jp

【背景と目的】リン (P) は、全ての生物の生存に必須の栄養素である。しかし、リンは環境中から供給される量に限りがあり、リン供給が植物の成長にとってしばしば制限要因になっている。地球環境中におけるリンの循環を介したリン供給率は、有機物を無機物に分解する土壤微生物の働きによって増加する。しかしながら、土壤中に金属元素 (Fe, Al, Mg など) が存在するとリンを吸着するため、リン供給率は低下することが知られている。われわれのこれまでの研究では、特定の土壤においては総細菌数とリン循環活性は正の相関を示すのに対し、全国の土壤においてはその傾向が見られなかった。そのことから、植物に対するリンの供給率を正確に把握するには、土壤中の金属元素量を測定することが重要であると考えられる。本研究では、土壤中のリン循環活性とリン供給率に対する微生物と金属の影響を調べることを目的とした。

【方法と結果】日本各地の 120 地点から土壤サンプルを採取し、土壤中のリン循環活性、リン供給率と pH, 金属量、微生物量を測定し、これらの関係性について解析した。その結果、微生物の多い土壤にも、リン循環活性が高いものから低いものまで存在し、リン循環の高いところでは、Fe, Al, Ca などの含有量が少なくリンの供給率が高いことがわかった。また、リン供給率は土壤の pH にも影響を受けることが示唆された。このことから、土壤環境中において、植物が利用できるリン供給率には、リン循環に関わる微生物量に加え、土壤に含まれる金属元素量が大きく影響していることが明らかとなった。

## Influences of bacteria and metals on the availability of phosphate in soil environment

○Tianyi Jiang, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** bacteria, phosphate

**2P-1p115 土壌中の金属成分と微生物活性の関係解析**

○Niamatullah Sidiq, 荒木 希和子, 久保 幹  
(立命館大院・生命科学)  
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

**【背景と目的】** 農地の肥沃度を向上させるため、土壌中の細菌数、窒素循環活性(アンモニア酸化活性と亜硝酸酸化活性)、リン循環活性、全窒素(TC)、全炭素(TN)等の解析(SOFIX: Soil fertile index)を行い、データベースの構築を行った。本SOFIXデータベースから、土壌中のTC、TN、およびC/N比の違いにより、細菌数が大きく変動することが明らかとなった。また、土壌中のTC、TN、C/N比を調整することにより、土壌細菌数を増加させることが可能となった。しかしながら、細菌数の増加と窒素循環活性やリン循環活性は必ずしも一致していなかった。本研究では、細菌の生育や活性と関係が深い、土壌中の金属成分に着目し、土壌中の金属成分が窒素循環活性やリン循環活性に及ぼす影響を解析することを目的とした。

**【方法】** 土壌サンプルは、農地を中心に日本各地から採取した。土壌中のTC、TN、金属成分は、それぞれ全有機体炭素計、ケルダール法、および原子吸光法により行った。細菌数測定、窒素循環活性(アンモニア酸化活性と亜硝酸酸化活性)、リン循環活性は、それぞれeDNA法、SOFIX窒素循環活性法、およびSOFIXリン循環活性法により解析した。使用した金属は、植物成長に用いられている範囲に基づいて調整した。

**【結果と考察】** 細菌数は、Mg、Ca、Mn、およびZnを添加することにおいて増加が認められた。一方、Fe添加においては変化がなかった。窒素循環活性においては、CaとFeが抑制傾向に働く傾向が認められたが、Mg、Mn、およびZnにおいては活性化した。これらの金属はアンモニア酸化活性や亜硝酸酸化活性に影響を与えていることが考えられた。一方、リン循環活性においては、Znを添加することにより顕著に活性が向上した。この結果から、Zn添加はリン循環に関与する微生物活性に正の影響を与えることが示唆された。

**Relationship between microbial activity and minerals in soil environment**

○Sidiq Niamatullah, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** bacteria, microbial community

**2P-1p116 アカテガニが示すバイオマス分解活性の解析**

裏 佳織<sup>1</sup>, 知田 真之介<sup>1</sup>, 馬場 保徳<sup>1</sup>, 柳井 清治<sup>2</sup>, ○三宅 克英<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>石川県大・生物資源研, <sup>2</sup>石川県大・生資環)  
miyake@ishikawa-pu.ac.jp

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林では、アカテガニやヨコエビなどの生息がよく観察される。これらの甲殻類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用する。アカテガニやヨコエビは森林物質循環と河口域の生態系(特に魚類生産)の中で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムはほとんどわかっていない。本研究ではアカテガニとヨコエビの新規バイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている。本発表ではアカテガニ消化管由来懸濁液のバイオマス分解活性(特にリグニン分解活性)についての解析とその活性に対する消化管細菌群の貢献度について報告する。

加賀地方や能登地方の水辺林に生息するアカテガニから消化管抽出液を作製し、そのバイオマス分解能力を解析した。セルラーゼ活性やリグニン分解活性を検討したところ、非常に強いグアヤコール酸化活性を検出することができた。我々はいままでにバイオマス分解能力のあるアカテガニ消化管由来細菌群を単離しており、消化管の強いバイオマス分解活性が細菌群に由来するのではと考え、アカテガニを抗生物質添加環境で飼育した。その結果、通常環境で飼育したカニと比べて顕著に低下したグアヤコール酸化活性しか示さなくなった。また因果関係は不明だが、多くの抗生物質処理アカテガニは死んでしまうことが判明した。消化管細菌群はアカテガニの食性と生存に大きな役割を果たしているものと考えている。従前の単離細菌群についての解析も引き続き行っており、こちらについても新規の知見を報告する予定である。

**Study on biomass-degrading activities from gut of herbivorous crustacea, *Chiromantes haematocheir***

Kaori Ura<sup>1</sup>, Shinnosuke Chida<sup>1</sup>, Yasunori Baba<sup>1</sup>, Seiji Yanai<sup>2</sup>, ○Katsuhide Miyake<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., <sup>2</sup>Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ.)

**Key words** biomass, lignin, lignin degradation, *Chiromantes haematocheir*

**2P-1p117 茹で麺排水への酵素剤添加による固形成分への凝集・沈降性付与機構の解明**

○渡辺 昌規<sup>1</sup>, 西山 航生<sup>1</sup>, 塩野 忠彦<sup>2</sup>, 楠 信行<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>山形大院・農, <sup>2</sup>広島県立総合技術研究所・食品, <sup>3</sup>くすのき厨房(株))  
mwata@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

**【目的】** 現在、茹で麺排水は、洗米排水と同様に難分解性であるデンプンを含有しているため、一般排水と比べコスト高になってしまう問題を有している。これまでに演者らは、安価な茹で麺排水処理装置の開発の一環として、食品工業用プロテアーゼ添加による茹で麺排水中固形成分への凝集・沈降性付与について検討を行い、これまでに固形成分表層小麦由来タンパク質特異的な分解、固形成分表層の負のゼータ電位(表面電位)の増大と濁度(NTU)の低下を認めた。しかしながら、本現象に対する工業用プロテアーゼに含有する糖化酵素等、他の酵素の関与については明らかとなっていない。そこで本研究では、詳細な本凝集沈降性付与機構を解明するにあたり、各種工業用酵素処理による排水中固形成分への凝集沈降性付与と添加酵素剤由来のプロテアーゼ、糖化酵素活性との関連性について検討を行った。

**【方法・結果】** 茹で麺排水に対し、各種酵素(工業用計13種)を任意量添加・反応後、5種の酵素剤において、濁度の低下と固形成分の急速沈降が認められた。さらに酵素剤添加後の茹で麺排水中の各種酵素活性の測定を行った結果、プロテアーゼ、 $\alpha$ -グルコシターゼの双方の活性を示した。また、プロテアーゼ活性のみを有するProtease N、グルコシターゼ( $\alpha$ ,  $\beta$ -)活性のみを有するOPTIMASE CX15Lにおいては、濁度の低下と固形成分の急速沈降は認められなかった。これらの結果より、茹で麺排水中固形成分の凝集・沈降性付与現象は、プロテアーゼの作用による固形成分表層の特定タンパク質分解・除去以外に、デンプンの非還元末端に結合しているタンパク質の分離、デンプン表層の水酸基露出による負のゼータ電位形成も $\alpha$ -グルコシターゼの作用として本現象に寄与している可能性を示唆した。現在、重回帰分析による各種酵素活性と本現象との関連について解析を進めている。

**Mechanism of sedimentation and flocculating ability of solid particle in waste water**

○Masanori Watanabe<sup>1</sup>, Koki Nishiyama<sup>1</sup>, Tadahiko Shiono<sup>2</sup>, Nobuyuki Kusunoki<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Yamagata Univ., <sup>2</sup>Hiroshima tech. res. inst., <sup>3</sup>Kusunoki Kitchen Instrument Co. Ltd.)

**Key words** protease for food processing, sedimentation, flocculation, wheat noodle manufacturing

**2P-1p118 ジスプロシウム高吸収能を示す酵母の探索**

見佑 垣田, ○岸田 正夫  
(阪府大院・生環科)  
masyksd@biochem.osakafu-u.ac.jp

現代社会において様々なハイテク製品に利用されている希少金属元素の安定供給に関わる金属マネジメントシステム開発は、年々重要性を増している。近年、それらを都市鉱山といわれる廃棄製品や都市排水などから効率良く回収、再利用する技術開発研究が行われており、その一つとして微生物の生物機能を利用する生物回収法が注目されている。我々の研究グループは、以前より、毒性金属であるカドミウム(Cd)やマンガン(Mn)を吸収する酵母の単離・解析を行っている。今回、レアアースの一種であるジスプロシウム(Dy)を高効率で吸収できる酵母の探索を試みた。ジスプロシウムはネオジウムと共にハードディスクなどの磁気メモリー、MRI(磁気共鳴画像診断装置)、燃料電池自動車のモーターなどの高磁気製品や赤色領域スペクトル線を放出する高輝度放電ランプなどに使用されている極めて重要な金属元素である。

研究室で保存している酵母菌株についてジスプロシウムを添加した完全培地で培養後、培養菌体を回収し、菌体画分に含まれるジスプロシウム量を測定した。また、あまりジスプロシウムを吸収しない*Saccharomyces cerevisiae*を指標菌として用い、*S. cerevisiae*よりも1菌体あたりで高いジスプロシウム含量を示す酵母菌株をスクリーニングした。その結果、野菜農場の土壌を採集されて、保存されていた2菌株(FC-ALT02株およびFC-ALT05株)が単離された。両菌株について完全培地で培養後に集菌し、得られた菌体をジスプロシウム溶液と混合攪拌しながら反応させたところ、菌体画分にジスプロシウムの吸収が認められた。また両菌株の菌体と様々な金属溶液とを懸濁し、その金属の菌体画分への吸収量を検定したところ、特にジスプロシウムに対して高吸収性を示すことが判明した。現在、両菌株の同定とジスプロシウム吸収条件を検討している。

**Screening of yeast strains showing high dysprosium-absorbance**

Kousuke Kakita, ○Masao Kishida  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** yeast, biosorption, dysprosium, rare metal

## 2P-1p119 酵母における酸耐性・塩耐性付与遺伝子の解析と分子育種による耐性強化

○松尾 昭則<sup>1,2</sup>, 鈴木 俊宏<sup>1</sup>, 根宜 香奈子<sup>1</sup>, 橋本 智代<sup>1</sup>,  
五島 徹也<sup>3</sup>, 星野 保<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>広島大院・先端物質, <sup>3</sup>酒総研)  
a-matsushika@aist.go.jp

**【目的】** バイオマスからのエタノールや乳酸の生産コスト低減化のために、前処理・糖化工程で使用される酸や中和で生成する塩に対して耐性が向上した酵母を育種することが重要である。我々は最近、酸や塩などのストレスに強い耐性を示す酵母 *Issatchenkia orientalis* から酸耐性・塩耐性に関わる遺伝子 (*IoGAS1*) を単離し、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において発現させることにより、低 pH 又は高濃度硫酸塩のストレス条件下でエタノール生産性を顕著に向上させることに成功している。本研究では、*IoGAS1* と高い相同性をもつ *S. cerevisiae* 由来 GPI アンカー型タンパク質をコードする *GAS1* の酸耐性・塩耐性効果を、*IoGAS1* と比較することで検討した。

**【方法及び結果】** 転写発現解析により、*I. orientalis* 由来 *IoGAS1* は pH2.0 の条件、*S. cerevisiae* 由来 *GAS1* は pH3.0 の条件で発現量が最大になることが分かった。また、硫酸塩存在下では、pH 値に関わらず、いずれの遺伝子も発現量が上昇することが示された。pH2.3 又は 5.0% の硫酸塩を含む pH2.5 の培地において、*GAS1* 過剰発現株は野生型株よりも増殖能が向上した。さらに、低 pH (pH 2.1) 又は高濃度硫酸塩 (5.0%, pH2.4) の条件下で、*GAS1* 過剰発現株は野生型株に比べてエタノール生産性が 32% 以上増加した。このように、*GAS1* は *IoGAS1* と同様に酵母の酸耐性・塩耐性に寄与することが明らかとなったが、*GAS1* の耐性効果は *IoGAS1* と比較して低かった。

### Characterization of a gene required for tolerance to low pH and salt stress in yeasts

○Akinori Matsushika<sup>1,2</sup>, Toshihiro Suzuki<sup>1</sup>, Kanako Negi<sup>1</sup>, Tomoyo Hashimoto<sup>1</sup>,  
Tetsuya Goshima<sup>3</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>ISC, AIST, <sup>2</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>NRIB)

**Key words** *Issatchenkia orientalis*, acid tolerance, salt tolerance, ethanol fermentation

## 2P-1p120 Process simulation for efficient acetic acid production from nipa sap

○Dung Van Nguyen<sup>1</sup>, Pinthep Sethapokin<sup>2</sup>,  
Harifara Rabemanolntsoa<sup>1</sup>, Eiji Minami<sup>1</sup>, Haruo Kawamoto<sup>1</sup>,  
Shiro Saka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ., <sup>2</sup>On leave from King Mongkut's Instit. Technol. Ladkrabang to Kyoto Univ.)  
saka@energy.kyoto-u.ac.jp

Efficient acetic acid production from nipa sap was proposed as a new environmentally-benign manufacturing process. The results showed that reducing sugars from the sap composed mainly of sucrose, glucose and fructose as hydrolyzed by oxalic acid or invertase can be converted into acetic acid by *Moorella thermoacetica* (formerly *Clostridium thermoacetum*) with high conversion efficiency of 98% as compared with only around 25-30% for the traditional vinegar production. To upgrade the process to pilot scale and analyze its energy consumption, process simulation was accomplished using Pro/II™ software with a nipa sap fed rate of 750 kg/h. The process includes hydrolysis step (by acid or enzyme) and fermentation step. Heat exchangers were used and could recover 1,053 and 1,058 MJ/h in the case of acid and enzymatic pretreatments, respectively. As a result, total energy consumption for the entire process was reduced to 378.7 MJ/h when acid hydrolysis was used and 383.7 MJ/h in the case of enzymatic hydrolysis. Although there were no major differences in the energy consumptions of these hydrolysis methods, oxalic acid shows higher advantage in terms of price. It was also found that regardless of the type of hydrolysis, fermentation step consumed higher energy compared with hydrolysis step. The preliminary results from this process simulation can be useful for further pilot-plant process design of efficient acetic acid production from nipa sap.

### Process simulation for efficient acetic acid production from nipa sap

○Dung Van Nguyen<sup>1</sup>, Pinthep Sethapokin<sup>2</sup>, Harifara Rabemanolntsoa<sup>1</sup>,  
Eiji Minami<sup>1</sup>, Haruo Kawamoto<sup>1</sup>, Shiro Saka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ., <sup>2</sup>On leave from King Mongkut's Instit. Technol. Ladkrabang to Kyoto Univ.)

**Key words** nipa sap, acetic acid, *Moorella thermoacetica*, process simulation

## 2P-1p121 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の効率的培養法の確立

○松岡 友洋<sup>1</sup>, 新谷 政己<sup>2</sup>, 金原 和秀<sup>2</sup>, 吉田 信行<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>静大・工, <sup>2</sup>静大院)  
tnyoshi@ipc.shizuoka.ac.jp

**【緒言】** 備蓄原油から単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は、炭素源および窒素源無添加の無機固体培地 (BM 培地) 上において良好な生育を示す超低栄養性細菌である。本菌は生育に二酸化炭素を要求するが、その際特別のエネルギーの添加を必要としないというユニークな特性を示す。また窒素源については、大気中の微量アンモニアを利用できることが明らかとなっている。最近、低栄養生育時にトレハロースやグリコーゲンなどの糖質を細胞内に蓄積することが判明し、微生物バイオマスとしての利用可能性について検討している。一方で、本菌は BM 固体培地には良好に生育するものの、液体培地での生育が極めて悪く、多くの菌体を得るためには効率的な液体培養法の確立が必要となる。本研究では、スポンジを支持体とした液体培養を試み、同時に培地成分についても検討したので報告する。

**【方法および結果】** 本菌は寒天またはシリカゲルを支持体とした固体培地上で良好な生育を示す。これらの支持体に代わるものとして、市販のポリウレタンスポンジを 6 cm×6 cm×1 cm の大きさに加工し、500 ml 容ビーカー中で 12 ml の BM 液体培地をスポンジに十分に含ませた。初発菌濃度を OD<sub>600</sub> = 0.002 となるように接種し、30℃で静置培養を行った。その結果、スポンジを支持体として用いた系では、スポンジを用いない系と比較して培養液 1 ml 当たりの菌体量が約 2.5 倍に増加した。また、スポンジの厚さが薄いほど培養液 1 ml 当たりの菌体量が増加する傾向が見られた。さらに、従来の BM 培地では窒素源として硝酸ナトリウムを添加していたが、塩化アンモニウムに置き換えることにより菌体の生育が向上した。スポンジの材質、その他の培地成分など培養条件の最適化も行い、アルデヒド脱水素酵素など低栄養条件下で特異的に発現する酵素活性についても検討したので併せて報告する。

### Establishment of effective oligotrophic cultivation system for *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

○Tomohiro Matsuoka<sup>1</sup>, Masaki Shintani<sup>2</sup>, Kazuhide Kinbara<sup>2</sup>, Nobuyuki Yoshida<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**Key words** oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*, liquid culture

## 2P-1p122 *Serratia marcescens* において 2,3-ブタンジオール生産性を増大させる変異の解析

○張 琳<sup>1</sup>, 大槻 隆司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大学・医工農・生環,<sup>2</sup>山梨大学・医工農・生環)  
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

**【背景・目的】** 2,3-ブタンジオール (2,3-BD) はそれ自体もインクなどの原料として使われる有用な化合物であるが、化学産業の重要な基幹化合物である 1,3-ブタジエンに容易に変換できるという特徴がある。1,3-ブタジエンの発酵生産は困難であるが、2,3-BD を生産する微生物は多く報告されている。筆者らは 2,3-BD 生産株として *Serratia marcescens* NBRC3735 株を用いている。NBRC3735 野生株を親株として、UV 変異処理を行い、30%グルコース寛容 2,3-BD 高生産変異株 (30GT) を取得した。本研究では野生株及び変異株のドラフトゲノムを決定し、変異株ゲノム上の変異点の特定を試みた。

**【方法】** 野生株と変異株から精製したゲノム DNA を、HiSeq2500 を用いてペアリード解析し、クリーニングした配列を *S.marcescens* SM39 株の既知ゲノムにマッピングし、サブトラクション解析により変異株ゲノム上の変異箇所を特定した。

**【結果・考察】** 変異株ゲノムにはサブトラクション解析の結果、3ヶ所の 1塩基置換変異が見出された。いずれも ORF 内に見出されたが、アミノ酸置換を伴う変異は 1ヶ所だけであった。推定アミノ酸配列の相同検索結果から、変異遺伝子はイソコリスマターゼスーパーファミリーに属する酵素をコードすると考えられた。変異は遺伝子産物の活性には影響はしないと考えられたが、変異株は高糖濃度寛容となり 2,3-BD 生産性が向上していることから、同変異が遺伝子産物の機能に与える影響に興味もたれた。現在、この遺伝子産物の機能を調査するために、大腸菌での発現精製を行っている。

### Search of mutations associated with increase of the 2,3-butanediol productivity in *Serratia marcescens*

○Lin Zhang<sup>1</sup>, Takashi Ohtsuki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Life/Environ. Sci., Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Univ. Yamanashi, <sup>2</sup>Dept. Life/Environ. Sci., Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Univ. Yamanashi)

**Key words** *Serratia marcescens*, genome mapping, Isochorismatase superfamily

## 2P-1p123 大腸菌グルコース燃料電池の出力向上を目指した糖代謝と呼吸鎖の改変

○福井 早紀<sup>1</sup>, 駒 大輔<sup>2</sup>, 大本 貴士<sup>2</sup>, 尾島 由紘<sup>1</sup>, 東 雅之<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪市大院・工, <sup>2</sup>大阪市工研)  
 azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

バイオマスから得られるクリーンエネルギーの一つとして、バイオ燃料電池に注目が集まっている。しかしその出力はまだ低く、改善が求められている。我々は、バイオ燃料電池の微生物触媒として大腸菌を用い、糖代謝遺伝子の欠損が出力に与える影響について2015年度に報告した。本発表ではそれらの結果を踏まえ、大腸菌のグルコース代謝および呼吸鎖関連遺伝子の染色体上での改変を行い、出力を評価した結果について報告する。出力の評価には各電極溶液量が7.5 mLの2槽型セルを用いた。電極には炭素棒もしくは炭素繊維を用い、18時間電流と電圧を測定し出力評価を行った。また、負極槽のグルコース量をHPLCにより測定しクーロン効率を計算した。染色体上の遺伝子の改変により、触媒として有利な複数の機能を大腸菌に集約することで、燃料電池に最適な菌株の構築を目指している。例えば、電子伝達系の初期段階で働くNdhII遺伝子(*ndh*)をフマル酸還元酵素の遺伝子(*frdA*)上に導入した組換え株を触媒に用いて出力を評価した結果、18時間の総出力は野生型と比べ約20%増加し、クーロン効率は1.5倍となった。これは、*frdA*の破壊によりTCAサイクルの逆回転が抑制され、より多くのNADHが生成したこと、さらに*ndh*の過剰発現により電子伝達系に流入する電子が増えたことが改善に繋がったと考えられる。現在、この株をベースにしてさらなる遺伝子改変を進めている。

1) Koma D, et. al. Appl Microbiol Biotechnol, 93, 815-829 (2012).

### Modification of glucose metabolism and respiration chain for the power improvement of glucose fuel cell using *Escherichia coli*

○Saki Fukui<sup>1</sup>, Daisuke Koma<sup>2</sup>, Takashi Ohmoto<sup>2</sup>, Yoshihiro Ojima<sup>1</sup>, Masayuki Azuma<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., <sup>2</sup>Osaka Mun. Tech. Res. Inst.)

**Key words** *Escherichia coli*, microbial fuel cell, metabolism, TCA cycle

## 2P-1p124 好熱菌発酵産物ならびに電子供与体としての有機物添加時における硝酸態窒素減少と菌叢解析

○荒岡 亮祐<sup>1</sup>, 井藤 俊行<sup>2</sup>, 宮本 浩邦<sup>3,4</sup>, 児玉 浩明<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>千葉大・園芸, <sup>2</sup>京葉プラントエンジニアリング, <sup>3</sup>千葉大院・融合, <sup>4</sup>サーマス)  
 kodama@faculty.chiba-u.jp

窒素は植物の成長に必須の栄養素であり、作物の収量増加に直結する。そのため、現代の農業では化学肥料として硝酸態窒素(NO<sub>3</sub>-N)を土壌に投与し、作物の生産性向上を図っている。その一方で、過剰に投与された硝酸態窒素の土壌中への残留が、水質汚染や連作障害などの原因となっており、過剰な硝酸態窒素の除去は、環境保全型農業の重要課題の一つとなっている。硝酸態窒素の減少は土壌中の微生物により還元的に行われ、亜硝酸、一酸化窒素、亜酸化窒素を経て窒素として大気中に放出される経路(脱窒)と亜硝酸からアンモニアに変化する経路(DNRA; dissimilatory nitrate reduction to ammonium)の二つがある(1)。これらの経路では異なる微生物が様々な還元反応を触媒している。したがって、脱窒とDNRAのいずれの経路が選択されるかは、土壌微生物叢ならびに電子供与体としての有機酸濃度に左右されると考えられるが、その詳しい作用機構は不明である。そこで我々は、モデル菌叢として好熱性発酵産物を、また電子供与体としてコハク酸ならびにエタノールを用いることで、土壌中の硝酸態窒素がどのような経路を選択して減少していくのか、その作用機構の解析を土壌微生物叢の変化に着目して行った。好熱性発酵産物は、これまで土壌改良材として広く使用されており、脱窒作用を持つことが明らかとなっている(2)。菌叢の変化は16Sならびに18S rRNA領域に関して次世代シーケンサーで解析し、バクテリアおよび糸状菌の変化を調べた。その結果、好熱菌発酵産物添加群では脱窒作用を持つバクテリアが増加する傾向が観察され、コハク酸およびエタノール添加群ではDNRA作用を持つ糸状菌が増加する傾向が確認された。

(1)Giles et al. (2012) Front Microbiol. 2012; 3: article 407.

(2)Ishikawa et al. (2013) Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 1349-1359

### Microbial diversity and nitrate reduction in soil amended with compost or organic carbon sources

○Ryosuke Araoka<sup>1</sup>, Toshiyuki Ito<sup>2</sup>, Hirokuni Miyamoto<sup>3,4</sup>, Hiroaki Kodama<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Horticult., Chiba Univ., <sup>2</sup>Keiyo plant engineering co.,Ltd, <sup>3</sup>Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., <sup>4</sup>Sermas co.,Ltd)

**Key words** compost, denitrification, DNRA, microbial diversity

## 2P-1p125 窒素除去を目的とした微生物燃料電池の単離菌を用いた評価

○荒井 雄貴, 井上 千弘, 須藤 孝一  
 (東北大院・環境)  
 inoue@er.kankyo.tohoku.ac.jp

[背景]排水処理と発電を同時に行うシステムとして微生物燃料電池が注目されている。現在、アノード反応に微生物を用い、カソード反応には白金触媒を用いた系が研究の主流となっているが、カソード反応にも微生物を用いることが可能なことが知られている。カソード反応に微生物を用いることで、白金と比較した場合よりも低コストで、またカソード槽の反応次第では、新たな機能を持つ微生物燃料電池の提案が行える。本研究では、細胞外電子伝達系により細胞外から電子を取り込み、硝酸の還元反応を行うことが報告されている*Thiobacillus denitrificans*をカソード反応に用い、硝酸イオンの除去機能を持った微生物燃料電池の評価を行う。

[方法]ポリプロピレン製セル、プロトン交換膜(Nafion117)、グラファイト製電極を用いて、二槽型の微生物燃料電池を作成した。アノード槽では、電子供与体として20mMの酢酸ナトリウムを与え、*Geobacter sulfurreducens*を電子生成微生物として用いた。カソード槽では、電子受容体として30mMの硝酸カリウムを与え、*Thiobacillus denitrificans*を電子消費生物として用いた。燃料電池は嫌気条件、30℃に保ち運転を行った。運転に伴う、電子受容体、供与体の濃度変化を確認するために、定期的にサンプリングを行い、イオンクロマトグラフによる分析を行った。また、電池の性能評価を行うために、外部抵抗を接続し、電圧の変化をデジタルマルチメータを用いて記録した。

[結果]アノード槽、カソード槽ともに微生物を用いた場合にのみ、電流が生成することが確認され、最大電力密度は16mW/m<sup>2</sup>であった。同時に、アノード槽では酢酸イオンの減少が確認され、カソード槽でも硝酸イオンの減少が確認された。これにより、両極の反応に微生物を用いた場合でも電池が機能することが示され、含窒素廃水処理への応用が期待される。

### Evaluation of Microbial fuel cell for denitrification with isolate

○Yuki Arai, Chihiro Inoue, Koichi Suto  
 (Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ.)

**Key words** Microbial Fuel Cells, denitrification, wastewater treatment

## 2P-1p126 蓄電性 Mackinawite の充放電前後における結晶構造解析

○由井 嵐士<sup>1</sup>, 鈴木 漢<sup>2</sup>, 安藤 翔太<sup>3</sup>, 田代 陽介<sup>1</sup>, 小暮 敏博<sup>4</sup>, 二又 裕之<sup>1,2,5</sup>

(<sup>1</sup>静大・創科技学院, <sup>2</sup>静大院・自然科学系教育学部, <sup>3</sup>静大・工, <sup>4</sup>東大院・理学系研究所, <sup>5</sup>静大・グリーン研)  
 thfutam@ipc.shizuoka.ac.jp

バイオミネラルとは生物が生成した無機化合物を指し、骨や貝殻など多様な形態や機能を有することが知られている。これまで本研究室では、微生物燃料電池負極上から単離した*Desulfovibrio* sp. HK-II株がMackinawite (Fe<sub>3-x</sub>S, X=0-0.11)を主成分とする蓄電性の黒色物質(Rechargeable Bio-Material: RBM)を生成することを見出している。バイオミネラルが蓄電性を有するという報告はこれまで無く、本物質は新規蓄電材料として期待されている。そこで本研究では、RBMの充放電機構解明を最終目標とした。そのため、まず本物質および化学合成Mackinawiteの電気化学的および物質科学的特性の比較を行った後、化学合成Mackinawiteの充放電機構解明を試みた。

充放電容量測定結果から、化学合成Mackinawiteの充放電容量はRBMと比較して約2倍高いことが確認された。また、走査電子顕微鏡観察から、共に製構造を有することが確認されたが、RBMは化学合成Mackinawiteと比較して10-100倍大きい物質であった。したがって、化学合成Mackinawiteの充放電容量が高い要因として、製法の微粒子であることから表面積が広く、充放電に伴う酸化還元反応が潤滑に行われる可能性が示唆された。さらに、各物質の形状が異なるのは、化学合成MackinawiteおよびRBMの形成速度が異なることが要因であると示唆された。また、化学合成Mackinawiteの充放電実験前後のX線回折法から、充電時にはMackinawiteであった物質が放電時にLepidocrocite (beta-FeOOH)に変化する様子が確認された。

以上の結果から、我々が見出したバイオミネラルの新たな機能である充放電性の機構解明につながる新規知見を得た。しかし、物質変化に伴う硫黄等の詳細な挙動は不明であり、それらは現在解析中である。

### Effect of charge/discharge on crystal structure of Rechargeable Mackinawite

○Arashi Yui<sup>1</sup>, Kei Suzuki<sup>2</sup>, Shota Ando<sup>3</sup>, Yosuke Tashiro<sup>1</sup>, Tshihiro Kogure<sup>4</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,2,5</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Fac. Eng. Shizuoka Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Sci. Univ. Tokyo, <sup>5</sup>Grad. Sch. Eng. Shizuoka Univ.)

**Key words** Biomineralization, Rechargeable material, *Desulfovibrio*, Mackinawite

## 2P-1p127 微生物燃料電池アノード電極上の微生物群集細胞内代謝解析

○佐々木 大介<sup>1</sup>, 佐々木 建吾<sup>1</sup>, 栢植 陽太<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>金沢大・新学術創成研究機構  
 daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【目的】我々はこれまでに、微生物群集を対象とした網羅的な細胞内代謝解析を実施し、各代謝物の濃度から、群集の代謝状態と機能とを結びつけて評価することに成功している。今回、その技術を微生物燃料電池 (MFC) 内の微生物群集に適用して、電流生成に寄与する代謝状態を群集の構造とともに解明し、発電性能の向上に貢献する知見を得ることを目的とした。

【方法】250 mL 容量のエアカソード型 MFC を、水理学的滞留時間 24h で運転した。代謝状態を比較するため、安定した電流生成が起こる状態とほとんど起こらない状態を創出する目的で、模擬排水の pH を 7.0 と 4.0 に調整した。電流値を指標に、定常状態までそれぞれ運転して、アノード電極上から回収した微生物群集の細胞内代謝物を抽出し、トリプル四重極 LC/MS・GC/MS を用いて解析した。また、16S rRNA 遺伝子を標的とした群集の定量・構造解析を行い、比較した。

【結果】物理化学的パラメータは pH 7.0 と pH 4.0 とで比較的に近い値を示したが、電気化学的パラメータは全く異なる値をとったことから、代謝状態の違いが予想された。代表的な電流生成菌グループである Geobacteraceae のアノード電極での全菌に対する割合は、電流生成が旺盛な pH 7.0 で 26.7%、ほとんど電流生成が起こらない pH 4.0 で 0.1% であった。群集構造解析からは、pH 7.0 のみで電流生成菌が優位に検出された (15.4%)。MFC の群集代謝解析では、我々が以前実施した電流生成菌・*Geobacter sulfurreducens* の網羅的代謝解析の結果と同様に、電流生成の大小に応じた代謝状態の違いが観察された。つまり、電流生成菌の電流生成に呼応した TCA 回路の活性化、NADH/NAD<sup>+</sup> 比の減少、ATP/ADP 比の増加が検出された。このように、人為的に発電性能をコントロールしたラボスケールの MFC において、電流生成量を微生物群集の代謝解析から特徴付けることに成功した。

### Metabolomic profiles from microflora associated with anode electrodes in microbial fuel cells

○Daisuke Sasaki<sup>1</sup>, Kengo Sasaki<sup>1</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Inno., Kobe Univ., <sup>2</sup>Inst. Front. Sci. Init., Kanazawa Univ.)

**Key words** metabolic analysis, microbial community, microbial fuel cell, *Geobacter* spp.

## 2P-1p128 メタノール原料からの共重合ポリヒドロキシアルカン酸生成に向けた *Methylobacterium extorquens* AM1 の代謝改変

○海野 源人, 折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭  
 (東工大院・生命理工)  
 tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】*Methylobacterium extorquens* AM1 株は通性メチロトローフであり、その C<sub>1</sub> 化合物代謝に関して多くの知見があることから、次世代資源であるメタノールからの有用物質生産に有用である。また本菌は環境低負荷型の高分子材料であるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 生成能力を有している。先行研究において、AM1 株の PHA シンターゼを *Aeromonas caviae* 由来広基質特異性 PHA シンターゼ PhaC<sub>Ac</sub> とした AM1C<sub>Ac</sub> 株はコバルト制限条件 (C<sub>1</sub> 代謝が抑制) でのメタノール培養において少量の 3HV (C<sub>3</sub>), 3HHx (C<sub>6</sub>) ユニッドが 3HB (C<sub>4</sub>) ユニッドと共重合した P(3HB-co-3HV-co-3HHx) を生成することが示されたが、PHA 蓄積率、3HHx 分率がともに低かった。本研究では 3HHx ユニッドの供給と取り込みの強化を目指した改変を目的とした。

【方法および結果】染色体上の PHA シンターゼ遺伝子を 3HHx ユニッド重合能が高い PhaC<sub>Ac</sub> 変異体 (PhaC<sub>NSDG</sub>) 遺伝子に置換する相同性組換えを行った。作製した AM1C<sub>NSDG</sub> 株はコバルト非制限条件でも少量の 3HHx ユニッドを含む PHA をメタノールから生合成した。さらに AM1C<sub>NSDG</sub> 株を宿主として、C<sub>1</sub> 代謝中間体である ethylmalonyl-CoA を 3HHx-CoA の前駆体となる butyryl-CoA へ変換する ethylmalonyl-CoA 炭酸酐酵素 (Emd) の遺伝子を染色体に導入した結果、宿主株と比較して PHA 中の 3HHx 分率が増加した。emd および 3HHx-CoA 供給系酵素遺伝子をベクター上で共発現することで、さらなる 3HHx ユニッドの増加が期待される。また、得られた組換え株の半回分培養による高密度培養と PHA 生産を検討する。

### Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* AM1 for production of polyhydroxyalkanoate copolymer from methanol.

○Gento Unno, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui  
 (Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** metabolic engineering, *Methylobacterium extorquens*, Polyhydroxyalkanoate, methanol

## 2P-1p129 脂質系バイオマスからの中鎖ホモポリヒドロキシアルカン酸の生合成とその物性解析

○廣江 綾香<sup>1,2</sup>, 石井 大輔<sup>2,3</sup>, 加部 泰三<sup>4</sup>, 岩田 忠久<sup>2,3</sup>, 田口 精一<sup>3</sup>, 栢植 文治<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>東大院・農生科, <sup>4</sup>JASRI, <sup>5</sup>北大院・工)  
 tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景・目的】中鎖ホモポリヒドロキシアルカン酸 (中鎖ホモ PHA) は、炭素数 6~14 の中鎖 3 ヒドロキシアルカン酸 (3HA) の単一重合体であり、近年新しく報告されているバイオプラスチックの一つである。従来の PHA やポリ乳酸と異なり、透明・軟質なフィルムを合成できるため、新しい用途への利用が期待されている。一方で、生産性の低さと炭素源 (植物由来の精製脂肪酸) の調達課題となっており、本研究ではこれからの課題解決に取り組んだ。また、3HA モノマーの側鎖長と材料物性の関連を明らかにすることを目的とした。

【実験】中鎖ホモ PHA の合成には、脂肪酸分解経路を欠損させた大腸菌を用いた。PHA 合成経路を構築するため、大腸菌に 3 遺伝子 (*acs<sub>ppp</sub>*, *phaC<sub>1pp</sub>*, *phaJ<sub>4pp</sub>*) を導入し、ミネラル培地で 3 日間培養した。このとき、ポリマー炭素源として、単一脂肪酸ナトリウム精製品及び混合脂肪酸粗製品を加え、培養条件や酵素改変によりポリマー生産量の増加を目指した。ポリマーの生産量及び組成は、ガスクロマトグラフィーにて、分子量、熱特性は引張試験及び示差走査熱量測定で決定した。

【結果・考察】脂肪酸精製品からの生産量が 0.14 g/L, 0.008 g/L だったポリヒドロキシデカン酸 P(3HD), ポリヒドロキシドデカン酸 P(3HDD) は、検討後はそれぞれ 2.51 g/L, 1.44 g/L と飛躍的に向上した。また、混合脂肪酸粗製品 (ドデカン酸を 50% 含む) からは、3HDD リッチな (70-80%) 中鎖ヘテロ PHA が合成可能であった。中鎖ホモ PHA の物性は、石油系生分解性ポリマーであるポリカプロラクトンに近く、側鎖が長いポリマーほど、機械強度・融点が上昇した。また、3HDD リッチ PHA は、P(3HD) の物性に近く、中鎖ホモ PHA と同等に利用可能であることが示唆された。

### Biosynthesis of medium-chain-length homo polyhydroxyalkanoate and analysis of its material property

○Ayaka Hiroe<sup>1,2</sup>, Daisuke Ishii<sup>2,3</sup>, Taizo Kabae<sup>4</sup>, Tadahisa Iwata<sup>2,3</sup>, Seiichi Taguchi<sup>5</sup>, Takeharu Tsuge<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, <sup>2</sup>CREST, JST, <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, <sup>4</sup>JASRI, <sup>5</sup>Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

**Key words** polyhydroxyalkanoate, medium-chain-length homopolymer, *Escherichia coli*, fatty acid

## 2P-1p130 3HHx を高含有率で含む共重合ポリエステル遺伝子組換え水素細菌による CO<sub>2</sub> からの生合成

○森 舜也<sup>1</sup>, 丸尾 浩希<sup>1</sup>, 折田 和泉<sup>2</sup>, 福居 俊昭<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近大院・産理工・生環化, <sup>2</sup>東工大院・生命理工)  
 tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) と中鎖 (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) の 3-ヒドロキシアルカン酸 (3HA) が共重合したポリエステル (PHA) は柔軟性に優れた生分解性プラスチックとして期待されている。しかし、共重合 PHA を糖など安価な炭素源から合成できる菌はほとんどなく、また中鎖 3HA 含有率が低いことが課題となっている。福居らがクロニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ遺伝子 *ccr* の導入を始めとする様々な代謝改変を加えた *Ralstonia eutropha* は、フルクトースから 3-ヒドロキシヘキサ酸 (3HHx) を 22.2mol% で含む P(3HB-co-3HHx) を 48wt% 蓄積した。今回、独立栄養条件下での CO<sub>2</sub> からの生合成について検討した。

【実験】*A. caviae* 由来 PHA シンターゼ変異酵素遺伝子 *phaC<sub>NSDG</sub>* の染色体挿入を行った *R. eutropha* 株を宿主とし、*ccr*, *R. eutropha* 由来 (R)-エノイル-CoA ヒドラーゼ遺伝子 *phaJ4a*, およびマウス由来エチルマロニル-CoA テラルボキシラーゼの合成遺伝子 *emd* を高発現させた組換え株 MF01/pBPB-ccrJ4a-emd (以下 MF01 株と称す) を作製した。これを完全無機塩合成培地に接種し、混合ガス (H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>=8:1:1) を基質としてフラスコ培養した。また、アセチル-CoA レダクターゼ (PhaB1) の遺伝子欠損株を宿主に用いた組換え株 MF01ΔB1 も試験した。

【結果】菌体増殖量は MF01 株よりも MF01ΔB1 株のほうが大きく、野生株と遜色無かった。P(3HB-co-3HHx) 蓄積率は MF01 株のほうが高く、培地窒素源である硫酸の濃度を 0.5g/l とした際に 95.1wt% にも達した。3HHx 含有率は MF01ΔB1 株のほうが MF01 株よりもずっと多く、硫酸 1.0g/l の時に 3HHx を 51.7mol% も含有していた。

1) C. Insomphun, H. Xie, J. Mifune, Y. Kawashima, I. Orita, S. Nakamura, T. Fukui, *Metabolic Engineering*, 27, 38-45, 2015

### Biosynthesis of copolymer with high 3-HHx unit from CO<sub>2</sub> by engineered *Ralstonia eutropha*

○Shunya Mori<sup>1</sup>, Kouki Maruo<sup>1</sup>, Izumi Orita<sup>2</sup>, Toshiaki Fukui<sup>2</sup>, Kenji Tanaka<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Humanity-Oriented Sci. & Eng., Kindai Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** *Ralstonia eutropha*, P(3HB-co-3HHx), hydrogen-oxidizing bacteria, CO<sub>2</sub> fixation

## 2P-1p131 *Ralstonia eutropha* 代謝改変株による糖質およびグリセロールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の合成

Zhang Mengxiao, 折田 和泉, 中村 聡, ○福居 俊昭  
(東工大・生命理工学院)  
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】  $C_4$  および  $C_6$  ユニットからなる共重合体ポリエステルである P(3HB-co-3HHx) は柔軟性に優れた環境低負荷型バイオプラスチックであり、通常は植物油・脂肪酸の  $\beta$ -酸化を経由した経路により生成される。本研究ではポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) 生産菌 *Ralstonia eutropha* の複合代謝改変株により糖質やグリセロールを原料とした P(3HB-co-3HHx) 生成を目的とした。

【方法および結果】、広基質特異性 PHA シンターゼ変異酵素遺伝子 *phaC<sub>NSDG</sub>* の染色体挿入とアセトアセチル-CoA レダクターゼ遺伝子 *phaB1* の破壊、グルコース資化性付与、グリセロール資化性強化を施した *R. eutropha* 組換え株を宿主として、クロトニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ遺伝子 *ccr<sub>16c</sub>*、短鎖特異的(R)-エノイル-CoA ヒドラーゼ遺伝子 *phaJ<sub>1c</sub>*、マウス由来エチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼ *emd<sub>100</sub>* を広宿主域ベクターで導入した組換え株はフルクトースおよびグルコースから乾燥菌体重量あたり約 75 wt% で P(3HB-co-11 mol% 3HHx) を生成した。一方でグリセロールからは P(3HB-co-4 mol% 3HHx) を 41 wt% で蓄積したが生成速度が極度に低下し、蓄積に長時間を要したことから、グリセロール炭素源での PHA 生成には *PhaB1* の機能が重要と考えられた。グリセロール原料での共重合ポリエステルの生産性と 3HHx 分率を改善する改変についてさらに検討した。

1) C. Chaytip et al. Metab. Eng. 27: 38-45, 2015

## Metabolic Engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymer from sugars and glycerol

Mengxiao Zhang, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, ○Toshiaki Fukui  
(Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech.)

**Key words** metabolic engineering, *Ralstonia eutropha*, polyhydroxyalkanoate, biomass

## 2P-2p132 CRISPR/Cas を用いた高耐久性酵母の創製

○三ツ井 良輔, 山田 亮祐, 荻野 博康  
(阪府大院・工)  
yamada@chemeng.osakafu-u.ac.jp

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の代謝反応を利用し、様々な有用物質を生産する研究が行われている。しかし、酵母は生育過程で生産する様々な代謝産物や発酵熱により生育阻害を受けることで、有用物質生産の効率が低下する。したがって、様々な代謝産物や発酵熱への高い耐性を有する高耐久性酵母を創製することができれば、酵母による有用物質生産効率の向上が期待できる。そこで本研究では、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas を用いて酵母の熱耐性および pH 耐性の向上を試みた。

【方法および結果】ガラクトース存在下で機能する GAL1 プロモーター下流に *Streptococcus thermophilus* 由来 Cas9 遺伝子を、RPR1 プロモーター下流に酵母ゲノム DNA 上に多数存在する  $\delta$  配列を標的化する guide RNA 遺伝子を配置したプラスミド pUStCas $\delta$  を構築した。プラスミド pUStCas $\delta$  で形質転換した酵母を高温または低 pH 条件下でガラクトースを炭素源とした培地で継代培養することで、熱耐性と pH 耐性が向上したゲノム改変体をそれぞれ取得することに成功した。取得した高耐久性酵母は様々な有用物質の生産に応用可能であると考えられる。

## Improvement of stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR/Cas

○Ryosuke Mitsui, Ryosuke Yamada, Hiroyasu Ogino  
(Dept. Chem. Eng., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, tolerance, CRISPR/Cas, genome engineering

## 2P-2p133 糸状菌の細胞内共生を利用した新規高機能株構築法確立への試み

○角田 貴一, 高野 真希, 星野 一宏  
(富山大院・理工)  
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【背景】自然界には他種微生物の細胞内で生育する微生物が存在している。その一例として糸状菌 *Rhizopus microsporus* を宿主とし、その内部に生育する原核生物 *Burkholderia* sp. の共生に関する研究がされている。この現象により宿主がエンドサイトーシスなどにより細胞外微生物を内包化し、新機能の獲得が期待できる。そこでこの現象を利用し、共生による高機能株構築法を確立させるため、本研究では微生物内生化を行うための条件について検討した。

【方法】モデル微生物として糸状菌 *R. microsporus* を宿主、内生菌にはグラム陰性細菌 *Zymomonas mobilis* を使用した。各菌体の懸濁液を新鮮な培地へ植菌し、共培養することにより自然誘発的に内生させた。導入確認は内生菌に特異的なプライマーを用いた FISH 法と PCR 法により行った。宿主および内生菌の膜電荷は中和滴定により測定した。菌体間の親和性は混合懸濁液の上部の濁度変化を測定することで間接的に求めた。

【結果・考察】自然誘発的な内生化を確認するために、共培養を行い FISH 法と PCR 法により宿主細胞内に *Z. mobilis* の存在が確認できた。しかし、自然誘発的な内生化は安定に実現できないことがわかった。そこで、宿主表面への内生菌吸着能が向上できれば宿主細胞内への取り込み率が向上すると考えられるので各菌体間の親和性について検討した。*R. microsporus* および *Z. mobilis* の膜電荷を測定した結果、pH7 および 6 が中和点であることがわかった。そこで、各菌体間に膜電荷が対極になると考えられる pH6.5 の溶液中で親和力を間接的に測定した結果、混合懸濁液上部の濁度は pH7 のとき最小となったため、*Z. mobilis* が最も多く宿主に吸着したと考えられる。現在、本研究で得られた条件下での接触導入法または、リボソームやプロトプラストを介した導入法についても試みている。

## Novel Construction of Hybrid Strain by Endosymbionts in Filamentous Fungus

○Kiichi Tsunoda, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** *Rhizopus microsporus*, endosymbiont, endobacteria

## 2P-2p134 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテアーゼ AdmA, AdmB の炭素源飢餓条件での役割

○小林 拓嗣, 大岩 達郎, 前田 浩, 竹内 道雄, 山形 洋平  
(農工大院・連農)  
y-yama@cc.tuat.ac.jp

【背景・目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、膜タンパク質である a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) をコードする遺伝子 *admA*, *admB* を持つ。哺乳類 ADAM は、細胞膜上に存在し、特定の膜タンパク質を切断、遊離することでシグナル伝達に関与することが知られている。これまでに我々は、*admA*, *admB* 遺伝子欠損により細胞壁の構成が変化し、シグナル伝達に関わる遺伝子の転写レベルが変化することを示した。これらの結果より、麹菌 ADAM も哺乳類同様に細胞膜上のタンパク質を切断することでシグナル伝達に関わる可能性が考えられたが、これらの変化に直接関与するかは不明である。我々は、麹菌 ADAM と相互作用するタンパク質を同定することでこの問題を解決することにした。

【方法・結果】麹菌 ADAM である AdmA, AdmB の局在を解析するために、GFP との融合タンパク質を発現する株を作製した。作製した株を蛍光顕微鏡による観察や抽出したタンパク質を抗 GFP 抗体によるウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、AdmB-GFP は大部分が液胞で分解を受け、一部が細胞膜上に局在することが示唆された。この解析の過程で、AdmB-GFP は培養時間依存的に発現量が増加することが示され、炭素源により AdmB の発現が誘導されるのではないかと考えた。最小培地で培養後に菌体を回収し、炭素源を含まないもしくは含む培地に移し、発現解析を行った。その結果、AdmB は炭素源を含む培地よりも含まない条件で発現量が増加することが明らかになった。次に、この炭素源飢餓条件で *admA*, *admB* 欠損株とコントロール株を培養し、細胞内外のタンパク質を調製し、SDS-PAGE に供した。その結果、欠損株とコントロール株の間でバンドパターンに変化が見られた。現在、発現が変化したタンパク質の同定と相互作用タンパク質候補の探索を行っている。

## Roles of metalloproteases, AdmA and AdmB, under carbon starvation in *Aspergillus oryzae*

○Takuji Kobayashi, Tatsuro Oiw, Hiroshi Maeda, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata  
(United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, protease, ADAM, carbon starvation

**2P-2p135 微細藻類加水分解液の2-ピロン-4,6-ジカルボン酸発酵培地への適用**

○野口 愛<sup>1</sup>, Htet April N<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>3</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>, 片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 本多 了<sup>1</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科, <sup>4</sup>長岡技科大, <sup>5</sup>日大・生資料, <sup>6</sup>農工大院・工, <sup>7</sup>森林総合研) noguchi@se.kanazawa-u.ac.jp

**【目的】** 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)は樹脂モノマーの前駆物質であるが、その化学的な生産方法は確立されておらず、これまで組換え微生物を用いた生物変換・発酵生産を報告してきた。しかしながら、グルコース1分子あたりのPDC発酵収率は十数%にとどまっており、より変換効率の高い条件の検討(培養条件、遺伝子組み換え等)が必要である。微細藻類は細胞内に多糖(デンプン等)を蓄積することが知られており、糖原料としての利用が検討されている。また、多糖以外にもタンパク質、脂質、灰分等が含まれていることから、本研究では多糖以外の成分がグルコースからのPDC変換に与える影響を検討した。**【方法および結果】** 微細藻類には *Chlorella emersonii* (NIES-2151) を、グルコースをPDCに変換する株として既報と同一の組換え大腸菌を用いた。微細藻類の加水分解は National Renewable Energy Laboratory の手法に従った。糖源は実験系と対照系にそれぞれ藻類加水分解物と試薬グルコースをグルコース濃度で2g/Lになるよう添加した。また、培地の栄養分としてトリプトンと酵母エキスをそれぞれ10g、5gの1倍、1/2倍、1/4倍、1/8倍で添加した4条件を用意し、培養は37℃で行った。すべての条件においてグルコースは12時間以内にすべて消費された。同一の糖源においては、栄養分が低くなればなるほど48時間後の菌体濃度・PDC濃度は低くなったが、同一の栄養条件では実験系の方が対照系よりもそれらが高くなった。グルコース1分子あたりのPDC変換率は実験系において最高で20%となり、既存の知見よりも高い値となった。以上より、微細藻類の加水分解物はPDC生産においてグルコース源だけではなく栄養源としても利用可能であることが示された。

**Application of microalgae hydrolysate to the 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid fermentation media**

○Mana Noguchi<sup>1</sup>, April N Htet<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Shinya Kajita<sup>3</sup>, Eiji Masai<sup>4</sup>, Yoshihiro Katayama<sup>5</sup>, Kazuhiro Shikina<sup>6</sup>, Yuichiro Otsuka<sup>7</sup>, Masaya Nakamura<sup>7</sup>, Ryo Honda<sup>1</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Bio-Appl. Syst. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>5</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>6</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>7</sup>Forestry Forest Products Res. Inst.)

**Key words** 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid, microalgae, hydrolysates

**2P-2p137 試料の有効な前処理とSCF法の組み合わせによる新規微生物の培養化**

○長谷川 智弘<sup>1</sup>, 村山 晃一<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>フタムラ化学) aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【緒言】** 寒天平板培養法(AP法)は微生物の単離培養に広く用いられてきたが、これまでに単離培養された微生物は自然界に存在する微生物の1%前後であり、限界が指摘されている。現在、残された99%の未培養微生物(microbial dark matter)の培養化、利用が求められている。この現状を踏まえ、我々は特殊セルロースフィルムを用いるSCF法<sup>1)</sup>を開発し、土壌等の環境試料を培養した結果、SCF法はAP法と異なる多様な微生物が培養化できることを明らかにした<sup>2)</sup>。今回は、環境試料中の微生物群集を意図的に変化させる前処理を施した系におけるSCF法の有効性について検討した。**【方法と結果】** 筑波大構内で採取した土壌試料を滅菌生理食塩水に懸濁した後、前処理として孔径0.8μmのフィルターで濾過し、試料中からサイズの大きな微生物を排除した。前処理した試料をR2A培地を用いてAP法とSCF法で培養し、各プレートで得られた培養微生物群集をPCR-DGGE法により比較解析した。その結果、前処理を施した試料でもSCF法はAP法と異なる微生物が培養化できた。また、前処理とSCF法を組み合わせることのみで培養化する新規微生物の存在が示唆された。次世代シーケンサーを用いてフィルター濾過前後の土壌試料中の微生物群集を解析した結果、フィルター濾過により未培養菌に属する微生物の割合が著しく増大することが示された。種々検討した結果、フィルター濾過等の試料の有効な前処理と、SCF法を組み合わせることは新規微生物の培養化に有効であることが示唆された。現在、増殖の速い微生物を選択的に排除する前処理を用いた系でのSCF法の有効性について検討中である。1) H25 生物工学会要旨 p.144. 2) H27 生物工学会要旨 p.139.

**Cultivation of new micro-organisms using the combination of effective pretreatments and SCF method**

○Tomohiro Hasegawa<sup>1</sup>, Koichi Murayama<sup>2</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Futamura Chemical Co., Ltd.)

**Key words** agar plate, microbial dark matter, pretreatment, specialized cellulose film

**2P-2p136 酸性条件下における寒天平板培養法の問題点の把握とSCF法の利用**

○高野 力<sup>1</sup>, 安田 竜馬<sup>2</sup>, 村山 晃一<sup>3</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境, <sup>3</sup>フタムラ化学) aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【緒言】** 微生物の単離培養には寒天やゲランガムをゲル化剤として用いる平板培地が一般的に使用されている。しかし、酸性条件下ではゲル化剤が加水分解し、使用困難になる場合がある。これまで、経時的な培地の弾性変化の定量的把握や、その解決策の提案は十分になされていない。本研究では、好酸性菌の培養における従来の平板培地の問題点や使用可能な範囲を明らかにするとともに、その解決策として本研究で開発したSCF法<sup>1)</sup>の利用を試みた。**【方法と結果】** 好酸性菌の単離培養に用いられるGYE培地と9-K培地を用いて種々のゲル濃度、培地濃度、培養温度、pH1~6の条件で寒天とゲランガムの平板培地を調製した。レオメーターを用いて経時的に平板培地の弾性を測定した結果、すべての条件で弾性低下が認められたが、特にpH1や2で弾性が顕著に低下した。種々検討した結果、従来の平板培地では低pH条件下で弾性低下や不均一性が生じるため、長期間の培養には使用できない事が示唆された。また、弾性が8kPa以下になるとコロニー形成が崩れ、単離培養に支障が生じる事が示唆された(弾性に基づき単離培養に使用できる期間の推算が可能)。寒天平板培地とSCF培地で、酸性環境から採取した試料を30℃で培養した。PCR-DGGE法を用いて培養微生物群集を比較解析した結果、SCF法に特異的な細菌の存在が示唆された。現在、SCF法を用い、低pH条件下での長期間培養による環境試料からの好酸性菌の培養化について検討中である。1) H25 生物工学会要旨 p.144

**Problems in agar plate culture method under acidic condition and application of SCF method**

○Chikara Takano<sup>1</sup>, Ryoma Yasuda<sup>2</sup>, Koichi Murayama<sup>3</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Coll. Agro-bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Futamura Chemical Co., Ltd.)

**Key words** acid hydrolysis, acidophilic bacteria, agar, specialized cellulose film

**2P-2p138 SCF法を用いた植物試料からの新規微生物の培養と評価(第2報)**

○小林 和輝<sup>1</sup>, 村山 晃一<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>フタムラ化学) aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【緒言】** 寒天平板培養法(AP法)で単離培養できる微生物は、環境中の1%前後であることが指摘されており、残された99%の未培養微生物(microbial dark matter)の培養化による新たな生物資源の開拓が求められている。この現状を踏まえ我々は、本研究で開発した特殊セルロースフィルムを用いた培養法(SCF法)を、新規微生物の分離源としてワサビなどの種々の植物試料に適用した<sup>1)</sup>。その結果、SCF法とAP法で異なる培養微生物群集が形成され、特にヒノキで大きな違いが現れた<sup>1)</sup>。今回は、SCF法を複数の樹木試料に適用し、培養微生物群集の解析と新規微生物の培養化を試みた。**【方法と結果】** SCF法とAP法を用いて、調製した種々の樹木試料(ヒノキ樹皮、クロマツ樹皮と葉、カエデ樹皮と葉など)を塗布し、培養を行った。試料は(公財)新技術開発財団植物研究園(静岡県熱海市)で採取した。得られたコロニーのDNAを抽出し、DGGE法で培養微生物叢を解析した結果、特にヒノキやカエデの樹皮において、SCF法とAP法で異なるバンドが複数検出された。また、これら樹木試料中の微生物群集と、その培養微生物群集を次世代シーケンサーにより比較解析した結果、SCF法でのみ生育する(もしくは生育しやすい)微生物の存在が示唆された。また、樹木試料中には、新門候補を含む未培養微生物が多く存在していることが明らかとなった。種々検討した結果、樹木試料は新規微生物の分離源として優れており、SCF法と適切に組み合わせることで新規微生物の培養化が期待できることが示唆された。現在、液体窒素を用いた試料の前処理についても検討中である。1) H27 生物工学会要旨 p.138

**Cultivation of novel microorganisms from plant samples using SCF culture method and its evaluation (part 2)**

○Kazuki Kobayashi<sup>1</sup>, Koichi Murayama<sup>2</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Futamura Chemical Co., Ltd.)

**Key words** microbial dark matter, PCR-DGGE, specialized cellulose film, tree bark

## 2P-2p139 最少量の低毒性イオン液体で前処理したバイオマスからの糖化・発酵生産プロセスの開発

○志津田 有成<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 梶田 真也<sup>3</sup>, 政井 英司<sup>4</sup>, 片山 義博<sup>5</sup>, 敷中 一洋<sup>6</sup>, 大塚 祐一郎<sup>7</sup>, 中村 雅哉<sup>7</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術, <sup>3</sup>農工大・生物システム応科, <sup>4</sup>長岡技科大, <sup>5</sup>日大・生資科, <sup>6</sup>農工大・工, <sup>7</sup>森林総合研) ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】現在、石油資源の代替資源として木質系バイオマス資源の利用が期待されている。木質系バイオマスから単糖を製造し燃料や有用物質へ変換する際、効率的な酵素糖化のためにはリグノセルロースの複雑な構造を緩和する糖化前処理を行う必要がある。近年、イオン液体を用いた前処理が提案されている。しかし、イオン液体は高価であり、生体触媒を阻害してしまうという問題があるため、イオン液体量を削減し、かつ低毒性なイオン液体を用いる必要がある。そこで本研究では、イオン液体量を削減するため、共溶媒としてジメチルスルホキシド(DMSO)を添加し、低毒性なイオン液体としてコリン酢酸(ChOAc)を用いて糖化前処理を行った。そして、イオン液体前処理の問題点を改善し、糖化・発酵まで一貫した有用物質生産プロセスの開発を目的とした。

【方法および結果】まず、イオン液体量を削減するため、前処理の際の Biomass:ChOAc:DMSO 比を検討した。結果、Biomass:ChOAc:DMSO=1:1:1 が最適な前処理条件であることが示唆された。次に、in situ 糖化 (イオン液体の存在下でバイオマスを酵素糖化すること) の際のイオン液体の最適な希釈倍率を検討した。結果、最適な希釈倍率は ChOAc の 20 倍量であると示唆された。最後に、上記で得られた条件を用いて、前処理、in situ 糖化を行い、得られた糖化液からの ethanol もしくは 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid の発酵生産まで一貫して実験を行った。その際、ChOAc は発酵微生物に対して毒性を示すことが考えられたため、発酵の前に電気透析にて ChOAc を取り除いた。結果、電気透析後の糖化液を炭素源として、発酵が可能であることが分かった。

## Saccharification and fermentation from biomass pretreated with minimum amount of biocompatible ionic liquid

○Yusei Shizuta<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Shinya Kajita<sup>3</sup>, Eiji Masai<sup>4</sup>, Yoshihiro Katayama<sup>5</sup>, Kazuhiro Shikinakaga<sup>6</sup>, Yuichiro Otsuka<sup>7</sup>, Masaya Nakamura<sup>7</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Bio-Appl. Syst. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>5</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>6</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>7</sup>Forestry Forest Products Res. Inst.)

**Key words** Lignocellulosic biomass, Ionic liquid pretreatment, 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid

## 2P-2p140 遺伝子組換え大腸菌を用いたフェニル乳酸生産に影響を与える遺伝子の発現解析

○宮川 寛規<sup>1</sup>, 川口 秀夫<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 老沼 研一<sup>3</sup>, 高谷 直樹<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>3</sup>筑波大院・生命環境) ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

フェニル乳酸 (PhLA) は、バイオプラスチックなど化成品の工業原料や医薬品原料としての活用が期待されている。これまでに、遺伝子組換え大腸菌を用いた発酵法により、グルコースから 29 g/L の生産性が報告されているが、産業利用に向けたさらなる生産性の向上が求められる。発酵生産による PhLA の収率は、基質となるグルコースの濃度と負の相関関係を示すことが報告されている。しかし、このメカニズムはまだ解明されていない。そこで本研究では、遺伝子組換え大腸菌による PhLA 発酵の生産性の向上を目的に、グルコース供給制限による PhLA 収率増加のメカニズムを解析した。

【方法・結果】グルコース濃度が PhLA 発酵細胞における遺伝子発現に影響を調べるために、初期グルコース濃度が高い条件 (40 g/L) と低い条件 (5 g/L) のフラスコ培養細胞から total RNA を抽出して、各種遺伝子の発現量を定量 PCR により比較解析した。その結果、低グルコース濃度条件では芳香族アミノ酸トランスアミナーゼをコードする *tyrB* の発現量が、高グルコース濃度条件より約 1/2 倍に減少していた。この結果から、低グルコース濃度条件では、PhLA 生合成と拮抗する下流のシキミ酸経路のフェニルアラニン生合成が抑制されることで、PhLA 収率が増加していた可能性が示唆された。

現在、上記の遺伝子発現の違いをグルコース消費の定常状態で調べるために、ジャーファメンターを用いた流加培養によりグルコース供給の十分条件と制限条件を確立し、2 条件から回収した細胞におけるキーンゼイムをコードする遺伝子発現量の比較を行っている。

## Effects of glucose concentration on gene expression patterns during phenylactic acid production by recombinant *Escherichia coli*

○Hiroki Miyagawa<sup>1</sup>, Hideo Kawaguchi<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>1</sup>, Ken-Ichi Oinuma<sup>3</sup>, Naoki Takaya<sup>3</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** *Escherichia coli*, Phenylactic acid, Shikimate pathway

## 2P-2p141 組換えタンパク質発現時における共発現 LEA ペプチドの発現条件の最適化

○池野 慎也, 岩水 岳哉  
(九工大院・生体工) ikeno@life.kyutech.ac.jp

【背景と目的】 LEA(Late Embryogenesis Abundant)タンパク質は植物の種子や一部の動物から発見された天然変性タンパク質であり、細胞内のタンパク質等を保護する機能を担っている。当研究室ではこの LEA タンパク質内の繰り返し配列をモチーフとして LEA ペプチドを設計し、大腸菌内で目的タンパク質と共発現させると目的タンパク質の発現量が增大することを報告してきた。しかし、LEA ペプチドの発現量とその発現誘導のタイミングを変化させた際の目的タンパク質の発現量を評価できていなかった。本研究では、目的タンパク質と LEA ペプチドを異なる発現系を用いて共発現させることで、目的タンパク質発現に対しての LEA ペプチドの発現量および発現誘導のタイミング等、発現条件の最適化を行った。

【実験方法と結果】 pBAD 系ベクターと pET 系ベクターに目的タンパク質である GFP 遺伝子と LEA ペプチド遺伝子をそれぞれ導入し、発現系の構築を行った。GFP を L-Arabinose, LEA ペプチドを IPTG で発現誘導し、各発現誘導剤の添加量を調整することで GFP の発現量を評価した。L-Arabinose 添加量および IPTG 添加量に対して、GFP 発現量を評価したところ、LEA ペプチドを 0.1mM IPTG で発現誘導を行うと、GFP の発現量が極大となった。この条件で、0.8% の L-Arabinose で GFP の発現誘導を行うと、LEA ペプチドを共発現させなかった場合と比較して GFP 発現量は約 10 倍となった。一方、LEA ペプチドを GFP 発現誘導前に発現させると、GFP の発現が著しく増大することを明らかにした。

## Optimizing condition of co-expression LEA peptide for the recombinant protein expression in *E.coli*

○Shinya Ikeno, Takanori Iwamizu  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

**Key words** *Escherichia coli*, protein expression, LEA peptide, L-arabinose

## 2P-2p142 転写因子改変放線菌を用いた異種タンパク質生産

○柏木 紀賢<sup>1</sup>, 西岡 雅都<sup>1</sup>, 廣瀬 修一<sup>2</sup>, 曾田 匡洋<sup>3</sup>, 荻野 千秋<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>長瀬産業・ナガセR&D センター, <sup>3</sup>神戸大院・工) akondo@kobe-u.ac.jp

放線菌は形態学的に着目されている土壌細菌であり、二次代謝生産能や様々な分泌酵素を生産する点から着目されている。様々な遺伝子改変ツールも近年開発されており、抗生物質、宿主由来のタンパク質、異種タンパク質等の物質生産を行う宿主としても放線菌は着目される。我々は以前、*Streptovorticillium cinnameum* 由来の Phospholipase D プロモーターを用いて、放線菌宿主から異種タンパク質を大量生産する技術を開発した。更なるタンパク質生産向上を目指すため、内在遺伝子の改変を試み、異種タンパク質生産の生産量を評価した。遺伝子改変のターゲットとして、複数の菌体内遺伝子発現に影響を与えると考えられる転写因子に着目した。

*Streptomyces lividans* 1326 を元株にして、複数の転写因子をターゲットに各 1 遺伝子破壊株、1 遺伝子過剰発現株を作成した。作成した株に *Stv. cinnameum* 由来の Phospholipase D タンパク質発現ベクターを導入し、分泌タンパク質の生産量や酵素活性により評価を行った。その結果、複数の転写因子改変株でタンパク質の生産量や酵素活性の値に変化が確認された。また、転写因子改変株の中にはこれまでに報告例がない表現型変化を行っている株も見られた。本発表ではこれらの結果をまとめて紹介したいと考えている。

## Effect of transcription factor mutation in *Streptomyces lividans* on recombinant protein production

○Norimasa Kashiwagi<sup>1</sup>, Masato Nishioka<sup>1</sup>, Shuichi Hirose<sup>2</sup>, Masahiro Sota<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>3</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Nagase Co., Ltd., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** *Streptomyces lividans*, strain engineering, transcription factor, recombinant protein

## 2P-2p143 グラム陰性菌由来のファイバータンパク質による微生物の固定化と表層提示技術の統合

○中谷 肇, 小原 優季, 堀 敏敏  
(名大院・工)  
nakatanih@nubio.nagoya-u.ac.jp

本研究では *Acinetobacter* 属細菌由来の三量体表層タンパク質である AtaA ファイバーの高い着性と、AtaA ファイバーを利用した表層提示技術とを同時に利用可能な方法論の確立を目的とした。

2種類のファイバーを区別するために提示用ファイバーには AtaA の部分欠損変異体 ( $\Delta$ NHisAtaA) を利用し、N 末端に His-tag を融合した。また、2種類のファイバーを提示する際にヘテロ三量体が生じ、機能が損なわれることがないように、三量体化に必要な膜貫通ドメイン (TM) に着目し、提示用ファイバーの TM を他の TAA の TM に置換したタンパク質を設計した。これらの提示用ファイバーを Tol 5 細胞で発現させ、表層発現していることをフローサイトメトリーで確認後、付着試験を行った。その結果、膜貫通ドメインを置換した変異体を発現させた場合は相対的な付着量の増加が観察され、膜貫通ドメインを置換していない変異体を発現させた Tol 5 細胞は付着量が減少していた。透過型電子顕微鏡によって細胞表層に生えている AtaA ファイバーを観察したところ、膜貫通ドメインを置換していないファイバーを発現させた Tol 5 細胞では野生型の AtaA ファイバーの本数が少なく、膜貫通ドメインを置換したファイバーを発現させた Tol 5 細胞では、細胞表層に球状の頭部を持つ野生型のファイバーが多く見られた。このことから、膜貫通ドメインを置換していない表層提示用 AtaA ファイバーを Tol 5 細胞で発現させると野生型の AtaA ファイバーと干渉し、ヘテロマーを形成し、AtaA の付着能に影響が及ぶことが推定された。したがって、AtaA を利用し、異なる機能を持つファイバーを複数表層提示させるためには、AtaA の膜貫通ドメインの入れ替えが有効に働くことが示唆された。

### Integration of bacterial immobilization and surface display by a bacterial surface fiber protein.

○Hajime Nakatani, Yuki Ohara, Katsutoshi Hori  
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** *Acinetobacter*, TAA, immobilization, surface display

## 2P-2p144 ボロン酸ゲルによる希少ヘキサースの新規分離法の確立

○後藤 成暁<sup>1</sup>, 十川 直也<sup>1</sup>, 野崎 智帆<sup>1</sup>, 吉原 明秀<sup>2</sup>, 森本 兼司<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>香川大学院 農学研究所, <sup>2</sup>香川大学国際希少糖研究教育機構)  
morimoto@ag.kagawa-u.ac.jp

<目的> 希少糖とは、「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」であり、一部の希少糖は生理機能を有することから健康食品や医薬品への応用が期待されている。当研究室では微生物由来の異性化酵素を用いて希少糖の生産を行っているが、反応後の分離が問題となっている。本研究では生産コストや生産効率を改善するためにボロン酸と希少糖との親和性に着目し、酵素反応液から希少糖の分離について検討した。

<方法> ささまざまな微生物由来の酵素を用いて4種のケトヘキサースを基質として10種の反応液を調製した。これらの希少糖混合液をボロン酸ゲルが充填されたカラムに供した。ボロン酸は、アルカリ側の pH で糖との親和性が増加することが報告されていることから、本研究では溶出液に pH8.0 以上のリン酸ナトリウム緩衝液もしくはグリシン-NaOH 緩衝液を用いた。分離させる温度はコスト削減の観点から室温に設定した。分離後の各画分を HPLC で分析した。

<結果および考察> 本研究で試験した10反応液のうち明確に分離できたのは6反応液であった。例えばフルクトースとブシコース混合液およびブシコースとアロース混合液は、グリシン-NaOH 緩衝液 (pH8.5) を溶出液に用い流速 0.5 mL/min の条件で分離され、タグトースとガラクトース混合液は、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を溶出液に用い流速 0.5 mL/min の条件で分離された。残りの4種はピークが重なり分離できなかったことや、反応産物への平衡比が低く分離の確認までには至らなかった。しかしながら、条件を検討すれば将来的にボロン酸は各種希少糖の分離が可能であることが示唆された。現在、緩衝液の種類や温度などの条件について検討中である。

### Development of a novel separation method of rare hexoses using boronic acid gel

○Shigeaki Goto<sup>1</sup>, Naoya Sogawa<sup>1</sup>, Chiho Nozaki<sup>1</sup>, Akihide Yoshihara<sup>2</sup>, Kenji Morimoto<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Kagawa Univ. Agric, <sup>2</sup>Internatsional Inst. Rare Sugar Res. Educ., Kagawa Univ.)

**Key words** rare sugar

## 2P-2p145 PEG 鎖長の異なる光分解回収型 PEGylation 試薬の合成と評価

○金兵 知毅<sup>2</sup>, 山口 哲志<sup>1</sup>, 塩田 英史<sup>2</sup>, 岡本 晃充<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東大・先端研, <sup>2</sup>東大院・工)  
okamoto@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

タンパク質性医薬品は、バイオ医薬品市場におけるシェアを年々拡大している。しかし、タンパク質は外部環境の変化や界面での吸着などによって変性し、高濃度条件下では容易に凝集する。そのため、医療現場に届くまでの製造、運搬、保管の過程で変性・凝集が生じ、それに伴う薬効の損失や血栓や重度の免疫応答による人体への悪影響が懸念される。そこで、タンパク質性医薬品の高濃度水溶液を製造現場からベッドサイドに届くまで高度に安定化する技術が求められている。

タンパク質性医薬品の安定化法として、ポリエチレングリコール(PEG)をタンパク質に修飾する PEGylation 法が広く用いられ、タンパク質の凝集抑制の効果が報告されている。一方、嵩高い PEG 鎖が基質のアクセスを阻害することによる活性損失や、PEG 化タンパク質を複数回投与した際に産生される抗 PEG 抗体による血中滞留性の低下、といった問題も指摘されている。そこで、我々は光分解回収型 PEGylation 法を開発してきた。本手法では、光分解性リンカーを介して PEG 鎖を修飾することによってタンパク質を安定化し、使用直前に照射射によって簡便・迅速に PEG 鎖を分解脱離できる。また、脱離した PEG 鎖は固相に吸着除去されるため、未修飾のタンパク質のみの溶液に戻すことができる。モデルタンパク質としてニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)を用いて、本手法の有用性を検証した。熱安定性解析により、PEG 鎖修飾による安定化効果が確認され、また、照射射による PEG の脱離および固相吸着による脱離 PEG の除去も確認された。さらに、PEG 化 HEWL はほとんど活性を示さなかったのに対し、照射射によって活性が回復し、未修飾の HEWL に近い比活性を示すことが確認された。本発表では PEG 鎖長を変換することで見られる安定化効果ならびに活性回復率への影響についても報告する。

### Synthesis and evaluation of photocleavable and recoverable PEGylation reagents with various lengths

○Tomoki Kinpyo<sup>2</sup>, Satoshi Yamaguchi<sup>1</sup>, Hidefumi Shiota<sup>2</sup>, Akimitsu Okamoto<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>RCast, Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** PEGylation, Stabilization of protein, Photo irradiation, Protein drug

## 2P-2p146 抗体精製用プロテイン A クロマトグラフィー担体の高機能化

○西八條 正克<sup>1,2</sup>, 鴻池 史恵<sup>1,2</sup>, 荻原 侑莉恵<sup>1,2</sup>, 中野 喜之<sup>1,2</sup>, 船木 正大<sup>1,2</sup>, 水口 和信<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>カネカ, <sup>2</sup>MAB組合)  
Masakatsu.Nishihachijo@kaneka.co.jp

【背景と目的】 抗体医薬品の製造において、培養工程の抗体発現量は近年の技術革新により飛躍的に向上している。高発現培養液は高濃度の抗体だけでなく、従来の培養液よりも多くの不純物を含み、精製工程への負担を大きくしている。精製工程の中では抗体を選択的に吸着し、高純度に精製可能なプロテイン A クロマトグラフィー担体 (以下、PA 担体) によるキャプチャー工程が特に重要である。これまでの PA 担体開発は繰り返し使用のためのアルカリ洗浄に対応した改良を中心に進められてきたが、最近では高発現培養液に対応した高機能化が求められている。例えば、単位時間当たりの生産性向上のための高流速化・高結合容量化、不純物除去能の向上及び高濃度抗体の凝集体形成を避けるための抗体酸溶出特性の改善等が挙げられる。

### 【方法と結果】

我々は、計算化学と遺伝子工学的手法を用いたプロテイン A リガンドの改変と基材への固定化技術の深耕により、リガンドの単点 (配向性制御) 固定化による抗体結合容量の向上に加えて、抗体溶出特性や不純物除去能も改善した新規 PA 担体を開発した。新規 PA 担体は 60 g/L 以上の高い動的結合容量を示し、かつ、市販 PA 担体に比べ温和な酸性 pH 条件下で抗体を溶出可能であった。この優れた抗体溶出特性によって溶出液体積の低減、溶出液中の不純物 (宿主由来タンパク質や DNA、抗体の凝集体) 含量の低減、さらには溶出液の pH 中和工程での抗体の高回収率などが可能になった。本発表では、新規開発した PA 担体の基本性能に加え、細胞培養液を用いた場合の性能評価結果についても紹介する。

### High performance Protein A chromatography resin for antibody purification

○Masakatsu Nishihachijo<sup>1,2</sup>, Fuminori Konoike<sup>1,2</sup>, Yurie Ogihara<sup>1,2</sup>, Yoshiyuki Nakano<sup>1,2</sup>, Masahiro Funaki<sup>1,2</sup>, Kazunobu Minakuchi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Kaneka Corp., <sup>2</sup>MAB)

**Key words** Protein A, affinity chromatography, antibody

**2P-2p147 低分子化抗体精製用アフィニティクロマト担体の開発**

○村田 大<sup>1,2</sup>, 吉田 慎一<sup>1,2</sup>, 荻原 侑莉恵<sup>1,2</sup>, 西八條 正克<sup>1,2</sup>,  
船木 正大<sup>1,2</sup>, 水口 和信<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>カネカ, <sup>2</sup>MAB組合)  
Kazunobu.Minakuchi@kaneka.co.jp

【背景と目的】 低分子化抗体は、Fab や scFv に代表されるような多様なフォーマットがあり、次世代型抗体医薬品や診断薬として開発が進められている。これらの低分子化抗体は、Protein G (PG) 担体や Protein L (PL) 担体を使用した精製プロセスの検討が試みられている。しかし市販の PG 担体および PL 担体は、分子種によって結合容量や回収率が低くなるという課題があり、プラットフォームへの適用が困難である。一般的には低分子化抗体の精製にはイオン交換担体等を組合わせたプロセスが用いられ、品目毎に複雑な条件設定が必要となる。しかし、汎用性の高いアフィニティ担体を開発できれば、低分子化抗体精製プロセスのプラットフォーム化が可能になると期待できる。

**【方法と結果】**

PG 担体に関しては、*in vitro* screening 法を用いた PG の改変により、Fab への結合能が野生型 PG と比較して数十倍向上した改変 PG を開発した。改変 PG を固定化した担体は、Fab に対する高い結合容量と 90%以上の高い精製回収率を達成した。PL 担体に関しては、各種 Fab との結合能評価をベースとした PL の改変により、抗体結合スペクトルの広い改変 PL を開発した。改変 PL を固定化した担体は、既存の PL 担体には結合しない Fab に対しても高い結合容量を示し、汎用性の高さを確認した。

本発表では、次世代の低分子化抗体精製用アフィニティ担体である上記新規 PG 担体および新規 PL 担体の機能評価を中心に発表する予定である。

**Affinity chromatography resin for antibody fragments purification**

○Dai Murata<sup>1,2</sup>, Shinich Yoshida<sup>1,2</sup>, Yurie Ogihara<sup>1,2</sup>, Masakatsu Nishihachijo<sup>1,2</sup>,  
Masahiro Funaki<sup>1,2</sup>, Kazunobu Minakuchi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Kaneka Corp., <sup>2</sup>MAB)

**Key words** Protein G, Protein L, affinity chromatography, antibody fragments

**2P-2p148 Fc レセプターを用いた抗体分析用アフィニティ分離剤による糖鎖改変抗体の解析**

○山中直紀, 寺尾陽介, 田中亨, 朝岡義晴, 青木大, 西山しずか,  
大江正剛, 井出輝彦  
(東ソー)  
naoki-yamanaka-cc@tosoh.co.jp

【背景と目的】 抗体医薬はがんや炎症、免疫疾患などの難治療領域を対象とすることからその市場が拡大している。特にがん領域における免疫細胞を介した細胞傷害活性を作用メカニズムとする抗体医薬の開発が活発に行われ、抗体の Fc 領域に結合する N 型糖鎖の構造、存在割合がその活性を左右することが知られている。このことから翻訳後修飾などにより分子多様性を有する抗体医薬は適切な方法でその品質を維持し、同一性を担保することが求められている。著者らはこれまでに抗体糖鎖構造を認識しその違いに基づき抗体を分離する Fc レセプター(FcR)をリガンドとした分離剤を開発してきた。本発表ではその FcR 分離剤を用いて異なる糖鎖構造を有する抗体を分析し、結合特性・分離特性を評価したので報告する。

【方法】 CHO 細胞株に目的抗体発現ベクターを導入し、異なる糖鎖構造を有する抗体産生細胞株の作製を行った。独自に開発した FcR リガンドを固定化した分離剤を用いて糖鎖改変抗体を分析した。各々の抗体の細胞傷害活性、及び N 型糖鎖構造と FcR 分離剤を用いて得られた分離結果を照合し解析した。

【結果】 作製した 2 種類の糖鎖改変抗体を試料として FcR 分離剤を用いてクロマト操作を行った結果、保持時間が異なるピークが得られた。また、これらの抗体を用いて特性解析を行ったところ細胞傷害活性及び糖鎖構造分布に明らかな違いがあることを確認した。

**Analysis of sugar chain modified antibodies with the affinity resin coupling engineered Fc receptor**

○Naoki Yamanaka, Yosuke Terao, Toru Tanaka, Yoshiharu Asaoka, Masaru Aoki,  
Shizuka Nishiyama, Seigo Ooe, Teruhiko Ide  
(Tosoh Corp.)

**Key words** affinity resin, Fc receptor, antibody, sugar chain

**2P-2p149 抗体及び低分子化抗体精製向け新規プロテイン L アフィニティ充てん剤の機能評価**

○田中亨, 小林秀峰, 荒木康祐, 中谷茂  
(東ソー)  
tooru-tanaka-pb@tosoh.co.jp

【背景と目的】 ガンや自己免疫疾患の治療薬として抗体医薬品が開発され、近年、市場が大きく拡大している。しかし、現在利用されている抗体医薬品は動物細胞培養により生産される完全分子型が主であり、高い製造コストや標的組織への低浸透性が課題となっている。そのため、低分子量化 (Fab, scFv, Diabody など) による低コストな微生物生産系の適用や組織浸透性改善についての研究開発が活発に行われている。一方、完全分子型抗体は精製プロセスにおいて Fc 領域に親和性を持つ Protein A をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィー (AFC) が標準的に利用されているのに対し、Fc 領域を含まない低分子化抗体は Protein A をリガンドとして利用することができない。そこで、このような低分子化抗体の精製でも利用可能な AFC 用充てん剤として、抗体の κ 軽鎖に親和性を持つ組換え Protein L を親水性多孔質ポリマーに導入した、TOYOPEARL® AF-rProtein L-650F を開発した。今回の発表ではその基本特性について報告する。

【方法】 本充てん剤をカラムに充てんし、ヒト Fab 動的吸着容量、抗体溶出挙動、及びカラム圧力損失を評価した。また、アルカリ耐久性の評価として、充てん剤を NaOH 水溶液に浸漬し、吸着容量の経時変化を調べた。

【結果】 Fab 動的吸着容量を他社 Protein L 充てん剤と比較した結果、50%以上高い値を示した。つづいて、完全分子型抗体及び Fab の溶出挙動を評価したところ、いずれも pH3~4 の酸性緩衝液で溶出・回収が可能であった。また、パイロットスケールの充てんカラムにおいて、高流速かつ低圧力で操作可能であることを確認した。充てん剤の洗浄に汎用される NaOH 水溶液に対する耐久性に関しては、他社品と比べて約 2 倍高いことが分かった。以上の結果から、本充てん剤は低分子化抗体の高効率精製に有用と考えられた。

**Functional evaluation of a novel protein L affinity resin for purification of antibodies and their fragments**

○Toru Tanaka, Hidetaka Kobayashi, Kosuke Araki, Shigeru Nakatani  
(Tosoh Corp.)

**Key words** purification, antibody fragments, Fab, protein L

**2P-2p150 光応答性マイクロウェル法を用いた細胞の選別**

○高木理沙<sup>1</sup>, 山口哲志<sup>2</sup>, 榎原昇一<sup>3</sup>, 田端和仁<sup>1</sup>, 野地博行<sup>1</sup>,  
飯野亮太<sup>4</sup>, 岡本晃充<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東大院・工, <sup>2</sup>東大・先端研, <sup>3</sup>阪大産研, <sup>4</sup>分子研)  
yamaguchi@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp

細胞生物学の基礎研究から再生医療までの幅広い分野において、一細胞レベルで細胞を選別することによって細胞の更なる解析や利用を可能にする技術が求められている。近年、マイクロウェル中に細胞を一つずつ入れて並べ、画像解析によって細胞を識別し、マニピュレーターで目的の細胞を一つずつ回収する一細胞アレイ技術が報告されている。この手法では、一細胞ずつの形態や表現型を多角的かつ継続的に解析できるため、既存法である FACS や MACS では選別が困難な細胞種をより正確に識別することができる。一方、マニピュレーターを用いた回収は時間がかかり、特別な装置を要する。そこで、我々は、よりハイスループットに細胞を回収できるマイクロウェル法の開発を志向し、光応答性マイクロウェル法の開発を行ってきた。光応答性マイクロウェル法では、流路内にてマイクロサイズのウェルに光分解性のゲル材料で細胞を一つずつ固定化する。画像解析により細胞を識別後、目的の細胞を含むウェルのみに光を照射してゲルを溶解させ、選択的に細胞を取り出すことができる。そこで、本研究では、この光応答性マイクロウェル法を用いて、細胞の選別を試みた。モデルとして蛍光タンパク質を発現させた BaF3 細胞と発現させていない BaF3 細胞を用意し、それらを混ぜたモデル細胞検体を一細胞ずつウェル内に並べ、固定化した。蛍光顕微鏡観察によって蛍光を有する細胞を識別し選択的に光照射を行った後、流路に培地を流すことによるせん断応力を利用して、光溶解したウェルから細胞を取り出した。その後、流路の出口から細胞を回収し、培養後に蛍光を有する細胞の比率を調べることによって、細胞選別の精度を確認した。本発表では、動物細胞以外に、藻類の選別を行った結果についても報告したい。

**Cell sorting using photo-responsive microwell method**

○Risa Takagi<sup>1</sup>, Satoshi Yamaguchi<sup>2</sup>, Shouchi Sakakihara<sup>3</sup>, Kazuhiro Tabata<sup>1</sup>,  
Hiroyuki Noji<sup>1</sup>, Ryota Ino<sup>4</sup>, Akimitsu Okamoto<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>RCast, Univ. Tokyo, <sup>3</sup>ISIR, Osaka Univ., <sup>4</sup>IMS)

**Key words** single cell, photo-responsive hydrogel, micro-well

## 2P-2p151 Analysis of cell migratory dispersion through spatial measurement of nucleus density

○Ziyu Chen, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The major aim of the proposed work is to develop a quantitative understanding of cell migratory dispersion, a process that is closely linked to stages of development, tissue repair, and tumor metastasis. To better understand the quantitative contributions of cell dispersion, we have developed a novel culture system for measuring cell dispersion with quantitative fluorescent imaging approaches. Retinal pigment epithelial (RPE) cells at the confluent state were obtained after 7-day culture in the limited area inside of removable ring, and after ring removal. In further culturing, tight junction, ZO-1 and nuclei of cells were stained, which determined the cell density, and ZO-1-positive cell density, along with radius direction from center of the culture to the outer. In the culture with the ring removal, the random migration of the cells in the peripheral region was observed and nucleus density toward the outside of ring increased, and their ZO-1 expression was negative. This suggested that the removal of region limitation released physical restriction in the periphery region of cultured cells and induced cell migration. Thus, our culture system can evaluate cell dispersion potential through spatial measurement of nucleus density, and the ring culture system also induce the preferential cell migratory dispersion in a number of different cell types, suggesting that it is a useful tool for evaluation in incipient functional impairment of cell-cell adhesion in stages of development, tissue repair, and tumor metastasis.

### Analysis of cell migratory dispersion through spatial measurement of nucleus density

○Ziyu Chen, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** cell migratory dispersion, spatial measurement of nuclei density, cell-cell adhesion

## 2P-2p152 糖尿病性腎症における細胞外マトリクスの早期変遷解析

○赤塚 愛里<sup>1</sup>, 村澤 裕介<sup>2</sup>, 王 碧昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>国立長寿医療セ)  
wang.pichao.ft@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】糖尿病性腎症(DN)は近年、我が国における透析治療の導入原因第一位の難疾患である。透析治療はリスクを抱え、多大な時間と費用を費やすため、DN治療法の開発は患者のQOL向上に必須である。DN腎では、細胞外マトリクス(ECM)タンパクが過剰に蓄積し、線維症を誘発、長期的には腎機能不全を引き起こすとされている。よって本研究では、糸球体(血液濾過を司る組織)のECMに着目し、DN発症早期におけるECM変遷を解析することで、DN腎で生じるECMタンパク変性と腎機能障害の関係の解明を目指す。  
【材料・方法】糖尿病誘発剤STZ(ストレプトゾトシン)を腹腔内投与することにより、早期DNモデルマウスを作製した。一方、クエン酸緩衝液を投与したマウスをコントロールとした。投与2, 4週間後の腎組織に(1)組織切片染色、(2)タンパク質を抽出、ゲル濾過の各フラクションに含まれるECMをDot blot法で検出することによる、ECM変遷解析を行った。  
【結果】DN早期で既にECM蓄積が始まっていることが組織切片染色により明らかになった。また、DN糸球体体内において、炎症誘発性ECMの蓄積、マクロファージの浸潤を始めとする炎症関連因子の存在が、免疫染色により認められた。さらに、Dot blot法によるECM変遷解析により、DN腎において、基底膜を構成する主要なECMであるIV型コラーゲンとラミニンの低分子化と、間質系ECMであるI型コラーゲン、フィブロネクチンの高分子化が観察された。これらの結果から、DN発症早期では、血液濾過機能を司る基底膜ECMの消化される一方、間質組織由来のECMの会合や線維形成、炎症誘発性ECMの蓄積が起こっていることが示唆された。  
【考察】DN腎でみられる過剰なECMの蓄積は、複数種類のECMの破壊と再構成を繰り返した過程から生じる結果であると推測される。また、ECM蓄積には炎症が関係している可能性が示唆された。

### Analysis of transitional changes of extracellular matrix at early stage of diabetic nephropathy

○Airi Akatsuka<sup>1</sup>, Yuksuke Murasawa<sup>2</sup>, Picao Wang<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Natl. Center Geriatrics Gerontology)

**Key words** glomeruli, extracellular matrix, inflammation, diabetes

## 2P-2p153 ラット骨髄培養細胞における時計遺伝子 *Per2* 発現の振動開始位相の解析

切明 研人<sup>1</sup>, 深浦 恵梨<sup>1</sup>, 藤原 政司<sup>1</sup>, 西出 真也<sup>2</sup>, 本間 さと<sup>2</sup>, 本間 研一<sup>2</sup>, 高木 睦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・工, <sup>2</sup>北大院・医)  
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】培養細胞中の時計遺伝子 *Per2* 発現の概日振動が、振動減衰後の培地交換、血清刺激、グルコース添加などの操作により再び誘起されることは確認されているが、各操作による振動開始位相を比較して解析した報告はほとんどない。そこで、本研究では *Per2* プロモーターにルシフェラーゼを連結したレポーター遺伝子を導入した *Per2::Luc* ラットの骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)様細胞を用いて、各操作による振動開始位相を比較して解析することを目的とした。  
【方法】MSC様細胞を35Φディッシュに高密度で接着させた後、ルシフェリン(100 μM)および5%または10%FBS含有DMEM-LG培地に交換して、10分毎にルシフェラーゼ発光強度を測定した。測定開始5日後に発光強度が減衰した時点で、培地交換(グルコース濃度0.9 g/L)、血清刺激(5%血清培地から50%血清培地への交換)、グルコース添加(0.9 g/L)の各操作を行い、さらに3日間測定した。発光強度の振動曲線から、振動ピークの位相を0 rad、ピーク前をマイナスrad、ピーク後をプラスrad、すなわち振動の谷を $\pi$  radと定義して、各操作直前および直後の位相を算出した。  
【結果・考察】振動減衰後の位相(操作直前の位相)がピーク付近、または谷付近の時点で、上記の各操作を各々行った。その結果、いずれの操作でも操作直後の位相は操作直前の位相と相関がなく、操作の種類毎にほぼ等しくなった。その操作直後の位相の平均は、培地交換では $-0.05\pi$  rad、血清刺激では $-0.44\pi$  rad、グルコース添加では $0.21\pi$  radと、操作の違いにより大きく異なることがわかった。これらの操作直後の位相の値を各操作による振動開始のメカニズムと合せて考察した。

### Initial phase of circadian oscillation of clock gene *Per2* expression in cultured rat bone marrow cells

Kento Kiriaiki<sup>1</sup>, Eri Fukaura<sup>1</sup>, Masashi Fujiwara<sup>1</sup>, Shin-ya Nishide<sup>2</sup>, Sato Honma<sup>2</sup>, Ken-ichi Honma<sup>2</sup>, Mutsumi Takagi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Med., Hokkaido Univ.)

**Key words** circadian oscillation, clock gene, luciferase, *Per2*

## 2P-2p154 軟骨再生用間葉系幹細胞のマикроキャリアによる増殖

○天笠 翼<sup>1</sup>, 高橋 伊織<sup>1</sup>, 目良 恒<sup>2,3</sup>, 脇谷 滋之<sup>3</sup>, 高木 睦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・工, <sup>2</sup>新潟大・魚沼基幹病院, <sup>3</sup>武庫女大・健スポ)  
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】自家と異なり他家軟骨再生に必要となる大量のヒト間葉系幹細胞(MSC)の培養方法として、マイクロキャリア培養の可能性を検討した。  
【方法】ヒト骨髄由来MSCを10%FCS含有DMEM培地を用いて表面型マイクロキャリア(Cytodex 1, GE Healthcare社)に接着させ、スピナーフラスコ中(液量10 ml)で37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で攪拌培養した。さらに、マイクロキャリアからマイクロキャリアへのトリプシンを用いない継代方法(Beads-to-beads継代法)を検討するとともに、表面抗原(CD90, CD166)の陽性率をフローサイトメーターにより測定した。  
【結果・考察】マイクロキャリアの浮遊に必要な最低撹拌速度である30 rpm以上の種々の撹拌速度(30, 60, 90 rpm)で培養したところ、マイクロキャリア凝集体の割合は各々64, 32, 20%となったが、最終細胞濃度は60 rpmで最も高かった。Beads-to-beads継代後も継代前と同等の増殖速度で増殖した。さらに60 rpmでの増殖ではMSC表面抗原の陽性率は約90%に維持されていた。以上から、マイクロキャリア(Cytodex 1)を用いたMSCの大量培養の可能性を確認することができた。

### Growth of mesenchymal stem cells using microcarrier for regenerative medicine of cartilage

○Tsubasa Amagasa<sup>1</sup>, Iori Takahashi<sup>1</sup>, Hisashi Mera<sup>2,3</sup>, Shigeyuki Wakitani<sup>3</sup>, Mutsumi Takagi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Uonuma Kikan Hosp., Niigata Univ., <sup>3</sup>Sch. Health Sports Sci., Mukogawa W. Univ.)

**Key words** mesenchymal stem cell, microcarrier, agitation, CD90

## 2P-2p155 デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた位相差解析によるガン細胞識別

○高木 陸, 倉島 つぐみ  
(北大院・工)  
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

**【目的】**再生医療用の細胞培養では、非侵襲的にガン細胞の混入有無を診断することが望ましい。これに対して当研究室で、細胞透過光に生ずる位相差を位相シフトレーザー顕微鏡 (PLM) を用いて調べた結果、正常細胞、ガン細胞の各々の細胞内の位相差プロファイルの形を利用して、両者を識別できることがわかった。そこで、PLM より安価で小型なデジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM) を用いた細胞内の位相差プロファイルの解析によるガン細胞識別の検討を目的とした。

**【方法】**上皮様のヒト正常前立腺上皮細胞 (PREC) およびヒト前立腺ガン細胞株 (PC-3)、さらに線維芽様のヒト正常骨髄間葉系幹細胞 (MSC) およびヒト骨肉腫細胞 (HuO-3N1) を 35Φ ディッシュに接着後、下からレーザー光を透過して DHM により細胞内全個所の位相差を定量した。培養中の未知細胞の細胞内位相差プロファイル形状が正常細胞とガン細胞のいずれの典型的プロファイルに近いを示すパラメーター Cancer index (CI) を計算した。測定後細胞を固定し、DAPI で核を染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

**【結果・考察】**上皮様細胞、線維芽様細胞ともに、ガン細胞、正常細胞 (各 n=10) の CI は各々 100% の確率で正および負の値となり、識別できることがわかった。また、細胞内位相差プロファイルの最高値付近に核が存在すること、正常細胞の方が核が伸長して大きくなっていることが分かった。従って、正常細胞とガン細胞の位相差プロファイル形状の差は、屈折率の高い核の伸長の違いによる可能性があると考えられた。

### Noninvasive discrimination of cancer cell by phase-shift analysis using digital holographic microscope

○Mutsumi Takagi, Tsugumi Kurashima  
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

**Key words** noninvasive discrimination, cancer cell, laser phase shift, DHM

## 2P-2p156 動物細胞の機能変化を利用したクロム検出

○小川 亜希子, 保坂 浩章, 田中 雄士  
(鈴鹿高専)  
ogawa@chem.suzuka-ct.ac.jp

動物細胞は、クロム化合物により糖質代謝や増殖といった生理機能が変化し、その変化量 (感受性) は、細胞の種類によって異なることが知られている。本研究では、動物細胞のクロム感受性を利用し、六価クロムと三価クロムとを別々に検出し、各クロムについて定量可能な分析法の構築を目指している。

初めに我々は、動物体内でのクロム分布情報、細胞機能との関連性について調査した。その結果、三価クロムは生体内で血液、肝臓、腎臓などに分布し、糖の取り込みや代謝促進に関与していることが分かった。また、六価クロムはヒトや動物に対しアレルギー性皮膚炎を生じることや発癌性をもつこと、神経毒性、遺伝的毒性、免疫毒性といった生体障害性を有することが分かった。これらの情報を基に、クロムに対して感受性が高いと期待された 3 種類の細胞株を選択した。選択した細胞株は、Hep G2 (ヒト由来肝実質細胞株)、PANC-1 (ヒト膵癌由来細胞株) および V79 (肺由来線維芽細胞株) である。

続いて各細胞株を対象とし、MTT アッセイと LDH 細胞毒性試験を用いて、細胞の活動度 (活性) 測定を行った。結果、六価クロムについては、MTT アッセイで PANC-1 が他の 2 種の細胞に比べて低濃度な六価クロムを検出できた。一方、LDH 細胞毒性試験では検出できなかった。三価クロムについては、まず EDTA を用いて三価クロム錯体を形成させた後、無血清培地を用いて試験した。MTT アッセイでは、Hep G2 が他の細胞に比べて低濃度な三価クロムが検出された。一方、LDH 細胞毒性試験については、PANC-1 のみで三価クロムが検出された。

### Detection of chromium by changing the functions of animal cells

○Akiko Ogawa, Hiroaki Hosaka, Yushi Tanaka  
(Nat. Inst. Tech., Suzuka)

**Key words** chromium, MTT assay, LDH activity assay

## 2P-2p157 マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛制御関連遺伝子の発現解析

○西川 麻裕, 森 英樹, 原 正之  
(阪府大院・理)  
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

**【背景と目的】**神経発生において神経幹細胞の分化や移動といった現象に多くの亜鉛結合タンパク質が関与することが報告されているにもかかわらず、中枢神経系を構築する細胞を生み出す神経幹細胞における亜鉛制御機構については知られていない。神経幹細胞に対する亜鉛の影響評価は神経発生毒性に関わる亜鉛制御機構を明らかにするとともに、神経幹細胞の亜鉛含有培地の改良にも役立つ。本研究ではマウス神経幹細胞/前駆細胞 (NSPC) の分化過程における亜鉛トランスポーターを中心とした亜鉛制御タンパク質の発現を解析することを目的とした。

**【方法と結果】**胎齢 14 日目の ICR マウス脳から採取し、細胞増殖因子 (20 ng/mL EGF, 20 ng/mL b-FGF) を含む培地で培養した NSPC と、1% ウシ胎仔血清を含む培地でさらに 7 日間培養し neuron と astrocyte に分化誘導した細胞を実験に用いた。細胞に塩化亜鉛 (ZnCl<sub>2</sub>) を添加し一定時間培養後、金属結合タンパク質 metallothionein ファミリー遺伝子 (*Mt1*, *Mt2*, *Mt3*, *Mt4*) 及び金属トランスポーター遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法で調べた。*Mt* は NSPC よりも分化誘導後の細胞で高発現していた。*Mt1*, *Mt2* は亜鉛濃度に依存して発現量が上昇したのに対し、*Mt3*, *Mt4* の発現量は亜鉛濃度に依存しなかった。亜鉛を細胞外から細胞内に輸送する亜鉛トランスポーターのうち、*Zip8* は NSPC、*Zip4* は分化誘導細胞で顕著に発現量が高かった。NSPC が分化する過程において亜鉛ホメオスタシスの維持機構が変化している可能性が示唆された。また、分化誘導に伴い ZnCl<sub>2</sub> に対する細胞の感受性が変化したことから、培養条件下で亜鉛濃度を調節することが神経幹細胞の増殖性を高めたり、細胞種を制限して選択的に培養する技術として利用できる可能性がある。

### Expression analysis of genes associated with zinc regulation in mouse neural stem/progenitor cells

○Mayu Nishikawa, Hideki Mori, Masayuki Hara  
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** zinc, neural stem cell, differentiation

## 2P-2p158 凍結保護剤を用いない瞬間凍結保存法における保存期間の細胞生存率への影響

○篠瀬 真人<sup>1</sup>, 上野 明<sup>2</sup>, 山口 修一<sup>2</sup>, 秋山 佳丈<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>信州大院・理工学, <sup>2</sup>株式会社マイクロジェット)  
aki@shinshu-u.ac.jp

**【背景・目的】**細胞凍結保存において、凍結時の水分子の結晶化を抑え、細胞への損傷を防ぐことが重要である。従来の細胞凍結保存法では、氷晶の生成や成長を抑制するために、凍結保護剤を添加しているが、凍結保護剤による細胞毒性の問題がある。そこで我々は、凍結時の冷却速度が高いほど、結晶サイズは小さくなることに着目し、微小液滴を吐出可能なインクジェット技術を用いて微小液滴中に細胞を内包し、液体窒素で冷却した基板に吐出することで、瞬間的に細胞を凍結する。それにより、氷晶の生成や成長を抑制し、細胞の損傷を抑えることで、凍結保護剤を用いない細胞凍結保存法の開発を目指す。本研究では、瞬間凍結による保存期間を設けたときの細胞生存率への影響を評価する。

**【方法】**細胞を瞬間的に凍結するために、インクジェット装置と液体窒素を用いた凍結装置を開発した。本装置は、細胞を内包した約 20 pL の液滴を液体窒素で冷却したガラス基板に吐出することで、細胞を瞬間的に凍結する。そして、このガラス基板を予め液体窒素で冷却しておいたクライオチューブに入れ、液体窒素凍結保存容器の気相中で 1 週間保存した。その後、37℃ に温めた培養液にガラス基板ごと浸すことで、急速に細胞を解凍した。解凍後 3 時間培養し、Calcein AM および PI を用いて細胞の生死判定を行った。

**【結果・考察】**凍結保存期間を設けずに凍結後すぐに解凍したときの生存率は 58.2% であったのに対し、凍結保存期間を 1 週間とした場合の生存率は 46.9% と低下した。この原因として、ガラス基板をクライオチューブへ移動させるわずかな時間に凍結した液滴が昇温し氷晶の生成や再結晶化による成長が起きた可能性や、凍結された微小液滴中の水分が昇華し、保存中に細胞が凍結乾燥状態になった可能性が考えられる。

### Influence of cryopreservation period to cell viability in flash freezing method without cryoprotectant

○Masato Shinose<sup>1</sup>, Akira Ueno<sup>2</sup>, Shuichi Yamaguchi<sup>2</sup>, Yoshitake Akiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., <sup>2</sup>MICROJET Co.)

**Key words** flash freezing, inkjet cell printing, cryopreservation, cryoprotectant-free

## 2P-2p159 iPS 細胞技術を利用した機能的ヒト NKT 細胞の大量培養とがん免疫療法モデル

○山田 大輔, 伊豫田 智克, 谷口 克, 藤井 眞一郎, 古閑 明彦  
(理研 統合生命医科学)  
daisuke.yamada@riken.jp

NKT (Natural killer T) 細胞は NK マーカーを発現しながら遺伝子再構成された T 細胞受容体 (TCR) を有する T 細胞の亜群で, キラー T 細胞とヘルパー T 細胞の機能を併せ持つ特異的な T 細胞である。拘束される抗原提示分子や, 抗原特異性, T 細胞受容体の可変性などによっていくつかのグループに分けられるが, その多くは TCR の  $\alpha$  鎖に可変性のないインバリエントな TCR (Va24-J $\alpha$ 18) を発現する細胞である。この TCR は MHC/HLA ではなく CD1d という脂質抗原を乗せる分子を認識する。したがって NKT 細胞は HLA に拘束されることなく活性化され様々なサイトカイン, ケモカインを産生することができる。特に多量に産生されるインターフェロンガンマにより, 自然免疫系 NK 細胞および獲得免疫系キラー T 細胞を共に増殖促進・活性化させること (アジュバント効果) と NKT 細胞自身の NK 活性により抗腫瘍効果を発揮する。実際に NKT 細胞標的がん治療の臨床試験が行われ長期平均生存期間延長効果が認められた。しかし担がん状態に伴って NKT 細胞の減少, 機能不全などのために, この治療法を希望する全ての患者に適用できていない。そこで本研究では iPS 細胞技術を利用して機能的な NKT 細胞を大量に調製することを目的とした。まず末梢血またはさい帯血由来のヒト NKT 細胞を糖脂質抗原を乗せた樹状細胞 (Dendritic cell: DC/Gal) により活性化後, センダイウイルスベクターにより初期化因子を導入し iPS (NKT-iPS) 細胞の樹立をおこなった。次に NKT-iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導については既に報告されていたヒト ES 細胞から T 細胞への分化誘導方法を改良することで成功した (iPS-NKT 細胞)。さらにこの iPS-NKT 細胞を純化培養する方法を確立し, 最終的に  $5 \times 10^7$  個の iPS-NKT 細胞を調製することができた。本発表では iPS-NKT 細胞の機能についても議論したい。

### Application of iPS technology for NKT cell-mediated tumor immunotherapy

○Daisuke Yamada, Tomonori Iyoda, Masaru Taniguchi, Shin-ichiro Fujii,  
Haruhiko Koseki  
(RIKEN IMS)

**Key words** NKT, induced pluripotent stem cell, tumor immunotherapy, natural killer T cell

## 2P-2p160 ボツリヌス菌由来 Hemagglutinin を用いたヒト iPS 細胞の高密度懸濁培養法の確立

○山本 陸<sup>1</sup>, 都倉 知浩<sup>1,2</sup>, Nath Suman Chandra<sup>1</sup>, 金 美海<sup>1</sup>,  
紀ノ岡 正博<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工,<sup>2</sup>藤森工業)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

### 【緒言】

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) を用いた再生医療分野において細胞の大量培養技術が必要とされている。培地量当たりの獲得細胞数が大きい三次元懸濁培養は細胞の大量培養手法として優位であるが未だ課題も多い。懸濁培養中では hiPS 細胞は球状細胞集塊を形成するが, 培養液中での合一や増殖による集塊径の増大は増殖阻害を引き起こす。増殖阻害を回避するため集塊分割が行われるが, 既存の酵素処理による集塊分割手法では単一細胞への分離により細胞自死が誘導され細胞密度が減少する。また酵素処理による分割は煩雑な操作が要求されスケールアップの際に, より簡便な操作が要求される。本研究では hiPS の培養において, 細胞間接着を特異的に阻害し集塊分割を行う新たな継代操作を開発し, 高密度培養を達成した。

### 【方法及び結果・考察】

二次元平面上で培養した hiPS 細胞 (Tic, 成育医療センター) を回収, 単一細胞処理を行い 30 mL 攪拌培養槽 (Able Co) に播種, 懸濁培養を行った。継代操作として, 従来の継代操作 (酵素処理を用いた継代操作: 細胞集塊の洗浄, 酵素処理, 集塊分割, 洗浄, 細胞播種) と新規の継代操作 (ボツリヌス菌由来ヘマグルチニン (HA) を用いた継代操作: HA 添加, 暴露, 物理的集塊分割, 洗浄, 再播種) を比較したところ, 従来の酵素処理法では, 再播種後, 操作時のストレス由来の細胞死による細胞数の低下及びその後の再増殖に対するラグタイムが観察されていたが, HA を用いる新手法では, 両者が見られず, 継代後, 良好な再増殖が確認された。

また HA の細胞分割効果は一定の時間経過とともに減衰することが確認され, HA を用いた継代操作には, 分割後の洗浄が不要であることが分かった。そこで, HA による細胞分割操作を高密度培養へ適用した結果, 未分割の条件と比較し高密度な培養を達成することが可能となった。

### High density culture of hiPSCs through disruption of aggregate with HA in suspension culture

○Riku Yamamoto<sup>1</sup>, Tomohiro Tokura<sup>1,2</sup>, Suman Chandra Nath<sup>1</sup>, Mee-Hae Kim<sup>1</sup>,  
Masahiro Kino-oka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Fujimori Kogyo Co.,LTD)

**Key words** human induced pluripotent stem cell, cell-cell adhesion, disruption of cell aggregate, high density culture

## 2P-2p161 単一集塊でのヒト iPS 細胞培養における高密度化の限界についての検討

○植野 真伍, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は, 再生医療あるいは創薬ツールへの応用が期待されている。iPS 細胞を用いて組織や臓器を構築するためには, 未分化状態の細胞を効率的に増幅させる培養プロセスの確立が求められる。しかし, 産業スケールでの有効な培養手法は未だ確立されていない。例えば, バイオリアクターを用いた懸濁培養法は, 液流によるシェアストレスが生じるため, 集塊同士の合一や崩壊が引き起こされる。本研究では, 培養底面に高密度にディンプルが配列された 6 well micro-patterned plate を用いて, 単一集塊を同プレート内で静置させたまま複数同時に培養し, 均質な集塊を高密度で培養する培養手法を提案する。

【方法および結果】6 well micro-patterned plate を用い, hiPS 細胞 (Tic, 成育医療センター) を Stem fit AK02N 培地 (Ajinomoto) 下で 168 h 培養, 播種から 96 h 後以降は細胞数の計測を 24 h ごとに行った。培地交換は, 培養期間を通じて培地成分の枯渇や老廃物の蓄積が起こらない培地交換頻度を算出して行った。コントロールとして 24 h ごとに培地交換を行った条件でも細胞数の計測を行った。その結果, 培地交換頻度を増やした条件における最終到達細胞密度はコントロールの約 1.5 倍であった。このことから培地交換頻度を増加させることによって, 最終到達細胞密度の向上を達成できることが示された。またこの最終到達細胞密度は, バイオリアクターを用いた懸濁培養法での最終到達細胞密度よりも高い値であった。以上の結果より 6 well micro-patterned plate を用いた単一集塊培養法は, 既存の培養法と比較して, 均質な集塊を高密度で培養できる新たな培養手法であることが示された。

### Investigation of maximum cell density in 3D static aggregate culture of hiPSCs

○Shingo Ueno, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** human induced pluripotent stem cell, single aggregate culture, high cell density

## 2P-2p162 クローン培養系を用いたヒト iPS 細胞培養中に生じる不均質性の解明

○近藤 伸彦, 金 美海, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景および目的】ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は再生医療や創薬への応用に向けて研究が広く行われている。これらの応用に向けて, iPS 細胞の質を維持したまま増幅させるための培養手法の開発が活発になってきている。培養手法の開発と平行して, 「iPS 細胞の特性, 安全性の検証」および「質の良い iPS 細胞の判定」は, iPS 細胞の品質管理を行うために取り組まなくてはならない重要な課題である。そこで本研究では, 単一の細胞から増殖したことが保証されるクローン培養系を用いたヒト iPS 細胞培養中に生じる不均質性の解明を行った。

【方法および結果】継代培養中のヒト iPS 細胞を StemFit 培地とラミニン 511-E8 フラグメント (iMatrix-511) でコートした培養面に  $6.5 \text{ cells/cm}^2$  の密度で播種した。播種直後に画像取得を行い単一細胞であることを確認し, 11 日目までクローン培養を行った。培養終了後, 未分化マーカーの 1 つである Oct3/4 に対する免疫染色を行い, 細胞が未分化状態であるか確認した。細胞が形成したコロニーの面積を測定した結果, 面積には  $0.19 \text{ mm}^2$  から  $1.5 \text{ mm}^2$  まで大小のばらつきがあることが確認された。さらに, 大きさが  $0.83 \text{ mm}^2$  以上のコロニーでは未分化状態から逸脱した細胞が発生することが確認された。これらの結果から, 通常の継代培養を行っている細胞には, 分裂速度が異なる細胞集団が混在しており, 分裂速度が高い細胞集団ほど, 未分化状態からの逸脱 (変異細胞の発生) が起こる可能性が高いことが示唆された。以上より, 細胞形態の異型に分けて評価することが困難であるフィーダーレス培養中の iPS 細胞において, クローン培養系を用いることで不均質性を評価することが可能であると考えられる。

### Evaluation of heterogeneity in maintenance culture of human iPS cells using clonal culture system

○Nobuhiko Kondo, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** iPS cells, Heterogeneity, Clonal culture, Cell quality

## 2P-2p163 紫外線照射コラーゲン上で培養した脳毛細血管内皮細胞におけるインテグリン遺伝子の発現解析

○土岐 麻菜, 佐藤 綾香, 森 英樹, 原 正之  
(阪府大院・理)  
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

**【目的】** コラーゲンは紫外線 (UV) 照射により分子間架橋される。3 重らせん構造を持つ I 型コラーゲンで形成された線維化コラーゲンゲルに UV 照射すると蛋白質分子間が架橋され、ゲル表面の構造や粘弾性に变化が生じる。我々は以前、ゲルの UV を照射がマウス由来脳毛細血管内皮細胞株である bEnd.3 細胞の線維化コラーゲンゲル表面に対する接着性や伸展性を高めることを発見した。本研究では、bEnd.3 細胞の線維化コラーゲンゲル表面への接着機構を探索するため、UV 照射コラーゲンゲル上で培養した同細胞で接着分子インテグリンの遺伝子発現変化を解析した。

**【方法と結果】** 0.5%I 型コラーゲン溶液と 10 倍濃度リン酸緩衝生理食塩水を混合し、ディッシュ上にて 37℃で一晩静置して線維化コラーゲンゲルを作製した。このゲルに UV 照射したものを UV 照射コラーゲンゲルとした。UV 照射/未照射コラーゲンゲル上で細胞を培養すると、各々のゲル上の細胞で異なる接着性及び伸展性を示した。各ゲル上で培養した細胞におけるインテグリン遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて測定し  $\Delta\Delta Ct$  法にて比較した。その結果、UV 未照射コラーゲンゲル上の細胞で高かった Itga2 の発現が UV 照射コラーゲンゲル上の細胞では低下した。更に、UV 照射コラーゲンゲル上で生じた細胞の形態変化が未変性のコラーゲン分子を添加することによって元に戻るかどうかを検討するため、0.02%コラーゲンを培地に添加し、UV 照射コラーゲンゲル上で培養した細胞を観察した。その結果、コラーゲンを添加したことによる細胞の増殖や形態の大きな変化は殆どみられなかった。このことから、UV 照射コラーゲンゲル上における細胞の接着性や形態変化はゲル表面の粘弾性や微細構造などの物理的要因によるものではないかと考えられる。

### Expression analysis of integrin genes in bEnd.3 cells cultured on UV-irradiated collagen gels

○Mana Doki, Ayaka Hara, Hideki Mori, Masayuki Hara  
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** collagen, ultraviolet, integrin, endothelial cell

## 2P-2p164 ポリアミド繊維上における神経幹細胞/前駆細胞の接着と三次元的な伸展

○森 英樹, 藤田 雅徳, 原 正之  
(阪府大院・理)  
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

**【目的】** 神経幹細胞/前駆細胞 (NSPC) はニューロンやグリア細胞への多分化能と自己複製能を有する中枢神経系の体性幹細胞である。NSPC の増殖には無血清培養によってニューロスフェアと呼ばれる細胞集塊を形成しながら増殖させる培養法が用いられる。ニューロスフェア培養では細胞の密度が高まると培養容器の中でニューロスフェア同士の接着が生じ、より大きな細胞集塊を形成する頻度が高まり、培養容器底に溜まりやすくなる。本研究ではニューロスフェア同士の接着を減らすために細胞が接着できる網目状ポリアミド繊維を用いて NSPC を培養し、細胞集塊の形成や増殖にどのように変化するかを検討した。

**【方法及び結果】** Polyamide-6.6 (PA66) メッシュに  $\gamma$  線 (0-60 kGy) を照射した後、アクリル酸水溶液に 25℃、24 時間浸漬することにより PA66 繊維上にポリアクリル酸 (PAA) をグラフト重合した。最もグラフト率が高かった 60%(v/v) アクリル酸水溶液への浸漬条件を用い、更に PAA 上にゼラチンや細胞外マトリクス成分を含むマトリゲルの修飾処理を行った。これらの PA66 繊維上でマウス胎仔 (E14) 脳由来 NSPC を培養し、繊維上への接着、増殖、細胞集塊形成を観察した。繊維上に接着した NSPC は 2 日目から顕著に増殖した。未処理の PA66 繊維やゼラチン修飾 PA66 繊維にも NSPC は接着し、細胞集塊を形成が見られたが、マトリゲル修飾 PA66 繊維では NSPC は繊維上に細胞が三次元的に伸展する様子が見られた。PA66 繊維上の細胞集塊を Nestin、GFAP、Tubulin $\beta$ III 抗体を用いて蛍光免疫染色をおこなった。多くの Nestin や GFAP 陽性の細胞が繊維上を伸展していた。

### Adhesion and three-dimensional extension of neural stem/progenitor cells on polyamide fibers

○Hideki Mori, Masanori Fujita, Masayuki Hara  
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** fiber, neural stem cell, polyamide, three dimension

## 2P-2p165 光増感反応で生じた活性酸素種がラット間葉系幹細胞の分化へ及ぼす影響

城田 裕介, 森 英樹, 原 正之  
(阪府大院・理)  
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

**【背景と目的】** 活性酸素種が従来から知られる細胞傷害性とは別に、幹細胞の増殖や分化の調節に影響を及ぼすことが最近報告されている。しかし、その機構については未解明の点が多い。光増感色素に対する光照射によって活性酸素種が発生する光増感反応を利用すれば、細胞培養容器内での活性酸素発生を制御しやすくなる。本研究では、骨、軟骨、脂肪細胞に分化できる体性幹細胞である間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) を用いて、可視光照射下の光増感色素から生じた活性酸素種が培養した MSC の生存と骨細胞への分化傾向に与える影響を調べた。

**【方法と結果】** 7 週齢 F344 雄ラットの大腿骨から MSC を採取し、15%(v/v)ウシ胎仔血清(FBS)含有 MEM 培地 (増殖培地) 中で培養し、増殖させた。光増感反応を起こさせるために、光増感色素である 1  $\mu$ M hematoporphyrin (HP) または 10  $\mu$ M rhodamin B (RhB) を培地に添加し、白色 LED 光源による白色光を室温にて照射した。細胞が生存できる光照射条件を決めるために、細胞生存率試験によって光照射時間を検討し、光照射時間を 10 分間に設定した。光照射処理以降の培地には増殖培地または Dexamethasone 等を含んだ骨分化誘導培地を用い、14 日間培養した。培養 1 日目の MSC の分化関連遺伝子 Runx2, Alpl, Sox9, Acan, Pparg, Cebpa、アポトーシス関連遺伝子 Bcl2, Bax2 の遺伝子発現レベルの変化を調べた。光照射処理後、増殖培地で培養した MSC では分化関連遺伝子とアポトーシス関連遺伝子はやや発現が増加する傾向が見られた。

### Effects of ROS induced by photodynamic reaction on the differentiation of rat mesenchymal stem cells

Yusuke Shirota, Hideki Mori, Masayuki Hara  
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** reactive oxygen species, mesenchymal stem cell, photodynamic reaction, differentiation

## 2P-2p166 膵 $\beta$ スフェロイドの遠心充填による立体組織作製

○大西 希咲, 榎本 詢子, 福田 淳二  
(横国大院・工)  
fukuda@ynu.ac.jp

**【目的】** 糖尿病に対する現在の治療法として、インスリン注射や膵島移植が用いられているが、合併症やドナー不足といった課題がある。そこで近年、新たな方法として、生体外で作製した細胞組織体を移植する再生医療が注目されている。その実現には、必要な細胞を大量に調製し、さらに、立体的な組織作製する手法の確立が求められる。そこで、本研究では、膵  $\beta$  細胞を大量調製するための培養器作製と、円柱状の組織体 (シリンドロイド) の作製および移植手法の確立を目的とした。

**【方法・結果】** 細胞の大量調製を実現するため、球状凝集体 (スフェロイド) の作製が可能な培養器を考案した。スフェロイド培養を行うことで、大量の細胞の培養に必要な面積を低減できるだけでなく、インスリン分泌などの機能の向上も期待できる。そこで、微細加工機を用いて、直径 500  $\mu$ m のウェル構造を有する鋳型を作製した後、酸素透過性が高いシリコンゴム (PDMS) を鋳型に流して転写することで、スフェロイド培養器を作製した。作製した培養器を用いて膵  $\beta$  細胞 (MIN6、神戸大清野先生より提供) を 3 日間培養することで、直径約 150  $\mu$ m のスフェロイドを大量に作製することができた。培養器の底面からも酸素を供給することで、膵  $\beta$  細胞の増殖活性とインスリン遺伝子の発現が促進されることを確認した。続いて、作製したスフェロイドは、4 分間の遠心操作のみで中空糸膜 (内径 570  $\mu$ m、孔径 0.2  $\mu$ m、東洋紡より提供) 内に充填され、シリンドロイドを作製できることを示した。さらに、中空糸とシリンジを接続し、培地の水圧によってシリンドロイドを回収し、生死染色と PCR 遺伝子解析により組織体の評価を行った。その結果、回収したシリンドロイドは膵  $\beta$  細胞としての機能を有しており、注射の要領で組織を生体内に移植できる可能性が示された。

### Fabrication of Cylindroid by centrifugation of Pancreatic Spheroids

○Kisaki Onishi, Junko Enomoto, Junji Fukuda  
(Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

**Key words** pancreas, spheroid, cylindroid, PDMS

## 2P-2p167 ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞を用いた没食子酸エピガロカテキンの機能性評価

○清水 康子<sup>1</sup>, 大貫 喜嗣<sup>1</sup>, 河野 高徳<sup>2</sup>, 卯川 裕一<sup>2</sup>, 堤坂 裕子<sup>2</sup>, 望月 和樹<sup>1</sup>, 黒澤 尊<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大院・総研部, <sup>2</sup>株式会社・伊藤園・中央研究所)  
kurohiro@yamanashi.ac.jp

### 【背景・目的】

肥満を予防するために、健康機能性食品が注目されている。中でも茶カテキンは飲料として簡単に摂取することができる。しかし、茶カテキンが脂肪細胞の増加や脂肪の蓄積を抑制する作用は明らかになっていない。この原因として、脂肪細胞研究に使用されるヒト脂肪細胞のロット間差や、脂肪細胞分化の源となる間葉系幹細胞がすぐに脂肪細胞への発生能力を失ってしまうことが挙げられる。そこで、我々は無限増殖能を有し、遺伝的背景が既知であるヒト iPS 細胞から分化誘導した脂肪細胞を用いて食品機能性成分の評価を目指している。本研究では、ヒト iPS 細胞から脂肪細胞へ分化誘導後、茶カテキンの主成分である没食子酸エピガロカテキン(Epigallocatechin gallate; EGCG)の抗炎症効果および脂肪蓄積抑制効果について検討した。

### 【方法】

本研究では、Hemopoietin Cocktail(HC)を用いた方法(以下、HC法)を使用し、白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞を選択的に分化誘導した。分化誘導後の脂肪細胞の種類および EGCG による脂肪蓄積能(代謝能への影響を定量 RT-PCR による遺伝学的解析によって調べた。

### 【結果・考察】

定量 RT-PCR の結果から、EGCG 非添加群と比較して EGCG 添加群では、褐色脂肪細胞へ分化誘導した細胞において、PPAR $\gamma$ 1 および HOXC9 の遺伝子発現量が減少し、PRDM16 が増加した。PRDM16 は褐色脂肪細胞化シグナルを促進させるため、脂肪細胞の褐色化が促進されている可能性がある。これにより白色脂肪細胞が減少し、その特異的マーカーである HOXC9 の発現量の減少が引き起こされたものと考えられる。白色脂肪細胞へ分化誘導した細胞においても、PRDM16 および HOXC9 に同様の傾向がみられた。以上により、EGCG はヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の褐色化を促進することが示唆された。

### Evaluation of functional activity of epigallocatechin gallate using adipocytes derived from human iPS cells.

○Yasuko Shimizu<sup>1</sup>, Yoshitsugu Ohnuki<sup>1</sup>, Takanori Kawano<sup>2</sup>, Yuuichi Ukawa<sup>2</sup>, Yuku M. Sagesaka<sup>2</sup>, Kazuki Mochizuki<sup>1</sup>, Hiroshi Kurosawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Fac. Interdisc. Res., Univ. Yamanashi, <sup>2</sup>ITO EN LTD., Central Res. Inst.)

**Key words** human iPS cells, adipocytes, epigallocatechin gallate

## 2P-2p168 筋収縮力測定マイクロデバイスの開発と筋萎縮モデルへの応用

○弦間 里歩<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 後藤 友規<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・予防早期医療創成セ)  
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】超高齢化社会を目前に、筋萎縮の予防薬や治療薬の開発に注目が集まっている。抗筋萎縮薬開発のための細胞アッセイでは、平面培養した筋管細胞の太さや筋タンパク質量の変化などを指標として筋萎縮度が評価されている。しかし、より直接的に筋萎縮度を評価するためには、筋管細胞が発揮する収縮力を測定することが重要であると考えられる。本研究では、収縮力測定機構を組み込んだマイクロデバイス上で培養三次元骨格筋組織を構築するプロセスを開発し、その筋組織デバイスを筋萎縮モデルとして利用することを検討した。

【方法と結果】ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて柱状の力測定機構をもつマイクロデバイスを作製した。収縮力測定機構部分で、マウス筋芽細胞(C2C12)とフィブリンを用いて三次元筋組織を構築した。筋組織が電気刺激に反応して収縮することで柱が動き、その変位量から収縮力を定量した。デバイス形状と培養条件を検討し、収縮能を有する三次元筋組織を数週間保つことが可能になった。次に、デキサメタゾン(Dex)を用いてデバイス上の筋組織に萎縮を誘導した。平面培養した筋管細胞を有意に細くする Dex 濃度を見出し、同濃度の Dex をデバイス上の筋組織に加えた。Dex 添加前と 24 時間後に電気刺激(20 V, 30 Hz, 2 ms)を加え、柱の変位量変化から収縮力変化を算出した。その結果、Dex 添加により収縮力有意に低下することが明らかになった。また Dex 添加後の筋組織では、萎縮関連遺伝子の発現が増加することを見出した。現在は、開発した筋萎縮モデルの特性解析を進めている。

### Development of *in vitro* skeletal muscle atrophy models.

○Riho Genma<sup>1</sup>, Kazunori Shimizu<sup>1</sup>, Yuki Goto<sup>1</sup>, Hiroyuki Honda<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>PME, Nagoya Univ.)

**Key words** microdevice, tissue engineering, electrical stimulation, skeletal muscle atrophy

## 2P-2p169 アプタマー修飾オリゴペプチド層を用いた選択的な細胞のキャッチ&リリース

○榎本 詢子<sup>1</sup>, Gautieri Alfonso<sup>2</sup>, 福田 淳二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>ミラノ工科大)  
fukuda@ynu.ac.jp

【目的】様々な細胞の懸濁液の中から特定の細胞を分離、濃縮、回収できる技術は、再生医療やがん研究、創薬などいくつかの分野において有用である。本研究では、アプタマーの選択性を利用して、特定の細胞のみを基板上に接着させる。さらに、電気化学的な反応を利用し、接着した細胞を非侵襲的に回収・分離する技術の確立に取り組んだ。

【方法】独自に設計したオリゴペプチドの自己組織化単分子膜を金表面上に形成させ、この末端に肝癌細胞と特異的に結合するアプタマーを結合させた。選択的な細胞接着のためには、アプタマーの立体構造が重要となる。そこで、まずはペプチドとアプタマーの相互作用による立体構造を分子力学計算により検討した。次にペプチドとアプタマーを修飾した基板上に肝癌細胞と正常肝細胞を播種し、細胞選択性を評価した。そして、接着した細胞を、金基板に-1.0 V (vs. Ag/AgCl)を 5 分間印加し、自己組織化単分子膜と金表面との結合を切断することで、細胞を脱離させた。

【結果・考察】ペプチドの自己組織化単分子膜のみを修飾した表面には、細胞が全く接着しないことを確認した。次に、分子力学計算の結果、ペプチド層に結合させるアプタマー密度を増加させると、アプタマー同士の静電反発によりアプタマーが立体的な構造を示すことを見出した。アプタマーをペプチド表面に修飾し、細胞懸濁液を播種した結果、肝癌細胞が 98% の選択性で接着した。接着した全ての細胞は、5 分間の電圧印加のみで回収可能であった。また、回収した肝癌細胞は良好な生存率を示し、増殖能やタンパク分泌量もコントロールと同様であることを確認した。さらに、この操作を繰り返すことで、肝癌細胞の濃縮が可能であることが示された。よって、アプタマーを利用した細胞分離濃縮システムの開発に向けた基盤技術を確立した。

### Catch-and-release of target cells using aptamer-modified oligopeptide

○Junko Enomoto<sup>1</sup>, Alfonso Gautieri<sup>2</sup>, Junji Fukuda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Dept. Elec. Info. Bioeng. Politec. Milano)

**Key words** self-assembled peptide, selective cell attachment, electrochemical cell detachment, aptamer

## 2P-2p170 3次元ゲル培養からの形態情報による細胞塊選抜システムの開発

○淡田 真結<sup>1</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 田村 磨聖<sup>3</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 松井 裕史<sup>4</sup>, 杉浦 慎治<sup>5</sup>, 金森 敏幸<sup>3</sup>, 柳沢 真澄<sup>5</sup>, 佐藤 琢<sup>3</sup>, 高木 俊之<sup>3</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>産総研, <sup>4</sup>筑波大, <sup>5</sup>エンジニアリングシステム)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

創薬探索の分野において、がん組織の浸潤・転移を防ぎ、再発のリスクを低下させるための新規薬剤の開発が求められている。多くの先行研究から、株化された細胞とは大きく異なり、腫瘍組織内の細胞は生体特有のヘテロ性(不均質性)を持ち、これが薬剤耐性やがんの特性と大きく関わっていることが明らかとされつつある。しかし、従来の分子生物学的手法において、未知のヘテロ性を限定されたマーカーなどの染色技術だけで評価・分類することは極めて難しく、がんの特性の評価は病理組織などにおける組織学的な特徴の形態的評価が主流であった。また、*in vitro* においてがん細胞を生体内に近いような機能性を維持したまま培養することも技術的には難しく、3次元での培養の有効性が知られてはいたが高いスループット性を維持しながら培養中の情報を解析することは難しかった。

我々は、高度に設計された光分解性ゲルを用いた3次元培養という培養環境と、細胞画像解析技術による表現型による未知の集団の分類技術、およびこれを自動的に光照射・回収する装置の機能性を組み合わせ、3次元培養した細胞を表現型(形態)で分類した場合の細胞集団のヘテロ性についての評価および特種なクローンの選抜についての検証を行ったのでこれを報告する。本研究では、この検証のためいくつかのモデル細胞株を用いて細胞種特有の細胞形態や増殖パターンというリアルタイムな3次元培養情報を取得し、表現型解析の精度および有効性について検証した。

### Development of cell selection system using cell morphology under photoresponsive gel culture

○Mayu Shibusita<sup>1</sup>, Hiroto Sasaki<sup>2</sup>, Masato Tamura<sup>3</sup>, Kei Kanie<sup>1</sup>, Hirofumi Matsui<sup>4</sup>, Shinji Sugiura<sup>2</sup>, Toshiyuki Kanamori<sup>3</sup>, Masumi Yanagisawa<sup>5</sup>, Taku Satou<sup>3</sup>, Toshiyuki Takagi<sup>3</sup>, Ryuji Kato<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>AIST, <sup>4</sup>Univ. Tsukuba, <sup>5</sup>ESCO)

**Key words** Cancer, Cell image analysis, Photoresponsive polymer, Single cell analysis

**2P-2p171 GFP 陰性造影法による生細胞の構造計測技術の開発**

○田中 正太郎, 高桑 雄一  
(東女医大・医・生化学)  
shtanaka@research.twmu.ac.jp

【目的】細胞の構造計測技術は、基礎研究分野のみならず、細胞や組織の病理診断、再生医療における品質管理、一細胞解析における細胞分類など、臨床や応用分野においても重要な基盤技術である。本課題では、未だ十分とは言えない「生細胞の」構造計測技術の発展を目指し、新規技術を開発したので報告する。【方法】今回報告する陰性造影法 (Negative contrast imaging) は、細胞質に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を過剰発現させた生細胞を、共焦点顕微鏡を用いて撮影するというシンプルな技術である。細胞本体のみならず、GFP が内腔に侵入しない核膜やオルガネラも観察可能である (Tanaka S et al., Sci. Rep., 2016)。この細胞の連続断面画像より構築した3次元像を元に、細胞本体および核、オルガネラの構造情報 (形状・体積・個数・配置など) を取得する。本技術は、ライブイメージングで一般的に行われるマーカータンパク質の過剰発現を必要としない為、細胞機能への影響が少なく、「あるがまま」の状態にある細胞をリアルタイムで観察できる。今回の報告では、研究モデルとして (1) マスト細胞ヒスタミン顆粒の構造情報 (2) がん細胞塊 (スフェロイド) の細胞構造情報について紹介する。【結果】間期のラットマスト細胞 (RBL-2H3、体積: 1,300 ~ 3,500 $\mu\text{m}^3$ ) に含まれる検出可能なオルガネラは最大で1,000個程度であり、体積の中央値は0.17 $\mu\text{m}^3$ であった。また、ヒト結腸腺癌細胞株 (HCT116) で構築したスフェロイド (直径280 $\mu\text{m}$ ) を観察したところ、接着面より100 $\mu\text{m}$ までの細胞構造を計測する事が可能であった。【考察】一連の実験により、本技術の原理が実証された。現在、技術の最適化を進めている。

**A novel method for detailed analysis of living cell structure by GFP-negative contrast imaging**

○Shotaro Tanaka, Yuichi Takakuwa  
(Dept. Biochem., Sch. Med., Tokyo Women's Med. Univ.)

**Key words** living cell, structural analysis, confocal microscopy, GFP

**2P-2p172 培養上清成分のインプロセス・モニタリングによる細胞非侵襲的なヒト iPS 細胞の未分化性の評価**

○豊田 健一<sup>1</sup>, 鈴木 崇<sup>1</sup>, 畑林 邦忠<sup>2</sup>, 平丸 大介<sup>1</sup>, 高橋 雅俊<sup>1</sup>, 加川 健一<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>島津製作所, <sup>2</sup>東京エレクトロン 革新技術企画室)  
tkenichi@shimadzu.co.jp

再生医療や創薬支援への応用を目的として、高品質且つ大量に多能性幹細胞を調製し供給する技術開発が求められている。多能性幹細胞の重要な特性の一つである未分化性の評価には遺伝子発現解析、FACS、免疫染色など種々の方法が確立されている。一方、これらの手法は細胞侵襲的であるため、インプロセスで細胞の状態を評価することは困難である。我々は、培養上清の多成分分析による細胞非侵襲的な新規インプロセス細胞評価手法の確立を目指し、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた培養上清の一斉分析手法を開発した。開発した分析手法は、基礎培地成分および主要分泌代謝物の計95成分を17分で一斉分析することが可能であるという特長を有する。未分化 iPS 細胞の培養上清および播種翌日より各胚葉系に分化誘導刺激を施した培養上清をサンプルとして、培養に伴う成分変化を上記の一斉分析手法を用いてデータ取得した。その結果、未分化維持された iPS 細胞と各胚葉系それぞれにおいて特徴的な継時変化を示す複数の化合物を見出すことができた。より特徴的なマーカーを絞り込むために、上記の成分分析データを多変量解析に供した。その結果、分化誘導の初期段階から細胞の分化状態を区別できる可能性が示された。以上のように、培養上清の多成分一斉分析が、細胞非侵襲的な新規インプロセス細胞評価手法となる可能性を確認することができた。

**Non-invasive evaluation of human Pluripotent Stem cells**

○Kenichi Toyoda<sup>1</sup>, Takashi Suzuki<sup>1</sup>, Kunitada Hatabayashi<sup>2</sup>, Daisuke Hiramuru<sup>1</sup>, Masatoshi Takahashi<sup>1</sup>, Kenichi Kagawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Shimadzu Corp., <sup>2</sup>Innovative Technology Planning Dept)

**Key words** iPS cells, Liquid chromatography-mass spectrometry, Bioprocess

**2P-2p173 量み込みニューラルネットワークによる C2C12 細胞分化の識別**

○新岡 宏彦<sup>1</sup>, 浅谷 学嗣<sup>2</sup>, 大東 寛典<sup>2</sup>, 田川 聖一<sup>1</sup>, 三宅 淳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・基礎工,<sup>2</sup>阪大基礎工)  
nioka@bpe.es.osaka-u.ac.jp

再生医療において、ヒト臓器の構築には大量の細胞が必要であり、個々の細胞を人の手で扱ってはいは多大なコストが必要になる。近年、細胞の自動培養装置については様々なものが登場しているが、今後、細胞の質や状態を非侵襲、自動的かつ高速に判断する装置が必要になると考えられる。我々は、Deep Learning の一手法である CNN (Convolutional Neural Network)[1,2]を構築し、位相差顕微鏡像から細胞の分化識別を行なった。実験では、試料としてマウス骨格筋芽細胞 (C2C12) を用い、高速演算処理のために自作の PC (GPU: NVIDIA GTX980Ti, CPU: Intel Corei7-4790K, メモリ: 8GB)と、独自に開発した Deep Learning ライブラリ Sigma 用いた。C2C12 は分化誘導を行なうと、徐々に細長い形状に変化し、最終的に細胞核が融合し多核の筋管細胞へと分化する。分化誘導を開始した日を Day 0 とし、Day 0 および分化後である Day 6 それぞれの細胞位相差像 (各 1000 枚、1 枚の画像サイズは 200x200 pixels) を取得した。各画像を CNN によって学習し、テストデータ (各 100 枚) の分類を行なったところ 93% の精度で識別が可能であった。また、Day 0, Day 3, Day 6 の比較的大きい細胞画像 (4080x3072 pixel) を用いて、画像内の各領域 (200x200 pixel) の細胞を CNN により識別し、Day 0 と認識すれば青色、Day 3 あるいは Day 6 と認識すればそれぞれ緑色、赤色というように色分けした。分化度の違いを色で視覚的に表現できたとと言える。

**参考文献**

- [1] Y. LeCun et al., Neural Computation, 1, 541 (1989)  
[2] D. Cireşan et al., Proc. Int. Joint Conf. Neural Netw. (IJCNN), Jul./Aug. pp.1918 (2011)

**Recognition of C2C12 cellular differentiation by using convolutional neural network**

○Hirohiko Niioka<sup>1</sup>, Satoshi Asatani<sup>2</sup>, Hironori Ohigashi<sup>2</sup>, Seichi Tarawa<sup>1</sup>, Miyake Jun<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** differentiation, Image analysis, Convolutional Neural Network, Deep Learning

**2P-2p174 細胞画像情報を用いた凍結ストレスに対する幹細胞品質変化の評価**

松本 恵<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>2</sup>, 清水 一恵<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1</sup>, 加藤 竜司<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工,<sup>2</sup>名大院・創薬科学)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

間葉系幹細胞 (MSC) は、様々な種類の細胞への分化能を有する多能性細胞であり、近年臨床的に様々なメリットを有する再生医療等製品の細胞源として大きな注目を集めている。体性幹細胞である MSC は、取得が容易であり、培養技術もかなり確立されている面があるが、人為的な継代操作によるストレスなどによって増殖能や分化能の低下が生じることや、細胞活性に大きな個人差があることが知られており、製品生産における品質管理の問題はいまだに解決されていない。現状、再生医療の現場では、患者細胞の品質評価やクオリティコントロールは医師や培養技術者の感覚的・経験的な顕微鏡観察だけで補われており、定量性・作業量において限界が問題視されつつある。今後、再生医療や細胞治療が安全かつ安定な医薬品製造に近い産業構造を有するには、細胞の品質を製造工程の途中から常に評価・計測することと、その細胞活性 (細胞品質) についての予測を行うような手法の確立が強く望まれている。我々はこれまで細胞形態の情報解析を行うことによって、細胞そのものの品質の変化を非破壊的、定量的、かつ早期に評価できる可能性を示してきた。我々は今回、今後 MSC の製品としての発展を考える際、避けては通れない「バンキング」における凍結ストレスの影響を評価するため、19 ロットの MSC について網羅的な遺伝子発現評価と分化能評価を行い、これを画像解析結果と紐づけることによって、どこまでの細胞の品質の程度を画像解析が評価することができるのかについて、工学的に感度および精度の観点から検証したのでこれを報告する。

**Evaluation of cellular quality change by cryopreservation stress using morphology-based analysis**

Megumi Matsumoto<sup>1</sup>, Kei Kanie<sup>2</sup>, Kazunori Shimizu<sup>1</sup>, Hiroyuki Honda<sup>1</sup>, Ryuyi Kato<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Technol., <sup>2</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** morphological change, mesenchymal stem cell, bioinformatics, expression

## 2P-2p175 ヒト iPS 細胞の継代培養中発生する逸脱細胞の簡便な除去法の構築

○金 美海, 松原 佳史, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

iPS 細胞の再生医療や創薬スクリーニング用製品作成の実用化を進めるためには、高品質の iPS 細胞を安定的に大量培養することが必要となる。近年では、培地・基質の開発により、逸脱発生が低減しているが、偶発的に発生した逸脱細胞を含むコロニーの除去は未だ必須である。しかし、逸脱細胞の除去は、コストや操作時間等の関係で産業発展には未だ問題が多く、未分化細胞と逸脱細胞の生物的特徴の差異を利用した単純な逸脱細胞除去に対する操作手法が望まれている。

これまで我々は、iPS 細胞の未分化状態からの逸脱する過程で E-カドヘリンによる細胞間接着の差異が生じることを確認し、細胞-細胞間接着を阻害するボツリヌス菌由来のヘマグルチニン(HA)を培地に添加すると逸脱細胞の選択的剥離が可能であることを実証した。本研究では、これらの除去現象を利用し、継代培養中発生する逸脱細胞の簡便な除去法の構築を目指した。iPS 細胞の未分化維持培養における HA の添加効果を添加方法および HA 添加濃度の条件を種々変化させ、逸脱細胞の除去を最適条件について検討し、連続継代による分化状態の維持を確認した。種々の継代培養条件での逸脱細胞の除去検証試験を行い、「どの細胞株でも」「フィーダーの有無にかかわらず」「どの培地・基質でも」HA 添加による逸脱細胞の除去が可能であることを確認した。さらに、より確度の高い HA 変異体を探索するため、サブユニットを置換したキメラ HA や、糖結合能を増強するような変異を導入した変異体 HA の作製を行い、逸脱細胞除去に対し、効率よい HA を確定することができた。HA 添加による逸脱細胞の除去の簡易化は、継代時の従来の逸脱細胞を含むコロニーの丁寧な除去操作を不要とし、継代培養の自動化への展開が容易となるため幹細胞産業における細胞源確保の際に欠かせない、大量培養操作に多大な貢献が見込まれる。

### A simple and robust method for culturing undifferentiated iPS cells using botulinum haemagglutinin

○Mee-Hae Kim, Yoshifumi Matsuura, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Human induced pluripotent stem cells, Botulinum Haemagglutinin, Selective removal of deviation, Maintenance culture

## 2P-2p176 プラズマ照射活性化培地を用いた残存未分化ヒト iPS 細胞の選択的除去

○長島 拓則<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 松本 凌<sup>1</sup>, 田中 宏昌<sup>2</sup>, 水野 正明<sup>3</sup>, 吉川 史隆<sup>4</sup>, 堀 勝<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大・未来社会創造機, <sup>3</sup>名大病院, <sup>4</sup>名大院・医, <sup>5</sup>名大・予防早期医療創成セ)  
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

**【背景と目的】** ヒト iPS 細胞から分化させた細胞群の再生医療への利用が期待されている。しかし、細胞移植後に未分化のまま残存したヒト iPS 細胞が奇形腫を形成する可能性が指摘されている。このため、ヒト iPS 細胞由来の分化細胞群から残存未分化細胞を除去する技術の開発が求められている。本研究では、近年がん治療などに応用されているプラズマ照射活性化培地 (PAM) に注目し、PAM による未分化ヒト iPS 細胞の選択的除去を試みた。

**【方法】** アルゴンガスによる非平衡大気圧プラズマをヒト iPS 細胞用培地に照射することで PAM を作製した。未分化ヒト iPS 細胞 201B7 株と分化細胞である正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を希釈した PAM に曝露し、それぞれの細胞の生死を顕微鏡観察や WST-8 法で評価した。

**【結果と考察】** 個別に培養した未分化ヒト iPS 細胞と NHDF を段階希釈した PAM に曝露したところ、NHDF は死滅せずに未分化ヒト iPS 細胞のみが選択的に死滅する濃度域が存在した。このことから、未分化ヒト iPS 細胞は NHDF に比べて PAM に対して強い感受性を有していることが示唆された。未分化ヒト iPS 細胞と蛍光染色した NHDF を共培養し、PAM で処理した後にフローサイトメーターでそれぞれの細胞数を計測したところ、初期細胞比が iPS 細胞 : NHDF = 1 : 8 の条件において、PAM 処理なしでは約 16.8%含まれていた未分化ヒト iPS 細胞が、PAM 処理ありでは約 1.4%以下に低下した。リアルタイム RT-PCR により、未分化ヒト iPS 細胞ではカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ 1 遺伝子の発現量が NHDF に比べて有意に低いことが確認され、本現象への関与が示唆された。これらの結果から、PAM は残存未分化ヒト iPS 細胞を選択的に除去するための有用な手段になると期待される。

### Selective Elimination of Residual Undifferentiated Human iPSCs by Plasma-Activated Medium.

○Takunori Nagashima<sup>1</sup>, Kazunori Shimizu<sup>1</sup>, Ryo Matsumoto<sup>1</sup>, Hiromasa Tanaka<sup>2</sup>, Masaaki Mizuno<sup>3</sup>, Fumitaka Kikkawa<sup>4</sup>, Masaru Hori<sup>2</sup>, Hiroyuki Honda<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Inst. Innovat. Future Soc., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Nagoya Univ. Hosp., <sup>4</sup>Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., <sup>5</sup>PME, Nagoya Univ.)

**Key words** human iPSCs, Regenerative Medicine, Plasma, Oxidative Stress

## 2P-2p177 密着結合タンパクの機能特性に基づいた網膜毒性の新規 in vitro 毒性評価系の構築

Xie Yucheng, 金 美海, 紀ノ岡 正博  
(阪大院・工)  
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【目的】** 哺乳類の網膜は、再生能力が低い組織であり、非臨床安全性試験において化学物質の暴露により網膜毒性が惹起された場合、その変化の多くは非可逆性であり、医薬品開発において開発が制限される因子となり得る。そのため、網膜毒性スクリーニングや網膜毒性機序解明のための高質な in vitro 試験系の確立が求められている。網膜色素上皮 (RPE) 細胞は網膜機能の恒常性維持に係わるとともに、その機能異常は化学物質による密着結合 (タイトジャンクション) 障害に一次的あるいは二次的に影響を与えている。そこで本研究では RPE 細胞を用いて核密度やタイトジャンクションを指標とした網膜毒性の新規 in vitro 毒性評価系の構築を試みた。

**【実験および結果】** ヒト ES 由来 RPE 細胞をラミネコートされた磁石型培養容器を作製し  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し 7 日間成熟培養を行った。成熟した PRE 細胞は、磁石型培養容器を培養面から外し、2つのモデル毒性薬剤阻害剤 (Chloroquine, Chlorpromazine) を用い、種々の濃度で細胞に加えた。細胞核とタイトジャンクションの蛍光染色を行い、画像解析で成熟度の評価を行った。それぞれの阻害剤における細胞死とタイトジャンクション喪失の 50%細胞毒性抑制濃度 (IC50) を算出した結果、Chloroquine において阻害剤の活性が 84.5 と 8.6 μM で検出された。しかし、Chlorpromazine においては、二つの IC50 で有意的な差が見られなかった。これらの結果より、細胞死と細胞間接着喪失のどちらかに対する選択的阻害剤、または非選択的阻害剤のいずれかに分類することを可能になった。以上の結果から、細胞遊走を誘導による細胞毒性試験において細胞死とタイトジャンクション喪失の作用時間および判定法が細胞毒性評価に大きな影響を及ぼすことが明らかとなり、今後の RPE 細胞毒性試験実施に当たって有益な示唆を与えるものと思われる。

### Novel in vitro assay tools for retinal toxicity using retinal epithelial pigment cells

Yucheng Xie, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Human retinal pigment epithelial cells, Retinal toxicity assay, Nucleus density, Tight junction

## 2P-2p178 ナノニードルアレイを用いたビメンチン陽性癌細胞分離技術の開発

○松本 雄太<sup>1</sup>, 清水 桂太<sup>1</sup>, 飯嶋 益己<sup>3</sup>, 黒田 俊一<sup>3</sup>, 中村 史<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>農大院・工, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>3</sup>阪大・産研・生体分子反応科学)  
Chikashi-nakamura@aist.go.jp

中間径フィラメント、ビメンチンは間葉系細胞のマーカーであり、癌細胞における上皮間葉転換の指標である。腫瘍組織を形成する細胞群からビメンチンをマーカーとして生きた細胞の分離および培養が可能となれば、癌幹細胞分離あるいは癌細胞株の樹立に繋がる技術に発展すると我々は期待している。

我々は AFM 探針を加工して作製したナノニードルを用い、これを抗体修飾することにより、細胞内の中間径フィラメントなどの骨格タンパク質を、力学的に検出する技術の開発を行ってきた。本手法では、ナノニードルを細胞に挿入し、引き上げる際のフォースカーブ上に現れる抗原抗体結合破断力の最大値を Fishing force とし評価する。ヒト子宮頸癌細胞 HeLa とヒト乳癌細胞 MCF-7 はそれぞれビメンチン陽性、陰性細胞であるが、これらに対してナノニードルの膜貫通効率が最も高い 4℃ 条件下で Fishing force の測定を行った結果、HeLa で 56.9±63.8 nN、MCF-7 で 6.3±5.4 nN であり、S/N 比 9.0 を達成した。この結果を踏まえ、現在ナノニードルを 1 万本配列したナノニードルアレイを用いて、混合癌細胞集団からビメンチン陽性癌細胞を分離する手法の開発を検討しており、その結果についても併せて報告する。

### Development of separation technology for vimentin positive cancer cell using nanoneedle array

○Yuta Matsumoto<sup>1</sup>, Keita Shimizu<sup>1</sup>, Masumi Iijima<sup>3</sup>, Shun'ichi Kuroda<sup>3</sup>, Chikashi Nakamura<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Biomed. Res. Inst., AIST, <sup>3</sup>Dept. Biomol. Sci. React., Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ.)

**Key words** vimentin, antibody, nanoneedle, cell separation

**2P-2p179 人工骨格筋組織の収縮力測定による薬剤評価系の構築**

○池田 史<sup>1</sup>, 井藤 彰<sup>2</sup>, 今田 隆介<sup>2</sup>, 河邊 佳典<sup>2</sup>, 上平 正道<sup>1,2</sup>  
 (1)九大院・シス生科, (2)九大院・工)  
 kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

[目的] 生体筋肉を模倣した人工筋組織は、筋機能を向上させる薬剤を *in vitro* で探索するためのツールとなりうる。これまでに本研究室では、生体における運動機能の根幹である骨格筋に焦点を当て、磁力を用いたティッシュエンジニアリングによって筋芽細胞の三次元構築を行い、電気刺激に応じて収縮力を発生する人工筋組織の作製に成功している。本研究では、5 種類の低分子薬剤をモデル薬剤として、筋分化誘導培養中に添加し、人工筋組織の収縮力測定を行うことで筋肉機能発揮への有効性を評価した。

[実験方法及び結果] マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を培養皿で平面培養し、分化誘導 7 日後における筋管の免疫染色と細胞核数から分化率を算出したところ、5 種類すべての薬剤において分化率の向上がみられた。さらに、磁力を用いた磁気工学的手法により C2C12 細胞を三次元構築し、7 日間分化誘導培養を行った。この際、モデル薬剤としてトリコスタチン A (TSA)、バルプロ酸ナトリウム (VPA)、酪酸ナトリウム (SB)、アピシジン (API) および 5-アザシチジン (5AC) を分化誘導培養 4 日目に添加した。分化誘導後、作製した人工筋組織が電気刺激に応じて生じる収縮力を測定したところ、TSA (0.01 $\mu$ M および 0.1 $\mu$ M) 添加で収縮力が増強した。一方で、TSA が Follistatin 遺伝子の発現量を増加させることが報告されており、本研究においても Follistatin 遺伝子発現と人工筋組織の収縮力の関係を調べるために、C2C12 細胞に Follistatin 遺伝子を強制発現させ、収縮力測定を行った。その結果、Follistatin 遺伝子を強制発現した人工筋組織は、コントロールと比較して有意に収縮力が向上したことから、骨格筋の収縮力向上には Follistatin シグナル系が重要な役割を有していると考えられた。本手法による人工筋組織および収縮力測定は薬剤評価のための有用なツールであると考えられる。

**A drug testing based on contractile force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs**

○Kazushi Ikeda<sup>1</sup>, Akira Ito<sup>2</sup>, Ryusuke Imada<sup>2</sup>, Yoshinori Kawabe<sup>2</sup>, Masamichi Kamihira<sup>1,2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., (2)Fac. Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** tissue engineering, skeletal muscle, drug testing, low molecular weight drug

**2P-2p180 アルギン酸カルシウム犠牲層を用いたゼラチンハイドロゲルの 3 次元構築**

○伊野 浩介<sup>1</sup>, 横川 裕紀<sup>1</sup>, 珠玖 仁<sup>2</sup>, 末永 智一<sup>1,3</sup>  
 (1)東北大院・環境, (2)東北大院・工, (3)東北大・WPI-AIMR)  
 ino.kosuke@bioinfo.che.tohoku.ac.jp

細胞培養において、ハイドロゲルは有用な細胞足場材料である。特に、ファイバー型のハイドロゲルは取り扱いが簡単なため、移植医療において有用である。また、ハイドロゲルファイバーは、3 次元構築のための部品として有用である。さらに、ノズル型の 3D バイオプリンターではハイドロゲルファイバーを吐出しており、3D バイオプリントにおいてもハイドロゲルファイバーの開発は重要である。ハイドロゲル内で細胞培養するためには、コラーゲンやゼラチンなどの細胞培養に適した材料を使用する必要がある。このようなハイドロゲル材料を希望の形に成型する手法が、様々な提案されている。

成型しやすいハイドロゲルとして、アルギン酸カルシウムハイドロゲルが挙げられる。アルギン酸カルシウムハイドロゲルは、アルギン酸ナトリウム溶液と塩化カルシウム溶液を混ぜるだけで迅速に形成される。一方、アルギン酸カルシウムハイドロゲルは細胞接着部位を持たないため、3 次元細胞培養においては不向きである。

そこで本研究では、アルギン酸カルシウムハイドロゲルを犠牲層に用いることで、ゼラチンハイドロゲルを簡単に成型する手法を開発した。この手法では光硬化性ゼラチンを使用しており、犠牲層を取り除いた後でも、光硬化したゼラチンハイドロゲルが成型された構造を保っている。また、光硬化性材料である利点を用いて、ハイドロゲル材料 (ファイバー) 同士の接着を可能し、3 次元ハイドロゲル構築を可能にした。この手法は、3D バイオプリンティングへの応用が可能であり、複雑な 3D ハイドロゲルへの展開が期待できる。

**3D gelatin-based hydrogels using alginate calcium templates**

○Kosuke Ino<sup>1</sup>, Yuki Yokokawa<sup>1</sup>, Hitoshi Shiku<sup>2</sup>, Tomokazu Matsue<sup>1,3</sup>  
 (1)Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., (2)Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., (3)WPI-AIMR, Tohoku Univ.)

**Key words** gelation, 3D culture, 3D structure

**2P-2p181 人工 mRNA スイッチによるヒト内在性タンパク質の検知**

○川崎 俊輔<sup>1,2</sup>, 藤田 祥彦<sup>2</sup>, 齋藤 博英<sup>2</sup>  
 (1)京大院・医, (2)京大・CiRA)  
 s.kawasaki@cira.kyoto-u.ac.jp

細胞の種類や状態は、主にタンパク質によって決定されている。従って、標的細胞で特異的に発現するタンパク質の存在を検知し、その細胞運命を制御できれば、生命工学、医療応用において有用なツールとなりうる。

mRNA スイッチは mRNA の 5'UTR に特定のタンパク質と結合する RNA (アプタマー) 領域を持つ遺伝子スイッチである。このスイッチは mRNA 上のアプタマーにタンパク質が結合することで、自身の翻訳を抑制する。原理的には、任意のタンパク質と結合するアプタマーを組み込むことで、望んだタンパク質を検知して翻訳を抑制する mRNA スイッチが作製できる。しかし、これまでに作製された mRNA スイッチでは、ヒト内在性タンパク質を検知できていない。そこで、人工 mRNA スイッチの開発には、新たな設計原理が必要である。我々は、mRNA に組み込むアプタマー配列を変更することで、ヒト内在性タンパク質を検出できる人工 mRNA スイッチの開発に成功した。我々の作製した mRNA スイッチは、スプライシング関連タンパク質と幹細胞マーカータンパク質に応答し、目的遺伝子の発現を抑制できる。これらのスイッチは、内在のタンパク質発現レベルで機能した。さらに我々は、幹細胞マーカータンパク質に応答するスイッチを細胞に導入し、iPS 細胞を識別することにも成功した。これらの結果は、人工 mRNA スイッチの新たな設計方法を提示する。我々の設計方法を用いることで、任意のタンパク質に反応する mRNA スイッチが作製でき、細胞種特異的な運命制御や、生きた細胞内における目的タンパク質の発現量測定が期待できる。

**Detection of human endogenous proteins via synthetic mRNA switches**

○Shunsuke Kawasaki<sup>1,2</sup>, Yoshihiko Fujita<sup>2</sup>, Hirohide Saito<sup>2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., (2)CiRA., Kyoto Univ.)

**Key words** RNA switch, Translational Regulation, aptamer, Synthetic Biology

**2P-2p182 代謝物と RNA の 2 入力に反応する AND ゲートリボザイムの開発**

○内藤 卓人, 井川 善也, 松村 茂祥  
 (富山大院・理工)  
 smatsumu@sci.u-toyama.ac.jp

**【背景と目的】**

グラム陽性菌の mRNA から発見された *glmS* リボザイムは、代謝物であるグルコサミン 6 リン酸 (GlcN6P) を補酵素として自身の RNA を切断する分子スイッチである。我々は、これを二種類の分子に反応する AND ゲートスイッチへと変更することを目指した。*glmS* リボザイムは、触媒中心をもつ「コア領域」と、リボザイム構造の安定化に寄与する「周辺領域」の 2 つのモジュールから構成されている。そこで、これらモジュールを物理的に分割し、コア領域をスイッチ本体、周辺領域をアクチベーター (入力 RNA 分子) と見なし、アクチベーター RNA によるスイッチ ON 機能の実現を目指した。これにより、代謝物と RNA の 2 入力に反応する、より精密な制御が可能な AND ゲート RNA スイッチを構築できると考えた。

**【方法】**

上記のように *glmS* リボザイムを分割し、スイッチ本体 (コア) とアクチベーター RNA を別々に作製した。次に、コア RNA の 3'末端を蛍光標識した。その後、コアとアクチベーターを混合し、GlcN6P を添加することで反応を開始、反応終了後の未切断物と切断物を変性ポリアクリルアミドゲルで分離した。最後に蛍光イメージャーで定量し、切断活性を評価した。

**【結果と考察】**

*glmS* リボザイムを物理的に分割し混合することで、その活性が再構成された。しかし、入力がない状態でのシグナルの漏れが確認されたため、新たな変異体を設計・作製したところ、シグナルの漏れは抑制された。また、入力のアクチベーター RNA をよりシンプルなオリゴ RNA に置き換えることにも成功し、さらに、すでに活性化しているコアに別のオリゴ RNA を加えることで不活性化することも可能となった。今後、スイッチ ON 時の活性の向上や入力を多様化することで、合成生物学における制御素子としての応用が期待できる。

**Development of an AND-gate ribozyme responding to metabolite and RNA inputs**

○Takuto Naito, Yoshiya Ikawa, Shigeyoshi Matsumura  
 (Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** Ribozyme, Synthetic biology, *glmS* ribozyme, AND-gate

## 2P-2p183 グループ I リボザイムの集積制御による RNA ナノ構造の選択的形成と活性評価

○大井 宏紀<sup>1</sup>, 藤田 大介<sup>1</sup>, 鈴木 勇輝<sup>2,3</sup>, 杉山 弘<sup>2,3</sup>, 遠藤 政幸<sup>2,3</sup>, 松村 茂祥<sup>1</sup>, 井川 善也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>富山大院・理工, <sup>2</sup>京大 iCeMS, <sup>3</sup>京大院・理)  
yikawa@sci.u-toyama.ac.jp

### 【背景と目的】

RNA ナノ構造体の構築には、これまで主に 100 塩基未満の RNA 鎖が用いられてきた。また、細胞内の機能性 RNA で多く見られる 300~1000 塩基の鎖を用いた例はまだ少ない。我々は、約 400 塩基長の酵素活性を有する RNA 分子 (リボザイム) を用いて、機能を有する RNA 構造体の形成を試みた。

### 【方法】

本研究では、自らの活性で自身をイントロンとして切りだすスプライシング反応を行う織毛虫テトラヒメナ由来のグループ I (GI) リボザイムを用いた。GI リボザイムをコア・リボザイム (ΔP5) とアクチベーター (P5abc) の 2 つの構造モジュールに分割し、P5abc を ΔP5 の適切な位置にリンカーを挿入組み込んだ。モジュールを再編成したリボザイムの ΔP5 と P5abc は分子間でのみ相互作用する。P5abc は ΔP5 の酵素活性を活性化するための機能を持つため、集積構造の形成に応じて酵素活性が発現する。

複数の特異的相互作用部位の導入、リンカー長の変更による相互作用界面の角度制御により、リボザイムを系統的に設計した。その組み合わせによりリボザイムを選択的に集積させ、非変性ゲル電気泳動によって会合体の同定を行った。また、その集積に依存した触媒活性も測定した。

### 【結果と考察】

複数の特異的相互作用部位の導入、相互作用界面の配向の制御によって選択的に多量体 (三角形、四角形) への集積に成功した。配向の組み合わせを変えることによって特定の構造が有利になることを非変性ゲル電気泳動によって確認した。また集積依存的なリボザイムの基質切断活性は、二量体と閉環三量体に集積する場合と比較すると、RNA 濃度が低条件下では閉環三量体の活性低下により抑制されていた。この結果は閉環構造がナノ構造の安定化に寄与していることを示唆する。

### Selective formation of GI ribozyme-based catalytic polyhedrons

○Hiroki Oi<sup>1</sup>, Daisuke Fujita<sup>1</sup>, Yuki Suzuki<sup>2,3</sup>, Hiroshi Sugiyama<sup>2,3</sup>, Masayuki Endo<sup>2,3</sup>, Shigeoyoshi Matsumura<sup>1</sup>, Yoshiya Ikawa<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Inst. for Integr. Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

**Key words** Group I ribozyme, RNA-RNA interaction, RNA nanostructure, RNA nanotechnology

## 2P-2p184 フコース結合型糖鎖合成に関わる酵素群をノックアウトした CHO-K1 細胞の構築

○岩崎 将士, 三崎 亮, 大橋 貴生, 藤山 和仁  
(阪大・生工国際セ)  
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 近年注目されている抗体は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を宿主とした遺伝子組換えによって生産される。抗体は糖タンパク質である。糖タンパク質の糖鎖はタンパク質の安定性や生理活性に大きな影響を及ぼすこと、糖鎖構造の違いが免疫原性をもたらすことが知られており、糖鎖構造を改変することでタンパク質の機能向上が期待できる。特に、抗体では Fc 領域が持つ N-結合型糖鎖から α1,6-フコース残基 (コアフコース) を除去することで、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が大幅に向上することが知られている。すなわち、コアフコースを合成しないバイオリクターを構築できれば、付加価値の高い抗体医薬品生産の有用宿主となりうると考える。そこで本研究では、コアフコース合成に関わる遺伝子をノックアウトした CHO 細胞の構築を目指す。

【方法および結果】 ノックアウト細胞の構築には CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた。まず、一つの標的遺伝子をノックアウトするためのベクターを構築し、CHO-K1 細胞に導入した。標的遺伝子を破壊した細胞群からノックアウト細胞をスクリーニング、単クローン化した。最終的に遺伝子配列を解析することによって標的遺伝子の変異を確認した。遺伝子破壊が認められた細胞の抽出物を用いてレクチンプロベリングを行った結果、変異体糖鎖は野生型と比較して半分程度にフコース結合が減少した。さらに、遺伝子破壊が認められた細胞株をベースとして、別のコアフコース合成に関わる遺伝子をノックアウトすることで、二重変異株を構築している。

### Construction of CHO cells for production of fucose-free antibodies

○Masashi Iwasaki, Ryo Misaki, Takao Ohashi, Kazuhito Fujiyama  
(ICBiotech, Osaka Univ.)

**Key words** fucosylation, Chinese hamster ovary, glycoengineering

## 2P-2p185 成熟糖鎖合成を促進する糖鎖修飾改変植物体の作出

○佐藤 主悟<sup>1</sup>, 弓岡 仁美<sup>1,2</sup>, 磯山 純子<sup>1</sup>, 土肥 浩二<sup>1</sup>, 大橋 貴生<sup>1</sup>, 三崎 亮<sup>1</sup>, 藤山 和仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大・生工国際セ, <sup>2</sup>大阪成蹊短大・栄養)  
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

### 【背景と目的】

現代のバイオテクノロジーを用いた医療用タンパク質の生産はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来細胞で盛んに行われている。しかし、CHO 細胞による生産は、培養槽の建設や管理が非常に高コストであることや、ヒトに感染性があるウイルスにより汚染される可能性などの課題があげられる。このような課題を解決できる宿主生物として植物が注目されている。生産コストが安価で、動物病原体汚染のない植物体は、CHO 細胞の課題を克服するために適した宿主である。また、多くの医療用タンパク質には N 結合型糖鎖が付加しているが、その糖鎖は付加したタンパク質の生理活性や分泌、フォールディングなどその性質に深く関わっており、医療用タンパク質生産において合成途中などの多様な構造の糖鎖は、その生理活性などの面からその品質が低下する恐れがある。品質を保つためには糖鎖修飾を促進させ、成熟糖鎖への集約が不可欠となる。そこで本研究では植物体 *Nicotiana tabacum* SR1 において成熟糖鎖への集約化の方法を模索した。

### 【方法および結果】

本研究では、糖鎖修飾経路の初期段階に関わる酵素 Mannosidase I (Man I) に着目した。N. tabacum 由来 Man I を導入することでその活性を増強し、糖鎖修飾経路初期段階の未成熟なハイマンノース型糖鎖をより成熟糖鎖へ集約させるよう試みた。ハイマンノース型糖鎖は植物体内において全可溶性タンパク質に付加した糖鎖のうち 10%~15% 程度存在していることがわかっている。qRT-PCR および Man I 酵素活性測定の結果、Man I 発現量および活性の増強された個体が得られた。また糖鎖構造解析の結果、未成熟な糖鎖であるハイマンノース型糖鎖の減少に成功した。このため、Man I 増強は糖鎖の成熟を促進させ、糖鎖構造の集約化に有効に活用されることが期待される。

### Production of the glyco-engineered *Nicotiana tabacum* facilitates N-glycans maturation

○Keigo Sato<sup>1</sup>, Hitomi Yumioka<sup>1,2</sup>, Junko Isoyama<sup>1</sup>, Koji Dohi<sup>1</sup>, Takao Ohashi<sup>1</sup>, Ryo Misaki<sup>1</sup>, Kazuhito Fujiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>ICBiotech, Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Nutrit. Sci., Osaka-Seikei Coll.)

**Key words** N-glycans, plant biopharmaceutical, transgenic tobacco

## 2P-2p186 糖転移酵素 GnTI 遺伝子発現抑制による植物型糖鎖構造の改変

土肥 浩二<sup>1</sup>, 弓岡 仁美<sup>1,2</sup>, 磯山 純子<sup>1</sup>, 菊池 輝美<sup>1</sup>, 藤山 和仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大・生工国際セ, <sup>2</sup>大阪成蹊短大・栄養)  
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 植物を利用した組換え医療用タンパク質の生産は、今日主流である動物細胞での生産系と比較して、低コスト化が期待でき、動物病原体汚染に対して安全であるといった利点がある。一方で、現在注目されている医療用タンパク質の多くは糖鎖を持つ糖タンパク質であり、糖鎖はタンパク質の生物学的活性の発現に極めて重要である。しかし、植物で生産したタンパク質には、動物にはない植物特有の N 結合型糖鎖が存在し、アレルギー性を示すことが懸念されている。本研究では、タバコ植物 (*Nicotiana tabacum* SR1) を用い、糖転移酵素 (GnTI: N-Acetylglucosaminyltransferase I) の活性を抑制することで、植物型糖鎖の付加を阻害し、かつ単一の糖鎖構造 (M5) を合成できる有用宿主植物の作出を目的とした。

【方法】 RNA interference 法を用いて GnTI 発現を抑制することで、N 結合型糖鎖修飾経路を遮断した。すなわち、アンチセンス型、アンチセンス-センス型、センス-アンチセンス型の RNA を植物細胞内で転写するベクターを構築し、形質転換植物を作出した。リアルタイム PCR (RT-PCR) 法を用いて GnTI の mRNA の相対的発現量を定量し、ミクロソーム画分の GnTI 活性を測定することで形質転換植物をスクリーニングした。さらに、抗西洋ワサビレオキターゼ抗体を用いたウェスタンブロットおよび、選抜した個体について詳細な糖鎖構造解析を行った。

【結果】 形質転換植物の GnTI 発現を RT-PCR 法で調べ、野生型に比べて GnTI mRNA の発現量が低下した株を得た。また、発現量とミクロソーム画分における GnTI 活性には相関が認められた。さらに T1 世代では、センス-アンチセンス型で GnTI の発現が顕著に抑制されていた。この T2 植物ラインの糖鎖構造解析により、野生型に比べて植物型糖鎖の含量が減少し、M5 型糖鎖の蓄積量の増加が認められた。

### Modification of plant-specific N-glycan structure by suppression of N-acetylglucosaminyltransferase I expression

Koji Dohi<sup>1</sup>, Hitomi Yumioka<sup>1,2</sup>, Junko Isoyama<sup>1</sup>, Terumi Kikuchi<sup>1</sup>, Kazuhito Fujiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>ICBiotech, Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Nutrit. Sci., Osaka-Seikei Coll.)

**Key words** glycosylation, glycosyltransferase, *Nicotiana tabacum*

**2P-2p187 均一な糖鎖構造を有する抗体 Fc 領域の生産と解析**

○千葉 靖典<sup>1</sup>, 高橋 佳江<sup>1</sup>, 岩城 隼<sup>2,3</sup>, 石田 秀樹<sup>2,3</sup>, 松崎 祐二<sup>2,3</sup>,  
平林 淳<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>産総研・創薬基盤, <sup>2</sup>東京化成工業, <sup>3</sup>次世代バイオ医薬品製造  
技術研究組合)

y-chiba@aist.go.jp

抗体等のバイオ医薬品の製造プロセスの段階において、細胞株の選抜やスケールアップ時の糖鎖構造の相違を確認するために、糖鎖をより迅速かつ再現性よく解析する技術が求められている。我々は抗体の糖鎖分析の際に用いる手法の適合性を担保するための校正物質の開発を検討してきた。昨年度の大会では、酵母で生産した抗体 Fc 領域の糖鎖を酵素的に処理し、化学合成した糖鎖と付け替えることにより均一な糖鎖構造を有する Fc 領域の調製条件の検討を報告した。今回は、昨年度検討した方法によるアガラクト二分岐複合型 (G0) 糖鎖、モノガラクトシル二分岐複合型 (G1, G1') 糖鎖、アシアロ二分岐複合型 (G2) 糖鎖を付加した Fc の生産と糖鎖構造解析、ならびにコアフコース付アガラクト二分岐複合型 (G0F) 糖鎖を有する Fc の合成について報告する。

メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* 株によりヒト抗体の Fc 領域を発現、糖鎖の切断と精製を行なった。一方、化学合成した G0、G1、G1'、G2 型糖鎖を切断しながら、直接糖鎖を転移する方法で Fc への糖鎖転移を行なった。未反応物が確認されたため、プロテイン G カラムを用いることによりそれぞれ目的の Fc を精製した。得られた G0-Fc、G1'-Fc、G2-Fc を等量混合し、これらから糖鎖を切り出して蛍光標識し、HPLC にて分析を行なった。その結果、G0 糖鎖のピーク面積が他に比べて若干少ないことから、これが調製した Fc のサンプルに依存するのかが、精製法や分析に依存し減少するのかが検討している。一方、フコース転移酵素 FUT8 を用いた G0-Fc へのフコース転移を検討した。レクチンプロットおよび HPLC による解析により、24 時間以内にフコース修飾が完了することが示唆された。今後ガラクトース転移酵素を利用し、G2F-Fc の作製を検討したい。

**Production and evaluation of IgG Fc region with homogeneous glycan**

○Yasunori Chiba<sup>1</sup>, Yoshie Takahashi<sup>1</sup>, Jun Iwaki<sup>2,3</sup>, Hideki Ishida<sup>2,3</sup>,

Yuji Matsuzaki<sup>2,3</sup>, Jun Hirabayashi<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>BRD, AIST, <sup>2</sup>Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., <sup>3</sup>MAB)

**Key words** antibody, glycosynthase, homogeneous glycan, *Ogataea minuta*



# 9月30日 (金)

## シンポジウム (13:00 ~ 15:00)

富山国際会議場 3階 A会場, 2階 B会場 / ANA クラウンプラザホテル富山 3階 C,D,E会場

|   |                   |        |
|---|-------------------|--------|
| 酒類製造における革新技术【本部企画】  | 3S-Ap01 ~ 3S-Ap05 | p. 265 |
| 生命ビッグデータの利活用による生物工学のイノベーション   | 3S-Bp01 ~ 3S-Bp07 | p. 267 |
| Gap Filling of Metabolic Pathway and Application<br>to Producing Valuable Compounds | 3S-Cp01 ~ 3S-Cp06 | p. 271 |
| 和食の機能性のメカニズム～生活習慣病予防, 腸内細菌へのインパクト～  | 3S-Dp01 ~ 3S-Dp05 | p. 274 |
| セルフリー (無細胞) タンパク質合成技術の新展開   | 3S-Ep01 ~ 3S-Ep05 | p. 276 |

## 一般講演（午前の部） ポスター掲示時間（9月29日 18:15～30日 11:00）

ポスター会場Ⅰ：富山国際会議場2階

ポスター会場Ⅱ：ANAクラウンプラザホテル富山3階 ASUKA

|                    |              |        |
|--------------------|--------------|--------|
| 分類, 系統, 遺伝学        | 3P-1a001～008 | p. 219 |
| 遺伝子工学              | 3P-1a009～033 | p. 221 |
| 酵素学, 酵素工学          | 3P-1a034～043 | p. 227 |
| タンパク質工学            | 3P-1a044～053 | p. 229 |
| 抗体工学               | 3P-1a054～063 | p. 232 |
| 発酵生理学, 発酵工学        | 3P-1a064～074 | p. 234 |
| 代謝工学               | 3P-1a075～087 | p. 237 |
| オミクス解析             | 3P-1a088～097 | p. 240 |
| 環境工学, 廃水処理技術       | 3P-1a098～113 | p. 243 |
| バイオマス, 資源, エネルギー工学 | 3P-1a114～131 | p. 247 |
| 生合成, 天然物化学         | 3P-2a132～154 | p. 251 |
| 有機化学, 高分子化学        | 3P-2a155     | p. 257 |
| ペプチド工学             | 3P-2a156～170 | p. 257 |
| 脂質工学               | 3P-2a171～175 | p. 261 |
| 生物工学若手研究者の集い（若手会）  | 3P-2a176～184 | p. 262 |

## 一般講演（午後の部） ポスター掲示時間（9月30日 11:15～17:30）

ポスター会場Ⅰ：富山国際会議場2階

ポスター会場Ⅱ：ANAクラウンプラザホテル富山3階 ASUKA

|                      |              |        |
|----------------------|--------------|--------|
| 遺伝子工学                | 3P-1p001～029 | p. 279 |
| 植物細胞工学, 組織培養, 育種工学   | 3P-1p030～034 | p. 286 |
| 酵素学, 酵素工学            | 3P-1p035～057 | p. 287 |
| タンパク質工学              | 3P-1p058～068 | p. 293 |
| 発酵生理学, 発酵工学          | 3P-1p069～077 | p. 296 |
| オミクス解析               | 3P-1p078～086 | p. 298 |
| 生体情報工学, バイオインフォマティクス | 3P-1p087～097 | p. 300 |
| システムバイオロジー           | 3P-1p098     | p. 303 |
| 環境工学, 廃水処理技術         | 3P-1p099～111 | p. 303 |
| バイオマス, 資源, エネルギー工学   | 3P-1p112～129 | p. 306 |
| 生物化学工学               | 3P-2p132～154 | p. 311 |
| 培養工学                 | 3P-2p155～167 | p. 317 |
| バイオプロセス              | 3P-2p168～177 | p. 320 |

## 3P-1a001 モンゴル国から分離した酵母の多様性及び

## Metschnikowia 属 2 新種の生育特性と脂質生産能

○Jambaldorj Ulziichimeg<sup>1</sup>, 山崎 敦史<sup>1</sup>, Balijanova Tsetseg<sup>2</sup>,  
安藤 勝彦<sup>1</sup>, 鶴海 泰久<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>NITE・NBRC, <sup>2</sup>モンゴル科学院・生物研究所)  
tsurumi-yasuhisa@nite.go.jp

目的 NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) では、生物多様性条約に基づき、生物遺伝資源の二国間移転に関する枠組みを構築し、アジア諸国において微生物の探索支援事業を行っている。本研究では、モンゴル国の発酵食品及び植物から分離した酵母の多様性及び、新規候補種の生育特性、脂質生産量及びその脂肪酸組成の分析結果を報告する。

方法 モンゴル国の伝統的な発酵食品及び植物から YM20 培地 (20% Glucose, 0.3% Malt extract, 0.3% Yeast extract, 0.5% Peptone) を用いて集積培養した後、希釈平板培養法により酵母を分離した。分離株は 26S rRNA 遺伝子 D1/D2 領域塩基配列 (以下、26S rRNA) の解析による簡易同定を行った。さらに、新規性が認められた 2 株について、生育特性、脂質生産量及びその脂肪酸組成の分析を行った。

結果と考察 2013 年に 102 株、2014 年に 66 株の合計 168 株の酵母を分離し、26S rRNA 解析から 18 属 27 種を推定した。高頻度で分離されたのは、発酵食品からは *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* 及び *Dekkera anomala* であり、植物からは *S. cerevisiae*, *Metschnikowia reukaufii* 及び *Candida parapsilosis* であった。*Metschnikowia* 属の新種として推定される 2 株 (MN13-F0057 及び MN13-F0074) が生産する脂質の脂肪酸組成を調べたところ、各々中鎖脂肪酸のラウリン酸を総脂質の 50% 及び 70% 程度生産し、さらにオレイン酸及びパルミチン酸を生産することが明らかとなった。生育特性の調査からは、両株とも 10% 濃度以上の D-Xylose を含む培地で生育することから、植物バイオマスを原料としたラウリン酸の生産に応用できる可能性が示唆された。なお、本研究で分離したモンゴル国由来の酵母はすべて NBRC より提供可能である。

Diversity of yeasts in Mongolia, and lipid producing two new species of *Metschnikowia*

○Ulziichimeg Jambaldorj<sup>1</sup>, Atsushi Yamazaki<sup>1</sup>, Tsetseg Balijanova<sup>2</sup>,  
Katsuhiko Ando<sup>1</sup>, Yasuhisa Tsurumi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>NBRC, NITE, <sup>2</sup>Inst.General & Experimental Biol., Mongolia)

**Key words** yeast, lipid, D-xylose, *Metschnikowia*

3P-1a002 鹿児島県及び山口県で分離した油脂酵母 *Lipomyces* 属及び油脂生産能について

○山崎 敦史, 川崎 浩子  
(NITE・NBRC)  
yamazaki-atsushi@nite.go.jp

【背景と目的】 *Lipomyces* 属酵母は、*Saccharomycetales* 目に属する子の菌酵母であり、本酵母が大量に生産する油脂はバイオ燃料に活用できると期待されている。土壌が主な生息域とされているが、その生態や種分布については不明な点が多い。本研究では、鹿児島県及び山口県で収集した土壌から *Lipomyces* 属酵母の分離を行い、生息地や環境との相関性を調べるための分布情報の蓄積と、高油脂生産能を有する新規酵母株を取得することを目的とした。

【方法と結果】無窒素培地 (NDM) を用いた希釈平板法により土壌試料から取得したムコイド状の酵母コロニーに対し、26S rRNA D1/D2 領域及び Elongation Factor 1 $\alpha$  遺伝子 (*EF-1 $\alpha$* ) の塩基配列を用いた分子系統解析による同定を行った。鹿児島県の森林土壌から取得した *Lipomyces* 属酵母は合計 59 株であり、88.1% が *L. starkeyi* となり大部分を占め、残り 11.9% が *L. doorenjongii* であった。山口県からは合計 48 株が得られ、そのうち 56.3% が *L. starkeyi* で最も多くを占め、続いて *L. doorenjongii* が 41.7%、*L. chichibuensis* が 2.1% だった。*L. doorenjongii* は、我々がこれまでに北海道、埼玉県、千葉県、静岡県及び沖縄県の土壌から分離した酵母の中で、唯一沖縄県から分離されていた。鹿児島県及び山口県は、静岡県と沖縄県の中間にあたる場所に位置していることから、*L. doorenjongii* は本州の南西から分布し、沖縄県では *L. starkeyi* と置き換わるように優占種になると考えられた。また、*L. kononenkoae*, *L. spencermartinsiae*, *L. yamadai* 及び *L. yarrowii* の 4 種が、沖縄県では分離されたが鹿児島県及び山口県から分離されなかったことも、*Lipomyces* 属各種の分布と気候との間に何らかの関係性があるためと考えられる。また、分離酵母株の中から遺伝的に異なる 20 株を選び、脂質生産量及びその脂肪酸組成を測定したため併せて報告する。

Isolation and analysis for lipid production ability of genus *Lipomyces* in Kagoshima and Yamaguchi

○Atsushi Yamazaki, Hiroko Kawasaki  
(NBRC, NITE)

**Key words** *Lipomyces*, taxonomy, ecology, biofuel

3P-1a003 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の新規溶血因子の同定

○島谷 雅文<sup>1</sup>, 高原 沙里<sup>1</sup>, 阿座 弘行<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学・農学系, <sup>3</sup>山口大・中高温  
微セ)  
azakami@yamaguchi-u.ac.jp

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* 1073 株は重度歯周病患者からの臨床分離株であり、羊血液寒天培地上でコロニーの周りの血液が透明になる  $\beta$  溶血が観察される。

まず、溶血因子の精製を試みた。1073 株を培養後、培養上清および細胞外被画分を得た。これらの画分の溶血アッセイを行ったところ、細胞外被画分から濃度依存的に溶血活性が見られた。そこで、この画分を界面活性剤で可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、約 65kDa の単一タンパク質として精製され、濃度依存的に溶血活性が認められた。N 末端アミノ酸シーケンスの解析の結果、得られた配列は既にゲノムが解読されている *E. corrodens* 23834 株の X-Proryl aminopeptidase (HlyA) の 2 から 11 番目のアミノ酸配列とはほぼ一致していた。したがって、この 65kDa のタンパク質が溶血因子であることが示唆された。

次に、このタンパク質の大腸菌での発現を試みた。HlyA をコードする遺伝子 (*hlyA*) を発現ベクター pET22b(+) に繋ぎ、*E. coli* BL21(DE3) に導入した。これを培養し、IPTG の添加により発現誘導を行ったところ、約 65kDa のタンパク質の発現が確認できた。Ni カラムでこのタンパク質を精製したところ、精製タンパク質から溶血活性が見られた。

さらに、HlyA の遺伝子欠損株の作成を試みた。*hlyA* 遺伝子の中にカナマイシン耐性遺伝子を挿入し、これをプラスミド pBR322 に繋いだ。これをエレクトロポレーションにより *E. corrodens* 1073 株に導入し、得られたカナマイシン耐性株の中から、フザリン酸耐性によるカウンターセクションでテトラサイクリン感受性株をスクリーニングし、*hlyA* 欠損株を得た。欠損株からは溶血活性が見られなかった。これらの結果から、HlyA が本菌の溶血因子であることが確認された。

Identification of novel hemolytic factor in periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*

○Masafumi Shimatani<sup>1</sup>, Sari Takahara<sup>1</sup>, Hiroyuki Azakami<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. and Tech for Innov., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>Res. Cent. for Thermotol. Microb. Resour., Yamaguchi Univ.)

**Key words** periodontopathogenic bacteria, *Eikenella corrodens*, hemolytic factor, aminopeptidase

3P-1a004 MALDI-TOF MS を用いたバイオマーカーによる *Acinetobacter* 属細菌の高精度識別

○下平 潤, 則武 ちあき, 野口 正宏, 上條 知昭, 川崎 浩子  
(NITE・NBRC)  
jshimo74@gmail.com

【背景・目的】 *Acinetobacter* 属細菌には、環境汚染物質分解菌や原油分解菌など、産業上有用な株が存在する。一方で、*Acinetobacter* 属には日和見感染菌種も存在することから、有用株を利用するためには、正確な種名を同定し、日和見感染菌種ではないことを確認する必要がある。しかし、*Acinetobacter* 属は 16S rRNA 遺伝子配列の多型度が低く、正確な同定が困難である。また、表現性状が非常に類似しており、MALDI-TOF MS による指紋判定法では種レベルでの正確な識別・同定を行うことができない。そこで、本研究では、MALDI-TOF MS を用いて、*Acinetobacter* 属を種レベルで高精度に識別・同定するためのバイオマーカーの作成を目的とした。

【方法】バイオマーカーとしてリボソームタンパク質を想定し、*Acinetobacter* 属基準株 28 株のゲノム情報からリボソームタンパク質の理論分子量を算出するとともに、微生物同定で使用されている Shimadzu 社製及び Bruker Daltonics 社製の両 MALDI-TOF MS を用いて測定を行った。リボソームタンパク質の理論分子量と実測値とを比較して、2 社の MALDI-TOF MS で検出可能なリボソームタンパク質のなかからバイオマーカーを選抜した。

【結果】最終的に、11 個のリボソームタンパク質をバイオマーカーとして選抜した。選抜したバイオマーカーの妥当性を検証するために、既に種レベルで同定されている *Acinetobacter* 属株 32 株を MALDI-TOF MS で測定し、バイオマーカーによる同定を行った結果、全て種レベルで正確に同定することができた。この結果より、選抜したバイオマーカーが *Acinetobacter* 属株の種レベルでの識別・同定に有効であることが示された。

Development of biomarkers for high quality identification of *Acinetobacter* species using MALDI-TOF MS

○Jun Shimodaira, Chiaki Noritake, Masahiro Noguchi, Tomoaki Kamijo,  
Hiroko Kawasaki  
(NITE・NBRC)

**Key words** *Acinetobacter*, MALDI-TOF MS, biomarker, ribosomal protein

### 3P-1a005 MALDI-TOF MS を用いた *Aspergillus flavus* とその類縁菌の迅速同定法のための前処理最適化

○上條 知昭, 下平 潤, 川崎 浩子  
(NITE・NBRC)  
kamijo-tomoaki@nite.go.jp

【背景と目的】MALDI-TOF MS を用いた微生物の迅速同定が臨床分野だけではなく、食品の品質管理分野に広がりがつつあるが、未だ糸状菌への対応が進んでいない状況である。その大きな原因はデータの安定化が確保できていないことにある。そこで、産業的に有用な糸状菌と有害菌が混在することが知られている *Aspergillus flavus* 類縁菌について、安定したデータを得るための前処理を検討したので報告する。

【方法】*A. flavus* 類縁菌である *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus nomius* を用い、培地による影響（平板培養と液体培養、培地の種類の違い、培養日数の違い）を検討した。さらに、菌体を回収してからの、溶菌方法の違いによるデータの安定性について比較を行った。溶菌後は、同様の方法で 80%エタノール処理と 70%酢酸：アセトニトリル処理後、その上清 1μL をマトリックス剤 CHCA および Sinapinic acid (SA) を用いて解析を行い、検出されるマススペクトルのデータの安定性を比較した。得られたデータを用いてデータベースを構築し、クラスタリング解析を実施し、前処理方法による同定結果に影響を与えるかどうかについて併せて検討を行った。

【結果と考察】平板培養においては培地を変えても液体培養を行った時に比べ、安定した結果が得られなかった。また、液体培養では培養日数を統一することで安定したマススペクトルのデータを得ることができた。さらに SA を用いても良好なピークを得ることができた。加えて、培養条件が異なるとクラスタリングの結果にも影響を与えることが明らかとなり、培養条件を統一することにより、MALDI-TOF MS を用いた指紋判定による迅速同定が可能となることが示唆された。

#### Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of *Aspergillus flavus* and its related fungi

○Tomoaki Kamijo, Jun Shimodaira, Hiroko Kawasaki  
(NBRC, NITE)

**Key words** MALDI-TOF MS, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, identification

### 3P-1a006 生分解性プラスチック分解糸状菌 B47-9 株のゲノム解析と同定

○山下 (鮫島) 結香<sup>1</sup>, 小坂橋 基夫<sup>1</sup>, 小池 英明<sup>2</sup>, 佐藤 豊三<sup>1</sup>, 森脇 丈治<sup>1</sup>, 雑賀 あずさ<sup>2</sup>, 森田 友岳<sup>2</sup>, 北本 宏子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農研機構, <sup>2</sup>産総研)  
kitamoto@affrc.go.jp

【背景と目的】生分解性プラスチック（生プラ）を効率よく分解する糸状菌 B47-9 株は、乳化した生プラを単一炭素源として液体培養すると、培養上清中にクチナーゼ様の生プラ分解酵素を高純度に分泌する。我々は、様々な生プラ分解性を示す酵素を、使用済み生プラ製農業用資材の効率的分解促進に用いるための検討を進めている。本研究では、酵素生産性の向上を目指して、B47-9 株のゲノム配列を解読するとともに、本菌株の同定を試みた。

【方法と結果】ゲノム解読はペアエンド、メイトペアライブラリーを作成し、Illumina 社の Miseq システムを用いて実施した。その結果、B47-9 株のゲノムサイズは 39.3 Mbp、GC 含量は 52.4%であった。さらに、*Aspergillus nidulans* FGSC A4 株のゲノム情報を参考にして、14,202 個の遺伝子の存在が推定された。B47-9 株は菌株の同定に必要な胞子を作らず、同定が完了できない。そこで、遺伝子レベルでの解析を進めた。リボソーム遺伝子 (LSU, SSU)、および ITS 全領域の配列比較から、B47-9 株は *Paraphoma* 属に属すると断定した。B47-9 株に最も近縁の *Paraphoma* 属の 6 株（農業生物資源ジーンバンク保存株）は、いずれも 2 種類の生プラフィルム（ポリブチレンサクシネート、ポリブチレンサクシネート-co-アジバート）分解能を示し、このうち B47-9 株が最も強力であった。本成果により、これまでほとんど解明されていない *Paraphoma* 属のゲノム科学情報の拡充や、酵素生産株としての利用が期待される。本研究は農林水産産業・食品産業科学研究推進事業 25017AB および JSPS 科研費 No.25・40169 の助成を受けて行った。

#### Draft genome sequence and identification of biodegradable plastic degrading fungi B47-9

○Yuka Sameshima-Yamashita<sup>1</sup>, Motoo Koitabashi<sup>1</sup>, Hideaki Koike<sup>2</sup>, Toyozo Sato<sup>1</sup>, Jyoji Moriwaki<sup>1</sup>, Azusa Saika<sup>2</sup>, Tomotake Morita<sup>2</sup>, Hiroko Kitamoto<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>NARO, <sup>2</sup>AIIST)

**Key words** biodegradable plastic, phylogenetic analysis, cutinase, *Paraphoma*

### 3P-1a007 青枯病菌に感染する Viunalikevirus, RP15 の単離と解析

○川崎 健<sup>1</sup>, 三原 知子<sup>2</sup>, 緒方 博之<sup>2</sup>, 藤江 誠<sup>1</sup>, 山田 隆<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>京大・化研)  
takeru@hiroshima-u.ac.jp

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は温暖な気候を中心に世界中に分布する土壌伝染性の植物病原細菌である。本菌はトマトやナスなど経済的に重要な作物を多数含む 50 科 200 種以上の植物に感染し被害を及ぼしている。この菌は地中深くで何年も生存するため、一度汚染された土壌から完全に除去することが困難である。そこで当研究室では、この菌に特異的に感染するファージに着目し、予防や防除技術への利用、青枯病菌検出ツールや研究ツールとしての応用を目指した研究を行っている。これらの目的のためにはファージストックの拡充が必須で有り、自然界からの単離を続けている。今回、Viunalikevirus (以下 VLV) に類似した RP15 ファージを単離、解析したのでこれを報告する。

【方法・結果】VLV は Gammaproteobacteria に感染する T4-related なファージであり特徴的な尾部構造を持つ。尾部プレートの先端にはフォーク様突起が、プレート横には星形の突出構造が存在し、高い吸着効率を示す。今回発見した RP15 は Betaproteobacteria である *R. solanacearum* に感染するファージであり、TEM 観察から星形の突出構造の存在は確認できたが、プレート先端の突起は観察できなかった。全ゲノム配列を決定したところ、167,619 bp であり、17 個もの tRNA をコードしていた。GC 含量は 44.7%と宿主の 67%よりも極端に低かった。他の VLV との比較を行うと、tail spike 遺伝子が存在せず、TEM 観察の結果を支持するものとなった。また、吸着実験を行ったところ T4 と同程度の吸着係数を示し、VLV の Limestone1 等と比べると 1/10 程度であった。一方で、吸着後の可逆性について解析したところ同程度の吸着係数を持つ RSL1 と比べはるかに安定した結合を示した。このことから星状構造が安定的な吸着に関与することが予想された。系統解析の結果 VLV の sister branch を形成すると考えた。

#### Characterization of Viunalikevirus infecting phytopathogen *Ralstonia solanacearum*.

○Takeru Kawasaki<sup>1</sup>, Tomoko Mihara<sup>2</sup>, Hiroyuki Ogata<sup>2</sup>, Makoto Fujie<sup>1</sup>, Takashi Yamada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

**Key words** phage, *Ralstonia solanacearum*

### 3P-1a008 畑土壌微生物叢の解析

○小西 智之<sup>1</sup>, 坂井 紗織<sup>2</sup>, 海野 智史<sup>2</sup>, 橋本 賢一<sup>2</sup>, 川崎 寿<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>電機大院・先科技, <sup>2</sup>東電大・工・環境化)  
kawasaki@cck.dendai.ac.jp

70 億人を超えて急増する世界人口と途上国の経済発展によって食糧需要の拡大は続いている。これらを賄うには農業技術の進歩が欠かせない。現在の地球は、砂漠化などで新たな農地の拡張は難しく、水耕栽培などで農地を持たない機械的に栽培するといった新しい農業技術の開発や現在の農地の面積当たりの収穫量を飛躍的に伸ばす必要が出てきている。

現在の農地の面積当たりの収穫量を伸ばすには植物の品種改良といった方法で収穫量を伸ばせるがそれにもいずれ限界が来ると考えられる。

そこで我々は農地の回転率を上げることで面積当たりの収穫量を伸ばすことを考えている。回転率を上げるには植物を育てる過程で必要な栄養素 17 元素が不可欠である。このうち 9 元素は、炭素、酸素、水素、窒素、リン、カリウム、カルシウム、マグネシウムで多量必須元素であり、8 元素は、鉄、マンガン、銅、亜鉛、ホウ素、塩素、モリブデン、ニッケルで微量必須元素、これらが必須栄養素と呼ばれている。これら 17 元素のうち窒素、リン、硫酸などといったものが土壌中の微生物を介して植物に吸収されている。また、他にも立枯病や連作障害といった植物が病気に生育不良にならないことも収穫量を伸ばすには不可欠である。

このように土壌中には植物の生育に役に立つ微生物、菌根菌などといったものから、立枯病などといった植物を病気にする病原菌が存在する。次世代シーケンサを用いた 16S や 18S のアンプリコン解析によって農地の土壌の微生物叢の分析を行った。その結果、小松菜の作付け前、栽培途中、収穫直後といった周囲の環境変化に応じて微生物叢に違いがみられた。

#### Analysis of field soil microbiota

○Tomoyuki Konishi<sup>1</sup>, Saori Sakai<sup>2</sup>, Satoshi Umino<sup>2</sup>, Ken-ichi Hashimoto<sup>2</sup>, Hisashi Kawasaki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Technol. Tokyo Denki Univ., <sup>2</sup>Dept. Green Sust. Chem., Eng. Dept., Tokyo Denki Univ.)

**Key words** Next Generation Sequencer, NGS, soil

### 3P-1a009 コリネ型細菌における乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *ldhA* の発現制御機構の解析

○豊田 晃一<sup>1</sup>, 乾 将行<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>RITE・バイオ,<sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
 mmg-lab@rite.or.jp

【背景と目的】乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)はピルビン酸を NADH 依存的に乳酸へ還元する酵素であり、生体内の酸化還元バランスの維持において重要である。我々は有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* における酸化還元バランスの調節機構の解明を目的として、LDH をコードする遺伝子 *ldhA* の発現制御機構の解析を進めている。これまでに糖応答因子 SugR および乳酸応答因子 LldR が転写抑制因子として働くことを明らかにしている。しかし *ldhA* の定常期における誘導は *sugR-lldR* 破壊株においても見られることから、別の転写因子の関与が示唆されていた。本研究では、cAMP receptor protein ファミリーに属するグローバルレギュレーター、GlxR の関与について解析を行った。

【方法】プロモーター活性を *lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、遺伝子の mRNA レベルを定量 PCR によりそれぞれ測定した。GlxR タンパク質を組換え大腸菌より精製し Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により DNA 結合活性を検出した。

【結果と考察】*in silico* 解析により、*ldhA* 遺伝子上流に GlxR 結合サイトが予測されている<sup>1</sup>。この結合サイトを削除することにより定常期におけるプロモーター活性の誘導が大きく減少した。EMSA により、この結合サイトに GlxR が弱いながらも結合することを示した。コンセンサス結合配列と比較して保存された塩基の置換によりこの結合は消失した。反対に、コンセンサス結合配列に近づけることにより GlxR の結合は強まった。さらに、結合を阻害する変異により、プロモーター活性は減少し、結合を促進する変異により活性は増加した。染色体上へ同じ変異を導入することで *ldhA* の発現が GlxR の結合強度に応じて変化することを示した。以上より、GlxR が *ldhA* の転写活性化因子として働くことを明らかにした。

I. J. Biotechnol. 143(4), 239-46, (2009)

### The transcriptional regulatory mechanism of the *ldhA* gene encoding lactate dehydrogenase, in *Corynebacterium glutamicum*

○Koichi Toyoda<sup>1</sup>, Masayuki Inui<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>RITE, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, transcriptional regulation, lactate dehydrogenase

### 3P-1a010 *Corynebacterium glutamicum* によるグルタミン酸生産に対するストレスの影響

○尾形 駿介<sup>1</sup>, 齊藤 正輝<sup>2</sup>, 吉川 勝徳<sup>2</sup>, 古澤 力<sup>3</sup>, 清水 浩<sup>2</sup>, 平沢 敬<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東工大・生命理工学院, <sup>2</sup>阪大院・情報, <sup>3</sup>理研・生命システム)  
 thirasawa@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】コリネ型細菌の一種である *Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸生産菌として日本で単離された通性嫌気性のグラム陽性細菌であり、発見から 50 年以上経つ現在でも、グルタミン酸の生産メカニズムには不明な点が多い。我々は、そのメカニズムを解明することを目指して、ペニシリン添加によるグルタミン酸生産誘導時の遺伝子発現変化について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、ストレス応答に関わる転写因子の制御下にある遺伝子が、多く発現変動を起こすことを見出し、グルタミン酸生産がストレス応答の一部として機能していることが推測された。本研究では、*C. glutamicum* の野生株およびグルタミン酸排出にかかわるメカノセンシティブチャネル NCgl1221 の変異株によるグルタミン酸生産に対するストレスの影響、特に金属イオンの影響を調べた。

【実験方法および結果】グルコースを基質とした合成培地で培養し、*C. glutamicum* の野生株 ATCC 13032 に対して銅 (II)・鉄 (II)・コバルト (II)・過酸化水素を対数増殖初期に添加してグルタミン酸生産を測定したところ、銅 (II) や鉄 (II) の添加によりわずかながらグルタミン酸の生産が確認された。そこで、グルタミン酸が恒常的に排出される NCgl1221 の変異株 (A111V) について銅 (II)・亜鉛 (II)・鉄 (II)・マンガン (II)・マグネシウム (II) の添加を行い、添加後のグルタミン酸生産を測定したところ、銅 (II)・亜鉛 (II)・鉄 (II)・マンガン (II) の添加による顕著なグルタミン酸生産の誘発が確認された。特に、銅 (II) の添加では著しく生産量が增大しており、その生産性は野生株にペニシリンを添加した際と同程度であったことから、銅代謝がグルタミン酸生産に関与する可能性が示唆された。

### Effect of stress on glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*

○Shunsuke Ogata<sup>1</sup>, Masaki Saito<sup>2</sup>, Katsunori Yoshikawa<sup>2</sup>, Chikara Furusawa<sup>3</sup>, Hiroshi Shimizu<sup>2</sup>, Takashi Hirasawa<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, <sup>2</sup>Grad. Sch. IST, Osaka Univ., <sup>3</sup>QBiC, RIKEN)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, glutamate fermentation, stress, Cu<sup>2+</sup>

### 3P-1a011 ビペリジン分解菌の分離と分解系遺伝子の解析

○山本 泰誠, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛  
 (関西大 化学生命工)  
 iwaki@kansai-u.ac.jp

【目的】脂環式アミンであるビペリジンは、医薬中間体など工業的に広く使用されている。環境中に放出されると発がん性のあるニトロソ化合物に変換されるため、その微生物分解についての知見は重要である。本研究では、土壌からビペリジン分解菌を分離するとともに、トランスポゾン挿入変異によりビペリジン分解に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】10mM ビペリジンを唯一の炭素源・窒素源として含む無機塩培地を用い、集積培養を行い、土壌からビペリジン分解菌 4-3 株を分離した。4-3 株は、16SrRNA 遺伝子配列に基づく系統解析の結果、*Pseudomonas* 属に帰属された。本菌株のビペリジン代謝経路およびビペリジン代謝に関与する遺伝子を解析するために、トランスポゾン (Tn5-31Tp) を利用し、ビペリジン資化能が欠損した 2 菌株 (M1 と M7) を取得した。これらの変異株のトランスポゾン挿入部位を特定するために、トランスポゾン周辺領域をインバース PCR 法で増幅し、塩基配列の解析を行った。その結果、M1 株では、ポリアミン ABC トランスポーターの基質結合タンパク質様遺伝子に、M7 株では、FMN 結合タンパク質様遺伝子にトランスポゾンが挿入されていることが明らかになった。現在、トランスポゾン挿入遺伝子周辺領域の塩基配列を解析し、分解機構の解明を試みている。

### Isolation and genetic characterization of piperidine degrading bacterium

○Taisei Yamamoto, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa  
 (Dept. Life Sci. & Biotechnol. Kansai Univ.)

**Key words** piperidine, degradation, *Pseudomonas*

### 3P-1a012 大腸菌 *tolC* 欠損株が酸感受性を示す機構の解析

○神田 健, 安彦 弦太, 岩井 伯隆, 和田 正明  
 (東工大・生命理工学院)  
 mwachi@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】大腸菌 *Escherichia coli* の外膜を貫通するチャネルタンパク質である TolC は、内膜上のポンプタンパク質と共役し、抗生物質等の外来物質や、インドール等の代謝物を能動的に排出することが知られている。当研究室では、大腸菌の *tolC* 遺伝子欠損株が酸感受性を示すことを見出し、主要な酸耐性機構の一つである GAD システムの発現誘導が阻害されていることを明らかにした。大腸菌 *tolC* 欠損株では、TolC 排出システムの基質が細胞内に蓄積することで、GAD システムの発現誘導が阻害されている可能性が考えられた。そこで *tolC* 欠損株において、TolC 排出システムの基質の一つであるインドールの合成酵素をコードする遺伝子 *tnaA* を欠損させたところ、GAD システムの発現の回復が見られ、酸耐性も回復した。従って、*tolC* 欠損株では、蓄積したインドールにより GAD システムが抑制されていると考えられた。本研究では、インドールによる GAD システムの発現抑制が起こるメカニズムの解明を目的とした。

【方法】インドールによる抑制シグナルを伝達する経路の特定のため、GAD システムの転写制御因子と *tnaA* 遺伝子との二重欠損株を構築し、GAD assay により GAD システムの発現の程度を調べた。(1) 転写制御因子欠損株では GAD システムの発現が抑制されること、(2) それがインドールによる抑制に関与する因子であれば、*tnaA* との二重欠損にしても GAD システムの発現が回復しないことが予想された。

【結果】(1)、(2) の条件を満たす転写制御因子として、GadE と RpoS の 2 つの因子を特定した。GadE は GAD システムのマスターレギュレーターであり、GAD システムの発現に必須であると考えられている。RpoS は *gadE* 遺伝子上流のプロモーター領域を認識し、転写を促進すると考えられているシグマ因子である。現在、TolC と RpoS の関連性について解析中である。

### Analysis of *Escherichia coli tolC* mutant showing increased acid sensitivity

○Takeshi Kanda, Genta Abiko, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi  
 (Dept. Life Sci. Technol.)

**Key words** *Escherichia coli*, acid tolerance, transporter, TolC

3P-1a013 *Bacillus* 属由来酵素の PHA モノマー供給能解析

○木原 崇博<sup>1</sup>, 廣江 綾香<sup>1</sup>, 水野 康平<sup>2</sup>, 柘植 文治<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>北九州高専)  
 tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】微生物が炭素源として貯蔵するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は生分解性、熱可塑性、生体適合性を有するバイオポリエステルである。現在、PHA 生産宿主として用いられている *Escherichia coli* や *Ralstonia eutropha* はグラム陰性菌で、内毒素リポポリサッカライド(LPS)を合成する。LPS は PHA 精製の際に同時に抽出されるため、PHA を医療用担体として利用するためには LPS を取り除く工程が余分に必要となる。そこで LPS 非生産宿主として *Bacillus* 属に着目した。しかし、*Bacillus* 属の PHA 合成遺伝子クラスターの解析は、グラム陰性菌ほど進んでいない。本研究では、*Bacillus* 属の PHA 合成遺伝子クラスターに含まれる 2 つのモノマー供給酵素候補である enoyl-CoA hydratase (PhaJ) と oxidoreductase について解析を行った。

【方法】脂肪酸からモノマーを供給する PhaJ の解析は炭素数 4 のクロトニル CoA を基質として *in vitro* 系で活性測定を行った。また、*in vivo* 系では幅広い基質特異性を有する PHA 重合酵素遺伝子(*phaC*)と共に *phaJ* を導入した大腸菌に炭素数 12 の脂肪酸から PHA を生産させ、ガスクロマトグラフィーにより合成した PHA の含有量と組成を測定した。Oxidoreductase は pET-15b に導入してタンパク質の過剰発現系を構築した。

【結果と考察】*In vitro* 系で *Bacillus* 属の PhaJ が炭素数 4 の基質に対して活性を有していることを示した。また、*in vivo* 系においても炭素数 4 と 6 のモノマー組成が増加したことから、*Bacillus* 属の PhaJ は PHA 重合酵素と類似した短鎖 PHA に基質特異性があると考えられる。また、oxidoreductase については pET システムを用いた過剰発現系を構築した。この oxidoreductase のアミノ酸配列は D-amino acid oxidase と高い相同性を有することから、現在、アミノ酸代謝の観点から PHA 生産との関連性を探索している。

Evaluation of PHA monomer-supplying capability of enzymes from *Bacillus* spp.

○Takahiro Kihara<sup>1</sup>, Ayaka Hiroe<sup>1</sup>, Kouhei Mizuno<sup>2</sup>, Takeharu Tsuge<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, <sup>2</sup>Kitakyushu Natl. Coll. Technol.)

**Key words** PHA, *Bacillus* sp., monomer supply, activity assay

3P-1a014 枯草菌の *iolH* がイノシトール代謝において果たす生理的意義

○松本 明日香<sup>1</sup>, Reuss Daniel<sup>2</sup>, 田中 耕生<sup>3</sup>, 石川 周<sup>1</sup>, 竹中 慎治<sup>4</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>Dept. General Microbiology, Gottingen Univ., <sup>3</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>4</sup>神戸大院・農・生命機能)  
 kennyoshi@kobe-u.ac.jp

## 【目的】

枯草菌における *myo*-inositol(MI)代謝には、*iolABCDEFGHIJ* と *iolRS*, *iolT* という多数の遺伝子が関与している。リブレッサーをコードする *iolR* は *iol* 遺伝子群の発現制御を担っており、MI 存在下では *iol* 遺伝子群が転写誘導される。*iol* 遺伝子群の中で未だ酵素学的機能が特定されていないのは *iolH* のみであった。本研究では *iolH* が果たす生理的意義を解明することを目的とした。

## 【方法と結果】

我々は *iolH* の構造より推論して、そのトリオースリン酸異性化酵素活性を見出した。枯草菌には解糖系で働くトリオースリン酸異性化酵素の遺伝子 *tpiA* が存在するが、その転写発現がグルコース非存在下で低下することが示されている。MI を代謝して生育する際に不足するトリオースリン酸異性化酵素活性を *iolH* が補う可能性を想起して、枯草菌の標準株(168 株)において、*iolR* と *iolH* それぞれの単独破壊あるいは二重破壊を施し、MI を唯一の炭素源とする最少培地で生育させて増殖を比較した。*iolH* の単独破壊による影響は殆ど見られなかったが、*iolR* を破壊すると生育の停滞遅延が生じた。さらに、*iolR* の単独破壊株と *iolR* と *iolH* の二重破壊株を比較すると、後者において最終的に到達する細胞濃度が明らかに低減した。この原因として、*iolR* の破壊によって *iol* 遺伝子群が強制的に誘導されるため MI がすみやかに代謝されるが、*tpiA* の低発現に起因するトリオースリン酸異性化酵素活性の不足が *iolH* の欠損のために補われなくなるので MI の最終代謝産物であるジヒドロキシアセトンリン酸が蓄積して生育への悪影響が現れた可能性が考えられた。そこで、*iolR*, *iolH* 破壊株において *tpiA* を過剰に発現すると上記の生育遅延等が解消された。すなわち、グルコース非存在下の MI 代謝において、*iolH* は第 2 のトリオースリン酸異性化酵素遺伝子として *TpiA* 発現の不足を補う役割を果たしていることが強く示唆された。

Physiological significance of *Bacillus subtilis* *iolH* on inositol metabolism

○Asuka Matsumoto<sup>1</sup>, Daniel Reuss<sup>2</sup>, Kosei Tanaka<sup>3</sup>, Shu Ishikawa<sup>1</sup>, Shinji Takenaka<sup>4</sup>, Ken-ichi Yoshida<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Dept. General Microbiology, Gottingen Univ., <sup>3</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

**Key words** *Bacillus subtilis*, inositol

3P-1a015 *Bacillus* 属細菌のシリカ蓄積メカニズムの解析

○池田 丈<sup>1</sup>, 田中 達也<sup>1</sup>, 中川 美樹<sup>2</sup>, 本村 圭<sup>1</sup>, 廣田 隆一<sup>1</sup>, 黒田 章夫<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大・工)  
 ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】ケイ素(シリコン, Si)は酸素に次いで地球上に二番目に多く存在する元素であり、産業的にも広く利用されている。珪藻や放射虫、一部の海綿や一部の高等植物などは可溶性のケイ酸(Si[OH]<sub>4</sub>)の形でケイ素を積極的に取り込み、その重合体であるシリカ(SiO<sub>2</sub>)を骨格や殻などとして利用する。これまでシリカを蓄積するとして知られていた生物は真核生物ばかりであったが、当研究室では、グラム陽性細菌 *Bacillus cereus* とその近縁種が孢子形成期にケイ酸を取り込み、孢子表面にシリカとして蓄積することを発見した。これまでに、真核生物由来のシリカ形成ペプチドとの相同性解析を足掛かりとして、孢子殻タンパク質のひとつである CotB1 がシリカ蓄積に関与することを明らかにした[1]。現在は、これとは異なるアプローチとして、形成されたシリカ中に含まれる有機物を調べることで、シリカ形成メカニズムの解析を進めている。

【方法・結果】ケイ酸を添加した培地中で *B. cereus* を培養し、シリカが蓄積された孢子を調製した。得られた孢子を濃硝酸・濃硫酸混合液中で強熱し、シリカ外部の有機物を分解した後、超遠心によりシリカを回収した。フッ酸(HF)処理によりシリカを溶解し、溶出した画分を SDS-PAGE に供した。泳動後のゲルを CBB 染色に供したところ、低分子量の領域にバンドが観察された。現在、得られた物質の同定を進めている。

[1] Motomura et al. *J. Bacteriol.* 198, 276 (2016)

Mechanism of silica accumulation in *Bacillus cereus* spores

○Takeshi Ikeda<sup>1</sup>, Tatsuya Tanaka<sup>1</sup>, Miki Nakagawa<sup>2</sup>, Kei Motomura<sup>1</sup>, Ryuichi Hirota<sup>1</sup>, Akio Kuroda<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Hiroshima Univ.)

**Key words** *Bacillus cereus*, biomineralization, silica, spore

3P-1a016 Negative chemotactic response toward maleate in *Ralstonia solanacearum*

○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato  
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)  
 jun@hiroshima-u.ac.jp

*Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt disease, is regarded as one of the world's most destructive plant pathogenic bacteria. Previous studies found that chemotaxis is an essential trait for the early stage of host invasion and pathogenic fitness in *R. solanacearum*, so we have attempted to functionally characterize chemoreceptors, so called methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs), in this pathogen. *R. solanacearum* strain Ps29 exhibited strong negative chemotactic response to a nonmetabolizable maleate, while two well-studied *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa* PAO1 and *P. putida* F1 showed no response to it. *P. fluorescens* Pf0-1, on the other hand, weakly attracted to maleate. The result of quantitative chemotaxis assay of *R. solanacearum* Ps29 with various concentration of maleate showed that repellent strength increased as the concentration increasing. To identify MCP potentially sensing maleate, single *mcp* gene-deletion mutants library of strain Ps29 was screened. Among 22 mutants, only *Δmcp16* mutant strain failed to chemotactic response to maleate, whereas the other mutants showed no significant difference of the response comparing with that of wild-type strain. *Δmcp16* complemented with *mcp16* gene successfully restored chemotaxis response toward maleate, further confirming that *mcp16* encodes chemotactic transducers mediating negative response to maleate.

Negative chemotactic response toward maleate in *Ralstonia solanacearum*

○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato  
 (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, maleate

## 3P-1a017 メタン酸化細菌の細胞内レドックス状態の可視化

○石川 聖人<sup>1,5</sup>, 田中 裕也<sup>2</sup>, 田中 謙也<sup>3</sup>, 木村 恒太<sup>3</sup>,  
加藤 創一郎<sup>4,5</sup>, 中西 周次<sup>5</sup>, 堀 克敏<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>阪大・基礎工, <sup>3</sup>阪大院・基礎工, <sup>4</sup>産総研・生物  
プロセス, <sup>5</sup>阪大・太陽エネ研)  
ishikawa.masahito@nubio.nagoya-u.ac.jp

## 【背景・目的】

微生物によるメタンの有用物質変換は近年注目されているが、反応の第一段階であるメタンの好氣的酸化は還元力を必要とする反応であることに留意しなくてはならない。極めて安定なメタンを水酸化できるメタン酸化細菌は、一般的にC1化合物しか基質として利用することができない。それゆえ、メタンの変換物質を生産物として回収してしまうと、細胞は増殖維持に必要な炭素源、メタン酸化に必要な電子源を失うことになる。従って、メタン由来の有用物質生産を持続させるには、細胞増殖と還元力を安定に維持することが重要である。このような背景のもと、本研究では安定なメタン由来の有用物質生産に適した条件を見出すために、メタン酸化細菌の細胞内レドックス状態の可視化を試みた。手法としては、蛍光タンパク質プロンプを利用する方法と電気化学計測法を検討した。

## 【実験・結果】

広宿主域プラスミド pJN105 に NADH センサー蛍光タンパクである Peredox-mCherry をクローニングし、代表的なメタン酸化細菌である *Methylococcus capsulatus* Bath 株へ導入した。得られた形質転換体の菌懸濁液に、メタン、ギ酸を添加したところ、蛍光強度の上昇が確認された。また、細胞膜透過性と生体適合性を兼ね備えた電子伝達メディエーターを含む菌懸濁液の開回路電位を、Ag/AgCl 電極を参照電極、グラッシカーボンを作用電極とした2電極系で測定した。電位が一定になった後、メタン、ギ酸を添加したところ、電位が大きく低下した。どちらの手法による結果も、目論見通りの変化を示したことから、代謝に伴う細胞内レドックス状態の変動を正しくモニターできたと考えられる。

## Visualization of an intracellular redox state of methane oxidizing bacteria

○Masahito Ishikawa<sup>1,5</sup>, Yuya Tanaka<sup>2</sup>, Kenya Tanaka<sup>3</sup>, Kota Kimura<sup>3</sup>,  
Souichiro Kato<sup>4,5</sup>, Shuji Nakanishi<sup>2</sup>, Katsutoshi Hori<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng.  
Sci., Osaka Univ., <sup>4</sup>BRI. AIST, <sup>5</sup>RCSEC. Osaka Univ.)

**Key words** methane oxidation, intracellular redox state, mediator, electrochemical measurement

## 3P-1a018 植物生長促進細菌によるシロイヌナズナの生長促進作用メカニズムの解析

○中岡 知規<sup>1</sup>, 澤田 祥子<sup>2</sup>, 大浦 麻里<sup>1</sup>, 田中 雄也<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>,  
岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・生物理工, <sup>2</sup>近畿大・生物理工)  
okanami@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】細菌と植物は多様な相互関係を築いており、植物の生長を促進する細菌も存在している。このような細菌は植物生長促進細菌(PGPB)と呼ばれており、植物の生長を直接的または間接的に促進する。PGPB は植物ホルモン様物質の産生、リンや鉄の可溶性などを行っていると考えられる。また、一部の PGPB では植物生長促進作用に加え、植物病原菌の増殖を抑制する作用も併せ持つことが知られている。これまでに我々は、シロイヌナズナの芽生えの側根伸長を促進する *Pseudomonas fluorescens* A-2 株を単離している。これは揮発性物質を分泌することによってシロイヌナズナの生長を促進しているようであった。さらに *Fusarium oxysporum* や *Rhizoctonia solani* などの植物病原菌の増殖を抑制する働きを持つことがわかった。本研究では *P. fluorescens* A-2 株が持つ、植物生長促進(PGP)作用に関わる遺伝子の同定を目的とした。

【方法】PGP 作用に関わる遺伝子を同定するために、*P. fluorescens* A-2 株に亜硝酸処理を行い、A-2 株の変異体プールを作製した。変異体をシロイヌナズナの芽生えと共生させ、シロイヌナズナの側根伸長を促進できない A-2 変異株の単離を試みた。得られた変異株の1つである A-2(C37)株に野生型 A-2 株のゲノム DNA 断片を導入し、再び PGP 作用を示すことができるようになった A-2(C37)変異株の選抜を試みた。PCR を用いて、A-2(C37)変異株に導入された DNA 断片の増幅を試みた。

【結果】PGP 作用を示さなくなった A-2 人工変異株を多数単離した。A-2(C37)変異株にゲノム DNA 断片を導入することによって、PGP 作用が復帰した A-2(C37)変異株を単離することができた。A-2(C37)変異株に導入された DNA 断片は、4kbp の断片であった。導入された DNA 断片の解析結果も報告する予定である。

Study on mechanisms for a plant growth promotion effect of bacteria on *Arabidopsis thaliana*

○Nakaoka Tomonori<sup>1</sup>, Sawada Shoko<sup>2</sup>, Oura Mari<sup>1</sup>, Tanaka Yuuya<sup>2</sup>,  
Ano Takashi<sup>1,2</sup>, Okanami Masahiro<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol. Ord. Sci. Technol., Kindai Univ., <sup>2</sup>Fac. Biol. Ord. Sci. Technol.,  
Kindai Univ.)

**Key words** *Pseudomonas*, *Arabidopsis thaliana*, plant growth promotion

## 3P-1a019 R-IVET 法によるマウス消化管特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の同定

○石神 夏実<sup>1</sup>, 河口 礼佳<sup>1</sup>, 平等 清夏<sup>1</sup>, 阪中 幹祥<sup>2</sup>, 横田 篤<sup>1</sup>,  
吹谷 智<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・農・微生物生理学, <sup>2</sup>石川県立大院・生資環)  
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】ビフィズス菌は宿主に対して整腸作用などの有用な効果を発揮する腸内細菌として知られているが、消化管における生存や宿主との相互作用の機構はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、これらの機構解明の端緒として、R-IVET (recombinase-based *in vivo* expression technology) 法を用いて、消化管特異的に発現するビフィズス菌の遺伝子を網羅的に同定することを目的とした。

【方法】これまでの研究で確立した *Bifidobacterium longum* 105-A 株 (105-A 株) の R-IVET 系を使用した。本系では、*loxP* に挟まれたスペクトノマイシン (Sp) 耐性遺伝子 (Sp<sup>R</sup>) を 105-A 株の染色体上に挿入した宿主株に、105-A 株のランダムな DNA 断片を Cre ORF 上流に連結したベクターを導入することにより、ゲノムライブラリーが構築されている。この DNA 断片中のプロモーター領域が機能すると、Cre が発現して Sp<sup>R</sup> が除去される。これを利用して、まず本ライブラリーを Sp 含有液体培地で培養し、培地中で機能するプロモーター領域を有する株を排除した (1 次選抜)。1 次選抜後のライブラリーを BALB/c 雌マウスへ経口投与し、糞便中からライブラリーを回収した。Sp 含有寒地培地へのレプリカ試験により Sp 感受性株、すなわちマウス消化管特異的に機能するプロモーター領域を有する株を選抜した (2 次選抜)。プロモーター領域のゲノム上の位置を決定し、その下流の遺伝子をマウス消化管特異的に発現する遺伝子として同定した。

【結果】1 回目の投与試験により、マウス消化管特異的に発現すると推測される遺伝子 23 個が同定され、それらの中には消化管での発現誘導が報告されている遺伝子も含まれていた。さらなる遺伝子の同定および R-IVET 法の有効性を検証するため、2 回目の投与試験を行い、Sp 感受性株を 60 株取得した。現在、消化管特異的に発現する遺伝子の同定を進めている。

Identification of *Bifidobacterium* genes specifically expressed in the mouse intestine by R-IVET

○Natsumi Ishigami<sup>1</sup>, Hiroka Koguchi<sup>1</sup>, Sayaka Hiratou<sup>1</sup>, Mikiyasu Sakanaka<sup>2</sup>,  
Atsushi Yokota<sup>1</sup>, Satoru Fukiya<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Lab. Microbial Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biores.  
Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ.)

**Key words** *Bifidobacterium longum*, R-IVET, gene expression

## 3P-1a020 ビフィズス菌プロモーターの機能解析

○小酒井 智也<sup>1</sup>, 野村 泉<sup>2</sup>, 鈴木 徹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大院・応生・応生, <sup>2</sup>岐阜大・応生・応生)  
jiji556important@yahoo.co.jp

【目的】近年、様々なビフィズス菌の全ゲノム配列がわかっている。しかし、ゲノム上の配列がもつ機能についてはわからないことが多い。ゲノムの中でも、遺伝子上流に存在するプロモーターは、mRNA への転写の中心的な役割を担っている。プロモーター配列の中でも特に重要な -10 領域と -35 領域については、ビフィズス菌において解明されていない。そこで、*Bifidobacterium longum* 内での二つの領域の最適な配列の特定を試みた。

【方法】*B. longum* NCC2705 から mRNA を抽出して RNA-seq を行った。遺伝子発現量の変化から、130 種類の遺伝子上流に存在する転写開始点 (TSS) を推定した。さらに、推定 TSS の上流 55 bp の配列に対して隠れマルコフモデルを適用し、-10 領域と -35 領域の 6 塩基モチーフをそれぞれ推定した。推定した二つの 6 塩基モチーフのプロモーター活性を測定するために、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を用いたレポーターアッセイを行った。プラスミドの構築においては、ベクターとして pKO403 を用い、プロモーター領域、CAT 遺伝子、*hup* ターミネーターを Golden-Gate 法により組み込むことで、目的のプラスミドを得た。また、各 6 塩基モチーフに 1 塩基ずつ変異を加えることで、各塩基の最適なプロモーター配列を特定しようとした。プラスミドはエレクトロポレーションにより *B. longum* 105-A に形質転換し、CAT アッセイを行った。

【結果及び考察】RNA-seq の結果の解析から、ビフィズス菌プロモーターの -10 領域と -35 領域の 6 塩基モチーフのコンセンサス配列は、それぞれ 5'-TTGTGC-3' と 5'-TACAAT-3' と推定された。また、この配列に基づいてレポーターアッセイを行った結果、-10 領域と -35 領域の最適な配列は、それぞれ 5'-TTGNNN-3' と 5'-TATAAT-3' であることがわかった。これらの配列は、大腸菌と比較して類似したものであった。

The analysis of the promoter in *Bifidobacterium*

○Tomoya Kozakai<sup>1</sup>, Izumi Nomura<sup>2</sup>, Tohru Suzuki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. sch. Fac. Appl. Bio. Sci., Gifu Univ., <sup>2</sup>Fac. Appl. Bio. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** *bifidobacterium*, promoter

### 3P-1a021 転写因子の競合デザインによる Half-adder 回路のコンパクト設計

○湯本 達弥, 佐伯 和哉, 河合 (野間) 繁子, 斎藤 恭一,  
梅野 太輔  
(千葉大院・工)  
umeno@faculty.chiba-u.jp

**【背景と目的】** 人工的な転写制御ネットワークの製作技術は進歩し続けているが、転写制御のカスケードデザインに依る現行の遺伝子回路設計学で創り得るネットワークの集積度には大きな限界がある。これは、制御ステップ数とともにノイズや分布が急拡大するからに他ならない。本研究では、RNA ポリメラーゼと転写制御タンパク質どうしが繰り返す結合競合現象を進化デザインすることによって、たったひとつのプロモータの上に、Boolean 型 2 入力論理回路のすべてを実現できるフォーマットを提案する。また、この手法を用いた、世界最小の Half-adder 回路の迅速な構築例を報告する。

**【結果および考察】**

#### 1. 結合競合を利用した単層論理ゲートの開発

choline 応答型転写因子 BetI, 無水テトラサイクリン (aTc) 応答型転写因子 TetR を選び、これらが T7 プロモータに対して機能を発揮できる オペレータ-P<sub>T7</sub> の距離を上下流それぞれに対して割り出した。こうして独立に作用できる上下流 2 つのオペレータ配列に、それぞれ部分重複させるかたちで外側からもう 1 つずつのオペレータを配置した。こうして作製した計 4 つのオペレータと P<sub>T7</sub> の複合プロモータを部分ランダム化すると、EQUAL ゲートを含む 6 種類の異なる論理ゲートが得られた。

#### 2. XOR/AND ゲートの構築

BetI の進化工学により、逆転型 (choline が co-repressor として働く) の変異体を得た。これを野生型 TetR と共に EQUAL ゲートに作用させると、XOR ゲートとして振る舞った。tetO/lacO/BetO の部分重複ライブラリの中から選抜した aTc/choline の AND ゲートと細胞に共存させることにより、歩留まり良く Half-adder 回路が構築できた。

#### The minimal Half-adder circuits constructed by competition design among operators and promoters

○Tatsuya Yumoto, Kazuya Saeki, Shigeo Kawai-Noma, Kyoichi Saito,  
Daisuke Umeno  
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** Boolean logic gate, protein displacement, binding competition, Half-adder

### 3P-1a022 異なる環境試料からの新規自己伝達性プラスミドの取得

○仲田 裕貴, 金原 和秀, 新谷 政己  
(静大・創科技院)  
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

プラスミドは染色体外の自己複製遺伝子で、その伝播は微生物の急速な進化・適応能に寄与し、微生物の遺伝子組換えの必須ツールである。対象となる微生物の機能解析やその利用には、その微生物に適したプラスミドベクター (宿主ベクター系) の開発が非常に重要であるが、現在ベクターとして利用可能なプラスミドの種類は、環境中に生息する種々の微生物を網羅するほど十分とはいえない。そこで、新規宿主ベクター系の開発を目指し、新たなプラスミドを取得することを目的とした。プラスミドの取得は、自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドを伝達させる能力を指標とする三親接合を利用して行った。既知の可動性プラスミドを用い、受容菌には染色体上に GFP 遺伝子を挿入した *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4GFP 株を用いた。環境試料由来のプラスミドと、可動性プラスミドを受け取った接合完了体は、可動性プラスミドが宿主に付与する抗生物質耐性と、受容菌の GFP 遺伝子の発現を指標に選抜した。また、環境試料としては 2 種類のサンプルを用いた。環境試料由来のプラスミドを保持していると推定される菌株、169 株の単離を行い、プラスミドの有無については改変アルカリ SDS 法で抽出後、電気泳動によって調べた。プラスミドに相当するバンドを確認できた菌株は、不適合性群 IncP-1 または PromA に属するプラスミドの、特定の領域を増幅するプライマーを準備して PCR を行った後、増幅産物の有無を調べた。これまでに 115 株が環境由来のプラスミドを保持すると推定され、うち 66 株について PCR を行ったところ、19 株が IncP-1 または PromA のプラスミドを保持すると推定され、残りは別グループのプラスミドであることが示唆された。本研究により、環境試料由来のプラスミドを取得する系を確立でき、現在は同様の手法を用いて嫌気条件下でのプラスミドの取得も試みている。

#### Plasmid capturing from different environmental samples

○Hiroki Nakata, Kazuhide Kimbara, Masaki Shintani  
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** plasmid, capturing, environmental bacteria

### 3P-1a023 納豆菌由来 pLS20cat を用いた新規プラスミドベクターシステムの開発

○宮野 恵<sup>1</sup>, 田中 耕生<sup>2</sup>, 石川 周<sup>1</sup>, 竹中 慎治<sup>3</sup>, 吉田 健一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション,<sup>2</sup>神戸大・自科・研究環,<sup>3</sup>神戸大院・農・生命機能)  
kenyoshi@kobe-u.ac.jp

**【目的】**

納豆菌由来の接合伝達プラスミド pLS20cat は 15 分の液体培養でも伝達する程に高効率で、*Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* の他バチラス属にも伝達出来ることが確認されている。また pLS20cat は自身だけでなく oriT を持つ可動プラスミドも伝達することが出来る。我々は pLS20cat と可動プラスミド pGR16B を用いて二親接合と三親接合を行い、両プラスミドの伝達について調べることを目的とした。

**【結果】**

pLS20cat を持つヘルパーと pGR16B を持つドナー、レシビエントの三親接合を行った。15 分の液体培地では pLS20cat のみ伝達したが、pGR16B は伝達しなかった。しかし 20 時間の寒天培地では、pLS20cat のみならず pGR16B の伝達も確認された。一方 pLS20cat と pGR16B の両者を持つドナーを用いて二親接合を行うと、15 分でも pLS20cat と pGR16B の伝達が確認された。このことから、三親接合では pLS20cat がドナーへ伝達され、続いて pGR16B が伝達されるという 2 段階を経ると想定され、そのため効率が低いと考えられた。そこで、pLS20cat の oriT を欠損させ自身が伝達不能となった pLS20catΔoriT を作製し接合を行うと、20 時間の三親接合においても pGR16B が伝達されなくなった。しかし二親接合では、pLS20cat を用いた時と同様の効率で pGR16B が伝達された。このことから三親接合における可動プラスミドの伝達は想定通り 2 段階を経ており、接合伝達プラスミドがヘルパーからドナーへ伝達することが不可欠であると確認された。

pLS20catΔoriT を用いた二親接合では、可動プラスミドのみを選択的にレシビエントへ伝達可能で、一度伝達された可動プラスミドがさらに第 3 者へ伝達されることもない。従って、この二親接合は自然形質転換能力を持たない菌株に遺伝子を導入するための新規遺伝子操作ツールとして応用可能である。

#### A novel plasmid-vector system based on pLS20cat of *Bacillus subtilis* (natto)

○Megumi Miyano<sup>1</sup>, Kosei Tanaka<sup>2</sup>, Shu Ishikawa<sup>1</sup>, Shinji Takenaka<sup>3</sup>,  
Ken-ichi Yoshida<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.,  
<sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Kobe Univ.)

**Key words** conjugation, *Bacillus subtilis*, gene transfer

### 3P-1a024 新規抗生物質の開発に向けた微生物群集の単離培養を伴わないスクリーニング手法の確立

○山元 奈緒, 中島 信孝  
(東工大大院・生命理工)  
nnakashima@bio.titech.ac.jp

**<背景・目的>**

多種類の抗生物質に耐性を示す、多剤耐性細菌の出現と蔓延が世界的な問題となっている。その耐性の獲得速度は年々早まっており、この先さらに増していくと考えられる耐性菌に対応できる抗生物質の新規開発が求められている。しかし、既存の抗生物質の約 70% を産生している土壌細菌は、そのほとんどが単離培養することが困難であり、このことが抗生物質の開発の妨げとなっている。そこで本研究では、単離培養という過程を経ずに土壌細菌をスクリーニングする方法を確立し、土壌細菌から新規抗生物質を探索することを目的とする。

**<方法・結果>**

実験は大腸菌を宿主として行った。しかし、野生型大腸菌の細胞外膜は疎水性の物質が透過しづらいため、土壌細菌が産生する化合物が疎水性だった場合その作用を観察することが難しい。そこで、外膜に欠損があり疎水性抗生物質感受性の大腸菌変異体を作製し、この変異大腸菌を用いた。まず、河川・海・森林など様々な環境から土壌試料を採取し、3 種類の液体培地で 2 週間培養した。培養後、培養液の上澄みを濃縮・フィルター滅菌し、土壌細菌が産生する化合物を含む液体を得た。この液体を、前培養した大腸菌に加え 4 時間培養し、濁度を測定することで成長阻害の有無を確認した。このスクリーニング手法により、土壌細菌の産生する抗生物質の濃度が非常に低いという問題を克服することができた。41 種類の土壌試料をそれぞれ 3 種類の培地で培養して得られた 123 試料についてスクリーニングを行ったところ、29 サンプルで大腸菌の成長阻害が確認された。現在はこれらの試料に含まれる成長阻害をもたらす化合物の同定方法、その化合物を産生する微生物種の特定方法を検討している。また今後は、創薬においてまだ標的になっていない遺伝子産物を標的にした「標的志向型のスクリーニング」を行う予定である。

#### Establishment of the method of screening microbial community without isolation for developing novel antibiotics

○Nao Yamamoto, Nobutaka Nakashima  
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** soil bacteria, antibiotics

### 3P-1a025 *Tricholoma matsutake* NBRC30605 株の De novo 解析および糖質分解酵素遺伝子の特定

○大沼 広宜<sup>1</sup>, 福田 泰久<sup>2</sup>, 白坂 憲章<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・農, <sup>2</sup>近畿大・農)  
sirasaka@nara.kindai.ac.jp

[目的] 外生菌根菌であるマツタケ(*Tricholoma matsutake*)の人工培地上での糖質分解酵素活性は弱く、生育に長期間要することからマツタケの人工栽培が困難とされている。他にも要因の一つとして、マツタケのゲノム、またはタンパクのデータベースの情報が少ないことが挙げられる。本研究では、マツタケの人工栽培を目指すための基礎データを得るため、ゲノムデータベースを構築し、これまでに明らかにされている糖質分解酵素系をコードする遺伝子配列を特定することを目的とした。演者らはマツタケ NBRC 30605 の全ゲノム配列を解析し、楠田ら<sup>1</sup>により報告されたβ-グルコシダーゼの内部アミノ酸配列およびコードするゲノム配列を決定した。

[結果] NextSeq500(illumina)を用いてマツタケ NBRC 30605 株の全ゲノム情報を取得・解析し、DDBJ に公開した(DDBJ/EMBL/GenBank : accession number ; BDDP00000001-BDDP00088884)。続いて本菌株の培養ろ液よりβ-グルコシダーゼ(160kDa)を単一に精製した。精製したβ-グルコシダーゼを Endo-H 処理し、SDS-PAGE 後、トリブシンによるゲル内消化で得られたペプチド断片を autoflex speed TOF/TOF-KN2 (Bruker) を用いて MS/MS 解析を行い、内部アミノ酸配列を決定した。それぞれのアミノ酸配列を JGI *T.matsutake* 945 (V3.0) BLAST system ゲノム配列をリファレンスとしてマツタケ NBRC 30605 株の配列情報に検索をしたところ、β-グルコシダーゼに相当するゲノム配列が見られ、ほぼ同一であった。本研究は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1512004) の助成を受け行われたものである。

1) Kusuda, M. et al., Mycoscience, 47, 184-189, (2006)

### De novo sequence analysis of *Tricholoma matsutake* NBRC30605 and specificity of glycoside hydrolase genes

○Hiroki Onuma<sup>1</sup>, Yasuhisa Fukuta<sup>2</sup>, Norifumi Shirasaka<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Kinki Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kinki Univ.)

**Key words** *tricholoma matsutake*, whole genome sequence, beta-glucosidase

### 3P-1a026 繊維虫テトラヒメナを用いたセルラーゼ生産ベクターの確立

○海老原 哲男<sup>1,2</sup>, 増田 光平<sup>2</sup>, 遠藤 浩<sup>2</sup>, 仁宮 一章<sup>3</sup>,  
小田切 正人<sup>4</sup>, 守屋 繁<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>名大・遺伝子,<sup>2</sup>金沢大院・自科,<sup>3</sup>金沢大・環日本海域環境研究セ,<sup>4</sup>理化学研究所 基幹研究所)  
hendoh@staff.kanazawa-u.ac.jp

現在、主要なバイオエタノールの発酵は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が最も有効な生産手段として成果を挙げてきている。バイオ燃料は、トウモロコシ *Zea mays* やサトウキビ *Saccharum officinarum* といった糖質系原料が主であるが、これらは食物としても十分に利用価値のある資源である。近年では、セルロースなどの木質系原料を分解することでグルコースを獲得し、発酵に利用する研究も行われている。しかし、その製法は希硫酸や濃硫酸等を用いた加水分解によるものであり、分解処理におけるエネルギーは生産するバイオ燃料から得られるエネルギーよりも高く、従来の方法でははるかに非効率であった。

そこで低コストで効率的にセルロースを分解し、獲得したグルコースを自身の栄養として利用しているオオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* に注目した。シロアリは自身が分泌するセルラーゼと彼らの腸内で共生している鞭毛虫や細菌が放出するセルラーゼを利用し、両者のセルラーゼの相乗作用により効率的なセルロース分解を可能としている。宿主シロアリよりも高い活性を有している腸内共生生物由来のセルラーゼを利用することで、木質系バイオマスから容易にグルコースを獲得できるものと期待した。

シロアリ腸内共生生物が持つセルラーゼの一種 Glycoside Hydrolase family5 に分類される Endoglucanase(EG5)を、モデル生物である繊維虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* で発現できるベクターを構築した。相同組み換えによりテトラヒメナへ EG5 分泌ベクターを導入し、ジントロサリチル酸法によってセルラーゼ活性測定を行った。その結果、酵母より1細胞当たりの活性が高いことが示された。

最終的には複数のセルラーゼ遺伝子を1細胞に導入し、好気環境下での効率的なセルロース分解システムをテトラヒメナにより実現することを目指す。

### Establishment of vector to secret cellulase by *Tetrahymena thermophila*

○Tetsuo Ebihara<sup>1,2</sup>, Kouhei Masuda<sup>2</sup>, Hiroshi Endo<sup>2</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>3</sup>,  
Masato Odagiri<sup>4</sup>, Shigeru Moriya<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>Center for research, Nagoya University, <sup>2</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Inst. Nat. Environ. Technol., Kanazawa Univ., <sup>4</sup>Adv. Sci. Inst., RIKEN)

**Key words** heterologous production, protist, cellulase, termite

### 3P-1a027 CRISPR-PCS 法を基盤とした酵母染色体の多様な操作技術の開発

○笹野 佑<sup>1</sup>, 長澤 宏器<sup>1</sup>, 木村 駿太<sup>1</sup>, Kaboli Saeed<sup>1</sup>, 中井 大志<sup>1</sup>,  
村山 亮太<sup>1</sup>, 杉山 峰崇<sup>1</sup>, 原島 俊<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工,<sup>2</sup>崇城大・生物生命)  
sasano@bio.eng.osaka-u.ac.jp

近年、ストレス耐性等の有用形質は多くの場合、複数の遺伝子によって制御されていることが明らかになってきた。これにより染色体や長大な遺伝子領域を自在に操作する染色体工学技術の重要性が高まっている。染色体の任意箇所での分断技術や、染色体上の任意領域を欠失や重複させる技術、あるいは染色体間で相互転座や融合を行う技術を開発することは、有用菌株を育種する上で非常に重要である。我々は出芽酵母において、染色体を任意の位置で分断し2つの機能的な染色体に分割する技術である PCS 法を開発し、これを基盤とした様々な染色体工学技術を開発してきた。これにより染色体の任意領域の欠失や重複が可能となった。さらに近年、PCS 法の効率を大幅に向上させた CRISPR-PCS 法を開発した。CRISPR-PCS 法は、任意の箇所 DNA 二重鎖切断 (DSB) を引き起こすことが出来る CRISPR/Cas9 システムを PCS 法と組み合わせた技術であり、染色体分断の効率を数百倍以上向上させることにより、従来の PCS 法では一度の操作で一か所の分断が限界であったのに対し、CRISPR-PCS 法では最大4か所の染色体部位を同時に分断することができるようになった。本研究では、CRISPR-PCS 法を染色体分断以外の染色体操作に応用することを試みた。その結果、9番染色体と15番染色体の約25kbの遺伝子領域の同時欠失、及び3番染色体と15番染色体の約200kbの領域の同時重複に成功した。さらに、これまで不可能であった400kbの染色体重複も可能となった。加えて、9番染色体と15番染色体間の相互転座にも成功し、染色体間操作も可能となった。以上より、CRISPR-PCS 法は酵母において多様な染色体操作を可能にする染色体工学の基盤技術となり得ることが示された。今後は本技術を利用したゲノム機能の解明や有用菌株育種への応用が期待される。

### Development of a versatile chromosome manipulation technology in yeast based on CRISPR-PCS

○Yu Sasano<sup>1</sup>, Koki Nagasawa<sup>1</sup>, Shunta Kimura<sup>1</sup>, Saeed Kaboli<sup>1</sup>, Taishi Nakai<sup>1</sup>,  
Ryota Murayama<sup>1</sup>, Minetaka Sugiyama<sup>1</sup>, Satoshi Harashima<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

**Key words** CRISPR-PCS, Chromosome engineering, *Saccharomyces cerevisiae*, CRISPR/Cas9

### 3P-1a028 DSB により誘発されるゲノム再編を駆動力とする出芽酵母の新規育種技術

○池内 暁紀<sup>1</sup>, 中村 里沙<sup>1</sup>, 田中 秀典<sup>1</sup>, 村本 伸彦<sup>1</sup>, 中村 隆宏<sup>2</sup>,  
太田 邦史<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>豊田中研,<sup>2</sup>東大院・総合文化)  
e1412@mosk.tytlabs.co.jp

再生可能な資源である植物バイオマスを微生物プロセスによって、低コストで燃料や化成品に変換するためには、微生物の物質生産性を飛躍的に向上させる育種技術が必要である。特に、実用プロセスで重要となる耐熱性や阻害物耐性などの量的形質は、複数の遺伝子が複雑に関与するため、従来の少数遺伝子を標的とした育種技術では限界がある。

近年、比較ゲノム解析により、ゲノムの倍加と DNA の二本鎖切断 (DSB) により誘発されるゲノム再編が生物進化の駆動力となった可能性が示唆されている。ゲノムの重複、欠失、転座、逆位などのゲノム再編は遺伝子発現の変動をもたらす、生物の遺伝的多様性獲得の重要な要因となってきたと考えられる。我々は、生物進化に着目した新たな育種技術として、好熱菌由来制限酵素 *TaqI* を酵母等の細胞内で発現させ、加温により *TaqI* の DSB 活性を制御する事で大規模なゲノム再編を誘発できる「TAQing システム」を開発した。

本手法を用いて、キシロース資化遺伝子を導入した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のキシロース資化速度と耐熱性の進化育種を行った結果、40℃でキシロース発酵可能な株を取得した。取得した株の全ゲノムタイピング解析を行った結果、複数のコピー数多型とゲノム再編が検出され、TAQing システムにより様々な遺伝的多様性が誘発されることが分かった。

### A novel breeding method; genome rearrangement induced by multiple DNA double strand breaks in yeast.

○Akinori Ikeuchi<sup>1</sup>, Risa Nakamura<sup>1</sup>, Hidenori Tanaka<sup>1</sup>, Nobuhiko Muramoto<sup>1</sup>,  
Takahiro Nakamura<sup>2</sup>, Kunihiko Ohta<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Toyota Cent. R&D Labs. Inc., <sup>2</sup>Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** genome engineering, evolutionary engineering, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol

### 3P-1a029 メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* の改良 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

○沼本 穂, 前川 裕美, 金子 嘉信  
(阪大院・工)  
kaneko@bio.eng.osaka-u.ac.jp

メタノール資化酵母 *Hansenula polymorpha* は、50℃ 近い高温でも生育可能であり、メタノール誘導による異種タンパク質生産宿主としても利用される産業酵母の1つである。これまで、本酵母で開発した YCp 型ベクターを使用して、高等動植物でゲノム編集技術として注目されている CRISPR/Cas9 システムの活用を検討し、10<sup>3</sup> の頻度で変異株が得られることを確認した。しかしながら、実用的にはさらに高い変異効率が望まれる。そこで、*Yarrowia lipolytica* での例<sup>1)</sup>を参考に、sgRNA を tRNA 遺伝子の直後に連結して発現させるように再設計した。tRNA 配列は、転写後 tRNA プロセッシングによって除去される。また、Cas9 の発現を高めるために、*H. polymorpha* の中で最も転写レベルの高い *HpTDH3* のプロモーターを使用した。*HpADE12*、*HpPHO84*、*HpPHO1* 遺伝子を標的として作製したそれぞれの CRISPR/Cas9 プラスミドを野生型株に導入したところ、30~70%の頻度で標的配列中に塩基の欠失や挿入をもつ変異体を得られた。この変異効率は以前の CRISPR/Cas9 システムより 100 倍向上した。この改良した CRISPR/Cas9 システムにより、本酵母でも効率的なゲノム編集が可能になった。本研究は、公益財団法人発酵研究所平成 23 年度寄付講座助成で実施された。

1) Schwartz et al., *ACS Synth. Biol.*, 5, 356-359 (2016)

#### Genome editing of *Hansenula polymorpha* using an improved CRISPR/Cas9 system

○Minoru Numamoto, Hiromi Maekawa, Yoshinobu Kaneko  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** Genome editing, CRISPR/Cas9, methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*

### 3P-1a030 CRISPR Cas9 system による遺伝子組み換え *Schizosaccharomyces pombe* を用いた有機酸生産

○高山 征也, 尾崎 愛子, 山口 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦  
(神戸大院・工)  
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

#### <研究背景・戦略>

近年石油資源の枯渇や地球温暖化の問題から、オイルリファイナリー型社会から再生可能資源であるバイオマスをを用いて有用物質を生産するバイオリファイナリー型の社会への転換が求められている。本研究では耐酸性に優れた分裂酵母を用いて有機酸生産を試みた。CRISPR Cas9 system を用いて分裂酵母内の代謝経路を改変することで、有機酸生産能に優れた分裂酵母を作製することを目指した。

#### <結果・今後の展望>

有機酸生産において副産物となる代謝経路の破壊、及び代謝経路に関する遺伝子を挿入することによる経路の強化を行った。CRISPR Cas9 system により主要な副産物であるエタノール生産の遺伝子 *adh* の破壊に成功した。それにより、エタノールの生産は抑えられた。しかし、アセトアルデヒドの蓄積や、補酵素の不均衡さによって生育が遅くなる。そこでアセトアルデヒドを酢酸に転換する遺伝子 *atd1* や NAD<sup>+</sup> を再生する遺伝子 *nox* を挿入することによって生育の改善を検討した。また、有機酸生産に関する遺伝子の挿入を行うことで、エタノール生産量を抑制し且つ有機酸生産能の優れた株の作製を行っている。

#### Organic acid production using *Schizosaccharomyces pombe* modified metabolism by CRISPR Cas9 system

○Takayama Seiya, Ozaki Aiko, Yamaguchi Rie, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko  
(Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** *Schizosaccharomyces pombe*, organic acid, CRISPR Cas9 system, metabolic engineering

### 3P-1a031 マンノシルエリスリトールリビッド生合成に関わるアシル転移酵素破壊株の作製

○吉田 優太, 小西 正朗  
(北見工大)  
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

#### 【背景・目的】

マンノシルエリスリトールリビッド (MEL) は *Ustilago* 属の真菌が生産する糖脂質界面活性物質であり、化粧品などへの応用研究が進んでいる。*Pseudozyma hubeiensis* SY62 株は脂肪酸側鎖を 2 本持つジアシル MEL を選択的に生産することができ、かつ、その生産性は既知の MEL 生産菌の中で最も優れている。既知の MEL 生産菌は 2 種類のアシルトランスフェラーゼが関与しジアシル MEL を選択的に合成するため、モノアシル MEL は容易に生産できない。そこで、MEL 代謝関連遺伝子を特定し、遺伝子破壊により MEL 合成代謝中間体を選択的に生産できる組み換え株の構築を試みた。

#### 【方法・結果】

Illumina HiSeq で取得したドラフトゲノムデータからアシルトランスフェラーゼ遺伝子 (*mac1*) の配列を推定し、部分配列 (上流・下流) を PCR 増幅した。大腸菌-*Ustilago* シャトルベクター pUXV1 のハイグロマイシン耐性マーカー配列を PCR 増幅した。In fusion cloning kit を使用し、耐性マーカーを *mac1* 部分配列ではさみ込むように連結させ、pUC19 の *Bam*HI サイトにクローニングし、*mac1* 遺伝子破壊カセットを作製した。破壊カセットを制限酵素で切り出し、エレクトロポレーション法により SY62 に遺伝子導入した。得られた組換え株のゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて目的遺伝子の破壊が達成されている株を選択したところ、1 株で *mac1* 遺伝子の破壊が確認できた。TLC 分析により、得られた *mac1* 破壊株はジアシル MEL 生産していないことが確認できた。同時にモノアシル MEL は検出されなかった。現在、得られた *mac1* 破壊株が生産している代謝産物の特定を試みている。

#### Disrupting an acyltransferase in mannosylerythritol lipid biosynthesis for *Pseudozyma hubeiensis* SY62

○Yuta Yoshida, Masaaki Konishi  
(Kitami Inst. Technol.)

**Key words** acyltransferase, gene disruption, *Pseudozyma hubeiensis* SY62, Mannosylerythritol lipids

### 3P-1a032 ミトコンドリア局在配列のモデル化から考察するタンパク質局在シグナル配列の膜認識仮説

○鈴木 絢子<sup>1,2</sup>, 徳田 茜<sup>1</sup>, 星田 尚司<sup>1</sup>, 赤田 倫治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学・化学系, <sup>2</sup>現)大分大・工)  
suzuki-ayako@oita-u.ac.jp

細胞内におけるタンパク質の局在は、局在シグナル配列と呼ばれる短いペプチド配列で決定されるが、明確なコンセンサス配列がないものが多い。本研究では、ミトコンドリア局在配列を基に、大量の削除及び置換変異シリーズを作製し、どの配列が最少のミトコンドリア局在配列となるかを解析した。さらに、類推される特定のアミノ酸で構成したリビッド配列を人工的に作製し、ミトコンドリア局在シグナル配列のモデル化を行った。このような大量変異配列を構築するために、まず、酵母 *Kluyveromyces marxianus* を利用した効率良い変異遺伝子構築を行い、最終的に“塩基性-疎水性-疎水性”の 3 アミノ酸残基の 3 回以上のリビッド配列がミトコンドリアに局在させることを明らかにした。この配列は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でもミトコンドリア局在を示すと考えたが、局在は見られなかった。このことは、ミトコンドリア局在配列には種の特異性が存在することを示す。次に、*S. cerevisiae* においても局在配列のモデル化を行った結果、非常に似た配列の 4 回リビッド配列がミトコンドリアに局在した。興味深いことに、この配列は *K. marxianus* およびヒト培養細胞においてもミトコンドリア局在を示したので、この配列こそが、生物種共通のミトコンドリア局在モデル配列となると考えている。この過程で、ミトコンドリア局在モデル配列のリビッド数を単に増加させるだけで、細胞膜に選択的に局在することを発見した。現在、ミトコンドリア局在シグナル配列はミトコンドリア膜上の受容体タンパク質によって認識されると考えられているが、我々は本研究の結果から、ミトコンドリアや細胞膜タンパク質へのターゲティングは、細胞膜とミトコンドリア膜自身の違いを認識しているのではないかと考えている。

#### Membrane recognition hypothesis for protein localization signal sequences based on modeling analyses of mitochondrial targeting sequences

○Ayako Suzuki<sup>1,2</sup>, Akane Tokuda<sup>1</sup>, Hisashi Hoshida<sup>1</sup>, Rinji Akada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov. Chem., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Oita Univ)

**Key words** Mitochondrial targeting sequence, Protein localization, yeast, Synthetic biology

**3P-1a033 酵母においてメタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写因子 Hap 複合体の機能解析**

○小田 沙織<sup>1</sup>, 由里本 博也<sup>2</sup>, 阪井 康能<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>鳥取大・工, <sup>2</sup>京大院・農)  
 s.oda@bio.tottori-u.ac.jp

メチロトロフ酵母は強力なメタノール誘導性プロモーターを持つため、異種遺伝子発現系の宿主として広く利用されている。しかしながら、メタノールによる遺伝子発現誘導の分子メカニズムの全貌は未だ明らかになっていない。メチロトロフ酵母を十分に活用し異種タンパク質の生産性・多様性を向上させるために、この分子メカニズムを解明することは重要な課題である。申請者は、メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* を用いて、メタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写因子の取得、機能解析を行ってきた。申請者が見出した転写因子 Hap 複合体は、*Saccharomyces cerevisiae* において呼吸代謝関連遺伝子を制御し、エタノール等の非発酵性炭素源での生育に必要であることが知られているが、*C. boidinii* においてはメタノール誘導性遺伝子の転写を正に制御することがわかった。解析を進め、CbHap 複合体の核移行・DNA 結合様式を解明し、さらに複合体構成因子 CbHap3 の C 末端領域が遺伝子の転写活性化に必要であることを見出した。興味深いことに、この C 末端領域はメチロトロフ酵母でのみ高度に保存されており、メタノール誘導機構において重要な役割を持つと考えられる。今回は *C. boidinii* に加え、産業で一般的に用いられているメチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* における Hap 複合体の役割についても報告する。

**Functional analysis of Hap complex that regulates methanol-induced gene expression in the methylotrophic yeast**

○Saori Oda<sup>1</sup>, Hiroya Yurimoto<sup>2</sup>, Yasuyoshi Sakai<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Eng., Tottori Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** methylotrophic yeast, transcriptional regulation, gene expression

**3P-1a034 *Geobacillus stearothermophilus* 由来マレートデヒドロゲナーゼの反応性考察と機能改変**

○下澤 勇弥, 西矢 芳昭  
 (棋南大・生命科学)  
 nisiya@lif.setsunan.ac.jp

マレートデヒドロゲナーゼ(MDH)は、肝臓の逸脱酵素であるグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)の反応を追従可能なため、肝機能の測定用検査薬に応用されている。現在、GOT 測定用酵素としてブタのミトコンドリア由来 MDH(pm-MDH)と好熱菌である *Geobacillus stearothermophilus* および *Thermus flavus* 由来 MDH(gs-MDH,tf-MDH)が市販されている。われわれは、Excel を用いた検査反応シミュレーションにより 3 種の MDH の有用性を比較し、gs-MDH がもっとも少量で GOT 測定が可能であることを検証した。さらに、ホモロジーモデリングによりオープンおよびクローズドの立体構造を予測した。その結果、オープン構造とクローズド構造では 2 つのループ領域が大きく動き、gs-MDH の活性部位は pm-MDH,tf-MDH と比較して狭まった。したがって、これらのループが MDH の反応性に重要な役割を持つと推定した。また、MDH と相同性の高いラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)のアミノ酸置換による機能改変も参考に、モデル構造から gs-MDH の活性部位に存在する Arg86 の変異体やループ周辺のアミノ酸を置換した変異体を作成した。これら変異体の反応性の変化を調べたので報告する。

**Improvement of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus***

○Yuya Shimozawa, Yoshiaki Nishiya  
 (Life Sci, Setsunan Univ.)

**Key words** Malate dehydrogenase, Simulation, Homology modeling, *Geobacillus stearothermophilus*

**3P-1a035 *Aspergillus oryzae* RIB40 ギ酸オキシダーゼの Phe510 は FAD 修飾と酵素活性に寄与する**

○岩越 亮汰, 田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之  
 (福井大院・工)  
 uchida@u-fukui.ac.jp

**[背景と目的]**  
 ギ酸オキシダーゼ (FOD) は、酸素存在下でギ酸を二酸化炭素に酸化し、同時に過酸化水素を産出する酵素で、GMC oxidoreductase family に属する。属する他の酵素は非共有結合または共有結合した FAD をコファクターとするのに対して、FOD は 8-formylFAD をコファクターとする。また、他の酵素では、FAD のイソアロキサジン環近傍に活性発現に重要な His-Asn 対又は His-His 対が存在するのに対して、FOD では 8-formyl FAD のイソアロキサジン環近傍に His-Arg 対 (*Aspergillus oryzae* RIB40 由来 FOD では His511-Arg554 対) が存在する。X 線結晶解析によって構築した *A. oryzae* RIB40 由来 FOD の活性部位で、Phe510 は 8-formylFAD のイソアロキサジン環のベンゼン環部位の近傍に存在している。本研究では、Phe510 の役割の解明するため、変異体を作成し、変異体における FAD の 8-formyl FAD への修飾、および酵素活性を調べた。

**[方法と結果]**

F510Y、F510W、F510A 変異体酵素を部位特異的変異導入法により作成し、Ni-sepharose カラムと Hi-trap Q カラムを用いて酵素を精製した。精製酵素の可視吸収スペクトル分析、熱抽出物の可視吸収スペクトル分析と HPLC 分析を経時的に行うことにより、コファクターの構造の変化を追った。F510Y と F510W では、精製終了時点で、酵素内に 8-formylFAD だけが存在した。F510A では、精製終了時点では、FAD と 8-formylFAD が存在し、保存中に FAD が 8-formylFAD に修飾された。ワイルドタイプの比活性に比べて、F510Y の比活性は約 3 分の 1 であったが、F510W と F510A の比活性はそれぞれ 1 桁、2 桁小さかった。また、F510W の酸素による酸化半反応は、ワイルドタイプの酸化半反応に比べて遅かった。これらの結果は、Phe510 が FAD の 8-formylFAD への修飾と酵素反応に関与すること、及び酸化半反応に重要であることを示唆している。

**Phe510 contributes to FAD modification and catalysis in formate oxidase of *Aspergillus oryzae* RIB40**

○Ryota Iwagoshi, Naoto Tanabe, Daijyu Doubayashi, Masaya Oki,  
 Hiroki Uchida  
 (Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** formate oxidase, 8-formylFAD, aromatic amino acid, FAD modification

**3P-1a036 エステラーゼを生産する環境細菌の単離**

○奥野 圭祐<sup>1</sup>, 橋本 明里<sup>2</sup>, 鳥居 誉<sup>2</sup>, 前田 真美<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>,  
 岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>近畿大院・生物理工, <sup>2</sup>近畿大・生物理工)  
 okanami@waka.kindai.ac.jp

**[背景と目的]** 生分解性プラスチック製品の農業利用は、農業の環境負荷および従事者負担を軽減するための重要な課題の一つである。生分解性プラスチックは、従来のプラスチックと同等の機能や物性を兼ね備えながら、ある一定の条件下で自然界に存在する細菌の働きによって分解される。分解機構の一つは、細菌が産生するエステラーゼによる加水分解であるが、自然条件下では、細菌の活性やエステラーゼの特性によって分解は極めて緩慢であると考えられる。生分解性プラスチックの効率的な分解には、反応条件や熱安定性などにおいて優れたエステラーゼを入手し利用することが必要である。そこで、優れたエステラーゼを産生する細菌の単離を目的とした。

**[方法と結果]** 土壌、自然水、植物葉表面から細菌を抽出し、トリオレインを含む寒天培地に塗布した。コロニーの周辺にクリアゾーンを形成する細菌をエステラーゼ産生菌として単離した。単離された細菌について、培養液に分泌されるエステラーゼ活性を測定したところ、研究室保有の *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株の活性と同等かそれ以上の活性を示す細菌を複数、単離することができた。これらのエステラーゼ産生菌の酵素について、産生至適温度、産生至適培地、反応至適温度、反応至適 pH、基質特異性、熱安定性について確認したので、報告する。

**Isolation of esterase-producing bacteria and characterization of their esterase**

○Keisuke Okuno<sup>1</sup>, Akari Hashimoto<sup>2</sup>, Takashi Torii<sup>2</sup>, Mami Maeda<sup>2</sup>,  
 Takashi Ano<sup>1,2</sup>, Masahiro Okanami<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad.Sch. Biol. Ortd.Sci. Technol., Kindai Univ., <sup>2</sup>Fac. Biol. Ortd.Sci. Technol., Kindai Univ.)

**Key words** *Stenotrophomonas maltophilia*, esterase, biodegradable plastic

### 3P-1a037 *Ruminiclostridium josui*の制限酵素 *Rjoi*の性質と *R. josui*の形質転換

○汪 重運  
(三重大院・生資)  
515d3s1@m.mie-u.ac.jp

**【背景と目的】** *Ruminiclostridium josui* (*Clostridium josui*)は、中温性のセルロース分解性嫌気性細菌であり、セルラーゼ複合体(セルロソーム)を形成する。本菌のセルロース分解系の解析と分子育種を目的として、*R. josui*への効率的な遺伝子導入系の確立を目指している。本研究では、形質転換系を確立する上で阻害要因となる *R. josui* の制限酵素 *Rjoi* の性質を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** *R. josui* 無細胞抽出液からの *Rjoi* の精製は、HiTrap Heparin HP 及び HiTrap Q HP カラムクロマトグラフィーにより行った。基質として、大腸菌の *dam*-株または *dam+*株から調製したプラスミド pQE-30T DNA などを用いた。制限酵素反応には主に M パッファー (NIPPON GENE) を用いた。

**【結果と考察】** HiTrap Heparin HP 及び HiTrap Q HP カラムにより部分精製した *Rjoi* の酵素活性を Dam メチラーゼでメチル化されたプラスミド pQE-30T と非メチル化 pQE-30T を基質として測定したところ、*Rjoi* はメチル化された DNA のみを切断し、アガロースゲル電気泳動による泳動パターンが *Sau3AI* や *DpnI* と同じであったことから、その認識配列は A がメチル化された G<sup>mt</sup>ATC であることが分かった。また、*Rjoi* 処理後の DNA 断片を鋳型にして塩基配列を決定したところ、その切断部位は A と T の間(G<sup>mt</sup>A↓TC)であること、すなわち平滑末端を生じることが分かった。ゲノム上に *dpnC* 遺伝子と相同性のある遺伝子が見出され、本遺伝子の<sup>1</sup>大腸菌への導入を試みたところ、*dam*-株のみで形質転換が得られたことから、本遺伝子が *Rjoi* をコードすることが予想された。さらに、pJIR751 を基本とする発現ベクターの構築と *R. josui* への導入の結果についても報告する。

#### Characterization of a *Ruminiclostridium josui* restriction enzyme *Rjoi* and transformation of *R. josui*

○Yayun Wang  
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

**Key words** *Ruminiclostridium josui*, restriction endonuclease, transformation, electroporation

### 3P-1a038 細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が保有するキチン代謝に関与する遺伝子群の解析

○佐藤 弘見, 松山 友香, 田口 悟朗, 野川 優洋, 下坂 誠  
(信州大・繊維)  
mashimo@shinshu-u.ac.jp

**【背景と目的】** *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3 株は、フレック状のキチンを効率よく分解化する強力なキチン分解細菌である。既に、SAY3 株の全ゲノムドラフト配列を取得し、49 個のキチン分解関連酵素遺伝子を検出した。この中には、糖質加水分解酵素 GH ファミリー 18, 19, 20 に属する触媒ドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子が、それぞれ 22, 3, 1 個確認できた。本研究では、キチンを炭素源とした合成培地を用いて SAY3 株を培養し、実際に発現している遺伝子を調査することにより、本株のキチン分解代謝系を解明することを目的とした。

**【方法】** グルコースおよび粉末キチンを炭素源とした M9 合成培地で SAY3 株を培養した。対数増殖期の細胞より全 RNA を調製し、次世代シーケンサを用いて RNA シークエンスを行った。得られた配列データを SAY3 株ゲノムにマップングし、グルコースおよびキチン培養での発現量の相対比を調査し、キチン培養で発現が確認された遺伝子からキチン代謝系に関与する酵素群を推定した。また、各遺伝子を大腸菌で異種宿主発現し、得られた組換えタンパク質のキチン分解活性を調査した。

**【結果】** 既に推定済みの 49 個のキチン分解関連酵素遺伝子について、キチン培地における発現量および大腸菌発現タンパク質のキチン分解活性の有無を確認した。また、*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) の細胞内への取り込みに関与が予想される輸送系タンパク質、および GlcNAc 代謝に関する酵素をコードする遺伝子が検出された。これらの結果をもとに SAY3 株のキチン分解代謝系の全容を推定した。

#### Analysis of genes involved in chitin catabolism in the bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*

○Hiroaki Sato, Yuka Matsuyama, Goro Taguchi, Masahiro Nogawa, Makoto Shimosaka  
(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

**Key words** chitin, chitinase, gene expression analysis

### 3P-1a039 Biosynthesis of 2-*epi*-5-*epi*-valiolone by *in vitro* synthetic biology approach

○JianJiang Zhong<sup>1</sup>, Song-Yan Huang<sup>2</sup>, Y.-H. Percival Zhang<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., <sup>2</sup>State Key Lab. Bioreactor Eng., Sch. Bioeng., East China Univ. Sci. Technol., <sup>3</sup>Dep. Biol. Syst. Eng., Virginia Tech)  
jjzhong@sjtu.edu.cn

The platform technology of *in vitro* synthetic biology possesses advantages such as high product yield and simplified process with its great potential for biomanufacturing. 2-*epi*-5-*epi*-Valiolone, the cyclic product of sedoheptulose 7-phosphate, is an important precursor of many bioactive C7N-aminocyclitols, and here an artificial *in vitro* biosynthetic pathway of 2-*epi*-5-*epi*-valiolone from fructose 6-phosphate was designed by including the by-product xylulose 5-phosphate into the enzymatic transformation. The contribution of this by-product transformation branch to the biosynthesis of sedoheptulose 7-phosphate and 2-*epi*-5-*epi*-valiolone was verified by experiments. Through the newly designed pathway, the production of sedoheptulose 7-phosphate and 2-*epi*-5-*epi*-valiolone from fructose 6-phosphate could reach a molar yield of 62.8% and 77.3% for each, which was much higher than that without the addition of the by-product transformation branch. Production of C7N-aminocyclitols via this designed pathway could be extended to starting raw materials of low-cost renewable biomass, which will be discussed in this presentation.

#### Biosynthesis of 2-*epi*-5-*epi*-valiolone by *in vitro* synthetic biology approach

○JianJiang Zhong<sup>1</sup>, Song-Yan Huang<sup>2</sup>, Y.-H. Percival Zhang<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>State Key Lab. Microb. Metab., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., <sup>2</sup>State Key Lab. Bioreactor Eng., Sch. Bioeng., East China Univ. Sci. Technol., <sup>3</sup>Dep. Biol. Syst. Eng., Virginia Tech)

**Key words** *in vitro* synthetic biology, enzyme reaction, bioconversion, 2-*epi*-5-*epi*-valiolone

### 3P-1a040 *Falsirhodobacter* sp. alg1 由来のアルギン酸リアーゼを用いたアルギン酸単糖の調製

○村瀬 祥光<sup>1</sup>, 柴田 敏行<sup>1</sup>, モリ テツシ<sup>2</sup>, 田中 礼士<sup>1</sup>, 植田 充美<sup>3</sup>, 三宅 英雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>早大・理工学術院, <sup>3</sup>京大院・農)  
miyake@bio.mie-u.ac.jp

*Falsirhodobacter* sp. alg1 は、PL7 に属するエンド型アルギン酸リアーゼ遺伝子 (*alyFRA*) と PL15 に属するエキソ型アルギン酸リアーゼ遺伝子 (*alyFRB*) が存在することがゲノム解析から明らかとなった。基質であるアルギン酸は、エンド型およびエキソ型アルギン酸リアーゼによって不飽和単糖を生成し、その後、不飽和単糖は開環し、4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) に変換する。そこで本研究では、*alyFRA* と *alyFRB* の組換え体を作製し、これら 2 種のアルギン酸リアーゼを用いた DEH の調製を試みた。

*alyFRA* と *alyFRB* の発現プラスミドを作製し、大腸菌 BL21(DE3) に形質転換した。培養を行い、菌体から目的タンパク質を可溶性化させ、単一バンドになるまで精製を行った。収量は培地 1 L あたり、*AlyFRA* は 4.7 mg、*AlyFRB* は 10.0 mg であった。

作製した組換え体酵素と、アルギン酸ナトリウムを反応させて得られた生成物を TLC に供した結果、*AlyFRA* の生成物では 3 糖以上のアルギン酸オリゴ糖を検出した。*AlyFRB* の生成物ではグルコースの位置に近いところにスポットを検出し、*AlyFRA* と *AlyFRB* を用いた時の生成物も同等の位置にスポットを検出し、*AlyFRB* の生成物の時よりも濃いスポットを検出した。さらに、これら 2 つの反応液を LC/MS で分析した結果、トータルイオンクロマトグラムで 1 ピークのみを検出し、*m/z*=175 での選択イオン検出法から生成物は DEH であると評価した。本発表では、DEH の効率的な調製法について説明する。

#### Preparation of alginate monosaccharide using two alginate lyases from *Falsirhodobacter* sp. alg1

○Yoshihiro Murase<sup>1</sup>, Toshiyuki Shibata<sup>1</sup>, Tetsushi Mori<sup>2</sup>, Reiji Tanaka<sup>1</sup>, Mitsuyoshi Ueda<sup>3</sup>, Hideo Miyake<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci. and Eng., Waseda Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** *Falsirhodobacter*, alginate lyase, alginate, DEH

### 3P-1a041 シトクロム P450 の活性化において外来電子伝達タンパク質を利用するための戦略

鈴木 里沙, ○平川 秀彦, 長棟 輝行  
(東大院・工)  
hirakawa@bio.t.u-tokyo.ac.jp

**【緒言】** 水溶性シトクロム P450 (P450) の多くは、電子伝達タンパク質を介して補酵素 NAD(P)H に由来する電子を受けることにより触媒サイクルを回す。P450 は電子伝達タンパク質とオベロンを形成しているとは限らないため、P450 にパートナーとなる電子伝達タンパク質は実験的に探索する必要がある。そこで、本来の電子伝達タンパク質パートナーの代替として由来の異なる電子伝達タンパク質を利用することが多い。しかし、由来の異なる電子伝達タンパク質を利用した場合、電子伝達効率が低いため、P450 は低い触媒活性しか発揮できない。本研究では、i)熱安定性の高い電子伝達タンパク質を人為的に P450 に近接させることにより、電子伝達タンパク質-P450 間の弱い相互作用を補った上で、安定的に長時間反応を行うことで、反応率を向上させ、さらに、ii)補酵素再生系を導入し、見かけの補酵素濃度を下げることにより、過剰な電子伝達タンパク質の還元を避けることで、無駄な還元力の消費を抑えることを目指した。**【結果・考察】** ヘテロ三量体タンパク質を利用して *Sulfolobus acidocaldarius* 由来 P450 (CYP119)、好熱性細菌 *Thermus thermophilus* 由来フェレドキシン (FdX)、フェレドキシン還元酵素 (FNR) を近接させると、FNR と FdX を介した NADPH から CYP119 への電子伝達効率は向上した。FdX と FNR は 55 度において 2 4 時間以上活性を低下させなかったのに対して、CYP119 は 3 時間程度しか活性を発揮しなかった。これは NADPH の枯渇によるものであり、亜リン酸脱水素酵素による NADPH 再生系を導入したところ、反応時間を伸ばすことに成功し、反応率は 10 倍以上向上した。したがって、補酵素再生系を利用した電子供給速度の制御は低い電子伝達効率に起因する P450 の低反応率の問題を解決するのに有用であることが明らかとなった。

#### Steady electron donation to a soluble cytochrome P450 through a foreign electron transfer protein

Risa Suzuki, ○Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** cytochrome P450, NAD(P)H, cofactor regeneration, thermostable enzyme

### 3P-1a042 ナノ空間反応場を利用した 1 分子 DNA 増幅システムの構築

松浦 俊一<sup>1</sup>, 馬場 知哉<sup>2</sup>, 千葉 真奈美<sup>1</sup>, ○角田 達朗<sup>1</sup>,  
山口 有朋<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・化学プロセス, <sup>2</sup>遺伝研・系統生物, <sup>3</sup>JST・さきがけ)  
matsuura-shunichi@aist.go.jp

**【背景・目的】** 犯罪捜査や化石試料等における遺伝子の精密診断では、極微量の DNA しか得られないことが多く、数分子レベルの DNA からの高感度かつ高精度の増幅技術の開発が求められている。しかし、従来のポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 等の DNA 増幅技術では、標的の DNA 分子が極度に減少すると、標的以外の DNA に起因する非特異的な DNA 増幅 (バックグラウンド) が増大し、標的 DNA の選択的増幅が阻害される点に課題があった。この課題の克服には、微量の標的 DNA であっても、DNA 増幅酵素/標的 DNA/プライマーの間での特異性を高度に維持できる反応場の確立が不可欠である。本研究では、細孔径をナノレベルで調節可能なメソポーラスシリカに酵素を正確に配向・集積させ、酵素周辺の反応環境を最適化することによって標的 DNA のみの選択的増幅を図るとし、新規の反応制御技術を提案する。ナノ空間への DNA 増幅酵素の精密配置と反応制御の実現により、究極的には 1 分子レベルの極微量 DNA からの増幅を可能にする技術開発を目的としている。**【方法・結果】** 細孔径の異なる 7 種類のメソポーラスシリカ (細孔径: 2-25 nm) に DNA 増幅酵素 (耐熱性 DNA ポリメラーゼ) を固定化し、環状のプラスミド DNA 上の標的配列 (約 1.2 kb) の PCR 増幅を試みた。基質 DNA を 10<sup>8</sup> 分子から段階的に減少させたところ、従来の DNA 増幅酵素が遊離状態での反応系では 10<sup>5</sup> 分子以下で非特異的な DNA 増幅が進行し、標的 DNA の選択的増幅が阻害された。一方、固定化酵素では、同条件において非特異的な DNA 増幅の抑制が示唆され、メソポーラスシリカの細孔径の最適化によって、数分子レベルの基質 DNA からの選択的増幅が可能となった。以上より、メソポーラスシリカのナノ空間が DNA 増幅における副反応抑制場として活用でき、DNA 増幅反応の特異性及び感度を飛躍的に向上できることを明らかにした。

#### Construction of a single-molecule DNA amplification system using nanoporous reaction field

Shun-ichi Matsuura<sup>1</sup>, Tomoya Baba<sup>2</sup>, Manami Chiba<sup>1</sup>, ○Tatsuo Tsunoda<sup>1</sup>,  
Aritomo Yamaguchi<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Chem. Proc. Technol., AIST, <sup>2</sup>Genet. Strains Res. Ctr., NIG, <sup>3</sup>PRESTO, JST)

**Key words** immobilized enzyme, DNA polymerase, mesoporous silica, single-molecule PCR

### 3P-1a043 持続的酵素反応プロセスを実現する酵素-メソポーラスシリカ複合体の開発

○松浦 俊一<sup>1</sup>, 池田 丈<sup>2</sup>, 千葉 真奈美<sup>1</sup>, 角田 達朗<sup>1</sup>, 黒田 章夫<sup>2</sup>,  
山口 有朋<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・化学プロセス, <sup>2</sup>広島大院・先端物質, <sup>3</sup>JST・さきがけ)  
matsuura-shunichi@aist.go.jp

**【背景・目的】** 固定化酵素を利用した低環境負荷型の物質変換プロセスでは、2 種類以上の酵素の組み合わせによる新たな反応経路の構築が期待されている。例えば、医薬農中間体として付加価値の高い光学活性アルコールの高効率合成に向け、補酵素再生系を組み込んだ異種酵素反応場の利用法が提案されている。しかし、酵素の安定性や再利用性に課題が残っており実用化に至っていない。我々は、無機多孔質材料 (メソポーラスシリカ) の規則性ナノ細孔に酵素を高密度かつ安定に配列化する手法を提案し、これまでに酵素の凝集失活の抑制や熱安定性の向上効果を見出ししている。本研究では、メソポーラスシリカの細孔を異種酵素の集積組立場とした高効率の酵素反応場の構築を目指し、モデル反応として補酵素再生による難分解性化学染料 (アゾ染料) の分解検証を試みた。また、反応中のシリカ細孔からの酵素の脱離を抑制するために、シリカ結合タンパク質 (Si-tag) を融合したハイブリッド酵素を適用し、固定化酵素の再利用性の向上を図った。**【方法・結果】** 異種酵素 (グルコース脱水素酵素およびアゾ還元酵素) によるアゾ染料 (メチルレッド) の還元分解を検証した結果、遊離の酵素や非多孔質シリカを用いた固定化酵素ではグルコース脱水素酵素の補酵素再生能の低下が認められた。一方、シリカ細孔に固定化した酵素では補酵素再生およびアゾ染料分解における本来の活性が保持され、異種酵素の安定性向上場としてのメソポーラスシリカの優位性を明らかにした。また、シリカ表面への Si-tag 融合酵素の配向固定によって補酵素再生系が効率的に機能するようになり、その結果、異種酵素が連動した高効率かつ持続的な酵素反応を実現した。さらに、Si-tag を介した強固な結合により、固定化酵素の繰り返し耐久性 (再利用性) が著しく向上した。

#### Development of enzyme-mesoporous silica composites for achieving durable enzyme reaction process

○Shun-ichi Matsuura<sup>1</sup>, Takeshi Ikeda<sup>2</sup>, Manami Chiba<sup>1</sup>, Tatsuo Tsunoda<sup>1</sup>,  
Akio Kuroda<sup>2</sup>, Aritomo Yamaguchi<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Res. Inst. Chem. Proc. Technol., AIST, <sup>2</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>PRESTO, JST)

**Key words** immobilized enzyme, silica-binding protein, glucose dehydrogenase, coenzyme regeneration

### 3P-1a044 静電相互作用を駆動力とした迅速なストレプトアビジンの結晶化

○南畑 孝介<sup>1</sup>, 安達 基泰<sup>2</sup>, 清水 瑠美<sup>2</sup>, 黒木 良太<sup>3</sup>, 長棟 輝行<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・工, <sup>2</sup>量研機構, <sup>3</sup>原子力機構, <sup>4</sup>東大院・工・化生, <sup>5</sup>東大院・工・バイオエンジニアリング)  
kosukeminami@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

**【背景】** タンパク質結晶は、内部にタンパク質分子が規則的に並んだ多孔質構造を有しており、X 線結晶構造解析の用途以外にも、反応場や、任意の分子を配列させるテンプレートとして用いるなどの利用が期待できるナノ材料である。しかし、一般的にタンパク質結晶の調製は困難であり、得られる量も極僅かであり、タンパク質結晶の材料としての利用を検討する上で、タンパク質結晶を迅速かつ簡便に調製する手法を確立することが求められている。そこで本研究では「静電的相互作用」を駆動力としたタンパク質結晶技術について検討を行った。ストレプトアビジン (SA) をモデルタンパク質として、SA の末端に正電荷あるいは負電荷を有するペプチドタグを導入した組換体を調製し、それらを互いに混合することによる迅速な結晶化を検討した。**【実験方法および結果】** SA の C 末端に R<sub>n</sub>Y あるいは D<sub>n</sub>Y を導入した SA 組換体 (SA-R<sub>n</sub>Y, SA-D<sub>n</sub>Y) を調製し、各 SA 組換体をテラサキプレート上で、5 μL の体積で等モル比で混合し、結晶化の検討を行った。溶液の白濁が生じた。12 時間、インキュベート後の溶液は白濁が消失し、容器の底面ならびに気液界面において正方形板状あるいは棒状の結晶が観察された。SA 組換体を混合後、約 30 分で結晶核の形成の生成が確認され、その後約 3 時間かけて結晶成長が観察された。2 μM の極めて低濃度の SA 溶液からも結晶を得ることが出来た。以上の結果より、極めて短時間でかつ低濃度の SA 溶液から結晶を得ることに成功した。

#### Genetically fused charged peptides induce rapid crystallization of streptavidin

○Kosuke Minamihata<sup>1</sup>, Motoyasu Adachi<sup>2</sup>, Rumi Shimizu<sup>2</sup>, Ryota Kuroki<sup>3</sup>,  
Teruyuki Nagamune<sup>4,5</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng. Kyushu Univ., <sup>2</sup>QST, <sup>3</sup>JAEA, <sup>4</sup>Dept. Chem., Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, <sup>5</sup>Dept. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** crystallization, streptavidin, electrostatic interaction, charged-peptide

### 3P-1a045 ホモ二量体化モジュールの導入による細胞内タンパク質間相互作用検出の高感度化

○鹿島 大揮, 河出 来時, 長棟 輝行, 河原 正浩  
(東大院・工)  
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

タンパク質は酵素活性・分子認識機能といった非常に高度な機能を有し、細胞内においては相互作用を介して協力的に働くことにより細胞増殖などを制御している。近年、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction: PPI) の網羅的研究が盛んであり、細胞内 PPI を検出する系として、哺乳類細胞にキメラタンパク質を導入した MaMTH, KISS, MAPPIT といった系が開発されている。しかし、これらの系においては十分なリードアウトを得るためにキメラタンパク質を過剰発現させているため発現が不安定であり、バックグラウンドの低減が課題とされてきた。

そこで、本研究室では、受容体型チロシンキナーゼの1つである c-kit の細胞内ドメイン (c-kit ICD) に着目し、これを標的タンパク質 (POI) の C 末端側に融合したキメラタンパク質を開発した。c-kit ICD は POI の相互作用依存的に二量体を形成して下流シグナルを活性化し細胞増殖を誘導する。これを IL-3 依存的に増殖するマウス由来 Ba/F3 細胞に導入し、IL-3 非存在下で培養した際の PPI 依存的な細胞増殖を指標とした新規スクリーニング系を構築した。しかし、従来系においては検出可能な対象が比較的強い相互作用を持つタンパク質に限られ、検出感度が課題となっていた。そこで本研究では POI の複合体形成の helper module として小分子依存的にホモ二量体化するタンパク質を POI の N 末端側に導入して、感度増強及び制御を図った。その結果、小分子濃度依存的に細胞増殖が誘導され、helper module 無しの従来系では検出できなかった細胞内 PPI の検出に成功した。今後、本系は PPI スクリーニング系として医薬品開発の場での応用が期待される。

#### Highly sensitive detection of intracellular protein-protein interactions by introducing a homo-dimeric module

○Daiki Kashima, Rajji Kawade, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** protein interaction, chimeric protein, mammalian cytoplasm, positive selection

### 3P-1a046 カニ殻堆肥由来“*Cellulosimicrobium* sp.NTK2”の結晶性キチン分解能と分解酵素の生産

○仁木 大輔, 西川 康太, 藤村 夏紀, 有馬 二朗  
(鳥取大・農)  
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】キチンの分解物は様々な生理機能を持つため、医療・食品分野への利用が期待される。しかし、キチンは水に溶けず、分解には酸処理等の様々な工程が必要であり、複雑さや環境負荷に関する問題が残されている。我々は、結晶性キチンのダイレクトな分解と利用を目指し、カニ殻廃棄物の迅速な堆肥化を可能とする完熟コンポストから、結晶性キチンを直接分解できる微生物の単離とキチン分解酵素の探索を行った。

【方法及び結果】本コンポストをもとに、炭素源として結晶性キチンのみを添加した培地で集積培養を行った結果、結晶性キチンを分解する微生物が1株単離された。16SrRNA 系統解析の結果、本菌は放線菌の一種である *Cellulosimicrobium* 属細菌であると同定された。2% (w/v) の結晶性キチンを含む培地中 25°C で本菌を培養すると、徐々に結晶性キチンが分解され、2日目付近から、培養上清から GlcNac-p-nitrophenol (pNP) 及び (GlcNac)<sub>2</sub>-pNP の分解活性が確認された。また、SDS-PAGE 及びキチンザイモグラフィ解析を行った結果、キチンを含有する培地で本菌を培養すると、キチン分解系のタンパク質が 10 種程度分泌していることが明らかとなり、N 末端配列解析を行った結果、Glycoside Hydrolase family 18 に属する酵素が 3 種 (30、40、及び 60 kDa) と約 20 kDa の Chitin binding Protein が同定された。上記のうち 40 及び 60 kDa のバンドの N 末端配列は同じであったため、40 kDa の酵素は 60 kDa の酵素からモジュールが外れたものであると推定された。なお、ザイモグラフィ解析の結果、20 kDa のバンドからもキチン分解活性が確認された。

#### Crystalline chitin degrading potential of “*Cellulosimicrobium* sp.NTK2” and its production of chitinases

○Daisuke Niki, Kota Nishikawa, Natsuki Fujimura, Jiro Arima  
(Fac. Agric., Tottori Univ.)

**Key words** *Cellulosimicrobium*, chitinase, zymography, chitin binding protein

### 3P-1a047 細胞増殖を効率的に誘導するチロシンモチーフのスクリーニング

○梅根 輝来人, 長棟 輝行, 河原 正浩  
(東大院・工)  
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】細胞はリガンドの刺激を受けることにより細胞膜上の受容体が活性化され、細胞内にシグナル伝達を起こすことで様々な細胞運命を辿るということが知られている。シグナル伝達経路の一つである JAK/STAT 経路の活性化機構は、受容体上のチロシンモチーフという数残基のペプチド配列中のチロシン残基がリン酸化されることで始まり、細胞内のシグナル伝達分子がこの部位に結合し活性化され、最終的に細胞運命を制御する。シグナル伝達分子はモチーフのチロシン周辺の数残基まで認識し結合するため、モチーフ配列によってシグナル伝達分子の活性化プロファイルが変化し、配列そのものが間接的に細胞運命を制御していると言える。そこで本研究は、チロシンモチーフ配列のライブラリを作製し、細胞内で増殖というフェノタイプを効率的に誘導することのできるモチーフのスクリーニングを行った。

【方法・結果】まず、ミリストイル化シグナル配列、有機小分子 AP20187 依存的に二量体化する FKBP<sub>F36V</sub>、JAK 結合ドメイン、STAT1 結合モチーフを融合した人工受容体を作製した。次に、モチーフ中のチロシン下流の三残基をランダム化したライブラリ遺伝子を作製し、この遺伝子を IL-3 依存的に増殖する Ba/F3 細胞に導入し受容体を発現させた。この細胞を AP20187 存在下で数日間マルチウェルプレートで培養し、著しい増殖を示した細胞を選択した。この結果、18 のクローンをスクリーニングすることに成功した。次にスクリーニングした細胞をそれぞれ複数濃度の AP20187 存在下で培養し増殖アッセイを行った結果、全ての細胞でリガンド濃度依存的な増殖を示した。これらの細胞を AP20187 で刺激し各シグナル伝達分子の活性化を検出した結果、増殖に寄与するとされる STAT3, 5, PI3K, MEK1/2 の活性化プロファイルがクローン間で大きく異なっていることを見出した。

#### Screening of tyrosine motifs which can induce efficient cell proliferation

○Kirarto Umene, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** signal transduction, tyrosine phosphorylation, screening, proliferation

### 3P-1a048 動物細胞内で強制発現させたがん抗原タンパク質の細胞内凝集機構の解析

○正元 晃平, 新土居 奈緒美, 本莊 知子, 二見 淳一郎  
(岡山大院・自科)  
futamiji@okayama-u.ac.jp

がんと精巣に限局した発現を示し、がんの悪性化と相関する Cancer-Testis(CT) 抗原は、現在 156 種類、バリエーションを含めると 243 種類の存在が報告されている。これらの CT 抗原はがん免疫治療のワクチン抗原、ならびに腫瘍免疫応答の活性化レベルを測定するための診断薬の作製に必須である。これらの CT 抗原の詳細な機能は不明なものが多く、構造上の特徴は天然変性領域が多く細胞内では様々なタンパク質と複合体を形成するハブタンパク質として機能し、細胞増殖を亢進しているものと推定されている。これらの CT 抗原をヒト由来の Hek293 細胞や HeLa 細胞内で強制発現をさせると、8 割以上の CT 抗原が細胞内で凝集することが確認された。本研究では細胞内で凝集した各種の CT 抗原が、どの様な機構で凝集しているのかを解析した。各種のがん抗原を HeLa 細胞内で強制発現させて免疫染色を行うと、各がん抗原は細胞内で様々な形状の凝集体を形成することが観察された。一方で我々は以前、ヒト細胞内の総タンパク質は核酸成分を完全に除去すると変性状態でありながら水中で高い溶解性を示すことを見出してきた。実際に、強制発現で不溶化した CT 抗原も、核酸成分を除去すると大部分が可溶化された。In vivo での凝集体形成と核酸との相互作用について、各種の染色法で解析したが、現時点では細胞内凝集体は変性タンパク質のみから構成され、核酸成分の混入は検出されていない。これまでの解析結果を小括すると、動物細胞内で形成される強制発現がん抗原タンパク質の凝集体は、大腸菌内でしばしば観察される組換えタンパク質のインクルージョンボディとよく似た性質の凝集体であるものと判断された。

#### Analysis of aggregation mechanism of cancer antigen by forced expression in mammalian cells.

○Kohei Shogen, Naomi Niidoi, Tomoko Honjo, Junichiro Futami  
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** protein, protein engineering, protein aggregation

### 3P-1a049 Hek293 細胞を用いた全長がん抗原タンパク質の網羅的調製条件の最適化

○大川 祐也, 新土居 奈緒美, 本荘 知子, 二見 淳一郎  
(岡山大院・自科)  
futamij@okayama-u.ac.jp

腫瘍局所での免疫抑制状態を解除する免疫チェックポイント阻害剤の登場で、がん免疫療法が現実的なオプションとして注目されている。腫瘍免疫応答の活性化は QOL の高い延命効果に相関するが、患者個人間の免疫細胞の活性化レベルやがん抗原種の個人差が大きい。従って、個人間の腫瘍免疫応答の活性化レベルを簡便に測定できる診断薬の開発で、がんの個別化医療が大きく発展する可能性が高い。我々は、がん細胞内で異常に発現している各種のがん抗原タンパク質に対する抗体の出現 (Antigen-Spreading) が腫瘍免疫応答の活性化レベルを評価できるバイオマーカーと考え、抗体価の変動を適切にモニタリングする抗体検査技術を開発中である。この技術開発には多種多様な全長がん抗原のリソースの網羅的整備が必要である。大半のがん抗原は細胞内タンパク質であり、大腸菌を宿主とした生産系が利用できるが、一部のがん抗原は大量調製が困難な膜タンパク質であり、Hek293 細胞を用いた一過的なタンパク質生産系の活用が適していた。本研究では独自開発の超高発現ベクターを活用し、乳がんマーカーでもある膜タンパク質の Her2 抗原やがんと精巣に局限した発現を示す Cancer-Testis(CT)抗原をモデルとして発現・精製条件の最適化を行った。また、一部のがん抗原は大腸菌の細胞内で速やかに分解される問題点があったが、Hek293 細胞を用いることで全長がん抗原の取得が可能になった。これらの全長がん抗原を用いた抗体検査技術の可能性について発表したい。

#### Optimization of preparation methodology for multiple full-length cancer antigens using Hek293 cells

○Yuya Okawa, Naomi Niidoi, Tomoko Honjo, Junichiro Futami  
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** protein, protein engineering, protein expression

### 3P-1a050 カイコ発現系を利用した抗体および膜タンパク質調製の試み

○柴田 真実<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 加藤 昌彦<sup>2</sup>, 長屋 英和<sup>2</sup>, 眞田 英明<sup>2</sup>, 熊谷 泉<sup>1</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・工・バイオ工, <sup>2</sup>シスメックス株式会社)  
mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

細胞間の物質の認識・授受を担う膜タンパク質は重要な創薬ターゲットであり、これに特異的に作用する抗体が分子標的薬として開発されている。このような抗体を取得する手段の一つにファージ提示法があり、この手法ではファージに標的結合の機能をもつ抗体の断片を提示させて調製した  $10^{10}$  種からなる抗体群を、標的膜タンパク質と相互作用させることで、目的の特異性を持つ抗体断片を取得し、その配列情報を元にして様々な有用抗体作製に反映させる。しかし膜タンパク質は活性を有した状態で発現させ、構造を安定に保ったまま調製することが困難であるという課題がある。また候補抗体の中から構造的安定性を持った抗体を確実に選抜するためには、ファージに提示された膨大な量の候補抗体群から、なるべく数多くの有望抗体断片を選択して実際に組換えタンパク質として調製し、定量的に機能と安定性を検証する必要があるが、このスクリーニングを可能にするには多種類の抗体断片を同時に調製可能な発現系が必要となる。

そこで我々はこれらの課題を解決する発現系として、膜タンパク質を調製可能かつ、組換え抗体の多品種調製に適した高細胞密度な小型リアクターであるカイコを宿主とした発現系に注目し、膜タンパク質に特異的に相互作用する抗体取得のプロセスの開発を試みている。今回はカイコ発現系を利用して、膜タンパク質の一種である B 型インフルエンザヘマグルチニンの活性を示す形での調製、および 11 種類の低分子抗体 scFv の迅速な調製に成功したので報告する。この結果は膜タンパク質特異的抗体取得プロセスの開発に、カイコ発現系が利用可能であることを示している。

#### Silkworm expression system suitable for high-throughput preparation of antibody fragment and membrane protein.

○Mami Shibata<sup>1</sup>, Hikaru Nakazawa<sup>1</sup>, Masahiko Kato<sup>2</sup>, Hidekazu Nagaya<sup>2</sup>, Hideaki Sanada<sup>2</sup>, Izumi Kumagai<sup>1</sup>, Mitsuo Umetsu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Systemex Corp.)

**Key words** silkworm express system, scFv, baculovirus

### 3P-1a051 原核生物における J タンパク質による Hsp90 と Hsp70 の協同的シャペロン作用の仲介と機能調節

○仲本 準  
(埼玉大院・理工・分子)  
nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp

【背景と目的】微生物は、食品・医薬品・バイオエタノールなどの生産に利用されている。このような有用物質生産の場においては、微生物は浸透圧、酸あるいは熱などのストレスに曝されて生育阻害が生じるために、生産性が低下することがある。自然界に生育し、様々な環境ストレスに曝されるシアノバクテリアなどの微生物は、高度な自己防御機構をもつと考えられるが、微生物のストレス耐性機構に関する知見は、有用物質生産の改善に役立つものと期待される。分子シャペロンは、ストレス下で高発現し、変性タンパク質の凝集抑制や機能的構造への折り畳み、タンパク質凝集塊の可溶化・再活性化などの機能を通して、宿主のストレス耐性に深く関わる一群のタンパク質である。我々は、シアノバクテリアの分子シャペロン Hsp90 と Hsp70 が協同的に作用することを明らかにしたが、J タンパク質 (DnaJ/Hsp40) がこれらシャペロンの仲介者として働くことを支持する結果を得たので発表する。

【方法】シアノバクテリア (*Synechococcus elongatus*) の Hsp90、Hsp70、種々の J タンパク質を高度に精製して実験に用いた。変性タンパク質の凝集反応は、光散乱強度 (濁度) 測定により解析した。

【結果】プルダウン法により、II 型 J タンパク質である DnaJ2 は、J ドメインを含まない C 末側領域で Hsp90 と物理的に相互作用することを明らかにした。これは、Hsp70-DnaJ2-Hsp90 の 3 者複合体形成を示唆するものである。DnaJ2 は、Hsp90 の変性タンパク質凝集阻止活性を阻害したが、Hsp70 のそれには影響を与えなかった。DnaJ2 は Hsp90-基質複合体の安定性を調節して、基質の解離あるいは (Hsp90 から) Hsp70 への基質移動を容易にするのではないかと考えられる。

#### Prokaryotic J protein mediates co-operation of Hsp90 with Hsp70 and controls the chaperone function

○Hitoshi Nakamoto  
(Dept. of Biochem. Mol. Biol., Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ.)

**Key words** folding mechanism, HSP70, Hsp90, Molecular chaperone

### 3P-1a052 カチオン化法による Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ (HNF-4 $\alpha$ ) タンパク質の細胞導入と核内転写活性の評価

○中野 智貴<sup>1</sup>, 曳野 隆之<sup>1</sup>, 曾 芳琴<sup>1</sup>, 西尾 知樹<sup>1</sup>, 二見 淳一郎<sup>2</sup>, 二見 翠<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岡山理大・工, <sup>2</sup>岡山大院・自科)  
mfutami@bme.ous.ac.jp

HNF-4 $\alpha$  は、肝臓の機能の代謝経路に関わる多数の遺伝子の転写を司る。HNF-4 $\alpha$  の働きを人工的に制御することができれば、肝細胞の機能の制御法に繋がる。本研究はカチオン化タンパク質導入法により HNF-4 $\alpha$  タンパク質を細胞に導入し、細胞内で機能させることを目的に行った。カチオン化法とはタンパク質を化学修飾により正の電荷を付加させることで、表面が負電荷に富み生きた細胞にタンパク質を導入させる方法である。インクルージョンボディとして大腸菌に発現させた HNF-4 $\alpha$  組み換えタンパク質を変性剤で溶かし、システイン側鎖にジスルフィド結合を介して 4 級アミン、または平均分子量 600,1200,1800 のポリエチレンイミン (PEI) を繋げ変性カチオン化 HNF-4 $\alpha$  を得た。これらの変性カチオン化 HNF-4 $\alpha$  を導入し、細胞質に到達した場合、細胞質内の還元環境により、4 級アミンや PEI は HNF-4 $\alpha$  より解離し、HNF-4 $\alpha$  は活性構造を取ると予想される。細胞導入した HNF-4 $\alpha$  タンパク質の核内転写活性を調べるために、HNF-4 $\alpha$  の結合 DNA モチーフの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋げてレポーターアッセイ系を構築した。このレポーター遺伝子と各種カチオン化 HNF-4 $\alpha$  を細胞導入し、細胞内に入った HNF-4 $\alpha$  の活性を評価した。その結果、分子量 1200, 1800 の PEI を付加させた HNF-4 $\alpha$  タンパク質の導入により、転写活性の上昇がみられた。この結果から、HNF-4 $\alpha$  タンパク質をカチオン化法により細胞の外から導入することで、細胞内で機能することが分かった。

#### Chemically cationized protein transduction of Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ (HNF-4 $\alpha$ ) and evaluation of the nuclear transcription activity.

○Tomoki Nakano<sup>1</sup>, Takayuki Hikino<sup>1</sup>, Houkin Sou<sup>1</sup>, Tomoki Nishio<sup>1</sup>, junichiro Futami<sup>2</sup>, Midori Futami<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Okayama Univ. Sci., <sup>2</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** hepatocyte, protein

### 3P-1a053 昆虫嗅覚受容体発現酵母を利用した迅速な匂い分子検出システムの基盤構築

○福谷 洋介<sup>1,2</sup>, 田中 良拓<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>農工大・院工・生命工,<sup>2</sup>農工大・工・生命工)  
fukutani@cc.tuat.ac.jp

嗅覚は生物の持つ高感度な匂いセンサーであるため、生物の嗅覚機能を模倣したセンサーの研究開発が広く行われている。嗅覚システムの中の匂い検出部である嗅覚受容体は、嗅覚神経細胞の膜上に発現している7回膜貫通タンパク質である。我々はかねてから出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主に、嗅覚受容体を発現させる手法を構築することで、嗅覚受容体の機能解析と酵母を使った匂いセンサー開発を目指し研究を進めている。

昆虫の嗅覚受容体は、哺乳類の嗅覚受容体とは異なる膜貫通構造とり、共受容体(Orco)とのヘテロ2量体を形成し機能する。その複合体自身が匂い応答性のイオンチャネル活性をもつという昆虫独自の機構を持つことが明らかになっている。本研究では、ショウジョウバエ由来の嗅覚受容体と Orco を共発現させた出芽酵母を構築し、特定の匂い分子に反応する、これまでよりも迅速な検出が可能なバイオセンシングシステムへの応用を目指した。

OR47a, Orco それぞれの酵母発現ベクターを構築し、出芽酵母に共発現させた、目的遺伝子の発現を確認したのちに、受容体の細胞膜への局在の有無を確認した。リガンド検出にはカルシウムイオンインジケーターである G-GECO を導入し、匂い分子応答性のイオンチャネル活性の有無を試験した。本発表においては、この昆虫嗅覚受容体の出芽酵母での機能的発現の有無や、匂いセンサー応用への展望などについて報告する。

#### Construction of the rapid odor detection system using insect odorant receptor expression yeast

○Yosuke Fukutani<sup>1,2</sup>, Tanaka Yoshihiro<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol., <sup>2</sup>Dept. of Biotechnol. Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

**Key words** odorant response, yeast

### 3P-1a054 抗原結合に伴う抗体の構造変化の解析

○岡本 優太<sup>1</sup>, 野田 勝紀<sup>1</sup>, 福井 希一<sup>1</sup>, 内山 進<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工,<sup>2</sup>岡崎統合バイオサイエンスセ)  
suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

抗体医薬品はがんや自己免疫疾患などに対する新しい治療薬として需要の拡大が見込まれている。一方で、抗原に抗体が結合した後の免疫細胞の活性化機構については未だ不明な点が多い。以前より、抗原の結合に伴って抗体に構造変化が生じる可能性が指摘されてきたが、この構造変化が起こっているかは依然として不明で、さらに、構造変化が生じているとしても、それが免疫細胞の活性化に関係するか否かは不明である。こうした抗原と抗体の相互作用に伴う構造変化と活性化機構との関係を明らかにできれば、新しいタイプの抗体創薬の可能性が広がると考えられる。

本研究では抗原の結合に伴う抗体の構造変化の解明を目的とし、抗原の結合に伴う Fab の構造変化を水素重水素交換質量分析法(HDX-MS)を用いて解析した。HDX-MS はタンパク質を軽水から重水に移した際に、主鎖のアミド水素が重水素に置換される現象を利用する手法で、結晶化や安定同位体ラベルなどの必要が無く、溶液中でのタンパク質の構造変化や相互作用部位を迅速に解析可能である。

まず抗体をバインで切断し、必要となる Fab を各種液体クロマトグラフィーを用いて、分離精製を行った。次に HDX-MS の測定濃度の条件設定に必要となる、Fab と抗原の解離定数 KD を等温滴定カロリメトリー(ITC)を用いて測定した。その後、HDX-MS により、抗原と結合していない際の Fab と抗原と複合体を形成した Fab の水素重水素交換反応の速度を比較した。

その結果、ITC により決定した KD の値は約 4 nM であった。一方、HDX-MS の結果では、抗原との結合に伴い、交換速度が変化する部位が複数存在していた。本研究により、HDX-MS により抗原との結合部位や構造変化部位を決定できることが分かった。

#### The quick analysis of conformational change in antibodies associated with antigens-binding

○Yuta Okamoto<sup>1</sup>, Masanori Noda<sup>1</sup>, Kiichi Hukui<sup>1</sup>, Susumu Uchiyama<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Okazaki bioscience inst.)

**Key words** antibody, structural analysis

### 3P-1a055 高感度免疫検査への利用を目指した材料親和性ペプチド融合単鎖抗体の高密度配向固定

○谷端 怜奈<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学,<sup>2</sup>デンカ,<sup>3</sup>デンカ生研)  
horiuchi@kit.ac.jp

【諸言】免疫検査に利用されてきた Whole 抗体は、動物細胞や実験動物を利用して生産されるため高コストであり、高分子量のため、プレート表面に高密度かつ均一な配向で固定化できず、検査の高感度化が難しい。一方、単鎖抗体(scFv)は大腸菌を宿主として安価に生産可能であり、C末端に材料親和性ペプチドタグを導入することで、プレート上に高密度かつ高配向に固定化できる。先行研究において、モデル抗体におけるペプチドタグ融合 scFv の生産方法、固定化方法などは十分に検討されたため、本研究ではこれらの技術の汎用性を広げることが目的とし、scFv とペプチドタグの組合せによるプレートへの吸着性、固定化後の抗原結合活性を評価した。特に、同じ scFv と同じアミノ酸配列を有する Whole 抗体との比較を行った。

【実験】CRP をモデル抗原とし、組換え大腸菌を用いてポリスチレン親和性ペプチド融合 scFv(scFv-PS)および PMMA 親和性ペプチド融合 scFv(scFv-PM)を、大腸菌を用いて生産した。scFv-PS, scFv-PM および Whole 抗体を PBS で 25 µg/ml となるよう希釈し、scFv-PS は親水性 PS プレート、scFv-PM は PMMA プレート、Whole 抗体は両方のプレートに固定化した。これらのプレートを用い、Sandwich ELISA によって CRP の検出を行い、固相化された抗体の活性を評価した。

【結果と考察】PBS 中の抗体を親水性 PS プレートに固定化した場合、scFv-PS の方が Whole 抗体よりも高いシグナルが得られ、約 5 倍低濃度の CRP を検出できた。また、PMMA プレートに固定化した場合は、Whole 抗体のシグナルはほとんど得られなかったのに対し、scFv-PM は高いシグナルが得られた。以上の結果より、材料親和性ペプチド融合 scFv は材料表面に対し、ペプチドタグの親和力によって強く結合し、高密度かつ高活性な状態で固定化できることが示された。

#### Immobilization of scFv antibodies through materials-binding peptides for application to sensitive immunoassay

○Reina Tanibata<sup>1</sup>, Koichi Takahashi<sup>2</sup>, Yoshiaki Hirayama<sup>2</sup>, Fumio Gondaira<sup>3</sup>, Jun-ichi Horiuchi<sup>1</sup>, Youichi Kumada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., <sup>2</sup>Denka, <sup>3</sup>Denka-Seiken)

**Key words** antibody, immobilization

### 3P-1a056 テンプレートスイッチ反応と懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応法を用いた抗体 cDNA 迅速合成システムの開発

○松原 悠紀<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大院・理工学教育学部,<sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)  
isobe@eng.u-toyama.ac.jp

【背景と目的】我々は迅速かつ大規模なモノクローナル抗体の単離を可能とするため、多数の抗体産生単一細胞から確実に抗体 cDNA を合成するための懸垂液滴アレイ式磁気ビーズ反応法(MAGrahd 法)を開発した。本法は、薄層平板下にアレイ状に懸垂配置された液滴中に存在する核酸が結合した磁気ビーズを、薄層平板上部から近づけた磁石によって液滴から液滴へ移動させることにより、溶液交換や攪拌などの煩雑な操作を一切行うことなく、1 個の細胞から効率よく cDNA を合成する方法である。本法を用いた 5'RACE 用 cDNA 合成は、mRNA 抽出、逆転写反応、デオキシターミナルトランスフェラーゼ(TdT)によるホモポリマーテリングからなる全 8 工程(HT 法)が必要で、反応に 135 分の時間を要してきた。我々は本工程をさらに効率化するため、逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性を利用するテンプレートスイッチ反応と液滴反応法を組み合わせた手法(SW 法)を新たに開発することで、5'RACE 用 cDNA 合成にかかる時間とコストを大幅に減少させることに成功したので報告する。

【方法と結果】SW 法を用いた 5'RACE 用 cDNA 合成は、磁気ビーズ含有細胞溶解液滴、洗浄液滴 1、2、スイッチプライマー含有逆転写反応液滴、洗浄液滴 3、4 の計 6 工程からなり、全反応に要する時間が約 90 分と、HT 法に比べ 45 分間短縮された。ラット抗体産生単一細胞を用い、HT 法並びに SW 法で作製された cDNA から抗体可変領域増幅を行い電気泳動により増幅効率を比較した結果、両者に差は認められなかった。更に、増幅された可変領域断片から作製した抗体遺伝子を細胞に導入し、抗体分泌量を調べた結果、SW 法の方が高い分泌量を示す傾向が観察された。以上の結果より SW 法を用いることで、より多数の単一細胞から抗体を作製することが可能となったことから、ヒト自己免疫疾患等の解析への応用が期待される。

#### The quick cDNA synthesis system of antibody gene by using template switching and MAGrahd method

○Yuuki Matsubara<sup>1</sup>, Nobuyuki Kurosawa<sup>2</sup>, Masaharu Isobe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Res., Univ. Toyama)

**Key words** antibody, single cell

### 3P-1a057 免疫検査の高感度化を目指した Whole 抗体の配向固定化条件の検討

○神吉 菜摘<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>デンカ, <sup>3</sup>デンカ生研)  
horiuchi@kit.ac.jp

[緒言]一般的に ELISA 法では、完全長抗体(Whole 抗体)が抗原認識部位を溶液側に配向させた状態でプレート表面に固定化されることが望ましいが、プレートの表面状態や抗体のアミノ酸配列の違いによって固定化状態は大きく異なる。したがって、Whole 抗体の高密度化・配向制御に適した表面状態・固定化条件の探索が求められている。本研究では、Whole 抗体の動物種や Fv ドメインのアミノ酸配列によらず、再現性良く高密度かつ均一な配向で固定化できる表面状態・固定化条件の探索を行った。

[実験]pH 2~8.5 の各バッファーを用いて Whole 抗体(マウスモノクローナル抗体・ウサギポリクローナル抗体)を 10 µg/ml に希釈し、親水度の異なる 2 種類のポリスチレンプレートに固定化し、Sandwich ELISA により抗原 (NP および CRP) に対する結合活性を評価した。

[結果と考察]Sandwich ELISA の結果より、マウスモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体は親水度のより高い PS プレートに対して固定化可能であり、固定化後の抗原結合活性は、pH5.5 以下のバッファーで固定化した場合において向上することが明らかになった。親水化 PS plate では、非イオン性界面活性剤である Tween20 を共存させて固定化した際にも抗原結合活性が低下しないことから Whole 抗体の親水性プレートに対する吸着は主に静電的相互作用であると考えられる。親水度が中程度の PS plate においても pH3 で抗体を固定化した際にシグナルが向上したため同様の効果によるものと考えられる。したがって、Whole 抗体の Fc 領域の荷電性アミノ酸の分布がプレートへの吸着性に大きく関与していることが明らかとなった。

#### Characterization of antibodies immobilized on the surfaces of PS plates with different surface properties

○Natsumi Kamiyoshi<sup>1</sup>, Koichi Takahashi<sup>2</sup>, Yoshiaki Hirayama<sup>2</sup>, Fumio Gondaira<sup>3</sup>, Jun-ichi Horiuchi<sup>1</sup>, Youichi Kumada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., <sup>2</sup>Denka, <sup>3</sup>Denka-Seiken)

**Key words** antibody, immobilization, IgG

### 3P-1a058 Expression and refolding of antigen-binding fragments (Fab) with the leucine zipper in *E. coli*.

○Panwad Ritthisan, Teruyo Ojima-Kato, Satomi Nagai, Takaaki Kojima, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)  
nakano@molbiotech-nagoya.org

Antibodies have become important for several applications in clinical research, therapy and medical diagnostics. Fragment antigen-binding (Fab) can be applied to such purposes. However, overexpression of Fab in *E. coli* cells often leads to the accumulation of inclusion bodies, which limits the application for Fab production using *E. coli* expression system. Inclusion bodies refolding requires extensive processing, including isolation of inclusion bodies from cell, solubilization, refolding of solubilized protein and purification of refolded protein to recovery functions of biological activity.

Leucine zipper LZA and LZB form a heterodimeric coiled-coil structure, the fusion of which peptides to Fab enhanced correct pairing of heavy chain (Hc) and light chain (Lc), leading to more efficient formation of active Fab in *E. coli* expression systems. The new Fab format is named as 'Zipbody'.

In this study, we examined various conditions to obtain a high amount of a zipbody, m6FabLZ, a leucine zipper-fused mouse Fab which binds to *E. coli* O157, from the inclusion bodies expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The isolated inclusion body was mildly solubilized in 3 M Urea using freeze-thawing method followed by step-wise dialysis and the incubation with GSSG. The yield of purified m6FabLZ was 0.25 g from 1 L culture. The refolded showed a high affinity and specificity toward *E. coli* O157 in ELISA. These results demonstrate that the refolding method can be utilized for high-yield production of Fab in *E. coli*.

#### Expression and refolding of antigen-binding fragments (Fab) with the leucine zipper in *E. coli*.

○Panwad Ritthisan, Teruyo Ojima-Kato, Satomi Nagai, Takaaki Kojima, Hideo Nakano  
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** inclusion body, refolding, solubilization

### 3P-1a059 DNA ハイブリダイゼーションを用いる抗体固定化技術の開発とイムノクロマトの高性能化

○岡林 雪乃<sup>1</sup>, 高橋 浩一<sup>2</sup>, 平山 良朗<sup>2</sup>, 権平 文夫<sup>3</sup>, 犬飼 忠彦<sup>4</sup>, 川瀬 三雄<sup>4,5</sup>, 堀内 淳一<sup>1</sup>, 熊田 陽一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京工織大院・工芸科学, <sup>2</sup>デンカ, <sup>3</sup>デンカ生研, <sup>4</sup>TBA, <sup>5</sup>東北大学 工学研究科)  
horiuchi@kit.ac.jp

[諸言]イムノクロマトグラフィは、インフルエンザや感染症の迅速かつ簡便な検査方法として医療診断に利用されている。しかし、リガンド抗体の失活や検体の非特異吸着によって、検出感度・特異性が変化し、その結果、偽陽性・偽陰性等の誤診をまねく可能性がある。ニトロセルロース (NC) 膜は、タンパク質の吸着容量が大きいものの、吸着後に抗原認識部位の構造が変化しやすく、残存活性は大きく損なわれることが多い。そこで本研究では、抗体にオリゴ DNA を標識し、DNA Hybridization を用いて NC 膜上に固定化することで、残存活性の向上と抗原検出シグナルの向上を目的とした。

[操作] 25µM に調製した Ligand DNA を NC 膜上に 2 µL スポットした後、UV 照射によって固定化した。NC 膜を洗浄後、相補 DNA を修飾した抗 FluB 抗体を同じ位置にスポットし、DNA Hybridization により抗体を固定化した。さらに、NC 膜をブロッキング後、濃度 0ng/mL~1000ng/mL の NP 抗原を加えて 1 時間インキュベートした。NC 膜上に捕捉された NP 抗原にビオチン化抗 FluB 抗体ならびに AP-streptavidin を反応させ、BCIP/NBT で発色させた。抗原検出の様子を観察した。また、物理吸着で NC 膜上に固定化した抗 FluB 抗体による抗原検出の様子と比較した。

[結果]NP 抗原を上述の方法で検出した。DNA Hybridization 法では、10ng/mL の NP 抗原を検出できたのに対し、物理吸着法では 1000 倍の抗体濃度 (1mg/ml) で固定化した場合でも 100ng/mL の抗原しか検出できなかった。以上のことから、DNA Hybridization を用いることで安定かつ高密度に抗体を NC 膜上に固定化できることが明らかとなった。

#### Immobilization of antibody utilizing DNA hybridization

○Yukino Okabayashi<sup>1</sup>, Koichi Takahashi<sup>2</sup>, Yoshiaki Hirayama<sup>2</sup>, Fumio Gondaira<sup>3</sup>, Tadahiko Inukai<sup>4</sup>, Mitsuo Kawase<sup>4,5</sup>, Jun-ichi Horiuchi<sup>1</sup>, Yoichi Kumada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., <sup>2</sup>DENKA, <sup>3</sup>DENKA-SEIKEN, <sup>4</sup>TBA, <sup>5</sup>Tohoku)

**Key words** antibody immobilization, nitrocellulose, DNA hybridization

### 3P-1a060 形質細胞内発現抗体を利用した抗原特異的モノクローナル抗体新規単離法(FIXAA)の開発

○塚本 薫<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大院・理工学教育, <sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)  
isobe@eng.u-toyama.ac.jp

#### [背景と目的]

抗体は研究用試薬・診断薬としての用途のみならず医薬品開発の有力な素材として注目されている。我々は小胞体親和性蛍光色素を用いた抗原特異的形質細胞同定法 (ERIAA) を開発し、これに単一細胞由来抗体遺伝子単離発現法を組み合わせることで、様々な動物からモノクローナル抗体を効率よく作製するためのシステムを完成させている。しかし ERIA A による抗原特異的形質細胞の同定は、細胞膜上で発現する僅かな抗体に対する蛍光標識抗原の結合性に依存しているため、抗体産生細胞がごく稀にしか存在しない場合には、高精度な分離が困難であった。一方形質細胞の細胞質には、膜上に発現する抗体に比べ 2 桁以上多い抗体が蓄えられている。そこで我々は、形質細胞の細胞質に蓄えられる抗体に蛍光標識抗原を作用させることで、例え極低頻度にして抗原特異的な形質細胞が存在していなくても、確実に目的の抗体を産生する細胞を同定し、抗体遺伝子の増幅を行い、抗体を取得するための手法を開発したので報告する。

#### [方法と結果]

我々は、細胞固定・細胞膜処理の条件を種々検討することで、抗原特異的な形質細胞を高精度に単離し、抗体遺伝子を増幅するための新技術 (FIXAA) を開発した。FIXAA 法の精度を検証するためのモデル実験として、抗体を産生しない Jurkat 細胞に抗体産生細胞であるハイブリドーマを一定の割合で加えた細胞集団より、ハイブリドーマの単離並びに抗体可変領域遺伝子断片の増幅を試みた。その結果、ハイブリドーマの存在率が 0.01% であっても、約 50% の成功率で V 領域の増幅を行うことができた。本技術は、従来法で取得が極めて困難であった標的タンパク質に対する抗体取得に道を開くものと期待される。

#### Novel method for the isolation of antigen specific plasma cells by intracellular antibody staining

○Kaoru Tsukamoto<sup>1</sup>, Nobuyuki Kurosawa<sup>2</sup>, Masaharu Isobe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Res., Univ. Toyama)

**Key words** antibody, single cell, flow cytometry

### 3P-1a061 取得困難な修飾部位特異的モノクローナル抗体の新規効率的な作製法の開発

○藤 聡志<sup>1</sup>, 黒澤 信幸<sup>2</sup>, 磯部 正治<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大院・理工学教育部, <sup>2</sup>富山大院・理工学研究部)  
isobe@eng.u-toyama.ac.jp

生体内に存在する多くのタンパク質は、特定のアミノ酸残基に対するリン酸化やメチル化などの様々な修飾によってその機能が制御されている。このような修飾タンパク質を特異的に検出するモノクローナル抗体(MAb)は、様々な生物機能の制御過程をモニターするための有用なツールとなる。我々は、形質細胞内に保持される多量の抗体に対する抗原の結合性を利用して、免疫された個体から抗原特異的形質細胞を同定し、そこから抗体遺伝子を単離・発現させることで、抗原特異的 MAb を確実に取得する新規手法(FIXAA 法)を開発した。本手法の有効性を示すため、種々の細胞ストレスに応じて様々な修飾を受ける p53 タンパク質に着目し、これまで単離できなかったリン酸化された Thr18 を含む p53 を特異的に認識する MAb の単離を試みた。p53 由来の Thr18 がリン酸化されたペプチド(pT18)を抗原としてモルモットに免疫を行った後、得られたリンパ球を固定・膜透過処理後、蛍光標識 pT18、蛍光標識非リン酸化 Thr18 ペプチド(蛍光標識 T18)、並びに抗 IgG 抗体を用いて染色を行い、pT18 強陽性細胞群から T18 陽性細胞をサブトラクションすることで、pT18 特異的抗体を発現する形質細胞のシングルセルソーティング・抗体遺伝子単離・発現を行った。得られた抗体の交差反応性を ELISA 法により解析した結果、重鎖・軽鎖の両免疫グロブリン遺伝子の増幅に成功した MAb の 96% 以上が非修飾ペプチドには反応せず修飾ペプチドに選択的に結合した。その中から pT18 を特異的に検出するウェスタン法と免疫染色に使用可能な KD 値 0.2nM のモノクローナル抗体の取得に成功した。本法により、種々の翻訳後修飾タンパク質に対する特異的抗体の効率的な作製が可能になると考えられる。

#### Novel method for the high-throughput isolation of modification-specific monoclonal antibodies

○Satoshi Fuji<sup>1</sup>, Nobuyuki Kurosawa<sup>2</sup>, Masaharu Isobe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Res., Univ. Toyama)

**Key words** antibody, single cell, flow cytometry

### 3P-1a062 低分子抗体-薬物複合体開発: リジン残基側鎖の化学反応へ界面活性剤が及ぼす影響

○服部 修平<sup>1</sup>, 服部 峰充<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 二井手 哲平<sup>1</sup>, 松永 淳<sup>2</sup>, 李 宣和<sup>2</sup>, 大江 知行<sup>2</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>東北大院・薬)  
mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

抗体依存性細胞傷害作用や補体依存性細胞傷害作用を有する抗体医薬品はリンパ腫などのがん種に高い治療効果を発揮するが、さらなる高機能化に向けて、抗体に低分子医薬品を化学接合させた抗体-薬物複合体(ADC)や、抗体の変異領域(Fv)のみを用いて分子量を減少させた腫瘍浸透性の高い低分子抗体が開発されている。本研究では、IgG 型抗体ではなく腫瘍浸透性の高い低分子抗体の ADC 化を目指し、低分子抗体の表面にあるリジン残基のアミノ基について化学反応特性を評価した。

抗体の Fv の重鎖と軽鎖をグリシンリッチなリンカーで繋いだ一本鎖 Fv(scFv)を設計し、大腸菌を用いて scFv が会合した二価の低分子抗体を調製した。まず、この低分子抗体と様々な混合比で N-ヒドロキスチンイミドピオチン(NHS-ピオチン)を反応させ、ピオチンの修飾率を HABA アッセイにより測定した。その結果、混合比を高くすると反応効率が向上するが、低分子抗体の安定性が減少した。そこで、安定性を向上するために界面活性剤を用いた。反応溶液を様々な界面活性剤濃度にして化学接合を行い、ピオチンの修飾率を測定したところ、界面活性剤を入れることにより反応効率が減少するが、低分子抗体の凝集が緩和された。さらに、界面活性剤が化学接合に及ぼす影響を評価するために、化学接合時の界面活性剤濃度が異なるピオチン修飾低分子抗体の優先修飾リジン残基を質量分析法により測定することで、リジン残基の同定を試みている。

#### Small antibody drug conjugate: influence of chemical reaction around lysine residues by surfactant

○Shuhei Hattori<sup>1</sup>, Takamitsu Hattori<sup>1</sup>, Hikaru Nakazawa<sup>1</sup>, Tepei Niide<sup>1</sup>, Atsushi Matsunaga<sup>2</sup>, Seon Hwa Lee<sup>2</sup>, Tomoyuki Oe<sup>2</sup>, Mitsuo Umetsu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Pharm., Tohoku Univ.)

**Key words** surfactant, antibody-drug conjugate, amine coupling

### 3P-1a063 次世代抗体医薬を目指した立体構造特異的モノクローナル抗体の作製およびその評価

○磯崎 勇志, 三浦 広己, 湊元 幹太, 富田 昌弘  
(三重大院・工)  
tomita@chem.mie-u.ac.jp

近年、分子標的治療薬として抗体医薬が注目されている。抗体医薬は、その高い特異性・親和性のため、より効果的な治療が期待できる。本研究では、標的分子として GPCR (G タンパク質共役受容体) に着目した。GPCR は様々な疾患に関与しており、GPCR に対する特異的モノクローナル抗体は、抗体医薬としての利用価値が非常に高いと考えられる。さらに、生体内で機能している全てのタンパク質は立体構造を有しており、標的分子の高次構造を認識するモノクローナル抗体の作製は、今までにはない特徴を持つと推測される。そこで、本研究において GPCR の 1 つである CRHR1 (コルチコトロピン放出ホルモン受容体 1) に対する立体構造特異的モノクローナル抗体の効率的な作製およびその評価を目的とした。

新規ハイブリドーマテクノロジーである「立体構造特異的モノクローナル抗体作製法」に基づき、CRHR1 に対する立体構造認識モノクローナル抗体を作製した。

その結果、多くのハイブリドーマの作製に成功した。ハイブリドーマ上清中の立体構造認識抗体を抗原発現 CHO 細胞を用いた Cell-ELISA 法に基づき評価したところ、陽性ハイブリドーマが確認された。そこで、限界希釈法に基づきクローン化を行ったところ、IgG タイプのモノクローナル抗体の作出に成功した。さらに、抗原発現 CHO 細胞を用いた免疫蛍光染色を行ったところ、細胞表面への特異的結合が確認された。これらの結果から、得られたモノクローナル抗体は目的抗原の立体構造を認識している可能性が極めて高いことが示された。今後、組換えバキュロウイルスを用いた抗体評価を行うと共に、CRHR1 のリガンドである CRF との競合アッセイも行う予定である。立体構造特異的モノクローナル抗体の次世代抗体医薬への応用を目指す。

#### Stereospecific monoclonal antibodies for next generation of therapeutic medicine

○Yushi Isozaki, Hiroki Miura, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita  
(Grad. Sch. Eng., Mie Univ.)

**Key words** GPCR, hybridoma technology, stereospecific antibody, therapeutic antibody

### 3P-1a064 菌体外 β グルカンを生産する *Aureobasidium pullulans* の網羅的遺伝子発現解析

○内山 博文<sup>1,4</sup>, 岡部 満康<sup>3</sup>, 道羅 英夫<sup>2</sup>, 加藤 竜也<sup>2</sup>, 朴 龍洙<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>静大・創科技院, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>アウレオ, <sup>4</sup>アウレオサイエンス)  
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】 *Aureobasidium pullulans* を液体培養すると酵母様の細胞形態となり、ある培養条件下では菌体外に水溶性の β-1,3-1,6-グルカン (β グルカン) を生産する。真菌類が普遍的に有する細胞壁 β グルカンとは異なり、この水溶性 β グルカンの β-1,6 側鎖はグルコース 1 分子から形成されているが、その生合成経路・分泌機構などは明らかにされていない。本研究では、網羅的遺伝子発現解析により水溶性 β グルカンの生合成・分泌に関わる候補分子を探索することを目的とした。

【方法】 β グルカン高生産培地 (米糠含有培地)、β グルカン低生産培地 (ポテトデキストロース培地) にて 72 h 振盪培養した菌体から total RNA を抽出し、シーケンスライブラリを調製した。MiSeq システム (illumina) を用いて得られた RNA-seq データから、各種解析を行った。

【結果と考察】 両群間の遺伝子発現量の比較において、β グルカン高生産培地で培養した菌体ではタンパク質分解酵素・トランスポーターなどの遺伝子発現レベルが亢進し、翻訳・代謝関連の遺伝子発現レベルが低下するという傾向が見られた。また、有意に発現量が亢進した遺伝子リストには細胞壁の β-1,6-グルカン合成に関わる Kre6 遺伝子が含まれていた。しかしながら、この Kre6 遺伝子を破壊した株を作製して野生株と比較したところ β グルカン産生量に変化はなく、明らかな表現型の違いは観察されなかったことから Kre6 は水溶性 β グルカンの産生には関与しないことが示唆された。現在は Kre6 ホモログである Skn1 の遺伝子及びその他の候補遺伝子の破壊株の作製を行い、得られた株の表現型を元に目的分子の同定を試みている。

#### Transcriptome analysis of extracellular β-glucan producing *Aureobasidium pullulans*

○Hirofumi Uchiyama<sup>1,4</sup>, Mitsuyasu Okabe<sup>3</sup>, Hideo Dohra<sup>2</sup>, Tatsuya Kato<sup>2</sup>, Enoch Y. Park<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Aureo Co., Ltd., <sup>4</sup>Aureo-science Co., Ltd.)

**Key words** *Aureobasidium pullulans*, beta-1, 3-glucan, transcriptome

### 3P-1a065 イオンビーム変異法による耐熱性乳酸生産系状菌の Xylose 発酵変異株の構築

○山下 聖樹<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>1</sup>, 畑下 昌範<sup>2</sup>, 星野 一宏<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山大院・理工, <sup>2</sup>若狭湾エネ研)  
 khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

近年リグノセルロースからのバイオリファイナリーによる乳酸生産が注目されている。効率の高い生産技術の一つとして同時糖化発酵 (SSF) があるが、通常のSSFはセルラーゼ剤の至適温度と比較して菌体の増殖温度が低い場合、SSFを増殖温度で行う必要がある。そのため耐熱性乳酸生産微生物が求められる。そこで、耐熱性 *Rhizopus oryzae* を乳酸生産に用いたが、40℃における Xylose 発酵能が低く、ヘミセルロース由来の Xylose を乳酸に変換しづらい。そこで本研究は、SSF によるリグノセルロースからの乳酸生産効率の向上のため、イオンビーム変異法を用いて耐熱性乳酸生産系状菌の Xylose 発酵変異株の構築を試みた。

本研究では耐熱性 *R.oryzae* NBRC5384 を用いた。変異誘導として菌株の分生子懸濁液にイオンビーム (WERC<sup>2</sup>, Carbon 2,500 Gy) を照射した。この分生子を Xylose を含む液体培地にて 40℃ で静置培養し、112 株の変異株を取得した。各変異株をそれぞれ 40℃ で振盪培養し、最も安定に乳酸生産した XM-40 株を獲得した。XM-40 を 120 g/L の Glucose で 40℃、好気振盪培養した時、120 h で 64 g/L の乳酸を生産できた (Wild: 56 g/L)。一方 50 g/L の Xylose で培養した場合、28℃ で Wild および XM-40 は乳酸を 8-13 g/L 生産できた。しかし 40℃ で行った場合、XM-40 は 120 h で 14.7 g/L 生産できた (Wild: 0.04 g/L)。この結果から、XM-40 はイオンビーム変異によって温度上昇による Xylose 代謝酵素の活性低下を抑制したと考えられる。そこで 40℃ で培養した各菌株を回収し、細胞内の Xylose reductase, Xylose dehydrogenase, Lactate dehydrogenase 活性を測定した。培養 24 h における XM-40 の酵素活性はそれぞれ Wild の 14, 101, 109 倍高い活性を示した。これらの結果からイオンビームにより構築した XM-40 は、Xylose から乳酸への代謝にかかわる酵素群が Wild よりも高発現していることが示唆された。

#### Construction of a Xylose-fermentable Mutant from Thermotolerant Lactic acid-producing Fungi by Ion-beam Irradiation

○Satoki Yamashita<sup>1</sup>, Maki Takano<sup>1</sup>, Masanori Hatashita<sup>2</sup>, Kazuhiro Hoshino<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>2</sup>WERC)

**Key words** *Rhizopus oryzae*, xylose fermentation, lactic acid, ion-beam

### 3P-1a066 亜臨界前処理したオカラの霊芝菌糸体発酵及び抽出した多糖類の評価

○官 羽, 張 振亜  
 (筑波大院・生命環境)  
 zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

#### 背景と目的

オカラとは豆腐、豆乳などの生産過程により、排出される残渣である。先行研究によると、オカラを基質とした食用キノコ及び薬用キノコの発酵技術が開発され、発酵産物に顕著な抗酸化活性も確認された。これらの研究成果から、微生物発酵法を用いることで、オカラの再資源化が可能になり、発酵産物を一般食品及び機能性食品の素材として利用する可能性もあると考えられる。そこで、オカラを亜臨界前処理することで、発酵効率の向上が可能だと考えた。本研究では、霊芝菌糸体発酵物の有効成分の一つである多糖類に着目し、抗酸化活性を評価し、亜臨界前処理をすることで、オカラの再資源化効率の向上や機能性食品素材の開発を目的とした。

#### 方法

オカラを異なる条件 (温度、維持時間、固液比) で亜臨界前処理をし、植菌した。20日、23℃の発酵を行い、発酵物から多糖類を抽出し、量を測定し、前処理をしない系との比較をした。また、抽出した多糖類の抗酸化活性も検討した。結果

170℃以下で前処理をした系の多糖類の量が前処理をしない系のより多いのがわかった。また、抽出した多糖類には抗酸化活性が持っていることが確認された。

#### Effect of sub-critical water pre-treatment of the Okara and evaluation of the extracted polysaccharides from *Ganoderma mycelia* fermentation product

○Yu Guan, Zhenya Zhang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** sub-critical water pretreatment, fermentation, polysaccharide, modification

### 3P-1a067 Polysaccharides Production from Solid-state Co-fermentation of Okara and Pretreated Corn Straw

○Yue Guan, Zhenya Zhang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
 zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

The fermentation of straw feedstock is difficult due to its lignocellulose structure, thus appropriate pretreatment of straw before fermentation is necessary. As a food processing residue, okara contains profuse nutrients like high proteins which are always neglected. In this study, these two materials were used as substrate for solid-state co-fermentation with *Ganoderma lucidum*, aiming to make full use of nutrients in the straw and okara to develop functional food materials.

[Methodology and Results] Subcritical water pretreatment was performed under different temperatures, holding time and solid-to-liquid ratio. Dried okara and pretreated corn straw were mixed in different proportions as the substrate for fermentation along with *Ganoderma lucidum*. Fermentation was carried out at 23℃ for 21 days. Polysaccharide content was quantified with phenol-sulfuric acid method. Single factor and orthogonal tests were employed in this study to optimize the pretreatment and co-fermentation conditions. The mixed substrate is more beneficial to the growth of *Ganoderma lucidum* mycelium during the fermentation process than single substrate under the same condition. Furthermore, when the pretreated corn straw was used for co-fermentation, the yield of polysaccharides was higher than the control tests without pretreatment. The highest yield of polysaccharide was obtained at pretreatment temperature of 190℃. Little growth of *Ganoderma lucidum* was observed during co-fermentation when the pretreatment temperature was above 200℃.

#### Polysaccharides Production from Solid-state Co-fermentation of Okara and Pretreated Corn Straw

○Yue Guan, Zhenya Zhang  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** subcritical water pretreatment, co-fermentation, *Ganoderma lucidum*, polysaccharide

### 3P-1a068 Effects of heating treatment and fermentation on antioxidative compound of tempe

○Dewi Kusumah<sup>1</sup>, Isamu Maeda<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., <sup>2</sup>Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)  
 kusumahdewi0402@yahoo.com

Food processing changes quality and quantity of many nutritional compounds in foods that determine food bioavailability and functionality. One of the functionality that beneficial for human health is anti oxidative effect. Tempe is a traditional fermented soybean that uses *Rhizopus* spp. as starter strains. The aim of this study is to observe the effects of heating treatment and fermentation on nutrition compound. The experiment use regular boiling process and autoclave method as treatments. Sampling was carried out at different fermentation periods after inoculating *Rhizopus microspores* var. *oligosporus*. DPPH scavenging assay, ABTS assay and Reducing power assay were used to observe antioxidant activity. The fungal biomass was measured with quantification of fungal DNA by qPCR. The results show that before fermentation, autoclaved grains possess higher antioxidant activity compared to boiled one. This antioxidant activity was kept increasing during fermentation process. During autoclaving, nutrition compounds like carbohydrate were maintained within the grains compared to boiling process. Autoclaving made the fungi grow to higher density. Simultaneously, this good fungal growth on the grains may participate on higher antioxidant activity in autoclaving grains

#### Effects of heating treatment and fermentation on antioxidative compound of tempe

○Dewi Kusumah<sup>1</sup>, Isamu Maeda<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., <sup>2</sup>Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

**Key words** fermentation, antioxidant, soybean, heating process

### 3P-1a069 糸状菌 *Aspergillus terreus* によるデンブ系バイオマスからのイタコン酸の直接生産

○清菜都実<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>2</sup>, 如下 昌範<sup>3</sup>, 星野 一宏<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工, <sup>3</sup>若狭湾エネ研)  
 khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

**[目的]** イタコン酸は米エネルギー省(DOE)が定めたバイオマスからの生産が求められる低分子化学物質の一つである。この化合物は分子中に2つのカルボキシル基を有し、化学修飾により様々な乳化重合に適用できることから、接着剤や抗菌剤の原料など化学工業から医療分野まで幅広く利用できる。*Ustilago maydis*, *Pseudozyma antarctica* および *Aspergillus terreus* がイタコン酸を生産することが知られており、中でも *A. terreus* は低 pH で増殖し、イタコン酸を生産できるという特徴を有する。そのため、バイオマス由来の雑菌に汚染されることが少なく、殺菌処理の手間が省けるという利点がある。本研究では *A. terreus* を用いてデンブ系バイオマスからの直接イタコン酸生産の可能性を検討した。**[方法・結果]** 本研究で使用したイタコン酸生産菌として *A. terreus* NBRC 6123 を使用した。培養は液体培地で好気振盪培養を 28°C で 5-8 日間行った。Glucose 50 g/L を基質とした時、培養 8 日でイタコン酸を 24.7 g/L 生産できた(収率: 68.5%)。また基質をそれぞれ 50 g/L の Maltose, Soluble starch, Corn starch として 5 日間振盪培養した結果、それぞれ 7.15, 0.67, 0.54 g/L のイタコン酸が生産できた。この結果、デンブ系バイオマスからの直接イタコン酸生産は現状では難しいことがわかった。そこで、デンブ系系加水分解酵素の分泌特性を検討した。Corn starch を基質として 5 日間培養した時の培養液中の Glucoamylase,  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glucosidase 活性はそれぞれ 1.99, 0, 0.10 U/L であった。これらの結果から本菌株は、 $\alpha$ -Amylase および  $\alpha$ -Glucosidase の分泌が低いことから、デンブ系から直接イタコン酸を生産しにくいことがわかった。そこで、デンブ系からのイタコン酸の直接生産を目指し、イオンビーム変異法による加水分解酵素高発現変異株の構築を検討している。

#### Direct Itaconic Acid Production from Starches with *Aspergillus terreus*

○Natsumi Sei<sup>1</sup>, Maki Takano<sup>2</sup>, Masanori Hatashita<sup>3</sup>, Kazuhiro Hoshino<sup>2</sup>  
 (Fac. Eng., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, <sup>3</sup>WERC)

**Key words** *Aspergillus terreus*, itaconic acid, starch, ion-beam

### 3P-1a070 二形性調節因子による酵母化 *Mucor circinelloides* の構築および好氣的 Ethanol 生産

○岩倉 遼, 高野 真希, 星野 一宏  
 (富山大院・理工)  
 khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

**[目的]** 二形性真菌は、温度や pH、血清、CO<sub>2</sub> の有無などの様々な環境の変化に応じて酵母体と糸状体に形態変化する。*Candida albicans* などは酵母体から糸状体に形態変化させ、病原性を示す。一方、本研究室で開発した接合菌 *Mucor circinelloides* 4572J は好気条件下で糸状体、完全嫌気条件下で酵母体へと形態変化する真菌であり、好気嫌気条件下で Ethanol 発酵が可能な菌株である。酵母化 4572J を用いた Ethanol 生産では菌糸が発酵槽内に絡みつく問題がなく、物質移動の改善により発酵効率の向上が期待できる。さらに、連続培養を行いながら培養液から直接 Ethanol の分離回収を行うためには好気条件下での酵母化が望ましい。そこで本研究では 4572J の二形性メカニズムを応用して好気条件下での酵母化および連続 Ethanol 生産について検討した。**[方法・結果]** 4572J を 70% N<sub>2</sub> + 30% CO<sub>2</sub> の嫌気条件下で培養し酵母体とし、4572J の酵母体を生培養に用いた。4572J は Glucose 基本培地において培養 24 時間で 50 g/L の Glucose から酵母体は 22 g/L、糸状体は 17 g/L の Ethanol を生産した。4572J における二形性変化は細胞内 cAMP 濃度や細胞膜構成成分が関係しているとされている。そこで本培養では、細胞内 cAMP の蓄積および細胞膜形成に影響を与える化合物を添加し好気条件下で培養を行い、形態の観察および Ethanol 生産の検討を行った。cAMP 分解酵素 Phosphodiesterase を阻害する Caffeic acid、細胞膜成分 Ergosterol に影響を与える Nerol を培地に添加し好気培養を行った。その結果、0.5 mM の Caffeic acid を添加したとき酵母体が多く確認でき、20 g/L の Ethanol を生産できた。Nerol は 5  $\mu$ M で酵母体が多く確認できた 25 g/L の Ethanol を生産できた。cAMP や細胞膜形成に関与する試薬を添加することによって、好気条件下で酵母化できた。現在、好気条件下における連続 Ethanol 生産を検討中である。

#### Construction of Yeast-like *Mucor circinelloides* by Using Dimorphism Regulators and Its Aerobic Ethanol Production

○Ryo Iwakura, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino  
 (Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** *Mucor circinelloides*, dimorphism, ethanol production

### 3P-1a071 海洋性 *A.thiooxidans* SH 株の末端酸化酵素の解析

○上村 一雄, 吉野 永里子, 金尾 忠芳  
 (岡山大院・環境生命)  
 kamimura@okayama-u.ac.jp

**[背景と目的]** *A.thiooxidans* SH 株は、当研究室が単離した最適増殖 pH が 4.0、2.0% の NaCl 存在下で最適な増殖を示す好酸性好塩性の硫黄酸化細菌である。本菌は、塩含有環境下でのバクテリアリーチングに利用できるが、その効率を向上させるために、硫黄代謝機構の解明は欠かすことが出来ない。また、好酸性 NaCl 要求性の硫黄酸化細菌の硫黄の酸化経路はほとんど解明されておらず、その機構の解明は、応用面に反映できるのみならず、地球レベルでの硫黄のサイクルに関して重要な知見をもたらすことが期待される。本菌は、チオ硫酸の酸化にチオ硫酸デヒドロゲナーゼを用いる。酵素はキノンを電子受容体に用いることを明らかにされている。還元されたキノンの酸化機構を明らかにするため、本研究では、チオ硫酸増殖細胞の末端酸化酵素の性質を明らかにすることにした。

**[方法]** チオ硫酸生育細胞から膜画分を調製し、界面活性剤 (n-ドデシル- $\beta$ -D-マルトピラノシド) を用いて膜タンパク質を可溶化した。TMPD 酸化活性測定によって、末端酸化酵素である、cytochrome c oxidase もしくは、ubiquinol oxidase の活性を検出し、陰イオン交換カラム、疎水カラム、ハイドロキシアパタイトカラムに供し末端酵素の精製を試みた。最終標品を用いて、酵素の性質検討を行った。

**[結果考察]** 最終標品の TMPD の酸化活性の反応最適 pH は 7.5 で、反応最適温度は 40°C であった。酵素は、膜画分から 13.2 倍に精製され、最終標品の SDS-PAGE 解析の結果、51.8、41.1、30.1kDa のタンパク質が主要な成分として含まれていた。スペクトル解析により、527、560、607 nm のピークが確認され、最終標品はユビキノ (Q2) を電子受容体とすることが明らかになったため、*ba<sub>3</sub>* タイプの ubiquinol oxidase である可能性が示唆された。

#### Analysis of a terminal oxidase in the marine sulfur-oxidizing bacterium *A. thiooxidans* SH

○Kazuo Kamimura, Eriko Yoshino, Tadayoshi Kanao  
 (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

**Key words** marine, *Acidithiobacillus thiooxidans*, thiosulfate dehydrogenase, ubiquinol oxidase

### 3P-1a072 自然界からのアラキドン酸含有脂質蓄積緑藻株のスクリーニング

○加藤 康夫<sup>1</sup>, 木野 貴仁<sup>1</sup>, 米田 有紗<sup>1</sup>, 野村 泰治<sup>1</sup>, 荻田 信二郎<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>富山県大・生工研セ, <sup>2</sup>県大広島・生命科学)  
 ykato@pu-toyama.ac.jp

**[目的]** 高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の一種であるアラキドン酸 (ARA) は、様々な生理機能を有するプロスタグランジン等の生合成前駆体となるだけでなく、乳児や高齢者の脳の発達に不可欠である等、その機能が注目されている。本研究では、自然界から広く緑藻を単離し、各種栄養条件下にて培養後、ARA 含有脂質を蓄積する株を選抜した。

**[方法及び結果]** 富山県内外の湖沼水、地面、植物体表面等よりサンプリングを行い (延べ 150ヶ所)、抗細菌物質を添加した無機塩のみからなる固体 C 培地上で緑藻株を単離した。得られた緑藻約 500 株を各々、Glucose、Glycerol 添加及び無添加の固体 C 培地上、明・暗の計 6 条件下にて培養し、生育特性を観察することで栄養要求性の検討を行った。このようにして培養した緑藻株中への ARA 含有脂質の蓄積を確認するため、加メタノール分解により構成脂肪酸をメチルエステル (FAME) 化し、以後の分析に供した。まず 1 次スクリーニングとして、FAME を二重結合数 0-2 及び 3 以上で分離する簡易 TLC 分析を行い、後者を主に与える緑藻を 263 株選抜した。次に 2 次スクリーニングとして、Ag イオンをコートしたシリカゲル TLC により FAME を二重結合数で詳細に分離分析し、ARA メチルエステルと移動度が一致するものを与える 71 株を選抜した。3 次スクリーニングとして、FAME をキャピラリーガスクロマトグラフィー分析に供し、ARA 含有脂質を蓄積する目的株 20 株を選抜した。このうち最も高含量に ARA を蓄積する数株について、単位培養液及び藻体あたりに ARA 含有脂質を最も良く蓄積する培養条件の検討を行った。

#### Screening of green algal strains accumulating arachidonic acid-containing lipids.

○Yasuo Kato<sup>1</sup>, Takahito Kino<sup>1</sup>, Arisa Yoneda<sup>1</sup>, Taiji Nomura<sup>1</sup>, Shinjiro Ogita<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

**Key words** arachidonic acid, green algae, fermentation, lipid

### 3P-1a073 好熱性新菌種 *Bacillus hisashii* N11<sup>T</sup> 株の経口給与がマウスに及ぼす抗肥満効果

○岩田 菖子<sup>1</sup>, 須田 互<sup>2,3</sup>, 福田 真嗣<sup>4</sup>, 大野 博司<sup>4</sup>, 服部 正平<sup>2,5</sup>, 尾玉 浩明<sup>1</sup>, 宮本 浩邦<sup>1,3,6</sup>  
(<sup>1</sup>千葉大院・融合,<sup>2</sup>東京大院・新領域,<sup>3</sup>慶應大・医,<sup>4</sup>理研・IMS,<sup>5</sup>早大・先進理工,<sup>6</sup>サーマス)  
h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp

【背景・目的】当研究室は、家畜生産性の向上作用を持つ高温発酵産物中から機能性候補微生物として好熱性の新菌種 *Bacillus hisashii* N11<sup>T</sup> 株 (国際寄託番号 NITE BP-863) を見出すことに成功し、低濃度の *B. hisashii* をマウスや豚に経口投与した場合には、成長促進効果を確認している。そこで本研究では、*B. hisashii* の動物に対する作用機序の解明を目的に、本菌のマウスに与える影響を詳細に解析した。【方法】2系統のマウス (C57BL/6, BALB/c) に対して馴化処理後、高濃度 *B. hisashii* 飲水給与群 (107 cfu/ml)、並びに非給与群を設定し、高脂肪食条件下にて35日間飼育した。血液成分、肝臓における代謝物、糞中の細菌叢を解析した。【結果】低濃度 *B. hisashii* 給与試験の結果とは異なり、高濃度給与群では非給与群よりも体重増加率が低く推移する傾向にあった。CTによる腹部断面の画像解析を行った結果、給与群では非給与群よりも脂肪積算値が有意に減少するとともに、血清グルコースやトリグリセリド濃度が減少し、逆にアディポネクチン濃度は増加していた。CE-TOFMSにより肝臓中の代謝産物のメタボロム解析を行った結果、給与群では解糖系の抑制傾向が確認された。さらに、盲腸内容物と排泄糞中の細菌叢をNGSにより解析した結果、給与群では非給与群よりも Firmicutes 門の割合が低く、逆に Bacteroidetes 門の割合が高いことが確認された。これらの傾向は、C57BL/6 よりも BALB/c において顕著であった。以上の結果から、高濃度の *B. hisashii* 経口給与は、肥満制御に関与する腸内細菌叢と血液成分の変化を伴って肥満抑制傾向を強めるが、その傾向はマウスの系統依存的に異なることが示唆された。

#### Anti-obesity effects of oral administration of *Bacillus hisashii* N11<sup>T</sup> on the mouse

○Shoko Iwata<sup>1</sup>, Wataru Suda<sup>2,3</sup>, Shinji Fukuda<sup>4</sup>, Hiroshi Ohno<sup>4</sup>, Masahira Hattori<sup>2,5</sup>, Hiroaki Kodama<sup>1</sup>, Hirokuni Miyamoto<sup>1,3,6</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Fro. Sci., Tokyo Univ., <sup>3</sup>Fac. Med., Keio Univ., <sup>4</sup>RIKEN IMS, <sup>5</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>6</sup>Sermas ltd.)

**Key words** *Bacillus* sp., thermophile, mouse, gut microbiota

### 3P-1a074 発酵食品からのデンブンプ質性乳酸菌の分離と諸性質の検討

○山本 脩幾  
(立命館大院・生命科学)  
wakayama@sk.ritsumeikai.ac.jp

古来より日本の各地において、醤油、味噌、酒などの醸造食品や、すぐき、しば漬けなどの漬物をはじめとした多くの発酵食品が作られてきた。このような発酵食品には多様な種類の乳酸菌が存在し、風味の形成や保存性の向上に寄与してきた。乳酸菌のなかには多糖類であるデンブンプを分解・利用できるデンブンプ質性乳酸菌が存在しており、そのような乳酸菌は食品に利用がされているものもあり、多くの有用な機能が報告されている。そこで、本研究では米やジャガイモなどのデンブンプを原料とした、発酵食品や、乳酸飲料などの開発を目的として発酵食品から分離したデンブンプ質性乳酸菌の諸性質を検討した。発酵食品や生野菜より、改変 MRS 培地に単離した菌のうち液体培地に培養し、 $\alpha$ -アミラーゼの活性測定、乳酸定量をおこない、その中から活性、乳酸生産量が高い3菌株について16S rRNA シーケンス解析により同定した。その結果、最も活性の高い2菌株は *Lactococcus* 属の一種であることが明らかとなった。そこで、以上の2菌株をそれぞれ *Lactococcus lactis* subsp. S.Y.I, *Lactococcus lactis* subsp. S.Y.II と命名した。前者の  $\alpha$ -アミラーゼは55℃、pH 7.0 付近で、最も高い活性を示した。

#### Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from fermented foods

○Shuuki Yamamoto  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** fermentation, amylolytic lactic acid bacteria

### 3P-1a075 糸状菌 *Aspergillus niger* 有機酸輸送体遺伝子破壊株によるシュウ酸生産

○吉岡 育哲, 上田 由佳, 小林 慶一, 桐村 光太郎  
(早大・先進理工・応化)  
kkohtaro@waseda.jp

【目的】クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* は pH 5.5 以上、とくにアルカリ性や高濃度のリン酸存在下などの培養条件下でシュウ酸を生産する。シュウ酸はサイトゾルで oxaloacetate hydrolase (EC 3.7.1.1) がオキサロ酢酸に作用することで生成し、当該酵素遺伝子高発現株ではシュウ酸生産量が增大した [1]。一方、当研究室では *A. niger* におけるミトコンドリア局在型有機酸輸送体をコードする2種の遺伝子 (*ctpA* と *cocA*) に関する破壊株を作製し [2,3]、とくに *cocA* 破壊株ではクエン酸生産量が減少することを見出している [3]。本研究では、2種の遺伝子破壊株を用いたシュウ酸生産試験を行い、有機酸輸送体遺伝子破壊の影響について検討した。

【方法および結果】*A. niger* WU-2223L は、当該培養条件下では12日間の培養で30 g/Lのグルコースを炭素源とする OA 培地で24 g/Lのシュウ酸を生産した。一方、*ctpA* 破壊株 DCTPA-1 は22 g/L、*cocA* 破壊株はクエン酸生産条件下で COCA-1 は25 g/Lのシュウ酸を生産し、最終的な生産量はほぼ同じであった。DCTPA-1 はクエン酸生産条件下と同様にシュウ酸生産条件下に培養初期の生育およびシュウ酸生産の遅延が生じたが、最終的な生産量は親株とほぼ同等であった。また、DCOCA-1 では親株に比べクエン酸生産量が減少する一方で、シュウ酸生産量は親株と同等であった。以上より、シュウ酸生産ではミトコンドリア局在型有機酸輸送体 *CTPA* や *COCA* の関与は少なく、とくにクエン酸生産とシュウ酸生産ではミトコンドリア局在型有機酸輸送体 *COCA* の役割が異なることが示唆された。

[1] K. Kobayashi, et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 41, 749-756 (2014).

[2] K. Kirimura, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, in press (2016).

[3] 小林慶一, 他, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 講演番号 4F120 (2016).

#### Production of oxalic acid by organic acid transporter gene disruptants in *Aspergillus niger*

○Isato Yoshioka, Yuka Ueda, Keiichi Kobayashi, Kohtaro Kirimura  
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** *Aspergillus niger*, citric acid, organic acid transporter, oxalic acid

### 3P-1a076 デンブンプからの直接乳酸生産に資する麹菌でのビルビン酸代謝関連酵素の欠損

○笹倉 直也<sup>1</sup>, 若井 暁<sup>2</sup>, 浅井 菜々実<sup>2</sup>, 堤 浩子<sup>3</sup>, 秦 洋二<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工,<sup>2</sup>神戸大院・イノベ,<sup>3</sup>月桂冠・総研)  
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

本研究の目的は、麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたデンブンプからの L-乳酸の高効率生産を目的とした代謝改変の影響を調べることであり、乳酸は、従来の石油系プラスチックの代替品として注目されるバイオプラスチックの原料となる物質で、植物バイオマスから微生物変換による生産が可能である。これまでに、栄養要求性麹菌 *A. oryzae* NSPID1 株に牛由来の lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子を導入し、デンブンプから約 30 g/L の L-乳酸を生産することに成功している。しかしながら、その変換効率は30%と悪く、乳酸生産の基質であるビルビン酸がエタノール生産や TCA 回路に使われていると考えられた。本研究では L-乳酸生産の競合経路の遺伝子破壊による代謝改変を試み、乳酸の生産量等を検討した。

LDH 導入株では、L-乳酸の生産だけでなく、副産物として約 10 g/L のエタノール生産が確認された。そこで、エタノール生産を無くす目的で、エタノール生合成経路上のビルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) をコードする遺伝子を破壊した株 (PDC 破壊株) を構築した。PDC 破壊株は、エタノール生産が抑制され、乳酸生産量が 40 g/L に改善された。これと並行して、ビルビン酸をオキサロ酢酸に変換して、TCA 回路を効率的に回すために必要なビルビン酸デカルボキシラーゼ (PYC) をコードする遺伝子を破壊した株 (PYC 破壊株) も構築した。PYC 破壊株においても、約 40 g/L の乳酸生産が確認された。また、PYC 破壊株ではエタノール生産能が残存しており、実際にエタノール生産が確認された。そこで、PDC および PYC 二重破壊株を構築し、乳酸生産量の変化を評価したが、二重破壊株では生育に悪影響が出て、乳酸生産能も向上しなかった。PYC 破壊株においても TCA 回路上の有機酸の蓄積が観察されたことから、現在、TCA 回路に対する流出の改善を進めている。

#### L-lactate production from starch by pyruvate metabolism-engineered *Aspergillus oryzae*

○Naoya Sasakura<sup>1</sup>, Satoshi Wakai<sup>2</sup>, Nanami Asai<sup>2</sup>, Hiroko Tsutsumi<sup>3</sup>, Youji Hata<sup>3</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., <sup>3</sup>Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, L-lactic acid, metabolic engineering, starch

### 3P-1a077 三種セルラーゼ共・強発現麹菌によるセルロースからのコウジ酸生産

○若井 暁<sup>1</sup>, 浅井 菜々実<sup>1</sup>, 荻野 千秋<sup>2</sup>, 堤 浩子<sup>3</sup>, 秦 洋二<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・イノベ, <sup>2</sup>神戸大院・工, <sup>3</sup>月桂冠・総研)

wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、1000 年以上発酵食品分野で活躍してきた微生物である。また、*A. oryzae* は酵素生産性に優れ、商業用酵素の生産ホスト株としても産業応用されている。加えて、近年、遺伝子組換え麹菌により、様々な物質生産が行われている。我々は、この高い酵素生産性を利用して、非過食バイオマスからの物質生産を可能とする麹菌の開発を進めている。

麹菌は、co-transformation により複数の遺伝子をマルチコピーで同時に導入することが可能である。我々は、この co-transformation 時の導入遺伝子断片末端配列に依存して導入遺伝子コピー数に多形が出ることを明らかにした。この多形性とプロモーター強度を加味することで、三種セルラーゼの発現バランスをアレンジしたセルラーゼ発現麹菌を構築した。その後、コウジ酸の生産能を上げることが知られている *kjR* 遺伝子を高発現用プロモーターと共に導入した株を構築した。

構築した遺伝子組換え麹菌をペプトン抜き培地 (3% [w/v] グルコース, 0.5% [w/v] 酵母エキス, 2 g/L KCl, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) で前培養し、10% (w/v) グルコース入りペプトン抜き培地、結晶性セルロースである Avicel を炭素源としたペプトン抜き培地、および、グルコースも Avicel も添加していないペプトン抜き培地で培養した。グルコースあるいは Avicel を炭素源とした培地において、コウジ酸生産が確認できた。一方で、グルコースも Avicel も添加していない培地では、コウジ酸の生産が確認できなかった。したがって、Avicel を炭素源とした培地でのコウジ酸生産は、前培養のグルコースキャリアオーバーではなく、Avicel 分解によるものである。

今回構築した株のセルロースからのコウジ酸生産量は既報の約 10 倍であり、セルロース分解能の改善がコウジ酸生産量の改善につながった。

#### Direct production of kojic acid from cellulose by three cellulases-coexpressing *Aspergillus oryzae*

○Satoshi Wakai<sup>1</sup>, Nanami Asai-Nakashima<sup>1</sup>, Chiaki Ogino<sup>2</sup>, Hiroko Tsutsumi<sup>3</sup>, Yoji Hata<sup>3</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., <sup>3</sup>Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, cellulase, cellulose, kojic acid

### 3P-1a078 アーキアを利用した炭水素生産

○佐藤 喬章<sup>1,3</sup>, 福家 翼<sup>1</sup>, Jha Savyasachee<sup>1</sup>, Tansengco Myra<sup>2</sup>, 跡見 晴幸<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>京大院・工, <sup>2</sup>Dept. Sci. & Technol., ITDI, <sup>3</sup>JST・CREST)

takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】アーキアは真核生物や細菌とは異なる第三のドメインを構成するが、その大きな特徴の一つに膜脂質の構造が挙げられる。アーキアの細胞膜脂質は他のドメインの生物とは異なりイソプレノイド型の疎水性部位を有しており、その基本構造は squalene や phytoene などの炭水素と類似している。そこで本研究ではアーキアが有するイソプレノイド合成経路を利用した squalene や squalene 炭炭化水素である phytoene の合成を目指した。

【実験・結果】宿主としては、全ゲノム解析が完了しており、遺伝子破壊・導入系が確立されている超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用いた。ゲノム解析および既知の膜脂質合成経路から、本菌における膜脂質合成の中間生成物には、炭素数 15 の farnesyl pyrophosphate (FPP) および炭素数 20 の geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) が含まれると考えられた。一方、squalene synthase (SS) の酵素反応により 2 分子の FPP が縮合し炭素数 30 の炭水素 squalene が合成される。同様に、phytoene synthase (PS) により 2 分子の GGPP から炭素数 40 の phytoene が合成される。しかし *T. kodakarensis* のゲノム上には SS および PS をコードする遺伝子は見つかっていないため、これらの炭水素は生合成していないと考えられた。そこで遺伝子導入技術によって他生物由来の phytoene/squalene synthase を導入することで、phytoene を産生する *T. kodakarensis* を創出することができた。

#### Hydrocarbon production with engineered Archaea

○Takaaki Sato<sup>1,3</sup>, Tsubasa Fuke<sup>1</sup>, Savyasachee Jha<sup>1</sup>, Myra Tansengco<sup>2</sup>, Haruyuki Atomi<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Dept. Sci. & Technol., ITDI, <sup>3</sup>CREST, JST)

**Key words** hydrocarbon, archaea, metabolic engineering

### 3P-1a079 二相培養法によるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の脂肪酸生産性の向上

○加藤 明宏<sup>1</sup>, 高谷 信之<sup>2</sup>, 瀬瀬 和秀<sup>1</sup>, 前田 真一<sup>1,2</sup>, 小俣 達男<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>名大院・生命農学, <sup>2</sup>JST CREST)

omata@agr.nagoya-u.ac.jp

<背景と目的>

光合成微生物を利用したバイオ燃料生産が近年注目されており、その中でもラン藻は生産した遊離脂肪酸 (FFA) を細胞外へと放出するため、物質生産の有用なホストとして期待されている。しかし我々が作製した *Synechococcus elongatus* PCC7942 の脂肪酸生産株は、FFA の細胞外への放出速度が生産速度に追いつかず、生産された FFA の 85% が細胞内に蓄積することでクロロフィルや光合成活性が消失して死滅した。これは FFA の生産性を低下させる重大な問題である。そこで本研究では、FFA の放出速度を向上させるための方策を探求した。

<結果>

FFA の放出を妨げている原因を調べると、細胞から培地への FFA の受動拡散が培地中の FFA によって阻害されることが示唆された。そこで培地に蓄積した FFA を培養中に取り除くために、有機溶媒を用いた二相培養法を構築した。PCC7942 の野生株は、デカン、ウンデカンといったアルカンやリン酸トリブチルを添加した場合には生育できずに死滅したが、ミリスチン酸イソプロピルを添加した場合には通常の培地と同程度に生育した。そこでミリスチン酸イソプロピルを使用して脂肪酸生産株を二相培養すると、コントロール条件と比べてクロロフィルや光合成活性の低下が緩和されただけでなく、細胞外への FFA の放出量と放出速度も増加して 0.5 g L<sup>-1</sup> と 3 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> に到達した。この FFA の生産性は、先行研究において他のモデルラン藻である *Synechocystis* sp. PCC6803 や *Synechococcus* sp. PCC7002 で報告されているものと比べても数倍高い値である。このことから、二相培養によって FFA の放出を促進することが、*S. elongatus* の FFA 生産性の向上に効果的であることが示された。

#### Two phase culture system improves the free fatty acid production using genetically engineered *Synechococcus elongatus* PCC7942

○Akihiro Kato<sup>1</sup>, Nobuyuki Takatani<sup>1,2</sup>, Kazuhide Use<sup>1</sup>, Shin-ichi Maeda<sup>1,2</sup>, Tatsuo Omata<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>JST CREST)

**Key words** cyanobacteria, fatty acid, biofuel

### 3P-1a080 藍藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 代謝改変株の増殖特性と光合成特性

○林原 加代子<sup>1</sup>, 広川 安孝<sup>2</sup>, 花井 泰三<sup>2</sup>, 村上 明男<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>2</sup>九大院・農)

kayoko\_h@people.kobe-u.ac.jp

近年、藍藻などの光独立栄養微生物を活用した各種有用アルコールの生産のため、合成代謝経路を構築した代謝改変株の作製が盛んに進められている。しかし、藍藻によるアルコールの生産量は、大腸菌などの従属栄養微生物に比べまだ低くとどまっており、何らかの改善が必要である。加えて、藍藻が本来持たない代謝経路を構築するための遺伝子導入は、光合成エネルギー変換系やその環境応答能などにも何らかの影響を与えるため、これらの基礎特性を明らかにすることは藍藻によるアルコール生産の最適化において重要である。我々はイソプロパノールや 1-ブタノール等の生産量の増強を目指し、藍藻のグリコーゲン合成遺伝子破壊株などの代謝改変株を作製している。本発表では、これらの代謝改変が光合成エネルギー変換系や光合成活性の各種パラメータへ与える影響について議論したい。

本研究は JST-CREST (藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創生のための基盤技術の創出) の支援を受け行った。

#### Photo-physiological characterization of metabolically engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942

○Kayoko Hayashihara<sup>1</sup>, Yasutaka Hirokawa<sup>2</sup>, Taizo Hanai<sup>2</sup>, Akio Murakami<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** cyanobacteria, photosynthetic bacteria, metabolic engineering

### 3P-1a081 *Euglena gracilis* における一次代謝産物の変化

○富田 結美子, 吉岡 和政, 小山内 崇  
(明治大・農)  
tosana@meiji.ac.jp

*Euglena gracilis*(*E. gracilis*)は真核微細藻類であり、光合成によって空気中の CO<sub>2</sub> と光と水さえあれば光独立栄養的に生育することができるが、酢酸やグルコースなどを単一炭素源として従属栄養的にも生育することもできる。

また *E. gracilis* は中性から酸性まで幅広い pH 環境下や高 CO<sub>2</sub> 濃度下など、他の水中生物が生育できないような環境下でも培養可能である。このような利点を利用してコンタミネーションなどの点から屋外での大量培養が難しいとされている藻類の中でも *Euglena* は大量培養が実用化している数少ない微細藻類の一つである。*E. gracilis* 藻体や抽出物は、健康食品や化粧品として商品化もされ、今後ジェット燃料への応用展開も期待されている。モデル藻類であるラン藻 *Synechocystis* や緑藻 *Chlamydomonas* などと比べ、*E. gracilis* の代謝解析の例は非常に少ない。

そこで本研究では *E. gracilis* NIES-48 株を用いて、培養温度、光の強さ、酸素濃度、外部炭素源などの培養条件を変化させ、細胞の代謝産物解析を行った。これらの培養条件変化によって炭素の一次代謝産物に変化する可能性が得られた。

#### Change in primary metabolite in *Euglena gracilis*

○Yuko Tomita, Kazumasa Yoshioka, Takashi Osanai  
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

**Key words** metabolic engineering, biomass

### 3P-1a082 プロモーター変更による合成代謝経路導入シアノバクテリアの 1,3-propanediol 生産性向上

○広川 安孝<sup>1,2</sup>, 牧 佑紀<sup>1,2</sup>, 花井 泰三<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>JST・CREST)  
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】異種生物由来の複数の遺伝子から構成される合成代謝経路をシアノバクテリアに導入することで、二酸化炭素からの様々な化合物の合成が可能である。これまでに *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に、炭酸固定経路であるカルビン回路中の Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) を出発物質とし、4段階の反応から構成される 1,3-Propanediol (1,3-PDO) 生産経路を導入することで二酸化炭素からの 1,3-PDO 生産に成功している (2014 年度本会にて報告)。しかし、合成代謝経路での中間代謝産物である Glycerol が顕著に蓄積しており、本研究では経路の一部改変を行うことで 1,3-PDO 生産量の向上を試みた。

【方法・結果】1,3-PDO 生産経路は、IPTG 誘導型プロモーターである PLlacO1 で制御した DHAP から Glycerol、Glycerol から 1,3-PDO に関わる酵素遺伝子群を分割してゲノム上に導入することで構築した。Luciferase をレポーターとして用いたプロモーターアッセイの結果、Ptrc の転写強度は PLlacO1 と比較して約 100 倍の転写活性を示すことが確認された。Glycerol の蓄積を解消するために、Glycerol から 1,3-PDO への変換に関わる酵素遺伝子群の制御プロモーターを Ptrc へと変更した。新たに構築した生産株は IPTG 濃度依存的な生育悪化を示すようになったが、IPTG の添加タイミングを検討することで生育悪化を回避し、1,3-PDO 生産量を向上させることに成功した (3.25→10.42 mM)。また、1,3-PDO 生産が増殖連動型の挙動を示すことに着目し、培地組成の検討を行なったところ、最大生産量は 16.05 mM (1.22 g/L) まで向上した。

#### Cyanobacterial 1,3-propanediol production improved by promoter change in synthetic metabolic pathway

○Yasutaka Hirokawa<sup>1,2</sup>, Yuki Maki<sup>1,2</sup>, Taizo Hanai<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>JST・CREST)

**Key words** cyanobacteria, 1,3-propanediol, synthetic metabolic pathway

### 3P-1a083 合成代謝経路を導入した *Synechocystis* sp. PCC 6803 による isopropanol 生産

○山下 泰一, 広川 安孝, 花井 泰三  
(九大院・農)  
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】光合成生物であるシアノバクテリアに異種生物由来の遺伝子からなる合成代謝経路を導入することで、空気中の CO<sub>2</sub> から直接的な物質生産ができる。当研究室ではプラスチックの原料となる isopropanol (以下 IPA) をターゲットとして、シアノバクテリアの一種である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下 7942) を用いた IPA 生産に成功している。この際、7942 に、Acetyl-CoA を基点とする IPA 生産経路 (以下 IPA 経路)、および IPA 経路で必要な酢酸の生産に関わる酵素 phosphate acetyltransferase をコードする遺伝子 *pta* を導入した 7942-IPA 株を構築し、密栓フラスコによる振とう培養で 0.55 mM の IPA 生産が行われている (2015 年度本会にて報告)。一方、7942 とは別種のシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 6803) は、7942 より細胞内 Acetyl-CoA 量が 6.7 倍多いと報告されており、IPA 生産に有利であると考えられた。そこで本研究では IPA 経路および *pta* を 6803 に導入し、6803 での IPA 生産を行う。

【結果・考察】まず、6803 に *pta* を導入した 6803-*pta* 株を構築した。6803-*pta* 株は、7942 で *pta* を導入した株よりも多い、14 mM の酢酸を生産した。酢酸は Acetyl-CoA を基点として生産されるので、同様に Acetyl-CoA を基点とする IPA 生産においても 6803 ではその生産量が増加すると期待された。そこで、6803-*pta* 株に IPA 経路を追加導入した 6803-IPA 株を構築し、密栓フラスコでの振とう培養を行った。6803-IPA 株は 19 日間の培養で IPA 0.79 mM、酢酸 15 mM を生産し、7942-IPA 株と比べ IPA 生産量が 1.4 倍となった。その一方で、酢酸生産量が IPA 生産量に比べて著しく多かったため、現在は、IPA 経路を制御するプロモーターを変更するなどして IPA 経路を強化し、IPA 生産量を増加させることを試みている。

1) Dempo *et al.* Metabolites, 4(2), 499-516. (2014)

#### Isopropanol production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 with synthetic metabolic pathway

○Taiichi Yamashita, Yasutaka Hirokawa, Taizo Hanai  
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** *synechocystis* sp. PCC 6803, synthetic biology, isopropanol

### 3P-1a084 桔梗抽出液により白色脂肪細胞から誘導したベージュ脂肪細胞の特性

○塩見 尚史, 伊藤 茉莉絵, 渡邊 桂子  
(神戸女学院大・人間科学)  
n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp

【目的】ベージュ脂肪細胞 (beige adipocytes) は、褐色脂肪細胞と類似の細胞として見いだされ、肥満や糖尿病を改善する働きが期待されている。ベージュ脂肪細胞は白色脂肪細胞から分化すると考えられているが、詳細はほとんどわかっていない。そこで、本研究では、白色脂肪細胞が本当にベージュ脂肪細胞に分化するかを確認すること、および分化したベージュ脂肪細胞の性質を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】細胞はマウス白色脂肪細胞 3T3-L24 を用い、桔梗抽出液 (20mg/mL) を培地に 3.3μL/mL 添加して分化を誘導した。ミトコンドリアの量と活性は Molt Verw Green と WST-1 を用いて測定し、タンパク質発現量は、蛍光顕微鏡と FACS により調べた。また、糖の取り込み速度は、Glucose Uptake Cell Based Assay により測定し、遺伝子発現はリアルタイム PCR により測定した。

【結果】マウス白色脂肪細胞 3T3-L24 をベージュ脂肪細胞に変化させる誘導物質を、PRDM16 及び UCP1 遺伝子の発現を指標として、防風通聖散の 16 成分から探した。その結果、桔梗抽出液に誘導活性が見られた。桔梗抽出液の誘導で得られた細胞 3T3-BA1 は、褐色脂肪細胞に特徴的な遺伝子の発現が増加していた。さらに、3T3-L24 よりも褐色がかっており、ミトコンドリアが増加し、UCP1 タンパク質を発現していた。このことから、3T3-BA1 は、ベージュ脂肪細胞であると考えられた。さらに、得られたベージュ脂肪細胞 3T3-BA1 の性質を調べた。その結果、3T3-BA1 は、白色脂肪細胞 3T3-L24 よりも、脂肪合成及び脂肪代謝能力が高かった。さらに、3T3-BA1 は、糖の取り込みを行う GLUT4 の発現が増加し、インスリン依存の糖取り込み速度も増加した。このことから、ベージュ脂肪細胞 3T3-BA1 は、高機能の脂肪細胞であり、桔梗抽出液には脂肪を燃焼しやすい体質に変える効果があることが明らかとなった。

#### Characteristics of beige adipocytes induced from white adipocytes by Kikyō extract

○Naofumi Shiomi, Marie Ito, Keiko Watanabe  
(Dept. Hum. Sci., Kobe Coll.)

**Key words** beige adipocytes, UCP1, Insulin resistance, Obesity

### 3P-1a085 Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxy-2-Methylbutyrate)の生合成

○中崎 瞳, 古館 祥, 廣江 綾香, 柘植 丈治  
(東工大院・総理工)  
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

#### 【背景・目的】

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は安価な再生可能資源から作ることができるため、石油系ポリマーの代替材料として幅広い用途への展開が期待されている。用途拡大に向けて課題の一つとなっているのが PHA の緩慢な結晶化挙動である。当研究室では 3-hydroxy-2-methylbutyrate (3H2MB)を含む PHA 共重合体が比較的速い結晶化速度を示すことを明らかにした。そこで、3H2MB の重合において基質特性の広い *Aeromonas caviae* 由来の PHA 重合酵素(PhaC<sub>Ac</sub>)に着目した。本研究では PhaC<sub>Ac</sub> の作用により、一般的な PHA の成分である 3-hydroxybutyrate (3HB)とともに 3H2MB を共重合体化した P(3HB-co-3H2MB)の生合成を試み、その物性を測定した。

#### 【実験】

大腸菌に PhaC<sub>Ac</sub> と PhaC<sub>Ac</sub>(NSDG)、エノイル CoA ヒドラーゼ PhaJ<sub>Ac</sub>、PHA 顆粒結合タンパク質 PhaP<sub>Ac</sub>、PhaP<sub>Ac</sub>(D4N)、3HB 供給のために *Ralstonia eutropha* 由来の PhaA<sub>Ac</sub> および PhaB<sub>Ac</sub> を導入した菌株を作製した。これらを培養し、菌体内にポリマーを蓄積させた。得られたポリマー組成をガスクロマトグラフィー(GC)により測定した。

#### 【結果・考察】

PhaC<sub>Ac</sub> を導入した菌株でポリマーへの 3H2MB の取り込みが確認された。変異を加えた PhaP<sub>Ac</sub>(D4N)と PhaC<sub>Ac</sub>(NSDG)を導入した菌株で 3H2MB 分率の向上が見られた。大腸菌に PhaP<sub>Ac</sub>(D4N)、PhaC<sub>Ac</sub>(NSDG)、PhaJ<sub>Ac</sub> を導入したところ、93.5mol%の 3H2MB からなるポリマーが得られた。菌株に PhaA<sub>Ac</sub> および PhaB<sub>Ac</sub> を導入すると 3H2MB 分率は低下したがポリマーの収量が改善された。P(3HB-co-3H2MB)の融点、冷結晶化温度を測定したところ、冷結晶化温度と融点の差が縮まる傾向が見られた。融点と冷結晶化温度の差は結晶化傾向の指標として用いられており、P(3HB-co-3H2MB)が結晶化しやすいことが示唆された。現在、3H2MB 重合能に優れた PhaC<sub>Ac</sub> 変異体の取得を試みており、その結果もあわせて報告したい。

### Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxy-2-Methylbutyrate)

○Hitomi Nakazaki, Sho Furutate, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge  
(Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

**Key words** *Aeromonas caviae*, polyhydroxyalkanoate, fatty acid metabolism, 3-hydroxy-2-methylbutyrate

### 3P-1a086 *Clostridium perfringens* の毒素発現を制御する内在性クオラムケエンチングの実態解明

○安達 桂香<sup>1</sup>, Ravindra Pal Singh<sup>1</sup>, 大谷 郁<sup>2</sup>, 園元 謙二<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>ミヤリサン製薬)  
nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景】微生物は同種または異種間でクオラムセンシング(QS)と称される菌密度依存的コミュニケーションをして、毒素生産など特定の遺伝子発現を調節する。例えば、ウエルシ菌 *Clostridium perfringens* の複数の病原性遺伝子の発現も VirSR 二成分制御系を介する QS により制御されている。ところが、QS 制御下にある溶血毒素遺伝子 *pfoA* の発現は一過的であり、本菌は自身の QS を下方制御する内在性クオラムケエンチング(QQ)機構を有していると考えられた。そこで、QQ 誘導物質の諸性質や QQ 誘導条件を解析することで、本菌の内在性 QQ 機構の実態解明を目指した。

【方法・結果】*C. perfringens* strain 13 の定常期馴化培養液を対数増殖期初期の菌体に添加し、37°C で 15 分間インキュベーションした結果、*pfoA* 発現が下方制御されることが逆転写定量 PCR により確認された。本菌が産生する QQ 誘導物質の諸性質を解析するため、限外ろ過により QQ 誘導物質を分子量ごとに分画後、それぞれの QQ 活性および pH を測定した。その結果、3 kDa 以下画分の QQ 活性が最も大きく、pH は最も低かった。さらに定常期馴化培養液を 121°C で 15 分間加圧滅菌しても失活しなかった。また、これまでに行っていた培養液からの部分精製結果から、QQ 誘導物質は疎水性の低い酸性化合物であると示唆されていたため、本菌が特に多く産生する有機酸が QQ 誘導物質の一つであると考えられた。次に、菌体外の環境因子に着目して本菌の内在性 QQ を調査した。その結果、QQ には培地成分が必要で、生育と同調した発酵において生成した有機酸による pH 低下によって誘導されることが示唆された。このような比較的単純な方法により QQ が誘導されることの発見は、低コストかつ簡便な臨床応用に繋がると思われる、QQ 誘導の分子機構の解明にも興味を持つた。

### Elucidation of self-quorum quenching in *Clostridium perfringens*

○Keika Adachi<sup>1</sup>, Pal Singh Ravindra<sup>1</sup>, Kaori Ohtani<sup>2</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1</sup>, Jiro Nakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Miyarisan Pharma. Co., Ltd.)

**Key words** *Clostridium perfringens*, quorum sensing, quorum quenching, pH

### 3P-1a087 腸内共生微生物代謝に注目した魚類飼料応答解析法の構築

○坂田 研二<sup>1</sup>, 坪井 裕理<sup>1</sup>, 朝倉 大河<sup>1,2</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>理研 CSRC, <sup>2</sup>横市院・生医, <sup>3</sup>名大院・生命農)  
jun.kikuchi@riken.jp

#### 【背景・目的】

近年世界的な養殖業生産量の増加に付随し、養殖用飼料の主成分である魚粉は高騰しており、魚粉の配合割合の低減に加え、高機能性、高付加価値飼料の需要が高まっている。そこで我々は魚粉に代用する新規飼料開発のために、魚類腸内微生物叢における多糖類代謝反応に注目し、非侵襲的魚類評価法[1]および魚類代謝プロファイリング法[2]を採用することにより、魚類飼料としての有用性に関する評価検討を行った。

#### 【方法・結果】

天然環境から採取したマダイ、ヒラメ、ブリの三大養殖魚に加え食性の異なる魚類の腸内容物と <sup>13</sup>C ラベル化でんぷんを混ぜ合わせ、NMR 法を用いた有用物質簡易スクリーニング法の構築を目的として代謝動態を評価した結果、反応時間が進むにつれ有機酸の増加、多糖類シグナルの減少及び低分子成分の増加傾向がみられた。また <sup>13</sup>C ラベル化でんぷんと人工餌を混ぜ合わせた飼料を飼育魚に摂食させた結果、腸内容物、筋肉ともに低分子成分由来の <sup>13</sup>C シグナルが検出されたことから腸内細菌叢における代謝反応の追跡とそれに伴う魚類の代謝応答の評価が可能であることが示唆された。加えて、新たな試みとして難溶性多糖類の解析技術高度化も推進しており[3]、本発表では難溶性多糖類等を魚類に摂食させた時の代謝効果についても議論したい。

Ref. [1] Asakura, T., et al. (2014) *PeerJ*, 2, e550. [2] Yoshida, S., et al. (2014) *Sci. Rep.*, 4, 7005. [3] Wei, F., et al. (2015) *Anal. Chem.* 87, 2819.

### Response analysis to fish feed composition based on metabolisms of gut symbiotic bacteria

○Kenji Sakata<sup>1</sup>, Yuuri Tsuboi<sup>1</sup>, Taiga Asakura<sup>1,2</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Riken CSRC, <sup>2</sup>Grad. Sch. Med. Life Sci. Yokohama City Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

**Key words** Polysaccharide, Fish, NMR, metabolic profiling

### 3P-1a088 メタボロミクスによる大腸菌による 1-ブタノール生産における重要因子の解明

○中島 広裕<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, Liao James C.<sup>2</sup>, 福崎 英一郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

メタボロミクスは生体における代謝産物を網羅的に解析する学術領域であり、生物学、分析化学、情報科学などの複合分野となっている。代謝産物はゲノム発現過程の結果として得られるため、転写や翻訳などの変化を経た細胞内の様子を表している。これらを解析するメタボロミクスでは微生物の成長速度や生産量などといった情報が得られるため、メタボロミクスの利用は微生物生産に用いられる菌体の改善に有用だと考えられる。そこで我々は、1-ブタノール生産経路を組み込んだ遺伝子改変大腸菌に着目した。この遺伝子改変大腸菌は、添加グルコース量が同等の場合、酵母抽出物やタンパク質を含む完全培地である TB 培地で培養した際のみ高い生産量を達成することが知られている。このことより培地組成に因る細胞内代謝状態の変化が 1-ブタノールの生産性に強い影響を及ぼしていると考えられている。本研究では、1-ブタノール生産を助ける栄養培地中の重要因子を発見するため、様々な培地で培養した 1-ブタノール高生産株に対し、メタボロミクスに基づく分析および解析を行った。まず初めに比較実験から酵母抽出物中に重要因子が含まれると推定した。その後、最少培地にアミノ酸群を加えた CA 培地と酵母抽出物を加えた YE 培地を用いて培養を行い、菌体および培養後上清について主成分分析を用いて代謝産物の比較を行うことにより、1-ブタノール生産を助ける 4 種の重要因子を推定した。推定された重要因子を CA 培地に添加したところ、1-ブタノール生産量を改善することができた。現在は添加物質の濃度の最適化を検討し、その生産量のさらなる改善を狙っている。また、この結果をもとにしたより高い 1-ブタノール生産量を示す遺伝子改変大腸菌が得られることを期待している。

### Investigation of important factors for *Escherichia coli* 1-butanol production by metabolomics

○Kosuke Nakashima<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, James C. Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

**Key words** metabolic analysis, butanol, *Escherichia coli*, medium

### 3P-1a089 Rational and efficient selection of gene targets for strain improvement using metabolomics approach

○ Sastia Putri<sup>1</sup>, Toshiyuki Ohtake<sup>1</sup>, James C. Liao<sup>2</sup>,  
Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)  
sastia\_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Conventional metabolic engineering techniques have made tremendous progress in constructing non-native organisms for the production of various useful chemicals. Metabolomics, the total profiling of metabolites in a biological system, is a very useful tool to improve the process of strain improvement. Snapshot metabolite profiling and dynamic profiling such as metabolic turnover analysis facilitate a systematic, high-throughput, and highly efficient strategy for selection of gene targets. Here, we show the utility of metabolome analysis as a stand-alone platform for strain improvement of 1-butanol producing microorganisms. A combination of several mass spectrometry-based metabolome analysis was used to reveal rate-limiting steps in the CoA dependent Clostridial pathway. Through the fine-tuning the expression level of the limiting enzyme in the production pathway, we successfully improved the productivity of 1-butanol. Our results demonstrate the usefulness of metabolomics in formulating successful metabolic engineering strategies.

### Rational and efficient selection of gene targets for strain improvement using metabolomics approach

○ Sastia Putri<sup>1</sup>, Toshiyuki Ohtake<sup>1</sup>, James C. Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

**Key words** metabolomics, metabolic engineering, butanol, *Escherichia coli*

### 3P-1a090 メタボローム解析を用いた大腸菌のバイオ燃料耐性関連物質の探索

○阿知和 弘樹, Theo Shao Thing, Sastia Prama Putri, 福崎 英一郎  
(阪大院・工・生命先端)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

**【背景】** バイオ燃料分野では1-ブタノールがポストバイオエタノールとして注目されている。近年、工業育種可能な大腸菌を用いて、1-ブタノール高生産性株が構築されている[1]。さらなる生産性向上の取り組みがなされている一方で、1-ブタノールは細胞毒性を有するために、高濃度中では生育できないという問題点がある。本研究では、メタボローム解析に基づく菌株育種戦略を用いて、大腸菌の1-ブタノール耐性向上に関連する代謝物探索をおこなった。当該戦略を用いて探索された代謝物は、表現型に高い相関をもつことが示されている。また、ランダムにおこる突然変異に依存せず、難解な分子機構解明を必要としないという利点も有する。

**【方法・結果】** GC/MSを用いて大腸菌細胞内の代謝物分析をおこなった。また、1-ブタノール曝露下の大腸菌増殖速度より耐性指標を算出した。同様にイソブタノール、1-プロパノールを用いて、各アルコール曝露下の耐性指標を求めた。代謝物情報と1-ブタノール耐性度、さらにイソブタノール、1-プロパノールの耐性度を多変量回帰分析に供したところ、カダベリンやプトレッシン、スベルミジンがバイオ燃料耐性に共通して相関する代謝物と示された。この結果よりポリアミン代謝が耐性向上に寄与していると考えられ、今後耐性株構築が期待される。

[1] Shen, C.R. *et al.*, AEM, 77, (2011), 2905-2915

### Search of metabolite related to bioalcohol tolerance in *Escherichia coli* based on metabolome analysis

○ Hiroki Achiwa, Shao Thing Theo, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki  
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, 1-butanol, metabolomics

### 3P-1a091 南極産担子菌酵母 *Mrakia lolloppis* の低温ストレス反応

○辻 雅晴  
(国立極地研究所)  
spindletuber@gmail.com

南極のような極地に生息している菌類は氷点下でも細胞が凍る事無く、生存する事が可能なことから有機物の最終分解者として極地における物質循環に重要な役割を果たしている。

これまで極地から分離された菌類の低温下での生存戦略に関する研究は分離した菌類の菌体脂肪酸含有比率の変化や不凍タンパク質、細胞外多糖のような凍結防止剤を分泌しているかどうかなど生理学的特徴について注目されてきただけで、これらの菌類が氷点下でどのように細胞内凍結を防ぎながら成長しているのかは不明であった。そこで、昭和基地周辺で培養可能な菌類の優占種である *Mrakia* 属菌を至適生育温度と氷点下でそれぞれ培養した場合、培養時間の経過と共にどのような代謝反応に影響が出るのかをメタボローム解析により調べた。

その結果、低温での生育に優れた *M. lolloppis* SK-4 株は至適生育温度と氷点下では全く異なる代謝反応を行っていたことが分かった。SK-4 株は特に氷点下で細胞分裂や細胞壁合成などの代謝経路が活発になるほか、低温下での成長に関与する芳香族アミノ酸など生合成するのに ATP を消費する物質を大量に生産していた。このことから、南極産菌類が氷点下で細胞を凍結させないために多大なコストを支払いながら成長していることを世界で初めて明らかにすることができた。

### Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia lolloppis*

○ Masaharu TSUJI  
(NIPR)

**Key words** metabolic analysis, Antarctic basidiomycetous yeast, cold-adapted microorganism, cold stress response

### 3P-1a092 代謝物解析を用いた微生物におけるメチルクエン酸回路の分布の検討

○ 田部 仁美, 宮越 俊一  
(群馬高専)  
miyako@nat.gunma-ct.ac.jp

**【背景及び目的】** 微生物代謝経路の分布について検討する手段として、これまでの酵素活性レベル、遺伝子レベルに加えて代謝物レベルの解析が普及しつつある。ここではメチルクエン酸回路を例に代謝物解析を試み、酵素活性との比較・検討を行った。本回路はプロピオン酸代謝に関与する異化的代謝経路として、主に真菌類で報告があるほか、近年のゲノムの解読により細菌においても注目されるようになった。

**【材料及び方法】** 検討する微生物を 1/2 YPD 培地等で培養し、分離した菌体に緩衝液を加えて超音波処理または磨砕により無細胞抽出液を調製した。本研究では、酵素活性レベルの検討として主に真菌・細菌を対象として Ellman 試薬を用いた 2-methylcitrate synthase (MCS) の測定を行った。培養上清は限外ろ過処理、または Sep-Pak Accell Plus QMA による前処理・濃縮を行い、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いて、陰イオンモードで分離、TOF MS により TIC 及び  $m/z = 205.0354$  により 2-メチルクエン酸の存在を確認した。

**【結果及び考察】** 酵素活性測定の結果、真菌だけでなく一部の細菌で新たに MCS 活性を確認することができた。また、微生物をプロピオン酸添加培地で培養後、その培養液の代謝物解析を行った結果、多くの酵母と糸状菌から 2-メチルクエン酸が確認され、実際にこれらではメチルクエン酸回路が C<sub>1</sub> 代謝経路として機能していることが確かめられた。これまでのところ、細菌類では代謝物としての 2-メチルクエン酸を確認できていないが、サンプル濃縮や部分精製によりこれらが改善される可能性がある。以上のことから、酵素活性と代謝物との間に一定の相関が認められ、メタボロミクスによる解析の可能性を示すことができた。

### Investigation of distribution of methylcitric acid cycle among microorganisms using a metabolic analyses

○ Hitomi Tabei, Shunichi Miyakoshi  
(Gunma Natl. Coll. Technol.)

**Key words** microorganisms, metabolic analysis, CE-MS, methylcitric acid cycle

### 3P-1a093 ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索

○渡邊 研志<sup>1,3</sup>, Arafles Kim Hazel V.<sup>1</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 田島 誉久<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 中島田 豊<sup>1,3</sup>, 秋 庸裕<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>広島大院・工, <sup>3</sup>JST・CREST)  
aki@hiroshima-u.ac.jp

【目的】ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの高機能性脂質を著量蓄積する海洋性真核微生物である。本微生物によって高機能性脂質を持続的かつ安価に供給するための手段として、海洋及び陸上の余剰バイオマスや産業廃棄物系バイオマスの培養基質としての利用が挙げられる。そのためには、各種バイオマスの多種多様な組成物によって生じる代謝変動の把握と、それに応じた分子育種や培養条件の最適化が必要となる。本研究では、異なる培地組成物が *Aurantiochytrium* 属の代謝に及ぼす影響をメタボローム解析によって包括的に観察し、高機能性脂質の生産効率の向上をめざして育種標的を探索した。

【方法及び結果】演者らは、褐藻マンニトールを炭素源として酢酸菌 *Gluconobacter* によるフルクトースへの変換とドコサヘキサエン酸高生産性の *Aurantiochytrium* sp. CB15-5 株による油脂発酵からなる二段階培養系を開発してきたが、グルコースを炭素源とした場合と比較してトリグリセリドの生産量が低下していた。そこで、細胞内の代謝物をトリメチルシリル誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析により解析した。その結果、クエン酸などのTCA回路関連物質の細胞内濃度に顕著な低下が見られたほか、リシンなどのアミノ酸代謝に大きな変動が観察された。このほか、各種培地組成物の違いや、ストレス負荷などの培養条件の違いによる代謝変動を解析しているため、その詳細について報告する。

#### Metabolomic analysis of marine oleaginous microorganism, *Aurantiochytrium* sp.

○Kenshi Watanabe<sup>1,3</sup>, Kim Hazel V. Arafles<sup>1</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1,3</sup>, Yukihiko Matsumura<sup>2,3</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)

**Key words** metabolomics, lipid production, *Aurantiochytrium*

### 3P-1a094 Metabolic profiling of *Drosophila melanogaster* metamorphosis

○Thuy An Phan Nguyen<sup>1</sup>, Masamitsu Yamaguchi<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)  
an\_phan@bio.eng.osaka-u.ac.jp

As a holometabolous insect, the development of *Drosophila* has to undergo metamorphosis which requires a lot of energy to reconstruct the body into the adult form. The fat body is an important energy reservoir accounted for more than 80% of total metabolism to support the animal through the subsequent pupation; however, how the flies use this source to generate energy is not clearly understood. On the other hand, ecdysteroids control *Drosophila* metamorphosis by regulating the cell cycle, autophagy and apoptosis, which can directly affect the metabolism of the body. Therefore in the present study, we aimed to investigate the effects of ecdysteroids on the metabolism. First, we performed metabolic profiling using two platforms GC/MS and LC/MS. The abundance of detected metabolites drastically changed and strongly correlated with the developmental stages of *Drosophila* pupae. Moreover, a prediction model for pupal stages based on metabolic profile by using partial least square projection to the latent structure was successfully conducted. With the putative important metabolites revealed from the prediction model, we found that the regulation of metabolite expression patterns in the central metabolic pathways have been shown to be essential in the synchronization of *Drosophila* metamorphosis. Finally, by using conditional mutant to control the ecdysteroid titers, we investigated the connection between the level of ecdysteroids and the metabolism of *Drosophila* during metamorphosis.

#### Metabolic profiling of *Drosophila melanogaster* metamorphosis

○Thuy An Phan Nguyen<sup>1</sup>, Masamitsu Yamaguchi<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

**Key words** metabolism, *Drosophila melanogaster*, ecdysteroid

### 3P-1a095 <sup>13</sup>C 代謝フラックス解析法を用いた動物培養細胞の NADPH ターンオーバー速度の計測

○岡橋 伸幸<sup>1</sup>, 松田 史生<sup>1</sup>, 河野 晋<sup>2</sup>, 高橋 智聡<sup>2</sup>, 清水 浩<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・情報, <sup>2</sup>金沢大・がん進展制御研)  
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】動物培養細胞の中心炭素代謝経路における酸化還元補酵素の再生、消費速度を測定することが、創薬スクリーニングや細胞の品質評価の有益な指針となると期待される。そこで、本研究では動物培養細胞に、<sup>13</sup>C 代謝フラックス解析法を適用し、増殖に必須の補酵素 NADPH の再生、消費速度のバランスを計測した。

【方法】[<sup>1-13</sup>C]グルコースを含む培地で p53 欠損マウス軟部腫瘍由来細胞株を培養し、細胞内代謝物の <sup>13</sup>C 標識割合をガスクロマトグラフ質量分析装置で分析した。フラックス分布の推定には OpenMebius (Kajihata *et al.*, 2014) を用いた。

【結果・考察】[<sup>1-13</sup>C]グルコース含有培地で p53 欠損マウス軟部腫瘍由来細胞株を培養し、中心炭素代謝経路のフラックス分布を推定した。取り込まれたグルコースの 94% は解糖系、5% がペントースリン酸経路で代謝されていた。一方、グルタミンは 72% が TCA サイクルで酸化的に代謝されている一方で、残りの 28% は還元的に代謝されていた。続いて、フラックス分布の情報から NADPH の再生、消費速度を算出した。その結果、全 NADPH の 36% がペントースリン酸経路で、64% が Malic enzyme の触媒する反応で再生されていたことから、Malic enzyme の重要性が示唆された。一方で、NADPH の消費先として、脂肪酸の生合成が 58%、アミノ酸生合成が 23%、還元的なイソクエン酸デヒドロゲナーゼの反応が 19% と、細胞構成成分の合成が 81% を占めた。今後、NADPH 再生反応を適切に制御することが、特定の細胞の増殖抑制や品質評価に繋がる可能性が示唆される。

#### Measurement of NADPH turnover rate in cultured mammalian cells using <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis

○Nobuyuki Okahashi<sup>1</sup>, Fumio Matsuda<sup>1</sup>, Susumu Kohno<sup>2</sup>, Chiaki Takahashi<sup>2</sup>, Hiroshi Shimizu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. IST, Osaka Univ., <sup>2</sup>Cancer Res. Inst., Kanazawa Univ.)

**Key words** <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis, NADPH, cultured mammalian cells

### 3P-1a096 D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発

○中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎  
(<sup>1</sup>阪大院・工)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

D-アミノ酸はL-アミノ酸とは異なる生物学的機能を担うため、近年では医薬、臨床、食品業界を初めとして様々な分野で大きな注目を集めている。D-アミノ酸とL-アミノ酸は物理化学的性質が近いため、通常的手法ではそれらの分離・分析が困難である。そのため、従来の鏡像体選択的アミノ酸分析手法では、アミノ酸の誘導体化といった特殊な処理を行うことで、望ましい分離や感度を得ている一方、実際にはその煩雑性やスループットの面で改善すべき問題が多い。そこで本研究では、液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、誘導体化を行わずに高感度にアミノ酸鏡像体を分離・分析できる手法の開発を目的とした。キラルクラウンエーテルを固定相に据えた光学分割カラムによるアミノ酸鏡像体分離を行い、さらに MS/MS パラメーターの最適化を行うことで、結果として高感度かつ高再現性を示す D-アミノ酸定量分析法の確立に成功した。また、本手法を食品中の D-アミノ酸定量分析に供し、nmol/mL レベルの極低濃度の D-アミノ酸の測定に成功した。これらの結果は、本手法が食品を初めとする様々なサンプル中の D-アミノ酸の定量分析に応用できる新規分析手法としての大きな可能性を有することを実証した。

#### Development of an LC-MS/MS method for quantitative analysis of trace D-amino acids

○Yosuke Nakano, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** D-amino acid, enantioselectivity

### 3P-1a097 イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析による陰イオン性代謝物分析手法の開発

和泉 自泰<sup>1</sup>，高橋 政友<sup>1</sup>，鈴木 隆弘<sup>2</sup>，押川 清孝<sup>1</sup>，木村 元一<sup>2</sup>，坂本 茂<sup>2</sup>，松本 雅記<sup>1</sup>，○馬場 健史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九大・生医研，<sup>2</sup>サーモフィッシャー)  
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

代謝主幹経路の中間体の多くは高極性，陰イオン性の特性を示す。これまで、陰イオン性代謝物の網羅的測定には、CE/MSやイオンペア LC/MSが有用技術として使用されてきたが、分析再現性や安定性の観点において未だ課題が残っている。イオンクロマトグラフィー(IC)はイオン性成分の分離分析手段として古い歴史があるものの、メタボロミクスの分野にはこれまでほとんど応用されてこなかった。本研究では、イオンクロマトグラフィー高分解能質量分析(IC/Q Exactive)による陰イオン性代謝物の網羅的測定法について検討したので報告する。

IC/Q Exactiveを使用して、有機酸、糖リン酸、ヌクレオチド、補酵素などの200種程度の親水性代謝物の分離分析条件を最適化し、保持時間やMS、MS/MSスペクトルを格納したライブラリーを構築した。本分析手法は、クエン酸やイソクエン酸などの各種異性体のクロマト分離を達成し、ATPやNAD(P)<sup>+</sup>、NAD(P)Hなどの代謝物についても高感度の測定が可能であった。続いて、動物培養細胞や体液試料を用いて検証したところ、生体試料においても保持時間及びピークエリアの再現性は極めて高く、cAMPなどの微量成分の検出にも成功した。本分析手法は、メタボロミクス分野における実用的な代謝物測定法として広く活用されていくことが期待できる。

#### Analysis of anionic polar metabolites by ion chromatography high resolution mass spectrometry

Yoshihiro Izumi<sup>1</sup>，Masatomo Takahashi<sup>1</sup>，Takahiro Suzuki<sup>2</sup>，Kiyotaka Oshikawa<sup>1</sup>，Motokazu Kimura<sup>2</sup>，Shigeru Sakamoto<sup>2</sup>，Masaki Matsumoto<sup>1</sup>，○Takeshi Bamba<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Thermo Fisher Scientific Japan)

**Key words** Metabolomics, Ion chromatography, High-resolution mass spectrometry, metabolic analysis

### 3P-1a098 アルボサイクリン生産放線菌を用いた微生物農薬の開発

○大池 達矢<sup>1</sup>，前田 みのり<sup>2</sup>，松川 哲也<sup>1,2</sup>，岡南 政宏<sup>1,2</sup>，梶山 慎一郎<sup>1,2</sup>，阿野 貴司<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・生物理工・生物工，<sup>2</sup>近畿大・生物理工・生物工)  
tano@waka.kindai.ac.jp

#### 【背景および目的】

近年、植物病原菌から作物を守る生物防除剤として微生物農薬が注目されている。これまでの微生物農薬は、主に *Bacillus* 属などの細菌や *Trichoderma* 属などの真菌が使用され、それらの研究が行われている。しかしながら、最近ではこれら以外の微生物を用いた微生物農薬に関する研究も行われるようになってきた。

放線菌は、抗生物質を生産する菌として周知されており、これまで発見された抗生物質のうち約3分の2は放線菌由来と言われている。それらの抗生物質からは、殺虫剤や動物薬として実用化された物質も少なくない。また、最近では微生物農薬に関する研究報告も増加しつつあり、放線菌を利用した農薬も開発されている。そこで、微生物農薬の新たな候補となる放線菌の探索を試みた。本研究では、アリの巣周辺土壌から単離した放線菌の植物病原菌に対する抗菌スペクトルおよび抗真菌活性物質に関する研究を報告する。

#### 【方法および結果】

環境中の土壌を採取し、抗生物質を添加したアルブミン培地を用いて希釈法にて放線菌を分離した。分離した放線菌は、抗真菌活性試験を行った。その結果、大学構内のアリの巣周辺土壌から採取した AR10 株が *Rhizoctonia solani* を始めとする8種の植物病原性真菌に対する強い抑制を示した。また、本菌株の生産する抗真菌活性物質を溶媒抽出し、精製後、LC/MSおよびNMRにて同定を行った結果、アルボサイクリンが検出された。これまでの研究において、放線菌がアルボサイクリンを生産することは既に知られているが、アルボサイクリンにおける微生物農薬を試行した研究は行われておらず、今後の微生物農薬の研究において有用な知見になると考えられる。

#### Development of biological control agent by albocyclin producing actinomycete

○Tatsuya Ohike<sup>1</sup>，Minoru Maeda<sup>2</sup>，Tetsuya Matsukawa<sup>1,2</sup>，Masahiro Okanami<sup>1,2</sup>，Shin'ichiro Kajiyama<sup>1,2</sup>，Takashi Ano<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotechnol. Sci., Kindai Univ.)

**Key words** actinomycetes, biological control agent, albocyclin

### 3P-1a099 *Streptomyces* sp. KT 株の微生物農薬としての可能性

○前田 みのり<sup>1</sup>，大池 達矢<sup>2</sup>，岡南 政宏<sup>1,2</sup>，松川 哲也<sup>1,2</sup>，梶山 慎一郎<sup>1,2</sup>，阿野 貴司<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大・生物理工・生物工，<sup>2</sup>近畿大院・生物理工・生物工)  
tano@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】農業において、植物病原菌の防除は生産性向上の観点から特に重要な課題である。近年、化学農薬に代わる新たな防除手段として、生物農薬が注目されている。微生物を用いて植物病原菌から作物を防除する微生物農薬では、大別すると細菌と糸状菌を使用した例が挙げられる。一方で、有用な抗生物質の生産菌として知られる放線菌を微生物農薬として利用する研究はあまり進められていない。そこで本研究では、放線菌を用いた微生物農薬の開発を目的とした。

【方法と結果】放線菌単離用の培地であるアルブミン培地で増殖した菌を単離し、植物病原菌 *Rhizoctonia solani* に対し抑制を示すKT株を選抜した。KT株は和歌山県内の木の根圏から回収した土壌から単離され、*Streptomyces lavenduligriseus* に近縁な *Streptomyces* sp. であると同定された。次に *R. solani* を始め全8種の植物病原菌と対峙培養を行い、成長抑制の有無を調べた。その結果、KT株は8種全ての植物病原菌に対して成長抑制能を示した。また、それぞれの植物病原菌に対して形成した阻止円の大きさで成長抑制能を3段階で評価したところ、特に *Bipolaris oryzae*、*Colletotrichum echinochloae*、*C. orbiculare*、*Fusarium oxysporum*、*Monilinia fructigena* の5株に対して強い活性がみられた。さらに、KT株をPDB培地で5日間培養し、培養液を100 μL塗布した水寒天にキュウリを播種、5日後に *R. solani* を植菌して植物への植物病原菌感染防除試験を行った。結果として、20日間に渡ってキュウリは枯死せず、KT株は植物病原菌に対して防除効果を持つことが示された。一方、KT株の菌体を回収して抗菌活性物質を抽出、精製後HPLCで分析した結果、抗菌活性物質は eurocin 類であると推測された。

#### Potential of a biocontrol agent by *Streptomyces* sp. strain KT, with broad antifungal spectrum

○Minoru Maeda<sup>1</sup>，Tatsuya Ohike<sup>2</sup>，Masahiro Okanami<sup>1,2</sup>，Tetsuya Matsukawa<sup>1,2</sup>，Shin'ichiro Kajiyama<sup>1,2</sup>，Takashi Ano<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotechnol. Sci., Kindai Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

**Key words** actinomycetes, biocontrol agent, soil born disease

### 3P-1a100 燐炭が *Bacillus* 属細菌 IA 株の生育を促進するメカニズムの解明

○江邊 正平，大池 達矢，岡南 政宏，阿野 貴司  
(近畿大院・生物理工・生物工)  
tano@waka.kindai.ac.jp

イネの初殻を焼成して得られる燐炭は古くから作物の成長促進をもたらす土壌改良剤として用いられてきた。その理由は燐炭の有する微細孔が微生物の住処として適することから VA 菌根菌や根圏微生物を活性化すると考えられているが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。これまでに我々は炭素材料としての燐炭の有効利用を目的に、活性炭素を添加した寒天培地上で増殖が促進される微生物の探索を行い、さらに燐炭でも増殖が促進される *Bacillus* 属細菌 IA 株を単離した。また IA 株の液体培養において燐炭を添加することが増殖・胞子化・抗生物質生産を促進することを見出した。しかし活性炭素の添加では同様の効果が認められず、このことから燐炭と活性炭素で IA 株の代謝を促進するメカニズムが異なるのではないかと考えた。燐炭の原料であるイネはケイ素を取り込み、体内で二酸化ケイ素として蓄積することが知られている。そこで焼成後の燐炭にも残存する二酸化ケイ素に着目した。本研究では燐炭が IA 株の増殖を促進するメカニズムの解明を目的に、二酸化ケイ素を構成成分とするケイ酸塩鉱物とそれら鉱物から構成される緑色凝灰岩を用いた実験を行い、微生物培養における二酸化ケイ素の影響について調べた。

IA 株における代謝促進メカニズムを調べるため、TSB培地 (Bacto-peptone 2.0%、glucose 0.25%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25%、NaCl 0.5%) にケイ酸塩鉱物、もしくは緑色凝灰岩を0.5% (w/v) 添加した培地にて IA 株の培養を行った。培養5日目にはそれら培地中に含まれる抗真菌活性物質 iturin A の定量を行った。結果、ケイ酸塩鉱物、緑色凝灰岩を添加した培地において燐炭と同様に iturin A 生産の促進が認められた。この結果から二酸化ケイ素が IA 株の活性促進に関わり、燐炭に含まれる二酸化ケイ素が微生物の活性促進において重要な役割を担うことが示唆された。

#### Mechanisms of growth enhancement of *Bacillus* sp. IA in the presence of rice husk biochar

○Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano  
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

**Key words** rice husk biochar, silicate minerals, bacterial growth enhancement, biocontrol agent

### 3P-1a101 ウレアーゼ生産菌の分離とそれを利用した土の強度改良効果

○米光 裕<sup>1</sup>, 高山 陽加<sup>1</sup>, 林和幸<sup>2</sup>, 西本 真琴<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>和歌山高専・物質, <sup>2</sup>和歌山高専・環境都市)  
yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp

【背景と目的】土中にウレアーゼ生産菌、尿素および塩化カルシウムを注入し、地盤強度を高める技術が提案されている。この技術は、地盤に注入された微生物が生産するウレアーゼにより尿素が加水分解され、そこで生じた炭酸イオンとカルシウムイオンとの沈殿反応で生成した炭酸カルシウムが砂粒子間を架橋し、地盤全体を固化するというものである。本研究では、地盤を15 mボーリングして採取した土からウレアーゼ生産菌を分離し、それを用いて、実験室レベルの砂の固化実験を行なったので報告する。

【方法と結果】土壌サンプルを生理食塩水に懸濁し、それをフェノールレッドを含む尿素寒天培地に播種し、30℃にて培養した。その結果、培養1日後に赤紫色のハロをもつコロニーが4個得られた。これら分離株をLB培地で培養し、その培養上清のウレアーゼ活性(上清1 ml当りの尿素分解量)を測定したところ、4株のうち2株の活性が61.8 µg/mlおよび62.7 µg/mlで同等に高かった。これら2株は16S-rRNA遺伝子解析の結果、それぞれ *Ensifer* 属および *Bacillus* 属と示唆された。これら2株の培養液、尿素、塩化カルシウムおよび砂の混合物をモールド(直径5 cm×高さ10 cm)に詰め、室温にて3週間放置して固化させた円柱供試体に対し軸圧縮試験を実施した結果、いずれの株を利用した砂供試体においても、軸圧縮強さが菌無添加に比べて20%程度高くなった。これら砂固化物と塩酸をガス圧測定器に入れ、得られたガス圧から炭酸カルシウムの析出量を求めたところ、2株による砂固化物の析出量は菌無添加に比べて24-28倍高かったことから、その強度改善効果は析出した炭酸カルシウムによると示唆された。

【謝辞】本研究はJSPS科研費JP15K06218の助成を受けたものです。感謝申し上げます。

#### Isolated from soil

○Hiroshi Yonemitsu<sup>1</sup>, Haruka Takayama<sup>1</sup>, Kazuyuki Hayashi<sup>2</sup>, Makoto Nishimoto<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Mater. Sci., Wakayama, NIT, <sup>2</sup>Dept. Civ. Eng., Wakayama, NIT)

**Key words** urease, bacteria, calcium carbonate, sand

### 3P-1a102 リングレス担体を用いた固定床一槽式アナモックスプロセス

○上野 嘉之<sup>1</sup>, 多田 羅 昌浩<sup>1</sup>, 柴田 晴佳<sup>1</sup>, 石川 秀<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>鹿島・技術研, <sup>2</sup>鹿島・エンジニア本部)  
uenoyo@kajima.com

【背景と目的】アナモックスを用いた窒素除去では、廃水中のアンモニアの約半分が亜硝酸に酸化され、この亜硝酸が残りのアンモニアによって還元されることで窒素ガスを生成する。この二つの反応工程を同一の反応槽で行うプロセスを一槽式と呼んでいる。本報では、リングレス担体を用いた固定床一槽式アナモックスリアクターによる連続窒素除去効果について報告する。

【方法】嫌気好気循環式廃水処理プロセスの活性汚泥を種菌として、アンモニアを唯一の窒素源とした人工廃水を、水理学的滞留時間(HRT)4.4h、窒素負荷(NLR)1.9kg/m<sup>3</sup>/dayでリアクター(5.5 L)に連続的に通水し、わずかに通気(20ml/min)しながら微生物を馴養した。この微生物バイオフィルムを種菌として、同様に醸造廃物のメタン発酵処理液を通水し、リアクターパフォーマンスを評価した。バイオフィルムの菌叢は、16SrRNA遺伝子を標的として454 GS-FLX (Roche)によるパイロシーケンシングにより解析を行った。

【結果と考察】人工廃水では、約30日間の培養で、アナモックス反応による窒素除去反応が観察され、80日経過後には窒素除去率80%を達成した。一方、実廃水では、通水直後より、窒素除去活性が観察され、約1年間の連続運転において、最大窒素除去速度0.53kg-N/m<sup>3</sup>/dayで、約85%の窒素除去効果を示した。いずれの系も、生成したバイオフィルムの深層部では、*Candidatus Brocadia anammoxidans* の近縁種(99%)が、ほぼ唯一のアナモックス菌として存在した。また、アンモニア酸化細菌(AOB)は表層部に存在比が高いことが観察された。この好気性菌と嫌気性菌から構成されるバイオフィルムが、一槽式での反応を可能にするものと考察できた。

#### Nitrogen Removal by a Single-stage Reactor Packed with Ring-laced String Media

○Yoshiyuki Ueno<sup>1</sup>, Masahiro Tataru<sup>1</sup>, Haruka Shibata<sup>1</sup>, Shu Ishikawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Kajima Tech. Res. Inst., <sup>2</sup>Kajima Co. Div. Eng.)

**Key words** anaerobic ammonium oxidation, nitrification, biofilm, nitrogen removal

### 3P-1a103 有機酸資化性細菌を用いたメタン発酵廃液中の有機酸除去

○中井 昇太<sup>1,2</sup>, 高橋 宏和<sup>1,2</sup>, 三浦 豊和<sup>1,2</sup>, 秋 庸裕<sup>1,2</sup>,  
中島田 豊<sup>1,2</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質, <sup>2</sup>科学技術振興機構, <sup>3</sup>広島大院・工)  
okamura@hiroshima-u.ac.jp

#### 【目的】

有機酸資化性細菌 *Nitratireductor* sp.OM-1 株は廃水処理過程における余剰汚泥の蓄積、プロピオン酸等の毒性の強い有機酸の蓄積を解消することを目的として海洋中から分離された。この株は酢酸-プロピオン酸を炭素源としてトリアシルグリセロールを合成する。また、酪酸、吉草酸、グリセロールといった基質を油脂に変換することも確認されている。さらに、窒素飢餓条件下で酢酸-プロピオン酸をクロトン酸イソプロピルに交換し細胞当たりで50%蓄積している。そこで本研究では大型海洋藻類を海洋複合メタン生成菌群によりメタン発酵後の低級有機酸が含まれる発酵廃液でOM-1株を好気的に培養し、有機酸除去と油脂生産を行うことを目的とした。

#### 【方法及び結果】

コンブを基質としたメタン発酵廃液に含まれている有機酸濃度を高速液体クロマトグラフィーによって分析を行い、*Nitratireductor* sp.OM-1株に蓄積している油脂をガスクロマトグラフィーによって分析した。また、発酵廃液でOM-1株培養後の培養液中の化学的酸素要求量(COD)を分析することで水質浄化に対する有効性を評価した。発酵廃液の有機酸は酢酸が約12 mM、プロピオン酸、酪酸が約1 mM含まれており、CODは6393 mg/Lであった。廃液のみを7日間振とうした場合、CODは1619 mg/Lに減り、廃液中の細菌叢が有機物分解に寄与していることが示された。また、ここにOM-1株を植菌すると有機酸は完全に消費され、CODは569 mg/Lとなり、OM-1株とメタン生成菌の共培養によってCODを低下させることが明らかになった。さらに、OM-1株に蓄積された油脂を測定した結果、培養液あたりで13 mg/L蓄積していた。好気的な排水処理では有機物の約50%を菌体に変換し余剰汚泥を生成してしまうが、OM-1株は有機物を油脂合成に用いるため、菌体への変換率は25%程度にまで抑えられた。

#### Removal of organic acids in wastewater derived from methane fermentation by the organic acids assimilating bacterium

○Shota Nakai<sup>1,2</sup>, Hirokazu Takahashi<sup>1,2</sup>, Toyokazu Miura<sup>1,2</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,2</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,2</sup>, Yukihiko Matsumura<sup>2,3</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Japan Science and Technology Agency, <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ.)

**Key words** wastewater, biodiesel fuel, triglyceride, bacteria

### 3P-1a104 自家発酵熱型高温好気処理における主要細菌の体系的フィードバック分離と諸特性解析

○福井 諒, 朝倉 佑弥, 田代 幸寬, 酒井 謙二  
(九大院・農)  
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】福岡県築上町では、尿尿を自家発酵熱型高温好気処理により液肥化し、農地に散布し使用している。液肥化過程における理化学的特性および次世代シーケンサーによる細菌群集構造解析に関する先行研究により、本過程は3段階からなり、各段階で異なる主要細菌が液肥化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、それらはいずれも未分離で機能も未解明である。そこで本研究では、液肥化第1段階における主要細菌 *Acinetobacter towneri* 近縁菌を体系的フィードバック分離法により取得し、その機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】*A. towneri*<sup>1</sup> についての好適培養条件を論文等からフィードバックし、それらを基にCASO AgarおよびTrypticase Soy Broth Agarを用いて分離源希釈液を30℃で1日間、培養した。形成したコロニーに対してMALDI-TOF MS分析を行い、それらのスペクトルを基に作製したデンドログラムから候補株の絞り込みを行った。絞り込んだ株について16S rRNA遺伝子のシーケンス解析を行い、得られた3株の候補株についてさらに特性を調べた。

【結果と考察】コロニー形態の違いを指標にCASO Agarから23株、Trypticase Soy Broth Agarから12株を得た。コロニーレベルのMALDI-TOF MSスペクトル測定を行い、デンドログラムを作成し、*A. towneri*<sup>1</sup>と同一性の高い株を選抜し、それらを16S rRNA遺伝子シーケンス解析に供したところ、3株が *A. towneri*<sup>1</sup>と高い同一性(99.5%, 99.0%, 98.9%)を示した。またそれらは先行研究で得られた主要細菌の塩基配列と高い同一性(99.7%, 98.5%, 98.3%)を示した。以上から体系的フィードバック分離法により目的菌3株の分離に成功した。分離菌は33℃で活発に増殖し、実際の液肥化過程の発酵温度とほぼ一致した。現在、さらなる特性解析を進めている。

#### Systematic feedback isolation and characterization of major bacterium from autothermal thermophilic aerobic treatment system

○Ryo Fukui, Yuya Asakura, Yukiro Tashiro, Kenji Sakai  
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** Systematic feedback isolation, Autothermal thermophilic aerobic treatment system, *Acinetobacter towneri*, MALDI-TOF MS

### 3P-1a105 ラボスケールでの自家発酵熱型高温好気処理によるし尿の液肥化における諸要因の影響

○朝倉 侑弥, 河野 祥尚, 程 慧君, 田代 幸寛, 酒井 謙二  
(九大院・農)  
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景】福岡県築上町の有機液肥製造施設では、町内で回収したし尿を液肥に変換することで資源の循環を行っている。し尿は酵素製剤を添加した後、好気的条件下で自家発酵熱及び機械熱により約 50℃に上昇した高温状態で約 3 週間処理されることから、このプロセスは自家発酵熱型高温好気処理と呼ばれる。本プロセスの解明・効率化を目指す上で、施設内発酵槽（実機）を用いた大規模な実験は困難であるため、本研究ではラボスケール発酵槽を用いた諸要因の検討を行った。

【方法】発酵槽には、かくはんにより空気を自発的に取り込む、自吸式通気かくはん発酵槽を用いた（第 67 回日本生物工学会大会 3P-157）。発酵槽にし尿試料 1.0 L を張り込み、490 rpm で 10 日間培養した。この間、実機の温度変化を参考に温度を制御し、溶存酸素濃度 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、pH を 30 min 毎に測定した。発酵 0, 4, 6, 8, 9 日に試料を採取し、アンモニア態窒素濃度変化の測定、及び変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法による細菌群集構造変化の解析を行った。試料には酵素製剤かつ種菌として発酵終了後の液肥を 5% (v/v) で添加 (a)、液肥 5% (v/v) のみ添加 (b)、酵素製剤のみ添加 (c) したし尿を用いた。

【結果】実機と a について DO、ORP、pH は類似した挙動をとったが、a ではアンモニア態窒素濃度が実機より減少した。また DGGE の結果、発酵後期の細菌群集構造が異なったことから、a では実機と異なる発酵が行われたと考えられた。a、b 間にはほぼ違いがなかったことから、酵素製剤が及ぼす影響は非常に小さいと考えられた。本プロセスは 3 段階を経て進行するが、c と比べ a の 2 段階目へのシフトが早かったことから、実機に常在する主要細菌がプロセスの促進に寄与することが示唆された。現在、次世代シーケンサーにより詳細な細菌群集構造解析を行っている。

#### Influence of various factors for converting human feces to liquid fertilizer on autothermal thermophilic aerobic treatment at laboratory scale

○Yuya Asakura, Yoshihisa Kawano, Cheng Huijun, Yukihiko Tashiro, Kenji Sakai  
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** complex microbiological system, autothermal thermophilic aerobic treatment, bacterial community structure, self-inducing fermenter

### 3P-1a106 複合微生物系であるコンポスト化で接種した微生物を生きかして使う温度制御

平井 秀平, ○中崎 清彦  
(東工大・環境社会理工)  
nakasaki@ide.titech.ac.jp

【背景と目的】コンポスト化においては、有機質廃棄物がコンポスト化処理場搬入されるまでに、酸敗が進み、生成する有機酸によって pH が低下していることが多い。そしてこの低い pH がコンポスト化微生物の活性を抑制し、速やかな有機物分解を妨げている。本研究では、コンポスト原料の酸敗にともなって生成する有機酸を分解する微生物を接種し、接種した微生物の活性に適した温度に制御することで、コンポスト化における有機物分解を促進することを目的とした。

【方法】モデル的な有機質廃棄物として市販のラビットフードと米飯を 7:3 に混合したものを用いた。このモデル廃棄物に、おがくずと市販の種菌を乾燥重量比で 10:9:1 に混合し、酸敗した有機物に特徴的にみられる 4 種類の有機酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸のそれぞれを 2.90、3.02、2.43、および 12.45 g/L）を添加してコンポスト原料とした。コンポスト化は原料そのままの実験と、研究室で単離した有機酸分解活性が高い酵母 *Pichia kudriavzevii* RB1 株を接種した実験、および RB1 株を接種して温度上昇期の温度を制御した実験の 3 通りをおこない、有機物分解速度を比較した。

【結果と考察】微生物 RB1 株を接種しないものでは、初期に含まれる有機酸の分解開始が遅く、一旦、始まった分解もコンポスト化で新たに生成する有機酸によって、微生物の活性が阻害され、コンポスト化は中断した。また、RB1 株を接種しても温度を制御しなければ、酸分解開始は促進されるが、コンポスト化中盤以降の酸の蓄積を抑制することはできなかった。一方、RB1 株を接種し 40℃を 2 日間維持することで有機酸の蓄積は抑制され、活発な有機物分解がおこって、酵母 RB1 株の接種と温度の制御が高速コンポスト化に有効であることが確かめられた。

#### Temperature control for making an inoculum effective in the complex microbial ecosystem, composting

Hidehira Hirai, ○Kiyohiko Nakasaki  
(Sch. Environ. Soc., Tokyo Tech)

**Key words** *Pichia*, composting, inoculum, acid degradation

### 3P-1a107 生物ろ過槽由来 Mn 酸化細菌群集の培養と硝酸濃度の影響

○飯田 早紀<sup>1</sup>, 鈴木 市郎<sup>1</sup>, 三好 萌栄子<sup>1</sup>, 杉田 龍兵<sup>2</sup>, 武田 穰<sup>1</sup>, 小泉 淳一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>横国大・理工)  
suz-1@ynu.ac.jp

【目的】Fe・Mn を含む地下水を微生物複合系を用いて浄化する生物ろ過法は、低コスト、低環境負荷の Fe・Mn 除去技術である。曝気によって自然に酸化・除去される Fe とは異なり、Mn 酸化には微生物の関与が必要となるが、生物ろ過槽からの Mn 酸化細菌の単離は報告されていない。生物ろ過槽に生息する細菌群集構造を解析した結果、*Hyphomicrobium* 属などの C1 化合物資化性細菌が多く存在していた。そこで本研究では C1 化合物資化性細菌に適した培地を用いて、生物ろ過槽より Mn 酸化能をもつ細菌群集を培養することを目的とした。

【方法】実験槽する 2 カ所の上水処理場の生物ろ過槽よりろ材を採取し、*Hyphomicrobium* 集積用培地中の硝酸濃度を 0-200 ppm とし、Mn を終濃度 1 mM とするように加えて、異なる炭素源を用いて 25℃で振とう培養した。サンプリングした培養液より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、DGGE で観察した。また、一部のサンプルについてさらに MiSeq による次世代シーケンス(NGS)解析に供した。得られた塩基配列について、解析ソフト Qiime を用いて操作的分類単位(OTU)を抽出し、優占度の高い OTU について培養期間中の経時変化をグラフ化した。

【結果・考察】2 カ所の生物ろ過槽のろ材のどちらからも、Mn 酸化物濃度を示す細菌群集が得られた。また、硝酸濃度は低濃度側で Mn 酸化能を示す細菌群集が得られたのに対し、高濃度側では Mn 酸化能が低下した。細菌群集構造を NGS で解析して各 OTU の動態を可視化した結果、*Hyphomicrobium* 属細菌の量の変動が Mn 酸化物の生成と似た挙動を示すことが判明した。

#### Effect of nitrate concentration on the culture of Mn-oxidizing bacterial consortia

○Saki Iida<sup>1</sup>, Ichiro Suzuki<sup>1</sup>, Moeiko Miyoshi<sup>1</sup>, Ryuhei Sugita<sup>2</sup>, Minoru Takeda<sup>1</sup>, Jun-ichi Koizumi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Coll. Eng. Sci., Yokohama Natl. Univ.)

**Key words** nitrate, manganese, *Hyphomicrobium*, biological filtration

### 3P-1a108 新規シデロフォアのスクリーニングと廃水からのニッケル回収への利用

保里 明日香<sup>1,2</sup>, 坪田 洗一郎<sup>1</sup>, 袋布 昌幹<sup>1</sup>, ○篠崎 由紀子<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>富山高専, <sup>2</sup>長岡技術科大)  
shinozaki@nc-toyama.ac.jp

【背景と目的】微生物の多くはシデロフォアと総称される鉄結合性小分子を生産し、効率よく細胞内に鉄を取り込むことができる。また、シデロフォアには様々な種類が存在し、鉄以外の金属もキレートするシデロフォアが存在する。本研究では、シデロフォアを利用した金属回収法の開発を最終目的として、有用なシデロフォアの探索を行っている<sup>1</sup>。今回は、めっき廃水中のニッケルに着目し、モデル廃水を用いて、シデロフォアを利用したニッケル回収法を検討した。

【方法と結果】ニッケルをキレートするシデロフォアの生産菌は、比較的高濃度のニッケル存在下でも生育可能と予想される。富山高専の敷地内など身近にある土壌を採取し、1 mM NiCl<sub>2</sub> を添加した細菌用栄養培地 10 mL に土壌約 0.1 g を加え集積培養を行い、ニッケル耐性菌を取得した。この取得した菌株のシデロフォア生産性を、一般的な手法である CAS アッセイにより判定した。その結果、5 か所の土壌から 9 種類のニッケル耐性菌を取得し、そのうちの 5 菌株がシデロフォアを生産することが分かった。最もシデロフォア生産量が多かった菌株を用いて、水溶液からのニッケル回収を検討した。方法としては、NiCl<sub>2</sub> を含む水溶液にシデロフォア粗抽出物を添加して室温で一定時間静置した後、この水溶液を疎水カラムに通し、カラム非吸着（素通り）画分および吸着（希塩酸で溶出）画分として回収し、それぞれのニッケルイオン濃度を測定した。その結果、添加したシデロフォア量に応じてニッケルイオンが疎水カラムに吸着し、そこに希塩酸を流すことで溶出・回収できることが分かった。

1)日本農芸化学会 2014 年大会、4A03a11

#### Screening for novel siderophores and its potential use for nickel recovery from wastewater

Asuka Hori<sup>1,2</sup>, Kouichirou Tsubota<sup>1</sup>, Masamoto Tafu<sup>1</sup>, ○Yukiko Shinozaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Natl. Inst. Technol., Toyama Coll., <sup>2</sup>Nagaoka Univ. Technol.)

**Key words** siderophore, nickel, wastewater treatment

### 3P-1a109 トランスクリプトーム解析による *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝関連遺伝子群の推定

○櫻井 紫乃, 黒田 真史, 池 道彦  
(大阪院・工)  
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】セレンは工業材料として利用されるレアメタルである一方で、水相での形態であるセレン酸及び亜セレン酸は生体への毒性が強いため、廃水からのセレンの除去・回収技術の確立は重要である。本研究では、セレン酸還元菌を用いたセレン廃水の生物学的処理の合理的なデザインに向け、既報のセレン酸還元菌の中で最も高い還元能力を有し、揮発性のジメチルセレンを生成する *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン代謝メカニズムを解明することを目的とし、トランスクリプトーム解析によってセレン代謝に関連する遺伝子の推定を行った。

【方法】*P. stutzeri* NT-I を前々培養、前培養した後、セレン酸 1 mM を含む TSB 培地 20 ml に OD<sub>600</sub> = 0.6 となるように接種し、培養液を 0.5 時間後、1 時間後にそれぞれ採取した。培養液から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、RiboMinus (Life Technologies) を用いてリボソームを除去した後、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies)、Magnetic Beads Cleanup Module (Life Technologies) を用いてライブラリを構築した。続いて、エマルジョン PCR でテンプレートを作製し、Ion PGM (Life Technologies) を用いた RNA-Seq によりトランスクリプトーム解析を行った。

【結果と考察】*P. stutzeri* NT-I のセレン酸還元酵素遺伝子 *serABDC*、およびその制御遺伝子 *serXSR* の転写量増加が見られた。また、Cysteine desulfurase, Cystathionine gamma-lyase など硫黄代謝に関連する遺伝子を含む 2 つのクラスターの転写量が顕著に増加していた。さらに、SAM-dependent methyltransferase の転写量増加も見られ、その機能からセレンの揮発化に関わっていると推測された。以上より、*P. stutzeri* NT-I のセレン代謝関連遺伝子とその制御機構の一部が明らかとなり、セレン代謝メカニズムの全容解明のための知見が得られた。

#### Transcriptome analysis of genes involved in selenium metabolism in *Pseudomonas stutzeri* NT-I.

○Shino Sakurai, Masashi Kuroda, Michihiko Ike  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** selenium, transcriptome analysis, *Pseudomonas stutzeri*

### 3P-1a110 酵母の細胞表面多糖の改変と金属吸着

○高橋 大地, 松川 真弓, 尾島 由紘, 東 雅之  
(阪大院・工・化生系)  
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

我々のグループでは、酵母の細胞壁構造に注目しその改変から新たな機能性酵母の構築に取り組んでいる。これまでに酵母の細胞壁多糖を化学的にリン酸化することにより、レアメタルを含む多くの金属の吸着が顕著に増加することを明らかにし、イオン交換樹脂に匹敵する生分解性吸着剤の開発を進めている。ここではキトサンに注目する。酵母の細胞壁キチンの脱アセチル化により得られるキトサンは、カチオン性凝集剤としての利用だけでなく、重金属イオンとのキレート形成による吸着作用、マクロファージ活性化能や真正細菌に対する抗菌作用などが知られ、近年非常に有用な多糖体として活用されている。我々は、これまでにアルカリ処理により細胞壁キチンをキトサン化することで、カチオン性凝集剤としての機能を持たせることが可能であることを示した。しかし、アルカリ処理では酵母の回収率が低く実用的ではない。本研究では、キトサン化酵母の金属吸着作用の詳細と新たなキトサン化酵母の構築方法について検討を進めた。アルカリ処理に代わる方法として、遺伝子組換えによる酵素的な手法を用いている。酵母の胞子細胞壁に作用する脱アセチル化酵素 (*Cda2p*) を細胞壁キチンへ作用させるため、酵素分泌ベクターや細胞表面提示ベクターを使った組換え株の構築を進めている。発表では、これらキトサン化酵母の構築と金属吸着能に関する結果について報告する。

#### A modification of cell surface polysaccharide of *Saccharomyces cerevisiae* and metal adsorption

○Daichi Takahashi, Mayumi Matsukawa, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma  
(Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Osaka City Univ.)

**Key words** yeast, cell surface, chitosan, metal adsorption

### 3P-1a111 *Rhodococcus* sp. Br-6 による複数の酸化還元メディエーターを介した臭素酸還元

○藤屋 寛子, 玉井 奈生子, 天知 誠吾  
(千葉大・園芸)  
hiroko.0815.pyon@outlook.jp

#### 【背景と目的】

臭素酸(BrO<sub>3</sub>)は浄水場で行われるオゾン処理により処理水中の臭化物(Br<sup>-</sup>)が酸化され発生する副生成物の一種であり、発癌性が報告されている。現状では、処理水中の有機物濃度に応じてオゾン注入量を制御するなどの対策法があるが、完全な臭素酸除去は困難である。一方近年、臭素酸還元能を有するいくつかの微生物が報告されているが、その還元速度は非常に遅く、メカニズムにも不明な点が多い。当研究室では、既知細菌と比較して 100 倍以上速い臭素酸還元速度を示す土壌細菌 *Rhodococcus* sp. Br-6 株の分離に成功している。本研究は Br-6 株による臭素酸還元メカニズムの完全解明を目的とした。

#### 【結果及び考察】

Br-6 株による臭素酸還元は好気条件下においてのみ進行し、酢酸の存在下で化学量論的に臭化物を生成した。この際、2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)などの酸化還元メディエーターが存在すると還元速度が約 4 倍に上昇した。Br-6 株の無細胞抽出液中には NADH 依存的に DCIP を還元する酵素ジアホラーゼ活性が存在した。一方、還元型 DCIP と臭素酸は直接反応せず、鉄イオンが第 2 のメディエーターとして介在することが強く示唆された。実際に還元型 DCIP と Fe(III)、Fe(II) と臭素酸は非生物学的に反応することが確認された。Native-PAGE と活性染色よりジアホラーゼ活性と臭素酸還元活性の一致が確認され、両活性の直接的な関与が示された。以上のことから、Br-6 株の臭素酸還元において DCIP と Fe(III)/Fe(II) はそれぞれ酸化還元メディエーターとして機能していることが明らかとなった。

#### Bromate reduction by *Rhodococcus* sp. Br-6 in the presence of multiple redox mediators

○Hiroko Hujiya, Naoko Tamai, Seigo Amachi  
(Fac. Horticul., Chiba Univ.)

**Key words** bromate, *Rhodococcus*, diaphorase, redox mediator

### 3P-1a112 硫黄酸化細菌を利用したタングステン含有コンクリート中のタングステンの迅速分析

○杉尾 剛<sup>1</sup>, 杉尾 理恵<sup>1</sup>, 根岸 敦規<sup>2</sup>, 井川 秀樹<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>杉尾化学合成独立栄養細菌研, <sup>2</sup>安藤ハザマ・技研, <sup>3</sup>日本ヒューム・技研)  
tcmry-sugio@nifty.com

【目的】浄化処理施設や下水管などのコンクリート構造物が硫黄細菌の作用で急速に腐食・泥状化する現象が社会問題になっている。この現象は、下水環境に存在する硫化水素が硫黄細菌によって硫酸に変換され、この硫酸がコンクリート成分の水酸化カルシウムと反応して硫酸カルシウム(石膏)を生成するために起こる。演者らはコンクリート腐食を遅延させる目的で、硫黄細菌の増殖を強く阻害するタングステン(W)を混入させたコンクリートを開発している。今回、コンクリート中の W を迅速に分析できる簡便法の開発を目指した。【方法及び結果】50 ml 容の蓋付透明容器に、20 ml の無機塩培地(pH 2.5)と 3.4 ml の酸性 buffer を加え、更に 0.2 ml の硫黄細菌培養液、EDTA(0.002 mmol)、元素硫黄 250 mg、テトラチオン酸(2 mg)、プロモクレゾールグリーン溶液 1 ml を加えた(全容量、25.5 ml)。微粉末状の W 無添加コンクリート、3 種類の W 添加コンクリート[4、8、20 kg W/m<sup>3</sup>]を各々 100 mg 添加する事によって反応を開始した。激しく攪拌後、反応溶液の pH と色調変化を 30 分毎、2 時間に渡って測定した。使用した硫黄細菌は、*Acidithiobacillus thiooxidans*、*Thiomonas intermedia*、*Paracoccus versutus*、*Starkeya novella* の 4 種類である。2 時間後の反応液の pH と色調は、W 無添加コンクリート(3.92、黄緑)、W 添加コンクリート[4、8、20 kg W/m<sup>3</sup>](4.22、緑青)、(4.57、青)、(4.68、青)であった。調製直後のコンクリートは pH12-13 で水に懸濁するとアルカリ性を示す。硫黄細菌の硫酸生成を強く阻害する W 添加コンクリートと比較して W 無添加コンクリートは、硫黄化合物の存在下、より多量の硫酸を生成するのでアルカリ化が遅れたと推定した。本分析法を用い反応 2 時間後の色調と pH を観察することで、コンクリート中に W が存在するか否かを迅速に判定することが可能である。

#### A rapid analysis of tungsten in a tungsten-mixed portland cement by use of sulfur-oxidizing bacteria

○Tsuyoshi Sugio<sup>1</sup>, Rie Sugio<sup>1</sup>, Atsunori Negishi<sup>2</sup>, Hideki Igawa<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Sugio Inst. of Chemolithoautotrophy, <sup>2</sup>Hazama Ando Corp, Tech., <sup>3</sup>Tech. Res. Lab. Nippon Hume Corp.)

**Key words** tungsten, portland cement, sulfur-oxidizing bacteria

### 3P-1a113 化学物質の微生物に対する毒性を評価するフロー式蛍光計測システムの開発

○櫻井 琢磨, 新谷 政己, 木村 元彦, 金原 和秀  
(静大・創科技院)  
tkkimba@ipc.shizuoka.ac.jp

**【目的】** 化学物質の微生物の呼吸活性に対する影響を解析し、毒性を評価することは、環境における化学物質の動態を考えるうえで重要な基盤情報である。そこで、微生物の基本生命活動の一つである転写に着目し、mRNA量から生理活性を計測することで、微生物に対する化学物質の毒性を評価する手法の開発を行った。

**【方法】** 多流路型デバイスを用い、流路上の細胞の蛍光を簡易かつ経時的に観察する計測装置を作製した。LEDで励起させた蛍光を、フィルターを通して蛍光波長のみを取得し、フォトダイオードで検出した。蛍光試薬として mRNA を染色し、蛍光を発するチオフラビン T を用いた。E. coli DH5 $\alpha$  の OD<sub>600</sub> = 0.6 に調整した菌液を同じ培地で 10 倍に希釈し、1 mL をシリンジで滅菌したデバイスに流し込み、1 時間静置させ、細胞を定着させた。定着後、デバイス一式を蛍光計測装置に組み込み、37℃のインキュベータに入れた。培地を連続供給し、蛍光変化を 2 時間おきに 1 分間計測した。測定開始から 12 時間後に 0.1 $\mu$ m フィルターを通して毒性物質を注入し、36 時間後まで継続して蛍光計測を行った。データは Labview (National Instruments™) を用いてプログラムを作成し、取得した。

**【結果】** 毒性物質の添加が無い場合、培地供給開始 6 時間後から 24 時間後まで蛍光強度は直線的に上昇した後、定常化した。培地供給開始から 12 時間後に毒性物質を添加すると、毒性物質添加後から蛍光強度の減少が見られた。また、添加する毒性物質の作用機作の違いにより蛍光強度の減少に違いが見られた。特に mRNA 合成阻害剤のリファンピシンを添加すると、添加直後に蛍光強度の大きな低下が認められ、初期値近くまで減少した。よって、本手法で測定することで、流れを持つ環境を模しながら、連続的かつ経時的に微生物に対する毒性物質の影響を評価することが可能であると示唆された。

#### Development of a flow-type of measuring device for evaluating microbial toxicity of chemicals

○Takuma Sakurai, Masaki Shintani, Motohiko Kimura, Kazuhide Kimbara  
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** toxicity, Thioflavin T, Fluorescence

### 3P-1a114 海洋底泥中における共生系アルギン酸分解メカニズムの解明と揮発性脂肪酸生産への応用

○喜多 晃久<sup>1,3</sup>, 三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 秋 庸裕<sup>1,3</sup>,  
松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 田島 啓久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>, 西尾 高道<sup>1</sup>, 中島 田 豊<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質,<sup>2</sup>広島大院・工・エネ環,<sup>3</sup>JST・CREST)  
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

**【背景と目的】** 褐藻類は海洋中に豊富に存在し、第 3 世代バイオマスとして注目されている。アルギン酸は褐藻類由来の有望な炭素源であり、近年ではエタノール、ビリン酸、そして揮発性脂肪酸 (VFAs) の発酵生産基質としても利用されているが、その報告例はまだ少ない。VFAs は 6 個以下の炭素原子からなる短鎖脂肪酸であり、バイオプラスチックやバイオガス、バイオディーゼル生産などへ広く応用できる。これまで、VFAs の商業生産は主に化学合成によって行われてきたが、石油価格の高騰などにより、生物学的生産への関心が高まっている。一方、アルギン酸は難分解性多糖であり、褐藻類を微生物によって有用物質へ変換する際の律速因子となることが報告されているが、近年の我々の研究において、海洋底泥中の菌叢が、いとも簡単にアルギン酸を分解し得ることを見出し得た。しかしながら、これまでに、海洋底泥中の共生系によるアルギン酸分解メカニズムの詳細な報告例はない。そこで、本研究では海洋底泥中からアルギン酸分解菌叢を取得し、その共生系による分解機構に関する知見を得るとともに、アルギン酸から VFAs を高効率に生産することを目的とした。**【方法・結果】** 有明海および広島湾由来の底泥をアルギン酸培地 (3% NaCl) に接種し、30℃および 37℃で 7 日間培養ごとに継代培養 (10% 植菌) を行った。継代が進むにつれ、約半数のサンプルで増殖が不安定となったが、残りの半数は安定して増殖し、主に酢酸を生産していた。5 世代継代培養後、Totla VFAs yield (g/g carbon) が高く、酢酸生産量が 10mM 以上であった 4 サンプルを選択し、以降の実験に用いることとした。現在、菌叢解析およびリアクターによる VFAs 生産の最適条件の検討を行っている。

#### Symbiotic alginate degradation mechanism in marine sediment and its application to VFAs production

○Akihisa Kita<sup>1,3</sup>, Toyokazu Miura<sup>1,3</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>,  
Yukihiko Matsumura<sup>2,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1,3</sup>, Junichi Kato<sup>1</sup>, Naomichi Nishio<sup>1</sup>,  
Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Div. Ener. Environ., Inst. Eng. Hiroshima Univ., <sup>3</sup>JST・CREST)

**Key words** alginate, volatile fatty acids, marine environment, symbiosis

### 3P-1a115 Alginate degradation product of anaerobic bacterium supports growth of oleaginous thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp.

○Kim Hazel V. Arafles<sup>1</sup>, Yuri Eramoto<sup>1</sup>, Kenshi Watanabe<sup>1</sup>,  
Akihisa Kita<sup>1</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1</sup>,  
Yukihiko Matsumura<sup>2,3</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)  
aki@hiroshima-u.ac.jp

The use of seaweed biomass as fermentation substrates is revolutionizing the way biofuels, chemicals, and other bioactive compounds are being made. Their carbohydrate backbones, however, pose challenges to scientists to develop new ways of pre-treating them prior to feeding to productive strains. In this study, biocatalytic conversion of alginate, a major sugar of brown seaweeds, using whole cells of an anaerobic bacterium isolated from a marine sediment consortium was employed due to its independence from the need of specialized equipment, and estimated lower running costs. Culture supernatants of this newly characterized anaerobe, *Dysgonomonas alginatilytica*, after being supplemented to peptone-yeast extract-seawater media, supported the growth of the oleaginous thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. Anion-exchange chromatography of the supernatant has shown that one fraction supports the growth of the thraustochytrid. Chromatographic separation and mass spectrometric analysis are ongoing to identify the bioactive compound. This work aims to give insight into the alginolytic pathway of *D. alginatilytica*, and give us further understanding of the roles the thraustochytrids play in the marine carbon cycling system.

#### Alginate degradation product of anaerobic bacterium supports growth of oleaginous thraustochytrid, *Aurantiochytrium* sp.

○Kim Hazel V. Arafles<sup>1</sup>, Yuri Eramoto<sup>1</sup>, Kenshi Watanabe<sup>1</sup>, Akihisa Kita<sup>1</sup>,  
Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1</sup>, Yukihiko Matsumura<sup>2,3</sup>,  
Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)

**Key words** macroalga, biomass conversion, biocatalysis, thraustochytrid

### 3P-1a116 コーンコブ糖化液中の発酵阻害物質に耐性を示す酵母のスクリーニング

○石田 奨, 荒川 知子, 加藤 勇太, 小西 正朗  
(北見工大)  
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

#### 【背景および目的】

リグノセルロースバイオマスは、燃料や化学製品生産のための再生可能な資源として、将来有望とされており、リグノセルロースを含む多糖を加水分解して得られる単糖を原料に、酵母によって有用物質を生産する試みが行われている。ただし、単糖を得るためには、リグノセルロースが持つ強固な繊維構造を前処理によって破壊しなければならない。この時、微生物反応に悪影響を与える発酵阻害物質が発生することが大きな問題となっている。我々は、阻害物質に耐性を持つ酵母を宿主とし、合成生物学的手法による育種を組み合わせることで阻害を受けない微生物生産系の構築を着想した。本研究では、環境中から宿主として利用できる発酵阻害物質耐性酵母の取得を試みた。

#### 【方法ならびに結果】

糖化液中の発酵阻害物質は HPLC と GC-MS により測定した。酢酸、フルフラール、バニリン、ヒドロキシメチルフルフラールはそれぞれ 182、9.21、3.58、0.26 mM であった。北見工業大学屈路研究所周辺で土壌をサンプリングし、作製した糖化液中で増殖可能な酵母を集積培養した後、YM 寒天培地で酵母を分離した。糖化液中での増殖が確認できた単離株 KS47-1 株は、リボゾーマル RNA の DNA 配列に基づいた系統解析ならびに形態観察、生化学的性状試験により *Pichia membranifaciens* と同定された。KS47-1 株とその近縁種 6 株ならびに *Saccharomyces cerevisiae* について、糖化液で再度培養特性を評価した。KS47-1 株は糖化液で良好な増殖を示したが、その他の株は増殖しなかった。KS47-1 株はコーンコブ糖化液に含まれる発酵阻害物質により増殖阻害を受けないことがわかった。

#### Isolation of yeast with resistibility against growth inhibitors in corn cob hydrolysate

○Masashi Ishida, Tomoko Arakawa, Yuta Kato, Masaaki Konishi  
(Kitami Inst. Technol.)

**Key words** *Pichia membranifaciens*, growth inhibitor, hydrolysates, biorefinery

### 3P-1a117 高セルロース含有コーンコブ残渣を原料とした同時糖化発酵による D-乳酸の効率的生産

○谷口麻菜美, 堀内 淳一, 熊田 陽一  
(京工繊大院・工学科)  
horiuchi@kit.ac.jp

[背景と目的]近年 L-乳酸から作られるポリ乳酸(PLLA)に D-乳酸由来のポリ乳酸(PLDA)を混合させることにより耐熱性等が向上することが明らかになり、D-乳酸の需要が高まっている。本研究ではバイオマスを原料としてバイオプロセスにより有用化学物質を生産するバイオリアファイナリー研究の一環として、コーンコブからヘミセルロース成分を抽出した後のセルロース含有率の高いコーンコブ加水分解残渣(corn cob residues, CCR)を用いた同時糖化発酵(SSF)による L-乳酸生産について報告した。本研究では CCR を用いた D-乳酸の効率的生産方法の確立を目的とした。

[方法と結果] 乳酸発酵には *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (JCM1012)を用いた。2L 容ジャーフェーマンターを用い、pH、温度をそれぞれ 6.0、37°C に制御しグルコースを炭素源とした MRS 培地を用いて回分培養を行ったところ、初期グルコース濃度 20g/L~60g/L の条件で良好な乳酸生産が認められグルコースはホモ乳酸発酵によりほぼ全量 D-乳酸へ変換されることが明らかになった。CCR はコーンコブを 1.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により 120°C、60min の条件で処理し、ヘミセルロース成分を抽出後、洗浄し、乾燥させた。この CCR は約 60% のセルロースを含有する。次にこの CCR を単一炭素源とし、糖化酵素としてメイセラゼ(明治)を用いる SSF による D-乳酸生産を検討した。培養条件は回分培養と同様としメイセラゼ添加量 51.8FPU/g-CCR としたところ、50g/L の CCR から 30.6g/L の D-乳酸が得られた。収率は 0.64g/g-CCR、生産性は 0.67g/L/h であった。次に CCR を逐次添加する SSF を行った。逐次添加を 1 回行ったところ、収率を維持しつつ CCR 100g/L から 64.5g/L の D-乳酸生産が達成された。現在、逐次添加量を増加させ D-乳酸生産のさらなる高濃度化について検討中である。

[参考文献] 1) 堀内淳一, 化学工学, 77, 12, 845-848 (2013)

#### Efficient production of D-Lactic acid from cellulose enriched corn cob residue by simultaneous saccharification and fermentation

○Manami Taniguchi, Jun-ichi Horiuchi, Yoichi Kumada  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

**Key words** biorefinery, simultaneous saccharification and fermentation, corn cob, D-lactic acid

### 3P-1a118 ビフェニル/PCB 分解細菌のリグニン由来芳香族化合物代謝酵素の探索と同定

○渡邊 崇人<sup>1</sup>, 藤原 秀彦<sup>2</sup>, 末永 光<sup>3</sup>, 木村 信忠<sup>3</sup>, 廣瀬 遼<sup>4</sup>, 二神 泰基<sup>5</sup>, 後藤 正利<sup>6</sup>, 古川 謙介<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>京大・生存研, <sup>2</sup>別府大・食物栄養, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス, <sup>4</sup>宮崎大・工, <sup>5</sup>鹿大・農, <sup>6</sup>佐賀大・農)  
takahito@rish.kyoto-u.ac.jp

[目的] 自然界から供給される芳香族化合物の多くは植物リグニン由来である。リグニンは木材腐朽菌等により部分分解されるとその分解生成物である芳香族化合物の多くは土壌中に供給される。土壌中には、リグニンから供給された芳香族化合物を分解する細菌が数多く存在する。我々は、これまでに土壌中より *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属を始めとするビフェニル/PCB 分解細菌を十数株単離し、それらの遺伝生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた。本研究では、これらの細菌の育種を通じて、木質バイオマス、特に、リグニン分解生成物からの芳香族化合物を含む有用物質生産を最終目的とする。今回は、ビフェニル/PCB 分解細菌のゲノム情報やプロテオミクスの手法を用いて有用物質生産に有用な酵素や遺伝子の探索を試みた。

[方法・結果] 最初に、リグニン分解生成物等に対する資化性が良好であるビフェニル/PCB 分解細菌を選抜した。次に、基質(芳香族化合物)を添加及び非添加の培養条件でその選抜した菌株を培養し、調製したタンパク質を異なる波長を持つ 2 種類の蛍光色素でそれぞれ標識・混合後、二次元電気泳動に供した。泳動後、それぞれの蛍光波長でゲルイメージを異なる色で取得した。これらのイメージを重ね合わせると、色の違いから発現量の変化を視覚的に捉えることが可能となった。また、基質の添加によって誘導されるタンパク質のスポットも容易に特定でき、さらに、質量分析及びデータベースの検索によりタンパク質の同定が可能となった。一方、ゲノム解析を行ったビフェニル/PCB 分解細菌のゲノム情報を精査した結果、細菌由来のリグニンペルオキシダーゼ遺伝子と相関性の高い遺伝子が存在し、そのクローニングに成功したので合わせて報告したい。

#### Screening and identification of enzymes from biphenyl/PCB-degrading bacteria that metabolize lignin-derived aromatic compounds

○Takahito Watanabe<sup>1</sup>, Hidehiko Fujihara<sup>2</sup>, Hikaru Suenaga<sup>3</sup>, Nobutada Kimura<sup>3</sup>, Jun Hirose<sup>4</sup>, Taiki Futagami<sup>5</sup>, Masatoshi Goto<sup>6</sup>, Kensuke Furukawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>RISH, Kyoto Univ., <sup>2</sup>Fac. Food Nut., Beppu Univ., <sup>3</sup>BPRI, AIST, <sup>4</sup>Fac. Eng., Univ. Miyazaki, <sup>5</sup>Fac. Agric., Kagoshima Univ., <sup>6</sup>Fac. Agric., Saga Univ.)

**Key words** lignin, biphenyl/PCB, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*

### 3P-1a119 リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産

○菊地 晟弘<sup>1</sup>, 杉田 晴佳<sup>1</sup>, 顏 昊<sup>1</sup>, 高橋 健司<sup>2,3</sup>, 上村 直史<sup>2,3</sup>, 政井 英司<sup>2,3</sup>, 園木 和典<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>弘前大院・農生, <sup>2</sup>長岡技術大院・工, <sup>3</sup>ALCA, JST)  
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

#### [目的]

ムコン酸はポリアミドやポリエステルなどの多様なポリマーの合成原料であるアジピン酸やテレフタル酸などへと展開できる基幹化学品である。これまで再生可能である植物バイオマス由来の糖質を原料としたムコン酸生産が提案されてきたが、プロトカテック酸脱炭酸酵素の活性化が課題であった。我々はこの酵素活性を向上させるタンパク質(KpdB)を同定し、KpdB の発現がムコン酸生産を効率化することを報告してきた。本研究では、プロトカテック酸がリグニン由来する多様な芳香族化合物の中間代謝物であることに着目し、リグニン由来のフェノール類を原料としたムコン酸生産について検討した。

#### [方法・結果]

プロトカテック酸及びムコン酸の資化能を欠損させた *Pseudomonas putida* IDPC 株を宿主とし、*Klebsiella pneumoniae* 由来の protocatechuate decarboxylase (*aroY*, *kpdB*)、*P. putida* 由来の vanillate demethylase (*vanA*, *vanB*) および catechol-1,2-dioxygenase (*catA*)、*p*-hydroxybenzoate hydroxylase (*pobA*) を発現する微生物株を作出し、複数のリグニンモデル化合物からのムコン酸生産能力を評価した。本研究で作出した微生物株は、理論収量に対してバニリン酸からは 102.1±2.37%、*p*-ヒドロキシ安息香酸からは 104.4±2.64%、*p*-クマル酸からは 93.2±2.33%、フェルラ酸からは 100.0±1.13% の収率にてムコン酸を生産可能な株であった。稲わら由来のフェノール類には主に *p*-クマル酸とフェルラ酸が含まれていた。そこで 5g の *p*-クマル酸とフェルラ酸を基質として試験した結果、それぞれ理論収量のムコン酸が生産された。さらに稲わらから抽出したリグニン由来するフェノール類からもムコン酸が生産出来ることを確認した。

本研究は、戦略的創造研究推進事業先端的低炭素技術開発 (ALCA)、科学研究費補助金の支援を受けて実施した。

#### Muconic acid production from lignin-related phenols

○Akihiro Kikuchi<sup>1</sup>, Haruka Sugita<sup>1</sup>, Kou Gan<sup>1</sup>, Kenji Takahashi<sup>2,3</sup>, Naofumi Kamimura<sup>2,3</sup>, Eiji Masai<sup>2,3</sup>, Tomonori Sonoki<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ., <sup>3</sup>JST・ALCA)

**Key words** muconic acid, lignin-related phenols, lignin

### 3P-1a120 酵素糖化残渣リグニンを原料としたリグノモノマーの生産とその生物変換への応用

○落合 芋葉子<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)  
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

[目的] 木質系バイオマスをイオン液体前処理・酵素糖化することにより得られる酵素糖化残渣リグニンは、複雑な構造であるリグニンを多く含むため有効な利用法が確立されていない。そこで本研究では、その利用法の一つとして、まずその酵素糖化残渣リグニンをリグニン酸化分解法の一つであるアルカリ酸化分解法を用いて、さまざまな物質に変換可能なリグノモノマーへ分解した。その際、既存のリグニン製造法で得られたリグニンとリグノモノマー収率の比較を行った。

[方法および結果] アルカリ酸化分解法で原料に用いたユーカリは、主にバニリンとシリンガルデヒドという 2 つのリグノモノマーに分解されるため、その 2 つを対象としてリグノモノマー収率を求めた。イオン液体前処理・酵素糖化で得られた酵素糖化残渣リグニンからのリグノモノマー収率は 48.0% であった。また、アルカリ蒸解法で得られたソーダリグニン、希硫酸前処理・酵素糖化で得られた酵素糖化残渣リグニンからのリグノモノマー収率は、それぞれ 29.0%、39.5% となった。よって、どの既存法で得られたリグニンよりもイオン液体前処理・酵素糖化で得られた酵素糖化残渣リグニンからのリグノモノマー収率の方が高い結果となった。さらに、リグノモノマーから樹脂原料を得るために必要な遺伝子を導入した遺伝子組換え生物を用いた変換結果についても報告する。

#### Lignin monomer production from enzymatic saccharification residue lignin and application to the bioconversion

○Kobako Ochiai<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

**Key words** Lignocellulosic biomass, Ionic liquid pretreatment, Lignin monomer

### 3P-1a121 酵素糖化残渣リグニンを硬化剤として用いたエポキシ樹脂の合成

○井上 優里<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)  
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】木質系バイオマスをイオン液体前処理・酵素糖化することによって得られる残渣は、分子量が大きい上に複雑かつ未知な構造であるリグニン(以下、糖化残渣リグニン)を多く含むため、有効な利用法が確立されていない。しかし、リグニンはフェノール性高分子であるため、材料学的視点から芳香族系化合物の原料として用いることができると考えられる。そこで本研究では、糖化残渣リグニンからメタノール抽出によって低分子量化合物を得たのち、それをエポキシ樹脂の硬化剤として用いることができるか検討し、糖化残渣リグニンの有効利用を目指した。比較のためにクラフト蒸解リグニンも用いた。

【方法および結果】糖化残渣リグニンおよびクラフト蒸解リグニンにおいて、どちらもメタノール抽出によって3,000の低分子量化合物を得ることができた。また、リグニン純度は糖化残渣リグニンのメタノール抽出物は75%、クラフト蒸解リグニンのメタノール抽出物は100%となることがわかった。水酸基当量においてはそれぞれ15.0 mmol/g、5.84 mmol/gとなった。エポキシ樹脂硬化物には、エポキシ樹脂と硬化剤、硬化促進剤を混合させ、加熱することにより得た。コントロールのために一般的な硬化剤であるフェノールノボラックを用いた。熱分解挙動を評価したところ、糖化残渣リグニンのメタノール抽出物ではコントロールよりも重量5%分解温度が10%ほど低いことがわかった。また、示差走査熱量測定での発熱ピーク温度と活性化エネルギーは、糖化残渣リグニンのメタノール抽出物を硬化剤として用いたとき、コントロールよりも高い値となることがわかった。しかしながら、糖化残渣リグニンのメタノール抽出物とコントロールは大差なく、糖化残渣リグニンのメタノール抽出物はエポキシ樹脂硬化物として機能することがわかった。

#### Synthesis of epoxy resin using saccharification residue lignin as curing agent

○Yuri Inoue<sup>1</sup>, Kazuaki Ninomiya<sup>2</sup>, Yota Tsuge<sup>2</sup>, Kenji Takahashi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

**Key words** Saccharification residue lignin, Curing agent, Epoxy resin

### 3P-1a122 リグノセルロース系バイオマスのみからなるノボラックフェノール樹脂の合成

○山岡 幸太郎<sup>1</sup>, 仁宮 一章<sup>2</sup>, 柘植 陽太<sup>2</sup>, 高橋 憲司<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・新学術)  
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】フェノール樹脂は化石資源を原料として合成される熱硬化性のプラスチックである。化石資源の枯渇化を考慮すれば、再生可能な植物由来の原料に置き換える必要がある。そこで本研究では、グルコースの分解生成物である5-hydroxymethyl-furfural (HMF)とバイオオイル(木質バイオマスの急速熱分解物)中のリグノフェノールとを反応させフェノール樹脂プレポリマーとし、それをリグニンで硬化することで、完全にバイオマスのみが原料となったフェノール樹脂の合成を目的とする。その際、バイオマスから純粋なグルコースを効率よく得る必要がある。近年、食物との競合がないリグノセルロース系バイオマスが注目されているが、強固なリグノセルロースを有しているため、その構造を緩和させるための前処理が必要である。本研究では酸性イオン液体(酸性IL)を用いる前処理でグルコース分画をする最適条件の検討も行った。

【方法および結果】酸性イオン液体 BmimHSO<sub>4</sub> の水溶液と原料バイオマスのバグスを混合し、前処理温度と酸性イオン液体濃度を変化させて3h糖化前処理を行なった。前処理温度について前処理残渣中に160℃以上でヘミセルロース成分がほとんど残っていないこと、また160℃で糖化液のグルコース純度が高いことより160℃が適切であるとした。酸性IL濃度については、高濃度でセルロース糖化率が高いことより3Mが適切だとした。また、グルコースとバイオオイルを原料としてプレポリマーを合成し、リグニンを硬化剤としてフェノール樹脂を作製したところ、 $T_{gs} = 280.8^{\circ}\text{C}$ 、 $R_{600} = 48.9\%$ となり石油由来フェノール樹脂と比較すると、それぞれ20℃、15%程熱安定性に劣ることが分かった。しかし、環境面を考慮すれば優れているとされる。

#### Synthesis of novolac phenol resin totally derived from lignocellulose biomass

○Kotaro YAMAOKA<sup>1</sup>, Kazuaki NINOMIYA<sup>2</sup>, Yota TSUGE<sup>2</sup>, Kenji TAKAHASHI<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

**Key words** 5-hydroxymethyl-furfural, bio-oil, novolac phenol resin

### 3P-1a123 林地残材糖化液を原料とした乳酸発酵生産

○荒井 隆益<sup>1</sup>, 池 正和<sup>2</sup>, 小杉 昭彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>国際農研セ, <sup>2</sup>農研機構・食総研)  
 tkara@affrc.go.jp

林地残材(間伐材)は国内最大の未利用資源であり、残材からリグニンを抽出し高付加価値製品への転換を目指しており、その抽出課程で排出される多糖類副産物(セルロース、ヘミセルロース)の高度利用技術の開発を行っている。多糖類副産物由来の糖液を用い、乳酸製造技術を開発し、乳酸オリゴマー化による肥効調節型機能性肥料の被覆材の開発を最終目標に研究を行っている。発表では、リグニン抽出後に排出されるリグノセルロース残渣糖化液から乳酸の効率的生産方法の検討を行った。

乳酸発酵には *Bacillus coagulans* を使用した。林地残材を糖化した糖液は、グルコースやキシロースが主要な単糖であるために、保存菌株から両糖を効率的に乳酸発酵する *B. coagulans* 169 菌株を選抜した。糖化液の原料は、林地残材からリグニン抽出後に排出されるヘミセルラーゼ残渣である。残渣は、リグニン抽出工程で使用した化合物を蒸留水で洗浄した後、市販酵素を用いて酵素糖化した。林地残材糖化液の糖濃度は、総グルコース 62.5mg/ml、総キシロース 2.2mg/ml であった。最適培養条件で糖化液の乳酸発酵を行った。糖化液は、80℃、1時間インキュベートし糖化酵素を失活させたのち、pH6.0に調整し、ミネラル及び酵母エキスを加えた培地を作成して乳酸発酵を行った。発酵72h後に乳酸濃度 6.25%に達し、対糖収率 96%であった。高濃度の糖化液に対応できるかを調べるために濃縮した糖液を作成した。10.5%まで濃縮した糖液を用いて乳酸発酵を行った結果乳酸の濃度は9.4%であった。濃縮した糖液を用いた糖化液においても対糖収率 90%であった。このことから糖化液中に乳酸発酵を阻害する濃度の阻害物質は含まれていないものと思われる。また中和コストの削減のために酸耐性株の使用も検討しており、その結果についても報告する。

#### The lactic acid production from residual forest wood

○Takamitsu Arai<sup>1</sup>, Masakazu Ike<sup>2</sup>, Akihiko Kosugi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>JIRCAS, <sup>2</sup>NFRI)

**Key words** *Bacillus coagulans*, bioconversion, lactic acid

### 3P-1a124 乳酸デヒドロゲナーゼを異種発現する白色腐朽菌による木質バイオマスからの乳酸生産

○加古 博子<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)  
 hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【目的】持続可能型社会の実現あるいは地球温暖化対策に向けた取り組みの一つとしてバイオマス由来プラスチックの研究が盛んに行われている。バイオマス由来プラスチックの一つとしてポリ乳酸があるが、前処理技術や製造コストなどの問題から木質バイオマスを原料とした実用化には至っていない。白色腐朽菌は木質バイオマスの低コスト前処理法として期待される微生物である。本実験では白色腐朽菌に乳酸産生能を付与し、かつエタノール発酵の鍵酵素をノックダウンした株を作出し、ブナ木粉からの直接的な乳酸生産を試みた。

【方法・結果】*Bifidobacterium longum* 由来乳酸デヒドロゲナーゼ (*bldh*) とマーカー遺伝子をウラルシ要求性変異株に共形質転換することで白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の乳酸産生株を作出した。この乳酸産生株はグルコースを炭素源として含む液体培地において半嫌気条件下において乳酸を生じた。乳酸産生能は RNAi 法を用いたピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (*Pspdc*) のノックダウンにより改善され、さらに培地に CaCO<sub>3</sub> を添加することで蓄積量が増加した。*Pspdc* ノックダウンかつ *bldh* 発現形質転換体をブナ木粉にて脱リグニンのために好気条件下で培養した後に、炭素源抜きの液体培地を加え半嫌気条件下で培養することで、木材からの単一微生物による乳酸生産を試みた。培養後、培地の培養上清を回収し HPLC 分析に供したところ、木材からの乳酸産生が確認された。半嫌気培養時のセルラーゼ添加は木粉からの乳酸産生 (0.29 g/L) には必須ではなかったが、添加によって乳酸産生量は 1.44 g/L にまで著しく改善した。

#### Lactic acid production from woody biomass by white-rot fungus expressing lactate dehydrogenase gene

○Hiroko Kako<sup>1</sup>, Toshio Mori<sup>1</sup>, Hirokazu Kawagishi<sup>1,2,3</sup>, Hirohumi Hirai<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green sci. Technol., Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** *Phanerochaete sordida* YK-624, woody biomass, lactate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase

### 3P-1a125 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による木質バイオマスからの水素産生

○曾我 亜由美<sup>1</sup>, 高橋 沙綾<sup>1</sup>, 有本 美沙<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>静大・農, <sup>2</sup>静大・グリーン研, <sup>3</sup>静大・創科技院)

hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

#### 【背景と目的】

近年、地球温暖化や化石資源の枯渇問題から、利用段階で二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーである水素が注目されている。現在のところ、水素は一般的に水の電気分解や化石燃料を原料とした水蒸気改質などにより製造されているが、製造過程で二酸化炭素が排出される等、環境負荷が問題となっている。そこで、低炭素循環型社会の実現のため、カーボンニュートラルなバイオマスからの水素産生に関する研究が展開されている。本研究では、自然界より分離した白色腐朽菌を用いた木質バイオマスからの水素産生を目標とし、水素産生特性の調査及び水素産生能向上を試みた。

#### 【方法と結果】

自然界より分離した白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株を、発酵液体培地を含むバイアル瓶に接種して密栓後、半嫌気条件下で 30℃、2 週間培養した。その結果、本培養条件下にて水素の産生が認められた。また、本培養系において得られた菌体より total RNA を抽出後、RT-PCR により発現解析を行ったところ、ヒドロゲナーゼ遺伝子が発現していることが確認された。このことから、*T. versicolor* K-41 株による水素産生にヒドロゲナーゼ遺伝子が関与していることが示唆された。さらに、スギ木粉に発酵液体培地を添加した木粉培地に *T. versicolor* K-41 株を接種し、好気条件下で 1 週間前培養後、半嫌気条件下で 10 日間培養した系と、菌体接種後即座に半嫌気条件下で 10 日間培養した系における水素産生量を測定した結果、どちらの系においても水素産生が認められ、前培養した系でより高い水素産生量および高い木材分解率を示した。以上の結果より、*T. versicolor* K-41 株は木質バイオマスから水素産生が可能であることが証明された。

#### Hydrogen production from woody biomass by white-rot fungus *Trametes versicolor* K-41

○Ayumi Soga<sup>1</sup>, Saaya Takahashi<sup>1</sup>, Misa Arimoto<sup>1</sup>, Toshio Mori<sup>1</sup>,

Hirokazu Kawagishi<sup>1,2,3</sup>, Hirofumi Hirai<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.,

<sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** white-rot fungi, hydrogen production, hydrogenase gene

### 3P-1a126 *Clostridium cellulovorans* および *Clostridium beijerinckii* の共培養系によるシュガービートパルプからの有用物質生産

川出 雄二郎<sup>1</sup>, ○富田 寿男<sup>1</sup>, 岡崎 文美<sup>1</sup>,

López-Contreras Ana M.<sup>2</sup>, 田丸 浩<sup>1,3,4</sup>

(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>Wageningen UR・Food Biobased Res., <sup>3</sup>三重大・新産業, <sup>4</sup>三重大・生命支セ)

ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【背景と目的】 近年、化石資源の枯渇や大気中 CO<sub>2</sub> 濃度の上昇に伴う温暖化が地球規模の課題となっている。その解決策として、植物バイオマスを原料とした燃料や化学品などの生産技術であるバイオリファイナリーが注目されており、特に非可食資源であるセルロース系バイオマスの利活用が求められている。そこで本研究では、甜菜糖業の副生物であるシュガービートパルプ (SBP) からの有用物質生産を目的とし、糖化能力に優れた *Clostridium cellulovorans* および発酵能力に優れた *Clostridium beijerinckii* の共培養系による有用物質生産の基盤技術確立を試みた。

【方法】 SBP を 2 % (w/v) 含む液体培地に、*C. cellulovorans* 743B 株 (ATCC 35296) および *C. beijerinckii* NCIMB8052 株 (ATCC 51743) を接種し 37℃ で培養した。経時的に培養液をサンプリングし、OD<sub>600nm</sub> および pH を測定し、HPLC により糖類、有機酸類、アルコール類の各濃度を定量した。

【結果と考察】 *C. cellulovorans* は酵素製剤の添加無しに、単独で SBP を分解し、セロビオースおよびアラビノースを培養液中に蓄積した。*C. beijerinckii* との共培養においては、培地中に遊離したこれらの糖を、*C. beijerinckii* が資化、増殖し、酪酸およびブタノールを生産したことが示唆された。このことから、異なる糖化および発酵特性、糖利用性を有する *C. cellulovorans* および *C. beijerinckii* の共培養系が、SBP からの有用物質生産に適していることが考えられた。

#### Production of useful chemicals from sugar beet pulp by co-culture of *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*

Yujiro Kawade<sup>1</sup>, ○Hisao Tomita<sup>1</sup>, Fumiyo Okazaki<sup>1</sup>, Ana M. López-Contreras<sup>2</sup>,

Yutaka Tamaru<sup>1,3,4</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>2</sup>Food Biobased Res., Wageningen UR, <sup>3</sup>Ind.

Technol. Innov. Inst., Mie Univ., <sup>4</sup>Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

**Key words** *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium beijerinckii*, Sugar beet pulp, biorefinery

### 3P-1a127 Effect of Cassava Pulp Supplement on 1,3-propanediol Production by *Clostridium butyricum*

Waraporn Apiwatanapiwat<sup>1,2</sup>, Pilanee Vaithanomsat<sup>2</sup>,

○Akihiko Kosugi<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Kasetsart Univ.,

<sup>3</sup>JIRCAS)

akosugi@affrc.go.jp

The three-carbon diol 1,3-propanediol (1, 3-PD) is an important organic substrate for biopolymers such as polytrimethylene terephthalate. Glycerol is the main substrate of 1,3-PD production by fermentation with microorganisms such as *Clostridium butyricum*. However, the yield and productivity of 1,3-PD on glycerol are low because the growth and energy production are hampered by the low assimilation rate. To improve its 1,3-propanediol (1,3-PD) production, *C. butyricum* was cultivated on glycerol medium supplemented with cassava pulp (CP). At small concentrations, the CP improved the 1,3-PD productivity of *C. butyricum* from (0.25±0.01)g/L/h (glycerol alone) to (0.43±0.02)g/L/h (glycerol+2g/L CP) after 24h fermentation [1]. Fiber as by-product from cassava pulp is one of promising bioresources. *C. butyricum* 15-42 which has high starch degradation ability could produce 1,3-PD yield 0.706 mol/mol glycerol with production rate 0.14 g/L/h from 20 g/L glycerol. This study reports that supplementation of cassava fiber to glycerol medium can significantly improve the productivity and yield of 1,3-PD production by *C. butyricum*. Productivity rate and yield was increased to 0.66 g/L/h and 0.752 mol/mol glycerol from 20 g/L glycerol. The productivity rate of 1, 3-PD was decreased when glycerol concentrations were increased from 20 to 60 g/L, while supplementation of cassava fiber could improve the productivity rate.

[1] Apiwatanapiwat W. et al. J Biotechnol. 2016 doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.016.

#### Effect of Cassava Pulp Supplement on 1,3-propanediol Production by *Clostridium butyricum*

Waraporn Apiwatanapiwat<sup>1,2</sup>, Pilanee Vaithanomsat<sup>2</sup>, ○Akihiko Kosugi<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Kasetsart Univ., <sup>3</sup>JIRCAS)

**Key words** lignocellulosic materials, 1,3-propanediol, glycerol, fiber

### 3P-1a128 乾式法を用いた下水汚泥と稲わらの混合消化における稲わらの効果と微生物叢の解析

○野澤 太湖, 張 振亜, 雷 中方

(筑波大院・生命環境)

zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

【背景・目的】 乾式メタン発酵法は含水率が低いことから、消化液処理が不要であり、発酵残さは肥料として利用できる可能性を秘めており、優れた利点をもつと期待される。しかし、乾式メタン発酵法では有機物濃度が高いため、アンモニアによるメタン発酵阻害が起こりやすい点や高温発酵のための加温方法、汚泥の供給方法や完全混合のための攪拌方法、最適な負荷量、スタートアップの迅速化、長期安定運転管理技術など様々な研究課題が残されている。さらに、汚泥のみ、稲わらのみ、混合汚泥とそれぞれを比較し、稲わら投入の効果や最適なメタン発酵条件を見出す研究は行われていない。従って、様々な処理条件で乾式メタン発酵の特性を調べることが必要となる。特に、メタン発酵プロセスにおいて、炭素や窒素の挙動や微生物群集の解析が重要となるので本実験ではこれらに着目した研究を行った。

【方法・結果】 乾式メタン発酵効率を評価するために、異なる C/N 比 20:1、15:1、10:1 で基質を添加した際と稲わら、汚泥のみでのメタン発酵ポテンシャルをバイオガス生成量やガス組成などから分析した。稲わらを投入することで水素生産は向上した。一方、高い TS で発酵させたため、メタン生成量が伸びない結果となった。継いで遺伝子抽出キットを用い、汚泥中から DNA を抽出し、DNA を PCR にかけて増幅させ、DNA シークエンスにより塩基配列を決定した。その結果を用い、土壌中のバクテリアと古細菌の分布を分析する。さらに、バイオガス生産と微生物群集の関係を明らかにし、乾式メタン発酵に適した実験条件を検討していくことがこれからの課題である。

#### Microbial community analysis and Effect of rice straw to the co-digestion of sewage sludge and rice straw by solid-state anaerobic digestion

○Daisaku Nozawa, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei

(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** solid state fermentation, bioconversion, biomass, microbial community

### 3P-1a129 雑草を原料とした高 C/N 比メタン発酵における微生物群構成種の単離

○松田 修平, 大槻 隆司  
(山梨大院・医工総)  
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】雑草は、河川や公園などの下草刈りによって生じる豊富なバイオマスであるが、C/N 比が高く難分解性であるため、単独でメタン発酵の原料とすることは難しいとされてきた。我々は、雑草(C/N 比 200)のみを原料とした高 C/N 比条件下で安定的にメタン生産可能な微生物群を、集積培養により複数取得することに成功している。本研究では、微生物群構成微生物の同定を行うとともに機能を精査し、メタン生産に至る作用機序を明らかにするために、平板培養による単離を試みた。

【方法】1 mm 以下に粉末化した雑草(ギョウギシバ)を 1%(w/v)含む、0.1 M リン酸ナトリウムカリウム緩衝液(pH7.2)95 ml に、微生物群懸濁液 5 ml を接種、気相を窒素置換し、35℃で静置培養した。培養中、菌体を回収し DNA を抽出後、16S rDNA を標的とした PCR を経てクローニングし、サンガー法により配列決定した。単離操作は、雑草熱水抽出液、セルロース、キシラン、有機酸などをそれぞれ炭素源とした培地を用いて、希釈平板法により行った。

【結果・考察】16S rDNA のクローニングの結果、真正細菌は *Clostridium* 属、*Bacteroides* 属、メタン菌は *Methanobacterium* 属、*Methanomassiliococcus* 属などが検出された。一般的なメタン発酵の原料は C/N 比 20 前後だが、本研究で得た微生物群は、既知菌種が主体であるにもかかわらず、はるかに高 C/N 比条件下でメタン発酵が行えることから非常に興味深く、これまで知られているメタン発酵とは作用機序が異なる可能性が示唆された。単離操作を行った結果、雑草熱水抽出液を炭素源とした培地から数十株を取得し、現在、そのほかの培地においても単離を行っている。単離株より得た情報をもとに、各微生物の微生物群内における動態を調べ、高 C/N 比に特徴的なメタン生成機構を見出すことを目指す。

#### Isolation of bacteria from methanogenic community degrading weed waste in high C/N ratio condition.

○Shuhei Matsuda, Takashi Ohtsuki  
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

**Key words** methane fermentation, weed waste, high C/N ratio

### 3P-1a130 褐藻の耐塩半連続メタン生産における固形分添加量増加による過負荷の影響

○三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 喜多 見久<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 秋庸裕<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 田島 啓久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>, 中島 田 豊<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質,<sup>2</sup>広島大院・工・エネ環,<sup>3</sup>JST・CREST)  
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

これまでに、褐藻であるコンブを基質とした海洋底泥微生物の流加培養液を使用し、無加水生コンブに相当する 10 wt% 固形分の基質から、1.7 g VS/kg/day の OLR (organic loading rate, 有機物負荷)、46 日の HRT (hydraulic retention time, 水理学的滞留時間) で、定常状態に達した状態で半連続メタン生産を行った。本研究では、10 wt% 固形分の基質から調製した半連続培養液を使用し、高速処理のために、固形分添加量増加による OLR 上昇条件下で半連続メタン生産を行った。15 wt% 固形分の基質を使用したメタン生産は、塩濃度が上昇する条件下においても、300 mL/g VS を超えるメタン収量で、1.7 g VS/kg/day の OLR、68 日の HRT で行うことができ、メタン生成速度は 1.3 倍に上昇した。続く 20 wt% 固形分の基質を使用した、2.3 g VS/kg/day の OLR、68 日の HRT での培養において、3 本の培養液中 1 本の培養液が有機酸を蓄積し、メタン生産量が減少した。再度 15 wt% 固形分の基質を使用することにより負荷を戻したが、1 本の培養液のメタン生産は完全に阻害された。プロピオン酸蓄積、一時的な水素蓄積、酢酸蓄積の後、酢酸と水素の蓄積を伴った完全なメタン生産不安定化に至った。いずれの条件においても、古細菌において、水素資化メタン生成菌の割合が優先していたことから、メタン生成は、酢酸酸化と水素資化メタン生成によっても起こっている可能性が考えられた。よって、一時的な水素蓄積が酢酸酸化に影響を与え、メタン生産不安定化を引き起こしたのかもしれない。真正細菌において、加水分解/酸生成過程に関与するかもしれない細菌が不安定化時に増加していたことから、加水分解/酸生成過程と酸消費過程の不均衡化により、不安定化を引き起こされた可能性が示唆された。

#### Influence of organic overloading in semi-continuous methane production from brown algae

○Toyokazu Miura<sup>1,3</sup>, Akihisa Kita<sup>1,3</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>, Yukihiro Matsumura<sup>2,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1,3</sup>, Junichi Kato<sup>1</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Div. Ener. Environ., Inst. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)

**Key words** semi-continuous methane production, brown algae, organic overloading

### 3P-1a131 海洋性メタン発酵モデルの構築

○矢野 友寛<sup>1,3</sup>, 三浦 豊和<sup>1,3</sup>, 喜多 見久<sup>1,3</sup>, 田島 啓久<sup>1,3</sup>, 加藤 純一<sup>1</sup>, 秋庸裕<sup>1,3</sup>, 岡村 好子<sup>1,3</sup>, 松村 幸彦<sup>2,3</sup>, 中島 田 豊<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>広島大院・先端物質,<sup>2</sup>広島大院・工・エネ環,<sup>3</sup>JST・CREST)  
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】メタン発酵(嫌気消化)法は排水処理技術として、さらにエネルギー資源であるメタンを回収できる資源循環技術として利用されている。メタン発酵は多種多様な微生物が共存する系である。その複雑なプロセスの数式モデリングのために、嫌気消化モデル(Anaerobic Digestion Model No.1:ADM1)が国際水環境学会(IWA)によって 2001 年に提案された。現在、嫌気消化プロセスの開発・操作・最適化に ADM1 が広く用いられている。本研究室では海洋底泥を微生物源としたメタン発酵の研究を行っているが、それに含まれる塩分(2-3%)がメタン生成パフォーマンスに影響を及ぼすことがわかっている。しかし、ADM1 にはメタン発酵プロセスへの塩の影響に関する記述はない。そこで本研究では、塩分がメタン発酵プロセスに与える影響を動力学的に解析し、その効果を考慮したメタン発酵モデルの構築を目的とする。

【方法・結果】0-5%塩(NaCl)濃度条件下でのメタン発酵試験を実施した。微生物源として有明海産海洋底泥を、基質として天然コンプ 0.7mm 粉砕物を用いた。この試験で得られた培養液の塩濃度と最大メタン生成速度との関係性をもとに、塩阻害式を考案した。次に、中間生成物質(酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、水素)を唯一の基質とした 0-5%塩濃度条件下でのメタン発酵試験を実施した。実験データから、それぞれの基質を消費する各機能的微生物特有の塩阻害パラメータを解析・決定した。塩阻害式および塩阻害パラメータについて記述したプログラムコードを、既存のメタン発酵シミュレータに追加した。その結果、塩存在条件下におけるメタン発酵試験を、従来よりも高い精度で再現することができた。

#### The mathematical model for methane fermentation using marine biomass resources

○Tomohiro Yano<sup>1,3</sup>, Toyokazu Miura<sup>1,3</sup>, Akihisa Kita<sup>1,3</sup>, Takahisa Tajima<sup>1,3</sup>, Junichi Kato<sup>1</sup>, Tsunehiro Aki<sup>1,3</sup>, Yoshiko Okamura<sup>1,3</sup>, Yukihiro Matsumura<sup>2,3</sup>, Yutaka Nakashimada<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Div. Ener. Environ., Inst. Eng., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>CREST, JST)

**Key words** methane fermentation, macroalga, salt tolerance, mathematical model

### 3P-2a132 *Citrobacter* 属細菌におけるキトサン様バイオ凝集剤の多糖化・分泌関連遺伝子の探索

○武尾 正弘<sup>1</sup>, 池本 啓史<sup>1</sup>, 宮本 弘毅<sup>1</sup>, 木村 和幸<sup>2</sup>, 柏 雅美<sup>1</sup>, 加藤 太郎<sup>3</sup>, 根来 誠司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫県大院・工・2(株)兵庫分析センター,<sup>3</sup>鹿児島大院・理工)  
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

我々は、多くの *Citrobacter* 属細菌の菌株が酢酸から N-アセチルグルコサミン及びグルコサミンよりなるキトサン様バイオ凝集剤を培養液に分泌生産することを以前に報告した (Appl. Microbiol. Biotechnol., 97, 9569, 2013)。いくつかの凝集剤生産菌株のドラフトゲノム解析の結果、解析できた配列中に多糖化に関わると推定される複数の糖転移酵素の遺伝子を見出した。そこで、既に *Citrobacter* 属細菌で確立している相同組換え法を用いて、それらの遺伝子破壊を順次実施し、バイオ凝集剤の分泌生産との関連を調べた。

いくつかの糖転移酵素の候補遺伝子について、その対象遺伝子の上下流各 0.5kb 領域でカナマイシン耐性遺伝子を含んだ直鎖 DNA を PCR 法により合成し、これをバイオ凝集剤生産菌 *C. freundii* IFO13545 株などにエレクトロポレーション法で導入した。カナマイシン含有寒地培地で生育した遺伝子破壊候補株を取得し、PCR 法及びサザンハイブリダイゼーションにより遺伝子破壊を確認した。次に、取得した遺伝子破壊株を野生株とともに酢酸ナトリウムを炭素源とする無機塩培地で 30 度で 48 時間振盪培養し、その培養上清の凝集力価をカオリン懸濁法により測定した。遺伝子破壊により、IFO13545 株に凝集活性を低下させるものと完全に欠失させるもの 2 つの遺伝子の存在が明らかとなった。後者の遺伝子については、別の凝集剤生産菌 *C. freundii* GTC09629 で同じ遺伝子破壊を実施したところ、同じ結果が得られた。これらの結果から、この遺伝子が凝集剤生産に必須であることがわかった。この遺伝子は、N-アセチルグルコサミンの多糖化に関わる 444 アミノ酸よりなる糖転移酵素の遺伝子と推定され、上下流の 3 つの遺伝子とクラスターを形成していた。

#### Search for *Citrobacter* genes involved in polymerization and secretion of chitosan-like bioflocculant

○Masahiro Takeo<sup>1</sup>, Keishi Ikemoto<sup>1</sup>, Kouki Miyamoto<sup>1</sup>, Kazuyuki Kimura<sup>2</sup>, Masami Kashiwa<sup>1</sup>, Daiichiro Kato<sup>3</sup>, Seiji Negoro<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>Hyogo Anaysis Center Co. Ltd., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

**Key words** *Citrobacter*, chitosan-like biopolymer, polymerization, secretion mechanism

**3P-2a133  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の分子構造に関する一考察**

栗田 あかね<sup>1</sup>, 中野 太一<sup>1</sup>, 高橋 良輔<sup>2</sup>, 北村 進一<sup>2</sup>, 山口 良弘<sup>1,3</sup>,  
萩田 亮<sup>1,4</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>, ○藤田 憲一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪市大院・理, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>阪市大・複合先端, <sup>4</sup>阪市大・健康・研セ)  
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

納豆のネバネバの主成分である  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (PGA) は、水質浄化作用や免疫賦活効果など興味深い活性を有するバイオポリマーである。しかしながら、PGA を長期間放置すると、粘性や分子量が低下し、それらの活性も失われていく。今回、PGA の分子量低下メカニズムとして次の二つの仮説を立てた。PGA は一本鎖の超高分子量で、低分子化の際、アミド結合がランダムに切断され、N 末端が増加していくという説、もう一方は、生合成の過程で低分子の PGA が会合してできた見かけの超巨大分子が解離するため N 末端は増加しないという説である。

本研究では、発酵生産された PGA に熱処理を加えて、分子量を低下させたときに、アミノ基の数が増加していないか、アミノ基ラベル化試薬 *o*-Phtalaldehyde (OPA) を用いる蛍光標識法を用いて調べた。その結果、熱処理によってアミノ基の増加は認められなかった。加えて、アミノ基の数をベースとした場合、PGA の数平均分子量は 25 k であると計算された。また、SEC-MALS 解析を行った結果、熱処理を施したサンプルでは高分子量のピークが減少し、逆に重量平均分子量 28 k のピークが増加した。以上の結果より、PGA は約 28 k をベースとする会合体の形で発酵生産され、分子量の低下は会合体が解離することによっておこる可能性が非常に高まった。

**Studies on molecular structure of poly- $\gamma$ -glutamic acid**

Akane Kurita<sup>1</sup>, Taichi Nakano<sup>1</sup>, Ryosuke Takahashi<sup>2</sup>, Shinichi Kitamura<sup>2</sup>,  
Yoshihiro Yamaguchi<sup>1,3</sup>, Akira Ogita<sup>1,4</sup>, Toshio Tanaka<sup>1</sup>, ○Ken-ichi Fujita<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>OCARINA, Osaka City Univ., <sup>4</sup>Res. Center Urban Health & Sport, OCU)

**Key words** poly(amino acid), poly-gamm-glutamate, *Bacillus* sp., aggregation

**3P-2a134 polygodial の殺真菌活性における液胞膜障害の意義**

○萩田 亮<sup>1,3</sup>, 近藤 拓也<sup>1</sup>, 山口 良弘<sup>1,2</sup>, 藤田 憲一<sup>1</sup>, 田中 俊雄<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪市大院・理, <sup>2</sup>阪市大・複合先端, <sup>3</sup>阪市大・健康研セ)  
ogita@sports.osaka-cu.ac.jp

**【目的】** 殺真菌機序の 1 つとみなされる液胞膜障害作用は、これまで放線菌の二次代謝産物である niphimycin および amphotericin B (AmB) に加えて、*Bacillus* 属細菌の二次代謝産物である polymyxin B にも見出だされている。真菌の液胞膜障害作用を発揮する植物由来の成分を探索したところ、ヤナギダテ破砕液中に目的とする活性を検出し、その活性成分が polygodial であることを同定した。本研究においては、polygodial による殺真菌活性と液胞膜障害との関係を明らかにするとともに、数種の真菌に対する液胞膜障害作用の有効性について検討した。

**【方法】** *Saccharomyces cerevisiae* および *Aspergillus niger* の培養は 2.5% 麦芽末培地、30℃ の条件で行った。*Candida albicans* の培養は、RPMI 培地、37℃ の条件で行った。また、生菌数の測定はコロニーカウント法によって行い、細胞内 K<sup>+</sup> の細胞外への漏出を細胞膜障害の指標として測定した。液胞膜の観察は蛍光試薬 FM4-64 にて処理した細胞を用いて行った。

**【結果】** polygodial は、古くから真菌において細胞内活性酸素種 (ROS) の産生を促進することや、細胞膜障害作用を発揮することが知られている。しかしながら、polygodial は ROS の産生を促進しない低濃度においても液胞膜障害作用を発揮した。さらに、K<sup>+</sup> および Mg<sup>2+</sup> の添加により細胞膜障害を抑制し得る条件においても、polygodial による殺真菌作用および液胞膜障害作用を抑制することはできなかったことから、液胞膜障害作用が殺真菌活性の主要因であるとみなされた。一方、polygodial は出芽酵母 *S. cerevisiae* だけでなく二形成の病原性酵母である *C. albicans* および糸状菌 *A. niger* に対しても液胞膜障害を伴う細胞死を誘発することが明らかになった。

**Role of vacuole-disruption in fungicidal activity of polygodial**

○Akira Ogita<sup>1,3</sup>, Takuya Kondo<sup>1</sup>, Yoshihiro Yamaguchi<sup>1,2</sup>, Ken-ichi Fujita<sup>1</sup>,  
Toshio Tanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., <sup>2</sup>OCARINA, Osaka City Univ., <sup>3</sup>Res. Center Urban Health & Sport, Osaka City Univ.)

**Key words** polygodial, fungicidal activity, vacuole

**3P-2a135 ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA<sup>Ala</sup> 依存型ペプチド合成酵素の機能解析**

○松田 貫暉<sup>1</sup>, 丸山 千登勢<sup>1</sup>, 橋本 純子<sup>2</sup>, 新家 一男<sup>2</sup>, 濱野 吉十<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井県大・生物資源, <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>産総研)  
hamano@fpu.ac.jp

**【目的】** 抗生物質 streptothricin (ST) 類縁化合物の 1 つである BD-12 は側鎖に glycine 誘導体を有しており、これまでの研究で、アミノ糖と glycine 側鎖のペプチド結合が FemAB family に相同性を示す Orf11 によって Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 依存的に触媒されることを見出した。従って Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索は、glycine 以外のアミノ酸を基質とする tRNA 依存型ペプチド合成酵素の同定と新しいアミノ酸側鎖を有する ST 類縁化合物の創製につながると思われ、放線菌ドラフトゲノムデータベースより Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索を行った。

**【方法と結果】** データベース検索の結果、新たな ST 類縁生合成遺伝子群 (sba 遺伝子群) を見出し、Orf11 ホモログ酵素遺伝子である sba18 遺伝子を同定した。そこで Sba18 組換え酵素を構築し、本酵素の基質特異性を調べたところ、Ala-tRNA<sup>Ala</sup> を基質として認識することが判明した。これまでに、alanine を側鎖に有する ST 類縁化合物は報告されておらず、その生理活性は大変興味深い。そこで酵素合成にて得られた alanine を側鎖に有する ST 類縁化合物の生理活性評価を行った。また本化合物の大量精製を目的に、これまでに当研究室で構築した ST 生合成中間体 streptothrisamine 生産菌に sba18 遺伝子を導入した異種発現株の構築を行っており、その詳細についても紹介する。

**Ala-tRNA<sup>Ala</sup>-dependent peptide synthase from streptothricin biosynthesis-related gene clusters**

○Kanki Matsuda<sup>1</sup>, Chitose Maruyama<sup>1</sup>, Junko Hashimoto<sup>2</sup>, Kazuo Shin-ya<sup>3</sup>,  
Yoshimitsu Hamano<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., <sup>2</sup>JBIC, <sup>3</sup>AIST)

**Key words** peptide synthase, aminoacyl-tRNA

**3P-2a136 抗生物質 BD-12 生合成に関与する *N*-メチル基転移酵素の機能解析**

○新倉 春香<sup>1</sup>, 丸山 千登勢<sup>1</sup>, 新家 一男<sup>2</sup>, 濱野 吉十<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>福井県大・生物資源, <sup>2</sup>産総研)  
hamano@fpu.ac.jp

**【目的】** Streptothricin (ST) は、放線菌によって生産される抗生物質であり、強力な抗菌活性を示す。しかし、真核生物への毒性も強いため医薬品としては利用されておらず、有機合成化学的な修飾による毒性緩和にも成功していない。そこで我々は、生物工学的アプローチによる毒性緩和を最終目標として、ST およびその類縁抗生物質の生合成研究を進めている。ST 類縁抗生物質の 1 つである BD-12 は、放線菌 *Streptomyces luteocolour* NBRC13826 によって生産され、2 つの *N*-メチル基を有している。本研究では、BD-12 生合成に関与する *N*-メチル基転移酵素の機能解析およびコンビナトリアル生合成による新規 ST 類縁化合物の創製を行った。

**【方法と結果】** BD-12 生合成遺伝子群に存在する 2 つの *N*-メチル基転移酵素遺伝子 (*orf6* と *orf13*) をそれぞれ ST 生産放線菌に導入し、生産された化合物を LCMS で分析した。その結果、*orf6* と *orf13* 遺伝子の導入株は、ST のラクタム構造とアミノ糖がそれぞれ *N*-メチル化された化合物を生産することが示唆された。また、両遺伝子の導入株は、ラクタム構造およびアミノ糖の両者が *N*-メチル化された新規 ST 類縁化合物であることが期待された。本発表では、これら研究成果および本化合物の単離精製と構造決定、そして、本化合物の生理活性について報告する。

**Functional analysis of the *N*-methyltransferases in the BD-12 biosynthesis**

○Haruka Niikura<sup>1</sup>, Chitose Maruyama<sup>1</sup>, Kazuo Shin-ya<sup>2</sup>, Yoshimitsu Hamano<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., <sup>2</sup>AIST)

**Key words** antibiotics, biosynthesis, *N*-methyltransferase

### 3P-2a137 *Photobacterium profundum* 由来エイコサペンタエン酸合成酵素の異種宿主発現

○中真以<sup>1</sup>, 林祥平<sup>1</sup>, 佐藤康治<sup>2</sup>, 氏原哲朗<sup>3</sup>, 大利徹<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>北大院・総合化学, <sup>2</sup>北大院・工, <sup>3</sup>協和発酵バイオ)  
 dairi@eng.hokudai.ac.jp

**【背景と目的】** エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は機能的性質と呼ばれ、様々な健康増進効果が報告されている。PUFA はある種の海洋性微生物により生産され、一部の菌株ではポリケチド合成酵素様のマルチドメインからなる PUFA 合成酵素により行われる。EPA 生産菌 *Photobacterium profundum* のゲノム配列中に PUFA 合成酵素遺伝子 (*Pp-pfaABCD*) が見出し、遺伝子破壊実験により EPA 生産に関与することが報告された。そこで本研究では、これら遺伝子の大腸菌を用いた異種宿主発現について検討した。

**【方法と結果】** *Pp-pfaABCD* 遺伝子をそれぞれ PCR にて増幅後、大腸菌発現ベクターにクローニングした。しかしアシルキャリアプロテイン (ACP) のホロ化に必要な 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPase) をコードする *pfaE* 遺伝子オルソログをゲノム配列に見出せなかった。本 ACP は EPA 生産菌 *Shewanella oneidensis* のもつ PUFA 合成酵素の ACP と非常に高い相同性を示すことから (84%)、*S. oneidensis* 由来 So-PfaE を用いてホロ化できると予想した。そこで So-PfaE を共発現させた結果、EPA 合成が確認できた。したがって、*P. profundum* 由来 PUFA 合成酵素を大腸菌で発現させることに成功し、さらにその ACP ドメインは *S. oneidensis* 由来 PfaE によってホロ化されることを明らかとした。

#### Heterologous expression of eicosapentaenoic acid synthase gene derived from *Photobacterium profundum*

○Mai Naka<sup>1</sup>, Shohei Hayashi<sup>1</sup>, Yasuharu Satoh<sup>2</sup>, Tetsuro Ujihara<sup>3</sup>, Tohru Dairi<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Kyowa Hakkō Bio)

**Key words** polyunsaturated fatty acid, *Photobacterium*, PUFA synthase, eicosapentaenoic acid

### 3P-2a138 多価不飽和脂肪酸合成酵素におけるタンデムアシルキャリアプロテインの機能解明

○林祥平<sup>1</sup>, 佐藤康治<sup>2</sup>, 氏原哲朗<sup>3</sup>, 大利徹<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>北大院・総合化学, <sup>2</sup>北大院・工, <sup>3</sup>協和発酵バイオ)  
 dairi@eng.hokudai.ac.jp

**【目的】** 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) には健康増進効果が知られており、その需要は年々増加している。現在の主な PUFA 供給源は魚油等の海洋資源であるが、海洋資源の枯渇や安定供給が問題となっており、新たな供給源として微生物発酵が期待されている。しかしその生産性は十分ではなく、その向上が望まれている。

PUFA は海洋性微生物により生産され、その生合成遺伝子が同定されている。この PUFA 合成酵素はポリケチド合成酵素に似た構造を有し、複数の連続したアシルキャリアプロテイン (ACP) ドメインを持つという特徴がある。これまでに活性型 ACP ドメイン数の減少に伴い PUFA 生産性が低下することが報告されているが (Jiang ら, *JACS* 2008, p. 6336, 林ら, 第 67 回日本生物工学会大会 2015, 3P-265)、ACP ドメイン数の増加効果に関する知見は無い。そこで本研究では、ACP ドメイン数を人工的に増加させ生産能に対する影響を検証した。

**【方法及び結果】** *Schizochytrium* 属由来 PUFA 合成酵素には 9 個の連続した ACP ドメインが存在する。そこで人工的に ACP ドメイン数を 10 と 11 個に増加させた遺伝子を構築、大腸菌にて異種宿主発現させ PUFA 生産能を評価した。その結果、ACP ドメイン数の増加に伴い、その生産性も増加することが明らかとなった。同様に ACP ドメインを 4 個もつ *Shewanella oneidensis* 由来 PUFA 合成酵素についても、ACP ドメイン数を 5、6、7、8、および 9 個に増加させた遺伝子を構築し評価した。その結果、本酵素においても ACP ドメイン数に比例した PUFA 生産能の増加が認められた。以上より、PUFA 合成酵素の ACP ドメイン数の増加はその生産能向上に有効であることを明らかとした。

#### Functional analysis of tandem acyl carrier protein in polyunsaturated fatty acid synthases

○Shohei Hayashi<sup>1</sup>, Yasuharu Satoh<sup>2</sup>, Tetsuro Ujihara<sup>3</sup>, Tohru Dairi<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Kyoto Hakkō Bio Co., LTD)

**Key words** acyl carrier protein, PUFA synthase, *Schizochytrium*, *Shewanella*

### 3P-2a139 Cyclophenin 類を viridicatin 類へと変換する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と精密機能解析

○岸本真治, 石川格靖, 山田陽香, 平山裕一郎, 渡辺賢二  
 (静岡県大・薬)  
 kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp

微生物が産生する天然物はポリケチド合成酵素、非リボソームペプチド合成酵素、テルペン合成酵素等で合成された母骨格に様々な酵素による修飾が加わることで生合成される。それら修飾酵素の中でも基質化合物の骨格を変換する酵素は天然物の多様性創出に大きく関わっている。このような基質化合物の骨格を変換する酵素の一つにシクロペナーゼがある。シクロペナーゼは cyclophenin から viridicatin への変換を担う酵素として Luckner らによってその存在が提唱された酵素である。しかし、シクロペナーゼは存在が提唱されたのみであり、どのような配列のタンパク質であるか長らく不明であった。そこで我々はシクロペナーゼの正体を明らかにするために viridicatin を生合成中間体とすると考えられる aspoquinolone 類、penigequinolone 類の生合成研究を開始した。

Aspoquinolone 類は *Aspergillus nidulans* が産生する。その構造を元にして必要な生合成遺伝子を推測し、*A. nidulans* のゲノム中からそれらを全て含む遺伝子クラスターとして *asq* クラスターを見出した。一方、penigequinolone 類は *Penicillium* 属糸状菌 FKI-2140 株が産生する。FKI-2140 株のドラフトゲノム解読後、*asq* クラスターと類似な遺伝子クラスターを探索した結果、*png* クラスターを見出した。化合物生産量の多い FKI-2140 株の菌体破砕液から酵素活性を指標にシクロペナーゼを探索し、見出したタンパク質の大きさ、必要補因子をもとに *png* クラスター中で候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子を異種宿主で発現し酵素活性を測定したところ、ヘモシアニン様タンパク質 PngL がシクロペナーゼ活性を有していた。また、*asq* クラスター中の遺伝子で *pngL* と相同性のある *asql* を異種発現させて得られた *Asql* にもシクロペナーゼ活性を確認することができた。現在、これらシクロペナーゼの機能解析を進めている。

#### Cyclophenases catalyzing atypical reactions of cyclophenin to form viridicatin in fungal biogenesis

○Shinji Kishimoto, Noriyasu Ishikawa, Haruka Yamada, Yuichiro Hirayama, Kenji Watanabe  
 (Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

**Key words** biosynthesis, *Aspergillus nidulans*, cyclophenase, hemocyanin

### 3P-2a140 *Penicillium purpurogenum* における PP-V 生産と細胞内アンモニウム濃度の関連性

○小嶋涼<sup>1</sup>, 新居鉄平<sup>1</sup>, 春見隆文<sup>1,2</sup>, 荻原淳<sup>1,2</sup>, 渡邊泰祐<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>日大院生資研究科・生資利用, <sup>2</sup>日大・生資科)  
 j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp

**【背景・目的】** *Penicillium purpurogenum* IAM15392 株は特定培地条件下で、Azaphilone 系 *Monascus* 色素同族体を産生する。しかし、その生合成経路の詳細は明らかになっていない。本糸状菌は 4 種の色素を生産することが知られている。そのうち、主生産色素として、母核のピラン環に酸素原子を含む PP-O とそれがアミノ基に置換した PP-V が知られる。我々は、グルタミンの異化反応の過程で発生するアンモニウムが構造中に取り込まれることで、同色素が生産されると予想している。したがって本研究では、*P. purpurogenum* の細胞内アンモニウム濃度と色素生産との関連性を明らかにすることを目的とした。

**【方法及び結果】** 菌体をメタノールに浸すことで細胞内の色素を抽出し、TLC によって解析した。その結果、グルタミンを窒素源とした培地で *P. purpurogenum* IAM15392 を培養したときに生産される PP-V は菌体内で生合成されていることが分かった。ネスラー試薬を用いて、このときの細胞内アンモニウムレベルを測定した。PP-O 生産条件下では、アンモニウム濃度に変化がなかったが、PP-V 生産条件下では、PP-V 生産と共にアンモニウム濃度が PP-O 生産条件と同じくらいまで減少した。また、グルタミンを含む培地で培養された菌体を、グルタミンを含まない通常の PP-O 生産条件として用いられる培地に移植し、さらに培養した。その結果、10 mM のグルタミンを含む培地で 72 時間培養後、培地置換された菌体だけが PP-V を生産し、そのときのアンモニウムレベルはこの条件のみ減少した。以上の結果から、我々は *P. purpurogenum* は細胞内のアンモニウムレベルを維持するために細胞内の余剰のアンモニウムを PP-V として排出すると考えた。

#### The relationship between the violet pigment PP-V production and intracellular ammonium level in *Penicillium purpurogenum*

○Ryo Kojima<sup>1</sup>, Teppei Arai<sup>1</sup>, Takafumi Kasumi<sup>1,2</sup>, Jun Ogihara<sup>1,2</sup>, Taisuke watanabe<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Biore. Util. Sci., Grad. Sch. Biore. Sci., <sup>2</sup>Coll. Bioreour. Sci., Nihon Univ.)

**Key words** Ammonium, Pigment, *Penicillium purpurogenum*, Secondary metabolism

### 3P-2a141 *Penicillium purpurogenum* における citrinin 生産能の評価

○荻原 淳<sup>1,2</sup>, 茂木 美樹<sup>2</sup>, 小嶋 涼<sup>2</sup>, 新居 鉄平<sup>1</sup>, 渡邊 泰祐<sup>1,2</sup>,  
春見 隆文<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>日大・生資科, <sup>2</sup>日大院・生資科・生資利用)  
j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp

目的) *Monascus* 色素は古来より利用される微生物由来天然物色素であり、現在日本で食品の着色料として認可される唯一の微生物由来天然物色素である。近年、*Monascus* spp.によって生産される赤色色素は、抗菌、抗がん、抗酸化などの生理活性を示すことが明らかにされたことで、改めて重要視されている。しかしながら、*Monascus* spp.はカビ毒である citrinin を副生することが明らかにされている。このため、欧米において食品への *Monascus* 色素の使用は認められておらず、国際的にも安全な微生物由来天然物色素の供給が求められている。一方、糸状菌 *P. purpurogenum* IAM15392 株は可溶性でんぷん、酵母エキス、クエン酸緩衝液という極めて単純な培地にて、多様な *Monascus* 色素同族体を生産する。また現在までに本糸状菌において *Monascus* 色素生産時に citrinin の副生は確認されておらず、本糸状菌の生産する *Monascus* 色素同族体の天然色素として利用・応用を検討する上で citrinin 副生の有無を確認することは重要である。そこで本研究では、IAM に保存された *P. purpurogenum* 8 菌株における citrinin 生産能の有無を確認することを目的とした。

方法及び結果) *P. purpurogenum* における citrinin 生産能の有無を確認するために Coconut Cream Agar 培地を用いた蛍光発光観察による簡易的な評価を行った。その結果、citrinin 生産菌として知られる *M. purpureus* と比較して、8 菌株すべてで特徴的な蛍光発色は確認されず、塩酸添加による蛍光発色の増強も確認されなかった。さらに、*P. purpurogenum* において、*M. purpureus* 由来 citrinin 生合成遺伝子(pksCT)の有無を PCR 反応的に確認した。その結果、8 菌株において pksCT の増幅断片は確認されなかった。現在、*P. purpurogenum* の色素生産培地における、citrinin 生産の確認を HPLC 分析を用いて行っている。

#### Evaluation of the citrinin productivity in *Penicillium purpurogenum*

○Jun Ogihara<sup>1,2</sup>, Yoshiki Motegi<sup>2</sup>, Ryo Kojima<sup>2</sup>, Teppei Arai<sup>1</sup>, Taisuke Watanabe<sup>1,2</sup>,  
Takafumi Kasumi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

**Key words** *Penicillium purpurogenum*, citrinin, *Monascus* fermentation products, mycotoxin

### 3P-2a142 休眠型天然物生合成遺伝子を利用した機能性新規物質の探索とその生合成解明

○恒松 雄太, 山本 剛, 横山 葵, 岸本 真治, 渡辺 賢二  
(静岡県大薬)  
tsunematsu@u-shizuoka-ken.ac.jp

化学構造多様性に富む天然物は古くから創薬の探索源として重要な役割を担ってきた。しかし、現在、多数の製薬企業が天然物創薬部門を縮小廃止している。新規物質獲得に多大な時間と労力が費やされる、獲得効率が悪い、生産性が低いなどがその一因と考えられる。一方、次世代シーケンサーにより、天然物生合成遺伝子クラスター(Biosynthetic Gene Cluster: BGC)情報、すなわち「天然物の設計図」が簡単に得られるようになった。同時に、多くの BGC が休眠型として存在しており、有効利用されていないことが明らかにされた。我々は天然物の設計図をもとに、遺伝子工学を利用して新規天然物を生産させること、加えてその代謝経路を化学的に解明し、応用利用することを目指して研究を行った。

さまざまな糸状菌株を対象に、機能未知かつ休眠型 BGC をゲノムデータベース上に探索した。なかでも糸状菌 *Aspergillus niger* における pyn クラスターは非リボソーム性ペプチド合成酵素-ポリケチド合成酵素混合型酵素などから構成される、典型的な BGC であった。しかし、本 BGC が休眠型であること、機能未知酵素遺伝子を多数含むことから、その生合成産物は新規物質であると予想された。そこで遺伝子改変により本 BGC の活性化を行った。転写因子遺伝子 *pynR* を強制発現させた変異体を培養すると、その培養液は明黄色を呈した。本変異体の培養物より、各種分離操作・機器分析にて約 10 種の新規物質の単離・構造決定に成功した。続いて遺伝子破壊実験、精製酵素による *in vitro* 実験、出芽酵母等による異種発現系を駆使してその生合成経路を解明した。二つの酵素の連続的酸化による  $\gamma$ -pyrone 構造の形成、プロテアーゼ様酵素 PynH によるエキソメチレン構造の形成など、これまで未知であった天然物部分構造の形成機構を明らかにした。

#### Harnessing the biosynthetic pathway in filamentous fungus

○Yuta Tsunematsu, Tsuyoshi Yamamoto, Mamoru Yokoyama, Shinji Kishimoto,  
Kenji Watanabe  
(Dept. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka)

**Key words** cryptic natural products, silent gene cluster, *Aspergillus niger*, transcriptional regulator

### 3P-2a143 *Cordyceps sphecocephala* による蛍光物質の生産およびその特性評価

○藤澤 祐哉<sup>1</sup>, 高野 真希<sup>2</sup>, 星野 一宏<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工)  
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【背景・目的】現在、蛍光物質は主に化学合成で生産されている。一方、天然物由来の蛍光物質は稀であり、大量生産は難しい。これまで冬虫夏草 *Cordyceps sphecocephala* が生成する生理活性物質についての研究を行ってきたところ、培養液中に蛍光物質が存在することを発見した。このような天然物由来の蛍光物質には、生体内蛍光プローブや食品添加物など様々な用途が期待できる。さらに *C. sphecocephala* は微生物であるため大量培養することで、この蛍光物質の安定的な生産の可能性がある。そこで、本研究では、*C. sphecocephala* を用いた蛍光物質の効率的な生産法の開発およびその特性評価を行った。

【方法・結果】14 種類の冬虫夏草を用い、YM 培地で静置培養した結果、*C. sphecocephala* NBRC 101415 の培養液は赤色を呈し、蛍光励起することを発見した。そこで本菌株を選択し、この蛍光物質について検討を行った。この培養液について液液抽出および TLC を行った結果、少なくとも 2 種類の蛍光物質を生産していることがわかった。このうち強い蛍光強度を示す物質は、EX 407 nm, EM 470 nm を有していた。次に、この蛍光物質を効率的に生産するため、窒素源の検討を行った。28°C、Glucose 10 g/L、pH5.0、好気条件で 10 日間静置培養をした結果、Polypeptone、Beef extract、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、および(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> の場合、培養液は高い蛍光強度を示した。特に(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> と(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> のとき、得られた菌体は少なかったが、培養液は黄色を呈し、青緑色の強い蛍光が認められた。さらに菌糸にも蛍光が認められたため、菌体内でこの蛍光物質が生合成され、分泌していることが示唆された。現在、この蛍光物質の効率的な生産の検討、構造解析およびその特性評価を実施している。

#### Production and characterizations of fluorescence materials by *Cordyceps sphecocephala*

○Yuya Fujisawa<sup>1</sup>, Maki Takano<sup>2</sup>, Kazuhiro Hoshino<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** *Cordyceps sphecocephala*, fluorescence material, nitrogen source

### 3P-2a144 卵菌による長鎖多価不飽和脂肪酸生産

○吉田 磨仁<sup>1</sup>, 松下 貴子<sup>1</sup>, 東條 元昭<sup>2</sup>, 永峰 賢<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・地環科, <sup>2</sup>阪府大院・生環科, <sup>3</sup>ロム)  
majin@ees.hokudai.ac.jp

n-3 系多価不飽和脂肪酸(LC-PUFA)であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)は抗炎症作用や抗血栓作用などの様々な生理機能を持ち、n-3 系 LC-PUFA の摂取は心血管疾患などの発症リスクの低減に寄与する。n-3 系 LC-PUFA は血中コレステロールや血清脂質レベルを下げる作用もあり、高脂血症の治療薬として EPA が用いられている。EPA や DHA の供給源は主に魚油であるが、漁獲高の不安定化や減少、食生活の変化などにより、EPA や DHA の摂取量は年々減少し、種々の疾患発症のリスクが高まっている。そこで、魚油に代わる供給源として、様々な微生物による EPA、DHA の生産研究が進められている。原生生物に属する卵菌(*Pythium*)のいくつかの種は EPA を作ることで知られている。また、*Pythium* は様々な加工食品の副産物を培地として増殖させることが可能であることから、*Pythium* を利用することで EPA の生産コストの削減が期待される。今回新たに、*P. myriotylum* の複数の株で EPA が産生されることを発見した。そこで、最も生育がよかった JK9 株を用い、EPA 生産を向上させることを目的に、培養条件の検討を行なった。その結果、50%のV8(野菜ジュース)培地で 20°C、7 日間、静置培養したところ、EPA の生産量は当初の約 7 倍の 93.6mg/L にまで増加することができた。しかしながら、この値は商業生産の目標値の約 10%に留まっており、培養条件や培養方法のさらなる改善が必要である。

#### Production of polyunsaturated fatty acids by necrotrophic oomycete, *Pythium myriotylum*

○Kiyohito Yoshida<sup>1</sup>, Takako Matsushita<sup>1</sup>, Motoaki Tojo<sup>2</sup>, Tadashi Nagamine<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>ROM Co. Ltd.)

**Key words** filamentous fungi, *Pythium*, eicosapentaenoic acid, polyunsaturated fatty acid

**3P-2a145** メラニン生成キナーゼチロシナーゼの抑制物質の微生物からのスクリーニングとその細胞毒性

○倉地 亜子, 塚本 義則, 車 炳久  
(中部大院・応生)  
mitsukamoto@isc.chubu.ac.jp

シミ・ソバカスの予防を目的として、メラニン合成の初発段階に位置するキナーゼであるチロシナーゼの活性の阻害あるいは遺伝子発現の抑制活性を有する物質のスクリーニングが世界的に広く行われている。我々は特殊環境微生物のメタノール/クロロホルム抽出物をスクリーニング源として、ヒト悪性黒色腫由来細胞株(HMV-II)とフォルスコリンを用いた系でのチロシナーゼ活性を有意に低下させる新規な物質のスクリーニングを行った。その結果、スクリーニング対象とした数百種類の微生物の中から、イソフラボン産生菌、オリゴ糖生産菌、テルペン系炭水素質化性菌のメタノール/クロロホルム抽出物の一部から細胞毒性を示さず、チロシナーゼ活性を有意に低下させる活性を有する物質をスクリーニングすることができたので報告する。

**Screening of Substances Repressing Tyrosinase of Key Enzyme for Melanin Synthesis from Microbe and its Cell Toxicity**

○Ako Kurachi, Yoshinori Tsukamoto, Byung-Yoon Cha  
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

**Key words** Tyrosinase, Melanin, microbe

**3P-2a146** *Pseudomonas* sp. C8 株が生産する増殖抑制物質の特定とその生産機構

○鈴木 研志<sup>1</sup>, アズワニ ファティマ<sup>2</sup>, 犬塚 友麻<sup>3</sup>, 本荘 雅宏<sup>4</sup>, 田代 陽介<sup>3</sup>, 二又 裕之<sup>1,3,5</sup>  
(<sup>1</sup>静大・創科技院, <sup>2</sup>プトラ マレーシア大, <sup>3</sup>静大院・工, <sup>4</sup>静大・工, <sup>5</sup>静大・グリーン研)  
thfutam@ipc.shizuoka.ac.jp

微生物が生産する様々な物質は食糧生産や医薬品の開発において、極めて重要な生物資源である。新規の抗菌あるいは静菌作用物質の発見は現在の医療分野を進展させると同時に、微生物生態系における微生物の生存戦略や共存を理解する重要な鍵となっている。これまでの研究で *Pseudomonas* sp. C8 株はフェノールを唯一の炭素源とする連続集積培養系において様々な微生物の増殖を抑制する物質を生産することが明らかとなった。そこで、本研究では増殖抑制物質の特定とその生産機構の解明を目的とした。増殖抑制物質を特定するため、HPLC 解析を実施し、増殖抑制物質の精製に成功した。また、マススペクトラム解析により、分子量 1033 の物質であることが明らかとなった。現在、NMR 解析による構造決定を進めている。増殖抑制物質の生産機構を解明するため、フェノールを唯一の炭素源とした C8 株連続集積培養系の解析を行った。その結果、増殖抑制物質は常に生産されているわけではなく、一定の条件を満たした時のみに生産されていることが推察された。次いで、グルコースあるいはスクロースを唯一の炭素源として培養を行ったところ、両培養系において菌密度に依存した増殖抑制物質生産が確認された。このことから、quorum sensing (QS) 様の機構により物質生産が制御されていることが推察された。そこで、QS のオートインデューサーである *N*-acyl homoserine lactones (AHL) の生産を解析したところ、少なくとも炭素鎖が 4 から 8 および 10 から 16 の AHL 生産は確認されなかった。また、C8 株のゲノム解析の結果 AHL の生産に関与する遺伝子は発見されなかった。以上のことから、C8 株増殖抑制物質は新規物質であると同時に、新しい QS 機構の発見が期待される。

**Characterization of a novel growth-repressing compound from *Pseudomonas* sp. C8**

○Kenshi Suzuki<sup>1</sup>, Fatma Azwani<sup>2</sup>, Yuma Inuzuka<sup>3</sup>, Masahiro Honjyo<sup>4</sup>, Yosuka Tashiro<sup>3</sup>, Hiroyuki Futamata<sup>1,3,5</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Inst. Trop. Agri., Univ. Putra Malaysia, <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Shizuoka Univ., <sup>4</sup>Fac. Eng. Shizuoka Univ., <sup>5</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**Key words** cell-cell interactions, growth, quorum sensing

**3P-2a147** フェニルプロパノイド類の抗酸化能力と構造との相関関係

○横川 遥香, 松郷 誠一  
(金沢大院・自科)  
haruside8133@stu.kanazawa-u.ac.jp

フェニルプロパノイド類は、フェニルアラニンから合成される植物の 2 次代謝産物である。構造はベンゼン環に C3 の鎖のついた骨格を基本としており、様々な官能基を有する。生理活性を有する化合物も多く、例えば、カフェイン酸は、抗発がん作用や抗炎症作用を示すという報告がある。フェニルプロパノイド類の抗酸化能力については多くの報告があるが、系統だった抗酸化能力の報告は少ない。本研究では、フェニルプロパノイド類の抗酸化能力と構造との相関関係の解明を目的とした。生体に存在するラジカルには、 $O_2^{\cdot-}$  や  $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$  など様々なものがある。特に  $\cdot OH$  は反応性が極めて高く、還元型金属イオンと過酸化水素の反応で発生する。 $\cdot OH$  量は生体における還元型・酸化型金属イオン量とある種の関連性が考えられている。我々はフェニルプロパノイド類が金属イオンの酸化・還元に関わっている可能性に注目して実験を行った。 $\cdot OH$  消去能に関しては、フェルラ酸よりカフェイン酸がより高い消去能を示した。カフェイン酸の IC50 はフェルラ酸の約 15 倍も低かったことから、OH 基が鉄イオンとの酸化・還元と関連していると考えた。Fe<sup>2+</sup> もしくは Fe<sup>3+</sup> との反応によりラジカル生成量の減少、増加が起こっていると仮定し、検討した。Fe<sup>2+</sup> との反応では、カテコール構造を有する場合のみ pH7.2 の条件で 585nm に新たな吸収ピークがあらわれ、錯体形成を確認した。また、Fe<sup>3+</sup> 還元力について Yen and Chen (1995) の方法に従って実験を行ったところ、OH 基によって Fe<sup>3+</sup> が Fe<sup>2+</sup> に還元されることが分かった。還元力に関しては、OH 基の数が少ないほど高い能力を示した。以上の結果より、カテコール構造を有する物質は、Fe<sup>3+</sup> を還元しラジカル生成量を増やすが、1 電子還元反応によるラジカル消去だけでなく錯体形成によりラジカル生成量を抑制し、高い抗酸化力を示すことが示唆された。

**Correlation of antioxidant activity and structure of phenylpropanoids**

○Haruka Yokokawa, Seiichi Matsugo  
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

**Key words** antioxidant, phenylpropanoid, hydroxyl radical, chelate reaction

**3P-2a148** *Cordyceps sphecocephala* を用いた新規神経突起伸長物質の生産およびその特性評価

○西川 絢, 高野 真希, 星野 一宏  
(富山大院・理工)  
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】冬虫夏草は昆虫等の体に寄生し育つ子囊菌であり、民間療法に用いられた。また、抗がん作用や抗酸化作用が期待されている。一方、認知症治療薬として神経成長因子(NGF)があるが、高分子のため、脳血液関門を通過できない。そのため、NGF 作用を有し、脳血液関門を通過できる新規物質が求められている。そこで、*Cordyceps sphecocephala* 培養液を神経細胞に添加したところ神経突起伸長を発見した。このことから、この新規神経突起伸長物質は認知症治療薬として期待できる。しかし、冬虫夏草は希少かつ高価であり、大量培養法の確立やこの物質の薬理的機能が明らかにされていない。本研究では、認知症治療薬の開発を目的として、*C.sphecocephala* を用いた新規神経突起伸長物質の生産およびその特性を検討した。【方法・結果】本研究では *C.sphecocephala* NBRC 101415 を用いた。培養は、3 種類の培地を用いて 28℃ で 10 日間静置培養を行った。培養液の神経突起伸長作用を検討するために、PC12 細胞を用いた。神経突起伸長作用は、PC12 細胞に培養液を添加し、細胞分化率を評価した。その結果、YM 培地での培養液は最大の細胞分化率を示し、NGF と同様に PC12 細胞直径以上の神経突起伸長 (1-3 本/cell) が確認された。このことから、*C.sphecocephala* 培養液中の新規物質は NGF と同様な伸長メカニズムであると推察される。次に、本菌株の培養経過時間による PC12 細胞分化率を検討した。菌体培養 6 日目から細胞分化率は上昇し、培養 10 日目で約 12.6% と最大の分化率を示した。さらに、新規物質の神経突起伸長メカニズムの解明として MEK や JNK 阻害剤を添加して PC12 細胞を培養すると、突起伸長は確認できなかった。したがって、この新規物質は NGF と同様に MEK や JNK 経路を介して伸長していると考えられる。現在、この神経突起伸長物質の大量生産法の確立や同定を試みている。

**Production and Characteristics of a New Nerve Growth Promoter by *Cordyceps sphecocephala***

○Jun Nishikawa, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino  
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** *Cordyceps sphecocephala*, NGF-like material, PC12

### 3P-2a149 放線菌 *Streptomyces rochei* 生合成制御系変異株の二次代謝プロファイル解析

岩國 美由季, 高橋 譲, 鈴木 敏弘, 木梨 陽康, ○荒川 賢治  
(広島大院・先端物質)  
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

#### 【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株のもつ線状プラスミド pSLA2-L 上には、抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされており、その他に *tetR* 型リプレッサー遺伝子(*srrA*, *srrB*, *srrC*), SARP 型活性化遺伝子(*srrY*, *srrZ*, *srrW*), さらに本菌のシグナル分子 SRB の生合成遺伝子 *srrX* など、抗生物質生産に関わる多くの制御遺伝子が存在している。当研究室では、*srrX*→*srrA*→*srrY*(→LC)→*srrZ*→LM という抗生物質制御カスケードの主要経路を明らかにした。本研究では、二次代謝生合成制御系の分子基盤の理解と物質生産への応用を目指した。

#### 【方法および結果】

(1) *SrrA/SrrB/SrrY* による二次代謝制御: まず、遺伝子発現およびゲルシフト解析により、*srrB* が *SrrA* の制御下にあり、*srrY* 上流に結合して転写調節を行う可能性が示唆された。さらに *srrB* の抗生物質生産における影響を調べるため、親株、 $\Delta srrA$  株、 $\Delta srrB$  株、 $\Delta srrA srrB$  株を培養し、ゲル濾過およびシリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い、抗生物質の生産量を比較した。その結果、LC に関して、 $\Delta srrA$  株は 1.5 倍、 $\Delta srrB$  株は 4.9 倍、 $\Delta srrA B$  株は 8.7 倍も高生産していた。また、LM に関して、*srrB* を破壊した  $\Delta srrB$  株、 $\Delta srrA B$  株において大量生産が確認された。転写量・抗生物質生産量の経時変化解析と考え合わせると、*srrB* は培養後期において抗生物質生産を負に制御していることが示唆された。

(2) 多重制御遺伝子変異による休眠二次代謝の覚醒: 3つ目のリプレッサー遺伝子 *srrC* を含めた多重制御遺伝子変異株を作成したところ、通常非生産の定極性分子 YT-02A, YT-02B を取得した。構造解析を行ったところ、プチロラクトン骨格を有していた。本発表では *Streptomyces* 属放線菌のシグナル分子との比較を含め詳述する。

#### Analysis of secondary metabolite profiles in the regulatory mutants of *Streptomyces rochei*

Miyuki Iwakuni, Yuzuru Takahashi, Toshihiro Suzuki, Haruyasu Kinashi,  
○Kenji Arakawa  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** regulation, *Streptomyces*, antibiotics, biosynthesis

### 3P-2a150 粘液細菌 *Sorangium cellulosum* の分離と有用物質の探索

○木村 義雄  
(香川大・農)  
kimura@ag.kagawa-u.ac.jp

【目的】微生物由来の天然物から作られる医薬品は年々減少の一途を辿っている。この一因として、これまで放線菌由来の医薬品が多く作られてきたが、近年、新規な放線菌の分離が困難になっていることが考えられる。しかし、天然物は新規な構造と強い生理活性を有することが多いため、放線菌に替わる新しい微生物資源が構築されると、新たな天然物由来の創薬の道が開けることが期待される。そこで、細菌の中で最も多くの遺伝子を有するものの、純化が難しいため、日本では分離されていない粘液細菌 *Sorangium cellulosum* の分離及び純化方法を確立し、本菌が生産する有用物質の探索を行うことを目的とした。

【結果及び考察】我々は土壌から約 15% 程度の割合で本菌を分離しており、この分離菌から様々な純化方法を用いて現在、135 菌株程度の粘液細菌の 1 種である *Sorangium cellulosum* を得ている。

これらの純化株を 2 種類の培地 (疎水性化合物吸着樹脂 XAD-16 含有) で培養後、菌体と XAD-16 を分け、それぞれからアセトン抽出物を調製した。この抽出物を 3 種の細菌、2 種の酵母及び 2 種のカビを指標菌として生育阻害を見たところ、半数以上のサンプルにおいてアスペルギルス症を引き起こす *Aspergillus* 属の生育阻害が見られ、本菌は真菌に対して強い抗菌作用を有する化合物を多く生産することが判明した。

また、抽出物を LC/MS 解析により生産物の同定を行った結果、生産物の中には約 45 種の既知化合物のほか、未知化合物と考えられる物質も多く含まれており、これらの中から今後、有用物質の探索を行っていききたい。

#### Isolation of *Sorangium cellulosum* and search of useful substances

○Yoshio Kimura  
(Fac. Agric., Kagawa Univ.)

**Key words** antifungal antibiotics, *Sorangium cellulosum*

### 3P-2a151 新規抗菌物質 demethyl-L-681,217 の単離とその生合成

○小谷 真也<sup>1</sup>, 菅井 翔吾<sup>1</sup>, 小牧 久幸<sup>2</sup>, 逸見 光<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>静大院・農, <sup>2</sup>NBRU, <sup>3</sup>農研機構)  
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

放線菌は、多様な二次代謝産物を生産することで、産業微生物として用いられている。また、近年、ゲノム解析によって放線菌のゲノムが解析されており、データベース上で利用することが出来る。また、ゲノム情報が明らかであれば生合成遺伝子の推定を行うことが出来る、生物情報学に寄与できる。そのような背景から、全ゲノムの解析が終了している *Streptomyces cattleya* を用いて抗菌活性物質の探索を行った。*S. cattleya* NBRU 14057<sup>1</sup> は ISP2 寒天培地 5L で、7 日間培養を行った。気菌糸および胞子形成が確認されたのちに、スパーテルを用いて気菌糸および胞子細胞を回収した。回収した細胞に対し約 2 倍量のメタノールを用いて抽出を行った。メタノール抽出物より、CHP20P を用いた溶媒分画を行い、抗菌活性画分を得た。最終的に HPLC を用いて、活性物質を単離・精製した。NMR および ESI-MS の解析によって、構造決定を行い、既知化合物の L-681,217 を同定した。さらにメチル基が 1 個少ない分子構造を有する新規抗菌物質 demethyl-L-681,217 を単離し、二次元 NMR スペクトラムの解析によって物質構造を決定した。また抗菌活性試験の結果、demethyl-L-681,217 は、*Streptomyces antibioticus* に対して抗菌活性を示した。L-681,217 に関しては、近縁株の *S. cattleya* ATCC 39203 から得られている (A.J. KEMPF, et al. J Antibiot 1983) が、その生合成は明らかにされていない。そこで、生合成遺伝子の明らかになっている Kirromycin の生合成遺伝子 (T. Weber et al. Chem&Biol 2008) を参照し、L-681,217 および demethyl-L-681,217 の推定生合成遺伝子を明らかにした。

#### Isolation of a new antibacterial compound demethyl-L-681,217 and its biosynthesis

○Shinya Kodani<sup>1</sup>, Shogo Sugai<sup>1</sup>, Hisayuki Komaki<sup>2</sup>, Hikaru Hemmi<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Int. Sci. Tech. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>NBRU, <sup>3</sup>NFRU)

**Key words** *Streptomyces cattleya*, antibacterial, polyketide, <sup>1</sup>NMR

### 3P-2a152 ジスプロシウムで惹起される巨大菌のポリ-γ-グルタミン酸増産現象と関連遺伝子分析

○白米 優一<sup>1</sup>, 松村 歩梨<sup>2</sup>, 芦内 誠<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>愛媛大院・連合農, <sup>2</sup>高知大・農)  
yuichi.haku@gmail.com

【背景と目的】レアメタルは「先端産業のビタミン」と呼ばれ、現代産業に不可欠である。しかし、そのようなレアメタルを輸入に頼る現在の供給方法は多くの懸念材料を含んでいる。そのため、レアメタルの再利用・回収技術の発達・拡充は喫緊の課題である。最近、我々は古細菌型ホモキラルポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) の優れたレアメタル吸着性に注目し、その高い吸着能に対する生理的意義に興味をもった。この生理的意義が解明することで、レアメタルの中でも特に性質の似通ったランタノイド元素の簡便かつ迅速な分別・効率回収にかかる重要な知見が得られるものと期待されている。

【方法】巨大菌と呼ばれる環境微生物を対象とした。これは納豆菌とは異なり、立体的規則性に優れた PGA を生産する。今回、基本 PGA 生産培地に、Dy をはじめとする 5 つのランタノイド元素、あるいはレアメタルの代表格とされる In を加えた修飾培地を用いた。PGA 合成量はサフラン法で測定した。巨大菌の PGA 合成オペロン (Cap) はメチレンブルーを検出色素とするファンクショナルクローニング法を用いて同定した。

【結果と考察】巨大菌による PGA 生産に対し、In は抑制的である一方、ランタノイド元素の多くが無応答であることが判明した。ただし、ランタノイドの中でも Dy のみ特殊な応答性を誘導し、具体的には有意な増産効果が認められた。巨大菌に Dy 特異的な認識機構が存在する可能性が示唆された。なお、PGA の生産種として有名な納豆菌では Dy による増産効果というものは知られていない。そこで、今回同定した巨大菌 Cap についてさらなる配列分析を進めた。既知の納豆菌 Pgs との比較から、該合成酵素をコードする構造遺伝子部の類似性が明らかになる一方、その遺伝子発現に係る制御領域に注目すべき相違点が見いだされた。

#### Dysprosium-triggered increases in poly-γ-glutamate productivity of *Bacillus megaterium*

○Yuichi Hakumai<sup>1</sup>, Ayuri Matsumura<sup>2</sup>, Makoto Ashiuchi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>United. Grad. Sch. Agric. Sci., Ehime Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ.)

**Key words** poly(amino acid), *Bacillus megaterium*, critical metals, production

### 3P-2a153 新規分離培養手法を用いた海綿由来の有用化合物産出菌の探索

○町田 光史<sup>1</sup>, Dawoon Jung<sup>2</sup>, 青井 謙輝<sup>2</sup>, 中尾 洋一<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>早大院・先進理工・化・生化, <sup>2</sup>広島大・ISSD)  
 ayocha@waseda.jp

**【背景と目的】**天然物化合物の有望な探索源である海綿からは、これまでに多くの二次代謝産物が報告されている。これらの多くは海綿内に共生する微生物が生産していると考えられているが、環境中の微生物は99%以上が分離培養不可能であるため、微生物が天然化合物の真の生産者であることを実証できた報告例はごく限られている。難培養性微生物は環境中では密集して生存していることを鑑みれば、従来の分離培養で用いられてきた限界希釈法では微生物密度が極端に低いため、この低密度がほとんどの微生物を培養できない理由の一つであると考えた。そこで、本研究では密集した微生物間に存在するであろうケミカルシグナルによる相互作用を維持した培養を可能にするために、従来法とは異なるアプローチによる微生物の分離株獲得を試行し、新たな有用性微生物を探索することを目的とした。

**【方法】**海綿から微生物を採集した後、従来培養法である平板培養法と複数の新規分離培養手法 (in situ 培養[(1)Diffusion Chamber 法、(2)i-tip 法]、(3)連続集積培養) を用いて1次培養を行った。その後、それぞれ培養したサンプルを2次培養(寒天平板)に付し分離株を獲得した。獲得した分離株について、16s RNA 遺伝子解析を行い、それらの多様性および新規性について従来法と新規分離法の比較を行った。同時に、それぞれの分離株について抽出液を調整し、LC-MS を用いてメタボローム解析を行った。

**【結果と考察】**手法ごとに獲得された分離株の種類は大きく異なることが判明した。さらに新規培養手法、特に Diffusion Chamber 法および連続集積培養を通じて獲得された分離株は、多様性および新規性の高い菌株(既存株に対する16s RNA 遺伝子の相同性が97%以下)の割合が従来法のそれらと比べて著しく高いことが判明した。

#### Microbial discovery from marine sponge by new cultivation method

○Koshi Machida<sup>1</sup>, Jung Dawoon<sup>2</sup>, Yoshiteru Aoi<sup>2</sup>, Yoichi Nkao<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>ISSD Hiroshima Univ.)

**Key words** marine sponge, uncultured bacteria, microbe, growth control

### 3P-2a154 Visualization of toluene-degrading *Pseudomonas putida* using fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

○Hak Jin Song<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>, Wu-Young Jeong<sup>1</sup>, Sang Hyun Lee<sup>1</sup>, Yung-Hun Yang<sup>1</sup>, Hyung Joo Kim<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)  
 hyungkim@konkuk.ac.kr

Active toluene-degrading *Pseudomonas putida* in soil samples were quantified by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). FISH with a Texas red-labeled oligonucleotide probe based on 16S rRNA sequences was used for the specific detection of *P. putida* at the single cell level. Analysis of the bacterial toluene-degrading activity in the soil samples that were incubated with 200ppm toluene as a sole carbon source with the FISH probe indicated that the number of the bacteria was depended on the presence of toluene. Gas chromatography analysis of toluene in the samples incubated with *P. putida* also showed that rapid decrease in toluene concentration was observed. Results in this report suggested that *in situ* enumeration of toluene-degrading bacteria using FISH might be of high potentials in the field of bioremediation of hazardous organic solvent in terrene environments.

#### Visualization of toluene-degrading *Pseudomonas putida* using fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

○Hak Jin Song<sup>1</sup>, Kwang Jin Kim<sup>2</sup>, Yong-Keun Choi<sup>1</sup>, Minju Chang<sup>1</sup>, Sok-young Shim<sup>1</sup>, Wu-Young Jeong<sup>1</sup>, Sang Hyun Lee<sup>1</sup>, Yung-Hun Yang<sup>1</sup>, Hyung Joo Kim<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Biological eng., Konkuk Univ., <sup>2</sup>Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

**Key words** *Pseudomonas putida*, FISH, toluene degradation

### 3P-2a155 細胞親和性電子伝達ポリマーを介した生細胞への電子注入

○金子 真大<sup>1</sup>, 石川 聖人<sup>2</sup>, 加藤 創一郎<sup>3</sup>, 橋本 和仁<sup>4</sup>, 中西 周次<sup>5</sup>  
 (<sup>1</sup>東大院・工, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>産総研, <sup>4</sup>物質材料機構, <sup>5</sup>阪大・太陽エネセ)  
 nakanishi@chem.es.osaka-u.ac.jp

一般に、生細胞における細胞内酸化還元状態は、その代謝経路・活性と密接に関係している。この事実に基づき、我々は細胞親和性の電子伝達ポリマーを開発し、これを用いた細胞内酸化還元種から細胞外電極への電子排出により、生細胞における細胞内酸化還元状態、ひいては代謝を電気化学的に制御することに成功してきた。この細胞親和性電子伝達ポリマーは、リン脂質極性基本模倣分子(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; MPC)と酸化還元活性分子の共重合体であり、高い分子設計自由度を有しているため、目的に応じて最適な電子伝達ポリマー構造をデザインすることが出来る。本研究では、生細胞への電子注入を第一の目的に、それに適した電子伝達ポリマーの設計と合成と大腸菌を用いた検証を行った。

酸化還元活性部位として十分に負の酸化還元電位を有するビオロゲン類を採用し、これを細胞親和性の MPC と共重合することで、電子伝達ポリマー PMBBV を新規合成した。PMBBV と大腸菌、電子受容体の硝酸を用いて電気化学測定を行ったところ、電子注入に由来する還元電流が検出された。また、MPC と共重合させない酸化還元活性部位モノマーと、共重合させた PMBBV の比較実験を行った結果、MPC と共重合させた場合において細胞毒性が低減されることが確認された。

上記と並行して、十分に正の酸化還元電位を有するフェロセンを MPC と共重合した別種の電子伝達ポリマー (PMF) を用いた細胞代謝制御にも取り組んだ。その結果、電子伝達ポリマーを介した細胞内の電子排出により、モデル微生物として使用した酵母の代謝が改変されることが明らかとなった。以上の結果は、電子伝達ポリマーの分子設計により、対象微生物の代謝の合目的な制御が可能であることを示している。

#### Electron injection into living microbial cells via cytocompatible redox-active polymers

○Masahiro Kaneko<sup>1</sup>, Masahiro Ishikawa<sup>2</sup>, Souichiro Kato<sup>3</sup>, Kazuhito Hashimoto<sup>4</sup>, Shuji Nakanishi<sup>5</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>AIST, <sup>4</sup>NIMS, <sup>5</sup>Res. Center for Solar Energy Chem., Osaka Univ.)

**Key words** electrochemical cultivation, extracellular electron transfer, polymeric mediator, metabolic pathway modification

### 3P-2a156 切断リンカーを利用した細胞内機能性ペプチド探索系の確立

○小崎 一功<sup>1</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 松本 凌<sup>1</sup>, 田邊 智哉<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>名大院・工・生物機能, <sup>2</sup>名大・予防早期医療創成セ)  
 honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

**【背景と目的】**我々は医薬品などへの応用が期待される細胞内機能性ペプチドの探索系を開発してきた[1]。本系はペプチドアレイの各スポットに光切断リンカー、膜透過性ペプチド (CPP) と候補ペプチドを順に合成したものであり、多種類 CPP-ペプチド複合体の細胞内機能を効率よく評価できる。しかし、細胞内導入を目指した CPP の付与や細胞特異性を指向した CPP 配列の改変により、ペプチドの機能が低下したり失われる可能性がある。そこで本研究では、CPP の影響なしに機能性ペプチドを探索可能にする系の確立を目指した。細胞内で切断されるリンカーを CPP とペプチド間に挿入し、細胞内導入後にそれぞれが解離するシステムを利用した。

**【方法】**切断リンカーとして、細胞内プロテクターゼで分解されるアゾリンカーを使用した。セルロースメンブレン上に光切断リンカー、CPP、アゾリンカー、候補ペプチドの順に合成したペプチドアレイを作製した。UV 照射でペプチド複合体を切り出し、各スポットのペプチド複合体を培地に溶出して細胞に添加し、WST-8 アッセイで細胞生存率を算出した。

**【結果と考察】**既報の細胞死誘導ペプチドで本系の検証を行った。アゾリンカー有無で細胞死誘導効果を比較したところ、アゾリンカーを切断できる肝がん細胞ではアゾリンカー有で細胞死誘導効果が高かった。一方、切断できない乳がん細胞では、リンカー有無で細胞死誘導効果に違いはなかった。このことから、細胞内で CPP とペプチドが解離することで CPP による機能阻害を解消できたことが示唆された。さらに本系を用いて、既報の細胞死誘導ペプチドよりも高活性のペプチドを取得することに成功した。

[1] Matsumoto, R. *et al.*, Scientific Reports, 5: 12884 (2015)

#### Establishment of screening system for intracellular functional peptides using a cleavable linker.

○Ikko Kozaki<sup>1</sup>, Kazunori Shimizu<sup>1</sup>, Ryo Matsumoto<sup>1</sup>, Tomoya Tanabe<sup>1</sup>, Hiroyuki Honda<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>PME, Nagoya Univ.)

**Key words** peptide chip, cell penetrating peptide, cleavable linker, screening system

### 3P-2a157 短鎖ペプチドの物理化学特徴に基づく長鎖機能性ペプチドの探索とデザイン

○岩田 晋明<sup>1</sup>, 久米 暁子<sup>1</sup>, 河合 駿<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>1</sup>, 本多 裕之<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・工, <sup>2</sup>名大院・創薬科学, <sup>3</sup>名大・予防早期医療創成セ)  
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】生体内分子に特異的に結合するペプチドは分子標的薬等への応用が期待されており、このような機能性ペプチドの探索は重要な課題である。ペプチドは残基数に応じて膨大な候補配列をもつ。一般的に特異性の高いペプチドは長鎖となるため、評価を行う候補配列を絞ることは探索の効率化につながる。我々は過去にアミノ酸の電荷と疎水度の指標に基づき 20 種のアミノ酸を 4 グループに分類することで配列候補を絞り、標的分子に高い結合性を示す 4 残基ペプチドの性質解析を行っている[1]。しかしこの手法を用いても、より長いペプチドを対象に探索を行う場合は膨大な実験データが必要となる。そこで我々は 4 残基ペプチドで得られた結果を元に、標的分子に高い結合性を示す 8 残基ペプチドの探索に挑戦した。

【方法と結果】512 配列の 4 残基ペプチドをアミノ酸の電荷、疎水度、極性など特徴量を用いた指標値で表し、主成分分析 (PCA) によって各ペプチド配列を 2 成分 PCA 平面上にプロットした。使用した PCA 指標は、特徴量ごとの平均、最大、最小値など、8 残基に拡張可能な指標である。ペプチドアレイ (4 残基、512 配列) に IL-2 を作用させ、抗原抗体反応を利用して各ペプチドと IL-2 の結合性を数値化した。2 成分 PCA 平面上で IL-2 との結合性が上/下位 20 配列のペプチドがプロットされる領域をそれぞれ高/低結合領域とした。640 配列の 8 残基ペプチドを合成して IL-2 との結合評価実験を行い同一平面上にプロットしたところ、高結合領域に含まれる 8 残基ペプチドの結合強度値の平均が低結合領域と比較して約 3 倍高くなった。これより、高結合性の短残基ペプチドの物理化学特徴を利用して、より長鎖の高結合性ペプチドを取得できることが示唆された。

[1] Kume, A., et al., *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(1): 119-127 (2016)

#### Design and analysis of protein binding octamer peptides by physicochemical characteristics of tetramer peptides

○Iwata Shinmei<sup>1</sup>, Kume Akiko<sup>1</sup>, Kawai Shun<sup>2</sup>, Kato Ryuji<sup>2</sup>, Shimizu Kazunori<sup>1</sup>, Honda Hiroyuki<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Pha. Nagoya Univ., <sup>3</sup>PME. Nagoya Univ.)

**Key words** peptide, binding analysis, peptide array, principal component analysis

### 3P-2a158 AuNP-tag を用いた生体分子修飾による金ナノ粒子の高機能化

○的場 晴香<sup>2</sup>, 前原 康秀<sup>1</sup>, 重森 陽士郎<sup>2</sup>, 石田 尚之<sup>2</sup>, 今村 維克<sup>2</sup>, 今中 洋行<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>岡山大・工, <sup>2</sup>岡山大院・自科)  
imanaka@okayama-u.ac.jp

目的: 金ナノ粒子 (AuNP) は、高い化学的安定性、生体適合性や局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) に起因する強い可視光の吸収などの優れた特性を有することから、生物学や医学の分野で広く利用されている。また、粒子の凝集状態による色調の変化を利用して安定・微量物質の比色検出への応用も期待されている。その際、粒子の分散安定性を維持しつつ AuNP 表面を生体分子で機能的に修飾することが重要となる。本研究では、遺伝子工学的手法により任意の部位に連結・挿入可能であり、配向制御および機能維持を可能とする固表面親和性ペプチドをタグとした生体分子の固定化法を確立してきた。本研究では、新たに同定した AuNP への高い親和性ならびに固定化後の分散安定性を担保するペプチド (AuNP-tag) を用いた、多様な機構、親和性を有するリガンド-アナライト間相互作用の比色検出システムの検証を目的とした。

方法と結果: リガンド生体分子として、ビオチン、Strep-tag II (STII) 及び O-Acetylserine sulfhydrylase (OASS) を、アナライト生体分子として Streptavidin (SA), Serine acetyltransferase (SAT) をそれぞれ用いた。AuNPs 懸濁液とリガンド生体分子溶液を混合し、AuNP に固定化後、アナライト溶液を混合した。そして Aggregation Index (=Abs. at 780 nm/Abs. at 530 nm) を測定し、相互作用を評価した。その結果、ビオチン、STII および OASS のいずれの分子をリガンドとして用いた場合でも AuNP は安定に分散し、アナライト分子の添加により相互作用による AuNP の凝集が生じた。また、OASS については AuNP-tag の連結末端を変えらることにより固定化配向を制御できることがわかった。これらの検討を通じ、生体分子による AuNP の簡便なワンステップ機能化が AuNP-tag の連結により可能であることが示された。

#### Preparation of Highly Functionalized Gold Nanoparticles via One-step Modification by AuNP-tag Conjugated Biomolecules

○Haruka Matoba<sup>2</sup>, Yasuhide Maehara<sup>1</sup>, Yojiro Shigemori<sup>2</sup>, Naoyuki Ishida<sup>2</sup>, Koreyoshi Imamura<sup>2</sup>, Hiroyuki Imanaka<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Okayama Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** biosensor, immobilization, peptide, gold colloid

### 3P-2a159 病原性微生物を対象としたプログラム細胞死誘導物質の探索

○大田 悠里<sup>1,2</sup>, 宮本 龍樹<sup>1,2</sup>, 横田 亜紀子<sup>2</sup>, 常田 聡<sup>1</sup>, 野田 尚宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>早大・先進理工, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル)  
stsuneda@waseda.jp

【目的】腐敗や感染症を引き起こす有害微生物を根絶する方法として主に抗生物質が使用されているが、薬剤耐性菌の出現や有益な菌に対してまで生育阻害を引き起こすといった問題も残されており、新しい作用機序を持つ抗菌技術が希求されている。Toxin-antitoxin (TA) 機構は毒性タンパクである Toxin と抗毒性タンパクである Antitoxin から成る微生物の自死機構である。通常 Toxin の毒性は、Antitoxin 分子が Toxin 分子と複合体を形成することで抑制されている。そこで本研究では Toxin と Antitoxin の結合を阻害することで人為的に特定の微生物の細胞死を誘導できるのではないかとこの発想に至り、これら分子の結合を阻害するペプチドの探索・同定、標的微生物の細胞死を誘導することを目的とした。

【方法】本研究では病原性微生物の一種である *Staphylococcus aureus* をモデルとし、ファージディスプレイ法を用いて、本微生物が保持する Toxin に特異的に結合するペプチドを探索した。Toxin と Antitoxin の結合阻害活性を評価するための蛍光消光現象を用いた手法を構築し、実際に TA 結合阻害活性評価を行った。

【結果・考察】ファージディスプレイ法により 10<sup>9</sup> 種類のペプチドライブラリから 235 種類のペプチド配列に絞り込むことに成功した。選定したペプチドをクラスタリングした結果、極性や電荷の異なる多様な化学特性を持つペプチドが含まれていたことが明らかとなった。濃縮率の高いペプチドに関して TA 結合阻害活性は検出されなかったものの、超並列シーケンシングを用いることで従来のファージディスプレイ法では不可能だった濃縮されたペプチドの特性といった情報を得ることが可能となった。

#### Screening of peptides inducing programmed cell death system in a pathogenic bacterial strain

○Yuri Ota<sup>1,2</sup>, Tatsuki Miyamoto<sup>1,2</sup>, Akiko Yokota<sup>2</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>1</sup>, Naohiro Noda<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Biomed. Res. Inst., AIST)

**Key words** *Staphylococcus aureus*, phage display, programmed cell death, peptide

### 3P-2a160 気生微細藻類 *Vischeria helvetica* 由来プロテアーゼによって生成したカゼインオリゴペプチドの ACE 阻害活性

○井上 悠希, 油井 信弘, 阿部 克也  
(工学院大・先進工・生化)  
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】岩の表面やコンクリート塀などの栄養源が少ない環境下で生活している気生微細藻類はユニークな生物機能を有している。コンクリート塀から採取した気生微細藻類 *Vischeria helvetica* KGU-Y001 はプロテアーゼを産生し、タンパク質分解物を窒素源として細胞内に取り込むことで増殖することが分かっている。本研究では、*V. helvetica* によって異なる光培養条件下で産生される細胞外プロテアーゼを利用したカゼインオリゴペプチドの生理活性について評価した結果を述べる。

【方法】*V. helvetica* はカゼイン添加 BB 培地を光強度 0 あるいは 40 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> の条件下で 7 日間振とう培養した。培地を経時的に回収し、乾燥細胞重量の測定、Bradford 法による培地中のタンパク質量の測定を行った。細胞外プロテアーゼはザイモグラフィにより検出し、それらの分子量は FPLC を用いて求めた。また、カゼインオリゴペプチドの加水分解度は OPA 法により求め、生理活性は血圧上昇抑制作用を示す ACE 阻害活性法によって評価した。

【結果と考察】*V. helvetica* をカゼイン添加 BB 培地で 7 日間振とう培養した結果、培地中で検出されたプロテアーゼは光条件によって分子量が異なることが分かった。細胞外プロテアーゼを用いてカゼインを加水分解したところ、明所下で産生されたプロテアーゼは暗所下で産生されたものより高い ACE 阻害活性を示すオリゴペプチドを生成することが認められた。したがって、産生された細胞外プロテアーゼは光条件によって異なる酵素活性を有することが分かった。

#### Bioactive oligopeptides produced by extracellular proteases photoinduced from the aerial microalga

○Yuki Inoue, Nobuhiro Aburai, Katuya Abe  
(Dept. Chem., life sci., Sch. Eng., Kogakuin Univ.)

**Key words** aerial microalgae, protease, casein, oligopeptide

### 3P-2a161 環状バクテリオシン enterocin NKR-5-3B の生合成における環状化部位アミノ酸残基の影響

○善藤 威史<sup>1</sup>, 杉野 春貴<sup>1</sup>, Perez Rodney Honrada<sup>1</sup>, 石橋 直樹<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>1</sup>, 園元 謙二<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大・バイオアーキ)  
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

細菌によってリポソーム上で合成される抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、主に生産菌の近縁種に対し強い抗菌活性を示す。とくに、N 末端と C 末端がペプチド結合した構造をもつ環状バクテリオシンは、高い安定性を有し、食品保存料や医薬品をはじめとする様々な分野への利用が期待される。発酵食品より分離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3B によって生産される環状バクテリオシン enterocin NKR-5-3B (Ent53B) は、様々なグラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す。Ent53B は 64 アミノ酸残基で構成され、その直鎖状の前駆体は 23 アミノ酸残基のリーダー配列を N 末端側に有する [1,2]。環状バクテリオシンの生合成は、リーダー配列の切断、環状化、菌体外排出の 3つの過程を経ると考えられるが、その詳細は未だ明らかとなっていない。そこで本研究は Ent53B 生合成機構の解明を目的とし、ここではとくに Ent53B の環状化部位のアミノ酸残基に着目し、生合成への影響について評価した。環状化部位の Leu1 と Trp64 を種々のアミノ酸に置換した発現用プラスミドを作成し、それぞれを異種発現宿主 *Enterococcus faecalis* JH2-2 に導入した。各変異株の変異 Ent53B 生産能を抗菌活性試験と精製・質量分析による変異体の検出によって評価した。その結果、Leu1 と Trp64 のいずれの場合にも、この領域の  $\alpha$ ヘリックス構造の維持が予想される変異の場合のみで変異 Ent53B が検出され、この  $\alpha$ ヘリックス構造の維持が生合成に必要と考えられた。また、同様にして、リーダー配列に種々の変異を加え、その生合成への影響についても評価を進めている。

[1] Himeno K. *et al.*, *Biochemistry*, 54, 4863-4876 (2015); [2] Perez R.H. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 198, 291-300 (2015).

#### Characterization of amino acid residues involved in circularization of enterocin NKR-5-3B

○Takeshi Zendo<sup>1</sup>, Haruki Sugino<sup>1</sup>, Rodney Honrada Perez<sup>1</sup>, Naoki Ishibashi<sup>1</sup>, Jiro Nakayama<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)

**Key words** bacteriocin, lactic acid bacteria, biosynthesis, circular peptide

### 3P-2a162 金ナノ粒子合成に寄与する二機能性ペプチドのキャラクタリゼーション

○田中 祐圭<sup>1,2</sup>, 大河内 美奈<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>東工大・物質理工学院, <sup>2</sup>JST・ImPACT)  
okochi@chemeng.titech.ac.jp

ペプチドは、生体分子やナノ材料など幅広い物質に親和性を持つことが知られ、標的生体分子とバイオセンサー素子を繋ぐ界面形成やナノ粒子合成の形態制御に利用される。本研究では、センサの電極材料としても利用される金に着目し、ペプチドアレイを利用した金ナノ粒子(AuNPs)結合性ペプチドの同定、並びにこれらの配列のキャラクタリゼーションを行うことを目的とした。

600 種類のペプチドからなるペプチドアレイを作製し、AuNPs との結合試験を行った。ここで高い結合性を示したペプチド中に存在するアミノ酸出現頻度を解析し、当該アミノ酸が優先的に存在するペプチド配列から構成されたペプチドアレイを再設計し、結合試験を再度実施した。この結合試験とペプチドアレイの設計を 3 回繰り返すことで、優れた金結合性を示すペプチドのスクリーニングを行なった。

その結果、AuNPs 結合能を示す多数のペプチドのスクリーニングに成功した。最も高い AuNPs 結合能を示したペプチド(AuP1, 2, 3)のペプチドアレイを作成し、AuNPs 溶液並びに AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>溶液に浸漬したところ、これらの配列は、AuNPs 結合能だけでなく、金イオンを還元し多様な形態を持つナノプレートと合成できる二機能性ペプチドであることが示された。また AuP1, 2, 3 ペプチドの断片化ライブラリーに対する結合試験の結果から、複数の AuNPs 結合や金イオン還元モチーフが同定された。今後、これらのペプチドを活用することで、溶液中に限らず基板表面においても温和な条件で緻密に制御されたナノ粒子を合成・配置可能な新たな技術を開創できると期待される。

#### Characterization of bi-functional peptide responsible for gold nanoparticle synthesis

○Masayoshi Tanaka<sup>1,2</sup>, Mina Okochi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Chem. Tech., Tokyo Tech., <sup>2</sup>JST・ImPACT)

**Key words** gold colloid, peptide chip

### 3P-2a163 ペプチド修飾ポアセンサによる微生物検出

○大河内 美奈<sup>1,2</sup>, イルファ ハズン ハルリサ<sup>1</sup>, 武藤 正記<sup>1,2</sup>, 田中 祐圭<sup>1,2</sup>, 横田 一暲<sup>2,3</sup>, 筒井 真楠<sup>2,3</sup>, 谷口 正輝<sup>2,3</sup>, 川合 知二<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>東工大・物質理工学院, <sup>2</sup>ImPACT, <sup>3</sup>阪大・産研)  
okochi@chemeng.titech.ac.jp

ペプチドは低分子でありながら、標的分子に対して親和性を有することから、マイクロ・ナノシステムにおける検出用プローブとして優れた特性を有する。本研究では、溶液中の微生物、粒子をはじめ単一分子検出において注目されるポアセンサに着目し、細菌結合性を示すペプチドを修飾した小型・安価な細菌検出デバイスの構築を目的とした。微生物認識受容体である Toll 様受容体、特にリポ多糖認識分子として機能する TLR4 のアミノ酸配列に基づいたペプチドアレイを作製し、グラム陰性菌である大腸菌に結合性を示すペプチドを探した。大腸菌との結合試験の結果、高い結合性を示す領域が 3つ見出された。また、これらの蛍光標識ペプチドを作製し、リポ多糖との結合性をドットプロット法により比較した結果、高結合性を示す配列の同定に成功した。そこで、ポア内にペプチドを固定化した電極を用いたイオン電流波形を解析したところ、ペプチド修飾により大腸菌の通過時間が顕著に増加することが示された。ペプチドの修飾により、未修飾の場合と比較して細菌との相互作用が増し、ポアセンサ内を通過する時間が増加したものと考えられる。これらの結果より、ペプチド修飾により多様な混入物の存在下においても細菌の検出が可能となるものと期待される。

#### Microbial detection using peptide modified-pore sensor

○Mina Okochi<sup>1,2</sup>, Ilva Hanun Harlisa<sup>1</sup>, Masaki Muto<sup>1,2</sup>, Masayoshi Tanaka<sup>1,2</sup>, Kazumichi Yokota<sup>2,3</sup>, Makusu Tsutsui<sup>2,3</sup>, Masateru Taniguchi<sup>2,3</sup>, Tomoji Kawai<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem. Sci. & Eng., Tokyo Tech., <sup>2</sup>ImPACT, <sup>3</sup>ISIR, Osaka Univ.)

**Key words** peptide, pore sensor, bacteria

### 3P-2a164 大豆タンパク質由来カチオン性ペプチドの抗菌・抗炎症・創傷治癒活性の解析

○齊藤 健吾, 野本 貴史, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】大豆タンパク質由来ペプチドには、血中コレステロールや中性脂肪の低下、抗糖尿病などの効果があることが報告されている。そこで、代表的な大豆タンパク質であるグリシニンおよび  $\beta$ -コングリシニンの  $\alpha$ サブユニットと  $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列に着目し、抗菌ペプチドに共通する特徴に基づいて、カチオン性ペプチドを探し、7 種類のペプチドを見出した。本研究では、異なるタンパク質由来の 3 種類のカチオン性ペプチドを選択し、4 種類のヒト病原微生物に対する抗菌活性、LPS 中和活性、および血管新生促進活性を解析した。

【方法】歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis*, 日和見感染真菌 *Candida albicans*, アクネ菌 *Propionibacterium acnes*, および球菌 *Streptococcus mutans* に対する抗菌活性を、生菌数に由来する ATP を測定することで評価し、50%増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。また、リムルテストによってリポ多糖 (LPS) 中和活性を検討し、50%反応阻害有効濃度 (EC<sub>50</sub>) を算出した。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をマトリゲル上で培養し、血管新生(管腔形成)促進作用を検討した。

【結果】3 種類のペプチドは、歯周病菌と日和見感染真菌に対して抗菌活性を発揮した。そのときの IC<sub>50</sub> は、30~65  $\mu$ M であった。また、3 種類のペプチドは、いずれも強い LPS 中和活性を示したことから、抗炎症作用があることが示唆された。今後、血管新生促進作用について検討する予定である。

#### Evaluation of antimicrobial, anti-inflammatory, and angiogenic activities of cationic peptides derived from soy proteins

○Kengo Saito, Takahumi Nomoto, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** soy bean peptide, antimicrobial peptide, anti-inflammatory peptide, angiogenic peptide

### 3P-2a165 アミノ酸置換によるコメ抗菌ペプチドの抗炎症活性の増強とその機構の解明

○豊田 竜, 金子 陽徳, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室ではコメ  $\alpha$ -アミラーゼ由来ペプチド (Amy I-1-18) が, 抗菌, 抗炎症, 創傷治癒などの多彩な生体防御機能を有することを見出している。そこで本研究では, 本ペプチドの抗炎症活性を増強するために, 5 種類の 1 残基アミノ酸置換体を化学合成し, リポ多糖 (LPS) 刺激によって誘導されるマクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生に対する抑制効果について検討した。また, LPS の作用の抑制に関わるこれらのペプチドが有する機構を解明するために, リムルステストを用いて各ペプチドと LPS の相互作用を解析した。

【実験方法】18 残基のアミノ酸からなる Amy I-1-18 中の 1 残基のアミノ酸をアルギニン, またはロイシンに置換した 5 種類の置換体を化学合成した。マウスマクロファージ細胞 (RAW264 細胞) をコンフルエントな状態まで培養した後, 各濃度のペプチドと 100 ng/ml の *Escherichia coli* 由来 LPS を添加し, 産生される NO 量を, Griess 試薬を用いて測定した。また, ペプチドによるエンドトキシン中和活性を, リムルステスト (生化学工業 (株)) を用いて測定し, 50% 有効濃度 (EC<sub>50</sub>) を求めた。

【結果】4 種類の置換体の抗炎症作用は, Amy I-1-18 に比べて高くなり, エンドトキシン中和活性も 3 種類の置換体において向上した。したがって, 3 種類の置換体は LPS に結合して抗炎症活性を発揮していると考えられる。現在, Biacore を用いて各置換体と LPS の相互作用を解析中である。

#### Effect of amino acid substitution on anti-inflammatory activity and mechanism of action of an octadecapeptide derived from rice.

○Ryu Toyoda, Akinori Kaneko, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka,  
Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** cationic peptide, anti-inflammatory peptide, antimicrobial peptide, LPS-neutralizing activity

### 3P-2a166 アミノ酸置換によるコメ抗菌ペプチドの創傷治癒活性の増強とその機構の解明

○生江 俊樹, 豊田 竜, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室ではコメ  $\alpha$ -アミラーゼ由来ペプチド (AmyI-1-18) が, 抗菌, 抗炎症, 創傷治癒などの多彩な生体防御機能を有することを見出している。そこで, 本研究では, AmyI-1-18 とその 3 種類のアルギニン置換体と 2 種類のロイシン置換体の創傷治癒活性を, 血管新生促進作用と細胞遊走促進作用に関して比較し, アミノ酸置換の効果を検討した。また, 阻害剤を用いて, AmyI-1-18 とその置換体の作用機構を解析した。

【実験方法】創傷治癒作用を評価するために, 血管新生 (管腔形成) 促進試験を, 次のようにして行った。予め 96 ウェルプレートに Matrigel を添加し, 人工基底膜を作製し, その上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とペプチドをそれぞれ添加した。一定時間培養した後に, 顕微鏡で管腔構造を形成した細胞を観察し, その細胞の長さの合計を測定した。細胞遊走促進 (スクラッチ) 試験では, 24 ウェルプレートに HUVEC をコンフルエントな状態まで培養した後, ステックによって一定の幅の創傷を作製した。その直後にペプチドを添加して, 創傷の面積を 24 時間ごとに測定した。

【結果】AmyI-1-18 またはロイシン置換体 (N3L) を添加した場合に, 血管構造をした細胞がより密な状態となり, その細胞の長さの合計がコントロールに比べて増加した。また, AmyI-1-18 または N3L を添加した場合に, 細胞遊走が促進され, 創傷閉鎖がコントロールと比べて促進された。現在, 各種阻害剤を用いて作用機構について検討している。

#### Effect of amino acid substitution on wound healing activity and mechanism of action of an octadecapeptide derived from rice.

○Toshiki Namae, Tayoda Ryu, Ochiai Akihito, Tanaka Takaaki,  
Taniguchi Masayuki  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** substitution of amino acids, wound healing, angiogenic activity, migration-promoting peptide

### 3P-2a167 ローヤルゼリー酵素加水分解物からの生理活性ペプチドの精製と同定およびその機能解析

○平塚 祐也, 川部 純弥, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】これまでに本研究室では, 米や大豆などの食品タンパク質から抗菌, 抗炎症, 創傷治癒などの機能を有する生体防御ペプチドの探索, 精製および同定を行ってきた。それらのペプチドに共通する特徴として, 分子量が 1,000~3,000 Da であること, 正味の正電荷を有すること, 等電点が 8 以上のカチオン性であることが挙げられる。そこで本研究では, ローヤルゼリー酵素加水分解物を等電点電気泳動によって, 20 の画分に分離し, 得られた画分の抗菌活性を測定し, 活性を確認できた画分に含まれるペプチドを同定した。

【方法】ローヤルゼリー酵素加水分解物(株)山田養蜂場本社)を, 調製用等電点電気泳動装置 (Rotofor, BioRad) を用いて 20 の画分に分離した。各画分の菌周病菌, アクネ菌, う蝕菌, および日和見感染真菌に対する抗菌活性を, 生菌由来する ATP を測定することによって算出した。活性を検出できた画分から逆相クロマトグラフィーを用いてペプチドを精製し, 得られたピーク画分に含まれるペプチドを MALDI TOF-MS を用いて同定した。

【結果】ローヤルゼリー酵素加水分解物を, 等電点電気泳動によって 20 画分に分離した結果, いくつかの等電点の高い画分に, 強い抗菌活性が確認された。そこで, 特に塩基性の高い画分 No.19 と No.20 に含まれるペプチドを, 逆相クロマトグラフィーを用いて精製し, MALDI TOF-MS を用いて同定した。現在までに, 画分 No.20 から 10 種類のペプチドを同定できている。

#### Purification, identification, and characterization of bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of royal jelly

○Yuya Hiratsuka, Jun-ya Kawabe, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka,  
Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** antimicrobial peptide, royal jelly protein, cationic peptide

### 3P-2a168 大豆タンパク質酵素加水分解物からの生理活性ペプチドの精製と同定およびその機能解析

○野田 悠輔, 川部 純弥, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室では, これまでにコメタンパク質加水分解物や納豆抽出物から抗菌, 抗炎症, 創傷治癒などの生理活性を有するカチオン性ペプチドを見出している。それらのペプチドは, 分子量が 1,000~3,000 Da 程度であること, 正味の正電荷を持つこと, 等電点が 8 以上のカチオン性であることなどの共通の特性を有していた。そこで本研究では, 大豆タンパク質加水分解物を等電点電気泳動によって分離し, 等電点の異なるペプチドを調製した。また, 各画分の抗菌活性を測定し, 活性を検出できた画分からペプチドを精製し, 同定した。

【実験方法】本研究では, 大豆タンパク質加水分解物(不二製油グループ本社(株))から高分子成分と低分子成分を除去した後, 得られた酵素加水分解物を, 等電点電気泳動装置 (Rotofor, BioRad) を用いて分離した。得られた各画分の菌周病菌, アクネ菌, う蝕菌, および日和見感染真菌に対する抗菌活性を, 生菌由来する ATP を測定することによって測定した。活性を検出できた画分から逆相クロマトグラフィーを用いてペプチドを精製し, 得られたピーク画分に含まれるペプチドを MALDI TOF-MS を用いて同定した。

【結果】大豆タンパク質加水分解物を, 等電点電気泳動によって 20 画分に分離した。いくつかの画分は, 菌周病菌とアクネ菌に対して抗菌活性を発揮した。抗菌活性は等電点が高い画分ばかりでなく, 中性付近に等電点を有する画分からも検出できた。現在, 各画分からペプチドを同定している。

#### Purification, identification, and characterization of bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of soybeans.

○Yuusuke Noda, Jyunya Kawabe, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka,  
Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** soybean peptide, antimicrobial peptide, host defense peptide, isoelectric focusing

### 3P-2a169 コメ糖タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製と同定およびその生理活性の解明

○谷口 正之, 亀田 光裕, 落合 秋人, 田中 孝明  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

**【目的】**本研究では、コメ糖タンパク質の酵素加水分解液を等電点電気泳動によって分離し、カチオン性ペプチドを調製した。得られた画分の生理活性を明らかにするために、ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した。また、抗菌活性を有する画分に含まれるペプチドを精製し、質量分析計を用いて同定した。さらに、同定したペプチドを化学合成し、それらの抗菌活性、LPS 中和活性、および血管新生促進活性について検討した。

**【実験方法】**本研究では、プロテアーゼを用いてコメ糖タンパク質を加水分解し、ペプチドサンプルを調製した。得られたペプチドサンプルを、調製用等電点電気泳動装置 (BioRad, Rotofor) を用いて 20 の画分に分離した。各画分の菌周病菌、アクネ菌、う蝕菌、および日和見感染真菌に対する抗菌活性を測定した。次に、逆相クロマトグラフィーを用いて活性を検出できた画分からペプチドを精製し、MALDI TOF-MS を用いて各画分に含まれるペプチドを同定した。同定したペプチドを化学合成し、それらの抗菌活性、LPS 中和活性、および血管新生促進活性を測定した。

**【結果】**ペプシンを用いてコメ糖タンパク質を加水分解した後、等電点電気泳動によって 20 画分に分離した。等電点が高い 3 つの画分から、等電点が 9 以上の 27 種類のペプチドを同定できた。同定したペプチドのうち 9 種類を化学合成し、それらの抗菌活性、LPS 中和活性、および血管新生促進活性を測定した結果、5 種類のペプチドは 3 つの生理活性を兼ね備えていた。

#### Purification, identification, and characterization of cationic peptides from enzymatic hydrolysate of rice bran protein

○Masayuki Taniguchi, Mitsuhiro Kameda, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** rice bran protein, bioactive peptide, multifunctional peptide, cationic peptide

### 3P-2a170 納豆水抽出物中のカチオン性ペプチドの精製と同定およびその生理活性の解析

○野本 貴史, 幡本 晃太, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之  
(新潟大・自然研)  
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

**【目的】**大豆たんぱく質由来ペプチドにはコレステロール代謝改善、抗肥満、食欲抑制効果などの機能があることが報告されている。そこで本研究では、大豆タンパク質由来の新たな生理活性ペプチドを探索するために、納豆に着目した。納豆水抽出物中に含まれるペプチドを等電点電気泳動によって分離し、抗菌活性を検出できた画分からペプチドを精製し、同定した。さらに、同定したペプチドを化学合成し、それらの生理活性を解析した。

**【実験手法】**本研究では、等電点電気泳動装置 (Rotofor : Bio-Rad) を用いて、納豆水抽出物を 20 の画分に分離した。各画分の菌周病菌、アクネ菌、および日和見感染真菌に対する抗菌活性を測定した。活性を検出できた画分に含まれるペプチドを逆相クロマトグラフィーにより精製し、各ピークに含まれるペプチドを MALDI-TOF/MS を用いて同定した。同定したペプチドの中から 12 種類のカチオン性ペプチドを化学合成した。合成したペプチドの抗菌、LPS 中和、および血管新生促進の各活性を測定した。

**【結果】**画分 No.16 と No.17 は菌周病菌に対して、画分 No.18 ~ No.20 はアクネ菌に対して、それぞれ抗菌活性を発揮した。抗菌活性を検出した画分からペプチドを精製した結果、88 種類のペプチドを同定できた。この中から 12 種類のカチオン性ペプチドを化学合成し、それらの生理活性を測定した結果、いくつかのペプチドが抗菌活性と血管新生促進活性を有することがわかった。現在、LPS 中和活性を測定中である。

#### Purification, identification, and characterization of cationic peptides from water extract of natto

○Takafumi Nomoto, Kota Hatamoto, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka,  
Masayuki Taniguchi  
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

**Key words** natto, soy bean peptide, bioactive peptide, multifunctional peptide

### 3P-2a171 マイクロ流路による water-in-oil エマルジョンの調製

○池田 奈央, 岩上 千華, 伊藤 伸哉, 牧野 祥嗣  
(富山県大・工)  
makino@pu-toyama.ac.jp

**【目的】**経口、経静脈などの非局所投与では、薬物は全身に到達する。すなわち、薬物は患部以外の正常組織へも作用する。そのため、例えば抗がん剤のような細胞毒性の高い薬剤が投与されると、患者はひどい副作用に悩まされることになる。この問題を解決するため、DDS (ドラッグデリバリーシステム) の開発が進められてきた。DDS は、患部のみに薬物を送達して作用させるための重要技術である。我々は、DDS キャリアとして有用なリポソームの、マイクロ流路チップ上での連続生産の実現を目指している。本研究では、脂質二重層からなるリポソームへ変換するための単層エマルジョンを、マイクロ流路チップ上で作製した。

**【方法】**まず、各流路幅が 50 $\mu$ m のマイクロ流路に水系緩衝液と有機溶媒を流し、それら 2 流路の合流点で water-in-oil (w/o) エマルジョンを作製した。水相と油相の流速比と脂質の種類を検討し、エマルジョンの直径を小さくするよう試みた。また、チップ貼り合わせ面へのオイルの浸透を抑制させるために流路の加工法を検討し、流路の耐油性を高めた。

**【結果】**水相と油相の流速比と脂質の種類を検討し、直径 20 ~ 30  $\mu$ m の w/o エマルジョンを作製した。オレイン酸や 1-ヘキサノールなどの有機溶媒を油相として、またメチレンブルー含有の水系緩衝液を水相として用いたところ、内水相が青色のエマルジョンの生成が顕微鏡下で観察された。w/o エマルジョンの生成は、有機溶媒内の脂質の有無に影響されなかった。各液相の流速、リポソーム生成のための脂質、調製時の温度等の詳細な結果を報告する。

#### Production of water-in-oil emulsion on microfluidic chip

○Nao Ikeda, Chika Iwakami, Nobuya Itoh, Yoshihide Makino  
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

**Key words** drug delivery system, water-in-oil emulsion, microfluidic chip, lipid

### 3P-2a172 蜂の子に含まれるグリコシルセラミドの免疫細胞に対する活性の解析

○酒谷 真以<sup>1</sup>, 濱 侑紀<sup>2</sup>, 松永 陽香<sup>1</sup>, 藤川 彩美<sup>1</sup>, 門脇 真史<sup>1</sup>,  
鶴田 裕美<sup>3</sup>, 吉賀 豊司<sup>1</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 栢 圭介<sup>3</sup>, 北垣 浩志<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大院・農, <sup>2</sup>株式会社正栄, <sup>3</sup>佐賀工技セ)  
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

#### 【背景・目的】

蜂の子は長い食経験がある伝統食であるが、機能性に関する報告はほとんどない。そこで蜂の子由来の機能性成分が見つければ、養蜂業者が多い九州地方において新たな産業シーズとなるのが期待される。また近年スズメバチの被害が拡大しており、こうした取り組みは駆除に繋がる可能性もある。これまで人体には存在しない  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドが CD1d 受容体に結合し、癌細胞に対する攻撃性を持つ iNKT (invariant natural killer T) 細胞を活性化することが報告されている。そこで本研究では、蜂の子には多くの機能性の報告があるグリコシルセラミド (GC) が存在するのか、存在するとすれば免疫細胞に対する活性を持っているのかの検証を行った。

#### 【実験方法】

蜂の子脂質を Bligh-Dyer 法で抽出し、オープンカラムクロマトグラフィーで粗精製後、TLC 上で展開した目的脂質を掻き取り有機溶媒で溶解し精製した。得られた画分は LPS 刺激により炎症性メディエーターを誘発したマウス由来マクロファージ RAW264.7 株に添加し、Griess 反応を用いた一酸化窒素 (NO) 産生量、ELISA による炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6) 産生量の測定を行った。

#### 【結果・考察】

蜂の子から GC と思われる脂質分子を見つけ精製した後、ESI-MS/MS によるフラグメントイオン解析を行った結果、*Caenorhabditis elegans* で既に報告がある GC の MS フラグメントパターンと一致した。このことから、蜂の子にも無脊椎動物に存在する GC が存在していると考えられた。次に精製した蜂の子 GC を LPS の刺激を受けた RAW264.7 細胞株に添加したところ、添加濃度に応じた NO 産生量の抑制が確認された (無添加区に比べ 1.5  $\mu$ g/mL 添加区で最大 20% の抑制率  $p < 0.001$ )。また、炎症性サイトカインでも同様の傾向が確認された。さらに細胞毒性は確認されず、蜂の子 GC には細胞傷害性のない抗炎症作用があることが示唆された。

#### Immunosuppression activity of glycosylceramide contained in the larva of bees

○Mai Sakatani<sup>1</sup>, Yuki Hama<sup>2</sup>, Haruka Matsunaga<sup>1</sup>, Ayami Fujikawa<sup>1</sup>,  
Masafumi Kadowaki<sup>1</sup>, Yumi Tsuruta<sup>3</sup>, Toyoshi Yoshiga<sup>1</sup>, Hiroshi Hamajima<sup>1</sup>,  
Keisuke Tsuge<sup>3</sup>, Hiroshi Kitagaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Saga Univ., <sup>2</sup>Shoei Corp., <sup>3</sup>Industrial Technology Center of Saga)

**Key words** functionality, larvae, bee

## 3P-2a173 局所麻酔薬による膜ラフト模倣構造熱安定性の低下

○菅原 恒, 下川 直史, 高木 昌宏  
(北陸先端大・マテリアル)  
takagi@jaist.ac.jp

## 背景

近年の研究で局所麻酔薬(local anesthetic(LA))の作用メカニズムについて、膜チャネルへの直接的な結合の他に、生体膜の物性変化の重要性が示唆されている。これまで我々は、膜ラフト構造のモデル系である Liquid-ordered(Lo)/Liquid-disordered(Ld)とに相分離したリポソームにおいて、各相間における流動性の差が、局所麻酔薬の添加によって小さくなり相分離形成が阻害されることを報告した。過去の研究に基づき、膜ラフト模倣構造の熱安定性に対する局所麻酔薬の影響を解析した。

## 方法

脂質として飽和脂質(DPPC)、不飽和脂質(DOPC)、コレステロール(Chol)を用いた。DPPC/LA 膜および DPPC/Chol/LA 膜の各温度(25-42°C)の流動性を、Laurdan 蛍光スペクトルの GP 値より解析した。DOPC/DPPC/LA および DOPC/DPPC/Chol/LA における膜の相分離構造の形成率を温度ごと(20-32°C)に観察し、相分離構造の消失温度(形成率が50%になる温度:miscibility temperature (T<sub>m</sub>))を測定した。観察には、蛍光顕微鏡を用いた。

## 結果と考察

GP 値解析より DPPC/LA、および DPPC/Cholesterol/LA 双方の系で、脂質の転移に対応する GP 値の急激な減少が DPPC のみよりも低い温度で見られ、その温度は両者で差が無い事が解った。この結果は、DPPC からなる Solid-ordered (So) 相、および DPPC/Chol からなる Lo 相の熱安定性が LA により低下する事を示唆している。しかし DOPC/DPPC/LA 膜に比べ、DOPC/DPPC/Chol/LA では、T<sub>m</sub> が顕著に低下していた。これらの結果は、(1)DOPC/DPPC(So/Ld)系で LA は、DOPC(Ld)領域に存在し、DPPC 領域(So)に分配されない事、(2)DOPC/DPPC/Chol(Lo/Ld)系では、LA の DPPC/Chol 領域(Lo)への分配が促進される事、(3)LA は DOPC/DPPC/Chol におけるラフト模倣構造である Lo/Ld 相分離構造の熱安定性を低下させる事、が解った。

## Decrease in thermostability of membrane raft-model structures by addition of local anesthetics

○Ko Sugahara, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

**Key words** local anesthetic, liposome, lipid raft, thermostability

## 3P-2a174 浸透圧印加による荷電脂質膜の張力誘起相分離

○山本 遼太, 下川 直史, 高木 昌宏  
(北陸先端大・マテリアル)  
takagi@jaist.ac.jp

[背景と目的] リン脂質は水中で自発的に脂質二重膜構造を形成し、これが閉じた構造をリポソームという。リポソームは細胞膜のモデル系として注目されており、特に多成分の脂質から成るリポソームでは組成の不均一な構造が形成される。これは相分離として理解され、細胞膜におけるラフトと対応付けられている。リポソームの構造制御は、基礎的な細胞機能の理解だけではなく、応用的にも、ドラッグデリバリーシステムの開発等と関連して重要である。しかし、リポソームの構造は、安定であるために外部からの擾乱が必要となる。そこで、本研究では塩や電場に応答する荷電脂質膜の基礎的な相分離制御を目指し、リポソームに浸透圧を印加することによる張力誘起相分離の観察を行った。

[実験方法] 脂質は DOPG(負電荷不飽和脂質)、DPPC(中性飽和脂質)、Cholesterolを用いた。また蛍光試薬として Rhodamine DHPE を用いた。リポソームは静置水と法で作製し、リポソーム内の溶液濃度が高くなるようにグルコースを用いてサンプルを調製した。観察は蛍光顕微鏡を用いて行った。

[結果・考察] 先行研究では、中性脂質から成るリポソームへ浸透圧による張力を印加した際、相分離ドメインの誘起が報告されている。本研究における荷電脂質から成るリポソームへの浸透圧による張力の印加においても、濃度勾配の上昇に伴う相分離ドメインの出現が観察された。荷電脂質を含む三成分系リポソームの各組成比を変化させ、浸透圧による張力を加えることで、相分離ドメイン形成の誘起やその相状態について総合的に議論する。特に、張力印加に伴いコレステロールの局在に変化が現れるかに注目する。

## Tension-induced phase separation by osmotic stress in charged lipid membranes

○Ryota Yamamoto, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

**Key words** liposome, charged lipid, membrane tension, phase separation

## 3P-2a175 リン脂質組成非対称リポソームにおける膜内外層間相互作用と相分離挙動

○大井 克仁, 下川 直史, 高木 昌宏  
(北陸先端大・マテリアル)  
takagi@jaist.ac.jp

## 背景

リン脂質分子から成る二重膜構造は細胞膜のモデル系として注目されており、多成分リン脂質膜の膜面で起こる相分離現象は細胞におけるラフトモデルとの関係から興味を持たれている。しかし、細胞膜は二重膜の内層と外層で異なる脂質組成を有しているにもかかわらず、多くの細胞モデル膜であるリポソームを用いた研究では、脂質組成の非対称性は考慮されてこなかった。さらに、細胞膜の内層に多く存在する負電荷脂質は膜電位に関係しており、荷電脂質を含む非対称膜の挙動を明らかにすることは重要である。そこで我々は脂質組成非対称二重膜を作成し相分離挙動を観察した。特に、二重膜内外層間の相互作用に注目し、その役割を解明することを目的とした。

## 実験方法

中性不飽和脂質(DOPC)、負電荷不飽和脂質(DOPG)、中性飽和脂質(DPPC)、負電荷飽和脂質(DPPG)を用いた。非対称リポソームは液滴法により作成した。塩として1価のNaClを、相分離構造を蛍光顕微鏡で観察するために不飽和脂質を染色する Rhodamine-DHPE を用いた。

## 結果

脂質組成非対称リポソームにおいて、外膜が飽和脂質で構成されたリポソームは、外膜が不飽和脂質で構成されたものよりも多くの相分離形成が観察された。これは、内層に形成される飽和脂質に富んだ固体ドメインは外膜が脂質の場合に安定化されることを示している。さらに、二重膜内外層で荷電脂質の量が異なるリポソームの作成に成功した。内層に DPPG を含む場合に相分離が促進される結果を得た。これは脂質組成が対称のリポソームで得られた結果と一致している。さらに、塩濃度がリポソーム内外で非対称の場合の相挙動についても議論する。

## Role of Interleaflet interaction in phase separation of asymmetric lipid membranes

○Katsuhito Ooi, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

**Key words** phase separation, biomimetic membrane, charged lipid, interleaflet interaction

3P-2a176 振盪フラスコ培養中の気相および液相の CO<sub>2</sub> と O<sub>2</sub> の挙動解析

○高橋 将人, 青柳 秀紀  
(筑波大院・生命環境)  
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

## 目的

我々は、「環境試料の振盪フラスコ培養中に、適切な方法(無菌的な培養栓の開封、通気、吸引操作)で気相環境を間欠的に変化させると、集積される培養微生物群集が大きく変化する」という新奇な現象を見出した<sup>1-3)</sup>。本研究では、この新奇な現象の解明を目指し、振盪培養中のフラスコの気相と液相(培養液)のガス成分(CO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>)のモニタリングを試みた(これまで振盪培養中のフラスコの気相や液相のガス成分の挙動は十分に解析されていない)。また、得られた結果に基づき、振盪フラスコ培養法の問題点の把握と解決策の提案を試みた。【方法および結果】

従来の測定法の問題点を排除し、振盪を中断せずに培養液の採取ができ、振盪フラスコ培養中の気相や液相のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>の濃度を連続測定できるシステムを開発した。*Escherichia coli* K12を三角フラスコ(EF)、坂口フラスコ(SF)および我々が開発した特殊円筒型フラスコ(S-CF)で振盪培養し、開発したシステムを用いて培養中の気相と液相のガス成分を比較解析した。気相部の初発CO<sub>2</sub>濃度は約0.06%であったが、培養に伴いEF、SF、S-CFでそれぞれ、3.5%、5.5%、0.33%まで増加した。培養液中の最大CO<sub>2</sub>濃度はEF、SF、S-CFでそれぞれ39 mg/L、62 mg/L、3.5 mg/Lであった。S-CFはEFやSFと比べてCO<sub>2</sub>濃度を低く抑えることができた。気相部の初発O<sub>2</sub>濃度は20.9%であったが、培養に伴いEF、SFでそれぞれ、17.2%、13.9%まで減少し、S-CFでは20%を維持した。一方、培養液中のO<sub>2</sub>濃度はどのフラスコも同様な経過で減少した。本研究は振盪フラスコ培養中の気相と液相のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>の挙動を連続的に把握した初めての報告である。現在、振盪フラスコ培養中のCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>が種々の微生物の生理活性に及ぼす影響について検討中である。

1) H24 生物工学学会要旨集 p. 156, 2) H26 生物工学学会要旨集 p. 248, 3) H27 生物工学学会要旨集 p. 138

Behavior analysis of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in gas-liquid phases of shake flask during cultivation

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** carbon dioxide, gas-liquid phases, oxygen, shake flask culture

### 3P-2a177 組換え大腸菌を用いたラムノースを出発基質とする 1-プロパノール発酵生産

○松原 充, 浦野 信行, 鳴滝 藍, 山田 尚平, 片岡 道彦  
(大阪大院・生環科)  
kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp

【目的】1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの単量体であるプロピレンへ容易に変換できるため、ポリマー原料としての価値が注目されている。ポリマー原料としての1-プロパノールをバイオマスから生産することが可能となれば、より長期間のCO<sub>2</sub>固定という面において大きな効果が期待できる。一方、ラムノースは未利用バイオマスの1つであるペクチンの主要な構成糖であり、その有効な利用法が求められている。そこで本研究では、ラムノースを出発基質とする1-プロパノール発酵生産について、組換え *Escherichia coli* を用いて検討を行った。

【方法と結果】*E. coli* はラムノースを資化する内在性経路を有しており、細胞内に取り込まれたラムノースは、ジヒドロキシアセトンリン酸とラクトアルデヒド(LA)に分割され、LAはさらに1,2-プロパンジオール(1,2-PD)へ変換される。そこで *E. coli* に対し、1,2-PD から1-プロパノールへの変換反応を触媒する *Klebsiella pneumoniae* 由来の酵素遺伝子群の導入を試みた。得られた株を用いて、ラムノースを炭素源とする培地で嫌氣的に培養を行ったところ、ラムノースの消費とともに1-プロパノールの生成が認められた。

さらに、1-プロパノールへ至る経路内の中間生成物の分解代謝あるいは副産物生成に関わる酵素遺伝子の破壊株を宿主として用いることで、1-プロパノール収率の向上を試みた。まず、野生株および12種類の遺伝子破壊株(1-プロパノール合成能未導入)を使用し、ラムノースからの1,2-PD収率を指標として検討した。その結果、LAを分解代謝する酵素遺伝子である *aldA* の破壊を含む5種類の株において、野生株よりも高い1,2-PD収量・収率が得られた。さらにこれらの株に対して1-プロパノール合成能を賦与したところ、野生株よりも高い1-プロパノール収量・収率が得られた。

#### Fermentative production of 1-propanol from L-rhamnose using recombinant *Escherichia coli*

○Mitsuru Matsubara, Nobuyuki Urano, Ai Narutaki, Shohei Yamada, Michihiko Kataoka  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, metabolic engineering, fermentation, 1-propanol

### 3P-2a178 精製プロセスを伴わない低分子抗体の定量的薬効・蛋白質間相互作用スクリーニング

○杉山 在生人<sup>1</sup>, 梅津 光央<sup>1</sup>, 中澤 光<sup>1</sup>, 浅野 竜太郎<sup>2</sup>, 二井手 哲平<sup>1</sup>, 服部 峰充<sup>1</sup>, 熊谷 泉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・工, <sup>2</sup>農大院・工)  
mitsuo@prn.che.tohoku.ac.jp

がん細胞およびTリンパ球表面蛋白質を標的とする2種類の抗体の変領域断片のみから構成される低分子型の二重特異性抗体(ディアボディ)は、T細胞を用いたがん細胞への傷害機構や腫瘍に対する高い浸透力等、IgG型抗体にはない利点を有しており次世代型の抗体医薬として期待されている。

しかし、その薬効は可変領域断片の組合せによって1000倍以上変化してしまうことが分かっており、高い薬効を示すディアボディ開発には網羅的に可変領域断片を組み合わせて、それらディアボディ群をハイスループットにスクリーニングする手法開発が重要だと我々は考えている。そのため、我々はこれまでに遺伝子設計を出発点とした発現ベクターの効率的作製法およびワンステップ精製を介する薬効評価法を開発してきたが、精製プロセスを伴うため迅速性に課題があった。そこで、本研究では未精製段階でディアボディ濃度を定量することで精製プロセスが不要な薬効スクリーニング法を開発し、遺伝子設計から薬効の網羅的評価までの一貫したスクリーニングプロセスの構築を目指した。

まず、ディアボディのC末端に付加した2種のペプチドタグを介した sandwich ELISA法を構築することで、未精製な培地上清中に含まれるディアボディの濃度を定量した。これに既開発の薬効スクリーニング法を組み合わせたことで、100種を超えるライブラリから高薬効型ディアボディ8種を簡便にスクリーニングできた。また、表面プラズモン共鳴法との組み合わせによって標的分子に対する簡易的な結合活性評価も試みたため合わせて報告する。

#### Quantitative cytotoxicity screening of antibody and protein-protein interaction without purification process

○Aruto Sugiyama<sup>1</sup>, Mitsuo Umetsu<sup>1</sup>, Hikaru Nakazawa<sup>1</sup>, Ryutarō Asano<sup>2</sup>, Tepei Niide<sup>1</sup>, Takamitsu Hattori<sup>1</sup>, Izumi Kumagai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** Cancer Therapy, Bispecific antibody, high-throughput screening

### 3P-2a179 油脂生産と菌体内油脂回収に適した *Lipomyces* 酵母のスクリーニング

○柳場 まな<sup>1</sup>, 正木 和夫<sup>2</sup>, 南アルプス市<sup>3\*</sup>, 長沼 孝文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山梨大院・医工総・生命, <sup>2</sup>独)酒類総研, <sup>3</sup>南アルプス市)  
tnaganuma@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】我々は、油脂生産酵母 *Lipomyces* を用いて低価値な再生可能資源からバイオディーゼル燃料(BDF)の原料となる油脂の生産に関する研究をおこなっている。この研究を実用化するためには、原料炭素源を高効率で油脂に変換でき、かつ菌体内油脂を低コストで回収できる菌株の取得が最優先されると考えた。本報告は分譲および野外分離菌株を用いて、これら目的に見合う菌株を取得するための解析をおこなうと共に、菌株の決定を試みた。

【結果と考察】多数の菌株の油脂生産能力を効率良く調べるために、顕微鏡を用いて Oil globule size(μm<sup>3</sup>)を測定する方法を用いた。得られた値の定量的数値への読み替えをおこなう目的で Oil content(mg/10<sup>8</sup>cells)を測定し、Oil globule sizeとの比較をおこなった。この size が大きい場合には、Oil content との間に相関性が高いことがわかった。

Oil content は Fat coefficient (g oil/100g sugar used)と関係があり、Oil content が多いものは Fat coefficient も高かった。Oil produced(g/l)に対して Oil content の高いもの有利であることがわかった。また、Oil content (=Oil globule size)の高いものの方が、簡単な処理で容易に菌体内油脂が漏出される傾向がみられた。*Lipomyces* を用いた BDF 用油脂の生産には、再生可能資源の廃棄モモ果汁と残炊飯米を用いることを当面は想定していることから、この研究に利用可能な Fat coefficient と油脂の回収し易さを重点に、これに Oil produced を加えた三つを選択指標としてスクリーニングをおこなった。廃棄モモ果汁において得られた菌株は、Fat coefficient と Oil produced は高いが菌体内油脂回収に難点があった。残炊飯米では Fat coefficient と Oil produced は高いが油脂回収が難しい菌株と、前者二つはそれほど高くないが油脂回収がし易い菌株が得られた。

\* 著者からの希望により自治体名を記載しています。

#### Screening of yeast *Lipomyces* for oil production and intracellular oil recovery

○Mana Yanagiba<sup>1</sup>, Kazuo Masaki<sup>2</sup>, Minami-Alps City<sup>3\*</sup>, Takafumi Naganuma<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, <sup>2</sup>NRIB, <sup>3</sup>Minami-Alps City)

**Key words** *Lipomyces* screening, oil production, intracellular oil recovery

### 3P-2a180 ミジンコにおける 2A ペプチドを用いたバイシストロニック発現システムの構築

○熊谷 仁志, 加藤 泰彦, 松浦 友亮, 渡邊 肇  
(阪大院・工)  
hawataana@gmail.com

バイシストロニック発現システムとは、1つのプロモーターから2つのタンパク質を発現させるシステムのことで、原核生物で一般に用いられている。この手法を真核生物に導入することで、遺伝子組み換え個体を作製した際にレポーター遺伝子と目的遺伝子の共発現が可能になり、スクリーニングが簡便になる。これを可能にする配列が「2A ペプチド」である。2A ペプチドはリボソームのトランスフェラーゼ活性を阻害し、ポリペプチド鎖の連結を抑制する。これにより、2A ペプチドの上流と下流の遺伝子が共発現する。

オオミジンコ(*Daphnia magna*)は淡水系に広く生息しており、毒性学、進化学、生態学などのモデル生物として長年利用されてきた。近年では、TALEN、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集も可能になっている。しかしながら、ミジンコにおける共発現システムはまだ確立していない。そこで本研究では、ミジンコにおける2Aペプチドの機能と活性を調べた。

2Aペプチドレポーターミジンコを作製し、その切断活性を調べた。切断活性を調べるため、2Aの上流と下流で異なる蛍光タンパク質遺伝子を発現させ、蛍光顕微鏡下での観察とWestern Blot法を行うことにした。ミジンコの全身で機能するEF1αプロモーターの制御下で、細胞膜で赤色、核で緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミド(My-mCherry-2A-H2B-GFP)を設計した。それをCas9タンパク質と一緒にマイクロインジェクションを用いてミジンコの卵に導入した。その結果、1種類の遺伝子組換え個体の創出に成功した。この個体を蛍光顕微鏡で観察したところ、赤色と緑色蛍光タンパク質の異所的な発現を確認することができた。それに加えて、mCherryとGFPが切断されていることをGFP抗体を使用したWestern Blotを用いて確認した。これらの結果はミジンコにおいて2Aペプチドが機能していることを示唆している。

#### Use of the bicistronic expression involving viral 2A peptide in *Daphnia magna*

○Hitoshi Kumagai, Yasuhiko Kato, Tomoaki Matsuura, Hajime Watanabe  
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** *Daphnia magna*, 2A-peptide, CRISPR/Cas9

### 3P-2a181 核酸医薬原料となるヌクレオシドアナログ生産に有用な微生物触媒の探索と機能解析

○光川 侑輝<sup>1</sup>, 日比 慎, 松谷 成裕, 堀之内 伸行, 高橋 里美, 小川 順  
(京大院・農)  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

#### 【背景と目的】

核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬に続く新たな分子標的医薬であり、その高い標的的特異性と低い抗原性に期待が集まる一方、積極的な酵素的分解に曝されることから患者体内での安定性に課題が残っている。この解決策として考えられているのが、2'-O-methylribonucleoside (2'-OMe-NR)をはじめとした修飾型ヌクレオシドアナログの RNA 鎖への導入による酵素耐性の付与である。ただ、こうしたヌクレオシドアナログ、特にプリンアナログの有機化学合成には多段階の反応が必要となり、コスト及び環境負荷が産業生産上の大きな課題となっている。そこで本研究では酵素法による温和かつ効率的なプリンアナログ合成法の開発、及び利用可能なヌクレオシドアナログのバリエーションの拡大を目指し、産業的に有用な微生物触媒の探索を行っている。

#### 【結果】

保存菌株及び土壌分離菌のスクリーニングにより 2'-O-methyluridine (2'-OMe-UR)の変換活性を持つ微生物として乳酸菌 1 株と放線菌 1 株を得た。また、これらの菌株より新規な nucleoside hydrolase を単離、同定した。これらの酵素は 2'-OMe-NR に対する加水分解活性に加えて糖転移活性も保有し、2'-OMe-UR と Adenine を基質とする 2'-O-methyladenosine (2'-OMe-AR)の酵素的合成が初めて可能となった。本酵素を用いた 2'-OMe-AR 合成には基質及び生成物の加水分解による収率低下が課題となったが、各種条件検討より、適当濃度のグリセロールの添加によって加水分解活性のみを選択的に抑制し収率の改善を達成することができた。現在、加水分解との競合下における糖転移反応の速度論的解析を行っており、さらなる収率向上への応用を検討している。また、この他にもスクリーニングから新規な 2'-OMe-NR 代謝酵素を持つ微生物を得ており、その詳細な機能および生理学的背景についても調査を進めている。

### Novel 2'-O-methylribonucleoside-metabolizing enzymes promising for the nucleic acid drug production

○Yuuki Mitsukawa, Makoto Hibi, Narihiro Matsutani, Nobuyuki Horinouchi, Satomi Takahashi, Jun Ogawa  
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** 2'-O-methylribonucleoside, nucleoside hydrolase, transribosylation, nucleic acid drug

### 3P-2a182 スイホウガンによる抗原特異的な抗体生産系の開発

○額田 夏生<sup>1</sup>, アヴシャル 恵利子<sup>1</sup>, 中井 沙織<sup>1</sup>, 都築 祥子<sup>1</sup>, 田丸 浩<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資,<sup>2</sup>三重大・生命支セ,<sup>3</sup>三重大・新産業)  
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【背景】7 回膜貫通型タンパク質 GPCR を含む膜タンパク質は、既存および開発中の医薬品のほぼ半数が標的としており、治療・診断薬やタンパク質の結晶化に用いる有用抗体の新規開発が期待されている。しかし、従来のマウスやラビットといった哺乳動物を用いた方法では、抗原タンパク質の相同性が高いと免疫寛容によって有用な抗体が作製できない場合がある。このような問題を克服するために、脊椎動物の源流に位置しており、自然免疫系に加えて獲得免疫系を保有する魚類を用いた抗体生産系の開発を目指した。本研究では、スイホウガン (水泡眼) という眼下に角膜が肥大化した水泡を有するキンギョを免疫動物として抗体生産系の開発を行った。

【方法】スイホウガンの水泡液中に含まれる goldfish Immunoglobulin M (IgM) を検出するために大腸菌を用いて IgM 重鎖の CH3 領域の組換えタンパク質を作製し、ウサギへ免疫することによって抗 IgM ウサギポリクローナル抗体を作製した。また、投与した抗原タンパク質に特異的な抗体が産生されたかどうか調べるために、Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を抗原タンパク質として水泡液中に複数回注入して免疫を行った。免疫したスイホウガンから水泡液を採取し、標的タンパク質 EGFP に対する抗体産生の有無を ELISA 法を用いて確認した。

【結果・考察】作製した抗 IgM ウサギポリクローナル抗体を用いて、水泡液中の IgM を ELISA 法によって定量的に検出することができた。さらに、EGFP を抗原として免疫した個体の水泡液中に EGFP 特異的な抗体が産生されていることが確認された。以上の結果、スイホウガンを免疫ホスト動物として利用して抗原特異的な抗体のスクリーニングおよびライブラリーを構築し、特異性や親和性の高い抗体の単離およびキンギョ抗体の特性解析をして抗体医薬に応用したいと考えている。

### Research and development of specific antibody production by goldfish

○Natsuki Nukada<sup>1</sup>, Eriko Avsar<sup>1</sup>, Saori Nakai<sup>1</sup>, Shoko Tsuzuki<sup>1</sup>, Yutaka Tamaru<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., <sup>2</sup>Life Sci. Res. Center, Mie Univ., <sup>3</sup>Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ.)

**Key words** antibody, immunity, goldfish

### 3P-2a183 生体制御分子硫酸体の生理機能評価技術開発

○下平 武彦<sup>1</sup>, 黒木 勝久<sup>1</sup>, Liu Ming-Cheh<sup>2</sup>, 榎原 陽一<sup>1</sup>, 水光 正仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎大院・農工総合,<sup>2</sup>トレド大・薬)  
ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景・目的】生体制御分子の一種であるポリフェノール化合物は、抗ガン作用等の様々な生理機能を持つ。これらの化合物は摂取されると肝臓や腸管で硫酸転移酵素(SULTs)などの薬物代謝第二相酵素により代謝される。近年、このようなポリフェノールの代謝産物が、様々な細胞応答に関与し、多くの疾病に関わる G タンパク質共役型受容体(GPCR)に作用し機能することが報告された。硫酸体においても同様に GPCR へ作用する可能性が考えられるが、機能性も未だ解明されていない。そこで本研究では生体制御分子硫酸体の GPCR への作用に焦点をあて、GPCR に対する機能評価系の構築および、硫酸体の生理機能解明を目的に研究を行った。

【方法】様々な生体制御分子硫酸体は、SULT を発現させた大腸菌により遺伝子工学的に調製した。得られた生体制御分子硫酸体は HPLC 解析、質量分析、NMR 解析にて構造決定した。次に、調製した硫酸体を用いて、ヒト肝がん由来細胞株 (HepG2) に対する増殖抑制効果を確認した。さらに、各種 GPCR を強発現させたヒト胎児腎細胞(293T)に、GPCR シグナルの下流の転写応答に関与する応答配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを遺伝子導入し、GPCR を介した機能評価系を構築した。この評価細胞を用いて、調製した生体制御分子硫酸体の GPCR に対する機能評価を行った。

【結果・考察】様々な生体制御分子硫酸体にガン細胞増殖抑制効果があることが確認できた。さらに GPCR の機能評価系にて、いくつかの硫酸体において硫酸体未処理区と比較しルシフェラーゼ活性の変化が確認できた。以上の結果から、生体制御分子硫酸体の GPCR を介したシグナル伝達系への関与が示されたので、今後更なる作用メカニズム解明を行う。

### Functional analysis of sulfated bioregulatory molecules

○Takehiko Shimohira<sup>1</sup>, Katsuhisa Kurogi<sup>1</sup>, Ming-Cheh Liu<sup>2</sup>, Yoichi Sakakibara<sup>1</sup>, Masahito Suiko<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. sch. Agric. and Eng., Univ. Miyazaki., <sup>2</sup>Dept. Pharm., Coll. Pharm. and Pharm. sci., Univ. Toledo.)

**Key words** Sulfotransferase, Sulfated polyphenol, GPCR, CRE-luciferase assay

### 3P-2a184 mRNA から構成される多入力 microRNA 応答性人工遺伝子回路の構築

○松浦 理史<sup>1,2</sup>, 藤田 祥彦<sup>2</sup>, 齊藤 博英<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・医,<sup>2</sup>京大・iPS細胞研)  
hirohide.saito@cira.kyoto-u.ac.jp

microRNA はノンコーディング RNA の一種であり、標的遺伝子の下方制御を通じて分化、発生、腫瘍形成、等様々な細胞プロセスに関与している。その発現プロファイルは細胞種によって異なることが知られている。それゆえに、特定の microRNA に応答して導入遺伝子の発現を制御できるような人工遺伝子回路は細胞種特異的な機能制御システムとして有用である。しかしながら、既存の microRNA 応答性遺伝子回路は DNA から構成されているため、回路を導入した細胞のゲノムへ挿入される可能性があり、安全上問題がある。そこで我々の研究室では近年、DNA と比べて安全な人工 RNA から成る遺伝子回路を提唱して実際にヒト細胞内で機能することを実証した。その仕組みとしては RNA 結合タンパク質を利用した転写後制御を基盤としており、検出したい microRNA の発現に応じて出力遺伝子の発現が ON となるシステムである。しかしながら、RNA から成る遺伝子回路は DNA から成るそれに比べてダイナミックレンジ(出力レベルの ON、OFF 比率)が低いという問題がある。また、複数の microRNA を同時検出できるような多入力回路はまだ実現していない。本研究では、ダイナミックレンジの改善、多入力応答回路の実現という 2 つの課題に取り組んだ。評価はフローサイトメーターを用いた蛍光定量アッセイにより行った。今回、我々は microRNA に対する感受性を高めることでダイナミックレンジを改善できることを実証する。更に、基本的な論理回路として多入力応答性の AND 回路や OR 回路が細胞内でプログラム通りに作動することも実証する。本研究により、RNA を基盤とした、より精密でかつ安全な細胞運命制御システムが実現するであろう。応用例としては分化誘導の際に生じる、未分化細胞の除去などが挙げられる。

### The construction of multi-input microRNA-responsive synthetic genetic circuit with mRNAs

○Satoshi Matsura<sup>1,2</sup>, Yoshihiko Fujita<sup>2</sup>, Hirohide Saito<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med. Kyoto Univ., <sup>2</sup>CiRA, Kyoto Univ.)

**Key words** microRNA, post-translational regulation, synthetic genetic circuit, synthetic biology

### 3S-Ap01 未利用資源のエネルギーを利用した焼酎製造

○奥村 隆享  
(霧島酒造)

takayuki-okumura@kirishima.co.jp

芋焼酎は、大地の恵みである農産物（サツマイモ、米）が原料です。当社は、その大地の恵みを余すことなく最大限利用するために、焼酎製造工程から排出される焼酎粕や芋くずを未利用資源として捉え、メタン発酵によりガスを回収し、エネルギー源として利用しています。焼酎粕とは、発酵した焼酎もろみを蒸留した後に残った粕のことです。また、芋くずとは、選別工程で傷ついたり、大きさを整える時に出た切れ端などの取り除かれた部分のことです。芋焼酎の場合、出来上がる焼酎の約2倍の焼酎粕が発生し、1日約650トンになります。従来のメタン発酵方法では、焼酎粕の液部のみしかメタン発酵できませんでした。そのため、ガス回収率が低く、焼酎粕の固液分離が律速となっていました。更に残った固体部分の処理も大きな課題でした。現在では、固定床式高温メタン発酵システムを採用することで、効率的にガス回収が行えるようになりました。固定床式は微生物を保持する担体がメタン発酵槽内で固定されているため、微生物の流出が起こりにくく効率的にガス回収が行えます。また、微生物の反応が速い高温発酵（約55℃）により粘性があり固形物が多い焼酎粕の高速処理を可能にしています。メタン発酵により有機物80%以上、固形分60%以上が分解されてバイオガスが発生します。このバイオガスは、焼酎粕1トン当たり約40Nm<sup>3</sup>発生し、メタン濃度60%、硫化水素濃度1,000ppmであり、脱硫塔で硫化水素を除去し、ガスホルダを経由して焼酎製造工程のボイラーへ供給されます。バイオガスは24時間連続的に発生し、焼酎製造工程に優先的に供給されますが、バイオガスの需要は原料の種類、工程、時間帯毎に大きく変動するため、余剰ガスが発生します。この余剰ガスは余剰量を確認しながら3基のガスエンジン発電機を台数制御し、無駄なくバイオガスを使い切るように運転パターンを工夫しています。バイオガスを100%使い切る事が、大地の恵みを余すことなく最大限利用することに繋がっていきます。これら一連の取組を紹介いたします。

#### The manufacturing of sweet potato shochu utilizing the biomass energy

○Takayuki Okumura  
(Kirishima Shuzou Co.,Ltd.)

**Key words** shochu, biomass, energy

### 3S-Ap02 清酒醸造を支える酵母開発技術

○中原 克己, 稲橋 正明  
(日本醸造協会)

labo@jozo.or.jp

清酒酵母は矢部規矩治により1895年（明治28年）初めて報告された。それ以来、多くの清酒酵母が優良な仕込み（醪）から分離されてきた。これらの優良清酒酵母を全国の清酒製造蔵元へ広めるために、1906年に醸造協会（現、日本醸造協会）は設立された。優良酵母には番号がつけられ、きょうかい〇号酵母として頒布されている。

研究者の創意・工夫による清酒酵母の開発は、1960年代に国税庁醸造試験所の秋山らによる「泡なし」酵母から始まった。それまでの清酒酵母には高泡を形成する特徴があり、清酒の仕込み時に大量の泡を発生させるため、タンクに半分の量しか仕込みを行うことができなかった。1963年、鳥根県の一酒造場で清酒の仕込みに泡の発生しない現象が連続して見られた。この現象をもとに泡を発生させない優良清酒酵母の開発が試みられた。高泡を形成する酵母には空気の泡に吸着する性質が見られることが分かり、この性質を利用して、泡に吸着しない酵母を自然変異の中から見つけ出し、「泡なし」酵母は誕生した。「泡なし」酵母は、仕込み作業の効率があがるなどメリットが多いため、今では販売されているきょうかい酵母の約85%が「泡なし」酵母である。

1973年をピークに清酒の消費量は下がりはじめた。平成の時代に入り、清酒業界では品質の多様化による消費拡大として吟醸酒や純米酒への取り組みが進んだ。そのため、特徴ある清酒酵母の開発が多方面で行われた。中でも吟醸酒特有の香り高い酵母の開発が数多く行われ、各地で各県開発吟醸酵母として利用され始めた。また、特徴的な香気を高生成する酵母や機能性を有する酵母の開発が行われた。

我々は清酒の品質に大きな影響をおよぼす有機酸に着目した。清酒醸造は並行複発酵といわれ、麴による糖化と酵母によるアルコール発酵が同時に行われる。糖化と発酵のバランスをコントロールすることが清酒醸造においてとても重要である。しかし、多数の仕込みを行っていけば中には糖化と発酵のバランスを崩し、多酸傾向になってしまうこともある。この問題を解決するために、既存の各種きょうかい酵母と比較して、大幅に酸生成の少ない清酒酵母を開発した。また、清酒の味の多様化として、酸味に特徴がある清酒を目指した。清酒に含まれる主な有機酸は乳酸、リンゴ酸、コハク酸、クエン酸である。酸に特長のある清酒をつくるには有機酸を直接添加する方法を除くと、微生物を利用する方法が考えられ、乳酸菌を利用して乳酸を高める方法とクエン酸生成の多い焼酎用の麴を利用してクエン酸を高める方法などが知られていた。そこで従来の方法では高められなかった酸、中でもリンゴ酸に注目した。リンゴ酸の割合を高め、かつ全体としても酸生成の多い清酒酵母を開発した。

さらに各県による吟醸酵母の開発の時流に乗り、先に開発した少酸・多酸性酵母のそれぞれに、カブロン酸エチルを多く作り出す特性を付け加えた。このため酸生成が少ない・多い、香気生成が高い・低い、の合計4タイプの酵母を開発した。

上記の4タイプのうち、少酸性高香気生成酵母の利用が進んだが、各県の吟醸酵母と比較される中で、この酵母は欠点として味が重いとの指摘が多くなされるようになった。原因に当たる成分を調べたところ、イソアミルアルコールを多く生成することが分かった。イソアミルアルコールは官能評価で嫌われるムレ香の主成分であるイソバレルアルデヒドの前駆物質でもあり、ムレ香の発生を抑えるために貯蔵管理を難しくさせる。そのためイソアミルアルコールが少なく、少酸性高香気生成の長所を生かした酵母を新たに開発した。

これらの清酒醸造のニーズに合わせた酵母の開発を紹介する。

#### Yeast breeding techniques to support the sake brewing

○Katsumi Nakahara, Masaaki Inahashi  
(Brewing Society Japan)

**Key words** sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, sake brewing

## 3S-Ap03 泡盛の商品展開における基盤研究の活用

○塚原 正俊  
(バイオジェット)  
tsuka@biojet.jp

泡盛は、沖縄で独自に発展した約 600 年の歴史を有する日本最古の蒸留酒である。原材料は米（主にタイ米）、水、黒麹菌、酵母であり、蒸留は古来からの手法である単式蒸留に限定されている。さらに、伝統的に年単位の熟成により風味が豊かになった「古酒（くーす）」が珍重され、泡盛における重要な付加価値となっている。しかしながら、これまでに泡盛を対象とした研究報告例は他の酒類と比較して少なく、多面的に研究開発を進める意義は大きい。我々は、これまで多くの機軸と連携し、研究シーズを産業応用につなげる取り組みを通じて、泡盛のパラエティー化に資する研究や新商品開発に取り組んできた。今回、学術的な分析結果や評価技術を産業化につなげた成果について紹介したい。

## &lt;泡盛黒麹菌&gt;

現在の泡盛醸造では、限られた黒麹菌株が用いられている。これは、戦前、各酒造所は独自菌株を用いていたものの、第 2 次世界大戦における沖縄戦の壊滅的な被害でほぼ全ての菌株が失われた後、醸造特性が高い菌株が採取・実用化され、泡盛の復興につながったという歴史的背景が要因となっている。一方、新たな泡盛黒麹菌の開発を目指す上では、黒麹菌の系統分類が長年の間混同としていたことが実用化研究のハードルとなっていた。近年、黒麹菌が *Aspergillus luchuensis* として再分類されたことで (Yamada *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233-237, 2011)、泡盛黒麹菌の新たな研究開発の道が開かれた。我々は、泡盛黒麹菌の詳細な解析に取り組み、現在の泡盛醸造に用いられている黒麹菌が全て *Aspergillus luchuensis* であること、泡盛醸造に用いられている株は様々な遺伝的差異が認められ泡盛の香味に影響を与えること、などを明らかにした。さらに、泡盛醸造において混合して用いられてきた 2 菌株 (ISH1, ISH2) について、混合比を変えて製麹することで風味の異なる泡盛醸造が可能であることを見出すと共に、本技術を用いた泡盛銘柄の商品化につなげることができた。

## &lt;泡盛酵母&gt;

泡盛醸造に用いられている酵母は、泡盛黒麹菌と同様に第 2 次世界大戦の影響で、ほとんどの銘柄で 101 号酵母が用いられている。我々は、新たな泡盛酵母を開発する試みとして、自然界から複数の泡盛酵母を確立し、目標とする香气成分の特徴を有する複数の泡盛銘柄を商品化することができた。一方、101 号酵母が泡盛醸造に適した特性を多く有していることを活用しつつ新たな泡盛酵母の開発につなげる取り組みとして、101 号酵母を親株として新たな酵母を育種する取り組みを進め、泡盛醸造に適した基本的特性を維持し、異なる風味の泡盛を醸造しうる酵母「101H 酵母」を確立し (Takagi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 140-147, 2015; 生化学論文賞)、商品化につなげることができた。

## &lt;香味解析&gt;

新商品開発における評価や、販売店や飲食店における商品アピールに用いるデータ取得を目的として、泡盛の総合的な風味の特徴を科学的に評価する手法の構築を進めてきた。官能評価法は、特にアルコール飲料では困難さが伴うため、泡盛を対象として迅速かつ精度の高い評価技術を検討してきた。香りの評価としてフラッシュ GC ノーズ HERACLES II、味分析として電子味覚システム ASTREE を用いた。各測定条件を泡盛に至適化し、市販されている約 200 銘柄の泡盛について網羅的な解析を行った。さらに、官能評価との統合解析の結果、香り及び味の 2 軸からなる泡盛風味プロファイルを作成した。得られた「泡盛味わいマップ」のデータの応用例として、那覇空港で 6 店舗を展開するエアポートトレーディング社と連携し、泡盛の小売りの現場での活用を開始した。本システムは泡盛の販促に活用され、乗客者及び販売者から良好な反響を得ている。弊社は基盤技術から応用までの一貫性を重視した対応を中心的業務としている。その上で、得られた基盤情報を様々な産業界で具体的に応用し成果につなげることが、産業振興はもちろん基盤研究の再評価や発展につながると確信し、企業や大学、研究機関とのネットワークを駆使した迅速な連携による新たな価値の創出を目指している。泡盛は沖縄という一地域の特産品であるものの、その特性は不明な点が多く、今後の泡盛振興、あるいは、他の酒類への波及しうる技術として貢献できると考えている。

この場をお借りして、これまでの取り組みに尽力していただいた琉球大学、奈良先端科学技術大学院大学、酒類総合研究所、農研機構食品研究部門、および多くの泡盛酒造所の皆様、および社員に深く感謝します。

## Application of scientific research to product development of Awamori

○Masatoshi Tsukahara  
(Biojet)

**Key words** Awamori, yeast, *Aspergillus luchuensis*

## 3S-Ap04 酒類製造における革新技術; まるごと果実瞬間凍結粉砕浸漬製法 Freeze-Crush-Infusion (FCI)

○藤原 裕之  
(サントリースピリッツ)  
Hiroyuki\_Fujiwara@suntory.co.jp

日本の酒類総市場は、人口減少などの影響で全体に縮小傾向にある一方で、缶チューハイやハイボールなどの低アルコール (3~9%) 飲料は大きく伸長を続けている。当社ではこれらの低アルコール飲料を Ready-to-drink (RTD) と呼んでいるが、RTD は従来より、ニュートラルなアルコールと果汁 (ストレートまたは濃縮) をブレンドして製造されるタイプのものが市場のほとんどを占めていた。当社は 2005 年に新技術「まるごと果実瞬間凍結粉砕製法; Freeze-Crush-Infusion (FCI)」を開発し、「-196℃」というブランド名の RTD を発売した。FCI 製法 (特許取得済) の概要は次の通りである。まるごと果実を液体窒素で瞬間凍結し、数 10 $\mu$ m の大きさまで粉砕する。パウダー状に粉砕された果実をニュートラル・アルコールに浸漬し、不溶物をろ過することによって「FCI 原料酒」が完成となる。

FCI 製法には技術的に 3 つのキープポイントが存在する。すなわち、まるごと果実・凍結粉砕・アルコール浸漬である。第一に、まるごと果実を使用することによって、多くの成分を FCI 原料酒中に含ませることができる。果実の芳香性成分は一般に果皮や内膜、種に多く存在するが、これらは通常の果汁には含まれない。第二に、凍結粉砕加工は一切の加熱や酸化を伴わない工程であるが、これもまた通常の市販果汁と異なる点である。第三に、アルコールに浸漬することによって、親水性と親油性の両方の成分を FCI 原料酒に溶け込ませることができるが、これもまた果汁とは異なる点となる。

この新技術「FCI 製法」によって、当社は現在 RTD 市場のリーディングカンパニーとなっている。(2016 年 5 月現在)

当日は直近の国内外の酒類市場についても紹介する。

## Development of new technology in spirits: Freeze-Crush-Infusion method

○Hiroyuki Fujiwara  
(Suntory Spirits Ltd.)

**Key words** spirits, fruits, ready-to-drink (RTD), Freeze-Crush-Infusion (FCI)

**3S-App05 研究開発の知見を生産技術に活用する事例紹介**

○伊藤 義則

(アサヒビール・研究開発本部)

yoshinori.ito@asahibeer.co.jp

ビール製品に影響を及ぼす化合物の数は数千といわれている。またその一つの化合物の生成に及ぼす要因も数多くありまたそれらの要因が互いに影響を及ぼしている。

すなわち小スケールの実験系で得られたファクトをそのまま現業に応用することはできない。一方、生産の現場では日々均一の品質の商品を製造していくことが必須となっている。我々は研究所の知見を工場での生産技術に展開するうえにおいて、目標の品質を工場で作るためのコントロールポイントを生産現場に提案しそのコントロールポイントを現場での生産工程に落としこむ業務を日々行っている。本報告ではこの活動の一部を報告する。

**3S-Bp01 グローバル化時代と地球温暖化に適した晩生コシヒカリのNGS解析に基づく開発**○富田 因則<sup>1</sup>, 岩瀬 雄大<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>(静岡大・グリーン科学技術研究所,<sup>2</sup>農工大)

omtomit@ipc.shizuoka.ac.jp

[背景]地球温暖化により、イネの主要品種「コシヒカリ」に高温障害が発生するとともに、多発化する台風による倒伏で深刻なダメージを被っている。加えて、環太平洋連携協定(TPP)の妥結に伴い、「コシヒカリ」が既に生産されている米国と豪州に新たにコメの輸入枠を設けたため、安価な外国産コシヒカリの流入が必至となった。従って、高温登熟を避けるとともに、より低コストで多収生産が可能な「スーパーコシヒカリ」を育成する必要がある。これまで、「コシヒカリ」に足りない遺伝子を付与するため、DNA マーカー選抜によって「コシヒカリ」への目的遺伝子の戻し交雑移入を進めてきた。さらに、次世代シーケンサー(NGS)による全ゲノムの解読によって、目的遺伝子が入っているかどうか、その他の配列が元の品種と同じかどうかが一目瞭然となれば、目的遺伝子以外は「コシヒカリ」のゲノムからなる新品種の早期開発が期待される。[実験材料及び方法]本研究では、伊勢神宮の神田で発見された変異種で「コシヒカリ」より6日晩生の「イセヒカリ」を高温登熟回避の遺伝子給源として期待し、遺伝子解析を試みた。まず、「コシヒカリ」と「イセヒカリ」との交雑F<sub>2</sub>およびF<sub>3</sub>において、「イセヒカリ」よりもさらに晩生の遺伝子型が分離し、固定した。続いて、F<sub>3</sub>で固定した晩生系統を1回親、「コシヒカリ」を反復親にして「コシヒカリ」への4回の戻し交雑を行った結果、「イセヒカリ」に由来し、「コシヒカリ」の遺伝的背景で12日の晩生効果をもつ不完全優性の1個の遺伝子 *Hd-i* の存在が明らかとなった。

以上のように、「コシヒカリ」に「イセヒカリ」に由来する晩生遺伝子 *Hd-i* を4回の戻し交雑で移入した「コシヒカリ Hd-i」(BC4F<sub>2</sub>)と「コシヒカリ」の全ゲノムを解読するため、Nextera トランスポソームでゲノム DNA をタグ付けしつづつ断片化し、PCR で両末端にシーケンスプライマーとなる配列を含むアダプターを合成後、磁性ビーズで DNA 断片をサイズ選択して、定性・定量分析し、NGS 解析用の DNA ライブリーを作製した。これを次世代シーケンサー HiSeq によりペアエンドリード条件で解読し、得られたリード配列を「日本晴」のゲノムをリファレンス配列として、ソフトウェア BWA を用いてマッピングした。[結果]次世代シーケンサーによるリシーケンス解析の結果、「コシヒカリ Hd-i」でカバー率が99.1%、平均 depth が61.52 となり、「コシヒカリ」ではカバー率が99.0%、平均 depth が35.68 となった。さらに、全ゲノムの vcf ファイルを作成し、「コシヒカリ」の仮想ゲノムを構築して「コシヒカリ Hd-i」のゲノム配列と比較した結果、第3染色体の33046628~34376629の約1.3 Mbの領域に SNP、INDEL が集中して存在する他は、ほぼ「コシヒカリ」のゲノムに置換されていた。この1.3 Mb 領域の中にある、*Hd16* 遺伝子の第9エキソンに1個の SNP が検出されたことから、*Hd-i* は *Hd16* と同じアルルと考えられる。本研究によって開発した、コシヒカリより12日晩生化し、約99%コシヒカリのゲノムを持つ「コシヒカリ Hd16」は、これまで「コシヒカリ」一辺倒といえる我が国の稲作において、8月の猛暑期の開花、登熟を避けるとともに、適地適作を可能にする「コシヒカリ型晩生品種」として期待できる。

本研究は、JST 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP 産学共同促進ステージハイリスク挑戦タイプ「グローバル化時代と地球温暖化に適した超多収・大粒・早晩生イネの次世代シーケンサー・ゲノムワイド解析による開発：研究責任者 富田因則」による成果である。

**Case studies on exploiting knowledge of R&D for industrial technology**

○Yoshinori Ito

(R&amp;D Div., Asahi Breweries, Ltd.)

**NGS-based development of late-flowering rice suitable for the globalized world and global warming**○Motonori Tomita<sup>1</sup>, Yuta Iwase<sup>1</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>(<sup>1</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Tokyo Univ. Agric. Technol.)**Key words** beer, production, technology**Key words** whole genome sequencing, genome integration, rice, *Oryza sativa*

### 3S-Bp02 網羅的遺伝子発現情報から重要遺伝子群を選択する方法の確立

○小林 拓嗣<sup>1</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 有江 力<sup>3</sup>, 山形 洋平<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>農工大院・連農, <sup>2</sup>農工大院・農学系ゲノム人材育成プログラム,  
<sup>3</sup>農工大院・農  
 s143821z@st.go.tuat.ac.jp

【バックグラウンド】ある遺伝子の機能を調べるために、遺伝子欠損株の遺伝子発現変化を次世代シーケンサー (RNA-Seq) やマイクロアレイで網羅的に解析することが一般的に行われている。得られた網羅的遺伝子発現情報から、コントロール株との発現変動比の大きさや統計処理による有意差検定により発現変動遺伝子 (DEGs) を抽出する。DEGs を Gene Ontology (GO) 解析やパスウェイ解析により生物学的意義付けを行うことで、どのような機能を持つ遺伝子の発現が変動していたかを調べる。これらの解析により、欠損させた遺伝子の機能を推測することになる。上記の方法では、DEGs がどのような機能を持っているか、何のタンパク質をコードしているのかといった情報が必要である。しかし、生物種によってはこの情報が充実していないものがあり、BLAST 検索でも機能を推定できずに predicted protein のままであるものの割合が多い場合がある。

【チャレンジ】この predicted protein を詳細に解析すれば、目的の遺伝子の機能解析に有用な情報を得ることができるが、重要な (=目的の遺伝子との関係が深い) 順に数を絞る必要がある。重要な遺伝子を絞り込む指標として、発現変動比やスチューデント *t* 検定の *p* 値を用いることが考えられるが、これらの順番が重要な遺伝子順になるとは限らない。また、ある遺伝子が関わる生命現象や表現型には、複数の遺伝子がグループとして働くため、遺伝子の絞り込みもグループとして評価する必要があると考えられる。

【ソリューション】そこで我々は、判別分析を用いてより重要な遺伝子群を探索することにした。判別分析は、属する群がわかっている標本を“ある複数項目”でどの群に属するかを判定する方法である。この方法により、“ある複数項目”=“ある遺伝子群の発現変動”が欠損株とコントロール株を区別することができるかを判定することができる。つまり、すべての DEG の組み合わせで判別分析を行い、より両株を区別するのに適した遺伝子群を探索することができれば、より重要な遺伝子群として絞り込むことが可能になる。しかし、DEG から 2 個、3 個、4 個…と説明変数を選択する組み合わせは指数関数的に増加するため、膨大な計算が必要になり、通常の手法では困難である。例えば、1,000 個の DEG から 5 個を選択する場合、 $8 \times 10^{12}$  回の計算が必要である。我々は、この問題を解決するために、統計解析ソフト R で 100,000 回の判別分析を行うためのプログラムを作成し、バッチ処理により 250 個を並列計算することで、説明変数ごとに最大 25,000,000 回の判別分析を行う手法を確立した。実際の計算では、説明変数 2 個および 3 個は組み合わせの数が少ないため全組み合わせを、説明変数 4 個以上は無作為抽出により 25,000,000 個の組み合わせについて判別分析を行った。計算の結果、説明変数 2~7 個のうち説明変数 5 個を最適と判断し、重点的に計算することで計 125,000,000 回の判別分析を行った。得られた結果を判別分析で出力されるウィルキスのラムダ統計量で評価することで最適な遺伝子の組み合わせを絞り込んだ。さらに、この遺伝子の組み合わせについて判別関数 (数理モデル) を作成することができた。

【ベネフィット】以上より、欠損株とコントロール株を区別するのに最適な遺伝子の組み合わせを絞り込む手法を確立することができた。また、興味深いことに、絞り込んだ 5 遺伝子の組み合わせの判別分析結果をプロットしたところ、スチューデント *t* 検定の *p* 値が小さい 5 遺伝子よりも明確に両株を区別できることがわかった。本手法により、網羅的遺伝子発現情報から遺伝子機能情報の有無に関わらずに、より重要な遺伝子群を選択することが可能になった。加えて、本手法は網羅的遺伝子発現情報の解析に限定されるのではなく、その他のオミックス解析にも適用することができることから、生命ビッグデータの利活用にも有用であると言える。

#### Establishment of the method for selection of gene combinations by discrimination analysis

○Takuji Kobayashi<sup>1</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>, Tsutomu Arie<sup>2</sup>,  
 Youhei Yamagata<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Hum. Resour.  
 Development Program in Agricultural Genome Sci., Tokyo Univ. of Agric. Technol.,  
<sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** gene combination, discrimination analysis, RNA-Seq

### 3S-Bp03 Understanding the gene control mechanism of physiological disorders in mangosteen using RNA-seq

○Deden Derajat Matra<sup>1,2,4</sup>, Toshinori Kozaki<sup>3</sup>, Kazuo Ishii<sup>3</sup>, Eiichi Inoue<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>(Plant Prod. Div., Dept. Agro. Hort., Fac. Agric., Bogor Agricultural Univ., <sup>2</sup>United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Coll. Agric., Ibaraki Univ.)  
 dedenmatra@apps.ipb.ac.id

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) is one of the most important Indonesian tropical fruits because it has high economic value and a pleasing taste, and a rich aroma as well as abundance of anti-oxidants. However, incidence of two physiological disorders namely, gamboge disorder (GD) and translucent flesh disorder (TFD), respectively is affecting to low grade of fruit quality. Limitation of genomic information and lack of studies on transcriptomics level in the mangosteen has restricted our understanding of gene control mechanism of these physiological disorders. Herein, we conducted RNA sequencing analysis to identify the differential expression genes between normal tissue and physiological disorder-affected tissue from two part of fruits including rind and aril and also investigated effect of environmental condition.

Two experimental conditions, natural and land surface-covering, were used to treating mature mangosteen tree from 6 weeks after anthesis (WAA) up to harvesting. We collected 4 types of the tissues including GD-affected rind (GDR), normal rind (NR), TFD-affected aril (TFDA) and normal aril (NA). All tissues for RNA extraction were collected and stored at RNALater® stabilization solution. Total RNA was extracted using modified hot-borate method (Wan and Wilkins, 1994). Intact polyadenylated (PolyA) mRNA using the Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit. The isolated mRNA was processed as sequencing library and performed sequencing using Ion Proton™ System.

Total libraries generated a total of 760.92 million reads (81.04 Gb pairs of bases). The high quality reads were produced by trimming and filtering with specific parameters and produced a total of 520.70 million reads (51.96 Gb pairs of bases). The de novo assembly was performed with optimized reads normalization by 30x coverage and 300 bp in minimum length (Haas et al. 2013). The assembly produced 211 005 transcripts with an average of 649.89 bp (N50 = 722 bp) in length ranging between 301 - 13 767 bp. The high quality of reads were aligned individually into the assembled-transcripts by Bowtie2 and estimated by eXpress software to be further analyzed in the differential gene expression (DGE). All of selected-113 821 unigenes were searched against the Nr (60 610), Nt (33 915), SwissProt (40 843), and TrEMBL (60 308) databases (subset to viridiplantae) using the BLAST algorithm (E-Value < 10<sup>-5</sup>). The functional annotation of unigenes with blast hits were further classified by Gene Ontology (GO) analysis of Blast2GO software. Within annotated unigenes, 22 370 unigenes were matched in the GO database and classified into 3 functional categories: molecular function, biological process, and cellular component. KEGG metabolic pathway analysis assigned to 141 pathways. In total, DEG were discovered between NR and GDR as well as NA and TFDA under two different environmental conditions. Furthermore, the DEG of transcripts will validate through qRT-PCR in the future work.

In this study, we analyzed through bioinformatics method to predict gene control mechanism from the quantitative expression values of differentially expressed genes based on RNA-Seq transcriptome data of fruit tissues in different types and conditions in mangosteen. We provided our perspective on future developments in plant gene control mechanism related to under various environmental condition in horticultural crops.

#### Acknowledgement:

This research was supported in part by the Special Expenditure of Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT, Japan) for the “Human Resource Development Program in Agricultural Genome Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology”

#### References:

Haas BJ et al, Nat Protoc. 8(8):1494-512 (2013).  
 Wan, CY and TA Wilkins, Anal. Biochem. 223 7-12(1994).

#### Understanding the gene control mechanism of physiological disorders in mangosteen using RNA-seq

○Deden Derajat Matra<sup>1,2,4</sup>, Toshinori Kozaki<sup>3</sup>, Kazuo Ishii<sup>3</sup>, Eiichi Inoue<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>(Plant Prod. Div., Dept. Agro. Hort., Fac. Agric., Bogor Agricultural Univ., <sup>2</sup>United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>4</sup>Coll. Agric., Ibaraki Univ.)

**Key words** RNA-Seq, transcriptome, mangosteen, physiological disorder

### 3S-Bp04 担子菌ウシグソヒトヨタケ子実体形成過程の Strand-specific RNA-seq 解析

○村口元<sup>1</sup>, 梅澤 究<sup>2</sup>, 新倉 舞<sup>2</sup>, 吉田 誠<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 酒井 杏匠<sup>3</sup>, 志水 元亨<sup>3</sup>, 中堀 清<sup>4</sup>, Choi Cindy<sup>5</sup>, Ngan Chew Yee<sup>5</sup>, Lindquist Erika<sup>5</sup>, Lipzen Anna<sup>5</sup>, Tritt Andrew<sup>5</sup>, Haridas Sajeet<sup>5</sup>, Barry Kerrie<sup>5</sup>, Grigoriev Igor V.<sup>5</sup>, Pukkila Patricia J.<sup>6</sup>  
<sup>1</sup>秋田県大院・生資, <sup>2</sup>農工大・農, <sup>3</sup>名城大院・農, <sup>4</sup>岡山大院・自科, <sup>5</sup>JGI, <sup>6</sup>Dept. Biol., Univ. North Carolina  
 muraguchi@akita-pu.ac.jp

キノコの子実体形成の分子機構は断片的にしか分かっていないのが現状であるが、その解明は食用キノコ等の安定供給の為に極めて重要である。キノコの子実体形成を分子レベルで理解する手掛かりを得るために、モデルきのこ「ウシグソヒトヨタケ」の子実体形成過程について Strand-specific RNA-seq 解析を行った。

一核性子実体形成株#326の子実体形成過程の13点（[1]栄養菌糸、[2]菌糸塊、[3]小字実体原基、[4]0hr子実体原基、[5]12hr子実体原基、[6]24hr子実体傘、[7]24hr子実体柄、[8]30hr子実体傘、[9]30hr子実体柄、[10]36hr子実体傘、[11]36hr子実体柄、[12]39hr子実体傘、[13]39hr子実体柄）（示しているhrは子実体成熟開始の光刺激を0hrとした時のサンプル採取時期）から Total RNA を抽出して（各点2サンプル、計26サンプル）、アメリカの Joint Genome Institute (JGI) に送り、Strand-specific RNA-seq 用ライブラリーを構築し、HiSeqにてcDNAの塩基配列を決定した。JGIがアセンブルした14,245のGene modelsに対して、Bowtie2を使ってR1とR2を別々にマップし、リード数をStrand別に数え、RPKM値を算出した。ステージ間のDEG (Differentially expressed gene) はフィッシャー検定であるiDEGES/edgeR (RパッケージTCC) を用いて検出した。

各点2サンプル間の類似度を評価したところ、[2]菌糸塊でばらつきが大きかった。この時期には急速に発生が進行するために同一状態の組織採取が難しかったのが原因だろうと思われる。

[8-10]の傘でUp-regulated DEG (uDEG) が最も多く、[5-7]の柄でDown-regulated DEG (dDEG) は最も多かった。また、[4-5]と[5-6]の移行期にはuDEG数よりdDEG数が上回っていた。

DAVIDを使って各ステージ間のDEGのGO解析を行い、ステージ移行における特徴的なDEGを抽出した。[1-2]の移行期には細胞膜成分や細胞外成分に変化をもたらすと推定される合成系酵素の遺伝子発現が上昇する一方、P450酵素のような分解系酵素の遺伝子発現は低下する。

転写調節因子候補 (TFC) に着目してその変動を調べた。まず、転写因子のタイプ分けを行い、各タイプの中で発現量の多いTop4の変動を調べた。特定の時期に発現が上昇するTFCがどんな遺伝子の発現を調節しているのか興味深い。全read中の逆鎖readの割合は[1-6]のステージで高く（5~15%）、[8-12]の傘や[7-13]の柄では5%以下であった。

発生の進行に伴うRPKM値の変化が鎖間で相関しない遺伝子には、違う発現制御を受けているanti-sense転写物があると考え、そのような特徴を持つ遺伝子を選んで、IGVで発現状況を確認したところ、確実にanti-sense転写物が存在していると言える遺伝子をいくつか見つけることができた。これらのanti-sense転写物が子実体形成過程においてどのような役割を担っているのかを今後詳しく調べていく必要がある。

今回のRNA-seq解析から14,245個の遺伝子モデルが作られたが、その中には、ゲノム解読から予測された遺伝子に対応しない転写物もあった（計1,089個）。このような転写物がタンパク質をコードしているのか、あるいは、Non-coding RNAとして何らかの働きを担っているのかについても、今後の解析が必要である。

上記のように、さらなる解析を待つデータを含むものの、モデルきのこの子実体形成過程における遺伝子発現情報は、食用キノコ等の有用キノコにおける子実体形成分子機構の解明や有用物質生産、担子菌の利活用に向けた基盤情報となり得るだろう。子実体形成分子機構がある程度明らかになれば、その応用として、食用キノコ等の子実体形成の人為的制御や機能性を持つキノコの安定供給が可能になると期待される。

[謝辞] この研究は、農水省実用化事業(23053)、JGI (the Office of Science of the US Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231) および文部科学省特別経費「農学系ゲノム科学領域における実践的先端研究人材育成プログラム」の支援を受けて実施した。

#### [引用文献]

1. Stajich JE, Wilke SK, Ahren D, Au CH, Birren BW, Borodovsky M, et al. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). PNAS. 2010;107(26):11889-94.
2. Muraguchi H, Umezawa K, Niikura M, Yoshida M, Kozaki T, Ishii K, et al. Strand-specific RNA-seq analyses of fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. PLoS One. 2015;10(10):e0141586.

#### Strand-specific RNA-seq analyses of fruiting in *Coprinopsis cinerea*

○Hajime Muraguchi<sup>1</sup>, Kiwamu Umezawa<sup>2</sup>, Mai Niikura<sup>2</sup>, Makoto Yoshida<sup>2</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>, Kiyota Sakai<sup>2</sup>, Motoyuki Simizu<sup>2</sup>, Kiyoshi Nakahori<sup>1</sup>, Cindy Choi<sup>3</sup>, Chew Yee Ngan<sup>3</sup>, Erika Lindquist<sup>3</sup>, Anna Lipzen<sup>3</sup>, Andrew Tritt<sup>3</sup>, Sajeet Haridas<sup>3</sup>, Kerrie Barry<sup>3</sup>, Igor V. Grigoriev<sup>3</sup>, Patricia J. Pukkila<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ., <sup>5</sup>JGI, <sup>6</sup>Dept. Biol., Univ. North Carolina)

**Key words** basidiomycetes, fruiting, RNA-seq, transcriptome

### 3S-Bp05 昆虫のバキュロウイルスに対する抵抗性メカニズムの解明

○岩田 賢人<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>2</sup>, 水谷 哲也<sup>2</sup>, 大松 勉<sup>3</sup>, 長井 誠<sup>3</sup>, 齋藤 康将<sup>1</sup>, 井上 真紀<sup>1</sup>, 仲井 まどか<sup>1</sup>  
 (農工大・農, <sup>2</sup>農工大・農学系ゲノム人材育成プログラム, <sup>3</sup>農工大・国際家畜感染症防疫研究教育センター)  
 s150494t@st.gou.tuat.ac.jp

【バックグラウンド】 農業生産の現場では化学合成農薬の過剰使用は好まれません、人や環境にやさしい害虫防除法の開発が望まれている。生物的防除は、天敵昆虫や昆虫病原微生物を用いた害虫防除法であり近年上記のような状況から関心が高まっている。昆虫病原微生物とは、昆虫に病気を引き起こす病原体を指すが、その一種であるバキュロウイルスは昆虫に特異的に感染する二本鎖DNAウイルスであり、その病原性や宿主特異性の高さから既に世界中で生物的防除資材として利用されている。近年、このバキュロウイルス製剤の利用拡大と共に、連続使用による害虫個体群の抵抗性の発達が報告され問題となっている。しかしながら、昆虫のバキュロウイルスに対する抵抗性メカニズムの全容は明らかにされていない。

【チャレンジ】 日本では、茶の主要害虫であるチャノコカクモンハマキ (*Adoxophyes honmai*: チョウ目ハマキガ科) の防除にバキュロウイルス製剤が用いられている。そこで、演者らは野外で採集したチャノコカクモンハマキ個体群に対して核多角体病ウイルス (*Adoxophyes honmai nucleopolyhedrovirus*; AdhoNPV: バキュロウイルス科) による選抜を繰り返すことで抵抗性研究のモデル系を確立した。すなわち、70%致死濃度のAdhoNPVを接種し生き残った個体の次世代に再度ウイルスを接種するという選抜を繰り返した。その結果、選抜をせずに継代した感受性の系統 (S系統) にくらべて、1万倍以上の抵抗性を持つ系統 (R系統) が確立された。本研究では、このR系統とS系統を用いた比較研究により、バキュロウイルスの抵抗性メカニズムの解明に取り組んだ。

【ソリューション】 本研究においては、R系統におけるウイルス感染の進行をS系統と比較した。バキュロウイルスは、ウイルス粒子を包み込んだ包埋体という構造を持つが、宿主昆虫が包埋体を飲み込むところから感染がはじまる。ウイルス粒子は、幼虫宿主の中腸 (消化管) の上皮細胞に結合し、膜融合によって細胞内へ侵入する。中腸上皮細胞で複製したウイルス粒子は、血体液 (解放血管系である昆虫の体腔) 内の全身の組織に感染を拡大する。感染細胞では、ウイルス遺伝子が発現し、ウイルスゲノムが複製され、次世代のウイルス粒子が産生される。この過程に基づき次の3点、1) 幼虫全身におけるウイルス増殖量 (定量PCR)、2) 幼虫中腸における網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq及びRT-PCR)、3) 中腸細胞に対するウイルス粒子の結合・融合実験 (Fluorescence-quenching assay) を調査した。

【ベネフィット】 R系統幼虫全身においてウイルスの増殖は検出されず、R系統中腸でのウイルス遺伝子の発現が非常に低いことが示された。そこで、中腸細胞へのウイルス粒子の結合能・融合能を調べたところ、ウイルス粒子の結合・融合量がR系統幼虫の中腸上皮細胞ではS系統にくらべて著しく低かった。このことから、AdhoNPVに対する抵抗性機構として、中腸細胞におけるウイルス粒子の結合あるいは融合の抑制、すなわちウイルス受容体の欠損など、を仮説として示すことができた。

本研究は、東京農工大学農学系ゲノム人材育成プログラム、及び国際家畜感染症防疫研究教育センターの支援を受け実施された。

#### Elucidation of mechanisms of insect resistance to a baculovirus

○Kento Iwata<sup>1</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Tetsuya Mizutani<sup>1</sup>, Tsutomu Omatsu<sup>1</sup>, Makoto Nagai<sup>1</sup>, Yasumasa Saito<sup>1</sup>, Maki N. Inoue<sup>1</sup>, Madoka Nakai<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Human Resource Development Program in Agricultural Genome Science, Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Research and Education Center for Prevention of Global Infectious Diseases of Animals, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** baculovirus, resistance, RNA-Seq, pest management

### 3S-Bp06 材料の異なる堆肥の生物脱臭効果および微生物叢に関する研究

○北村 里香<sup>1</sup>, 石井 一夫<sup>2</sup>, 古崎 利紀<sup>3</sup>, 前田 勇<sup>3</sup>, 飯郷 雅之<sup>3</sup>, 黒倉 健<sup>3</sup>, 岩淵 和則<sup>4</sup>, 齋藤 高弘<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>宇都宮大・バイオセ, <sup>2</sup>農工大, <sup>3</sup>宇都宮大・農, <sup>4</sup>北大院・農)  
kitamura.rika1229@gmail.com

堆肥化は農業副産物や食品残飯をリサイクルすることで持続的な食品生産に貢献している。しかしながら、堆肥化の際には環境に悪影響を及ぼす悪臭の発生も伴う。そこで堆肥化時悪臭を少ないエネルギーで除去する生物脱臭技術についての検討を行った。生物脱臭は、微生物の分解および同化によって悪臭を除去する技術である。しかし、脱臭効果は脱臭媒体によって不安定であり、その理由は明確にはなっていない。有用な微生物の増殖を促進するために、その微生物が必要とする条件が必要である。微生物にとっての条件とは、温度、光、酸素量、水分量、pH および圧力、さらに酸素、窒素、塩分、栄養成分および微生物による産生物質（微生物相互関係）などである。そこで、微生物がどんな条件を必要としているのかを明確にしていける必要がある。ここでは生物脱臭を行う微生物、特にアンモニアを分解する微生物に焦点を当てた。アンモニアに関する生物脱臭の作用機構は硝化細菌などが関与しているが、これを細菌叢レベルで詳細に調べた例はない。本研究ではNGSを用いた16S rRNA メタゲノム解析によって、原材料の異なる堆肥(牛糞堆肥および残飯堆肥)を脱臭媒体として用い、微生物叢および成分組成の比較、さらにアンモニア暴露前後の微生物叢を明確にし、生物脱臭の効果の検討を行った。

本研究によって堆肥を使用した生物脱臭に関与する細菌群が明確となった。堆肥の成分組成、系統分類などの結果は、同材料を用いた堆肥毎に特徴を有していた。牛糞堆肥には Proteobacteria が多く、残飯堆肥には Firmicutes が多く検出された。主に Proteobacteria または Nitrospira に属している硝化細菌は、アンモニア酸化に強く関わっている。乳酸菌が属する Firmicutes は他の微生物の増殖を妨げ、微生物多様性を減少させる。Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌(AOB)は、高濃度のリン、加里および塩によって成長が阻害されることが既存文献により示されており、これらの物質は残飯堆肥に多く含まれていた。これらの知見から、堆肥化材料が堆肥化中および完熟堆肥の微生物叢へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、牛糞堆肥における高い $\alpha$ 多様性は、豊富な微生物叢を有していることを意味し、牛糞堆肥 MCU1 および MCK1 間の低い $\beta$ 多様性および同材料(MCU および MCK、または FCU および FCN)の堆肥の持つ微生物叢が近縁種で成り立っていることは、牛糞のような家畜糞の堆肥化への利用は単一材料として品質の管理が容易であり、似ている微生物叢を持つための安定した環境を持ち得ていると考えられた。これらの結果は原材料が微生物叢の形成に重要であり、堆肥化の際に異なった発酵環境を与えていることを示している。牛糞堆肥の高い $\alpha$ 多様性、アンモニア脱臭に寄与している AOB および amoA 遺伝子が確認されたことによって、悪臭を除去する生物脱臭媒体として牛糞堆肥が適している可能性を示唆した。

脱臭実験の結果として、牛糞堆肥で脱臭効果が得られ、残飯堆肥では脱臭効果が得られなかった。メタゲノム分析では真性細菌および古細菌について検討を行った。真性細菌の replicate 間による $\beta$ 多様性は、牛糞堆肥 MCU においてアンモニア暴露前に約5割の微生物が一致していたのに対し、暴露後に約9割が一致し、微生物叢がアンモニアのある環境に適応したと言える。微生物の Phylum による系統分類においても MCU1-3 の各 Phylum の割合がほぼ一致し、硝化細菌の属する Proteobacteria の割合が増加していた。古細菌の replicate 間による $\beta$ 多様性の結果は、牛糞堆肥 MCU においてアンモニア暴露前後で微生物叢に大きな変化はなく、Phylum による系統分類でも変化がなかった。牛糞堆肥 MCU の古細菌には硝化細菌である Thaumarchaeota が約60%存在しており、メタン生成菌である Methanosarcina sp. が約15%で2位につけていた。アンモニア暴露前後において、これらの存在割合は変化していなかった。Mendez et al.(2015)が微生物に影響を与える要因として特にリン酸を挙げていること、生物脱臭媒体として効果の認められている黒ぼく土では活性アルミニウムによってリン酸が固定されており微生物や植物が利用しにくい状態であることから、硝化細菌にとってリン酸の存在は苦手であることが推察された。そこで、牛糞堆肥 MCU にリン酸が少ない事が、硝化細菌が増殖し易い環境であったことが示唆された。このように次世代シーケンサーを使用した16S rRNA メタゲノム分析は、存在量の少ない微生物の検出、材料中微生物の経時変化、そして存在比などの細かい情報を得るために非常に有効であり、本研究では脱臭効果を示した堆肥の微生物叢が明らかとなった。今後、その細菌群が産生する酵素などの作用機序が解明されることにより、成分組成や微生物相互関係などを合わせた生物脱臭媒体の脱臭効果の評価やその作用の制御が可能となり、堆肥の有効活用の促進というイノベーションが起こることが期待される。

謝辞・・・本研究は、東京農工大学農学系ゲノム人材育成プログラムの支援を受け実施された。

#### Studying biofiltration effect and bacterial communities in different types of compost

○Rika Kitamura<sup>1</sup>, Kazuo Ishii<sup>2</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Isamu Maeda<sup>3</sup>, Masayuki Iigo<sup>3</sup>, Takeshi Kurokura<sup>3</sup>, Kazunori Iwabuchi<sup>4</sup>, Takahiro Saito<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>C-Bio, Utsunomiya Univ., <sup>2</sup>Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>3</sup>Fac. Agric., Utsunomiya Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

**Key words** biofiltration, 16S rRNA, bacteriome, nitrifying bacteria

### 3S-Bp07 機械学習システムによる人工知能の生物工学への応用

○石井 一夫<sup>1</sup>, 古崎 利紀<sup>1</sup>, 中村 和敬<sup>2</sup>, 當仲 寛智<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・農, <sup>2</sup>USP研究所)  
kazuishii2014@gmail.com

背景：次世代シーケンサーやマイクロアレイの普及により、生物分野におけるビッグデータ分析は日常的なものとなっている。これら生物学ビッグデータの利活用促進により、従来では困難であった生物機能の解明とその生物学への応用が可能となる。これらのデータは、多数の遺伝子発現やDNAのメチル化などの説明変数からなる超多次元データである。従来は生体現象の理解には少数の因子による生化学的解析が主流であったが、これら超多次元データを組み合わせることによるビッグデータの利活用で、複数の要因により数理予測モデルを作成し表現型などの生体現象の高精度な予測が可能となる。これら高精度予測モデルは、臨床診断や農作物の生育予測、環境アセスメントなど生物学分野へのあらゆる分野への波及効果が期待される。近年の機械学習システムの技術的進歩により、これらの予測システムへの精度向上などの改善が期待される。しかし、これらの超多次元データによる数理予測モデルの作成においては、候補となる説明変数(例えば、遺伝子発現など)が膨大であり、これらの組み合わせの中から適切な説明変数を選択し、予測モデルを作成することは困難を伴う。

問題点：我々は、多数の組み合わせの中からモンテカルロ法による無作為抽出と並列処理を組み合わせ、近似的な最適化予測モデルを作成することを検討してきた(本シンポジウム、小林らの発表)。これらの検討により、超多次元データから数理予測モデルを作成する方法が確立され、従来のt検定などの古典的な統計的手法では見つけることのでなかった生物学的機能の解析が可能となった。しかし、この方法は完全なものではなく、未だ様々な問題点を抱えている。例えば、数理モデルの作成には大量の計算を必要とする。また、特に、次世代シーケンサーデータのような離散型を用いた場合、多重共線性などが原因となる大量のエラーが生じ、計算が困難な場合がしばしば生じる。また、最適化モデルは試験した集団に依存し過学習などのために、得られたモデルが必ずしも予測モデルとして最適ではない可能性も考えられた。したがって、超多次元データによる予測モデルの作成には様々な問題が残っており、改善の余地が多く残されている。本研究では、上記のような様々な問題を洗い出し、超多次元データによる予測モデルの効率的な作成法を確立するために、様々な工夫を凝らし、機械学習による人工知能を適用した予測システムを構築することを試みた。

解決策とその効果：まず、並列分散処理の効率化のためにはCライブラリとシェルスクリプトによる高速化を行った。多重共線性などが原因となる大量のエラーへの対応には、Lasso 回帰や Ridge 回帰などの正則化処理を行った。過学習に対しては、各種の機械学習システムを検討した。これらの検討を組み合わせることで、よりパフォーマンスの高いシステムの構築が可能となった。本講演では、超多次元データを用いた表現型予測システムを構築する際の様々な問題点とその解決策をまとめ、よりパフォーマンスの高いシステム構築の方法を示すことで、機械学習システムの生物学への応用の可能性を議論したい。

謝辞：本研究は、東京農工大学「農学系ゲノム科学人材育成プログラム」及び科研費基盤研究(C)「研究課題番号26330325」の支援により実施された。また、本研究の一部は、(有)ユニバーサル・シェル・スクリプティング研究所、アマゾンウェブサービス(AWS in Education Research Grant Award)、日本ヒューレット・パカード、文部科学省HPCI戦略プログラム分野1「予測する生命科学・医療および創薬基盤」SCLS 計算機システムの支援により実施された。

#### Introducing of artificial intelligence with machine learning applications to biotechnology

○Kazuo Ishii<sup>1</sup>, Toshinori Kozaki<sup>2</sup>, Kazutaka Nakamura<sup>2</sup>, Nobuaki Tohnaka<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>USP Lab.)

**Key words** Artificial Intelligence, Predictive Analysis, Machine Learning, Mathematical Modeling

**3S-Cp01 Discovery of valuable genes by massive sequencing and time lapse analysis of environmental RNAs**

○Nobutaka Nakashima, Yuya Nakamura  
(Sch. Life Sci. Technol.)  
nnakashima@bio.titech.ac.jp

Breaking free from fossil fuels and establishing the sustainable society are the urgent task, and production of industrially important compounds by means of biological functions (bio-based processes) attracted much attention recently. Many biotechnologists keep on proposing novel ways to produce compounds from biomass feedstock using organisms (in particular, microorganisms) as host cells. However, even when the target compound is known to be produced in microorganisms, it frequently happens that the only part of the metabolic pathway for the target compound from biomass feedstock is revealed. Accordingly, such compounds can not be produced in practical amounts. We call this situation “the presence of metabolic gap” and would like to fill-in the gap by finding the responsible metabolic genes.

We suppose that there are three reasons why metabolic gaps remain. First, if one microorganism is known to have the metabolic pathway of interest, identifying enzyme genes which are responsible for the metabolic pathway is not so easy. Second, even if the metabolic pathway of interest is revealed to exist in a microorganism hidden in the environment, many microorganisms are not able to be isolated and cultured in the laboratory. Generally, 95% or more of the microorganisms on the earth is in the “viable but not culturable (VBNC)” state. Third, the metabolic pathway of interest may be present separately over multiple microorganisms. When the above three problems are solved, the number of compounds that can be produced in a microorganism will increase dramatically.

In order to solve the above problems, it is considered to use a technique called “metagenome”. In the metagenomic technique, DNAs/RNAs are extracted from environmental microbial populations without isolating individual microbes, and DNA/RNA libraries are constructed. Then, genes of interest are screened from the libraries by hybridization experiments based on sequence homology or by evaluating enzyme activities of proteins. Therefore, using bacteria such as *Escherichia coli* as host cells is necessary, but manipulating recombinant DNAs in bacteria is time-consuming and leads to loss of specific DNA species, resulting in low throughput and decreased accuracy in screening. Success in gene discovery with metagenomics relies on high throughput and accuracy at the screening step.

We here propose a new screening method depending on massive RNA sequencing and an index of expression induction by the precursor compounds. The method is named “Time Lapse Analysis of Massive RNA Sequences (TILAMS)”. TILAMS is developed based on the fact that expression of bacterial metabolic genes is frequently induced with corresponding substrates. In TILAMS, two microbial populations are prepared; one sample is treated with a precursor of the target compound and the other is untreated. RNAs are extracted from both samples over time, and RNA sequences are read massively using the next generation sequencer. Then, RNA species that are increased after addition of the substrate are found in silico. False positive RNAs are eliminated through bioinformatics analyses, identifying candidate enzyme genes whose products act on the precursor.

Since TILAMS can screen large numbers of genes without using microbial cells, it is expected that the bottleneck in the metagenomic technique will be eliminated. The Nagoya Protocol was signed in 2010, which regulates access to genetic resources between countries, and it is important to facilitate rapid access to such resources.

**Discovery of valuable genes by massive sequencing and time lapse analysis of environmental RNAs**

○Nobutaka Nakashima, Yuya Nakamura  
(Sch. Life Sci. Technol.)

**Key words** metabolic engineering, transcriptome, RNA-seq, metagenomic libraries

**3S-Cp02 Transcriptome and translome of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

○Byung-Kwan Cho  
(Dept. Biol. Sci., KAIST, South Korea)  
bcho@kaist.ac.kr

*Streptomyces* produce various secondary metabolites including antibiotics, and many of these are used in medical and agricultural fields. The production of these compounds occurs after passing through the transition from primary metabolism to secondary metabolism, and involves complex morphological differentiation. Despite the significant attributions of *Streptomyces* to biotechnological area, their complex organizational structures and gene regulation mechanisms are not fully discovered. Here we show the architecture of *Streptomyces coelicolor* genome and gene expression patterns at transcriptional and translational level along with different developmental phases, by integrating genome-wide data of transcription start sites (TSSs), mRNA abundance and ribosome-protected mRNA fragment (RPF) abundance. Over 3,000 TSSs of genes were identified, and significant portion of them represented leaderless genes. Based on the identified TSSs, the length distribution of 5' untranslated regions (UTRs) was calculated and conserved promoter motif was elucidated. We also found novel transcripts, some of which exhibited translational expression, indicating novel open reading frames (ORFs). Analyses of transcriptional and translational expression at four different growth phases showed increasing expression pattern of genes in secondary metabolism to the later developmental stages. Using clustering analysis we were able to find genes that have same expression patterns with secondary metabolite genes. Finally, expression level comparison of protein complex subunits revealed strong correlation between protein stoichiometry and translational expression. Thus, we offer comprehensive information on genome architecture, and transcriptional and translational gene expression patterns that allows better understanding of *Streptomyces coelicolor*.

**Transcriptome and translome of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

○Byung-Kwan Cho  
(Dept. Biol. Sci., KAIST, South Korea)

**Key words** genome, transcriptome, *Streptomyces*, translation

**3S-Cp03 Genome-mining based natural product discovery**

○Pei-Yuan Qian

(Division of Life Science and Environmental Science Programs,  
Hong Kong University of Science and Technology)  
boqianpy@ust.hk

With rapid increase in genome information of marine microbes in public domain, genome mining allows us to extract substantial amount information on metabolic process and secondary metabolites of microbes, which can aid the bioactive compound discovery as well as the understanding of ecological function of microbes. In the present study, I will present our recent work on genome-mining based bioactive compound discovery from marine microbes, which was triggered by our discovery of a didemniin-producing marine bacterium from the Red Sea. Analysis of *T. mobilis* genome has not only allowed us to characterize the biosynthesis pathways of didemniins but also led to discovery a group of calpian inhibitors and relevant biosynthesis pathways. Using genome mining methods, we revealed chemical diversity and genome diversity. As we have also developed a method to clone entire biosynthesis pathways of marine bioactive compounds, it became possible for us to manipulate biosynthesis pathways to generate more analogous for screening and studying mode of action of compounds in near future.

**Genome-mining based natural product discovery**

○Pei-Yuan Qian

(Division of Life Science and Environmental Science Programs, Hong Kong  
University of Science and Technology)**Key words** genome mining**3S-Cp04 Current Status of CBD and Nagoya Protocol on ABS, including the Synthetic Biology****[生物多様性条約および名古屋議定書に関する最新情報と合成生物学に関する国際的な動き]**

○Mutsuaki Suzuki

(National Institute of Genetics)  
msuzuki@nig.ac.jp

Genetic Resources, which are plants, animals and microorganism and their derived parts including DNA extracts, are used as essential elements widely in academic research area. The Convention on Biological Diversity (CBD) entered into force on 29 December 1993. It has three main objectives. 1) The conservation of biological diversity; 2) The sustainable use of the components of biological diversity; 3) The fair and equitable sharing of the benefits arising out of the utilization of genetic resources.

The Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity is an international agreement which aims at sharing the benefits arising from the utilization of genetic resources in a fair and equitable way. The Protocol was adopted on 29th of October 2010 in Nagoya, Japan, and entered into force on 12th of October 2014. It has been ratified by 60 parties, which including the European Union.

The Access and Benefit-sharing Clearing-House (ABS Clearing-House) is a platform for exchanging information on access and benefit-sharing established which aims at sharing the benefits arising from the utilization of genetic resources in a fair and equitable way. The ABS Clearing-House is a key tool for facilitating the implementation of the Nagoya Protocol, by enhancing legal certainty and transparency on procedures for access and benefit-sharing, and for monitoring the utilization of genetic resources along the value chain, including through the internationally recognized certificate of compliance. By hosting relevant information regarding ABS, the ABS Clearing-House will offer opportunities for connecting users and providers of genetic resources and associated traditional knowledge.

In the COP12, Synthetic Biology issues came to surface, as new emerging issues. Some parties concern that living organism, component and products, have negative socio-ecological effect, using DNA sequence information. Japan opined that digital sequence information falls beyond the CBD's scope in SBSTTA20 meeting. I will explain current status about discussion under CBD. From the view from scientific community, we have to keep watch and propose appropriate opinion.

研究分野において、海外にて植物・動物・微生物などを採取、また商品などを入手し、研究用として日本に持ち込む機会は多い。これらは、科学的な研究材料として利用される場合は、生物多様性条約1)において、すべて遺伝資源と見なされる。

遺伝資源が国家に属するという考え方は、1993年に発効された生物多様性条約の発効にて明確にされた。生物多様性条約における3つの柱として、(1)生物多様性の保全(2)生物多様性の構成要素の持続可能な利用(3)遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分、が掲げられている。特に(3)は Access and Benefit Sharing の頭文字から ABS と呼ばれている。

2010年に名古屋のCOP10にて、名古屋議定書が採択され、2014年10月COP12の会期中に発効された。名古屋議定書の内容は、従来からある流れに法的拘束力を持たしたものである。従来からあるスキームは下記のとおりである。(1)利用者は政府に事前届出を行い許可を受ける(事前同意,PIC)。(2)提供者と利益配分などの規定を含む相互合意(MAT)を結ぶ。(3)遺伝資源を利用国に移転する。(4)利益配分を行う。名古屋議定書は上記の従来からある流れに、提供国における情報の透明性を上げる仕組みとしてABSクリアリングハウス、及び利用国の遵守をモニタリングする仕組みとしてチェックポイントを設置することが決められている。現状提供国での法的整備が行われている。

最近のホットな話題は、DNA塩基配列の取り扱いである。合成生物学(主に、天然物相当品をバイオテクノロジーで製造すること)の課題として、2015年9月の専門家会合で事前同意なしの移転がおこり、利益配分が行われないとアフリカグループから主張され、DNA塩基配列も名古屋議定書の対象すべきという動きが顕在化してきた。専門家会合が開始され、2016年4月に開催された第20回科学技術助言会合(SBSTTA20)において、合成生物学の定義、範囲、リスクアセスメント案と共に、DNA塩基配列の取り扱いについて、討論が進められ、その結果は決定が保留状態となり、本年12月のCOP13にて、今後の進め方などが決定される。DNA塩基配列が名古屋議定書の対象となることをとても学術・産業界に対する影響は大きく、今後、学術界からの意見要望を基に対応を行っていかねばならない。

**Current Status of CBD and Nagoya Protocol on ABS, including the Synthetic Biology**

○Mutsuaki Suzuki

(National Institute of Genetics)

**Key words** nagoya protocol, biodiversity, genetic resources, synthetic biology

**3S-Cp05 Prediction and identification of sequences coding for orphan enzymes**

○Takuji Yamada  
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)  
takuji@bio.titech.ac.jp

Despite the current wealth of sequencing data, one third of all biochemically characterized metabolic enzymes lack a corresponding gene or protein sequence and are thus not amenable to modern systemic analyses. As 555 of these orphan enzymes operate in pathways, we developed a global framework to integrate pathway adjacency and (meta)genomic neighborhood information for the inference of candidate sequences to orphan enzymes. For 131 of them (37% of those for which (meta) genomic neighbors are available), we associate sequences to the orphan enzymes with more than 70% accuracy, implying functional annotation of 16,278 gene sequences in numerous (meta)genomes. As a case in point, two of these candidate sequences were experimentally validated to encode the predicted activity.

**3S-Cp06 Elucidation of gene regulatory network by structural equation modelling**

○Sachiyo Aburatani  
(AIST)  
s.aburatani@aist.go.jp

One of the essential systems in a living cell is gene expression which is controlled for surviving and adapting to various conditions by translating proteins when needed. The system of gene expression is usually started by transcription, which is the process of creating complementary RNA copies of a protein-coding gene. Thus, clarifying the transcriptional control system is an important task for uncovering the cellular mechanism.

Inference of gene regulatory network is a useful approach to understand the control systems in living cells. To obtain the better insights into the gene regulation, I developed statistical approach, based on Structural Equation Modeling (SEM) in combination with factor analysis and improved four-step procedure. The significant features of SEM are the inclusion of latent variables within the constructed model and the ability to infer the network, including its cyclic structure. Furthermore, the SEM approach allows us to strictly evaluate the inferred model by using fitting scores. In the constructed model, linear relationships among variables are assumed to minimize the differences between the fitted covariance matrix and the calculated sample covariance matrix. Some fitting indices are defined for evaluating the model adaptability, and thus the most suitable model can be selected by SEM.

To assume the model structure, I selected the optimal number of factors for inclusion in the network model as latent variables, by performing Exploratory Factor Analysis (EFA) with the Kaiser criterion. After the decision of optimal number of factors, an initial network structure should be assumed before the SEM analysis. Thus, I improved and modified four-step procedure to connect models as follows,

Step1: Determination of the number of latent variables

Step2: Solution of the regulatory relationships between the observed and latent variables by CFA

Step3: Establishment of the regulatory relationships between the observed and latent variables by SEM

Step4: Construction of all possible interactions between latent variables.

After the assumption of an initial model, I applied the SEM calculation to determine the relationships between all variables. There are four possible relationships between the variables: relationships between latent variables, regulatory relationships between observed variables, causal relationships from observed variables to latent variables, and regulatory relationships from latent variables to observed variables. SEM is based on a covariance analysis defined as  $S = S_{model}$ , where  $S$  is the covariance matrix calculated from the observed data and  $S_{model}$  is the matrix-valued function of the parameter. Each element of the covariance matrix  $S_{model}$  is expressed as a function of the parameters that appear in the model. The unknown parameters were estimated, in order to minimize the difference between the model covariance matrix  $S_{model}$  and the sample covariance  $S$ . I utilized the Maximum Likelihood (ML) method to minimize the difference between  $S$  and  $S_{model}$ . The network structures are evaluated according to the goodness of fit between the constructed model and the measured data by using some scores. I developed an iteration algorithm, which using the inverse matrix of the Fisher information matrix of parameters, for fitting the constructed model to the measured data. In my algorithm, all parameters should be re-calculated from the reconstructed model, and the similarity of the network structure should also be re-calculated. Furthermore, a new causal edge is added by the *Modification Index* scores.

In this presentation, I'll show you the details of my SEM statistical approach and some examples for detecting the causality and constructing a network model between genes and other cellular components. This approach will allow us to clarify the long distance effect for producing valuable compounds.

**Prediction and identification of sequences coding for orphan enzymes**

○Takuji Yamada  
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** enzyme reaction

**Elucidation of gene regulatory network by structural equation modelling**

○Sachiyo Aburatani  
(AIST)

**Key words** gene expression analysis, structural equation modelling, network identification

## 3S-Dp01 日本食の健康機能性

○都築 毅  
(東北大院・農)  
tsudukit@m.tohoku.ac.jp

日本人の平均寿命は伸び続け、世界有数の長寿国として知られている。日本人は寿命が長いだけでなく、自立して生活できる期間を示す健康寿命も長い。日本人が健康長寿である理由は、欧米人と異なる特徴的な食生活に起因すると考えられている。日本人の食事「日本食」は、米を主食とし、魚、野菜、大豆などの食素材、味噌や醤油といった調味料が伝統的に使われ、近年では、肉、牛乳、油脂、果実も加わり、多様な食素材を使用し、健康維持に有効な成分を多く含んでいると考えられている。本講演では、日本食の健康有益性について、我々の知見を中心に紹介する。

日本食中の特徴的な食品に含まれる個々の成分が生体に与える影響を検討した試験は、これまでも数多くあったが、食事のメニューまるごとを総合して検討した研究はなかった。日本食の健康有益性は、健康維持に有効な食素材を多く摂取していることによると考えられる。そこで我々は、現在の日本食と米国食を再現し、ラットに一定期間これらの食事を与えた後、食事内容の違いによる生体への影響の差異を調べ、日本食はストレス性が低く、エネルギー消費を促進し、健康維持に有益であることを示した[1]。

現在の日本食は欧米の影響を受け「食の欧米化」が進行し、また、生活習慣病の罹患率が増加している。よって、どの時代の日本食が健康維持に有益かを詳細に検討した。様々な年代の食事献立を作成し、それらを試験飼料としマウスに4週間摂食させたところ、1975年の日本食摂取により、内臓脂肪が減少し、エネルギー消費が亢進することを示した[2]。長期摂食させた試験でも、1975年日本食は、肥満抑制効果を有し、さらに、老化による脂質・糖質代謝調節機能の低下を防いで脂肪肝や糖尿病の発症リスクを低減し、寿命も延伸することが示され、1975年頃の伝統的日本食は、高い健康有益性を持つことが明らかとなった[3, 4]。

この要因を探るべく様々な検討を行ったところ、何か1つの成分の効果で良い効果を得るのは難しく、複数成分の相互作用が重要であると示唆された。1975年の日本食は他の年代の日本食と比較して豆類、野菜類、果実類、藻類、魚介類、卵類、発酵調味料の使用量が多く、使用している食材の種類が豊富であった。これらの点を考慮に入れて食習慣を見直せば、1975年の日本食の成分の健康有益性を実生活に取り入れることができると考えられた。最近、1975年の食事の特徴を強化した食事をを用いてヒト試験を行い、その結果も合わせて紹介したい。

## ・文献

- [1]. 都築毅ら、日本栄養・食糧学会誌、2008; 61: 255-264.  
[2]. Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J. Jpn. Soc. Nutr. Sci., 2014; 2: 73-85.  
[3]. 本間太郎, 都築毅ら, 日本食品科学工学会誌. 2013; 60: 541-553.  
[4]. K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al. Nutrition. 2016; 32: 122-128.

## Healthy functionality of Japanese diet

○Tsuyoshi Tsuduki  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** Japanese diet, long life, longevity, Japanese food

## 3S-Dp02 アジア人の食と腸内細菌叢の関連性

○中山 二郎<sup>1</sup>, 本田 倫子<sup>2</sup>, Kisuse Juma<sup>2</sup>, 百田 理恵<sup>2</sup>, 田中 優<sup>2</sup>,  
園元 謙二<sup>1</sup>, Lee Yuan-Kun<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大院・生資環, <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Natl. Univ. Singapore)  
nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp

近年の腸内細菌学の発展により、数百種の細菌コミュニティで構成される腸内細菌叢は、食と健康を繋ぐインターフェースとして人体において非常に重要な役割を果たしていることが分かってきている。例えば、肥満者と痩身者ではファーミキューテスとバクテロイデテスの腸内占有率が異なり、この差から、食事から抽出し吸収するエネルギー量に差が生じているとされている(Turnbaugh et al., Nature 2006)。また、欧州を中心とした国際共同研究(MetaHIT)の発表で、ヒトの腸内細菌叢は大きく3つのタイプ「エンテロタイプ」に分けられることが示された。これら3つのエンテロタイプはそれぞれ、バクテロイデス、プレボテラ、ルミノコッカスを優占属としており、食習慣の違いとエンテロタイプの相関も報告されている(Arumugan et al., Nature 2011 / Wu et al., Science 2011)。さらに近年、欧州、米国、アフリカの共同研究で欧州人とアフリカ人の間で高タンパク質・高脂肪の西欧食と高炭水化物のアフリカ食を2週間交換し、腸内細菌叢と代謝物の解析が行われている。その結果、腸内の短鎖脂肪酸や二次胆汁酸などの発ガンリスクマーカーに大きな変化が見られたと報告されている(O'Keefe et al., Nat. Commun. 2015)。アフリカ人は欧米に移住することで大腸がんの発ガン率が10倍以上高まることが知られており、西欧食の影響から、アフリカ系アメリカ人は腸内細菌叢が変化し、その細菌叢コミュニティの代謝が偏倚し、大腸がんのリスクとなっている可能性が指摘されている。これらの研究を背景とし、食と健康のインターフェースである腸内細菌叢の研究への興味が日々高まっている。

我々は、アジア諸外国・計10ヶ国の研究グループと共同で Asian Microbiome Project (AMP) を設立し、アジア各地域における食と腸内細菌叢についての情報収集を行っている。AMPは現在、第3期を迎えている。第1期は、各国の食習慣を反映した食生活を営んでいると期待される、小学児童を対象に調査を行った。第2期は、新生児から高齢者まですべての年齢層のデータを広く集めることを目標に調査を行っている。そして第3期では、特定地域を対象として、より詳細に食と腸内細菌叢の関連性を調査している。

第一期研究の結果として、①欧米人では準優占菌であるビフィズス菌がアジア人の腸内では優占菌の一つとなっていること、②アジア人には2つの腸内細菌型(エンテロタイプ)が存在すること、③エンテロタイプに加えて各国特有の特徴が細菌叢に見られること、以上が見出された(Nakayama et al., Sci.Rep. 2015)。中でも、日本人の腸内細菌叢は非常に特徴的で、善玉菌であるビフィズス菌が非常に多く、逆に一般的に悪玉菌と言われる大腸菌群の細菌数が低い。一方、タイ人は日本人の10倍以上の大腸菌群を保有していた。また、各国内における地域比較コホート研究においても興味深いデータが得られている。例えば、タイの大都市バンコクと地方都市のコンケンの子どもは異なるエンテロタイプを有していた。両エンテロタイプの細菌叢コミュニティをショットガンメタゲノム解析によりゲノムレベルで比較解析すると、両者の関係は、アメリカ人とアフリカ人の関係(Yatsunen et al., Nature 2012)に類似していた。つまり東南アジアにおいても欧米化の影響が腸内細菌叢に現れていると考えられる。第二期研究の結果では、①第一期研究で見られた国ごとの特徴は成人でもある程度維持されていること、②各国にほぼ共通して、年齢とともに、ビフィズス菌の占有率が減少し、逆に大腸菌の占有率が増加する傾向が見られること、③しかし②で見られる年齢の傾向から逸脱する被験者も多く、これらの被験者の健康状態との関係に興味を持たれること、が報告されている。

第三期研究では、①タイ・バンコクと日本・福岡の比較コホート研究において、日本食を食するタイ人の腸内細菌叢が日本人の腸内細菌叢に近似してきていること、②フィリピンレイテ島の都市部と農村部の小学児童の食と腸内細菌叢の調査研究において、都市部の児童の一部は米国の子どもに匹敵する高脂肪食を摂取しており、腸内細菌叢も農村部の子どもと大きく異なっていること、などが示されている。

以上のように、アジア人の腸内細菌叢は、食の欧米化の影響を受けながら、現在進行形で変動していることが示された。今後、この腸内細菌叢の変化が、宿主の健康に与える影響を注意深く追跡していくことが重要であると考えられる。

## Link between diet and gut microbiota in Asians

○Jiro Nakayama<sup>1</sup>, Noriko Honda<sup>2</sup>, Juma Kisuse<sup>2</sup>, Rie Momoda<sup>2</sup>, Masaru Tanaka<sup>2</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1</sup>, Yuan-Kun Lee<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>3</sup>Dept. Microbiol., Natl. Univ. Singapore)

**Key words** gut, microbial flora, Asia, diet

## 3S-Dp03 麹菌プロテアーゼの腸内細菌叢への影響

○加藤 範久  
 (広島大院・生物圏)  
 nkato@hiroshima-u.ac.jp

麹菌は古来より味噌や醤油、清酒、漬物などの我国の発酵食品の製造に広く利用されてきた。しかしながら、機能性食品の開発への麹菌の応用研究は非常に限られている。最近、我々は麹菌で発酵させたごぼうをラットに摂取させるとごぼうと比較して盲腸内の *Bifidobacterium* が著しく増加し、発酵産物の有機酸も顕著に増加することを見出した (Okazaki et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 53-57, 2013)。同様な現象が米麹や多穀麹を摂取させた場合でも見られた。さらに、発酵ごぼうの水抽出物をラットに摂取させたときも同様な効果が見られ、加熱するとその効果が消失した。そこで、菌体外の成分のプロテアーゼなどの消化酵素が関与しているのではないかと考え、食品加工用の様々なプロテアーゼ剤についても検討を行なった。その結果、麹菌由来のプロテアーゼ剤 protease A 'Amano' SD (*Aspergillus oryzae* 由来、天野エンザイム) (アミノプロテアーゼ) をラットに摂取させた場合に、腸内の *Bifidobacterium* が著しく増加することが見出された (Yang et al. *Biomedical Rep.* 3: 715-720, 2015)。このアミノプロテアーゼには複数のプロテアーゼや低分子物質が含まれている。そこで、その活性本体を特定する研究を行なっている。これまでの解析の結果、その中に含まれる酸性プロテアーゼが腸内 *Bifidobacterium* を著しく増加させることが明らかとなった。さらに、酸性プロテアーゼを失活させて摂取させるとビフィズス菌の増加効果は消失した。驚くべきことに従来のオリゴ糖などのプレバイオティクスよりはるかに少ない摂取量 (100 分の 1 程度) で顕著な効果が見られた。こうした特徴から従来のプレバイオティクスとは全く異なる作用機構が考えられ、プレバイオティクスの基本概念を変える可能性がある。今後はその詳細な作用機構を解明する必要がある。また、麹菌由来のプロテアーゼは医療用医薬品の消化酵素剤にも含まれている。そのため、米麹菌に由来する酸性プロテアーゼの機能性食品や医薬品への応用が期待できる。本研究は麹菌発酵食品の効能を探るうえで新たな突破口を開くものである。

Effect of protease derived from *Aspergillus* on intestinal microflora

○Norihisa Kato  
 (Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, fermentation, probiotics, protease

## 3S-Dp04 麹グルコシルセラミドの腸内細菌叢への影響

藤川 彩美<sup>1</sup>, 佐藤 友哉<sup>1</sup>, 浜島 弘史<sup>1</sup>, 柳田 見良<sup>2</sup>, 光武 進<sup>1</sup>,  
 尾尾 見治<sup>1</sup>, 中山 二郎<sup>3</sup>, ○北垣 浩志<sup>1</sup>  
 (1)佐賀大・農, (2)西九州大学, (3)九大院・農)  
 ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

医療レベルがほぼ同じ主要先進国の中でも日本人の平均寿命は世界トップレベルであり、日本人の健康長寿の原因として医療レベル以外の要因があると考えられる。その原因のひとつとして、日本人が1000年以上受け継いできた和食を考へることは十分な根拠がある。和食は繊維質が多い、多価不飽和脂肪酸が多い、飽和脂肪酸が少ないなど健康により要因が知られているが、そうした栄養成分だけでは説明できない未解明の要因もあると考えられている。和食の特徴のひとつは発酵食品を多く含むことである。味噌、醤油、お酢、黒酢、日本酒、酒粕、焼酎などの日本の発酵食品の多くの製造工程においてはでんぷんの糖化剤・酵素源として麹を使うことから、麹は日本の発酵食品の、そして和食の基盤であると言える。従って、麹の機能性を明らかにすれば日本の発酵食品の、ひいては和食全体の機能性として訴求できることになる。麹は、蒸した米に麹菌 *Aspergillus oryzae* もしくは *A. luchuensis* を生やしたものである。これらの菌は長年日本で種麹菌企業・技術者集団により育種・培養されてきたことから、米国 FDA から GRAS (Generally Regarded As Safe) と認定されている。

麹はこれまで酵素源としての役割が想定されており、酵素源としての研究は多く行われてきたが、腸内細菌叢を制御するプレバイオティクスとしての研究はほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、麹のプレバイオティクスとしての役割を調べるため、麹に含まれる成分を探索し、その腸内細菌叢に及ぼす影響を調べることにした。

麹に含まれる成分を調べた結果、麹には 0.5-3.0 mg/g の濃度で独自構造のグリコシルセラミドが含まれることを見出した。グリコシルセラミドはスフィンゴ脂質の一種であり、スフィンゴイド塩基に脂肪酸がアミド結合し、さらに一位の水酸基にグルコースもしくはガラクトースが結合した分子種である。スフィンゴイド塩基や脂肪酸、結合している糖の組成などで、麹菌の生産するグリコシルセラミドは N-2'-hydroxyoctadecanoyl-1-O-beta-D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine (69.7%) と N-2'-hydroxyoctadecanoyl-1-O-beta-D-galactopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine (30.3%) であり、他の生物種のグリコシルセラミドとは構造が異なり、独自構造を持つと言える。麹に含まれるグリコシルセラミドの濃度は他の食品と比べても最も多いもののひとつであった。日本人の摂取する発酵食品の量から考えると、日本人は平均で一日あたり 26-77mg のグリコシルセラミドを食べてきたと推定される。これらのことから、独自構造のグリコシルセラミドの摂取が多いことは、和食のひとつの特徴と言える。そこで麹に含まれるグリコシルセラミドの影響を調べるために、麹からグリコシルセラミドを大量に抽出・粗精製し、0.5%w/w の割合で餌に混ぜてマウスに一週間摂食させ、その糞便のゲノムを抽出して Illumina miseq で解析し細菌叢を調べた。その結果、グリコシルセラミド添加区の一部の細菌に統計的に有意な変化が観察された。グリコシルセラミド添加区で統計的に有意に増えていた細菌のひとつに、健康への寄与が近年提唱されている *Blautia coccoides* が含まれていた。*B. coccoides* は特に日本人の糞便に多く含まれていることが報告されており、精神を落ち着かせたり制御性 T 細胞の腸管への集積を誘導することが報告されている。さらに、*B. coccoides* は肝硬変や大腸がん、大腸炎、乳がん、1 型糖尿病、急性下痢などで減少することが報告されており、健康との関連が近年強く示唆されている腸内細菌である。また、麹グリコシルセラミドは *B. coccoides* の増殖を *in vitro* でも刺激した。これらの結果から、和食が日本人の健康に寄与するメカニズムのひとつは麹グリコシルセラミドを介した *B. coccoides* の腸内での増加である可能性が示唆された。

麹は日本人が和食として 1000 年以上食べてきた食材であることから、麹は独自のグリコシルセラミドを通じて日本人の腸内細菌叢を制御するプレバイオティクスとして歴史的に機能してきており、健康のみならず、日本人の精神性にも影響してきたことが考えられる。

Influence of glycosylceramide of Japanese *Koji Aspergillus oryzae* on the intestinal microbial flora

Ayami Fujikawa<sup>1</sup>, Tomoya Sato<sup>1</sup>, Hiroshi Hamajima<sup>1</sup>, Teruyoshi Yanagita<sup>2</sup>,  
 Susumu Mitsutake<sup>1</sup>, Koji Nagao<sup>1</sup>, Jiro Nakayama<sup>3</sup>, ○Hiroshi Kitagaki<sup>1</sup>  
 (1)Fac. Agric., Saga Univ., (2)Nishikyushu Univ., (3)Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** *Koji* making, microbial flora, *Aspergillus oryzae*, lipid

## 3S-Dp05 麴グリコシルセラミド分解物の PPAR への影響

○浜島 弘史, 光武 進, 北垣 浩志  
(佐賀大・農)  
hamajima@cc.saga-u.ac.jp

PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) は、ペルオキシソーム増殖剤によって細胞小器官ペルオキシソームを誘導する核内レセプターとして報告され、脂肪酸のβ酸化を活性化させることから、脂肪酸代謝の調節機構の重要な転写因子として注目された。その後の研究から、PPARは脂肪酸代謝のみならず、糖やタンパク質の代謝、免疫系の調節や細胞分化など様々な働きに関与すると考えられている。PPARには3種類のサブタイプ、PPARα、PPARβ(γ)、PPARγの存在が確認され、PPARγにはさらに選択的スプライシングによるPPARγ1、γ2、γ3の3つアイソフォームが存在することが知られている。核内レセプターは基本的な構造が共通し、リガンド非依存的転写活性化領域(AF-1)を持つA/Bドメイン、Zn+フィンガー構造を有するDNA結合領域を持つCドメイン、構造可変に関与するヒンジ領域のDドメイン、リガンドの結合とリガンド依存的転写活性化領域のAF-2を持つE/Fドメインから構成される。PPARでは、リガンドの結合により活性化してレチノイドX受容体(Retinoid X Receptor; RXR)とヘテロダイマーを形成し、コアクチベーターと共に転写活性を發揮する。PPARαは、肝臓、腎臓、心臓、筋肉、脂肪組織などで多くの組織で発現しており、フィブラート系薬剤によって活性化される。高脂血症改善薬の主要な標的であり、脂肪酸のβ酸化・ω酸化の促進、脂肪酸トランスポート・アシル CoA シンターゼの活性増加、アシル CoA カルボキシラーゼ・脂肪酸シンターゼの活性抑制やアポ蛋白 A-I と A-II の発現増加による HDL 産生促進などに関与する。PPARγはチアゾリジン系薬剤によって活性化されてインスリン抵抗性の改善を示すことから抗糖尿病薬に用いられる。PPARγ1は心臓、筋肉、消化器官を含む多くの組織で、γ2は主に脂肪組織に、γ3は免疫細胞、大腸、白色脂肪組織で多く発現している。アディポネクチンの産生促進や小型化脂肪細胞の分化誘導によるアディポネクチン産生亢進と炎症性アディポサイトカイン産生抑制を促し、インスリン抵抗性の改善に寄与する。また、マクロファージの脂質輸送タンパクの発現を調節して泡沫細胞への分化を抑制することなどに関与する。PPARδは、多くの組織で発現するが特に脳、脂肪組織、皮膚や骨格筋で発現が見られる。多価不飽和脂肪酸などで活性化され、骨格筋において脂肪酸の輸送タンパク及びミトコンドリア造成などの遺伝子発現調節を介して、脂肪酸の取り込みやβ酸化代謝を亢進して抗肥満作用を示すことが報告され、インスリン抵抗性の改善などに寄与すると考えられる。PPARのリガンドであるペルオキシソーム増殖剤は一般に疎水性の化合物であり、天然リガンドも同様に脂溶性である脂質メデイエーターが同定されている。アラキドン酸から生成されるプロスタグランジン代謝物やイコサノイドが PPAR の天然リガンドとして活性を持つほか、脂肪酸そのものやスフィンゴ脂質も PPAR の天然リガンドの候補である。

麴は日本の発酵食品を製造するのに欠かせない素材であり、日本古来からの洗練された製造技術を受け継いできた日本が誇る食文化である。米、麦、大豆などの穀物に食品発酵に有益なコウジカビ(*Aspergillus*)を繁殖させたもので、日本では700年以上の食経験をもつ伝統食品である。麴菌はカビや真菌の一種であることから、一般の食品とは違う栄養成分が期待され、その中で我々は麴の持つスフィンゴ脂質に着目して解析を行ってきた。その結果、麴に含まれるスフィンゴ脂質には高濃度でグルコシルセラミドが含まれることを見出した。また、そのグルコシルセラミドの中には、植物由来や動物由来とは異なり、スフィンゴイド塩基の9位にメチル基を持つカビや真菌を由来とするグルコシルセラミド、9-methylsphingadienineが存在することを報告した。そこで我々は、一般食品とは違う特徴的なスフィンゴ脂質を含む麴脂質が、脂質メデイエーターをリガンドとする PPAR にどのような影響を与えるか解析を行った。麴から抽出精製した麴セラミドを酸加水分解によりスフィンゴイド塩基に変換した。麴セラミドは、複数のセラミドが混在しており多様なスフィンゴイド塩基を構成成分としていることから、含まれるスフィンゴイド塩基の種類を LC-MS/MS にて解析を行った。その結果、麴スフィンゴイド塩基には、9-methylsphingadienine(30%)だけでなく、phytosphingosine (PHS, 22%)や sphingadienine(27%)が含まれていることが明らかになった。次に麴スフィンゴイド塩基が PPAR の活性に与える影響をレポーターアッセイにより解析を行った。転写因子 PPARγ を強制発現した CHOP 細胞において、麴スフィンゴイド塩基による PPARγ 活性を解析した結果、DMSO 溶媒添加(刺激なし)に比べ約3倍の PPARγ の活性が認められ、その活性量は麴スフィンゴイド塩基に含まれる PHS 相当であった。これらの研究結果から、麴に含まれるスフィンゴ脂質には、セラミドのスフィンゴイド塩基を介して PPARγ の活性を促進することが示唆された。麴は和食の多くに使われていることから、和食にも PPARγ の活性化能があることになり、日本人に心疾患、脳血管疾患の患者数が少ないことの原因のひとつである可能性がある。

## Regulation of the PPAR by koji glycosylceramide degradation products

○Hiroshi Hamajima, Susumu Mitsutake, Hiroshi Kitagaki  
(Fac. Agric., Saga Univ.)

**Key words** Koji, glycosylceramide, PPAR, sphingoid base

## 3S-Ep01 ヒト因子由来無細胞タンパク質合成系の開発と応用

○町田 幸大<sup>1,2</sup>, 重田 友明<sup>1</sup>, 今高 寛晃<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>兵庫庫大院・工,<sup>2</sup>理研・ライフサイエンス)  
machida@eng.u-hyogo.ac.jp

近年、真核細胞の翻訳調節に関わる真核生物特異的な機構と翻訳関連因子が明らかにされると共に、ヒトの疾患に関連する遺伝子の修飾やプロセシングやフォールディング等の諸反応が、翻訳のどの段階(開始→伸長→終結)でどの様に起こっているのか?あるいはどのように制御されているのか?を詳細に解析するための研究ツールの開発が急務になっている。このような社会のニーズに応えるために、我々の研究グループでは、「HeLa S3 細胞抽出液をベースとしたセルフフリータンパク質合成系」とヒトのタンパク質合成に必要な遺伝子のみを試験管内で混合した「ヒト因子由来再構成型タンパク質合成系」の開発を行ってきた。HeLa S3 細胞抽出液をベースとしたセルフフリータンパク質合成系は、細胞膜と核を除いた細胞内容物を含有する無細胞 (*in vitro*) 翻訳系として樹立しており、より細胞に近い状態でタンパク質合成(翻訳反応)を再現することが可能である。一方、ヒト因子由来再構成型タンパク質合成系は、精製したヒトのリボソーム、翻訳開始因子群 (eIF)、翻訳伸長因子群 (eEF)、翻訳終結因子群 (eRF)、tRNAs、20種類のアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARSs) を、アミノ酸、ATP などのエネルギー源と共にエッペンリブチューブ内で混合したシンプル無細胞翻訳系であり、(1)翻訳開始因子を必要とする cap 依存型および EMCV-IRES 依存型の翻訳系と、(2)翻訳開始因子を必要としない HCV-IRES 依存型の翻訳系の樹立に成功している。このため、最初に紹介したヒトの翻訳反応(開始→伸長→終結)の個々の反応段階に焦点を当てた解析を行うために最適なツールとなっている。現在、我々は上記の無細胞翻訳系を使い分けて、ヒトの翻訳開始に関与する PABP の作用機構の解析、翻訳伸長の過程で生じる EMCV ウイルスタンパク質のプロセシング解析、翻訳終結後に起こるハンチントン病原タンパク質 polyQ の凝集機構の解析および凝集抑制因子のスクリーニング、さらに、リボソーム化による人工ヒト細胞の創出に向けた研究を進めている。本講演では、我々が開発したヒト因子由来無細胞翻訳系の詳細と有用性について紹介する。

## Establishment and applications of human cell free translation systems

○Kodai Machida<sup>1,2</sup>, Tomoaki Shigeta<sup>1</sup>, Hiroaki Imataka<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, <sup>2</sup>CLST, RIKEN)

**Key words** cell free translation, protein folding, protein aggregation, artificial human cell

### 3S-Ep02 昆虫嗅覚受容体の機能的再構成系の構築と匂いセンサへの応用

○櫻井 健志, 光野 秀文, 神崎 亮平  
(東大・先端研)  
sakurai@brain.imi.i.u-tokyo.ac.jp

近年、われわれの生活の安全・安心や快適さの向上、危機安全管理の観点から、ごく微量の匂い物質をリアルタイムに検出する技術に対する社会的ニーズが高まってきている。また、匂いを手掛かりにした被災地での救助活動、匂い情報の疾病診断への利用など匂いセンサの幅広い活用が期待されている。このような多様なニーズに応えるために、金属酸化物半導体や水晶振動子などをセンサ素子とする工学的技術に基づいた匂いセンサの開発が進められており、一部は実用化されている。しかしながら、これらのセンサは、感度や選択性が十分でない、センサ素子の素材の制約で検出できる匂い物質が限定される、検出に要する時間が長いといった問題点がある。これらの問題点を克服するために、検出可能な匂い物質の種類に制限がなく、高い検出感度、高い選択性を兼ね備えリアルタイムに匂いを検出できる、革新的な検出原理に基づく匂いセンサの開発が望まれている。

生物の中でも昆虫は嗅覚が発達しており、環境中に存在する多様な匂い物質を既存の匂いセンサをはるかに凌ぐ高感度でリアルタイムに検出する。最近になり、昆虫の高性能な匂い検出機能が、触角に存在する嗅覚受容細胞の樹状突起膜で発現する嗅覚受容体の機能によって達成されていることが明らかにされてきた。昆虫では、匂い選択性を決定する嗅覚受容体が共受容体とヘテロ複合体を形成し、匂い作動性のイオンチャネル型受容体として機能するため、Gタンパク質共役型として機能する脊椎動物の嗅覚受容体と比較して応答速度が速い、ヘテロ発現系での再構成が比較的容易という特徴がある。さらに昆虫種ごとに数十種以上の匂い選択性の異なる嗅覚受容体をもつことが報告されており、多様な匂い物質に対する匂いセンサ素子として利用可能性があるといえる。そこで、われわれは昆虫の嗅覚受容体に着目し、そのセンサ機能を再現した再構成系を構築することで、多様な匂い物質を既存の匂いセンサの性能を越える性能で検出可能な匂いセンサ素子の開発を進めている。

これまでにわれわれは、ガ類昆虫の一種であるカイコガ生体の嗅覚受容細胞、昆虫培養細胞における嗅覚受容体の再構成系を確立し、匂いセンサ素子としての性能を評価してきた。さらに、匂いの検出に細胞内の代謝系を必要としない昆虫嗅覚受容体の特性を活かし、無細胞翻訳系を利用したジャイアントベシクル内での嗅覚受容体合成による機能再構成系を構築してきた。本講演では、これらの再構成系における昆虫嗅覚受容体の機能を比較検討し、個々の再構成系の長所と短所を匂いセンサとしての利用への展望を含めて議論する。

#### Functional reconstitution of insect odorant receptors and application to odorant sensors

○Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Ryohei Kanzaki  
(RCAST, Univ. Tokyo)

**Key words** odorant receptor, insect, sensor, reconstruction

### 3S-Ep03 再構成型無細胞タンパク質合成システムを利用した新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定

○清水 義宏, 鳴海 良平, 上田 泰己  
(理研・生命システム)  
yshimizu@riken.jp

細胞中に含まれる特定の酵素や因子などのタンパク質の量を正確に測定することにより、その細胞がどのような状態にあり、どのような機能を担っているかを知る手掛かりとなりうる。また、細胞中の特定の生体システムをターゲットにし、その構成要素の定量を経時的に行い、動的・量的な情報を得ることにより、その生体システムの役割や、細胞間の役割の違いなどを明らかにすることで、そのシステムの包括的な理解へとつながると考えられる。こうした観点から、近年、質量分析装置を用いた定量プロテオミクスや、より高感度な三連四重極質量分析装置を利用したターゲットプロテオミクスなどの手法が確立されつつある。

質量分析装置を利用した定量プロテオミクスにおいては、目的タンパク質を含むサンプルのトリプシン消化物に対し、濃度既知の安定同位体標識した参照ペプチドを投入し、質量分析により得られたシグナル強度の比較を元に、目的タンパク質の定量を行うことが一般的である。これまで、安定同位体標識したアミノ酸を基質として用いた化学合成や、同アミノ酸を含む培地などを利用して生体試料から取得するなどの方法により、参照ペプチドの合成が行われてきたが、高価な安定同位体標識アミノ酸の大量使用や、生体中にある代謝酵素によるアミノ酸の置換などにより、安定して多種類のペプチドを調達することが困難なため、複数種類のタンパク質を効率よく定量するための障壁となっていた。本研究では、再構成型無細胞タンパク質合成システム、PURE system を利用してこれら参照ペプチドを安価かつ迅速に調製する手段を構築し、質量分析装置によるタンパク質定量法「MS-QBiC」として開発を行った。MS-QBiC法をマウスの概日時計タンパク質ネットワークの定量に利用し、20種類の概日時計タンパク質に対して時系列変化の測定を行ったところ、16種類の定量解析に成功した。うち、14種類は概日周期で増減するという結果が得られ、さらに、これら増減するタンパク質の定量値そのものがマウスの体内時刻を示しているという結果からタンパク質定量による体内時刻の測定が可能であることを明らかにした。本研究により確立されたMS-QBiC法は概日時計タンパク質ネットワークだけでなく、膜タンパク質などの困難なターゲットを含む生体内の様々なタンパク質ネットワークの定量解析に応用可能であると考えている。

#### Body time detection by a novel protein quantification method using cell-free translation system

○Yoshihiro Shimizu, Ryohei Narumi, Hiroki Ueda  
(QBiC, RIKEN)

**Key words** protein, proteomics, amino acid

## 3S-Ep04 セルフリータンパク質合成系を用いた特殊ペプチド創薬

○窪田 規一  
 (ペプチドリーム株式会社)  
 k-kubota@peptidream.com

1969年に発見され、移植医療の成功率を大幅に増加させたシクロスポリンは、通常のペプチドとは異なりD-アミノ酸やN-メチルアミノ酸が組み込まれた構造をもった11のアミノ酸からなる特殊ペプチドであった。天然由来の特殊ペプチドの例などから、特殊ペプチドは創薬候補物質として大きな期待を持たれていたものの、創薬開発システムに組み込むためのライブラリー作成が困難であった。

特殊ペプチドライブラリーを創製させるには、一つの手段として固相合成法を基盤とした有機化学的アプローチがある。しかし、この方法ではライブラリーの多様性が樹脂ビーズの個数に左右されるため、多様性に限りがあり大規模ライブラリーの構築は困難であった。

また、リボソームを利用した無細胞翻訳合成系は大きな多様性を持った大規模ライブラリーの構築が可能ではあるが、従来の無細胞翻訳合成系では20種類のタンパク質性アミノ酸にしか対応できず、特殊な構造を持つ特殊ペプチドの合成は不可能であった。

我々はこの問題を解決するために、アミノアシル化RNA触媒(リボザイム)を人工的に改変してフレキシザイム(Flexizyme)を開発した。フレキシザイムはtRNAの3'末端を強制的にアミノアシル化することにより結果として、あらゆるアミノ酸すなわち、多様な非タンパク質性アミノ酸をアミノアシル化することができるようになった。

そして、フレキシザイムによるアミノアシルtRNA合成系と、無細胞翻訳合成系を統合することにより、新しい無細胞翻訳合成系を開発することに成功した。これが、FITシステム(Flexible In-vitro Translation system)である。

さらに、FITシステムにより創製できる10兆種類にも及ぶ特殊アミノ酸から創薬ターゲットタンパクに特異的なものを選択するために、独自のディスプレイ選択系RAPID(Random Peptide Integrated Discovery)システムを開発し、組み合わせることにより特殊ペプチド創薬プラットフォームシステム:PDPS(Peptide Discovery Platform System)を完成させた。

PDPSによって創出される特殊ペプチドは、分子量1,500程度でありながら抗体に匹敵する特異性と結合力を持っており、細胞内を含めタンパク-タンパク相互作用(PPI)阻害剤などの機能を有することができる。

今後、開発が進むことにより多くの次世代医薬品が提供できると確信している。本シンポジウムでは特殊ペプチド創薬プラットフォームシステム:PDPS(Peptide Discovery Platform System)の開発秘話を含め、PD-1/PDL-1特殊ペプチドなどの実例を踏まえた特殊ペプチド創薬の可能性に関してその片鱗を紹介できればと考えている。

#### The constrained peptides innovative drug development using a cell free translation systems.

○Kiichi Kubota  
 (PeptiDream Inc.)

Key words peptide

## 3S-Ep05 無細胞合成抗原を用いた抗膜タンパク質抗体作製技術

○竹田 浩之, 澤崎 達也  
 (愛媛大・PROS)  
 takeda.hiroyuki.mk@ehime-u.ac.jp

生体膜上に局在する膜タンパク質はシグナル伝達や物質輸送、物質代謝などの役割を担っており、重要な創薬ターゲットである。膜タンパク質を特異的に認識する抗体が膜タンパク質の機能解明のためには欠かせない。特異性や親和性が高い抗体、高次構造認識抗体、あるいは多様なアプリケーションに適した抗体など特徴のある抗体が求められている。しかし、高品質の抗膜タンパク質抗体の開発は困難であり、膜タンパク質研究の大きな足かせになっている。最近、我々は無細胞タンパク質合成技術を用いて抗膜タンパク質抗体作製のための技術開発を行ったので報告する。

抗膜タンパク質抗体作製の大きな問題点の一つが、免疫や抗体選抜に必要な膜タンパク質の大量調製である。複数の膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質は構造が複雑で不安定であり発現の過程で容易に凝集・失活してしまうこと、また膜タンパク質を過剰発現させると細胞内の恒常性が攪乱されることなどから、従来の細胞タンパク質発現系では大量調製が困難である。また、可溶化や精製のような複雑な工程が必要であり、その過程で標的膜タンパク質の収率の低さや失活が問題になることがしばしばある。また、アミノ酸変異やT4L、BRIL挿入により膜タンパク質の安定性を高めることが可能であるが、変異導入した膜タンパク質を抗原に用いると変異導入箇所に対する抗体ができることがある。そのため野性型の膜タンパク質を安定かつ大量に生産する方法が求められていた。

近年、無細胞タンパク質合成系に人工脂質小胞・リボソームや界面活性剤を添加することで膜タンパク質を安定に合成する手法が複数報告されている。我々はリボソームを添加したコムギ無細胞タンパク質合成系を改良し、透析法と重層法を組み合わせた透析重層法を開発した。透析重層法では、カップ型透析デバイスの内部で合成反応液と基質液を重層し、さらにカップ自体も基質液に浸漬することで、透析膜と重層界面の両面において基質供給を円滑に行う。その結果、従来法に比べてコムギ胚芽抽出液あたりの生産量が4倍から8倍に高まり、mgオーダーの膜タンパク質を容易に合成することが可能になった。Gタンパク質共役型受容体(GPCR)を用いた合成試験を実施した。A, B, Cの全てのクラスから代表的な25種類のGPCRを選択し透析重層法を用いて合成したところ、すべてのGPCRの合成を確認した。コムギ胚芽抽出液1mLあたりの合成量についても数百μgから最大8mgと非常に良好であった。機能性抗体の取得のためには、高速かつ高感度な抗原抗体反応検出法も必要である。ごく稀にしか得られない機能性抗体の取得のためには、多くのハイブリドーマ母集団から効率的な抗体選抜を行う必要がある。また、変性抗原のみには結合する配列認識抗体は早い段階で除外できるほうが望ましい。我々はビオチン化脂質を構成脂質に添加したビオチン化プロテオリボソームと、AlphaScreenを用い、Biotinylated Liposome-based Interaction assay (BiLIA法)を開発した。BiLIA法ではビオチン化リボソーム上に合成した膜タンパク質と抗体の相互作用を2種類のビーズで検出する。本手法は洗浄課程を必要としないホモジニアスアッセイであり、少ない工程で短時間に抗体スクリーニングを実施することができる。そのため抗原膜タンパク質の変性が起きにくく、未変性タンパク質に結合する抗体の選抜に適している。

これまでに我々は無細胞合成プロテオリボソーム抗原とBiLIA法を用いて、様々な膜タンパク質の大量調製とモノクローナル抗体の取得に成功している。最初の抗体作製例であるドーパミンD1受容体(DRD1)に対するモノクローナル抗体作製では、通常のハイブリドーマ系を用いたマウスモノクローナル抗体と、ISAAC法によるウサギモノクローナル抗体を作製した。マウスへの免疫には1mg、ウサギへの免疫には5mgのDRD1を合成した。得られた35クローンのマウス抗体は親和性の高いグループと低いグループの2群に分かれた。ウサギ抗体6クローンはすべて高親和性抗体であった。DRD1オゾンログを用いたBiLIA法では、全ての抗体がDRD1以外のヒトのドーパミン受容体には結合せず、また1/3の抗体はマウスDrd1にさえ反応しなかった。親和性と特異性が高いこれらの抗体は特に免疫染色で高い性能を示した。BiLIA法を応用したエピトープ解析の結果、ほとんどの抗体はDRD1の細胞外C末端領域に結合したが、マウス抗体1種とウサギ抗体1種がDRD1の細胞外第二ループに結合していた。FACS解析の結果、マウスの細胞外第二ループ認識抗体が膜透過処理をしていないDRD1発現細胞に結合することを確認した。

このように、無細胞技術を抗体作製に応用することで、これまで生産性が低く免疫することさえ困難だった膜タンパク質に対する抗体作製が可能になってきている。本発表ではこれらの技術の紹介と、これまでの抗体作製で判明した利点や問題点、改善のための取り組みなどについて説明する。

#### Production of monoclonal antibodies against membrane proteins using cell-free technology

○Hiroyuki Takeda, Tatsuya Sawasaki  
 (PROS, Ehime Univ.)

Key words monoclonal antibody, membrane protein, cell-free protein synthesis, proteoliposome

### 3P-1p001 慢性皮膚疾患である乾癬関連遺伝子群の酵母を利用した解析

○辻 竜海  
(山口大学院 創成科学研究科 化学系専攻)  
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

乾癬とは全身に赤い発疹や鱗屑と呼ばれるかさぶたができ、ポロポロと剥がれ落ちる慢性の炎症性皮膚疾患であり、欧米圏での疾患率は3%と高いがその根本的な治療法が確立されていない難病の1つである。乾癬患者の遺伝子解析の結果から IL36RN の遺伝子に家族性変異が見つかったので IL36RN が乾癬の発症に関わる。IL36RN は抑制性のインターロイキンであり、IL1 受容体のリガンドであると考えられているが、免疫系のリガンドと受容体の相互作用を解析することは容易ではない。ヒト培養細胞にて乾癬関連受容体遺伝子を発現させたが、安定な発現自体ができなかった。そこで IL36RN 及び乾癬に関与する遺伝子を解析するために、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を使用する新たな実験系の開発を試みた。まず、IL36RN に加えて、活性型の IL36 $\alpha$ 、IL36 $\beta$ 、IL36 $\gamma$  等のリガンド遺伝子群とそれらの受容体である IL1RL2 遺伝子を合成し、GFP と融合させて酵母細胞内で発現させた。すると IL36RN 及びその受容体 IL1RL2 は酵母内にてドット状局在することがわかった。そこで、もし IL36RN と IL1RL2 が酵母内でも結合するならばドットが共局在を示すと考えた。そこで IL1RL2 に GFP を、IL36RN に RFP を融合させて同時に発現させ、2つのタンパク質の挙動を観察した。その結果、2つのタンパク質は同一カ所にドットとして共局在することがわかった。このことは、酵母内ではヒト細胞膜上でのリガンドと受容体の相互作用を可視化できるようになったことを示唆している。次に IL36RN の家族性変異を導入し、共局在を観察したところ、いくつかは共局在しなくなった。抑制性リガンドが受容体へ結合できなくなったり、活性が強まり皮膚の炎症が起こると想像できた。多くの病気やその治療のために受容体とリガンドとの反応性を調べるのが求められている。本研究では酵母を利用した新しい方法を提案する。

#### Analysis of genes relating to chronic disease psoriasis in yeast

○Tatsumi Tsuji  
(Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*

### 3P-1p002 高温耐性酵母 *Ogataea polymorpha* による乳酸生産

○杉山 峰崇<sup>1</sup>、加藤 謙斗<sup>1</sup>、深谷 健<sup>1</sup>、橋本 晋弥<sup>1</sup>、笹野 佑<sup>1</sup>、金子 嘉信<sup>1</sup>、原島 俊<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工、<sup>2</sup>崇城大・生物生命)  
sugi2@bio.eng.osaka-u.ac.jp

環境負担のより少ない新たな資源として、植物由来のポリ乳酸プラスチックが注目されている。その原料となる乳酸の発酵生産に向けて様々な微生物宿主が開発されているが、本研究では、バイオマスが豊富であるが年中温暖な熱帯地域での効率的な発酵生産に向けて重要となり、バイオマスの糖化と発酵を同時に並行発酵プロセスでも重要となる高温耐性を備え、かつキシロース資化性も備えた酵母 *Ogataea polymorpha* による乳酸生産について検討した。*O. polymorpha* は乳酸をほとんど生産せずエタノールを生産することから、まず、乳酸生産取率の向上を狙って、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*OpPDC1*) を欠失させることによりエタノールの生産を停止できるかどうか検討した。その結果、*Oppdc1* 破壊の導入により、エタノールの生産をほぼ完全に停止できることがわかった。次に、ウシ由来の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*L-LDH*) を導入し、45°C の高温かつ非中和条件下で乳酸生産を行わせた。その結果、73% の対グルコース取率で乳酸を生産させることができた。さらに、*L-LDH* を 2 コピー導入することによって、乳酸の生産性を 1.7 倍向上させることができた。一方、45°C の高温かつ中和条件下では、97% の対グルコース取率で乳酸を生産させることができた。したがって、*O. polymorpha* は乳酸生産のためのプラットフォーム菌株として高いポテンシャルを有するが、中和コストの低減などさらなる発酵生産の低コスト化に向けて、今後、乳酸耐性の向上が必要であることがわかった。

#### Genetic engineering of the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* for lactic acid production

○Minetaka Sugiyama<sup>1</sup>, Kento Kato<sup>1</sup>, Takeru Fukaya<sup>1</sup>, Shinya Hashimoto<sup>1</sup>, Yu Sasano<sup>1</sup>, Yoshinobu Kaneko<sup>1</sup>, Satoshi Harashima<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

**Key words** *Ogataea polymorpha*, lactic acid fermentation

### 3P-1p003 Expression of an AT-biased *Rhizopus* glucoamylase gene in *Aspergillus oryzae*

○Dalia Zaouil, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)  
dalia.zwl@gmail.com

Glucoamylase (EC 3.2.1.3) hydrolyzes  $\alpha(1,4)$ - and  $\alpha(1,6)$  glucan links in polysaccharides. It also removes successive glucose units from the non-reducing ends of the chains and is useful in saccharifying starch in commercial alcohol production. In particular, glucoamylase from *Rhizopus oryzae* highly in biotechnological applications because of its strong hydrolyzing activity toward raw starch compared to other glucoamylases. However, despite such an advantage of *Rhizopus* glucoamylase, *R. oryzae* produces low amounts of glucoamylase in submerged cultures. To overcome some of the obstacles of mass production of *Rhizopus* glucoamylase, we try to produce it at high level using *Aspergillus oryzae* as a host. *A. oryzae* is quite the candidate for transformation as it produces large amounts of enzymatic proteins, considered a safe microorganism and is capable of heterologous protein expression.

Working with two organisms of different GC content, however, codon optimization is a must to be able to efficiently produce glucoamylase, according to our previous studies (1, 2) suggesting that AT-biased heterologous gene transcripts tend to be polyadenylated prematurely and rapidly degraded. Hence, we first compare the production level of *Rhizopus* glucoamylase overexpressed in *A. oryzae* and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. So far we have succeeded in transforming the *Rhizopus* glucoamylase in both yeast and *A. oryzae*. Proceedingly we are checking the transformants for activity and transcript level by northern blot analysis.

- 1) Tokuoka et al, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 6538-6546 (2008)
- 2) Tanaka et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 1275-1282 (2012)

#### Expression of an AT-biased *Rhizopus* glucoamylase gene in *Aspergillus oryzae*

○Dalia Zaouil, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* glucoamylase, codon usage, mRNA

### 3P-1p004 Cas9 タンパク質を用いた麹菌のゲノム編集技術の開発

○嶋本 孝平<sup>1,2</sup>、齊藤 亮太<sup>1</sup>、和田 悠作<sup>3</sup>、織田 健<sup>1</sup>、奥田 将生<sup>1,2</sup>、岩下 和裕<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>酒総研、<sup>2</sup>広島大院・生物圏、<sup>3</sup>ファスマック、<sup>4</sup>広島大院・先端物質)  
iwashitact@nrib.go.jp

【目的】 麹菌はその優秀なタンパク質分泌能や、安全性から醸造などの産業で広く利用されている微生物で、宿主・ベクター系や相同組換え系の開発により部分的な遺伝子改変も可能になっている。こうした技術や、突然変異処理による育種は煩瑣である上、オフターゲットな変異が産業株ではしばしば問題となる。そこで近年、標的的部位を迅速かつ簡便に編集できるゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 システムが注目されている。このシステムは *Streptococcus* 属のエンドヌクレアーゼ Cas9 を用いたもので、動物や植物で利用されている。このシステムは、構築した Cas9 プラスミドベクターを導入することで用いられている。この場合外来 DNA を入れる必要があり遺伝子組換え体となる。そこで本研究では *in vitro* で Cas9 タンパク質を直接細胞内に導入することで標的遺伝子を編集できる技術の開発をした。

【方法・結果】 今回、ウラシル生合成に必要な 5-FOA によりポジティブセレクション出来る *pyrG* 遺伝子をターゲットとし、Cas9 タンパク質によるゲノム編集を行う事とした。標的遺伝子に対しガイド RNA を設計し Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体を形成させ、プロトプラスチド-PEG 法により形質転換した。その結果、ウラシル要求性の *pyrG* 変異株を多数得た。得られた変異株の *pyrG* 遺伝子領域をシーケンスしたところ、約半数が標的配列を起点に 1 塩基欠失しており、その他も標的配列を起点に最大 1781 bp までの塩基の欠失が確認された。本研究により、Cas9 タンパク質直接導入によるゲノム編集が可能であることが示された。

#### Development of genome editing using Cas9 protein in *Aspergillus oryzae*

○Shimamoto Kouhei<sup>1,2</sup>, Ryouta Saitou<sup>1</sup>, Yusaku Wada<sup>3</sup>, Ken Oda<sup>4</sup>, Masaki Okuda<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Iwashita<sup>1,4</sup>  
(<sup>1</sup>NRIB, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., <sup>3</sup>Fasmac Co., Ltd., <sup>4</sup>Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, genome editing, CRISPR/Cas9

### 3P-1p005 非相同末端結合に関する遺伝子破壊株における麴菌のTALENsを用いたゲノム編集

○水谷 治<sup>1</sup>, 荒添 貴之<sup>2</sup>, 利田 賢次<sup>1</sup>, 林 梨咲<sup>1</sup>, 大里 修一<sup>2</sup>, 佐久間 哲史<sup>3</sup>, 山本 卓<sup>3</sup>, 桑田 茂<sup>2</sup>, 山田 修<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>明治大院・農, <sup>3</sup>広島大院・理)  
mizutani@nrib.go.jp

麴菌は古くから醸造・発酵現場で用いられている産業微生物であり、我々は、麴菌の有菌株育種を目指して、様々なアプローチで研究を進めている。TALENsは、Transcription Activator-Like Effector Nucleasesの略で、植物病原菌キサントモナス属が有する任意の塩基配列を認識するDNA結合ドメインに、2量体時にDNA切断活性を示す酵素FokIのスクレアーゼドメインを融合させた人工キメラタンパク質であり、人工ヌクレアーゼとも呼ばれている。TALENsによりゲノム上の任意の位置に2本鎖切断を引き起こすと、切断されたDNAは、非相同末端又は、相同末端結合により修復されるが、この時に修復エラー等により目的の遺伝子を改変すること、即ちゲノム編集が可能となる。我々は、TALENを用いた麴菌育種の可能性を探るために、糸状菌コドン使用頻度に最適化された高活性型 Platinum-Fungal TALENs<sup>(1)</sup>を用いて非相同末端結合 (Nonhomologous end-joining: NHEJ) 修復エラーを引き起こすコンストラクトでゲノム編集を行った。その結果、得られた欠失株の半分程度が1 kb以上の大規模欠失が引き起こされたことを報告してきた<sup>(2)</sup>。そこで本研究では、この大規模欠失が引き起こされるメカニズムを探る最初のとりかかりとして、NHEJに関与する遺伝子破壊株を宿主にゲノム編集を行った。その結果、NHEJの末端結合に必要なligase (*IigD*) 破壊株でゲノム編集を行うと、野生株と比較して、大規模欠失の割合が大きく減少した。

(1) Arazoe T et al., *Biotechnol. bioeng.*, (2015)  
(2) 水谷ら、第67回生物工学会大会要旨集 1P011

#### Genome editing of *A. oryzae* disruptant which involved in nonhomologous end-joining using TALENs

○Osamu Mizutani<sup>1</sup>, Takayuki Arazoe<sup>2</sup>, Kenji Toshida<sup>1</sup>, Risa Hayashi<sup>1</sup>, Shuichi Ohsato<sup>2</sup>, Tetsushi Sakuma<sup>2</sup>, Takashi Yamamoto<sup>3</sup>, Shigeru Kuwata<sup>2</sup>, Osamu Yamada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>NRIB, <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, TALENs, genome editing, NHEJ

### 3P-1p006 HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 生産菌における生産性向上 UV 変異株の変異点解析

○伊東 広哉<sup>1,3</sup>, 松井 真<sup>1</sup>, 熊谷 俊高<sup>2,3</sup>, 町田 雅之<sup>3,4</sup>, 柴田 孝<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>アステラス製薬, <sup>2</sup>ファームラボ, <sup>3</sup>TRAHED, <sup>4</sup>産総研)  
takashi.shibata@astellas.com

微生物を工業的に利用する際には、目的物質の生産性の高い株や各種ストレスに耐性を持つ株など工業的製造時に有利な形質をもつ菌株を得ることを目的として様々な育種が行われる。育種の方法としてUVやNTGを用いた突然変異法がよく用いられているが、次世代シーケンサー (NGS) の登場により簡便にゲノム解析を行うことが出来るようになったことから、今後は遺伝子工学的手法を用いた分子育種が主流になっていくことが予想される。遺伝子組換えによる育種法では、特定の形質のみを付与・除去することが出来るために突然変異法と比較して育種の効率が大幅に向上することが期待できる。本手法を効果的に利用するため、当社で取得した高生産株について、リバースエンジニアリング技術を利用して高生産化・工業生産菌の育種への鍵となる遺伝子の探索を実施している。

Fungus No. 14919 は、HMG-CoA reductase inhibitor であるFR901512を生産する。本菌は、FR901512の生産性の向上を目的としてUVによる変異導入によって育種が行われており、4株の生産性向上株が得られている。まず本菌においてNGSを用いたゲノムシーケンシングとアセンブルを実施した。得られたゲノム情報から、*Aspergillus terreus* の Lovastatin 生合成遺伝子クラスターと相同性の高い遺伝子クラスターが見出された。また、各変異株についてUVによって生じた変異点の解析を実施した。得られた変異点情報と、RNA-Seqによる変異株間の転写情報の比較から生産性向上の鍵と思われる遺伝子についての検証を実施しており、本内容について報告する。

本研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施された。

#### Mutational analysis of fungus No.14919 producing HMG-CoA reductase inhibitor FR901512

○Hiroya Itoh<sup>1,3</sup>, Makoto Matsui<sup>1</sup>, Toshitaka Kumagai<sup>2,3</sup>, Masayuki Machida<sup>3,4</sup>, Takashi Shibata<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Astellas Pharma. Inc., <sup>2</sup>Fermlab, <sup>3</sup>TRAHED, <sup>4</sup>AIST)

**Key words** secondary metabolite, genome analysis, RNA-seq, filamentous fungi

### 3P-1p007 麴菌マルトーストランスポーター MalP 分解に関わる CreD-HulA 間の相互作用解析

○多田 日菜子, 田中 瑞己, 平本 哲也, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
gomi@biochem.tohoku.ac.jp

麴菌のデンプン分解酵素生産において、誘導基質であるマルトースの細胞内取り込み系が重要である。その取り込みを担っているマルトーストランスポーター MalP は、グルコース存在下で転写抑制を受けるとともに、タンパク質レベルでも細胞膜上からエンドサイトーシス依存的な取り込み・分解を受けることが明らかになっている。我々はこれまでに、アレシチン様タンパク質 CreD が、HECT ユビキチンリガーゼ HulA による MalP のユビキチン化をアダプターとして介在することを明らかにした。CreD-HulA 間の相互作用は、CreD の PY モチーフ (PPXY, PXY) と HulA の WW ドメインを介して行われると予想される。そこで、PY モチーフに変異を導入した株において、GFP-MalP の細胞内局在、WW ドメインとの相互作用解析を行った。

CreD の PPLY モチーフに変異を導入した株、また三箇所ある PXY モチーフのうち二箇所に変異を導入した株において解析を行った。GFP-MalP の局在解析を行ったところ、すべての変異株においてエンドサイトーシスの遅延が観察された。また、ブルダウンアッセイによる相互作用解析を行ったところ、PPLY モチーフおよび PXY モチーフの双方が WW ドメインとの相互作用に関与していること、PXY モチーフの寄与がより大きいことが示された。現在、三箇所の PXY モチーフに単独で変異を導入した株において同様の解析を進めており、その結果についても報告する予定である。

#### Analysis of interaction between CreD and HulA involved in degradation of maltose transporter MalP in *Aspergillus oryzae*.

○Hinako Tada, Mizuki Tanaka, Tetsuya Hiramoto, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, transporter, endocytosis, protein interaction

### 3P-1p008 麴菌におけるカーボンカタボライト抑制関連因子 CreB の細胞内局在解析

○一瀬 桜子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
sakurako.ichinose.q2@dc.tohoku.ac.jp

麴菌は多様な多糖類分解酵素遺伝子を有するものの、その発現はグルコースによるカーボンカタボライト抑制 (CCR) を受ける。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において CCR 制御因子として、脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されており、これまでに麴菌において *creB* 遺伝子を破壊することで、CCR が解除されることを明らかにした。しかし、CreB がグルコース抑制の制御にどのように関与するかは未だ不明である。そこで本研究では、CreB の細胞内局在観察を通じて、CreB による CCR の制御機構を解明することを目指した。

チアミン添加により発現抑制可能な *thiA* プロモータを用いて、C 末端に GFP を融合した CreB を発現させた。フルクトースを炭素源とする最小培地で培養後、チアミンを添加して発現を抑制させた状態でグルコースまたはマルトースを含む培地に移し、蛍光顕微鏡で CreB の細胞内局在を観察した。その結果、CreB は炭素源の種類にかかわらず細胞質に局在していることが観察された。さらに、免疫沈降法により CreB は WD40 リピータンパク質である CreC と相互作用しており、さらに *creC* 遺伝子破壊株では CCR が解除されることが観察された。現在は、CreC との相互作用が CreB の機能にどのように作用するのか明らかにするために、CreC 欠損条件下での CreB の細胞内局在を解析している。

#### Subcellular localization of deubiquitinase CreB involved in glucose repression in *Aspergillus oryzae*

○Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, carbon catabolite repression, subcellular localization, deubiquitinase

### 3P-1p009 麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の分解におけるカルボキシ末端領域の関与

○田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
mizuki.tanaka.a7@tohoku.ac.jp

糸状菌の加水分解酵素遺伝子の発現は、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制 (CCR) によって強く抑制される。昨年度の本大会では、麹菌において CCR を制御する転写因子 CreA が、CCR 非誘導条件下において核内から細胞質に移行し、速やかに分解されることを報告した。本発表では、CreA の分解に関わる領域について解析した結果を報告する。

カルボキシ末端にタグを融合した CreA の安定性を調べた結果、アミノ末端にタグを融合した CreA と比較して半減期が長くなった。このことから、CreA のカルボキシ末端領域に分解に重要な領域が存在する可能性が考えられた。そこで、カルボキシ末端を欠失させた CreA 変異体を作成したところ、末端の 40 アミノ酸を欠失させることで CCR の誘導・非誘導条件にかかわらず半減期が著しく長くなった。一方、末端の 20 アミノ酸を欠失した変異体では半減期の大きな変化は観察されなかった。以上の結果から、カルボキシ末端から 40-20 アミノ酸の領域が CreA の分解において非常に重要であることが示された。この領域内に存在するプロリン-rich な配列をアラニンに置換したところ、CCR 誘導条件下における半減期が長くなったことから、このプロリン-rich 配列が核内における構造的な分解に関わっていることが示唆された。現在、分解に重要な領域のさらなる絞り込みを行っている。

(本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。)

#### Involvement of C-terminal region of *Aspergillus oryzae* glucose repressor CreA in its degradation.

○Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, transcriptional regulation, transcriptional regulator gene, amylase gene

### 3P-1p010 糸状菌の鉄恒常性維持を担う転写因子 HapX のシステムリッチ領域の機能解析

○村田 俊輔, 小森 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士  
(名城大・農)  
hahahashun@gmail.com

#### 【背景と目的】

HapX は、我々の研究グループが初めて見出した CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用する真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の転写を抑制することから、鉄の恒常性維持機構の中心的な役割を果たしている。我々はすでに、HapB/C/E 複合体存在下での HapX の DNA 結合様式について詳細に研究を進めてきた。その結果、HapX の N-末端側に存在するアミノ酸モチーフが HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用に関与していることを明らかにした。一方、C-末端側ドメインにはオルソログ間で保存されたシステイン残基が連続する 4 つのモチーフ (cysteine-rich region A-D; Crr A-D) が存在しているが、その機能については不明である。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX の C-末端側ドメインの機能解明を目的とした。

#### 【結果・考察】

野生型のリコンビナント HapX (HapX<sup>WT</sup>) の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、波長 420 nm 付近に鉄硫黄クラスターに特有のピークが検出された。このことから、HapX<sup>WT</sup> は鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆された。さらに、HapX の C-末端側ドメイン中に存在する CrrA, B, C, D を欠失させた 4 種の変異型 HapX (HapX<sup>CrrA</sup>, HapX<sup>CrrB</sup>, HapX<sup>CrrC</sup>, HapX<sup>CrrD</sup>) の吸収スペクトルを測定したところ、HapX<sup>CrrA</sup> および HapX<sup>CrrB</sup> では吸収強度が HapX<sup>WT</sup> に比べてそれぞれ 30% まで低下しており、鉄硫黄クラスターの含有量の低下が示唆された。HapX<sup>CrrC</sup> および HapX<sup>CrrD</sup> の吸収強度は HapX<sup>WT</sup> と同程度であった。これらのことから、鉄硫黄クラスターの保持には CrrA および CrrB が重要であると示唆された。

#### Functional analysis of the cysteine-rich regions of HapX, a regulator of iron-homeostasis

○Shunsuke Murata, Masaya Komori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato  
(Meijo Univ. Agric.)

**Key words** HapX, iron-sulfur cluster, CCAAT, *Aspergillus*

### 3P-1p011 *Aspergillus aculeatus* セルラーゼ誘導発現における *sepM* 遺伝子破壊の影響

○津村 亮輔, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪府大院・生環科)  
shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp

【目的】糸状菌におけるセルラーゼ遺伝子の発現は、基質存在下において正の制御因子を介した機構により誘導される。本研究では、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ誘導を調節する新規制御因子の同定を目的とした。【方法・結果】本研究では、主要セルラーゼ FIII-avicelase 遺伝子 (*cbhl*) のプロモーター制御下で orotidine-5'-monophosphate decarboxylase 遺伝子 (*pyrG*) 及び  $\beta$ -glucuronidase 遺伝子 (*uidA*) を発現する 2 つの独立したレポーターシステムを有する宿主を用いて制御因子を探索した。アグロバクテリウム形質転換法 (AMT) により宿主を形質転換し、構築した約 10,000 株の変異ライブラリから、5-fluoroorotic acid 耐性を獲得及び GUS 活性・セルラーゼ資化能が低下した株を選択し、セルラーゼ誘導調節因子が欠損されたと推測される 7 株の一次候補株を獲得した。一次候補株において、サザンブロット解析によりシングルローカスに T-DNA が挿入されていた 4 株を選抜後、inverse PCR により T-DNA 周辺配列を増幅し、シーケンス解析により T-DNA 挿入座位を特定した。それら 4 株について qRT-PCR 解析を行い、*cbhl* 発現量が宿主に比べて有意に低下した株を二次候補株とした。各候補株において、T-DNA 挿入により機能が低下したと推測された遺伝子の破壊株を新たに相同組み換え法を用いて作製した。qRT-PCR 解析により *cbhl* 発現量を定量した結果、*S. pombe cdc14* ortholog の *sepM* 遺伝子欠損株において *cbhl* 発現量がコントロール株に比べ三分の一に低下していた。現在、SepM のセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子発現誘導における機能をより詳細に解析している。

#### The effect of the *sepM* disruption on the induction of the cellulase genes in *Aspergillus aculeatus*

○Ryosuke Tsumura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Aspergillus aculeatus*, cellulase induction, *sepM*, regulator

### 3P-1p012 *Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ系バイオマス分解酵素生産調節因子の探索

○白柳 英俊, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪府大院・生環科)  
takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

【目的】*Aspergillus aculeatus* におけるセルラーゼ系酵素は、誘導性基質に反応して生産される。本研究では *A. aculeatus* における新規セルラーゼ系酵素生産調節因子を遺伝学的手法により同定し、その機能を解明することを目的とした。【方法と結果】セルラーゼ系酵素生産調節因子は、アグロバクテリウム形質転換法 (AMT) を用いて作出した T-DNA 挿入変異株ライブラリから探索した。AMT の宿主には、セルラーゼにより遺伝子発現が誘導される FIII-avicelase 遺伝子 (*cbhl*) のプロモーター制御下で orotidine-5'-monophosphate decarboxylase 遺伝子 (*pyrG*) と  $\beta$ -glucuronidase 遺伝子 (*uidA*) をそれぞれ発現する株を使用し、これまでにセルラーゼ生産調節因子破壊候補株を二株 (No. 79, No. 68) も取得した。各株とコントロール株におけるセルラーゼ資化能と GUS 生産量を比較すると共に、*cbhl* 発現量と菌体外タンパク質生産量を qRT-PCR 法および SDS-PAGE、二次元電気泳動により解析した。セルラーゼ資化能と GUS 生産量が低下していた No. 79 株では、*cbhl* 発現量がコントロール株の約 30% に低下しており、セルラーゼ性基質を炭素源とした場合、約 70 kDa のタンパク質のみが消失していた。No. 68 株ではセルラーゼ資化能が低下しており、*cbhl* 発現量はコントロール株の約 40% に低下していた。また、本株では GUS 生産量が増加している一方で、2% Avicel、4% 小麦フスマを炭素源とした時には変化が無いものの、2% ガラクトマンナンを炭素源とした場合には培養上清中のタンパク質質量が著しく減少していた。現在、各株において二次元電気泳動を行い、peptide mass fingerprinting 解析により消失したタンパク質を同定をしている段階である。

#### Screening for the factor regulating the production of cellulose biomass degrading enzymes in *Aspergillus aculeatus*

○Hidetoshi Shiroyanagi, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Aspergillus aculeatus*, *cbhl*, AMT, T-DNA

### 3P-1p013 *Aspergillus* 属糸状菌の細胞壁 $\alpha$ -1,3-グルカンの二次代謝物生産に及ぼす影響

○張 斯来, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
gomi@biochen.tohoku.ac.jp

コウジ酸 (5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone) は麹菌の重要な二次代謝産物の一つであり、食品・医療薬剤・化粧品などに広く利用されている。麹菌はコウジ酸生成に関わる遺伝子 *koiA*、トランスポーター遺伝子 *kojT*、転写因子遺伝子 *kojR* のクラスターを持ち、コウジ酸は最適な窒素や炭素濃度を維持し長時間培養することで生産される(1)。我々は  $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* の欠損株におけるコウジ酸生産性を解析した結果、生産性が著しく低下すると同時に、*kojA*、*kojT*、*kojR* の発現量も低下したことを明らかにした(2)。*agsB* 欠損株に野生型 *agsB* を導入した株は野生株と同様のコウジ酸生産とコウジ酸合成遺伝子の発現量に回復した。このことから、細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンの欠損はコウジ酸生成に関与する遺伝子の発現を抑制しているものと考えられる。一方、 $\alpha$ -1,3-グルカン欠損株は最小寒地培地で分生子形成効率が著しく低下し、コウジ酸生産用培養条件で二次代謝産物の生産制御に関わる代表的な因子としてよく知られている *laeA* の発現量も著しく低下していることが認められた。このことは、細胞壁  $\alpha$ -1,3-グルカンはコウジ酸以外の二次代謝産物の生産にも関与している可能性を示している。そこで、現在は *Aspergillus nidulans* においても  $\alpha$ -1,3-グルカン欠損における二次代謝産物の生産について解析を行っており、その結果について報告する予定である。

(1) Terabayashi et al., Fungal Genet. Biol., 47, 953-951 (2010)  
(2) 張ら, 2016年度 日本農芸化学会大会講演要旨集, 4F153

#### Effect of cell wall $\alpha$ -1,3-glucan on secondary metabolites production in *Aspergillus*

○Silai Zhang, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus*,  $\alpha$ -1, 3-glucan, secondary metabolism

### 3P-1p014 麹菌のアミラーゼ生産に関与する転写因子 MalR の核局在シグナル変異体の機能解析

○今野 友維, 鈴木 空太, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
gomi@biochem.tohoku.ac.jp

MalR は麹菌のマルトース取り込みと資化を直接制御する転写因子であるだけでなく、アミラーゼ生産にも深く関与している。これまでの研究により、MalR が誘導基質の有無にかかわらず構造的に核局在しており(1)、安定性が極めて高いことが明らかになっている。そこで本研究では MalR の核局在シグナル (NLS) に変異を導入した株を作製し、細胞内局在と安定性などについて解析した。MalR は RRK (NLS1)、PTERRR (NLS2) という 2 種類の推定 NLS を持っており、NLS1 は Zinc finger motif 内に、NLS2 は C 末端領域に存在している。それぞれに変異導入した株を作製し細胞内局在解析を行ったところ、NLS1 に変異導入した sGFP-MalR-NLS1pm と NLS2 に変異導入した sGFP-MalR-NLS2pm では比較的強い蛍光が核に認められるものの菌糸全体に蛍光が観察された。一方、NLS1 と NLS2 の両方に変異導入した sGFP-MalR-NLS1/2pm では核内に蛍光は観察されなかった。このことから NLS1 および NLS2 の両配列に変異導入することで MalR の核局在能が失われることが明らかになった。また、NLS1 が Zinc finger motif 内に存在していることから、NLS1 に変異導入した株は DNA 結合能が失われることが予想された。そこでハローアッセイを行った結果、NLS1 に変異導入した株ではアミラーゼ生産能が失われていることが確認された。しかし、C 末端領域に存在する NLS2 の変異導入株ではアミラーゼ生産能への影響は見られなかった。これらの株の安定性についても現在解析中である。本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

(1) Suzuki et al., Appl Microbiol Biotechnol. 99: 1805-1815 (2015)

#### Functional analysis of *Aspergillus oryzae* MalR that has mutations in its putative nuclear localization signals.

○Yui Konno, kuta Suzuki, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** MAL activator, *Aspergillus oryzae*, nuclear localization

### 3P-1p015 麹菌のプロテアーゼ低生産および細胞壁構成因子破壊による異種タンパク質生産量への影響

○新庄 梨沙, 渡邊 崇健, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也  
(東北大院・農)  
gomi@biochem.tohoku.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、安全性が高いことやタンパク質の分泌能力に優れていることから、異種タンパク質生産の有用な宿主としての利用が期待されている。しかし、麹菌自身の産生するプロテアーゼによる分解が、異種タンパク質を生産させる際のボトルネックとなっており、高等動物由来のタンパク質の生産量は期待されるほどの量には至っていない。そこで、プロテアーゼ遺伝子の破壊による生産量増加が期待されるが、ゲノム解析の結果から 134 種類存在することが知られており、これらすべての破壊は難しい。そこで、本研究では、菌体外プロテアーゼを広く制御する転写因子 PrtR に着目した。この遺伝子破壊株では、菌体外プロテアーゼ活性の顕著な低下が観察され、すでに液体培養時に異種タンパク質の生産量が増加することが確認されている。加えて、PrtR 支配下でない液胞プロテアーゼと考えられている PepE の遺伝子もあわせて破壊したところ、さらなる生産量の増加が認められた。一方、糸状菌の細胞壁構成因子である  $\alpha$ -1,3-グルカンの合成酵素遺伝子を破壊することによって、タンパク質の生産量が増加することが報告されている(1)。そこで、先述のプロテアーゼ低生産株において、 $\alpha$ -1,3-グルカン合成酵素遺伝子 *agsB* も併せて破壊し、異種タンパク質の生産量を調べたところ、生産量が増加する傾向が認められた。

(1) 吉見、阿部、バイオサイエンスとインダストリー、73 ページ(2015)

#### Effect of combination of mutations in protease regulator PrtR and $\alpha$ -1,3-glucan synthase AgsB on heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*

○Shinjo Risa, Takayasu Watanabe, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi  
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, heterologous production, protease,  $\alpha$ -1, 3-glucan synthase

### 3P-1p016 有用糸状菌 *Trichoderma reesei* 日本型変異株の網羅的表現型解析

○平沢 大樹<sup>1</sup>, 志田 洋介<sup>1</sup>, 田代 康介<sup>2</sup>, 久原 哲<sup>2</sup>, 小笠原 渉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>長岡技科大, <sup>2</sup>九大院・農)  
owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

糸状菌 *Trichoderma reesei* はリグノセルロースを単糖へと分解するために必要な多種多様なセルラーゼ・ヘミセルラーゼを多量に分泌生産することが知られている。産業上の有用性から、世界中の研究機関で突然変異導入を用いてセルラーゼ高生産変異株が作出されてきた。日本においても、標準株 QM9414 より複数回の変異導入によって高生産変異株 PC-3-7 が作出されている。PC-3-7 はセロビオースによるセルラーゼ誘導能の劇的な増加、ソルボースによるセルラーゼ誘導能の獲得といった特徴を持つ。これまでのゲノム解析によって、これら日本型変異株群に蓄積された変異点が明らかとなっているのに対し、表現型の解析についてはセルラーゼ生産性を評価したものに限定されている。そのため、産業への応用を考えると、セルラーゼ生産性の評価だけでなく、生育など種々の表現型を解析する必要がある。本研究では、網羅的に表現型を解析し、日本型変異株の進化について新たな知見を得ることを目的とした。日本型変異株に対し、フェノタイプマイクロアレイを用いて炭素、窒素、リン、硫黄および pH に対する生育能を網羅的に評価した。その結果、変異株のセルラーゼ生産性が増加するにつれ、一部の炭素源での生育能が減少する傾向が観察された。また、培地 pH に対する評価を行った結果、高 pH になるにつれて、生育が減少した。さらに、pH における生育能は変異株によって最適条件が異なっていた。種々の pH におけるセルラーゼ生産性を評価した結果、変異株によって pH 応答性が劇的に変化することを明らかとした。

#### Comprehensive phenotype analysis of Japanese mutants in Filamentous fungus *Trichoderma reesei*

○Hiroki Hirasawa<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Kosuke Tashiro<sup>2</sup>, Satoru Kuhara<sup>2</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** Comprehensive phenotype analysis, *Trichoderma reesei*, cellulase

### 3P-1p017 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有するセスキテルペン合成酵素の同定および機能解析

○釜場 将太<sup>1</sup>, 北岡 卓也<sup>2</sup>, 一瀬 博文<sup>2</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>九大院・生資源, <sup>2</sup>九大院・農)</sup>  
 ichinose@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】テルペノイドは、イソプレレン単位の倍数で形成される多種多様な天然化合物群である。中でもセスキテルペノイドは構造多様性に富み、多彩な生物活性を有するなど創薬シード化合物の探索資源として期待される。生合成では、共通基質であるファルネシルピロリン酸が合成酵素により環化されることで基本骨格が形成され、さらにシトクロム P450 による酸化修飾を経ることで、さらに多様な構造へと導かれる。すなわち、テルペノイド合成において重要な役割を担う合成酵素と P450 の生化学的理解により、セスキテルペノイドの高度利用が促進されると考えられる。本研究では、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有するセスキテルペン合成酵素の同定と機能解析を試みた。

【方法】3~21 日間培養した *P. chrysosporium* より totalRNA を抽出した。既存の合成酵素に配列相同性を示す遺伝子を *P. chrysosporium* のゲノムデータベースより網羅的に探索し、PCR プライマーを設計した。抽出した totalRNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、候補遺伝子を増幅した。遺伝子を pET ベクターに連結した後、大腸菌にて異種発現させ、抽出した揮発性代謝物を GC/MS 分析に供した。

【結果・考察】*P. chrysosporium* のゲノムデータベースを精査したところ、11 種の候補遺伝子が見出され、9 種の遺伝子を cDNA として獲得した。また、大腸菌を宿主とする異種発現を行い、代謝物を GC/MS 分析に供したところ、9 種中 8 種の形質転換体にてセスキテルペン合成が示唆される結果が得られ、候補遺伝子が 大腸菌内で活性型酵素として発現したことが示された。

#### Identification and characterization of sesquiterpene synthases from *Phanerochaete chrysosporium*

○Shota Ukeba<sup>1</sup>, Takuya Kitaoka<sup>2</sup>, Hirofumi Ichinose<sup>2</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)</sup>

**Key words** secondary metabolism, basidiomycetes, sesquiterpene

### 3P-1p018 超好熱性アーキア由来ヘリカーゼの PCR 反応への影響

○川戸 克展<sup>1</sup>, 秀瀬 涼太<sup>1</sup>, 保川 清<sup>2</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>関西学院大院・理工, <sup>2</sup>京大院・農)</sup>  
 fujiwara-s@kwansei.ac.jp

ヘリカーゼは ATP 依存的に核酸の二本鎖をほどく酵素である。そのアミノ酸配列から 6 つのスーパーファミリー (SF1-6) に分類される。これまでに、SF2 ヘリカーゼ TK0566 (*Tk-EshA*) が PCR の連鎖反応の段階で非特異的に結合したプライマーを 3' 突出型から剥がし、PCR 誤増幅を低減する効果 (ノイズ低減効果) を有することを示した (1)。本研究では、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の SF2 ヘリカーゼ TK0306、TK0460 及び SF1 ヘリカーゼ TK0178 に着目し、これらヘリカーゼの酵素性質を調べ、PCR 反応時のノイズ低減効果を検証した。組換え TK0306、TK0460、TK0178 を大腸菌で発現させ、精製した。一本鎖または二本鎖ヌクレオチドを基質として、TK0306、TK0460、TK0178 の ATPase 活性の至適温度はそれぞれ 50℃、60℃、100℃ 以上であった。TK0460 は 3' 突出型二本鎖 DNA にアンワインド活性を示し、TK0306、TK0178 は 5' 突出型二本鎖 DNA にアンワインド活性を示した。次に、PCR による *T. kodakarensis* 由来 16S rDNA の増幅におけるこれら酵素のノイズ低減効果を検証した。TK0306 や TK0460 にノイズ低減効果は認められなかった一方、TK0178 を添加することで非特異的増幅産物の減少が確認された。*Tk-EshA* は 80℃ に ATPase 活性の至適温度をもつ。これらことから PCR におけるヘリカーゼによるノイズ低減は、酵素の基質に対する特異性ではなく、高温での活性または耐熱性に依存していると推察される。

(1) Fujiwara, A. *et al.* (2016) Appl. Environ. Microbiol., 82:3022-31.

#### Effect of thermostable archaeal helicases on PCR.

○Katsuhiro Kawato<sup>1</sup>, Ryota Hidesel<sup>1</sup>, Kiyoshi Yasukawa<sup>2</sup>, Shinsuke Fujiwara<sup>1</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)</sup>

**Key words** hyperthermophile, Helicase, PCR, Noise-reduction

### 3P-1p019 ランダム変異による超好熱菌糖代謝変異株の単離と解析

○東 健弘<sup>1</sup>, 二石 涼平<sup>1</sup>, 折田 和泉<sup>1</sup>, 中村 聡<sup>1</sup>, 今中 忠行<sup>2</sup>, 福居 俊昭<sup>1</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>東工大・生命理工学院, <sup>2</sup>立命館大・生命科学)</sup>  
 tfukui@bio.titech.ac.jp

【背景・目的】絶対嫌気性超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* はビルビン酸やデンプンを基質として元素硫黄非依存的に水素を発生して生育することができる。本菌の糖代謝には変型 Embden-Meyerhof (EM) 経路が機能しているが、ビルビン酸基質では糖新生方向、デンプンやマルトオリゴ糖では解糖方向に代謝が制御されている。この変型 EM 経路には多くの研究がなされ、転写および酵素レベルでの制御が報告されているが、その代謝フラックスの維持や切り替えには未だ同定されていない関連酵素・代謝や制御機構が存在すると推測される。本研究では超好熱菌の糖代謝制御に関与する未知遺伝子の同定と機能解明を目指し、最近確立した *T. kodakarensis* ランダム変異による糖代謝変異株の単離と解析を行った。

【方法および結果】*T. kodakarensis* アグマチン要求性株 ( $\Delta pdaD$ ) を *pdaD* マーカーを含むトランスポゾン転移 gDNA ライブラリーで形質転換することによりランダム変異ライブラリーを作製した。ランダム変異体モノコロニーをビルビン酸またはマルトオリゴ糖を含む液体培地を分注した 96 穴プレートでそれぞれ 85℃、12 時間培養して増殖を比較し、いずれかの基質での生育能が低下した変異株を選抜した。約 1,200 クローンからビルビン酸生育能低下株を 2 株、マルトオリゴ糖生育能低下株を 6 株取得した。単離株における変異部位を同定したところ、マルトオリゴ糖生育能低下株からは変型 EM 経路に固有の酵素である ADP 依存型ホスホフルクトキナーゼ遺伝子 *pfk* が同定され、本スクリーニング系の有用性が示された。さらに翻訳後成熟への関与が推定される酵素遺伝子などが同定され、これらについて相補実験や機能解析を行っている。

#### Identification of genes related to sugar metabolisms in hyperthermophilic archaeon by random mutagenesis

○Takehiro Azuma<sup>1</sup>, Ryohei Futatsushii<sup>1</sup>, Izumi Orita<sup>1</sup>, Satoshi Nakamura<sup>1</sup>, Tadayuki Imanaka<sup>2</sup>, Toshiaki Fukui<sup>1</sup>  
<sup>(<sup>1</sup>Sch. Life Sci. & Technol., Tokyo Tech, <sup>2</sup>Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)</sup>

**Key words** hyperthermophile, random mutagenesis, modified Embden-Meyerhof pathway, *Thermococcus kodakarensis*

### 3P-1p020 光化学系 II 耐熱性 D1/D2 タンパク質と D1 プロセシングプロテアーゼの中温性シアノバクテリアでの発現

鶴田 開生, 田中 誠, 原口 典久, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳  
 (崇城大・生物生命)  
 matsuoaka@bio.sojo-u.ac.jp

葉緑体やシアノバクテリアでの光エネルギーに依存した水からプラストキノンの電子伝達反応はチラコイド膜にある光化学系 II (PSII) 複合体によって触媒される。2 つの水分子の分解による 4 プロトンと 1 酸素分子の生成は、PSII 複合体の中心に位置する D1/D2 ヘテロダイマーの D1 タンパク質に結合したマンガンとカルシウムを含む酸素発生複合体 (OEC) で起こる。好熱性シアノバクテリアから結晶解析された PSII のデータより、OEC には D1 タンパク質の C 末端がプロセシングされて生じる Ala344 の C 末端カルボキシル基を含む 7 つのアミノ酸側鎖が配位結合している。水分子の酸化反応を *in vitro* で解析するため、私達は中温性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の D1/D2 タンパク質を好熱性シアノバクテリア由来の耐熱性 D1/D2 で置換した組換え株 GRPS971 を作成した。28 および 38℃ において低光強度下 BG11 培地で培養した GRPS971 株の比増殖速度は親株 GRPS810 の約 70% に低下していたが、両者の酸素発生活性は同程度であった。チラコイド膜タンパク質および精製した PSII 複合体の耐熱性 D1/D2 タンパク質のウェスタン分析より、GRPS971 株では耐熱性 D2 タンパク質は PSII 複合体に取り込まれていたが、耐熱性 D1 タンパク質は取り込まれていなかった。また GRPS971 株のチラコイド膜には C 末端プロセシングされていない前駆型の耐熱性 D1 タンパク質が検出された。この結果より D1 プロセシングが遮断されていると考え、好熱性シアノバクテリアより D1 プロセシングプロテアーゼの *ctpA* 遺伝子をシャトルベクターにクローン化し、GRPS971 株に導入して現在解析中である。またプロセシング部位 Ala344 の C 末端側のアミノ酸配列を PCC 7942 と同じ配列に改良した耐熱性 D1 タンパク質がプロセシングを受けるか検討している。

#### Expression of thermostable photosystem II D1/D2 proteins and D1-processing protease in a mesophilic cyanobacterium

Kaisei Tsuruda, Makoto Tanaka, Norihisa Haraguchi, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Masayoshi Matsuoka  
 (Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

**Key words** photosystem II, cyanobacteria, protein expression, thermostability

### 3P-1p021 水面浮遊性微細藻類 FFG039 株における遺伝子組換え技術の確立

○櫻井美季<sup>1</sup>, 野島大佑<sup>1</sup>, 若田裕一<sup>2</sup>, 細川隆史<sup>2</sup>, 邑上健<sup>2</sup>,  
吉野知子<sup>1</sup>, 田中剛<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>富士フィルム株式会社)  
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】効率的なバイオマス回収プロセスの開発に向けて、水面でバイオフィーム形成する微細藻類に着目したスクリーニングを実施し、これまでに水面浮遊性微細藻類 FFG039 株を獲得している。FFG039 株は水面に非常に強固なバイオフィームを形成する為、ポリエチレンフィルムを用いて簡便に回収することが可能である。しかし更なる脂質生産性の向上や、効率的なバイオフィーム形成を促進する為にはその代謝変化や形成機構の解析が必須となるが、当該株においてはその解析の基盤技術となる遺伝子組換え技術が確立していない。そこで本研究では、当該株における遺伝子組換え技術の確立を目的とした。

【方法】Neomycin phosphotransferase II (*ntpII*) を選択マーカーとしたベクターを FFG039 株にエレクトロポレーション法により導入を行った。エレクトロポレーション条件として印加電圧、DNA 添加量を検討し、得られたコロニー数から形質転換効率を算出した。また遺伝子保持安定性の評価として形質転換体から抽出したゲノムに対して *ntpII* の保持を確認した。

【結果】エレクトロポレーションの各条件を検討し、遺伝子組換えを行った結果、形質転換効率は約 50 colonies/10<sup>6</sup> cells であった。この効率は、緑藻におけるエレクトロポレーションを用いた遺伝子組換えの効率と同等である。形質転換体の継代培養を行い、外来遺伝子の保持安定性を評価した。その結果、5 ヶ月間の継代培養においても、ゲノム中での *ntpII* の保持が確認された。以上のことから、水面浮遊性微細藻類 FFG039 株においてエレクトロポレーションを用いた安定的な遺伝子組換え技術が確立できたと結論づけた。

#### Establishment of transformation in floating microalgae strain FFG039

○Miki Sakurai<sup>1</sup>, Daisuke Nojima<sup>1</sup>, Yuichi Wakata<sup>2</sup>, Takafumi Hosokawa<sup>2</sup>,  
Takeshi Murakami<sup>2</sup>, Tomoko Yoshino<sup>1</sup>, Tsuyoshi Tanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>FUJIFILM Corporation)

**Key words** floating microalgae, biofilm, biofuel production, transformation

### 3P-1p022 シマミズ *Eisenia fetida* を用いた異種遺伝子発現系の構築

○町田 悠, 伊佐 猛, 土田 喜野, 赤澤 真一  
(長岡高専・物質工)  
s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】近年、遺伝子組換え生物を用いて治療薬を生産するバイオ医薬が注目されており、様々な生物を用いた異種遺伝子発現系が開発されている。我々は、新規宿主生物として糖鎖修飾が可能で、タンパク質分泌生産も可能なシマミズ *Eisenia fetida* に注目し、異種遺伝子発現系の構築を目指してきた。本ミミズは生物毒性試験のモデルとして世界的に認められているため、本技術の進展により分子生物学的研究が加速化される事も期待される。これまでの研究で、我々はマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することにより *E. fetida* の遺伝子導入に世界で初めて成功し、遺伝子導入に最適な培地条件等を明らかにしてきたが<sup>1)2)</sup>、エレクトロポレーションの条件については詳細に検討していなかった。そこで本研究では本条件について詳細に検討し、さらにこれまで課題であった *E. fetida* 頭部断片への遺伝子導入を試みた。

【方法】*E. fetida* への遺伝子導入は、切断した尻尾側の切断面に、ルシフェラーゼ遺伝子をマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することによって行った。遺伝子導入の確認は、破碎・溶解し、ルシフェラーゼの発光強度を計測することで行った。また、遺伝子導入を行った *E. fetida* 頭部からゲノムを抽出し、ルシフェラーゼ遺伝子の確認を PCR 法で検証した。

【結果】エレクトロポレーションの条件を最適化した結果、生存率は約 6 倍、形質転換効率は 4 倍に向上した。また、PCR により再生尾端部位に遺伝子が組み込まれている事を確認した。頭部については現在実施中である。本研究の一部は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究 15K14713 の助成を受けて実施された。

[1]赤澤真一他. 日本生物工学会. 2015 年 10 月. ポスター番号 1P-028. 鹿児島.  
[2]町田悠他. 日本農芸化学会. 2016 年 3 月. ポスター番号 2G059. 北海道.

#### Construction of heterologous gene expression system in the earthworm, *Eisenia fetida*

○Yu Machida, Takeru Isa, Kino Tsuchida, Shin-ichi Akazawa  
(Dept. Material Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka. Coll.)

**Key words** Biological medicine, Earthworm, transformation, *Eisenia fetida*

### 3P-1p023 Heterologous Gene Expression as A tool to Obtain Some Chemical Compound from Bifidobacteria

○Hend Altaib<sup>1</sup>, Izumi Nomura<sup>2</sup>, Tohru Suzuki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Fac. Appl. Biol. Gifu Univ., <sup>2</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)  
suzuki@gifu-u.ac.jp

Bifidobacteria is a G (+) anaerobic bacteria normally inhabitant of mammalian intestinal tract; thus it can be considered as a good candidate for large scale production of some chemical compounds; it is supposed to reduce the risk of toxic byproduct such as *E. coli*. Also, it can save the running cost because of its anaerobic nature. Further more, the knowledge is increasing about Bifidobacteria genome, which opens the way for metabolic engineering to get some special function of interest or to increase productivity of some chemical. Heterologous gene expression is an important tool for such purpose. In the present study, we are applying heterologous gene expression of some pyrimidine pathway genes to enhance the productivity of some metabolites. The first metabolite of interest is Orotate. At least 6 genes are involved in its production; *pyrB*, *pyrC*, *pyrK* and *pyrD* are essential genes for Orotate production. *pyrI* is a feedback inhibitory gene and *pyrE* converts orotate to orotidine. Therefore, first 4 genes were included in our *PKO403* expression vector, using multiple fragment ligation technique. Three promoters from *B. longum* 105A are to be used, two of them are constitutive *hup*, *gap* and one inducible promoter *FruEKFG*. For now, we succeeded to construct a big shuttle vector with 6 genes inside and electroporate it successfully inside Bifidobacteria. In a word, this study is considered the first trail to use Bifidobacteria as a cell factory. We hope that our technique can offer a useful tool for wide scale production.

#### Heterologous Gene Expression as A tool to Obtain Some Chemical Compound from Bifidobacteria

○Hend Altaib<sup>1</sup>, Izumi Nomura<sup>2</sup>, Tohru Suzuki<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Fac. Appl. Biol. Gifu Univ., <sup>2</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

**Key words** bifidobacterium, transcriptional regulation, gene knockout, gene expression

### 3P-1p024 SUMO2 変異体ライブラリからの HER2 親和性選択

○河上佳奈, 伊藤 春佳, 伊藤 伸哉, 牧野 祥嗣  
(富山県大・工)  
makino@pu-toyama.ac.jp

【目的】乳がんの 20~25% を占める HER2 陽性乳がんでは、細胞表面に HER2 が過剰に発現しているため、大量の細胞増殖シグナルが発生している。HER2 は二量体化することで細胞増殖を活性化する。その抗体医薬にペルツスマブがあり、HER2 に結合し二量体化を抑えることでがん細胞の増殖を抑える。しかし、抗体医薬品は動物培養細胞を用いて生産されるためコストがかかる。本研究では、HER2 の二量体化を抑える抗体医薬品と同等の薬効を持ち、動物培養細胞を用いなくても生産することが可能な抗体代替タンパク質の探索を目的としている。抗体ではないタンパク質をランダムに変異させてファージライブラリを作製し、変異させたタンパク質から HER2 に親和性のあるものを探す。

【方法】SUMO2 (small ubiquitin-related modifier 2) の表面で互いに近接した 5 アミノ酸残基を選び、そのコドンに NNB または NNB でランダムに置換した遺伝子を合成した。合成遺伝子が組み込まれたファージミドで大腸菌 TG1 を形質転換した。回収したコロニーにヘルパーファージ M13KO7 を感染させ、培養上清から得られたファージを集めてファージディスプレイライブラリとした。HER2 に親和性があるファージを濃縮するために、HER2 固定化磁性粒子を用いたパニングを繰り返し行った。

【結果】NNK 置換ライブラリで 6.0×10<sup>7</sup> cfu、NNB 置換ライブラリで 4.0×10<sup>7</sup> cfu のライブラリサイズが得られた。また、パニングの回数を重ねるごとに回収ファージ数、S/N 比ともに高くなった。シーケンス解析の結果、同じアミノ酸配列を持つものが複数確認できたため、HER2 に親和性のあるタンパク質が濃縮されたと推定される。クローンの親和性解析等を行った結果を合わせて報告する。

#### Selection of HER2 binding protein from SUMO2 mutant library

○Kana Kawakami, Haruka Itoh, Nobuya Itoh, Yoshihide Makino  
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

**Key words** HER2, affinity selection, phage display library, SUMO2

### 3P-1p025 大腸菌による抗結核薬 D-サイクロセリンの高レベル異種生産

○熊谷 孝則<sup>1</sup>, 小澤 智紀<sup>2</sup>, 青田 達明<sup>1</sup>, 谷本 桃子<sup>2</sup>, 的場 康幸<sup>1</sup>, 野田 正文<sup>1</sup>, 杉山 政則<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>広大院・医歯薬保健学, <sup>2</sup>広大・薬)  
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】私たちは、これまで、抗結核薬 D-サイクロセリン (D-CS) の生合成遺伝子 (*dcsC*, *dcsD*, *dcsE* および *dcsG*) を連結したベクター pET-21a(+)/*dcsEDCG* と、4 遺伝子の下流に自己耐性遺伝子である *dcsJ* を連結したベクター pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* を作製し、大腸菌 BL21(DE3) 株を宿主とした D-CS 生産を行い、第 66 回大会で報告した。本研究では、硫化水素の生成および L-セリンの代謝に関与する遺伝子 (*cysJ* および *cysK*) の二重破壊大腸菌株を宿主とした結果、D-CS の生産性向上に成功したので報告する。

【方法および結果】大腸菌 BL21(DE3) を親株とし、Red/ET recombination により、*cysJ* および *cysK* 遺伝子の二重破壊大腸菌 ( $\Delta cysJ/\Delta cysK$ ) を作製した。 $\Delta cysJ/\Delta cysK$  株、および、単独破壊株 ( $\Delta cysJ$  および  $\Delta cysK$ ) のそれぞれに上記 2 種類のベクターをそれぞれ導入し、D-CS 生産性を評価した。その結果、pET-21a(+)/*dcsEDCG* 導入株については、 $\Delta cysJ$  および  $\Delta cysK$  では親株と比べ、D-CS 生産の有意な上昇は認められなかったものの、 $\Delta cysJ/\Delta cysK$  株では有意に増加した。pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* 導入株については、 $\Delta cysJ$  および  $\Delta cysK$  では親株と比べ、D-CS 生産量の有意な上昇は認められなかったものの、上昇傾向が観察された。一方、 $\Delta cysJ/\Delta cysK$  株では親株と比べ、D-CS 生産量が有意に増加した。pET-21a(+)/*dcsEDCGJ* を導入した  $\Delta cysJ/\Delta cysK$  株の D-CS 生産量は、D-CS 生産性放線菌に匹敵するものであった。

### High level heterologous production of an anti-tubercular agent D-cycloserine by *Escherichia coli*

○Takanori Kumagai<sup>1</sup>, Tomoki Ozawa<sup>2</sup>, Tatsuaki Aota<sup>1</sup>, Momoko Tanimoto<sup>2</sup>, Yasuyuki Matoba<sup>1</sup>, Masafumi Noda<sup>1</sup>, Masanori Sugiyama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Faculty of Pharm. Sci., Hiroshima Univ.)

**Key words** D-cycloserine, heterologous production, metabolic engineering

### 3P-1p026 認知症を引き起こす神経変性疾患原因タンパク質の酵母を用いた凝集性解析

○浦野 大樹<sup>1</sup>, 鈴木 絢子<sup>1,2</sup>, 星田 尚司<sup>1</sup>, 赤田 倫治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・創成科学・化学系, <sup>2</sup>現大分大・工・応化)  
hoshida@yamaguchi-u.ac.jp

現在、認知症の治療薬の開発が大きな課題となっている。認知症を引き起こす神経変性疾患において、アルツハイマー病ではアミロイド  $\beta$ 、パーキンソン病では  $\alpha$  シヌクレインと呼ばれるタンパク質の凝集が主な原因と考えられている。しかし、これらが凝集するメカニズムは分かっていない。そこで本研究では、アミロイド  $\beta$  と  $\alpha$  シヌクレインの凝集に重要な配列を明らかにするために酵母を用いた。アミロイド  $\beta$  全長 (43 aa) の C 末に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合させて酵母で発現させると細胞内で凝集が見られた。そこで、C 末端からアミノ酸を削除してみると 8 アミノ酸削除すると凝集が消え、細胞質局在を示した。この削除した C 末端は疎水性アミノ酸で構成されており、どの疎水性アミノ酸が凝集に重要な役割を担っているかを調べるために、単一の疎水性アミノ酸で構成した人工配列を 35 aa に付加した。その結果、バリリン (V) の連続した配列を付加したもので凝集が多く見られた。そこで、C 末端の疎水性をモデル化するために、C 末端側の 14 アミノ酸を除き、バリリンの連続配列に置換したところ、6 アミノ酸でも凝集が見られた。この結果から、アミロイド  $\beta$  の凝集において、C 末端は単純な疎水性配列でよいことが分かった。現在 N 末端側の変異体を作製し、凝集に必要なアミノ酸を調べている。次に、 $\alpha$  シヌクレインも酵母で全長を発現させたところ凝集が見られたので、C 末端から削除した。C 末端の酸性アミノ酸配列を削除すると凝集が増え、さらに、その N 末端側にある疎水性アミノ酸が多く存在する領域を部分的に削除すると、凝集が減った。 $\alpha$  シヌクレインにおいても、疎水性アミノ酸配列が凝集に必要な配列であることが示唆された。

### Yeast as a model for analyses of protein aggregation leading to neurodegenerative diseases

○Daiki Urano<sup>1</sup>, Ayako Suzuki<sup>1,2</sup>, Hisashi Hoshida<sup>1</sup>, Rinji Akada<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Chem., Grad. Sch., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Oita Univ.)

**Key words** amyloid beta, alpha synuclein, protein aggregation, yeast

### 3P-1p027 シャペロン共発現がポリヒドロキシアルカン酸分子量へ与える影響

○南部 友香<sup>1</sup>, 百武 真奈美<sup>2</sup>, 廣江 綾香<sup>1</sup>, 柘植 丈治<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大院・総理工, <sup>2</sup>理研・バイオマス)  
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】微生物により生産されるポリヒドロキシブタン酸[P(3HB)]は、重合酵素によって重合されるが、先行研究より *Bacillus cereus* YB-4 の重合酵素は、アルコールによりポリマー鎖を切断するアルコールシス活性を有し、P(3HB) を低分子量化することが確認された。低分子量 P(3HB)は、結晶核剤やブレンド体として、従来の P(3HB)とは異なる用途が期待できる。本研究では、このアルコールシス反応によって分子量 1 万以下の P(3HB)を合成することを目指している。今回は、シャペロンを利用して、細胞内で働く重合酵素量を増加させることで、ポリマーの分子量制御を試みた。

【方法】*Escherichia coli* BL21(DE3)に重合酵素遺伝子を有するプラスミド pET3a-*phaRC<sub>YB4</sub>AB* を導入し、さらに 5 種類のシャペロン発現プラスミド (*dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL* (pG-KJE8), *groES-groEL* (pGro7), *dnaK-dnaJ-grpE* (pKJE7), *groES-groEL-tig* (pG-Tf2), *tig* (pTf16)) をそれぞれ導入し組換え株を作製した。それらの株を培養し、コントロール株との比較を行った。

【結果と考察】コントロール株が分子量約 30 万に対し、シャペロンを発現した株では約 10 万未満であり、3 万にまで低分子量化しているものもあった。このことから、シャペロンと共発現させることで重合酵素の発現量が高まり、低分子量化が進んだことが推察された。今後は、重合酵素活性測定により各組換え株の重合酵素発現量の確認し、シャペロンによる重合酵素量への影響を調べ、さらなる分子量制御を試みる。

### Molecular Weight Control of Polyhydroxyalkanoate by Co-Expression of Chaperone and PHA synthase

○Yuka Nanbu<sup>1</sup>, Manami Hyakutake<sup>2</sup>, Ayaka Hiroe<sup>1</sup>, Takeharu Tsuge<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, <sup>2</sup>BMEP, RIKEN)

**Key words** polyhydroxyalkanoate, Molecular weight, chaperonin, PHA synthase

### 3P-1p028 *Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの遺伝子クローニングと大量発現

○鳥居 誉<sup>1</sup>, 奥野 圭祐<sup>2</sup>, 朝倉 紗也菜<sup>1</sup>, 大浦 麻里<sup>2</sup>, 阿野 貴司<sup>1,2</sup>, 岡南 政宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大・生物理工, <sup>2</sup>近畿大院・生物理工)  
okanami@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】生分解性プラスチック製農薬の効率的分解は、農業の環境負荷および従事者負担を軽減するための重要な課題の一つになっている。細菌が産生するエステラーゼは、一般的に動植物が産生する酵素より安定性が高く、生分解性プラスチックの分解への利用が期待できる。これまでに高いエステラーゼ活性を示す *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株を環境中より単離している。そこで本研究では、4A 株が産生するエステラーゼの特性解析や、4A 株のエステラーゼ遺伝子の単離およびエステラーゼの大量発現を試みた。

【方法と結果】4A 株が産生するエステラーゼについて、様々な誘導条件および様々な反応条件での活性を測定した。その結果、熱安定性が高く、至適 pH が中性付近であり、至適反応温度が中温付近であることが分かった。また、生分解性プラスチックを 4A 株によって分解した後の溶液の植物の生長に対する影響を調べた。PBS 系生分解性プラスチックを分解した 4A 株の培養液をキュウリの苗に与えたところ、キュウリの生長は全く阻害されなかった。以上の結果は、4A 株が産生するエステラーゼが農業での利用に適していることを示唆した。そこで、エステラーゼを大量発現させるために、エステラーゼ遺伝子の単離を試みた。4A 株のゲノム DNA ライブラリーを構築し、大腸菌にライブラリーを導入した結果、エステラーゼ活性を有する形質転換体が得られた。その形質転換体が保持するプラスミドには、エステラーゼ産生遺伝子を含む約 5kbp の DNA 断片が挿入されていた。本大会では、エステラーゼの推定されるアミノ酸配列や大量発現、発現調節機構について報告する予定である。

### Molecular cloning and overexpression of a *Stenotrophomonas maltophilia* esterase

○Takashi Torii<sup>1</sup>, Keisuke Okuno<sup>2</sup>, Sayaka Asakura<sup>1</sup>, Mari Ooura<sup>2</sup>, Takashi Ano<sup>1,2</sup>, Masahiro Okanami<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Biol. Ord. Sci. Technol., Kindai Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Ord. Sci. Technol., Kindai Univ.)

**Key words** biodegradable plastic, esterase, *Stenotrophomonas maltophilia*

**3P-1p029 蛍光タンパク質を利用した白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の交配技術開発**

○近藤 旺次郎<sup>1</sup>, 隅谷 友紀<sup>1</sup>, 森 智夫<sup>1</sup>, 河岸 洋和<sup>1,2,3</sup>, 平井 浩文<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>静大・農,<sup>2</sup>静大グリーン研,<sup>3</sup>静大・創科技院)  
 hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

**【背景と目的】** 高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株への遺伝子導入法はすでに確立されており、遺伝子高発現株の取得が可能であるが、導入し高発現する遺伝子数には限界がある。一方で、個々の遺伝子を導入した形質転換株を交配させることで、さらに優良な株が獲得可能であると考えられるが、*P. sordida* YK-624 株の交配方法・条件は未だ確立されていない。そこで本研究では、交配により作成される二核菌糸体の有無の判別を容易にするため、2種の蛍光タンパク質 Enhanced Green Fluorescent Protein 遺伝子 (*egfp*) もしくは mCherry 遺伝子導入株をそれぞれ作出し、細胞内での蛍光の状態により交配の成否が判断できる評価系の確立を目指して検討を行った。

**【方法・結果】** *egfp* 発現プラスミド pPact0 *pro-egfp* 及び mCherry 発現プラスミド pPsgpd-mCherry を構築し、*P. sordida* YK-624 株由来のウラシル要求性変異株である UV-64 株に *ura5* マーカープラスミドと構築した上記発現プラスミドを PEG 法により共形質転換を行い、緑色蛍光を発する共形質転換体 *egfp* 発現株及び赤色蛍光を発する共形質転換体 mCherry 発現株をそれぞれ取得した。得られた *egfp* 及び mCherry 発現株を用いて PDA 培地上で対峙培養を行い、境界付近の菌糸を採取し蛍光顕微鏡にて各タンパク質に適した波長で観察し、それぞれの結果の写真を重ね合わせると、緑色蛍光及び赤色蛍光の混在によって黄色になる細胞が得られ、簡便に交配の成否を判別可能な評価法の確立に成功したと結論づけた。また、対峙培養株から単離した胞子から *egfp* 及び mCherry 双方の蛍光を示す株が得られ、交配により双方の特性を獲得した株の単離が可能であった。

**Development of crossbreeding method in white-rot fungus using fluorescent proteins.**

○Ojiri Kondo<sup>1</sup>, Tomoki Sumiya<sup>1</sup>, Toshio Mori<sup>1</sup>, Hirokazu Kawagishi<sup>1,2,3</sup>, Hirofumi Hirai<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** *Phanerochaete sordida* YK-624, fluorescent proteins, crossbreeding

**3P-1p030 Identification of beta-amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis***

○Keita Tamura<sup>1</sup>, Hikaru Seki<sup>1</sup>, Hideyuki Suzuki<sup>2</sup>, Mareshige Kojoma<sup>3</sup>, Toshiya Muranaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Kazusa DNA Res. Inst., <sup>3</sup>Fac. Pharm. Sci., Health Sci. Univ. Hokkaido)  
 muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

*Glycyrrhiza uralensis* (licorice) is one of the important medicinal plants belonging to the Fabaceae. An oleanane-type triterpenoid saponin produced by licorice plants, glycyrrhizin, is widely used as medicine and natural sweetener. Although glycyrrhizin is the most prominent triterpenoid in licorice plants, they also produce other types of triterpenoids such as oleanolic acid, betulinic acid, and soyasaponins. Several cytochrome P450 monooxygenases (P450s) regarding to the biosynthesis of glycyrrhizin and soyasaponins have been reported from licorice, however, P450s for the biosynthesis of oleanolic acid and betulinic acid are unknown. Here, we performed RNA-seq of tissue cultured stolons of licorice and identified a novel P450, GuCYP716A, that could not be identified in our previous transcriptome data obtained from intact roots, stolons, or leaves. Enzymatic activities of GuCYP716A towards three triterpene skeletons, beta-amyrin, alpha-amyrin, and lupeol were analyzed in engineered yeast, and the production of oleanolic acid, ursolic acid, and betulinic acid was confirmed respectively. Comparative analysis of intact roots and tissue cultured stolons has revealed that gene transcript level of GuCYP716A in tissue cultured stolons was more than 100 times higher than that in intact roots. Furthermore, oleanolic acid and betulinic acid were detected only in tissue cultured stolons. These results provide a better understanding of the molecular mechanisms of tissue-type specific biosynthesis of triterpenoids in licorice.

**Identification of beta-amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis***

○Keita Tamura<sup>1</sup>, Hikaru Seki<sup>1</sup>, Hideyuki Suzuki<sup>2</sup>, Mareshige Kojoma<sup>3</sup>, Toshiya Muranaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Kazusa DNA Res. Inst., <sup>3</sup>Fac. Pharm. Sci., Health Sci. Univ. Hokkaido)

**Key words** *Glycyrrhiza uralensis*, terpenoid, P450, transcriptome

**3P-1p031 キク科 *Flaveria* 属形質転換系と遺伝子発現誘導系の確立**

○岡 美慧, 谷口 幸美, 宗景 ゆり  
 (関西学院大院・理工)  
 munekage@kwansai.ac.jp

トウモロコシやサトウキビ等の C<sub>4</sub> 型作物は、葉内に CO<sub>2</sub> を濃縮する機構を持つため、乾燥高温条件下での生育に有利である。一方、イネや小麦といった作物はこのような濃縮機構を持たない C<sub>3</sub> 型作物であるため、乾燥高温条件下での生育が厳しい。C<sub>4</sub> 型植物は C<sub>3</sub> 型植物から進化し発生しており、この進化の過程から C<sub>4</sub> 化に必須の因子が解明できれば、作物の C<sub>4</sub> 化分子育種技術へ応用できると考えている。当研究室では研究材料として同属内に C<sub>3</sub> 種および C<sub>4</sub> 種が複数存在し、進化過程の解析が容易であるキク科 *Flaveria* 属を用いている。C<sub>4</sub> 種における形質転換体作出技術は数種に限定されており、形質転換効率は低い。本研究では C<sub>4</sub> 型 *Flaveria bidentis* の形質転換において、アグロバクテリウム培養液条件やカルス化誘導時の光条件などを改良した、効率的な形質転換方法について報告する。また C<sub>3</sub> 型 *Flaveria* の形質転換系の立ち上げについても着手している。この系の確立ができれば、C<sub>3</sub> 型植物を C<sub>4</sub> 化もしくは C<sub>4</sub> 型植物を C<sub>3</sub> 化するという双方向の解析が可能になると考える。カルスやシュート誘導時の培地中ホルモン濃度を調節し、最適濃度を調べた結果についても報告する。さらに *Flaveria bidentis* における GVG 転写誘導系を導入した誘導型遺伝子発現制御系についても報告する。GVG 転写誘導系には、酵母の転写因子 *GAL4* の DNA 結合ドメイン、ヘルペスウイルス由来の転写活性化ドメイン *VP16*、グルココルチコイドホルモン結合ドメインを用いている。この系は遺伝子発現制御が随意に可能であることから、遺伝子の一過的な応答について解析ができると考える。

**Establishment of transformation system and inducible gene expression system in genus *Flaveria***

○Misato Oka, Yukimi Taniguchi, Yuri Munekage  
 (Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansai Gakuin Univ.)

**Key words** transformation, gene expression

**3P-1p032 (講演中止)**

**3P-1p033 シロイヌナズナのディフェンシンに関する組換えタンパク質の調製と解析**

○角谷 茜, 柳川 大樹, 今井 博之  
(甲南大院・自然科学・生物)  
imai@konan-u.ac.jp

植物の身の周りには微生物や昆虫が棲みついているが、植物は動物のように移動が出来ず免疫細胞のような特殊な細胞を持っていない。そのため、植物は自身を守る特殊な構造や成分を持ち、感染細胞が全身へ危険信号を送り未感染組織も抵抗性を獲得できるという機構を持っている。このような植物の防御応答はだまかに2つに分けられる。1つが静的抵抗性と呼ばれ、植物が元々持つ構造(表皮やクチクラ層)や化学物質(カテキンやタンニン酸)による抵抗性である。もう1つは動的抵抗性と呼ばれ、病原菌が植物体にアタックして初めて動き始める。動的抵抗性には、過敏反応や感染特異的タンパク質(PRタンパク質)の産生、ファイトアレキシン(抗菌性物質)の産生などが挙げられる。そして前述したように、感染細胞が未感染組織に危険信号を送るシグナル伝達経路が知られている。このシグナル伝達経路は、伝達物質としてサリチル酸、エチレン、ジャスモン酸などがある。このエチレンとジャスモン酸が関わる経路で、PRタンパクの一種である抗菌性の植物ディフェンシンが産生され、病原菌をアタックするということが分かっている。しかし、この機構は詳しく解明されていない。そこで本研究では、シロイヌナズナを用いて植物ディフェンシンと病原菌との関係性を調べることにした。

まず、シロイヌナズナの植物ディフェンシン遺伝子(*AtPDF1.1*)を、上流にGSTタグがくるようpDEST15発現ベクターを設計し、大腸菌BL21AIに形質転換した。その後組換えタンパク質精製を試みたところ、大腸菌に対して精製されたディフェンシンタンパクが毒性を持つことが確認された。そのため、温度や大腸菌の濃度を変更し条件検討を行った。結果、低温でのタンパク質誘導を行うことで安定して組換えタンパク質を精製でき、GST抗体を用いたイムノブロットでバンドを確認することができた。

**Expression of an *Arabidopsis* recombinant defensin in *E. coli***

○Akane Kakutani, Daiki Yanagawa, Hiroyuki Imai  
(Dept. Biology, Grad. Sch. Sci., Konan Univ.)

**Key words** *Arabidopsis thaliana*, defensin

**3P-1p034 土壌肥沃度指標に基づく薬用植物の有機栽培**

○山崎 透<sup>1</sup>, 荒木 希和子<sup>1</sup>, 上野 省一<sup>2</sup>, 久保 幹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学,<sup>2</sup>ノエビア・研究開発部)  
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】 薬用植物は二次代謝産物などとして生産される含有成分に薬効がある植物の総称である。薬用に利用するには特に安全性が重要であり、化学肥料や農薬を用いない有機栽培による薬用植物の収量・品質の向上が求められている。しかし、有機栽培は経験に基づく手法が多く、正しい施肥量の判断が難しいという課題がある。したがって、土壌環境を正確に把握し、適切な施肥を行うことが重要である。土壌肥沃度指標(SOFIX)は微生物の数や活性に着目した土壌分析の指標であり、指標に基づき土壌成分を調整すると、土壌の微生物活性が上がり、物質循環が高まることが確認されている。また、この物質循環を基盤とした有機栽培が作物の生育にも効果的であることが示唆されている。本研究では薬用植物の有機栽培法の確立を目的とし、SOFIXに基づいて土壌環境と薬用植物の収量、品質の関係を解析した。

【方法】 実験に使用する土壌のSOFIX分析を行ったところ、微生物活性が低かった。そこで、炭素源および窒素源を適切に供給するように土壌改良を行った。最適条件の検討のため、窒素源については、A:高、B:中、C:低の3条件を設定した。その後、4ヶ月の栽培後に収穫を行い、土壌分析、作物の収量測定と含有成分量の定量を行った。

【結果と考察】 施肥後、土壌のバイオマスが増加し、それに伴って微生物活性は向上した。栽培後、収量、含有成分共に条件Aが最も高かった。このことから、SOFIXに基づいた土壌調整で、薬用植物の収量と品質が向上することが示唆された。しかし、栽培後、土壌の総細菌数、物質循環活性は全ての条件で減少した。その原因として、根酸が細菌に作用し、菌数と土壌微生物の多様性が変化することが推測された。したがって、薬用植物を継続的に適切な土壌環境で栽培するためには、施肥の量とタイミングが重要であると考えられた。

**Organic cultivation of medical plants based on Soil Fertile Index**

○Toru Yamasaki<sup>1</sup>, Kiwako S. Araki<sup>1</sup>, Shoichi Ueno<sup>2</sup>, Motor Kubo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>R&D Dept., NOEVIR Co., Ltd.)

**Key words** organic cultivation, medical plant, soil condition, soil bacteria

**3P-1p035 *Aspergillus oryzae* RIB40 由来ギ酸オキシダーゼにおける Tyr99, Phe405 の役割**

○田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之  
(福井大院・工)  
uchida@u-fukui.ac.jp

【目的】 ギ酸オキシダーゼ(FOD)は、ギ酸を二酸化炭素に酸化し、酸素を電子受容体として過酸化水素を産生する酵素で、*Aspergillus sp.*や*Debaryomyces sp.*で確認されている。FODはGMCオキシドレクターゼファミリーに属するが、他の酵素と違い、8-formylFADをコファクターとし、セミキノン体で高い安定性を示すといった特徴がある。X線結晶解析で構築した*Aspergillus oryzae* RIB40由来ギ酸オキシダーゼの活性部位には3つの芳香族残基(Tyr99, Phe405, Phe510)がコファクターのフラビン環を挟んで存在しており、Tyr99とPhe405はギ酸と酸素が活性部位に侵入する位置に存在する。本研究では、Tyr99とPhe405をそれぞれAla又はTrpに置換し、これらの変異体酵素の性質の検討を行った。

【方法と結果】 大腸菌で生産した*Aspergillus oryzae* RIB40由来FODを用い、変異導入はinverse PCR法で行った。酵素は、Ni-SepharoseTMとHi-Trap Qカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製後のY99AとY99Wではコファクターとして8-formylFADを持ち、そのセミキノン体特有のスペクトルを示した。Y99AとY99Wの見かけのVmaxは、ワイルドタイプ(WT)に比べて、それぞれ2桁と1桁小さく、Y99Wのギ酸に対する見かけのKmは、WTに比べて、4倍大きかった。F405AはコファクターとしてFADを持ち、活性を示さなかった。F405Wには8-formylFADが存在し、見かけのギ酸に対するKmとVmaxは、WTに比べて、それぞれ約10分の1と約3分の1であった。これらの結果は、Tyr99とPhe405は酵素活性発現に重要な役割を果たしていること、またPhe405はFADの修飾に関与していることを示している。

**Roles of Tyr99 and Phe405 in formate oxidase of *Aspergillus oryzae* RIB40**

○Naoto Tanabe, Daijyu Doubayashi, Masaya Oki, Hiroyuki Uchida  
(Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** formate oxidase, 8-formylFAD, catalysis, aromatic amino acid

**3P-1p036 ラン藻 *Synechocystis* の乳酸脱水素酵素の生化学解析**

○伊東 昇紀, 竹屋 壮浩, 小山内 崇  
(明治大・農)  
tosanai@meiji.ac.jp

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、酸素発生型の光合成を行う淡水性の単細胞性球菌で乳酸脱水素酵素(Ddh)を持つ。最近の研究により、*Synechocystis* は、乳酸を始めとする有機酸を細胞外に放出する能力を有することが明らかになった。

大腸菌コンピテントセル[BL21 (DE3), Takara Bio]に *Synechocystis* の Ddh の GST 融合組換えタンパク質の発現ベクターを導入した。形質転換後にアンピシリン入りの LB 寒天培地でコロニーを選別した。

2 L の大量培養時に 2 μM の IPTG で ddh 遺伝子の転写を 20 時間誘導した。集菌後、VC-750 (Sonic & Materials, Inc.) で超音波破砕(Intensity 20%, 20 秒間)を 10 回行い、遠心分離(4℃, 8000 rpm, 2 分間)した。可溶性タンパク質を含む上清にグルタチオンセファロースビーズ (GE ヘルスクア) を加え、30 分間振盪して GST 融合タンパク質をビーズに結合させた。その後、再び遠心分離(4℃, 8000 rpm, 2 分間)し、GST 融合 Ddh タンパク質を含む画分を得た。その画分に PBS-T を加え、よく攪拌後、遠心分離(4℃, 5000 rpm, 1 分間)し、上清を捨てる作業を 3 回行った。最後に 10 mM 還元グルタチオンを含む GST-Elution Buffer を用いて、GST 融合 Ddh タンパク質を溶出した。

精製したタンパク質を、スピニカラム VIVASPIN 500 【分画分子量: 50000】(Sartorius) を用いて遠心分離(4℃, 15000 rpm, 2 分間)を繰り返し、濃縮した。電気泳動の結果、63~64 kD 付近に最も濃いバンドが検出された。これは予想される GST 融合 Ddh タンパク質の分子量に一致する。精製した GST 融合 Ddh タンパク質に対して生化学解析を行った。

**Biochemical analysis of lactate dehydrogenase from *Synechocystis***

○Shoki Ito, Masahiro Takeya, Takashi Osanai  
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

**Key words** lactate dehydrogenase, cyanobacteria

### 3P-1p037 海洋細菌由来マルチ銅オキシダーゼを用いた塩基性色素の脱色

○海老原 京太<sup>1</sup>, 吉川 潤<sup>2</sup>, 堀口 博文<sup>2</sup>, 天知 誠吾<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>千葉大院・園芸, <sup>2</sup>合同酒精(株))  
 amachi@faculty.chiba-u.jp

#### 【背景と目的】

染色工場等から排出される人工色素を含んだ排水による環境汚染が問題となっている。特に crystal violet をはじめとする塩基性色素には発癌性が報告されている。その対策として物理化学的処理が行われているが、高コストと毒性を有する副産物の生成という課題がある。そこで現在、マルチ銅オキシダーゼ(MCO)を用いた生物的処理が注目されている。当研究室では、天然ガスかん水水中からヨウ素酸化能を有する MCO を生産する細菌 Q-1 株を単離し、その構造遺伝子の特定に成功している。また、本 MCO を用いた酸性色素の脱色にも成功している。そこで本研究では、Q-1 株由来 MCO を用いた塩基性色素の脱色を検討した。さらに染色工場の実排水の脱色も試みた。

#### 【方法】

Q-1 株を Marine broth 2216 で 2 日間振盪培養し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液と 0.3 mM 塩基性色素 (methylene blue, malachite green, crystal violet) または工場排水を、ヨウ化カリウム (KI) と共に 30°C で反応させ吸光度の減少から脱色率を評価した。

#### 【結果及び考察】

塩基性色素及び工場排水に対し KI 無添加で MCO と反応させた場合、脱色率は見られなかった。しかしながら、KI 添加により脱色が進行し、塩基性色素に関しては沈殿物の生成も認められた。また KI 濃度依存的に脱色率は上昇し、methylene blue 及び crystal violet は 1 mM、malachite green は 2 mM で 98% 以上の脱色率を示した。さらに至適 pH は中性付近に存在していた。一方、工場排水においても KI 濃度依存的に脱色率の向上が見られ、1 時間の反応で 0.5 mM KI では 47.4%、1 mM KI では 59.5% の脱色が確認された。工場排水の pH は 8.2 と高かったため、本 MCO は塩基性条件で活性を持たない糸状菌由来 MCO と差別化できると共に、適切な pH 制御により、さらに効率的な脱色に繋がる可能性が示唆された。

#### Decolorization of basic dyes by multicopper oxidase produced by a marine bacterium strain Q-1

○Kyota Ebihara<sup>1</sup>, Jun Yoshikawa<sup>2</sup>, Hirohumi Horiguchi<sup>2</sup>, Seigo Amachi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Horticult., Chiba Univ., <sup>2</sup>GODO SHUSEI Co., Ltd.)

**Key words** multicopper oxidase, iodine, decolorisation, marine bacterium

### 3P-1p038 サルコシンオキシダーゼの L-チオプロリンに対する反応性評価

○岡島 奨, 吉田 知左, 西矢 芳昭  
 (棋南大・生命科学)  
 nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景および目的】 クレアチニンは、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼ (Sox) によりクレアチニンを過酸化水素に導き、発色定量する。診断の有効性をより高めるため、クレアチニン測定酵素法のさらなる精度向上が期待されている。

Sox (EC1.5.3.1) はサルコシンの酸化的脱メチル化を触媒する。Sox は反応性に優れた酵素だが、基質であるサルコシンと構造的に類似性のある L-プロリンに対し、非常に微弱な反応性を有する。

今回は L-プロリン類似物質である L-チオプロリンを取り上げ、Sox の反応にどのような影響を与えるかの評価を行ったので報告したい。

【実験方法および結果】 まず、Sox の構造モデルを基に、基質のドッキングシミュレーションを実施した。その結果、酵素との親和性は L-プロリンよりも L-チオプロリンの方がずっと高いと推測された。

活性測定により、Sox が L-チオプロリンに反応することを確認できたため、反応速度定数を求めた。結果として、Sox は L-チオプロリンに対して L-プロリンよりも低い  $K_m$  値を示し、 $K_m$  値に関してドッキングシミュレーションでの推測が証明された。

次に、各種基質の有酸素条件での酵素反応と無酸素条件での酵素反応の吸収スペクトル解析を行った結果、各基質の反応速度に対応する吸収スペクトルの変化が認められた。

現在、Sox の変異体を作成し各基質と反応させ、変異体の特性を評価しており、報告したい。

【結論】 ドッキングシミュレーションより、L-チオプロリンが Sox と反応すると予測し、そのことを実験的に確認した。L-チオプロリンに対する反応は、従来の基質とはかなり異なる特徴を示した。

#### Reactivity evaluation of sarcosine oxidase for L-Thioproline

○Tasuku Okajima, Tisa Yoshida, Yoshiaki Nishiya  
 (Life Sci., Setsunan Univ.)

**Key words** Sarcosine oxidase, Mutagenesis, L- Thioproline, Kinetic paramater

### 3P-1p039 超好熱古細菌由来 glycerol 代謝酵素の酵素活性調整の分子機構

○古賀 雄一, 高野 築, 小西 佳菜子, 小林 淳, 大政 健史  
 (阪大院・工)  
 kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

Glycerol はリン脂質の炭素骨格となる Glycerol 3-phosphate や、解糖系の代謝中間代謝物 Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) に代謝される重要な化合物である。大腸菌等でよく研究されており、Glycerol から DHAP までの二通りの代謝経路や Glycerol 代謝のキーステップであるリン酸化反応が、Glucose 関連タンパク質 (Protein I1glc) や解糖系中間代謝物 (fructose 1,6-bisphosphate) によって、アロステリック制御されていることがわかっている。

本研究では超好熱性古細菌 (始原菌) *Thermococcus kodakarensis* KOD1 の glycerol kinase (Tk-GK) と glycerol 3-phosphate dehydrogenase (Tk-G3PDH) の構造と機能の特性を解析し、古細菌 (始原菌) における glycerol 代謝酵素の調整メカニズムについて考察する。

Glycerol kinase は分子量約 55kDa のタンパク質で一般的に 4 量体を形成しているのに対し、Tk-GK は特異な 6 量体構造と 2 量体構造の平衡状態をとっていた。この平衡は glycerol の結合によって 6 量体側にシフトすること、その際に ATP の親和性が 10 倍良くなることから、酵素機能の調整に関連することが示唆された。Tk-GK と基質の複合体の X 線結晶構造解析の結果、本酵素は基質結合にともなって 6 量体を形成し、ATP 結合に有利なコンフォメーションを安定化していることが考えられた。

一方、Tk-G3PDH は、NADH oxydase、molybdopterin oxidoreductase と遺伝子レベルでオペロンを形成しており、タンパク質としては特異な複合体を形成することが分かった。Tk-G3PDH においても単量体と複合体の形成時で Glycerol 3-phosphate を酸化した際に生じる電子の受容体が変わるなど機能が変化することが示唆された。

両酵素は遺伝子レベルでの発現調整や、解糖系からのフィードバック制御は受けていないが、酵素分子レベルでの単純な調整機能があることが明らかとなった。

#### Molecular mechanism of regulation of glycerol metabolism enzymes from a hyper-thermophilic archaeon

○Yuichi Koga, Takano Kizuku, Kanako Konishi, Atsushi Kobayashi, Takeshi Omasa  
 (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** archaea, glycerol, enzyme, regulation

### 3P-1p040 D-サイクロセリン生合成に関わる新規ヘムタンパク質 DcsA の構造と性質

○的場 康幸<sup>1</sup>, 古川 裕貴<sup>1</sup>, 柳澤 幸子<sup>2</sup>, 宇田 成利<sup>1</sup>, 熊谷 孝則<sup>1</sup>, 小倉 尚志<sup>2</sup>, 杉山 政則<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>広島大院・医歯薬保健, <sup>2</sup>兵庫県大院・生命理)  
 ymatoba@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 当研究グループでは、これまでに、抗結核薬 D-サイクロセリンの生合成機構の解明に取り組んできた。その成果のひとつとして、DcsA と名付けた酵素は新規性の高いヘムタンパク質であり、L-アルギニン水酸化酵素として働くことを明らかにした。ちなみに、DcsA の反応産物である  $N^{\alpha}$ -ヒドロキシ-L-アルギニンは、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の酵素反応における中間体である。また、一段階目で窒素原子を水酸化する NOS は、様々な基質の炭素原子を水酸化する P450 と同じく、システイン残基のチオール基を近位配位子とするヘムタンパク質であることが知られている。本研究では、DcsA の触媒機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析とラマンスペクトル解析を行った。

【結果】 X 線結晶構造解析の結果、DcsA は NOS や P450 と同じくチオール基を近位配位子とするヘムタンパク質であるが、新規の構造をもつことが明らかとなった。特に、DcsA の基質結合ポケットは、NOS のものに比べて明らかに小さかった。一方、共鳴ラマンスペクトル解析からは、Fe(III)型 DcsA は高スピン状態であるものの、L-アルギニンや  $N^{\alpha}$ -ヒドロキシ-L-アルギニンを添加することにより低スピン状態に変化する事が明らかになった。また、CO と結合した Fe(II) 型 DcsA のラマンスペクトル解析から、DcsA は単一のコンフォメーションをとること、および、チオール基から鉄への電子供与性が弱いことが示唆された。これらの情報をもとに、DcsA の反応機構を予測した。

#### Structure and property of a novel heme protein DcsA

○Yasuyuki Matoba<sup>1</sup>, Yuki Furukawa<sup>1</sup>, Sachiko Yanagisawa<sup>2</sup>, Narutoshi Uda<sup>1</sup>, Takanori Kumagai<sup>1</sup>, Takashi Ogura<sup>2</sup>, Masanori Sugiyama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Sci., Univ. Hyogo.)

**Key words** crystallographic study, hydroxylase, heme protein, biosynthesis

### 3P-1p041 イオン液体による酵素の耐熱化：安定化剤、反応溶媒への展開

○金子 恒太郎, 河合 功治  
(ミヨシ油脂)  
kanekok@so.miyoshi-yushi.co.jp

#### 【背景と目的】

常温で液体のイオン液体は、揮発性、高極性、低融点等の特異的な物性を有し、材料からバイオまで幅広い分野での応用が期待される中、タンパク質保存液への応用が検討されている。我々は、特定官能基を導入した4級アンモニウム型イオン液体が、化学構造に依存してタンパク質、酵素等の生体高分子を高濃度で溶解し、長期にそれらの活性を保持することを見出した。今回、本イオン液体の酵素安定化剤及び酵素反応溶媒への展開を指向し、イオン液体水溶液における酵素の保存温度ならびに反応温度への影響について実験を行い、イオン液体による酵素の耐熱化について評価した。

#### 【結果と考察】

特定官能基を導入した4級アンモニウム塩型イオン液体の10~70%水溶液に酵素を溶解し、25、40℃で一定期間保存した後、酵素の活性(イオン液体による酵素の安定化効果)を測定した。いずれの温度においても、イオン液体の系は、バッファー及び各種安定化剤の水溶液等のリファレンスより酵素の活性が高く、イオン液体が酵素の安定化効果に優れることを示した。次に、イオン液体水溶液を反応場として、30、40、50℃の反応温度で酵素反応を試みた。上記と同様に、イオン液体の系は、各温度において、バッファー、安定化剤水溶液より反応率は良好で、優れた結果が得られた。特に、反応温度を30℃から40及び50℃へ上げた際、リファレンスの系は反応率の低下が認められたのに対して、イオン液体の系は反応率が上昇する傾向を示し、イオン液体による酵素の耐熱性向上の効果を確認した。つまり、本イオン液体は、化学構造の調整により酵素の活性保持効果、さらには耐熱性を高めることを可能とし、酵素をはじめとする生体高分子の安定化剤、酵素反応溶媒への応用が期待される。

#### Thermostabilization of enzyme by ionic liquids : Development to stabilizers and reaction solvents

○Kotaro Kaneko, Koji Kawai  
(Miyoshi Oil & Fat Co.,Ltd.)

**Key words** ionic liquid, thermostability, enzyme stabilizing agent, enzyme reaction solvent

### 3P-1p042 クマモリシンのカルシウムイオン結合部位特異的変異体の作製と熱安定性の解析

○洲鎌 勇太<sup>1</sup>, 尾山 廣<sup>2</sup>, 伊東 昌章<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>沖縄高専, <sup>2</sup>摂南大・理工)  
ma-itou@okinawa-ct.ac.jp

【背景と目的】クマモリシンは、好熱菌 *Bacillus novosp.* MN-32 株が産生するプロテアーゼ(反応最適条件:pH3.0,70℃)であり、セリンプロテアーゼのセリン-カルボキシプロテアーゼ群に分類される。本研究では、触媒活性や安定性に寄与すると考えられるカルシウムイオンの機能を明らかにすることを目的とし、カルシウム結合部位の Asp を Ala あるいは Asn に置換した部位特異的変異体を無細胞タンパク質合成系にて調製し、それらの熱安定性を調べた。

【方法】無細胞タンパク質合成には昆虫培養細胞由来の系を用いた。その発現ベクター pTD1 にプロクマモリシン遺伝子を挿入した野生型プロクマモリシン発現プラスミドをもとに、変異型プロクマモリシン発現プラスミド4種(D316A,D316N,D338A,D338N)を構築した。常法にて無細胞合成を行い、合成反応液に、5倍量の1mM CaCl<sub>2</sub>を含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)を加え、4℃、1時間インキュベートした(活性化処理液)。活性は、2μM基質(Nma-Lys-Pro-Ile-Pro-Arg-Phe-Arg-Leu-Lys(Dnp)-NH<sub>2</sub>)を含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)に活性化処理液を添加し、25℃で反応を行い、Arg-Phe間の加水分解により生じる蛍光強度の増加より算出した。熱安定性は、各活性化処理液を50℃から90℃まで5℃ごとにそれぞれ10分間熱処理した後の残存活性より評価した。

【結果と考察】ウェスタンブロット解析から、活性化処理により野生型、変異型クマモリシンが成熟型へと移行したことで、活性測定より成熟型クマモリシンが活性を有することを確認した。熱安定性の評価より、野生型は80℃まで活性の低下が認められなかった。一方、D316A,D316N,D338Nは75℃、D338Aは70℃まで安定であり、熱安定性の低下が見られた。これらのことから、カルシウム結合部位における Asp がクマモリシンの熱安定性に寄与していることが分かった。

#### Mutational analysis of the calcium ion binding site of kumamolisin

○Yuuta Sugama<sup>1</sup>, Hiroshi Oyama<sup>2</sup>, Masaaki Ito<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Nati.Inst.Technol.,Okinawa.Coll., <sup>2</sup>Sch.Sci.Technol.,Setunan Univ.)

**Key words** Kumamolisin, Calcium binding site, Aspartic acid, Cell-free protein synthesis system

### 3P-1p043 Toxin-antitoxin 分子認識機構：病原菌由来 RNA インターフェレンスの特異的認識配列の同定

横田 亜紀子<sup>1</sup>, 宮本 龍樹<sup>1,2</sup>, 大田 悠里<sup>1,2</sup>, 常田 聡<sup>2</sup>, 野田 尚宏<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・バイオメディカル, <sup>2</sup>早大・先進理工)  
akiko-yokota@aist.go.jp

【背景と目的】原核生物においては、トキシン-アンチトキシン (TA; toxin-antitoxin) というプログラム細胞死に関与するシステムが存在する。平常時には antitoxin が toxin に結合して、その毒性を無毒化しているが、飢餓等のストレス条件下では、その結合様式が崩壊する。そして、フリーとなった toxin が細胞内の標的分子を攻撃し、結果的に細胞の成長阻害・致死を誘導する、という作用機序である。この TA システムを上手く利用し、病原菌自身の持つ toxin の活性を何らかの方法で促進することで細胞死を誘導できれば、多剤耐性菌等に対して有効な次世代抗生物質の創製に繋がる可能性がある。そこで、本研究においては、病原菌由来の TA システムに焦点を当て、RNA を標的として配列特異的に認識・切断する toxin である MazF (RNA interferase) と、その標的 RNA ならびに antitoxin (MazE) との分子認識機構について考察し、細胞応答制御に応用することを目的とした。

【方法と結果】病原菌由来 TA システムの中で、腹痛や下痢などを引き起こすウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の toxin である MazF-CPE に着目し、その発現ベクターを構築した。大腸菌 BL21(DE3)を用いて培養と発現誘導を行い、回収した菌体の超音波破砕液の上清をアフィニティクロマトグラフィーで精製し、高純度 MazF-CPE の調製に成功した。取得した MazF-CPE を基質 RNA と反応させ、当研究グループで開発した手法により、次世代シーケンサーで切断部位を解析し、MazF-CPE の認識 RNA 配列を同定した。さらに、蛍光消光アッセイにより配列特異的な RNA 切断活性を確認し、同定した認識配列に対する特異性が高いことを明らかにした。今後は、MazF-CPE と標的 RNA、そして antitoxin MazE-CPE との相互作用について解析を進め、細胞増殖抑制因子(細胞外致死因子)の探索を目指す予定である。

#### Identification of specific RNA sequences cleaved by a MazF from a pathogenic organism

Akiko Yokota<sup>1</sup>, Tatsuki Miyamoto<sup>1,2</sup>, Yuri Ota<sup>1,2</sup>, Satoshi Tsuneda<sup>2</sup>,  
○Naohiro Noda<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., AIST, <sup>2</sup>Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** Toxin-antitoxin system, RNA interferases, Massively Parallel Sequencing, Molecular recognition

### 3P-1p044 合成生物学的手法により構築したシアノバクテリアによる CO<sub>2</sub> からバイオエチレンへの変換効率に関する研究

○神藤 定生<sup>1</sup>, 林 業依<sup>2</sup>, 細田 晃文<sup>2</sup>, 田村 廣人<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>名城大・理工, <sup>2</sup>名城大・農)  
sjindou@meijo-u.ac.jp

#### 【目的】

脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来の1-アミノシクロロパン-I-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)およびACC酸化酵素(ACO)を複合体化させ、Ethyleneome とし、これをシアノバクテリアへ導入した結果、本細菌はバイオエチレンを生産する能力を3.4 ml/ml/O.D.<sub>730</sub>/h の効率で生産した。さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、①基質 S-アデノシルメチオニン(SAM)供給量を増やすため、SAM 合成酵素(SAMS)を、②メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため、MTA スクレーオスターゼ(MTAN)を、それぞれ Ethyleneome へ導入したので、その成果を報告する。

#### 【方法および結果】

① *Arabidopsis thaliana* 由来 cDNA クローンから MTAN 遺伝子を、*Clostridium josui* ゲノム DNA から Cel8A 由来ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット AtMTAN-Cjdoc を構築した。② *Streptomyces avermitilis* ゲノム DNA から SAMS 遺伝子を、*Clostridium thermocellum* ゲノム DNA から CipA 由来タイプ II ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット SaSAMS-CtdocII を構築した。③ ①、②で得たキメラサブユニットを保持する2種のキメラ骨格タンパク質、Cip3C および Cip4、をそれぞれ構築した。①~③で構成される Ethyleneome による、シアノバクテリアのバイオエチレン生産効率、およびこれら組換え体の CO<sub>2</sub> 固定化能をガスクロマトグラフィーで定量したので、その詳細を報告する。

#### Improved enzyme complex expression for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○Sadanari Jindou<sup>1</sup>, Mai Hayashi<sup>2</sup>, Akifumi Hosoda<sup>2</sup>, Hiroto Tamura<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Sci. Technol., Meijo Univ., <sup>2</sup>Fac. Agric., Meijo Univ.)

**Key words** ethylene, cellulosome, *Synechococcus*

### 3P-1p045 ジアホラーゼ内包硫化カドミウムナノ粒子の作製と水系/非水系における特性評価

○安田 信幸, 油井 信弘, 阿部 克也  
(工学院大・先進工・生化)  
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】生体分子とナノ材料をハイブリットすると単体とは異なるユニークな特性を示す。近年、このようなナノバイオテクノロジーが環境や医療分野、新規触媒等に応用されている。これらは一般的に生体分子をナノ材料表面へ修飾する方法を用いる。一方、ナノ材料に酵素を内包した場合、従来とは異なる特性を示す可能性がある。本報告では逆ミセル法によりジアホラーゼ内包硫化カドミウムナノ粒子(DA-CdSNP)の作製を試み、CdSNPに内包された酵素の特性を水系/非水系における触媒活性により評価した結果を述べる。

【方法】常温常圧下で逆ミセル法により DA-CdSNP を作製し、その表面に 2-ジメチルアミノエタノールで正電荷処理を施した(DA-CdSNP-N<sup>+</sup>)。形成した粒子は粉末 X 線回折(XRD)を用いて解析した。DA-CdSNP-N<sup>+</sup>の触媒活性は NADH あるいは BNAH の光酸化反応により評価した。反応系は 25℃に制御し、リン酸緩衝液中で光照射サイクル(Dark/Light)において反応液を経時的に回収し、NADH あるいは BNAH の減少を分光学的に測定した。また、DA の酵素阻害剤(Warfarin)を用いることで DA-CdSNP-N<sup>+</sup>の触媒活性を評価した。

【結果と考察】得られた黄色粉末は、XRD パターンより立方晶の CdS からなるナノ粒子であることが分かった。作製した CdSNP-N<sup>+</sup>は水系において NADH の酸化は光依存性を示し、DA を内包した場合に酸化率は約 26%向上した。また DA-CdSNP-N<sup>+</sup>の触媒活性について、熱処理による影響は見られず、DA の阻害剤の添加による低下が見られたことから、CdSNP に内包された DA は構造的に安定であり、活性部位が基質と親和できる位置で存在していることが示唆された。

#### Development of a novel enzyme-CdS nanoparticle hybrid system

○Nobuyuki Yasuda, Nobuhiro Aburahi, Katsuya Abe  
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

**Key words** CdS nanoparticles, enzyme-semiconductor hybrid, photocatalyst, NADH oxidation

### 3P-1p046 D-erythro-3-ヒドロキシアスパラギン酸デヒドラターゼの機能解析および光学分割への応用

○柴野 可菜, 長野 弘幸, 横田 篤, 和田 大  
(北大院・農・微生物生理学)  
wada@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】アスパラギン酸アナログである 3-ヒドロキシアスパラギン酸(HA)は分子内に 2 つの不斉炭素を持ち、4 種の光学異性体 (D-threo-HA, L-threo-HA, D-erythro-HA, L-erythro-HA) が存在する。我々はこれまでに報告しなかった D-erythro-HA を分解する酵素 D-erythro-HA デヒドラターゼ (D-EHA DH) を *Pseudomonas* sp. N99 より発見し、様々な生化学的な解析を行った。しかし類縁酵素との触媒特性の比較が不十分でありこの解明を第一の目的とした。また、神経生理学分野においては長い間 L-threo-HA が注目されていたが、近年 L-erythro-HA が真核生物のセリンラセマーゼを阻害すると判明し、高次脳機能解明のため光学的に純粋な L-erythro-HA が必要とされている。有機合成法による立体選択的合成は困難であるが、本酵素の基質特異性の高さから、酵素的光学分割法を用いればこれが可能になると考えられた。そこで、本酵素を用いて光学活性な HA を調製することを第二の目的とした。

【方法・結果】D-EHA DH をコードする遺伝子を大腸菌において高発現させ、精製タンパク質を調製し触媒特性の比較を行った。その結果、本酵素の主反応は L-threo-HA と D-erythro-HA に対するデヒドラターゼ反応である一方、微弱ながら類縁酵素から予測される L-セリンへのデヒドラターゼ活性も示した。次に精製 D-EHA DH を、DL-threo-HA および DL-erythro-HA に作用させ、D-threo-HA と L-erythro-HA をそれぞれ調製したところ、理論最大収率 50% に対しそれぞれ単離収率 37.4%、35.1% で両異性体を取得した。これら異性体の光学純度は HPLC により、化学純度は <sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR により確認した。この結果、既報<sup>1</sup>と合わせて 4 種類の HA 異性体を酵素的光学分割法により調製することが可能となった。

1) Matsumoto Y. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 99, 7137-7150 (2015).

#### Functional analysis and utilization of D-erythro-3-hydroxyaspartate dehydratase

○Kana Shibano, Hiroyuki Nagano, Atsushi Yokota, Masaru Wada  
(Lab. Microbial Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

**Key words** 3-hydroxyaspartate, enzyme reaction, asymmetric hydrolysis, chiral compound

### 3P-1p047 *Pseudomonas nitroreducens* 由来 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究

○佐野 千晴, 岡住 修平, 今岡 大士, 若山 寿  
(立命館大院・生命科学)  
wakayama@sk.ritsume.ac.jp

【目的】 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、細菌から哺乳類に至る多くの生物が有する酵素であり、 $\gamma$ -グルタミル化合物の  $\gamma$ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドなどの  $\gamma$ -グルタミル基受容体へ転移する反応と、 $\gamma$ -グルタミル化合物の加水分解を触媒する。本研究では、テアニンの合成に優れ、既報の GGT とは異なる特性を示す *Pseudomonas nitroreducens* 由来の GGT (PnGGT) に着目した。この酵素の反応特性に関わるアミノ酸残基を、PnGGT の立体構造に基づき、W385、F417 および W525 と推定した。本研究では、W385、F417 および W525 における変異型酵素を作製し、より詳細な反応特性を解析することを目的とした。

【方法および結果】1 アミノ酸変異型である W385T、F417Y および W525A、2 アミノ酸変異型である W385T&F417Y および F417Y&W525A、そして 3 アミノ酸変異型である W385T&F417Y&W525A を作製後、それぞれ精製を行い酵素の単一化に至った。活性測定の結果、全変異型酵素において野生型酵素と比較すると加水分解活性が減少し、転移活性が増大した。また、酵素活性への金属イオンの影響も野生型酵素と各変異型酵素では異なるものであった。さらに基質の立体選択性を比較したところ、W525A のみ野生型酵素や他の変異型酵素とは異なる性質を示した。基質認識における W525 の役割をより詳細に検討するため、W525A に加えて W525G、W525V を作製し、活性測定や基質特異性の比較を行ったところ、これら 3 種類の変異型酵素は互いに似た性質を示した。現在さらに W525 における変異型酵素を作製し、諸性質の検討を行っている。

#### Structure and characteristic of $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*

○Chiharu Sano, Shuhei Okazumi, Masashi Imaoka, Mamoru Wakayama  
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** gamma-glutamyltranspeptidase, mutants, substrate specificity

### 3P-1p048 *Exiguobacterium acetylicum* 由来ポリ乳酸分解活性を有するプロテアーゼの精製と諸特性解析

○田所 花菜, 杉森 大助  
(福島大院・理工)  
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【背景・目的】ポリ乳酸(PLA)は生分解性プラスチックであるものの、環境中における分解性は決して高いとは言えない。さらに、分別回収やマテリアルリサイクルコストの面でも課題があり、PLA の約 8 割が焼却処分されている現状にある。我々は、常温で PLA 分解活性が極めて高いグラム陽性細菌 *Exiguobacterium acetylicum* Z153-3 株を見出した。そこで本研究では、PLA のバイオリサイクル法の開発を目指し、PLA 分解酵素の精製と諸特性解析を行った。

【方法・結果】Z153-3 株を 28℃、24 h 培養し、遠心分離上清をアセトン粗分画、カラムクロマトグラフィーにより目的酵素を精製した。精製酵素サンプルを用いて至適温度、pH や阻害剤の影響などの諸特性解析を行った。培養上清 920 mL (約 2 U/mg-protein) から比活性約 370 U/mg-protein のプロテアーゼ活性 (基質アゾカゼイン) を有する精製酵素サンプルを得た。SDS-PAGE 分析の結果、本酵素の分子質量は 32 kDa であることがわかった。本酵素は pH 8.2、37℃で最大活性を示した。阻害剤の影響を調べた結果、EDTA、EGTA により失活し、Ca<sup>2+</sup>添加により活性が増強したことから本酵素は Ca<sup>2+</sup>要求性であると考えられる。また、PMSF、TPCK により活性が低下したことから、本酵素はセリンプロテアーゼであると推定した。次世代シーケンサーにより Z153-3 株のドラフトゲノムシーケンスの取得が完了し、現在は遺伝子クローニングを行うため本酵素の N 末端および内部アミノ酸配列解析を進めている。

#### Purification and characterization of PLA-degrading protease from *Exiguobacterium acetylicum*

○Kana Tadokoro, Daisuke Sugimori  
(Grad. Sch. Symbio. Sys. Sci. Tech., Fukushima Univ.)

**Key words** *Exiguobacterium acetylicum*, protease, purification, characterization

### 3P-1p049 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来のホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼの精製と特徴

○竹屋 壮浩, 小山内 崇  
(明治大・農)  
tosanai@meiji.ac.jp

*Synechocystis* sp. PCC 6803 は、酸素発生型光合成の単細胞藻類である。形質転換の容易さ、増殖の迅速さなどの多くの特徴を有することから、光合成研究のモデル生物として広く利用される藻類である。最近、地球温暖化や食糧問題の解決の一助として藻類が注目を集めている。なぜなら藻類は炭酸固定と有機資源の再生という二役をひとつの系の中で果たし、その過程で必要とされるものは無尽蔵ともいえる太陽光や二酸化炭素のみであるからだ。例えば、藻類はとうもろこしよりも約 700 倍のオイル生産効率があり、将来のエネルギー資源として高い評価を得ている。したがって藻類の炭素代謝を理解することは、基礎・応用研究の両分野において、非常に重要なことである。

*Synechocystis* sp. PCC 6803 が有する炭酸固定酵素に Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)がある。PEPC は、ホスホエノールビルビン酸(PEP)と炭酸水素イオンから、オキサロ酢酸と無機リン酸を発生させる反応を触媒する。生理学的に PEPC は、解糖系で生じた PEP に炭素を固定して TCA 酸回路にオキサロ酢酸を供給するという役割をしている。特にラン藻では本酵素のアナプレロティックな役割が重要となる。なぜならラン藻の TCA 酸回路は不完全( $\alpha$  ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼとスクシニル COA シンターゼの欠損)であると知られており、代謝エネルギーが TCA 回路の回転によっては再供給されないからである。

PEPC はラン藻が行う炭酸固定の 20–25% を行い、また PEPC は動力学的に最も効率の良い酵素であることから、PEPC がラン藻の炭素代謝に非常に重要であることが分かる。それにも関わらず、その特徴はこれまでにほとんど明らかにされてこなかった。この発表は *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 PEPC の特徴を解明することにより、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝の理解に貢献するものとなるだろう。

#### Purification and Characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Masahiro Takeya, Takashi Osanai  
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

**Key words** enzyme purification, enzyme activity, enzyme inhibitors

### 3P-1p050 *Flavobacterium aquatile* 由来 $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase 遺伝子の発現

○中越 麻里菜, 谷 修治, 炭谷 順一, 川口 剛司  
(阪府大院・生環科・応生科)  
takashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】 グルコース (Glc) が  $\beta$ -1,3 結合したオリゴ糖 (ラミナリオリゴ糖, LO) には様々な生理活性が認められており、安価な合成法が望まれている。本研究では、LO を酵素的に合成する方法としてホスリラーゼに注目した。 $\beta$ -1,3 グルカンに作用するホスホリラーゼとして一般的に知られている Laminariobiose phosphorylase (LBP) はラミナリビオース (Lam2) に、 $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase (LOP) は三糖以上の LO に対する加リン酸分解とその逆反応を触媒する酵素である。

*Euglena gracilis* Z 由来の LOP (EgLOP) は LBP 活性を有する LOP であることから単独で安価な Glc からの LO 合成が期待できるが、安定性に問題がある。最近、当研究室において EgLOP をコードする遺伝子が同定された。EgLOP の推定されるアミノ酸配列は既知のホスホリラーゼとの相同性を示さなかったが、存在が推定されている機能未同定のタンパク質群と相同性が確認された。そこで本研究では、*Flavobacterium aquatile* に見出した EgLOP オルソログについて大腸菌を用いて異種発現を行い、発現産物の機能解析を行うことを目的とした。【方法と結果】 *F. aquatile* から PCR により目的遺伝子を取得した。C 末端側に His-tag が付加されるよう構築した発現プラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し培養することで目的遺伝子が可溶性タンパク質として発現した。無細胞抽出液を用いて、リン酸存在下で LO を加リン酸分解すること、 $\alpha$ -D-グルコース-1-リン酸の存在下で Glc、Lam2 から脱リン酸合成を行うことを TLC により確認した。アフィニティ精製を行った発現産物について糖受容体特異性を検討したところ、Glc に対する Lam2 からの脱リン酸合成活性は 86% であり、本酵素が Glc と Lam2 に対して同程度の糖受容体特異性を有することが明らかとなった。

#### Expression of $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase gene from *Flavobacterium aquatile*

○Marina Nakagoshi, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi  
(Dep. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Flavobacterium*, phosphorylase, laminariobiose, laminarioligosaccharide

### 3P-1p051 ジペプチド Val-Gly 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼのクローニングと精製および諸性質の検討

○田中 貴大<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)  
wakayama@sk.ritsume.ac.jp

【目的】  $\gamma$ -Glu-Val-Gly は非常に高活性なコク味物質であり、食品添加物や調味料として有用なトリペプチドであるが、酵素合成基質であるジペプチド Val-Gly を効率的に合成する方法が確立されておらず、広く普及するに至っていない。そこで、本研究では、L-アミノ酸エステラーゼにより、バリンのメチルエステルとグリシンから、効率的に Val-Gly を合成する方法を確立することを目的とした。我々はこれまでに、土壌微生物のスクリーニングを行い、*Elizabethkingia* sp. TT1 由来 L-アミノ酸エステラーゼ (TT1LAE) が高い Val-Gly 合成能を持つことを見出した。今回は、TT1LAE のクローニングおよび精製と諸性質を検討したことを報告する。

【方法・結果】 *Elizabethkingia* sp. BM10 由来 Cocaine esterase からプライマーを設計し、*Elizabethkingia* sp. TT1 のゲノムより PCR によって目的遺伝子の増幅を行った。シーケンス解析の結果、取得した遺伝子のアミノ酸配列と既報の L-アミノ酸エステラーゼのアミノ酸配列に高い相同性 (70%) が確認されたため、TT1LAE 遺伝子の取得に成功したと判断した。そこで、TT1LAE 遺伝子を pET22b(+)+ベクターに組込み、大腸菌 Rosetta-gami B(DE3) 株に導入した。さらに、陰イオン交換、陽イオン交換、疎水性クロマトグラフィーにより、酵素の精製を行った。最終精製酵素は、精製倍率 69.1 倍、比活性 26.67  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (60 mM バリンメチルエステル, 500 mM グリシン, 25°C, pH 9.0, 30 分反応) を示した。本酵素の至適 pH は 9.0、至適温度は 25°C、安定温度は 25°C~40°C、安定 pH は 5.0~9.0 であった。

#### Gene cloning, purification and characterization of L-amino acid esterase catalyzing synthesis of dipeptide Val-Gly

○Takahiro Tanaka<sup>1</sup>, Kazuyoshi Takagi<sup>2</sup>, Mamoru Wakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Biotechnol., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>Applied. Chem., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** dipeptide, Val-Gly, L-amino acid esterase, gene cloning

### 3P-1p052 ジペプチド Trp-His 合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼの精製と諸性質の検討

○牧 慶子<sup>1</sup>, 田中 貴大<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)  
sb0032si@ed.ritsume.ac.jp

【目的】 Trp-His は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルブロッカーであり、唯一の血管拡張作用ジペプチドとして、アテローム性動脈硬化の発症を防止する。これまでにテトラペプチド Lys-Arg-Glu-Ser の抗アテローム性動脈硬化に関する研究が報告されているが、トリペプチドより長いペプチド鎖は、小腸の上皮細胞の粘膜に吸収されない。一般的なアテローム性動脈硬化治療薬である  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル拮抗薬では心臓疾患が忌避されるが、Trp-His は併発していても使用可能である。Trp-His が非常に高価であることから、健康食品や医薬品への利用が進みにくいが現状である。そこで本研究では、L-アミノ酸エステラーゼを用いて Trp-OMe および His から Trp-His の効率的な酵素的合成の確立を目的とし、土壌中から合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼを生産する菌のスクリーニング、菌の同定、酵素の生産条件及び酵素の精製について検討を行った。【方法・結果】 比色法および HPLC を用い、日本各地の土壌より、Trp-His 合成能を有する微生物のスクリーニングを行った。その結果、単離・同定した 8 種類の菌株のうち、*Pseudomonas* sp. KM1 に最も強い活性が見られた。*Pseudomonas* sp. KM1 の菌体より、陰イオン交換、疎水性、アフィニティークロマトグラフィーを用いて L-アミノ酸エステラーゼを精製した。最終精製酵素は、精製倍率 176 倍、比活性 1.33  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (50 mM トリプトファンメチルエステル, 300 mM ヒスチジン, 40°C, pH 9.0, 60 分反応) を示した。本酵素の至適 pH は 10.0、至適温度は 40°C、安定温度は 30°C~40°C、安定 pH は 9.0~10.0 となり、 $\text{Ag}^+$  によって反応が阻害された。

#### Purification and characterization of L-amino acid esterase catalyzing synthesis of dipeptide Trp-His

○Keiko Maki<sup>1</sup>, Takahiro Tanaka<sup>1</sup>, Kazuyoshi Takagi<sup>2</sup>, Mamoru Wakayama<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Biotechnol., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>Applied. Chem., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** dipeptide, Trp-His, L-amino acid esterase, purification

### 3P-1p053 L-アミノ酸エステラーゼによるイミダゾールペプチドの酵素合成に関する研究

○小塩 茂々子<sup>1</sup>, 高木 一好<sup>2</sup>, 若山 守<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>立命館大院・生命科学・生工, <sup>2</sup>立命館大院・生命科学・応化)  
 wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】イミダゾールペプチドとは、イミダゾール基を含むペプチドのことであり、本研究では、カルノシン( $\beta$ -アラニルヒスチジン)及びホモカルノシン(GABA-ヒスチジン)に注目した。カルノシンは、哺乳動物の筋肉や脳、心臓中に多く存在しており、抗酸化作用や疲労回復効果、抗老化作用を有している。ホモカルノシンは、哺乳動物の骨格筋や脳、脳髄液中に存在しており、抗酸化剤や神経伝達物質、金属キレート剤としての機能を有している。イミダゾールペプチドの既知の生産法では、食料と競合や、低い合成効率といった欠点がある。そこで、本研究では、L-アミノ酸エステラーゼにより $\beta$ -アラニンのメチルエステルもしくは $\gamma$ -アミノ酪酸のメチルエステルとヒスチジンからそれぞれカルノシンとホモカルノシンを酵素合成する方法を確立することを目的とし、土壌からイミダゾールペプチド合成能を有するL-アミノ酸エステラーゼを生産する菌のスクリーニング、菌の同定、及びイミダゾールペプチドの生産性について検討を行った。

【方法と結果】比色法、およびHPLCを用い、日本各地の土壌よりイミダゾールペプチド合成能を有する微生物のスクリーニングを行った。その結果、単離した菌株のうち、*Chryseobacterium* 属菌の一種に最も高い合成活性が見られた。*Chryseobacterium* sp. MK-4 由来のL-アミノ酸エステラーゼにおける合成活性は、ホモカルノシンよりもカルノシンの方が高かった。最適培地は、炭素源としてD-グルコース、窒素源として硫酸アンモニウムを用いた場合だった。また、最適反応条件は、温度は25°C、pHは9.5になった。

#### Enzymatic synthesis of imidazole peptides using L-amino acid esterase

○Momoko Koshio<sup>1</sup>, Kazuyoshi Takagi<sup>2</sup>, Mamoru Wakayama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Biotechnol., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., <sup>2</sup>Applied Chem., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

**Key words** carnosine, homocarnosine, L-amino acid esterase

### 3P-1p054 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が有する GH134 ファミリーに属する糖質加水分解酵素の生理学的役割の解明

○新沢 祐大<sup>1</sup>, 酒井 杏匠<sup>1</sup>, 木本 紗蘭<sup>1</sup>, 嶺澤 美帆<sup>1</sup>, 望月 麻衣<sup>1</sup>, 神藤 定生<sup>2</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>名城大・理工)  
 n6d1j7@gmail.com

#### 【背景・目的】

糸状菌 *Aspergillus nidulans* を $\beta$ -マンナンを唯一の炭素源として生育させると、細胞外に Glycoside Hydrolase family 5 (GH5) および GH26 に属する $\beta$ -1,4-マンナーゼが生成されることが知られている。これまでに我々は、これらの酵素と全く相同性を有さない新規 GH family 134 に分類される $\beta$ -1,4-マンナーゼ (Man134A) を見出した。さらに、*A. nidulans* のゲノム中には Man134A と 50% 以上の相同性を有する遺伝子が Man134A の他に 2 種類存在していた。本研究では、Man134A および 2 種類のパラログ (Man134B, Man134C) の機能および生理学的な役割を解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

Man134A およびそのパラログである Man134B および Man134C (Man134A との identity がそれぞれ 71%, 54%) のリコンビナントタンパク質を大腸菌にて異種発現させ精製した。 $\beta$ -マンナンおよび他の多糖類 (セルロース、キシラン、キチンなど) と反応後、TLC および HPLC にて反応生成物を分析することで基質特異性を解析した。その結果、Man134B および Man134C はどちらも $\beta$ -1,4-マンナーゼ活性を有していたが、Man134A と比較して $\beta$ -マンナンやマンノオリゴ糖に対する酵素学的パラメーターおよび分解産物の生成パターンは異なっていた。Man134A の *in vivo* での機能を解明するため *man134A* の遺伝子破壊株 (*Aman134A* 株) を作製し、 $\beta$ -マンナンのみを炭素源として生育させたところ、野生株 (WT 株) と比較して *Aman134A* 株の生育が顕著に低下したことから、Man134A は、 $\beta$ -マンナンの資化に関与していることが明らかとなった。現在、*man134B* および *man134C* の遺伝子破壊株を作製し表現型を解析することで、これらの生理学的役割についても検討している。

#### Physiological roles of $\beta$ -1,4-mannanases belonging to GH134 in *Aspergillus nidulans*

○Yuta Shinzawa<sup>1</sup>, Kiyota Sakai<sup>1</sup>, Saran Kimoto<sup>1</sup>, Miho Minezawa<sup>1</sup>, Mai Mochizuki<sup>1</sup>, Sadanari Jindou<sup>2</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Meijo Univ., <sup>2</sup>Meijo Univ.)

**Key words** GH134, Man134B, Man134C, *Aspergillus nidulans*

### 3P-1p055 糸状菌および放線菌由来 GH134 に属する $\beta$ -1,4-マンナーゼの機能解析と活性部位残基の探索

○木本 紗蘭<sup>1</sup>, 酒井 杏匠<sup>1</sup>, 新沢 祐大<sup>1</sup>, 嶺澤 美帆<sup>1</sup>, 山田 みゆき<sup>1</sup>, 望月 麻衣<sup>1</sup>, 神藤 定生<sup>2</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>名城大・農, <sup>2</sup>名城大・理工)  
 masharan0206@gmail.com

#### 【背景と目的】

我々は、 $\beta$ -マンナンを唯一の炭素源とした際に糸状菌 *Aspergillus nidulans* が細胞外に分泌する新規 GH ファミリー 134 に分類される $\beta$ -1,4-マンナーゼ (AnMan134A) を発見した。本酵素は Glycoside Hydrolase (GH) ファミリー 5 (GH5) および GH26 に属する既知の $\beta$ -1,4-マンナーゼのみならず、既知の糖質加水分解酵素と全く相同性を有していないために、AnMan134A の立体構造および活性部位残基については推定できなかった。また、GH134 に属するタンパク質は植物病原菌を含む糸状菌および放線菌の一部にのみ分布していた。本研究では、AnMan134A および糸状菌 *A. oryzae*、放線菌 *Streptomyces* sp. が有する AnMan134A オルソログ (それぞれ AoMan134A, StMan134A) の機能を解析した。さらに、GH134 で高度に保存されているアミノ酸残基を選抜して部位特異的変異を導入することで、AnMan134A の活性に必要なアミノ酸残基を探索した。

#### 【方法と結果】

AnMan134A および AnMan134A オルソログのリコンビナントタンパク質を異種発現させ調製した。それぞれの基質特異性を解析したところ、AoMan134A (AnMan134A と identity 70%) および StMan134A (AnMan134A と identity 61%) のどちらも $\beta$ -1,4-マンナーゼ活性を有していた。また、AnMan134A と AoMan134A は 70-90 °C で 0-120 分間インキュベート後、 $\beta$ -1,4-マンナーゼ活性を測定した結果、AnMan134A および AoMan134A どちらも高い熱安定性を有していた。さらに AnMan134A の 9 種類のアミノ酸変異タンパク質を作製したところ、61 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した AnMan134A E61A では活性が消失した。このことから、61 番目のグルタミン酸は $\beta$ -1,4-マンナーゼ活性に必須の残基であることが示唆された。

#### Characterization of novel $\beta$ -1,4-mannanases and identification of active site residues of AnMan134A

○Saran Kimoto<sup>1</sup>, Kiyota Sakai<sup>1</sup>, Yuta Shinzawa<sup>1</sup>, Miho Minezawa<sup>1</sup>, Miyuki Yamada<sup>1</sup>, Mai Mochizuki<sup>1</sup>, Sadanari Jindou<sup>2</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Meijo Univ., <sup>2</sup>Meijo Univ.)

**Key words** GH134, beta-1, 4-mannanase, thermostability, active site residues

### 3P-1p056 好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来ネオアガロビオース加水分解酵素の酵素的特徴

○渡辺 輝彦<sup>1</sup>, 櫻村 佳奈<sup>1</sup>, 桐村 光太郎<sup>1</sup>  
 (早大・先進理工・応化)  
 kkohtaro@waseda.jp

【目的】ネオアガロビオース(NA2)は保湿性や美白作用を有する機能性二糖であり[1]、ネオアガロビオース生成型の $\beta$ -アガラゼによる寒天(アガロース)からの効率的生産が可能である[2]。一方、GH117 に属するネオアガロビオース加水分解酵素(EC 3.2.1.159; NAH)については極めて研究例が少ない。演者らは、非海洋性の好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来の NAH を精製して諸性質を検討し、*Escherichia coli* BL21 (DE3) を宿主として NAH 遺伝子の高発現を可能にしている[3]。本研究では、NAH の基質特異性などの酵素的特徴を明らかにした。

【方法および結果】*E. coli* BL21 を宿主として WU-0601 株由来の NAH 遺伝子を組み込んだ *E. coli* BL21 (DE3)/pNAH を作製し、ヒスチジンタグを付与した組換え His-tagged NAH を研究に利用した。NA2 を基質とした際の当該酵素が触媒する反応の最適温度は 25°C、最適 pH は 6.0 であり、native NAH と同一の性質を示した。また、動力学定数の算出を行い、 $K_m = 5.77$  mM,  $V_{max} = 59.9$  U/mg と決定した。さらに、当該酵素が NA2 だけでなくネオアガロテトラオース(NA4)とネオアガロヘキサオース(NA6)にも作用することを明らかにした。ネオアガロオリゴ糖を基質とした際の加水分解産物を TLC 分析および LC-Q-TOFMS 分析により同定し、加水分解産物が単糖である 3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース(ALG)とアガロオリゴ糖であることを明らかにした。したがって、当該酵素は ALG を認識し、非還元末端の  $\alpha$ -1,3 結合を特異的に加水分解する酵素であることが示唆された。

[1] R. Kobayashi, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 162-163 (1997).  
 [2] K. Kirimura, *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 436-441 (1999).  
 [3] 渡辺 輝彦, 他, 2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p. 105 (2015).

#### Characterization of a Neogariobiose Hydrolase from an Alkalophilic Bacterium *Cellvibrio* sp. WU-0601

○Teruhiko Watanabe, Kana Kashimura, Kohtaro Kirimura  
 (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** agarase, *Cellvibrio* sp. WU-0601, GH117 family enzyme, neogariobiose hydrolase

**3P-1p057 *Aspergillus niger* NRRL 328 由来 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析**

○丸海老 純也, 渡邊 昭太郎, 小林 慶一, 桐村 光太郎  
(早大・先進理工・応化)  
kkohtaro@waseda.jp

**【目的】** ポリケタイドはポリフェノールやフラボノイドを代表例とする二次代謝産物であり、ポリケタイド合成酵素 (PKS) による脂肪酸アシル CoA の縮合反応によって合成される。PKS は構造上の違いから3つに分類されているが、糸状菌由来の III 型 PKS についての報告例は少ない。本研究では、ゲノム解析株 *Aspergillus niger* NRRL 328 由来 III 型 PKS ホモログ遺伝子 (*An-csyA*) を大腸菌を宿主として異種発現させ、組換え An-CsyA を用いて *in vitro* での機能解析を行った [1]。

**【方法および結果】** An-CsyA は 52 bp のイントロンを含む 1231 bp から成る。*An-csyA* の cDNA を大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) を宿主として異種発現させ、His-tag が付加した組換え酵素 (以下、His-tagged An-CsyA) の生産を可能にした。精製 His-tagged An-CsyA を用い、種々の脂肪酸 acyl-CoA を開始基質、malonyl-CoA を伸長基質とした *in vitro* での酵素反応を行った。生成物については HPLC および LC-Q-TOFMS で分析した。C2-C14 の脂肪酸 acyl-CoA を開始基質とした場合に生成物が検出され、使用した全ての基質に対して triketide pyrone が検出された。これらに加えて、C2-C10 に対して tetraketide pyrone が、C10-C14 に対して pentaketide resorcinol が検出された。以上より、An-CsyA は *A. niger* CBS 513.88 由来 III 型 PKS (AnPKS) のアミノ酸配列と 84 % の相同性を示すものの、基質特異性や生成物が異なることを明らかにした。また、既知の糸状菌由来 III 型 PKS と異なり、An-CsyA は malonyl-CoA を開始基質および伸長基質として利用可能で、さらに acetyl-CoA や acetoacetyl-CoA, malonyl-CoA などの短鎖の脂肪酸 acyl-CoA より tetraketide pyrone を合成した [1]。

[1] K. Kirimura *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 473, 1106-1110 (2016).

**Functional analysis of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger* NRRL 328**

○Junya Maruebi, Shotaro Watanabe, Keiichi Kobayashi, Kohtaro Kirimura  
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** *Aspergillus niger*, polyketide synthase, type III, polyketide, pyrone- and resorcinol-type

**3P-1p058 嗅覚受容体膜輸送機構の解明に向けた RTP の機能構造解析**

○玉木 良平<sup>1</sup>, 福谷 洋介<sup>1</sup>, 池上 健太郎<sup>1</sup>, 松波 宏明<sup>2</sup>, 養王田 正文<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>農工大院・工・<sup>2</sup>デューク大・メディカルセンター)  
yohda@cc.tuat.ac.jp

嗅覚は食物や交配相手の発見、捕食者からの逃避など生命活動に重要な役割を担う感覚である。数十万種類存在するといわれる大気中の匂い分子を特異的に識別するのが、嗅神経細胞に発現している嗅覚受容体 (Odorant Receptor; OR) である。7 回膜貫通型の GPCR である OR が匂い分子を特異的に受容し、そのシグナルが脳に伝わることによって、匂いとして感じることができる。多くの OR は Receptor Transporting Protein (RTP) の補助によって細胞膜に局在する。1 回膜貫通型の膜タンパク質である RTP が細胞膜上で OR と相互作用していること、脂質ラフトにおける局在化に関わることが分かっている。しかし RTP の立体構造は未解明であるため、OR との相互作用状態、さらには、RTP による OR 膜輸送の詳細な機構についてはいまだ多くが不明である。

本研究では OR の機能的発現に重要な RTP に注目し、RTP の機能構造解析による OR 膜輸送機構の解明、さらには RTP を利用した新規リガンド検出方法の開発を目指した。今回は RTP の中でも OR の機能的発現に特に寄与する RTP1S を対象に研究を進めた。

RTP1S のタンパク質立体構造解析を行うため RTP1S を大腸菌組換え体で発現させたところ、亜鉛が RTP1S の構造形成に必要であることが明らかとなり、アミノ酸配列からも新規のジンクフィンガー様タンパク質であることが示唆された。また、HEK293T 細胞に RTP と OR を共発現させ、匂い分子添加の有無における RTP と OR の局在変化を免疫染色で調べた。RTP の細胞膜表面層への局在には影響がないことが確認され、OR 活性化後も OR のエンドサイトーシスに影響を受けない可能性が示唆された。現在、分割ルシフェラーゼを利用した RTP-OR の相互作用解析、およびそれを利用した匂い分子検出システムの構築を目指しており、その進捗についても報告する予定である。

**Structural and functional characterization of receptor transporting protein for elucidation of the olfactory receptor membrane transport mechanism**

○Tamaki Ryohei<sup>1</sup>, Yousuke Fukutani<sup>1</sup>, Kentaro Ikegami<sup>1</sup>, Hiroaki Matsunami<sup>2</sup>, Masafumi Yohda<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Duke Univ. Medical center)

**Key words** receptor, protein interaction, transmembrane domain

**3P-1p059 Self-assembling supramolecular nanostructures created by *de novo* extender protein nanobuilding blocks**

Naoya Kobayashi<sup>1</sup>, Kouichi Inano<sup>1</sup>, Takaaki Sato<sup>1</sup>, Keisuke Miyazawa<sup>2</sup>, Takeshi Fukuma<sup>2</sup>, Michael H. Hecht<sup>3</sup>, ○Ryoichi Arai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Dept. of Chem., Princeton Univ.)  
rarai@shinshu-u.ac.jp

The design of novel proteins that self-assemble into supramolecular complexes is an important step in the development of synthetic biology and nanotechnology. Recently, we designed and created a protein nanobuilding block (PN-Block), WA20-foldon, by fusing an intermolecularly folded dimeric *de novo* protein WA20 and a trimeric foldon domain of T4 phage fibrin (Kobayashi, *et al.*, *JACS*, 2015). The WA20-foldon formed several distinctive types of self-assembling nanoarchitectures in multiples of 6-mer (6, 12, 18, 24-mer). In this study, to construct self-assembling chain-extended nanostructures, we designed *de novo* extender protein nanobuilding blocks (ePN-Blocks) as the second series of PN-Blocks. The ePN-Blocks were constructed by fusing tandemly two *de novo* WA20 proteins with various linkers. The purified ePN-Blocks migrated as ladder bands in native PAGE, suggesting that the ePN-Blocks form several homooligomeric states, probably circular chain structures, in the soluble fraction. Then, we reconstructed heteromeric complexes from extender and stopper PN-Blocks by denaturation and refolding. SEC-MALS and SAXS analyses suggest that the heterocomplexes formed several types of linear chain structures. Moreover, observation by AFM in liquid revealed the heterocomplexes with metal ion further self-assembled into supramolecular nanostructures on mica surface. These results suggest that the PN-Block approach using the *de novo* proteins is a powerful strategy to create novel self-assembling supramolecular nanostructures.

**Self-assembling supramolecular nanostructures created by *de novo* extender protein nanobuilding blocks**

Naoya Kobayashi<sup>1</sup>, Kouichi Inano<sup>1</sup>, Takaaki Sato<sup>1</sup>, Keisuke Miyazawa<sup>2</sup>, Takeshi Fukuma<sup>2</sup>, Michael H. Hecht<sup>3</sup>, ○Ryoichi Arai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., <sup>2</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., <sup>3</sup>Dept. of Chem., Princeton Univ.)

**Key words** *de novo* protein, protein nanobuilding block, supramolecular nanostructure, protein engineering

**3P-1p060 カイコ由来糖転移酵素 GnTIII 及び GalT オルソログの機能解析**

○宮下 龍之介<sup>1</sup>, 宮崎 剛亜<sup>1,2</sup>, 加藤 竜也<sup>1,2</sup>, 朴 龍洙<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>静大・創科技学院, <sup>2</sup>静大・グリーン科技研)  
park.enocho@shizuoka.ac.jp

**【目的】** カイコで発現させた組換えタンパク質には、哺乳動物細胞で認められる複合型糖鎖ではなく、昆虫特有のパウチマンノース型糖鎖が付加される。カイコで発現させた糖タンパク質を医薬品として利用するためには複合型糖鎖を付加させる必要がある。カイコには複合型糖鎖合成に必要な N-acetylglucosaminyltransferase II (GnTII)、β-1,4-galactosyltransferase (GalT) と相同性を有する遺伝子が内在するが、複合型糖鎖が合成されない。本研究では、カイコ内在のそれぞれの遺伝子発現を調べ、GnTII と GalT オルソログについて組換え酵素の活性測定を行い、複合型糖鎖形成の可能性を追求した。

**【結果】** 1 齢から 5 齢幼虫と蛹から mRNA を抽出し、RT-PCR でそれぞれの遺伝子発現を確認した。また、カイコ由来 GnTII 及び GalT 遺伝子をそれぞれ BmNPV バクミドに挿入し、カイコ幼虫で過剰発現させた。カイコ体液から GnTII 及び GalT を精製後、HPLC 分析のピークから活性測定を行った。

**【結果】** 1 齢から 5 齢幼虫と蛹で GnTII 及び GalT の遺伝子の発現が確認された。カイコ由来 GalT の活性測定において、GlcNAc-β-pNP と GlcNAcβ(1-3)GalNAc-α-pNP をアクセプター基質として反応を行ったところ、UDP-GalNAc からの GalNAc 転移反応が確認された。現在カイコ由来 GnTII の活性確認を行っており、今後カイコ由来 GnTII 及び GalT の詳細な特性を明らかにしていく予定である。

**Characterization of GnTIII and GalT ortholog of the silkworm**

○Ryunosuke Miyashita<sup>1</sup>, Takatsugu Miyazaki<sup>1,2</sup>, Tatsuya Kato<sup>1,2</sup>, Enoch Y. Park<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

**Key words** glycosyltransferase, *Bombyx mori*, N-glycosylation, ortholog

### 3P-1p061 乳酸オキシダーゼのタンパク質工学による基質特異性の改変

○比留田 美咲, 西矢 芳昭  
(棋南大院 生命科学)  
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

**【目的】** Enterococcus 属由来乳酸オキシダーゼ (LoxL) は、乳酸測定用として血液検査やバイオセンサに応用されている。本研究では、LoxL の変異体をデザインすることで、本来反応性の乏しい高い基質に反応する変異酵素の開発を目指す。今回そのような基質として、マンデル酸とグリセリン酸を取り上げることとした。本改変が成功すれば、医薬品原料の光学分析法による生成や分析分野に貢献できる可能性がある。

**【方法及び結果】** Aerococcus viridans 由来乳酸オキシダーゼ (LoxA) の構造を基に、ホモロジーモデリングを行うことで、LoxL の立体構造を構築した。そして、マンデル酸とのドッキングを行うことにより、野生型 LoxL とマンデル酸との間に生じる立体障害を確認した。この立体障害を軽減すると予想される単変異 (A88G, Y117A)、二重変異 (M2:A88G+Y117A)、および三重変異 (M2+V206A など) をデザインした。Inverse PCR により各変異体を作成し、精製後、L-乳酸に対するマンデル酸、グリセリン酸の活性比率及び比活性を求めた。その結果、野生型ではマンデル酸の活性比率が検出限界以下であり、高い基質に対する反応性は著しく低いことが実証された。一方、二重変異では活性比率が約 1.9、三重変異 M2+Y207V では約 9.5 と著しく高まった。このことから、活性部位周辺のポケットを広げ、高い基質との立体障害を軽減する程、マンデル酸の L-乳酸に対する活性比率が大幅に増加する傾向が分かった。また、グリセリン酸の L-乳酸に対する活性比率も同様の傾向が見られ、二重変異では野生型の約 12 倍、三重変異 M2+Y207V では約 36 倍向上した。

**【結論】** 以上の結果より、高い基質に対してより高い反応性を示す新たな変異体を作成することに成功した。今後は、反応速度定数を求めてさらなる改変および応用に繋げたい。

#### Improvement of the substrate specificity of a lactate oxidase by protein engineering

○Misaki Hiruta, Yoshiaki Nishiya  
(Life Sci, Setsunan Univ.)

**Key words** lactate oxidase, substrate specificity, homology modeling, protein engineering

### 3P-1p062 N 末端蛍光標識抗体プローブを用いた抗原の蛍光検出

○福永 圭佑<sup>1</sup>, 渡邊 貴嘉<sup>1</sup>, Novitasari Dian<sup>1</sup>, 阿部 亮二<sup>2</sup>,  
大橋 広行<sup>2</sup>, 芳坂 貴弘<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北陸先端大・マテリアル, <sup>2</sup>ウシオ電機)  
hohsaka@jaist.ac.jp

一本鎖抗体 scFv の N 末端領域に TAMRA などを持つ蛍光非天然アミノ酸を導入することで蛍光基が scFv 内部のトリプトファン残基による消光を受ける一方、抗原結合に伴って蛍光消光が解消され、その結果、溶液中の抗原を蛍光強度の変化として定量的に検出できるとする知見が報告されている (*J. Am. Chem. Soc.* 133, 17386 (2011); *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 89, 573 (2016); *J. Biosci. Bioeng.*, in press)。しかしながら、遺伝暗号拡張技術を用いた蛍光アミノ酸の導入には無細胞タンパク質合成系を用いた多段階の実験操作が必要とされ、またタンパク質の合成量が少ないという問題があった。このため、N 末端蛍光標識抗体を簡便に作製する新規技術の開発が望まれている。

そこで我々は、市販のモノクローナル IgG の N 末端  $\alpha$ -アミノ基を選択的に蛍光標識することで抗原依存的な蛍光増強を示す蛍光標識 IgG の新規合成法の開発を試みた。N 末端  $\alpha$ -アミノ基は Lys 側鎖  $\epsilon$ -アミノ基と比べて  $pK_a$  が低いため、弱酸性バッファー中で蛍光色素アルデヒド誘導体を用いた還元アルキル化反応を行うことで N 末端選択的な蛍光標識が可能になる。実際に本手法で合成した蛍光標識 IgG の酵素消化物をタンデム質量分析法で解析したところ、蛍光色素が N 末端  $\alpha$ -アミノ基に付加していることが確認された。さらに、蛍光標識した IgG は抗原濃度依存的な蛍光増強を示し、抗体型蛍光プローブを作製する方法として IgG の N 末端蛍光標識が有効であることが明らかとなった。

#### Fluorescence detection of antigens by using N-terminally fluorescent-labeled antibody probes

○Keisuke Fukunaga<sup>1</sup>, Takayoshi Watanabe<sup>1</sup>, Dian Novitasari<sup>1</sup>, Ryoji Abe<sup>2</sup>,  
Hiroyuki Ohashi<sup>2</sup>, Takahiro Hohsaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>USHIO Inc.)

**Key words** antibody, chemical modification, fluorescence spectra

### 3P-1p063 脂肪酸アシル-ACP 還元酵素の *in vivo* 迅速活性評価法の開発

○林 勇樹, 新井 宗仁  
(東大院・総合文化)  
hayashi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

微生物が生成するアルカン (軽油相当) は、バイオ燃料の候補として注目を集めている。2010 年に藻類でアルカン合成を担う 2 つの酵素、脂肪酸アシル ACP 還元酵素 (AAR) とアルデヒド脱ホルミル化酸化酵素 (AD) が同定された。AAR は脂肪酸合成経路の代謝産物である脂肪酸アシル ACP を基質として脂肪酸アルデヒドを生成し、AD がこれをアルカンへと変換する。しかし、AAR の活性は非常に低いため、微生物を利用したアルカン生産を実用化するためには AAR の高活性化が必要である。

タンパク質の高活性化を行う手法として、進化分子工学があげられる。進化分子工学は、変異と選択を繰り返すことにより、目的機能を有するタンパク質を創出する手法である。通常、AAR の活性を測定するためには、大腸菌内で AAR と AD を共発現し、生成された不安定なアルデヒドを AD により安定なアルカンへと変換後、大腸菌培養液を超音波破砕し、細胞破砕液に含まれるアルカンを有機溶媒で抽出して、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) によりアルカンの定量分析を行っている。しかし、この方法では 1 つの変異体の活性を調べるために、多段階のプロセスを経るため多くの時間と労力を要する。そこで本研究では、大腸菌培養液の状態、菌体内で発現した  $10^3$  種以上の変異型 AAR の活性を蛍光強度として評価できる系を構築した。この系では、大腸菌内で AAR とともにバクテリアルシフェラーゼ (BL) を共発現する。発現した AAR によって脂肪酸アルデヒドが生成されるが、共発現した BL によって脂肪酸アルデヒドが脂肪酸へと変換される際に生物発光が起きる。そのため、大腸菌の発光強度から、AAR の活性を評価できる。ポスター発表では、本評価法の構築に向けた条件検討と、本評価法による野生型 AAR と変異体 AAR の活性比較の結果について議論する。

#### Development of a high-throughput method to evaluate the *in vivo* activity of Acylan acyl-(acyl-ACP) reductase

○Yuuki Hayashi, Munehito Arai  
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** acyl-ACP reductase, alkane biosynthesis, bacterial luciferase, directed evolution

### 3P-1p064 シグナル伝達分子の特異的活性化を目的とした新規受容体の開発

○Kongkrongtong Tatphon, 長棟 輝行, 河原 正浩  
(東大院・工)  
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

**【背景と目的】** 細胞内シグナル伝達機構においては、膜上の受容体が細胞外からの情報をシグナル伝達分子に伝達し、次々とシグナルを受け渡ししながら、最終的に遺伝子の発現を制御することによって細胞運命が決定される。このシグナル伝達パターンを人為的に制御することができれば、シグナル伝達メカニズムの解明や細胞運命の制御等が期待できる。そこで、本研究ではシグナル伝達分子が結合するチロシン残基とその周囲の数アミノ酸残基 (チロシンモチーフ) に着目した。さらに、改変型受容体チロシンキナーゼとチロシンモチーフを融合することで、キナーゼからリン残基を受けたチロシンモチーフが特定のシグナル伝達分子を活性化できると考えた。以上のアイデアを元に、本研究ではシグナル伝達分子を特異的に活性化できる新規受容体の開発を目的とした。

**【方法】** 融合したチロシンモチーフと改変型受容体チロシンキナーゼの N 末端に、リガンド依存的にキナーゼを活性化できるように FKBP を連結したキメラ受容体をコードするプラスミドを構築して、レトロウイルスベクターでマウス由来 Ba/F3 細胞に導入した。抗生物質選択後、キメラ受容体が発現している細胞をリガンドで 37°C、15 分間刺激した。次に細胞のライセートを調製し、標的シグナル伝達分子の活性化をウエスタンブロッティングで確認した。

**【結果と考察】** モデルとして STAT1, STAT3 及び STAT5 の結合モチーフをそれぞれ挿入したキメラ受容体において、標的シグナル伝達分子のリン酸化を確認でき、特異的活性化に成功した。今後、オフターゲット効果を検証しつつ、さらにチロシンモチーフを複数個に増やし、二つ以上のシグナル伝達分子を活性化できる受容体を開発していく。

#### Constructing novel chimeric receptors for activating on-target signaling molecules

○Tatphon Kongkrongtong, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** signal transduction, chimeric receptor, c-kit, tyrosine phosphorylation

### 3P-1p065 細胞死シグナルを利用したタンパク質間相互作用阻害分子選択法の開発

○江口 晃弘, 長棟 輝行, 河原 正浩  
(東大院・工)  
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

細胞内ネットワークは、多数のタンパク質間相互作用によって成り立っている。このため、細胞内ネットワーク解析のための方法としてその相互作用を阻害することは極めて有効である。

そのような阻害分子を選択するために、本研究では、多量体化により細胞死シグナルを発する受容体 Fas に注目し、抗原タンパク質を細胞外ドメインに持ち、そこに Fas の細胞内ドメインと、FKBP (F36V) というリガンド依存的に二量体化するタンパク質を融合した細胞死シグナル伝達受容体を作製した。また、抗体として、scFv と FKBP (F36V) を融合した二量体化抗体を作製した。抗原抗体間に相互作用がある場合、この2つのタンパク質を共発現させた細胞に対して二量体化リガンドを加えると、2つの二量体化ドメインが協調して多量体化し、発現細胞に細胞死シグナルを伝達する。次に、更にこの細胞に対して阻害分子候補のタンパク質を発現させる。そのタンパク質が抗原抗体相互作用を阻害する場合は、細胞死シグナルが伝達されなくなるために細胞の生存が見られ、阻害しない場合は細胞死が誘導される。このようにして、細胞の生存を指標とした阻害分子の選択が可能である。

本系が機能するかを調べる為に、受容体チロシンキナーゼの一種である ErbB2 という膜タンパク質を抗原として、また ErbB2 に特異的な scFv を抗体として用いて、リガンド依存的に細胞死が誘導されるかどうかを調べた。その結果、若干ではあるが細胞死を誘導することに成功した。今後の展望として、細胞死シグナル伝達受容体が発現させることによるバックグラウンドの細胞死が減少するようにエンジニアリングすることで、細胞死に対して感度の高い細胞集団を保持できる系を探索する。

#### A system to select protein-protein interaction inhibitors utilizing a death signal

○Akihiro Eguchi, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara  
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** protein interaction, Cell death, chimeric receptor

### 3P-1p066 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の機能を利用した GFP のシリカへの固定化

○小林 大起<sup>1</sup>, 天野 太郎<sup>2</sup>, 有馬 二期<sup>1</sup>, 清水 克彦<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>鳥取大・農, <sup>2</sup>鳥取大院・農, <sup>3</sup>鳥取大産学)  
arima@muses.tottori-u.ac.jp

**【目的】** シリカを主成分とする骨格を持つガラスカイメン類カイロウドウケツは、その骨格内にシリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”を持つ。グラシンは、室温、中性 pH 条件下でケイ酸からシリカを形成させる機能を有しており、自信は形成されたシリカに埋め込まれるという性質を持つ。これまでに、組換えグラシンの生産系が構築されたため、本研究では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を使用して、グラシンと有用タンパク質との融合による、有用タンパク質のシリカへの固定化の利用可能性を検証した。

**【方法】** カイロウドウケツの全ゲノム DNA 配列解析により得られたグラシンの遺伝子配列を基に合成した遺伝子、及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を融合させ、グラシン融合 GFP の発現プラスミドを構築した。続いて *E. coli* Rosetta (DE3) を使用してグラシン融合 GFP を調製した。このグラシン融合 GFP に対して、ケイ酸を混合して GFP のシリカへの固定化を試みた。

**【結果】** 発現させたグラシン融合 GFP の SDS-PAGE の結果、組換えグラシンと比較して発現量の増加が確認された。また、グラシン融合 GFP 溶液にケイ酸を添加すると、組換えグラシンと同等のシリカ形成能を示し、得られたシリカ粒子からは GFP 特有の蛍光色が観察された。また、もともと GFP のために蛍光色を示していたグラシン融合 GFP 溶液は、シリカ形成後は無色となった。一方で、GFP に対しケイ酸を添加しても、シリカは形成されず、上清も蛍光色のままであった。これらの結果から、GFP はグラシンと融合することで、シリカ粒子近傍に固定化されたと考えられた。現在は、工業的に利用が考えられる酵素タンパク質をシリカ固定化し、諸性質を検討中である。

#### Application of silica particle formation promoting protein "Glassin" to immobilization of GFP to silica

○Hiroki Kobayashi<sup>1</sup>, Taro Amano<sup>2</sup>, Ziro Arima<sup>1</sup>, Katsuhiko Shimizu<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Tottori Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., <sup>3</sup>Org. Reg. Ind. Acad. Coop., Tottori Univ.)

**Key words** immobilization, silica particle formation protein, *Euplectella aspergillum*

### 3P-1p067 CutA1 及び VHH 抗体を利用した高感度バイオセンシングシステムのデザイン

○伊達 弘輝, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行  
(岡山大院・自科)  
imanaka@okayama-u.ac.jp

**目的:** 生体分子間相互作用の検出技術は、バイオセンサー、薬剤スクリーニングや医療診断など幅広く応用されており、バイオ分子の固体表面への固定化技術が重要な基盤要素として挙げられる。我々のグループでは、固体表面への生体分子の機能的固定化技術の開発を進めてきた。本研究では、固定化分子に親水性ポリスチレン親和性ペプチド (PS-tag) あるいは金表面親和性ペプチド (Au-tag) をタグとして連結し、固定化の配向を制御する方法に着目した。さらに超好熱菌由来タンパク質 CutA1 を固体表面との相互作用を緩和するクッションタンパク質として利用し、リガンドの固定化後の機能維持ならびに、相互作用検出の高感度化を図ることを目的とした。

**方法と結果:** 固定化リガンドタンパク質として抗 EGFP の VHH 抗体、親和性ペプチドとして PS-tag 及び Au-tag、そしてスパーサーとして E/K coiled-coil を用い様々なデザインした各種リガンドバイオ分子の発現・精製を行った。アナライトタンパク質として Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を用い、PS 表面上では ELA、金表面上では QCM で相互作用を評価した。その結果、リガンドを物理吸着させた場合に比べ、タグの連結により相互作用検出量が向上した。CutA1 内に VHH を挿入すると更に検出量が向上し、VHH の構造が CutA1 内である程度維持されたと考えられた。また、C 末端に VHH を連結する分子デザインを施した結果、相互作用検出量が顕著に向上した。これらの検討を通じて、リガンドと表面との直接的な相互作用を CutA1 が緩和し、リガンドの機能維持が可能であることが示された。

#### Design of highly sensitive biosensing system by utilizing CutA1 and VHH antibody

○Koki Date, Naoyuki Ishida, Koreyoshi Imamura, Hiroyuki Imanaka  
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

**Key words** affinity peptide, immobilization, biosensing, vhh antibody

### 3P-1p068 アクセサリータンパク質を標的とした抗センダイウイルス薬の開発

○小田 康祐, 的場 康幸, 入江 崇, 坂口 剛正  
(広大院・医歯薬保健学)  
kosuke-81@hiroshima-u.ac.jp

**【背景と目的】** 病原ウイルスの多くは、細胞内での増殖や感染性粒子産生のために、宿主因子と結合し、その機能を阻害もしくは利用する。呼吸器疾患の原因であるヒトパラインフルエンザウイルス (hPIV) においては、アクセサリータンパク質のひとつである C タンパク質が病原因子として知られており、宿主因子 Signal Transducers and Activator of Transcription 1 (STAT1) と結合することで自然免疫を回避する。その一方で、Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) 関連因子 Alix と結合すると、細胞膜表面より感染性ウイルス粒子が産生される。最近、当研究グループは、マウス PIV であるセンダイウイルス (SeV) を用いて、C タンパク質の構造を、X 線結晶構造解析より明らかにした。本研究では、C タンパク質とこれら宿主因子 (STAT1 および Alix) との結合を阻害する化合物を探索し、C タンパク質に対する構造活性相関を明らかにすることで、SeV や hPIV に対する薬剤を開発することを目的とした。

**【方法】** C タンパク質と STAT1 との間の結合を阻害する化合物を探索するため、それぞれのペプチド末端に蛍光タンパク質を結合させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したアッセイ法を開発し、バリデーションを実施した。このアッセイ法を用い、東京大学創薬機構が保有する化合物ライブラリーから、阻害剤をスクリーニングした。

**【結果と考察】** FRET に基づくアッセイ法は、有色化合物を用いたスクリーニングには適さないが、極めて高い精度をもつことから、非有色化合物に対する優れたアッセイ方法であることが示された。また、このスクリーニングにより 20 個の候補化合物が得られた。今後は、それぞれの化合物の結合様式を明らかにし、より強力な阻害剤開発を行う予定である。

#### Development of an anti-Sendai virus drug targeting on the accessory protein

○Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba, Takashi Irie, Takemasa Sakaguchi  
(Grad. Sch. Biomed. Sci., Hiroshima Univ.)

**Key words** inhibitor, screening, antiviral

## 3P-1p069 4-aminocinnamic acid の発酵生産システムの構築

○皆川一, 梶尾 俊介, 周 勝敏, 高谷 直樹  
(筑波大・生命環境)  
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景】芳香族アミンは、色素、医薬品あるいはポリマーの原料などとして広く利用できる産業上有用な化合物である。本研究では、芳香族アミンの一種である 4-aminophenylalanine (4APhe) の発酵生産及び 4APhe から 4-aminocinnamic acid (4ACA) へのバイオコンバージョンに成功している。また、この 4ACA を原料として既存のバイオポリマーよりも優れた耐久性及び耐熱性を示す新たなバイオポリマーを開発した。本研究では、このバイオポリマーの産業上の利用可能性をさらに高めることを目指して、ジャーファーメンターを用いた大量培養によって 4APhe 及び 4ACA の大量生産を試みた。

【方法・結果】(1) 4APhe の発酵生産: *Pseudomonas fluorescens* 由来の *papABC* 遺伝子を高発現させた大腸菌をジャーファーメンターを用いて 100 L スケールで培養したところ、グルコースを原料として 280 g の 4APhe を培養上清中に生産できた。得られた 4APhe を陽イオン交換樹脂に吸着・回収・濃縮することによって、4APhe の結晶 (108 g, 収率 39%) 及び濃縮液 (96 g, 収率 34%) を得ることができた。(2) 4APhe から 4ACA へのバイオコンバージョン: 濃縮液の一部を逆相カラムでさらに精製し、23.4 g の 4APhe を得た。これを *Rhodotorula glutinis* 由来の Phenylalanine ammonia lyase を高発現させた大腸菌の休止菌体 300 g (湿菌体重量) とジャーファーメンター内で反応させ、反応後の上清中に 22.5 g の 4ACA を得た (収率 96%)。さらに、溶媒抽出・再結晶により純度の高い結晶を得ることができた。得られた 4ACA はポリアミドとポリイミドへの重合も可能であった。

## Fermentative production of 4-aminocinnamic acid

○Hajime Minakawa, Shunsuke Masuo, Shengmin Zhou, Naoki Takaya  
(Faculty of Life & Environ. Sci., University of Tsukuba)

**Key words** aromatic amine, biopolymer, fermentation

## 3P-1p070 光学活性ジカルボン酸モノアミド生産に有用な新規微生物イミダーゼ

○間中 千尋, 光川 侑輝, 志澤 宏明, 日比 慎, 高橋 里美, 小川 順  
(京大院・農)  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

## 【背景と目的】

光学活性ジカルボン酸モノアミドは医薬品合成において重要なキラル原料として利用されており、その実用的生産法としてイミド代謝酵素を用いたバイオプロセスが検討されてきた。例えば、環状イミドの開環加水分解反応を触媒してジカルボン酸モノアミドを生成する酵素としてイミダーゼが知られている。立体選択性や部位特異性の高いイミダーゼを利用することで、プロキラルな環状イミドより光学活性ジカルボン酸モノアミドの生産が可能となる。本研究ではイミダーゼを触媒として用いる事で、抗癌剤など複数の医薬品の原料となる *cis*-5-norbornene-*exo*-2,3-dicarboxylic acid monoamide (NDM) の生産法の開発を目指した。

## 【結果】

*cis*-5-norbornene-*exo*-2,3-dicarboximide (NDI) を基質とするイミダーゼ活性を持った微生物を探索した。約 1,300 株の土壌分離微生物を用いたスクリーニングの結果、*Mesorhizobium* sp. A9-2-3 株において NDI に対するイミダーゼ活性が確認できた。本菌株は立体選択的なイミダーゼ活性を保持しており、最大で 97% e.e. の光学活性 NDM を生成することが確認された。また本菌株のイミダーゼ活性は培養時に環状イミド化合物を添加することで特異的に誘導発現された。*Mesorhizobium* sp. A9-2-3 株の保持するイミダーゼを同定するため、本菌株のドラフトゲノム解析とプロテオーム解析を実施した。誘導時と非誘導時における発現タンパク質の差を比較する事で、*N*-methylhydantoinase (*N*-MH) のサブユニットをコードする 2 つの遺伝子が候補として選別された。*N*-MH の組換え大腸菌を用いた反応において NDI から NDM の生成が確認されたことから、この *N*-MH が NDI イミダーゼ活性の本体であることが明らかになった。現在、*N*-MH の詳細な機能解析を目指し、精製酵素を用いた基質特異性や補酵素要求性などに関して調査を行っている。

## Novel microbial imidase useful for the production of optically active dicarboxylic acid monoamide

○Chihiro Kenchu, Yuuki Mitsukawa, Hiroaki Shizawa, Makoto Hibi,  
Satomi Takahashi, Jun Ogawa  
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** *Mesorhizobium* sp., *N*-methylhydantoinase, chiral cyclic monoamide

3P-1p071 タンデム酵素反応を利用した *S*-アルキルシステインスルフォキシド生産のためのバイオプロセス開発

日比 慎, ○松岡 智里, 飯星 貴幸, 小園 祥子, 高橋 里美, 小川 順  
(京大院・農)  
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

ネギ属やアブラナ属の食用植物に著量含まれる *S*-アルキルシステインやそのスルフォキシドは抗酸化・抗肥満・疾病改善作用など多彩な機能性を秘めた含硫アミノ酸である。これらの含硫アミノ酸の産業的な生産法としては植物体からの抽出が挙げられるが、その含有率の低さに起因する高い生産コストや低い純度が問題点である。そこで新規なバイオプロセスによる含硫アミノ酸の産業的な生産法の確立が必要とされる。本研究で発見した *Bacillus thuringiensis* 2e2 株由来のジオキシゲナーゼ IDO は、*S*-アルキルシステインの立体選択的なスルフォキシド化を触媒するが、*S*-アルキルシステインが原料として高価である点が問題となっている。一方で *S*-アルキルシステインに関しては、cysteine desulphhydrase (CD) が触媒する加水分解反応の逆反応の利用によって、ピルビン酸・アンモニア・アルキルメルカプタンから生成可能であるが、その効率は非常に低い (*S*-アルキルシステインの場合で 0.36 mM)。そこで本研究では CD と IDO のタンデム酵素反応による新たなバイオプロセスを考案した。本バイオプロセスにおいては、まず CD の作用により安価な化合物から *S*-アルキルシステインがキラル合成され、次いで速やかに IDO の作用を受けてキラルスルフォキシド化される。通常加水分解側に片寄る CD 反応を、不可逆な IDO 反応と共役することで、本バイオプロセス全体では *S*-アルキルシステインスルフォキシドの合成側へと反応を進行させることが可能となる。これまでにピルビン酸・アンモニア・アリルメルカプタンを基質としたタンデム酵素反応によって、光学活性 *S*-アリルシステインスルフォキシド (+)-alliin を 11 mM 生産することができた。今後は基質特異性の異なる CD を探索・利用する事で、生産可能な *S*-アルキルシステインスルフォキシドの分子種多様化を進めていく。

Bioprocess development of *S*-alkyl cysteine sulfoxides by the tandem enzyme reaction

Makoto Hibi, ○Chisato Matsuoka, Takayuki Iihoshi, Shoko Kozono,  
Satomi Takahashi, Jun Ogawa  
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

**Key words** cysteine desulphhydrase, dioxygenase, *S*-alkyl cysteine sulfoxides, alliin

## 3P-1p072 出芽酵母における褐藻類由来糖質(アルギン酸とマンニトール)の代謝機構

松岡 史也<sup>1</sup>, 柏原 貴幸<sup>1</sup>, 平山 誠<sup>1</sup>, 田中 秀樹<sup>1</sup>, 佐藤 潤季<sup>1</sup>,  
橋本 渉<sup>1</sup>, 村田 幸作<sup>2</sup>, ○河井 重幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>摂南大・理工)  
kawais@kais.kyoto-u.ac.jp

海洋バイオマスのうち、藻体が巨大で生育速度も速く著量の糖質(マンニトールと高分子アルギン酸)を含む褐藻類は、広大な海域を有する我が国にとって有望な糖質(微生物発酵の基質)源である。他方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は優良な発酵微生物であるが、そもそも出芽酵母はアルギン酸とマンニトールを資化しない。

我々は、出芽酵母によるアルギン酸とマンニトール代謝に焦点を当てた研究を進めている。マンニトール資化に関しては、出芽酵母が Tup1-Cyc8 コリプレッサー遺伝子への自然変異に依存した経路、あるいは非依存経路によりマンニトール資化能を自然に獲得する現象を見出している<sup>1)</sup>。また、マンニトール資化に必要な *HXT17/DSF1* の強制発現によってもマンニトール資化能を付与できることが報告されている<sup>2)</sup>。

アルギン酸代謝に関しては、DEH (エキソ型アルギン酸リアーゼによるアルギン酸の分解産物) の資化に要する 4 つの遺伝子出芽酵母ゲノム DNA への導入により、DEH 資化酵母を作出した。*HXT17/DSF1* の強制発現によるマンニトール資化能の付与方法の優位性を確認した上で、本法によりマンニトールと DEH の両方を資化できる株を構築した。さらに、DEH 培地での馴養により、DEH 資化能の増強した Mtl+DEH++株を取得した。他方、Tup1-Cyc8 非依存経路によるマンニトール資化能獲得におけるプリオンの関与も示した。現在、Mtl+DEH++株を用いて、DEH 代謝ならびに DEH 資化能増強(馴養)機構の解明、DEH からエタノール等の生産、エキソ型アルギン酸リアーゼの細胞外発現によるアルギン酸を資化できる出芽酵母株の構築などを目指している。本発表では、これらに関して現状と課題を報告する。また、プリオンによるマンニトール資化能の獲得にも触れる。

<sup>1)</sup> *Appl. Environ. Microbiol.* 81:9-16 (2015). <sup>2)</sup> *Nature* 505:239-243 (2014).

Metabolism of alginate and mannitol, sugars from brown macroalgae, in *Saccharomyces cerevisiae*

Fumiya Matsuoka<sup>1</sup>, Takayuki Kashiwara<sup>1</sup>, Makoto Hirayama<sup>1</sup>, Hideki Tanaka<sup>1</sup>,  
Hiroyuki Sanagi<sup>1</sup>, Wataru Hashimoto<sup>1</sup>, Kousaku Murata<sup>2</sup>, ○Shigeyuki Kawai<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, mannitol, alginate, prion

### 3P-1p073 Effect of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production

○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Over the last few decades, the rising global warming and crisis of fossil fuels have increased the usage of alternative fuels. Hydrogen gas is a clean alternative energy and generates only water vapor as by-product of combustion and has drawn attention worldwide. Biological hydrogen production through anaerobic digestion is an attractive process because of its environmental-friendly and economical nature. Nevertheless, it has certain drawbacks like low hydrogen production, availability and cost of substrates. On the other hand, conventional fixed-bed was used in methane fermentation, which improved the efficiency of methane production effectively. However, the research about the usage of fixed-bed in the hydrogen fermentation is limited. Therefore, in this study, a series of experiment with three different bedding materials including loofah sponge (LS), chlorinated polyethylene (CPE) and porous nylon (PN) and without bedding materials as the control was carried out. Fermentation was set at pH 5 and 35 °C under anaerobic conditions. As the result, CPE bioreactor showed the best performance compared to PN, LS and control reactor. Conclusively, the CPE fixed-bed bioreactor has the capacity to show better performance compared to reactor without fixed-bed and it could be could be a promising system for higher bio-hydrogen production.

#### Effect of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production

○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** fixed-bed bioreactor, bio-hydrogen production, fermentation

### 3P-1p074 Semi-continuous anaerobic digestion under illumination condition for mitigating ammonia inhibition

○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Haoyuan Gao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Anaerobic digestion is a promising method to deal with livestock waste. However, ammonia acts as a strong inhibitor during anaerobic digestion. Conventional anaerobic digesters are operated under dark conditions, but it has been reported that optimal illumination time on anaerobic reactor activates methanogens efficiently. In our previous study, intermittent illumination method proved to be efficient in mitigating ammonia inhibition with batch operation. Therefore, in this study, a long-term 118-day semi-continuous anaerobic digestion with illuminated system under ammonium-rich condition was carried out under thermophilic condition (55°C) to discuss the practical effect of intermittent illumination on mitigating ammonia inhibition. The results showed that the illuminated bioreactor achieved higher and more stable methane concentration and methane yield than dark condition during anaerobic digestion. The ATP value and microscopic study revealed that illumination improved the activity and the immobilization ability of the microorganisms, respectively. The results indicated that the optimal intermittent process contributed to high efficiency and stability of the ammonia-rich anaerobic digestion process with long-term operation.

#### Semi-continuous anaerobic digestion under illumination condition for mitigating ammonia inhibition

○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Haoyuan Gao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** Ammonia inhibition, intermittent illumination, semi-continuous anaerobic digestion

### 3P-1p075 バイオマスを原料としたフェニルプロパノイドの発酵生産

○佐々倉 有麻<sup>1</sup>, 榊尾 俊介<sup>2</sup>, 高谷 直樹<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大)  
takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【目的】** フェニルアラニンを前駆体として生合成される 2-phenylethanol (2-PE) や cinnamic acid (CA) などの芳香族化合物は香料や医薬品などとして広く利用されている産業上重要な化合物である。これら化成品をバイオマスから生産するバイオリアリー技術は資源の枯渇や環境問題への対応策として期待される。そこで、本研究では発現宿主として汎用性の高い *Escherichia coli* と安全でタンパク質高分泌能を持つ *Aspergillus oryzae* を用いこれらの化合物をバイオマスから生産することを目的とした。

**【方法・結果】** 異種タンパク高生産菌である *A. oryzae* NSID-ΔP10 および *A. oryzae* AUT1-ID-v10-sD にフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)をコードする *Rhodotorula glutinis* の PAL 遺伝子を導入した形質転換体を得た。これらをフェニルアラニンを含む培地を用いて培養したところ、最大で 0.12 g/L の CA が培地中に生産された。同じ *A. oryzae* 宿主に 2-PE 生合成に関わるフェニルピルビン酸炭酸酵素(PPD)をコードする *A. oryzae* の ppdA を高発現させ、フェニルアラニンを含む培地で培養した場合には、2-PE の生産はみられなかった。一方、フェニルアラニン生産菌である NST37(DE3)に *Saccharomyces cerevisiae* の PPD (ARO10) およびシキミ酸経路に関わる *E. coli* 由来の *aroG* と *pheA* を導入し高発現させ 2-PE 生産菌を得た。さらにこの菌株による 2-PE の生産性を向上させるため、フェニルアラニンの生合成に関わるアミノトランスフェラーゼ遺伝子の遺伝子破壊株(*AtyrB*, *AtyrBΔaspC*, *AtyrBΔaspCΔilvE*)を作製し培養した。その結果、*AtyrB* 株を用いた場合に最も多くの 2-PE の生産が見られた。この株をジャーファーメンターを用いて流加培養したところ、グルコースを原料として 1.45 g/L の 2-PE を生産することができた。これは、大腸菌を用いた 2-PE 生産としては最大の値であった。

#### Fermentative production of phenylpropanoid from biomass

○Yuma Sasakura<sup>1</sup>, Shunsuke Masuo<sup>2</sup>, Naoki Takaya<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Univ. Tsukuba)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli*, fermentation, phenylethyl alcohol

### 3P-1p076 Study on the intermittent illumination to mitigate ammonia inhibition under mesophilic condition

○Haoyuan Gao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

With the boom of population, the demand for meat is increasing, and the quantity of livestock waste is also on the rise. Anaerobic digestion is proved to be effective method to deal with livestock waste. Normally, anaerobic digestion is operated under dark conditions, but some researchers have shown that intermittent illumination for 60 min/d in anaerobic digestion can increase the biogas production significantly. However, until now, these researches have been carried out only under thermophilic conditions. Therefore, the objective of this research is to investigate intermittent illumination in anaerobic digestion under mesophilic condition. Batch experiments were carried out in fixed bed bioreactor. From the results intermittent illumination increased the methane production by 20% comparing with control. The ammonia inhibition could be mitigated effectively with the assistance of intermittent illumination. Moreover, ATP value of microorganism in bioreactor and VS removal was higher under intermittent illumination condition. The results indicate that, intermittent illumination of anaerobic digestion was also effective under mesophilic condition in terms of methane production and mitigation of ammonia inhibition.

#### Study on the intermittent illumination to mitigate ammonia inhibition under mesophilic condition

○Haoyuan Gao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** Illumination, ammonia inhibition, mesophilic condition

### 3P-1p077 Development of bioprocess with designed biomass: Design of rice straw hydrolysate for efficient butanol production without carbon catabolite repression

○Tao Zhao<sup>1</sup>, Yukihiko Tashiro<sup>1</sup>, Takuya Noguchi<sup>1</sup>, Jin Zheng<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Univ. Sci. Technol. Beijing, <sup>3</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)  
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

Designed biomass study is defined as an approach to design biomass substrates to fit an established efficient fermentative process<sup>(1)</sup>. To date, there is no report on implementing this approach for butanol fermentation. Previously, we have established a butanol fermentation process without carbon catabolite repression (CCR) by using cellobiose and xylose<sup>(2)</sup>. Thus, we aimed to design rice straw hydrolysate for efficient butanol production without CCR.

The effects of pretreatment (NaOH and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and hydrolysis [cellulase mixture, β-glucosidases (β-G)] on sugar compositions in rice straw hydrolysates were investigated. Pretreatment using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yielded higher concentrations of both pentose (xylose, arabinose) and hexose (glucose, cellobiose) sugars in hydrolysate than that using NaOH. In addition, cellobiose-rich hydrolysate with glucose and xylose were obtained by only cellulase mixture while hydrolysis by cellulase mixture and additional β-G gave glucose-rich hydrolysate with xylose. Cellobiose-rich hydrolysate successfully eliminated CCR in butanol fermentation but glucose-rich hydrolysate did not. Furthermore, by optimizing a dosage of cellulase mixture, butanol yield based on enzyme dosage was improved drastically from 0.00182 g/unit enzyme in glucose-rich hydrolysate to 0.174 g/unit enzyme in cellobiose-rich hydrolysate. Thus, we successfully designed rice straw hydrolysate for efficient butanol production.

Ref. (1) J Biotechnol, 156, 286-301, 2011. (2) J Biosci Bioeng, 116, 716-721, 2013.

### Development of bioprocess with designed biomass: Design of rice straw hydrolysate for efficient butanol production without carbon catabolite repression

○Tao Zhao<sup>1</sup>, Yukihiko Tashiro<sup>1</sup>, Takuya Noguchi<sup>1</sup>, Jin Zheng<sup>2</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Univ. Sci. Technol. Beijing, <sup>3</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)

**Key words** designed biomass, carbon catabolite repression, rice straw, butanol fermentation

### 3P-1p078 実験室進化とオミクス解析によるイソプロパノール耐性大腸菌の育種

○堀之内 貴明<sup>1</sup>, 酒井 亜希<sup>1</sup>, 田辺 久美<sup>1</sup>, 古澤 力<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>理研・生命システム, <sup>2</sup>東大院・理)  
takaaki\_horinouchi@riken.jp

**【目的】**近年、環境調和型生産技術として微生物によるバイオアルコール生産に関する研究が盛んにおこなわれている。中でもイソプロパノール (IPA) はプロピレン原料として有望であり、微生物による生産が試みられているが、IPAの蓄積は生育や生産の阻害を引き起こすことが問題となる。そこで本研究では大腸菌を用い、IPA存在下での実験室進化による耐性株の取得と、オミクス解析による耐性化に寄与する情報の取得を行い、親株へのIPA耐性の賦与を目指した。

**【結果】**本研究では複数のIPA濃度の培地を用意し、それら全てに大腸菌を植菌し、増殖可能であった最大IPA濃度の菌体を選択して次の培地に植菌するというサイクルを繰り返すことによりIPA耐性菌を取得した。こうした進化実験を6つの系列について24日間行ったら、全ての系列において増殖速度ならびに増殖可能IPA濃度の上昇が観察された。次にこれらの株について全ゲノム変異解析とトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、*relA*と*marC*への変異が6株中3株において見出された。このうち*marC*について、変異があった3株のうち2株ではORF全域が欠損しており、残り1株ではフレームシフト変異が生じていたことから、*marC*の機能欠失がIPA耐性と関係していると考え、親株の*marC*を欠損させたところ、IPA耐性が向上した。またトランスクリプトーム解析の結果からいくつかの*marC*酸生成経路の発現量上昇が観察され、培地中へのそれらのアミノ酸の添加によりIPA耐性の向上が見られた。これらの知見を組み合わせ、*marC*欠損株にアミノ酸を添加したところ、IPA耐性がさらに向上した。*marC*への変異はブタノールなど他の短鎖アルコール類の耐性への関与が報告されていることから、我々が取得した株のさまざまなアルコールに対する耐性も解析しており、ポスターではその結果についても議論する。

### Breeding of iso-propanol tolerant *Escherichia coli* by experimental evolution and omics approach

○Takaaki Horinouchi<sup>1</sup>, Aki Sakai<sup>1</sup>, Kumi Tanabe<sup>1</sup>, Chikara Furusawa<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>QBiC, RIKEN, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

**Key words** *Escherichia coli*, iso-propanol, evolutionary engineering, omics analysis

### 3P-1p079 Widely targeted metabolic profiling for improvement of 1-butanol-producing *Synechococcus elongatus*

○Artnice Mega Fathima<sup>1</sup>, Walter Lavina<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, James Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)  
artnicemega@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Direct conversion of CO<sub>2</sub> to biofuel using cyanobacteria is a promising alternative solution of an energy supply for a carbon neutral society. Recently, 1-butanol has received significant attention to displace gasoline for its high energy density, and is less corrosive for current infrastructure. *Synechococcus elongatus*, capable of producing 1-butanol, BUOHSE strain, was already developed by means of molecular biological tactics. However, the current production titer is still low, thus further optimization of the pathway is needed. Previous analysis of BUOHSE strain using quantitative target analysis and kinetic profiling of acyl-CoAs by LCMS revealed one of the rate limiting step in 1-butanol biosynthesis pathway. This result strongly demonstrated the power of metabolomics as a tool for seeking the bottleneck in the pathway. In order to broaden the coverage of metabolites that can be analyzed, widely targeted profiling of central metabolism has been performed. By using IP-RP-LC/QqQ-MS system, 74 metabolites in central metabolism were successfully annotated. Based on widely targeted analysis, TCA cycle is up-regulated in BUOHSE strain compared to low 1-butanol producing strain (EL22). Increasing acetyl-CoA pool to malonyl-CoA in 1-butanol biosynthesis pathway may lead to another strain improvement strategy. The metabolic information obtained in this study will be useful for future studies on 1-butanol production or other important chemicals production using engineered cyanobacteria.

### Widely targeted metabolic profiling for improvement of 1-butanol-producing *Synechococcus elongatus*

○Artnice Mega Fathima<sup>1</sup>, Walter Lavina<sup>1</sup>, Sastia Prama Putri<sup>1</sup>, James Liao<sup>2</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

**Key words** cyanobacteria, butanol, metabolomics

### 3P-1p080 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来転写因子 Lrp の標的遺伝子の網羅的探索

○石井 友理<sup>1</sup>, 赤坂 直紀<sup>2</sup>, 佐古田 久雄<sup>3</sup>, 秀瀬 涼太<sup>1</sup>, 阿部 達明<sup>3</sup>, 兼崎 友<sup>4</sup>, 石川 森夫<sup>3</sup>, 貝沼 (岡本) 章子<sup>3</sup>, 藤原 伸介<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>関西学院大院・理工, <sup>2</sup>マルカン酢, <sup>3</sup>東京農大・応生科醸造, <sup>4</sup>東京農大・ゲノムセンター)  
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

食酢製造工程において、酢酸菌は細胞膜結合型脱水素酵素によりエタノールを酸化し、食酢主成分である酢酸を産生する。このエタノール酸化は酢酸菌における電子伝達系であり、エネルギー生産の大部分を同代謝に依存する酢酸菌にとって、極めて重要な基幹代謝である。これまでに、酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来 Lrp (KeLrp, 大腸菌 Leucine responsive regulatory protein のオルソログ) が分岐鎖アミノ酸およびメチオニン代謝遺伝子群の発現を制御し、細胞内における同アミノ酸群やポリアミンの恒常性維持に関与することが明らかにされた<sup>1,2,3)</sup>。また、KeLrp 完全欠損株は野生株と比較して著しい生育遅延を示すが、転写量解析により合成の停滞および不足が予測された代謝産物(分岐鎖アミノ酸、メチオニンおよびスベルミジン等)を培養液に添加しても、同株の生育遅延は完全には解消されなかった。このことから、KeLrp は上記代謝経路だけでなく、中枢代謝や電子伝達系等、酢酸菌の生存にとって必須な基幹代謝の調節にも関与することが示唆された。これらを踏まえ、本研究では、KeLrp 標的遺伝子群を網羅的に同定し、同転写因子制御下にある代謝経路を解明するため、*K. europaeus* 野生株および KeLrp 完全欠損株の mRNA を供試し、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq 法を実施した。現在、完全欠損株において顕著な発現量変動が見られた遺伝子群を絞り込み、それらの発現動態変化に伴う代謝変動を特定する事で、KeLrp の機能を包括的に解析している。

1) Akasaka, N. et al., J. Biosci. Bioeng. 118, 607-615 (2014)  
2) Ishii, Y. et al., Appl. Environ. Microbiol. 81, 2265-2273 (2015)  
3) 井井ら: 2015年度日本生物工学会大会

### Screening for genes under the control of a leucine responsive regulator in acetic acid bacteria

○Yuri Ishii<sup>1</sup>, Naoki Akasaka<sup>2</sup>, Hisao Sakoda<sup>2</sup>, Ryota Hideki<sup>1</sup>, Tatsuaki Abe<sup>3</sup>, Yu Kanesaki<sup>4</sup>, Morio Ishikawa<sup>3</sup>, Akiko Okamoto-Kainuma<sup>3</sup>, Shinsuke Fujiwara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., <sup>2</sup>Marukan Vinegar Co., Ltd., <sup>3</sup>Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., <sup>4</sup>Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric)

**Key words** acetic acid bacteria, leucine responsive regulatory protein, RNA-seq, metabolic pathway

### 3P-1p081 担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成初期に発現するタンパク質の探索およびその機能解析について

○酒井 杏匠<sup>1</sup>, 相島 奈央<sup>2</sup>, 村口 元<sup>3</sup>, 吉田 誠<sup>3</sup>, 志水 元亨<sup>1</sup>, 加藤 雅士<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名城大院・農, <sup>2</sup>秋田県立大・生物資源, <sup>3</sup>東京農工大・農)  
kiyota9356@gmail.com

#### 【目的】

担子菌は、光や温度など環境変化に応じて菌糸体から子実体への形態変化を行う。このため、細胞分化および形態形成機構を解明するにあたり、担子菌は極めて興味深いターゲットであると考えられる。しかしながら、担子菌の子実体形成機構については完全に解明されていない。担子菌 *Coprinopsis cinerea* は、ゲノムプロジェクトが完了していることや短期間で子実体が形成されることから、担子菌類のモデル生物として用いられている。本研究では、プロテオーム解析で子実体に特異的に発現するタンパク質を探索し、さらにそれらの機能について解析した。

#### 【方法・結果】

*C. cinerea* を MYG 培地に接種して3日間(30℃)暗所下にて培養した。既報に従い4日目からは12時間の明暗サイクルで培養し子実体形成を誘導した。菌糸体および形成初期の子実体からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行なったところ、それぞれ300を超えるスポットが検出された。それらの中で菌糸体に特異的に発現するものを30スポット、子実体に特異的に発現するものを41スポット見出した。これらのスポットを切り出しトリプシン処理後、MALDI-TOF/TOF-MSによって得られた質量スペクトルから、MASCOTサーチを行なうことでタンパク質の同定を行った。形成初期の子実体で同定されたものには、子実体特異的に発現することが知られているセブチンやガレクチンが含まれていた。さらに、形成初期の子実体に特異的に発現していた機能未知のタンパク質についてはリコンビナントタンパク質を調製した。現在、その機能を解析している。

#### Proteome analysis at the different developmental stages of *Coprinopsis cinerea*

○Kiyota Sakai<sup>1</sup>, Nao Aishima<sup>1</sup>, Hajime Muraguchi<sup>2</sup>, Makoto Yoshida<sup>3</sup>, Motoyuki Shimizu<sup>1</sup>, Masashi Kato<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Meijo Univ., <sup>2</sup>Akita Prefectural Univ., <sup>3</sup>Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

**Key words** *Coprinopsis cinerea*, fruiting body, proteomics

### 3P-1p082 メタボロミクスに基づく *Saccharomyces cerevisiae* の連続培養におけるエタノール生産の低減

○井村 誠<sup>1</sup>, 岩切 亮<sup>1</sup>, 馬場 健史<sup>2,3</sup>, 福崎 英一郎<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>興人ライフサイエンス, <sup>2</sup>九大・生医研, <sup>3</sup>阪大院・工)  
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は食品分野において必要不可欠な微生物である。しかしながら、この酵母はクラブツリー効果が陽性であるため、十分に酸素を供給しているにも関わらず、高い増殖速度では副生成物としてエタノールを生産する。加えて、このクラブツリー効果について詳細な機構は未だ明らかになっていない。そのため、物質生産の現場ではエタノールを生産させないために、糖の流入を制限した流加培養や希釈率を制限した連続培養が行われてきたが、これらの培養方法では生産量が低下してしまう。そこで、本研究では代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスに基づいて *S. cerevisiae* NBRC101557 における連続培養でのエタノール生産の低減に取り組んだ。連続培養中の *S. cerevisiae* は希釈率 (D) を 0.05 から 0.30 まで上昇させると、バイオマス形成 ( $D \leq 0.20$ ) からエタノール生産 ( $D = 0.30$ ) へと表現型が変わるので、この表現型の変化に応じて代謝物のプロファイルも異なることが予測できた。これより、様々な希釈率より取得した酵母抽出物におけるメタボローム解析を GC/MS によって実施した。希釈率に応じて一様に増減している代謝物や表現型の変化に伴い蓄積に差が見られる代謝物がエタノール生産を低減できる可能性があるため、得られた分析結果からいづれかの条件を満たしていたトレハロース、オルニチン、フマル酸、リンゴ酸、リンゴ酸をそれぞれ培地中に 100 mg/L となるように添加し、連続培養の定常期にて培養上清中のエタノール濃度を測定した。その結果、無添加の培地の場合と比較して、フマル酸やリンゴ酸を添加した培地では培養上清中のエタノール濃度をそれぞれ 5.9、3.4% 低減することに成功した。

#### Metabolomics approach toward ethanol reduction in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*

○Makoto Imura<sup>1</sup>, Ryo Iwakiri<sup>1</sup>, Takeshi Bamba<sup>2,3</sup>, Eiichiro Fukusaki<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>KOJIN Life sciences Co., Ltd., <sup>2</sup>Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** metabolic analysis, continuous culture, Crabtree effect

### 3P-1p083 ゲノミクスとトランスクリプトミクスを用いた麹菌変異株の変異点の同定と解析

○吉村 太郎<sup>1,2</sup>, 和田 洋樹<sup>1,2</sup>, 松田 俊文<sup>2</sup>, 佐藤 敦史<sup>1</sup>, 小川 真弘<sup>1,3</sup>, 松島 健一朗<sup>1</sup>, 小山 泰二<sup>1,3</sup>, 伊藤 孝太郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>キッコーマン, <sup>2</sup>キッコーマン食品, <sup>3</sup>野田産研)  
tyoshimura@mail.kikkoman.co.jp

しょうゆ製造における麹菌の主な役割は、諸味中でタンパク質や糖質を可溶化させるために必要な糖質・タンパク質の加水分解酵素を生産することである。近年では、この高い加水分解酵素の生産性がバイオマス利用の分野でも注目されている。このため、麹菌における加水分解酵素分泌能の向上は、しょうゆの利用率向上のみならずバイオマス利用分野への展開においても重要である。我々は、当社保有の麹菌変異株ライブラリーの中に、様々な加水分解酵素の分泌能が増加する変異株を見出した。一方、近年は次世代シーケンサーの発達によりゲノム解析が迅速・安価に行えるようになってきている。当社でも 2011 年に *A. sojae* NBRC4239 のゲノム解析を実施している。そこで、先の変異株のゲノム配列を解析し比較することで、加水分解酵素の分泌能が増加する原因解明を試みた。変異株のゲノム解析を実施し、変異株特有の遺伝子機能の欠損や喪失を招く可能性が高い変異点を抽出して、変異の再現を行った。その結果、ある遺伝子のアミノ酸置換を伴う変異を再現すると、変異株と同様にプロテアーゼやアミラーゼ等、各種加水分解酵素の活性が向上した。本遺伝子は、様々な分泌型の加水分解酵素の活性に関与する特徴から Regulator of Secretory Enzymes A (RseA) と命名した。続いて、*rseA* 遺伝子を破壊した結果、破壊株でも同様に加水分解酵素活性が対照株と比べて増加した。これらの効果は、*A. oryzae* でも同様であった。次に、変異再現株の遺伝子発現解析を行った結果、様々な加水分解酵素の遺伝子発現量が向上しており、さらに、それらを制御する転写因子の発現も上昇していた。以上の結果から、RseA の機能欠失は、各転写制御因子の転写量を上昇させ、その下流の酵素タンパク質の遺伝子発現が誘起されることにより、各種加水分解酵素活性が向上することを明らかにした。

#### Analysis of genomic mutation site in *Aspergillus sojae* mutant using comparative genomics and transcriptomics

○Taro Yoshimura<sup>1,2</sup>, Hiroki Wada<sup>1,2</sup>, Toshifumi Matsuda<sup>2</sup>, Atsushi Sato<sup>1</sup>, Masahiro Ogawa<sup>1,3</sup>, Kenichiro Matsushima<sup>1</sup>, Yasuji Koyama<sup>1,3</sup>, Kotaro Ito<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Kikkoman Corp., <sup>2</sup>Kikkoman Food Products Company, <sup>3</sup>Noda Inst. Sci. Res.)

**Key words** *Aspergillus sojae*, comparative genomics, hydrolase, gene regulation

### 3P-1p084 バイオ医薬生産に向けた CHO 細胞培養情報データベースの構築

○許 漢修, 荒木 通啓, 蓮沼 誠久, 河野 愛子, 近藤 昭彦  
(神戸大院・科学技術イノベーション)  
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景と目的】次世代バイオ医薬である抗体医薬の実用化に向けて、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いたバイオ医薬の大量生産技術の開発が求められている。単一細胞の有効蛋白生産量の向上が期待されており、そのために外来蛋白質の生産である細胞の代謝を解析することは重要であると考えられる。本研究では CHO 細胞培養の培地内、細胞内、そして遺伝子発現の情報を統合的な解析を行った。

【方法】LC/MS、HPLC、および次世代シーケンサー(NGS)解析を用い、基盤情報としての迅速に統合・解析する情報解析プラットフォーム並びにデータベース構築から、CHO 細胞の培養条件の改良や高生産化に関わる分子機構の解明を目的とした解析・評価を行った。高精度なハイスループットのオミクスデータ解析基盤を構築するため、時系列データの相関係数計算を行い、公共データを併用し、抗体生産並びに細胞増殖に関わる糖・アミノ酸・エネルギー代謝を中心に代謝経路マップを作成した。得られた結果を当研究室独自開発の代謝パスウェイ上に視覚化し、トランスクリプトーム・メタボロームの時系列データの統合解析システムを構築した。

【結果と考察】データベースの高度化を行い、システム解析を通じて生産性指標・プロファイルの同定ならびに遺伝子・代謝物の相関を明らかにした。網羅的システム解析をもとにしたデータ駆動型のアプローチにより、様々な培養条件下におけるトランスクリプトーム・メタボロームの特徴を抽出することができた。実際に、各濃度の乳酸添加の培地で培養した CHO 細胞内部及び外部(培地内)の代謝物、遺伝子発現、アミノ酸などの時間的な変化を解析した。このアプローチは、統合解析システムとしてプラットフォームの開発を可能にし、新たな作業仮説を産み出していく上で意義あるものと考えられる。

#### Development of an integrative data analyzing system for bio-pharmaceutical CHO cell culture profile

○Han-Hsiu Hsu, Michihiro Araki, Tomohisa Hasunuma, Aiko Kono, Akihiko Kondo  
(Sci. Tech. Innov., Grad. Sch., Kobe Univ.)

**Key words** CHO cell, Biopharmaceutics, Omics analysis, Next-generation sequencing

**3P-1p085 ハッサク葉のストレス応答反応における二次代謝物質の変動解析**

○伊佐木 芳<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1,2</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>近畿大院・生物理工・生物工, <sup>2</sup>近畿大・附属農場)  
 kajiyama@waka.kindai.ac.jp

**[目的]** カンキツ類は古くから世界的に栽培されている商業的価値の高い果樹で、果実の保存環境や、果実に含まれる代謝産物に関する研究が数多く行われてきた。一方で、果実以外の葉や枝に関する研究は少なく、特にこれらのストレス応答に関する研究はあまり例がない。我々はこれまでに、数種のカンキツ類の葉において、ストレス応答時に香氣成分や一次代謝成分が変動することを見出すとともに、ハッサクの葉からは新規傷害誘導性物質を単離・同定してきた。今回は、ハッサク葉に対する物理的傷害処理および、ストレス関連植物ホルモン処理を行い、これをLC/TOFMSを用いて分析することにより、防御応答に最も直接的に関与すると考えられる不揮発性二次代謝物質の傷害応答時における代謝変動を網羅的に解析することを目的とした。

**[方法および結果]** 近畿大学附属農場にて栽培されているハッサクの成熟葉を採取し、6 mm 間隔で刺傷を与えた。これを蒸留水に浮かべて25℃、常光下で一定時間培養した試料を傷害処理葉とした。また、採取直後に0.2 mMのSAおよびJA溶液に切断部を浸した状態で培養した試料をSAおよびJA処理葉とした。各処理葉を液体窒素中で破砕した後、メタノールを加えて懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清を回収して粗抽出液とした。各処理葉の抽出液をLC/TOFMSに供して得られたピークデータを多変量解析に供し、数種のストレス応答性ピークを見出した。現在、各処理に反応していると考えられるピークの解析を進めており、その結果も併せて報告する。

**Metabolomic analysis of stress related secondary metabolites in *Citrus hassaku* leaf**

○Kaoru Isaki<sup>1</sup>, Tetsuya Matsukawa<sup>1,2</sup>, Shin'ichiro Kajiyama<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Div. Biotechnol. Sci., Grad. Sch. Biol. Oriented Sci. and Technol., Kindai Univ.,  
<sup>2</sup>Experimental Farm, Kindai Univ.)

**Key words** *C. hassaku*, stress related compounds, metabolic analysis

**3P-1p086 和食固有素材摂取による生体応答プロファイリング**

益田 静香<sup>1</sup>, 嶋 秀明<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>2,3</sup>, 篠 阿弥宇<sup>2</sup>, 梶山 瑞穂<sup>1</sup>,  
 井上 能博<sup>1</sup>, 石戸 聡<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>2,3,4</sup>  
 (<sup>1</sup>昭和薬大・薬, <sup>2</sup>理研・環境資源科学研究セ, <sup>3</sup>横市大院・生医,  
<sup>4</sup>名大院・生命農学)  
 shima@ac.shoyaku.ac.jp

**[背景と目的]** 世界有数の長寿国である日本には和食文化が存在し、栄養バランス等の点から健康の維持・増進に寄与していると考えられている。一方、腸内細菌叢は宿主の免疫系にとって重要であり、食生活により多大な影響を受けることは周知の事実であるが、食生活の多様化とそれに伴った代謝変動の関係性については不明な点が多く、有用な評価法も乏しいのが現状である。そこで本研究では、和食固有素材の成分評価と、これらの摂取が腸内細菌叢をはじめとする体内環境に及ぼす影響を統合的に評価可能な生体応答評価法の構築を目的とした。

**[方法]** 和食固有素材であるワラビ・コゴモを一般的な方法で灰汁抜きし、凍結乾燥後に破砕したもの、およびこれらの構成成分であるセルロースを生理食塩水に懸濁させた。固形物懸濁液と生理食塩水投与群を設定し、週3回の経口強制給餌を2週間行った。給餌前・中・後それぞれ2週間で採取した糞便・尿・血液、およびワラビ・コゴモをNMRにより含有成分を解析した。また、ELISA法により、検体中のIgA・IgG等の抗体量の解析をした。

**[結果と考察]** 和食固有素材中に含まれる低分子および細胞壁成分をNMRにより網羅的に解析するとともに、それらを摂取した時の免疫および代謝応答を評価した。その結果、陰性対照群と和食固有素材投与群とで尿中成分に違いが生じ、その変化は摂取期間終了後も維持された。これらの代謝変化は、摂取変化に伴う腸内細菌叢の変動に起因し、期間後も元の状態には戻らない為、尿中代謝物にこのような影響を与えたという可能性が推測できる。さらに糞便中代謝変動、和食固有素材中成分および尿中代謝変動との関係性を統合的に評価することにより得られた最新の知見についても本会で議論した。

**Metabolic profiling in biological responses induced by Washoku intake**

Masuda Shizuka<sup>1</sup>, Hideaki Shima<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>2,3</sup>, Amiu Shino<sup>2</sup>,  
 Mizuho Kajikawa<sup>1</sup>, Yoshihiro Inoue<sup>1</sup>, Satoshi Ishido<sup>1</sup>, Jun Kikuchi<sup>2,3,4</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. pharmacy, Showa Pharmaceutical Univ., <sup>2</sup>CSRS,RIKEN, <sup>3</sup>Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** metabolism, microbiome, multivariate analysis

**3P-1p087 *Staphylococcus aureus* に注目したアトピー性皮膚炎の重症化メカニズムの理解**

○沖野 風沙<sup>1</sup>, 稲垣 瑞穂<sup>1</sup>, 佐藤 綾子<sup>1</sup>, 澤野 博之<sup>1</sup>, 坪内 美香<sup>1</sup>,  
 林 将大<sup>2</sup>, 田中 香お里<sup>2</sup>, 兼崎 友<sup>3</sup>, 吉川 博文<sup>3</sup>, 鈴木 徹<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>岐阜大・応生科, <sup>2</sup>岐阜大・生命科学総合研究支援センター, <sup>3</sup>東農大・応生科)  
 suzuki@gifu-u.ac.jp

**[目的]** 近年、皮膚微生物叢と皮膚疾患との関係が注目されている。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* はアトピー性皮膚炎 (AD) の炎症部に高頻度で検出され、多数の炎症性外毒素遺伝子を持つ株が多いことから、AD は *S.aureus* の感染症であると仮説を立てた。AD 患者と健康者の皮膚菌叢を解析し、さらに *S.aureus* の外毒素遺伝子の構成を明らかにすることで、AD の重症化と *S.aureus* との関係を探明することを目的とした。

**[方法]** AD 患者を含む学内外の約 150 名のボランティアに対し、肘の裏側を生理食塩水に浸した綿棒で拭き取り皮膚常在細菌を採取した。好気および嫌気条件下で菌を生育し、MALDI TOF-MS による菌種の同定を行った。さらに、*S.aureus* と同定された株について比較ゲノム解析を行った。

**[結果・考察]** MALDI-TOF MS の結果、AD 軽症者からは *S.aureus* が検出されなかった。AD は *S.aureus* の感染症であると予想したが、軽症者が感じる痒みは微生物が関与する経路とは異ったメカニズムで生じている可能性が高い。一方、中等症以上では高い保有率を示したことから、痒みの原因が *S.aureus* の感染に切り替わり、症状が悪化していると考えられる。また、24 株の *S.aureus* のゲノムについて毒素遺伝子について調べたところ、高いスーパー抗原活性を持ち、重篤なショック症状を引き起こすと言われている細胞外毒素 TSST-1 をコードする遺伝子 (*tst-1*) について、すべての健康株で *tst-1* 保有されていたが、重症株は一切保有していなかった。TSST-1 同様にスーパー抗原活性を有するとされているエンテロトキシンについてその遺伝子数を調べたところ、重症株では比較的少ないことがわかった。このことから、AD 重症株は健康者で検出されるような一般的な株よりも、むしろ弱毒化している傾向があり、ヒト皮膚への長期の定着と、AD 症状の慢性化に関与している可能性がある。

**The mechanism of advancing severity in atopic dermatitis in the scope of genomics of *Staphylococcus aureus*.**

○Nagisa Okino<sup>1</sup>, Mizuho Inagaki<sup>1</sup>, Ayako Sato<sup>1</sup>, Hiroyuki Sawano<sup>1</sup>,  
 Fumika Tsubouchi<sup>1</sup>, Masahiro Hayashi<sup>2</sup>, Kaori Tanaka<sup>2</sup>, Yu Kanesaki<sup>2</sup>,  
 Hirofumi Yoshikawa<sup>3</sup>, Tohru Suzuki<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., <sup>2</sup>Life Sci.Res.Center,Gifu Univ., <sup>3</sup>Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

**Key words** atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*, human skin microbiome

**3P-1p088 *Aspergillus* section *Flavi* の比較ゲノム解析**

○佐藤 敦史<sup>1</sup>, 松島 健一郎<sup>1</sup>, 伊藤 孝太郎<sup>1</sup>, 服部 正平<sup>2,3</sup>,  
 光山 統泰<sup>4</sup>  
 (<sup>1</sup>キッコーマン, <sup>2</sup>東大院・新領域, <sup>3</sup>早大・先進理工, <sup>4</sup>産総研)  
 a.sato@mail.kikkoman.co.jp

*Aspergillus* section *Flavi* に分類される種には、醸造や発酵に広く利用されている産業上有用な *A. sojae* (As) と *A. oryzae* (Ao) が含まれる一方で、アフラトキシンなどのマイコトキシンを生成する有害な *A. parasiticus* (Ap) と *A. flavus* (Af) が含まれる。産業利用においてこれらの種を区別することは重要であるが、これらの種を形態学と生理学のみで区別することは難しい。そのため、分子生物学的アプローチが産業利用上の区別に利用され、これら4種の起源について様々な議論がなされてきた。我々は、これら4種の間をDNAの違いにより明らかにするため、As NBRC 4239 のリシークエンスを実施し、比較ゲノム解析を実施した。DNA 1kb ごとに相同性を比較した結果、As のゲノムは Ap と高い相同性を示し、Af あるいは Ao との相同性は低かった。As の染色体サイズ (39.4Mb) は Ap (39 Mb) とほぼ同じで、Af (36.8 Mb) あるいは Ao (37.2 Mb) よりも大きかった。As の染色体には、大規模な DNA の挿入や重複は見つからず、Af あるいは Ao と相同性の低い領域が染色体全体に分散していた。As の全子測遺伝子に section *Flavi* の他の3種にアライメントした結果、As は Ap と最も高い相同性を示した。しかしながら二次代謝合成に関与する遺伝子では、As に欠損や配列変化が起こっていた。これらの結果から、これら4種は Ap と Af の2グループに分けることができ、Ap から As が、Af から Ao が其々マイコトキシン生産性を失って進化していることが推測された。

**Genome-wide comparative analysis among *Aspergillus* section *Flavi*.**

○Atsushi Sato<sup>1</sup>, Kenichiro Matsushima<sup>1</sup>, Kotaro Ito<sup>1</sup>, Masahira Hattori<sup>2,3</sup>,  
 Toutai Mituyama<sup>4</sup>  
 (<sup>1</sup>Kikkoman Corp., <sup>2</sup>Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo, <sup>3</sup>Sch. Adv. Sci. Eng.,  
 Waseda Univ., <sup>4</sup>AIIST)

**Key words** *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus oryzae*, comparative genome

**3P-1p089 糖質系高分子に対する分子動力学計算のためのパラメータ設定支援プログラム**

○園部 智彩<sup>1</sup>, 矢部 誠<sup>2</sup>, 上田 一義<sup>1</sup>, 近藤 敬子<sup>3</sup>, 片平 正人<sup>3</sup>, 武田 稜<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>横浜市大院・生命医科, <sup>3</sup>京大・エネルギー理工研)  
 mtake@ynu.ac.jp

**【背景と目的】** Molecular Dynamics (MD) の実行に必須の結合角や電荷などのパラメータセット (力場) がライブラリに存在しない場合、力場を量子化学計算で算出する方法がある。しかし、高分子の場合には計算コスト過多で算出は容易でない。例外的に繰り返し単位を有する高分子の場合には、最低3単位 (両末端部と中央部) を含むオリゴマーの力場を算出し、それを高分子構造に対応した形式 (両末端部+中央部×n) に変換するという手法が可能である。しかしながら、変換は手作業であり、多大な時間を必要とする共に信頼性に欠ける。そこで、繰り返し単位を持ち力場の存在しない高分子に対する MD を簡便かつ確実に実行すべく、力場変換半自動化ツールの開発を目指した。

**【方法】** 本ツールで変換する力場ファイルは、オリゴマーの構造ファイルを元に Antechamber より生成したものである。まず開発したツールの構造ビュー機能により、オリゴマーの構造ファイルから高分子の繰り返し構造の中央部および末端部に相当する部分を分割・帰属する。次に、開発ツールの自動変換機能により、高分子の構造に対応した形式 (両末端部+中央部×n) へ力場ファイルの自動変換を行う。最後に、任意の重合度 (2+n) を持つ構造ファイルと共に力場ファイルを出力する。検証計算はアミロースに対して行った。

**【結果と考察】** GUI を採用したことで、作業負荷の低減と時間短縮が実現した。さらに、複雑なファイル変換過程を自動化したことによりヒューマンエラーを大幅に減らせた。ノナン中のアミロース分子を想定した系で MD を実行したところ、ライブラリに基づく力場を与えた場合と同様の規則構造が得られ、ツールの有効性が確認できた。複雑な構造の高分子に対する MD 実行における本ツールの有効性を確認すべく、キサンタンに対する計算に適用中である。

**A software which assists parameter setup for molecular dynamics simulation of saccharic polymers**

○Chisaya Sonobe<sup>1</sup>, Makoto Yabe<sup>2</sup>, Kazuyoshi Ueda<sup>1</sup>, Keiko Kondo<sup>3</sup>, Masato Katahira<sup>3</sup>, Minoru Takeda<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., <sup>3</sup>Adv. Energy Inst., Kyoto Univ.)

**Key words** molecular dynamics, polysaccharide

**3P-1p090 Effect of d-and l-menthol on stability of membrane heterogeneity**

○Pooja Gusain<sup>1</sup>, Kunihide Hoshino<sup>1,2</sup>, Yoshio Tsujino<sup>1,2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>Takasago International Corporation)  
 takagi@jaist.ac.jp

Menthol activates TRPM8, a cold activated Transient Receptor Potential ion channel. l-Menthol induces cooling sensitization whereas d-menthol induces irritation. It is believed that cell membrane including a large variety of components has compositional heterogeneity called Raft. Our interest is to clarify stability of two isomers d- and l-menthol on membrane heterogeneity. Binary (DOPC/DPPC) and ternary (DOPC/DPPC/Chol) systems were examined by fluorescent microscopy. Miscibility temperature  $T_m$  is defined as temperature at which heterogeneous phase (50%) is formed. In binary system without cholesterol, stripe like solid-ordered ( $S_o$ ) domains formed predominantly surrounded by liquid-disordered ( $L_d$ ) phase. Liposomes with homogeneous phase were increased in the presence of l-menthol i.e the phase separation was suppressed leading to destabilization of  $S_o$  phase. On the other hand d-menthol did not affect  $S_o$  formation, indicating that d-menthol interact with unsaturated DOPC lipid. In binary system, l-Menthol ( $T_m=36^\circ\text{C}$ ) did not show significant change in miscibility temperature compared to control ( $T_m=35.7^\circ\text{C}$ ) while d-menthol showed decline in miscibility temperature ( $T_m=32.8^\circ\text{C}$ ). Whereas, in ternary system, l-menthol increased the miscibility temperature ( $T_m=30.9^\circ\text{C}$ ) compared to control ( $T_m=28.1^\circ\text{C}$ ) and d-menthol ( $T_m=28.3^\circ\text{C}$ ). Therefore, it was suggested that raft like structure was stabilized by l-menthol.

**Effect of d-and l-menthol on stability of membrane heterogeneity**

○Pooja Gusain<sup>1</sup>, Kunihide Hoshino<sup>1,2</sup>, Yoshio Tsujino<sup>1,2</sup>, Naofumi Shimokawa<sup>1</sup>, Masahiro Takagi<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Sch. Mater. Sci., JAIST, <sup>2</sup>Takasago International Corporation)

**Key words** Miscibility Temperature  $T_m$ , Solid-ordered  $S_o$ , Liquid-disordered  $L_d$ , cholesterol (Chol)

**3P-1p091 ディープラーニングを用いた生体分子解析**

○三宅 淳, 金下 裕平, 浅谷 学嗣, 東 祐之介, 田川 聖一, 新岡 宏彦 (阪大院・基礎工)  
 jun\_miyake@bpe.es.osaka-u.ac.jp

多層パーセプトロンの中層を多層化させた Deep Learning (DL) は、自動的な特徴表現の学習を可能としており、獲得された特徴表現の理解が、観測データの本質的な情報の抽出へ繋がると考えられる。しかし、バイオ分野では、生命分子や組織の複雑さ故に、解析方法が確立されて来なかった。創薬技術への応用を考えれば、生体分子の構造から、特性や細胞内での分子間の関係、そして細胞の状態の評価などに用いられることが期待される。研究開発には、当該分野に特化したプログラムと、高速計算が可能なコンピューターの適用が不可欠である。当グループでは独自に、C 言語を用いた DL である「Sigma」と GPU コンピューター (演算速度約 15TFlops) を制作して用いている。

これまでの研究結果から考えられる可能性について紹介する。アミノ酸シーケンスが得られているヒト抗体約 6000 本の H 鎖可変領域 (100 アミノ酸) について、ディープラーニング (スタックドオートエンコーダー) を用いた解析を試み、ウイルス結合抗体の二次元圧縮プロットを得た。対 HIV、Influenza、Rotavirus 抗体 H 鎖について、それぞれ特徴的な分布が得られた。

mtDNA の塩基配列と抗体可変領域のアミノ酸シーケンスという生体分子に対して Deep Learning による解析を行い、生体分子に内在する情報的特性を抽出できるか検討した。Stacked Autoencoder を用いて mtDNA を二次元平面にプロットした結果、起源とするハプログループ毎に分布の傾向に違いが見られた。また抗体を用いた場合、抗原ごとに分布の違いが見られた。CNN によりハプログループを教師として学習したところ 90%以上の精度で mtDNA ハプログループの分類・識別が出来る可能性が示唆された。

**Deep Learning for Biomolecules**

○Jun Miyake, Yuhei Kaneshita, Satoshi Asatani, Yunosuke Azuma, Seichi Tagawa, Hirohito Niikawa  
 (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** Deep Learning, DNA, Antibody, Virus

**3P-1p092 シェルスクリプトを用いたパラレルモンテカルロ法の構築と生体工学への応用**

○石井 一夫<sup>1</sup>, 中村 和敬<sup>2</sup>, 富仲 寛哲<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>農工大・農, <sup>2</sup>USP研)  
 kazuoshii2014@gmail.com

次世代シーケンサーやマイクロアレイの普及により、生物分野におけるビッグデータ分析は日常的なものとなっている。これらのデータは、多数の遺伝子発現や DNA のメチル化などの説明変数からなる超多次元データである。従来までの生体現象の理解には少数の因子による生化学的解析が主流であったが、これら超多次元データを組み合わせることによるビッグデータの利活用で、複数の要因により数理予測モデルを作成し表現型などの生体現象の高精度な予測が可能となる。しかし、これらの超多次元データによる数理予測モデルの作成においては、候補となる説明変数 (例えば、遺伝子発現など) が膨大であり、これらの組み合わせの中から適切な説明変数を選択し、予測モデルを作成することは困難を伴う。我々は、多数の組み合わせの中からモンテカルロ法による無作為抽出と並列処理を組み合わせ、近似的な最適化予測モデルを作成することを検討してきた (本大会シンポジウム 3S-Bp 小林、石井らの発表)。しかし、この方法は完全なものではなく、未だ様々な問題点を抱えている。例えば、数理モデルの作成には大量の計算を必要とし、並列分散処理を用いて高速化を図っていく必要がある。今回、並列分散処理の効率化のために C ライブラリとシェルスクリプトによる高速化を行った (本大会シンポジウム)。これにより、より簡便でパフォーマンスの高いシステムの構築が可能となった。本発表では、C ライブラリとシェルスクリプトによるソフトウェアのこの効率化と高速化に関するアプローチについて紹介する。

謝辞: 本研究は、東京農工大学「農学系ゲノム科学人材育成プログラム」の支援により実施された。

**Introducing of Parallel Monte Carlo methods with shell scripting to biotechnology**

○Kazuo Ishii<sup>1</sup>, Kazutaka Nakamura<sup>2</sup>, Nobuaki Tounaka<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agr., Tokyo Univ. of Agr. Eng., <sup>2</sup>USP Lab.)

**Key words** Monte Carlo methods, Shell scripting, Mathematical Modeling, Parallel computing

### 3P-1p093 糖残基を指標とする抗菌性化合物探索のためのゲノム情報解析ツールの開発

○木村 明音, 笹川 真稚, 市川 夏子, 藤田 信之  
(NITE・NBRC)  
kimura-akane@nite.go.jp

微生物が産生する二次代謝産物は医薬、農業等に利用されており、生物活性物質の探索源として工業的に極めて重要である。近年、次世代シーケンサーの登場によりゲノム解析が簡便になり、ゲノム情報に基づき二次代謝産物合成酵素を探索する手法(ゲノムマイニング)が注目されている。糖残基が付加された天然二次代謝産物は、アグリコン(非糖部分)と糖残基から成り、糖ユニットはしばしば化合物の生物活性に直接影響することが知られている。そのため、糖残基の合成に関与する酵素を指標にしたゲノムマイニングは生物活性を有する二次代謝産物の探索に有用であると考えられる。ポリエン系抗真菌薬ナイスタチンの糖残基であるマイコサミン(3,6-dideoxy-3-aminomannose)は抗菌活性に寄与することが報告されている。本研究ではマイコサミン基を有する抗菌性化合物探索のためのゲノム情報解析ツールの開発を行った。マイコサミンは、GDP-マンノースから脱水反応、異性化反応、アミノ基転移反応を経て合成され、糖転移酵素によってアグリコンへ付加される。異性化反応を担う酵素は見つかっておらず自発的に起こると推定されている。本研究では、マイコサミン合成に関与する脱水酵素、アミノ基転移酵素、糖転移酵素について、論文情報から既知の酵素を調査し、収集した既知の遺伝子配列の系統解析を行い、遺伝子の特徴を定義することで、ゲノム中から遺伝子を探索するためアルゴリズムを決定した。それぞれの遺伝子に応じたプロファイルデータベースを準備し、マイコサミン合成に関与する酵素遺伝子群をゲノム中から検索するツールを開発した。本ツールは、微生物遺伝子機能検索データベース MiFuP (<http://www.bio.nite.go.jp/mifup/>)にて利用可能である。現在、本ツールを用いて放線菌ゲノムから新規抗菌性化合物の探索を実施している。

#### Development of genome-mining tool for antibiotics containing the sugar moiety

○Akane Kimura, Machi Sasagawa, Natsuko Ichikawa, Nobuyuki Fujita  
(NBRC, NITE)

**Key words** genome-mining, mycosamine, MiFuP, antibiotics

### 3P-1p094 アンチセンス核酸による配列特異的な殺菌

○木野 裕太, 中島 信孝  
(東工大院・生命理工)  
nnakashima@bio.titech.ac.jp

現在、抗生物質として利用されているものの多くは、抗菌スペクトルが広く、我々の健康や、環境を維持している多くの共生細菌まで殺してしまう。また、抗生物質の乱用は薬剤耐性細菌の出現を誘発するため問題視されている。そこで我々は、アンチセンス核酸を用いることにより、細菌群集の中から標的とする細菌だけを特異的に殺すことを目的とした本研究を立ち上げた。アンチセンス核酸は、人工的に合成したオリゴDNAやオリゴ核酸類似体などを指し、細菌内のmRNAに特異的に結合し、その翻訳を阻害する。この性質を利用して、標的細菌の生育に必須な遺伝子のmRNAのリボソーム結合領域(Shine-Dalgarno配列)周辺を標的としたアンチセンス核酸を設計することにより、目的の細菌だけを殺すことが可能になる。そこで、我々は、環境から採取したサンプルに大腸菌を混ぜて、モデル系としての実験を行った。また、目的を達成するアンチセンス核酸の設計方法を確立するために、ツールを作成した。将来的にはバイオフィルムや皮膚細菌叢などの複雑な集団に存在する細菌のうち、目的とする1種類だけを、作成したツールを用いて簡単に設計したアンチセンスを用いて、配列特異的に殺菌することを目指している。

#### Sequence-specific sterilization by antisense nucleic acid

○Yuta Kino, Nobutaka Nakashima  
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

**Key words** antibiotics, microbial flora, bioinformatics, peptide nucleic acid

### 3P-1p095 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索

○中村 祐哉<sup>1</sup>, 森 宙史<sup>1</sup>, 黒川 顕<sup>2</sup>, 中島 信孝<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東工大院・生命理工, <sup>2</sup>東工大・地球生命研)  
nnakashima@bio.titech.ac.jp

現代の医薬品製造や化成品生産において、酵素タンパク質の利用は欠かせない。新規に有用酵素遺伝子を探査する際、メタゲノムと呼ばれる手法がよく用いられる。これは、環境などから取得してきた微生物群集を培養せずに、そのDNA/RNAだけを抽出し、ライブラリ化して利用するものである。ライブラリ化後は、DNA/RNA配列の相同性を指標にハイブリダイゼーションや、組換えタンパク質を発現させ酵素活性を指標にスクリーニングすることが多い。しかし、それらの方法では多大な時間を要することから、より簡易なスクリーニング方法が求められていた。そこで本研究では、新たなスクリーニング方法として、大量RNA配列経時解析法(TILAMS)を提唱する。TILAMSではまず、環境から取得した微生物群集に、着目する基質を添加した物としない物を用意し、両試料から経時的にRNAを抽出する。そして、次世代シーケンサーを用いて得られたRNAを大量に配列解読し、基質添加によって量が変動したRNA配列を探し出す。そこに、バイオインフォマティクスによる各種解析を与えることによって、擬陽性のRNA配列を除去し、基質に作用する酵素遺伝子のRNA候補を探し出す。TILAMSによれば、微生物細胞を使用せずに大量にスクリーニングを行うことができるため、メタゲノムからの有用酵素遺伝子探索のボトルネックを解消することができる。本研究においては、化成品として利用価値の高いレプリン酸を基質として用い、その代謝を担うレプリン酸分解酵素遺伝子を取得することを目指し、講演では研究の過程と成果について発表する。

#### Discovery of valuable genes by massive sequencing and time-lapse analysis of environmental RNAs

○Yuya Nakamura<sup>1</sup>, Hiroshi Mori<sup>1</sup>, Ken Kurokawa<sup>2</sup>, Nobutaka Nakashima<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, <sup>2</sup>ELSI, Tokyo Tech)

**Key words** Rna-Seq, metagenome, levulinic acid, environmental bacteria

### 3P-1p096 細胞画像情報解析による抗がん剤プロファイリング技術の開発

○河合 駿<sup>1</sup>, 岡田 法大<sup>1</sup>, 湯澤 勝浩<sup>2</sup>, 佐々木 寛人<sup>2</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 清田 泰次郎<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>ニコン)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

#### 【背景と目的】

新薬開発の初期段階では多様な化合物スクリーニングが行われているが、その中で新薬開発の成功率を上げるため、効率的に探索するハイスループットスクリーニング(HTS)技術の研究が重要になってきている。近年、HTS技術の中でも細胞を利用したセルベースアッセイが注目されている。セルベースアッセイはヒト細胞の挙動に基づいて評価することで、生体内反応に近い情報が得られる。歴史的には、画期的な新薬はセルベースアッセイから得られることも多く、その有効性が近年再注目されている。しかし、従来のセルベースアッセイは免疫染色などを必要としスループット性に課題があった。さらにエンドポイントアッセイの多くは細胞を破壊するため経時的な作用を評価することも難しかった。本研究では細胞形態に基づく薬効評価技術の開発を試みている。細胞形態は、現在の細胞の遺伝子発現等により変化し、先行研究では形態と薬効に相関があることが報告されている。また本研究では、位相差画像のみで細胞を経時的にモニタリングする細胞形態情報解析を開発しており、免疫染色などを必要しないため、従来の問題を解決できる可能性を持つ。本研究では、抗がん剤を細胞形態情報解析によって評価することで、薬効評価技術としての有効性を検証することを目的とした。

#### 【方法と結果】

具体的には5種類の細胞を9種類の抗がん剤に暴露し、形態によるプロファイリングを行った。結果として位相差顕微鏡中の細胞を定量化し、それを統計解析することで、形態プロファイルが阻害する標的分子によって異なることが示唆された。さらに上記以外の異なる抗がん剤にも応用し、形態のみから標的を評価することで、実用性も含めた本手法の有効性も同様に検証した。

#### Development of Anti-cancer Drug Profiling Method by Image-based Cellular Morphological Analysis

○Shun Kawai<sup>1</sup>, Norihiro Okada<sup>1</sup>, Katsushiro Yuzawa<sup>2</sup>, Hiroto Sasaki<sup>2</sup>, Kei Kanie<sup>1</sup>, Yasujiro Kiyota<sup>3</sup>, Kazunori Shimizu<sup>2</sup>, Hiroyuki Honda<sup>2</sup>, Ryuji Kato<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Nikon Corp.)

**Key words** high-throughput screening, cell morphology, anti-cancer drug, cell-based assay

**3P-1p097 乳化を指標とした細胞壁形成阻害剤の新規スクリーニング法の検討**

○根路銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之  
(阪市大院・工・化生系)  
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

ヒトと真菌の細胞構造は類似しており、選択毒性の点で抗真菌薬の開発は抗細菌薬に比べ困難である。現在も有効な薬剤は数少なく、また耐性菌の出現も問題となっており、新たな薬剤が求められている。我々は、酵母を用いてヒトにはない真菌特有の構造体である細胞壁の研究を進めてきた。昨年度の本大会では、酵母変異株の細胞から遊離する乳化物質とそれら変異株の解析を進めその成果を報告した。本研究では、細胞壁形成に作用する化合物の検出に、酵母の乳化現象を適用できると考え、以下について検討した。乳化物質は、これまでの解析から細胞壁から遊離する高分子物質と考えられた。そこで、細胞壁の主要成分である  $\beta$ -1,3-グルカンの分解と乳化の関係を調べた。*Saccharomyces cerevisiae* を用い、浸透圧保護下で  $\beta$ -1,3-グルカナーゼを作用させ、細胞遊離物の乳化活性を測定した。乳化はケロシンと試料の混合により評価した。その結果乳化が検出され、乳化物質は  $\beta$ -1,3-グルカンに結合していることが示唆された。病原真菌である *Candida albicans* においても同様の現象が観察された。さらに、浸透圧保護下で  $\beta$ -1,3-グルカン合成阻害薬 Micafungin を作用させ、培養上清の乳化活性を測定した。ここでも乳化が検出され、乳化による  $\beta$ -1,3-グルカン阻害剤の検出が可能であることが強く示唆された。他の細胞壁に作用する薬剤の影響についても評価しており、乳化が細胞壁形成に作用する薬剤検出の指標として使用できるか議論する。

**Study on a new screening method of cell wall formation inhibitors using emulsification as a detection index**

○Shinsuke Nerome, Yushiro Ojima, Masayuki Azuma  
(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, antifungal agent, emulsification

**3P-1p098 海洋微生物群集による有機化合物の変換過程：NMR を用いた網羅型解析**

○内宮 万里央<sup>1</sup>, 伊達 康博<sup>1,2</sup>, 坪井 裕理<sup>1</sup>, 菊地 淳<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>理研CSRS, <sup>2</sup>横市大院・生命医, <sup>3</sup>名大院・生命農)  
mario.uchimiya@riken.jp

海洋における従属栄養性の微生物群集は、水中に供給される有機化合物の約半分を消費する。そのため、微生物群集による有機化合物の変換過程を詳細に明らかにすることは、海洋の物質循環像を高度化する上で必要不可欠である。しかしながら、現場環境における有機化合物の変換過程は極めて多様であり、方法論的制約からその全容を捉える試みは乏しかった。本研究では、近年急速に発達する核磁気共鳴(NMR)法による代謝物の網羅型解析手法を導入し、現場環境における有機化合物の変換過程を明らかにすることを目的とした。現場海水を採取し、海洋微生物が利用する主要な化合物として知られるグルコース(安定同位体炭素標識物)を添加したのち(終濃度 1 mmol C/L)、暗所・現場水温条件下で培養を行った。培養完了後、微生物画分を回収し、菌体内に含まれる代謝物を網羅解析した。その結果、培養開始から1日後には菌体内にグルコースおよびグルタミン酸の存在が検出され、微生物に取り込まれたグルコースが、解糖系およびTCA回路を経たのち、グルタミン酸まで変換されたことが示唆された。また、その1日後には、グルタミン酸の生産がさらに強まる(前日比4.9倍)と共に、アルギニンに代表される他のアミノ酸も合成されていることが確認された。さらに、チミジンに代表される核酸構成種も検出され、微生物の細胞分裂に関わる化合物も合成されていることが確認された。以上のことは、NMR法を用いた解析手法を導入することで、現場環境における有機化合物の変換過程を網羅的に追跡することが可能であることを示しており、今後、本手法を様々な環境へ展開することで、海洋における有機物の変換過程に関する理解が飛躍的に高まることが期待される。

**Microbial transformations of organic substrates using environmental marine water analyzed by NMR metabolomics**

○Mario Uchimiya<sup>1</sup>, Yasuhiro Date<sup>1,2</sup>, Yuuri Tsuboi<sup>1</sup>, Jun Kikuchi<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>RIKEN CSRS, <sup>2</sup>Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

**Key words** marine environment, microbe, metabolism, NMR

**3P-1p099 フローサイトメーターを用いた、長期冷蔵保存した海水における微生物細胞の膜損傷状態の評価**

○高橋 裕里香<sup>1</sup>, 古澤 裕<sup>2</sup>, 畠 俊郎<sup>1</sup>, 西田 洋巳<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>富山県大・工, <sup>2</sup>富山県大・教養)  
t-yurika@pu-toyama.ac.jp

[背景・目的] 海水中の微生物の計数には、SYBR Green I 染色を行って落射蛍光顕微鏡で観察する方法 (Nature Protocols, 2007, 2:269-276.) が広く用いられている。SYBR Green I は細胞膜の状態に関わらず細胞内(またはウイルス粒子内)に入り込み二本鎖 DNA に結合するため、この方法によって真核微生物、細菌、ウイルスを同時に計数できる。しかし一方で、全菌数に占める生菌の割合は不明であり、計数値が観察者によって変動しやすいという欠点もある。そこで本研究では、海水中の生菌と死菌を染め分けてフローサイトメーター (FACS) によって計数することで、長期冷蔵保存した海水中の菌数及び生菌の割合を測定することを目的とした。[方法・結果] 富山湾及び日本海の複数の地点で採取した海水(表層水)を4℃で静置保存した。保存した海水 50 mL を  $\phi$ 0.2  $\mu$ m フィルターで濾過し、フィルターを 500  $\mu$ L の染色バッファー (Phosphate-buffered saline, 1 mM EDTA, 0.2% Pluronic F-68, 0.1% sodium azide) に懸濁した。懸濁液に、細胞膜への透過性の異なる2種類の染色試薬 [thiazole orange (TO, 全菌を染色)と propidium iodide (PI, 死菌を染色)] を添加して15-60分静置した後、BD Liquid Counting Beads を加え、FACS Canto (BD) を用いて分析した。2年間保存した海水中の全菌数は  $10^3 \sim 10^4$  cells/mL であり、その中で損傷していない膜を保持する生菌の割合は5-8割であった。本研究は、JSPS 科研費 26892024 及びクワタ水・環境科学財団の助成を受けて行われた。

**Bacterial enumeration and live/dead discrimination in long-preserved seawater by flow cytometry**

○Yurika Takahashi<sup>1</sup>, Yukihiko Furusawa<sup>2</sup>, Toshiro Hata<sup>1</sup>, Hiromi Nishida<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>Dept. liberal arts, Toyama Pref. Univ.)

**Key words** bacterial counting, flow cytometry, seawater, Toyama Bay

**3P-1p100 家庭内使用タオルに生息する細菌によるバイオフィーム形成の解析**

○諸星 知広, 池谷 謙太, 池田 幸  
(宇都宮大院・工)  
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

家庭で使用されるタオルに付着した細菌は、悪臭の原因となるなど日常生活において様々な悪影響を及ぼしている。しかしながら、タオル中に生息する細菌の菌種や付着メカニズムに関しては、ほとんど解明がなされていないのが現状である。本研究では、家庭で使用されたタオルから細菌を単離し、付着に関わるバイオフィーム形成を解析することを目的とした。まず、5戸の家庭で使用したタオルから菌株を単離するとともに、培養を介さずに直接 DNA を抽出し、実際の細菌構成を解析した。その結果、培養可能な菌株と実際のタオル内の細菌構成には共通性が見られ、この中から *Micrococcus* 属細菌4株、*Paracoccus* 属細菌2株、*Williamsia* 属細菌1株、*Brevundimonas* 属細菌2株、*Sphingomonas* 属細菌2株をモデル細菌として選定した。これらのモデル菌株が形成するバイオフィームについて、96穴マイクロタイタープレートを用いた静置法により定量した。その結果、バイオフィーム形成量は菌株により大きく異なることが明らかとなった。次に、モデル細菌による複合バイオフィーム形成を調べるため、2菌株を混合してバイオフィームの定量を行った。その結果、モデル菌株の中でも *Brevundimonas* sp. AB1 株を特定の菌株と組み合わせることにより、それぞれ単独の場合と比較してバイオフィーム形成量が大幅に向上することが明らかとなった。さらに、蛍光顕微鏡による観察の結果、複合バイオフィームは単独の場合と比較して非常に高密度で形成されていることが明らかとなった。

**Characterization of biofilm formation by isolates from towels for household use**

○Tomohiro Morohoshi, Kenta Ikeya, Tsukasa Ikeda  
(Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

**Key words** biofilm

**3P-1p101 テレフタル酸分解菌の取得とその性質**

○中島 鈴佳<sup>1</sup>, 野中 大輔<sup>1</sup>, 森田 穂<sup>1</sup>, 内堀 孝博<sup>3</sup>, 清 啓自<sup>2</sup>,  
中島 敏明<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境, <sup>3</sup>パナック工業)  
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

PET 製品の処理等において、モノマーを含む廃液がしばしば生じる。その主成分はテレフタル酸とエチレングリコールであるが、活性汚泥による廃液処理においてテレフタル酸が残存し、その処理が特に問題となっている。テレフタル酸は市場価値が高く、精製及び再利用は採算が合わないため現在はコストをかけて処分されている。

本研究では、テレフタル酸を効率よく分解する微生物の取得およびこれを用いた廃水処理の効率向上を目的とする。

テレフタル酸を単一炭素源とする液体培地中に活性汚泥を加え、30℃、180 rpm で数日間培養を行った。培養液の一部を同液体培地に再度接種し、同条件で数日間培養した。これと同じくテレフタル酸を単一炭素源とする寒天平板培地に接種し、テレフタル酸分解菌を二株単離した。このテレフタル酸分解菌を用いてテレフタル酸分解能の測定、16S rDNA 遺伝子解析を用いた簡易同定、最適塩濃度の検討を行った。

本実験ではテレフタル酸分解能を有する株のスクリーニングに成功した。得られた二株はともに1%のテレフタル酸2ナトリウムを36時間でほぼすべて分解することが可能であった。また簡易同定の結果、Pseudomonas 属であることがわかった。今後さらに pH、温度の最適条件を検討し、テレフタル酸分解量の向上を目指す。

**Isolation and characterization of terephthalate-degrading bacteria**

○Suzuka Nakajima<sup>1</sup>, Daisuke Nonaka<sup>1</sup>, Minoru Morita<sup>1</sup>, Takahiro Uchibori<sup>3</sup>,  
Keiji Kiyoshi<sup>2</sup>, Toshiaki Nakajima-Kambe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>3</sup>Panac Ind. Inc.)

**Key words** terephthalate, biodegradation, characterization, isolation

**3P-1p102 *P. pseudoflava* および *P. palleronii* による芳香族化合物の生物分解に関する研究**

○中屋 江梨花, モタカトラ ベンカテスワーレディ, 矢島 由佳,  
張 倬喆  
(室工院・工・環境創生)  
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

[目的] バイオプラスチックをより安価な方法で生産するために毒性芳香族化合物を基質とした生産方法が提案されている。そこで、本研究ではバイオプラスチック生成能を有する *Pseudomonas pseudoflava* 株 (NBRC102511) および *P. palleronii* 株 (NBRC102513) のアルキルフェノール類および Phenol、4-chlorophenol、Naphthalene、Phenanthrene に対する分解能を検討した。これら化学物質は、ヒトの健康や生態系に有害な影響を及ぼすことが知られている。

[方法] Phenol、4-chlorophenol、Naphthalene、Phenanthrene においては Mineral Salt 培地 (MS 培地)、アルキルフェノール類については MS 培地に酵母エキスを少量加えた MSY 培地で6日間培養し、経時的に培養液を採取し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) に供した。分解率を算出した後、分解率が30%以下の化学物質に対しては、非イオン性界面活性剤 Tween-80 を添加し同条件で再度実験を行った。Tween-80 は生物に対する影響が少なく、疎水性有機化合物の低い水溶性を打消し、分解効率を高めることで知られている。

[結果および考察] *P. pseudoflava* 株を用いた場合、アルキルフェノール類、Phenol、Naphthalene、4-chlorophenol、Phenanthrene の分解率は30%以下であった。一方、*P. palleronii* 株の場合は、Phenol と Phenanthrene をそれぞれ88%と42%まで分解した。Phenol 分解における最適条件は、初発菌体濃度が OD<sub>600</sub> で0.01、pH は7.0、最適温度は30℃、そして最適初発 Phenol 濃度は100 mg/L であった。さらに *P. palleronii* 株がバイオプラスチックを生産しているかどうかを確認するために透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した結果、細胞内のバイオプラスチックが確認できた。以上の結果から *P. palleronii* 株が Phenol を用いてバイオプラスチックを生産していることが示唆された。

**A study on biodegradation of aromatic compounds with *P. pseudoflava* and *P. palleronii***

○Erika Nakaya, M Venkateswar Reddy, Yuka Yajima, Young-Cheol Chang  
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

**Key words** *P. palleronii*, Bioplastics, Phenol

**3P-1p103 高濃度脂肪酸を効率的に分解する酵母の単離と挙動解析法の検討**

○仲山 真美, 綾部 里美  
(SGラボラトリー)  
info\_sglab@ybb.ne.jp

【背景・目的】食品工場や飲食店等では、大量の食用油脂が排出されているが、自然分解しにくい、排管の詰まりや悪臭を引き起こし、深刻な問題となっている。これまで当社では、微生物を廃油脂処理に応用するために、油脂 (トリグリセリド) 分解菌を取得し研究を行ってきたが、油脂濃度が上がるにつれて分解速度は低下することが分かっている。一般的に、反応生成物としての脂肪酸は、油脂分解反応を停滞させるのみならず、脂肪酸自体も濃度が高ければ油脂と変わらず問題を引き起こす原因となる。よって、高濃度油脂の分解を効率的に行うには、同時に積極的な脂肪酸分解を行う必要がある。しかし脂肪酸の存在は、廃水を酸性にするうえに、殺菌作用により通常の微生物の生育を困難にする。本研究では、高濃度脂肪酸存在下でも生育と分解が可能な微生物をスクリーニングした。

【方法・結果】各地の土壌サンプルについて複数種の液体培地を用いて集積培養し、候補株の選抜を繰り返した結果、福岡県内のツバキの木の下で土壌より、オレイン酸分解菌 HFA40-c 株を単離した。分離株を用いて、5%オレイン酸を含む液体培地にて28℃で3日間培養後、Bligh-Dyer 法により油脂と脂肪酸を抽出し、薄層クロマトを行ったところ、油脂類は検出されず、完全分解したことが示された。菌体も同時に抽出しているため、菌体内への蓄積ではないと考えられる。分離株は、26S rDNA-D1/D2 の塩基配列により、酵母の *Candida orthopsilosis* と同定された。また、オレイン酸を唯一炭素源とする培地でも十分に増殖できることが分かっている。現場で応用するために、他の脂肪酸および分解の経時変化について試験し、分解を加速させる因子を探索した。さらに、環境中に投入した時に挙動を解析するためのリアルタイム PCR 法を用いた特異的検出方法の検討を行った。

**Isolation of high concentration fatty acid-degrading yeast and construction of behavior analysis**

○Mami Nakayama, Satomi Ayabe  
(SG Laboratory Co., Ltd)

**Key words** yeast, fatty acid, degradation, wastewater treatment

**3P-1p104 産業用リパーゼによる新規コポリエステルの生分解**

○廣田 泰志<sup>1</sup>, 川西 琢也<sup>1,2</sup>, 滝口 昇<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・理工)  
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】PET に有機酸を共重合させた新規コポリエステルとして、デュポン社は APEXA<sup>®</sup>を開発した。APEXA<sup>®</sup>は、長期間における特定堆肥中での生分解が確認されており、PLA 等と比較して高い強度と耐熱性を有することから、CFRP 母材等の新しい工業分野に適用可能な生分解性樹脂である。一方で、芳香族環に起因する結晶構造により酵素分解を受けにくく、実用的な生分解速度は得られていないため、前処理を含めた新しい生分解プロセスが求められている。本研究では、*Alcaligenes* sp. 由来の産業用リパーゼを使用することで、APEXA<sup>®</sup>の生分解を試みた。

【実験方法】樹脂としてペレット状の APEXA<sup>®</sup>4027、酵素として lipase QLM (名糖産業) を使用した。15 mL 遠心チューブに、ペレット 1 g と 0.1 M Tris-HCl バッファー 4.5 mL を加えた後、5 g/L の酵素溶液 0.5 mL を添加して、各条件で反応を開始した。カルシウムイオンの効果として、バッファーに各濃度の CaCl<sub>2</sub> を加えて同様に反応を行い、コントロールと比較した。分解度評価として、HPLC により分解生成物であるテレフタル酸 (TPA) 量を測定した。

【結果と考察】産業用リパーゼによる APEXA<sup>®</sup>の生分解が確認できた。カルシウムイオンの添加により、APEXA<sup>®</sup>の加水分解が促進された。酵素の添加によって、コントロールの約2倍量の TPA が検出された。

**Biodegradation of the new copolyester with industrial lipase**

○Yasushi Hirota<sup>1</sup>, Takuya Kawanishi<sup>1,2</sup>, Noboru Takiguchi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

**Key words** biodegradable polymer, lipase, hydrolysis

### 3P-1p105 都市排水を利用した微細藻類のバイオ燃料生産に向けた新規候補株の探索

○星川 優美子<sup>1</sup>, 野島 大佑<sup>1</sup>, 高野 博幸<sup>2</sup>, 田中 剛<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>農工大院・工, <sup>2</sup>太平洋セメント)  
 tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】バイオ燃料生産における培養プロセスの低コスト化を目的とし、多量の栄養源を含む排水の利用が注目されている。しかしながら、排水中では様々な生育阻害を受けることから、培養可能な株が制限されている。また排水中で生育可能な微細藻類のオイル含有量は他のバイオ燃料生産候補株と比べて低く、排水を用いたバイオ燃料生産を目的とした場合、既報の排水中で培養可能な株ではオイル生産性が不十分である。そこで本研究では、排水中で培養可能な新規のオイル高生産株の探索と生産性向上に向けたキャラクターゼーションを目的とした。

【方法】オイル高蓄積株を含むカルチャーコレクション及び各種排水サンプル中から、高いバイオマス量及びオイル生産性を有する株のスクリーニングを実施した。更に最も高いオイル生産性を示した株について培養温度、光量、CO<sub>2</sub>流量などの培養条件の検討を行い、生産性向上を試みた。

【結果】スクリーニングの結果、カルチャーコレクション中より NKG 021201 株を獲得した。本株は 18S rDNA に基づく系統解析により *Chlorella* 属に属することが示唆された。またオレイン酸 (C18:1) を主成分とし、バイオ燃料生産候補株として十分に利用可能であることが示唆された。更に本株において培養条件を検討した結果、オイル生産性は 57 mg/L/day、窒素及びリンの除去率は共に 80%以上となり、既報の株と比べて優位に高いことが確認された。本結果より都市排水を用いたバイオ燃料生産に向けた候補株となりえる NKG 021201 株を獲得し、オイル生産だけでなく、窒素及びリンの除去との統合プロセス設計への利用性が示唆された。今後、更に培養検討を行うことにより排水を利用したオイル生産株として期待できる。

#### Screening of the candidate microalgae for biofuel production using municipal wastewater

○Yumiko Hoshikawa<sup>1</sup>, Daisuke Nojima<sup>1</sup>, Hiroyuki Takano<sup>2</sup>, Tsuyoshi Tanaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., <sup>2</sup>Taiheyo Cement Corp.)

**Key words** Biofuel production, municipal wastewater, nutrient removal, green algae

### 3P-1p106 *Pelomonas saccharophila* MRB3 によるコウキクサ成長促進効果の検討

○加地 由季子<sup>1</sup>, 黒田 真史<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 池道彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス)  
 ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】*Pelomonas saccharophila* MRB3 は、コウキクサ (*Lemna minor*) と共生し、その成長を促進する Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) 候補菌株として、ミソハギ (*Lythrum anceps*) 根圏から単離された。コウキクサはウキクサ亜科植物の一種であり、その成長過程で富栄養化の原因となる水中の窒素・リンを吸収するうえ、バイオマスとしても有用な水生植物である。したがって、コウキクサと MRB3 株の共生関係を利用することで、コウキクサによる水中の窒素・リン除去及びバイオマス生産プロセスを効率化できると考えられる。本研究では、MRB3 株がコウキクサの成長に与える影響を種々の条件下で調べ、そのウキクサ亜科植物 PGPB としての有用性を評価することを目的とした。

【方法と結果】MRB3 株を懸濁した A&H 培地中でコウキクサを 14 日間栽培した場合、葉状体数の増加量が無菌の系と比べ約 1.9 倍となり、コウキクサに対し高い成長促進効果を発揮することが示された。また、培養液中の硝酸イオン濃度の経時変化を測定した結果、MRB3 株を懸濁した系で除去速度が上昇した。培養液中のリン酸イオンについては、MRB3 株を懸濁した系において実験開始直後に一時的な濃度の上昇がみられた。これは、MRB3 株のリン可溶性能により、培養液中の難溶性リンが可溶化されたためと推測された。さらに、実験終了時の植物体中の全窒素、全リン含有率についても、MRB3 株を懸濁した系においてそれぞれ無菌の系の約 1.3 倍、1.7 倍となり、コウキクサが吸収した窒素・リンが植物体中に高濃度で蓄積されることが示された。以上の結果から、MRB3 株によるコウキクサの成長促進、及び窒素・リンの吸収促進効果を確認することができた。

#### Growth promotion of *Lemna minor* by an aquatic plant rhizobacterium *Pelomonas saccharophila* MRB3

○Yukiko Kajii<sup>1</sup>, Masashi Kuroda<sup>1</sup>, Hideyuki Tamaki<sup>2</sup>, Michihiko Ike<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>BRI, AIST)

**Key words** Plant Growth-Promoting Bacteria, Duckweed, phytoremediation, biomass

### 3P-1p107 環境中の微生物群集がコウキクサの成長に及ぼす影響の評価

○黒田 真史<sup>1</sup>, 石澤 秀敏<sup>1</sup>, 玉木 秀幸<sup>2</sup>, 森川 正章<sup>3</sup>, 池道彦<sup>1</sup>  
 (阪大院・工, <sup>2</sup>産総研・生物プロセス, <sup>3</sup>北大院・環境)  
 kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】浮遊性の水生植物であるウキクサ亜科植物は、水中から窒素やリンを吸収して成長し、リグニン含量が低くタンパク質・デンプン含量が豊富な良質のバイオマスを生産することから、資源生産を伴う植生浄化プロセスへの適用が期待されている。実環境中でのウキクサ亜科植物の栽培において、環境微生物群集は植物の成長に大きく影響し得ることから、その作用を理解することは不可欠である。本研究では、環境中の微生物群集がコウキクサ (*Lemna minor*) の成長に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】15ヶ所の池や川から採取した環境水から回収した微生物群集をコウキクサに付着させ、培地中でコウキクサ成長への影響を調べたところ、7日後のコウキクサ個体数は、対照系である無菌コウキクサに対してそれぞれ24%~14%に変化した。この実験系から単離した3株の成長促進細菌と4株の成長阻害細菌に、これまでに単離している成長促進細菌 *Pelomonas saccharophila* MRB3 を加えた8株を、2株ずつ組み合わせて懸濁した培地中でそれぞれコウキクサの成長を調べたところ、成長促進細菌と成長阻害細菌を組み合わせた場合のほとんどでコウキクサの成長は阻害されたことから、環境中で成長阻害細菌は促進細菌に優先してコウキクサの成長を制御していることが示唆された。また、本試験に用いた成長促進細菌のうち唯一、*Aquitalea* sp. H3 はいずれの成長阻害細菌と組み合わせた場合でも成長促進効果を発揮したことから、植生浄化プロセスへの適用が有望な細菌であると考えられた。

#### Effect of environmental microbial communities on the growth of duckweed *Lemna minor*

○Masashi Kuroda<sup>1</sup>, Hidehiro Ishizawa<sup>1</sup>, Hideyuki Tamaki<sup>2</sup>, Masaaki Morikawa<sup>3</sup>, Michihiko Ike<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>BRI, AIST, <sup>3</sup>Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ.)

**Key words** microbial community, biomass, duckweed, wastewater treatment

### 3P-1p108 FISH 法と定量 PCR 法による国内下水処理施設におけるバルキング関連糸状性細菌の探索

○新田見 匡<sup>1</sup>, 庄司 仁<sup>2</sup>, 野口 愛<sup>3</sup>, 押木 守<sup>4</sup>, 黒田 真史<sup>5</sup>, 金田一 智規<sup>6</sup>, 福田 淳<sup>2</sup>, 栗栖 太<sup>7</sup>  
 (<sup>1</sup>横国大院・工, <sup>2</sup>成蹊大・理工, <sup>3</sup>金沢大・理工, <sup>4</sup>長岡高専・環境都市, <sup>5</sup>阪大院・工, <sup>6</sup>広島大院・工, <sup>7</sup>東大院・工)  
 nittami@ynu.ac.jp

【背景と目的】糸状性細菌により誘引される活性汚泥のバルキングは、廃水処理施設における未解決問題の一つである。糸状性細菌の多くは FISH 法などの顕微鏡観察によりその特定が可能となってきた。しかし各種糸状性細菌によるバルキングへの寄与を定量的に調べた研究は少ない。本研究では、国内の都市下水処理施設を対象に、バルキングに関連する主要な糸状性細菌を識別し、同細菌とバルキングの指標である汚泥容量指標 (SVI) との定量的な関係について調べることを目的とした。

【方法】都市下水処理場4施設より活性汚泥試料を採取し、既存のプローブを使った FISH 法により各種糸状性細菌を観察した。次に FISH 法による観察で SVI との関連がみられた糸状性細菌を対象に、PCR プライマーをデザインし、FISH 法に供した試料を含む9道府県の都市下水処理13施設の試料に対して定量 PCR を行った。

【結果と考察】4施設を対象とした FISH 調査において、その出現数が SVI の高低と関連する *Kouleothrix* 属糸状性細菌を特定した。次に13施設を対象とした *Kouleothrix* の定量 PCR を行ったところ、*Kouleothrix* の遺伝子コピー数が 10<sup>6</sup> copies/ng-DNA を超える場合には、汚泥の SVI がほぼ 200 mL/g-sludge 以上の高い値を示す結果を得た。これは *Kouleothrix* の増殖がバルキングを誘引することを示す定量的な情報であった。しかし解析した汚泥試料の中には、*Kouleothrix* の遺伝子コピー数が 10<sup>3</sup> copies/ng-DNA 程度と少ないにも関わらず、200 mL/g-sludge 以上の高い SVI を示すものもあった。単一の糸状性細菌の定量のみでバルキングの発生を説明する難しさを示す結果であった。

#### Exploration of filamentous bacteria associated with bulking in Japanese WWTPs by FISH and qPCR

○Tadashi Nittami<sup>1</sup>, Tadashi Shoji<sup>2</sup>, Mana Noguchi<sup>3</sup>, Mamoru Oshiki<sup>4</sup>, Masashi Kuroda<sup>5</sup>, Tomonori Kindaichi<sup>6</sup>, Junji Fukuda<sup>1</sup>, Futoshi Kurisu<sup>7</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., <sup>2</sup>Fuc. Sci. Tech., Seikei Univ., <sup>3</sup>Inst. Sci. Eng., Kanazawa Univ., <sup>4</sup>Dept. Civil Eng., Nat. Inst. Technol. Nagaoka Coll., <sup>5</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>6</sup>Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., <sup>7</sup>Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

**Key words** activated sludge bulking, *Kouleothrix* filamentous bacteria, qPCR, wastewater treatment

**3P-1p109 Development of P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> thin film modified by polyethylene glycol for water treatment**

○Qiansu Ma, Zetao Dong, Qi Zhu, Xiaohong Hu, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Currently, TiO<sub>2</sub> has drawn worldwide attention for water treatment due to its high efficiency and low toxicity. Many researchers have studied the modification of TiO<sub>2</sub> by doping with nonmetal elements, metals and semiconductors, in order to enhance its photocatalytic ability. In our previous study, an efficient P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst thin film was developed. Polyethylene glycol (PEG), known as binder, dispersant and structure-directing reagent, to prepare nano-crystalline particles was used to further improve the stability of thin film by creating smaller particle size and enhancing light absorbance under visible irradiation. The synthesis of PEG modified thin film was optimized by investigating the effects of dosage, calcination temperature, calcination time and number of coating layers. The result indicated that 1.0 g/L of PEG modified thin film with two coating layers; calcinated under 350°C for 2 hours had the highest photocatalytic ability. Comparing with non-modified thin film, the PEG modified composite film exhibited wider visible light absorption spectrum, higher stability and photocatalytic activity, which can be used for practical applications of water treatment.

**Development of P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> thin film modified by polyethylene glycol for water treatment**

○Qiansu Ma, Zetao Dong, Qi Zhu, Xiaohong Hu, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** photocatalysis, P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> thin films, photocatalytic stability, polyethylene glycol

**3P-1p110 Improvement of silver modified TiO<sub>2</sub> solar-light-driven photocatalyst by hydrothermal method**

○Zhu Qi, Xiaohong Hu, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

TiO<sub>2</sub>-based photocatalysis has been attracting enormous interest as one of the most promising technologies for environmentally benign water purification owing to its relatively high photocatalytic activity, non-toxicity and low cost. Nevertheless, some drawbacks have been found in practical application: the fast recombination of photogenerated electron-hole pairs, large band gap, low utilization of solar light and smaller specific surface area. In this study, silver salts were used to modify TiO<sub>2</sub> to develop a solar-light-driven photocatalyst, and hydrothermal method was used for fabrication. The activity of photocatalyst was evaluated by structure analysis and degradation effect of organic waste. Compared to the TiO<sub>2</sub>-based photocatalysts prepared by other method, hydrothermal synthesized material exhibited larger specific surface area and much higher photocatalytic activity under solar light. The present work shows hydrothermal method could be an effective way for the development of highly efficient solar-light-driven photocatalysts on water purification.

**Improvement of silver modified TiO<sub>2</sub> solar-light-driven photocatalyst by hydrothermal method**

○Zhu Qi, Xiaohong Hu, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** photocatalysis, Ag modified TiO<sub>2</sub>, hydrothermal method

**3P-1p111 Inactivation of *Escherichia coli* using P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst under LED irradiation**

○Na Liu, Qi Zhu, Ruida Xiao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Nowadays, water pollution by pathogenic microorganisms has become a big problem. Unfortunately, all of conventional water disinfection methods, including chlorination, ozonation and ultraviolet treatment have some disadvantages, such as high cost and formation of by products with potential carcinogenicity. Among the processes in developing, semiconductor photocatalysis has emerged as a very attractive technology for water disinfection due to its superior oxidation ability, low cost, nontoxicity and stability. According to our previous studies, a novel P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst has demonstrated promising aspects with remarkable efficiency in decomposing organic matter. In this study, the efficiency of photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* under LED irradiation by using the novel photocatalyst and normal TiO<sub>2</sub> photocatalyst was examined. P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst showed higher bactericidal activity than other photocatalysts and could completely inactivate 10<sup>7</sup> cfu mL<sup>-1</sup> of *Escherichia coli* in just 5 min. The present results suggest that this new photocatalyst material could greatly facilitate water disinfection effectively.

**Inactivation of *Escherichia coli* using P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst under LED irradiation**

○Na Liu, Qi Zhu, Ruida Xiao, Yingnan Yang  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** P/Ag/Ag<sub>2</sub>O/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalyst, *Escherichia coli*, disinfection

**3P-1p112 気生微細藻類 *Vischeria helvetica* の脂質合成を制御するストレス応答シグナル伝達**

○油井 信弘, 阿部 克也  
(工学院大・先進工・生化)  
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

**【目的】** 微細藻類には、窒素源欠乏が引き金となりシストを形成するとともに脂質(カロテノイドや脂肪酸)を高濃度に蓄積する種が存在する。演者らは、脂質蓄積能が高い気生微細藻類に対し、生物活性物質を用いたカロテノイド合成と脂肪酸合成との代謝スイッチングによる物質生産について検討している。本報告では、気生微細藻類の脂質合成を制御するストレス応答シグナル伝達について、生物活性物質を用いて検討した結果を述べる。

**【方法】** 気生微細藻類は、真正眼点藻綱 *Vischeria helvetica* KGU-Y001 を用いた。窒素源添加または無添加の Bold's Basal 培地に MAPK (p38, JNK または ERK) 阻害剤を添加し、光強度 40 (通常光) または 200 (強光) μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> で振とう培養した。生物活性物質の輸送体としてサポニンを用い、濃度を 0.1% とした。有機溶媒で脂質成分を十分に抽出し、HPLC と分光光度計でカロテノイドとクロロフィルを、GC で脂肪酸をそれぞれ分析した。

**【結果と考察】** 生育条件下(窒素源添加、通常光)で MAPK 阻害剤を添加し 1 日間培養した後に、7 日間ストレス培養(窒素源無添加、強光)したところ、ERK を添加した場合に脂質蓄積量の顕著な変化が示された。すなわち、コントロールと比べ、カロテノイドとクロロフィル含有量はそれぞれ 82 と 98% 減少し、脂肪酸含有量は 500% 増加した。一方、p38 阻害剤を添加した場合にはカロテノイド含有量は 50% 増加し、脂肪酸含有量は 23% 減少することが分かった。おそらく、藻細胞の増殖時期と環境ストレスによってカロテノイドと脂肪酸の生合成に関わるストレス応答シグナル伝達が切り変わったと考えられる。今後は、細胞内タンパク質のリン酸化状態とその経時変動を定量解析し、細胞周期やシスト形成と脂質の代謝との関係について調べる。

**Regulation of lipid biosyntheses by stress response signaling in aerial microalgae**

○Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe  
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

**Key words** aerial microalgae, lipid, bioactive compound, stress response signaling

**3P-1p113 低温・弱光において生育可能な気生微細藻類の探索と特徴づけ**

○西田 章弘, 油井 信弘, 阿部 克也  
(工学院大・先進工・生化)  
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】屋外における微細藻類の大型培養法は、一年中温暖な気候ではない場合や培養槽の深さによっては光強度が不足する場合において問題が生じる可能性がある。そこで演者らは、山岳地帯の基物表面上で生活する気生微細藻類に注目した。その光合成微生物は温度・光ストレスを受けるため厚いビロード状のコロニーを形成し、内側には光が当たりにくい部分が存在すると考えられる。そのため、低温・弱光で生育できる種が期待される。本報告では、低温・弱光において生育可能な気生微細藻類の探索と特徴づけについて述べる。

【方法】気生微細藻類は東京都奥多摩地区の壁面上から採集した。採集したビロード状のコロニーを寒天培地に植菌し、コロニーが形成するまで静地培養した。培養後、コロニーを滅菌水で希釈し、マイクロピペット法によって顕微鏡下で藻細胞を1個体に分けた。単離した藻細胞は、48穴マイクロプレートを用いて光強度  $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  の条件下で1週間培養した。細胞増加度は分光学的に測定した濁度から求めた。脂肪酸分析はガスクロマトグラフィーを用いて行った。

【結果と考察】マイクロピペット法によって単離操作を行った結果、直径  $10 \mu\text{m}$  程度の球状や楕円形の藻細胞が5種得られた。これらの藻細胞を低温・弱光において培養したところ、すべて増殖することが分かった。中には細胞増加度が2.5倍を示すものもあった。細胞増加度が最も高かった藻株の脂肪酸蓄積量は、3週間培養で11%、5週間培養で24%に達した。興味深いことに、エイコサペンタエン酸が3週間培養で15%含まれていた。また脂肪酸組成については、5週間培養でパルミトレン酸とパルミチン酸の割合が2倍、オレイン酸が30倍高くなることが分かった。

**Isolation of aerial microalgae grown under lower temperatures and light intensities.**

○Akihiro Nishida, Nobuhiro Aburay, Katsuya Abe  
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

**Key words** aerial microalgae, lower temperatures and light intensities, isolation, fatty acid

**3P-1p114 塩ストレス下におけるウキクサデンプン合成代謝の特徴とそのデンプン増産への応用**

○高木 航平, 李 彦, 遠山 忠, 森 一博  
(山梨大院・医工総)  
ttohyama@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】ウキクサ亜科植物は生成速度が高く、食糧食物と競合しないこと、そしてデンプン含有率が比較的高いことから次世代のデンプン系バイオマスとして近年注目されている。ウキクサのデンプン含有率をさらに向上させることができれば、高効率で魅力的なデンプン資源生産が可能になる。一方、貧栄養や低塩などの環境ストレス下でウキクサのデンプン蓄積が誘導されることが知られている。本研究では塩ストレス下でのウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) の生育特性とデンプン蓄積特性を検討した。

【方法と結果】ウキクサを  $0 \sim 300 \text{ mM NaCl}$  が含まれた培養液に浮かべて生育させ、デンプン含有率、クロロフィル含有率、バイオマス生産を経時的に測定した。その結果、 $\text{NaCl}$  存在下においてウキクサは生育24時間以内にデンプン蓄積を誘導した。そのデンプン蓄積率は、 $200 \text{ mM NaCl}$  濃度までは  $\text{NaCl}$  濃度依存的に高まった。 $200 \text{ mM NaCl}$  存在下のウキクサは生育2日後にデンプン含有率が37%に達し、これは  $\text{NaCl}$  非存在下のウキクサの約2倍であった。一方、 $\text{NaCl}$  存在下ではウキクサの生育や光合成が阻害され、特に  $200 \text{ mM NaCl}$  以上では著しい生育阻害が確認された。このような塩に対する応答を経て、 $200 \text{ mM NaCl}$  存在下でウキクサを生育させることによって、デンプン生産性を2倍以上高めることを実証した。現在は、塩ストレス下でウキクサのデンプン合成代謝遺伝子群の発現解析を実施し、分子基盤解明を進めている。

**Starch synthesis by duckweed under salt stress and its application for enhancing starch production**

○Kohei Takagi, Yan Li, Tadashi Toyama, Kazuhiro Mori  
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

**Key words** duckweed, salt, starch-production

**3P-1p115 Effects of photocatalytic pretreatment on *Chlorella vulgaris* to enhance biohydrogen production**

○Mishma Silvia Stanislaus<sup>1</sup>, Qi Zhu<sup>1</sup>, Chenyu Zhao<sup>1</sup>,  
Nobuaki Negishi<sup>2</sup>, Yingnan Yang<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>AIST)  
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Biohydrogen being a clean energy has drawn worldwide attention and researches have been carried out to make it a sustainable energy for the future. Biohydrogen from biomass has drawn particular interest due to its eco-friendly and cost effective nature. However, pretreatment and availability of biomass are a few constraints. Thermal, acid, alkali and ultrasonic pretreatment methods have been investigated as pretreatment methods of *Chlorella*, but all of them are energy intensive processes. Therefore, in this research we propose to use a newly developed photocatalyst material ( $\text{P/Ag/Ag}_2\text{O/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$ ), which has shown high photocatalytic ability under simulated solar light. This material was coated on glass tubes and used for photocatalytic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for enhanced hydrogen production. On treating *Chlorella vulgaris* (150 ml) the protein and carbohydrate concentration increased exponentially in 60 hr. This showed that the photocatalytic pretreatment was effective in breaking down the algal cell walls and releasing the components into the solution. Also, on subjecting the photocatalytic pretreated algae to fermentation generated higher hydrogen than the algae with no pretreatment. Conclusively,  $\text{P/Ag/Ag}_2\text{O/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$  photocatalyst can serve as an appropriate material for photocatalytic pretreatment of biomass like *Chlorella*. Furthermore, photocatalysis can be used as a cost effective pretreatment method for practical application.

**Effects of photocatalytic pretreatment on *Chlorella vulgaris* to enhance biohydrogen production**

○Mishma Silvia Stanislaus<sup>1</sup>, Qi Zhu<sup>1</sup>, Chenyu Zhao<sup>1</sup>, Nobuaki Negishi<sup>2</sup>,  
Yingnan Yang<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>AIST)

**Key words** Biohydrogen, *Chlorella vulgaris*, photocatalytic pretreatment,  $\text{P/Ag/Ag}_2\text{O/Ag}_3\text{PO}_4/\text{TiO}_2$  photocatalyst

**3P-1p116 オイル高蓄積海洋珪藻 *Fistulifera solaris* におけるオイルボディタンパク質の解析**

○野島 大佑, 吉野 知子, 田中 剛  
(農工大院・工)  
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】オイル高蓄積珪藻 *Fistulifera solaris* は、最大で65%のオイル含有量を有し、バイオ燃料生産候補株として非常に有用である。細胞内で合成されたオイルはオイルボディと呼ばれるオルガネラに保存される。このオルガネラ上には多数のタンパク質が存在し、その形成やオイルの分解に関与していることが報告されているが、微細藻類における知見はほとんどない。そこで本研究では *F. solaris* からこれらタンパク質を分離・同定し、その機能解析を行った。【方法】培養した *F. solaris* からガラスビーズを用いて細胞破碎を行い、オイルボディを単離した。単離したオイルボディ中からタンパク質を分離し、nanoLC-MSを用いてタンパク質の同定を行い、*in silico* 解析によりオイルボディ関連タンパク質の予測を行った。続いて GFP を融合したタンパク質を発現するベクターを構築し、細胞内での局在観察を行った。更に予測された機能に関連する阻害剤を用いて、オイルボディ形成に与える影響を評価した。【結果】オイルボディを単離し、nanoLC-MSにより同定を行った結果、全73オイルボディ関連タンパク質候補を獲得した。この中から更にオイルボディ上に局在している可能性の高いタンパク質を絞り込み、GFP 融合による局在解析を実施した。その結果、2つのタンパク質においてオイルボディ上に GFP 蛍光を観察することが出来た。また複数の膜輸送関連タンパク質が同定され、これらのタンパク質がオイルボディ形成に関与している可能性が示唆された。

**Identification of oil body proteins from *Fistulifera solaris* for elucidation oil body formation**

○Daisuke Nojima, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka  
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** *Fistulifera solaris*, Oil body, proteomics, biodiesel fuel

### 3P-1p117 明暗周期下で効率的に油脂を生産するための海洋性緑藻培養技術の開発

○藤原 悠右<sup>1</sup>, 加藤 悠一<sup>1</sup>, 賀 詩欣<sup>2</sup>, 蓮沼 誠久<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>Harbin Institute of Technology, China  
 akondo@kobe-u.ac.jp

近年、微細藻類を用いた液体燃料・有用物質生産技術の開発が進められている。我々は油脂蓄積能の高い海洋性緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4 株を用い、バイオディーゼルの原料となるトリアシルグリセロールのラボスケールでの生産試験を実施してきた。しかし、これまでは連続的に光を照射する条件（継続光）で生産試験を行ったのみであり、昼夜（明暗周期）が存在する場合に油脂生産がどのような影響を受けるかは明らかではなかった。本研究は屋外での培養を想定し、明暗周期下での油脂生産の検証と培養条件の最適化を目的とした。

#### 【結果】

12 時間明期の明暗周期下で JSC4 株の培養を行い、バイオマス生産量・油脂含有率・炭水化物含有率を測定した。24 時間明期の条件と比較すると、明暗周期条件では油脂含有率および油脂生産量が低下し、一方で炭水化物含有率は増加した。明暗周期による油脂含有率低下を克服する手段の一つとして、我々は暗期における弱光照射の技術を開発した。暗期において弱光を継続的に照射することで油脂含有率が増加し、炭水化物含有率が低下した。加えて、明暗周期による油脂含有率の低下のメカニズムを解明するため、代謝物量および遺伝子発現量の網羅的解析を現在行っており、本発表で報告する予定である。

#### 【考察】

本研究は、明暗周期下での油脂生産における課題の抽出を行い、それに対する解決策のひとつを見出した。屋外で油脂生産培養を実施する際には、暗期弱光照射が有効な手段として期待できる。

### Development of lipid production strategy using the oceanic green alga under light and dark cycles

○Yusuke Fujihara<sup>1</sup>, Yuichi Kato<sup>1</sup>, Shih-Hsin Ho<sup>2</sup>, Tomohisa Hasunuma<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Harbin Institute of Technology, China

**Key words** Light dark cycles, microalgae, Lipid production, Metabolomics

### 3P-1p118 海藻由来好熱菌を用いた海藻分解プロセスの検討

藤井 健太<sup>1</sup>, 奥中 淳平<sup>2</sup>, 富永 有里絵<sup>1</sup>, 八木 寿幸<sup>3</sup>, 大城 隆<sup>1</sup>, 鈴木 宏和<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>鳥取大院・工・化生応工, <sup>2</sup>鳥取大・工・生応工, <sup>3</sup>鳥取大・工・GSC  
 hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】バイオマスを糖化する好熱菌は、高温糖化プロセスに利用できると考えられ、また高温プロセスには病原菌増殖抑制などといった長所がある。このことから我々は好熱菌を基盤とした高温バイオマス分解系の開発に取り組み、以前の研究において褐藻多糖類を資化できる好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 を海藻から単離した。本大会では、OS27 株および OS27 遺伝子改変体の海藻分解能について報告する。

【実験】市販ワカメを褐藻材料として使用した。培養は 60°C で好気的に行った。*Geobacillus-E. coli* シャトルプラスミドにセルラーゼ遺伝子をクローニングし、得られたプラスミドで OS27 株を形質転換した。培養液中の糖質は、フェノール硫酸法を用いて定量した。

【結果と考察】粉砕ワカメを含む最少培地中で OS27 を培養したところ、細胞濃度が 100 倍程度増加した。その際の細胞密度は LB 培地中での増殖と比べると 1/1000 程度であったが、本結果は OS27 株がワカメを栄養源として増殖できることを示す。興味深いことに、培養過程において培地中ワカメは半分程度の大きさに微粒化していた。OS27 株を含まない培養液においても、若干の微粒化が見られたが、OS27 を含む培地中での微粒化が顕著であった。OS27 株は、アルギン酸と可溶性セルロースを資化できることから、当該ワカメ分解は褐藻多糖類の分解を通じて起こっていると考えられる。細胞増殖が向上した場合のワカメ分解を調べるために、カザミノ酸とワカメ粉砕物を含むリン酸バッファー中で培養したところ、ワカメの微粒化は更に加速した。その過程では可溶性糖質も増加した。以上の結果は、OS27 株が褐藻バイオマスの高温糖化プロセスに有用である可能性を示唆している。現在、セルラーゼ遺伝子を高発現する OS27 株組換え体を用いた海藻分解も検討している。

### Evaluation of seaweed degradation processes using a thermophile

Kenta Fujii<sup>1</sup>, Jyumpei Okunaka<sup>2</sup>, Yurie Tominaga<sup>1</sup>, Hisashi Yagi<sup>3</sup>,  
 ○Takashi Ohshiro<sup>1</sup>, Hirokazu Suzuki<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., <sup>2</sup>Dept. Biotechnol., Tottori Univ., <sup>3</sup>GSC, Faculty of Eng., Tottori Univ.)

**Key words** macroalgae, degradation, *Geobacillus thermodenitrificans*, thermophile

### 3P-1p119 ミトコンドリア電子伝達系制御によるユーグレナ低酸素下ワックスエステル生産の調節

○中澤 昌美<sup>1,2</sup>, 太田 剛志<sup>1</sup>, 石川 孝博<sup>2,3</sup>, 上田 光宏<sup>1</sup>, 阪本 龍司<sup>1</sup>, 乾 博<sup>2,4</sup>, 中野 長久<sup>1</sup>, 宮武 和孝<sup>1,5</sup>  
<sup>1</sup>大阪大院・生環科, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>鳥根大院・生資科, <sup>4</sup>大阪大院・総研ハ, <sup>5</sup>帝塚山学院大・人間科  
 mami@biochem.osakafu-u.ac.jp

微細藻類ユーグレナは好気条件において、余剰の炭素を貯蔵多糖パラミロン (β-1,3 グルカン) として蓄積する。低酸素状態に曝露すると、パラミロンを速やかに分解し、脂肪酸・脂肪アルコールエステルであるワックスエステル (WE) へと変換する。ユーグレナ WE を輸送用燃料として実用するには、生産量およびコスト面の改善が不可欠である。我々は、WE 生産を向上させる因子を獲得すること、およびそれを可能とする代謝メカニズムの解明を通じて、WE 高生産への新たな方法論を確立することを目指した。WE を構成する脂肪酸・アルコールは主に炭素長が 10 から 16 の飽和化合物であり、炭素数が奇数の分子も多く含まれている。従来の代謝予測において、奇数鎖脂肪酸・アルコール合成起点となるプロピオニル-CoA 合成には、ミトコンドリア電子伝達系の関与が必要であることが示唆されてきた。本研究では、ミトコンドリア電子伝達系を薬剤により調節し、ユーグレナの低酸素下代謝に及ぼす影響を調べた。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤ロテノン、低酸素下での複合体 II 阻害剤パモ酸ピルビニウム、複合体 III 阻害剤アンチマイシン、および膜のプロトン勾配を解消する脱共役剤 CCCP を作用させ、低酸素処理後のパラミロンの分解および WE 生産を解析した。アンチマイシンは低酸素下パラミロン、WE 代謝に全く影響しなかった。ロテノン、パモ酸ピルビニウム、CCCP 添加は、低酸素下パラミロン分解を亢進した。このとき、ロテノンおよびパモ酸ピルビニウム添加群では、WE 生産量が低下しており、パラミロン由来の炭素が WE 以外の経路で代謝されていることが示唆された。これに対して、CCCP 添加群ではコントロール群と比べ WE 生産量が 2 倍以上に増加していた。現在、これらの現象の原因となる細胞内代謝変動理解のために、細胞内 ATP および酸化還元バランスの解析を進めている。

### Regulation of mitochondrial ET system improved wax ester production in *Euglena gracilis*

○Masami Nakazawa<sup>1,2</sup>, Tsuyoshi Ohta<sup>1</sup>, Takahiro Ishikawa<sup>2,3</sup>, Mitsuhiro Ueda<sup>1</sup>, Tatsuji Sakamoto<sup>1</sup>, Hiroshi Inui<sup>2,4</sup>, Yoshihisa Nakano<sup>1</sup>, Kazutaka Miyatake<sup>1,5</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>CREST, JST, <sup>3</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Shimane Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Compr. Rehabil., Osaka Pref. Univ., <sup>5</sup>Tezukayama Gakuin Univ.)

**Key words** *Euglena gracilis*, biofuel, wax ester, mitochondria

### 3P-1p120 ラン藻スピリリナからの高生産エタノール変換プロセスの開発

○藍川 晋平<sup>1</sup>, 猪熊 健太郎<sup>1</sup>, 若井 晁<sup>1</sup>, 佐々木 建吾<sup>1</sup>, 蓮沼 誠久<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・イノベ, <sup>2</sup>神戸大院・工  
 akondo@kobe-u.ac.jp

新たなバイオマス資源として、ラン藻や微細藻類が目ざされ、その光合成産物であるグリコーゲンやデンプンを糖質源としたエタノール生産プロセスが開発されてきた。しかし、従来法では、発酵工程の前に、細胞内からデンプンやグリコーゲンを抽出し、それらを微生物に資化させるためにグルコースへと糖化する必要があった。我々は細胞破砕が容易なラン藻 *Arthrospira platensis* (スピリリナ) に注目した。そして、細胞内からのグリコーゲンの抽出を促進するリゾチームとグリコーゲンを糖化し、利用できるアミラーゼ発現酵母を用いることで、スピリリナをエタノールへと直接変換するプロセスを開発した。従来法で必要であったグリコーゲンの抽出と糖化の工程を発酵工程に統合することに成功した。しかし、グリコーゲンの抽出に時間がかかり、酵母へのグルコースの供給が遅いため、エタノール生産速度が低いことが問題であった。これまでに大腸菌では金属塩により細胞外多糖を除去することで、細胞内で生産された組換えタンパク質の分泌量が増加することが報告されている。我々は、スピリリナからのグリコーゲン抽出も細胞外多糖の除去により促進されるのではないかと考え、金属イオンがスピリリナの細胞外多糖の除去およびグリコーゲンの抽出に及ぼす影響を調べた。その結果、100 mM CaCl<sub>2</sub> により、細胞外多糖が剥離し、グリコーゲン抽出が促進された。そして、CaCl<sub>2</sub> とリゾチーム存在下でアミラーゼ発現酵母によるスピリリナからの直接エタノール生産を行ったところ、エタノール生産速度が 1 g/L/h まで向上し、48 g/L のエタノールを理論値の 93% の収率で生産できた。金属塩による細胞外多糖の除去により、エタノール生産速度を大幅に向上させることに成功し、従来法と比べて、高収率、高収量、高生産速度のエタノール生産プロセスを開発できた。

### High-productive conversion of cyanobacteria *Arthrospira platensis* to ethanol

○Shimpei Aikawa<sup>1</sup>, Kentaro Inokuma<sup>1</sup>, Satoshi Wakai<sup>1</sup>, Kengo Sasaki<sup>1</sup>, Tomohisa Hasunuma<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** Glycogen, cyanobacteria, calcium, ethanol

**3P-1p121 藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 *hox* 遺伝子変異株のコントロールされた培養条件における有機酸生産**

○中島 満晴<sup>1</sup>, 飯嶋 寛子<sup>1</sup>, 白井 智美<sup>2</sup>, 岡本 真美<sup>2</sup>, 蓮沼 誠久<sup>3</sup>, 近藤 昭彦<sup>2,3</sup>, 平井 優美<sup>2</sup>, 小山内 崇<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>明治大・農, <sup>2</sup>理研・CSRS, <sup>3</sup>神戸大院・工)  
tosanai@meiji.ac.jp

シアノバクテリアは双方向触媒性の[NiFe]型ヒドロゲナーゼを有し、同酵素は水素生産に関わっていることが知られている。シアノバクテリアにおけるヒドロゲナーゼの生理学的役割はよくわかっていないが、これまでの研究により嫌気培養条件下においては、電子伝達の調節する役割を有することが示唆されている。また、このヒドロゲナーゼはHoxEFUYHの5つのサブユニットから構成される。これらのサブユニットのうち、HoxEFUはジアフォラーゼ反応、HoxYHはヒドロゲナーゼ反応に関与していることが明らかになっており、HoxHは触媒活性に必須であることが知られている。そこで、本研究では、非窒素固定型単細胞藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis* 6803) で *hoxH* の発現量が低下した *hoxH* 変異株を、暗所、嫌気条件下で培養し、同株における代謝物の解析と遺伝子の転写解析を行った。その結果、コハク酸をはじめとする有機酸と、糖リン酸の生産量の増加が見出された。さらに、糖代謝に関わるRNAポリメラーゼシグマ因子であるSigEと6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼの転写量・タンパク質量が、野生株よりも増加していた。このことから、*hoxH* 遺伝子が *Synechocystis* 6803 の糖代謝の制御と有機酸生産に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

**Organic acid production under controlled culturing condition in *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant**

○Mitsuharu Nakajima<sup>1</sup>, Hiroko Iijima<sup>1</sup>, Tomokazu Shirai<sup>2</sup>, Mami Okamoto<sup>2</sup>, Tomohisa Hasunuma<sup>3</sup>, Akihiko Kondo<sup>2,3</sup>, Masami Yokota Hirai<sup>2</sup>, Takashi Osanai<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Sch. Agric., Meiji Univ., <sup>2</sup>RIKEN, CSRS, <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** cyanobacteria, hydrogenase, metabolic engineering, anaerobic condition

**3P-1p122 Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides***

○Dung Pham Khanh<sup>1</sup>, Atsushi Miyata<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Harutake Yamazaki<sup>2</sup>, Kazuo Masaki<sup>3</sup>, Kazuki Mori<sup>4</sup>, Kosuke Tashiro<sup>4</sup>, Satoru Kuhara<sup>4</sup>, Hiroaki Takaku<sup>2</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>2</sup>Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., <sup>3</sup>NRIB, <sup>4</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)  
owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

In recent years, carotenoids have received increasing attention as they have extensive use in medicine, cosmetic, chemistry, food and feed industry as an antioxidant, vitamin A precursor and food colorants. Carotenoids widely distribute in diverse microorganisms including the bacteria, the algae, fungi and the yeasts. Among them, the yeast *Rhodospiridium toruloides* is convenient for large-scale fermentation due to its unicellular nature and high growth rate. However, the biotechnological synthesis of carotenoids is influenced by many factors such as carbon source, light, temperature, aeration, metal ions and salts. Light is an important factor to considerate during the production of microbial carotenoids; hence, it improves carotenogenesis. This is well-known response for *R. toruloides* but molecular mechanism of light response has been unknown. The purpose of this study is to obtain insight of light response for carotenoids biosynthesis in *R. toruloides*. To carry out comparative analysis with wild type, carotenoids non-producing mutants were created.

To obtain carotenoid non-producing mutant, UV-mutagenesis was carried out. After 3 cycles of mutation and screening, white mutants were successfully obtained. Carotenoid production, oil production, and other growth parameter under the light and dark were analyzed. Now, transcription response of genes encoding carotenoid biosynthesis are analyzing.

**Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodospiridium toruloides***

○Dung Pham Khanh<sup>1</sup>, Atsushi Miyata<sup>1</sup>, Yosuke Shida<sup>1</sup>, Harutake Yamazaki<sup>2</sup>, Kazuo Masaki<sup>3</sup>, Kazuki Mori<sup>4</sup>, Kosuke Tashiro<sup>4</sup>, Satoru Kuhara<sup>4</sup>, Hiroaki Takaku<sup>2</sup>, Wataru Ogasawara<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Nagaoka Univ. Technol., <sup>2</sup>Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., <sup>3</sup>NRIB, <sup>4</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ.)

**Key words** *Rhodospiridium toruloides*, Carotenoids biosynthesis, light response mechanism

**3P-1p123 II-VI 族化合物半導体結晶を合成する光合成細菌のスクリーニング**

○清水 稜, 富永 依里子, 岡村 好子  
(広島大院・先端物質)  
okamura@hiroshima-u.ac.jp

**[目的]**

化合物半導体は、電子移動度がシリコンより高く、現在需要の高まりつつある半導体である。この化合物半導体の生産では、材料入手過程や結晶精製過程にかかるコストが高いことが知られている。これにより資源豊富で安価なシリコン半導体がしばしば用いられていた。微生物の中には、金属イオンを最終電子供与体あるいは最終電子受容体に利用可能なものが知られており、生成物としてCdSやCdSeのような化合物半導体結晶粒子も見られている。このことから、微生物培養によって半導体結晶の合成が可能になれば、温和な条件での結晶合成が期待でき、さらに低コスト化、環境フレンドリーな生産システムが期待される。よって本研究では、化合物半導体結晶を合成する微生物のスクリーニングを目的とした。

**[方法及び結果]**

広島県、愛媛県、福岡県沿岸で採取した海水、計40サンプルについて、光合成細菌用培地で培養することで、光合成細菌を集積した。40サンプル中20サンプルで光合成細菌が集積された。集積した光合成細菌にII-VI族元素(Pb-S, Cd-S, Zn-S)を終濃度1mMで添加し培養した結果、II-VI族両イオンを回収していることを確認した。X線回折分析を行った結果、結晶由来のピークが確認され、PbSの結晶が存在していることが示唆された。現在、TEM/EDSを用いてその結晶形態を検討している。

**Screening of photosynthetic bacteria synthesizing crystal of group II-VI compound semiconductor**

○Ryo Shimizu, Yoriko Tominaga, Yoshiko Okamura  
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

**Key words** biomineralization, photosynthetic bacteria, compound semiconductor

**3P-1p124 ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した大腸菌を用いた無機-バイオハイブリッド光触媒による水からの水素製造**

○本田 裕樹<sup>1</sup>, 渡邊 源規<sup>1</sup>, 萩原 英久<sup>1,2</sup>, 伊田 進太郎<sup>1,2</sup>, 石原 達己<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>九大カーボンニュートラル・エネルギー国際研, <sup>2</sup>九大院・工)  
yhonda@i2cner.kyushu-u.ac.jp

**[目的]** 光触媒反応を用いた水の分解反応による水素生産が注目されている。演者らは、無機半導体による電子メディエータ (methylviologen, MV) の光触媒還元 (反応(1)) と、生体触媒による還元型MVからの水素生産 (反応(2)) の2段階の反応から成る、無機-バイオハイブリッド光触媒による水素生産系について検討している。本研究では、無機半導体TiO<sub>2</sub>、MV、生体触媒として[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した大腸菌の休止菌体を組み合わせた反応系による水素生産について検討した。

**[方法および結果]** TiO<sub>2</sub> (anatase)が、Tris-HCl (pH7)緩衝液中において、アスコルビン酸を犠牲試薬として照射下でMVを還元することを確認した (反応(1))。続いて、*Clostridium acetobutylicum* 由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよび修飾タンパク質の遺伝子4種を *Escherichia coli* BL21(DE3)へ導入し組換え大腸菌を作製した。本組換え大腸菌を培養し得られた休止菌体を触媒として細胞破碎や酵素精製等の煩雑な操作をせずに直接反応に供したところ、還元型MVを電子供与体として水素生成が可能であることを確認した (反応(2))。これらの結果をもとに、TiO<sub>2</sub>、MV、組換え大腸菌菌体を含む反応溶液を調整し、犠牲試薬としてアスコルビン酸を添加した条件において照射下における水素生成を確認し、無機-バイオハイブリッド光触媒による水素生産に成功した[1]。さらに、反応(1)を効率的に進行する反応条件、無機半導体を探索することで、当該反応系による水素生成能の向上について検討している。

[1] Y Honda, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, doi:10.1002/anie.201600177

**Hydrogen production by inorganic-bio hybrid photocatalyst using whole-cell of recombinant *E. coli***

○Yuki Honda<sup>1</sup>, Motonori Watanabe<sup>1</sup>, Hidehisa Hagiwara<sup>1,2</sup>, Shintaro Ida<sup>1,2</sup>, Tatsumi Ishihara<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>WPI-I2CNER, Kyushu Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Kyushu Univ.)

**Key words** hydrogen, hydrogenase, photocatalyst, whole cell biocatalyst

### 3P-1p125 光合成細菌と枯草菌の共培養による酸素ガス共存下の窒素固定

○前田 勇, 久下 沼匠  
(宇都宮大院・農)  
i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

生物学的窒素固定はニトロゲナーゼによって触媒される、窒素ガスをアンモニアに変換する過程である。生化学反応は一般的に、常温・常圧の温和な条件下で進行するため、窒素固定反応はエネルギー消費の少ない窒素肥料生産に結び付く可能性を秘めている。窒素固定を考える上でニトロゲナーゼ活性の酸素ガスあるいはアンモニアによる失活は考慮されなければならない特性である。本研究では、細菌による窒素固定を農業生産へ役立てるための新たな手法を考案することを目的として、光合成細菌の培養方法に関する研究を行った。多くの光合成細菌は酸素非発生の光合成と、窒素固定を行うことができる。しかしながら、酸素ガスからニトロゲナーゼを防護する仕組みを持たないため、大気中窒素ガスを基質とした窒素固定を考える場合に、活発に呼吸を行う従属栄養細菌との共培養により、酸素ガスを取り除き反応を持続させることが可能か否かを検討した。光合成細菌は *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 を、従属栄養細菌は枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC6633 をそれぞれ用いた。ガラス製培養容器の中に入れた無機態・有機態窒素を含まない培地に、両細菌を移植しタングステンランプの光を照射して培養を行った。検鏡により培養液中に形成されたバイオフィルム内に光合成細菌と枯草菌が互いに近接して増殖の様子が観察された。両細菌 DNA を特異的に検出するプライマーを用いた定量 PCR により無機態・有機態窒素非存在下において両細菌が増殖することが確認された。また、共培養液中にアンモニアは検出されなかった。また、共培養時のみ菌体を含む培養液中の無機態・有機態窒素含量が増加することがマイクロゲル法により確認された。これらの結果より、光合成細菌を枯草菌と共培養することで大気中の窒素ガスを基質とした窒素固定が持続されることが明らかとなった。

#### N<sub>2</sub> fixation by co-culture of photosynthetic bacterium and *Bacillus subtilis* in the presence of O<sub>2</sub>

○Isamu Maeda, Takumi Kugenuma  
(Grad. Sch. Agric., Utsunomiya Univ.)

**Key words** nitrogen fixation, coculture, photosynthetic bacteria, *Bacillus subtilis*

### 3P-1p126 Is Archaerhodopsin a powerful photosensitizer of the TiO<sub>2</sub> based solar energy conversion system ?

○Luomeng Chao<sup>1</sup>, Gang Dai<sup>2</sup>, Xiong Geng<sup>3</sup>, Tatsuo Iwasa<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan., <sup>2</sup>Coll. Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China, <sup>3</sup>Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan)  
iwasa@mmm.muroran-it.ac.jp

Solar energy is the primary energy source of our planet. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is a widely utilized semiconductor for transforming the solar energy. The TiO<sub>2</sub>-based system has been utilized in solar cell, photocatalytic hydrogen production and photocatalytic degradation of organic pollutants. Bacteriorhodopsin (BR) was shown to be able to enhance the performance of TiO<sub>2</sub> materials in TiO<sub>2</sub>-based solar cell, photocatalytic water splitting and photocatalytic degradation of pollutants. However, high cost of the preparation of the protein restricts its industrial application. Although numerous attempts have been made, *E.coli*-expression system of the protein has not been developed yet. Recently we found a BR homolog, Archaerhodopsin (AR) of a *Halorubrum* species isolated from Ejninoor salt lake of China. The protein showed similar photoreaction properties as that of BR and most importantly the *E.coli*-expression of the protein was achieved. The protein might be an excellent candidate for a photosensitizer of the TiO<sub>2</sub>-based solar energy conversion system. In the present study, the photochemical properties and the performance as a photosensitizer of AR are presented and compared with those of BR.

#### Is Archaerhodopsin a powerful photosensitizer of the TiO<sub>2</sub> based solar energy conversion system ?

○Luomeng Chao<sup>1</sup>, Gang Dai<sup>2</sup>, Xiong Geng<sup>3</sup>, Tatsuo Iwasa<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan., <sup>2</sup>Coll. Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China, <sup>3</sup>Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan)

**Key words** Bacteriorhodopsin, Archaerhodopsin, TiO<sub>2</sub> nanoparticles, Photocatalytic degradation

### 3P-1p127 銀ナノ粒子・ポロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の暗所と可視光照射下におけるカビ胞子に対する殺菌効果

○深野木 伸太<sup>1</sup>, 宮崎 愛<sup>1</sup>, 山本 幸次郎<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・産理工・生環化, <sup>2</sup>伊都研)  
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

**【背景と目的】**我々は、銀ナノ粒子(AgNPL)・ポロン樹脂(B)・クレイ(C)から構成される新規な光触媒を開発した。このABC光触媒は、UV応答型光触媒として広く用いられている二酸化チタンとは異なり可視光の吸収が強いので、屋内でも使用できる光触媒として期待されている。今回、組成が異なる2種類のABC光触媒のカビ胞子に対する暗所および可視光照射下での殺菌効果について比較検証した。

**【方法】**抗菌試験は、JIS R1705「ファインセラミックス-光照射下での光触媒抗カビ加工製品の抗カビ性試験方法」を参考に、一部方法を適宜修正して実施した。すなわち、表面をバインダーでコートしたPETフィルムに光触媒を吸着させ、所定の胞子濃度(5.6×10<sup>6</sup> CFU/ml)に調整した *Aspergillus niger* および *Penicillium pinophilum*, *Trichoderma virens* の胞子液を塗布し、素のPETフィルムを被せ、暗所およびLED光照射下(照度1000lx)で8時間放置した。その後、胞子液を回収し、1/10濃度のポテトデキストロー平板培地に培養後のコロニー形成数を比較することにより胞子の生残率を測定した。

**【結果】**本光触媒への曝露により、*A.niger*, *P.pinophilum*, *T.virens* の3菌種ともに暗所においてもコントロール試験区に較べて胞子の生残数は大きく減少した。しかし、暗所とLED光照射下での胞子数に大きな差は認められなかった。そこでABC光触媒の組成を変えて試験を行ったところ、暗所に較べてLED光照射下では胞子の生残数が少なくなっており、可視光照射下により殺菌効果がさらに向上することが分かった。可視光の波長、バインダーへのコートの方法、異なる種類のカビを用いて、更なる抗菌活性の向上について現在、検証している。

#### Antifungal effect of novel photocatalyst against pathogenic bacteria under dark and visible light

○Shinta Fukanoki<sup>1</sup>, Megumi Miyazaki<sup>1</sup>, Kojiro Yamamoto<sup>1</sup>, Kengo Ito<sup>2</sup>, Kenji Tanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad.Sch.Humanity-Oriented Sci.&Eng., Kindai Univ., <sup>2</sup>Ito Laboratory)

**Key words** visible-light responsible photocatalyst, antifungal effect, nanosilver

### 3P-1p128 銀ナノ粒子・ポロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の暗所と可視光照射下における病原細菌殺菌効果

○宮崎 愛<sup>1</sup>, 深野木 伸太<sup>1</sup>, 山本 幸次郎<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・産理工・生環化, <sup>2</sup>伊都研)  
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

**【目的】**光電池や建築外装材、抗菌剤等として実用化されている光触媒の多くは二酸化チタンのような紫外線応答型である。このため、太陽光の当たらない室内でも利用できる可視光応答型の光触媒が求められている。伊都研究所が開発したABC光触媒は可視光や近赤外光を吸収することから、本研究では数種の病原細菌に対する本光触媒の殺菌効果をフィルム密着法により検証した。

**【方法】**ABC光触媒は水に不溶であるため、予備試験としてABC光触媒の希釈液を平板培地に直接塗布して検定菌の増殖阻害効果を検証した。その結果、可視光を照射しない暗所下でもO157:H7のコロニー数を7桁から8桁減少させ、黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対する効果も確認された。また、可視光照射により抗菌効果がさらに向上するほか、可視光の波長によって効果が異なることが分かった。その後、ABC光触媒を固定化させるバインダーを開発したことから、JIS R 1752に基づき、フィルム密着法による抗菌試験を実施した。表面をバインダーでコートしたPETフィルムにABC光触媒原液(40mg/ml)の希釈液を吸着させ、検定菌液を塗布した。素のPETフィルムで挟み込み、暗所および白色光照射下(照度1000lx)で8時間静置した後、菌液を回収した。この菌液を溶融寒天培地に混合させた平板を30℃で培養し、生残菌数を数数することでABC光触媒の殺菌効果を検証した。

**【結果】**ABC光触媒500倍希釈液を用いた場合、O157:H7に関しては暗所下で約2桁、可視光照射下で約4桁の菌数減少が認められた。希釈倍率を増やして試験したところ、15000倍までは殺菌効果が認められたものの、20000倍希釈液では効果が得られなかった。現在、黄色ブドウ球菌に対しても1000倍希釈液で効果が確認されており、緑膿菌や病原性大腸菌に関しても検証を行っている。

#### Bactericidal effect of novel photocatalyst against pathogenic bacteria under dark and visible light

○Megumi Miyazaki<sup>1</sup>, Shinta Fukanoki<sup>1</sup>, Kojiro Yamamoto<sup>1</sup>, Kengo Ito<sup>2</sup>, Kenji Tanaka<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad.Sch.Humanity-Oriented Sci.&Eng., Kindai Univ., <sup>2</sup>Ito Laboratory)

**Key words** bactericidal effect, visible-light photocatalyst, nanosilver

**3P-1p129 銀ナノ粒子・ポロン樹脂・クレイからなる新規光触媒の近赤外光照射下における殺菌効果**

○山本 幸次郎<sup>1</sup>, 深野木 伸太<sup>1</sup>, 宮崎 愛<sup>1</sup>, 伊東 謙吾<sup>2</sup>, 田中 賢二<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>近畿大院・産業理工・生環化, <sup>2</sup>伊都研)  
 tanaka@fuk.kindai.ac.jp

**【目的】** 現在実用化されている光触媒の多くは二酸化チタンのように紫外線のみを吸収・利用するため、可視光応答型の光触媒の開発が近年盛んである。伊都研究所が開発した平板状銀ナノ粒子(A)・ホウ素樹脂(B)・クレイ(C)からなるABC光触媒は、可視光のみならず近赤外線領域の吸収も強いため、新規な光触媒として屋内でも利用可能な光電変換素子や抗菌剤として期待される。近赤外光応答型光触媒は世界的にも報告例が無い。これまでの研究により、ABC光触媒は微量で暗所下でもO157や黄色ブドウ球菌、緑膿菌などの病原細菌や黒カビに対して強い殺菌能を有し、室内灯程度(1000lx)の可視光照射による殺菌能の向上が認められた。今回、近赤外光照射がABC光触媒の殺菌能に及ぼす影響について検証することとした。

**【方法】** 『ファインセラミックス-可視光応答形光触媒抗菌加工製品の抗菌性試験方法』であるJIS R1752法を参考に、本光触媒の近赤外光照射下での殺菌能を評価した。すなわち、表面を吸着剤でコートしたPETフィルムに光触媒を吸着させ、所定の菌数に調整した大腸菌液を塗布し、そこへ素のPETフィルムを被せ暗所もしくは自作の近赤外光照射装置内に設置した。8時間後に菌液を回収し、平板コロニー形成計数法で大腸菌の生残菌数の減少を調べることにより殺菌能を評価した。

**【結果】** フィルムへの吸着量にも依るが、ABC光触媒存在下では大腸菌の生菌数は暗所下で4桁以上減少し、近赤外光照射下ではさらにその1桁ないし数分の1に減少した。ただし、塗布状態や光触媒の組成による影響も小さくなく、これらの点を改善すればより大きな抗菌活性が期待できると思われた。暗所下での殺菌作用は、銀ナノ粒子と他の成分との相乗効果によるものと考えられる。現在、黄色ブドウ球菌などの病原細菌やカビにおける近赤外光照射下での殺菌能を調べている。

**Bactericidal effect of near infrared ray-responsible photocatalyst**

○Kojiro Yamamoto<sup>1</sup>, Shinta Fukanoki<sup>1</sup>, Megumi Miyazaki<sup>1</sup>, Kengo Itou<sup>2</sup>, Kenji Tanaka<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad.Sch.Humanity-Oriented Sci.&Eng.,Kindai Univ, <sup>2</sup>Ito Laboratory)

**Key words** bactericidal effect, near infrared ray-responsible photocatalyst, nanosilver

**3P-2p132 LAL 固定化ビーズを用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用 (第3報)**

○猪瀬 陽加<sup>1</sup>, 飯島 綾<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境)  
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【目的】** 注射薬や輸液などの医薬品の品質管理において、発熱の代表的なバイロジェンであるエンドトキシン(ET)の検査が義務づけられており、ETの高感度測定は重要である。また臨床現場では、敗血症などのETショック症状を示す救急患者に対して、血中のET濃度の迅速かつ正確な測定が求められている。この現状を踏まえ、我々はLAL固定化ビーズ法を開発し、ETの高感度・迅速測定を実現した<sup>1)</sup>。本研究では、開発したLAL固定化ビーズ法を用い、従来法では測定が困難であった種々の試料中のET濃度の測定を行い、本法の汎用性と実用性を評価した。

**【方法と結果】** 前報<sup>1)</sup>に従い、LAL固定化ビーズを作成した。LAL固定化ビーズ法により、ET測定に影響を与える夾雑物である胆汁酸などを含む、種々のモデル溶液の系や市販の透析液や経腸栄養剤を対象に、ETの添加回収試験をおこなった。その結果、従来法では添加したET濃度と大きく異なる値を検出したのに対し、LAL固定化ビーズ法では正確なET濃度の測定が可能であり、本法の幅広い汎用性と有用性が示された。さらに本法を用い、約30名のヒトの血清試料中のET濃度の測定を行った結果、試料を適切に希釈することで、簡便、迅速かつ精度よく測定が可能であり、本法の実用性が示唆された。

1) H25 生物工学会要旨 p.152.

**Development of a rapid and sensitive method for assessing endotoxin by using LAL-conjugated-microbeads and it's application (part 3)**

○Haruka Inose<sup>1</sup>, Aya Iijima<sup>2</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Col. Agro-bio. Resource. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** bile acid, endotoxin, Limulus ameocyte lysate, serum sample

**3P-2p133 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析**

○大瀧 賀也<sup>1</sup>, 飯島 綾<sup>2</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>筑波大・生物資源, <sup>2</sup>筑波大院・生命環境)  
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【目的】** エンドトキシン(ET)はグラム陰性菌の外膜構成成分の一種で、血中へ混入すると人体に重篤な症状を引き起こす。腸内のETは腸管膜を通じて血中に入り、腸内細菌由来のETが様々な疾患に関与する可能性が指摘されている。一般的に、ETは菌体に安定に保持され、菌体外への漏出は溶菌によるみ生じるとされている。しかしながら、我々が開発したETの高感度、迅速測定法(LAL固定化ビーズ法)を用い、培養に伴う*Escherichia coli*のETの挙動を定量的に解析した結果、増殖に伴い培養液中へのET遊離量が増加し、“溶菌だけではなく、菌体の分裂に伴いETが顕著に遊離する”という新規な現象を見出した<sup>1,2)</sup>。本研究では、この現象の普遍性の有無を明らかにするために、*E. coli*と他のグラム陰性菌のエンドトキシンの遊離特性の定量的な比較解析を試みた。

**【方法と結果】** 802 培地を用い *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Serratia marcescens* Bizio 1823, *E. coli* の培養を行い、LAL 固定化ビーズ法を用いて経時的に菌体内と培養液中の ET 濃度を測定した。また、U.O.D.<sub>600</sub> と生菌数も同時に測定した。種々検討した結果、菌種により総 ET 量(菌体内の ET + 培養液中へ遊離した ET) は大幅に異なり、*S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* の順に高い値を示した。また、総 ET 量に対する遊離 ET 量の割合(遊離率)にも大きな差が見られた。特に、*S. marcescens* と *E. coli* で高い遊離率が認められた。なお、YPD 培地を用いた場合でも同様の傾向が認められた。以上の結果より、*E. coli* 以外にも“溶菌だけではなく、菌体の分裂に伴い ET が顕著に遊離する”タイプのグラム陰性菌が存在することが示された。現在、他のグラム陰性菌の ET の遊離特性の定量的解析についても検討中である。

1) H26 生物工学会要旨集 p. 249. 2) H27 生物工学会要旨集 p. 138.

**Application of LAL-conjugated-microbeads method for quantitative analysis of endotoxin-releasing characteristics of gram-negative bacterial cultures**

○Kaya Ohtaki<sup>1</sup>, Aya Iijima<sup>2</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Col. Agro-bio. Resource. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** cultivation, endotoxin, gram-negative bacteria, Limulus ameocyte lysate

**3P-2p134 Development of a novel co-culture-cell bioreactor system for bioethanol production from rice straw**

○Yu-Kuo Liu, Yi-Chieh Lee  
 (Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., ChangGung Univ., Taiwan, ROC)  
 ykliu@mail.cgu.edu.tw

Demanding of alternative energy sources has received attention due to petroleum shortage recently. Bioethanol is one of the most cost-effective products with a clean environment, sustainable regeneration benefits. There were more than 1600 thousand tons of rice straw agricultural wastes produced in Taiwan every year. Fermentative production of ethanol from renewable resources has prompted interest in immobilized microbial cell systems for conversion of biomass to fuels. Bioethanol production from rice straw not only regenerates the agriculture waste into bioenergy, but also solves the problem of environmental pollution by rice straw burning. For the last two decades, ethanol production from agriculture waste by the co-immobilized-cell system has been studied extensively. An efficient bioreactor is the key for a profitable co-immobilized aerobic/anaerobic mixed process of bioethanol production from lignocellulosic biomass. The aim of this study is to develop a novel vertical mass-flow type bioreactor (VMFB) with space for both aerobic and anaerobic reaction, and investigate its feasibility to co-immobilized saccharification strains (*T. reesei* & *A. niger*) and fermentation strains (*Z. mobilis* & *Pichia stipitis*) for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rice straw using calcium-alginate beads as the immobilization carrier.

**Development of a novel co-culture-cell bioreactor system for bioethanol production from rice straw**

○Yu-Kuo Liu, Yi-Chieh Lee  
 (Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., ChangGung Univ., Taiwan, ROC)

**Key words** agricultural waste, co-immobilization system, co-immobilized-bioreactor VMFB

### 3P-2p135 有機溶媒非耐性菌による疎水性物質生産を目的とした隔壁二相培養系の提案

○滝口昇<sup>1</sup>, 穴田 侑也<sup>2</sup>, 川西 琢也<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>金沢大・理工, <sup>2</sup>ダイト株式会社)  
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

**【目的】** バイオプロセスは環境負荷の少ない持続可能な反応プロセスとして近年注目されているが、疎水性物質生産への適用にはその毒性抑制が課題となる。対策のひとつとして二相培養系が提案されているが、攪拌による二相の混合(乳化)のため有機溶媒耐性菌への適用に限られており、生産物も限定的であった。我々は、水相と有機相の間に隔壁を設置した隔壁二相培養系において、二相の分離を維持し乳化を抑制できることを確認している。本研究では、疎水性物質生産への有機溶媒非耐性菌の利用を目指し、隔壁二相培養系の有機溶媒非耐性菌の増殖に対する効果を評価することとした。

**【方法および結果】** 使用菌株として *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を用い、2 L フェーマンターを用いて水相のみの培養、二相培養、隔壁二相培養を行い、①隔壁の有無による培養への影響、②攪拌回転数の変更による培養への影響の2項目について検討をおこなった。隔壁二相培養では水相のみの場合と同様に基質が枯渇するまで増殖を続けたのに対し、通常の二相培養では培養初期から増殖活性が低下し、基質が残っているにも関わらず増殖が停止した。これは乳化により菌体有機溶媒と直接接触することで細胞膜へのダメージが蓄積し、生命活動を維持できなくなったためだと考えられる。次に隔壁二相培養において攪拌回転数の影響を調べたところ、200~400 rpmの間では、基質残存条件では増殖活性に顕著な差は無かった。維持定数を算出したところ、培養液の乳化後に増大し、菌体の維持活動に利用される基質量が大幅に増加していることが分かった。菌体は、排出ポンプにより細胞膜内に蓄積された有機溶媒を体外へ排出することで、毒性を軽減することが知られており、ポンプ駆動のエネルギー源として基質が利用されたためだと考えられる。

#### Application of two phase partitioning bioreactor on organic solvent intolerant bacteria

○Noboru Takiguchi<sup>1</sup>, Yuya Anada<sup>2</sup>, Takuya Kawanishi<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Daito Pharmaceutical Co., Ltd.)

**Key words** two-phase partitioning bioreactor, *Escherichia coli*

### 3P-2p136 負電荷脂質を含む生体模倣膜での多価カチオン添加による相分離構造形成

○古田 一夢, 下川 直史, 高木 昌宏  
(北陸先端大・マテリアル)  
takagi@jaist.ac.jp

**【背景】** 細胞膜の構造は様々な脂質分子で構成される二分子膜であり、膜面上でコレステロールと飽和脂質に富んだ脂質ラフトを形成していると考えられている。現在までのラフトの性質や形成メカニズムに関する研究では、中性脂質から成る脂質膜での相分離として理解されてきた。しかし、細胞膜には負電荷脂質が含まれ、その静電的な効果が相分離に及ぼす影響は未だ明らかになっていない。本研究では、脂質膜へ添加するカチオンの価数に注目した。金属イオンのみならず、カチオン性ペプチドであるポリアミン類にも注目した。ポリアミン類はDNAとの相互作用についてよく知られるが、荷電脂質膜との相互作用に関する研究は少なく、金属イオンとは異なる振る舞いを示す可能性がある。**【方法】** 本研究では、負電荷不飽和脂質(DOPG)と中性飽和脂質(DPPC)を混合し、静置水合法を用いて脂質膜を作成した。作成した負電荷脂質膜に、1価(NaCl)、2価(MgCl<sub>2</sub>)の金属イオン及び3価(Spermidine)、4価(Spermine)のポリアミンを加えた場合の相分離構造の変化を、室温にて蛍光顕微鏡で観察した。蛍光試料として Rho-DHPE を用いた。緩衝溶液として Tris buffer(pH 7.4)を用いた。

**【結果・考察】** カチオン無添加の場合は一様である DOPG/DPPC の2成分系へ、1価の金属イオン NaCl を加えた場合 10mM の濃度で初めて相分離の形成が確認された。これは DOPG 間の静電反発が塩の添加により遮蔽されたためと考えられる。2価の金属イオン MgCl<sub>2</sub> や 3価や 4価のポリアミンを添加した際には、NaCl に比べ大幅に低い濃度で相分離が観察された。これより、多価カチオンには荷電脂質との強い引力が存在し、相分離を形成することが示唆された。また、相分離を引き起こす濃度に MgCl<sub>2</sub> とポリアミンで違いが見られ、相分離の形成はカチオンの価数だけでなく、カチオンの電荷密度が重要な要素となっていると考えられる。

#### Phase separation by addition of multivalent cation in negatively charged lipid membranes

○Kazumu Furuta, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi  
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

**Key words** liposome, Charged lipid, phase separation, polyamine

### 3P-2p137 タンパク質のアミロイド化を利用した機能性材料の開発

○大島 立樹<sup>1</sup>, 追野 昌文<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>富山大・工, <sup>2</sup>富山大院・理工)  
msakono@eng.u-toyama.ac.jp

**【背景と目的】** タンパク質のアミロイド凝集体は、分子間ペータシート形成により自己組織的に形成することが知られている。近年、アミロイド繊維をナノワイヤーとして機能性材料に応用する試みがなされている。アミロイドに機能を付与するには、アミロイド繊維への機能性分子の固定が必要となるが、いまだ調製に困難が多い。本研究では、ペプチド転移酵素を用いたペプチド連結反応を機能性分子固定法として用い、任意の分子を固定可能なアミロイドの構築を試みる。

**【方法】** PCR および制限酵素を用いて定法に従い、アミロイド性タンパク質トランスサイレチン (TTR)、機能性タンパクとして緑色蛍光タンパク質(GFP)、ペプチド転移酵素として SortaseA(SrtA)の、ヒスタグ配列融合発現ベクタープラスミドを調製した。また、SrtA 認識配列タグを持つ TTR(TTR-LPETGG)および GFP(G5-GFP)のプラスミドを調製した。各々、大腸菌を用いたタンパク質の発現・精製を行った。TTR のアミロイド化および SrtA によるペプチド連結反応は既報にしたがった。アミロイド繊維形成はチオフラビン T (ThT)を用いて評価した。

**【結果と考察】** 発現タンパク質はニッケルカラムを用いて精製し、SDS-PAGEによりタンパク質発現を確認した。GFP および G5-GFP は、プロテアーゼ FactorXa を用いてヒスタグ配列を消化し、カラムで精製した。SDS-PAGEより加水分解反応が定量的に行われたことを確認した。次に精製した TTR のアミロイド化反応を行ったところ、インキュベート後の ThT 蛍光増加がみられたことから、リコンビナント TTR のアミロイド化が示唆された。また、SrtA によるタグ付きタンパク質の連結反応が認められた。これらの知見をもとに TTR アミロイドへのタンパク質固定化について検討を行う。

#### Development of amyloid-based functional materials.

○Tatsuki Oshima<sup>1</sup>, Masahumi Sakono<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Eng., Univ. Toyama, <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

**Key words** amyloid, transthyretin, SortaseA, functional material

### 3P-2p138 バイオナノカプセルとリポソームの複合粒子による *in vivo* での抗腫瘍効果

○西村 勇哉<sup>1</sup>, 鈴木 貴弘<sup>2</sup>, 森田 健太<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大・科学技術イノベーション, <sup>2</sup>神戸大院・工)  
akondo@kobe-u.ac.jp

癌治療において副作用を軽減し、効果的に薬理効果を発現させるために、ドラッグデリバリーシステム (DDS) という技術が注目されている。この DDS のキャリアとして、B 型肝炎ウイルスの表面抗原 L タンパク質から成るバイオナノカプセル (BNC) が開発されている。これまでに本研究グループでは、BNC の L タンパク質中の肝細胞認識部位を Affibody ( $Z_{HER2}$ ) に置換することで、Affibody 提示 BNC ( $Z_{HER2}$ -BNC) を開発し、乳癌や卵巣癌細胞などに発現している HER2 受容体を特異的に認識することに成功している。また、薬剤を封入したリポソーム (LP) の表面に BNC を融合することで、細胞標的能力と高い薬剤封入効率をもつ複合粒子 (BNC/LP) の開発にも成功している。本研究では、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP 複合粒子を用いて HER2 発現癌細胞へ特異的に抗腫瘍剤や放射線増感剤を送達し、抗腫瘍効果を発現させることを目指した。まず、doxorubicin (dox) を封入した  $Z_{HER2}$ -BNC/LP 複合粒子 ( $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox)) を 5 日おきに尾静脈投与した担癌マウスの腫瘍体積を測定した。その結果、コントロールとして投与した PBS、dox 単体、 $Z_{HER2}$ -BNC を融合していない LP(dox) の群はほぼ同等の腫瘍体積の増加が見られた。それに対し、 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(dox) では腫瘍体積の増加が著しく抑制された。また、X 線照射によってラジカルを発生させ、抗腫瘍効果を示すポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子 (PAATiO<sub>x</sub>) を放射線増感剤として封入した  $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiO<sub>x</sub>) を担癌マウスの尾静脈から投与し、一日後に X 線を照射した。その結果、PBS、PAATiO<sub>x</sub> 単体や LP(PAATiO<sub>x</sub>) と X 線の併用では、照射後しばらくして腫瘍体積の増加が見られた。 $Z_{HER2}$ -BNC/LP(PAATiO<sub>x</sub>) の群では、25 日目辺りまで目立った増加が確認されなかった。これらの結果から、抗腫瘍剤や放射線増感剤を標的の腫瘍に送達し、抗腫瘍効果を示すことに成功した。

#### Anticancer efficacy *in vivo* using bio-nanocapsule/liposome complex

○Yuya Nishimura<sup>1</sup>, Takahiro Suzuki<sup>2</sup>, Kenta Morita<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>2</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** drug delivery system, antitumor

### 3P-2p139 ショウジョウバエ株化神経細胞 BG2-c6 を用いたアミロイド $\beta$ 神経細胞毒性評価

○山下 涼太<sup>1</sup>, 板田 鉄平<sup>1</sup>, 中川 裕之<sup>2</sup>, 上井 幸司<sup>1</sup>, 徳楽 清孝<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>室工大院・工・環境創生, <sup>2</sup>福岡大・理・地球圏科学)  
 tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景と目的】アルツハイマー病 (AD) は、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) と呼ばれるペプチドが脳内で凝集・蓄積することによって発症すると考えられているため、 $A\beta$  凝集阻害物質は AD の治療・予防に有用であると期待されている。マウス由来 PC12 細胞を用いた一般的な  $A\beta$  の神経細胞毒性評価法は、細胞の培養温度 37℃ かつ 5%  $CO_2$  が必要であるため、ハイスループット解析には向きがでない。それに対し、ショウジョウバエ中枢神経由来の BG2-c6 細胞は培養に  $CO_2$  が不要で、ほぼ常温 (25℃) で培養できるため、サンプル調製中に細胞の活性が低下する可能性が低く、PC12 細胞よりもハイスループット解析に適しているといえる。本研究では、 $A\beta$  神経細胞毒性のハイスループット評価法の確立を目指し、BG2-c6 細胞に対するヒト  $A\beta_{42}$  の神経細胞毒性および凝集阻害物質による毒性緩和能を評価した。

【方法】本研究では代表的な細胞毒性評価法である MTT アッセイによって、神経化した BG2-c6 細胞および PC12 細胞に対するヒト  $A\beta_{42}$  の毒性を評価した。また、 $A\beta$  凝集阻害効果が知られている様々なポリフェノール類や、新たに我々の研究室で  $A\beta$  凝集阻害効果が見いだされた植物抽出物など、様々な  $A\beta$  凝集阻害物質による神経細胞毒性緩和能を BG2-c6 細胞および PC12 細胞を用いて評価した。

【結果と考察】 $A\beta_{42}$  の添加によって、いずれの細胞でも  $A\beta$  神経細胞毒性が確認され、BG2-c6 細胞をヒト  $A\beta_{42}$  神経細胞毒性の評価に用いることができることが確認できた。また、様々な  $A\beta$  凝集阻害物質の神経細胞毒性緩和能を評価した結果、チリメンアオジ粗抽出物は  $A\beta$  凝集阻害活性がすでに知られているロスマリン酸やクルクミンの純品よりも高い毒性緩和能を有していることが示唆された。

#### Evaluation of amyloid $\beta$ toxicity by *Drosophila* neural cell line BG2-c6

○Ryota Yamashita<sup>1</sup>, Teppei Itada<sup>1</sup>, Hiroyuki Nakagawa<sup>2</sup>, Koji Uwai<sup>1</sup>,  
 Kiyotaka Tokuraku<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sustain. Environ. Eng., Muroran Inst. Technol., <sup>2</sup>Division of Biology,  
 Faculty of Science, Fukuoka University)

**Key words** Amyloid beta, BG2-c6 cell, PC12 cell, MTT assay

### 3P-2p140 Fish-killing activities and possible toxic factors of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*

Daekyung Kim<sup>2</sup>, Kichul Cho<sup>2</sup>, ○Tatsuya Oda<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Jeju Center,  
 KBSI, Korea)  
 t-oda@nagasaki-u.ac.jp

We conducted comparative study on two *Chattonella* species, which are known as harmful red tide phytoplankton with potent fish-killing activity. *Chattonella antiqua* isolated in 2010 showed extremely more potent fish-killing activities against red sea bream, Japanese horse-mackerel, and blue damselfish than those of *C. marina* isolated in 1985. At a cell density of 10,000 cells/ml, nearly 80% of these fish species were died within 7 h exposure to *C. antiqua*, whereas *C. marina* showed no significant toxicity on these fish species. Fish-killing activity of ultrasonic-ruptured *C. antiqua* against red sea bream decreased significantly. Chemiluminescence and electron spin resonance (ESR) analyses suggested greater reactive oxygen species (ROS)-producing activity of *C. antiqua* than that of *C. marina*. In addition, chemiluminescence response level in ultrasonic-ruptured *C. antiqua* was almost negligible level. Sodium benzoate, a hydroxyl radical scavenger, significantly suppressed the fish-killing activity of *C. antiqua* on blue damselfish. The chlorophyll level in the gill tissue of blue damselfish exposed to flagellate cells increased along with the exposure time, and the cell count of gill-associated *C. antiqua* estimated with chlorophyll level was higher than that of *C. marina*. These results suggest that the ROS-producing activity and affinity of *Chattonella* cells to the gill surface may be important factors influencing the fish-killing activity of *Chattonella* species.

#### Fish-killing activities and possible toxic factors of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*

Daekyung Kim<sup>2</sup>, Kichul Cho<sup>2</sup>, ○Tatsuya Oda<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ., <sup>2</sup>Jeju Center, KBSI, Korea)

**Key words** red tide control, plankton, reactive oxygen species, toxicity

### 3P-2p141 *Corynebacterium glutamicum* を用いたヘミセルロース系バイオマスからのカダペリン生産

○今尾 健太, 山口 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦  
 (神戸大院・工)  
 tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】カダペリンはナイロンや医薬など様々な化学品の原料となるジアミンであり、従来、化石燃料から作られてきた。しかし環境への配慮からバイオマスを原料とした、バイオプロセスによる生産法が求められている。そこで本研究ではカダペリン生産の原料にヘミセルロースを、宿主に *Corynebacterium glutamicum* を選択した。*C. glutamicum* はカダペリンの前駆体であるリジン生産に優れている一方で、バイオマス分解能、キシロース資化能、リジン脱炭酸能を有さない。そこで本研究ではキシラン (ヘミセルロースの主成分) の分解物であるキシロオリゴ糖資化に向けて b-xylosidase (XYL) および Xylose isomerase (XylA) の共発現を行い、キシロオリゴ糖資化性の取得を行った。

【実験方法】まず、枯草菌由来の XYL 遺伝子と *C. glutamicum* 由来のアンカータンパク質である PorH 遺伝子を融合させたプラスミドを構築した。次にそのプラスミドに対して大腸菌由来の XylA 遺伝子を導入することで、XYL・XylA 共発現プラスミドを作製した。そのプラスミドを用いてエレクトロポレーション法により *C. glutamicum* を形質転換した。得られた形質転換体を、試験管中 BHI 液体培地で前々培養および前培養を行った後、同じく試験管中キシロオリゴ糖 20 g/L を含む MMYE 培地で本培養を行った。そして培養液の OD<sub>600</sub>、培養上清のキシロオリゴ糖およびリジン濃度を測定した。

【結果と展望】XYL・XylA 共発現株において培養 72 時間で 12.0 g/L の糖消費が見られ、OD<sub>600</sub> は 11.8 まで増大した。それと同時に、15.3 mM のリジン生産が確認された。この結果から、キシロオリゴ糖資化性株の取得に成功したと言える。今後は、XYL・XylA に加えてリジン脱炭酸酵素 (LDC) を同時発現させることによりキシロオリゴ糖からのカダペリン生産を目指す。

#### Cadaverine production from hemicellulose using *Corynebacterium glutamicum*

○Kenta Imao, Rie Yamaguchi, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo  
 (Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, xylosidase, xylose isomerase

### 3P-2p142 カバノアナタケの液体表面培養による抗酸化物質の生産

○蔵本 彩加, 高柴 則子, 櫻井 明彦  
 (福井大院・工)  
 a\_sakura@u-fukui.ac.jp

【緒言】耐寒性の白色腐朽菌であるカバノアナタケは、菌核にポリフェノールや beta-グルカン、エルゴステロールなどを含み、抗腫瘍や血糖降下などの生理活性を示すことが知られている。中でもポリフェノールは強い抗酸化活性を示すことが分かっており、赤ワインに含まれるレスベラトロールと同様に寿命延長作用が期待されている。しかし、天然のカバノアナタケの存在数が少なく、また増殖速度が低いことから人工培養技術の開発が望まれている。本研究ではカバノアナタケの液体表面培養によるポリフェノールの高生産条件を検討し、得られたポリフェノール画分の抗酸化特性を評価した。

【方法】評価に用いたカバノアナタケ (*Inonotus obliquus* NY-1) は、天然菌核及び 30 日間の液体表面培養により取得した培養菌糸体である。カバノアナタケの天然菌核及び培養菌糸体は凍結乾燥した後、エタノールで抽出し上清をエタノール抽出物とした。残渣を熱水で抽出し、多糖とポリフェノールに画分した各画分の抗酸化活性を DPPH、SOD、ORAC、ABTS、FRAP 法により測定した。

【結果・考察】培養菌糸体のポリフェノール画分は、天然菌核のポリフェノール画分よりも ORAC、FRAP、ABTS 法において低い抗酸化活性だったが、SOD 法においては高い値を示した。天然菌核及び培養菌糸体の各画分の抗酸化特性が異なることから、生産される抗酸化物質の構造や組成が異なると考えられる。また、培養条件により菌糸体のポリフェノール含有量が変化し、抗酸化特性も変化した。現在、ポリフェノール画分をさらに画分し、抗酸化特性を評価しているところである。

#### Production of antioxidants by liquid surface culture of *Inonotus obliquus*

○Ayaka Kuramoto, Noriko Takashiba, Akihiko Sakurai  
 (Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** *Inonotus obliquus*, polyphenol, antioxidant, liquid surface culture

3P-2p143  $\sigma$  因子欠損放線菌の 3,4-AHBA 生産への影響

○釜我主<sup>1</sup>, 柏木 紀賢<sup>2</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション)  
 ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

## 【背景・目的】

本研究で着目した 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸(3,4-AHBA)は芳香環を有しているため、そのポリマーであるポリ 2,5-ベンゾオキサゾールは高強度かつ難燃性という特徴を持つ。これは微生物が作る新たな種類のポリマーとしての応用が期待できる。

本研究では、*Streptomyces griseus* 由来の 3,4-AHBA 合成遺伝子 *griH*, *griI* を宿主(*Streptomyces lividans*)に導入することで 3,4-AHBA 生産能を持たせ、複数の糖源からの生産を検討した。さらに各遺伝子群の転写に関わる  $\sigma$  因子を欠損させることにより大幅な代謝機構の改変を試み、3,4-AHBA の更なる向上を目指した。

## 【方法】

放線菌 *S. lividans* に 3,4-AHBA 合成遺伝子 *griH*, *griI* (*S. griseus* 由来)を導入することで 3,4-AHBA 生産能を持たせ、複数の炭素源(グルコース、フルクトース、キシロース、グリセロール等)からの 3,4-AHBA 生産を行った。さらに各遺伝子群の転写に関わる  $\sigma$  因子を欠損させ、得られた形質転換体でも同様に 3,4-AHBA の発酵生産検討を行った。

## 【結果】

*S. lividans* に 3,4-AHBA 生産能を付与することに成功し、複数の炭素源を資化することも確認した。特にグルコース、フルクトースを用いた発酵生産で高い生産性を示した。また、幾つかの  $\sigma$  因子欠損株を用いて発酵生産を試みたところ、野生株の形質転換体と比較して各炭素源からの 3,4-AHBA 生産量に変化が見られる株が存在した。この結果より、 $\sigma$  因子を欠損させることで中央代謝経路に変化が起きた可能性が示唆される。

Effect of sigma factor disruption in *Streptomyces lividans* on 3,4-AHBA production

○Kei Kamaga<sup>1</sup>, Norimasa Kashiwagi<sup>2</sup>, Chiaki Ogino<sup>1</sup>, Akihiko Kondo<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Sci, Tech, Innov, Kove Univ.)

**Key words** *Streptomyces lividans*, metabolic engineering, sigma factor, 3,4-AHBA

## 3P-2p144 固定化フォトバイリアクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオール生産

○端 瞭太<sup>1,2</sup>, 堀内 淳一<sup>1,2</sup>, 熊田 陽一<sup>1,2</sup>, 広川 安孝<sup>2,3</sup>,  
 花井 泰三<sup>2,3</sup>, 村上 明男<sup>2,4</sup>  
 (<sup>1</sup>京工繊大院・工芸科学, <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>九大院・農, <sup>4</sup>神戸大院・工)  
 horiuchi@kit.ac.jp

[背景・目的]我々は CREST プロジェクトにより、光合成細菌シアノバクテリア(藍藻)に新たな代謝経路を導入し、炭酸ガスから光合成により各種化学物質を生産する研究を進めている。本発表では 1,3 プロパンジオール(1,3PDO)合成代謝経路を導入したシアノバクテリアを用い、フォトバイリアクターシステムにより 1,3PDO の連続生産について検討した結果を報告する。

[方法・結果]菌株として *Synechococcus elongates* PCC7942 に 1,3PDO 合成代謝経路を導入した TA2984 株を用いた。培地には 20  $\mu$ g/ml kanamycin spectinomycin, 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM IPTG を含んだ BG11 培地を用いた。2.0 L 容量のエアリフト型バイリアクターを用いて 30°C、蛍光灯照射により回分培養を行い、培養 10 日目から一定量の培地の追加と引き抜きを同時に行う半連続培養を行った。その結果、増殖と連動した 1,3PDO 生産が認められ、25 日目まで 1,3PDO 濃度は 1.44 mM まで増加し、1,3PDO の連続生産の可能性が示された。次に連続バイリアクターに適用する目的で菌体を高い希釈率でも高濃度に維持できる菌体固定化法を用いて、最適な担体及び条件を検討したところ、アルギン酸ナトリウム固定化法で良好な増殖が認められた。この固定化菌体を用い、エアリフト型バイリアクターによる回分培養を行ったところ、良好な増殖と 10 日目まで 0.63 mM の 1,3PDO 生産が得られ、連続培養の可能性が示された。現在、固定化菌体を用いたエアリフトバイリアクターにおける連続培養実験を進めている。

## 1,3PDO production by photobioreactor using immobilized recombinant cyanobacteria

○Ryota Hashi<sup>1,2</sup>, Jun-ichi Horiuchi<sup>1,2</sup>, Yoichi Kumada<sup>1,2</sup>, Yasutaka Hirokawa<sup>2,3</sup>,  
 Taizo Hanai<sup>2,3</sup>, Akio Murakami<sup>2,4</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., <sup>2</sup>JST・CREST, <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>4</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

**Key words** cyanobacteria, photobioreactor, immobilized cell, continuous culture

## 3P-2p145 Sortase A を用いた大腸菌体内での代謝酵素の連結とその影響

○松本 拓也<sup>1</sup>, 田中 勉<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>神戸大院・科イノ, <sup>2</sup>神戸大院・工)  
 t\_matsu@rabbit.kobe-u.ac.jp

持続可能な低炭素化社会の構築に向け、地球上に豊富に存在し、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用の開発は急務である。バイオリアクターは、バイオマスを原料に燃料や化成品原料などを製造する技術や産業のことであり、このようなバイオリアクターを担う技術の一つとして微生物代謝を利用した物質生産が挙げられる。しかしながら、微生物を用いたバイオプロセスでは反応速度が遅いなどの、克服すべき課題が多数存在し、これらを解決するためには、目的物質の生産に適した微生物を新たに設計・創製するといった発想が必要になる。

代謝改変微生物を用いた有用物質生産は、上記課題を克服する上で重要な技術である。代謝経路上の遺伝子を予め破壊することで、競合する経路を遮断し、代謝フラックスを目的物質の生産に最適化する手法がよく用いられるが、本研究においては、代謝経路上の酵素を近接させることで、代謝中間体の局所濃度を上げることができる「代謝チャネリング」に着目した。本研究では、大腸菌細胞内において代謝酵素を近接させるために Sortase A と呼ばれるペプチド転移酵素を「酵素ステープラー」として用いることで、代謝経路上の酵素を連結した。このことにより、「代謝チャネリング」を引き起こすことが可能かどうか検討した。具体的には、アセチル CoA を代謝分岐点と捉え、その代謝の前後の酵素(ピルビン酸ギ酸リアーゼおよびリン酸アセチルトランスフェラーゼ)に Sortase A の認識配列を付与することで、それらを連結させ、代謝経路に与える影響を調査した。

Sortase A-mediated metabolic enzyme ligation in *Escherichia coli*

○Takuya Matsumoto<sup>1</sup>, Tsutomu Tanaka<sup>2</sup>, Akihiko Kondo<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, metabolic engineering, acetate, metabolic pathway modification

## 3P-2p146 黄麹菌 hydrophobin-cutinase 間相互作用における hydrophobin N 末端側の寄与

○田中 拓未<sup>1</sup>, 深谷 愛衣<sup>2</sup>, 佐藤 大貴<sup>1</sup>, 對馬 裕誠<sup>1</sup>, 上原 健二<sup>1</sup>,  
 高橋 徹<sup>3</sup>, 阿部 敬悦<sup>1,2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>東北大院・農, <sup>2</sup>東北大・農・応生化, <sup>3</sup>東北大・未来研)  
 kabe@niche.tohoku.ac.jp

【背景】 hydrophobin は糸状菌に広く保存された低分子量の分泌型両親媒性タンパク質である。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RoLA はポリエステル PBSA 等の疎水性固体表面に吸着し、その後 cutinase CutL1 と相互作用して固体表面にリクルートする<sup>(1)</sup>。これまでに、RoLA N 末端側の複数の正電荷残基と、CutL1 分子表面の複数の負電荷残基が協奏的にイオンの相互作用することを明らかにした<sup>(2)</sup>。しかし、双方に未特定なイオンの相互作用部位が存在することも示唆されており、相互作用機構の完全な解明には至っていない。本報告では RoLA の N 末端側に着目し、この部位の相互作用への寄与を定量的に解析することを目的とした。

【方法】 CutL1 野生型と RoLA の N 末端側変異体を用い、PBSA 微粒子の分解促進試験、テフロン微粒子への CutL1 リクルート量定量、分子間相互作用解析装置 QCM による相互作用の定量的解析を行った。

【結果】 RoLA の N 末端側正電荷残基 (H32, K34, K41, K46, K51) のうち、既知の相互作用部位 H32, L34 と、それ以外の Lys 残基を Ser に置換した RoLA 多重変異体を作製した。QCM により RoLA 三重変異体 (H32/K34/K41S, H32/K34/K46S, H32/K34/K41S) と CutL1 の間の結合解離定数  $K_D$  値 (160~250 nM) は、RoLA 二重変異体 (H32/K34S) を用いた場合 (46.1 nM) より大きく、Lys 残基を化学修飾した RoLA を用いた場合 (276 nM) に近い値を示した。ここから、K41, K46, K51 も CutL1 とのイオンの相互作用に関与する可能性が示唆された。現在、RoLA 三重変異体を用いてさらなる解析を行っている。さらに、RoLA 四重変異体、五重変異体 (H32/K34/K41/K36/K51S)、RoLA 荷電増加変異体 (H22S, H33S) を作製し、これらを用いた親和性解析を行っている。

1. Takahashi T, et al., Mol. Microbiol. 57:1780-1796 (2005)

2. Takahashi T, et al., Mol. Microbiol. 96:14-27 (2015)

Contribution of N-terminal of *Aspergillus oryzae* hydrophobin in the hydrophobin-cutinase interaction

○Takumi Tanaka<sup>1</sup>, Ai Fukaya<sup>2</sup>, Daiki Sato<sup>1</sup>, Yusei Tsushima<sup>1</sup>, Kenji Uehara<sup>1</sup>,  
 Toru Takahashi<sup>3</sup>, Keietsu Abe<sup>1,2,3</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., <sup>2</sup>Dept. Agric., Appl. Biol. Chem., Tohoku Univ., <sup>3</sup>NICHE, Tohoku Univ.)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, hydrophobin, cutinase, quartz crystal microbalance

## 3P-2p147 腸内有用細菌のストロンチウム除去特性の解析(第2報)

○遠藤 輪, 青柳 秀紀  
(筑波大院・生命環境)  
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】原子力発電所の事故などが発生した際に放出された放射性元素が食品などを介して消化管内に侵入した場合、適切に体外へ排出させる必要がある。特に、放射性 Sr が体内に取り込まれ、一旦、骨に沈着してしまうと体外への排出は困難であり、長期間にわたり内部被曝を受け続けるため深刻な問題となる。我々は、副作用のない新規な放射性元素の消化管からの排出法として乳酸菌の利用を考案し、その可能性を示してきた<sup>1)</sup>。本研究では、乳酸菌の Sr 除去量の向上が可能な培養条件の探索をおこなった。また、腸上皮の培養細胞を用いて Sr の腸管透過性評価を行い、乳酸菌を用いた Sr 体外排出法の有効性について検討を行った。

【方法と結果】乳酸菌の Sr 除去量を向上させるため、種々の培養条件を検討した。その結果、培地成分により Sr 除去量が大きく変化することが明らかになり、検討をおこなった中ではクエン酸添加培地で培養した乳酸菌で単位菌体量あたりの Sr 除去量が最大となった。また、ヒト結腸ガン由来の Caco-2 細胞をセルカルチャーインサート上で 3 週間培養し、腸管上皮の透過性評価モデルとして使用した。このモデルの管腔側に Sr 濃度を 10 mg/L に調整した HBSS (pH 7.4) を加え、基底膜側への Sr の移行量を ICP-MS により測定した。乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. gasserii*, *L. casei*) を加熱処理することで遊離した成分を管腔側に添加したところ、無添加の場合と比較して Sr の移行量は 10~40% 程度減少した。この結果から、乳酸菌から遊離した成分が Sr を吸着することで腸管上皮での Sr 透過量を減少させることができる可能性が示唆された。

1) H27 生物工学会要旨集 p.139

## Analysis of strontium removal characteristics of probiotics (part 2)

○Rin Endo, Hideki Aoyagi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** Caco-2 cells, lactic acid bacteria, probiotics, strontium

## 3P-2p148 模擬微小重力培養が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響の解析と利用(第2報)

○長谷川 文香, 青柳 秀紀  
(筑波大院・生命環境)  
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【諸言】従来法で培養可能な微生物は、自然界に存在する微生物の 1% 前後であることが示唆され、新たな培養法が求められている。我々は微小重力場を形成し、優れた拡散や低剪断力環境を有する模擬微小重力 (LSMMG) 培養に着目し、ヒトと綿密な相互作用がある種々の腸内細菌 (乳酸菌やビフィズス菌など) の生理活性に及ぼす影響を解析した。その結果、通常重力 (NG) 培養とは異なる挙動が認められた<sup>1)</sup>。今回は、検討する腸内細菌株の範囲を拡げ、LSMMG 培養が腸内細菌の生理活性に及ぼす影響を比較解析した。

【方法と結果】 HARV bioreactor を用いて、乳酸菌 10 株、ビフィズス菌 9 株を NG と LSMMG の条件で比較培養した。乳酸菌株の多くは LSMMG 培養で増殖が促進した (*Lactobacillus acidophilus* では、NG 培養の約 2.7 倍高い増殖を示した)。また、顕微鏡観察により、*L. acidophilus* の LSMMG 培養で特異的に、NG 培養では見られなかった菌体同士の接着、凝集が認められた。ビフィズス菌や他の腸内細菌についても検討した結果、LSMMG に対する感受性や応答性には多様性があることが示唆された (タイプ別の分類を検討中)。NG 条件下では腸内細菌の増殖を促進する様々な prebiotics (PB) が報告されているが、LSMMG 条件下での効果は未解明である。モデル PB として大豆組成物を用いて *B. breve* を LSMMG 培養した結果、増殖促進効果が認められた。現在、LSMMG 培養における PB の他の腸内細菌への効果や有効な PB の探索を検討中である。

1) H27 生物工学会要旨集 p.139

## Analysis of the effect of low shear and modeled-microgravity culture on the physiological activities of enteric bacteria (part 2)

○Fumika Hasegawa, Hideki Aoyagi  
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** bifidobacterium, enteric bacteria, lactic acid bacteria, low shear and modeled-microgravity culture

## 3P-2p149 大腸菌フロック上での組換えタンパク質固相発現系の構築

○尾島 由紘<sup>1)</sup>, 布上 翔太<sup>2)</sup>, 東 雅之<sup>1)</sup>, 田谷 正仁<sup>2)</sup>  
(<sup>1</sup>阪市大院・工・化生系, <sup>2</sup>阪大院・基礎工)  
ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【目的】本研究グループは、これまで大腸菌のセルロース生合成関連遺伝子である *bcsB* の過剰発現により、浮遊型バイオフィームであるフロックが自発的に形成されることを報告している。また、フロックの主構成成分はタンパク質であること、さらに LC-MS/MS 解析により、翻訳因子の 1 つである Elongation factor Ts (TSF) と呼ばれるタンパク質の存在比率が最も高いことを明らかにしてきた。本研究では、大腸菌フロック上に多く存在する TSF を起点とし、フロック上での組換えタンパク質固相発現系の構築を行った。

【方法および結果】 *bcsB* 遺伝子を導入した大腸菌に対して、さらに TSF-GFP 融合タンパク質を発現するプラスミドを導入し、グルコースを含む LB 培地を用いて 37°C で培養し、目視観察により数 mm 程度のフロック形成を確認した。さらに蛍光顕微鏡による観察で、フロック構造全体に GFP が発現していることを確認した。ここで、融合タンパク質 TSF-GFP のリンカーとしてトロンピン認識配列を挿入しており、フロックに対してトロンピン処理を行ったところ、フロック上に発現した GFP が溶液中に遊離することが蛍光強度測定ならびに SDS-PAGE によって確認でき、組換えタンパク質がトロンピン処理により回収可能であることが示された。

以上の結果より、TSF タンパク質を起点として大腸菌のフロック上に組換えタンパク質の固相発現が可能であることを明らかにした。

Solid-state expression of recombinant protein on the flocs formed by *Escherichia coli* cells

○Yoshihiro Ojima<sup>1)</sup>, Shota Nunogami<sup>2)</sup>, Masayuki Azuma<sup>1)</sup>, Masahito Taya<sup>2)</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

**Key words** flocculation, recombinant protein production, *Escherichia coli*

## 3P-2p150 菌体表面疎水性とバイオフィーム形成量との関係解明

○谷川 純美<sup>1)</sup>, 小田 忍<sup>2)</sup>, 大箸 信一<sup>2)</sup>  
(<sup>1</sup>金工大院・工・<sup>2</sup>金工大・ゲノム研)  
odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】従来のバイオフィーム定量法は試験管中に試験片と菌体懸濁液を入れ振とう培養を行う方法か 6 穴マルチプレートの底面にバイオフィームを形成させる方法が主流であった。だがこれらの方法では振とう培養中にバイオフィームが剥離する、polystyrene しか計測できないといった問題点があった。これらの問題点を解決し、バイオフィームを正確かつ汎用的に定量し得る方法として、Plate-hanging 法の確立を目的とした。その上で、菌体表面疎水性、試験片の疎水性、バイオフィーム形成能との関連性を調べた。

【方法】6 穴マルチプレートに菌体懸濁液を分注し、ふたに設置した試験片を懸濁液に接する形で 24 時間又は 48 時間振とう培養した。その後試験片を洗浄し、超音波処理でバイオフィームを剥離させた。剥離液を寒天プレートに塗布し、48 時間培養後にコロニー数をカウントした。菌体表面疎水性の定量に関しては菌体懸濁液を振とう培養し、3 回遠心分離を行い洗浄と集菌を行った。その後リン酸緩衝液に懸濁させて有機溶媒とホルテックスし、OD<sub>400</sub> を計測することで菌体表面疎水性を求めた。

【結果】 *Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993, *Pseudomonas putida* NBRC 14164 のバイオフィーム形成量を Plate-hanging 法で確認したところ、*S. epidermidis* NBRC 12993 は疎水性の低い試験片に多く附着し、*P. putida* NBRC 14164 は疎水性の高い試験片に多く附着した。疎水性の試験でも 2 種の菌を比較したところ、*S. epidermidis* NBRC 12993 の表面疎水性は低く *P. putida* NBRC 14164 の表面疎水性は高い結果が得られた。同様の試験を酵母についても実施した。

## Relationship elucidation of biofilm formation amount and the cell surface hydrophobicity

○Ayami Tanikawa<sup>1)</sup>, Shinobu Oda<sup>2)</sup>, Shinichi Ohashi<sup>2)</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., <sup>2</sup>Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

**Key words** biofilm, Hydrophobicity of the cell surface

### 3P-2p151 変異原性ヌクレオシド dP による細胞死誘発に関与する遺伝子の特定と、その集積によって構築された高効率ネガティブ選択系

○河合 (野間) 繁子, 佐伯 和哉, 湯本 達弥, 斎藤 恭一, 梅野 太輔  
(千葉大院・工)  
kawai-noma@chiba-u.jp

外来遺伝子のゲノムへの導入、そして導入する遺伝子 (機能) の発現調節系の機能選抜のために、数多くのポジティブおよびネガティブ選択系が試されてきた。ポジティブ選択系は十分な性能を持つものが多数知られるのに対し、ネガティブ選択系のラインナップは少なく、それらの性能にも多くの技術的問題が残っている。

当研究室には、変異原性非天然ヌクレオシド dP とチミジンキナーゼ HsvTK を用いたネガティブ選択系が存在している (Tashiro, NAR, 39, e12 (2011))。この選択系は、わずか 0.1-1 $\mu$ M の dP を培地に添加するだけで、HsvTK を発現している大腸菌細胞だけを、高速かつ高効率に死滅させることができる。しかし、dP は変異原性化合物であるため、現行の 0.1 $\mu$ M という添加濃度では、細胞ゲノムの自然突然変異頻度が 1 桁ほど高まる。更に一桁低い作用濃度 (0.01 $\mu$ M) では細胞の突然変異頻度は変化しないことが分かったため、本研究では、dP によるネガティブ選択をこの低濃度領域で実施可能とすることを目標とした。

各種ヌクレオシドの取り込みや代謝に関与する (あるいはし得る) 遺伝子を文献情報をもとに洗い出し、それらの欠損株、および過剰発現株を作製した。これらの大腸菌株内で HsvTK を発現させ、その dP による致死性に対する影響を調べた。ヌクレオシド取り込みに関わる内膜トランスポーター、NupC と NupG の欠損は大腸菌の dP 感受性を低下させ、逆に過剰発現によって dP 感受性は高まった。dP の細胞内取り込みに大きく関与することが示唆された。また、外膜トランスポーター Tsx やヌクレオシドキナーゼ Ndk の過剰発現も dP 感受性を大いに高め、0.01 $\mu$ M (目標値) の dP 添加で十分な致死性を実現できた。本講演では、これらの遺伝子因子を組み合わせ、さらに高効率で変異フリーなネガティブ選択系構築の試みについても紹介する。

**Identification of the genes that boost the cell death mediated by non-natural nucleoside dP for the development of highly effective negative selection platform.**

○Kawai-Noma Shigeko, Sake Kazuya, Yumoto Tatsuya, Saito Kyoichi, Umeno Daisuke  
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

**Key words** Directed evolution, Non-natural nucleoside, Negative selection

### 3P-2p152 LEA peptide - confer tolerance to salinity and temperature in *E.coli*.

○Nishit Pathak, Shinya Ikeno  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)  
ikeno@life.kyutech.ac.jp

Late embryogenesis abundant (LEA) proteins are a family of hydrophilic proteins, play a protective role under different abiotic stresses. Then, we constructed, characterized and generated novel peptide with 13 mer motif for the expression of the target protein in *E.coli* through the co-expression system. Our previous study the LEA peptide has increased the cellular expression of the target protein in *E.coli* as comparison to control. Most of the *in vivo* studies demonstrate a protective function of LEA proteins in relation to abiotic stress. The differential accumulation profiles of the LEA protein suggest different roles in cell, correlating with salt, heat and cold tolerance. However, mostly researcher work on the LEA protein function that lead to stress protection has become known. On the basis of the previous research, we try to abiotic stress experiment against our constructed LEA peptide. Salt and temperature tolerance assay of *E.coli* harboring on Luria broth medium at 37°C, growing at 4 h after the with or without induction of IPTG. Further, LEA peptide expressing *E. coli* cells exhibited extreme after salt treatment was 4-fold higher than that of control cells. These results showed that LEA peptide can enhance the cellular tolerance to temperature and salt stresses in *E.coli* cells. This study provides a detailed repository of LEA peptide that accumulates in relation to the survival in the salt state and represents an important step towards the analysis of their functional properties.

**LEA peptide - confer tolerance to salinity and temperature in *E.coli*.**

○Nishit Pathak, Shinya Ikeno  
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

**Key words** salt tolerance, LEA peptide, abiotic stress, co-expression

### 3P-2p153 凝集性酵母における新規な阻害剤耐性機構の解明

○糸見 明徳<sup>1</sup>, 紀平 和枝<sup>1</sup>, Kahar Prihardi<sup>1</sup>, 荻野 千秋<sup>1</sup>, 近藤 昭彦<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・工, <sup>2</sup>神戸大院・科学技術イノベーション)  
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

微生物である酵母を用いた発酵に関する研究は、近年多くの研究者によって行われているが、バイオマスの前処理後に副生成物として生成される、酢酸やフルフラールといった阻害剤によって発酵が妨げられているというのが現状である。製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) の酵母ライブラリーから約 2,000 株の網羅的スクリーニングおよび改良を行った結果、極めて高い発酵阻害剤耐性を示す株として凝集性 *Saccharomyces cerevisiae* F118 株 (以下、F118) を獲得した。さらに F118 の変異処理および順化により、35°C で増殖・発酵できる F118S8-8 株 (以下、S8-8) を獲得した。この株は、30°C では凝集するが 35°C では凝集しないという特有な温度感受型凝集性も示した。本研究では、S8-8 の発酵阻害剤耐性および温度感受型凝集性の機構解明を試みた。そこで、S8-8 の凝集遺伝子破壊株 (S8-8 $\Delta$ Flox) および凝集遺伝子再導入株 (S8-8 $\Delta$ Flox/FF) を作製してエタノール発酵試験を行った。次に qPCR を用いることでこれらの酵母株における遺伝子の発現量を比較し、発酵阻害剤耐性機構に関連する遺伝子の決定とその相関関係を検討してみた。その結果、S8-8 $\Delta$ Flox でエタノール発酵が行われず、S8-8 $\Delta$ Flox/FF で元の株 S8-8 と同様のエタノール発酵が行われることから、阻害剤存在下での S8-8 の発酵能には凝集遺伝子 Flox が関与していることがわかった。さらに qPCR の結果より、細胞膜貫通 ATP 結合型トランスポーター遺伝子の発現が阻害剤耐性に影響を与えることがわかった。

**Study on the new tolerance mechanism of flocculating yeast to fermentative inhibitor**

○Akiho Itomi<sup>1</sup>, Chie Kihira<sup>1</sup>, Prihardi Kahar<sup>1</sup>, Ogino Chiaki<sup>1</sup>, Kondo Akihiko<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Innovation. Kobe Univ.)

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, chemical inhibitor, flocculating yeast, fermentation

### 3P-2p154 ストロニウムがツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響の解析

山下 綾子<sup>1</sup>, 中村 真由<sup>2</sup>, 望月 玲於<sup>1</sup>, 青柳 秀紀<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>筑波大・生物資源)  
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

**【目的】** 東日本大震災により、福島原発から環境中に飛散した放射性ストロニウム ( $Sr^{2+}$ ) は大きな問題となっている。汚染地域の大部分は森林域であり、現在、そこに生息する生物や土壌などを対象に、 $Sr^{2+}$  の動態・影響評価が行われている。しかしながら、森林域に多く存在する花粉の生理活性に  $Sr^{2+}$  が及ぼす影響は十分に解析されておらず未解明部分が多い。花粉は極性成長をする細胞のモデルであり、培養期間が短いという長所もある。これらの背景を踏まえ、本研究では  $Sr^{2+}$  が花粉の生理活性に及ぼす影響の解析を試みた。

**【方法と結果】** モデルとしてツバキ (*Camellia japonica*) の花粉を実験に用いた。従来法の問題点を排除し、 $Sr^{2+}$  がツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響を適切に解析するために、高純度セルロースシートを用いた培養法 (UCS 法) を独自に開発した。 $Sr^{2+}$  はアルカリ土類金属類と類似した動態を示すため、任意の濃度の  $SrCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$  を用い種々検討した結果、 $Sr^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  と比べて低濃度で、ツバキ花粉の発芽率を大幅に低下させ、花粉管の伸長を顕著に阻害するとともに、花粉管先端部にカロースの沈着が認められた。UCS 法を活用し、 $Sr^{2+}$  が生育状態の異なるツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響を検討した結果、 $Sr^{2+}$  は花粉の発芽前に強く作用することが示唆された。 $Sr^{2+}$  による阻害効果の緩和を目指し、 $Ca^{2+}$  と  $Sr^{2+}$  を同時に添加してツバキ花粉を培養した結果、 $Ca^{2+}$  量の増加に伴い  $Sr^{2+}$  による阻害の緩和効果の増大が認められた。現在、花粉粒の細胞壁における  $Ca^{2+}$  と  $Sr^{2+}$  の挙動や役割について解析中である。

**Effect of strontium on the physiological activities of *Camellia japonica* pollen grains**

Ayako Yamashita<sup>1</sup>, Mayu Nakamura<sup>2</sup>, Reo Mochizuki<sup>1</sup>, Hideki Aoyagi<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Col. Agro-bio. Resource. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** calcium, novel culture method, pollen, strontium

### 3P-2p155 強化平板法と発育遅延解析法を併用した「固液培地生存性差分(DiVSA)法」による微生物の新規損傷菌数評価

○岩田 吏世<sup>1</sup>, 坂元 仁<sup>2</sup>, 土戸 哲明<sup>2</sup>, 古田 雅一<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>阪府大院・工, <sup>2</sup>阪府大・21科研機構・微制御セ)  
 mfuruta@b.s.osakafu-u.ac.jp

#### [目的]

一般に、殺菌処理を比較的温和な条件で行うと損傷菌が発生するため、その計数や評価が問題となる。一般の微生物栄養細胞の損傷菌の計数・評価は通常2つの異なる方法によって検出された生存数の差によって行われることが多い。演者らは、加熱や薬剤によって発生する損傷菌の特性について検討してきており、損傷菌数測定法として「固液培地生存性差分法」(Difference in Viabilities between Solid and Liquid Media - DiVSA法)を提唱している<sup>1)</sup>。この方法は、殺菌処理後の生存率測定法として液体培地を用いる発育遅延解析法<sup>2)</sup>(理論基盤となる損傷細胞集団の発育遅延時間分布関数を導入し、損傷による遅延時間を生存数低下に換算して評価)と、想定可能な最良の培養条件で計数する強化寒天平板法(十分な時間を与え、損傷菌を極力蘇生させてCFUを計数)の2つの方法によって得た生存率の差を損傷菌数として測定・評価する方法である。今回は大腸菌をモデルに用いて加熱損傷における損傷菌数評価について適用した結果を報告する。

#### [方法及び結果]

大腸菌 OW6 (NBRC106482) を EM9 液体培地中、30°C で培養し、対数増殖期の細胞を集菌、洗浄後、50mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) 中、50°C で加熱処理した。加熱処理中の損傷菌数は、加熱時間とともに減少した。平板上でのコロニー形成の時間差から損傷度を亜集団ごとに評価し、その平均の遅延時間を評価した。得られた結果から、この新しい定義による損傷菌数評価法は、細胞集団レベルでの液体・固体培地での発育特性の原理の違いを利用したもので、食品のシェルフライフの概念に適合し実用的なものと言える。

1)土戸:防菌防霉学要旨集, p. 213 (2015).

2) Takano, M. and Tsuchido, T.: J. Ferment. Technol., 60, 189 (1982).

#### A novel method for enumeration of injured microbial cell population by differential viabilities

○Riyo Iwata<sup>1</sup>, Jin Sakamoto<sup>2</sup>, Tetsuaki Tsuchido<sup>2</sup>, Masakazu Furuta<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>RCMC, Res. Org. 21st Century. Osaka. Pref. Univ.)

**Key words** differential viability, injured microorganism, growth delay analysis, plate count

### 3P-2p156 大腸菌細胞質内における *ssrA* タグ認識プロテアーゼ活性評価のためのレシオメトリックセンサーの開発

○坂元 仁<sup>1,2</sup>, 古田 雅一<sup>1,2,3</sup>, 土戸 哲明<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪府大・21科研, <sup>2</sup>阪府大・放研セ, <sup>3</sup>阪府大院・工・量子)  
 sakamoto.jj@gmail.com

**[目的]** 大腸菌において停止コドンを持たない分解 mRNA からタンパク質が翻訳される際、*ssrA* 遺伝子がコードする tmRNA によって 11 残基のペプチドが C 末端に付加され、これが細胞内で合成された異常タンパク質の標識として働き、細胞質では ClpA、ClpX プロテアーゼ系によって特異的に分解除去される。tmRNA は細胞内のタンパク質の品質維持に必要なシステムである。半致死的な外的ストレスに曝された細胞での分解代謝が回復に相関するならば、この機能を細胞の健全性の指標として活用できると考えられる。そこで *ssrA* タグ標識タンパク質の分解挙動を解析するための蛍光タンパク質を用いたアッセイ系の構築を試みた。

**[方法及び結果]** GFP への *ssrA* タグ標識システムが、Farrell ら(2005)により報告されている。しかしながら蛍光タンパク質の発現量や蛍光団形成の成熟速度は、宿主の遺伝的背景や培養条件など細胞内環境の違いに影響され、絶対量と蛍光量が必ずしも一致しない等の問題を内包している。そこで我々はこの問題の解決を試みた。構成プロモーター *PlacUV5* 下流に EGFP 遺伝子または mCherry 遺伝子と連結したベクターを構築し、さらに mCherry の C 末端側に通常の *ssrA*(AA)タグと、末端 2 箇所の L-Ala を L-Asp に置換した分解を免れる *ssrA*(DD)タグを付加し、pKK232-8 ベクターを基盤に EGFP と mCherry-*ssrA* を互いに逆向きに連結した pTwoFP-*ssrA*(AA)および pTwoFP-*ssrA*(DD)を構築した。同じベクター内かつ同じプロモーターで EGFP と mCherry が誘導されるため、細胞環境が異なり、プラスミドコピー数、発現量、蛍光団成熟速度が異なってもネガティブコントロールベクター保持株の赤:緑の蛍光比で割ることで *ssrA* タグ標識タンパク質の分解能の評価が可能となった[赤(AA)/緑]/[赤(DD)/緑]。今回はこれを用いた各種ストレス条件下での *ssrA* タグ認識プロテアーゼ活性評価を報告する。

#### Ratiometric sensor for *ssrA* tagged protein specific protease activity assay in *Escherichia coli*

○Jin Sakamoto<sup>1,2</sup>, Masakazu Furuta<sup>1,2,3</sup>, Tetsuaki Tsuchido<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>21Res.Osaka Pref. Univ., <sup>2</sup>Rad. CRes.Osaka Pref. Univ., <sup>3</sup>Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

**Key words** *Escherichia coli*, *ssrA*, protein-quality control, GFP

### 3P-2p157 細胞間相互作用を利用した新規微生物制御法の開発

○勝亦 雄太, 豊福 雅典, 小川 和義, 野村 暢彦  
 (筑波大院・生命環境)  
 nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

近年、実環境中の微生物の多くはバイオフィームのような集団を形成して存在することが知られるようになってきた。加えて、このような集団中では微生物が互いにコミュニケーションを行うことも明らかとなってきた。中でも Quorum Sensing (QS) と呼ばれるコミュニケーションは、呼吸や毒素生産、抗生物質耐性といった多くの活性を制御しており、QS を対象とした微生物制御は幅広い産業分野への応用が期待できる。QS は菌体密度依存的なシステムであるため、菌体密度を意図的に調節することで発現制御が可能になると考えられる。そこで本研究では、菌体密度の調節による QS 制御法の開発を目指した。

菌体密度制御素材として、我々は poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA) に着目した。PNIPA は 32°C を境に伸縮する性質を持つため、温度刺激により菌体密度の制御が可能になると考えた。まず、QS モデル細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (野生株) を包括した PNIPA 担体を異なる温度条件で培養し、包括菌体の増殖挙動を観察した。結果、収縮した PNIPA 担体特異的に菌体数が増加することが分かった。この挙動に QS が関与するか確かめるため、続いて *AtasI/DsrIII* (シグナル物質非生産株) を用いた同様の実験を行った。結果、*AtasI/DsrIII* では野生株に見られた菌体数の増加は確認されなかった。加えて、収縮しない担体においては、いずれの温度条件でも細胞数の変化は観察されなかった。以上の結果から、収縮した PNIPA 担体が作り出す高い菌体密度条件が、*P. aeruginosa* の QS 発現を誘導する効果を持つことが示唆された。本研究により、菌体密度の調節によって QS が制御できる可能性が示された。

#### A new method to control bacteria by applying a cell-cell interaction

○Yuta Katsumata, Masanori Toyofuku, Kazuyoshi Ogawa, Nobuhiko Nomura  
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

**Key words** bacteria, quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*, signal transduction

### 3P-2p158 白色腐朽菌によるマンガンペルオキシダーゼの高効率生産に向けた pH シフト条件の検討

○嶋田 亮, 森本 康介, 櫻井 明彦  
 (福井大院・工)  
 a\_sakura@u-fukui.ac.jp

**[緒言]** 白色腐朽菌が生産するマンガンペルオキシダーゼ(MnP)は基質特異性が低く、酸化力が強いことから、バイオリファイナリーやバイオレメディエーションなどへの応用が期待されている。しかしながら、MnP の生産性は低く、工業レベルには達していない。当研究室のこれまでの実験から、培養途中に培地の pH を低下させること(pH シフト)により、MnP の生産性が向上することが分かっている。そこで本研究では、pH のシフト値とシフト時期の MnP 生産性に対する影響について検討した。

**[方法]** MnP 生産菌には *Bjerkandera* sp. L-25 株を用いた。培養は振盪培養法(30°C、150 rpm)で行い、500 mL バッフル付き三角フラスコ内の培地 100 mL に、前培養(30°C、5 日間)した菌糸体を接種して開始した。培地組成は Potato Dextrose Broth 24 g/L、Polypepton (Fine granules) 45 g/L、MnSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 0.241 g/L とし、オートクレーブ前の pH を 7.0 に調整した。培養途中の pH は 3.0~5.5 にシフトさせ、シフト時期は 2.5~6.5 日目に設定し、応答曲面法により最適条件を探索した。また、得られた最適条件を用いて pH シフトを繰り返した(12 時間毎)。MnP 活性は、Mn<sup>3+</sup>マロン酸錯体法で測定した。

**[結果と考察]** 応答曲面法による解析結果から、最大 MnP 活性は pH を低い値にシフトし、シフト時期を遅くするにつれて上昇する傾向を示し、最適条件はシフト値が 4.6、シフト時期が 5.5 日目と予測された。得られた最適条件で培養を行ったところ、Control と比較して最大 MnP 活性は約 40% 上昇し、増殖量は約 10% 上昇した。また、pH シフトを繰り返したところ、Control と比較して最大 MnP 活性が約 90% 上昇し、増殖量は約 50% 上昇した。現在、pH シフトによる代謝の変化などを解析している。

#### Enhanced production of manganese peroxidase by white rot fungus with pH stimulation

○Ryo Shimada, Kosuke Morimoto, Akihiko Sakurai  
 (Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

**Key words** white-rot fungi, manganese peroxidase, pH shift, response surface method

### 3P-2p159 イオンビーム照射によるリグニンペルオキシダーゼ高生産株の育種

○三木 紀彦<sup>1</sup>, 杉浦 康友<sup>1</sup>, 如 下 昌範<sup>2</sup>, 櫻井 明彦<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>福井大院・工, <sup>2</sup>若狭エネ研)  
 a\_sakura@u-fukui.ac.jp

【緒言】白色腐朽菌が生産するリグニン分解酵素の一つであるリグニンペルオキシダーゼ(LiP)は、他のリグニン分解酵素に比べて酸化力が強く、リグニン分解能力が高いためバイオリファイナリーへの応用が期待されている。本研究では、*Bjerkandera* 属の白色腐朽菌にイオンビームを照射することにより LiP 高生産株の作出を検討した。また、得られた変異株の培養条件を検討した。

【方法】野生株である *Bjerkandera* sp. L-25 にプロトン(LET 0.5 KeV/μm)とカーボン(LET 42.0 KeV/μm)のビームを照射した。照射線量はプロトンでは 1000~3500 Gy、カーボンでは 750~1500 Gy に設定した。照射後の菌糸は、PDA(Potato Dextrose Agar)培地にリグニン 2 g/L を加えたりグニンプレートと、PDA に RBBR(レマゾールブリリアントブルー R)0.1 g/L を加えた RBBR プレートの両方に植菌した。両プレートでの増殖の様子から生存率と変異率を算出し、脱色具合からリグニン分解能力の簡易的な評価を行った。さらに、得られた有望株の LiP 生産性を振盪培養(30℃, 150 rpm)により確認し、候補をしばらくこんだ。また、選択した有望株に対して、LiP 生産に及ぼす窒素源(Bacto Yeast Extract)濃度の影響を検討した。なお、LiP 活性はベラトリルアルコールの酸化により生成するベラトリルアルデヒドの吸光度(310 nm)を測定することで算出した。

【結果と考察】プロトンビームを用いた場合では、生存率は照射線量 1500 Gy 付近から低下し始め、2000 Gy 付近で急激に低下した。変異率は 2000 Gy 以上で上昇した。一方、カーボンビームを用いた場合では、生存率は照射線量が 1000 Gy を超えると急激に低下し変異率も上昇した。得られた変異株は BYE 濃度が 45 g/L で最も高い LiP 活性の値を示し、その値は野生株の約 2 倍であった。

#### Breeding of white rot fungus with high lignin peroxidase productivity by ion beam irradiation

○Norihiko Miki<sup>1</sup>, Yasutomo Sugiura<sup>1</sup>, Masanori Hatashita<sup>2</sup>, Akihiko Sakurai<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., <sup>2</sup>Wakasa Wan Energy Res. Center)

**Key words** white-rot fungus, lignin peroxidase, mutation, ion beam

### 3P-2p160 新規酢酸耐性酵母 KS47-1 株における耐性機構に関する基礎検討

○加藤 勇太, 荒川 知子, 石田 奨, 小西 正明  
 (北見工大)  
 konishim@mail.kitami-it.ac.jp

#### 【背景】

現在、食糧・飼料と拮抗しない原料、草木・木質由来のリグノセルロース系バイオマスを用いた微生物発酵の確立が求められている。しかし、リグノセルロース系バイオマスから有用物質を生産する際に発酵阻害物質が副生成されることが知られており、その除去処理によるコストの増加が問題となっている。当研究グループは、北見工業大学屈斜路研究所周辺の土壌から発酵阻害物質存在下でも良好に増殖する酵母 *Pichia membranifaciens* KS47-1 株の分離に成功している。また、KS47-1 株の持つ発酵阻害耐性は基準株や近縁種には見られない KS47-1 株特有のものであることがわかっている。そこで、既知の発酵阻害物質に対する KS47-1 株の耐性を培養工学的に評価し、発酵阻害耐性機構について検討した。

#### 【方法・結果】

KS47-1 株の培養特性を検討したところ、酢酸に対し既知の耐性菌より強い耐性を示し、350 mM 酢酸存在下でも良好に増殖することがわかった。そこで Illumina HiSeq を用いて KS47-1 株のドラフトゲノムを解析し、アノテーションデータに対して既知の酢酸耐性に関する遺伝子について相同解析した。これにより酢酸の細胞内への流入チャネル Fps1 の欠損、プロトンポンプ Pma1、アニオン排出に関わる膜輸送タンパク質 Pdr12 の存在が推定された。一方、KS47-1 株の酢酸に対する資化性試験を行った結果、炭素源が酢酸のみでも増殖が見られ、酢酸を資化していることがわかった。このことから、非 Fps1 酢酸取り込み能を有することが示唆された。

#### Investigating acetate-tolerance mechanism of *Pichia membranifaciens* KS47-1

○Yuta Kato, Tomoko Arakawa, Masashi Ishida, Masaaki Konishi  
 (Kitami Inst. Technol.)

**Key words** acetate, fermentation inhibitors, *Pichia membranifaciens*, draft genome sequencing

### 3P-2p161 酵母 *Kluyveromyces marxianus* によるキシロース条件下でのタンパク質分泌生産

○石田 尚司<sup>1,3,4</sup>, 木寺 研太<sup>1</sup>, 瀧下 竜太<sup>2</sup>, 藤岡 経久<sup>1</sup>, 深川 泰紀<sup>2</sup>, 赤田 倫治<sup>1,3,4</sup>  
 (<sup>1</sup>山口大院・創成科学, <sup>2</sup>山口大・工, <sup>3</sup>山口大・中高温微生物セ, <sup>4</sup>山口大・生命医工セ)  
 hoshida@yamaguchi-u.ac.jp

【背景と目的】組換えタンパク質生産宿主として多くの微生物でタンパク質発現系が開発されている。一般的に酵母はタンパク質の分泌生産能が低い。しかし、増殖速度や培養の容易さ、さらには遺伝子操作の点では優位性があり、分泌生産能の高い酵母、あるいはそのための培養条件が明らかになれば、タンパク質生産に適した宿主となり得る。そこで、酵母 *K. marxianus* がタンパク質分泌生産宿主として利用可能かどうかを調べた。

【方法、結果、考察】*K. marxianus* は比較的広い糖資化能を持つ酵母である。DMKU3-1042 株を 8 つの異なる糖を炭素源とする培地を用いて培養し、培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE で解析すると、キシロース条件下で強く分泌生産されるタンパク質が存在した。N 末アミノ酸配列解析、および、そこから推測された候補遺伝子の破壊により、そのタンパク質がイヌリナーゼであることが分かった。DMKU3-1042 株を含む 16 の *K. marxianus* 株のグルコースおよびキシロース培地での分泌を比較すると、グルコース培地でも比較的多くイヌリナーゼを分泌する株も存在し、ほとんどの株でキシロースにより分泌生産が増加した。中でも NBRC1777 株は高い分泌生産量を示した。NBRC1777 株を用いてイヌリナーゼ分泌生産のための培養条件を調べたところ、酸素供給が影響することを示唆する結果を得た。そこで、発酵槽を用いて攪拌数を変えて培養すると、高い攪拌数で溶存酸素を高く保った培養条件でイヌリナーゼ分泌生産量が高かった。組換えタンパク質として分泌性ルシフェラーゼを NBRC1777 株に導入し、キシロース培地で培養すると、ルシフェラーゼも溶存酸素濃度が高い条件下で多く分泌された。これらの結果は、*K. marxianus* がタンパク質分泌生産のための宿主として有用であることを示している。

#### Secretory protein production by the yeast *Kluyveromyces marxianus* in xylose medium

○Hisashi Hoshida<sup>1,3,4</sup>, Kenta Kidera<sup>1</sup>, Ryota Takishita<sup>2</sup>, Nobuhisa Fujioka<sup>1</sup>, Taiki Fukagawa<sup>2</sup>, Rinji Akada<sup>1,3,4</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Yamaguchi Univ., <sup>3</sup>YURC-TMR, Yamaguchi Univ., <sup>4</sup>YUBEC, Yamaguchi Univ.)

**Key words** *Kluyveromyces marxianus*, xylose, secretory production, inulinase

### 3P-2p162 CHO 細胞培養における予測制御技術を用いたグルコース濃度制御法

生田目 哲志<sup>1</sup>, 中村 幸弘<sup>1</sup>, 伊崎 文晃<sup>1</sup>, 平野 明成<sup>1</sup>,  
 ○下田 聡一郎<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>横河電機・イノベーションセンター, <sup>2</sup>阪大院・工)  
 Souichirou.Shimoda@jp.yokogawa.com

#### 【背景と目的】

動物細胞培養におけるグルコース濃度は、細胞代謝活性の指標として有用であり、適切に濃度制御することで細胞の生産性、安定性を向上する培養が期待できる。しかしながら、通常は限られた回数のサンプリング分析により、一定期間の必要量を間欠的に流加する方法となり、細胞代謝を考慮した濃度制御は行われていない。本研究では、CHO 細胞を対象として、インライン計測とグルコース消費量の予測に基づいて、設定濃度の維持に必要なグルコース投入量を適切に制御するシステムの開発を行った。

#### 【方法】

抗体産生 CHO 細胞株と無血清培地である BalanCD 培地を用いた 2L スケールのバッチ培養下で、2g/L のグルコース濃度制御を行った。インラインで取得した近赤外吸光スペクトルと交流インピーダンスを基に、30 分周期でグルコース濃度の推定と消費量予測を行い、2g/L を維持するようにグルコースを自動流加した。

#### 【結果及び考察】

構築した制御システムを用いて 2g/L のグルコース濃度自動制御を行った結果、滅菌期に入る培養 7 日目まで、グルコース濃度のインライン推定値はオフラインの測定値に良く一致し、2g/L±10% 精度の濃度制御を実現した。本システムは、リアルタイムなデータ収集と解析によりグルコース比消費速度など細胞代謝活性の指標を随時把握出来るため、細胞状態の理解に基づいた培養条件検討を可能にする。今後は、本グルコース濃度制御技術を搭載した培養装置開発を、連続プロセス向けに視野に入れて検討する予定である。

#### Advanced Glucose Control Method Applying Predictive Control Technology in CHO Cell Culture

Tetsushi Namatame<sup>1</sup>, Yukihiro Nakamura<sup>1</sup>, Fumiaki Izaki<sup>1</sup>, Akinari Hirano<sup>1</sup>,  
 ○Soichiro Shimoda<sup>1</sup>, Takeshi Omasa<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Innovation Center, Yokogawa Electric Corp., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** in-line monitoring, predictive feed control, glucose concentration, CHO cell culture

### 3P-2p163 軟培養面によるヒト iPS 細胞増殖への影響

○堀江 正信<sup>1</sup>, 藤田 英明<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>京大・RIRC・生化工, <sup>2</sup>理研・生命システム, <sup>3</sup>阪大・免疫)  
horie.masanobu.4z@kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】 ヒト人工多能性幹細胞(ヒト iPS 細胞)はヒトから採取した体細胞へ特定の因子を導入することで樹立され、体を構成する様々な細胞に分化する多分化能と、無限に増殖する自己複製能を併せ持った細胞である。ヒト iPS 細胞にはドナーの遺伝情報を保存することが知られており、病態を体外で再現することができるため、創薬分野における利用が期待されている。さらに再生医療分野及び組織工学分野の著しい発展により、ヒト iPS 細胞由来細胞から作成した組織を移植する臨床試験なども行われており、今後ヒト iPS 細胞の需要が拡大することは自明である。しかしヒト iPS 細胞は人工的に作成した細胞であるために株間差が大きく、製造におけるパラメーターの設定が煩雑である。本研究ではまず、未分化維持培養でのヒト iPS 細胞増殖制御を目的とし、様々な軟らかさの培養面上におけるヒト iPS 細胞増殖の評価を行った。

【方法】 アクリルアミドゲルの重合度を変化させることで様々な軟らかさの培養面を作成し、ヒト iPS 細胞(253G1 株)を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。培養 24 h における接着率  $\alpha$  及び、24-120 h における見かけの比増殖速度  $\mu$  を評価した。さらに、未分化性を評価するために、未分化細胞マーカー遺伝子である Oct3/4, Sox2, Nanog, Rex1 の発現を評価した。

【結果と考察】 軟培養面上においては全ての条件において  $\alpha$  が低くなったものの、 $\mu$  に関しては通常の硬さの培養面よりも高くなる条件が存在した。また、培養 120 h において軟培養面上で培養したヒト iPS 細胞は未分化性を維持しており、軟培養面を用いて増殖を制御できる可能性が示唆された。

#### Effect of substrate stiffness on human induced pluripotent stem cell proliferation

○Masanobu Horie<sup>1</sup>, Hideki Fujita<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>Div. Bio. Chem. Eng., RIRC., Kyoto Univ., <sup>2</sup>QBIC, RIKEN, <sup>3</sup>IFReC, Osaka Univ.)

**Key words** Human induced pluripotent stem cells, Soft substrate, Mechanotransduction, Actin filament

### 3P-2p164 コロニー形態情報解析を用いた iPS 細胞における培養工程の評価

○吉田 啓<sup>1</sup>, 長坂 理紗子<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 清田 泰次郎<sup>2</sup>, 古江-楠田 美保<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>4</sup>, 本多 裕之<sup>4</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>ニココン, <sup>3</sup>医薬基盤研究所, <sup>4</sup>名大院・工)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

iPS 細胞は、創薬スクリーニング、再生医療など様々な利用が期待されている有用なツールである。今後、iPS 細胞の産業化に向けては、未分化な状態を維持した高品質な細胞を大量に生産し、供給する必要がある。現状 iPS 細胞の品質管理は、日々の培養状態の観察に基づき行われているが、このような細胞培養は今後、機械化・自動化することが求められてきている。しかしながら、細胞製品の製造工程には未だに原因不明のバラツキをもたらす変動要因が存在しており、特に細胞として極めてデリケートな一面を持つ iPS 細胞は、多くの外的変動要因の影響を受け、培養の途中で品質が変化してしまう可能性が高いが、これまで何の影響が小さく、何の影響が大きいのかという定量的なデータ化を報告した例は少なかった。そのため、培養工程に潜む変動要因の影響の大きさを定量的に把握し、管理することが望まれていた。これまで我々のグループは、培養中の iPS 細胞の状態(iPS 細胞コロニーの増殖や形態変化)について画像情報処理技術を用いてデータ化・可視化することを試みてきている。本研究では本技術を応用することで、iPS 細胞の培養方法(細胞、手技、コーティング剤)の違いによる細胞品質への影響をスコア化する品質管理技術について開発したので報告する。

#### Image-based evaluation of cell culture protocols in iPSC processing

○Kei Yoshida<sup>1</sup>, Risako Nagasaka<sup>1</sup>, Kei Kanie<sup>1</sup>, Yasujiro Kiyota<sup>2</sup>,

Miho Furue-Kusuda<sup>3</sup>, Kazunori Shimizu<sup>4</sup>, Hiroyuki Honda<sup>4</sup>, Ruyji Kato<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Nikon Corp., <sup>3</sup>NIBIO, <sup>4</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

**Key words** iPSC, undifferentiation status, image-based analysis

### 3P-2p165 神経分化工程の非破壊評価に向けた細胞画像情報解析法の開発

○藤谷 将也<sup>1</sup>, Binti Huddin Noor Safika<sup>2</sup>, 河合 駿<sup>1</sup>, 蟹江 慧<sup>1</sup>, 清田 泰次郎<sup>3</sup>, 清水 一憲<sup>2</sup>, 本多 裕之<sup>2</sup>, 加藤 竜司<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名大院・創薬科学, <sup>2</sup>名大院・工, <sup>3</sup>ニココン)  
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

【目的】 近年、筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー病などの神経疾患に対する治療として幹細胞の利用が注目されている。特に神経幹細胞(Neural stem cell: NSC)はニューロンとグリア細胞に分化できる幹細胞であり、臨床応用に向けた培養法や品質評価法が開発されている。しかし NSC の品質評価には長期の培養に加え、各分化マーカーによる染色評価が必要であり、評価するタイミングも評価者の判断に委ねられているといった課題がある。我々はこれまで位相差画像を用いて幹細胞の分化状態を非破壊的に定量評価する画像解析手法を開発してきた。本研究では、本手法を NSC に応用し将来の分化度をリアルタイムに評価できる手法の構築を目的とした。

【方法】 ヒト NSC 及びマウス NSC を 3 種類の神経分化培地を用いて分化培養し、培養中の位相差画像を連続的に取得して形態情報を抽出した。その後、培養最終日に 2 種類の免疫染色にて分化評価データを取得した。抽出した形態情報と分化評価データを解析することで、細胞の形と神経分化度の対応を評価した。

【結果】 NSC を各分化培地で分化培養した結果、培地ごとに細胞形態や分化度に違いが生じることが確認された。また、分化培養中の細胞画像から得られる形態パラメータを用いることで分化培養時期の NSC の変化を非破壊的に定量化し、神経分化度を従来の 1/2 の期間で検出可能であることが明らかになった。

【考察】 今回の結果から分化培養時期の細胞画像により、将来の神経分化度をリアルタイムに予測でき、細胞画像情報による神経分化評価の有効性を示唆する結果となる。

#### Image-based analysis for non-invasive quantitative evaluation of neural differentiation

○Masaya Fujitani<sup>1</sup>, Noor Safika Binti Huddin<sup>2</sup>, Shun Kawai<sup>1</sup>, Kei Kanie<sup>1</sup>,

Yasujiro Kiyota<sup>3</sup>, Kazunori Shimizu<sup>2</sup>, Hiroyuki Honda<sup>2</sup>, Ruyji Kato<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., <sup>3</sup>Nikon Corp.)

**Key words** Morphological profiling, Non-invasive, Neural stem cell

### 3P-2p166 Muse 細胞の非侵襲的・迅速な濃縮法の開発

○江橋 具<sup>1,3</sup>, 富田 悠一<sup>2</sup>, 吉田 健祐<sup>3</sup>, 山田 秀樹<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>神戸大・自科・研究環, <sup>2</sup>神戸大・工, <sup>3</sup>神戸大院・工)  
yamaji@kobe-u.ac.jp

間葉系幹細胞(MSC: mesenchymal stem cell)に含まれている Muse (multilineage-differentiating stress enduring) 細胞は高い多能性を有し、MSC 移植による治療において組織修復に直接貢献する有用な細胞である。しかしながら、培養 MSC 中でも数パーセント以下しか含まれないことから、Muse 細胞を効率よく取得する方法の開発が必要である。従来法であるセルソーターや酵素処理による細胞の濃縮法では、細胞への侵襲や長時間の培養が伴うことから、本研究では、さまざまな pH に調整した緩衝液で MSC を処理することにより、非侵襲的かつ迅速に Muse 細胞を濃縮する方法を検討した。

培養 MSC をさまざまな pH に調整したリン酸緩衝液中に懸濁し、37°C にて 20 分間静置した。その後、非接着性培養皿による浮遊培養を行い、多能性幹細胞のマーカーとして知られる SSEA-3 を指標として、全細胞中に含まれる Muse 細胞の割合をフローサイトメトリーにて経時的に測定した。その結果、リン酸緩衝液が pH 4.5-7.4 の場合に溶液の pH が低くなるほど、Muse 細胞の割合が増加した。未処理の MSC 中の Muse 細胞は 0.6% であったのに対し、最も割合が増加した pH 4.5 の場合では、培養 1 日目における割合は 1.2% となり、5 日目には 27% にまで増加した。以上の結果から、MSC を低 pH の緩衝液にて処理する方法により、非侵襲的かつ短期間で、Muse 細胞を濃縮することに成功した。

#### Novel method for noninvasive and rapid enrichment of Muse cells

○Tomo Ehashi<sup>1,2</sup>, Yuichi Tomita<sup>2</sup>, Kensuke Yoshida<sup>2</sup>, Hideki Yamaji<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., <sup>2</sup>Fac. Eng., Kobe Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

**Key words** Muse cell, enrichment, noninvasive method, pH

**3P-2p167 遺伝子導入による皮膚細胞から肺細胞への分化転換**

○二宮直登<sup>1,2,3</sup>, 野口隆明<sup>1</sup>, 関根麻莉<sup>1</sup>, 道上達男<sup>2</sup>, 浅島誠<sup>3</sup>,  
王碧昭<sup>1</sup>, 栗崎晃<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>筑波大院・生命環境, <sup>2</sup>東大院・総合文化, <sup>3</sup>産総研)  
a.ninomiya@aist.go.jp

肺は人間が生存する上で必須の臓器の一つであるが、肺線維症、肺がん、肺炎、気管支拡張症、肺結核など様々な病気が発生し、多くの方が肺疾患により命を落としている。なかでも慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) は不可逆的な肺組織の破壊が生じるため、慢性的な呼吸困難による QOL の低下を伴う不治の病である。現在 COPD の根本的な治療法は肺移植以外にないが、ドナー肺不足は深刻で一部の患者しか肺移植治療を受けられないため、多くの患者がこの疾患で命を落としている。また、肺がんや肺結核などの肺疾患後の後遺症に苦しむ患者も数多く存在することから、肺疾患に対する根本的な治療法が開発される事が強く期待されている。現在多能性幹細胞から肺細胞を作製することは可能であるが、肺組織の細胞のみを特異的に分化誘導することは困難である。

本研究では数種類の遺伝子を導入することで、皮膚細胞を肺細胞の元となる肺の前駆細胞へと特異的に転換させる事を試みた。

**Direct reprogramming of fibroblasts into lung progenitor-like cells**

○Naoto Ninomiya<sup>1,2,3</sup>, Takaaki Noguchi<sup>1</sup>, Mari Sekine<sup>1</sup>, Tatuo Michiue<sup>2</sup>,  
Makoto Asashima<sup>3</sup>, Pichao Wang<sup>1</sup>, Akira Kurisaki<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, <sup>2</sup>Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo,  
<sup>3</sup>AIST)

**Key words** Lung cell

**3P-2p168 コリネ型細菌によるパラアミノ安息香酸の高生産**

○久保田健<sup>1</sup>, 渡邊彰<sup>1</sup>, 須田雅子<sup>1</sup>, 小暮高久<sup>1</sup>, 平賀和三<sup>1</sup>,  
乾将行<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>RITE・バイオ, <sup>2</sup>奈良先端大・バイオ)  
mmg-lab@rite.or.jp

【目的】パラアミノ安息香酸(PABA)は医薬品やポリマーの原料となる芳香族化合物であり、産業的価値が高い。現在 PABA は石油を原料として多段階の化学反応により合成されている。一方、PABA は多くの微生物が有する葉酸合成経路上に位置する代謝産物である。そのため、石油に依存しない代替製造法として低環境負荷型のバイオプロセスを利用した PABA 生産法が有望である。本研究ではアミノ酸等の生産に広く利用される有用工業微生物、コリネ型細菌を用い、PABA の発酵生産検討を行った。

【方法と結果】高い生産性を達成するためには高濃度の生産物存在下でも活性を維持できる宿主を選ぶことが重要である。一方で、いくつかの芳香族化合物は細胞毒性を示すこと知られている。そこで、コリネ型細菌の増殖における PABA の影響を調べることで宿主の生産物に対する耐性を評価した。その結果、培養液中に 200 mM の PABA が存在すると、PABA の生産が報告されている他宿主微生物の増殖は強く阻害された。これに対してコリネ型細菌は培養液中に 400 mM の PABA が存在しても増殖可能であった。そのため、コリネ型細菌は他の代表的な生産菌よりも高い PABA 耐性を示すことが分かった。次に、生成経路上の中間体であるコリスミ酸を PABA に変換する酵素のスクリーニングを行い、高活性な遺伝子を得た。この遺伝子を高発現させることで培地中に PABA を蓄積する組換え菌株を得た。さらにシキミ酸経路上の遺伝子を高発現させる等の改変を加えることにより、PABA 生産能が顕著に向上した組換え菌株を構築した。また、PABA 生産時に著量の未同定副生成物が現れることを確認した。今回は PABA の生産結果に加え、生産過程で発生する副生成物について考察する。

**Production of para-aminobenzoic acid by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum***

○Takeshi Kubota<sup>1</sup>, Akira Watanabe<sup>1</sup>, Masako Suda<sup>1</sup>, Takahisa Kogure<sup>1</sup>,  
Kazumi Hiraga<sup>1</sup>, Masayuki Inui<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>RITE, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**Key words** *Corynebacterium glutamicum*, shikimate pathway, byproduct

**3P-2p169 ビルビン酸高生産大腸菌を利用したビルビン酸の生産**

○秋田 絏長<sup>1</sup>, 中島 信孝<sup>2,3</sup>, 星野 保<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>産総研・機能化学, <sup>2</sup>東大院・生命理工, <sup>3</sup>産総研・生物プロセス)  
h-akita@aist.go.jp

【背景と目的】ビルビン酸は、様々な方法により、多様な化学品原料に変換できる。そのため、ビルビン酸を高生産する大腸菌の作製は、バイオマスを利用した有用物質生産のための基盤技術の構築を可能にする。本研究では、大腸菌内に存在する数種のビルビン酸代謝関連遺伝子をテトラサイクリン誘導性プロモーター制御下に置くとともに破壊して、それら遺伝子の発現量を著しく低下させ、ビルビン酸を高生産可能な大腸菌を作製した。

【方法】必須遺伝子である *accBC* 遺伝子をテトラサイクリン誘導性プロモーター制御下に置き、ドキシサイクリンの添加が生育におよぼす影響を確認した。さらに、*aceE* 遺伝子をテトラサイクリン誘導性プロモーター制御下に置き、数種類のビルビン酸代謝関連遺伝子を破壊して、ビルビン酸生産株を作製した。また、ビルビン酸生産の高効率化を図るため、培養温度・pH、攪拌速度および空気供給量について検討し、生産条件の最適化を行った。

【結果と考察】*accBC* 遺伝子制御株は、ドキシサイクリンの添加に依存した生育を示した。また、ビルビン酸生産条件を最適化させることで、生産収率の向上が確認された。本法で得られるビルビン酸の理論収率は、既存の方法に比べて高いことから、より経済的なビルビン酸生産が可能となることが示唆された。

**Pyruvate production using engineered *Escherichia coli***

○Hironaga Akita<sup>1</sup>, Nobutaka Nakashima<sup>2,3</sup>, Tamotsu Hoshino<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>ISC. AIST, <sup>2</sup>Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech., <sup>3</sup>BRI. AIST)

**Key words** *Escherichia coli*, pyruvate, promoter regulation, doxycycline

**3P-2p170 Pyruvate decarboxylase 遺伝子を発現した微生物による シンナムアルデヒドからの光学活性ジオールの生産**

○大竹 遥, 關谷 悠介, 井野口 諒太, 根岸 佑香里, 宮越 俊一  
(群馬高専)  
miyako@nat.gunma-ct.ac.jp

【目的】*Saccharomyces cerevisiae* はシンナムアルデヒドから (2*S*,3*R*) 5-phenylpent-4-ene-2,3-diol への立体特異的な還元を行う。われわれは、この反応を触媒すると考えられる pyruvate decarboxylase 遺伝子 (*PDC1*) を *S. cerevisiae* からシャトルベクター pAUR123 にクローニングした。*Escherichia coli* 及び *S. cerevisiae* に形質転換して、ジオール化合物の生成メカニズムを明らかにした。ここでは、組換え微生物によるシンナムアルデヒドの変換及び得られた目的化合物の構造確認と、変換の効率化を目的とした。

【方法】酵母とその組換え株は前培養を行い、20 ml の GPY 培地に 5% 接種した。24 時間培養後、10 mg のシンナムアルデヒドを加え、48 時間培養を行った。変換物質を当量の酢酸エチルで抽出、濃縮後、TLC 及び HPLC (カラム: Shim-pack FC-ODS) で確認を行った。変換の効率化のため、培地に添加するグルコース量及び、添加方法の検討を行った。大腸菌においても LB 培地で変換培養の検討を行った。

【結果と考察】*PDC1* を発現した酵母によるシンナムアルデヒドの変換では、目的のジオールの蓄積量が 23% 増加し、副産物が 13% 抑制されることを確認できた。培養条件の検討では糖濃度 2% で生育後、10% のグルコースとともに基質を添加し培養を行うことで変換率は向上した。組換え酵母では宿主より 39% 多く目的化合物を生産した。また、目的のジオール体の構造を確認するため旋光度の測定を行う予定である。組換え大腸菌では、ビルビン酸とシンナムアルデヒドの縮合反応後の還元が進行しないため、代謝中間体が蓄積する。中間体への変換効率は基質と共に 2% グルコースを添加することにより大幅に向上した。

1) S. Miyakoshi et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 265-267, (2016).

**Production of an optically active diol compound from cinnamaldehyde by microorganisms expressing pyruvate decarboxylase gene**

○Haruka Oodake, Yusuke Sekiya, Ryota Inoguchi, Yukari Negishi,  
Syunichi Miyakoshi  
(Gunma Natl. Coll. Technol.)

**Key words** cinnamaldehyde, pyruvate decarboxylase, *Saccharomyces cerevisiae*, diol compound

### 3P-2p171 有機溶媒耐性菌を宿主とした SMO-LSADH 共発現システムによる光学活性エポキシド生産

○戸田 弘<sup>1</sup>, 小柳 喬<sup>2</sup>, 榎本 俊樹<sup>2</sup>, 伊藤 伸哉<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>富山県大・生工研セ, <sup>2</sup>石川県大・生資環)  
 htoda@pu-toyama.ac.jp

#### 【目的】

光学活性エポキシドは医薬品中間体や高分子材料として多用される有用化合物である。我々はこれまでに、*Rhodococcus* sp. ST-10 由来スチレンモノオキシゲナーゼ(RhSMO)を利用した環境調和型バイオプロセスによる光学活性エポキシド生産について研究を行ってきた。その過程で、有機溶媒耐性菌 *K. rhizophila* DC2201 を宿主としたときに、優れた生産性を示すことを明らかにしている<sup>1)</sup>。そこで本研究では、*K. rhizophila* DC2201 を SMO 発現宿主として用い、光学活性エポキシド化合物の生産条件を検討した。また新規に開発した大腸菌-Kocuria シャトルベクターを用いて、*Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素(LSADH)を NADH 再生系とするバイオプロセス構築を試みた。

#### 【実験方法・結果】

RhSMO を導入した *K. rhizophila* DC2201 形質転換体を用いて、スチレンオキシド生産試験を行った。各種炭素源を用いて変換試験を行った結果、2%グルコースおよびマルトースを用いた時に良好な生産性を示し、菌体培養から変換時まで一貫してマルトースを炭素源として用いた場合に最も高い生産性を示すことが明らかとなった。

次いで RhSMO-LSADH 共発現菌体の構築および 2-プロパノールを水素供与体としたスチレンオキシド生産プロセスの構築を試みた。*K. palstris* 野生株より単離した内在性プラスミドを用いて新規大腸菌-Kocuria シャトルベクターを構築し、GAPDH プロモーター下流に LSADH を組み込んだ発現カセットを導入した。構築したプラスミドを RhSMO 発現菌体に導入し、RhSMO-LSADH 共発現菌体を構築した。2-プロパノールを用いたスチレン変換試験を行った結果、有意なスチレンオキシド生産を示した。現在これらの菌体を用いたスチレンオキシド生産条件の最適化を検討中である。

H. Toda, T. Ohuchi, R. Imae, N. Itoh, Apple. Environ. Microbiol., 81, 1919-1925 (2015)

#### Bioproduction of enantiopure epoxides by combination of SMO-LSADH expressed in organic solvent-tolerant microorganism

○Hiroshi Toda<sup>1</sup>, Takashi Koyanagi<sup>2</sup>, Toshiki Enomoto<sup>2</sup>, Nobuya Itoh<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., <sup>2</sup>Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ.)

**Key words** styrene, monooxygenase, organic solvent, *Kocuria rhizophila*

### 3P-2p172 単細胞生物用液/液界面バイオリクターによるシトロネロールの変換

○石川 麻子<sup>1</sup>, 小田 忍<sup>2</sup>, 大箸 信一<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>金工大院・工, <sup>2</sup>金工大・ゲノム研, <sup>3</sup>金工大・ゲノム研)  
 odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】カビを用いて医薬品原料や高級香料を効率よく生産できる液/液界面バイオリクターでは菌糸を作らない微生物は強固な複合マット形成が不可能である。本研究では適用微生物を酵母、放線菌、単細胞微生物に拡大させることを目的に、水/有機溶媒界面における新規な界面培養システムの構築を行った。

【方法】液体培地に中空マイクロスフェア (MS) とバインダー材 (CMC、ブチラル樹脂) を混合すると、液面に浮上しながら菌体をトラップできる。MS とバインダー材の配合比と MS/バインダー材複合マット耐久性との関係を調べた。本リアクターを *Pichia kluyveri* NBRC 1165 のアセチル転位反応における citronellyl acetate の微生物変換試験、*Candida viswanathii* NBRC 10321 の酸化における citronellic acid の微生物変換試験に適用し、その有用性を検証した。

【結果】MS/バインダー材複合マット耐久性試験では MS に対しバインダー材を 8.5%以上配合することで崩壊を防いだ。最も MS 層を強固にしたバインダー材はブチラル樹脂であった。*Pichia kluyveri* NBRC 1165 による citronellyl acetate の生産量は、10% citronellol における 3.25 g/L (15 d) であった。*Candida viswanathii* NBRC 10321 による citronellic acid の生産量は 10% citronellol における 14.9 g/L (15 d) であった。

#### Citronellol bioconversion in a novel interface bioreactor with unicellular microorganism

○Asako Ishikawa<sup>1</sup>, Shinobu Oda<sup>2</sup>, Shinichi Ohashi<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., <sup>2</sup>Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., <sup>3</sup>Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

**Key words** bioconversion, bioreactor

### 3P-2p173 Biotransformation of 3'-hydroxydaidzein by *Escherichia coli* expressing *O*-methyltransferase

○Te-sheng Chang, Xin-Yi Huang, Ya-Ting Tsai, Dong-Sheng Wang  
 (Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan)  
 mozyme2001@gmail.com

Two metabolites were produced from biotransformation reaction from 3'-hydroxydaidzein by recombinant *Escherichia coli*, which expressed *O*-methyltransferase (OMT) SpOMT2884 from *Streptomyces peucetius*. The two methoxy-isoflavones metabolites were isolated by using preparative high-pressure liquid chromatography (HPLC). Anti-melanogenesis activity of both methoxy-isoflavones metabolites were determined using cultured B16 melanoma cells. The results showed that one (metabolite 2) of the two methoxy-isoflavones metabolites dose-dependently inhibited melanogenesis under non-toxic conditions. Using NMR and Mass spectral analysis to resolve the chemical structure of the active compound was undertaken in our laboratory. The present study highlights the production and application of methoxy-isoflavones in the cosmetics industry.

#### Biotransformation of 3'-hydroxydaidzein by *Escherichia coli* expressing *O*-methyltransferase

○Te-sheng Chang, Xin-Yi Huang, Ya-Ting Tsai, Dong-Sheng Wang  
 (Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan)

**Key words** Hydroxydaidzein, Methyltransferase, Biotransformation

### 3P-2p174 インドアイ (マメ科) からの固体藍染料の微生物

○常盤 豊<sup>1</sup>, 角 寿子<sup>2</sup>, 世嘉良 宏斗<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>グリーン・プロダクツ・ラボ, <sup>2</sup>北の藍染織工房, <sup>3</sup>沖縄県工技セ)  
 y.tokiwa@grplab.co.jp

【目的】伝統的な藍染めは、*Alkalibacterium* 属や *Amphibacillus* 属などの好アルカリ性微生物の作用で、藍染料のインジゴを還元することにより行われている<sup>1,2)</sup>。我々は、天然の藍染料に由来する微生物と藍染めとの関係に興味を持ち、すでに、リュウキュウアイ (キツネノマゴ科)、タデアイ (タデ科) およびインドアイからの沈澱藍やタデアイからのスクモの微生物について報告した。今回、世界中で広く使われてきたインドアイからの固体状の藍染料の微生物について調べたので報告する。

【方法】インドアイからの固体藍染料は、インドタミル・ナドゥ州産を 2012 年 12 月 21 日、2013 年 4 月 22 日および 2013 年 7 月 11 日に入手して用いた。微生物の分離は、グルコース、酵母エキス、ペプトン等を含む寒天平板培地を用いて、30℃で培養して行った。分離した微生物については、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。

【結果】2012 年入手の固体藍染料の生菌数は、pH10、好気条件の寒天平板において  $1.4 \times 10^9$  CFU g<sup>-1</sup> であり、*Cellulosimicrobium* 属や *Brevibacterium* 属、*Brachybacterium* 属の細菌が分離された。2013 年 4 月入手の固体藍染料の生菌数は、 $1.0 \times 10^8$  CFU g<sup>-1</sup> であり、*Bacillus* 属、*Citricoccus* 属の細菌が分離された。また、2013 年 7 月入手の固体藍染料からは、*Bacillus* 属、*Kocuria* 属、*Citricoccus* 属などの細菌が分離された。さらに、天然の藍染料である沈澱藍やスクモの微生物と固体藍染料の微生物との比較を行い、藍染めへの影響について考察した。

1) 沖縄県工業技術センター研究報告書, 15, 13-21 (2013)

2) 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2F-205, p653 (2016)

#### Microbes in solid indigo dyes made from *Indigofera* sp.

○Yutaka Tokiwa<sup>1</sup>, Hisako Sumi<sup>2</sup>, Hiroto Yokaryo<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Green Products Labo, <sup>2</sup>North-Indigo Textile Arts Studio, <sup>3</sup>Okinawa Ind. Technol. Center)

**Key words** indigo, microbe, alkaliphilic, dye

**3P-2p175 好気発酵による (R)-3-ヒドロキシ酪酸生産**

○世嘉良 宏斗<sup>1</sup>, 花城 隆二<sup>1</sup>, 合田 雅浩<sup>1</sup>, 照屋 盛実<sup>1</sup>, 楽 隆生<sup>2</sup>, 常盤 豊<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>沖縄県工技セ, <sup>2</sup>甲南化工, <sup>3</sup>グリーン・プロダクツ・ラボ)  
 yokryouh@pref.okinawa.lg.jp

**【背景】**(R)-3-ヒドロキシ酪酸 (R3HB) は生分解性樹脂等の原料となるほか、認知機能改善効果等の生理活性機能も注目されている。光学活性化化合物である R3HB の生産方法については微生物を用いた発酵法等による検討が行われてきた。発酵法では R3HB を構成単位とする高分子 (PHB) を細胞内に蓄積する好気性細菌を用いて、好氣的に PHB を蓄積させた後、これを加水分解して R3HB を得る方法がいくつか検討されており、近年では著しく生産性の高い菌株が報告されている。しかし、これらの方法で得られる R3HB は細胞内に蓄積する PHB の量以上に生産量を増やすことは困難である。そこで、R3HB を高効率に生産するため、好気条件下で R3HB を細胞外へ生産する菌株を探索した。  
**【方法】**沖縄県内の様々な試料から分離・収集した約 1,000 株のうち有望な菌株について、好気条件下における R3HB の生産性を評価した。グルコース又はスクロースを含む培養液 3mL に菌株を接種し、3-4 日間好気培養 (30°C, 200rpm) したあと、培養液上清の R3HB と菌体内に蓄積された PHB を定量した。早上型培養装置を用いた発酵試験では、無機塩類と糖類で構成される培養液 2L を用いて培養条件を一定に保ちながら好気培養した (攪拌速度 600rpm, 通気量 5 L min<sup>-1</sup>, pH8.5)。  
**【結果と考察】**分離株のうち PHB 生産菌として知られる *Halomonas* 属細菌を中心に R3HB の生産性を調べた結果、PHB を細胞内に蓄積すると同時に R3HB を培地中に生産する特異的な性質の菌株 (OITC1261 株) を見いだした。この OITC1261 株による 2L スケールの培養試験では、スクロースを基質とする培地で好気培養した結果、89 時間後に 58g L<sup>-1</sup> の R3HB と 27g L<sup>-1</sup> の PHB を生産した。好気条件下で R3HB と PHB を同時に生産する野生株はこれまで報告がなく、R3HB の生産性も高いことから、OITC1261 株を用いることで効率的な R3HB/PHB 生産が期待できる。

**Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by aerobic fermentation**

○Hiroto Yokaryo<sup>1</sup>, Ryuji Hanashiro<sup>1</sup>, Masahiro Goda<sup>1</sup>, Morimi Teruya<sup>1</sup>, Takao Raku<sup>2</sup>, Yutaka Tokiwa<sup>3</sup>  
 (<sup>1</sup>Okinawa Ind. Tech. Cent., <sup>2</sup>Konan Chemical Ind. Co., Ltd., <sup>3</sup>Green Products Lab.)

**Key words** 3-hydroxybutyric acid, aerobic culture, *Halomonas*, fermentation

**3P-2p176 デザインドバイオマス研究：好熱性乳酸菌による混合糖代謝系の解析とエナジーケーンからの高効率乳酸生産**

○沼口 真緒<sup>1</sup>, Tan Jiaming<sup>1</sup>, Abdel-Rahman Mohamed Ali<sup>1,2</sup>, 田代 幸寛<sup>1</sup>, 善藤 威史<sup>1</sup>, 酒井 謙二<sup>1</sup>, 園元 謙二<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>Al-Azhar University, <sup>3</sup>九大・バイオアーキ)  
 sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

**【背景】**本研究室においてエジプトの土壌より単離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* QU 50 (以下 QU 50) は、50°C という高温条件下で増殖し、キシロースを基質としてホモ発酵を行い、高純度 L-乳酸を生産することができる<sup>1)</sup>。木質系バイオマスの糖化に用いる酵素の最適温度は 50°C 付近であることから、QU 50 の同時糖化発酵への応用を見据えた解析を行った。  
**【方法・結果】**グルコース/キシロース混合糖 (GX)、セロビオース/キシロース混合糖 (CX) を用い、50°C で乳酸発酵を行った。その結果、GX において緩やかなカーボンカタボライト抑制 (CCR) が見られるものの、QU 50 はグルコースの資化と同時にキシロースを資化することができた。また、CX においては CCR を回避することができ、GX の場合と比較して 3.6 倍のキシロース比消費速度を示した。一方、CX において GX と比較しキシロース初期代謝酵素の活性は 3.2 倍に増加しており、これがキシロース比消費速度に寄与していることが示唆された。次に、エナジーケーンの加水分解物と同じ組成の混合糖 (グルコース 5 g/L/セロビオース 40 g/L/キシロース 20 g/L) を用いたところ、全ての糖源を同時に資化する乳酸発酵に成功した。さらに、同組成の混合糖を基質とした固定化増殖菌体を用いた繰り返し発酵では、非殺菌・開放発酵条件下でも乳酸生産速度 3.60 g/L/h、対糖収率 100% を維持した、非常に高い操作安定性と高速発酵を達成できた。

1) Mohamed Ali Abdel-Rahman et al, FEMS Microbiology Letters, 362(2), 1-7, 2014

**Designed biomass study: Establishment of highly efficient lactic acid production by using thermophilic lactic acid bacterium.**

○Mao Numaguchi<sup>1</sup>, Jiaming Tan<sup>1</sup>, Mohame Ali Abdel-Rahman<sup>1,2</sup>, Yukihiko Tashiro<sup>1</sup>, Takeshi Zendo<sup>1</sup>, Kenji Sakai<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,3</sup>  
 (<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Al-Azhar University, <sup>3</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ.)

**Key words** lactic acid, mixed sugars, carbon catabolite repression, repeated fermentation

**3P-2p177 *Settatia* 属細菌による BDF 廃液代謝に対する pH の影響**

○内山 佳祐<sup>1</sup>, 川西 琢也<sup>1,2</sup>, 滝口 昇<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>金沢大院・自科, <sup>2</sup>金沢大・理工)  
 tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

**【背景と目的】**化石燃料の代替燃料としてバイオディーゼル燃料 (BDF) が注目されている。BDF の主要な製造法であるアルカリ触媒法においては、グリセロール含有廃液 (BDF 廃液) が副生成物として生成されるが、現状では強アルカリ性の産業廃棄物として廃棄されている。そこで BDF 廃液の利用方法としてバイオプロセスに注目した研究がおこなわれている。我々のこれまでの研究から、*Serratia* 属細菌による BDF 廃液を基質とした回分培養では、pH の変化によって代謝が大きく変化することが分かっている。本研究では、BDF 廃液の処理の効率化を目的として、BDF 廃液代謝に対する pH の影響について評価を行った。  
**【実験方法】**1.5 L ジャーファンターを用いてそれぞれ pH 7.0, 6.3, 5.6 に制御した好気培養を 30 時間行った。微生物の代謝変化を評価するために、菌体濃度および細胞外代謝物、細胞内代謝物を測定し経時変化の比較を行った。細胞外代謝物の濃度は HPLC、細胞内代謝物の蓄積量は LC-MS および GC-MS を用いて測定した。  
**【結果と考察】**pH が弱酸性寄りであるほど菌体収率が高くなることが確認された。細胞外代謝物の測定では全ての実験において酢酸が生成され、pH 5.6 のときのみギ酸が生成されていた。純グリセロールを基質とした回分培養では、pH が弱酸性寄りであるほど菌体収率が下がることが明らかとなっている。このことから、BDF 廃液中のグリセロール以外の物質も微生物の代謝に影響を与えていることが考えられる。細胞内代謝物の測定では、ピーク強度のブレが非常に大きく傾向が読み取れなかったため現在正確な評価に至っていない。サンプルの不純物の除去が不十分であり実験誤差が大きくなったと考えられたため、前処理方法を含めて検討中である。

**Effect of pH on BDF waste metabolism with *Serratia* sp.**

○Keisuke Uchiyama<sup>1</sup>, Takuya Kawanishi<sup>1,2</sup>, Noboru Takiguchi<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup>Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

**Key words** BDF waste, pH, *Serratia* sp.

## 人名索引

- |                            |                    |                        |                              |                      |                    |
|----------------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|
| A                          |                    | Fui Seung Clament Chin | 1S-Cp04                      | Jha Savyasachee      | 3P-1a078           |
| Abdel-Rahman Mohamed Ali   | 3P-2p176           | Fukuma Takeshi         | 3P-1p059                     | Jiao Song            | 1S-Dp03            |
| Aburatani Sachiyo          | 3S-Cp06            | Fukusaki Eiichiro      | 3P-1a089, 3P-1a094, 3P-1p079 | Jusakulvjit Piradee  | 1P-1p128           |
| Adegoke Oluwasesan         | 1P-2p183, 1P-2p184 | G                      |                              | K                    |                    |
| Aki Tsunehiro              | 3P-1a115           | Gao Haoyuan            | 3P-1p074, 3P-1p076           | Kaboli Saeed         | 3P-1a027           |
| Akita Hironaga             | 1S-Cp03            | Gautieri Alfonso       | 2P-2p169                     | Kahar Prihardi       | 3P-2p153           |
| Altaib Hend                | 3P-1p023           | Geng Xiong             | 3P-1p126                     | Kanai Tamotsu        | 1P-1p013           |
| Annisyia Zarina Putri      | 2P-1p066           | Glieder Anton          | 1S-Dp01                      | Kang Dongwon         | 2S-Da06            |
| Apiwatanapiwat Waraporn    | 3P-1a127           | Gomi Katsuya           | 3P-1p003                     | Kato Junichi         | 1P-1p047, 3P-1a016 |
| Arafiles Kim Hazel V.      | 3P-1a093, 3P-1a115 | Grigoriev Igor V.      | 3S-Bp04                      | Kawai Auto           | 1P-1p047           |
| Arai Ryoichi               | 2S-Ca03, 3P-1p059  | Gruber Karl            | 1S-Dp01                      | Kawamoto Haruo       | 2P-1p120           |
| Asano Yasuhisa             | 1S-Dp02, 1S-Dp04   | Guan Yue               | 3P-1a067                     | Ki Mi Ran            | 2S-Ca04            |
| Aslam Mehwish              | 1P-1p013           | Gusain Pooja           | 3P-1p090                     | Kim Daekyung         | 3P-2p140           |
| Atomi Haruyuki             | 1P-1p013           | H                      |                              | Kim Dong Hyun        | 2S-Bp02            |
| Auesukaree Choowong        | 2A-Dp01            | Hamamoto Shin          | 2P-1p017                     | Kim Dong Sup         | 2S-Dp01            |
| B                          |                    | Han Sung Ok            | 2S-Dp04                      | Kim Hyroi            | 2S-Ca02            |
| Balijanova Tsetseg         | 3P-1a001           | Harada Kazuo           | 1P-2p175                     | Kim Hyung Joo        | 2P-1p039, 3P-2a154 |
| Barry Kerrie               | 3S-Bp04            | Harashima Satoshi      | 2A-Dp01                      | Kim Jong Ki          | 2S-Ca04            |
| Beak KeangOK               | 1P-1p028           | Haridas Sajeet         | 3S-Bp04                      | Kim Jungwook         | 2S-Da06            |
| Binti Huddin Noor Safika   | 3P-2p165           | Hassan Mohd Ali        | 1S-Cp02, 1S-Cp04, 1S-Cp05    | Kim Kwang Jin        | 2P-1p039, 3P-2a154 |
| Boonchird Chuenchit        | 2A-Dp01            | Hayakawa Takashi       | 2P-1p066                     | Kim Mee-Hae          | 2P-2p151           |
| C                          |                    | Hecht Michael H.       | 3P-1p059                     | Kim Seung Wook       | 2S-Dp01            |
| Cabrera-Ostertag Ignacio   | 2P-1p093           | Hegazy Adel            | 1P-1p130                     | Kim Soohyun          | 2S-Ca02            |
| Cai Wei                    | 1P-1p131           | Hida Akiko             | 3P-1a016                     | Kim Sung Ho          | 2S-Ca04            |
| Chang Minju                | 2P-1p039, 3P-2a154 | Hirata Kazumasa        | 1P-2p175                     | Kim Youhwan          | 2S-Da04            |
| Chang Te-sheng             | 3P-2p173           | Horiuchi Ayumi         | 1P-1p013                     | Kimura Naoya         | 2S-Ca03            |
| Chao Luomeng               | 3P-1p126           | Hoshi Naomi            | 2P-1p017                     | Kino-oka Masahiro    | 2P-2p151           |
| Chen Jie                   | 1S-Dp03            | Hoshino Kunihide       | 3P-1p090                     | Kishi Hiroyuki       | 2S-Da05            |
| Chen Ziyu                  | 2P-2p151           | Hoshino Tamotsu        | 1S-Cp03                      | Kisuse Juma          | 3S-Dp02            |
| Cho Byung-Kwan             | 3S-Cp02            | Htet April N           | 2P-2p135                     | Kita Akihisa         | 1P-1p047, 3P-1a115 |
| Cho Kichul                 | 3P-2p140           | Hu Xiaohong            | 3P-1p109, 3P-1p110           | Kobayashi Naoya      | 2S-Ca03, 3P-1p059  |
| Choi Cindy                 | 3S-Bp04            | Huang Song-Yan         | 3P-1a039                     | Koide Shohei         | 2S-Ca01            |
| Choi Jeong-Woo             | 2S-Da02            | Huang Weiwei           | 1P-1p131                     | Kojima Takaaki       | 3P-1a058           |
| Choi Yong-Keun             | 2P-1p039, 3P-2a154 | Huang Xin-Yi           | 3P-2p173                     | Kojoma Mareshige     | 3P-1p030           |
| Chung Junho                | 2S-Ca02            | Hwang Minji            | 2S-Da06                      | Kongkrontong Tatphon | 3P-1p064           |
| Cordonier Christopher E.J. | 1P-2p152           | Hyeon Jeong Eun        | 2S-Dp04                      | Kosugi Akihiko       | 2S-Dp03, 3P-1a127  |
| D                          |                    | I                      |                              | Kozaki Toshinori     | 3S-Bp03            |
| Dahl Christiane            | 1P-1p063           | Ikawa Yoshiya          | 2S-Ca06                      | Kruatrachue Maleeya  | 2A-Dp01            |
| Dai Gang                   | 3P-1p126           | Ikeno Shinya           | 3P-2p152                     | Kubota Nodoka        | 2P-1p066           |
| Dawoon Jung                | 3P-2a153           | Inano Kouichi          | 3P-1p059                     | Kuhara Satoru        | 3P-1p122           |
| Dong Zetao                 | 3P-1p109           | Inoue Eiichi           | 3S-Bp03                      | Kuroda Kouichi       | 2S-Dp02            |
| E                          |                    | Ishida Yuko            | 1S-Dp02                      | Kusumah Dewi         | 3P-1a068           |
| Ellen                      | 2P-1p017           | Ishii Kazuo            | 3S-Bp03                      | L                    |                    |
| Eramoto Yuri               | 3P-1a115           | Iwasa Tatsuo           | 3P-1p126                     | Lanfranchi Elisa     | 1S-Dp01            |
| F                          |                    | Iwasaki Yuki           | 1P-1p047                     | Lavina Walter        | 3P-1p079           |
| Farida Rahayu              | 1P-1p047           | J                      |                              | Lee Hyun Ho          | 2S-Ca07            |
| Fathima Artnice Mega       | 3P-1p079           | Jambaldorj Ulziichimeg | 3P-1a001                     | Lee Ju Hun           | 2S-Dp01            |
|                            |                    | Jannatul Ferdouse      | 2P-1p075                     | Lee Keelyong         | 2S-Da04            |
|                            |                    | Jeong Wu-Young         | 2P-1p039, 3P-2a154           | Lee Sang Hyun        | 3P-2a154           |
|                            |                    |                        |                              | Lee Sanghoon         | 2S-Ca02            |
|                            |                    |                        |                              | Lee Serin            | 2S-Da04            |
|                            |                    |                        |                              | Lee Soo Kweon        | 2S-Dp01            |
|                            |                    |                        |                              | Lee Yi-Chieh         | 3P-2p134           |

Lee Yuan-Kun 3S-Dp02  
 Lei Zhongfang 1P-1p131  
 Liao James 3P-1p079, 3P-1a088,  
 3P-1a089  
 Lindquist Erika 3S-Bp04  
 Lipzen Anna 3S-Bp04  
 Liu Chi-Hsien 1P-2p186  
 Liu Ming-Cheh 3P-2a183  
 Liu Na 3P-1p111  
 Liu Yu-Kuo 3P-2p134  
 López-Contreras Ana M. 3P-1a126

## M

Ma Qiansu 3P-1p109  
 Maeda Isamu 3P-1a068  
 Maeda Toshinari 1S-Cp05  
 Masaki Kazuo 3P-1p122  
 Matra Deden Derajat 3S-Bp03  
 Matsumura Yukihiko 3P-1a115  
 Matsuura Hideyuki 1P-2p175  
 Menton John 2P-1p093  
 Metzner Richard 1S-Dp04  
 Minami Eiji 2P-1p120  
 Miyake Hideo 2S-Dp02  
 Miyata Atsushi 3P-1p122  
 Miyazawa Keisuke 3P-1p059  
 Mohd Yusoff Mohd Zulkhairi 1S-Cp03  
 Mohd-Nor Diana 1S-Cp05  
 Mori Kazuki 3P-1p122  
 Mori Tetsushi 2S-Dp02  
 Muraguchi Atsushi 2S-Da05  
 Muranaka Toshiya 3P-1p030  
 Muraoka Misa 1P-2p175

## N

Nagai Satomi 3P-1a058  
 Nakagawa Tomoyuki 2P-1p066  
 Nakamura Yuya 3S-Cp01  
 Nakamura Gouvea Natalia 2P-1p084  
 Nakano Hideo 3P-1a058  
 Nakashima Nobutaka 1S-Cp03,  
 3S-Cp01  
 Nakashimada Yutaka 1P-1p047,  
 3P-1a016, 3P-1a115  
 Nam Sojung 2S-Da04  
 Nanatani Kei 2P-1p017  
 Nath Suman Chandra 2P-2p160  
 Nawarat Nantapong 1P-1p043  
 Negishi Nobuaki 3P-1p115  
 Nemoto Naoto 2S-Ca05  
 Ngan Chew Yee 3S-Bp04  
 Nguyen Dung Van 2P-1p120  
 Nguyen Kho My 2S-Ca04  
 Nguyen Trinh TM 2P-1p049  
 Niamatullah Sidiq 2P-1p115  
 Noguchi Takuya 3P-1p077  
 Nomura Izumi 3P-1p023  
 Novitasari Dian 3P-1p062

## O

Oda Tatsuya 3P-2p140  
 Ogasawara Wataru 3P-1p122  
 Ohtake Toshiyuki 3P-1a089  
 Ojima-Kato Teruyo 3P-1a058  
 Okamura Yoshiko 3P-1a115  
 Ondiba Hesborn Andole 1P-1p131  
 Ozawa Tatsuhiko 2S-Da05

## P

Pack Seung Pil 2S-Ca04  
 Palaniveloo Kishneth 1S-Cp06  
 Park Enoch Y. 1P-2p184  
 Park Hyun Gyu 2S-Da07  
 Park Sungjo 1P-1p030  
 Pathak Nishit 3P-2p152  
 Pavkov-Keller Thea 1S-Dp01  
 Perez Rodney Honrada 3P-2a161  
 Pham Van 2S-Ca04  
 Pham Khanh Dung 3P-1p122  
 Phan Huong Thi Thanh 1P-1p028  
 Phan Nguyen Thuy An 3P-1a094  
 Pokethitiyook Prayad 2A-Dp01  
 Pukkila Patricia J. 3S-Bp04

## Q

Qi Zhu 3P-1p110  
 Qian Pei-Yuan 3S-Cp03

## R

Rabemanolontsoa Harifara 1P-1p128,  
 2P-1p120  
 Ramli Norhayati 1S-Cp05  
 Ravindra Pal Singh 3P-1a086  
 Reuss Daniel 3P-1a014  
 Rimbach Gerald 2P-1p094  
 Ritthisan Panwad 3P-1a058

## S

Sahoo Soubhagya Laxmi 1P-2p186  
 Saka Shiro 1P-1p128, 2P-1p120  
 Sakai Kenji 1S-Cp04, 1S-Cp05,  
 1S-Cp06, 3P-1p077  
 Sastia Prama Putri 3P-1a088, 3P-1a090,  
 3P-1p079  
 Sastia Putri 3P-1a089  
 Sato Takaaki 3P-1p059  
 Savangsuksa Aulaphan 1P-1p029  
 Seelan Jaya 1S-Cp06  
 Seki Hikaru 3P-1p030  
 Seng Tin-Hoe 1S-Cp06  
 Sethapokin Pinthep 2P-1p120  
 Sharma Neha 1P-1p028  
 Sharuddin Siti Suhailah 1S-Cp05  
 Shen Zhongyao 1S-Dp03  
 Shibata Toshiyuki 2S-Dp02  
 Shida Yosuke 3P-1p122  
 Shim Sok-young 2P-1p039, 3P-2a154

Shimokawa Naofumi 1P-1p028,  
 3P-1p090  
 Shin Kwangin 2S-Da06  
 Shin Kwanwoo 2S-Da04  
 Shintani Takahiro 3P-1p003  
 Shirai Yoshihito 1S-Cp01, 1S-Cp02,  
 1S-Cp05  
 Song Hak Jin 2P-1p039, 3P-2a154  
 Sonomoto Kenji 3P-1p077  
 Stanislaus Mishma Silvia 3P-1p073,  
 3P-1p074, 3P-1p076,  
 3P-1p110, 3P-1p115  
 Su Yi-Hsin 2P-1p017  
 Sun Hongyi 2P-1p096  
 Suyotha Wasana 1P-1p014  
 Suzuki Hideyuki 3P-1p030  
 Suzuki Mutsuaki 3S-Cp04  
 Suzuki Tohru 3P-1p023

## T

Tajima Takahisa 1P-1p047, 3P-1a016,  
 3P-1a115  
 Takagi Masahiro 1P-1p028, 3P-1p090  
 Takagi Toshiyuki 2S-Dp02  
 Takahashi Mami 2S-Dp02  
 Takaku Hiroaki 3P-1p122  
 Takamura Yuzuru 2S-Da03  
 Takeyama Haruko 2S-Dp02  
 Tama Jeremy 2P-1p026  
 Tamiya Eiichi 2S-Da01  
 Tamura Keita 3P-1p030  
 Tan Jiaming 3P-2p176  
 Tanaka Mizuki 3P-1p003  
 Tanaka Reiji 2S-Dp02  
 Tansengco Myra 3P-1a078  
 Tashiro Kosuke 3P-1p122  
 Tashiro Yukihiko 1S-Cp04, 1S-Cp06,  
 3P-1p077  
 Terzic Andre 1P-1p030  
 Theeragool Gunjana 1P-1p042  
 Theo Shao Thing 3P-1a090  
 Tran Duyen 1P-2p175  
 Tritt Andrew 3S-Bp04  
 Tsai Ya-Ting 3P-2p173  
 Tsao Min-Han 1P-2p186  
 Tsuda Masashi 2S-Ep02  
 Tsujino Yoshio 3P-1p090  
 Tunchai Mattana 3P-1a016

## U

Ueda Mitsuyoshi 2S-Dp02  
 Ujiie Kazuki 1P-2p175  
 Ulanova Dana 2S-Ep02  
 Uozumi Nobuyuki 2P-1p017

## V

Vairappan Charles 1S-Cp06  
 Vaithanomsat Pilanee 3P-1a127  
 Vangnai Alisa S. 1P-1p058



|        |  |        |                              |               |                    |
|--------|--|--------|------------------------------|---------------|--------------------|
| 池田 奈央  | 3P-2a171   | 井出 輝彦  | 2P-2p148                     | イルファ ハヌン ハルリサ | 3P-2a163           |
| 池野 慎也  | 2P-2p141   | 伊藤 秋実  | 2P-1p104, 2P-1p105           | 岩井 和也         | 2P-1p090           |
| 池本 啓史  | 2P-1p063, 3P-2a132   | 井藤 彰   | 1P-2p157, 1P-2p158, 2P-2p179 | 岩井 謙一         | 2P-1p081           |
| 池谷 謙太  | 3P-1p100   | 伊藤 圭祐  | 1S-Bp03                      | 岩井 伯隆         | 3P-1a012           |
| 伊佐 猛   | 3P-1p022   | 伊東 謙吾  | 3P-1p127, 3P-1p128, 3P-1p129 | 岩井 宏徒         | 2S-Bp03            |
| 伊佐木 芳  | 3P-1p085   | 伊藤 考太郎 | 2A-Ap01, 3P-1p083, 3P-1p088  | 岩井 良輔         | 1P-2p149           |
| 伊崎 文晃  | 3P-2p162   | 伊東 昇紀  | 3P-1p036                     | 岩上 千華         | 3P-2a171           |
| 井沢 真吾  | 2P-1p048, 2P-1p049   | 伊藤 大知  | 1P-2p137                     | 岩城 隼          | 2P-2p187           |
| 石井 一夫  | 3P-1p092, 3S-Bp01, 3S-Bp02, 3S-Bp04, 3S-Bp05, 3S-Bp06, 3S-Bp07 | 伊藤 俊彦  | 2P-1p072                     | 岩木 宏明         | 3P-1a011           |
| 石井 純   | 2P-1p068, 2P-1p089   | 井藤 俊行  | 2P-1p038, 2P-1p124           | 岩切 亮          | 3P-1p082           |
| 石井 大輔  | 2P-1p129   | 伊藤 伸哉  | 3P-1p024, 3P-2a171, 3P-2p171 | 岩國 美由季        | 3P-2a149           |
| 石井 寛子  | 1P-1p061   | 伊藤 春佳  | 3P-1p024                     | 岩倉 遼          | 3P-1a070           |
| 石井 正治  | 1P-1p059, 1P-1p063   | 伊東 広哉  | 3P-1p006                     | 岩越 亮汰         | 3P-1a035           |
| 石井 友理  | 1P-1p050, 3P-1p080   | 伊東 昌章  | 3P-1p042                     | 岩崎 将士         | 2P-2p184           |
| 石神 夏実  | 3P-1a019   | 伊東 雅人  | 2P-1p014, 2P-1p015           | 岩崎 雄吾         | 2P-1p011           |
| 石川 輝   | 2P-1p103   | 伊藤 茉莉絵 | 3P-1a084                     | 岩下 和裕         | 2P-1p074, 3P-1p004 |
| 石川 麻子  | 3P-2p172   | 伊藤 みさご | 1P-1p103, 1P-1p104           | 岩下 小太郎        | 2P-1p079           |
| 石川 一彦  | 1P-1p026   | 伊藤 通浩  | 1P-2p176                     | 岩瀬 雄大         | 3S-Bp01            |
| 石川 周   | 3P-1a014, 3P-1a023   | 伊藤 康広  | 1P-1p008                     | 岩田 賢人         | 3S-Bp05            |
| 石川 秀   | 3P-1a102   | 伊藤 義訓  | 3S-Ap05                      | 岩田 菖子         | 3P-1a073           |
| 石川 孝博  | 3P-1p119   | 糸見 明穂  | 3P-2p153                     | 岩田 晋明         | 3P-2a157           |
| 石川 格靖  | 3P-2a139   | 稲垣 瑞穂  | 3P-1p087                     | 岩田 忠久         | 2P-1p129           |
| 石川 聖人  | 2P-1p019, 3P-1a017, 3P-2a155                                   | 稲葉 知大  | 1P-1p113                     | 岩田 悠志         | 2P-1p045           |
| 石川 森夫  | 1P-1p049, 3P-1p080   | 稲橋 正明  | 3S-Ap02                      | 岩田 吏世         | 3P-2p155           |
| 石倉 幹大  | 1P-1p037   | 乾 博    | 3P-1p119                     | 岩瀨 和則         | 3S-Bp06            |
| 石崎 真章  | 1P-1p030   | 乾 将行   | 1P-1p045, 3P-1a009, 3P-2p168 | 岩間 千草         | 1P-2p155           |
| 石澤 秀紘  | 3P-1p107   | 犬飼 忠彦  | 3P-1a059                     | 岩水 岳教         | 2P-2p141           |
| 石田 尚之  | 3P-1p067, 3P-2a158   | 犬塚 友麻  | 3P-2a146                     | 岩谷 和輝         | 1P-1p096           |
| 石田 秀樹  | 2P-2p187   | 伊野 浩介  | 2P-2p180                     |               |                    |
| 石田 奨   | 3P-1a116, 3P-2p160   | 井上 大介  | 1P-1p111                     |               |                    |
| 石田 陽子  | 2P-1p049   | 井上 達也  | 1P-1p059                     |               |                    |
| 石戸 聡   | 3P-1p086   | 井上 千弘  | 1P-1p107, 2P-1p125           |               |                    |
| 石野 良純  | 2S-Ea03  | 井上 宏之  | 1P-1p026                     |               |                    |
| 石橋 直樹  | 3P-2a161   | 井上 真紀  | 3S-Bp05                      |               |                    |
| 石原 達己  | 3P-1p124   | 井上 瑞葉  | 1P-1p001                     |               |                    |
| 井嶋 博之  | 1P-2p139   | 井上 悠希  | 3P-2a160                     |               |                    |
| 石渡 晟   | 1P-2p135   | 井上 優里  | 3P-1a121                     |               |                    |
| 泉田 森   | 1P-2p150   | 井上 能博  | 3P-1p086                     |               |                    |
| 泉 厚志   | 2P-1p009   | 井野口 諒太 | 3P-2p170                     |               |                    |
| 和泉 自泰  | 3P-1a097   | 猪熊 健太郎 | 2P-1p051, 2P-1p052, 3P-1p120 |               |                    |
| 何森 健   | 2P-1p013   | 猪瀬 陽加  | 3P-2p132                     |               |                    |
| 伊勢 孝太郎 | 1P-1p082   | 井原 弘絵  | 1P-2p180                     |               |                    |
| 磯崎 勇志  | 3P-1a063   | 今井 健太郎 | 1P-1p049                     |               |                    |
| 磯部 正治  | 3P-1a056, 3P-1a060, 3P-1a061                                   | 今井 伸二郎 | 2P-1p083                     |               |                    |
| 磯山 純子  | 2P-2p185, 2P-2p186   | 今井 博之  | 3P-1p033                     |               |                    |
| 伊田 賢吾  | 2P-1p068   | 今尾 健太  | 3P-2p141                     |               |                    |
| 伊田 進太郎 | 3P-1p124   | 今岡 大士  | 3P-1p047                     |               |                    |
| 板田 鉄平  | 3P-2p139   | 今田 隆介  | 2P-2p179                     |               |                    |
| 板谷 光泰  | 2S-Ea04  | 今高 寛晃  | 3S-Ep01                      |               |                    |
| 市川 夏子  | 3P-1p093   | 今中 忠行  | 3P-1p019                     |               |                    |
| 一小路 貴士 | 1P-1p002   | 今中 洋行  | 3P-1p067, 3P-2a158           |               |                    |
| 一瀬 桜子  | 3P-1p008   | 今村 維克  | 3P-1p067, 3P-2a158           |               |                    |
| 一瀬 博文  | 1P-1p023, 3P-1p017   | 井村 誠   | 3P-1p082                     |               |                    |
| 市原 佐保子 | 1S-Bp01  | 伊豫田 智典 | 2P-2p159                     |               |                    |
| 市原 拓巳  | 2P-1p018, 2P-1p029   | 入江 崇   | 3P-1p068                     |               |                    |

う

|        |                             |
|--------|-----------------------------|
| 上杉 大智  | 2P-1p090                    |
| 上田 一義  | 3P-1p089                    |
| 上田 賢一  | 1P-1p116                    |
| 上田 紗季子 | 2P-1p064                    |
| 上田 泰己  | 3S-Ep03                     |
| 上田 宏   | 1P-2p185, 2P-1p035, 2S-Bp03 |
| 上田 光宏  | 3P-1p119                    |
| 植田 充美  | 1P-2p167, 3P-1a040          |
| 上田 由佳  | 3P-1a075                    |
| 植月 英智  | 2P-1p028                    |
| 上野 明   | 2P-2p158                    |
| 上野 省一  | 3P-1p034                    |
| 植野 真伍  | 2P-2p161                    |
| 上野 泰   | 1P-2p171                    |
| 植野 陽平  | 1P-1p032                    |
| 上野 嘉之  | 3P-1a102                    |
| 上原 健二  | 2P-1p076, 3P-2p146          |
| 植松 君夫  | 1P-1p045                    |
| 卯川 裕一  | 2P-2p167                    |
| 鷯川 眞也  | 1P-1p098                    |
| 釜場 将太  | 3P-1p017                    |
| 宇治家 武史 | 2S-Ea06                     |
| 氏原 哲朗  | 2S-Ep03, 3P-2a137, 3P-2a138 |
| 鷯瀬 和秀  | 3P-1a079                    |
| 宇田 成利  | 3P-1p040                    |
| 内田 菜月  | 2P-1p103                    |
| 内田 博之  | 3P-1a035, 3P-1p035          |
| 内堀 孝博  | 3P-1p101                    |



|            |                               |        |                              |            |                              |
|------------|-------------------------------|--------|------------------------------|------------|------------------------------|
| 小倉 尚志      | 3P-1p040                      | 鹿島 諒人  | 2P-1p016                     |            | 2P-2p174, 3P-1p096,          |
| 小栗 秀俊      | 1P-1p108                      | 檉村 佳奈  | 3P-1p056                     |            | 3P-2p164, 3P-2p165           |
| 小黒 芳史      | 1P-1p089                      | 梶山 慎一郎 | 1P-1p130, 3P-1a098,          | 金岡 英徳      | 1P-2p165, 1P-2p166           |
| 生越 大輔      | 2P-1p015                      |        | 3P-1a099, 3P-1p085           | 金桶 光起      | 2P-1p082                     |
| 尾崎 愛子      | 3P-1a030                      | 柏 雅美   | 2P-1p063, 3P-2a132           | 金子 亜紀江     | 1P-1p069                     |
| 小山内 崇      | 2P-1p064, 3P-1a081,           | 柏木 紀賢  | 2P-2p142, 3P-2p143           | 金子 陽徳      | 3P-2a165                     |
|            | 3P-1p036, 3P-1p049, 3P-1p121  | 数岡 孝幸  | 1P-1p074                     | 金子 恒太郎     | 3P-1p041                     |
| 小澤 智紀      | 3P-1p025                      | 春見 隆文  | 2P-1p045, 3P-2a140,          | 金子 真大      | 3P-2a155                     |
| 小澤 幸央      | 1P-1p096                      |        | 3P-2a141                     | 金子 美華      | 2P-1p036                     |
| 押川 清孝      | 3P-1a097                      | 片岡 健   | 1P-2p151                     | 金子 嘉信      | 3P-1a029, 3P-1p002           |
| 押木 守       | 3P-1p108                      | 片岡 尚也  | 1P-1p042, 1P-1p043,          | 兼崎 友       | 1P-1p049, 1P-1p077,          |
| 尾島 由紘      | 2P-1p123, 3P-1a110,           |        | 1P-1p044, 1P-1p058           |            | 3P-1p080, 3P-1p087           |
|            | 3P-1p097, 3P-2p149            | 片岡 道彦  | 3P-2a177                     | 兼崎 祐介      | 2S-Ea05                      |
| 尾関 健二      | 2P-1p069, 2P-1p090            | 片倉 啓雄  | 1P-1p101, 2P-1p098           | 金下 裕平      | 3P-1p091                     |
| 織田 健       | 2P-1p074, 3P-1p004            | 片平 正人  | 3P-1p089                     | 加納 周作      | 2P-1p001                     |
| 小田 康祐      | 3P-1p068                      | 片山 義博  | 2P-1p058, 2P-2p135,          | 梶田 聖孝      | 2P-1p079                     |
| 小田 沙織      | 3P-1a033                      |        | 2P-2p139                     | 加畑 眞人      | 1P-2p171                     |
| 小田 忍       | 2P-1p054, 3P-2p150, 3P-2p172  | 勝亦 雄太  | 3P-2p157                     | 蕪 卓弥       | 1P-1p078                     |
| 小田切 正人     | 3P-1a026                      | 加藤 明宏  | 3P-1a079                     | 加部 泰三      | 2P-1p129                     |
| 小田巻 俊孝     | 1S-Bp05                       | 加藤 謙斗  | 3P-1p002                     | 釜我 圭       | 3P-2p143                     |
| 越智 大起      | 2P-1p079                      | 加藤 晃   | 2P-1p040                     | 鎌形 洋一      | 1P-1p105, 1P-1p114,          |
| 落合 秋人      | 2P-1p027, 3P-2a164,           | 加藤 沙枝  | 2P-1p048                     |            | 1P-1p115                     |
|            | 3P-2a165, 3P-2a166, 3P-2a167, | 加藤 彩織  | 1P-1p050                     | 鎌田 健一      | 2P-1p026                     |
|            | 3P-2a168, 3P-2a169, 3P-2a170  | 加藤 純一  | 2P-1p056, 2P-1p057,          | 蒲池 沙織      | 1P-1p026, 1P-1p115           |
| 落合 芋葉子     | 3P-1a120                      |        | 2P-1p100, 3P-1a114,          | 上條 知昭      | 3P-1a004, 3P-1a005           |
| 落合 佑香      | 2P-1p080                      |        | 3P-1a130, 3P-1a131           | 上平 正道      | 1P-2p155, 1P-2p156,          |
| 鬼塚 正義      | 1P-2p144, 1P-2p159,           | 加藤 創一郎 | 1P-1p105, 3P-1a017,          |            | 1P-2p157, 1P-2p158,          |
|            | 1P-2p160, 1P-2p162,           |        | 3P-2a155                     |            | 1S-Ep03, 2P-2p179            |
|            | 1P-2p163, 2P-1p030            | 加藤 太一郎 | 1P-1p057, 2P-1p108,          | 上村 一雄      | 2P-1p012, 3P-1a071           |
| 小野 拓人      | 1P-2p173                      |        | 3P-2a132                     | 上村 直史      | 3P-1a119                     |
| 小野 智博      | 1P-1p001                      | 加藤 竜也  | 1P-1p005, 1P-1p030,          | 神谷 典穂      | 1P-2p138                     |
| 小野 浩       | 1P-1p096                      |        | 2P-1p016, 3P-1a064, 3P-1p060 | 神吉 菜摘      | 3P-1a057                     |
| 小野寺 武      | 1P-2p185                      | 加藤 晃代  | 2P-1p024, 2P-1p031,          | 亀田 光裕      | 3P-2a169                     |
| 小野寺 瑠依     | 2P-1p109                      |        | 2P-1p034                     | 狩山 美沙紀     | 2P-1p104, 2P-1p105           |
| 尾花 望       | 1P-1p113                      | 加藤 紀彦  | 1P-1p099                     | 河合 功治      | 3P-1p041                     |
| 小原 優季      | 2P-2p143                      | 加藤 範久  | 3S-Dp03                      | 河井 重幸      | 3P-1p072                     |
| 小俣 達男      | 3P-1a079                      | 加藤 雅士  | 1P-1p027, 3P-1p010,          | 河合 駿       | 3P-1p096, 3P-2a157, 3P-2p165 |
| 尾山 廣       | 3P-1p042                      |        | 3P-1p054, 3P-1p055, 3P-1p081 | 川合 知二      | 3P-2a163                     |
| 折田 和泉      | 2P-1p128, 2P-1p130,           | 加藤 昌彦  | 3P-1a050                     | 河合 (野間) 繁子 | 1P-1p025,                    |
|            | 2P-1p131, 3P-1p019            | 加藤 三恵子 | 2P-1p037                     |            | 3P-1a021, 3P-2p151           |
| オリベイラ サヌエ  | 1P-1p117                      | 加藤 康夫  | 2S-Ba03, 3P-1a072            | 河上 佳奈      | 3P-1p024                     |
| 恩田 浩幸      | 1P-1p092                      | 加藤 泰彦  | 2P-1p020, 3P-2a180           | 川上 賀代子     | 2P-1p099                     |
|            |                               | 加藤 悠一  | 3P-1p117                     | 川上 晃司      | 2P-1p099                     |
|            |                               | 加藤 勇太  | 3P-1a116, 3P-2p160           | 河上 春樹      | 2P-1p090                     |
|            |                               | 加藤 幸成  | 2P-1p036                     | 河岸 洋和      | 3P-1a124, 3P-1a125,          |
|            |                               | 加藤 竜司  | 1S-Bp03, 2P-2p170,           |            | 3P-1p029                     |
|            |                               |        | 2P-2p174, 3P-1p096,          | 川口 剛司      | 1P-1p004, 1P-1p017,          |
|            |                               |        | 3P-2a157, 3P-2p164, 3P-2p165 |            | 3P-1p011, 3P-1p012, 3P-1p050 |
| 貝沼 (岡本) 章子 | 1P-1p049, 3P-1p080            | 門倉 利守  | 1P-1p051, 1P-1p074,          | 川口 秀夫      | 2P-2p140                     |
| 加川 健一      | 2P-2p172                      |        | 1P-1p077, 1P-1p078, 1P-1p079 | 川口 祐加      | 2P-1p028                     |
| 香川 元気      | 1P-2p138                      | 門脇 真史  | 2P-1p075, 3P-2a172           | 川崎 了       | 1P-1p108                     |
| 香川 悠馬      | 1P-2p162                      | 金井 宗良  | 1P-1p095                     | 川崎 俊輔      | 2P-2p181                     |
| 角谷 茜       | 3P-1p033                      | 金井 里紗  | 1P-1p074                     | 川崎 健       | 3P-1a007                     |
| 景山 達斗      | 1P-2p151                      | 金尾 忠芳  | 2P-1p012, 3P-1a071           | 川崎 寿       | 3P-1a008                     |
| 加古 博子      | 3P-1a124                      | 金木 達朗  | 1P-2p140                     | 川崎 浩子      | 3P-1a002, 3P-1a004,          |
| 笠井 拓哉      | 1P-1p065                      | 金田 祥宜  | 1P-1p105                     |            | 3P-1a005                     |
| 笠井 尚哉      | 1P-1p085, 1P-1p097            | 金森 敏幸  | 2P-2p170                     | 川嶋 草平      | 1P-1p051                     |
| 加地 由季子     | 3P-1p106                      | 金山 直樹  | 2P-1p028                     | 川瀬 貴斗      | 2P-1p087                     |
| 梶川 瑞穂      | 3P-1p086                      | 蟹江 慧   | 1S-Bp03, 2P-2p170,           | 川瀬 三雄      | 3P-1a059                     |
| 梶田 真也      | 2P-1p058, 2P-2p135,           |        |                              |            |                              |
|            | 2P-2p139                      |        |                              |            |                              |
| 柏原 貴幸      | 3P-1p072                      |        |                              |            |                              |
| 鹿島 大揮      | 3P-1a045                      |        |                              |            |                              |

## か



|            |                           |        |                               |  |  |        |                     |
|------------|---------------------------|--------|-------------------------------|--|--|--------|---------------------|
| 小池 英明      | 2P-1p042, 3P-1a006        | 小林 直也  | 2P-1p025                      |  |  |        | 3P-1p081, 3S-Bp04   |
| 小泉 淳一      | 2P-1p084, 3P-1a107        | 小林 秀峰  | 2P-2p149                      |  |  | 酒井 謙二  | 3P-1a104, 3P-1a105, |
| 小坂橋 基夫     | 3P-1a006                  | 小林 大起  | 3P-1p066                      |  |  |        | 3P-2p176            |
| 小出 静代      | 1P-2p163                  | 小林 美穂  | 1P-1p087                      |  |  | 坂井 沙織  | 3P-1a008            |
| 小出 (吉田) 静代 | 2P-1p018                  | 小林 優香  | 1P-2p152                      |  |  | 境 慎司   | 2S-Cp04             |
| 高 未麗       | 2P-1p106                  | 小林 夕香  | 1P-2p171                      |  |  | 坂井 華美  | 1P-2p180            |
| 河口 礼佳      | 3P-1a019                  | 小林 洋介  | 1P-1p114, 1P-1p115            |  |  | 阪井 康能  | 3P-1a033            |
| 高坂 哲也      | 1P-1p030                  | 駒 大輔   | 2P-1p123                      |  |  | 坂上 吉一  | 2P-1p104, 2P-1p105  |
| 晃佑 垣田      | 2P-1p118                  | 小牧 久幸  | 3P-2a151                      |  |  | 榊原 昇一  | 2P-2p150            |
| 合田 雅浩      | 3P-2p175                  | 小松 圭   | 2P-1p030                      |  |  | 榊原 陽一  | 3P-2a183            |
| 合田 亮       | 1P-1p103, 1P-1p104        | 小松 将大  | 1P-2p157                      |  |  | 坂口 剛正  | 3P-1p068            |
| 高妻 篤史      | 1P-1p065                  | 小松 眞也  | 1P-2p157                      |  |  | 坂口 利文  | 2P-1p103            |
| 河野 愛子      | 3P-1p084                  | 小松 大祐  | 2P-1p112                      |  |  | 坂口 正明  | 1A-Aa01             |
| 河野 晋       | 3P-1a095                  | 五味 勝也  | 1P-1p006, 3P-1p007,           |  |  | 酒瀬川 信一 | 2P-1p003            |
| 河野 弘美      | 1P-1p083                  |        | 3P-1p008, 3P-1p009,           |  |  | 坂田 研二  | 3P-1a087            |
| 鴻池 史憲      | 2P-2p146                  |        | 3P-1p013, 3P-1p014, 3P-1p015  |  |  | 酒谷 真以  | 1P-1p081, 2P-1p077, |
| 高屋 朋彰      | 2P-1p086                  | 米田 英伸  | 2P-1p009                      |  |  |        | 3P-2a172            |
| 古賀 雄一      | 1P-1p031, 1P-2p159,       | 小森 誠也  | 3P-1p010                      |  |  | 阪中 幹祥  | 3P-1a019            |
|            | 1P-2p160, 1P-2p162,       | 小柳 喬   | 1P-1p076, 3P-2p171            |  |  | 坂本 沙祐里 | 1P-1p036            |
|            | 1P-2p163, 3P-1p039        | 小山 純弘  | 2P-2p174                      |  |  | 坂本 茂   | 3P-1a097            |
| 小川 雅人      | 1P-2p176, 1P-2p177        | 小山 正浩  | 2P-1p095                      |  |  | 坂元 仁   | 3P-2p155, 3P-2p156  |
| 小暮 高久      | 3P-2p168                  | 小山 泰二  | 3P-1p083                      |  |  | 阪本 龍司  | 3P-1p119            |
| 小暮 敏博      | 2P-1p126                  | 權平 文夫  | 3P-1a055, 3P-1a057,           |  |  | 坂本 裕希  | 1P-2p139            |
| 古在 豊樹      | 1S-Ap01                   |        | 3P-1a059                      |  |  | 阪本 真由子 | 1P-1p081, 2P-1p077  |
| 小坂 恵       | 2P-1p012                  | 近藤 昭彦  | 1P-1p034, 1P-1p041,           |  |  | 阪本 泰光  | 1P-1p008            |
| 小境 敏揮      | 2P-1p081                  |        | 1P-2p136, 2P-1p051,           |  |  | 佐川 岳人  | 1P-1p092            |
| 小酒井 智也     | 3P-1a020                  |        | 2P-1p052, 2P-1p055, 2P-1p059, |  |  | 佐久間 哲史 | 1P-2p157, 1S-Ep01,  |
| 小崎 一功      | 3P-2a156                  |        | 2P-1p068, 2P-1p085, 2P-1p089, |  |  |        | 3P-1p005            |
| 古崎 利紀      | 3S-Bp02, 3S-Bp04,         |        | 2P-1p127, 2P-2p140, 2P-2p142, |  |  | 櫻井 明彦  | 2P-1p088, 3P-2p142, |
|            | 3S-Bp05, 3S-Bp06, 3S-Bp07 |        | 3P-1a030, 3P-1a076, 3P-1a077, |  |  |        | 3P-2p158, 3P-2p159  |
| 小里 孟       | 2P-1p074                  |        | 3P-1p084, 3P-1p117, 3P-1p120, |  |  | 櫻井 紫乃  | 3P-1a109            |
| 小塩 茂々子     | 3P-1p053                  |        | 3P-1p121, 3P-2p138, 3P-2p141, |  |  | 櫻井 琢磨  | 3P-1a113            |
| 兒島 孝明      | 1S-Bp02, 2P-1p031,        |        | 3P-2p143, 3P-2p145, 3P-2p153  |  |  | 櫻井 健志  | 3S-Ep02             |
|            | 2P-1p034                  | 近藤 旺次郎 | 3P-1p029                      |  |  | 櫻井 美季  | 3P-1p021            |
| 小島 康弘      | 1P-1p005                  | 近藤 敬子  | 3P-1p089                      |  |  | 提坂 裕子  | 2P-2p167            |
| 小嶋 涼       | 3P-2a140, 3P-2a141        | 近藤 聡   | 1P-1p118                      |  |  | 佐古田 久雄 | 1P-1p050, 3P-1p080  |
| 五島 徹也      | 2P-1p119                  | 近藤 拓也  | 3P-2a134                      |  |  | 迫野 昌文  | 1P-1p038, 2P-1p021, |
| 小杉 昭彦      | 3P-1a123                  | 近藤 伸彦  | 2P-2p162                      |  |  |        | 2S-Bp05, 3P-2p137   |
| 古関 明彦      | 2P-2p159                  | 近藤 雅子  | 1P-2p156, 1P-2p158            |  |  | 笹川 真稚  | 3P-1p093            |
| 小園 祥子      | 3P-1p071                  | 今野 博行  | 1P-1p012                      |  |  | 佐々木 建吾 | 2P-1p085, 2P-1p127, |
| 小高 敦史      | 1P-1p071                  | 今野 友維  | 3P-1p014                      |  |  |        | 3P-1p120            |
| 小谷 真也      | 3P-2a151                  | 紺屋 豊   | 1P-2p169, 1P-2p170, 3P-1a096  |  |  | 佐々木 大樹 | 1P-1p049            |
| 児玉 知大      | 1P-1p042                  |        |                               |  |  | 佐々木 大介 | 2P-1p085, 2P-1p127  |
| 児玉 浩明      | 2P-1p038, 2P-1p124,       |        |                               |  |  | 佐々木 寛人 | 2P-2p170, 3P-1p096  |
|            | 3P-1a073                  |        |                               |  |  | 笹倉 直也  | 3P-1a076            |
| 後藤 成暁      | 2P-2p144                  | 雜賀 あずさ | 2P-1p042, 3P-1a006            |  |  | 佐々倉 有麻 | 3P-1p075            |
| 後藤 正利      | 3P-1a118                  | 西條 雄介  | 2S-Ap02                       |  |  | 笹野 佑   | 3P-1a027, 3P-1p002  |
| 後藤 雅宏      | 1P-2p138                  | 齋藤 勝一  | 1P-1p088, 1P-1p090            |  |  | 佐々野 僚一 | 1P-1p092            |
| 後藤 友規      | 2P-2p168                  | 斎藤 恭一  | 1P-1p025, 3P-1a021,           |  |  | 粟冠 和郎  | 1P-1p019, 1P-1p129  |
| 小西 佳菜子     | 3P-1p039                  |        | 3P-2p151                      |  |  | 粟冠 真紀子 | 1P-1p019, 1P-1p129  |
| 小西 智之      | 3P-1a008                  | 齊藤 健吾  | 3P-2a164                      |  |  | 佐藤 敦史  | 3P-1p083, 3P-1p088  |
| 小西 正朗      | 3P-1a031, 3P-1a116,       | 齊藤 高弘  | 3S-Bp06                       |  |  | 佐藤 綾香  | 2P-2p163            |
|            | 3P-2p160                  | 齊藤 博英  | 2P-2p181, 3P-2a184            |  |  | 佐藤 綾子  | 3P-1p087            |
| 小橋 興次      | 2P-1p104, 2P-1p105        | 齊藤 正輝  | 3P-1a010                      |  |  | 佐藤 伊純  | 2P-1p040            |
| 小林 淳       | 3P-1p039                  | 齊藤 雅典  | 1P-1p106                      |  |  | 佐藤 香枝  | 1P-2p150            |
| 小林 和輝      | 2P-2p138                  | 齊藤 康将  | 3S-Bp05                       |  |  | 佐藤 圭悟  | 2P-2p185            |
| 小林 和也      | 1P-1p089, 1P-1p094        | 齊藤 亮太  | 3P-1p004                      |  |  | 佐藤 舜   | 2P-1p102            |
| 小林 慶一      | 3P-1a075, 3P-1p057        | 佐伯 和哉  | 3P-1a021, 3P-2p151            |  |  | 佐藤 大貴  | 3P-2p146            |
| 小林 拓嗣      | 2P-2p134, 3S-Bp02         | 酒井 垂希  | 3P-1p078                      |  |  | 佐藤 喬章  | 1P-1p007, 3P-1a078  |
|            |                           | 酒井 杏匠  | 3P-1p054, 3P-1p055,           |  |  |        |                     |

## さ



|           |   |        |  |         |  |
|-----------|---|--------|--|---------|--|
| 鈴木 義之     | 1P-1p008  | 高木 理沙  | 2P-2p150   | 竹川 薫    | 2P-1p108, 3P-2a132   |
| 鈴木 里沙     | 3P-1a041  | 高桑 雄一  | 2P-2p171   | 竹嶋 康誠   | 1P-1p015, 1P-1p016   |
| 須田 彰一郎    | 1P-2p176  | 高柴 則子  | 2P-1p088, 3P-2p142   | 竹田 裕貴   | 1P-1p041   |
| 須田 雅子     | 1P-1p045, 3P-2p168  | 高島 昌子  | 2P-1p044   | 竹田 浩之   | 1P-2p176   |
| 須田 互      | 2P-1p038, 3P-1a073  | 高瀬 良和  | 2P-1p081   | 竹田 正久   | 3S-Ep05  |
| 須藤 孝一     | 2P-1p125  | 高田 真由  | 1P-1p110   | 武田 穰    | 1P-1p074   |
| 角 寿子      | 3P-2p174  | 高谷 信之  | 3P-1a079   | 武田 穰    | 2P-1p084, 3P-1a107, 3P-1p089   |
| 炭谷 順一     | 1P-1p004, 1P-1p017, 3P-1p011, 3P-1p012, 3P-1p050          | 高野 築   | 3P-1p039   | 竹中 慎治   | 1P-1p018, 3P-1a014, 3P-1a023   |
| 隅谷 友紀     | 3P-1p029  | 高野 力   | 2P-2p136   | 竹原 一起   | 1P-1p057, 2P-1p014, 2P-1p015   |
| 陶山 友彰     | 1P-1p037  | 高野 博幸  | 3P-1p105   | 竹村 謙信   | 1P-2p183   |
| せ         |   | 高野 真希  | 2P-2p133, 3P-1a065, 3P-1a069, 3P-1a070, 3P-2a143, 3P-2a148                     | 竹本 淳一   | 2P-1p001   |
| 清 和成      | 1P-1p111  | 高橋 伊織  | 2P-2p154   | 竹屋 壮浩   | 3P-1p036, 3P-1p049   |
| 清 菜都実     | 3P-1a069  | 高橋 圭   | 1P-1p083   | 竹山 春子   | 1P-2p176, 1P-2p177   |
| 清木 俊雄     | 2P-1p028  | 高橋 健司  | 3P-1a119   | 田島 誉久   | 2P-1p056, 2P-1p057, 2P-1p100, 3P-1a093, 3P-1a114, 3P-1a130, 3P-1a131           |
| 戚 蟠       | 1P-2p137  | 高橋 憲司  | 1P-2p153, 1P-2p154, 2P-1p058, 2P-2p135, 2P-2p139, 3P-1a120, 3P-1a121, 3P-1a122 | 田代 康介   | 3P-1p016   |
| 關 光       | 2S-Ba01   | 高橋 浩一  | 3P-1a055, 3P-1a057, 3P-1a059   | 田代 幸寛   | 3P-1a104, 3P-1a105, 3P-2p176   |
| 関 兵馬      | 1P-1p129  | 高橋 沙綾  | 3P-1a125   | 田代 陽介   | 2P-1p113, 2P-1p126, 3P-2a146   |
| 関 実       | 1P-2p143, 1P-2p148  | 高橋 里美  | 1P-1p048, 3P-1p070, 3P-1p071, 3P-2a181   | 多田 孝清   | 1P-1p093   |
| 関口 桂      | 1P-1p100  | 高橋 太雅  | 1P-1p107   | 多田 千佳   | 1P-1p106   |
| 関根 麻莉     | 3P-2p167  | 高橋 大地  | 3P-1a110   | 多田 日菜子  | 3P-1p007   |
| 関根 由璃子    | 2P-1p097  | 高橋 智聡  | 3P-1a095   | 多田 羅 昌浩 | 3P-1a102   |
| 關谷 悠介     | 3P-2p170  | 高橋 徹   | 3P-2p146   | 立木 隆    | 1P-1p012   |
| 瀬田 幸平     | 1P-1p053, 1P-1p054  | 高橋 俊成  | 1P-1p073   | 伊達 弘輝   | 3P-1p067   |
| 善藤 威史     | 3P-2a161, 3P-2p176  | 高橋 仁志  | 1P-1p120   | 伊達 修平   | 2P-1p101   |
| 仙波 弘雅     | 1P-1p018  | 高橋 宏和  | 3P-1a103   | 伊達 康博   | 1P-2p178, 1P-2p181, 3P-1a087, 3P-1p086, 3P-1p098                               |
| そ         |   | 高橋 将人  | 2P-2a176   | 立松 健司   | 1P-2p133   |
| 曾 芳琴      | 3P-1a052  | 高橋 雅俊  | 2P-2p172   | 田所 花菜   | 3P-1p048   |
| 相馬 悠希     | 1P-1p067, 1P-1p068  | 高橋 政友  | 3P-1a097   | 田中 香お里  | 3P-1p087   |
| 曾我 亜由美    | 3P-1a125  | 高橋 讓   | 3P-2a149   | 田中 賢二   | 2P-1p130, 3P-1p127, 3P-1p128, 3P-1p129   |
| 十川 直也     | 2P-2p144  | 高橋 裕里香 | 3P-1p099   | 田中 謙也   | 3P-1a017   |
| 曾田 匡洋     | 2P-2p142  | 高橋 佳江  | 2P-2p187   | 田中 耕生   | 1P-1p018, 1P-1p041, 3P-1a014, 3P-1a023   |
| 曾根 輝雄     | 1P-1p105  | 高橋 良輔  | 3P-2a133   | 田中 沙季   | 1P-1p119   |
| 園木 和典     | 3P-1a119  | 高橋 沙里  | 3P-1a003   | 田中 純平   | 1P-1p079   |
| 園部 智彩     | 3P-1p089  | 高原 順子  | 1P-2p182   | 田中 翔    | 1P-2p160   |
| 園元 謙二     | 1A-Aa03, 3P-1a086, 3P-2a161, 3P-2p176, 3S-Dp02            | 高原 和則  | 2P-1p080, 2P-1p091   | 田中 正太郎  | 2P-2p171   |
| 曾宮 正晴     | 1P-2p132  | 高村 岳樹  | 2P-1p022   | 田中 孝明   | 2P-1p027, 3P-2a164, 3P-2a165, 3P-2a166, 3P-2a167, 3P-2a168, 3P-2a169, 3P-2a170 |
| た         |   | 高谷 直樹  | 1P-1p040, 2P-2p140, 3P-1p069, 3P-1p075   | 田中 貴大   | 3P-1p051, 3P-1p052   |
| ターナー ピーター | 2P-1p093  | 高山 征也  | 3P-1a030   | 田中 拓未   | 3P-2p146   |
| 大利 徹      | 2S-Ep03, 3P-2a137, 3P-2a138                               | 高山 陽加  | 3P-1a101   | 田中 達也   | 3P-1a015   |
| 多賀 直彦     | 2P-1p079  | 田川 聖一  | 2P-2p173, 3P-1p091   | 田中 勉    | 2P-1p059, 3P-1a030, 3P-2p141, 3P-2p145   |
| 高木 一好     | 1P-1p014, 3P-1p051, 3P-1p052, 3P-1p053                    | 滝口 昇   | 3P-1p104, 3P-2p135, 3P-2p177   | 田中 剛    | 3P-1p021, 3P-1p105, 3P-1p116   |
| 高木 航平     | 3P-1p114  | 瀧下 竜太  | 3P-2p161   | 田中 亨    | 2P-2p148, 2P-2p149   |
| 高木 大地     | 2P-1p029  | 田口 和典  | 2P-1p103   | 田中 俊雄   | 3P-2a133, 3P-2a134   |
| 高木 哲史     | 2P-1p065  | 田口 耕造  | 1P-1p072   | 田中 尚人   | 1P-1p074   |
| 高木 俊幸     | 1P-2p167  | 田口 悟朗  | 3P-1a038   | 田中 信忠   | 1P-1p008   |
| 高木 俊之     | 2P-2p170  | 田口 精一  | 2P-1p129   | 田中 信行   | 1P-2p182   |
| 高木 智子     | 1P-2p150  | 田口 誠我  | 1P-1p075, 2P-1p075   | 田中 秀樹   | 3P-1p072   |
| 高木 博史     | 1P-1p060, 1P-1p061, 1P-1p062, 1P-1p069, 1P-1p070, 2S-Aa04 | 田口 久貴  | 1P-1p127   |         |  |
| 高木 昌宏     | 1P-2p164, 3P-2a173, 3P-2a174, 3P-2a175, 3P-2p136          | 武 慶太郎  | 1P-1p014   |         |  |
| 高木 睦      | 2P-2p153, 2P-2p154, 2P-2p155                              | 竹内 道雄  | 2P-2p134   |         |  |
|           |   | 武尾 正弘  | 1P-1p057, 2P-1p014, 2P-1p015, 2P-1p063,  |         |  |



|        |  |        |   |         |   |
|--------|--|--------|---|---------|---|
| 豊福 雅典  | 3P-2p157   | 中西 里菜  | 1P-1p044  | 成瀬 美樹   | 1P-1p107  |
| 寅本 拓   | 1P-1p101   | 長沼 孝文  | 3P-2a179  | 鳴滝 藍    | 3P-2a177  |
| 鳥居 誉   | 3P-1a036, 3P-1p028   | 中野 祥平  | 2P-1p001  | 鳴海 良平   | 3S-Ep03   |
| な      |  | 中野 太一  | 3P-2a133  | 難波 孝行   | 1P-1p012  |
| 内藤 翔乃  | 1P-2p138   | 中野 智貴  | 3P-1a052  | 南部 友香   | 3P-1p027  |
| 内藤 卓人  | 2P-2p182   | 中野 秀雄  | 1S-Bp02, 2P-1p011,<br>2P-1p024, 2P-1p031, 2P-1p034  | に       |   |
| 中 真以   | 3P-2a137   | 中野 宏軌  | 1P-1p037  | 新岡 宏彦   | 2P-2p173, 3P-1p091  |
| 中井 沙織  | 3P-2a182   | 中野 洋介  | 3P-1a096  | 新倉 春香   | 3P-2a136  |
| 中井 昇太  | 3P-1a103   | 中野 義勝  | 1P-2p176  | 新倉 舞    | 3S-Bp04   |
| 中井 大志  | 3P-1a027   | 中野 長久  | 3P-1p119  | 二井手 哲平  | 2P-1p033, 3P-1a062,<br>3P-2a178   |
| 中井 貴久  | 1P-1p122   | 中野 喜之  | 2P-2p146  | 新土居 奈緒美 | 3P-1a048, 3P-1a049  |
| 仲井 まどか | 3S-Bp05  | 長野 弘幸  | 3P-1p046  | 新納 俊    | 1P-1p042  |
| 中井 裕   | 1P-1p106   | 長野 由梨子 | 1P-2p174  | 仁木 大輔   | 3P-1a046  |
| 永井 暉   | 1P-1p066   | 長濱 一弘  | 3P-1p020  | 西 真郎    | 1P-2p174  |
| 長井 誠   | 3S-Bp05  | 中原 克己  | 3S-Ap02   | 西尾 翔子   | 1P-1p096  |
| 中尾 仁美  | 1P-1p038   | 中堀 清   | 3S-Bp04   | 西尾 知樹   | 3P-1a052  |
| 仲尾 祐輝  | 2P-1p028   | 永峰 賢   | 3P-2a144  | 西尾 尚道   | 3P-1a114  |
| 中尾 洋一  | 3P-2a153   | 長棟 輝行  | 1P-2p135, 1P-2p150,<br>2P-1p023, 3P-1a041,<br>3P-1a044, 3P-1a045,<br>3P-1a047, 3P-1p064, 3P-1p065 | 西岡 雅都   | 2P-2p142  |
| 永尾 晃治  | 3S-Dp04  | 中村 和敬  | 3P-1p092, 3S-Bp07   | 西川 康太   | 3P-1a046  |
| 中岡 知規  | 3P-1a018   | 中村 浩蔵  | 2P-1p095  | 西川 絢    | 3P-2a148  |
| 長岡 亨   | 1P-1p112   | 中村 貞夫  | 1P-1p100  | 西川 弘樹   | 2P-1p059  |
| 中川 拓弥  | 1P-1p068   | 中村 聡   | 2P-1p128, 2P-1p131, 3P-1p019  | 西川 麻裕   | 2P-2p157  |
| 中川 智行  | 1P-1p002, 1P-1p055,<br>1P-1p056, 2P-1p065,<br>2P-1p067, 2P-1p087                     | 中村 崇裕  | 1P-2p157  | 西川 洋平   | 1P-2p176, 1P-2p177  |
| 中川 裕之  | 3P-2p139   | 中村 隆宏  | 3P-1a028  | 西口 みゆ   | 1P-1p060, 1P-1p062  |
| 中川 美樹  | 3P-1a015   | 中村 史   | 2P-2p178  | 西澤 尚樹   | 1P-1p124  |
| 中越 麻里菜 | 3P-1p050   | 中村 敏英  | 1P-1p088, 1P-1p090  | 西島 謙一   | 1P-2p165, 1P-2p166  |
| 長坂 理紗子 | 3P-2p164   | 中村 真人  | 2S-Cp01, 2S-Cp04  | 西田 章弘   | 3P-1p113  |
| 中崎 清彦  | 3P-1a106   | 中村 雅哉  | 2P-1p058, 2P-2p135,<br>2P-2p139   | 西田 洋巳   | 3P-1p099  |
| 中崎 瞳   | 3P-1a085   | 中村 真由  | 3P-2p154  | 西出 真也   | 2P-2p153  |
| 中澤 光   | 2P-1p033, 2P-1p036,<br>3P-1a050, 3P-1a062, 3P-2a178                                  | 中村 真理子 | 1P-1p107  | 西野 泰斗   | 1P-2p140  |
| 中澤 昌美  | 3P-1p119   | 中村 祐哉  | 3P-1p095  | 西野 智彦   | 2P-1p083  |
| 長澤 宏器  | 3P-1a027   | 中村 幸弘  | 3P-2p162  | 西八條 正克  | 2P-2p146, 2P-2p147  |
| 中島 一紀  | 1P-1p108   | 中村 里沙  | 3P-1a028  | 西部 洋晴   | 1P-1p109  |
| 中島 広裕  | 3P-1a088   | 中村 龍貴  | 1P-1p035  | 西村 重徳   | 1P-1p017  |
| 中島 信孝  | 3P-1a024, 3P-1p094,<br>3P-1p095, 3P-2p169  | 仲本 準   | 3P-1a051  | 西村 拓    | 1P-1p046  |
| 中島 鈴佳  | 3P-1p101   | 中屋 江梨花 | 3P-1p102  | 西村 実    | 2P-1p112  |
| 中島 敏明  | 1P-1p052, 1P-1p053,<br>1P-1p054, 2P-1p050, 3P-1p101                                  | 長屋 英和  | 3P-1a050  | 西村 泰央   | 2P-1p073  |
| 中島 春紫  | 1P-1p037   | 中山 俊一  | 1P-1p051, 1P-1p074,<br>1P-1p077, 1P-1p078, 1P-1p079   | 西村 勇哉   | 1P-2p136, 3P-2p138  |
| 中島 満晴  | 3P-1p121   | 中山 純一  | 2P-1p036  | 西本 遼    | 2P-1p073  |
| 中島 悠太  | 1P-1p021   | 中山 二郎  | 3P-1a086, 3P-2a161,<br>3S-Dp02, 3S-Dp04   | 西本 真琴   | 3P-1a101  |
| 長島 拓則  | 2P-2p176   | 中山 久之  | 2P-1p012  | 西本 完    | 2P-1p002  |
| 中島田 豊  | 2P-1p056, 2P-1p057,<br>2P-1p100, 3P-1a093, 3P-1a103,<br>3P-1a114, 3P-1a130, 3P-1a131 | 仲山 真美  | 3P-1p103  | 西森 大貴   | 1P-1p078  |
| 永瀬 史憲  | 1P-2p152   | 中山 泰秀  | 1P-2p149  | 西矢 芳昭   | 1P-2p180, 2P-1p001,<br>3P-1a034, 3P-1p038, 3P-1p061   |
| 仲田 裕貴  | 3P-1a022   | 中山 泰宗  | 3P-1p020  | 西山 航生   | 2P-1p117  |
| 中谷 茂   | 1P-2p172, 2P-2p149   | 名倉 由起子 | 2S-Ea02   | 西山 しずか  | 2P-2p148  |
| 仲谷 豪   | 1P-1p060   | 那須 博光  | 1P-2p182  | 西山 由美子  | 2P-1p028  |
| 中谷 肇   | 2P-2p143   | 生井 智仁  | 1P-1p040  | 西脇 俊和   | 1P-1p089  |
| 中枋 昌弘  | 1S-Bp01  | 生江 俊樹  | 3P-2a166  | 新田見 匡   | 3P-1p108  |
| 中西 周次  | 3P-1a017, 3P-2a155   | 生越 克典  | 2P-1p043  | 仁宮 一章   | 1P-2p153, 1P-2p154,<br>2P-1p058, 2P-2p135,<br>2P-2p139, 3P-1a026,<br>3P-1a120, 3P-1a121, 3P-1a122 |
| 中西 豪   | 1P-1p091   | 生田目 哲志 | 3P-2p162  | 二宮 直登   | 3P-2p167  |
| 中西 智美  | 2P-1p018   | 並木 禎尚  | 1P-1p106  | ぬ       |   |
|        |  | 成田 純也  | 1P-2p156  | 額田 夏生   | 3P-2a182  |

|        |                     |        |                              |                              |                             |
|--------|---------------------|--------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 布上 翔太  | 3P-2p149            | 朴 龍洙   | 1P-1p005, 1P-1p030,          | 濱田 浩幸                        | 2P-1p062                    |
| 沼口 真緒  | 3P-2p176            |        | 1P-2p183, 2P-1p016,          | 濱野 雄大                        | 2P-1p058                    |
| 沼本 穂   | 3P-1a029            |        | 3P-1a064, 3P-1p060           | 濱野 吉十                        | 3P-2a135, 3P-2a136          |
| ね      |                     |        |                              |                              |                             |
| 根宜 香奈子 | 2P-1p119            | 白米 優一  | 3P-2a152                     | 早川 あすか                       | 1P-1p099                    |
| 根岸 敦規  | 3P-1a112            | 端 瞭太   | 3P-2p144                     | 早川 享志                        | 1P-1p055, 1P-1p056,         |
| 根岸 佑香里 | 3P-2p170            | 橋爪 克己  | 2P-1p072                     | 2P-1p065, 2P-1p067, 2P-1p087 |                             |
| 根来 誠司  | 1P-1p057, 2P-1p014, | 橋本 明里  | 3P-1a036                     | 早川 文代                        | 1P-1p086                    |
|        | 2P-1p015, 2P-1p063, | 橋本 和仁  | 3P-2a155                     | 早坂 大亮                        | 2P-1p104, 2P-1p105          |
|        | 2P-1p108, 3P-2a132  | 橋本 恭兵  | 1P-1p085                     | 林 和幸                         | 3P-1a101                    |
| 根来 宏明  | 1P-1p071            | 橋本 賢一  | 3P-1a008                     | 林 衆治                         | 1P-2p142                    |
| 根来 雄哉  | 2P-1p086            | 橋本 絢子  | 3P-2a135                     | 林 祥平                         | 2S-Ep03, 3P-2a137, 3P-2a138 |
| 鼠尾 まい子 | 1P-1p082            | 橋本 晋弥  | 3P-1p002                     | 林 司                          | 2S-Ea06                     |
| 根本 泰   | 1P-2p149            | 橋本 智代  | 1P-1p126, 2P-1p119           | 林 寿人                         | 1P-2p140                    |
| 根路銘 伸介 | 3P-1p097            | 橋本 弓加  | 2P-1p069                     | 林 秀謙                         | 1P-1p102                    |
| の      |                     |        |                              |                              |                             |
| 野川 優洋  | 3P-1a038            | 橋本 涉   | 3P-1p072                     | 林 茉依                         | 3P-1p044                    |
| 能木 裕一  | 1P-2p174            | 蓮沼 誠久  | 2P-1p051, 2P-1p052,          | 林 将大                         | 3P-1p087                    |
| 野北 昂志  | 1P-1p023            |        | 3P-1p084, 3P-1p117,          | 林 優花                         | 2P-1p003                    |
| 野口 明德  | 1P-1p076            |        | 3P-1p120, 3P-1p121           | 林 勇樹                         | 3P-1p063                    |
| 野口 恵一  | 1P-1p033            | 蓮實 凉子  | 2P-1p067                     | 林 優佑                         | 2P-1p054                    |
| 野口 隆明  | 3P-2p167            | 長谷 英理菜 | 1P-2p171                     | 林 梨咲                         | 3P-1p005                    |
| 野口 巧実  | 2P-1p072            | 長谷 成記  | 2P-1p012                     | 林原 加代子                       | 3P-1a080                    |
| 野口 秀樹  | 1P-1p075            | 長谷川 智弘 | 2P-2p137                     | 原 正之                         | 2P-2p157, 2P-2p163,         |
| 野口 洋文  | 1P-2p142            | 長谷川 文香 | 3P-2p148                     | 2P-2p164, 2P-2p165           |                             |
| 野口 正宏  | 3P-1a004            | 長谷川 喜衛 | 3P-1a011                     | 原 良太郎                        | 1P-1p020, 1P-1p021,         |
| 野口 愛   | 2P-2p135, 3P-1p108  | 秦 信子   | 1P-2p144                     | 1P-1p022, 2P-1p005, 2P-1p006 |                             |
| 野崎 智帆  | 2P-2p144            | 畠 俊郎   | 3P-1p099                     | 原口 典久                        | 3P-1p020                    |
| 野澤 太朔  | 3P-1a128            | 秦 洋二   | 1P-1p071, 3P-1a076,          | 原島 俊                         | 3P-1a027, 3P-1p002          |
| 野地 博行  | 2P-2p150            | 羽田 圭吾  | 2P-1p014                     | 原田 涼之介                       | 1P-2p163                    |
| 野島 大佑  | 3P-1p021, 3P-1p105, | 羽田 毅   | 1P-2p158                     | 春園 嘉英                        | 1P-2p182                    |
|        | 3P-1p116            | 畠山 真由美 | 1P-1p023                     | 春野 玲弥                        | 1P-1p093                    |
| 野島 良太  | 1P-1p035            | 畑下 昌範  | 3P-1a065, 3P-1a069,          | 盤若 明日香                       | 1P-1p046                    |
| 野田 修平  | 2P-1p055            | 秦田 勇二  | 3P-2p159                     | 坂野 聡美                        | 2P-1p060                    |
| 野田 尚宏  | 3P-1p043, 3P-2a159  | 畑中 唯史  | 1P-1p174                     | 馬場 健史                        | 3P-1a097, 3P-1p082          |
| 野田 勝紀  | 3P-1a054            |        | 1P-1p011, 1P-1p123,          | ひ                            |                             |
| 野田 正文  | 3P-1p025            | 秦野 琢之  | 2P-1p099                     | 日尾 彰宏                        | 1P-1p106                    |
| 野田 悠輔  | 3P-2a168            | 畑林 邦忠  | 1P-1p116                     | 曳野 隆之                        | 3P-1a052                    |
| 野中 浩一  | 1P-2p155            | 幡本 晃太  | 2P-2p172                     | 樋口 裕次郎                       | 1P-1p015, 1P-1p016          |
| 野中 大輔  | 1P-1p052, 1P-1p053, | 蜂須賀 真一 | 3P-2a170                     | 久 景子                         | 1P-1p099                    |
|        | 1P-1p054, 3P-1p101  | 服部 修平  | 1P-1p007                     | 久田 一輝                        | 1P-1p111                    |
| 野濱 元輝  | 2P-1p107            | 服部 峰充  | 3P-1a062                     | 緋田 安希子                       | 2P-1p100                    |
| 信木 公介  | 1P-1p051            |        | 2P-1p033, 2P-1p036,          | 秀瀬 涼太                        | 3P-1p018, 3P-1p080          |
| 野村 泉   | 3P-1a020            | 服部 菜月  | 3P-1a062, 3P-2a178           | 日比 慎                         | 1P-1p048, 3P-1p070,         |
| 野村 泰治  | 2S-Ba03, 3P-1a072   | 服部 正平  | 2P-1p011                     | 3P-1p071, 3P-2a181           |                             |
| 野村 暢彦  | 1P-1p113, 3P-2p157  |        | 2P-1p038, 3P-1a073,          | 日比野 歩美                       | 1P-1p056                    |
| 野村 将   | 1P-1p087            | 服部 領太  | 3P-1p088                     | 百武 真奈美                       | 3P-1p027                    |
| 野村 嘉紀  | 1P-2p162            | 花井 泰三  | 2P-1p010                     | 平井 健吾                        | 2P-1p006                    |
| 野本 健太  | 1P-1p104            |        | 1P-1p067, 1P-1p068,          | 平井 秀平                        | 3P-1a106                    |
| 野本 健斗  | 2P-1p003            | 花方 寛   | 2P-1p062, 3P-1a080,          | 平井 浩文                        | 3P-1a124, 3P-1a125,         |
| 野本 貴史  | 3P-2a164, 3P-2a170  | 花城 隆二  | 3P-1a082, 3P-1a083, 3P-2p144 | 3P-1a124, 3P-1a125,          |                             |
| 則武 ちあき | 3P-1a004            | 羽生 義郎  | 1P-1p032                     | 平井 優美                        | 3P-1p029                    |
| は      |                     |        |                              |                              |                             |
| 萩 達朗   | 1P-1p087            | 馬場 知哉  | 3P-2p175                     | 平岡 修                         | 1P-1p036                    |
| 萩原 英久  | 3P-1p124            | 馬場 保徳  | 2P-1p037                     | 平賀 和三                        | 3P-2p168                    |
| 白 至桓   | 2P-1p084            | 濱 侑紀   | 3P-1a042                     | 平川 秀彦                        | 3P-1a041                    |
|        |                     | 濱垣 秀平  | 1P-1p106, 2P-1p116           | 平沢 敬                         | 3P-1a010                    |
|        |                     | 濱口 慎也  | 3P-2a172                     | 平沢 大樹                        | 3P-1p016                    |
|        |                     | 濱島 弘史  | 2P-1p029                     | 平田 章悟                        | 2P-1p074                    |
|        |                     |        | 1P-1p033                     | 平田 善彦                        | 2P-1p043                    |
|        |                     |        | 1P-1p075, 1P-1p081,          | 平塚 祐也                        | 3P-2a167                    |
|        |                     |        | 3P-2a172, 3S-Dp04, 3S-Dp05   |                              |                             |

|        |  |                |                                       |        |  |
|--------|--|----------------|---------------------------------------|--------|--|
| 平等 清夏  | 3P-1a019                               | 福家 翼           | 3P-1a078                              | 古澤 力   | 3P-1a010, 3P-1p078   |
| 平野 明成  | 3P-2p162                               | 藤 聡志           | 3P-1a061                              | 古澤 之裕  | 3P-1p099   |
| 平野 伸一  | 1P-1p059, 1P-1p112                     | 藤井 謙吾          | 2P-1p007                              | 古田 一夢  | 3P-2p136   |
| 平野 滂   | 1P-1p027                               | 藤井 健太          | 3P-1p118                              | 古田 雅一  | 3P-2p155, 3P-2p156   |
| 平林 淳   | 2P-2p187                               | 藤井 智           | 1P-2p172                              | 古舘 祥   | 3P-1a085   |
| 平間 知之  | 2P-1p102                               | 藤井 眞一郎         | 2P-2p159                              | 古屋 俊樹  | 1P-1p024   |
| 平松 久卓  | 1P-2p148                               | 藤井 力           | 1P-1p095                              |        |  |
| 平丸 大介  | 2P-2p172                               | 藤井 翼           | 1P-1p057                              |        |  |
| 平本 哲也  | 3P-1p007                               | 藤井 玲央奈         | 1P-2p167                              | 白 京玉   | 1P-2p164   |
| 平山 誠   | 3P-1p072                               | 藤江 誠           | 3P-1a007                              | 逸見 光   | 3P-2a151   |
| 平山 裕一郎 | 3P-2a139                               | 藤岡 経久          | 3P-2p161                              |        |  |
| 平山 良朗  | 3P-1a055, 3P-1a057, 3P-1a059           | 藤川 彩美          | 1P-1p081, 2P-1p077, 3P-2a172, 3S-Dp04 |        |  |
| 比留田 美咲 | 3P-1p061                               | 藤木 英寿          | 1P-1p014                              | 賀 詩欣   | 3P-1p117   |
| 晝間 敬   | 2S-Ap02                                | 藤澤 祐哉          | 3P-2a143                              | 坊垣 隆之  | 2P-1p090   |
| 廣江 綾香  | 2P-1p129, 3P-1a013, 3P-1a085, 3P-1p027 | 藤田 明子          | 2P-1p099                              | 芳坂 貴弘  | 3P-1p062   |
| 廣岡 青央  | 2P-1p071                               | 藤田 憲一          | 3P-2a133, 3P-2a134                    | 保坂 浩章  | 2S-Ep01  |
| 広川 安孝  | 3P-1a080, 3P-1a082, 3P-1a083, 3P-2p144 | 藤田 聡史          | 1P-2p134, 2S-Cp02                     | 保坂 浩章  | 2P-2p156   |
| 廣重 竜太  | 2P-1p019                               | 藤田 純孝          | 2P-1p062                              | 星 英之   | 1P-1p103, 1P-1p104   |
| 廣瀬 修一  | 2P-2p142                               | 藤田 大介          | 2P-2p183                              | 星川 優美子 | 3P-1p105   |
| 廣瀬 遵   | 3P-1a118                               | 藤田 直子          | 2P-1p072                              | 星田 尚司  | 3P-1a032, 3P-1p026, 3P-2p161   |
| 廣瀬 竜郎  | 1P-1p118                               | 藤田 夏美          | 1P-1p037                              | 星野 一宏  | 2P-2p133, 3P-1a065, 3P-1a069, 3P-1a070, 3P-2a143, 3P-2a148   |
| 廣田 泰志  | 3P-1p104                               | 藤田 信之          | 3P-1p093                              |        |  |
| 廣田 隆一  | 3P-1a015                               | 藤田 英明          | 3P-2p163                              | 星野 邦秀  | 1P-2p164   |
|        |  | 藤田 雅徳          | 2P-2p164                              | 星野 孝幸  | 1P-1p025   |
|        |  | 藤田 祥彦          | 2P-2p181, 3P-2a184                    | 星野 保   | 1P-1p026, 1P-1p115, 1P-1p126, 2P-1p119, 3P-2p169   |
|        |  | 藤谷 将也          | 3P-2p165                              | 細川 隆史  | 3P-1p021   |
|        |  | 藤波 友樹          | 1P-1p130                              | 細川 正人  | 1P-2p176, 1P-2p177   |
|        |  | 藤原 秀彦          | 3P-1a118                              | 細田 晃文  | 3P-1p044   |
|        |  | 藤原 悠右          | 3P-1p117                              | 堀田 秋津  | 1S-Ep02  |
|        |  | 藤丸 悠貴          | 2P-1p075                              | 保里 明日香 | 3P-1a108   |
|        |  | 藤村 夏紀          | 3P-1a046                              | 堀 綾香   | 1P-2p148   |
|        |  | 藤本 拓哉          | 1P-1p009                              | 堀 克敏   | 2P-1p019, 2P-2p143, 3P-1a017   |
|        |  | 藤本 佳則          | 2P-1p070                              | 堀 勝    | 2P-2p176   |
|        |  | 藤森 一浩          | 1P-1p114, 1P-1p115                    | 堀井 悠一郎 | 1P-1p094   |
|        |  | 藤屋 寛子          | 3P-1a111                              | 堀内 淳一  | 1P-1p125, 3P-1a055, 3P-1a057, 3P-1a059, 3P-1a117, 3P-2p144   |
|        |  | 藤山 秋佐夫         | 1P-1p075                              |        |  |
|        |  | 藤山 和仁          | 2P-2p184, 2P-2p185, 2P-2p186          | 堀内 貴之  | 1P-2p155   |
|        |  | 藤原 伸介          | 1P-1p050, 3P-1p018, 3P-1p080          | 堀江 正信  | 3P-2p163   |
|        |  | 藤原 裕之          | 3S-Ap04                               | 堀木 雅文  | 1P-1p048   |
|        |  | 藤原 政司          | 2P-2p153                              | 堀口 博文  | 3P-1p037   |
|        |  | 藤原 由梨          | 1P-1p068                              | 堀米 綾子  | 1S-Bp05  |
|        |  | 二神 泰基          | 2P-1p080, 3P-1a118                    | 堀之内 貴明 | 3P-1p078   |
|        |  | 二石 涼平          | 3P-1p019                              | 堀之内 伸行 | 3P-2a181   |
|        |  | 二又 裕之          | 2P-1p113, 2P-1p126, 3P-2a146          | 本莊 知子  | 3P-1a048, 3P-1a049   |
|        |  | 二見 淳一郎         | 3P-1a048, 3P-1a049, 3P-1a052          | 本莊 雅宏  | 3P-2a146   |
|        |  | 二見 翠           | 3P-1a052                              | 本田 憲昭  | 2P-1p079   |
|        |  | 鮒 信学           | 2S-Ep04                               | 本田 孝祐  | 1P-1p001   |
|        |  | 船木 正大          | 2P-2p146, 2P-2p147                    | 本田 真也  | 2P-1p089   |
|        |  | 舟橋 久景          | 1P-2p173                              | 本田 倫子  | 3S-Dp02  |
|        |  | フリート ジョージ W.J. | 2P-1p013                              | 本多 裕之  | 1A-Aa04, 1P-2p141, 1S-Bp03, 2P-2p168, 2P-2p174, 2P-2p176, 3P-1p096, 3P-2a156, 3P-2a157, 3P-2p164, 3P-2p165 |
|        |  | 古市 圭介          | 1P-1p039                              | 本田 裕樹  | 3P-1p124   |
|        |  | 古江-楠田 美保       | 3P-2p164                              | 本多 了   | 2P-2p135   |
|        |  | 古川 謙介          | 3P-1a118                              |        |  |
|        |  | 古川 裕貴          | 3P-1p040                              |        |  |

|        |   |        |   |        |   |
|--------|---|--------|---|--------|---|
| 本間 研一  | 2P-2p153                                  | 松田 貫暉  | 3P-2a135  | 水谷 哲也  | 3S-Bp05                                   |
| 本間 さと  | 2P-2p153                                  | 松田 修平  | 3P-1a129  | 水野 康平  | 3P-1a013                                  |
| 本間 英夫  | 1P-2p152                                  | 松田 俊文  | 3P-1p083  | 水野 正明  | 2P-2p176                                  |
| ま      |   | 松田 史生  | 1P-1p066, 2P-1p053,<br>2P-1p068, 3P-1a095           | 三田 麻友華 | 2P-1p098                                  |
| 前川 裕美  | 3P-1a029                                  | 松田 靖   | 2P-1p079  | 道上 達男  | 3P-2p167                                  |
| 前田 勇   | 3P-1p125, 3S-Bp06                         | 松谷 成裕  | 3P-2a181  | 三井 亮司  | 1P-1p002, 1P-1p003,<br>1P-1p056           |
| 前田 真一  | 3P-1a079                                  | 松谷 峰之介 | 1P-1p042, 1P-1p043,<br>1P-1p044                     | 三ツ井 良輔 | 2P-2p132                                  |
| 前田 憲成  | 2P-1p110                                  | 松永 淳   | 3P-1a062  | 光川 侑輝  | 3P-1p070, 3P-2a181                        |
| 前田 浩   | 2P-2p134                                  | 松永 恵美子 | 1P-1p015  | 光武 進   | 3S-Dp04, 3S-Dp05                          |
| 前田 真美  | 3P-1a036                                  | 松永 陽香  | 1P-1p081, 2P-1p077,<br>3P-2a172                     | 光野 秀文  | 3S-Ep02                                   |
| 前田 瑞夫  | 2S-Bp01                                   | 松波 宏明  | 1P-1p029, 3P-1p058                                  | 光山 統泰  | 3P-1p088                                  |
| 前田 みのり | 3P-1a098, 3P-1a099                        | 松原 拓哉  | 1P-1p049  | 水戸 光昭  | 1P-1p107                                  |
| 前原 康秀  | 3P-2a158                                  | 松原 達昭  | 1S-Bp01   | 皆川 一   | 3P-1p069                                  |
| 曲 正樹   | 2P-1p028                                  | 松原 充   | 3P-2a177  | 水口 和信  | 2P-2p146, 2P-2p147                        |
| 牧 慶子   | 3P-1p052                                  | 松原 悠紀  | 3P-1a056  | 南 淳一   | 1S-Bp05                                   |
| 牧 佑紀   | 3P-1a082                                  | 松藤 仁美  | 1P-1p016  | 南アルプス市 | 3P-2a179                                  |
| 牧野 祥嗣  | 3P-1p024, 3P-2a171                        | 松原 佳史  | 2P-2p175  | 南畑 孝介  | 1P-2p135, 1P-2p138,<br>2P-1p023, 3P-1a044 |
| 政井 英司  | 2P-1p058, 2P-2p135,<br>2P-2p139, 3P-1a119 | 松村 佳史  | 3P-2a152  | 三繩 由希子 | 1P-1p129                                  |
| 正木 和夫  | 3P-2a179                                  | 松村 歩梨  | 3P-2a152  | 嶺澤 美帆  | 3P-1p054, 3P-1p055                        |
| 榊尾 俊介  | 1P-1p040, 3P-1p069,<br>3P-1p075           | 松村 憲吾  | 1P-1p071  | 峰野 純一  | 1S-Ep05                                   |
| 増田 亜美  | 2P-1p060                                  | 松村 茂祥  | 2P-2p182, 2P-2p183                                  | 三原 知子  | 3P-1a007                                  |
| 増田 兼治  | 1P-2p155                                  | 松村 幸彦  | 3P-1a093, 3P-1a103,<br>3P-1a114, 3P-1a130, 3P-1a131 | 宮内 明   | 1P-1p032                                  |
| 増田 光平  | 3P-1a026                                  | 松村 吉信  | 2P-1p106  | 宮内 啓介  | 1P-1p107, 2P-1p102                        |
| 益田 静香  | 3P-1p086                                  | 松本 明日香 | 3P-1a014  | 宮川 寛規  | 2P-2p140                                  |
| 町田 光史  | 3P-2a153                                  | 松本 健司  | 1P-1p099  | 宮川 博士  | 2P-1p081                                  |
| 町田 幸大  | 3S-Ep01                                   | 松本 貴良  | 1P-1p102  | 宮川 幸   | 2P-1p077                                  |
| 町田 雅之  | 3P-1p006                                  | 松本 拓也  | 3P-2p145  | 三宅 克英  | 1P-1p106, 2P-1p116                        |
| 町田 悠   | 3P-1p022                                  | 松本 伯夫  | 1P-1p059, 1P-1p112                                  | 三宅 淳   | 2P-2p173, 3P-1p091                        |
| 松井 和彦  | 1A-Aa02                                   | 松本 帆南  | 1P-1p119  | 三宅 英雄  | 1P-2p167, 3P-1a040                        |
| 松井 裕史  | 2P-2p170                                  | 松本 雅記  | 3P-1a097  | 三宅 良磨  | 1P-1p022                                  |
| 松井 真   | 3P-1p006                                  | 松本 恵   | 2P-2p174  | 宮越 俊一  | 3P-1a092, 3P-2p170                        |
| 松浦 理史  | 3P-2a184                                  | 松本 雄太  | 2P-2p178  | 宮崎 剛亜  | 2P-1p016, 3P-1p060                        |
| 松浦 俊一  | 3P-1a042, 3P-1a043                        | 松本 凌   | 2P-2p176, 3P-2a156                                  | 宮崎 均   | 2P-1p097                                  |
| 松浦 友亮  | 2A-Ep01, 3P-2a180                         | 松山 友香  | 3P-1a038  | 宮崎 愛   | 3P-1p127, 3P-1p128, 3P-1p129              |
| 末永 智一  | 2P-2p180                                  | 的場 晴香  | 3P-2a158  | 宮下 龍之介 | 3P-1p060                                  |
| 松尾 俊介  | 1P-1p092                                  | 的場 康幸  | 3P-1p025, 3P-1p040,<br>3P-1p068                     | 宮田 篤郎  | 2P-1p091                                  |
| 松岡 智里  | 3P-1p071                                  | 真野 潤一  | 2P-1p041  | 宮武 和孝  | 3P-1p119                                  |
| 松岡 友洋  | 2P-1p121                                  | 間宮 愛   | 1P-1p019  | 宮地 雄大  | 1P-1p027                                  |
| 松岡 史也  | 3P-1p072                                  | 間宮 幹士  | 2S-Ba04   | 宮野 恵   | 3P-1a023                                  |
| 松岡 正佳  | 3P-1p020                                  | 丸海老 純也 | 3P-1p057  | 宮野 泰征  | 1P-1p113                                  |
| 松川 哲也  | 1P-1p130, 3P-1a098,<br>3P-1a099, 3P-1p085 | 丸尾 浩希  | 2P-1p130  | 宮本 弘毅  | 2P-1p063, 3P-2a132                        |
| 松川 真弓  | 3P-1a110                                  | 丸尾 昭二  | 1P-2p152  | 宮本 重彦  | 2S-Ea05                                   |
| 松郷 誠一  | 2P-1p094, 3P-2a147                        | 丸山 千登勢 | 3P-2a135, 3P-2a136                                  | 宮本 龍樹  | 3P-1p043, 3P-2a159                        |
| 松崎 典弥  | 2S-Cp06                                   | 万 クン   | 1P-1p123, 2P-1p099                                  | 宮本 浩邦  | 2P-1p038, 2P-1p124,<br>3P-1a073           |
| 松崎 千秋  | 1P-1p099                                  | 萬年 一斗  | 2S-Ba02   | 宮本 義孝  | 1P-2p142                                  |
| 松崎 浩明  | 1P-1p116                                  | み      |   | 三好 孝則  | 1P-1p041                                  |
| 松崎 祐二  | 2P-2p187                                  | 三浦 豊和  | 3P-1a103, 3P-1a114,<br>3P-1a130, 3P-1a131           | 三好 萌栄子 | 3P-1a107                                  |
| 松沢 智彦  | 1P-1p010                                  | 三浦 広己  | 3P-1a063  | 三輪 京子  | 2S-Ap03                                   |
| 松鹿 昭則  | 1P-1p026, 1P-1p115,<br>1P-1p126, 2P-1p119 | 三木 健夫  | 2P-1p046  | 三輪 秀和  | 2P-1p043                                  |
| 松下 功   | 1P-1p046                                  | 三木 紀彦  | 3P-2p159  | む      |   |
| 松下 一信  | 1P-1p042, 1P-1p043,<br>1P-1p044, 1P-1p058 | 三崎 亮   | 2P-2p184, 2P-2p185                                  | 武藤 正記  | 1P-2p185, 3P-2a163                        |
| 松下 貴子  | 3P-2a144                                  | 三澤 龍志  | 1P-2p150  | 宗景 ゆり  | 3P-1p031                                  |
| 松島 健一朗 | 3P-1p083, 3P-1p088                        | 水谷 治   | 3P-1p005  | 村上 明男  | 3P-1a080, 3P-2p144                        |
|        |   |        |   | 村上 淳   | 2S-Bp04                                   |
|        |   |        |   | 邑上 健   | 3P-1p021                                  |

|             |                              |            |                     |        |                               |
|-------------|------------------------------|------------|---------------------|--------|-------------------------------|
| 村口 元        | 3P-1p081, 3S-Bp04            | 諸星 知広      | 3P-1p100            | 山田 修   | 3P-1p005                      |
| 村澤 裕介       | 2P-2p152                     | 門間 聖子      | 1P-1p107            | 山田 尚平  | 3P-2a177                      |
| 村澤 友紀恵      | 2P-1p106                     |            |                     | 山田 大輔  | 2P-2p159                      |
| 村瀬 祥光       | 3P-1a040                     | や          |                     | 山田 隆   | 3P-1a007                      |
| 村田 幸作       | 3P-1p072                     | 八色 奈央      | 1P-1p015            | 山田 翼   | 1P-1p073                      |
| 村田 俊輔       | 3P-1p010                     | 矢追 克郎      | 1P-1p010            | 山田 陽香  | 3P-2a139                      |
| 村田 大        | 2P-2p147                     | 矢木 修身      | 2P-1p111            | 山田 真澄  | 1P-2p143, 1P-2p148            |
| 村田 達郎       | 2P-1p079                     | 八木 透       | 1P-2p142            | 山田 南実  | 1P-1p093                      |
| 村田 龍太郎      | 1P-1p043                     | 八木 寿梓      | 3P-1p118            | 山田 みゆき | 3P-1p055                      |
| 村中 俊哉       | 2S-Ba01                      | 薬師 寿治      | 1P-1p042, 1P-1p043, | 山田 康伸  | 2P-1p083                      |
| 村松 昇        | 2P-1p046                     |            | 1P-1p044, 1P-1p058  | 山田 亮祐  | 2P-2p132                      |
| 村本 伸彦       | 3P-1a028                     | 矢澤 彌       | 2P-1p074            | 山田 良正  | 1P-2p156, 1P-2p158            |
| 村山 晃一       | 2P-2p136, 2P-2p137,          | 矢嶋 俊介      | 1P-1p077            | 山中 直紀  | 2P-2p148                      |
|             | 2P-2p138                     | 矢嶋 祐也      | 1P-2p148            | 山根 健司  | 2P-1p070                      |
| 村山 亮太       | 3P-1a027                     | 矢島 清       | 2P-1p109, 3P-1p102  | 山野 範子  | 1P-2p159, 1P-2p160,           |
|             |                              | 保川 清       | 2S-Ea01, 3P-1p018   |        | 1P-2p161, 1P-2p162, 1P-2p163  |
| め           |                              | 安田 伸       | 2P-1p079            | 山畑 直樹  | 1P-1p072                      |
| 目良 恒        | 2P-2p154                     | 安田 信幸      | 3P-1p045            | 山平 真也  | 1P-2p135, 1P-2p150            |
|             |                              | 安田 竜馬      | 2P-2p136            | 山本 恵理  | 1P-1p039                      |
| も           |                              | 矢内 健太郎     | 1P-2p185            | 山本 佳奈子 | 1P-1p078                      |
| 茂木 喜信       | 2P-1p076                     | 柳井 清治      | 2P-1p116            | 山本 健   | 1S-Bp01                       |
| モタカトラ       | ベンカテスワーレディ                   | 柳川 大樹      | 3P-1p033            | 山本 憲二  | 1P-1p099                      |
|             | 3P-1p102                     | 柳澤 幸子      | 3P-1p040            | 山本 幸次郎 | 3P-1p127, 3P-1p128,           |
| 望月 和樹       | 2P-2p167                     | 柳沢 真澄      | 2P-2p170            |        | 3P-1p129                      |
| 望月 麻衣       | 3P-1p054, 3P-1p055           | 柳沢 美貴      | 2P-1p033            | 山本 脩幾  | 3P-1a074                      |
| 望月 玲於       | 3P-2p154                     | 柳田 晃良      | 3S-Dp04             | 山本 周平  | 2P-1p042                      |
| 茂木 美樹       | 3P-2a141                     | 柳場 まな      | 3P-2a179            | 山本 修平  | 1P-2p141                      |
| 本村 圭        | 3P-1a015                     | 柳原 格       | 2S-Ea02             | 山本 省吾  | 1P-1p045                      |
| 百田 理恵       | 3S-Dp02                      | 矢野 成和      | 1P-1p012            | 山元 翔太  | 1P-1p077                      |
| 森 昭博        | 2P-1p031                     | 矢野 友寛      | 3P-1a131            | 山本 泰誠  | 3P-1a011                      |
| 森 一博        | 3P-1p114                     | 矢野 裕之      | 1P-1p002, 1P-1p003  | 山本 卓   | 1P-2p157, 3P-1p005            |
| 森 慶太        | 1P-1p122                     | 藪内 里実      | 1P-2p164            | 山本 竜也  | 1P-1p027                      |
| 森 舜也        | 2P-1p130                     | 矢部 誠       | 3P-1p089            | 山本 剛   | 3P-2a142                      |
| 森 翔太郎       | 1P-2p153                     | 山内 雪菜      | 2P-1p048            | 山元 奈緒  | 3P-1a024                      |
| モリ テツシ      | 1P-2p167, 3P-1a040           | 山岡 幸太郎     | 3P-1a122            | 山本 哲史  | 1P-1p111                      |
| 森 智夫        | 3P-1a124, 3P-1a125, 3P-1p029 | 山縣 海       | 1P-1p020, 1P-1p022  | 山本 眞知  | 2P-1p001                      |
| 森 英樹        | 2P-2p157, 2P-2p163,          | 山形 洋平      | 2P-2p134, 3S-Bp02   | 山本 有紀  | 1P-1p049                      |
|             | 2P-2p164, 2P-2p165           | 山口 有朋      | 3P-1a042, 3P-1a043  | 山本 佳宏  | 1P-1p009, 1P-2p180,           |
| 森 宙史        | 3P-1p095                     | 山口 哲志      | 1P-2p135, 1P-2p150, |        | 2S-Aa02                       |
| 森 美穂        | 2P-1p104, 2P-1p105           |            | 2P-2p145, 2P-2p150  | 山本 陸   | 2P-2p160                      |
| 森 裕太郎       | 1P-1p034                     | 山口 修一      | 2P-2p158, 2S-Cp05   | 山本 理奈  | 2P-1p098                      |
| 森川 正章       | 2S- Ap03, 3P-1p107           | 山口 翔平      | 2P-1p095            | 山本 遼太  | 3P-2a174                      |
| 森下 明彦       | 1P-2p144                     | 山口 千尋      | 1P-2p147            | 山森 昭   | 1P-1p084                      |
| 森下 しおみ      | 2P-1p034                     | 山口 良弘      | 3P-2a133, 3P-2a134  |        |                               |
| 森田 啓介       | 2P-1p068                     | 山口 理絵      | 3P-1a030, 3P-2p141  | ゆ      |                               |
| 森田 健太       | 1P-2p136, 3P-2p138           | 山崎 思乃      | 1P-1p101, 2P-1p098  | 湯浅 恵造  | 2P-1p018, 2P-1p029,           |
| 森田 峻秀       | 1P-1p052, 1P-1p053,          | 山崎 将太郎     | 2P-1p040            |        | 2P-1p092                      |
|             | 1P-1p054                     | 山崎 新平      | 1P-1p116            | 由井 嵐士  | 2P-1p126                      |
| 森田 友岳       | 2P-1p042, 3P-1a006           | 山崎 透       | 3P-1p034            | 行平 大地  | 1P-1p091, 1P-1p100            |
| 森田 (松下) 真由美 | 2P-1p010                     | 山崎 敦史      | 3P-1a001, 3P-1a002  | 湯澤 勝浩  | 3P-1p096                      |
| 森田 穂        | 3P-1p101                     | 山地 秀樹      | 3P-2p166            | 湯下 佳和  | 1P-1p119                      |
| 守谷 智恵       | 2P-1p099                     | 山下 綾子      | 3P-2p154            | 弓岡 仁美  | 2P-2p185, 2P-2p186            |
| 森本 兼司       | 2P-2p144                     | 山下 聖樹      | 3P-1a065            | 湯本 達弥  | 3P-1a021, 3P-2p151            |
| 森本 康介       | 3P-2p158                     | 山下 純平      | 2P-1p018            | 由里本 博也 | 3P-1a033                      |
| 守屋 繁        | 3P-1a026                     | 山下 泰一      | 3P-1a083            |        |                               |
| 森谷 千星       | 1P-1p074                     | 山下 伸雄      | 1P-1p080, 2P-1p073  | よ      |                               |
| 森山 幸祐       | 1P-2p138                     | 山下 (鯨島) 結香 | 3P-1a006            | 養王田 正文 | 1P-1p029, 1P-1p033,           |
| 森脇 脩一郎      | 1P-2p165                     | 山下 涼太      | 3P-2p139            |        | 1P-1p035, 2P-1p030, 2P-1p111, |
| 森脇 丈治       | 3P-1a006                     | 山田 綾華      | 1P-1p110            |        | 2P-1p112, 3P-1a053, 3P-1p058  |

|        |                     |        |                               |
|--------|---------------------|--------|-------------------------------|
| 世嘉良 宏斗 | 3P-2p174, 3P-2p175  | 李 宣和   | 3P-1a062                      |
| 横川 遥香  | 2P-1p094, 3P-2a147  | 李 彦    | 3P-1p114                      |
| 横川 裕紀  | 2P-2p180            | 劉 秋実   | 1P-2p132                      |
| 横田 亜紀子 | 3P-1p043, 3P-2a159  | 林 理希   | 1P-1p018                      |
| 横田 篤   | 3P-1a019, 3P-1p046  |        |                               |
| 横田 一道  | 3P-2a163            |        |                               |
| 横田 充弘  | 1S-Bp01             |        |                               |
| 横山 葵   | 3P-2a142            | 若井 暁   | 3P-1a076, 3P-1a077, 3P-1p120  |
| 吉岡 育哲  | 3P-1a075            | 若田 裕一  | 3P-1p021                      |
| 吉岡 和政  | 3P-1a081            | 若林 里衣  | 1P-2p138                      |
| 吉岡 潤一  | 1P-1p102            | 若山 守   | 1P-1p012, 1P-1p014,           |
| 吉賀 豊司  | 3P-2a172            |        | 1P-1p072, 2P-1p078, 3P-1p047, |
| 吉川 勝徳  | 2P-1p060, 3P-1a010  |        | 3P-1p051, 3P-1p052, 3P-1p053  |
| 吉川 潤   | 3P-1p037            | 脇谷 滋之  | 2P-2p154                      |
| 吉川 翔太  | 2P-1p038            | 脇屋 香   | 2P-1p104, 2P-1p105            |
| 吉川 博文  | 1P-1p049, 3P-1p087  | 和田 亜樹  | 1P-2p154                      |
| 吉川 裕之  | 1P-2p167            | 和田 洋樹  | 3P-1p083                      |
| 吉崎 由美子 | 2P-1p080, 2P-1p091  | 和田 大   | 3P-1p046                      |
| 吉田 磨仁  | 3P-2a144            | 和田 悠作  | 3P-1p004                      |
| 吉田 啓   | 3P-2p164            | 渡部 昭   | 1P-1p006                      |
| 吉田 健一  | 1P-1p018, 1P-1p041, | 渡辺 旭   | 2P-1p095                      |
|        | 3P-1a014, 3P-1a023  | 渡邊 彰   | 3P-2p168                      |
| 吉田 健祐  | 3P-2p166            | 渡邊 和史  | 2P-1p027                      |
| 吉田 佐和子 | 2P-1p016            | 渡邊 一哉  | 1P-1p065                      |
| 吉田 滋樹  | 2P-1p097            | 渡部 邦彦  | 1P-1p009                      |
| 吉田 重信  | 2S-Ap01             | 渡邊 桂子  | 3P-1a084                      |
| 吉田 慎一  | 2P-2p147            | 渡邊 研志  | 3P-1a093                      |
| 吉田 知左  | 3P-1p038            | 渡辺 賢二  | 3P-2a139, 3P-2a142            |
| 吉田 真人  | 2S-Cp01             | 渡辺 剛   | 1P-1p102                      |
| 吉田 信行  | 2P-1p121            | 渡辺 聡   | 1P-1p094                      |
| 吉田 誠   | 3P-1p081, 3S-Bp04   | 渡辺 哲   | 2S-Ap04                       |
| 吉田 将也  | 1P-1p049            | 渡部 潤   | 2P-1p076                      |
| 吉田 優太  | 3P-1a031            | 渡邊 昭太郎 | 3P-1p057                      |
| 吉田 稜   | 1P-1p129            | 渡邊 泰祐  | 1P-1p082, 2P-1p045,           |
| 吉富 耕太  | 1P-2p159            |        | 3P-2a140, 3P-2a141            |
| 吉野 永里子 | 3P-1a071            | 渡辺 大輔  | 1P-1p069, 1P-1p070            |
| 吉野 知子  | 3P-1p021, 3P-1p116  | 渡邊 崇人  | 3P-1a118                      |
| 吉原 明秀  | 2P-1p013, 2P-2p144  | 渡邊 崇健  | 3P-1p015                      |
| 吉宗 一晃  | 1P-2p171            | 渡邊 貴嘉  | 3P-1p062                      |
| 吉村 太郎  | 3P-1p083            | 渡辺 輝彦  | 3P-1p056                      |
| 吉村 知紗  | 1P-2p151            | 渡辺 敏郎  | 2S-Aa03                       |
| 吉村 芳修  | 2S-Ea02             | 渡邊 肇   | 2P-1p020, 3P-2a180            |
| 吉本 将悟  | 2P-1p019            | 渡邊 仁   | 1P-1p033                      |
| 良元 伸男  | 2P-1p032            | 渡辺 宏紀  | 1P-1p113                      |
| 義盛 光代  | 1P-1p074            | 渡辺 昌規  | 2P-1p117                      |
| 依田 伸生  | 2P-1p098            | 渡邊 美紀  | 1P-1p027                      |
| 依田 ひろみ | 2P-1p022            | 渡邊 源規  | 3P-1p124                      |
| 米倉 円佳  | 1P-1p118            | 渡部 玲子  | 1P-1p039                      |
| 米田 有紗  | 3P-1a072            | 和地 正明  | 3P-1a012                      |
| 米田 任伸  | 2P-1p088            | 汪 雪    | 1P-2p158                      |
| 米光 裕   | 3P-1a101            |        |                               |

## わ

## ら

|       |          |
|-------|----------|
| 羅 宮臨風 | 2P-1p056 |
| 雷 中方  | 3P-1a128 |
| 楽 隆生  | 3P-2p175 |

## り

|     |          |
|-----|----------|
| 李 昊 | 1P-2p133 |
|-----|----------|

## キーワード索引

| A                                      |                              |                                       |                               |
|--|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| a functional amino acid accumulation   |                              | adhesin                               | 2P-1p019                      |
|  | 1P-1p070                     | adhesion                              | 2P-1p019                      |
| 2A-peptide                             | 3P-2a180                     | adipocytes                            | 2P-2p167                      |
| abiotic stress                         | 3P-2p152                     | Adipose-derived stem cell             | 1P-2p142                      |
| absolute quantification                | 1P-1p066                     | Adipose-like Microtissues             | 1P-2p142                      |
| accumulation                           | 1P-1p102                     | ADP-ribose                            | 1P-1p007                      |
| accumulative gene integration          |                              | aerial microalgae                     | 3P-1p112, 3P-1p113,           |
|  | 1P-2p156, 1P-2p158, 1S-Ep03  |                                       | 3P-2a160                      |
| acetaldehyde                           | 2P-1p065, 2P-1p066           | aerobic culture                       | 3P-2p175                      |
| acetate                                | 1P-1p047, 3P-2p145, 3P-2p160 | <i>Aeromonas caviae</i>               | 3P-1a085                      |
| acetate kinase                         | 2P-1p002                     | affinity chromatography               | 1P-2p172,                     |
| acetate overoxidation                  | 1P-1p049                     |                                       | 2P-2p146, 2P-2p147            |
| acetic acid                            | 1P-1p128, 2P-1p120           | affinity peptide                      | 3P-1p067                      |
| acetic acid bacteria                   | 3P-1p080                     | affinity resin                        | 2P-2p148                      |
| acetic acid fermentation               | 1P-1p049                     | affinity selection                    | 3P-1p024                      |
| <i>Acetobacter</i>                     | 1P-1p049                     | Ag modified TiO <sub>2</sub>          | 3P-1p110                      |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i>        | 1P-1p042,                    | Ag-AuNPs                              | 1P-2p183                      |
|  | 1P-1p044, 1P-1p050           | agar                                  | 2P-2p136                      |
| Acetoin                                | 1S-Cp03                      | agar plate                            | 2P-2p137                      |
| acetonitrile                           | 1P-1p034                     | agarase                               | 3P-1p056                      |
| acetyl-CoA synthetase                  | 1P-1p049                     | aggregation                           | 1P-2p145, 3P-2a133            |
| acetylcholinesterase                   | 1P-1p009                     | agitation                             | 2P-2p154                      |
| acid and bile tolerance                | 2P-1p086                     | agmatine                              | 1P-1p050                      |
| acid carboxypeptidase                  | 1P-1p080                     | agricultural waste                    | 3P-2p134                      |
| acid degradation                       | 3P-1a106                     | 3,4-AHBA                              | 3P-2p143                      |
| acid hydrolysis                        | 1P-1p117, 2P-2p136           | air pollution                         | 1P-1p109                      |
| acid sensing ion channels              | 1P-1p098                     | airlift bioreactor                    | 1P-1p125                      |
| acid tolerance                         | 1P-1p014, 2P-1p119,          | albacycline                           | 3P-1a098                      |
|  | 3P-1a012                     | alcohol oxidase                       | 2P-1p067                      |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  | 2P-1p012                     | alcoholic fermentation                | 1P-1p069                      |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>   | 3P-1a071                     | aldehyde dehydrogenase                | 1P-1p042                      |
| acidophilic bacteria                   | 2P-2p136                     | aldoxime dehydratase                  | 1S-Dp04                       |
| <i>Acidovorax</i> sp.                  | 2P-1p103                     | alfa-EG                               | 2P-1p069                      |
| <i>Acinetobacter</i>                   | 2P-2p143, 3P-1a004           | alginate                              | 3P-1a040, 3P-1a114, 3P-1p072  |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> P23 |                              | alginate lyase                        | 3P-1a040                      |
|  | 2S-Ap03                      | Alginate unsaturated oligosaccharides | 1P-2p167                      |
| <i>Acinetobacter towneri</i>           | 3P-1a104                     | alkalinity                            | 1P-1p131                      |
| ACP                                    | 2S-Ep03                      | alkaliphilic                          | 3P-2p174                      |
| acryl acid                             | 2P-1p090                     | alkane biosynthesis                   | 3P-1p063                      |
| acrylamide                             | 2P-1p090                     | Allergen-free culture media           | 2P-1p093                      |
| Actin filament                         | 3P-2p163                     | allergy                               | 2P-1p083                      |
| actinomycetes                          | 1P-1p011, 1P-1p102,          | alliin                                | 3P-1p071                      |
|  | 2S-Ep01, 2S-Ep02,            | allosteric                            | 1P-1p006                      |
|  | 3P-1a098, 3P-1a099           | alpha synuclein                       | 3P-1p026                      |
| activated sludge bulking               | 3P-1p108                     | alpha-1,3-glucan                      | 3P-1p013                      |
| activation                             | 1A-Aa01                      | alpha-1,3-glucan synthase             | 3P-1p015                      |
| active site residues                   | 3P-1p055                     | alpha-1,3-glucanase                   | 1P-1p012                      |
| activity assay                         | 3P-1a013                     | Alzheimer's disease                   | 2P-1p021                      |
| acyl carrier protein                   | 3P-2a138                     | amazake                               | 1P-1p089                      |
| acyl-ACP reductase                     | 3P-1p063                     | amidase                               | 2P-1p009                      |
| acyl-CoA synthetase                    | 2P-1p006                     | amide bond                            | 2P-1p006                      |
| acyltransferase                        | 3P-1a031                     | amine coupling                        | 3P-1a062                      |
| ADAM                                   | 2P-2p134                     | amino acid                            | 1P-1p039, 1P-1p084,           |
|  |                              |                                       | 1P-2p168, 2P-1p009,           |
|  |                              |                                       | 2P-1p071, 3S-Ep03             |
|  |                              |                                       | 1S-Bp03                       |
|  |                              |                                       | 2P-1p005                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a135                      |
|  |                              |                                       | 1P-1p057                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p010                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p008, 3P-1a003            |
|  |                              |                                       | 3P-1p074,                     |
|  |                              |                                       | 3P-1p076                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a140                      |
|  |                              |                                       | 3P-1p012                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p027                      |
|  |                              |                                       | 3P-1p009                      |
|  |                              |                                       | 3P-2p137                      |
|  |                              |                                       | 1P-1p028, 2P-1p021,           |
|  |                              |                                       | 3P-1p026, 3P-2p139            |
|  |                              |                                       | 3P-1a074                      |
|  |                              |                                       | 3P-1a102                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p111                      |
|  |                              |                                       | 3P-1p121                      |
|  |                              |                                       | 1P-1p104                      |
|  |                              |                                       | 2P-2p182                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a166                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a164                      |
|  |                              |                                       | 1P-1p093                      |
|  |                              |                                       | 3P-1a091                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p079                      |
|  |                              |                                       | 3P-1p096                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p027                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p091                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a164,                     |
|  |                              |                                       | 3P-2a165                      |
|  |                              |                                       | 1P-2p185                      |
|  |                              |                                       | 1P-2p166                      |
|  |                              |                                       | 3P-2a151                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p054, 2S-Ep01,            |
|  |                              |                                       | 3P-1a024, 3P-1p093,           |
|  |                              |                                       | 3P-1p094, 3P-2a136, 3P-2a149  |
|  |                              |                                       | 1P-2p133, 1P-2p144,           |
|  |                              |                                       | 1P-2p156, 1S-Ap03,            |
|  |                              |                                       | 2P-1p028, 2P-1p031,           |
|  |                              |                                       | 2P-1p032, 2P-1p033, 2P-1p035, |
|  |                              |                                       | 2P-2p146, 2P-2p148, 2P-2p178, |
|  |                              |                                       | 2P-2p187, 2S-Bp03, 2S-Ca02,   |
|  |                              |                                       | 3P-1a054, 3P-1a055, 3P-1a056, |
|  |                              |                                       | 3P-1a057, 3P-1a060, 3P-1a061, |
|  |                              |                                       | 3P-1p062, 3P-1p091, 3P-2a182  |
|  |                              |                                       | 1P-2p163                      |
|  |                              |                                       | 2P-2p147, 2P-2p149            |
|  |                              |                                       | 3P-1a059                      |
|  |                              |                                       | 2P-1p030                      |
|  |                              |                                       | 1P-2p159                      |

|  |  |  |   |   |   |  |
|--|--|--|---|---|---|--|
| antibody-drug conjugate                          | 3P-1a062   |  | 3P-1p088  | <i>Bifidobacterium longum</i>                         | 3P-1a019  |  |
| anticancer drug                                  | 2P-1p110   | <i>Aspergillus</i> sp.                               | 1P-1p015  | bile acid   | 3P-2p132  |  |
| antifungal agent                                 | 3P-1p097   | <i>Aspergillus terreus</i>                           | 3P-1a069  | binding   | 1P-1p031  |  |
| antifungal antibiotics                           | 3P-2a150   | aspartic protease                                    | 1P-1p018  | binding analysis                                      | 3P-2a157  |  |
| antifungal effect                                | 3P-1p127   | Assay  | 1P-2p180  | binding competition                                   | 3P-1a021  |  |
| antihypertension                                 | 2P-1p095   | asymmetric hydrolysis                                | 3P-1p046  | Bio-3D printer  | 1P-2p153, 1P-2p154  |  |
| antimicrobial peptide                            | 3P-2a164,<br>3P-2a165, 3P-2a167, 3P-2a168  | asymmetric synthesis                                 | 1S-Dp04   | bio-artificial organ                                  | 2S-Cp01   |  |
| antioxidant                                      | 2P-1p096, 3P-1a068,<br>3P-2a147, 3P-2p142  | <i>ATF1</i>  | 1P-1p073  | bio-ethanol   | 1P-1p117  |  |
| antioxidation                                    | 2P-1p079   | atopic dermatitis                                    | 3P-1p087  | bio-hydrogen production                               | 3P-1p073  |  |
| antitumor  | 3P-2p138   | ATP regeneration                                     | 2P-1p002  | bio-nanocapsule                                       | 1P-2p132, 1P-2p179  |  |
| antivirus  | 3P-1p068   | <i>Aurantiochytrium</i>                              | 3P-1a093  | bio-oil   | 3P-1a122  |  |
| AOD isozymes                                     | 2P-1p067   | <i>Aureobasidium pullulans</i>                       | 3P-1a064  | bioactive compound                                    | 3P-1p112  |  |
| aptamaer   | 2P-2p169   | authentication                                       | 2P-1p082  | bioactive peptide                                     | 3P-2a169, 3P-2a170  |  |
| aptamer  | 2P-2p181   | autothermal thermophilic aerobic<br>treatment        | 3P-1a105  | bioactive substances                                  | 2P-1p088  |  |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>                      | 3P-1a018,<br>3P-1p033  | Autothermal thermophilic aerobic<br>treatment system | 3P-1a104  | bioassay  | 2P-1p098  |  |
| arachidonic acid                                 | 3P-1a072   | autotransporter                                      | 2P-1p019  | biocatalysis  | 3P-1a115  |  |
| archaea  | 1P-1p013, 3P-1a078, 3P-1p039   | <i>Awamori</i>                                       | 1P-1p082, 2S-Aa04, 3S-Ap03                                    | biochemicals  | 2S-Dp01   |  |
| Archaerhodopsin                                  | 3P-1p126   | awamori yeast  | 1P-1p074  | biocontrol agent                                      | 3P-1a099, 3P-1a100  |  |
| aromatic amine                                   | 1P-1p040, 3P-1p069   | <b>B</b>   |   |   | bioconversion   | 1S-Dp01, 3P-1a039,<br>3P-1a123, 3P-1a128, 3P-2p172 |
| aromatic amino acid                              | 3P-1a035,<br>3P-1p035  | B cell   | 2P-1p034  | biodegradable plastic                                 | 3P-1a006,<br>3P-1a036, 3P-1p028   |  |
| aromatic ring compound                           | 2P-1p055,<br>2S-Ep04   | <i>Bacillus cereus</i>                               | 3P-1a015  | biodegradable polymer                                 | 3P-1p104  |  |
| arsenic  | 2P-1p102   | <i>Bacillus coagulans</i>                            | 3P-1a123  | biodegradation  | 2P-1p014, 2P-1p106,<br>2P-1p108, 2P-1p109,<br>2P-1p110, 3P-1p101  |  |
| arsenic hyperaccumulator plant<br><i>vittata</i> | 1P-1p107   | <i>Bacillus megaterium</i>                           | 3P-2a152  | biodiesel fuel  | 1P-1p052, 3P-1a103,<br>3P-1p116   |  |
| <i>Arthrobacter</i>                              | 1P-1p057   | <i>Bacillus</i> sp.                                  | 1P-1p016, 2P-1p084,<br>3P-1a013, 3P-1a073, 3P-2a133           | biodiesel waste                                       | 1P-1p053  |  |
| artificial human cell                            | 3S-Ep01  | <i>Bacillus subtilis</i>                             | 2P-1p107, 2S-Ea04,<br>3P-1a014, 3P-1a023, 3P-1p125            | biodistribution                                       | 1P-2p136  |  |
| Artificial Intelligence                          | 3S-Bp07  | <i>Bacillus thuringiensis</i>                        | 2S-Ap01   | biodiversity  | 1S-Cp06, 3S-Cp04  |  |
| artificial protein                               | 2P-1p026   | bacteria   | 2P-1p114, 2P-1p115, 3P-1a101,<br>3P-1a103, 3P-2a163, 3P-2p157 | bioelectronics  | 2S-Ca07, 2S-Da02  |  |
| Asia   | 3S-Dp02  | bacterial community structure                        | 3P-1a105  | bioethanol  | 1P-1p126, 3P-1a028  |  |
| aspartic acid                                    | 2P-1p056, 3P-1p042   | bacterial consortium                                 | 1S-Cp06   | bioethics   | 2S-Ba05   |  |
| <i>Aspergillus</i>                               | 3P-1p010, 3P-1p013   | bacterial counting                                   | 3P-1p099  | biofabrication  | 2S-Cp01   |  |
| <i>Aspergillus aculeatus</i>                     | 1P-1p004,<br>3P-1p011, 3P-1p012  | bacterial growth enhancement                         | 3P-1a100  | biofilm   | 1P-1p113, 3P-1a102,<br>3P-1p021, 3P-1p100, 3P-2p150   |  |
| <i>Aspergillus flavus</i>                        | 3P-1a005   | bacterial luciferase                                 | 3P-1p063  | biofiltration   | 3S-Bp06   |  |
| <i>Aspergillus glaucus</i>                       | 1P-1p018   | bactericidal effect                                  | 3P-1p128, 3P-1p129  | bioflocculant   | 2P-1p063  |  |
| <i>Aspergillus kawachii</i>                      | 1P-1p081,<br>2P-1p072  | bacteriocin  | 3P-2a161  | biofuel   | 1P-1p118, 3P-1a002,<br>3P-1a079, 3P-1p119   |  |
| <i>Aspergillus luchuensis</i>                    | 1P-1p082,<br>3S-Ap03   | bacteriome   | 3S-Bp06   | Biofuel production                                    | 3P-1p021, 3P-1p105  |  |
| <i>Aspergillus nidulans</i>                      | 1P-1p027, 1S-Bp02,<br>3P-1p054, 3P-2a139   | Bacteriorhodopsin                                    | 3P-1p126  | Biohydrogen   | 3P-1p115  |  |
| <i>Aspergillus niger</i>                         | 3P-1a075, 3P-1p057,<br>3P-2a142  | baculovirus  | 3P-1a050, 3S-Bp05   | bioimaging  | 2S-Da01   |  |
| <i>Aspergillus oryzae</i>                        | 1P-1p006, 1P-1p010,<br>1P-1p037, 1P-1p080,<br>2P-1p010, 2P-1p040,<br>2P-1p090, 2P-2p134, 3P-1a005,<br>3P-1a076, 3P-1a077, 3P-1p003,<br>3P-1p004, 3P-1p005, 3P-1p007,<br>3P-1p008, 3P-1p009, 3P-1p014,<br>3P-1p015, 3P-1p075, 3P-1p088,<br>3P-2p146, 3S-Dp03, 3S-Dp04 | bagasse  | 1P-1p117  | bioinformatics  | 1S-Bp02, 2P-2p174,<br>3P-1p094  |  |
| <i>Aspergillus section Flavi</i>                 | 3P-1p088   | Bakanae disease                                      | 2S-Ap04   | biological arsenic removal from<br>contaminated water | 1P-1p107  |  |
| <i>Aspergillus sojae</i>                         | 2A-Ap01, 3P-1p083,   | bamboo cultured cells                                | 2S-Ba03   | biological control agent                              | 3P-1a098  |  |
|  |  | basidiomycetes                                       | 3P-1p017, 3S-Bp04   | biological filtration                                 | 3P-1a107  |  |
|  |  | BDF waste  | 3P-2p177  | Biological medicine                                   | 3P-1p022  |  |
|  |  | bee  | 3P-2a172  | biological saccharification                           | 2S-Dp03   |  |
|  |  | beer   | 1P-1p100, 2P-1p070, 3S-Ap05                                   | bioluminescence                                       | 2P-1p039  |  |
|  |  | beige adipocytes                                     | 3P-1a084  | <i>biomarker</i>                                      | 3P-1a004  |  |
|  |  | beta-1,3-glucan                                      | 3P-1a064  | biomass   | 1P-1p047, 1P-1p123,<br>1P-1p129, 1S-Cp01,<br>2P-1p059, 2P-1p116, 2P-1p131,<br>2S-Dp01, 3P-1a081, 3P-1a128,<br>3P-1p106, 3P-1p107, 3S-Ap01 |  |
|  |  | beta-1,4-mannanase                                   | 3P-1p055  |   |   |  |
|  |  | beta-galactofuranose                                 | 1P-1p015  |   |   |  |
|  |  | beta-galactofuranosidase                             | 1P-1p015  |   |   |  |
|  |  | beta-glucosidase                                     | 3P-1a025  |   |   |  |
|  |  | BG2-c6 cell  | 3P-2p139  |   |   |  |
|  |  | bifidobacterium                                      | 1S-Bp05, 3P-1a020,<br>3P-1p023, 3P-2p148                      |   |   |  |

|                                      |   |   |                                 |                                    |  |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------|------------------------------------|--|
| biomass conversion                   | 3P-1a115  | C                                       | Cell quality                    | 2P-2p162                           |  |
| biomaterial                          | 1P-2p138, 2S-Cp01   |   | cell separation                 | 2P-2p178                           |  |
| biomaterials                         | 2S-Cp05   | c-kit                                   | 3P-1p064                        | cell sheet                         | 1P-2p152   |
| biomimetic membrane                  | 3P-2a175  | <sup>13</sup> C-metabolic flux analysis | 3P-1a095                        | cell surface                       | 3P-1a110   |
| biomineral                           | 1P-1p108  | <i>C. hassaku</i>                       | 3P-1p085                        | cell surface display               | 2P-1p032, 2P-1p052   |
| Biom mineralization                  | 2P-1p103, 2P-1p126,<br>3P-1a015, 3P-1p123   | Caco-2 cells                            | 3P-2p147                        | cell surface engineering           | 2P-1p059   |
| biopesticide                         | 2S-Ap01   | <i>Caenorhabditis elegans</i>           | 1P-1p103,<br>2P-1p088           | cell wall                          | 3P-1p097   |
| Biopharmaceutics                     | 3P-1p084  | calcium                                 | 3P-1p120, 3P-2p154              | cell wall components               | 1P-1p101   |
| Bioplastics                          | 3P-1p102  | Calcium binding site                    | 3P-1p042                        | cell-based assay                   | 1P-2p141, 3P-1p096   |
| biopolymer                           | 1P-1p040, 3P-1p069  | calcium carbonate                       | 3P-1a101                        | cell-cell interactions             | 3P-2a146   |
| bioprinting                          | 2S-Cp01   | <i>Calnexin</i>                         | 1P-1p038                        | cell-cell adhesion                 | 2P-2p151, 2P-2p160   |
| bioprocess                           | 2P-2p172, 2S-Dp01   | cAMP                                    | 1P-1p065                        | cell-free protein synthesis        | 3S-Ep05  |
| bioprocessing device                 | 2S-Da02   | Cancer                                  | 2P-2p170                        | Cell-free protein synthesis system | 3P-1p042   |
| bioreactor                           | 2S-Ba04, 3P-2p172   | cancer cell                             | 2P-2p155                        | cellobiohydrolase                  | 1P-1p026   |
| biorefinery                          | 2S-Dp01, 2S-Dp04,<br>3P-1a116, 3P-1a117, 3P-1a126   | Cancer cells                            | 2P-1p035                        | cellulase                          | 1P-1p051, 1P-1p097,<br>1P-1p116, 3P-1a026,<br>3P-1a077, 3P-1p016 |
| biorefinery enzymes                  | 2S-Dp02   | Cancer Therapy                          | 3P-2a178                        | cellulase induction                | 3P-1p011   |
| bioremediation                       | 1P-1p035, 1P-1p103,<br>1P-1p111, 2P-1p111, 2P-1p112   | <i>Candida antarctica</i> lipase A      | 2P-1p011                        | cellulose                          | 3P-1a077   |
| bioresources                         | 2S-Dp04   | capillary electrophoresis               | 2S-Bp02                         | cellulose nanowhisker              | 1P-1p120   |
| biosensing                           | 3P-1p067  | capsaicin                               | 1P-2p164                        | cellulosic biomass                 | 1P-1p118, 2S-Dp03  |
| biosensor                            | 1P-2p175, 2P-1p035,<br>2P-1p102, 2S-Bp03, 2S-Da01,<br>2S-Da03, 2S-Da07, 3P-2a158              | capturing                               | 3P-1a022                        | <i>Cellulosimicrobium</i>          | 1P-1p120, 3P-1a046   |
| Biosilica                            | 2S-Ca04   | carbon catabolite repression            | 3P-1p008,<br>3P-1p077, 3P-2p176 | cellulosome                        | 2S-Dp03, 3P-1p044  |
| biosorption                          | 2P-1p118  | carbon dioxide                          | 3P-2a176                        | <i>Cellvibrio</i> sp. WU-0601      | 3P-1p056   |
| biosurfactant                        | 1P-1p037, 2P-1p043  | carbon starvation                       | 2P-2p134                        | central metabolism                 | 2P-1p053   |
| biosynthesis                         | 2S-Ba01, 2S-Ba03,<br>2S-Ep04, 2S-Ep05,<br>3P-1p040, 3P-2a136,<br>3P-2a139, 3P-2a149, 3P-2a161 | carbon steel                            | 1P-1p112                        | cesium                             | 1P-1p102, 1P-1p105   |
| Biotransformation                    | 3P-2p173  | carbonyl reductase                      | 1P-1p001                        | cesium recovery                    | 1P-1p106   |
| biphenyl/PCB                         | 3P-1a118  | cardiomyocyte differentiation           | 1P-2p147                        | <i>Chamberlinius hualienensis</i>  | 1S-Dp02  |
| Bispecific antibody                  | 3P-2a178  | cardiomyocytes                          | 1P-2p146                        | chaperonin                         | 3P-1p027   |
| bisphenol A                          | 2P-1p106  | carnosine                               | 3P-1p053                        | characterization                   | 3P-1p048, 3P-1p101   |
| bisphenol S                          | 2P-1p108  | Carotenoids biosynthesis                | 3P-1p122                        | charged lipid                      | 3P-2a174, 3P-2a175,<br>3P-2p136                                  |
| Black pepper                         | 1P-1p092  | casein                                  | 3P-2a160                        | charged-peptide                    | 3P-1a044   |
| BmNPV                                | 1P-1p030  | catabolite repression                   | 1P-1p061                        | chelate reaction                   | 3P-2a147   |
| <i>Bombyx mori</i>                   | 3P-1p060  | catalysis                               | 3P-1p035                        | chemical reaction                  | 3P-2a153   |
| Boolean logic gate                   | 3P-1a021  | Cathepsin                               | 2S-Ca04                         | chemical inhibitor                 | 3P-2p153   |
| boric acid                           | 2P-1p100  | cationic peptide                        | 3P-2a165, 3P-2a167,<br>3P-2a169 | chemical modification              | 3P-1p062   |
| Botulinum Haemagglutinin             | 2P-2p175  | <i>cbhl</i>                             | 3P-1p012                        | chemical sensor                    | 2S-Bp01  |
| brackish lake                        | 2P-1p113  | CCAAT                                   | 3P-1p010                        | chemotaxis                         | 2P-1p100, 3P-1a016   |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | 1P-1p048, 1P-1p056  | CD90                                    | 2P-2p154                        | chicken                            | 1P-2p166   |
| BRET                                 | 1P-2p173  | cDNA                                    | 2S-Ea01                         | chimeric antigen receptor          | 1S-Ep05  |
| <i>Brevibacillus choshinensis</i>    | 1P-1p032  | cDNA display                            | 2S-Ca05                         | chimeric protein                   | 3P-1a045   |
| bromate                              | 3P-1a111  | CdS nanoparticles                       | 3P-1p045                        | chimeric receptor                  | 2A-Cp01, 3P-1p064,<br>3P-1p065                                   |
| brown algae                          | 3P-1a130  | CE-MS                                   | 3P-1a092                        | Chinese hamster                    | 1P-2p161   |
| brown sugar <i>shochu</i>            | 2P-1p080  | cell behaviors                          | 1P-2p145                        | Chinese hamster ovary              | 1P-2p155,<br>2P-1p030, 2P-2p184                                  |
| <i>BTN2</i>                          | 2P-1p048  | Cell death                              | 3P-1p065                        | Chinese Hamster Ovary (CHO) cells  | 1P-2p162, 1P-2p163   |
| <i>Burkholderia</i> sp.              | 1P-1p009  | cell fate control                       | 2A-Cp01                         | Chinese hamster ovary cells        | 1P-2p144,<br>1P-2p160  |
| butanol                              | 1A-Aa03, 1P-1p051, 3P-1a088,<br>3P-1a089, 3P-1a090, 3P-1p079                                  | cell free translation                   | 3S-Ep01                         | chiral compound                    | 3P-1p046   |
| butanol fermentation                 | 3P-1p077  | cell fusion                             | 1P-1p072                        | chiral cyclic monoamide            | 3P-1p070   |
| butyrate                             | 1P-1p058  | Cell image analysis                     | 2P-2p170                        | <i>Chiromantes haematocheir</i>    | 2P-1p116   |
| byproduct                            | 3P-2p168  | cell immobilization                     | 1P-2p138, 1P-2p150              | chitin                             | 1P-1p013, 3P-1a038   |
|                                      |   | cell line development                   | 1P-2p161                        | chitin binding protein             | 3P-1a046   |
|                                      |   | cell line establishment                 | 1P-2p155                        | chitinase                          | 1P-1p013, 1P-1p014, 3P-1a038,<br>3P-1a046                        |
|                                      |   | cell membrane                           | 1P-2p150, 2P-1p017              | chitosan                           | 3P-1a110   |
|                                      |   | cell microenvironments                  | 2S-Cp06                         |                                    |  |
|                                      |   | cell migration                          | 2S-Cp02                         |                                    |  |
|                                      |   | cell migratory dispersion               | 2P-2p151                        |                                    |  |
|                                      |   | cell morphology                         | 3P-1p096                        |                                    |  |
|                                      |   | cell penetrating peptide                | 3P-2a156                        |                                    |  |





1P-1p060, 1P-1p062, 1P-1p127,  
2P-1p043, 2P-1p044, 2P-1p085,  
2S-Aa03, 3P-1a066, 3P-1a068,  
3P-1a072, 3P-1a074, 3P-1p069,  
3P-1p073, 3P-1p075, 3P-2a177,  
3P-2p153, 3P-2p175, 3S-Dp03  
fermentation inhibitors 3P-2p160  
fermentation process 2P-1p074  
fermented beverage of plant extracts  
1P-1p084  
fermented food 2P-1p078, 2P-1p087  
fermented milk 1P-1p087  
fermented soybean 1P-1p094  
feruloyl esterase 1P-1p019, 1P-1p123  
fiber 2P-2p164, 2S-Da04, 3P-1a127  
fibroblast 1P-2p161  
fibronectin 2S-Da04  
filamentous fungi 1P-1p124, 3P-1p006,  
3P-2a144  
Fish 3P-1a087, 3P-2a154  
*Fistulifera solaris* 3P-1p116  
fixed-bed bioreactor 3P-1p073  
flash freezing 2P-2p158  
*Flavobacterium* 3P-1p050  
flavoprotein 1P-1p033  
flavor compounds 1P-1p100  
floating microalgae 3P-1p021  
flocculating yeast 3P-2p153  
flocculation 2P-1p117, 3P-2p149  
flow cytometry 3P-1a060, 3P-1a061,  
3P-1p099  
Fluorescence 3P-1a113  
fluorescence material 3P-2a143  
fluorescence spectra 3P-1p062  
fluorescent proteins 3P-1p029  
fluorine ion 2P-1p110  
flux analysis 2P-1p060  
FMO 2P-1p004  
folding mechanism 3P-1a051  
food 1P-1p091  
forest soil 1S-Cp06  
formate oxidase 3P-1p035  
formate oxidase 3P-1a035  
formic acid 1P-1p054  
8-formylFAD 3P-1a035, 3P-1p035  
Freeze-Crush-Infusion (FCI) 3S-Ap04  
fruiting 3S-Bp04  
fruiting body 3P-1p081  
fruits 3S-Ap04  
fucosylation 2P-2p184  
functional material 3P-2p137  
functional peptide 1A-Aa04  
functionality 3P-2a172  
fungicidal activity 3P-2a134  
fungus 1P-1p082, 2P-1p109  
furfural 2P-1p049  
*Fusarium* 1P-1p124

## G

GABA 1P-1p046, 1P-1p068,  
1P-1p084, 1P-1p087, 2P-1p086  
gamma-glutamyltranspeptidase  
3P-1p047  
*Ganoderma lucidum* 3P-1a067  
gas-liquid phases 3P-2a176  
GC-FID 2P-1p075  
GC/MS 1P-1p100, 1P-1p130  
gelation 2P-2p180, 2S-Cp04  
gene cloning 3P-1p051  
gene combination 3S-Bp02  
gene disruption 1P-1p079, 2P-1p063,  
3P-1a031  
gene expression 2P-1p089, 3P-1a019,  
3P-1a033, 3P-1p023,  
3P-1p031, 3P-1p032  
gene expression analysis 3P-1a038,  
3S-Cp06  
gene knockout 1P-1p039, 3P-1p023  
gene regulation 3P-1p083  
gene therapy 1S-Ep02, 1S-Ep05,  
1S-Ep06  
gene transfer 3P-1a023  
genetic epidemiology 1S-Bp01  
genetic resources 3S-Cp04  
genome 1P-1p075, 1S-Bp04,  
2P-1p106, 2S-Ea03, 3S-Cp02  
genome analysis 3P-1p006  
genome editing 1S-Ep06, 3P-1a029,  
3P-1p004, 3P-1p005  
genome editing tools 1P-2p157  
genome engineering 1S-Ep01, 1S-Ep02,  
2P-2p132, 2S-Ea04, 3P-1a028  
genome integration 3S-Bp01  
genome mapping 2P-1p122  
genome minning 3S-Cp03  
genome synthesis 2S-Ea04  
genome-mining 3P-1p093  
*Geobacillus stearothermophilus*  
3P-1a034  
*Geobacillus thermodenitrificans*  
3P-1p118  
*Geobacter* spp. 2P-1p127  
geographical origin 2P-1p082  
GFP 2P-2p171, 3P-2p156  
GH117 family enzyme 3P-1p056  
GH134 3P-1p054, 3P-1p055  
ginger 2S-Aa03  
*glmS* ribozyme 2P-2p182  
glomeruli 2P-2p152  
glucose 1P-1p121, 1P-1p122  
glucose concentration 3P-2p162  
glucose consumption rate 1P-1p045  
glucose dehydrogenase 3P-1a043  
glucose repression 2P-1p067  
glutamate fermentation 3P-1a010  
glutaminase 2A-Ap01

glycerol 1P-1p052, 1P-1p053,  
3P-1a127, 3P-1p039  
glycoengineering 2P-2p184  
Glycogen 3P-1p120  
glyconeogenesis 2P-1p094  
glycosidase 1P-1p016, 2S-Bp05  
glycoside hydrolase 1P-1p011  
glycosylation 2P-2p186  
glycosylceramide 1P-1p081, 2P-1p077,  
3S-Dp05  
glycosyltransferase 1P-2p165, 2P-2p186,  
2S-Bp05, 3P-1p060  
glycosynthase 2P-2p187  
*Glycyrrhiza uralensis* 3P-1p030  
gnetin C 2P-1p097  
gold colloid 3P-2a158, 3P-2a162  
gold plating 1P-2p152  
goldfish 3P-2a182  
GPCR 3P-1a063, 3P-2a183  
gram-negative bacteria 3P-2p133  
green algae 3P-1a072, 3P-1p105  
green florescent protein 2S-Bp02  
green wall 1P-1p109  
GroEL 2P-1p022  
GroES 2P-1p022  
groundwater 1P-1p111  
group I intron 2S-Ca06  
Group I ribozyme 2P-2p183  
growth 3P-2a146  
growth control 3P-2a153  
growth delay analysis 3P-2p155  
growth inhibitor 1P-1p054, 3P-1a116  
growth stimulation 1P-1p076  
gut 3S-Dp02  
gut microbiota 2P-1p038, 3P-1a073

## H

H4IIEC3 2P-1p094  
hair follicle germ 1P-2p151  
hair regenerative medicine 1P-2p151  
Half-adder 3P-1a021  
*Halomonas* 1P-1p046, 3P-2p175  
*Hansenula polymorpha* 3P-1a029  
HapX 3P-1p010  
heat lytic filamentous fungi 1P-1p121  
heat lytic fungi 1P-1p122  
heat of decomposition 1P-1p122  
heating process 3P-1a068  
HEK293 1P-2p140  
HEK293T cell 1P-1p029  
helicase 2S-Ea01, 2S-Ea02, 3P-1p018  
hemagglutinin 2P-1p016  
heme protein 3P-1p040  
HEMF 2P-1p076  
hemicellulose 1P-1p119  
hemocyanin 3P-2a139  
Hemoglobin A<sub>1c</sub> 1P-2p171  
hemolytic factor 3P-1a003  
heparan sulfate proteoglycan 1P-2p132

|  |   |   |  |  |  |
|--|---|---|--|--|--|
| hepatitis B virus                      | 1P-2p132                                  | hydrolase   | 3P-1p083   | <i>in vitro</i> molecular evolutionary |  |
| hepatocyte                             | 3P-1a052                                  | hydrolysates                                      | 2P-2p135, 3P-1a116   | engineering                            | 2A-Ep01  |
| HER2                                   | 3P-1p024                                  | hydrolysis  | 3P-1p104   | <i>in vitro</i> selection              | 2S-Ca05  |
| herbaceous biomass                     | 1P-1p121                                  | hydrophobic core                                  | 2P-1p025   | in vitro synthetic biology             | 3P-1a039   |
| Heterogeneity                          | 2P-2p162                                  | Hydrophobicity of the cell surface                |  | in-line monitoring                     | 3P-2p162   |
| heterologous production                | 2P-1p003,<br>3P-1a026, 3P-1p015, 3P-1p025 | hydrophobin                                       | 1P-1p037, 3P-2p146   | in-SPE derivatization method           | 1P-1p092   |
| HiCEP                                  | 1P-2p160                                  | hydroponics treatment                             | 1P-1p107   | inclusion body                         | 1P-1p032, 3P-1a058                                 |
| high amylose content rice              | 2P-1p072                                  | hydroquinone                                      | 2P-1p108   | indigo                                 | 3P-2p174   |
| high C/N ratio                         | 3P-1a129                                  | hydrothermal method                               | 3P-1p110   | induced pluripotent stem cell          | 2P-2p159   |
| high cell density                      | 2P-2p161                                  | 3-hydroxy-2-methylbutyrate                        | 3P-1a085   | induction system                       | 1P-1p025   |
| high density culture                   | 2P-2p160                                  | 3-hydroxyaspartate                                | 3P-1p046   | industry-academia collaboration        |  |
| high mannose enzyme                    | 1P-1p018                                  | 3-hydroxybutyric acid                             | 3P-2p175   |  | 1A-Aa02  |
| high specific activity                 | 2P-1p003                                  | hydroxycinnamic acid amide                        | 2S-Ba03  | industry-government-university         |  |
| High-resolution mass spectrometry      |   | Hydroxydaidzein                                   | 3P-2p173   |  | 2S-Aa04  |
|  | 3P-1a097                                  | 3-hydroxyhistidine                                | 1P-1p021   | inflammation                           | 1P-2p134, 2P-2p152                                 |
| high-throughput screening              | 1P-2p141,<br>1S-Bp02, 3P-1p096, 3P-2a178  | hydroxyl radical                                  | 3P-2a147   | influenza virus                        | 2P-1p016   |
| histone deacetylase                    | 2P-1p047                                  | hydroxylase                                       | 1P-1p020, 1P-1p021,<br>3P-1p040  | informational analysis                 | 1A-Aa04  |
| homocarnosine                          | 3P-1p053                                  | hydroxyllysine                                    | 1P-1p022   | inhibitor                              | 3P-1p068   |
| homogeneous glycan                     | 2P-2p187                                  | 5-hydroxymethyl-furfural                          | 3P-1a122   | initial viable cells                   | 2P-1p081   |
| Homology modeling                      | 3P-1a034,<br>3P-1p061                     | hydroxynirile lyase                               | 1S-Dp02  | injured microorganism                  | 3P-2p155   |
| homologous recombination               | 1P-2p156                                  | 3-hydroxyornithine                                | 1P-1p020   | inkjet                                 | 2S-Cp05  |
| Homozygous mutation                    | 1P-1p071                                  | hyperthermophile                                  | 1P-1p007, 1P-1p013,<br>3P-1p018, 3P-1p019  | inkjet cell printing                   | 2P-2p158   |
| hormesis                               | 2S-Ep01                                   | Hyphomicrobium                                    | 3P-1a107   | inkjet head                            | 2S-Cp05  |
| host defense peptide                   | 3P-2a168                                  |   |  | inkjet printing                        | 2S-Cp02, 2S-Cp03                                   |
| HPLC                                   | 1P-2p168, 1P-2p172                        |   |  | inoculum                               | 3P-1a106   |
| HPLC-ELSD                              | 1P-2p167                                  |   |  | <i>Inonotus obliquus</i>               | 2P-1p088,<br>2P-1p096, 3P-2p142                    |
| HSP70                                  | 3P-1a051                                  | identification                                    | 3P-1a005   | inositol                               | 3P-1a014   |
| Hsp90                                  | 3P-1a051                                  | IDH1/2  | 2P-1p036   | insect                                 | 3S-Ep02  |
| human induced pluripotent stem cell    |   | IgA   | 1P-1p101   | insoluble glucan                       | 1P-1p012   |
|  | 2P-2p160, 2P-2p161                        | IgG   | 1P-2p172, 3P-1a057   | Insulin resistance                     | 3P-1a084   |
| Human induced pluripotent stem cells   |   | Illumina Miseq                                    | 1S-Cp05  | insulin secretion                      | 1P-2p173   |
|  | 2P-2p175, 3P-2p163                        | Illumination                                      | 3P-1p076   | Insulin-like peptide                   | 1P-1p030   |
| human intestine                        | 2P-1p085                                  | Image analysis                                    | 1P-2p154, 2P-2p173   | integrin                               | 2P-2p163   |
| human iPS cells                        | 2P-2p167                                  | image-based analysis                              | 3P-2p164   | interface bioreactor                   | 2P-1p054   |
| human iPSCs                            | 2P-2p176                                  | imaging   | 1P-2p186   | interface screening system             | 2P-1p054   |
| human mesenchymal stem cells           |   | imaging mass spectrometry                         | 1P-2p187   | interleaflet interaction               | 3P-2a175   |
|  | 1P-2p145                                  | imidacloprid                                      | 2P-1p105   | intermittent illumination              | 3P-1p074   |
| human milk oligosaccharide             | 1S-Bp05                                   | iminodiacetic acid                                | 1P-2p137   | intracellular metabolites              | 1P-1p066   |
| Human retinal pigment epithelial cells |   | immobilization                                    | 1P-1p125, 1S-Dp04,<br>2P-1p090, 2P-2p143, 3P-1a055,<br>3P-1a057, 3P-1p066, 3P-1p067,<br>3P-2a158 | intracellular oil recovery             | 3P-2a179   |
|  | 2P-2p177                                  |   |  | intracellular redox state              | 3P-1a017   |
| human skin microbiome                  | 3P-1p087                                  | immobilized cell                                  | 3P-2p144   | inulinase                              | 3P-2p161   |
| hyaluronic acid                        | 1P-2p137                                  | immobilized enzyme                                | 1P-1p024,<br>3P-1a042, 3P-1a043  | iodine                                 | 3P-1p037   |
| hybrid material                        | 2S-Da02                                   | immunity  | 3P-2a182   | ion beam                               | 3P-2p159   |
| hybridoma technology                   | 3P-1a063                                  | immuno-assay                                      | 2S-Da01  | Ion chromatography                     | 3P-1a097   |
| hydrocarbon                            | 3P-1a078                                  | immunoelectron microscopy                         | 2P-1p052   | ion-beam                               | 3P-1a065, 3P-1a069                                 |
| hydrogel                               | 1P-2p137, 1P-2p138,<br>1P-2p143, 2S-Da06  | Immunoglobulin New Antigen Receptor               |  | ionic liquid                           | 3P-1p041   |
| hydrogen                               | 3P-1p124                                  | impact assessment                                 | 2P-1p104, 2P-1p105   | Ionic liquid pretreatment              | 2P-2p139,<br>3P-1a120                              |
| hydrogen production                    | 1P-1p129,<br>3P-1a125                     | in situ hybridization                             | 1P-1p029   | iPS cells                              | 1P-2p146, 1P-2p147,<br>1S-Ep02, 2P-2p162, 2P-2p172 |
| hydrogen-oxidizing bacteria            | 1P-1p059,<br>1P-1p063, 2P-1p130           | <i>in vitro</i> analysis                          | 1P-2p150   | iPSC                                   | 3P-2p164   |
| hydrogenase                            | 1P-1p059, 3P-1p121,<br>3P-1p124           | <i>in vitro</i> cancer model                      | 1P-2p141   | iron respiration                       | 2P-1p057   |
| hydrogenase gene                       | 3P-1a125                                  | <i>in vitro</i> coupled transcription/translation |  | iron-sulfur cluster                    | 3P-1p010   |
| <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>    | 1P-1p063                                  | in vitro diagnostic                               | 2A-Ep01<br>2S-Bp04   | ISAAC                                  | 2S-Da05  |
|  |   |   |  | ISFET                                  | 1P-1p009   |
|  |   |   |  | iso-propanol                           | 3P-1p078   |
|  |   |   |  | isoamyl acetate                        | 1P-1p073, 2P-1p047                                 |
|  |   |   |  | isobutanol                             | 2P-1p068   |

|   |  |   |   |  |                              |
|---|--|---|---|--|------------------------------|
| Isochorismatase superfamily             | 2P-1p122   | <i>Lactobacillus sakei</i>              | 1P-1p089  | low shear and modeled-microgravity       |                              |
| isoelectric focusing                    | 3P-2a168   | <i>Lactococcus lactis</i>               | 1P-1p039,   | culture                                  | 3P-2p148                     |
| isolation                               | 1P-1p120, 3P-1p101, 3P-1p113   |   | 1P-1p087, 2P-1p098  | lower temperatures and light intensities |                              |
| isopropanol                             | 3P-1a083   | laminaribiose                           | 3P-1p050  | LPS-neutralizing activity                | 3P-2a165                     |
| isoquinoline alkaloids                  | 2S-Ba05  | laminarioligosaccharide                 | 3P-1p050  | luciferase                               | 2P-2p153                     |
| <i>Issatchenkia orientalis</i>          | 2P-1p119   | larvae                                  | 3P-2a172  | Lung cell                                | 3P-2p167                     |
| itaconic acid                           | 3P-1a069   | laser phase shift                       | 2P-2p155  | lyase                                    | 1S-Dp01                      |
| ITO electrode                           | 1P-2p174   | LC-MS                                   | 1P-1p093, 1P-2p167  | lymphocyte-microarray chip               | 2S-Da05                      |
| <b>J</b>                                |  |   |   |  |                              |
| Japanese diet                           | 3S-Dp01  | LC-TOFMS                                | 1P-2p169  | lysine hydroxylase                       | 1P-1p022                     |
| Japanese food                           | 3S-Dp01  | LC/MS                                   | 1P-1p130, 2P-1p071  | lysozyme                                 | 1S-Bp05                      |
| Japanese sake                           | 1P-1p083   | LDH activity assay                      | 2P-2p156  | <b>M</b>                                 |                              |
| Japanese sake yeast                     | 1P-1p070   | LEA peptide                             | 2P-2p141, 3P-2p152  | <i>M. thermoacetica</i>                  | 1P-1p128                     |
| Joint development                       | 2S-Aa01  | Lectin AAL                              | 1P-2p171  | Machine Learning                         | 1P-2p181, 3S-Bp07            |
| jojoba                                  | 1P-1p130   | leguminous bacteria                     | 1P-1p048  | Mackinawite                              | 2P-1p126                     |
| <i>Junmai-shu</i>                       | 2P-1p069   | <i>Lemna minor</i>                      | 2S-Ap03   | macroalga                                | 3P-1a115, 3P-1a131, 3P-1p118 |
| <b>K</b>                                |  |   |   |  |                              |
| K <sup>+</sup> homeostatis              | 2P-1p017   | leucine responsive regulatory protein   | 3P-1p080  | macroalgae                               | 2S-Dp02                      |
| keratin                                 | 1P-1p031   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>        | 1P-1p012  | macrophage                               | 1P-2p134                     |
| kinase                                  | 2P-1p002   | levulinic acid                          | 3P-1p095  | magnetite nanoparticle                   | 1P-2p141                     |
| kinetic modeling                        | 2P-1p062   | library selection                       | 2A-Cp01   | maintenance culture                      | 1P-2p146, 2P-2p175           |
| kinetic paramater                       | 3P-1p038   | life span                               | 2P-1p088  | MAL activator                            | 3P-1p014                     |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>             | 1P-1p072   | lifestyle disease                       | 1S-Bp01   | Malate dehydrogenase                     | 3P-1a034                     |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i>          | 1P-1p126, 3P-2p161   | Light dark cycles                       | 3P-1p117  | <i>MALDI-TOF MS</i>                      | 3P-1a004, 3P-1a005, 3P-1a104 |
| Kocuria rhizophila                      | 3P-2p171   | light response mechanism                | 3P-1p122  | maleate                                  | 3P-1a016                     |
| <i>Koji</i>                             | 1P-1p089, 2P-1p077, 2P-1p091, 3S-Dp05  | lignin                                  | 2P-1p116, 3P-1a118, 3P-1a119  | malic acid                               | 1P-1p071, 2P-1p101           |
| <i>Koji</i> making                      | 2S-Aa03, 3S-Dp04   | lignin degradation                      | 2P-1p116  | malic enzyme                             | 2P-1p056                     |
| kojic acid                              | 3P-1a077   | Lignin monomer                          | 3P-1a120  | malonyl-CoA                              | 2S-Ep04                      |
| <i>Kouleothrix</i> filamentous bacteria |  | lignin peroxidase                       | 3P-2p159  | maltooligosaccharide-forming amylase     | 1P-1p017                     |
| Kumamolisin                             | 3P-1p108   | lignin-related phenols                  | 3P-1a119  | maltotriose                              | 1P-1p017                     |
|   | 3P-1p042   | Lignocellulosic biomass                 | 2P-2p139, 3P-1a120  | mammalian cell                           | 2P-1p032                     |
| <b>L</b>                                |  |   |   |  |                              |
| L- Thioproline                          | 3P-1p038   | lignocellulosic materials               | 2P-1p049, 3P-1a127  | mammalian cytoplasm                      | 3P-1a045                     |
| L-amino acid esterase                   | 3P-1p051, 3P-1p052, 3P-1p053   | Limulus ameocyte lysate                 | 3P-2p132, 3P-2p133  | Man134B                                  | 3P-1p054                     |
| L-arabinose                             | 2P-2p141   | lipase                                  | 2P-1p042, 3P-1p104  | Man134C                                  | 3P-1p054                     |
| L-glutamate                             | 1P-1p046, 2A-Ap01  | lipid                                   | 2P-1p041, 2P-1p044, 3P-1a001, 3P-1a072, 3P-1p112, 3P-2a171, 3S-Dp04 | mandelonitrile oxidase                   | 1S-Dp02                      |
| L-glutamate oxidase                     | 2P-1p003   | lipid production                        | 3P-1a093, 3P-1p117  | manganese                                | 3P-1a107                     |
| L-lactic acid                           | 3P-1a076   | lipid raft                              | 3P-2a173  | manganese peroxidase                     | 3P-2p158                     |
| lab on paper                            | 2S-Da03  | lipic acid                              | 2P-1p094  | mangosteen                               | 3S-Bp03                      |
| lactate dehydrogenase                   | 3P-1a009, 3P-1a124, 3P-1p036   | <i>Lipomyces</i>                        | 3P-1a002  | manniol                                  | 3P-1p072                     |
| lactate oxidase                         | 3P-1p061   | <i>Lipomyces</i> screening              | 3P-2a179  | mannosylerythritol lipid                 | 2P-1p042                     |
| lactic acid                             | 3P-1a065, 3P-1a123, 3P-2p176   | Liposome                                | 2S-Da04, 3P-2a173, 3P-2a174, 3P-2p136                               | Mannosylerythritol lipids                | 3P-1a031                     |
| lactic acid bacteria                    | 1P-1p096, 1P-1p099, 1P-1p101, 2P-1p038, 2P-1p081, 2P-1p083, 2P-1p086, 2P-1p087, 2P-1p093, 3P-2a161, 3P-2p147, 3P-2p148 | Liquid chromatography-mass spectrometry | 2P-2p172  | marine                                   | 3P-1a071                     |
| lactic acid fermentation                | 1P-1p089, 1P-1p090, 1P-1p096, 3P-1p002   | liquid culture                          | 2P-1p121  | marine bacterium                         | 3P-1p037                     |
| Lacto-vinegar                           | 2P-1p078   | liquid surface culture                  | 3P-2p142  | marine environment                       | 3P-1a114, 3P-1p098           |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>          | 2P-1p087   | Liquid-disordered L <sub>d</sub>        | 3P-1p090  | marine microbe                           | 2P-1p103                     |
|   |  | live cell response                      | 1P-2p173  | marine sponge                            | 3P-2a153                     |
|   |  | liver failure rat                       | 1P-2p139  | mass culture                             | 1P-2p151                     |
|   |  | liver regeneration                      | 1P-2p139, 1S-Ap02   | mass microscope                          | 1P-2p187                     |
|   |  | living cell                             | 1P-2p173, 2P-2p171  | mass spectrometry                        | 1P-1p030, 1P-1p091           |
|   |  | local anesthetic                        | 3P-2a173  | Massively Parallel Sequencing            | 3P-1p043                     |
|   |  | long life                               | 3S-Dp01   | mathematical model                       | 3P-1a131                     |
|   |  | longevity                               | 3S-Dp01   | Mathematical Modeling                    | 3P-1p092, 3S-Bp07            |
|   |  | low molecular weight drug               | 2P-2p179  | mechanical property                      | 1P-2p182                     |
|   |  |   |   | mechanobiology                           | 2S-Da06                      |

|                                 |  |  |  |                                       |   |
|---------------------------------|--|--|--|---------------------------------------|---|
| Mechanotransduction             | 3P-2p163   | methyl-accepting chemotaxis protein    | 2P-1p100   | molecular chaperone                   | 2P-1p021,<br>2S-Bp05, 3P-1a051          |
| media optimization              | 2P-1p093   | methylcitric acid cycle                | 3P-1a092   | Molecular design                      | 1P-2p162                                |
| mediator                        | 3P-1a017   | <i>Methylobacterium extorquens</i>     | 2P-1p128   | molecular dynamics                    | 3P-1p089                                |
| medical plant                   | 3P-1p034   | <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 |  | molecular evolution                   | 1P-1p105                                |
| medium                          | 1S-Ap03, 3P-1a088  |  | 1P-1p002, 1P-1p003   | Molecular recognition                 | 3P-1p043                                |
| medium-chain-length homopolymer |  | <i>Methylobacterium zatmanii</i>       | 1P-1p055   | Molecular weight                      | 3P-1p027                                |
|                                 | 2P-1p129   | methylotroph                           | 1P-1p002, 1P-1p003   | <i>Monascus</i> fermentation products |   |
| Melanin                         | 3P-2a145   | methylotrophic yeast                   | 3P-1a029,<br>3P-1a033  |                                       | 3P-2a141                                |
| membrane protein                | 3S-Ep05  |  |  | <i>Moniliella megachiliensis</i>      | 2P-1p045                                |
| membrane tension                | 3P-2a174   | Methyltransferase                      | 3P-2p173   | monoclonal antibody                   | 2P-1p034,<br>2P-1p037, 2S-Da05, 3S-Ep05 |
| Memory device                   | 2S-Ca07  | mevalonate                             | 1P-1p066   | monomer supply                        | 3P-1a013                                |
| mesenchymal stem cell           | 2P-2p154,<br>2P-2p165, 2P-2p174  | mevalonic acid                         | 2P-1p060   | monoxygenase                          | 3P-2p171                                |
| Mesocarp fiber                  | 1S-Cp03  | <i>MGA2</i>                            | 1P-1p073   | Monte Carlo methods                   | 3P-1p092                                |
| mesophilic condition            | 3P-1p076   | Micro vascular structure               | 1P-2p154   | <i>Moorella thermoacetica</i>         | 2P-1p120                                |
| mesoporous silica               | 3P-1a042   | micro-well                             | 2P-2p150   | morphological change                  | 2P-2p174                                |
| <i>Mesorhizobium</i> sp.        | 3P-1p070   | microalgae                             | 2P-2p135, 3P-1p117   | Morphological profiling               | 3P-2p165                                |
| metabolic analysis              | 1S-Ap03, 2P-1p127,<br>3P-1a088, 3P-1a091, 3P-1a092,<br>3P-1a097, 3P-1p082, 3P-1p085  | microarray                             | 1P-2p151   | mouse                                 | 1P-2p136, 3P-1a073                      |
| metabolic engineering           | 1P-1p064,<br>2P-1p055, 2P-1p058, 2P-1p059,<br>2P-1p068, 2P-1p128, 2P-1p131,<br>2S-Ba05, 2S-Dp04, 3P-1a030,<br>3P-1a076, 3P-1a078, 3P-1a080,<br>3P-1a081, 3P-1a089, 3P-1p025,<br>3P-1p121, 3P-2a177, 3P-2p143,<br>3P-2p145, 3S-Cp01 | microarray transfection                | 2S-Cp02  | mRNA                                  | 3P-1p003                                |
| metabolic pathway               | 3P-1p080   | microbe                                | 3P-1p098, 3P-2a145,<br>3P-2a153, 3P-2p174                      | mRNA flux                             | 2P-1p048                                |
| metabolic pathway modification  |  | microbial community                    | 1S-Cp01,<br>1S-Cp05, 2P-1p115,<br>2P-1p127, 3P-1a128, 3P-1p107 | mRNA-seq                              | 1P-2p160                                |
|                                 | 1P-1p064, 3P-2a155, 3P-2p145   | microbial dark matter                  | 2P-2p137,<br>2P-2p138  | MsMab-1                               | 2P-1p036                                |
| metabolic profiling             | 3P-1a087   | microbial diversity                    | 2P-1p124   | MTT assay                             | 2P-2p156, 3P-2p139                      |
| metabolic simulation            | 2P-1p061   | microbial flora                        | 1S-Bp05, 3P-1p094,<br>3S-Dp02, 3S-Dp04                         | muconic acid                          | 3P-1a119                                |
| metabolism                      | 1P-1p057, 1P-1p063,<br>1P-1p065, 2P-1p123,<br>3P-1a094, 3P-1p086, 3P-1p098   | microbial fuel cell                    | 2P-1p123, 2P-1p127   | <i>Mucor circinelloides</i>           | 3P-1a070                                |
| metabolites                     | 1P-1p100   | Microbial Fuel Cells                   | 2P-1p125   | multi-functional bacteria             | 1S-Cp04                                 |
| metabolome                      | 1P-1p087, 1S-Bp04,<br>2P-1p074, 2P-1p075   | Microbially Influenced Corrosion       |  | multicopper oxidase                   | 3P-1p037                                |
| metabolome analysis             | 1P-1p092, 2S-Ba02  |  | 1P-1p113   | multifunctional peptide               | 3P-2a169,<br>3P-2a170                   |
| metabolomics                    | 1P-1p086, 1P-1p088,<br>1P-1p090, 1P-1p091, 2P-1p094,<br>3P-1a089, 3P-1a090, 3P-1a093,<br>3P-1a097, 3P-1p079, 3P-1p117  | microbiome                             | 1P-2p178, 3P-1p086   | multiplex PCR                         | 2S-Ea05                                 |
| metabonomics                    | 1P-2p178   | microbiota                             | 2P-1p085   | multivariate analysis                 | 1P-2p181,<br>3P-1p086                   |
| metagenome                      | 3P-1p095   | microcarrier                           | 2P-2p154   | municipal wastewater                  | 3P-1p105                                |
| metagenomic libraries           | 3S-Cp01  | microdevice                            | 2P-2p168   | Muse cell                             | 3P-2p166                                |
| metagenomics                    | 2S-Dp02  | microfiber                             | 1P-2p148   | Mutagenesis                           | 2P-1p001, 3P-1p038                      |
| metal adsorption                | 3P-1a110   | microfluidic chip                      | 3P-2a171   | mutant                                | 1P-1p051                                |
| metal adsorption                | 3P-1a110   | microfluidic device                    | 1P-2p148,<br>1P-2p176, 1P-2p177,<br>2S-Da03, 2S-Da06           | mutants                               | 1P-1p034, 3P-1p047                      |
| metalloprotease                 | 2P-1p007   | microorganisms                         | 3P-1a092   | mutation                              | 3P-2p159                                |
| metalloprotein                  | 2S-Da02  | microRNA                               | 3P-2a184   | MxaFI                                 | 1P-1p055                                |
| <i>Metchnikowia</i>             | 3P-1a001   | Microscopy                             | 1P-1p113   | mycosamine                            | 3P-1p093                                |
| methane fermentation            | 3P-1a129,<br>3P-1a131  | MiFuP                                  | 3P-1p093   | mycotxin                              | 3P-2a141                                |
| methane oxidation               | 3P-1a017   | migration-promoting peptide            | 3P-2a166   |                                       |   |
| methanogen                      | 1P-1p112   | milk                                   | 2P-1p050   |                                       |   |
| methanol                        | 2P-1p128   | mini-tomato                            | 1P-1p086   |                                       |   |
| methanol dehydrogenase          | 1P-1p002,<br>1P-1p055, 1P-1p056  | Miscibility Temperature $T_m$          | 3P-1p090   |                                       |   |
|                                 |  | Miso                                   | 1P-1p093   |                                       |   |
|                                 |  | mitochondria                           | 1P-1p079, 2P-1p068,<br>3P-1p119                                |                                       |   |
|                                 |  | Mitochondrial targeting sequence       |  |                                       |   |
|                                 |  |  | 3P-1a032   |                                       |   |
|                                 |  | mixed sugars                           | 3P-2p176   |                                       |   |
|                                 |  | modification                           | 3P-1a066   |                                       |   |
|                                 |  | modified Embden-Meyerhof pathway       | 3P-1p019   |                                       |   |
|                                 |  |  |  |                                       |   |

|   |
|---|
| N |
|---|

|  |          |
|--|----------|
| <i>N</i> -acetylglucosamine                        | 2P-1p051 |
| <i>N</i> -glycans                                  | 2P-2p185 |
| <i>N</i> -glycosylation                            | 3P-1p060 |
| <i>N</i> -linked oligosaccharides                  | 1P-1p018 |
| <i>N</i> -methylhydantoinase                       | 3P-1p070 |
| <i>N</i> -methyltransferase                        | 3P-2a136 |
| <i>Na</i> -taurocholate cotransporting polypeptide | 1P-2p132 |
| NAD(P)H  | 3P-1a041 |
| NAD <sup>+</sup>                                   | 1P-1p007 |
| NADH dehydrogenase                                 | 1P-1p045 |
| NADH oxidation                                     | 3P-1p045 |
| NADPH  | 3P-1a095 |
| nagoya protocol                                    | 3S-Cp04  |
| nano biotechnology                                 | 2S-Da01  |

|   |  |  |                           |                                     |   |                   |
|---|--|--|---------------------------|-------------------------------------|---|-------------------|
| nano magnetic particle                      | 1P-1p106   | NRPS   | 2P-1p005                  | palm oil mill                       | 1S-Cp02   |                   |
| nanocapsule                                 | 2P-1p022   | nuclear localizacion   | 3P-1p014                  | palmitic acid                       | 2P-1p091  |                   |
| nanocrystal                                 | 1P-2p184   | nucleic acid chromatography  | 2S-Ea06                   | pancreas                            | 2P-2p166  |                   |
| nanofilms                                   | 2S-Cp06  | nucleic acid drug  | 3P-2a181                  | Parallel computing                  | 3P-1p092  |                   |
| nanoneedle                                  | 2P-2p178   | nucleoside hydrolase   | 3P-2a181                  | <i>Paraphoma</i>                    | 3P-1a006  |                   |
| nanoparticle                                | 1P-2p136, 2S-Bp01, 2S-Ca07   | Nucleus density  | 2P-2p177                  | <i>Passiflora edulis</i>            | 1S-Dp02   |                   |
| nanoparticles                               | 1P-2p186   | nucleus labeling   | 1P-2p186                  | PC12                                | 3P-2a148  |                   |
| nanosilver                                  | 3P-1p127, 3P-1p128, 3P-1p129   | nukadoko   | 1P-1p096                  | PC12 cell                           | 3P-2p139  |                   |
| <i>Narezushii</i>                           | 2P-1p087   | nutrient removal   | 3P-1p105                  | PCA                                 | 1P-1p130, 2P-1p075  |                   |
| NASBA                                       | 2S-Ea06  | Nylon  | 2P-1p014, 2P-1p015        | PCR                                 | 3P-1p018  |                   |
| natto                                       | 1P-1p094, 3P-2a170   | <b>O</b>   |                           |                                     | PCR-DGGE  | 1S-Cp05, 2P-2p138 |
| natural killer T cell                       | 2P-2p159   | 2'- <i>O</i> -methylribonucleoside   | 3P-2a181                  | PDMS                                | 2P-2p166  |                   |
| near infrared ray-responsible photocatalyst | 3P-1p129   | Obesity  | 3P-1a084                  | <i>Pedobacter</i>                   | 2P-1p112  |                   |
| Negative selection                          | 3P-2p151   | odorant receptor   | 3S-Ep02                   | PEGylation                          | 2P-2p145  |                   |
| neogaroibiose hydrolase                     | 3P-1p056   | odorant response   | 1P-1p029, 3P-1a053        | <i>Penicillium purpurogenum</i>     | 3P-2a140, 3P-2a141  |                   |
| neonicotinoid pesticide                     | 2P-1p105   | <i>Ogataea minuta</i>  | 2P-2p187                  | pentose                             | 2P-1p044  |                   |
| neonicotinoide pesticide                    | 2P-1p104   | <i>Ogataea polymorpha</i>  | 3P-1p002                  | pentose phosphate pathway           | 1P-1p115  |                   |
| network identification                      | 3S-Cp06  | Oil body   | 3P-1p116                  | peptide                             | 2P-1p099, 3P-2a157, 3P-2a158, 3P-2a159, 3P-2a163, 3S-Ep04 |                   |
| Neural stem cell                            | 2P-2p157, 2P-2p164, 3P-2p165   | Oil palm biomass   | 1S-Cp02, 1S-Cp03          | peptide aptamer                     | 2S-Ca05   |                   |
| new action and promotion                    | 1A-Aa01  | oil production   | 3P-2a179                  | peptide array                       | 1S-Bp03, 3P-2a157   |                   |
| Next Generation Sequencer                   | 3P-1a008   | oleaginous yeast   | 2P-1p044                  | peptide chip                        | 3P-2a156, 3P-2a162  |                   |
| next generation sequencing                  | 2P-1p084   | oligopeptide   | 1P-1p083, 3P-2a160        | peptide informatics                 | 1S-Bp03   |                   |
| Next-generation sequencing                  | 3P-1p084   | oligosaccharide  | 1P-1p010                  | peptide medicines                   | 2P-1p033  |                   |
| NGF-like material                           | 3P-2a148   | oligotroph   | 2P-1p121                  | peptide nucleic acid                | 3P-1p094  |                   |
| NGS   | 1P-1p075, 3P-1a008   | Omics analysis   | 3P-1p078, 3P-1p084        | peptide probe                       | 1P-2p185  |                   |
| NHEJ  | 3P-1p005   | optically pure lactic acid   | 1A-Aa03                   | peptide synthesis                   | 3P-2a135  |                   |
| nickel                                      | 3P-1a108   | organ on a chip  | 1P-2p143                  | peptide synthesis                   | 2P-1p010  |                   |
| <i>Nicotiana tabacum</i>                    | 2P-2p186   | organic acid   | 1P-1p077, 3P-1a030        | peptide tag                         | 2P-1p024  |                   |
| NIH shift                                   | 2P-1p108   | organic acid transporter   | 3P-1a075                  | <i>Per2</i>                         | 2P-2p153  |                   |
| nipa sap                                    | 2P-1p120   | organic cultivation  | 3P-1p034                  | perfusion culture                   | 1P-2p143  |                   |
| nisin                                       | 1P-1p039, 2P-1p098   | organic overloading  | 3P-1a130                  | periodontopathogenic bacteria       | 3P-1a003  |                   |
| nitrate                                     | 3P-1a107   | organic solvent  | 3P-2p171                  | peritoneal adhesion                 | 1P-2p137  |                   |
| nitrifying bacteria                         | 2P-1p113, 3S-Bp06  | organic-solvent tolerance  | 1P-1p001                  | peroxidase                          | 1P-2p138, 1P-2p180  |                   |
| nitrilase                                   | 2P-1p112   | oriented immobilization  | 1P-2p179                  | pest management                     | 3S-Bp05   |                   |
| nitrile hydratase                           | 1S-Dp03  | ortholog   | 3P-1p060                  | PGPB                                | 2S-Ap03   |                   |
| nitritation                                 | 3P-1a102   | <i>Oryza sativa</i>  | 2P-1p027, 3S-Bp01         | pH                                  | 3P-1a086, 3P-2p166, 3P-2p177                              |                   |
| nitrocellulose                              | 3P-1a059   | osmotic pressure   | 1P-1p043                  | pH shift                            | 3P-2p158  |                   |
| nitrogen fixation                           | 3P-1p125   | osmotic stress   | 2P-1p045                  | PHA                                 | 3P-1a013  |                   |
| nitrogen removal                            | 3P-1a102   | oxalic acid  | 3P-1a075                  | PHA synthase                        | 3P-1p027  |                   |
| nitrogen source                             | 3P-2a143   | oxidation  | 2P-1p008                  | phage                               | 3P-1a007  |                   |
| NKT   | 2P-2p159   | Oxidative Stress   | 2P-2p176                  | phage display                       | 2P-1p033, 2S-Ca02, 3P-2a159                               |                   |
| NMR   | 1P-1p088, 1P-1p090, 1P-1p093, 1P-2p178, 3P-1a087, 3P-1p098, 3P-2a151 | 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase   | 1P-1p020, 1P-1p021        | phage display library               | 3P-1p024  |                   |
| NMR metabolomics                            | 1P-2p181   | oxygen   | 3P-2a176                  | <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624 | 3P-1a124, 3P-1p029  |                   |
| nocodazole                                  | 1P-2p147   | oxygenase  | 1P-1p024, 1P-1p033        | phase separation                    | 3P-2a174, 3P-2a175, 3P-2p136                              |                   |
| Noise-reduction                             | 3P-1p018   | oysterol   | 1P-1p028                  | Phenol                              | 3P-1p102  |                   |
| non-fermentable sugar                       | 2P-1p070   | <b>P</b>   |                           |                                     | phenylethyl alcohol                                       | 3P-1p075          |
| Non-invasive                                | 3P-2p165   | P(3HB- <i>co</i> -3HHx)  | 2P-1p130                  | Phenylactic acid                    | 2P-2p140  |                   |
| Non-natural nucleoside                      | 3P-2p151   | <i>P.alleronii</i>   | 3P-1p102                  | phenylpropanoid                     | 3P-2a147  |                   |
| noninvasive discrimination                  | 2P-2p155   | P/Ag/Ag <sub>2</sub> O/Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> photocatalyst | 3P-1p111, 3P-1p115        | phlorotannin                        | 2P-1p092  |                   |
| noninvasive method                          | 3P-2p166   | P/Ag/Ag <sub>2</sub> O/Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> thin films    | 3P-1p109                  | Pho13p                              | 2P-1p065  |                   |
| Norovirus                                   | 1P-2p183   | P450   | 1P-1p034, 3P-1p030        | phosphate                           | 2P-1p114  |                   |
| novel culture method                        | 3P-2p154   | <i>Paecilomyces tenuipes</i>   | 2S-Ap01                   | phosphorylase                       | 3P-1p050  |                   |
| novolac phenol resin                        | 3P-1a122   | palm oil   | 1S-Cp01, 1S-Cp04, 1S-Cp06 | Photo irradiation                   | 2P-2p145  |                   |
|   |  | palm oil mill effluent   | 1S-Cp05                   | photo-responsive hydrogel           | 2P-2p150  |                   |



|                                  |                     |                                |                           |                                       |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| rabbit                           | 2P-1p034            | rice protein                   | 1P-1p083                  | screening 1A-Aa04, 1S-Ep04, 2P-1p037, |
| radiation-polluted biomass       | 1P-1p106            | rice seedborne diseases        | 2S-Ap04                   | 2P-1p054, 2P-1p083, 2P-1p089,         |
| Radioactive substances           | 1P-1p103            | rice straw                     | 3P-1p077                  | 2P-1p098, 3P-1a047, 3P-1p068          |
| raft domain                      | 1P-2p164            | rice vinegar                   | 1P-1p050                  | screening system                      |
| <i>Ralstonia eutropha</i>        | 2P-1p130, 2P-1p131  | <i>RIM15</i>                   | 1P-1p069                  | 3P-2a156                              |
| <i>Ralstonia solanacearum</i>    | 2P-1p100,           | RNA                            | 2S-Ca06                   | seawater                              |
| 2P-1p101, 3P-1a007, 3P-1a016     |                     | RNA interferases               | 3P-1p043                  | 3P-1p099                              |
| random mutagenesis               | 3P-1p019            | RNA nanostructure              | 2P-2p183                  | secondary metabolism                  |
| rare earth elements              | 1P-1p056            | RNA nanotechnology             | 2P-2p183,                 | 2S-Ep02, 3P-1p013,                    |
| rare metal                       | 2P-1p118            |                                | 2S-Ca06                   | 3P-1p017, 3P-2a140                    |
| rare sugar                       | 2P-2p144            | RNA switch                     | 2P-2p181                  | secondary metabolite                  |
| Rate variable control            | 1S-Ap01             | RNA-RNA interaction            | 2P-2p183                  | 2S-Ep05, 3P-1p006                     |
| reaction mechanism               | 2P-1p004            | RNA-seq                        | 1P-1p077, 3P-1p006,       | secretion mechanism                   |
| reactive oxygen species          | 2P-2p165,           |                                | 3P-1p080, 3P-1p095,       | 3P-2a132                              |
|                                  | 3P-2p140            |                                | 3S-Bp02, 3S-Bp03,         | secretory production                  |
| ready-to-drink (RTD)             | 3S-Ap04             |                                | 3S-Bp04, 3S-Bp05, 3S-Cp01 | 2P-1p018,                             |
| receptor                         | 3P-1p058            | ROS generation                 | 2P-1p045                  | 2P-1p029, 3P-2p161                    |
| Rechargeable material            | 2P-1p126            | royal jelly protein            | 3P-2a167                  | sedimentation                         |
| recombinant protein              | 1P-1p032, 2P-2p142  | <i>RPD3</i>                    | 2P-1p047                  | 2P-1p117                              |
| recombinant protein production   | 2P-1p020, 3P-2p149  | rumen bacteria                 | 1P-1p106                  | selective cell attachment             |
|                                  |                     | <i>Ruminiclostridium josui</i> | 1P-1p019,                 | 2P-2p169                              |
|                                  |                     |                                | 1P-1p129, 3P-1a037        | Selective removal of deviation        |
| reconstruction                   | 3S-Ep02             |                                |                           | 2P-2p175                              |
| red tide control                 | 3P-2p140            |                                |                           | 2P-1p103                              |
| redox balance                    | 2P-1p062            |                                |                           | selenate reduction                    |
| redox mediator                   | 3P-1a111            |                                |                           | 2P-1p109                              |
| Redox state                      | 1P-1p045            |                                |                           | selenium                              |
| reductase                        | 1P-1p033            |                                |                           | 3P-1a109                              |
| reductive dehalogenase           | 1P-1p035            |                                |                           | self-assembled peptide                |
| refolding                        | 1P-1p108, 3P-1a058  |                                |                           | 2P-2p169                              |
| regenerative medicine            | 1P-2p149,           |                                |                           | self-assembling                       |
|                                  | 2P-2p176            |                                |                           | 2P-1p026                              |
| regulation                       | 3P-1p039, 3P-2a149  |                                |                           | self-assembly                         |
| regulator                        | 3P-1p011            |                                |                           | 1P-1p108                              |
| repeated batch culture           | 1P-1p125            |                                |                           | self-inducing fermenter               |
| repeated fermentation            | 3P-2p176            |                                |                           | 3P-1a105                              |
| repressor                        | 2S-Ep05             |                                |                           | semi-continuous anaerobic digestion   |
| residual pesticides              | 1P-1p009            |                                |                           | 3P-1p074                              |
| resistance                       | 3S-Bp05             |                                |                           | semi-continuous methane production    |
| Resource use efficiency          | 1S-Ap01             |                                |                           | 3P-1a130                              |
| response surface method          | 3P-2p158            |                                |                           | sensor                                |
| response surface methodology     | 2P-1p096            |                                |                           | 1P-2p182, 2S-Aa02, 3S-Ep02            |
| restriction endonuclease         | 3P-1a037            |                                |                           | sensory evaluation                    |
| resveratrol                      | 2P-1p097            |                                |                           | 1P-1p086                              |
| Retinal toxicity assay           | 2P-2p177            |                                |                           | <i>sepM</i>                           |
| reverse transcriptase            | 2S-Ea01             |                                |                           | 3P-1p011                              |
| <i>Rhizopus glucoamylase</i>     | 3P-1p003            |                                |                           | serine protease                       |
| <i>Rhizopus microsporus</i>      | 2P-2p133            |                                |                           | 1P-1p031                              |
| <i>Rhizopus oryzae</i>           | 3P-1a065            |                                |                           | <i>Serratia marcescens</i>            |
| <i>Rhodococcus</i>               | 2P-1p102, 2P-1p107, |                                |                           | 2P-1p018, 2P-1p122                    |
|                                  | 3P-1a111, 3P-1a118  |                                |                           | <i>Serratia</i> sp.                   |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i>  | 2P-1p121            |                                |                           | 3P-2p177                              |
| <i>Rhodospiridium paludigium</i> | 2P-1p041            |                                |                           | serum sample                          |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 3P-1p122            |                                |                           | 3P-2p132                              |
| Ribonucleotide reductase         | 1P-1p005            |                                |                           | serum-free culture                    |
| <i>ribosomal protein</i>         | 3P-1a004            |                                |                           | 1P-2p161                              |
| ribozyme                         | 2P-2p182, 2S-Ca06   |                                |                           | sesquiterpene                         |
| rice                             | 2P-1p099, 3S-Bp01   |                                |                           | 3P-1p017                              |
| rice bran protein                | 3P-2a169            |                                |                           | shake flask culture                   |
| rice husk biochar                | 3P-1a100            |                                |                           | 3P-2a176                              |
|                                  |                     |                                |                           | shark antibody                        |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-2p162                              |
|                                  |                     |                                |                           | Shell scripting                       |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1p092                              |
|                                  |                     |                                |                           | <i>Shewanella</i>                     |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-2a138                              |
|                                  |                     |                                |                           | <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1     |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p065                              |
|                                  |                     |                                |                           | Shikimate pathway                     |
|                                  |                     |                                |                           | 2P-2p140, 3P-2p168                    |
|                                  |                     |                                |                           | shochu                                |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p078, 2P-1p081, 3S-Ap01           |
|                                  |                     |                                |                           | shochu distillery wastewater          |
|                                  |                     |                                |                           | 2P-1p079                              |
|                                  |                     |                                |                           | shochu yeast                          |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p074                              |
|                                  |                     |                                |                           | siderophore                           |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1a108                              |
|                                  |                     |                                |                           | sigma factor                          |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-2p143                              |
|                                  |                     |                                |                           | Signal accumulation                   |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-2p180                              |
|                                  |                     |                                |                           | signal peptide                        |
|                                  |                     |                                |                           | 2P-1p020                              |
|                                  |                     |                                |                           | signal transduction                   |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p065,                             |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-2p150, 1S-Ep04,                    |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1a047, 3P-1p064, 3P-2p157          |
|                                  |                     |                                |                           | silent gene cluster                   |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-2a142                              |
|                                  |                     |                                |                           | silica                                |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p108, 3P-1a015                    |
|                                  |                     |                                |                           | silica particle formation protein     |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1p066                              |
|                                  |                     |                                |                           | silica-binding protein                |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1a043                              |
|                                  |                     |                                |                           | silicate minerals                     |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1a100                              |
|                                  |                     |                                |                           | Silicatein                            |
|                                  |                     |                                |                           | 2S-Ca04                               |
|                                  |                     |                                |                           | silkworm                              |
|                                  |                     |                                |                           | 1P-1p030, 2P-1p016                    |
|                                  |                     |                                |                           | silkworm express system               |
|                                  |                     |                                |                           | 3P-1a050                              |

## S

|                                  |                               |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 16S rRNA                         | 1P-2p176, 3S-Bp06             |
| S-adenosylmethionine             | 1P-1p095                      |
| S-alkyl cysteine sulfoxides      | 3P-1p071                      |
| saccharification                 | 1P-1p118, 1P-1p119            |
| Saccharification residue lignin  | 3P-1a121                      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 1P-1p072,                     |
|                                  | 1P-1p073, 1P-1p076, 1P-1p077, |
|                                  | 1P-1p078, 1P-1p079, 1P-1p095, |
|                                  | 1P-1p114, 1P-1p115, 1P-1p116, |
|                                  | 1P-1p124, 1P-1p127, 2A-Dp01,  |
|                                  | 2P-1p052, 2P-1p053, 2P-1p065, |
|                                  | 2P-1p066, 2P-1p068, 2P-2p132, |
|                                  | 3P-1a027, 3P-1a028, 3P-1p001, |
|                                  | 3P-1p072, 3P-1p097, 3P-2p153, |
|                                  | 3P-2p170, 3S-Ap02             |
| safety                           | 1S-Ep06                       |
| sake                             | 1P-1p080, 1P-1p095, 2P-1p073, |
|                                  | 2P-1p074, 2P-1p082            |
| sake brewing                     | 3S-Ap02                       |
| sake lees                        | 2S-Aa03                       |
| sake yeast                       | 1P-1p074, 1P-1p075,           |
|                                  | 2P-1p047, 2P-1p071, 3S-Ap02   |
| salt                             | 3P-1p114                      |
| salt bridge                      | 1S-Dp03                       |
| salt tolerance                   | 2P-1p119, 3P-1a131,           |
|                                  | 3P-2p152                      |
| sand                             | 3P-1a101                      |
| Sarcosine oxidase                | 2P-1p001, 3P-1p038            |
| scaffold                         | 2P-1p036                      |
| scFv                             | 2P-1p029, 2P-1p037, 3P-1a050  |
| scFv-Fc                          | 1P-2p158                      |
| <i>Scheffersomyces stipitis</i>  | 2P-1p051                      |
| <i>Schizochytrium</i>            | 3P-2a138                      |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 3P-1a030                      |
| scp                              | 2P-1p050                      |



|                                    |   |   |  |                          |  |
|------------------------------------|---|---|--|--------------------------|--|
| toxicity                           | 3P-1a113, 3P-2p140  |   | 3P-1p064   | xylanase                 | 1P-1p019   |
| Toxin-antitoxin system             | 3P-1p043  |   |  | xylitol                  | 1P-1p125, 1P-1p127   |
| Toyama Bay                         | 3P-1p099  | U                                       |  | xyloe fermentation       | 1P-1p126   |
| traditional fermented food         | 2P-1p084  | ubiquinol oxidase                       | 3P-1a071   | xyloglucan               | 1P-1p010   |
| <i>trans</i> -3-hydroxyproline     | 1P-1p020  | UCP1                                    | 3P-1a084   | xylose                   | 1P-1p119, 3P-2p161   |
| transcription                      | 1P-2p165  | ultrasound irradiation                  | 1P-1p076   | xylose fermentation      | 3P-1a065   |
| transcription factor               | 2P-2p142  | ultraviolet                             | 2P-2p163   | xylose isomerase         | 1P-1p115, 3P-2p141   |
| transcriptional factor             | 1P-1p025  | uncultured bacteria                     | 3P-2a153   | xylosidase               | 3P-2p141   |
| transcriptional regulation         | 3P-1a009,<br>3P-1a033, 3P-1p009, 3P-1p023   | undifferentiation status                | 3P-2p164   | Y                        |  |
| transcriptional regulator          | 3P-2a142  | university-industry collaboration       |  | yeast                    | 1P-1p076, 1P-1p095, 1P-1p096,<br>2P-1p046, 2P-1p050, 2P-1p051,<br>2P-1p076, 2P-1p089, 2P-1p118,<br>2S-Aa02, 2S-Aa04, 3P-1a001,<br>3P-1a032, 3P-1a053, 3P-1a110,<br>3P-1p026, 3P-1p103, 3S-Ap03 |
| transcriptional regulator gene     | 3P-1p009  | urease                                  | 3P-1a101   | <i>YNLI34C</i>           | 2P-1p076   |
| transcriptome                      | 1S-Bp02, 1S-Bp04,<br>3P-1a064, 3P-1p030,<br>3P-1p032, 3S-Bp03,<br>3S-Bp04, 3S-Cp01, 3S-Cp02 | useful compounds                        | 2S-Ba04  | Z                        |  |
| transcriptome analysis             | 2S-Ba02,<br>3P-1a109  | 5'-UTR                                  | 2P-1p040   | zero emission            | 1S-Cp02  |
| transfection                       | 1P-2p133  | V                                       |  | zinc                     | 2P-2p157   |
| transformation                     | 3P-1a037, 3P-1p021,<br>3P-1p022, 3P-1p031   | vacuole                                 | 3P-2a134   | zymography               | 3P-1a046   |
| transgene expression               | 2P-1p040  | Val-Gly                                 | 3P-1p051   | <i>Zymomonas mobilis</i> | 2P-1p078   |
| transgenic chicken                 | 1P-2p165  | valuable chemicals production           | 2P-1p062   |                          |  |
| transgenic tobacco                 | 2P-2p185  | vanillin                                | 1P-1p024, 2P-1p049                                     |                          |  |
| transglycosylation                 | 1P-1p010  | vascular tissue                         | 1P-2p143   |                          |  |
| Transistor                         | 1P-2p180  | vector                                  | 1S-Ep05  |                          |  |
| translation                        | 2P-1p024, 2P-1p040,<br>3S-Cp02  | vhh antibody                            | 3P-1p067   |                          |  |
| translation repression             | 2P-1p048,<br>2P-1p049   | <i>Vibrio fischeri</i>                  | 2P-1p039   |                          |  |
| Translational Regulation           | 2P-2p181  | <i>VID24</i>                            | 1P-1p071   |                          |  |
| transmembrane domain               | 3P-1p058  | vimentin                                | 2P-2p178   |                          |  |
| transporter                        | 1P-1p105, 2P-1p017,<br>3P-1a012, 3P-1p007   | vinegar fermentation                    | 1P-1p042   |                          |  |
| transribosylation                  | 3P-2a181  | Virus                                   | 1P-2p133, 3P-1p091                                     |                          |  |
| tranthyretin                       | 3P-2p137  | visible-light photocatalyst             | 3P-1p128   |                          |  |
| tree bark                          | 2P-2p138  | visible-light responsible photocatalyst |  |                          |  |
| trehalose                          | 1P-2p163, 2P-1p053  |   | 3P-1p127   |                          |  |
| Tret1                              | 1P-2p163  | vitellogenin                            | 2P-1p020   |                          |  |
| triacylglycerol                    | 2P-1p011  | volatile explosive                      | 1P-2p185   |                          |  |
| trichloroethylene                  | 2P-1p111  | volatile fatty acids                    | 3P-1a114   |                          |  |
| <i>Trichoderma reesei</i>          | 3P-1p016  | W                                       |  |                          |  |
| <i>Trichoderma</i> sp.             | 2S-Ap04   | wastewater                              | 3P-1a103   |                          |  |
| <i>tricholoma matsutake</i>        | 3P-1a025  | wastewater treatment                    | 2P-1p125,<br>3P-1a108, 3P-1p103,<br>3P-1p107, 3P-1p108 |                          |  |
| triglyceride                       | 3P-1a103  | water-in-oil emulsion                   | 3P-2a171   |                          |  |
| Trp-His                            | 3P-1p052  | wax ester                               | 3P-1p119   |                          |  |
| TTC staining                       | 1P-1p079  | weed waste                              | 3P-1a129   |                          |  |
| tumor immunotherapy                | 2P-2p159  | wettability                             | 1P-2p182   |                          |  |
| tumor spheroid                     | 1P-2p153  | wheat bran                              | 1P-1p097   |                          |  |
| tungsten                           | 3P-1a112  | wheat noodle manufacturing              | 2P-1p117   |                          |  |
| twitching motility                 | 2P-1p101  | Whey                                    | 1P-1p072, 2P-1p078                                     |                          |  |
| two-dimensional gas chromatography | 2P-1p073  | white-rot fungi                         | 3P-1a125, 3P-2p158                                     |                          |  |
| two-phase partitioning bioreactor  | 3P-2p135  | white-rot fungus                        | 3P-2p159   |                          |  |
| type 1 secretion system            | 2P-1p018,<br>2P-1p029   | whole cell biocatalyst                  | 3P-1p124   |                          |  |
| Tyrosinase                         | 3P-2a145  | whole genome amplification              | 1P-2p177   |                          |  |
| tyrosine phosphorylation           | 3P-1a047,   | whole genome sequence                   | 3P-1a025   |                          |  |
|                                    |   | whole genome sequencing                 | 3S-Bp01  |                          |  |
|                                    |   | whole organ engineering                 | 1P-2p139   |                          |  |
|                                    |   | woody biomass                           | 3P-1a124   |                          |  |
|                                    |   | wound healing                           | 3P-2a166   |                          |  |
|                                    |   | X                                       |  |                          |  |
|                                    |   | X-ray crystallography                   | 2P-1p009   |                          |  |







1LA1

## -クローニングから発現・精製まで- タンパク質実験を強力に押し進めるツールのご紹介

タカラバイオでは、目的遺伝子のクローニングからタンパク質発現、精製まで、タンパク質実験をトータルサポートする関連製品を取り揃えています。クローニングでは制限酵素不要のクローニングキット『In-Fusion』があり、タンパク質発現では大腸菌や昆虫細胞・ヒト細胞を使用したシステムから無細胞タンパク質合成システムまで、様々な発現系を取り揃えています。Hisタグ融合タンパク質の精製には、次世代メンブレン技術を用いて迅速に精製できる革新的なキット『Capturem His-Tagged Purification Kit』が威力を発揮します。『Capturem His-Tagged Purification Kit』は、バクテリアと哺乳類細胞ライセートの両方に使用でき、室温、最速5分で精製が完了します。また、従来の金属レジンでは対応が難しい幅広い条件に適用でき、変性条件下での使用も可能で、EDTA、還元剤、グリセロールなどの添加剤を含む条件下でも優れた性能を発揮します。本セミナーでは、タカラバイオが提供するタンパク質実験を強力にサポートするユニークな関連製品についてご紹介します。

日 時：9月 **28日** (水) 11:45-12:45

会 場：富山国際会議場 3F A 会場 (メインホール)

演 者：井上 晃一 (タカラバイオ 営業部)

### タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282  
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995  
 テクニカルサポートライン  
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995  
 Website <http://www.takara-bio.co.jp>  
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

that's  
**GOOD**  
 science!™

第68回 日本生物工学会大会

株式会社島津製作所

# ランチオンセミナー

**日時** 9月28日(水) 11:45~12:45**場所** C会場 (ANAクラウンプラザホテル富山 3F) 1LC2

## メタボロミクスを用いた食品及び 培養プロセス評価法の紹介

生体中の代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスは、食品機能性の評価や細胞培養プロセスの有効な解析手法としても期待されています。本講演では、質量分析装置と代謝物分析用データベースを用いた効果的メタボロミクス手法と食品解析及び、培養プロセス評価への応用事例を紹介いたします。

**演者** 渡辺 淳 / 中西 豪株式会社島津製作所 分析計測事業部  
ライフサイエンス事業統括部 MSビジネスユニット

豊田 健一

株式会社島津製作所 分析計測事業部  
ライフサイエンス事業統括部 細胞事業開発室

# 第68回日本生物工学会大会

## サイエックス ランチョンセミナー

日時 9月28日(水) 11:45-12:45

会場 富山国際会議場-ANA クラウンプラザ富山

SCIEX

QTOFシステムとBioPharmaView™ソフトウェアを使用したバイオ医薬品特性解析例  
横山 亮 (サイエックス)

バイオ医薬品の分析では、メジャーなピーク中からマイナーなピークの構造解析や定量解析が求められたため、その複雑性に対応するための広いダイナミックレンジ、定量再現性、データ取得スピードが必要となります。また、膨大なデータをマニュアルで解析をすることは非生産的であり、専門的なノウハウを詰め込んだ専用の解析ソフトウェアが必要となります。今回のセミナーでは、QTOFシステムとBioPharmaView™ソフトウェアを活用したバイオ医薬品の不均質性を解析するワークフローをご紹介します。

招待講演

State-of-the Art Characterization of Biopharmaceuticals Using High Speed and High Resolution Mass Spectrometry

Head of R&D Division and Director of Center for Biomedical Mass Spectrometry,  
Diatech Korea Co., Ltd., Seoul, Korea

Je-Hyun Baek

Mass Spectrometry has been increasingly recognizing as a critical tool for structural characterization of biopharmaceuticals such as erythropoietin (EPO), antibody-drug conjugates, and new protein drugs. Full characterization of biopharmaceuticals is essential for the CMC (Chemistry, Manufacturing, and Controls) process in the biologics development. In general, protein characterization is achieved by mass spectrometry and includes various qualitative analyses: intact protein, amino acid sequence, enzymatic peptides, disulfide linkages, carbohydrates, various post translational modifications, and so on. Several applications based on high resolution mass spectrometry is increasingly in high demand owing to their greater reliability, assessment, and safety (e.g. contamination of host-cell proteins) for developing drugs in the CMC process. Here, I would like to introduce good examples of protein characterization, and how it can be completed by high resolution mass spectrometry in advance of clinical trials.

SCIEX

株式会社エービー・サイエックス

本社: 〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F

TEL: 0120 (318) 551 FAX: 0120 (318) 040

大阪: 〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3 ビアスタワー

<http://www.sciex.jp> Email: [jp\\_sales@sciex.com](mailto:jp_sales@sciex.com)

株式会社シクロケムバイオ ランチョンセミナー

## ～シクロデキストリン包接技術の可能性～

R- $\alpha$  リポ酸 -  $\gamma$ -CD 包接体のエネルギー産生促進 $\delta$ -トコトリエノール -  $\gamma$  CD 包接体の脳機能改善

2016 年 9 月 29 日 (木) 11:45 ~ 12:45 C 会場

**座長** 松郷 誠一 先生

金沢大学

理工研究域 自然システム学系 教授

**講演者** Prof.Dr.Gerald Rimbach

Institute of Human Nutrition and Food Science University of Kiel



R- $\alpha$ -リポ酸や $\delta$ -トコトリエノールなどの機能性成分は安定性や吸収性が低いといった理由により食品への応用が困難ですが、環状オリゴ糖の1つである

「 $\gamma$ -シクロデキストリン包接」

により問題を解決できる事例があります。

本セミナーではそのような包接化された食品素材が発揮する機能性についてご紹介いたします。

また、ブラジル産グリーンプロポリスの最新研究成果も加えてご紹介いたします。

-シクロデキストリンの機能を最大限に発揮する-

株式会社シクロケムバイオ

東京本社 :Tel.03-5614-7147

神戸本社 :Tel.078-302-7073

URL:www.cyclochem.com/cyclochembio

2LD2

# 第68回 日本生物工学会大会 アジレント・テクノロジー ランチョンセミナー

共催:第68日本生物工学会大会/アジレント・テクノロジー株式会社

日 時 : 2016年9月29日 (木)  
会 場 : D会場 (ANAクラウンプラザホテル富山 3階)

## バイオ医薬品の多角的な特性解析

アジレント・テクノロジー株式会社  
アプリケーションセンター 瀬崎 浩史

HPLC、LC/MSおよびCE/MSを用いたバイオ医薬品の特性解析事例を紹介いたします。  
具体的には以下の3点になります。

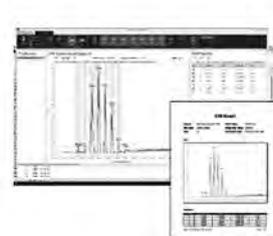
- ① 2D-LC (イオン交換-SEC、HIC-逆相) とQ-TOFを組み合わせた  
オンライン脱塩自動化ソリューション
- ② アナライザ感覚で誰もが簡単にADCのDAR (Drug Antibody Ratio)をレポート可能な  
Walkup LC/Q-TOF
- ③ ジスルフィド結合の掛け違いを容易に見い出す新BioConfirmソフトウェア

アジレントは核酸医薬の受託製造設備を持っています。  
核酸医薬をはじめとした中分子分析事例、核酸配列を同定するユニークなソフトウェア  
Agilent Oligonucleotide Sequencer (AOS)にも触れます。

Keyword: 抗体医薬、バイオ医薬品、ADC、糖鎖、核酸医薬、中分子、ジスルフィド結合

Key technology: HPLC, LC-MS, CE-MS, 2D-LC、脱塩

Key point: 特性解析、省力化、自動化、Walkup



アジレント・テクノロジー株式会社  
Tel:0120-477-111  
email\_japan@agilent.com



**Agilent Technologies**



第68回 日本生物工学会

2LE3

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社 ランチョンセミナー

# 物質生産における メタボロミクスの活用例

## E 会場

2016年9月29日 (木) 11:45~12:45

講演者 味の素株式会社  
バイオ・ファイン研究所  
福井 啓太様

植物プラスチックの原料として注目されているコハク酸は、安価な糖蜜から微生物の力を利用した発酵によって生産することができます。コハク酸発酵では、好気条件下で菌体を生成し、嫌気条件下でコハク酸発酵を行うプロセスを採用しています。発酵生産では、糖蜜から目的物を効率的、且つ安定的に生産することが重要ですが、コハク酸発酵は培養が安定しないことが課題でした。

今回のランチョンセミナーでは、発酵におけるメタボローム解析の活用例として、トランスクリプトーム解析と組み合わせた、コハク酸発酵における安定化因子の探索・同定と、菌株改良への利用について報告します。

✉ [contacthmt@humanmetabolome.com](mailto:contacthmt@humanmetabolome.com)

☎ 03-3551-2180



ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

The Society for Biotechnology, Japan / Annual Meeting 2016

第 68 回 日本生物工学会大会



# 東ソー ランチョンセミナー

9月30日(金) **11:30 - 12:30**

**A 会場** (富山国際会議場 3F メインホール)

演題

**ファージライブラリーを使った機能性抗体・ペプチドの設計と抗体精製、医薬品創製への展開**

演者

**伊東 祐二 先生** (鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻 教授)

ファージライブラリーは、蛋白質・ペプチドの分子ライブラリーから、目的の機能を持つバインダーを単離する上で極めて強力なツールである。本セミナーでは、まず、この技術を用いて、抗体ライブラリーからの疾患関連因子に対する抗体の単離を行った研究について、特に次世代シーケンサーを用いた網羅的配列解析により効率的に機能抗体を特定する手法を交え紹介する。一方、ランダムペプチドライブラリーからの機能性ペプチドの単離研究については、ペプチドによる抗体精製システムを構築するため、ヒトIgG、IgA抗体に結合するペプチドを単離した結果について報告する。最後に、このように設計した抗体結合ペプチドの更なる応用として、抗体の特異的標識技術を開発した例について紹介したい。この標識技術CCAP法 (Chemical conjugation by affinity peptide) は、極めて短時間で、定量的に、Fc上の特定のLys残基を共有結合で標識することができる。そのため、前もってペプチドに種々の機能性リガンドを連結させておけば、抗体とペプチドを混合するだけで、新しい機能が付加された抗体の創製が可能となる。講演では、新たなバイオ医薬品創製に向けた、この技術の展開事例についても紹介したい。

その他、東ソー株式会社より、新規抗体精製用アフィニティー充填剤・抗体定量用カラムのご紹介をさせていただきます。

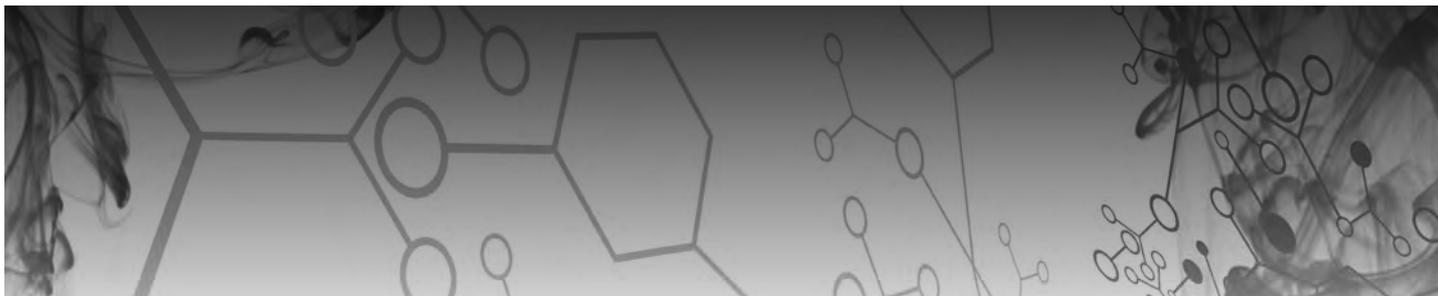


**東ソー株式会社**  
バイオサイエンス事業部

本社 / 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2 芝公園ファーストビル  
TEL 03-5427-5180 FAX 03-5427-5220

大阪支店 ☎ (06) 6209-1948 名古屋支店 ☎ (052) 211-5730  
福岡支店 ☎ (092) 781-0481 仙台支店 ☎ (022) 266-2341  
山口営業所 ☎ (0834) 63-9888

<http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>



## 第68回日本生物工学会富山大会 3LC2 ランチョンセミナー

C会場(ANAホテル) 9月30日(金) 11:30-12:30

### ■ 標的成分の効果的な分離と検出:

#### 低分子(糖、有機酸)から高分子(タンパク質、核酸、糖鎖)まで分析システム一挙公開

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

演者: 高原 健太郎

広いラインナップの分析装置を提供しているサーモフィッシャーならではの、化合物の特性に応じた分析システムをご提案します。特に弊社に特徴的な分析技術が活用できる下記の化合物に関して実用例とともにご紹介します。

#### — 極性低分子化合物の分析: 糖、有機酸

生体試料、食品試料、培地成分などの分析において、糖、有機酸は多くの研究者に注目され、分析されてきました。しかしながら、LCやイオンクロマトグラフ(IC)により異性体の分離特性が異なったり、検出器の選択肢が多様(UV検出器、電気化学検出器、質量分析計など)であったりします。そこで、実際の分析事例を基に、運用性、分離および検出感度の観点から分析システムの特徴をご提示します。

#### — 生体高分子の分析: 専用カラムの活用 ~タンパク質(抗体)核酸、糖鎖~

バイオ医薬品をはじめとした生体高分子の分離・検出は、近年のホットトピックスの一つです。弊社では、タンパク質(抗体)核酸、糖鎖に関して専用カラムを開発しており、それぞれの生体高分子において、質量分析計にも対応したカラムも取りそろえております。専用カラムを用いた解析により、どのような情報が得られるのかについて、実際の測定データとともにご紹介します。

#### — 分析条件検討の効率化: AppsLab Library (<https://appslib.thermoscientific.com/>)

研究者が測定すべき化合物はますます多様になり、適した分析手法を迅速に導入できることが望まれています。そこで、弊社は分析条件を効率よく検索して導入するための無料のWebサイトである "AppsLab Library" をご提供しています。さまざまな分析装置(GC、LC、IC、GCMS、LCMS)の分析条件が登録されているだけでなく、前処理条件、使用した消耗品の情報も閲覧できます。また分析条件をダウンロードでき、弊社のクロマトグラフィー解析ソフトウェアを共に使用することで、最小6クリックだけで分析開始が可能です。

本セミナーでは、新たに生体分子を測定する研究者に、どのような分析システムを採用あるいは導入すべきかについてご提案します。



#### ● 問い合わせ先

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町 3-9

 Tel.0120-753-670  Fax.0120-753-671

E-mail: [Analyze.jp@thermofisher.com](mailto:Analyze.jp@thermofisher.com) [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

第 68 回日本生物工学会  
日本ウォーターズ株式会社

# ランチオンセミナー

日時: 9月30日(金) 11:30~12:30

会場: E 会場 (ANA クラウンプラザホテル富山 3F)

講演番号: 3LE3

## 次世代インフォマティクス プラットフォームによる バイオ医薬品の特性解析

信頼性の高いインタクトタンパク解析、ペプチドマッピング、遊離糖鎖解析などによるバイオ医薬品の特性解析を効率的に行うための次世代のインフォマティクスツールである UNIFI バイオ医薬品システムソリューションは、UPLC/MS を用いた頑健性の高い特性解析のために必要な機能を包括的に統合した、システムソリューションです。

本セミナーでは、UNIFI バイオ医薬品システムソリューションのコンセプトおよび、UPLC/MS を用いたバイオ後続品の特性解析について実際の測定例を交えながらご紹介します。



日本ウォーターズ株式会社 [www.waters.com](http://www.waters.com)

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 (代表) FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル 11F TEL 06-6304-8888 (代表) FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

**第68回日本生物工学会大会講演要旨集**

2016年8月25日発行

発行所 公益社団法人日本生物工学会  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1  
大阪大学工学部内  
TEL. 06-6876-2731 FAX. 06-6879-2034  
E-mail: info@sbj.or.jp  
<http://www.sbj.or.jp>

● 表紙写真について（左より）●

おわら風の盆，黒部峡谷鉄道，雨晴海岸，雷鳥，みくりが池，黒部ダム