

創立100周年記念

第74回 日本生物工学会大会

講演要旨集

令和4年10月17・18・19・20日

一般講演・シンポジウム・ランチタイムセミナー・展示
Zoomによるオンライン形式

記念式典・授賞式・受賞講演・記念シンポジウム
千里ライフサイエンスセンターからのZoom配信

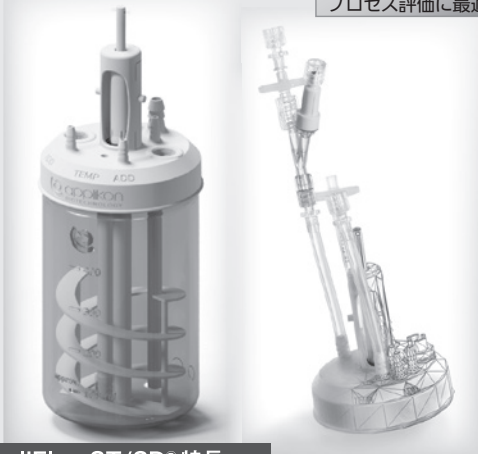
令和4年度
(2022)

公益社団法人 日本生物工学会

三洋貿易のバイオプロセスソリューション

所有培養装置をシングルユース化しませんか？
 カスタムシングルユース培養容器
 AppliFlex ST/3D®

シングルユース
 プロセス評価に最適!



AppliFlex ST/3D® 特長

- 微生物・細胞培養対応可
- ご希望のヘッドプレート仕様
- アプリケーションに合わせインペラ作成
- シングルユースDO/pHセンサー対応可
- 煩わしい工程作業を簡素化・効率化

音響式セルセパレータ BioSep®
 ミニバイオリアクタ MiniBio®
 250/500/1000

連続培養・
 環流培養に最適!



◎BioSep®は音響共鳴原理を採用した細胞にやさしい高分離効率のセルセパレータです。

BioSep® 特長

- スケラブル: 1/10/50/200/1000 (L/Day)
- セル分離原理: 音響共鳴方式
- 低セルダメージ/高分離効率
- バイオリアクタとの組合せで連続培養・連続生産が可能

Minibio® 特長

- 省スペース/高拡張性
- ブラウザソフトウェア/各種センサー対応可能

バイオプロセス
 シングルユース製品

NEW

avantor®

AVANTOR社では、バイオ医薬品製造に関わるシングルユース製品を取り扱っております。
 国内外で多くの医薬品製造バイオプロセスへの採用実績があります。



特長

- カスタマイズ品(お客様ユニーク仕様)として提供可能。
- アッセンブリ状態にて納入可能。
 (例: コネクターとチューブ類をはじめから接続した状態等。)
- 新たに3Dデータ等から、シングルユース製品をデザイン可能。

◎AVANTOR社のシングルユース製品は、バイオ医薬品製造向けに最適です。
 シングルユース製品にご興味があれば、是非お問い合わせください。

リアルタイム
 グルコースバイオセンサー
 乳酸バイオセンサー

バイオプロセス
 代謝評価に最適!



ワイヤレス通信

【新製品】
 PG13.5プローブセンサー
 およびフローセルセンサー
 既存の各種培養フラスコに取り付け可能です。

CITSens バイオセンサー特長

- グルコース、乳酸の費用対効果の高いオンライン細胞培養モニタリング
- CITSens電極による非侵襲的かつリアルタイム計測
- 安定した培養条件、長期安定性
- 無線データ伝送
- 汚染リスクの低減



 三洋貿易株式会社

ライフサイエンス事業部
 〒101-0054 東京都千代田区神田錦町2丁目11番地 三洋安田ビル
 TEL 03-3518-1196 FAX 03-3518-1237
 URL://www.sanyo-si.com/ e-mail:info-si@sanyo-trading.co.jp

培養モニタリング用 非接触・非破壊
シングルユース DO,pH,CO₂ センサー



シングルユースのフロースルーセルセンサー



マイクロウェル培養モニタリングシステム
 SDR (センサーディッシュリーダー)



- リアルタイム培養モニタリングシステム
- 非破壊・非接触測定
- 溶存酸素 (DO)、pH、CO₂ の測定が可能
- 滅菌、校正済みのセンサーで効率化を実現

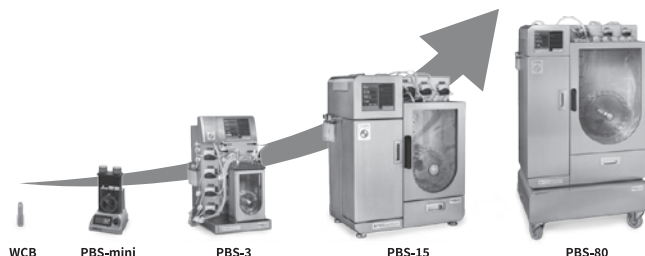


オートクレーブ滅菌可能なチップセンサー
 もご用意しています。

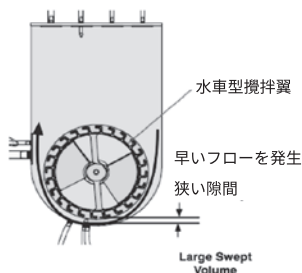


振とう培養モニタリングシステム
 SFR vario (センサーフラスコリーダー)

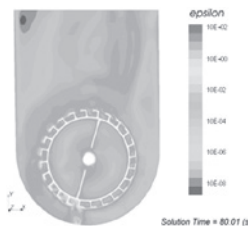
幹細胞培養に適したやさしい攪拌、優れたスケーラビリティ
シングルユースバイリアクター
PBS バイリアクター



水車型攪拌翼が低い剪断力と均一な培養環境を生み出す



培養容器の略図。攪拌翼とU字底の隙間に強い流速を作り、容器内を均一に攪拌する。攪拌翼に逆向きに取り付けられた羽根により、少ない電力消費で効率的に攪拌翼を回転させることができる。攪拌翼の掃引容積が大きいため、乱流エネルギー散逸率が低く、穏やかな混合が可能。



コンピューターによる流体力学シミュレーション。エネルギー (m²S⁻²) のばらつきが少なく、均一であることがわかります。

お問合せ先



本社 〒135-0014 東京都江東区石島2-14 Imas Riverside 4F
 Tel. (03)6458-6696 Fax. (03)6458-6697
 西日本営業所 〒532-0003 大阪市淀川区宮原5-1-3 NLC新大阪アースビル403
 Tel. (06)6394-1300 Fax. (06)6394-8851

Web Site www.scrum-net.co.jp

SONY

“どなたにでも” “すぐ使える” 全自動セットアップセルソーター

SH800S

コストパフォーマンスに優れたミドルクラスモデル

本体価格 ¥15,000,000 ~



最大4レーザー6カラー

詳しくは、ソニーのライフサイエンス製品専用ホームページをご覧ください。

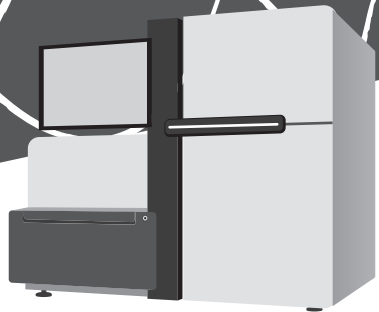
<https://www.sony.co.jp/Products/Lifescience/fcm/products/sh800s/>



お問合せ先：ソニー（株）メディカルビジネスグループ ライフサイエンス事業部 ライフサイエンス営業部
TEL: 0120-667-010 / FAX: 0120-388-060 / MAIL: cytometry@sony.co.jp / WEB: <http://www.sony.co.jp/LS>

独 自 開 発 ハ イ ス ル ー プ ッ ト

低コスト NGS解析

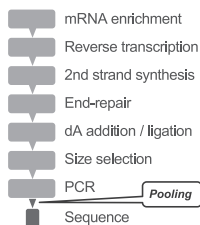


*HiSeqX: PE150+150,
~400M read-pairs/lane

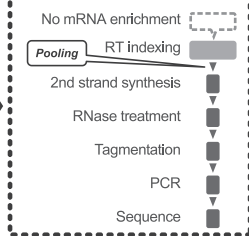
トランスクリプトーム解析 RNA-Seq

Lasy-Seq v1.1法:
Kamitani *et al*, (2019), Sci. Rep.
Low cost and easy RNA-Seq (3' RNA-Seq)

従来のRNA-Seq



Lasy-Seq v1.1



ライブラリー調製
税込3,960円/サンプル

シーケンス(HiSeqX*)
税込220,000円/レーン

ゲノムワイドSNP解析 ddRAD-Seq

Perterson *et al*, (2012), PLoS Oneを
ベースにハイスループット化

ライブラリー調製
税込1,650円/サンプル

シーケンス(HiSeqX*)
税込220,000円/レーン

環境DNA解析 16S, 18Sアンプリコン解析

Early-pooling法:
Ushio *et al*, (2022), Environmental DNA

ライブラリー調製
税込2,750円/サンプル

魚類などマクロ生物も対応
データ解析パック追加可能

目的に応じて選べるシーケンス方法

おすすめ:
NovaSeq
納期7-8週間

- ① 150PE (1Gb): 税込46,200円
- ② 250PE (1Gb): 税込59,400円

※Gb変更可能

長いリードが必要な方:
MiSeq v3
納期4-6週間

お急ぎの方:
iSeq
納期7-10日

※価格等詳細は、
下記URLをご覧ください

多検体NGS解析受託サービス

数サンプル~数千以上に幅広く対応いたします。

お見積りのご相談は

一般社団法人クロックミクス

E-mail: info@clockmics.com

詳細はこちらをご覧ください。

▶▶ <http://bit.ly/3d8pBG1>



これから研究を始めるあなたに

よく解る 実験プロトコール



「解らない」が「解る」喜び。

ナカライテスクでは、実験方法・製品の使い分け・使用例・注意点・トラブルシューティングなどを合わせて掲載した4種類の「よく解る実験プロトコール」を用意しています。

選択ガイド

Western Blotting

ウェスタンブロッティング

転写からブロッキング、検出、ストリッピングまで、実験の流れに沿ってプロトコールを掲載。

検出方法(化学発光検出、発色検出)、検出試薬の感度の比較、検出感度の向上、バックグラウンドの改善などの情報が充実しています。また、転写やブロッキングを高速化する試薬[Bulletシリーズ]についても紹介しています。

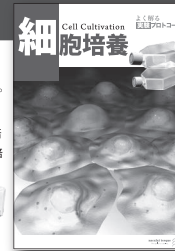
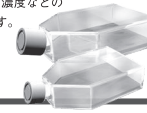


Cell Cultivation

細胞培養

培養からコンタミネーションの予防、細胞数の測定、凍結保存までのプロトコールを掲載。

基本的な細胞培養関連試薬の他、マイコプラズマの検出・予防・除去、FGF2 徐放ビーズ、アニマルフリー培地添加剤などの試薬も掲載しています。また、主要な培地の組成、抗生物質の使用濃度などの参考情報も充実しています。



Electrophoresis

電気泳動

核酸およびタンパク質の電気泳動について、ゲルの作製から染色までのプロトコールを掲載。

一般的なプロトコールのほか、RNAを泳動する変性アガロース法、低分子タンパク質を分離する Tris-Tricine 泳動法といった特殊なプロトコールやトラブルシューティングも掲載し、充実した内容となっています。また、初めて実験を行う方にも「よく解る」ように動画も用意しました。QRコードから簡単にアクセス可能で、実験前のちょっとした確認に最適です。

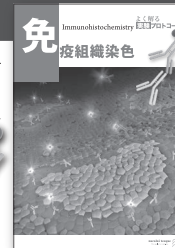


Immunohistochemistry

免疫組織染色

組織切片の作製から抗原の賦活化、ブロッキング、検出、封入までのプロトコールを掲載。

検出方法について、発色検出(ヘルオキシダーゼ検出系、アルカリホスファターゼ検出系)や蛍光検出を紹介しています。基本的な免疫組織染色関連試薬の他、キシレン代替品で非劇物のD-リモン、エタノール代替品で安価なヒストールも掲載しています。



ご希望の方は、弊社営業担当または販売取扱店までご連絡ください。

QRコードで
Webへアクセス!

弊社 Web サイトでは、よく解る実験プロトコールを公開しています。右記 QR コードよりアクセスし、各 PDF ボタンをクリックしてください。
※ QR コードは株式会社デンソーウェアの登録商標です。



ナカライテスク株式会社
〒604-0855 京都市中京区二条通烏丸西入東玉屋町 498

お問い合わせ

価格・納期のご照会 0120-489-552

製品に関するご照会

Web site : <https://www.nacalai.co.jp/ss/Contact/>
TEL : 075-211-2703

ナカライテスク

検索

または <https://www.nacalai.co.jp/>

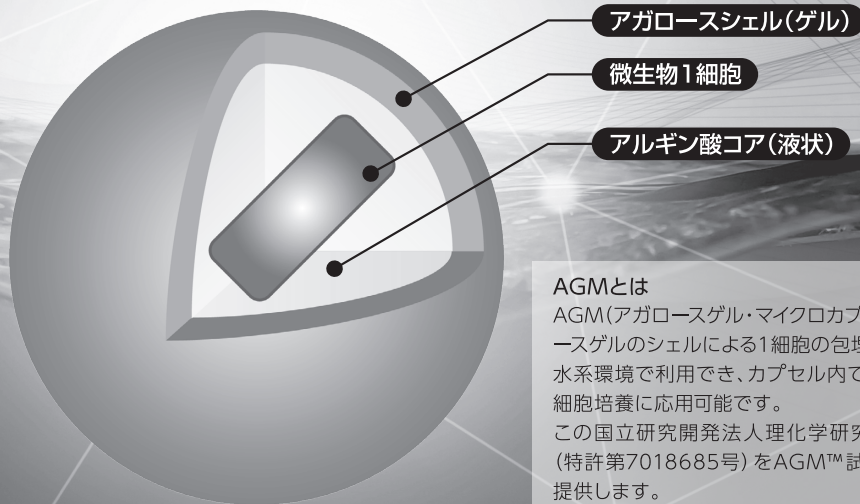
“はかる”技術で未来を創る

微生物1細胞全ゲノム解析用

AGM™ 試薬キット

AGM: アガロースゲル・マイクロカプセル

1細胞全ゲノム解析をサポートするマイクロカプセル
画期的なWater-in-waterエマルジョンによる1細胞包埋技術



AGMとは
AGM(アガロースゲル・マイクロカプセル)は、アガロースゲルのシェルによる1細胞の包埋技術です。水系環境で利用でき、カプセル内でのDNA増幅や細胞培養に応用可能です。この国立研究開発法人理化学研究所の特許技術(特許第7018685号)をAGM™試薬キットとして提供します。

AGM™試薬キットの特長

微量サンプルから均質に増幅

90%を超える高いゲノムカバー率でのDNA増幅

簡便な操作でかつ専用機器が不要

難培養性微生物への応用

試供品・カタログのお申込みは <http://agm.onetech.onl>

 東陽テクニカ

www.toyo.co.jp

ONE  TECH

株式会社 東陽テクニカ
ワン・テクノロジーズ・カンパニー
〒103-8284 東京都中央区八重洲1-1-6
TEL.03-3279-0771 E-Mail: agm-sales@toyo.co.jp

大阪支店 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原1-6-1 (新大阪ブリックビル) TEL.06-6399-9771
名古屋支店 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄2-3-1 (名古屋広小路ビルディング) TEL.052-253-6271
宇都宮営業所 〒321-0953 栃木県宇都宮市東宿郷2-4-3 (宇都宮大塚ビル) TEL.028-678-9117

医療検査装置で培った高い信頼性とコストパフォーマンスを実現

研究用 フローサイトメーター RF-500

<特長>

- ☑ セルフスタートアップと多様なメンテナンスプログラム
- ☑ 充実した精度管理プログラム
- ☑ シリンジポンプ方式による高精度セルカウンティング
- ☑ 自動蛍光補正

<仕様> ・光学系：1レーザー（488 nm）・4カラー・6パラメーター
 ・蛍光検出分離能：CV \leq 3 %
 ・最小検出粒径：0.5 μ m

※ 本製品は医療機器ではありませんので、診断に用いることはできません。



詳しくはこちら

フローサイトメーターと組み合わせ、細菌数を迅速に計数

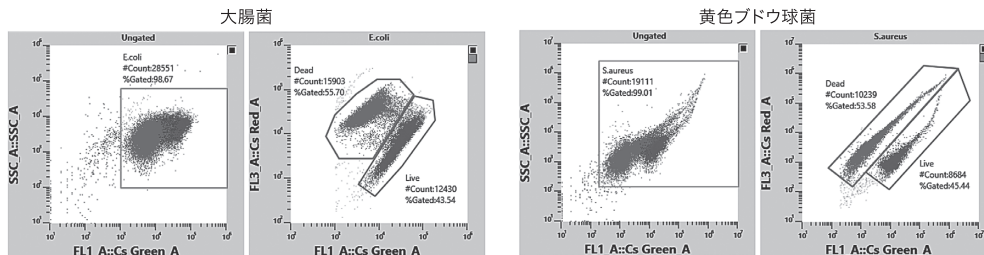
細菌数測定・生死判別用試薬CyStainシリーズ 研究用

CyStain BacCount Total/Viable



詳しくはこちら

生菌と死菌を混合した細菌懸濁液をCyStain BacCount Viableで染色し、RF-500で測定しました。



品番	製品名	包装単位	製品説明	希望小売価格(円)
CX507401	05-5008 CyStain BacCount Total	200 tests	総細菌数測定用試薬	70,000
CC618160	05-5028 CyStain BacCount Viable	200 tests	生細菌数測定用試薬(細菌の生死判別)	90,000

※ 本試薬は研究用であり、診断に用いることはできません。

※ 希望小売価格は消費税別です。

お問い合わせ先

シスメックス株式会社 日本・東アジア地域本部 R&I営業推進部

リレーションセンター 神戸市西区室谷1-3-2

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2

sysmex-fcm.jp



お問い合わせ先

生物工学研究に長年の実績!

微量精密分析の感度アップ!

立体8の字[®]原理による **秒速粉碎機** **マルチビーズショッカー[®]**



MB3000シリーズ

☑ 卓上型・省スペース ☒ 極静音

安価・タフな使い捨て容器内で植物、昆虫、微生物、土壌等の精密粉碎が可能!
各種サンプルの試料調整は、マルチビーズショッカー[®]にお任せください!

安価・タフな樹脂製使い捨て容器の種類も充実。
(96well/2ml/3ml/10ml/22ml/50ml/50mlロング/100ml)
容器の洗浄の手間不要で時間短縮/経費節減に貢献。

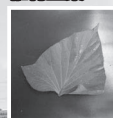
一度に多数の試料を同一条件で粉碎可能、
かつ1試料でもランサー無しで粉碎可能。

常温、低温(-10~20.0℃等)、液体窒素条件下等、
粉碎温度の制御が可能。

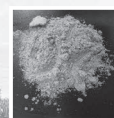
粉碎容器/粉碎媒体の材質もステンレス、ジルコニア、
タングステンカーバイドなど豊富なラインナップ。

コンピュータモータ(0~4,500rpm)により
1rpmごとの精密回転制御など豊富な制御が可能。

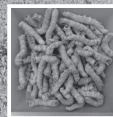
植物生葉



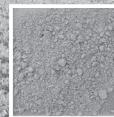
粉碎時間
10秒
液体窒素
条件下



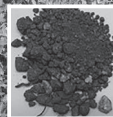
蚕



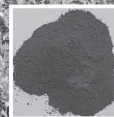
粉碎時間
30秒
常温



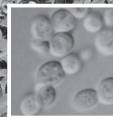
風乾土壌



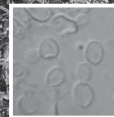
粉碎時間
30秒
常温



微生物



粉碎時間
90秒
4℃



CE ヨーロッパ安全基準適合



アプリケーションラボ完成!

テスト粉碎とデモは無料で実施します。
遠慮なくお問合せ下さい!



製造発売元

Y 安井器械株式会社

since 1953

本社・工場 〒534-0027 大阪市都島区中野町2-2-8

TEL.06-4801-4831

FAX.06-6353-0217

E-mail:s@yasuikikai.co.jp

http://www.yasuikikai.co.jp

©2022 Yasui Kikai Corporation, all rights reserved

220713

100年以上の歴史を持つオリンパスの科学事業が
株式会社エビデントとして新たにスタートしました

会社概要はこちら

<https://www.evidentscientific.com/ja/>



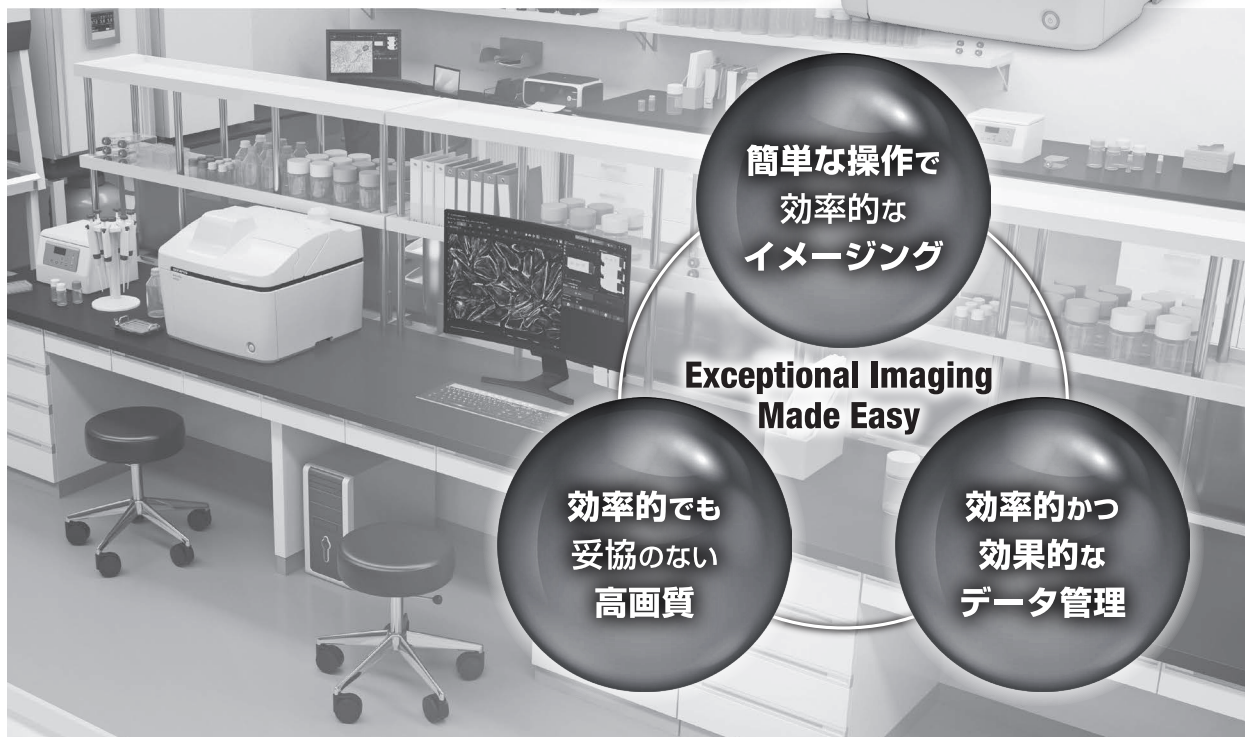
デジタルイメージングシステム APX100

研究品質を向上させるデジタルイメージングシステム

顕微鏡イメージングに最適化された光学系、

直感的なユーザーインターフェイス、AI、

一連のスマート機能で
構築されたAPX100は、
使いやすさと高画質を
同時に実現します。



簡単な操作で
効率的な
イメージング

Exceptional Imaging
Made Easy

効率的でも
妥協のない
高画質

効率的かつ
効果的な
データ管理

株式会社エビデント

〒163-0910 東京都新宿区西新宿2-3-1 新宿モノリス
[お問い合わせ]お客様相談センター 0120-58-0414

EvidentScientific.com

<https://www.olympus-lifescience.com/ja>

シングルセル、pg RNAからRNA-Seq用高品質ライブラリーが調製可能！

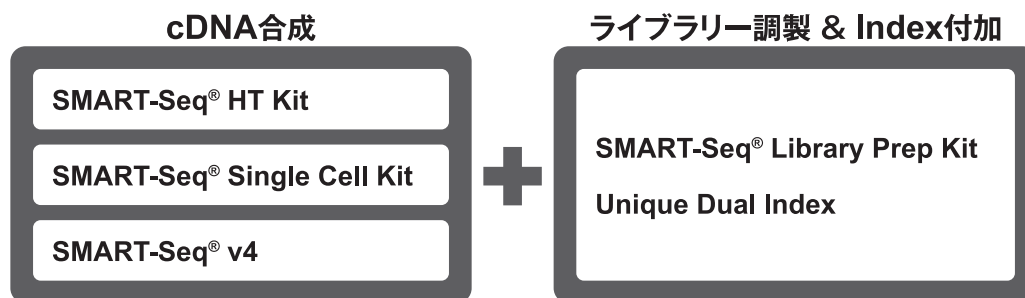
SMART-Seq[®] PLUS シリーズ



- ◆ cDNA合成、ライブラリー調製、Indexを含むイルミナ社NGS装置用オールインワンライブラリー調製キット
- ◆ 従来のライブラリー調製法よりも圧倒的に簡単。その上収量と遺伝子検出数も大幅にUp
- ◆ Unique Dual Indexの採用により、インデックスホッピングの影響を軽減



■ キットの構成



■ 製品リスト

製品名	説明	容量	製品コード
SMART-Seq [®] HT PLUS Kit	操作が簡単で価格も安い、一番おススメのキット	48回	R400748
		96回	R400749
SMART-Seq [®] Single Cell PLUS Kit	シングルセル解析をするならこれ	48回	R400750
		96回	R400751
SMART-Seq [®] v4 PLUS Kit	圧倒的使用実績を誇るゴールドスタンダード	48回	R400752
		96回	R400753

Clontech **Takara** cellartis

タカラバイオ株式会社

<https://www.takara-bio.co.jp>

KM060

遺伝子治療・ワクチン製造用
ウイルスベクター製造用バイオリアクター

scale-X™ システム

NevoLine™
Upstream



scale-X [hydro]
2.4 m²



scale-X [carbo]
10 & 30 m²



scale-X [nitro]
200 & 600 m²

POC (Proof of Concept)

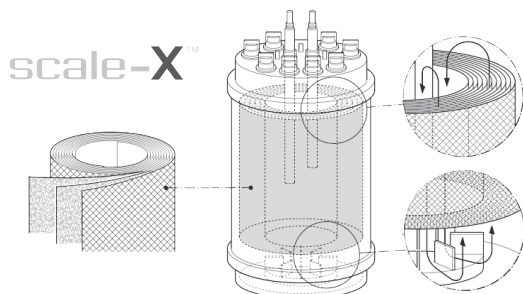
R & D (研究開発)

Clinical (臨床試験)

Commercial (商業製造)

Univercells Technologies S.A.製 scale-X™ バイオリアクターは、
ラボレベルのプロセス開発から大規模GMP商業製造スケールまで対応

特徴的なfixed-bedバイオリアクター



- ▶ 均一な細胞分布
- ▶ 安定した培地流速と栄養供給
- ▶ 再現性のある高い生産能力

培養細胞が接着可能な特徴的なfixed-bedバイオリアクターは
PET不織布とスペーサーネットが交互にらせん状に巻かれたシートで構成

お問い合わせは

PHC株式会社
バイオメディカ事業部
〒105-8433
東京都港区西新橋2丁目38番5号

新規事業推進課 TEL 03-5408-7277 FAX 03-5408-0873

New

TGI
LIFE SCIENCE

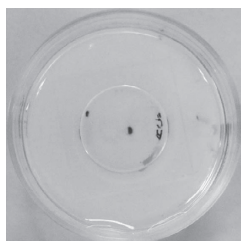
バイオフィルム透明化試薬 iCBiofilm

Clearing Reagent iCBiofilm-H1 [for Biofilm]

8mL 9,000円 [T4031]

Clearing Reagent iCBiofilm-H2 [for Biofilm]

8mL 10,000円 [T4032]



PBS 添加



iCBiofilm 添加

特長

- 本製品を添加するだけでバイオフィルムを透明化
- 様々な菌種のバイオフィルムに対応可能
- 透明化後のバイオフィルムは、光シート顕微鏡 (LSFM) や共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって3次元で観察可能

本製品は、東京慈恵会医科大学の杉本真也 准教授らの技術指導により製品化されました。

詳細はTGI のウェブサイトで



or <https://bit.ly/3RtfRWC>



東京化成工業株式会社

お問い合わせは 本社営業部 Tel: 03-3668-0489 Fax: 03-3668-0520
大阪営業部 Tel: 06-6228-1155 Fax: 06-6228-1158

facebook.com/tci.jp

www.TCIchemicals.com

twitter.com/TCI_J

創立100周年記念 第74回日本生物工学会大会 (2022)

創立100周年記念式典・授賞式

日時 2022年10月17日(月) 9:00～10:45
会場 Zoomによるオンライン形式(S会場)

受賞講演

日時 2022年10月17日(月) 10:50～15:05
会場 Zoomによるオンライン形式(S会場)
(生物工学若手賞・生物工学アジア若手賞・生物工学アジア若手研究奨励賞(DaSilva賞)の講演日程については大会日程表をご覧ください)

創立100周年記念シンポジウム

日時 2022年10月17日(月) 15:15～17:20
会場 Zoomによるオンライン形式(S会場)

一般講演・シンポジウム

会期 2022年10月18日(火)～20日(木)
会場 Zoomによるオンライン形式

懇親交流会

日時 2022年10月18日(火) 18:30～20:30
会場 Zoomによるオンライン形式(B会場)

ランチタイムセミナー

日時 2022年10月18日(火)～20日(木) 12:00～13:00
会場 Zoomによるオンライン形式(A, C, E, G会場)

展示会

日時 2022年10月18日(火)～20日(木) 9:00～17:30
会場 WebおよびZoomによるオンライン形式

生物工学若手研究者の集い(若手会)

日時 2022年10月19日(水) 18:30～20:30
会場 Zoomによるオンライン形式(B会場)

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

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

目 次

大会日程表	(3)
一般講演発表日程・演題番号表	(6)
実行委員会担当者表	(8)
受賞者一覧	(9)
各種講演番号の見方	(11)
プログラム	
第1日目 創立100周年記念式典, 授賞式, 受賞講演, シンポジウム	(13)
第2日目 受賞講演, 一般講演, ランチタイムセミナー, シンポジウム	(15)
第3日目 受賞講演, 一般講演, ランチタイムセミナー, シンポジウム/受賞講演/招待講演	(33)
第4日目 受賞講演, 一般講演, ランチタイムセミナー, シンポジウム	(51)
要旨	
第1日目 受賞講演	(71)
シンポジウム	(75)
第2日目 受賞講演	(81)
一般講演	(82)
シンポジウム	(123)
第3日目 受賞講演	(147)
一般講演	(148)
シンポジウム/受賞講演/招待講演	(190)
第4日目 受賞講演	(213)
一般講演	(214)
シンポジウム	(254)
人名索引	(271)
ランチタイムセミナープログラム	(285)
ランチタイムセミナー要旨	(286)

大会日程表

10月17日（月）

会場	午 前		昼 11:55-13:10	午 後		
		9:00-11:55		13:10-15:05		15:15-17:20
S 会場		創立100周年記念式典・授賞式・受賞講演 (功労賞, 生物工学賞)		受賞講演 (功績賞, 技術賞, 斎藤賞, 照井賞)		創立100周年記念シンポジウム 生物工学の未来 (2050年) 第1回【本部企画】

10月18日（火）

会場	午 前					昼 12:00-13:00	午 後			
	8:45-9:00	9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15	11:15-12:00		13:30-15:30		16:00-18:00	18:30-20:30
A 会場	受賞講演 (生物工学若手賞)	酵素学, 酵素工学/タンパク質工学		酵素学, 酵素工学		[L] P&G イノベーション合同会社	[S] 若手とシニアで語る生物工学の未来【本部企画・生物工学若手研究者の集い】		[S] 若手研究者のこれからの「活躍の場」を語ろう【本部企画・生物工学若手研究者の集い】	
B 会場			分類, 系統, 遺伝学/遺伝子工学		遺伝子工学					懇親交流会
C 会場	受賞講演 (生物工学若手賞)	発酵生理学, 発酵工学/代謝工学		代謝工学/発酵生理学, 発酵工学/オミクス解析			[S] 未来産業の創造に向けた産学官連携プラットフォーム【本部企画】		[S] 生体分子の相互作用における曖昧さの意義	
D 会場			醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学		醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学					
E 会場		環境浄化, 修復, 保全技術		環境浄化, 修復, 保全技術/環境工学, 廃水処理技術			[S] 先端バイオ分析の新潮流		[S] 高度に生体を模倣した細胞培養技術「Microphysiological System (MPS)」が拓く未来社会	
F 会場			培養工学/生物化学工学/バイオプロセス		バイオプロセス/生物化学工学					
G 会場		生体医用工学/セル&ティッシュエンジニアリング		セル&ティッシュエンジニアリング			[S] 持続発展可能な未来社会を創造するバイオプラスチックの最前線		[S] 光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究	

10月19日(水)

会場	午 前					昼 12:00-13:00	午 後			
	8:45-9:00	9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15	11:15-12:00		13:30-15:30	15:45-16:00	16:00-18:00 (~18:15)	18:30-20:30
A会場	受賞講演 (生物工学 若手賞)	酵素学, 酵 素工学		酵素学, 酵 素工学			[S] シンポストバイオの 潮流～腸内代謝物の有益 性と商品化		[S] 健康長寿に貢献する これからの醸造発酵技術 【本部企画】	
B会場			遺伝子工学		遺伝子工学					若手会
C会場	受賞講演 (生物工学 若手賞)	発酵生理 学, 発酵工 学/代謝工 学		発酵生理 学, 発酵工 学/代謝工 学/オミク ス解析			[IS] KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 【本部企画・国際シンポ ジウム】 Session 1: Sustainable Biotechnology Using Metabolic Engineering (メタボリッ クエンジニアリングを用 いた持続可能なバイオテ クノロジーの展開)	受賞講演 (生物工 学アジア 若手研究 奨励賞)	[IS] アジアにおけるバイ オプロダクションの現状 と未来～SDGsの達成を 目指して～【国際シンポ ジウム・関西支部】	
D会場			醸造学, 醸 造工学/食 品科学, 食 品工学		醸造学, 醸 造工学/食 品科学, 食 品工学					
E会場		環境工学, 廃水処理技 術/バイオ マス, 資源, エネルギー 工学		バイオマ ス, 資源, エネルギー 工学			[S] ゲノム編集食品の未 来を語り合う～技術か ら法規制, 実用化事例ま で～【関西支部】		[S] 植物由来のバイオプ ロダクションの新潮流	
F会場			生物化学工 学/バイオ プロセス/ 培養工学		培養工学/ 生物化学工 学					
G会場		セル& ティッシュ エンジニア リング		セル& ティッシュ エンジニア リング		[L] ノバ・バイ オメディカル 株式会社	[S] 加速する次世代抗体の 実用化に向けた取り組み	受賞講演 (生物工 学アジア 若手賞)	[IS] KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 【本部企画・国際シンポ ジウム】 Session 2: Current Advances in Nanobiotechnology and Nanomedicine (ナノバ イオテクノロジーとナノ メディシンの最先端研究) (~18:15)	

10月20日（木）

会場	午 前					昼 12:00-13:00	午 後			
	8:45-9:00	9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15	11:15-12:00		13:30-15:30		16:00-18:00	
A 会場	受賞講演 (生物工学 若手賞)	タンパク質 工学/酵素 学, 酵素工 学		タンパク質 工学			[S]生物工学会英文誌 JBBのあゆみとこれから 【本部企画・国際シンポ ジウム】			
B 会場			生合成, 天 然物化学/ 有機化学, 高分子化学		タンパク質 工学/抗体 工学					
C 会場	受賞講演 (生物工学 若手賞)	代謝工学		オミクス解 析/代謝工 学/発酵生 理学, 発酵 工学		[L]ベックマ ン・コルター 株式会社	[S]産学連携シンポジウ ム(培養・計測)【本部 企画】		[S]生物工学が拓く未培 養微生物(微生物ダーク マター)の未来	
D 会場			センサー, 計測工学/ バイオセン シング, 分 析化学		代謝工学/ オミクス解 析/発酵生 理学, 発酵 工学/シス テムバイオ ロジー/生 体情報工 学, バイオ インフォマ ティクス					
E 会場		バイオマ ス, 資源, エネルギー 工学		バイオマ ス, 資源, エネルギー 工学/植物 細胞工学, 組織培養, 育種工学		[L]バイオテッ ク株式会社	[S]バイオエコノミーに 資するバイオ×デジタル 融合型の次世代研究プ ラットフォームの創出		[S]科学者の Well-being のための志向倫理【本部 企画】	
F 会場			生物化学工 学/培養工 学/バイオ プロセス		バイオプロ セス/培養 工学/生物 化学工学					
G 会場		ペプチド工 学		ペプチド工 学/脂質工 学/糖鎖工 学			[S]最先端の代謝研究が 解き明かす解糖系の深淵 — Otto Meyerhof ノーベ ル賞受賞100周年によせ て—		[S]グローバルバイオで 達成するカーボンニュー トラル	

S：シンポジウム

IS：国際シンポジウム

L：ランチタイムセミナー

一般講演発表日程・演題番号表

一般講演発表日：10月18日（火）午前、10月19日（水）午前、10月20日（木）午前

会場：A会場～G会場

発表・討論時間：それぞれのブレイクアウトルームで45分間参加者と討議

*演題番号の見方： 例 2A01-01（第2日目 A会場 01:9:00-9:45 01番のブレイクアウトルーム）

分野	Category	第2日目（10月18日）		
		9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15
遺伝学, 分子生物学および遺伝子工学	Genetics, Molecular Biology, and Gene Engineering			
1 分類, 系統, 遺伝学	1 Taxonomy, Phylogenetics		2B02-01～03	
2 遺伝子工学	2 Genetic Engineering		2B02-04～11	
酵素学, タンパク質工学および酵素工学	Enzymology, Protein Engineering, and Enzyme Technology			
3 酵素学, 酵素工学	3 Enzymology, Enzyme	2A01-01～09, 11～13		2A03-01～12
4 タンパク質工学	4 Proteins	2A01-10		
5 抗体工学	5 Antibody Engineering			
代謝生理学・発酵生産	Metabolism and Fermentation Production			
6 発酵生理学, 発酵工学	6 Fermentation Physiology, Fermentation Technology	2C01-01～05, 12		2C03-02, 06～12
7 代謝工学	7 Metabolic Engineering	2C01-06～11		2C03-01, 04, 05
8 オミクス解析	8 Omics Technology			2C03-03
醸造・食品工学	Brewing and Food Technology			
9 醸造学, 醸造工学	9 Brewing, Brewing Technology		2D02-01～03	
10 食品科学, 食品工学	10 Food Science, Food Technology		2D02-04～11	
環境バイオテクノロジー	Environmental Biotechnology			
11 環境浄化, 修復, 保全技術	11 Bioremediation	2E01-01～12		2E03-01～05
12 環境工学, 廃水処理技術	12 Environmental Technology, Wastewater Treatment			2E03-06～12
13 バイオマス, 資源, エネルギー工学	13 Biomass, Bioresource and Energy Engineering			
生物化学工学	Biochemical Engineering			
14 生物化学工学	14 Biochemical Engineering		2F02-03～08, 11	
15 培養工学	15 Cell Culture Engineering		2F02-01, 02	
16 バイオプロセス	16 Bioprocess Engineering		2F02-09, 10, 12, 13	
植物バイオテクノロジー	Plant Biotechnology			
17 植物細胞工学, 組織培養, 育種工学	17 Plant Cell / Tissue Engineering			
動物バイオテクノロジー	Animal Cell Technology			
18 生体医用工学	18 Biomedical Engineering	2G01-01～05		
19 セル&ティッシュエンジニアリング	19 Cell and Tissue Engineering	2G01-06～12		2G03-01～12
バイオ情報工学	Bioinformatic Engineering			
20 生体情報工学, バイオインフォマティクス	20 Bioinformatics			
21 システムバイオロジー	21 Systems Biology			
分析計測化学	Analytical Chemistry and Measuring Device			
22 バイオセンシング, 分析化学	22 Biosensing and Analytical Chemistry			
23 センサー, 計測工学	23 Sensors and Monitoring Devices			
生体関連化学	Biofunctional Chemistry			
24 生合成, 天然物化学	24 Biosynthesis, Natural Organic Chemistry			
25 有機化学, 高分子化学	25 Organic Chemistry, Polymer Chemistry			
生体分子工学	Biomolecular Engineering			
26 核酸工学	26 Nucleic Acid Engineering			
27 ペプチド工学	27 Peptide Engineering			
28 脂質工学	28 Lipid Engineering			
29 糖鎖工学	29 Glycoengineering			

11:15-12:00	第3日目 (10月19日)				第4日目 (10月20日)			
	9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15	11:15-12:00	9:00-9:45	9:45-10:30	10:30-11:15	11:15-12:00
2B04-01 ~ 11		3B02-01 ~ 11		3B04-01 ~ 10				
	3A01-01 ~ 13		3A03-01 ~ 13		4A01-02, 03, 07			
					4A01-01, 04 ~ 06, 08 ~ 13		4A03-01 ~ 12	4B04-01 ~ 06
								4B04-07 ~ 12
	3C01-01 ~ 07		3C03-01 ~ 06, 09, 12				4C03-07	4D04-03
	3C01-08 ~ 13		3C03-07, 08, 10		4C01-01 ~ 12		4C03-03, 04	4D04-01, 04, 06
			3C03-11				4C03-01, 02, 05, 06, 08 ~ 12	4D04-02, 05, 07 ~ 10
2D04-01 ~ 08		3D02-01 ~ 04		3D04-01 ~ 10				
2D04-09 ~ 11		3D02-05 ~ 11		3D04-11				
	3E01-01 ~ 04							
	3E01-05 ~ 12		3E03-01 ~ 12		4E01-01 ~ 12		4E03-01 ~ 07	
2F04-02 ~ 08, 10, 11		3F02-01 ~ 06		3F04-02 ~ 07, 10 ~ 12		4F02-01, 02, 05, 06, 11		4F04-06 ~ 12
		3F02-09, 11 ~ 13		3F04-01, 08, 09		4F02-03, 04, 07, 09, 10		4F04-02, 03
2F04-01, 09, 12		3F02-07, 08, 10				4F02-08, 12, 13		4F04-01, 04, 05
							4E03-08 ~ 11	
	3G01-01 ~ 12		3G03-01 ~ 12					
								4D04-13
								4D04-11, 12
						4D02-03 ~ 05, 07 ~ 09, 11		
						4D02-01, 02, 06, 10		
						4B02-01 ~ 09		
						4B02-10		
					4G01-01 ~ 09		4G03-01, 02	
							4G03-03 ~ 07	
							4G03-08, 09	

創立100周年記念 第74回日本生物工学会大会（2022）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

大会会長	福崎 英一郎
大会副会長	青柳 秀紀・秦 洋二
実行委員長	大政 健史
実行副委員長	東 雅之
庶務	○松田 史生・古賀 雄一・山野-足立 範子・安本 周平・梶浦 裕之
式典	○清水 浩・馬場 健史
記念祝賀会	○東 雅之・堀 克敏・馬場 健史
会計	○内山 進
会場	○境 慎司・岡橋 伸幸・戸谷 吉博・梅津 光央・藤山 和仁・關 光
シンポジウム	○村中 俊哉
プログラム	○紀ノ岡 正博・石川 聖・岡澤 敦司・岡野 憲司・尾島 由紘・加藤 泰彦・ 金 美海・楠本 憲一・鳥巢 哲生・黒田 浩一・佐藤 喬章・炭谷 順一・ 田中 勉・藤田 憲一・藤田 聡史・三崎 亮・森 英樹・山崎（屋敷）思乃・ 山田 亮祐・渡辺 大輔
広報	○本田 孝祐・渡辺 大輔・中澤 昌美
展示	○荻野 千秋
ランチタイムセミナー	○蓮沼 誠久・石井 純
懇親交流会	○新聞 秀一

日本生物工学会 2022年度学会賞受賞者

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(敬称略)。

■第41回 生物工学賞

- ・近藤 昭彦(神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科・教授)
「バイオ物質生産に資するスマートセル創出に向けた革新的アプローチ」
- ・高木 昌宏(北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系・教授)
「生命機能におけるバイオマテリアルの秩序形成に関する研究」

■第16回 生物工学功績賞

- ・上平 正道(九州大学大学院工学研究院・教授)
「機能細胞作製のための動物細胞工学に関する研究」
- ・神谷 典穂(九州大学大学院工学研究院・教授)
「酵素触媒架橋反応を利用した生体分子工学分野の開拓に関する研究」

■第16回 生物工学功労賞

- ・日野 資弘(株式会社ヘリオス神戸研究所・エキスパート)
「日本生物工学会における産学連携の発展および90周年記念事業の成功に資する貢献」

■第55回 生物工学奨励賞(江田賞)

該当者なし

■第58回 生物工学奨励賞(斎藤賞)

- ・Sastia P. Putri(大阪大学大学院工学研究科・准教授)
「代謝工学および食品技術のためのメタボロミクスの新展開」

■第45回 生物工学奨励賞(照井賞)

- ・戸谷 吉博(大阪大学大学院情報科学研究科・准教授)
「光を利用したバイオプロセスの開発に関する研究」
- ・中島 一紀(北海道大学大学院工学研究科・准教授)
「有機-無機界面に着目した複合バイオ材料の創製に関する生物化学工学的研究」

■第31回 生物工学技術賞

- ・塚原 正俊¹・山田 修²・高木 博史³・外山 博英⁴
(¹株式会社バイオジェット, ²酒類総合研究所, ³奈良先端科学技術大学院大学, ⁴琉球大学)
「微生物機能を活用した新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発」

■第1回 生物工学若手賞

- ・大城 麦人(九州大学大学院農学研究院・助教)
「乳酸菌研究の異分野融合と複合微生物工学アプローチ」
- ・相馬 悠希(九州大学大学院農学研究院・助教)
「合成生物学を駆使した代謝工学研究の展開」
- ・高橋 将人(筑波大学生命環境系・博士研究員)
「ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開」
- ・徳山 健斗(中外製薬株式会社デジタル戦略推進部・データサイエンティスト)
「バイオ生産プロセスのデジタルトランスフォーメーションに向けた先進技術研究」
- ・羽城 周平(味の素株式会社バイオ・ファイン研究所・主任研究員)
「次世代農業資材に向けた二本鎖RNAの高効率バイオ生産技術の開発」
- ・松沢 智彦(香川大学農学部・助教)
「植物の多糖類を分解する微生物の緻密な酵素システム」

■第19回 生物工学アジア若手賞(Young Asian Biotechnologist Prize)

- ・Jonghoon Choi(Chung-Ang University, Korea)
「Nanoscale liposomes encapsulating oxygen saturated buffers for the reverse of hypoxia and drug delivery」

■第11回 生物工学アジア若手研究奨励賞(DaSilva Award)

- ・Yu Wang(Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, P.R. China)
「Development of genome engineering technologies for *de novo* design and construction of microbial cell factories」

■第30回 生物工学論文賞

- Huanran Wei · Yazhu Wang · Zheng Jin · Fan Yang · Jiajun Hu · Min-Tian Gao

(School of Life Sciences, Shanghai University, China)

「Utilization of straw-based phenolic acids as a biofugicide for a green agricultural production」

- 中村 恵理¹・門岡 千尋^{1,2*}・奥津 果優¹・吉崎由美子^{1,2}・高峯 和則^{1,2}・後藤 正利^{2,3}・玉置 尚徳^{1,2}・二神 泰基^{1,2}

(¹鹿児島大学農学部, ²鹿児島大学大学院連合農学研究科, ³佐賀大学農学部, *現 崇城大学生物生命学部)

「Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* and *Aspergillus oryzae*」

- 金澤 慎司^{1,2,4}・野田 陽¹・伊東 有沙²・橋本 恭子²・國澤 研大¹・中西 豪¹・梶原 茂樹¹・向 紀雄¹・飯田 順子^{1,2}・福崎英一郎³・松田 史生⁴

(¹島津製作所, ²大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所, ³大阪大学工学研究科, ⁴大阪大学情報科学研究科)

「Fake metabolomics chromatogram generation for facilitating deep learning of peak-picking neural networks」

- Emine Kemiklioglu¹ · Ebru Busra Tuncgovde² · Gonen Ozsarlak-Sozer³

(¹Bioengineering Department, Manisa Celal Bayar University, Turkey, ²Biotechnology Department, Ege University, Turkey, ³Faculty of Pharmacy, Ege University, Turkey)

「Development of liquid crystal biosensor for the detection of amyloid beta-42 levels associated with Alzheimer's disease」

- 山本 陸・紀ノ岡正博 (大阪大学大学院工学研究科)

「Design of suspension culture system with bubble sparging for human induced pluripotent stem cells in a plastic fluid」

- Zhang Min · 田代 幸寛 · 朝倉 侑弥 · 石田 夏美 · 渡邊 康太* · Yue Siyuan · 丸山 明子 · 酒井 謙二 (九州大学, *現 東京農業大学)

「Lab-scale autothermal thermophilic aerobic digestion can maintain and remove nitrogen by controlling shear stress and oxygen supply system」

- 斉藤 洸¹・加藤美登里¹・平井 格郎¹・木山 政晴¹・大山 国夫¹・半澤 宏子¹・中根 淳²・関谷 明香²・吉田 賢司²・岸野 晶祥²・土田 敦之²・木村 徹²・高橋 淳³・武田 志津¹

(¹株式会社日立製作所, ²大日本住友製薬株式会社〔現 住友ファーマ株式会社〕, ³京都大学)

「Analysis of extracellular vesicles as a potential index for monitoring differentiation of neural lineage cells from induced pluripotent stem cells」

■第11回 生物工学学生優秀賞（飛翔賞）

- 江澤 理徳 (秋田大学大学院理工学研究科)

「抗リウマチ薬の作用機序解明を目的とした標的タンパク質マクロファージ遊走阻止因子の中性子構造解析」

- 南茂 彩華 (横浜国立大学大学院理工学府)

「毛髪再生医療のための毛包原基の3Dバイオプリンティング」

- 小塚 康平 (静岡県立大学薬食生命科学総合学府)

「配列データベースを活用した酵素改変法“酵素パーツリモデリング法”の開発と検証」

- 谷口 赳夫 (大阪大学大学院情報科学研究科)

「アミノ酸代謝の¹³C代謝フラックス解析法の構築と好中球機能の制御への応用」

- 益井 実鈴 (岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科)

「新規2次元分離法を用いた自己抗体バイオマーカータンパク質の効率的な探索法の開発」

- 平田 風子 (琉球大学大学院農学研究科, 現 鹿児島大学大学院連合農学研究科)

「真菌細胞壁多糖類ニゲランの合成酵素と分解酵素の機能解析」

各種講演番号の見方

1日目
受賞講演
創立100周年記念シンポジウム

1S01-01

発表番号

開催：01 (10:50~11:55)

時間 02 (13:10~14:15)

03 (14:20~15:05)

04 (15:15~17:20)

オンライン会場: S会場

開催日：1日目

2～4日目
一般講演

2A01-01

Breakout room番号

開催：01 (9:00~ 9:45)

時間 02 (9:45~10:30)

03 (10:30~11:15)

04 (11:15~12:00)

オンライン会場: A~G会場

開催日：2～4日目

2～4日目
シンポジウム・ランチタイムセミナー

3A06-01

発表番号

開催：05 (12:00~13:00)

時間 06 (13:30~15:30)

07 (16:00~18:00)

オンライン会場: A, C, E, G会場

開催日：2～4日目

2～4日目
受賞講演

2A01-A1

発表番号

開催：01 (8:45~ 9:00)

時間 07 (15:45~16:00)

オンライン会場: A, C, G会場

開催日：2～4日目

第1日（10月17日）

開始時間	講演番号	演 題	発表者氏名（所属） ○印は講演者を示す
------	------	-----	------------------------

創立100周年記念式典・授賞式・ 受賞講演（生物学功労賞，生物学賞）

S会場（9:00～11:55）

9:00		創立100周年記念式典 会長挨拶・創立100周年記念事業について報告・来賓紹介	
9:15		来賓挨拶・祝電披露	
9:45		感謝状贈呈	
9:55		功労会員等推戴・2022年度各賞授賞式	
10:50	1S01-A1	〈生物学功労賞〉 生物学功労賞受賞にあたって ○日野 資弘（ヘリオス・神戸研究所）	
11:00	1S01-A2	〈生物学賞〉 バイオ物質生産に資するスマートセル創出に向けた革新的アプローチ ○近藤 昭彦（神戸大院・科技イノベ）	座長：福崎 英一郎
11:30	1S01-A3	〈生物学賞〉 生命機能におけるバイオマテリアルの秩序形成に関する研究 ○高木 昌宏（北陸先端大・マテリアル）	

受賞講演（生物学功績賞，生物学技術賞，生物学奨励賞（斎藤賞・照井賞））

S会場（13:10～15:05）

13:10	1S02-A1	〈生物学功績賞〉 機能細胞作製のためのセル・エンジニアリング技術の開発 ○上平 正道（九大院・工）	座長：青柳 秀紀
13:35	1S02-A2	〈生物学功績賞〉 酵素触媒架橋反応を利用した生体分子工学分野の開拓 ○神谷 典穂 ^{1,2} （ ¹ 九大院・工, ² 九大・未来化セ）	
14:00	1S02-A3	〈生物学技術賞〉 微生物機能を活用した新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発 ○塚原 正俊 ¹ , 山田 修 ² , 高木 博史 ³ , 外山 博英 ⁴ （ ¹ バイオジェット, ² 酒総研, ³ 奈良先端大・バイオ, ⁴ 琉球大・農）	座長：秦 洋二
14:15		休憩	

- 14:20** 1S03-A1 <生物学奨励賞（斎藤賞）> 座長：芦内 誠
 代謝工学および食品技術のためのメタボロミクスの新展開
○Sastia Prama Putri^{1,2,3}（¹阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構,
³大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所）
- 14:35** 1S03-A2 <生物学奨励賞（照井賞）> 座長：上平 正道
 光を利用したバイオプロセスの開発に関する研究
○戸谷 吉博（阪大院・情報）
- 14:50** 1S03-A3 <生物学奨励賞（照井賞）>
 有機-無機界面に着目した複合バイオ材料の創製に関する生物化学工学的研究
○中島 一紀（北大院・工）

シンポジウム

S 会場（15:15～17:20）

創立 100 周年記念シンポジウム 生物学の未来（2050 年）第 1 回【本部企画】

- 15:15** はじめに
 青柳 秀紀
 座長：青柳 秀紀
- 15:18** 1S04-01 日本生物工学会の 100 年の振り返り（歴史に学び未来に活かす）
○福崎 英一郎^{1,2}（¹阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構）
 座長：吉野 知子
- 16:05** 1S04-02 メタボロミクスの食品フレーバー解析への応用
○福崎 英一郎^{1,2}（¹阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構）
 座長：竹山 春子
- 16:25** 1S04-03 ロボティックバイオロジーによる生命科学の加速 —研究室の自律化と科学的発見の自動化に向けて—
○高橋 恒一^{1,2,3}（¹理研・生命機能,²慶應大,³大阪大）
 座長：章 超
- 16:55** 1S04-04 ビール商品開発設計者を支援する「醸造匠 AI」の開発
○岡田 理志¹, 福沢 周平¹, 柴垣 和広², 成 承炫², 板倉 豊和², 大勝 信秀¹
 （¹キリンホールディングス,²三菱総合研究所）
- 17:15** おわりに
 秦 洋二

第2日 (10月18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） ○印は講演者を示す
------	------	----	------------------------

受賞講演（生物工学若手賞）

A 会場（8:45～9:00）

8:45	2A01-A1	〈生物工学若手賞〉 乳酸菌研究の異分野融合と複合微生物工学アプローチ	座長：田丸 浩 ○大城 麦人（九大院・農）
------	---------	--	--------------------------

C 会場（8:45～9:00）

8:45	2C01-A1	〈生物工学若手賞〉 合成生物学を駆使した代謝工学研究の展開	座長：上平 正道 ○相馬 悠希（九大院・農）
------	---------	---	---------------------------

一般講演

A 会場（9:00～9:45）

【酵素学，酵素工学／タンパク質工学】

9:00	2A01-01	超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> が有する 2-phosphoglycolate 代謝関連遺伝子群の解析	○道盛 裕太, 井崎 力久, 三輪 有哉, 濱北 宗太郎, 下坂 天洋, 牧野 勇樹, 竹野 領, 佐藤 喬章, 別府 春樹, 金井 保, 跡見 晴幸 (京大院・工)
9:00	2A01-02	高度好塩菌 <i>Halomicrobium mukohataei</i> の MazF の機能解析	○中田 健太, 山口 良弘 (大阪公大院・理)
9:00	2A01-03	白色腐朽担子菌 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 由来新規 Flavoprotein monooxygenase の機能解析	○早坂 実夏, 森 玲香, 鈴木 裕満, 加藤 雅士, 志水 元亨 (名城大院・農)
9:00	2A01-04	キトサナーゼのグルコース-グルコサミン β -1,4 交互共重合体に対する作用	○千田 舜 ¹ , 森田 大貴 ¹ , 高遠 昌樹 ¹ , 近藤 敬子 ² , 片平 正人 ² , 武田 穰 ¹ (¹ 横国大院・工, ² 京大・エネ研)
9:00	2A01-05	超好熱性海洋細菌 <i>Thermotoga neapolitana</i> 由来 β -キシロシダーゼの酵素化学的諸性質	○石黒 早紀 ¹ , 長縄 真以 ¹ , 西山 千遥 ² , 岡崎 文美 ^{2,3} (¹ 三重大・生資, ² 三重大院・生資, ³ 三重大・先端科学研支セ)
9:00	2A01-06	<i>Paenibacillus</i> sp. A13 由来マイコデキストラナーゼの酵素学的諸性質とカイネティクス	○平田 風子 ¹ , 山内 夢乃 ² , 稲福 隆之 ² , 上地 敬子 ² , 平良 東紀 ^{1,2} (¹ 鹿児島大院・連農, ² 琉球大・農)

- 9:00 2A01-07 *Caldanaerobacter* ポリサッカライドデアセチラーゼの反応機構解析
 ○武田 悠杜¹, 佐々本 康平^{1,2}, 氷見山 幹基², 森芳 邦彦³,
 大本 貴士³, 上垣 浩一⁴, 西矢 芳昭¹, 中村 努²
 (¹ 摂南大院・理工, ² 産総研・バイオメディカル, ³ 大阪技術研, ⁴ 近畿大・農)
- 9:00 2A01-08 *N*-acetylglucosaminyltransferase IV の C 末端領域の機能と構造の解析
 ○岡 希望¹, 森 壮太¹, 池谷 真里奈², 朴 龍洙^{1,2,3}, 宮崎 剛重^{1,2,3}
 (¹ 静大院・総合科技, ² 静大・創科技院, ³ 静大・グリーン科技研)
- 9:00 2A01-09 細菌 *Arthrobacter protophormiae* 由来 D-アミノ酸オキシダーゼの塩基性 D-アミノ酸酸化活性に寄与する構造因子
 ○松永 陽平, 高橋 祥司 (長岡技科大院・工)
- 9:00 2A01-10 サブユニット間 SS 結合導入による酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼの耐熱化
 ○財津 奏太, 高橋 祥司 (長岡技科大院)
- 9:00 2A01-11 極限環境微生物 *Candidatus Desulforudis audaxviator* MazF の高度に保存されたアミノ酸の役割
 ○石塚 寛子, 釣賀 雅子, 野田 尚宏, 横田 亜紀子 (産総研・バイオメディカル)
- 9:00 2A01-12 サルコシンオキシダーゼの L-チオプロリン結合様式の解明
 ○張 宇琪¹, 下澤 勇弥¹, 佐々本 康平¹, 氷見山 幹基², 中村 努², 西矢 芳昭¹
 (¹ 摂南大院・理工, ² 産総研・バイオメディカル)
- 9:00 2A01-13 ダイコン由来グルコース転移酵素のヒドロキシ安息香酸類に対する糖転移活性の解析
 ○大橋 博之, 駒 大輔, 森芳 邦彦, 山中 勇人, 大本 貴士 (大阪技術研)

A 会場 (10:30~11:15)

【酵素学, 酵素工学】

- 10:30 2A03-01 大腸菌における異種コハク酸脱水素酵素の発現と機能化の比較
 ○塩田 悠介¹, 高坂 智之² (¹ 山口大学院・創成科学, ² 山口大・中高温微生物研究セ)
- 10:30 2A03-02 *Paenibacillus* 属由来 *nif* 遺伝子群を導入した組換え大腸菌におけるニトロゲナーゼ活性
 ○早川 紗和子, 藤井 浩, 本田 裕樹 (奈良女子大・化学生物環境)
- 10:30 2A03-03 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの熱安定性と活性に及ぼす N 糖鎖修飾の影響
 ○石田 直己¹, 廣田 瑠花¹, 塩野 義人¹, 真壁 幸樹², 小関 卓也¹
 (¹ 山形大・農, ² 山形大院・理工)
- 10:30 2A03-04 Extensive analysis of transglutaminase 1 substrate preferences using cDNA display
 ○T.I.K. Munaweera¹, Jasmina Damjanovic¹, Moeri Nezu¹, Maurizio Camagna¹, Takaaki Kojima²,
 Kiyotaka Hitomi⁴, Hideo Nakano¹, Naoto Nemoto³
 (¹ Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ² Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ³ Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ⁴ Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)
- 10:30 2A03-05 SH 基化学修飾による臨床検査薬酵素の機能改変と特性解析
 ○外山 二卯佳, 西矢 芳昭 (摂南大院・理工)
- 10:30 2A03-06 シロイヌナズナ Ca 依存性キナーゼ CPK6 の脂質修飾に関する解析
 ○増田 賢人¹, 齋藤 俊也¹, 内海 俊彦², 木原 章雄³, 辻井 雅¹, 石丸 泰寛¹, 魚住 信之¹
 (¹ 東北大院・工, ² 山口大・農, ³ 北大院・薬)
- 10:30 2A03-07 健康診断用馬尿酸加水分解酵素の開発と構造解析
 ○奥迫 拓也¹, 大西 諒², 巽 謙太³, 矢倉 一樹³, 西矢 芳昭^{1,2}
 (¹ 摂南大院・理工, ² 摂南大・理工, ³ ニプロ)
- 10:30 2A03-08 ラッカーゼの迅速選抜系構築に向けた基礎検討
 ○折田 兼成, 徳王 亮太, 大川 優生, 南畑 孝介, 神谷 典穂 (九大院・工)

- 10:30 2A03-09 フェムトリットドロップレットアッセイを用いた人工リボソーム活性の高感度検出
○小坂 唯心^{1,2}, 宮脇 佑実¹, 森 めぐみ¹, 植田 充美¹, 青木 航¹
 (1京大院・農, 2日本学術振興会)
- 10:30 2A03-10 質量分析イメージングを用いたマメ科植物の種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化
○篠原 菜穂¹, 生田 宗一郎¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}, 新間 秀一^{1,2,3}
 (1阪大院・工, 2阪大・先導的学際研機構, 3大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
- 10:30 2A03-11 質量顕微鏡を用いたオオムギ発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化
○生田 宗一郎¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}, 新間 秀一^{1,2,3}
 (1阪大院・工, 2阪大・先導的学際研機構, 3大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
- 10:30 2A03-12 質量顕微鏡を用いたネオニコチノイド系薬剤を投与した *Drosophila melanogaster* におけるアセチルコリンとその関連酵素の可視化
○林 大暉¹, 岡澤 敦司², 西脇 寿³, 福崎 英一郎^{1,4,5}, 新間 秀一^{1,4,5}
 (1阪大院・工, 2大阪公大院・農, 3愛媛大院・農, 4大阪大学先導的学際研機構, 5大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

B 会場 (9:45~10:30)

【分類, 系統, 遺伝学/遺伝子工学】

- 9:45 2B02-01 褥瘡患者の創部細菌叢と予後との関連の予備的検討: 次世代シーケンサーによるメタ 16S 解析と機械学習
○加藤 頼子¹, 藤井 隆夫¹, 尾田 友香¹, 平田 善彦¹, 平 大輔², 峰松 健夫^{3,4}, 臺 美佐子^{3,5}, 仲上 豪二郎³, 國光 真生^{3,6}, 真田 弘美^{3,4}
 (1サラヤ, 2崇城大・生物生命, 3東大院・医, 4石川県看大, 5藤田医大, 6横市大院・医)
- 9:45 2B02-02 微好気環境を好む新規な鞘細菌の単離と分類学的特徴付け
○成原 菜, 萩尾 葵, 秋本 凌輔, 武田 穰 (横国大院・工)
- 9:45 2B02-03 全ゲノム解析に基づく時無し性・極早生コシヒカリの開発
○富田 因則 (静大・グリーン科技研)
- 9:45 2B02-04 出芽酵母ピルビン酸デカルボキシラーゼの欠損株が示す 2-デオキシグルコース感受性についての解析
○野村 亘^{1,2}, 宇田 竜成¹, 井上 善晴¹ (1京大院・農, 2京大・生理化学研究ユニット)
- 9:45 2B02-05 ε-ポリ-L-リジンによる酵母 Mpk1 MAP キナーゼの活性化と抗真菌活性の相関性
栗原 優紀¹, 福井 健人¹, 池田 佳代¹, 野村 亘^{1,2}, 竹原 宗範³, ○井上 善晴¹
 (1京大院・農, 2京大・生理化学研究ユニット, 3滋賀県大・工)
- 9:45 2B02-06 微生物由来の抗生物質生産の費用対効果分析
○鄭 美嘉 (海洋研究開発機構)
- 9:45 2B02-07 翻訳制御部位の選択的変異導入による放線菌二次代謝の包括的影響
○大塚 遼¹, 佐藤 悠², 宮崎 健太郎¹, 本田 孝祐^{1,4}, 木谷 茂^{1,3}
 (1阪大・生工国際セ, 2山口大院・創成・農, 3青学大・理工・化・生命, 4阪大・先導的学際研機構)
- 9:45 2B02-08 動物細胞培養廃液のリサイクルに向けた L-乳酸資化性ラン藻の開発
○加藤 悠一¹, 稲辺 宏輔¹, 辻 彩花¹, 原口 裕次², 清水 達也², 近藤 昭彦^{1,3,4}, 蓮沼 誠久^{1,3}
 (1神戸大・先端バイオ工研セ, 2東京女子医大・先端生命医, 3神戸大院・科技イノベ, 4神戸大院・工)
- 9:45 2B02-09 *Aurantiochytrium* 属のゲノム編集による脂質生産性の向上
○新本 佳子, 渡邊 研志, 秋 庸裕 (広島大院・統合生命科学)

- 9:45 2B02-10 リン代謝の制御による生物学的封じ込め技術の実用化に向けた研究
 ○廣田 隆一, 村上 博紀, 石田 文典, 池田 丈, 舟橋 久景, 黒田 章夫
 (広島大院・統合生命科学)
- 9:45 2B02-11 ポリヒドロキシアルカン酸生成系を利用したスクリーニングによる光合成細菌由来 RuBisCO 高機能変異体の創出
 ○渡邊 秀平¹, 藤原 悠暉¹, 永田 暁洋¹, 工藤 悠希¹, 松本 直己¹,
 齋藤 樹里¹, 喜多 幸³, 富田 宏矢², 蘆田 弘樹³, 松本 謙一郎²
 (1 北大院・総合化学, 2 北大院・工, 3 神戸大院・人間発達環境学)

B 会場 (11:15~12:00)

【遺伝子工学】

- 11:15 2B04-01 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* によるパーム産業廃棄物を炭素源とした生分解性プラスチックの生産
 ○中村 優里¹, 壺井 ひかり¹, Prihardi Kahar¹, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹
 (1 神戸大・工, 2 神戸大院・科技イノベ)
- 11:15 2B04-02 新規生分解性プラスチックの生産に向けた配列制御型共重合が可能な *Ralsotonia eutropha* 改変株の開発
 ○石原 静流¹, 折田 和泉¹, 松本 謙一郎², 福居 俊昭¹
 (1 東工大・生命理工, 2 北大院・工)
- 11:15 2B04-04 コドン最適化による、麹菌 *Aspergillus oryzae* による *Ideonella sakaiensis* 由来 PET 分解酵素の異種発現
 ○伊出 健太郎¹, 戸所 健彦¹, 佐貫 理佳子³, 南 はつね²,
 河野 恵美², 小高 敦史¹, 吉田 昭介², 石田 博樹¹
 (1 月桂冠・総研, 2 奈良先端大・バイオ, 3 京工繊大・工学科学)
- 11:15 2B04-05 有用タンパク質の高生産化に向けた新たなビキア酵母株の開発方針
 ○伊藤 洋一郎^{1,2}, 石上 美佐³, 寺井 悟朗⁴, 中村 泰之², 橋場 倫子³, 西 輝之⁵,
 中澤 光⁶, 蓮沼 誠久^{1,2}, 浅井 潔⁴, 梅津 光央⁶, 石井 純², 近藤 昭彦^{1,2}
 (1 神戸大・先端バイオ工研セ, 2 神戸大院・科技イノベ, 3 高機能遺伝子デザイン技術研究組合,
 4 東大院・新領域, 5 カネカ, 6 東北大院・工)
- 11:15 2B04-06 酢酸菌を宿主としたウレアプラズマ由来タンパク質発現の試み
 ○棚倉 有哉 (関西学院大・理工)
- 11:15 2B04-07 *Aspergillus nidulans* 由来新規 aminopeptidase の機能解析
 ○古澤 晃史¹, 鈴木 貴之¹, 半田 敦也¹, 小林 吉生¹, 加藤 大志¹,
 鈴木 裕満¹, 志水 元亨¹, 加藤 雅士¹, 山形 洋平²
 (1 名城大院・農, 2 農工大院・農)
- 11:15 2B04-08 黒麹菌細胞壁構成多糖ニゲランの高生産化に関する研究
 ○水谷 治, 奥古田 佳世, 阿部 多恵, 外山 博英, 上地 敬子 (琉球大・農)
- 11:15 2B04-09 *Streptomyces* 属放線菌 NBRC14001 株は lucensomycin を生産するーゲノムマイニングによる発見ー
 西村 祥¹, 中村 和音², 山本 美也子², 森田 大地², 黒田 照夫², ○熊谷 孝則²
 (1 広島大・薬, 2 広島大院・医系科学)
- 11:15 2B04-10 プラズマローゲン生産株の探索と効率的プラズマローゲン生産法の検討
 ○桑原 芽美¹, 入交 伶¹, 藤野 泰寛¹, 本庄 雅則², 馬渡 志郎³, 藤野 武彦³, 土居 克実¹
 (1 九大院・生資環, 2 九大院・医, 3 レオロジー機能食品研)
- 11:15 2B04-11 蛋白質高分泌をもたらす黒コウジカビ *Ire1* 変異体、および出芽酵母を用いた機能解析
 ○中原 尚太¹, 木俣 有紀¹, 寺本 寛², 中西 貴士², 木俣 行雄¹
 (1 奈良先端大・バイオ, 2 ノボザイムズ・ジャパン)

C 会場 (9:00~9:45)

【発酵生理学, 発酵工学/代謝工学】

- 9:00 2C01-01 CO₂/H₂ 資化性ホモ酢酸菌 *Acetobacterium woodii* の発酵生産向上に向けた酢酸耐性株の単離と解析
 ○渡辺 直己¹, 加藤 節¹, 青井 議輝¹, 加藤 淳也¹,
 秋 庸裕¹, 松浦 将吏², 沢田 健², 中島 豊¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²中国電力)
- 9:00 2C01-02 糖消費速度が変化した時のコリネ型細菌中央代謝酵素の量的変動
 ○森下 風香¹, 浜岸 麻衣², 松田 史生³, 豊田 晃一⁴,
 和田 大⁵, 乾 将行⁴, 横田 篤⁶, 柘植 陽太^{1,7}
 (¹金沢大院・自科, ²金沢大・理工, ³阪大院・情報, ⁴RITE, ⁵摂南大・農, ⁶北大院・農,
⁷金沢大・新学術)
- 9:00 2C01-03 コリネ型細菌における代謝フラックスセンサーの探索
 ○山敷 拓人¹, 山口 陽¹, 佐々木 大介², 佐々木 建吾², 豊田 晃一³,
 和田 大⁴, 乾 将行³, 近藤 昭彦², 横田 篤⁵, 柘植 陽太^{1,6}
 (¹金沢大院・自科, ²神戸大院・科技イノベ, ³RITE, ⁴摂南大・農, ⁵北大院・農, ⁶金沢大・新学術)
- 9:00 2C01-04 チロシン高生産に向けたコリネ型細菌の代謝工学
 ○片岡 尚也^{1,2,3}, 谷口 和彌³, 松下一 信^{2,4}, 薬師 寿治^{1,2,3}
 (¹山口大・研究推進機構, ²山口大・中高温微セ, ³山口大院・創成科学, ⁴山口大・農)
- 9:00 2C01-05 *Citrobacter braakii* TB-96 の代謝経路改変による電気発酵における発酵産物の変化
 ○柳瀬 卓馬, 井上 謙吾, 吉田 ナオト, 清 啓自 (宮崎大院・農)
- 9:00 2C01-06 超高ホルムアルデヒド耐性細菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株における C₁ 毒性および C₁ 代謝制御機構の解明
 ○根本 侑知¹, 井本 誠志³, 島本 真奈³, 米光 裕³, 島田 昌也^{1,2}, 中川 智行^{1,2}
 (¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜大・応生科, ³和歌山高専)
- 9:00 2C01-07 コリネ型細菌を用いたカロテノイド化合物生産における糖源の影響
 ○山口 慎一郎¹, 弘埜 陽子², 原 清敬², 柘植 陽太^{1,3}
 (¹金沢大院・自科, ²静岡県大・食栄, ³金沢大・新学術)
- 9:00 2C01-08 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* の代謝改変エタノール生産において可逆性ヒドロゲナーゼ活性が細胞内酸化還元バランスを補正する
 ○加藤 淳也¹, 小林 駿介¹, 和田 圭介², 竹村 海生¹, 加藤 節¹, 藤井 達也²,
 岩崎 祐樹³, 青井 議輝¹, 森田 友岳², 松鹿 昭則⁴, 村上 克治², 中島 豊¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²産総研, ³呉高専, ⁴近畿大・工)
- 9:00 2C01-09 *Rhodococcus jostii* RHA1 におけるエチレングリコール酸化酵素の解析
 鈴木 快¹, ○清水 哲², 乾 将行^{1,2} (¹奈良先端大・バイオ, ²RITE)
- 9:00 2C01-10 膜脂質組成改変によるマグネトソーム上の膜受容体の活性制御
 ○森本 啓太, 巴 瞭斗, 脇 駿也, 田中 剛, 吉野 知子 (農工大院・工)
- 9:00 2C01-11 有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 代謝改変株を利用した芳香族化合物生産
 ○戸田 弘, 金井 保 (富山県大・生医工研セ)
- 9:00 2C01-12 ランタノイド依存型 C₁ 細菌の植物共生と生育促進技術への応用
 ○久田 健司¹, 野村 颯人², 根本 侑知¹, 水野 洗介¹, 三井 亮司³,
 谷 明生⁴, 井口 博之⁵, 清水 将文^{1,2}, 島田 昌也^{1,2}, 中川 智行^{1,2}
 (¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜大・応生科, ³岡山理大・理, ⁴岡山大・資源植物科研,
⁵京都先端大・バイオ環境)

C 会場 (10:30~11:15)

【代謝工学／発酵生理学, 発酵工学／オミクス解析】

- 10:30 2C03-01 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の有機酸と水素生産の解析
 ○秋山 実里, 小山内 崇 (明治大院・農)
- 10:30 2C03-02 ラビリンチュラ類による植物残渣を活用したドコサヘキサエン酸 (DHA) 生産系の開発
 ○樋口 響, IP CHI HEI, WU CHANGYU, 奥田 知生, 勝矢 祥平, 安藤 晃規, 小川 順
 (京大院・農)
- 10:30 2C03-03 シアノバクテリアにおけるカルビン回路活性化時の高速代謝変化の解析
 ○田中 謙也¹, 白井 智量^{2,3}, 松田 真実³, 近藤 昭彦^{1,2,3,4}, 蓮沼 誠久^{1,2,3}
 (¹神戸大・先端バイオ工研セ, ²理研・環境資源, ³神戸大院・科技イノベ, ⁴神戸大院・工)
- 10:30 2C03-04 ハプト藻 *Pavlova* sp. の代謝解析に基づくフコキサンチン高生産技術の開発
 ○吉田 江里菜¹, 加藤 悠一², 金本 昭彦³, 近藤 昭彦^{1,2,4}, 蓮沼 誠久^{1,2}
 (¹神戸大院・科技イノベ, ²神戸大・先端バイオ工研セ, ³OP バイオファクトリー, ⁴理研・環境資源)
- 10:30 2C03-05 シアノバクテリアにおける Entner-Doudoroff 経路の生理学的役割
 ○今田 辰海, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 10:30 2C03-06 柑橘から分離した *Enterococcus faecalis* DB-5 株のゲノム構造と乳酸生産性に関する解析
 ○福田 大介¹, Nolasco-Hipolito Cirilo² (¹GlaxoSmithKline K.K.,
²Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec)
- 10:30 2C03-07 乳酸菌における環状ジアデニル酸合成および分解酵素の解析
 ○川本 翔希¹, 藤井 直紀¹, 松原 未佳¹, 甲斐 達己¹, 國枝 尚弘¹,
 池松 充基¹, 西村 聡子¹, 三宅 克英², 飯島 信司¹
 (¹愛工大・工, ²名城大・理工)
- 10:30 2C03-08 食物繊維キシランに対して高い凝集性を示す乳酸菌の特性解析
 ○山本 万結¹, 矢野 嵩典², 三井 亮司^{2,3}
 (¹岡山理大院・理, ²岡山理大・理, ³岡山理大・生命)
- 10:30 2C03-09 乳酸菌 *Lactobacillus curvatus* WDN19 株の D-アスパラギン酸高生産機構の解析
 梶谷 賢吾¹, 小林 智宏¹, 高屋 朋彰², 柴田 公彦³, ○高橋 祥司¹
 (¹長岡技科大, ²小山高専, ³福島高専)
- 10:30 2C03-10 乳酸菌の生育に対する酵母エキスの影響
 ○齊藤 悠希, 富高 美佐, 二田 昂志郎, 深野 和紘, 梶 直人, 勝又 忠与次
 (三菱商事ライフサイエンス)
- 10:30 2C03-11 Fermented stevia improved alcohol-poisoning symptoms in association with changes in the gut microbiota of mice
 ○Qingmiao Ma, Masafumi Noda, Narandalai Danshiitsoodol, Masanori Sugiyama
 (Div. Integr. Health. Sci., Hiroshima Univ.)
- 10:30 2C03-12 ヘテロ発酵型乳酸菌 *Weissella cibaria* YN2 株の新規なフェルラ酸変換機構の解明
 ○丸子 ひかる¹, 若槻 壮哉¹, 栢木 宏之², 阿波 里佳²,
 西谷 洋輔², 栗原 浩誠², 矢野 嵩典¹, 三井 亮司^{1,3}
 (¹岡山理大・理, ²丸善製薬・総研, ³岡山理大・生命)

D 会場 (9:45~10:30)

【醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学】

- 9:45 2D02-01 二次元ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析による清酒香気成分の網羅的分析法の検討
○小林 拓嗣¹, 岩原 信之^{1,2}, 児玉 千聡¹, 岩下 和裕^{1,2}
 (酒総研,²広島大・工)
- 9:45 2D02-02 (講演中止)
- 9:45 2D02-03 麴甘酒中の麴菌体は、マウス樹状細胞を刺激して IL10/IL12 を誘導する
村山 芳香¹, 榎本 利彦¹, 小平 一也¹, 辻 典子^{2,3}, ○倉橋 敦¹
 (¹八海醸造,²十文字・食品開発,³日大・医・微生物学/粘膜免疫・共生微生物学)
- 9:45 2D02-04 酒粕の長期熟成が香気成分及び呈味成分に与える影響
○榎本 利彦, 小平 一也, 小黒 芳史, 倉橋 敦 (八海醸造・研究開発室)
- 9:45 2D02-05 低温性接合菌 *Helicostylum* sp. JW-1 株における熟成肉製造時に発現する protease 遺伝子の解析
○服部 真帆¹, 村上 周一郎² (¹明治大院・農,²明治大・農)
- 9:45 2D02-06 好熱菌発酵産物の給与が真鯛の肉質と養殖水質に与える影響評価
○碓井 茉依¹, 河内 伸浩², 宮本 浩邦^{1,3,4}, 児玉 浩明¹
 (¹千葉大院・園芸,²河内水産,³サーマス,⁴理研・生命医科学)
- 9:45 2D02-07 ヒト腸内細菌叢培養モデルを用いたグリコサミノグリカンの機能性評価
○猪熊 健太郎¹, 佐々木 大介¹, 市川 めぐみ², 大塚 祐也², 佐々木 建吾¹, 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・科技イノベ,²生化学工業)
- 9:45 2D02-08 ヒト腸内細菌叢培養モデルによるガーガム加水分解物の機能性評価
○佐々木 大介¹, 安部 綾², 小関 誠², 佐々木 建吾¹, 近藤 昭彦¹
 (¹神戸大院・科技イノベ,²太陽化学株式会社)
- 9:45 2D02-09 微細藻類サプリメント Pavlova MCT+の機能性評価
○宮古 圭, 倉場 静子, 豊里 恵, 秋山 清隆, 藤原 健史, 渡邊 崇史, 金本 昭彦
 (オーピーバイオファクトリー)
- 9:45 2D02-10 *Bacillus macerans* 由来のシクロデキストリン合成酵素によるオレウロペインへの糖転移反応
○張 易千, 張 羽嘉, 吉田 滋樹 (筑波大院・生命環境)
- 9:45 2D02-11 Multidisciplinary metabolomics of meglutol: From foodomics to epidemiology
○Marvin Nathanael Iman¹, Danielle E. Haslam^{2,3}, Shilpa N. Bhupathiraju^{2,3}, Jessica Lasky-Su²,
 Sastia Prama Putri¹, Eiichiro Fukusaki¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Med., Brigham and Womens Hosp. and Harvard Med. Sch., ³Dept.
 of Nutrition, Harvard T.H. Chan Sch. of Public Health)

D 会場 (11:15~12:00)

【醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学】

- 11:15 2D04-01 *Aspergillus luchuensis* の株間比較による色素関連遺伝子の解析
○塚原 正俊¹, 久貝 樹幹¹, 東 春奈¹, 水谷 治², 外山 博英²
 (¹バイオジェット,²琉球大・農)
- 11:15 2D04-02 亜麻仁粕の麴化によるシアン化合物の低減とその推定メカニズムの解析
戴 鳳凰^{1,2}, 曾 聲儀¹, 満生 萌水¹, 稲葉 繁樹¹, 柳田 晃良³, 古澤 省吾⁴, ○北垣 浩志^{1,2}
 (¹佐賀大・農,²鹿児島大院・連農,³西九州大健康栄養学部,⁴株式会社エヌ・ビー・アール)

- 11:15 2D04-03 鏗節製造に用いられる糸状菌 *Aspergillus chevalieri* の生活環に関与する遺伝子の解析
 ○平松 健太郎¹, 門岡 千尋², 森 一樹³, 田代 康介³, 奥津 果優¹,
 吉崎 由美子¹, 高峯 和則¹, 玉置 尚徳¹, 二神 泰基¹
 (¹鹿兒島大・農, ²崇城大・生物生命, ³九大院・農)
- 11:15 2D04-04 黄麹菌および黒麹菌の分生子への音波照射と酵素活性に及ぼす影響
 ○松本 拓¹, 坂本 響², 橋本 萌加², 小島 幸治¹, 三枝 敬明¹, 寺本 祐司¹
 (¹崇城大院・工, ²崇城大・生物生命)
- 11:15 2D04-05 *Aspergillus oryzae* の実用株における窒素源の資化に関する解析
 ○三木 翔平¹, 山下 秀行¹, 田中 拓未², 劉 利雲², 酒井 香奈江², 楠本 憲一²
 (¹樋口松之助商店, ²阪大院・工)
- 11:15 2D04-06 Effect of soil organic matter on the growth of *Aspergillus oryzae*
 Liyun Liu, Takumi Tanaka, Kanae Sakai, ○Ken-ichi Kusumoto
 (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
- 11:15 2D04-07 麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生するフェルロイルエステラーゼ FacA による清酒のオフフレーバー
 4-VG 前駆体の生成
 ○戸所 健彦, 根来 宏明, 小高 敦史, 秦 洋二, 石田 博樹 (月桂冠・総研)
- 11:15 2D04-08 糸状菌における鉄代謝制御機構：転写制御因子 HapX とその結合タンパク質の機能解析
 ○三浦 綾夏, 小林 吉生, 榊原 誠也, 深津 奈々, 津島 玲奈, 加藤 雅士, 志水 元亨
 (名城大院・農)
- 11:15 2D04-09 麹菌脂質抽出物による白血病細胞における細胞死誘導作用
 ○竹口 徹¹, 竹下 美愛⁴, 三浦 真帆⁴, 小境 敏揮²,
 甲斐 久博³, 小川 健二郎⁵, 西山 和夫^{1,4}, 山崎 正夫^{1,4}
 (¹宮崎大院・農, ²霧島酒造, ³九州保健福祉大・薬, ⁴宮崎大・農, ⁵宮崎大・TT 推進機構)
- 11:15 2D04-10 RP 含量を高めた甘酒製造法の開発
 ○中嶋 唯人^{1,2}, 坂本 篤彦², 佐藤 実紗², 尾関 健二^{1,2}
 (¹金工大院・工, ²金工大・ゲノム研)
- 11:15 2D04-11 *Aspergillus pseudoglaucus* 由来カルボキシエステラーゼ/リパーゼの特性解析と異種発現
 ○豊嶋 暲太¹, 仙波 弘雅¹, 上村 真理子¹, 木村 行宏¹, 土居 幹治², 竹中 慎治¹
 (¹神戸大院・農, ²マルトモ)

E 会場 (9:00~9:45)

【環境浄化, 修復, 保全技術】

- 9:00 2E01-01 ステンレス鋼材料における腐食発生とバイオフィーム形成のトレードオフ関係
 ○若井 暁^{1,2}, 小川 真弘¹ (¹海洋研究開発機構, ²JST・さきがけ)
- 9:00 2E01-02 軟質塩ビシートの硬化劣化への土壌細菌の関与
 ○平田 悠大¹, 別宮 浩之², 天牛 英清², 八木 敬祐², 岡野 憲司¹, 岩木 宏明¹
 (¹関西大・化生工, ²住ベシート防水)
- 9:00 2E01-03 微生物群集の好適制御に向けた複合微生物系の機能的構造解析
 ○池田 麗¹, 天野 光喜¹, 本莊 雅宏², 高橋 宣博³, 鈴木 研志⁴,
 栗栖 太⁵, 木村 元彦¹, 田代 陽介¹, 二又 裕之⁶
 (¹静大院・総合科技, ²静大・創科技院, ³静大・工, ⁴東大院・農生科, ⁵東大院・工,
⁶静大・グリーン科技研)
- 9:00 2E01-04 *Ralstonia* sp. C16 株を用いたポリヒドロキシ酪酸の最適分解条件の検討
 ○佐野 夕貴, 大上 嵩洋, 張 俗喆 (室工大院・工・環境創生)

- 9:00 2E01-05 PHB フィルムの土壌分解中におけるフィルム上菌体量の影響
 ○寺山 拓臣, 張 榕喆 (室工大院・工・環境創生)
- 9:00 2E01-06 *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 株由来ポリアミド4分解酵素遺伝子のクローニングと組換え大腸菌
 における発現検討
 ○佐藤 駿光¹, 佐々浪 由梨香¹, 山下 哲郎¹, 外村 彩夏², 山田 美和¹
 (1岩手大・農, 2東海大・農)
- 9:00 2E01-07 海洋生分解性プラスチック ポリアミド4分解菌の探索および分解酵素の諸性質解明
 ○齋藤 祐介¹, 山下 哲郎², 山田 美和² (1岩大院, 2岩大・農)
- 9:00 2E01-08 ハイドロキノンスルホン酸分解菌 *Delftia lacustris* HQS1 のゲノム解析と芳香族酸分解遺伝子群の染
 色体上での分布
 ○黒江 真由, 大滝 世和, 石澤 秀紘, 武尾 正弘 (兵庫県大院・工)
- 9:00 2E01-09 強酸性条件下でのバイオソープションによる水圏の汚染重金属除去の検討
 ○岩間 蒼平¹, 高野 力^{1,2}, 中島 一紀^{1,2}, 川崎 了^{1,2}, 青柳 秀紀³
 (1北大・工, 2北大院・工, 3筑波大・生命環境系)
- 9:00 2E01-10 車軸藻 *Penium margaritaceum* の二価鉛イオンの吸着に関する研究
 ○Byamba Tsogjargal, 前田 勇 (宇都宮大院・農)
- 9:00 2E01-11 キチンと融合タンパク質を複合化した重金属イオン吸着材料の作製
 ○重政 友貴, 中島 一紀, 青木 孝祐, 高野 力, 川崎 了 (北大院・工)
- 9:00 2E01-12 Removal of phosphate from wastewater by cyanobacteria for biotechnological applications
 ○Devi Asih^{1,2}, Tina Summerfield², Julian Eaton-Rye¹
 (1Dept.Biochem., Med. Sch. University of Otago, 2Dept. Botany. Sci. Div. University of Otago)

E 会場 (10:30~11:15)

【環境浄化, 修復, 保全技術/環境工学, 廃水処理技術】

- 10:30 2E03-01 アンモニアガス耐性細菌 *Paenibacillus lentus* NH33 のアンモニア耐性機構の解明
 ○安東 剛, 清 啓自, 吉田 ナオト (宮崎大院・農)
- 10:30 2E03-02 洗濯工程から単離したバクテリア細胞の綿布付着における界面活性剤の影響
 ○橋本 稜知¹, 奥田 裕暁^{1,3}, 松村 吉信^{1,2}, 脇田 克也³
 (1関西大院・理工, 2関西大・ORDIST, 3パナソニック・くらしアプライアンス社)
- 10:30 2E03-03 糸状性細菌 *Leptothrix* 属細菌によるベリクル形成
 ○久能 樹¹, 小野 絵里香¹, Li Xiaojie¹, 山本 達也¹, Prasad Manoj¹,
 杉本 真也², 尾花 望³, 野村 暢彦¹, Utada Andrew¹
 (1筑波大院・生命環境, 2慈恵医大・医, 3筑波大・医)
- 10:30 2E03-04 SOFIX 有機標準土壌等を用いた土壌の物理性の解析
 ○高橋 海, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 10:30 2E03-05 森林整備による池の水質浄化
 ○岡崎 飛鳥, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 10:30 2E03-06 南極地域における大気バイオエアロゾル種組成変化
 ○小林 史尚 (弘前大院・理工)
- 10:30 2E03-07 道志川における 2-メチルイソボルネオール生成微生物と環境要因に関する解析
 ○奥野 凌, 大槻 隆司 (山梨大院・医工農)
- 10:30 2E03-08 Effect of fertilizer application for the volatile organic compounds (VOCs) formation in plant leaves
 ○Ju Yeon Lee, Jeong Wook Jo, Seung Woo Yang, Hyung Joo Kim, Seung Jun Kim, Hak Jin Song,
 Yong Keun Choi
 (Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

- 10:30 2E03-09 異化的亜リン酸酸化を行う化学独立栄養細菌の探索と解析
 ○山中 享史, 加藤 淳也, 田島 誉久, 石田 文典, 池田 丈,
 舟橋 久景, 中島田 豊, 黒田 章夫, 廣田 隆一
 (広島大院・統合生命科学)
- 10:30 2E03-10 アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸合成・分解酵素の解析
 ○西村 聡子¹, 水崎 圭¹, 清水 博史¹, 三宅 克英², 飯島 信司¹
 (1愛工大・工, 2名城大・理工)
- 10:30 2E03-11 *Aspergillus oryzae* によるβラクタム系抗生物質の除去
 ○星野 里帆¹, 満保 拓実², 佐野 元昭^{1,2} (1金工大院・工, 2金工大)
- 10:30 2E03-12 海洋生分解性プラスチックの開発
 ○常盤 豊 (グリーンテクノプラス)

F 会場 (9:45~10:30)

【培養工学/生物化学工学/バイオプロセス】

- 9:45 2F02-01 糸状菌における攪拌翼形状とタンパク質生産分泌生産の相関解析
 ○小野 太暉¹, 鈴木 智大¹, 松本 琴音⁵, 荻野 千秋¹, 若井 暁^{3,4}, 近藤 昭彦³,
 坊垣 隆之², 坪井 宏和², 加戸 悠^{2,3}, 幸田 明夫², 辻野 義雄³
 (1神戸大院・工, 2大関総研, 3神戸大院・科技イノベ, 4海洋研究開発機構, 5神戸大・工)
- 9:45 2F02-02 麹菌の液体培養における菌糸分散株の酸素移動度改善がもたらす一次代謝への影響
 ○薄田 隼弥¹, 武藤 清明¹, 荒木 聡馬², 市川 暉¹, 宮澤 拳¹,
 吉見 啓^{3,4}, 加藤 好一⁵, 熊谷 俊高⁶, 油谷 幸代⁶, 阿部 敬悦^{1,4}
 (1東北大院・農, 2東北大・農, 3京大院・農, 4東北大・未来研, 5佐竹マルチミクス, 6産総研)
- 9:45 2F02-03 *Cupriavidus necator* を宿主とした乳酸ベースポリマーの生合成
 ○板倉 真優¹, 宮原 しろ沙², 岡本 沙樹¹, 田中 賢二³, 田口 精一⁴, 松崎 弘美^{1,2}
 (1熊本県大院・環境共生, 2熊本県大・環境共生, 3近畿大・産理工, 4神戸大院・科技イノベ)
- 9:45 2F02-04 コリネ菌を用いたグルコースからのフロログルシノール生産技術の開発
 ○堀田 真代¹, 道家 美紗¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
 (1神戸大院・工, 2神戸大院・科技イノベ)
- 9:45 2F02-05 コリネ菌を用いたスチレン生産技術の開発
 ○岡田 海斗¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹ (1神戸大院・工, 2神戸大・先端バイオ工研セ)
- 9:45 2F02-06 PHB production from CO₂-derived acetate via acetogen
 ○Huan Ren^{1,2}, Kazuaki Ninomiya^{1,2} (1Grad. Sch. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., 2Ints.
 Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)
- 9:45 2F02-07 *Bifidobacterium dentium* が生産する MVs の特性
 ○前田 瑞歩¹, 小西 莉子², 入江 健太², 岡田 美玖², 福田 隆志²,
 川本 純³, 今井 友也⁴, 栗原 達夫³, 倉田 淳志², 上垣 浩一²
 (1近畿大院・農, 2近畿大・農, 3京大・化研, 4京大・生存研)
- 9:45 2F02-08 カイコを用いたブタロタウイルス構造タンパク質の発現
 ○加藤 竜也^{1,2,3}, 角田 達紀², 米塚 亜美², 町田 佑樹³,
 関口 智史³, 徐 剣⁴, 鈴木 亨⁵, 朴 龍洙^{1,2,3}
 (1静大・グリーン科技研, 2静大・農, 3静大院・総合科技, 4静大・グリーン科技研(現・華東師範大学),
 5農研機構・動衛研)
- 9:45 2F02-09 カバノアナタケ培養菌糸体の生理活性物質が線虫の寿命・脂肪蓄積・糖化に及ぼす影響
 ○杉森 康一¹, 藤 あかね¹, 櫻井 明彦¹, 畑下 昌範²
 (1福井大院・工, 2若狭エネ研)

- 9:45 2F02-10 カルボン酸無水物を用いたコルジセピンの誘導体化とその増殖抑制効果
..... ○井上 元希, 鈴木 章弘, 櫻井 明彦 (福井大院・工)
- 9:45 2F02-11 Green synthesis of gold nanoparticles via fungal cell extract and their dye degradation potential
.....○Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi (Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 9:45 2F02-12 海洋性細菌による含セレン・テルル重金属微粒子の合成
.....○小川 岳紘¹, 豊田 達哉¹, 岡村 好子², 富永 依里子³, 前田 誠⁴, 阪口 利文¹
(¹県大広島・生命科学, ²広島大院・統合生命科学, ³広島大院・先進理工系科学, ⁴広島大・自然科学研究支援開発センター)
- 9:45 2F02-13 Production of glyceric acid from glucose using engineered *Escherichia coli*
.....○Bui Hoang Dang Long, Kotaro Matsubara, Yuji Aso
(Kyoto Inst. Technol.)

F 会場 (11:15~12:00)

【バイオプロセス／生物化学工学】

- 11:15 2F04-01 原生生物の捕食圧下における海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 の形態変化メカニズムの解析
.....○吉田 亮介¹, 渡辺 智², 石田 丈典¹, 池田 丈¹, 舟橋 久景¹, 黒田 章夫¹, 廣田 隆一¹
(¹広島大院・統合生命科学, ²東農大・バイオ)
- 11:15 2F04-02 油性酵母を用いた三酢酸ラクトン生産技術の開発
..... ○松岡 宥汰¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹ (¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ)
- 11:15 2F04-03 出芽酵母機能未知転写因子 *Ygr067C* の標的遺伝子の同定
..... ○栗田 涼子¹, 河原崎 泰昌^{1,2}, 田中 瑞己³
(¹静岡県大院・薬食生命, ²静岡県大・食栄, ³農工大院・農)
- 11:15 2F04-04 リン高蓄積酵母のリン含有量や貯蔵形態に関する解析
..... ○尾島 由紘, 直井 喬平, 東 雅之 (大阪公大院・工)
- 11:15 2F04-05 耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属吸着プロセス
..... ○高野 力¹, 中島 一紀¹, 川崎 了¹, 青柳 秀紀²
(¹北大・工, ²筑波大・生命環境系)
- 11:15 2F04-06 ゴム分解微生物 MOE-1 の有するゴム分解酵素の抽出・精製
..... ○桑野 光明, 笈木 宏和 (久留米高専)
- 11:15 2F04-07 ゴム分解菌を用いた様々な SBR 分解条件の AI 解析
..... ○山根 周弥, 笈木 宏和 (久留米高専)
- 11:15 2F04-08 Tet 転写活性化システムを用いた微細藻類クラミドモナスにおける人工遺伝子発現制御技術の開発
..... ○秋山 立幹, 河邊 佳典, 宮副 ころ, 上平 正道 (九大院・工)
- 11:15 2F04-09 (講演中止)
- 11:15 2F04-10 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の培養に伴うエンドトキシンの遊離挙動の解析とその利用
..... ○吉澤 莉奈¹, 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P, ²筑波大・生命環境系)
- 11:15 2F04-11 *Weissella minor* COM 株が生産する 2 種の新奇バクテリオリシンの異種発現系の構築と諸特性の解析
..... ○内藤 温貴¹, 竹内 愛子¹, 野見山 泰成¹, 庄野 陸太¹, 吉田 遥海¹, 中山 二郎², 善藤 威史²
(¹九大院・生資環, ²九大院・農)
- 11:15 2F04-12 最小サイズの発光酵素「picALuc」の開発とその応用
..... ○大室 (松山) 有紀¹, 古田 忠臣², 松井 勇人¹, 叶井 正樹¹, 上田 宏³
(¹鳥津製作所, ²東工大・生命理工, ³東工大・化学生命研)

G 会場 (9:00~9:45)

【生体医用工学/セル&ティッシュエンジニアリング】

- 9:00 2G01-01 グルクロン酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞損傷効果の検討
○森下 琢麻¹, 鷲尾 周¹, 山手 康輝², 森田 健太¹,
 西村 勇哉³, 大谷 亨¹, 近藤 昭彦³, 荻野 千秋¹
 (1神戸大院・工, 2神戸大・工, 3神戸大院・科技イノベ)
- 9:00 2G01-02 がん細胞における低酸素状態での過酸化水素の寄与に関する解析
○鷲尾 周¹, 森下 琢麻¹, 山手 康輝⁴, 森田 健太¹,
 西村 勇哉², 佐々木 良平³, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹
 (1神戸大院・工, 2神戸大院・科技イノベ, 3神戸大院・医, 4神戸大・工)
- 9:00 2G01-03 アニサキスと *C.elegans* の表面機能化法の開発と Living Drug Delivery System への応用可能性の検討
○境 慎司, Mubarak Wildan, 小嶋 勝 (阪大院・基礎工)
- 9:00 2G01-04 フェロセン含有リン脂質ポリマーによるがん細胞の免疫原性細胞死誘導
○山口 明生, 金子 真大, 井藤 彰 (名大院・工)
- 9:00 2G01-05 Synthesis and characterization of a novel self-assembled amphiphilic alpha-1,3-glucan nanomicelles for drug delivery
○Zhengyu Su, Yosuke Toyotake, Daisuke Matsui, Yoichi Takeda, Mamoru Wakayama
 (Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
- 9:00 2G01-06 メチルグリオキサールによるヒト間葉系幹細胞の増殖促進効果の解明
○Ang Kai Torng, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 9:00 2G01-07 培養画像を用いた培養工程評価技術の開発
○幡多 徳彦^{1,3,4}, 張本 乾一^{2,3,4}, 上岡 惇也³, Ang Kai Torng³, 宮本 風俊³, 紀ノ岡 正博^{3,4}
 (1ローツェライフサイエンス, 2ローツェ, 3阪大院・工,
 4阪大・テクノアリーナ細胞製造コトづくり拠点)
- 9:00 2G01-08 塑性流体を用いたヒト iPS 細胞の大量培養
○山本 陸¹, 都倉 知浩^{1,2}, 紀ノ岡 正博¹ (1阪大院・工, 2藤森工業)
- 9:00 2G01-09 ヒト iPS 細胞分化過程における上皮間葉転換の機構解明と新規分化誘導法開発への応用
○坂谷 優奈, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 9:00 2G01-10 ヒト間葉系幹細胞の培養におけるエクソソームを含む細胞外小胞の生産能の検討
○木山 実優, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 9:00 2G01-11 コラーゲン塗布面を用いたヒト間葉系幹細胞の細胞外マトリックスのリモデリング効果の検討
○Tan Shao Ying, 金 美海, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 9:00 2G01-12 幹細胞の拡大培養時における細胞特性の“揺らぎ”を表す速度論モデル構築
○今井 綾¹, 佐々木 啓^{1,2}, 上岡 惇也¹, 紀ノ岡 正博¹
 (1阪大院・工, 2阪大・MEIセ)

G 会場 (10:30~11:15)

【セル&ティッシュエンジニアリング】

- 10:30 2G03-01 自動培養装置を活用した分化誘導工程の最適化
○丹原 慎司, 福守 一浩, 紀ノ岡 正博 (阪大院・工)
- 10:30 2G03-02 iPS 細胞培養におけるコロニー成長挙動の解析技術の開発と有用性検証
○鳥羽 修平¹, 山本 陽治¹, 櫻井 康雄², 塚原 正義³
 (1キヤノン, 2キヤノンメディカルシステムズ, 3京都大学 iPS 細胞研究財団)

- 10:30 2G03-03 ヒト毛包幹細胞の機能維持培養法
○山内 万貴¹, 景山 達斗^{1,2,3}, 笠井 敬一郎⁴, 福田 淳二^{1,2}
 (¹横国大院・工, ²神奈川県産業技術総合研, ³JST・さきがけ, ⁴湘南美容外科)
- 10:30 2G03-04 細胞自己凝集化技術を用いた造影剤担持型細胞凝集塊の作製
○膝 魯鵬¹, 福島 宗一郎³, 岡野 ジェイムス洋尚³, 岩井 良輔^{1,2}
 (¹岡山理大院・工, ²岡山理大・フロンティア理工研, ³東京慈恵会医大・再生医学研)
- 10:30 2G03-05 クラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ3Dプリンターによる三次元組織の作製
○大野 莉歩¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
- 10:30 2G03-06 酵素による架橋形成反応を用いた液体金属内包ヒドロゲルの作製
○松田 幸大¹, 小嶋 勝¹, 中畑 雅樹², 堀口 一樹¹, 境 慎司¹
 (¹阪大院・基礎工, ²阪大院・理)
- 10:30 2G03-07 SpyTag/SpyCatcher システムを用いた SARS-CoV-2-VLP ワクチンの開発
○NAM SEOYEON¹, 保木本 達也¹, Nguyen Bich Thao¹, 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2},
 大政 健史^{1,2}
 (¹阪大院・工, ²阪大・OTRI)
- 10:30 2G03-08 バイオリアクターを用いたヒト iPS 細胞からの NK 細胞分化誘導の検討
○畑岡 堯也¹, 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (¹阪大院・工, ²阪大・先導的学際研機構)
- 10:30 2G03-09 チャイニーズハムスター肺細胞由来の iPS 細胞の樹立
○藤岡 晴生¹, 吉田 貴美¹, 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 古賀 雄一³, 大政 健史^{1,2}
 (¹阪大院・工, ²阪大・先導的学際研機構, ³岡山理大・工)
- 10:30 2G03-10 立体子宮内膜様組織構築のための灌流培養の有効性の検討
○若林 憲信¹, 坂口 勝久¹, 戸部 友輔¹, 藤間 千尋²,
 藏本 吾郎², 本間 順², 岩崎 清隆¹, 清水 達也²
 (¹早大院・先進理工, ²東京女子医大・先端研)
- 10:30 2G03-11 CHO 細胞灌流培養における組換え IgG1 抗体特性の動的変化解析
○岡本 棟悦¹, 樋口 拓哉², 鈴木 真史², 奥谷 聡志², 鬼塚 正義³
 (¹徳島大院・創成科学研究, ²味の素・バイオファイン研, ³徳島大院・社会産理工)
- 10:30 2G03-12 中間径フィラメントのテール領域における二次構造とアクチン結合の関係
○内田 幸希¹, 山岸 彩奈^{1,2}, 長崎 晃³, 上田 太郎⁴, 中村 史^{1,2}
 (¹農工大院・工, ²産総研・細胞分子工学, ³産総研・バイオメディカル, ⁴早大院・先進理工)

ランチタイムセミナー

2A05-01 P&G イノベーション合同会社

A 会場 (12:00~13:00)

シンポジウム

A 会場 (13:30～15:30)

若手とシニアで語る生物工学の未来【本部企画・生物工学若手研究者の集い】

13:30		はじめに 青木 航 座長：青木 航
13:40	2A06-01	日本生物工学会が果たすべき役割とは？ ○福崎 英一郎 ^{1,2} (1 阪大院・工, 2 阪大・先導的学際研機構) 座長：蟹江 慧
13:45	2A06-02	生物工学分野における産学連携の未来 ○秦 洋二 (月桂冠・総研) 座長：三浦 夏子
13:50	2A06-03	次世代生物工学会を支える若手研究者のダイバーシティーとは？ ○竹山 春子 (早大・先進理工) 座長：徳山 健斗
13:55	2A06-04	ダイバーシティーを生かした生物工学のシナリオ作り ○吉野 知子 (農工大院・工) 座長：青木 航
14:00	2A06-05	オンとオフでの生物工学若手会 -昔と今, そして次の世代へ- ○中島 一紀 (北大院・工) 座長：蟹江 慧
14:05	2A06-06	若手研究者がワクワクする生物工学の未来について考える ○曾宮 正晴 (阪大・産研) 座長：青木 航
14:10		パネルディスカッション 生物工学の未来を語ろう 全講演者
15:25		終わりに 青木 航

A 会場 (16:00～18:00)

若手研究者のこれからの「活躍の場」を語ろう【本部企画・生物工学若手研究者の集い】

16:00		はじめに 蟹江 慧 座長：三浦 夏子
16:05	2A07-01	インダストリー研究者のキャリアパス紹介～ご参考までに～ ○佐藤 俊輔 (カネカ) 座長：曾宮 正晴
16:15	2A07-02	"ウェット×ドライの二刀流"の現在地 ～製薬企業における博士のキャリアパス紹介～ ○佐々木 寛人 (塩野義製薬)
16:25	2A07-03	博士のひとりとして、行政の世界で仕事をしてきた経験と個人的な感想 ○勝山 (高橋) めぐみ (内閣府食品安全委員会事務局)

			座長：徳山 健斗
16:35	2A07-04	ダブルメジャー、トリプルメジャーを目指そう！女性研究者のDXの活用の仕方○向田 志保 ^{1,2} (1三井化学, ² 信州大・工)	
16:45	2A07-05	科学・技術と政策をつなぐキャリアの探索～シンクタンク研究員の事例紹介～○仲嶋 翼 (三菱 UFJ リサーチ&コンサルティング)	座長：三浦 夏子
16:55	2A07-06	公的研究機関での研究系キャリアパス紹介～大学と研究所の違いって？～○千葉 洋子 (理研・環境資源)	座長：蟹江 慧
17:05		パネルディスカッション これからの「活躍の場」を語ろう 全講演者	
17:55		おわりに 蟹江 慧	

C 会場 (13:30～15:30)

未来産業の創造に向けた産学官連携プラットフォーム【本部企画】

13:30		はじめに 林 圭 座長：岡 賀根雄	
13:35	2C06-01	研究成果の社会実装を進める知識製造 ○井上 浄 (株式会社リバネス)	座長：明石 貴裕
14:10	2C06-02	社会的課題コロナに対しての連携～飛沫防止フェイスシールドの迅速開発～○山田 賢治 ¹ , 齊藤 昌典 ² , 白井 宏樹 ³ (¹ サントリーホールディングス, ² 凸版印刷, ³ 理研)	
14:45		休憩	座長：林 圭
14:50	2C06-03	「大分宇宙港」実現に向けた挑戦 宇宙規模で愛される「おんせん県おおいた」を目指して ○堀 政博 (大分県庁)	
15:25		おわりに 明石 貴裕	

C 会場 (16:00～18:00)

生体分子の相互作用における曖昧さの意義

16:00	2C07-01	序章：非特異的接着性を示すバクテリオナノファイバータンパク質 AtaA ○堀 克敏 (名工大院・工)	座長：中村 史
16:25	2C07-02	バイオミネラリゼーションタンパク質の無機物吸着機能 ○新垣 篤史 (農工大院・工)	
16:50	2C07-03	不凍タンパク質とは何か？ ○津田 栄 (東大院新領域)	

座長：堀 克敏

- 17:15 2C07-04 変性タンパク質工学から見えてきた天然変性タンパク質の姿
 ○二見 淳一郎 (岡山大院・統合科学)
- 17:40 2C07-05 総括と将来展望：秩序と無秩序の間の「曖昧さ」
 ○高木 昌宏 (北陸先端大・マテリアル)

E 会場 (13:30~15:30)

先端バイオ分析の新潮流

- 13:30 はじめに
 座古 保
 座長：座古 保
- 13:35 2E06-01 パターン認識を活用した超分子化学センシング
 ○南 豪 (東大・生研)
- 14:00 2E06-02 Chemical tongue: 味覚の模倣によって試料の特徴を捉えるバイオ分析ツール
 ○富田 峻介 (産総研・健康医工学)
- 14:25 休憩
- 14:30 2E06-03 安定性駆動型バイオセンサの機能的可塑性
 ○梅野 太輔, 木村 友紀, 関 貴洋 (早大院・先進理工)
 座長：梅野 大輔
- 14:50 2E06-04 新規蛍光プローブによるアミロイド多型認識
 ○座古 保 (愛媛大院・理工)
- 15:10 2E06-05 各種食中毒から生活者を守る「パトロール酵母」の開発
 ○上田 宏¹, 蘇 九龍¹, 朱 博¹, 井上 暁人¹, 大山 浩之², 森田 いずみ²,
 董 金華¹, 小西 良子³, 北口 哲也¹, 小林 典裕², 三宅 司郎⁴
 (¹東工大・化学生命研, ²神戸薬大・薬, ³東農大・応生科, ⁴麻布大・生命環境)
- おわりに
 上田 宏

E 会場 (16:00~18:00)

高度に生体を模倣した細胞培養技術「Microphysiological System (MPS)」が拓く未来社会

- 16:00 はじめに
 清水 一憲
 座長：清水 一憲
- 16:05 2E07-01 ヒト iPS 細胞由来腸細胞を用いた生体模倣システムの開発
 ○松永 民秀 (名市大・院薬)
- 16:25 2E07-02 三次元微小血管モデルにおけるマルチスケール解析
 ○松永 行子 (東大・生研)
 座長：堀江 正信
- 16:45 2E07-03 リバースバイオエンジニアリングによる生体再構成への挑戦
 ○亀井 謙一郎 (京大・アイセムス)
- 17:05 2E07-04 多能性幹細胞からの機能的組織誘導
 ○永樂 元次^{1,2} (¹京大・医生研, ²京大・ASHBi)

17:25	2E07-05	ヒト iPS 細胞のライブセルレポーターアッセイと仮想人体構築学 ○福田 淳二 (横国大院・工)
17:45	2E07-06	運動神経支配されたヒト骨格筋組織モデルの開発 ○清水 一憲 (名大院・工)
17:58		おわりに 堀江 正信

G 会場 (13:30~15:30)

持続発展可能な未来社会を創造するバイオプラスチックの最前線

13:30		はじめに 金原 和秀 座長: 本田 孝祐
13:35	2G06-01	天然ゴムの生分解とバイオプラスチックへの変換 ○笠井 大輔 (長岡技科大) 座長: 笠井 大輔
13:55	2G06-02	粘弾性 PHA ブロック共重合体の合成と生分解 ○松本 謙一郎 (北大院・工) 座長: 福居 俊昭
14:15	2G06-03	メタオミクス解析で解き明かす実海洋環境でのプラスチックの生分解プロセス ○石井 俊一 ¹ , 鈴木 美和 ² , 粕谷 健一 ² (¹ 海洋研究開発機構, ² 群大院・理工)
14:35		休憩
14:45	2G06-04	海洋生分解性プラスチック製品の社会実装のための生分解評価法の ISO 規格化 ○国岡 正雄 (産総研) 座長: 笠井 大輔
15:05	2G06-05	バイオものづくりによる新ポリマー産業創出への挑戦 ○佐藤 俊輔 (カネカ)
15:25		おわりに 森川 正章

G 会場 (16:00~18:00)

光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究

16:00		はじめに 国岡 正雄 座長: 中山 敦好
16:10	2G07-01	イタコン酸由来光スイッチ分解性ナイロンの分子設計 ○金子 達雄, Mohammad Asif Ali, 岡島 麻衣子, Yin Hongrong, Maninder Singh, 高田 健司 (北陸先端大・マテリアル)
16:30	2G07-02	光スイッチを可能にする光触媒の開発 ○勝又 健一 ¹ , 町田 慎悟 ¹ , 中田 一弥 ² , 小川 誠 ³ (¹ 東理大・先進工, ² 東農大・農学院, ³ VISTEC)

座長：荻野 千秋

- 16:50 2G07-03 イタコン酸由来光スイッチポリアミドの酵素分解
○加藤 太郎¹, 柴田 直樹², 根来 誠司³
 (¹鹿大院・理・化学, ²兵庫県大院・理, ³兵庫県大院・工)
- 17:10 2G07-04 新しいバイオプラスチック開発のための植物バイオマスを原料とする発酵プロセス
○川口 秀夫¹, 佐塚 隆志² (¹神戸大・先端バイオ工研セ, ²名大・生物機能開発セ)
 座長：金子 達雄
- 17:30 2G07-05 光スイッチ機能を有するプラスチックの社会実装を目指して
○佐藤 治 (東理大・経営)
- 17:50 おわりに
 金子 達雄

第3日 (10月19日)

開始時間	講演番号	演 題	発表者氏名 (所属) ○印は講演者を示す
------	------	-----	-------------------------

受賞講演 (生物工学若手賞)

A 会場 (8:45~9:00)

8:45	3A01-A1	〈生物工学若手賞〉 ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開 ○高橋 将人 (筑波大・生命環境系)	座長：竹山 春子
------	---------	---	----------

C 会場 (8:45~9:00)

8:45	3C01-A1	〈生物工学若手賞〉 バイオ生産プロセスのデジタルトランスフォーメーションに向けた先進技術研究 ○徳山 健斗 (中外製薬)	座長：梅津 光央
------	---------	--	----------

一般講演

A 会場 (9:00~9:45)

【酵素学, 酵素工学】

9:00	3A01-01	光増感剤/組換え大腸菌ハイブリッド系による可視光駆動型水素生産 ○丸山 季穂, 藤井 浩, 本田 裕樹 (奈良女子大・化学生物環境)	
9:00	3A01-02	Biochemical analysis of citrate synthase from the red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> for increased organic acid production ○Maki Nishii, Takashi Osanai (Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)	
9:00	3A01-03	Study on the enzymatic synthesis of chiral trifluorolactic acid by lactate dehydrogenase ○Jingfei Wu ¹ , Aem Nuylert ¹ , Misako Iwaki ¹ , Shinsuke Miki ² , Yasuhisa Asano ¹ (¹ Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ² Central Glass Co., Ltd.)	
9:00	3A01-04	微生物酵素反応による新たな有用 S-置換システインスルフォキシド供給経路の構築 ○水谷 拓 ¹ , 原 良太郎 ¹ , 竹内 道樹 ¹ , 日比 慎 ² , 上田 誠 ³ , 小川 順 ¹ (¹ 京大院・農, ² 富山県大・工, ³ 小山高専)	
9:00	3A01-05	<i>Xanthomonas campestris</i> WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を用いた alpha-グルコシルグリセロールの酵素的合成 ○坂野 正季 ¹ , 曹 偉 ¹ , 石井 義孝 ² , 桐村 光太郎 ^{1,2} (¹ 早大院・先進理工・, ² 早大・理工総研)	
9:00	3A01-06	化学酵素的アミド結合形成反応を利用したポリアミド合成への展開 ○鈴木 達也 ¹ , 唐鎌 翔大 ¹ , 鈴木 伸 ² , 木野 邦器 ^{1,2} (¹ 早大院・先進理工, ² 早大・理工総研)	

- 9:00 3A01-07 固定化ラン藻 *Nostoc* sp. 由来酵素 (NsPCS) を用いた機能性食品素材候補化合物 γ グルタミルシステインの生産
○中井 拓也¹, 大野 萌華¹, 村岡 未彩¹, 松浦 秀幸¹, 長野 一也^{1,3},
 荒井 雅吉¹, 宇山 浩⁴, 平田 善彦^{1,2}, 平田 収正^{1,3}
 (1) 阪大院・薬, (2) サラヤ (株), (3) 和歌山医大・薬, (4) 阪大院・工)
- 9:00 3A01-08 長鎖ポリアミンの鎖長がシリカ重合活性に与える影響の評価
○中杉 行秀, 舟橋 久景, 石田 丈典, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 池田 丈
 (広島大院・統合生命科学)
- 9:00 3A01-09 クラウディング環境が微生物由来トランスグルタミナーゼの架橋触媒挙動に与える影響
○佐藤 峻¹, 南畑 孝介¹, 若林 里衣¹, 後藤 雅宏^{1,2}, 神谷 典穂^{1,2}
 (1) 九大院・工, (2) 九大・未来化セ)
- 9:00 3A01-10 鯉節カビ *Aspergillus* 属糸状菌による鯉節(荒節)の燻煙香成分の代謝分解
○米子 響¹, 藤原 卓巳¹, 木村 行宏¹, 竹中 慎治¹, 土居 幹治²
 (1) 神戸大院・農, (2) マルトモ)
- 9:00 3A01-11 ブタ糞から単離された乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の遺伝的多様性と有機酸産生
○保科 涼¹, 板谷 かえで¹, 宮本 浩邦^{1,2,3}, 児玉 浩明¹
 (1) 千葉大院・園芸, (2) 理研・生命医科学, (3) サーマス)
- 9:00 3A01-12 ヒドロキシエタオール類の酵素合成と生物活性の評価
○古屋 俊樹¹, 野澤 大樹¹, 松山 彰取² (1) 東京理科大・理工, (2) (株) ダイセル)
- 9:00 3A01-13 腸内細菌における葉酸生合成に関わる酵素の同定
○佐藤 喬章, 加地 楓, 跡見 晴幸 (京大院・工)

A 会場 (10:30~11:15)

【酵素学, 酵素工学】

- 10:30 3A03-01 直接電子移動型酵素の電極触媒活性向上変異体の設計を目指した多変量解析による変異体ライブラリ解析
○後藤 翼¹, 高村 映一郎¹, 坂元 知里², 坂元 博昭¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦³, 末 信一郎¹
 (1) 福井大院・工, (2) 福井高専, (3) 香川大・農)
- 10:30 3A03-02 配列保存度情報を組み入れた酵素工学
○二井手 哲平, 杉木 創, 宮脇 佳汰, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 10:30 3A03-03 異種生物由来酵素の発現量向上を目指した酵素設計プロセス開発
○宮脇 佳汰, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 10:30 3A03-04 リンゴ酸酵素の補酵素特異性変換を先導する機械学習手法の提案
○杉木 創, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 10:30 3A03-05 炭素間二重結合を酸化開裂する酵素の機能改変とパニリン合成への応用
○坂本 紗津記¹, 木野 邦器², 古屋 俊樹¹ (1) 東京理科大院・理工, (2) 早大・先進理工)
- 10:30 3A03-06 プラズマニルエタノールアミン不飽和化酵素の可溶性発現
○齊藤 彩¹, DAMNJANOVIC Jasmina¹, 中野 秀雄¹, 岩崎 雄吾²
 (1) 名大院・生命農学, (2) 中部大院・応生)
- 10:30 3A03-07 糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来クチナーゼのアミノ酸変異による反応特性の改良
○島 帆花, 野崎 功一 (信州大院・総理工研)
- 10:30 3A03-08 様々な炭素鎖長のアルデヒドに対応可能なアルカン合成酵素の開発
○工藤 恒¹, Christopher J. Vavricka¹, 伏見 圭司¹, 蓮沼 誠久², 近藤 昭彦¹
 (1) 神戸大院・科技イノベ, (2) 神戸大・先端バイオ工研セ)

- 10:30 3A03-09 フルオロケトン還元する酵母由来新規カルボニルレダクターゼの発見と諸性質の検討及び合理的
 改変型酵素の X 線結晶構造解析
 ○渡邊 幸夫¹, 釜井 彩花¹, 三木 慎介², 日比 慎¹, 浅野 泰久¹
 (¹富山県大・生医工研セ, ²セントラル硝子 (株))
- 10:30 3A03-10 酵母由来カルボニルレダクターゼの部位特異的変異導入による可溶性発現
 ○池田 宇宙¹, Kunwadee Palasin¹, 三木 慎介², 浅野 泰久¹
 (¹富山県大・生医工研セ, ²セントラル硝子 (株))
- 10:30 3A03-11 超好熱性マルチ銅オキシダーゼの T1 銅周辺への部位特異的導入による酸化還元電位の改変
 ○平中 佑磨¹, 多喜 俊介¹, 高村 映一郎¹, 坂元 博昭¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦², 末 信一朗¹
 (¹福井大院・工, ²香川大・農)
- 10:30 3A03-12 シリカ形成細菌における長鎖ポリアミン合成酵素の進化に関する研究
 ○池田 丈¹, 西本 健太郎², 中杉 行秀¹, 石田 丈典¹, 舟橋 久景¹, 廣田 隆一¹, 黒田 章夫¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²広島大・工)
- 10:30 3A03-13 多様な機能を有する祖先型 *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素群の設計
 ○荒関 隼人, 川崎 真由, 神戸 彬光, 中野 祥吾, 伊藤 創平 (静大院・薬食生命)

B 会場 (9:45~10:30)

【遺伝子工学】

- 9:45 3B02-01 Cas11d の設計・発現による新規ゲノム編集技術 CRISPR-Cas type I-D (TiD) の高効率化
 ○和田 直樹¹, 村上 愛美¹, 丸井 和也¹, 刑部 祐里子², 刑部 敬史¹
 (¹徳島大院・社会産理工, ²東工大・生命理工)
- 9:45 3B02-02 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* におけるゲノム編集の効率化に向けた CRISPR-Cas ϕ system の利用
 ○鈴木 沙和, 藤井 大河, 前田 義昌, 田中 剛 (農工大院・工)
- 9:45 3B02-03 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術の開発
 ○丸山 魁斗¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹,
 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
 (¹新潟薬大・応生命, ²不二製油, ³産総研・生物プロセス)
- 9:45 3B02-04 オオミジンコにおける CRISPR/dCas9 を利用した遺伝子発現活性化システムの開発
 ○原 あや乃, アディタマ ニッコ, 加藤 泰彦, 渡邊 肇 (阪大院・工)
- 9:45 3B02-05 オオミジンコにおける有用タンパク質高発現ベクターの構築と利用
 ○柴田 成樹¹, リー デイビッド², アディタマ ニッコ¹, 加藤 泰彦¹, 渡邊 肇¹
 (¹阪大院・工, ²University of California, Berkeley)
- 9:45 3B02-06 細菌 1 細胞レベルの微量 RNA からの RNA-seq 手法の開発
 ○西村 美郁¹, 西川 洋平^{2,3}, 竹山 春子^{1,2,3,4}, 細川 正人^{1,2,3,4}
 (¹早大院・先進理工, ²早大・ナノライフ創新研, ³産総研・早大 CBBD-OIL, ⁴早大・生命動態研)
- 9:45 3B02-07 1 細胞ゲノム情報から設計した細菌種特異的標識ツールの開発
 ○岩井 直哉¹, 竹山 春子^{1,2,3,4}, 細川 正人^{1,2,3,4}
 (¹早大院・先進理工, ²早大・ナノライフ創新研, ³産総研・早大 CBBD-OIL, ⁴早大・生命動態研)
- 9:45 3B02-08 確率的 Cre-lox 組換え反応の機械学習ドリブンエンジニアリングによる任意の割合でのスパースラ
 ベリングの実現
 ○山内 悠至^{1,2}, 植田 充美¹, 青木 航¹ (¹京大院・農, ²日本学術振興会)
- 9:45 3B02-09 電気穿孔法で形質転換可能な好熱菌 (*Geobacillus thermodenitrificans* K1041) の特性評価と遺伝学的
 考察
 ○小山 幸祐¹, 中川 翔太², 大城 隆², 鈴木 宏和²
 (¹鳥取大院・持続創生, ²鳥取大・工)

- 9:45 3B02-10 *Leptothrix* 属細菌の糸状成長に必要な鞘形成メカニズムの解明
 ……○小野 絵里香¹, 山本 達也², 尾花 望^{2,3}, 杉本 真也⁴, Andrew S. Utada^{2,5}, 久能 樹², 野村 暢彦^{2,5}
 (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大・生命環境系, ³筑波大・医学医療系・TMRC, ⁴東京慈恵大・医学,
⁵筑波大・MiCS)
- 9:45 3B02-11 キンギョにおける細菌感染時に誘導される免疫グロブリン遺伝子の比較
 ……○山田 紗里奈, 田丸 浩 (三重大院・生資)

B 会場 (11:15~12:00)

【遺伝子工学】

- 11:15 3B04-01 日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* の細菌細胞間シグナル伝達物質に対する走性応答
 ……○永井 敦也¹, 荷方 稔之², 酒井 保藏² (¹宇都宮大院・工, ²宇都宮大・工)
- 11:15 3B04-02 酵母の増殖における芳香族アルコールの効果とクオラムセンシング
 ……○崎濱 由梨¹, 西村 洸樹¹, 望月 貴博¹, 三岡 哲生¹,
 加藤 拓², 只見 秀代², 永富 康司², 阿部 文快¹
 (¹青山学院大・理工, ²アサヒクオリティードイノベーションズ)
- 11:15 3B04-03 ビフィズス菌における二成分制御系の環境応答についての検証
 ……○末松 和真¹, 和泉 絢子², 下総 葉子¹, 岩橋 均³, 小酒井 智也⁴
 (¹岐阜大院・自然科技, ²岐阜大院・応生科, ³岐阜大・応生科, ⁴岐阜大院・連農)
- 11:15 3B04-04 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養性に関与する遺伝子発現と栄養源の関係
 ……○池田 裕布里, 岸本 真奈, 新谷 政己, 吉田 信行 (静大・創科技学院)
- 11:15 3B04-05 黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの合成酵素遺伝子発現に関わる転写因子の探索
 ……○上地 敬子, 平良 東紀, 水谷 治 (琉球大・農)
- 11:15 3B04-06 通常飼育マウス消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の INSeq 法による同定
 ……○山口 颯人¹, 倉持 碧海¹, 後藤 恭宏², 小椋 義俊³,
 前田 智也¹, 林 哲也², 横田 篤¹, 吹谷 智¹
 (¹北大院・農, ²九大院・医, ³久留米大・医)
- 11:15 3B04-07 好熱菌由来のヒートショックタンパク質による大腸菌のストレス耐性強化
 ……○佐藤 悠¹, 岡野 憲司², 本田 孝祐^{3,4}
 (¹山口大院・創成・農, ²関西大・化生工, ³阪大・生工国際セ, ⁴阪大・先導的学際研機構)
- 11:15 3B04-08 *Methylosinus trichosporium* OB3b のランタノイド依存的な発現制御に関与する TonB 依存性レセプター遺伝子の同定
 ……椎名 渉, 伊藤 栄紘, ○蒲池 利章 (東工大・生命理工)
- 11:15 3B04-09 PromA 群プラスミドの「天然の宿主」を同定するためのシングルセル解析
 ……○川北 鈴香^{1,2}, 高木 妙子², 大田 悠里², 陶山 哲志², 野田 尚宏², 金原 和秀¹, 新谷 政己¹
 (¹静大院・総合科技, ²産総研・バイオメディカル)
- 11:15 3B04-10 Replication-Cycle Reaction 法による環境試料からのプラスミドの収集とその性状解析
 ……○一瀬 拓海¹, 池田 奈菜子², 森 光矢¹, 奈良 聖亜³, 末次 正幸³, 金原 和秀^{1,2}, 新谷 政己^{1,2,4}
 (¹静大院・総合科技, ²静大・工, ³立教大院・理, ⁴静大・グリーン科技研)

C 会場 (9:00~9:45)

【発酵生理学, 発酵工学/代謝工学】

- 9:00 3C01-01 ATP 浪費による出芽酵母バイオアルコール生産能の向上
 谷田部 楓太¹, 岡橋 伸幸¹, 清家 泰介¹, 石井 純², 〇松田 史生¹
 (¹ 阪大院・情報, ² 神戸大院・科技イノベ)
- 9:00 3C01-02 分子育種による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 生産油脂の脂肪酸組成改変
 〇河野 翔吾¹, 中島 由莉奈¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹,
 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
 (¹ 新潟薬大・応生命, ² 不二製油, ³ 産総研・生物プロセス)
- 9:00 3C01-03 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の不飽和脂肪酸合成遺伝子 *OLE1* プロモーター解析
 〇渡部 凌¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹,
 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
 (¹ 新潟薬大・応生命, ² 不二製油, ³ 産総研・生物プロセス)
- 9:00 3C01-04 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂低蓄積原因因子による油脂生産低下メカニズムの解明
 〇佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹, 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
 (¹ 新潟薬大・応生命, ² 不二製油, ³ 産総研・生物プロセス)
- 9:00 3C01-05 酵母の多層化した細胞壁の解析とその形成メカニズムについて
 〇細田 景太¹, 尾島 由紘¹, 田原 悠平², 宮田 真人², 東 雅之¹
 (¹ 大阪公大院・工, ² 大阪公大院・理)
- 9:00 3C01-06 発酵阻害物質に高い耐性を持つスリランカの酵母の胞子形成と交配育種
 〇外山 博英¹, 高里 良将¹, スボジニー マドゥカ², 水谷 治¹
 (¹ 琉球大・農, ² ルフナ大学)
- 9:00 3C01-07 酵母由来 Gas タンパク質の乳化能と糖鎖構造の関係
 〇二塚 美紀, 高田 真穂, 尾島 由紘, 東 雅之 (大阪公大院・工)
- 9:00 3C01-08 ピキア酵母によるプレニル化フェノール高生産に向けた代謝経路の最適化
 〇右城 夕海哉¹, 雲北 涼太¹, 棟方 涼介⁴, 矢崎 一史⁴, 近藤 昭彦^{1,2}, 蓮沼 誠久^{1,2,3}
 (¹ 神戸大院・科技イノベ, ² 神戸大・先端バイオ工研セ, ³ 理研・環境資源, ⁴ 京大・生存研)
- 9:00 3C01-09 分裂酵母を用いたグルコースからのアントラニル酸メチル生産技術の開発
 〇松本 知歩¹, 川村 和佳菜¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
 (¹ 神戸大院・工, ² 神戸大院・科技イノベ)
- 9:00 3C01-10 油性酵母を用いたグルコースからのエステル生産技術の向上
 〇小柴 歩実¹, 松岡 宥汰¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
 (¹ 神戸大院・工, ² 神戸大院・科技イノベ)
- 9:00 3C01-11 分岐鎖アルコール生産量のバイオアッセイ系に向けたイソブタノール超感受性を示す酵母二重破壊株の同定
 〇佐藤 源気, 黒田 浩一 (京大院・農)
- 9:00 3C01-12 液胞膜へのロドプシン発現による出芽酵母のエネルギー代謝の改善
 〇大長 薫, 弘埜 陽子, 菊川 寛史, 田村 謙太郎, 原 清敬 (静県大院・薬食生命)
- 9:00 3C01-13 酵母による高効率 D-乳酸生産を目指した機械学習モデルの構築
 〇山本 祥輝, 山田 亮祐, 松本 拓也, 荻野 博康 (大阪公大院・工)

C 会場 (10:30~11:15)

【発酵生理学, 発酵工学/代謝工学/オミクス解析】

- 10:30 3C03-01 *Aspergillus oryzae* のアルギニン脱炭酸酵素の同定
○村上 優衣¹, 吉岡 美紗¹, 赤坂 直紀³, 福田 青郎^{1,2}, 藤原 伸介^{1,2}
 (1 関西学院大院・理工, 2 関西学院大・理工, 3 京大・循環型バイオ事業開発研究部門)
- 10:30 3C03-02 分散型麹菌の発達したミトコンドリア形成からわかる呼吸活性との相関
○鈴木 智大¹, 小野 太暉¹, 若井 暁^{2,3}, 近藤 昭彦², 萩野 千秋¹
 (1 神戸大院・工, 2 神戸大院・科技イノベ, 3 海洋研究開発機構)
- 10:30 3C03-03 糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L におけるクエン酸排出タンパク遺伝子 *cexA* の高発現によるメタノール効果非依存性のクエン酸高生産
 ○吉岡 育哲^{1,2}, 岡村 隼杜³, 桐村 光太郎^{1,3}
 (1 早大・理工学術院, 2 千葉大・真菌センター, 3 早大院・先進理工)
- 10:30 3C03-04 固体培養に適したクエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus laticoffeatus* WU-2020 のゲノム配列の決定
 ○柴田 朗¹, 吉岡 育哲^{2,3}, 高橋 弘喜^{3,4,5}, 矢口 貴志³, 桐村 光太郎^{1,2}
 (1 早大院・先進理工・応化, 2 早大・理工総研, 3 千葉大学真菌医学研究センター, 4 千葉大学分子キラリテイ研究センター, 5 千葉大学植物分子科学研究センター)
- 10:30 3C03-05 *Mucor lusitanicus* における糖により誘導される発芽に関わる転写因子の解析
 ○大澤 亮¹, 村上 周一郎² (1 明治大院・農, 2 明治大・農)
- 10:30 3C03-06 界面バイオプロセスによる *Monascus* 橙黄色色素の選択的高生産
 ○澁谷 駿太, 上野 拓夢, 松浦 将介, 小田 忍 (金工大・ゲノム研)
- 10:30 3C03-07 ターゲットプロテオミクスを用いた油脂酵母増殖期と定常期の酵素発現プロファイル比較解析
 ○岩倉 崇文¹, 清家 泰介¹, 岡橋 伸幸¹, 佐藤 里佳子², 高久 洋暁², 松田 史生¹
 (1 阪大院・情報, 2 新潟薬大・応生命)
- 10:30 3C03-08 アミノ酸添加培地で培養した出芽酵母の ¹³C 代謝フラックス解析
 ○藤原 逸人, 岡橋 伸幸, 松田 史生 (阪大院・情報)
- 10:30 3C03-09 ブタノールに曝露した大腸菌細胞の形態解析による新たな細胞死機構の解明
 ○新里 海咲¹, 川畑 龍司¹, 荒木 勇登², 青井 議輝¹, 中島 豊¹, 加藤 節¹
 (1 広島大院・統合生命科学, 2 広島大・工)
- 10:30 3C03-10 低エネルギー電子線が微生物細胞に及ぼす影響
 ○片井 順也¹, 長野 祐太¹, 鈴木 研志², 安池 一貴¹, 林 稜也¹, 田中 朝陽³, 佐々 文洋⁴, 鳴海 哲夫¹, 新谷 政己¹, 田代 陽介¹, 川田 善正⁵, 居波 涉⁵, 二又 裕之⁶
 (1 静大院・総合科技, 2 静大・創科技学院, 3 静大院・光医工, 4 九大・シス情科院, 5 静大・電工研, 6 静大・グリーン科技研)
- 10:30 3C03-11 質量分析を基盤としたヒト初代肝細胞の薬物誘発性肝障害評価法の開発
 ○高橋 政友^{1,2}, 池田 和輝², 秦 康祐¹, 中谷 航太¹, 油屋 駿介³, 富安 範行², 相馬 悠希⁴, 馬場 健史^{1,2}, 和泉 自泰^{1,2}
 (1 九大・生医研, 2 九大院・シス生科, 3 学振, 4 九大院・農)
- 10:30 3C03-12 低温で活性の高いβ-ガラクトシダーゼの探索
 ○執行 崇志, 辻 雅晴 (旭川高専)

D 会場 (9:45~10:30)

【醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学】

- 9:45 3D02-01 酒粕における D-アミノ酸の分析とその生理機能の評価
○佐藤 友紀¹, 森 あすか², 前川 佳花², 伊藤 謙³,
 中村 啓哉⁴, 濱口 裕明⁴, 福崎 英一郎², 進藤 昌¹
 (¹秋田県総食研, ²阪大院・工, ³秋田県大院・生資, ⁴岩手医科大学医学部)
- 9:45 3D02-02 *Tetragenococcus halophilus* における自然挿入変異のターゲットスクリーニング
○額川 裕矢¹, 脇中 琢良², 茂木 喜信², 渡部 潤^{1,2,3}
 (¹福島大・食農, ²ヤマサ醤油, ³福島大・食農・発酵研)
- 9:45 3D02-03 抗酸化能に優れた乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* の選抜とそれらが清酒の劣化に及ぼす影響
○野口 友嗣, 小田木 美保, 河原 航, 石川 卓, 藤井 恵輔, 飛田 啓輔
 (茨城産技セ)
- 9:45 3D02-04 発酵食品由来の *Bacillus* 属の抗菌物質の活性に関する研究
○多賀 直彦, 坂元 佑吏 (東海大学 農学部 食生命科学科)
- 9:45 3D02-05 発芽誘起物質アナログによる枯草菌芽胞発芽・増殖抑制の可能性の検討
○坂元 仁^{1,2}, 朝田 良子^{2,3}, 古田 雅一^{2,3}, 土戸 哲明²
 (¹関西大・化生工, ²大阪公立大・微制研セ, ³大阪公大院・工)
- 9:45 3D02-06 酒粕給与による腸管細菌叢の変動および腸管免疫に及ぼす効果
○伊藤 謙¹, 佐藤 友紀², 濱口 裕明¹ (¹岩手医大・医, ²秋田総食研)
- 9:45 3D02-07 *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 株による腸管尿酸排泄トランスポーター ABCG2 発現亢進
○根井 俊輔¹, 川久保 響², 松崎 竜也⁵, 中野 智木⁵, 竹下 正彦⁵,
 新山 拓男⁵, Tsend-Ayush Chuluunbat⁴, 小川 健二郎³, 西山 和夫¹, 山崎 正夫¹
 (¹宮崎大・農, ²宮崎大院・農, ³宮崎大 TT 推進機構, ⁴蒙科技大, ⁵南日本酪農共同 (株))
- 9:45 3D02-08 *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 摂取が高脂肪食マウスの脂質代謝に及ぼす影響
○市谷 花帆¹, 松崎 竜也², 中野 智木², 竹下 正彦², 新山 拓男²,
 Chuluunbat Tsend-Ayush³, 小川 健二郎⁴, 西山 和夫⁵, 山崎 正夫⁵
 (¹宮崎大院・農, ²南日本酪農, ³蒙科技大, ⁴宮崎大・TT 推進機構, ⁵宮崎大・農)
- 9:45 3D02-09 たくあん漬から分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製と性質
○永田 妃奈子¹, 松崎 弘美^{1,2} (¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生)
- 9:45 3D02-10 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンに関する研究
○松田 明香里¹, 河原 あい¹, 本田 絢郁², 善藤 威史³, 松崎 弘美^{1,2}
 (¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生, ³九大院・農)
- 9:45 3D02-11 *In vivo* study of synbiotic formulation for hyperphosphatemia (chronic kidney disorder) prevention
○Ajeeta Anand¹, Peddha Muthukumar Serva², Hideki Aoyagi¹
 (¹Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)

D 会場 (11:15~12:00)

【醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学】

- 11:15 3D04-01 清酒醸造における高温障害米用の消化酵素剤の研究
○山川 達也¹, 朝日 凌大¹, 埴生 智洋¹, 尾関 健二¹, 高山 宗幸²,
 山城 寛², 多田 周作², 三木 翔平³, 山下 秀行³
 (¹金工大・ゲノム研, ²天野エンザイム, ³樋口松之助商店)

- 11:15 3D04-02 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる「老香」を発生させにくい特長へのSAM低蓄積の関与
 ○柴田 裕介¹, 池田 優理子², 金井 宗良², 藤井 力³, 赤尾 健², 五島 徹也², 磯谷 敦子², 山田 翼¹
 (¹ 菊正宗酒造, ² 酒総研, ³ 福島大)
- 11:15 3D04-03 酵母のホモ変異型遺伝子を含む染色体領域の異数化が清酒醸造に与える影響
 ○堀田 夏紀¹, 小高 敦史¹, 戸所 健彦¹, 杉山 峰崇², 石田 博樹¹
 (¹ 月桂冠・総研, ² 広工大・生命)
- 11:15 3D04-04 ゲノム編集技術を用いた有機酸高生産能を有する清酒酵母の育種
 ○西 智之¹, 西田 郁久², 本間 一郎¹, 田村 博康¹, 赤尾 健³, 大矢 禎一⁴, 平田 大^{1,2,5}
 (¹ 朝日酒造, ² 新潟大・日本酒学セ, ³ 酒総研, ⁴ 東大・院新領域, ⁵ 広島大)
- 11:15 3D04-05 自然界から分離した清酒製造用酵母の4-ビニルグアイアコール生成能とその生成遺伝子の一塩基多型
 ○高橋 空良¹, 数岡 孝幸² (¹ 東農大院・応生研, ² 東農大・応生科)
- 11:15 3D04-06 橘の花から分離した野生酵母のビール醸造への適用に向けた育種
 ○栞原 智也¹, 大橋 正孝¹, 大橋 貴生² (¹ 奈良産振セ, ² 摂南大・理工)
- 11:15 3D04-07 オルニチン及びカプロン酸エチル高生産清酒酵母の育種と醸造特性の解析
 ○大橋 正孝¹, 高木 博史² (¹ 奈良産振セ・バイオ・食品グループ, ² 奈良先端大・バイオ)
- 11:15 3D04-08 高濃度エタノールストレス下における酵母のプロテオスタシスと適応応答
 Vo Thi Anh Nguyet, 石川 優, 吉田 雅徳, 堀江 楓子, 古谷 昇, ○井沢 真吾
 (京工繊大院・工芸科学)
- 11:15 3D04-09 含硫アミノ酸応答に着目したチオール様香気を生成する清酒酵母の育種
 ○園 彰吾, 窪寺 隆文, 明石 貴裕 (白鶴酒造)
- 11:15 3D04-10 高浸透圧条件における酵母 OCM-2 株の脂肪酸組成の変化～GPD1 遺伝子破壊による影響～
 ○三木 健夫, 佐野 絢子 (山梨大院・医工農)
- 11:15 3D04-11 酵母細胞の高温ストレスによる活性酸素発生量に関する研究
 ○佐野 絢子, 田中 伶奈, 天野 真希, 三木 健夫 (山梨大院・医工農)

E 会場 (9:00～9:45)

【環境工学, 廃水処理技術/バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 9:00 3E01-01 微細藻類と動物細胞を利用した循環型食料生産システムの構築
 ○岡本 裕太^{1,2}, 原口 裕次², 坂口 勝久¹, 澤村 直哉³, 朝日 透^{1,4}, 清水 達也²
 (¹ 早大院・先進理工, ² 女子医・先端研, ³ 早大・ナノライフ, ⁴ 早大・理工)
- 9:00 3E01-02 モデルウイルスを用いた室内環境中のウイルス暴露評価に関する研究
 ○小田 慎太郎¹, 岩橋 均^{1,2,3}, 高橋 淳子⁴
 (¹ 岐阜大院・自然科, ² 岐阜大・応生科, ³ 岐阜大院・連農, ⁴ 早大院・情報生産システム)
- 9:00 3E01-03 不凍タンパク質を用いたアスベスト結合タンパク質の分子デザイン
 ○市川 京香, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫
 (広島大院・統合生命科学)
- 9:00 3E01-04 硫酸還元細菌 *Cupidesulfovibrio* sp. HK-II 株における細胞外電子伝達に関する導電性膜タンパク質
 ○窪野 一郎¹, 大前 貴裕¹, 川島 京介², 田代 陽介¹, 二又 裕之^{1,3}
 (¹ 静大院・総合科技, ² 静大・工, ³ 静大・グリーン科技研)
- 9:00 3E01-05 α -アミラーゼ遺伝子導入大腸菌を用いたデンプンを燃料とする微生物燃料電池の開発
 ○風間 伊織, 廣瀬 尚仁, 麻生 祐司, 田中 知成, 小原 仁実 (京工繊大院・工芸科学)

- 9:00 3E01-06 高い酸素耐性を示す水素酸化細菌 *Cupriavidus* sp. FM-47 株の分離とその特性解析
 ○永井 翔悟¹, 堀 真紀², 上谷 はる², 遠藤 遼平², 西原 宏史¹
 (1茨城大院・農, 2茨城大・農・資生科)
- 9:00 3E01-07 グリコール酸トランスポーターを利用した、組換え大腸菌におけるエチレングリコールからのグリ
 コール酸ポリマーの合成
 ○太田 陽介¹, 西向 めぐみ², 山田 美和² (1岩手大・院, 2岩大・農)
- 9:00 3E01-08 リグニンからの芳香族ポリマー原料の選択的生産: サルファイトリグニンからのバニリン酸生産へ
 の *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用
 ○鎌田 真未¹, 安田 智恵子¹, 樋口 雄大¹, 吉田 暁弘², 坂本 千穂¹,
 大関 さおり¹, 上村 直史³, 政井 英司³, 園木 和典¹
 (1弘前大・農生, 2弘前大・地域戦略, 3長岡技科大・物質生物)
- 9:00 3E01-09 組換え大腸菌を用いたテレフタル酸からの有用物質生産
 ○駒井 理乃¹, 内堀 孝博², 中島 敏明¹ (1筑波大院・生命環境, 2パナック)
- 9:00 3E01-10 Light boosted bioenergy recovery from ammonia-rich anaerobic digestion: Long-term effectiveness and
 underlying mechanisms
 ○Yunxin Zhu, Zhiyuan Liu, Nan Zhang, Yingnan Yang
 (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
- 9:00 3E01-11 木質バイオマスの 200 倍の CO₂ 削減効果をもたらす甘藷・メタンの持続的大量生産システムの開発
 ○鈴木 高広¹, 坂本 勝¹, 川上 高男², 久保 裕志²,
 宮部 由彩², 横田 祐介², 若山 泰介², 廣島 大祐³
 (1近畿大院・生物理工, 2日本下水道事業団, 3ウォーターエージェンシー)
- 9:00 3E01-12 草食性陸ガニのリグニン分解活性について
 ○三宅 克英, 永倉 佑真 (名城大・理工)

E 会場 (10:30~11:15)

【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 10:30 3E03-01 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いたグリセロールの高効率連続生産プロセスの開発
 ○叶 静遠¹, 堀内 淳一¹, 熊田 陽一¹, 小倉 慎也¹, 橋 暲太¹,
 広川 安孝², 花井 泰三², 村上 明男³, 武田 真由子¹
 (1京工織大院・工芸科学, 2九大院・農, 3神戸大院・工)
- 10:30 3E03-02 代謝改変乳酸菌を用いたコーンコブの同時糖化発酵による低コスト D-乳酸生産
 ○久保 早友理¹, 熊田 陽一¹, 堀内 淳一¹, 岡野 憲司², 近藤 昭彦³, 田中 勉³
 (1京工織大院・工芸科学, 2阪大院・工, 3神戸大院・工)
- 10:30 3E03-03 耐熱性乳酸菌 *Bacillus smithii* を用いたコーンコブの高温同時糖化発酵による L-乳酸生産の効率化
 ○野村 果音, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工織大院・工芸科学)
- 10:30 3E03-04 コーンコブを用いた赤色酵母によるアスタキサンチン生産の向上
 ○平井 優輝, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工織大院・工芸科学)
- 10:30 3E03-05 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* を用いた酵素分泌生産システムの開発
 ○屋良 みなみ¹, 小林 友哉¹, 坂本 大輔¹, 荻野 千秋¹, 近藤 昭彦²
 (1神戸大院・工, 2神戸大院・科技イノベ)
- 10:30 3E03-06 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
 ○松崎 浩明, 石田 健登, 亀川 颯人, 今久保 友則, 藤田 雄大, 秦野 琢之
 (福山大・生命工)

- 10:30** 3E03-07 有機酸資化酵母の開発とバイオリファイナリーへの展開
 ○荻野 千秋¹, Prihardi Kahar¹, 壺井 ひかり¹, Risanto Lucki¹, 近藤 昭彦²
 (¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ)
- 10:30** 3E03-08 油糧生産酵母によるグリセロールを用いた脂質生産
 ○吉本 真¹, 梶浦 裕之^{2,3}, 三崎 亮^{2,3}, 藤山 和仁^{2,3}
 (¹阪大院・工, ²阪大・生工国際セ, ³阪大・先導的学際研機構)
- 10:30** 3E03-09 脂質生産機構の解明に向けた油脂酵母の RNA-seq 解析
 ○前田 紗香¹, 梶浦 裕之^{2,4}, 元岡 大祐^{3,4}, Wu Chih-Chan², 三崎 亮^{2,4}, 藤山 和仁^{2,4}
 (¹阪大院・工, ²阪大・生工国際セ, ³阪大院・医, ⁴阪大・先導的学際研機構)
- 10:30** 3E03-10 *Lipomyces starkeyi* の油脂蓄積プロセスのリアルタイムモニタリング
 ○高橋 優花¹, 志田 洋介¹, 鈴木 義之¹, 高久 洋暁², 小笠原 渉¹
 (¹長岡技科大, ²新潟薬大・応生命)
- 10:30** 3E03-11 難資化性ミミズ堆肥土壌からの油脂生産微生物の単離と同定
 ○橘 駿介¹, 若月 良子¹, 鈴木 義之², 志田 洋介³,
 小笠原 渉², 森 一樹⁴, 田代 康介⁴, 赤澤 真一¹
 (¹長岡高専・物質工, ²長岡技大・技学イノベ, ³長岡技大・物生, ⁴九州大・農)
- 10:30** 3E03-12 サトウキビバガスを利用したオーランチオキトリウム属による脂質生産
 ○渡邊 研志¹, 西嶋 美保¹, 黛 新造², 秋 庸裕¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²出光興産株式会社)

F 会場 (9:45~10:30)

【生物化学工学／バイオプロセス／培養工学】

- 9:45** 3F02-01 複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御：炭素源がメタ回分発酵における細菌叢変遷と有機酸の生産に及ぼす影響の解明
 ○水野 優¹, 古閑 友紀¹, 大城 麦人¹, 宮本 浩邦^{2,3,4,5}, 酒井 謙二¹, 田代 幸寛¹
 (¹九大院・生資環, ²千葉大・園芸, ³(株)サーマス, ⁴日環科学(株), ⁵理研・生命医科学)
- 9:45** 3F02-02 複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御：メタ連続発酵における希釈率が細菌叢と有機酸生産性に及ぼす影響の解明
 ○古閑 友紀¹, 宮本 浩邦^{2,3,4}, 酒井 謙二¹, 大城 麦人¹, 田代 幸寛¹
 (¹九大院・農, ²千葉大・園芸, ³理研・生命医科学, ⁴サーマス)
- 9:45** 3F02-03 ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用 (第3報)
 石本 弥子¹, ○齋藤 愛弥², 相馬 悠希³, 馬場 健史⁴, 青柳 秀紀^{1,2,5}
 (¹筑波大院・生物資源科学学位 P, ²筑波大・生物資源, ³九大院・農, ⁴九大・生医研, ⁵筑波大・生命環境系)
- 9:45** 3F02-04 細菌・ウイルスのシングルセルゲノム解析技術を用いた河川水中における遺伝子の伝播解析
 ○西川 洋平^{1,2}, 塚田 祐子³, 我妻 竜太^{2,3}, Lin Chia-Ling³, 小川 雅人³, 細川 正人^{1,2,3,4},
 竹山 春子^{1,2,3,4}
 (¹早大・ナノライフ創新研, ²産総研・早大 CBBBD-OIL, ³早大・先進理工, ⁴早大・生命動態研)
- 9:45** 3F02-05 ウイルス 1 粒子ゲノムに対する効率的なデータ解析手法の開発と環境ウイルスの多様性解析
 ○我妻 竜太^{1,2}, 西川 洋平^{2,3}, 塚田 祐子¹, 千々岩 樹佳³, 細川 正人^{1,2,3,4}, 竹山 春子^{1,2,3,4}
 (¹早大院・先進理工, ²産総研・早大 CBBBD-OIL, ³早大・ナノライフ創新研, ⁴早大・生命動態研)
- 9:45** 3F02-06 土壌環境と根内細菌叢の関係解析
 ○佐々木 匠, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 9:45** 3F02-07 ダイズ栽培用微生物資材開発に向けたリソ解菌の分離及び特性評価
 ○岩元 真菜, 村田 智志, 新垣 篤史, 田中 剛 (農工大院・工)

- 9:45 3F02-08 ダイズ栽培用微生物資材開発に適した有用窒素固定細菌の探索
..... ○小林 真理香, 村田 智志, 新垣 篤史, 田中 剛 (農工大院・工)
- 9:45 3F02-09 AI を用いた大腸菌異種タンパク質生産の培地最適化
..... ○渡辺 一樹¹, 邱 泰瑛², 小西 正朗² (¹北見工大院・工, ²北見工大)
- 9:45 3F02-10 酵母エキスおよびペプトンの定量データを用いた成分プロファイリング
..... ○中島 拓都¹, 邱 泰瑛², 小西 正朗² (¹北見工大院・工, ²北見工大)
- 9:45 3F02-11 DO-stat 流加培養に基づく組換え大腸菌を用いたラクダ科 VHH 抗体の効率的生産
..... ○鈴木 貴博, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工織大院・工芸科学)
- 9:45 3F02-12 DO-stat 流加培養による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産のための基質供給制御
..... ○湯川 忠二, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工織大院・工芸科学)
- 9:45 3F02-13 組換え大腸菌を用いた DO-stat 流加培養による効率的単鎖抗体生産
..... ○山口 大介, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工織大院・工芸科学)

F 会場 (11:15~12:00)

【培養工学／生物化学工学】

- 11:15 3F04-01 可聴音による加振条件下での酵母のアルコール発酵
..... ○寄兼 菜摘, 徳田 宏晴 (東農大・醸造)
- 11:15 3F04-02 マイクロ波前処理を行ったシアノバクテリアをバイオマス原料とした糖化・発酵
..... ○端谷 智子¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
- 11:15 3F04-03 細胞サイズリポソームの相分離構造における酒の吟醸香成分の影響
..... ○依田 毅 (青森産技セ)
- 11:15 3F04-04 Effect of electromagnetic field on plant growth and microbial rhizosphere
..... ○Jeong Wook Jo, Ju Yeon Lee, Sung Woo Yang, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi, Hyung Joo Kim
(Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)
- 11:15 3F04-05 ソホロースリピッドを用いたウルトラファインバブル発生技術の開発
..... ○謝花 喜史, 小守 啓友, 脇坂 都, 尾田 友香, 平田 善彦 (サラヤ)
- 11:15 3F04-06 ウルトラファインバブルと超音波を組み合わせた水中のウイルス不活性化
..... ○中野 一成¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
- 11:15 3F04-07 ITO 電極システムを活用した微生物培養化の機構解析とその利用
..... ○小鷹 健太¹, 小山 純弘², 青柳 秀紀^{1,3}
(¹筑波大院・生物資源科学学位 P, ²エイブル株式会社, ³筑波大・生命環境系)
- 11:15 3F04-08 ゲルマイクロドロップレット (GMD) 凝集培養法を用いた難培養性細菌の新規分離培養法
..... ○下村 有美, 鈴木 陸太, Martinez Joval, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 議輝
(広島大院・統合生命科学)
- 11:15 3F04-09 振盪フラスコ培養の換気能を増大させる新規デバイスの開発
..... ○高橋 将人, 青柳 秀紀 (筑波大・生命環境系)
- 11:15 3F04-10 微生物培養におけるフラスコスケールの液滴型流加システムの開発
..... ○加藤 拓也¹, 高橋 将人², 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P, ²筑波大・生命環境系)
- 11:15 3F04-11 エマルジョン化固定化技術を用いたハロカテコールの生産
..... ○高橋 風, 汲田 幹夫, 滝口 昇 (金沢大院・自科)
- 11:15 3F04-12 低温菌シンプル酵素触媒の熱処理による細胞構造への影響
..... ○穴田 康太, 田島 誉久, 緋田 安希子, 加藤 純一 (広島大院・統合生命科学)

G 会場 (9:00~9:45)

【セル&ティッシュエンジニアリング】

- 9:00 3G01-01 魚血液に由来する栓球の溶解物を用いた CHO 細胞の接着培養
○藤原 政司^{1,2}, 猪股 亮佑¹, 森島 輝³, 塩谷 格³, 山原 研一⁴, 高木 陸^{1,2}
 (1 北大院・総合化学, 2 北大院・工, 3 日本水産, 4 兵庫医大)
- 9:00 3G01-02 間葉系前駆細胞を含む in vitro 骨格筋組織モデルの構築と特性評価
○高瀬 智也¹, 秋山 裕和¹, 深田 宗一朗², 上住 聡芳³, 本多 裕之¹, 清水 一憲¹
 (1 名大院・工, 2 阪大院・薬, 3 徳大院・医歯薬)
- 9:00 3G01-03 高品質セルバンク構築のための細胞画像を用いた超早期細胞品質評価
○竹本 悠人¹, 陶山 隆史², 今井 祐太¹, 蟹江 慧¹, 松崎 有未^{2,3}, 加藤 竜司^{1,4}
 (1 名大院・創薬, 2 PuREC, 3 島根大・医, 4 名大・ナノライフシステム研究所)
- 9:00 3G01-04 近赤外光イメージング解析によるフェロイド品質モニタリングの可能性
○加藤 竜司^{1,2}, 林 咲希¹, 永井 美希¹, 蟹江 慧¹, 五十嵐 陽子³, 本村 麻子³, 菅沼 寛³
 (1 名大院・創薬, 2 名大・ナノライフシステム研究所, 3 住友電工)
- 9:00 3G01-05 CHO-K1 細胞株を用いた SARS-CoV-2 ウイルス様粒子の生産
○保木本 達也, Nguyen Bich Thao, 金井 貴蓉, 山野-足立 範子, 大政 健史 (阪大院・工)
- 9:00 3G01-06 保存培地の pH がヒト iPS 細胞の新規非凍結保存安定性に及ぼす影響
○佐藤 佑菜, 徐 卓然, 大貫 喜嗣, 田中 佑治, 黒澤 尋 (山梨大院・医工農)
- 9:00 3G01-07 ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲルの調製方法
 森 英樹, 竹綱 椰々, 下釜 香枝, ○原 正之 (大阪公大院・理)
- 9:00 3G01-08 血管内皮細胞の接着・剥離挙動を利用した細胞転写培養ゲルの設計
 ○下釜 香枝, 森 英樹, 原 正之 (大阪公大院・理)
- 9:00 3G01-09 光増感色素修飾ガラス基板を用いたラット間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導
 ○森 英樹, 柴田 了哉, 原 正之 (大阪公大院・理)
- 9:00 3G01-10 Generation of recombinant CHO cells towards bio-engineered heparin and heparan sulfate production
○Razia Sultana^{1,2}, Yoshinori Kawabe¹, Kyosuke Akiyama³, Kosuke Sagawa¹,
 Masamichi Kamihira^{1,3}
 (1 Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ., 2 Dept. Biotechnol. Genet. Eng., Fac. Sci, Noakhali Sci.
 Technol. Univ., 3 Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)
- 9:00 3G01-11 Engineered functional and expandable hepatocytes derived from HepG2 cells
○Silas Habimana, Hiroyuki Kitano, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
 (Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)
- 9:00 3G01-12 Evaluation of the effectiveness of an integrin stimulating molecule for cell inoculation inside a liver template
○Mario K. Uehara, Satoshi Doko, Lucija Stefan, Yusuke Sakai, Hiroyuki Ijima
 (Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

G 会場 (10:30~11:15)

【セル&ティッシュエンジニアリング】

- 10:30 3G03-01 改変型受容体チロシキナーゼによるシグナル伝達のリプログラミング
○河原 正浩¹, コンクローン トン タット ポーン² (1 医薬健康研, 2 東大院・工)
- 10:30 3G03-02 CHO 細胞における Sar1A 過剰発現の抗体生産性および分泌プロセスへ与える影響
○角田 悠¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2} (1 阪大院・工, 2 阪大 OTRI)

- 10:30 3G03-03 CHO 細胞を用いた組換え抗体生産に有効な高機能化因子の探索
 ……○鬼塚 正義¹, 平田 結風², 天羽 宏枝¹ (¹徳島大院・社会産理工, ²徳島大院・創成科学研究)
- 10:30 3G03-04 高機能化因子を利用した組換え CHO 細胞の高度化
 ……○福間 奈々子¹, 山内 清司², 田地野 浩司², 鬼塚 正義³
 (¹徳島大院・創成科学研究, ²株式会社 chromocenter, ³徳島大院・社会産理工)
- 10:30 3G03-05 阻害剤が作用した機械刺激応答がん浸潤関連チャンネルに外力印加が与える影響
 ……○長田 あかね¹, 山岸 彩奈^{1,2}, 中村 史^{1,2} (¹農工大院・工, ²産総研)
- 10:30 3G03-06 ケモインフォマティクスによる TRPA1 アゴニストにおける多様性の理解
 ……○田中 健二郎¹, 寺田 祐子², 松山 南², 藤谷 将也¹,
 澁谷 正俊¹, 山本 芳彦¹, 伊藤 圭祐², 加藤 竜司¹
 (¹名大院・創薬, ²静岡県大院・薬食生命)
- 10:30 3G03-07 骨再生を促進する短鎖ペプチド界面設計の網羅検証
 ……○杉山 亜矢斗¹, 蟹江 慧¹, 加藤 竜司^{1,2} (¹名大院・創薬, ²名大・ナノライフシステム研)
- 10:30 3G03-08 線維芽細胞における継代ストレス応答の非破壊評価
 ……○木村 和恵¹, 坂口 滉基¹, 田中 健二郎¹, 蟹江 慧¹, 加藤 竜司^{1,2}
 (¹名大院・創薬, ²名大・ナノライフシステム研究所)
- 10:30 3G03-09 Cre 組換え酵素を用いたニワトリ始原生殖細胞への抗体遺伝子のノックイン
 ……○金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道 (九大院・工)
- 10:30 3G03-10 ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子によるがん温熱療法
 ……○山崎 裕永, 金子 真大, 井藤 彰 (名工大院・工)
- 10:30 3G03-11 高機能性ビニルアルコール系重合体を用いたバイオ人工臓臓の開発
 ……○森口 浩聡, 金子 真大, 井藤 彰 (名大院・工)
- 10:30 3G03-12 Investigating the synthesis bottleneck of shark IgNAR antibodies produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells and its application
 ……○Xiaofang Lyu¹, Masayoshi Onitsuka², Noriko Yamano-Adachi^{1,3}, Yuichi Koga⁴, Takeshi Omasa^{1,3}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Technol. Ind. and Soc. Sci., Tokushima Univ., ³OTRI, Osaka Univ., ⁴Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

ランチタイムセミナー

3G05-01 ノバ・バイオメディカル株式会社

G 会場 (12:00~13:00)

シンポジウム

A 会場 (13:30~15:30)

シンポストバイオの潮流～腸内代謝物の有益性と商品化

13:30

はじめに

…………… 松山 彰収

座長：松山 彰収

- 13:32 3A06-01 腸内代謝物と宿主の健康
 ○木村 郁夫 (京大院・生命)
 座長：福田 真嗣
- 14:00 3A06-02 腸内細菌脂肪酸代謝物 HYA の機能と応用
 ○米島 靖記 (Noster)
- 14:22 3A06-03 ポリフェノールパラドックスの鍵は 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) であるか
 ○栢木 宏之¹, 阿波 里佳¹, 三井 亮司², 吉野 進¹, 西谷 洋輔¹, 栗原 浩誠¹
 (¹丸善製薬 総合研究所, ²岡山理大・理)
- 14:44 3A06-04 腸内細菌の共生系によって生産される機能性腸内代謝物ウロリチン A
 ○中島 賢則 (ダイセル)
 座長：高木 忍
- 15:06 3A06-05 疾患予防と健康維持のための腸内環境モジュレーション
 ○金 倫基 (慶大)
- 15:28 おわりに
 高木 忍

A 会場 (16:00~18:00)

健康長寿に貢献するこれからの醸造発酵技術【本部企画】

- 16:00 はじめに
 赤尾 健
 座長：章 超
- 16:02 3A07-01 醸造食品中の D-アミノ酸：生成機構、機能性と新たな醸造技術の開発
 ○老川 典夫 (関西大・化生工)
- 16:30 3A07-02 発酵の力 - 酒粕による老化抑制や脳機能活性化の可能性 -
 ○藤井 力 (福島大・食農)
- 16:58 休憩
 座長：秦 洋二
- 17:02 3A07-03 麹菌を活用した機能性食品の開発事例
 ○仲原 丈晴 (キッコーマン)
- 17:30 3A07-04 健康な人の免疫を維持するプラズマ乳酸菌：日本初の免疫機能性表示素材の研究開発
 ○藤原 大介 (キリンホールディングス)
- 17:58 おわりに
 秦 洋二

C 会場 (13:30~15:30)

KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 第一部

メタボリックエンジニアリングを用いた持続可能なバイオテクノロジーの展開【本部企画・国際シンポジウム】 “Sustainable Biotechnology Using Metabolic Engineering”

- 13:30 Opening Remarks
 Kazuhito Fujiyama, Shen-Long Tsai

座長：Kazuhito Fujiyama

- 13:35 3C06-01 PET hydrolysis by a recyclable supramolecular enzyme complex
 ○Shen-Long Tsai (National Taiwan University of Science and Technology)
 座長：Shen-Long Tsai
- 13:55 3C06-02 Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the sustainable production of value-added chemicals
 ○Hyun Uk Kim (Dept. Chem. Biomol. Eng., KAIST)
- 14:15 Break
 座長：Hyun Uk Kim
- 14:20 3C06-03 Complex microbial engineering of meta-fermentation process for bioresource-recycling and sustainability
 ○Yukihiro Tashiro (Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)
 座長：Yukihiro Tashiro
- 14:40 3C06-04 Model-driven elucidation of transcriptional regulation by Nac highlights its complementary role between nitrogen and carbon metabolism in *Escherichia coli*
 ○Donghyuk Kim (School of Energy and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology)
 座長：Donghyuk Kim
- 15:00 3C06-05 Dynamic model-guided engineering of cyanobacteria metabolism
 ○Fumio Matsuda^{1,2} (¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)
- 15:25 Closing Remarks
 Yukihiro Tashiro, Donghyuk Kim

受賞講演（生物工学アジア若手研究奨励賞（DaSilva 賞））

C 会場（15:45～16:00）

- 15:45 3C07-A1 <生物工学アジア若手研究奨励賞（DaSilva 賞）> 座長：大橋 貴生
 Development of genome engineering technologies for *de novo* design and construction of microbial cell factories
 ○Yu Wang (Tianjin Inst. Ind. Biotechnol., Chin. Acad. Sci.)

シンポジウム

C 会場（16:00～18:00）

アジアにおけるバイオプロダクションの現状と未来 ～SDGs の達成を目指して～【国際シンポジウム・関西支部】 “Recent Advances on Bioproduction toward SDGs in Asia”

- 16:00 Opening Remarks
 Takao Ohashi, Jun Ishii
 座長：Takao Ohashi
- 16:01 3C07-01 Conversion of corn stover into lipids
 ○Zongbao Zhao (Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences)

座長：Kenji Okano

- 16:24 3C07-02 Development of high-lipid-producing strain in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
 ○Hiroaki Takaku (Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)
- 16:47 3C07-03 Enhanced PET biodegradation by a synthetic consortium
 ○Shen-Long Tsai (National Taiwan University of Science and Technology)
- 座長：Yoshihito Ojima
- 17:10 3C07-04 Metabolic engineering for bioethanol production from oil palm biomass
 ○Prayoga Suryadarma (Dept. Agroind. Technol., Fac. Agric. Technol., Bogor Agric. Univ.)
- 座長：Jun Ishii
- 17:33 3C07-05 What do we need for microbial synthetic biology for fine and speciality chemical production
 ○Eriko Takano (University of Manchester, UK)
- 17:56 Closing Remarks
 Takao Ohashi, Jun Ishii

E 会場 (13:30～15:30)

ゲノム編集食品の未来を語り合う～技術から法規制、実用化事例まで～【関西支部】

- 13:30 開会の挨拶
 柴田 裕介
 座長：古座岩 範保
- 13:32 3E06-01 ゲノム編集の研究動向と産業開発
 ○山本 卓 (広島大院・統合生命科学)
- 13:54 3E06-02 ゲノム編集基本特許の最近の動向
 ○橋本 一憲 (弁理士法人セントクレスト国際特許事務所)
 座長：根来 宏明
- 14:16 3E06-03 ゲノム編集技術を用いた水産物の品種改良
 ○梅川 忠典 (リージョナルフィッシュ株式会社)
- 14:38 休憩
- 14:43 3E06-04 ゲノム編集技術による機能性トマトの開発と上市
 ○江面 浩 (筑波大院・生命環境)
 座長：岡野 憲司
- 15:05 パネルディスカッション(ゲノム編集の実用化課題に関して)
 全講演者+聴講者
- 15:28 閉会の挨拶
 藤田 陽平

E 会場 (16:00～18:00)

植物由来のバイオプロダクションの新潮流

- 16:00 はじめに
 岡澤 敦司
 座長：岡澤 敦司
- 16:02 3E07-01 植物甘味成分の酵母生産
 ○關 光^{1,2} (1 阪大院・工, 2 阪大・先導的学際研機構)

座長：關光

- 16:30 3E07-02 植物酵素を利用した有用物質の生物変換
 ○田口 悟朗 (信州大・繊維)
 座長：田口 悟朗
- 16:58 3E07-03 植物を用いたタンパク質生産の過去と現在
 ○梶浦 裕之, 藤山 和仁 (阪大・生工国際セ)
 座長：梶浦 裕之
- 17:26 3E07-04 UV-LEDによる植物代謝産物の増産
 ○岡澤 敦司¹, 鶴本 智大², 藤川 康夫² (¹大阪公大院・農,²日亜化学工業)
- 17:54 おわりに
 田口 悟朗

G 会場 (13:30~15:30)

加速する次世代抗体の実用化に向けた取り組み

- 13:30 はじめに
 上平 正道
 座長：上平 正道
- 13:32 3G06-01 第一三共のマルチモダリティ戦略における次世代抗体とその製造プロセス
 ○野中 浩一 (第一三共株式会社)
- 14:10 3G06-02 タンパク質工学を駆使した多重特異性抗体の開発
 ○浅野 竜太郎 (農工大院・工)
- 14:35 休憩
 座長：大政 健史
- 14:40 3G06-03 抗体医薬精製プラットフォームプロセス：その進化と今後の展望
 ○山本 修一 (山口大・工)
- 15:05 3G06-04 次世代抗体医薬品の効率的実用化推進のための品質管理手法研究
 ○石井 明子 (国立医薬食衛研)
- おわりに
 大政 健史

受賞講演 (生物工学アジア若手賞)

G 会場 (15:45~16:00)

- 15:45 3G07-A1 <生物工学アジア若手賞> 座長：藤山 和仁
 Nanoscale liposomes encapsulating oxygen saturated buffers for the reverse of hypoxia and drug delivery
 ○Jonghoon Choi^{1,2,3}
 (¹Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ²Dept. Chem. Bio. Eng., Univ. of Pennsylvania,
³Nanomedicine Corp.)

シンポジウム

G 会場 (16:00~18:15)

KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 第二部
ナノバイオテクノロジーとナノメディシンの最先端研究【本部企画・国際シンポジウム】
“Current Advances in Nanobiotechnology and Nanomedicine”

16:00	Opening RemarksKazuhiro Fujiyama, Jonghoon Choi 座長： Kazuhiro Fujiyama
16:05	3G07-01 Novel nanomaterials for the detection and elimination of antibiotics resistant pathogenic microbes and biofilms○Jonghoon Choi ^{1,2,3} (¹ Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ² Dept. Chem. Biomol. Eng., Univ. of Pennsylvania, ³ Nanomedicine corp.) 座長： Jonghoon Choi
16:25	3G07-02 Applications of cell-free protein synthesis for generation and characterization of monoclonal antibody: versatile tool of nanomedicine○Hideo Nakano, Teruyo Ojima-Kato (Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.) 座長： Hideo Nakano
16:45	3G07-03 Controlling diffusion for <i>in vitro</i> human intestinal model systems○Raehyun Kim ¹ , Yuli Wang ² , Nancy Allbritton ² (¹ Hongik Univ., Korea, ² Univ. Washington, USA)
17:05	Break 座長： Raehyun Kim
17:10	3G07-04 Bio-inspired zwitterionic polymeric chelating assembly for treatment of copper-induced cytotoxicity and triggered-release drug delivery○Chun-Jen Huang (Dept. Chem. & Mater. Eng., Nat'l Central Univ., Taiwan) 座長： Chun-Jen Huang
17:30	3G07-05 Stabilization and immobilization of carbonic anhydrase via nanobiocatalytic approaches for CO ₂ conversion and utilization○Jungbae Kim (Korea Univ.) 座長： Jungbae Kim
17:50	3G07-06 How to design nano carriers of amphiphiles: vesicle, cataniosome, cubosome, and nanostructured lipid carrier○Hiroshi Umakoshi, Nozomi Watanabe (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
18:10	Closing RemarksHideo Nakano, Chun-Jen Huang

第4日 (10月20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) ○印は講演者を示す
------	------	----	-------------------------

受賞講演 (生物工学若手賞)

A 会場 (8:45~9:00)

8:45	4A01-A1	〈生物工学若手賞〉 次世代農業資材に向けた二本鎖 RNA の高効率バイオ生産技術の開発 ○羽城 周平 (味の素・バイオファイン研)	座長：上田 宏
------	---------	---	---------

C 会場 (8:45~9:00)

8:45	4C01-A1	〈生物工学若手賞〉 植物の多糖類を分解する微生物の緻密な酵素システム ○松沢 智彦 (香川大・農)	座長：芦内 誠
------	---------	---	---------

一般講演

A 会場 (9:00~9:45)

【タンパク質工学／酵素学, 酵素工学】

9:00	4A01-01	テーラーメイド・バイオ生産に向けた α -ケト酸脱炭酸酵素の開発 ○伏見 圭司 ¹ , 秀瀬 涼太 ^{1,2} , Vavricka Christopher J. ¹ , 工藤 恒 ¹ , 蓮沼 誠久 ^{1,2} , 近藤 昭彦 ^{1,2} (¹ 神戸大院・科技イノベ, ² 神戸大・先端バイオ工研セ)	
9:00	4A01-02	高基質特異性酵素 L-グルタミン酸オキシダーゼの基質認識に関わる残基の機能解析 ○中山 夏女 ¹ , 矢野 佳果 ¹ , 上田 悠加 ² , 今田 勝己 ² , 田村 隆 ¹ , 金尾 忠芳 ¹ , 稲垣 賢二 ¹ (¹ 岡山大院・環境生命, ² 阪大院・理)	
9:00	4A01-04	麹菌由来 Hydrophobin RolA の N 末端領域内正電荷残基が自己組織化に与える影響の解析 ○高橋 尚央 ¹ , 寺内 裕貴 ² , 田中 拓未 ³ , 吉見 啓 ⁴ , 藪 浩 ^{5,6} , 阿部 敬悦 ¹ (¹ 東北大院・農, ² 京大院・地球環学, ³ 阪大院・工, ⁴ 京大院・農, ⁵ 東北大・WPI-AIMR, ⁶ 東北大・多元研)	
9:00	4A01-05	麹菌由来界面活性タンパク質 RolA の自己組織化メカニズム及び界面活性に関する解析 ○井田 大輝 ¹ , 寺内 裕貴 ² , 田中 拓未 ³ , 吉見 啓 ⁴ , 三ツ石 方也 ⁵ , 藪 浩 ^{6,7} , 阿部 敬悦 ¹ (¹ 東北大院・農, ² 京大院・地球環学, ³ 阪大院・工, ⁴ 京大院・農, ⁵ 東北大院・工, ⁶ 東北大・多元研, ⁷ 東北大・WPI-AIMR)	
9:00	4A01-06	機械学習を用いた耐熱性リパーゼの創製 ○吉田 和典 ¹ , 亀田 倫史 ² , 齋藤 裕 ² , 小池田 聡 ¹ (¹ 天野エンザイム, ² 産総研・人工知能)	
9:00	4A01-08	新規耐熱性 DNA メチル基転移酵素 M.ApcKI の配列認識ドメインの特性評価 ○林 真央, 飯田 泰広 (神奈川工科大院・工)	

- 9:00 4A01-09 TNF- α 親和性フィブロネクチンドメイン変異体の親和性成熟
 ○牧野 祥嗣, 石坂 滯来, 金井 保 (富山県大・工)
- 9:00 4A01-10 Split intein を用いた超好熱菌由来プロテアーゼ Tk-SP 高発現系の構築
 ○白須 尊大¹, 巽 祐介¹, 山野-足立 範子¹, 古賀 雄一^{1,2}, 大政 健史¹
 (¹ 阪大院・工, ² 岡山理大・工)
- 9:00 4A01-11 超好熱菌由来 β -sandwich domain1 を基にした新規 binding scaffold の開発
 ○月元 漱介¹, 長尾 征秀¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 古賀 雄一^{1,3}, 大政 健史^{1,2}
 (¹ 阪大院・工, ² 阪大・OTRI, ³ 岡山理大・工)
- 9:00 4A01-12 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来リゾソホリパーゼの生体内機能解明に向けた特性解析
 ○熊野 祐香¹, 古賀 雄一², 山野-足立 範子^{1,3}, 大政 健史^{1,3}
 (¹ 阪大院・工, ² 岡山理大・工, ³ 阪大・先導的学際研機構)
- 9:00 4A01-13 Engineering the sandwich domain 1 (SD1) of a thermostable protease for improved soluble expression for novel binding
 ○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo¹, Masahide Nagao¹, Hidekazu Kishi¹,
 Noriko Yamano-Adachi¹, Yuichi Koga², Takeshi Omasa¹
 (¹ Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ² Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

A 会場 (10:30~11:15)

【タンパク質工学】

- 10:30 4A03-01 オーバーラップオペロン構造を用いた複数タンパク質の同時高発現
 ○西岡 優佑¹, Wolf Ruslana², 星田 尚司¹, 赤田 倫治¹
 (¹ 山口大院・創成科学, ² Berlin University of Applied Sciences and Technology)
- 10:30 4A03-02 組換え漏れの無い化合物遺伝学的 Cre-loxP 遺伝子組換え制御技術の開発
 ○河野 風雲, 佐藤 守俊 (東大院・総文)
- 10:30 4A03-03 *Geobacillus* 属好熱菌を用いた異種タンパク質生産の実用性に関する検証
 ○鈴木 宏和^{1,2}, 小山 幸祐³, 倉敷 凌太³, 渡辺 俊介⁴, 大城 隆^{1,2}
 (¹ 鳥取大・工, ² 鳥取大・GSC センター, ³ 鳥取大院・持続創生, ⁴ (株) プロテイン・エクスプレス)
- 10:30 4A03-04 微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発
 ○伊藤 良浩^{1,2}, 佐々木 隆一¹, 朝里 さやか¹, 北口 哲也³, 上田 宏³
 (¹ 味の素・バイオファイン研, ² 東工大・生命理工, ³ 東工大・化学生命研)
- 10:30 4A03-05 分割蛍光タンパク質プローブによる DNA 損傷応答の細胞内イメージング
 ○金岡 英徳, 渡邊 愛梨, 深田 梨沙子, 田代 有輝, 清中 茂樹 (名大院・工)
- 10:30 4A03-06 新規ナノ材料開発を志向したタンパク質超分子カルボキシソーム外殻形成の鍵タンパク質 CcmO の生化学的特性解析
 ○大久保 詠一郎¹, 杉山 由花¹, 大島 昌也¹, 中村 隆太郎¹,
 松村 洋寿¹, 野口 恵一², 養王田 正文², 尾高 雅文¹
 (¹ 秋田大院・理工, ² 農工大院・工)
- 10:30 4A03-07 タンパク質の人工パルミトイル化技術の拡張と生細胞を用いた評価
 ○内田 和希¹, 大林 洋貴¹, 南畑 孝介¹, 若林 里衣¹,
 後藤 雅宏^{1,2}, 下川 直史³, 高木 昌宏³, 神谷 典穂^{1,2}
 (¹ 九大院・工, ² 九大・未来化セ, ³ 北陸先端大・マテリアル)
- 10:30 4A03-08 タンパク質性分子認識素子の合理的設計と静電的相互作用モデルの検証
 ○光成 麻弥, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行 (岡山大院・自科)
- 10:30 4A03-09 CutA1 を足場とした分子認識素子積層型ナノバイオ界面の作製とその特性評価
 ○中山 友梨香, 石田 尚之, 今村 維克, 今中 洋行 (岡山大院・自科)

- 10:30 4A03-10 炎症性腸疾患治療薬 5-アミノサリチル酸の作用機序解明に向けた新規標的タンパク質の同定と機能解析
 ○伊藤 和哉, 涌井 秀樹, 尾高 雅文, 松村 洋寿 (秋田大院・理工)
- 10:30 4A03-11 PD-SELEX 法で得られた人工 RNA-RBP ペアの特性解析
 ○福永 圭佑 (沖縄科技大)
- 10:30 4A03-12 転写因子 ArsR-LuxR 融合タンパク質のヒ素添加に伴う OFF スイッチ原理の解明
 ○阿由葉 里奈¹, 田中 佑樹⁴, 小椋 康光⁴, 梅野 太輔³, 河合 繁子²
 (1千葉大院・融合理工, 2千葉大院・工, 3早大院・先進理工, 4千葉大院・薬)

B 会場 (9:45~10:30)

【生合成, 天然物化学/有機化学, 高分子化学】

- 9:45 4B02-01 微生物分離装置を用いた抗生物質生産菌のスクリーニング法の開発
 ○小川 昌規, 平瀬 辰朗, 多田 孝清 ((株) KRI)
- 9:45 4B02-02 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の制御遺伝子変異株に見いだされたガンマブチロラクトン化合物の解析
 ○見崎 裕也^{1,2}, 高橋 譲², 原 圭佑², 立野 智資², 荒川 賢治^{1,2}
 (1広島大院・統合生命科学, 2広島大院・先端研)
- 9:45 4B02-03 *Streptomyces* sp. TSP2-12 株の生産する抗菌活性物質に関する研究
 ○鶴貝 龍聖, 秦田 勇二 (埼玉工業大院・工)
- 9:45 4B02-04 *Bacillus amyloliquefaciens* に分布する新規 surfactinC 生合成オペロン
 ○伊藤 光次朗¹, 安達 真菜¹, 松谷 峰之助², 梶川 揚申³, 五十君 静信³, 横田 健治³
 (1東農大院・応生科, 2東農大・ゲノム解析セ, 3東農大・応生科)
- 9:45 4B02-05 M13 ファージのライフサイクルを活用した S-Allyl-L-cysteine 生合成経路の最適化
 ○松本 拓也, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 9:45 4B02-06 フルコナゾール耐性病原性真菌 *Candida albicans* に対するアネトールの相乗的抗真菌作用
 ○土田 泰暉¹, 村田 和加恵^{1,2}, 山口 良弘¹, 荻田 亮^{1,3}, 藤田 憲一¹
 (1大阪公大院・理, 2米子高専, 3大阪公大健康研セ)
- 9:45 4B02-07 出芽酵母における微小管重合阻害とミトコンドリアの融合・分裂異常の関係
 ○村田 和加恵^{1,2}, 荻田 亮^{2,3}, 山口 良弘², 藤田 憲一²
 (1米子高専, 2大阪公大院・理, 3大阪公大健康研セ)
- 9:45 4B02-08 担子菌 *Trametes versicolor* 抽出物による PC12 細胞におけるグルタミン酸誘発酸化ストレス抑制機構の解明
 ○友尻 創太¹, 森脇 真希² (1富山大・工, 2富山大院・理工)
- 9:45 4B02-09 *Talaromyces trachyspermus* が産生するスピクリスポール酸およびその誘導体に関する抗菌活性
 ○望月 誉志幸¹, 平敏彰², 関口 喜則¹ (1磐田化学工業, 2産総研・化プロ)
- 9:45 4B02-10 超広域感染阻止能を具備するバイオ超分子コーティング: 新型コロナから白癬症まで
 ○大成 冬真¹, 小野寺 正孝², 白米 優一¹, 芦内 誠¹
 (1高知大院・総人間自科, 2東洋濾紙株式会社)

B 会場 (11:15~12:00)

【タンパク質工学／抗体工学】

- 11:15 4B04-01 アンモニア応答 G タンパク質共役型受容体の阻害による効果的なアンモニア知覚抑制
 ○福谷 洋介¹, 齋藤 芽生¹, 江口 諒², 田澤 寿明², 養王田 正文¹
 (¹農工大院・工, ²エステー株式会社)
- 11:15 4B04-02 中性子結晶構造に基づく小分子阻害剤によるマクロフェージ遊走阻止因子の阻害機構の解明
 ○江澤 理徳¹, 刈屋 佑美², 平野 優³, 日下 勝弘⁴,
 玉田 太郎³, 涌井 秀樹¹, 尾高 雅文¹, 松村 洋寿¹
 (¹秋田大院・理工, ²秋田大・産連, ³量研機構・量子生命,
⁴茨城大・フロンティア応用原子科学研セ)
- 11:15 4B04-03 Immunostimulation of shrimp through oral administration of silkworm pupae expressing VP15 against WSSV
 ○Jirayu Boonyakida¹, Takafumi Nakanishi², Jun Satoh³, Yoshiko Shimahara³, Tohru Mekata⁴,
 Enoch Y. Park^{1,2,5}
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Japan Fish.
 Res. Educ. Agcy., ⁴Fac. Vet. Med., Okayama Univ. Sci., ⁵Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
- 11:15 4B04-04 イヌパルボウイルス様粒子の作製と EGFP の提示
 ○朴 龍洙^{1,2}, 関口 智史², プーニャキダ ジラユ¹, 徐 劍¹, 加藤 竜也^{1,2}
 (¹静大・グリーン科技研, ²静大院・総合科技)
- 11:15 4B04-05 がん免疫サイクルのレベルを末梢血で評価する自己抗体バイオマーカー群網羅的測定法の確立
 ○宮本 愛¹, 本莊 知子¹, 益井 実鈴¹, 木下 理恵², 公文 裕巳³, 垣見 和宏⁴, 二見 淳一郎¹
 (¹岡山大院・統合科学, ²岡山大院・医歯薬, ³新見公大, ⁴東大病院)
- 11:15 4B04-06 代替 2 次元分離法の開発による自己抗体バイオマーカー探索の効率化
 ○益井 実鈴¹, 塩川 つぐみ², 多田 宏子², 宮本 愛¹, 二見 淳一郎¹
 (¹岡山大院・統合科学, ²岡山大・自然生命支援セ)
- 11:15 4B04-07 PURE リボソームディスプレイを用いたエピトープマッピング技術の開発
 ○Jia Beixi¹, 兒島 孝明², 加藤 晃代¹, 中野 秀雄¹
 (¹名大院・生命農学, ²名城大院・農)
- 11:15 4B04-08 パラトープ改変抗体の作製とその応用
 ○安西 高廣, 安永 正浩 (国がん・先端医療開発セ)
- 11:15 4B04-09 H 鎖 L 鎖の特異的ペアリングによる二重特異性抗体の構築
 ○吉田 純菜¹, 中西 猛², 真壁 幸樹^{1,3}
 (¹山形大院・理工, ²大阪公大院・工, ³JST・さきがけ)
- 11:15 4B04-10 タンデム scFv を環状に連結した二重特異性抗体(Cyclobody BiTE)の作製と評価
 ○山田 梨沙¹, 中原 維新², 中西 猛³, 浅野 竜太郎², 真壁 幸樹^{1,4}
 (¹山形大院・理工, ²農工大院・工, ³大阪公大院・工, ⁴JST・さきがけ)
- 11:15 4B04-11 分離インテインを用いた蛋白質連結反応による二重特異性抗体の構築と評価
 ○菅野 菜津奈¹, 森井 勇翔¹, 浅野 竜太郎², 中西 猛³, 真壁 幸樹^{1,4}
 (¹山形大院・理工, ²農工大院・工, ³大阪公大院・工, ⁴JST・さきがけ)
- 11:15 4B04-12 A 型インフルエンザウイルスの高度保存領域を標的にした抗体酵素の作製と性質
 ○鶴田 貴幸¹, 野中 玲実², 宇田 泰三³, 一二三 恵美^{2,4}
 (¹大分大・工, ²大分大・研究マネジメント機構, ³九州先端科学技術研究所,
⁴大分大・グローバル感染症研究センター)

C 会場 (9:00~9:45)

【代謝工学】

- 9:00 4C01-01 大腸菌におけるロドプシンの光駆動プロトンポンプが弱酸耐性に及ぼす影響
○小林 祐摩¹, 佐野 海瑚人¹, 弘埜 陽子², 松田 史生¹,
 石井 純³, 原 清敬², 戸谷 吉博¹, 清水 浩¹
 (¹ 阪大院・情報, ² 静大・食栄, ³ 神戸大院・科技イノベ)
- 9:00 4C01-02 異なる炭素源を消費する2種類の腸菌株を用いた共培養によるイソプレノール生産
○村上 茉奈美¹, 川井 隆太郎¹, 三吉 健太¹, 芝井 厚², 前田 智也³,
 堀之内 貴明⁴, 古澤 力^{2,5}, 戸谷 吉博¹, 清水 浩¹
 (¹ 阪大院・情報, ² 理化学研究所, ³ 北大院・農, ⁴ 産総研, ⁵ 東大院・理)
- 9:00 4C01-03 多様な腸菌株を利用した芳香族化合物生産技術の開発
○戸村 正稔¹, 番場 崇弘^{1,2}, 蓮沼 誠久^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2,3}
 (¹ 神戸大院・科技イノベ, ² 神戸大・先端バイオ工研セ, ³ 理研・環境資源)
- 9:00 4C01-04 4-ヒドロキシフェニル酢酸-3-モノオキシゲナーゼ遺伝子を高発現した腸菌によるチロソールのヒドロキシチロソールへの変換
○藤澤 誠¹, 駒 大輔², 大橋 博之², 山中 勇人², 森芳 邦彦², 長森 英二³, 大本 貴士²
 (¹ 大阪工大・院, ² 大阪技術研, ³ 大阪工大・工)
- 9:00 4C01-05 マイクロドロプレットを用いた腸菌指向進化実験のとりくみ
佐藤 玲子¹, 大竹 理寛¹, 高 イクサイ¹, 戸谷 吉博², 清水 浩², ○鈴木 宏明¹
 (¹ 中央大・理工, ² 阪大院・情報)
- 9:00 4C01-06 マロニル-CoA 生合成を強化した腸菌での遊離脂肪酸生産
○濱田 美志, 中平 洋一, 西澤 智康, 長南 茂 (茨城大院・農)
- 9:00 4C01-07 腸菌染色体上のリボソーム結合配列改変を利用した最適メバロン酸生産
澤田 将吾, 松田 史生, 戸谷 吉博, ○清水 浩 (阪大院・情報)
- 9:00 4C01-08 アンチセンス RNA を利用した光照射による代謝フラックス制御技術の開発
○櫻井 翔太, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 9:00 4C01-09 非酸化分解糖経路の有望な目的化合物の検討と *in silico* 代謝デザイン
○三吉 健太, 一色 衣香, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 9:00 4C01-10 青色光応答タンパク質を利用した中枢代謝フラックスの制御技術の開発
○赤木 駿斗, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 9:00 4C01-11 Development of ATP regeneration based on Non-Oxidative Glycolysis (ArNOG) module for cofactor recycling in *in vitro* biosynthetic pathways
 Gladwin Suryatin Alim¹, ○Jonathan Ekaputra¹, Kenji Okano^{1,3}, Kohsuke Honda^{1,2}
 (¹ ICBiotech, Osaka Univ., ² OTRI, Osaka Univ., ³ Dept. Life Sci. Biotechnol., Kansai Univ.)
- 9:00 4C01-12 アンチセンスペプチド核酸を用いた減算的な菌叢改変手法の開発
○岡野 憲司¹, 日詰 達哉², 佐藤 悠³, 岩木 宏明¹, 本田 孝祐^{2,4}
 (¹ 関西大・化生工, ² 阪大・生工国際セ, ³ 山口大院・創成・農, ⁴ 阪大・先導的学際研機構)

C 会場 (10:30~11:15)

【オミクス解析／代謝工学／発酵生理学, 発酵工学】

- 10:30 4C03-01 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 脂質代謝経路の¹³C トレーサー解析
○山田 侑季¹, 村上 慶多¹, 岡橋 伸幸^{1,2,3}, 遠山 敦彦⁴, 飯田 順子^{2,4}, 松田 史生^{1,2,3}
 (¹ 阪大院・情報, ² 阪大島津協働研, ³ 阪大先導研, ⁴ 島津製作所)

- 10:30 4C03-02 Data-independent acquisition (DIA) 法による脂質構造異性体の分離法の構築
○原 大樹¹, 小森 柊花¹, 岡橋 伸幸^{1,2,3}, 遠山 敦彦⁴, 飯田 順子^{2,4}, 松田 史生^{1,2,3}
 (¹ 阪大院・情報, ² 阪大島津協働研, ³ 阪大先導研, ⁴ 島津製作所)
- 10:30 4C03-03 様々な酵母種間に見られる代謝戦略の比較解析
○清家 泰介¹, Prihardi Kahar², 荻野 千秋², 松田 史生¹
 (¹ 阪大院・情報, ² 神戸大院・工)
- 10:30 4C03-04 ピキア酵母による芳香族化合物大量生産に向けたチロシンシャーシ株の開発
 ○雲北 涼太¹, 番場 崇弘¹, 猪熊 健太郎¹, 伊藤 洋一郎^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2,3}, 蓮沼 誠久^{1,2}
 (¹ 神戸大院・科技イノベ, ² 神戸大・先端バイオ工研セ, ³ 理研・環境資源)
- 10:30 4C03-05 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* が産生する揮発性成分と油脂蓄積量の相関調査
○中井 慶治¹, 古野 正浩¹, 本田 孝祐¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}
 (¹ 阪大院・工, ² 阪大・先導的学際研機構, ³ 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
- 10:30 4C03-06 未知の親水性代謝物の包括的構造推定に向けた in silico エピメタボライトデータベース (IEMDB) の開発
 ○和泉 自泰^{1,2}, 鳥越 大平², 中尾 素直¹, 相馬 悠希³,
 池田 和輝², 中谷 航太¹, 高橋 政友^{1,2}, 馬場 健史^{1,2}
 (¹ 九大・生医研, ² 九大院・シス生科, ³ 九大院・農)
- 10:30 4C03-07 自然発酵パン種の in vitro 菌叢変遷の数理モデル化
○大城 麦人¹, 善藤 威史², 中山 二郎² (¹ 山崎製パン・中央研 (現 九大院・農), ² 九大院・農)
- 10:30 4C03-08 Metabolomics-based characterization of commercial coconuts from different origins
 ○Raffaello Riley C. Voluntad¹, Sastia Prama Putri^{1,2}, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}
 (¹ Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ² Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and
 Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., ³ Osaka University Shimadzu Omics Innovation
 Research Laboratories)
- 10:30 4C03-09 Metabolite profile of cocoa beans and its correlation to environmental temperature
○Abu Hanifah¹, Hendy Firmanto², Sastia Prama Putri^{1,3}, Eiichiro Fukusaki^{1,3,4}
 (¹ Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ² Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst., ³ OTRI, Osaka
 Univ., ⁴ Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)
- 10:30 4C03-10 Chitosan coating and low temperature treatment metabolomic analysis reveals different mechanism in
 delaying banana ripening
○Muhammad Maulana Malikul Ikram¹, Anjaritha Aa Parijadi¹, Kana Yamamoto¹,
 Fenny M. Dwivany², Ketut Wikantika³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}
 (¹ Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ² Sch. of Life Sci. and Tech., ITB., ³ Cent. of Remote Sensing, ITB., ⁴ Ind.
 Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka Univ., ⁵ Osaka University-Shimadzu
 Omics Innov. Res. Lab., Osaka Univ.)
- 10:30 4C03-11 Metabolites profile of soybean and red kidney bean tempe powder in different drying treatments
 ○Della Rahmawati^{1,2}, Made Astawan³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}
 (¹ Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, Japan, ² Dept. Food Sci. Tech., Swiss German Univ,
 Indonesia, ³ Dept. Food Sci. Tech., IPB Univ, Indonesia, ⁴ OTRI, Osaka Univ, Japan, ⁵ Osaka Univ.,
 Shimadzu Omics Innov. Res. Lab, Osaka Univ, Japan)
- 10:30 4C03-12 メタボロミクスに基づいた、テンダーココナツウォーターの異なる保存状態の評価
 ○渡邊 拓海¹, Putri Sastia Prama^{1,2}, 福崎 英一郎^{1,2,3}
 (¹ 阪大院・工, ² 大阪大学先導的学際研機構, ³ 大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)

D 会場 (9:45~10:30)

【センサー, 計測工学/バイオセンシング, 分析化学】

- 9:45 4D02-01 Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing.
○Tharatorn Rungreungthanapol¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹, Mina Okochi¹
 (1 Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech, 2 Toshiba Corporation)
- 9:45 4D02-02 3D-HLD 法を用いたバイオ医薬品の凝集体計測
○大澤 賢太郎^{1,2}, 安齋 由美子², 梅田 麻理子², 峯邑 浩行², 横山 雅美³, 福原 彩乃³, 内山 進^{3,4}
 (1 日立ハイテク, 2 日立製作所, 3 ユー・メディコ, 4 阪大院・工)
- 9:45 4D02-03 N,S-グラフェン量子ドット (N,S-GQD) の合成反応の最適化による電気化学的シグナル安定性の向上
○敦賀 健太¹, シャイクリザル エル ムッタキン², 朴 龍洙^{1,2} (1 静大院・総合科技, 2 静大・グリーン科技研)
- 9:45 4D02-04 Pt-embodiment ZIF-67-derived nanocage as enhanced nanozyme for infectious virus detection
○Indra M. Khoris¹, Kenta Tsuruga², Akhilesh B. Ganganboina³, Enoch Y. Park^{1,2,4}
 (1 Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., 2 Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., 3 Nat. Inst. Mater. Sci., 4 Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
- 9:45 4D02-05 The development a simple polyaniline gold nanoparticle-based biosensor for norovirus detection
○Sjaikhurrizal El Muttaqien^{1,2}, Indra M. Khoris¹, Enoch Y. Park¹
 (1 Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., 2 Research Center for Vaccine and Drug, National Research and Innovation Agency (BRIN), Indonesia)
- 9:45 4D02-06 ナノマテリアルによる SERS を利用したウイルス検出装置の開発
○前畑 秀叡¹, Ojodomo Achadu², Memdi Indra³, 朴 龍洙^{1,2,3}
 (1 静大院・総合科技, 2 静大・グリーン科技研, 3 静大・創科技院)
- 9:45 4D02-07 ラマン分光を用いた赤潮終息予測のためのシングルセル分子解析
○安藤 正浩¹, 久保 昂也², 堀井 俊平², 外丸 裕司³, 羽野 健志³, 竹山 春子^{1,2,4}
 (1 早大・ナノライフ創新研, 2 早大院・先進理工, 3 水産機構水技研, 4 早大・生命動態研)
- 9:45 4D02-08 シグナリング方式 DNA マイクロアレイを用いた飲料/製薬分野向け微生物迅速検査システムの開発
○平川 祐子^{1,2}, 青木 秀年¹, 三森 裕示¹, 田口 朋之¹
 (1 横河電機, 2 農工大院・工)
- 9:45 4D02-09 スタフィロコッカス属細菌の同定方法の開発
○石川 文啓, 多田 孝清 (株式会社 KRI)
- 9:45 4D02-10 微生物熱測定法を用いたポリフェノール存在下での大腸菌増殖抑制効果の定量解析
○千原 菜緒¹, 柴田 敏行^{1,2}, 田中 礼士^{1,2}, 三宅 英雄^{1,2}
 (1 三重大院・生資, 2 三重大・海藻バイオリファイナー)
- 9:45 4D02-11 血小板が結合した血中循環腫瘍細胞の 3 D イメージング解析
○後藤 紗也香¹, 桶川 隆嗣², 出来 真弓², 中村 雄², 田中 剛¹, 吉野 知子¹
 (1 農工大院・工, 2 杏林大・医)

D 会場 (11:15~12:00)

【代謝工学／オミクス解析／発酵生理学，発酵工学／システムバイオロジー／生体情報工学，バイオインフォマティクス】

- 11:15 4D04-01 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の代謝モデル構築とその検証
○小林 友哉¹, 渡邊 直暉¹, 屋良 みなみ¹, 坂本 大輔³, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹
 (¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ, ³神戸大・工)
- 11:15 4D04-02 歯周病菌が産生する揮発性化合物のプロファイリング
○森 あすか¹, 谷口 百優², 久保庭 雅恵³, 天野 敦雄³, 福崎 英一郎^{1,2,4}
 (¹阪大院・工, ²大阪大学島津分析イノベーション協働研究所, ³阪大院・歯, ⁴阪大・先導的学際研機構)
- 11:15 4D04-03 Lrp/AsnC 型転写制御因子による L-アスパラギン代謝制御機構の解明
 丸山 凌¹, 谷本 充¹, 吉田 晃¹, 山本 康之¹,
 Liu Rengwei¹, 道盛 裕太¹, ○金井 保^{1,2,3}, 跡見 晴幸¹
 (¹京大院・工, ²富山県大・生医工研セ, ³富山県大・工)
- 11:15 4D04-04 C₆ カルボン酸代謝酵素遺伝子群を導入した超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の解析
 ○浅井 祐亨¹, 村松 彩香¹, 折田 和泉¹, 今中 忠行², 福居 俊昭¹
 (¹東工大・生命理工, ²立命館大・総合科学技術研究機構)
- 11:15 4D04-05 ゲノムデータとメタボロームデータを用いた酵素遺伝子と代謝産物の推定法の開発
 ○岡橋 伸幸, 松田 史生 (阪大院・情報)
- 11:15 4D04-06 微生物共培養のための精製タグ付きタンパク質を利用した ¹³C 代謝フラックス比解析技術の開発
 ○川本 優一, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)
- 11:15 4D04-07 ヒト定量メタボロミクスに資する安定同位体標識内部標準群 (SILIS) のバイオプロダクション
 ○相馬 悠希¹, 高橋 政友², 今戸 優理², 松田 貴意³, 池田 明夏里⁴,
 田邊 芽衣⁴, 寺内 勉⁴, 花井 泰三¹, 馬場 健史²
 (¹九大院・農, ²九大・生医研, ³SAIL テクノロジーズ, ⁴大陽日酸)
- 11:15 4D04-08 アルツハイマーモデルマウス海馬の空間位置特異的な遺伝子発現解析
 ○山崎 美輝^{1,2}, 依田 卓也¹, 松永 浩子³, 細川 正人^{1,2,3,4}, 大島 登志男^{1,4}, 竹山 春子^{1,2,3,4}
 (¹早大院・先進理工, ²産総研・早大 CBB-D-OIL, ³早大・ナノライフ創研研, ⁴早大・生命動態研)
- 11:15 4D04-09 LC-MS/MS を用いた培養上清/細胞内抽出成分の一斉分析による抗体高産生クローンの代謝解析
 ○黒田 博隆^{1,2,3}, 空田 和也¹, 山野 範子¹, 飯田 順子^{2,3}, 鈴木 崇², 本山 賢人², 大政 健史¹
 (¹阪大院・工, ²島津製作所, ³大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所)
- 11:15 4D04-10 メタボロームデータとフラックスデータを組み合わせた代謝制御点の探索法の開発
 ○丸山 正晴, 荒木 千絵, 岡橋 伸幸, 松田 史生 (阪大院・情報)
- 11:15 4D04-11 好中球の活性酸素種産生能の制御に向けた中心炭素代謝経路の定量解析法の構築
 ○谷口 昶夫, 岡橋 伸幸, 松田 史生 (阪大院・情報)
- 11:15 4D04-12 カチオン条件の違いによる酸性環境下の大腸菌細胞内 pH 調節遺伝子群の探索
 ○福田 紘子¹, 住田 和弥¹, 森 浩禎², 中嶋 幹男³, 片岡 正和¹
 (¹信州大院・総理工研, ²広東省農業科学院, ³MSL)
- 11:15 4D04-13 広範な酵素反応予測のための機械学習モデルの開発
○渡邊 直暉¹, 山本 昌輝^{2,4}, 村田 昌浩^{2,3}, Vavricka Christopher J.³, 荻野 千秋¹, 近藤 昭彦^{1,3},
 荒木 通啓^{1,2,3,4,5}
 (¹神戸大院・工, ²京都大院・医, ³神戸大院・科技イノベ, ⁴国立医薬基盤・健康・栄養研,
⁵国立循環研セ)

E 会場 (9:00~9:45)

【バイオマス, 資源, エネルギー工学】

- 9:00 4E01-01 微生物で構成される系の細胞密度を推定する AI プログラムの開発
○松本 李梨¹, 江口 文仁², 福西 広晃^{2,3}, 中西 昭仁^{1,4}
 (¹東京工科大・応生, ²東京工科大・コンピューターサイエンス,
³東京工科大院・コンピューターサイエンス, ⁴東京工科大院・バイオニクス)
- 9:00 4E01-02 組換え大腸菌細胞を用いる水素生成バイオカソードの作製
○結城 里沙, 藤井 浩, 本田 裕樹 (奈良女子大・化学生物環境)
- 9:00 4E01-03 新規メタン酸化性菌のスクリーニングと遺伝子導入法の検討
○木村 裕花, 田島 大輝, 出川 貴彬, 中島 敏明 (筑波大院・生命環境)
- 9:00 4E01-04 *Methylobacterium extorquens* 高濃度メタノール耐性株の取得と解析
○千葉 恒慶, 鶴田 爽, 折田 和泉, 福居 俊昭 (東工大・生命理工)
- 9:00 4E01-05 Improved GABA production from waste biomass by engineered *Halomonas elongata* GOP-Gad
○Ziyan Zou¹, Hideki Nakayama^{1,2,3} (¹Grad. Sch. Fish. Environ. Sci., Nagasaki Univ., ²Inst. Sci. Technol., Nagasaki Univ., ³Org. Marine Sci. Technol., Nagasaki Univ.)
- 9:00 4E01-06 植物病害防除における *Bacillus* 属細菌 IA 株が生産する揮発性と非揮発性の抗菌活性物質の複合効果
○松瀬 一平¹, 江邊 正平², 大池 達矢², 岡南 政宏^{1,2}, 阿野 貴司^{1,2}
 (¹近畿大院・生物理工, ²近畿大・生物理工)
- 9:00 4E01-07 ファイトレメディエーション後のフィトマスから細菌・酵母の共培養による第2世代バイオエタノール生産
○簡 梅芳¹, 張 瑞仁², Tusher Tanmoy Roy¹, Saunivalu Maria Ita¹,
 若狭 颯介¹, 李文雄³, 黄 辰介⁴, 井上 千弘¹
 (¹東北大院・環境,
²Department of Medical Research, China Medical University Hospital, China Medical University, Taiwan,
³Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taiwan,
⁴Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taiwan)
- 9:00 4E01-08 遺伝子発現から見た植物共生細菌の種間相互作用と代謝スイッチング
○石澤 秀紘^{1,4}, 田代 陽介², 井上 大介³, 池 道彦³, 二又 裕之^{2,4,5}
 (¹兵庫県大院・工, ²静大院・総合科技, ³阪大院・工, ⁴静大・グリーン科技研, ⁵静大・創科技院)
- 9:00 4E01-09 牛尿発酵液由来分離菌を用いた微細藻類増殖促進能の評価
○Tan Pei Yu¹, 石田 奨², 加藤 勇太³, 邱 泰瑛², 小西 正朗²
 (¹北見工大院・工, ²北見工大, ³環境大善株式会社)
- 9:00 4E01-10 木質バイオマスの新規利用に関する研究
○桂木 遼太郎, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 9:00 4E01-11 農作物のミネラル含有量を増加させる資材の探索
○前野 友美, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)
- 9:00 4E01-12 ガラスを用いた新規有機標準土壌の開発
○水野 淳太, Tran Quoc Thinh, 久保 幹 (立命館大院・生命科学)

E 会場 (10:30~11:15)

【バイオマス, 資源, エネルギー工学/植物細胞工学, 組織培養, 育種工学】

- 10:30 4E03-01 群体性藻類 *Botryococcus braunii* の機能解析や分子育種に資する単細胞培養条件の確立
○村山 拳午, 大槻 隆司 (山梨大院・医工農)

- 10:30 4E03-02 緑藻細胞のみで作製された細胞プラスチックにおける細胞間接合因子の評価
 ○根本 進太郎¹, 中西 昭仁^{1,2} (¹東京工科大・応生,²東京工科大院・バイオニクス)
- 10:30 4E03-03 *Euglena gracilis* 細胞の沈降に培地中へのエタノール添加がもたらす影響
 ○高橋 優, 島本 航輔, 小山内 崇 (明治大院・農)
- 10:30 4E03-04 ユーグレナワックスエステル合成系における NADPH→NADH 変換の重要性
 ○中澤 昌美¹, 大石 陸人¹, 高橋 夢月¹, 柏山 祐一郎², 乾 博¹, 上田 光宏¹, 阪本 龍司¹
 (大阪公大院・農,²福井工大)
- 10:30 4E03-05 褐藻類を原料とした 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) の生産
 ○野田 祐亮¹, 柴田 敏行^{1,2}, 田中 礼士^{1,2}, 三宅 英雄^{1,2}
 (三重大院・生資,²三重大・海藻バイオリアファイナリー)
- 10:30 4E03-06 外部循環型フォトバイオリアクターを用いた耐塩性微細藻類 *Dunaliella tertiolecta* によるグリセロール生産
 ○立林 尚門, 熊田 陽一, 堀内 淳一 (京工繊大院・工芸科学)
- 10:30 4E03-07 *Torulasporea quercuum* を用いた紅藻糖化液を原料とした効率的なエタノール生産
 ○小西 正朗, 森本 一輝, 邱 泰瑛 (北見工大)
- 10:30 4E03-08 ゲノム編集による微細藻類ナンノクロロプシスへの高濃度炭酸ガス耐性の付与
 乔 俏¹, 張 吉¹, 渡部 寛大², ○藤江 誠¹
 (広島大院・統合生命科学,²広島大・工)
- 10:30 4E03-09 植物の気孔開閉を制御する化合物の探索
 ○竹田 遥¹, 鈴木 喬太¹, 三俣 好令¹, 有澤 美枝子², 石丸 泰寛¹, 魚住 信之¹
 (東北大院・工,²九大院・農)
- 10:30 4E03-10 土壌に対する植物地下部の環境応答性の解析
 ○大西 智也¹, Tran Quoc Thinh¹, 荒木 希和子², 久保 幹¹
 (立命館大院・生命科学,²滋賀県大・環境科学)
- 10:30 4E03-11 新規なシグナルペプチドを利用した、植物における組換えタンパク質の分泌生産
 ○山本 佳奈¹, 梶浦 裕之^{2,3}, 三崎 亮^{2,3}, 藤山 和仁^{2,3}
 (大阪大院・工,²阪大・生工国際セ,³阪大・先導的学際研機構)

F 会場 (9:45~10:30)

【生物化学工学／培養工学／バイオプロセス】

- 9:45 4F02-01 無血清で作成した肝臓様三次元組織との共培養による筋芽細胞の無血清培養
 ○新井 世望¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科,²金沢大・新学術)
- 9:45 4F02-02 動物細胞培養のための可食性マイクロキャリアの作成
 ○坂本 竜朗¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科,²金沢大・新学術)
- 9:45 4F02-03 線維化コラーゲン微粒子を用いる間葉系幹細胞の軟骨分化促進
 ○佐野 文香, 山田 真澄, 関 実, 鶴頭 理恵 (千葉大院・融合理工)
- 9:45 4F02-04 Human umbilical vein endothelial cell behavior on Gelatin-Ph/HA-Ph composite hydrogel obtained via hydrogen peroxide mediated crosslinking and degradation
 ○Kelum Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, Wildan Mubarak, Ikki Horiguchi, Masaru Kojima, Shinji Sakai
 (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
- 9:45 4F02-05 新規生産宿主細胞 CHL-YN 細胞を用いたグルタミンフリー培養におけるアンモニア濃度への影響
 ○古藤 隆衣¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 有島 凛太郎¹, 古賀 雄一^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (大阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構)

- 9:45 4F02-06 光独立栄養微生物を原料とした動物細胞培養用の基礎培地の作製
..... ○若林 壮吾¹, 仁宮 一章² (¹金沢大院・自科,²金沢大・新学術)
- 9:45 4F02-07 抗体生産宿主として有用性の示された高染色体数を持つ CHO 細胞株の特徴解析とその高生産性を示す要因の解明
..... ○山崎 雅大¹, 中西 悠人¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
(¹阪大院・工,²阪大・OTRI)
- 9:45 4F02-08 トレハロース添加がもたらす抗体機能への影響と宿主 CHO 細胞の応答
..... ○中野 美貴子, 三崎 亮, 新 勇介, 梶浦 裕之, 藤山 和仁 (阪大・生工国際セ)
- 9:45 4F02-09 画像解析に基づいたポリビニルアルコールゲル上における神経幹/前駆細胞の移動能の評価
..... ○前田 結衣, 森 英樹, 原 正之 (大阪公大院・理)
- 9:45 4F02-10 ヒアルロン酸誘導体を活用した間葉系幹細胞の免疫機能制御
..... ○小高 雄也, 穂山 太一, 濱崎 奈津香, 田村 彰彦, 村松 和明 (電機大院・理工)
- 9:45 4F02-11 CHL-YN 細胞の重力沈降型小型灌流培養
..... ○國田 紘夢¹, Sukwattananipaat Puriwat¹, 古賀 雄一^{1,2}, 山野-足立 範子^{1,3}, 大政 健史^{1,3}
(¹阪大院・工,²岡山理大・工,³阪大・OTRI)
- 9:45 4F02-12 糖鎖成分群毎の抗体分取を可能とするアルカリ安定化 Fc 受容体固定化分離剤の開発
..... ○谷口 直優, 早川 勇太, 寺尾 陽介 (東ソー)
- 9:45 4F02-13 微細孔を有する金属製メッシュと沈降分離を併用した浮遊懸濁細胞の分離技術の開発
..... ○嘉悦 勇太¹, 谷原 健吾¹, 今井 健太², 近藤 孝志², 長森 英二¹
(¹大阪工大・生命工,²村田製作所)

F 会場 (11:15~12:00)

【バイオプロセス/培養工学/生物化学工学】

- 11:15 4F04-01 細胞培養プロセスにおける光計測によるリアルタイムモニタリング技術の検証
..... ○小林 航, 山中 洋昭, 末綱 彩花, 木村 一雅, 下田 聡一郎 (横河電機)
- 11:15 4F04-02 ノイズフリーな光子検出器で実現する微弱光の共焦点ライブセルイメージング
..... ○岡野 千草¹, 佐野 千佳歩², 熊谷 彩純³, 堀江 千紘², 衛藤 雄二郎^{4,5},
丹羽 一樹⁶, 福田 大治^{5,6}, 野村 暢彦^{1,7}, 八幡 稜^{1,7}
(¹筑波大・生命環境系,²筑波大院・生命地球科学研究群,³筑波大・生命環境学群,⁴京大院・工,
⁵産総研・東大オペランド計測 OIL,⁶産総研,⁷筑波大・微生物サステイナビリティ研究セ)
- 11:15 4F04-03 栄養源の投入制御による培養の高い再現性と品質安定化の実現
..... ○末綱 彩花, 山中 洋昭, 小林 航, 木村 一雅, 下田 聡一郎 (横河電機)
- 11:15 4F04-04 濾過分離における細胞の圧縮性の変化に関する研究
..... ○田中 孝明, 渋谷 裕紀, 民部 裕洋, 落合 秋人 (新潟大)
- 11:15 4F04-05 ラボスケール高度制御培養トレンドをスケールアップ培養で再現する手法の開発
..... ○木村 一雅, 小林 航, 山中 洋昭, 末綱 彩花, 下田 聡一郎 (横河電機)
- 11:15 4F04-06 簡便な好気-嫌気共培養法の開発
..... ○梅原 嘉宏¹, 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P,²筑波大・生命環境系)
- 11:15 4F04-07 模擬微小重力が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用 (第3報)
..... ○高津 あゆみ¹, 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P,²筑波大院・生命環境系)
- 11:15 4F04-08 ヒト消化管ストレスに耐性を有するプロバイオティクスの新規な評価・選抜・取得法の開発
..... ○小澤 拓真¹, 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P,²筑波大・生命環境系)
- 11:15 4F04-09 食品添加物が腸内細菌やモデル複合系に及ぼす影響の解析 (第2報)
..... ○芦沢 紘希¹, 青柳 秀紀^{1,2} (¹筑波大院・生物資源科学学位 P,²筑波大・生命環境系)

- 11:15 4F04-10 マンナンが乳酸菌の食物繊維への接着に及ぼす影響
○鄭 清¹, 赤川 夏月¹, 清水 咲弥², 山崎 思乃^{1,2}, 片倉 啓雄^{1,2}
 (¹ 関西大院・理工, ² 関西大・化生工)
- 11:15 4F04-11 焼成多孔性シリカゲルによる 可食性タンパク質加水分解物からの 生理活性ペプチドの探索と分離
 清水 翔太, 松永 裕太, 羽川 瞳, 秋山 裕和, 清水 一憲, ○本多 裕之
 (名大院・工)
- 11:15 4F04-12 Low Endotoxin Recovery を解消したエンドトキシン測定法の開発と利用
 川崎 芳美¹, ○今村 百花², 青柳 秀紀^{1,2,3}
 (¹ 筑波大院・生物資源科学学位 P, ² 筑波大・生物資源, ³ 筑波大・生命環境系)

G 会場 (9:00~9:45)

【ペプチド工学】

- 9:00 4G01-01 がん免疫療法への応用を目指した新規 PD-1/PD-L1 間相互作用阻害ペプチドの SELEX 法による開発
 ○安東 丈洋¹, Vedi Santhana¹, 佐藤 将¹, 高守 幸男¹,
 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-02 ヒト iPS 細胞の未分化増殖を可能にする新規人工ペプチド化合物の開発
 ○佐藤 将¹, 大貫 喜嗣¹, 升井 伸治¹, 川上 隆史^{1,2}, 黒澤 尋¹
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-03 新規小分子結合ペプチドタグの開発と生細胞内タンパク質イメージングおよびノックダウンへの
 応用
 ○山本 美月¹, 安東 丈洋¹, 高守 幸男¹, Vedi Santhana¹,
 佐藤 将¹, 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 川上 隆史^{1,2}
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-04 血管新生阻害への応用を目指した新規 VEGF/VEGFR2 間相互作用阻害ペプチドの SELEX 法による
 開発
 ○横山 匠¹, 安東 丈洋¹, Vedi Santhana¹, 佐藤 将¹,
 高守 幸男¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-05 がん治療への応用を目指した新規ペプチド阻害剤の SELEX 法による開発
 ○高守 幸男¹, 佐藤 将¹, 安東 丈洋¹, Vedi Santhana¹,
 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-06 自己免疫疾患治療への応用を目指した新規ペプチド阻害剤の SELEX 法による開発
 ○富士 大輔¹, 安東 丈洋¹, Vedi Santhana¹, 佐藤 将¹,
 高守 幸男¹, 横山 匠¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
 (¹ 山梨大院・医工農, ² JST・さきがけ)
- 9:00 4G01-07 Development of functional unnatural cyclic peptides by PURE system, genetic code expansion and mRNA
 display
 ○Santhana Vedi¹, Takehiro Ando¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹, Takumi Yokoyama¹,
 Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
 (¹ Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ² PRESTO, JST)
- 9:00 4G01-08 アフィニティーペプチドカラムを用いたエクソソームの大量精製技術の開発
 ○眞崎 加奈子, 石田 丈典, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 池田 丈, 黒田 章夫
 (広島大院・統合生命科学)

- 9:00 4G01-09 ペプチドによる金粒子のバイオナノミネラリゼーションと触媒活性評価
 ○桐木 友花, 田中 祐圭, 大河内 美奈 (東工大・物質理工)

G 会場 (10:30~11:15)

【ペプチド工学／脂質工学／糖鎖工学】

- 10:30 4G03-01 MSKIK ペプチドタグによる翻訳停止の解除・阻止
 ○加藤 晃代, 西河 佑馬, 古川 裕貴, 中野 秀雄 (名大院・生命農学)
- 10:30 4G03-02 大腸菌の外膜タンパク質 OmpW を利用した表層ディスプレイ法の開発
 ○西田 行希, 尾島 由紘, 東 雅之 (大阪公大院・工)
- 10:30 4G03-03 黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌に対する選択的抗菌活性に及ぼす脂肪酸の炭素数と二重結合数の影響
 ○永尾 寿浩¹, 吉井 未貴¹, 田中 重光¹, 菊川 寛史², 鈴木 徹³
 (¹大阪技術研, ²静岡県・食栄, ³岐阜大院・自然科技)
- 10:30 4G03-04 リポソームの膜ダイナミクスによる界面活性剤刺激性評価
 ○中谷 祐将¹, 伊藤 太一¹, 下川 直史¹, 萬代 由莉恵²,
 安 鋼², 高瀬 修一², 辻野 義雄^{1,3}, 高木 昌宏^{1,3}
 (¹北陸先端大・マテリアル, ²コタ, ³神戸大院・科技イノベ)
- 10:30 4G03-05 *Weizmannia coagulans* SANK70258 由来メンブランベシクルの機能解析
 ○和田 佳湖¹, 久保 宏実², 山田 良一³, 片倉 啓雄^{1,2}, 山崎 思乃^{1,2}
 (¹関西大院・理工, ²関西大・化生工, ³三菱ケミカル)
- 10:30 4G03-06 次世代油脂製造技術の開発～微細藻類による EPA 高生産検討～
 ○石塚 匠, 尾崎 達郎, 和田 真由美, 齋藤 猛, 小山 伸吾 (花王)
- 10:30 4G03-07 Encapsulation of *Xenopus* egg extract into giant liposomes by phase-transfer of inverted emulsions
 ○Sho Takamori¹, Hisatoshi Mimura¹, Toshihisa Osaki¹, Tomo Kondo², Miyuki Shintomi³,
 Keishi Shintomi⁴, Miho Ohsugi², Shoji Takeuchi^{1,5,6}
 (¹Artificial Cell Membrane Systems Group, KISTEC, ²Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, ³Life Sci. Network, Univ. Tokyo, ⁴Chromosome Dynamics Lab., RIKEN, ⁵Grad. Info. Sci. and Technol., Univ. Tokyo, ⁶IIS, Univ. Tokyo)
- 10:30 4G03-08 大腸菌におけるアピゲニン-7-O-グルコシド生産向上を目指したグルコース転移酵素発現条件の検討
 ○小林 美稀¹, 石水 毅², 大橋 貴生¹ (¹摂南大院・理工, ²立命館大・生命科学)
- 10:30 4G03-09 アカテガニ由来脱皮関連キチナーゼの解析
 ○永倉 佑真, 三宅 克英 (名城大・理工)

ランチタイムセミナー

4C05-01 ベックマン・コールター株式会社

C 会場 (12:00~13:00)

4E05-01 バイオテック株式会社

E 会場 (12:00~13:00)

シンポジウム

A 会場 (13:30~15:30)

生物工学会英文誌 JBB のあゆみとこれから【本部企画・国際シンポジウム】

“JBB Special Symposium: History and Future of Journal of Bioscience and Bioengineering”

座長：小西 正朗

- 13:30 4A06-01 Introduction of JBB and its historical records
○Noriho Kamiya^{1,2} (¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²CFC, Kyushu Univ.)
 〈Editor-in-chief of JBB〉
 座長：清水 一憲
- 13:50 4A06-02 JBB, a treasured scientific journal for me
○Eiichiro Fukusaki^{1,2} (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)
 〈President of SBJ, the highest number of publications with high citations〉
 座長：神谷 典穂
- 14:05 4A06-03 JBB, A bridge for academic development and long-term friendship between BEST and SBJ
○Jo-Shu Chang^{1,2} (¹Tunghai University, ²National Cheng Kung University)
 〈President of BEST, Editorial board member (long-term contribution to JBB)〉
- 14:20 Break
 座長：神谷 典穂
- 14:30 4A06-04 New trend and development in Bioscience and Bioengineering
○Jingchun Tang (Nankai University)
 〈Recipient of the Young Asian Biotechnologist Prize in 2012,
 the author of the highly cited review in the last decade〉
- 14:45 4A06-05 Latest development of Microalgae Biorefinery
○Pau-Loke Show (University of Nottingham Malaysia)
 〈Recipient of the DaSilva Award in 2018, the author of the highly cited research papers〉
- 15:00 4A06-06 My memory of JBB
○Akira Ito (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
 〈Former Deputy Editor-in-chief, the author of the highly cited review〉
- 15:15 4A06-07 Panel Discussion
 Former EiCs (Profs. Junichi Kato and Masahiro Takagi),
 and scholars from abroad including KSBB president.

C 会場 (13:30~15:30)

産学連携シンポジウム (培養・計測)【本部企画】

- 13:30 はじめに
 今井 泰彦
 座長：児島 宏之
- 13:32 4C06-01 PUFA synthase を用いた多様な多価不飽和脂肪酸(PUFA)発酵生産法の開発
 ○氏原 哲朗 (協和発酵バイオ)
- 14:00 4C06-02 オリゴ糖が有するプレバイオティクス効果の分子基盤と応用展開
 ○片山 高嶺 (京大院・生命)
- 14:28 休憩

座長：今井 泰彦

- 14:32 4C06-03 発酵生産におけるトランスポーターの重要性
 ○福井 啓太 (味の素・バイオフィン研)
- 15:00 4C06-04 バイオコントロールとバイオインターフェイスをベースとした革新的微生物技術による起業
 ○堀 克敏 (名大院・工)
- 15:28 おわりに
 児島 宏之

C 会場 (16:00~18:00)

生物工学が拓く未培養微生物 (微生物ダークマター) の未来

- 16:00 はじめに
 堀之内 貴明
 座長：堀之内 貴明
- 16:03 4C07-01 複合的極限環境に生きる微生物の生存戦略から紐解く極限微生物の遺伝資源の潜在性
 ○鈴木 志野 (宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所)
- 16:28 4C07-02 生物種間ネットワークと微生物叢動態分析で難培養生物に挑む
 ○東樹 宏和 (京大・生態研)
 座長：青柳 秀紀
- 16:53 4C07-03 未知の微生物を"培養"して新たな生物機能を探る -未利用微生物遺伝子資源開拓と利活用に向けて-
 ○玉木 秀幸 (産総研・生物プロセス)
- 17:18 4C07-04 有用抗生物質探索源としての線虫マイクロバイオームの利用
 ○今井 優^{1,2} (1信州大・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研,
²ノースイースタン大・抗生物質発見セ)
 座長：堀之内 貴明, 青柳 秀紀
- 17:43 パネルディスカッション
- 17:58 おわりに
 青柳 秀紀

E 会場 (13:30~15:30)

バイオエコノミーに資するバイオ×デジタル融合型の次世代研究プラットフォームの創出

- 13:30 はじめに
 蓮沼 誠久
 座長：蓮沼 誠久
- 13:32 4E06-01 バイオとデジタルの融合によるバイオエコノミーの形成
 ○近藤 昭彦^{1,2} (1神戸大院・科技イノベ,²パッカス・バイオイノベーション)
- 13:51 4E06-02 人工代謝経路設計技術を利用した有用化合物の微生物による生産
 ○白井 智量 (理研・環境資源)
- 14:10 4E06-03 代謝知識のデジタル化技術の進展
 ○荒木 通啓^{1,2,3,4}
 (1医薬基盤研究所,²神戸大院・科技イノベ,³京大院・医,⁴循環器病研究セ)
- 14:29 休憩

座長：近藤 昭彦

- 14:31 4E06-04 機械学習を道先案内とした進化分子工学によるプロテインマイニング
..... ○梅津 光央^{1,2} (1東北大院・工,²理研・革新知能)
- 14:50 4E06-05 圧縮と分類のデジタル生物学
..... ○緒方 法親^{1,2,3} (1株式会社日本バイオデータ,²次世代バイオ医薬品製造技術研究組合,
³農工大)
- 15:09 4E06-06 バイオ DX によるスマートセル開発
..... ○蓮沼 誠久^{1,2,3} (1神戸大・先端バイオ工研セ,²神戸大院・科技イノベ,³理研・環境資源)
- 15:28 おわりに
..... 近藤 昭彦

E 会場 (16:00~18:00)

科学者の Well-being のための志向倫理【本部企画】

- 16:00 はじめに
..... 石井 正治
座長：石井 正治
- 16:05 4E07-01 Well-being を志向したエンジニア教育の試み
..... ○小林 幸人 (国立高等専門学校機構)
- 16:30 4E07-02 科学者の well-being のための志向倫理
..... ○片倉 啓雄 (関西大・化生工)
- 16:55 休憩
座長：片倉 啓雄
- 17:00 4E07-03 学生の主体性を育む仕掛けづくり
..... ○岡野 憲司 (関西大・化生工)
- 17:15 4E07-04 リベラルアーツ教育を通じた実践事例
..... ○池田 翼 (熊本高専)
座長：石井 正治
- 17:30 総合討論
..... 全講演者
- 17:55 おわりに
..... 片倉 啓雄

G 会場 (13:30~15:30)

最先端の代謝研究が解き明かす解糖系の深淵 —Otto Meyerhof ノーベル賞受賞 100 周年によせて—

座長：三浦 夏子

- 13:30 4G06-01 はじめに～解糖系：代謝研究の原点にして頂点
..... ○渡辺 大輔 (奈良先端大・バイオ)
- 13:40 4G06-02 質量分析インフォマティクスの研究開拓による代謝多様性の理解
..... ○津川 裕司^{1,2,3} (1農工大,²理研・環境資源,³理研・生命医科学)
- 14:02 4G06-03 細胞の代謝振動と共生動態
..... ○雨宮 隆 (横国大)

座長：渡辺 大輔

- 14:24 4G06-04 NMR解析を用いた解糖系酵素 PGK による解糖流量調節機構の解明
○八木 宏昌¹, 葛西 卓磨¹, Rioual Elisa¹, 池谷 鉄兵², 木川 隆則¹
 (¹理研・生命機能, ²都立大・理)
- 14:46 4G06-05 細胞質に蓄積したミトコンドリア代謝酵素によって引き起こされる異所性代謝ストレス
○中務 邦雄 (名市大院・理)
- 15:08 4G06-06 解糖系酵素が形成する細胞内集合体とその制御
○三浦 夏子 (大阪公立大院・農)

G 会場 (16:00~18:00)

グローバルバイオで達成するカーボンニュートラル

- 16:00 はじめに
 古賀 雄一
 座長：河原崎 泰昌
- 16:05 4G07-01 徳島バイオコミュニティ構想 香酸系柑橘を用いた地域活性
○中澤 慶久 (徳島大院・社会産理工)
 座長：古賀 雄一
- 16:30 4G07-02 バイオマイニング：～金属代謝微生物を活用したグローバル技術～
○沖部 奈緒子 (九大院・工)
- 16:55 休憩
- 17:00 4G07-03 カーボンニュートラル循環型酪農システム
○大久保 敬^{1,2} (¹阪大・高等共創研究院, ²阪大・先導的学際研機構)
 座長：仲嶋 翼
- 17:25 4G07-04 PHA系バイオプラスチックのライフサイクル実証
○長田 守弘 (公益財団法人京都高度技術研究所)
- おわりに
 古賀 雄一

10月17日(月)

創立100周年記念式典・授賞式(9:00～10:45)

創立100周年記念式典

会長挨拶・創立100周年記念事業について報告・来賓紹介

来賓挨拶・祝電披露

感謝状贈呈

功労会員等推戴・2022年度各賞授賞式

受賞講演(10:50～11:55)

〈生物工学功労賞〉

受賞者 日野 資弘(ヘリオス・神戸研究所)

生物工学会功労賞受賞にあたって

1S01-A1 p.71

〈生物工学賞〉

受賞者 近藤 昭彦(神戸大院・科技イノベ)

バイオ物質生産に資するスマートセル創出に向けた革新的アプローチ

1S01-A2 p.71

〈生物工学賞〉

受賞者 高木 昌宏(北陸先端大・マテリアル)

生命機能におけるバイオマテリアルの秩序形成に関する研究

1S01-A3 p.72

受賞講演 (13:10 ~ 15:05)

〈生物学功績賞〉

受賞者 上平 正道 (九大院・工)

機能細胞作製のためのセル・エンジニアリング技術の開発

1S02-A1 p. 72

〈生物学功績賞〉

受賞者 神谷 典穂^{1,2} (1 九大院・工, 2 九大・未来化セ)

酵素触媒架橋反応を利用した生体分子工学分野の開拓

1S02-A2 p. 73

〈生物学技術賞〉

受賞者 ○塚原 正俊¹, 山田 修², 高木 博史³, 外山 博英⁴

(¹ バイオジェット, ² 酒総研, ³ 奈良先端大・バイオ, ⁴ 琉球大・農)

微生物機能を活用した新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発

1S02-A3 p. 73

〈生物学奨励賞 (斎藤賞)〉

受賞者 ○Sastia Prama Putri^{1,2,3}

(¹ 阪大院・工, ² 阪大・先導的学際研機構, ³ 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所)

代謝工学および食品技術のためのメタボロミクスの新展開

1S03-A1 p. 74

〈生物学奨励賞 (照井賞)〉

受賞者 戸谷 吉博 (阪大院・情報)

光を利用したバイオプロセスの開発に関する研究

1S03-A2 p. 74

〈生物学奨励賞 (照井賞)〉

受賞者 中島 一紀 (北大院・工)

有機-無機界面に着目した複合バイオ材料の創製に関する生物化学工学的研究

1S03-A3 p. 75

シンポジウム (15:15 ~ 17:20)

創立 100 周年記念シンポジウム 生物学の未来 (2050 年) 第1回 【本部企画】

1S04 p. 75

1S01-A1 〈受賞講演（生物工学功労賞）〉

生物工学功労賞受賞にあたって

○日野 資弘
 (ヘリオス・神戸研究所)
 m.hino@healios.jp

藤沢薬品に入社以来、私は、微生物産物や動物細胞からの創薬及び工業化研究に従事してきた。若い頃はもっぱら学会を情報収集や研究発表の場としか捉えていなかったが、40代の半ばからアカデミアの先生や他業種の方との交流や学会の運営に携わる中で、産業界は学会に何を貢献できるのか、また、産業界は学会に何を期待するのかについて考えるようになった。

産業界からの学会への貢献では、第一に運営に関する資金面のサポートが重要な要素であるとは言うまでもない。特に記念大会における基金の積み立ては非常に重要であり、企業や団体の寄付が欠かせない。日本ではまだまだ寄付文化が定着しておらず、学会活動を円滑に進めるには課題がある。90周年事業において、業界からの寄付金の獲得では少しは貢献できたと思う。今回の記念大会開催において寄付をいただいた個人、団体の皆さんに感謝したい。また継続的な支援もお願いしたい。

産業界に期待される二つ目は、企業における製品化研究の成果を学会の場で公開し、バイオテクノロジーの応用例について考える機会を提供すること、さらには製品化のニーズや課題についてアカデミアに提案し、共同研究としてテーマ化することであろう。私は入社後の初めの20年余り、創薬研究部門に所属していた。当時は有望な種を見出すと、それだけでビジネス展開できる程度の認識しかなかった。今思うと恥ずかしいことである。創薬から工業化部門に異動後、改めて品質、生産性、コストの重要性を理解し、これらの課題解決は非常に困難であるが、チャレンジのしがいがあると理解した。特にビジネス展開を考える際に、これらの製品化におけるプロセス開発の課題をいかに解決するかが非常に重要である。このような経験を若い学生さんに伝え、製造技術開発の面白さや意義を理解してもらうことも産業界のメンバーの務めであると考え、シンポジウムやいくつかの大学の講義においてプロセス開発の話をしてきた。

醗酵創薬、工業化に始まり、バイオ医薬開発を経て、現在私は細胞医薬のプロセス開発に従事している。かなり異なる分野を渡ってきたと思われるかもしれないが、実はこれらの製造技術には基本の部分で共通する考え方があり、応用の上に成り立っている。参学連携、異文化交流の場といえる生物工学会は共通のバイオテクノロジー言語で異なる事象を議論し、新たな発想を得る場であり、それを学ぶ貴重な場である。今回の受賞にあたり、異業種交流の最たる場である生物工学会で学会活動を盛り上げるために少しでも貢献できたのなら、非常にうれしく思う。推薦していただいた先生、選考委員の先生方にお礼申し上げるとともに生物工学会の益々の繁栄を祈る。

On receiving the Meritorious Service Award of the Society for Biotechnology, Japan

○Motohiro Hino
 (Healios K.K., Kobe Research Institute)

Key words biopharmaceutical development, industry-academia cooperation

1S01-A2 〈受賞講演（生物工学賞）〉

バイオ物質生産に資するスマートセル創出に向けた革新的アプローチ

○近藤 昭彦
 (神戸大院・科技イノベ)
 akondo@kobe-u.ac.jp

演者は、1998年に博士学位を取得した後、九州工業大学で職を得て、コロイド工学の研究開発を行っていた。1995年に神戸大学に移動した後、生物工学に関する研究を行いたい思いから、微生物を活用した物質生産に関する取り組みを開始した。既に30年近い月日が流れている。この間、様々なプロジェクトに取り組んできた。当初は、バイオマスからのバイオ燃料生産に関する研究開発に注力してきた。大きな転機を迎えたのが、2008年に開始した、科学技術振興調整費・先端融合領域イノベーション創出拠点の形成事業「バイオプロダクション次世代農工連携拠点」(後に文部科学省事業)と、2012年に開始した、「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」(経済産業省事業)である。特に後者の事業においては、バイオものづくりを革新するために、Dry (計算科学的技術開発)とWet (バイオ技術開発)の融合をモットーに、二つの研究領域の研究者が一体となった研究開発が推進された。これは、世界的に見ても、先進的な取り組みであったが、当初は、両研究領域の研究者の言語や価値観が合わず、スムーズな研究開発が進められるようになるまでには時間を要した。この研究開発は、2016年からスタートした、大規模なスマートセルプロジェクト (NEDO 事業)「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発：高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」へと発展した。このスマートセルプロジェクトでは、代謝工学 (人工代謝経路設計等の Dry 技術) や合成生物学 (先進的なゲノム工学技術等の Wet 技術) における基盤開発と、それらの要素技術を統合したバイオファウンドリの開発、そしてこのバイオファウンドリ技術を活用しての様々な有用物質生産技術の開発が精力的に行われた。

合成生物学では構成要素に関する知見に基づいて、新しい生体の部品やシステムを設計して、これらを合成的に組み上げて得られた細胞等を解析してモデル化することで、普遍的な生命の仕組みを明らかにすることを目指す。これはまさに工学的なアプローチであり、新しい機能を持った分子や細胞を作り出すことに、速やかに応用展開できる。具体的には、新たな人工的代謝経路や人工酵素を設計する手法やプログラムの開発、遺伝子発現の On-Off を人工的に制御する多様な遺伝子スイッチを作り出す手法の開発、微生物への遺伝子導入やスクリーニングなどの自動化技術、ピンポイントなゲノム編集技術として、デアミナーゼ等の塩基編集酵素と dCas9 を連結した Base Editor システムの開発、枯草菌を活用して 10 万塩基以上の長鎖 DNA 合成を可能とするゲノム合成技術の開発、ハイスループットに代謝物等の解析を行う自動化システムの開発、等の多くの基盤開発を行った。

さらにこれらの基盤研究成果を統合することで、バイオファウンドリの構築を行った。バイオファウンドリでは、微生物の代謝経路や制御系を設計し「Design: D」、ロボティクスを活用して設計した微生物細胞を並列・迅速に作出し「Build: B」、構築した微生物の自動化機器によるハイスループット評価を行い「Test: T」、得られたデータを機械学習等に供してルール抽出を行い「Learn: L」、さらに設計を改善する。この DBTL サイクルを迅速に回すことで、目的物質を高生産するロバストな細胞「スマートセル」を迅速に構築することができる。さらに、この DBTL サイクルで得られるデータをシステム内に集積することで、データベースや知識ベースを構築していくことで、開発時間のさらなる短縮を図る。すなわち、バイオ×デジタル×ロボティクスの融合技術であり、こうした領域は、近年 Engineering Biology と呼ばれるようになった。今、バイオファウンドリ技術は、バイオエコノミーを牽引する技術基盤として、世界的に競争が激化している。世界では、バイオファウンドリが様々な研究機関で次々と構築され、バイオファウンドリのさらなる高度化とデータ集積が行われている。さらにバイオファウンドリ事業を展開するスタートアップ企業が生まれている。

演者らは、このバイオファウンドリを活用することで、スマートセル迅速開発によるバイオものづくりの実現に取り組んできた。特に、カーボンリサイクルによるカーボンニュートラル社会の実現を目指して多くの研究開発を行ってきた。具体的には、各種のバイオマス資源からの多様な化学品や素材、そしてバイオ燃料生産に関する実績を上げてきている。一方、バイオ医薬品分野においても、酵母 *Pichia pastoris* を活用した次世代抗体の迅速生産や、ヒト腸管モデルの開発とマイクロバイオーム制御に関する研究開発を推進している。この様に、バイオファウンドリにより、医療、エネルギー、物質生産分野の幅広い領域を、より持続可能かつ高度にすることが可能であり、日本の研究開発が世界をリードし続けることを願っている。

Innovative approaches to creating smart cells for bioproduction

○Akihiko Kondo
 (Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words synthetic biology, biofoundry, smart cells, bioproduction

1S01-A3 <受賞講演 (生物工学賞)>

生命機能におけるバイオマテリアルの秩序形成に関する研究

○高木 昌宏
(北陸先端大・マテリアル)
takagi@jaist.ac.jp

【「いかにして地球上に生命が誕生したのか?」を知りたくて、生物の分野を志した】

生物の特徴の一つに「階層性」つまり、分子、細胞、組織、個体が挙げられるが、それらを網羅して生物工学を中心に据えつつも、学問領域の枠を越えて、化学、物理学、数学等、幅広い分野と連携しつつ研究を行ってきた。発生、代謝、増殖、進化等、生命現象の背景には、常に秩序形成の謎が存在し、完全な理解には遠く及ばない。反面、分子生物学により種の障壁が取り除かれ、また物理学において散逸構造や自己組織化に対する理解が、数学において線形のみならず非線形への理解が進むにつれ、秩序形成の根底に共通した(フラクタルな)特徴があるという点で、生命現象とその進化を俯瞰的に理解する事ができつつあるのも事実である。我々は、タンパク質の構造形成、人工脂質膜相分離構造形成、膜ダイナミクスと細胞信号伝達、魚類発生過程等に関する研究に携わり、生命機能におけるバイオマテリアルの秩序形成について理解を深めたとともに、癌診断、遺伝子増幅、薬物送達、機能性化粧品開発等、多くの社会実装にも関わってきた。以下に、具体的な研究内容について紹介する。

【タンパク質の構造・機能相関】

遺伝子工学的手法と立体構造解析を組み合わせて、酵素機能をタンパク質工学、つまり構造と機能相関に基づいて計画的に改変する研究を中心に行ってきた。発表論文(Nature, 324, 695-697 (1986))は、戦略的な酵素熱安定性向上の計画を立案するための指針ともなる論文である。博士研究員としてカリフォルニア大学で、結晶性セルロース分解能力を示すセルロソームに関する研究に着手し、セルロース結合タンパク質(CbpA)の存在を明らかにした(PNAS, 89, 3483-3487 (1992))(J. Bacteriol. 175, 7119-7122 (1993))。

【超好熱菌由来耐熱酵素】

大阪大学にて独自に分離された超好熱菌由来の耐熱酵素に関して、熱安定酵素の工業利用(DNAポリメラーゼ:PCR用酵素)さらに、立体構造解析による触媒機能、熱安定性の原因解明を行った(Appl. Environ. Microbiol. 63, 4504-4510 (1997))。当該酵素は、実用化され東洋紡からKOD DNA polymeraseとして、世界中で広く遺伝子増幅酵素(PCR酵素)として利用されている。

【細胞研究】

耐熱性が高くL鎖のみで機能するユニークな抗体酵素をデザインし、また同抗体酵素の触媒メカニズムの解析を行った(FEBS Lett. 375, 273-276 (1995))。癌細胞特異的なモノクローナル抗体に関する論文(J. Ferment. Bioeng. 79,405-409 (1995))は生物工学賞・論文賞を受賞した。カドミウムの細胞毒性に関する研究も行い、酸化ストレスにより起こる細胞死のメカニズムを明らかにし、蛋白質質変性(アミロイド)、脂質膜ダイナミクス研究に繋がった。

【蛋白質質変性とその制御】

蛋白質の安定性を論じるには、正しい構造状態(ネイティブ状態)のみならず、変性状態を理解し構造転移を抑制する必要があると考えた。そこで、蛋白質変性過程(凝集、線維形成)に関する研究、さらには、アミノ酸等の小分子添加による変性抑制に関する研究を行った。アルギニンによる抑制効果についての研究やボリアミンやアミノ酸エステル誘導体による凝集抑制効果について発表し、診断薬開発会社と共同で特許も取得した。

【膜構造の多様な変化と細胞信号伝達】

細胞膜は、広範な生命現象に、エンドサイトーシスなど動的構造変化を介して関わっている。膜構造の動的な構造変化に膜ミクロドメイン(脂質ラフト)が重要な役割を担っていることを、従来のリポソームよりも大きい巨大リポソームを用いた試験管内実験で示した(J. Phys. Chem. B, 111, 10853-10857 (2007))。膜構造の変化を光によって制御したり(J. Am. Chem. Soc., 132, 10528-10532 (2012))、モデル膜とアミロイドβとの相互作用に関する研究(Soft Matter, 8, 2816-2819 (2012))など、タンパク質研究と膜研究の融合分野を生物・物理・数学の境界領域として確立しつつある。さらに、実際に生きた細胞を使って、免疫活性化過程における脂質ラフトの動きを観察し、膜ダイナミクスと細胞信号伝達との関係性を明らかにした(J. Biosci. Bioeng., 124, 685-693 (2017))。その知見を角膜細胞における薬物送達システムへと発展・実用化(ライオン・スマイル目薬)させている(Colloids Surf. B-Biointerf., 169, 444-452 (2018))。

【モデル生物としてのゼブラフィッシュ】

個体レベルの研究も行ってきた。ゼブラフィッシュ胚の発生過程は、個体レベルの研究のモデル系として優れている。カルシウムに反応するタンパク質「カメレオン」をゼブラフィッシュに導入し、発生過程における細胞内カルシウムイオンのモニタリングを行った(Zebrafish, 4, 253-260 (2007))。さらにヒトの遺伝子と相同性のあるゼブラフィッシュ dax 遺伝子の発生過程における役割を解析した結果については、生物工学賞・英文誌にて報告した(J. Biosci. Bioeng., 113, 683-638 (2012))。

【受賞に際して】

御指導下さった先生方、諸先輩、さらに研究を支えてくれたスタッフ、学生の皆さんに、この場を借りてお礼申し上げます。そして学会活動で出会った皆さんは、私の人生の宝物です。

Research on order formation of materials in biological functions

○Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words membrane lipids, signal transduction, protein folding

1S02-A1 <受賞講演 (生物工学功績賞)>

機能細胞作製のためのセル・エンジニアリング技術の開発

○上平 正道
(九大院・工)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

これまで動物細胞を対象として、遺伝子、細胞、組織・臓器、個体を扱いながら、機能細胞作製のためのセル・エンジニアリング技術の開発を行い、バイオ医薬品や細胞医薬品生産への適用のために研究を行っている。例えば、合成生物学的アプローチにより遺伝子回路を設計・作製し、細胞に導入することで新たな機能を発揮する細胞を作製し、抗体などのバイオ医薬品生産、細胞センサーとしての利用や遺伝子治療システムの開発を行った。また、動物細胞への遺伝子導入技術として、ウイルスベクター、非ウイルスベクターの双方から技術開発を行っており、レトロウイルスベクターに染色体への組込みにおける配列指向性を付与したハイブリッドウイルスベクターの開発や、組換え酵素を活用した配列特異的な遺伝子集積技術の開発を行い、これらの技術が実際にバイオ医薬品を生産する生産細胞構築に利用できることを証明した。また生体バイオリアクターによるバイオ医薬品生産技術として、トランスジェニック(TG)ニワトリ作製技術を開発し、抗体などの医薬品となりうるタンパク質を卵中に生産するニワトリの作製を行った。

1. 機能細胞・組織作製技術の開発

組織を構築するための細胞大量培養技術、細胞機能を引き出すための遺伝子的な改変、機能的な組織を作製するための細胞パターンニング、3次元組織構築、ES/iPS細胞の未分化維持や機能細胞への分化に関する技術開発を行った。また、合成生物学的アプローチにより作製した人工遺伝子回路を細胞に導入することによって、バイオ医薬品生産、人工臓器、細胞センサーに利用可能な細胞の作製を行っている。例として、ヘパトマ細胞に、肝機能発現に必要な8種類の肝特異的転写因子の遺伝子を誘導型の遺伝子発現システムとして導入することで、誘導の有無によって増殖と肝機能発現を切換え可能な細胞株の取得に成功し、この細胞が薬剤スクリーニングや人工肝臓システム構築において有用であることを示した。また、環境応答型の人工遺伝子回路として、磁場/温熱誘導型、DNA傷害誘導型、低酸素誘導型遺伝子発現システムの開発を行い、細胞センサーや遺伝子治療システム、機能化された組織作製への応用を示した。

2. 遺伝子導入技術の開発

バイオ医薬品生産細胞構築、遺伝子治療、トランスジェニック動物作製のための基盤技術として、ウイルスベクター、非ウイルスベクターの双方から技術開発を行ってきた。レトロウイルスベクターの機能改変では、エンベロープタンパク質を改変したキメラエンベロープにより細胞指向性の制御が行えることを示し、さらに、インテグラーゼ欠損レトロウイルスベクターに、ゲノム組込みのためのシステムとしてCre-loxPシステムやアデノ随伴ウイルスのRepを組込むことによって部位特異性を付与したハイブリッドウイルスベクターを開発した。さらにCre酵素をウイルスベクター粒子内に包摂した遺伝子ターゲティングウイルスベクターの開発を行っている。また、細胞染色体特定部位への遺伝子導入技術として、組換え酵素Creを用いて、目的の遺伝子発現ユニットを染色体に多重化して組み込む、逐次遺伝子組込システム(AGIS)と名付けた染色体上での遺伝子集積技術の開発を行い、バイオ医薬品生産細胞構築に利用できることを示した。この遺伝子導入技術の汎用性を示すために、核ゲノムへの遺伝子導入・発現が困難な微細藻類クラミドモナスへ適用した。また、レトロトランスポソンのベクター化について検討を行い、LINE-1をベースとするベクターを開発した。

3. TGニワトリ作製技術の開発

鶏卵の高いタンパク質生産性に早くから着目し、ニワトリを生体バイオリアクターとして用いるために必要な技術開発を行っており、卵の中に組換えタンパク質を大量に生産するためのTGニワトリ作製技術を開発した。独自に胚培養技術を開発し、劇的に孵化率を向上させることができるようになり、さらに完全な人工容器による孵化までの胚発生にまで成功した。ヒトの遺伝子治療に使われていたレトロウイルスベクターを用いて、導入遺伝子を高効率に子に伝播可能な方法を開発した。TGニワトリの活用例として、組換え抗体やエリスロポエチンを生産するTGニワトリの作製を行った。この方法では、血清や卵白中で数g/Lの生産がみられ、導入遺伝子は子孫への伝播も可能であった。さらに、食べる医薬品として、スギ花粉症の治療のためにスギ花粉エピトープペプチドを卵白中に生産するニワトリの作製を行い、花粉症モデルマウスを使った食餌実験により効果があることを示した。近年は、ニワトリでの染色体操作技術の開発を行っており、先述のCre-loxPを利用した特定遺伝子座への遺伝子ノックイン技術を確立している。

Development of cell engineering technology for the production of functional animal cells

○Masamichi Kamihira
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

Key words animal cell biotechnology, cell engineering, synthetic biology, genetic engineering

1S02-A2 〈受賞講演（生物工学功績賞）〉

酵素触媒架橋反応を利用した生体分子工学分野の開拓

○神谷 典穂^{1,2}¹九大院・工,²九大・未来化セ)

kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

温和な反応条件下、多様な化学反応を高い選択性をもって加速する酵素は、生命活動の維持に必須の生体触媒分子である。その高度な触媒機能の活用は、バイオテクノロジーに関連する幅広い産業分野において、持続可能なものづくりの実現の鍵を握っている。演者は、有機化学と生物工学を融合した新たな生体分子工学分野の開拓を目指し、異種分子を架橋する酵素反応に基づく研究開発を進めてきた。

1. 非水溶媒を利用する酵素反応場の設計

通常、酵素の機能発現の場は水系である。一方、反応場の水系から非水系への移行は、基質の溶解性の改善や、加水分解反応の平衡の合成方向へのシフトなど、新たな酵素機能発現の場を提供し得る。演者は、非水系生体触媒プロセスの構築において、Water-in-Oil 型エマルションの内水相を複合酵素反応場として利用できることを示した[1]。また、水、有機溶媒に続く第三の溶媒としてイオン液体に着目し、結晶性セルロースの溶解能とセルラーゼの機能発現を両立可能な親水性イオン液体を見出し、その溶媒系バイオマスの前処理と酵素糖化を同一反応場で行う方法を提案した[2]。

2. 酵素触媒架橋反応を利用した生体分子工学

水系での翻訳後修飾酵素による共有結合形成反応は、ATP 等の高エネルギー結合を介する場合が多い。演者は、補因子を必要とせずに架橋反応を触媒する酵素として、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に注目した。MTG は、短いペプチドタグ間の架橋反応を効率良く触媒する。従って、基質となるペプチド配列のペアを、目的分子と、導入対象分子の双方にそれぞれタグとして導入することで、多様な分子をタグ選択的（部位特異的）に連結可能となる。このシンプルなアイデアに基づき、様々な生体分子を組み合わせたバイオコンジュゲートの設計・創出が可能であることを示した。例えば、酵素と核酸をピンポイントで架橋する技術に基づき、組織切片上の微量核酸 (mRNA) 検出用の新規プローブ分子の設計 [3] や、DNA アプタマーと酵素の連結によるバイオアッセイ系の構築 [4] に成功した。現在、脂質修飾タンパク質の新規調製法 [5] を活用し、抗真菌キチナーゼ製剤の開発 [6] や、人工パルミトイル化タンパク質の細胞膜上での局在と内化に関する基礎研究 [7] へと展開している。

3. 酵素触媒架橋反応のバイオマテリアル分野への展開

MTG とは異なる反応様式で架橋形成を触媒する酵素として、西洋わさびペロキシダーゼ (HRP) に着目した。HRP は、組換えタンパク質に導入したペプチドタグ末端に存在するチロシン残基を認識可能であり、その反応生成物としてタンパク質ポリマーを与えることが明らかとなった [8]。さらに、末端に SH 基を有する高分子基材と HRP を組み合わせた、外部からの過酸化水素の添加を必要とせずにハイドロゲル形成が進行することを見出した [9]。この偶然の発見は、現在、細胞培養のためのハイドロゲルの調製法として、基礎研究分野で広く活用されている [10]。

非水溶媒中での生体触媒の利用から始まった演者の研究は、今、改めてバイオ界面・異相界面を舞台にした酵素反応・タンパク質機能の理解と活用へと進んでいる。同時に、応用から基礎を生み出す研究への想いを強くしている。末筆になりましたが、これまでに薫陶を賜った全ての先生方、産学官の共同研究者の皆様、切磋琢磨した先輩・同輩・後輩・学生諸君、そして家族に、心より感謝を申し上げます。また、博士後期課程在籍時より、研究発表の場と、多くの出会いの機会を与えて頂いた本会ならびにご関係の皆様へ厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

1. Michizoe, J. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 99, 12-17.
2. Kamiya, N. et al., *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30, 1037-1040.
3. Kitaoka, M. et al., *Anal. Chem.*, 2012, 84, 5885-5891.
4. Takahara, M. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2013, 116, 660-665.
5. Takahara, M. et al., *Chem. Eur. J.*, 2019, 25, 7315-7321.
6. Santos, P. et al., *ACS Infect. Dis.*, 2022, 8, 1051-1061.
7. Uchida, K. et al., *Langmuir*, 2022, 10.1021/acs.langmuir.2c01205.
8. Minamihata, K. et al., *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 74-81.
9. Moriyama, K. et al., *Chem. Commun.*, 2014, 50, 5895-5898.
10. Ramadhan, W. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2020, 130, 416-423.

Exploring the potential of bond-forming enzymes in biomolecular engineering

○Norihito Kamiya^{1,2}¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²CFC, Kyushu Univ.)

Key words enzyme reaction, cross-linking, hydrogel, lipid

1S02-A3 〈受賞講演（生物工学技術賞）〉

微生物機能を活用した新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発

○塚原 正俊¹, 山田 修², 高木 博史³, 外山 博英⁴¹バイオジェット,²酒総研,³奈良先端大・バイオ,⁴琉球大・農) tsuka@biojet.jp

沖縄県の伝統的蒸留酒「泡盛」は、第二次世界大戦の激しい地上戦により、ほとんどの酒造所が壊滅的な被害を受け、各酒造所に存在していた醸造微生物の多くも失われた。その後、先人たちの努力により泡盛は沖縄を代表する特産品となったものの、現在まで、泡盛醸造に用いることができる微生物の選択肢は乏しく、泡盛酒造所は限られた菌株を用いて泡盛醸造を行っている状況にある。我々は、これまでに泡盛醸造に影響するそれぞれの微生物を解析・活用し、新たな風味を有する泡盛醸造技術の開発を目指した取り組みを行ってきた。特に泡盛醸造で重要な黒麹菌、酵母、およびもろみ中の常在乳酸菌を対象とした基盤研究によりそれぞれ成果を得るとともに、それらを用いて新たな風味を有する複数の泡盛開発につなげた。

○黒麹菌

泡盛醸造に用いられている黒麹菌実用株はアワモリ株、サイトイ株の2株には限定されているものの、これらの株同士の関係性や近縁種内での黒麹菌の系統的位置などは不明であった。そこで、まず、複数遺伝子の配列を用いた解析により、近縁種内での黒麹菌の位置づけを明らかにするとともに、黒麹菌を学名 *Aspergillus luchuensis* として再整理を行い、安全性を担保する情報を得た¹⁾。さらに、*A. luchuensis* の株間の関係性を明らかにするため、全ゲノム情報から得られる変異を用いた詳細な系統解析法を確立した²⁾³⁾。本法は、(1)ゲノム全体の領域を対象としている、(2)出現頻度および解析の精度が高いSNVを対象としている、(3)比較するデータサイズが小さく迅速な解析が可能、などの特徴を持ち、有種株の親子関係の評価が可能な感度・精度を有する。本法により、*A. luchuensis* は主な2グループ (A, SK) とこれら以外の側鎖の株に分かれること、泡盛実用株の2株はAおよびSKグループのそれぞれに属すること、本格焼酎の白麹菌はSKグループに含まれることなど黒麹菌の種内の系統関係の詳細が明らかとなった²⁾。これらの成果を応用することで、従来の黒麹菌株と系統的に離れた新たな泡盛黒麹菌株を選抜し、さらに新たな泡盛の商品化を進めている。また、本法は詳細な系統関係を評価する手法として高精度かつ迅速で優位性が高く、酵母などを対象とした解析に利用可能である³⁾。

○酵母

沖縄の自然界から新たに複数の *Saccharomyces cerevisiae* を採取し、前述の全ゲノム情報を用いた系統解析法により *S. cerevisiae* 内での詳細な系統的位置を解析した。これらの株のうちいくつかについては、泡盛醸造への応用を進め、古酒香関連成分のパニリンを増強した泡盛の開発などにつなげている。一方、従来の泡盛酵母やハイビスカス花から分離した酵母を親株として、ロイシンを高生産する泡盛酵母株の育種を行い、ロイシン高生産に関与する LEU4 遺伝子の変異部位と高生産機構を明らかにした⁴⁾⁵⁾。さらに、これらの育種株を用いて吟醸香成分の一つである酢酸イソアミル含量が増加した泡盛を商品化した。

○乳酸菌

酒造所の泡盛もろみに含まれる乳酸菌について、泡盛古酒香成分への関与を解析した。複数の泡盛酒造所のもろみに含まれる微生物を評価したところ、古酒香成分パニリンの前駆体である4-ビニルグアヤコール (4-VG) を生成する微生物の存在を見出し、そのうちの1つが *Lactococcus lactis* であること、この *L. lactis* をもろみに添加することで実際に4-VG濃度が上昇することを確認した⁴⁾。これらの結果から、泡盛のもろみに生息する常在微生物が泡盛風味の生成に関与していることを示した。現在、当該技術を応用した新たな泡盛醸造技術の確立を進めている。

以上のように、我々は複数の泡盛醸造微生物に関して基盤研究の成果を得るとともに、これらを実際の泡盛醸造に応用することで複数の商品開発につなげることができた。今後も、泡盛をはじめとする発酵食品や地域資源について基盤研究に取り組み、得られた成果を実用化することで産業振興に貢献したいと考えている。

【参考文献】

- 1) O. Yamada et al., Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 3, 233-237, 2011
- 2) 塚原正俊ら、全ゲノム情報を用いた黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の系統解析、日本醸造協会誌、117、6、413-421、2022
- 3) T. Abe et al., Characterization of a New *Saccharomyces cerevisiae* Isolated from Hibiscus Flower and Its Mutant with L-Leucine Accumulation for Awamori Brewing, *Front. Genet.*, 28, 490, 2019
- 4) H. Takagi et al., Isolation and characterization of awamori yeast mutants with L-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 2, 140-147, 2015 2016 年日本生物工学会「第24回生物工学論文賞」
- 5) 塚原正俊ら、泡盛の醸造過程における4-ビニルグアヤコール生成に及ぼす乳酸菌の影響、日本醸造協会誌 (印刷中)

Development of awamori brewing technology with new flavor utilizing microbial functions

○Masatoshi Tsukahara¹, Osamu Yamada², Hiroshi Takagi³, Hirohide Toyama⁴¹Biojet, ²NRIB, ³Grad. Sch. Biol. Sci., NAIIST, ⁴Fac. Agric., Univ. Ryukyus)Key words Awamori, *Aspergillus luchuensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, lactic acid bacteria

1S03-A1 <受賞講演 (生物工学奨励賞 (齋藤賞))>

代謝工学および食品技術のためのメタボロミクスの新展開

○Sastia Prama Putri^{1,2,3}¹阪大院・工, ²阪大・先進的学際研機構, ³大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所)

sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

代謝物の包括的な解析法であるメタボロミクスは、様々な生物の表現型の特徴と強く相関していることが知られている。これまでメタボロミクスは、主に医学分野や生物システムの基礎研究分野で注目されてきた一方で、生物の表現型の改良といった工学分野への応用は限られていた。これは、包括的な分析結果や官能試験結果を、生物工学分野に応用するための知見に乏しかったためである。また、経済的に重要な農産物や水産物の品質改良を目的としたメタボロミクス研究は、先進国で一般的に見られる食品に関する報告がほとんどであり、熱帯農産物、水産物、発酵食品における品質改良を目指したメタボロミクスの応用はほとんど報告されていなかった。演者らは、メタボロミクスを微生物代謝工学と食品工学の二つの新たな分野に応用することを目指した。それぞれ、有用物質生産菌の生産性改良や、東南アジア由来の熱帯バイオ産物の品質改良及び高級食品の品質鑑定に貢献することを狙いとしている。*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus licheniformis*, *Synechococcus elongatus* などの多くのモデル生物を使用して、微生物の包括的なメタボロミクスプラットフォームを構築した。このプラットフォームを用いて、新規代謝経路の同定、微生物生産に重要な定量的形質の解明、有用代謝産物（バイオ燃料、抗生物質および化学原料など）の生産性向上につながる標的遺伝子の効率的な探索などをおこない、さらに、以下の食品を対象として、GC/MS および LC/MS を用いた包括的な代謝産物解析と、官能分析を用いた食品機能の定量解析を実施した。a) スペシャルティコーヒー、b) ファインカカオ、c) トロピカルフルーツ（マンゴスチン、マンゴー、バナナ、パイナップル）、d) エビ、e) 発酵大豆食品テンペ、f) 薬用植物。

その結果、世界で最も高価なコーヒーの一つであるコビルワクの認証方法を初めて確立したとともに、マンゴスチンやその他のトロピカルフルーツ、テンペ、種々の薬用植物に関する代謝産物解析を世界で初めて報告することができた。これらの研究成果は、食品産業および農業分野にフィードバックすることにより、食品の品質改良や貯蔵期間の延長、収穫後の作業工程の改良、作物の損失を最小限に抑えることなどに、貢献できると考えている。食品や農業の業界に貴重なフィードバックを与えるとともに、有用化合物の生産ホストとして微生物を扱うバイオ産業にも、有用な知見をもたらすことができると考えている。

Novel applications of metabolomics for metabolic engineering and food technology

○Sastia Prama Putri^{1,2,3}¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.)

Key words metabolic analysis, metabolic engineering, food technology, metabolomics

1S03-A2 <受賞講演 (生物工学奨励賞 (照井賞))>

光を利用したバイオペロセスの開発に関する研究

○戸谷 吉博

(阪大院・情報)

ytoya@ist.osaka-u.ac.jp

持続可能な社会の実現に向けて、微生物を利用した有用物質の生産プロセスの効率化が求められている。原料から目的物質への変換を高効率化するには、反応経路における代謝の流れ、すなわちフラックス分布を目的物質の生産に適した状態に最適化することが求められる。これまでフラックスの調節方法として、培養液に誘導剤を添加することで標的酵素発現を誘導する方法が用いられてきた。しかし、一度培養液に加えた薬剤は除去できないためフラックスの微調整が難しいという欠点がある。培養環境は時々刻々と変化するため、代謝を最適な状態に制御するにはアクセラとブレーキを兼ね備えた可逆的に働くスイッチが必要であった。本研究では、大腸菌の中枢代謝経路のフラックス分布が有用物質の生産性に及ぼす影響を明らかにし、リアクタ中の細胞のフラックス分布を自在に制御するために、光を入力シグナルやエネルギー源として利用する微生物発酵プロセス技術について研究を実施した。本研究は、(1)代謝システムの設計と解析、(2)光照射によって代謝を制御する技術の開発、(3)細胞を理想状態に近づけるためのプロセスの開発から構成されている。

(1)代謝システムの設計と解析：代謝を有用物質生産に最適化するには、フラックス分布をどう変化させれば生産性が向上するか明らかにすることが重要である。代謝経路の数理モデルを利用して、理想的なフラックス分布を予測することや、目的物質の生成に必要な補酵素の供給に関係する反応を特定することが可能になっている。例えば、燃料となるイソプレノイド化合物の前駆体であるメバロン酸の生産では、解糖系 (EMP) と酸化的ペントースリン酸 (OPP) 経路のフラックス比がメバロン酸の収率に影響することを予測し、このフラックス比と収率の関係を実験的に評価した。このように、理想的な生産を行うには分岐経路のフラックス比を最適値に制御する必要がある。また、経路全体のフラックスを調節するには、制御に有効な律速反応に注目して改変することが必要である。粗酵素液を利用して試験管内で経路を駆動し、取得した代謝物濃度の時系列から一連の経路の各反応の V_{max} を推定し、経路全体の反応速度に影響を及ぼす律速反応の同定をする方法を開発した。

(2)光照射によって代謝を制御する技術の開発：理想的な代謝状態が決まったら、それを目指して実際の細胞のフラックス分布を制御する手法が必要である。シアノバクテリア由来の CcaS/CcaR という二成分制御系を利用した可逆的に働く光誘導の代謝スイッチを開発した。このスイッチでは、緑色光を当てると *cpcG2* プロモータ下流の遺伝子発現が促進され、赤色光を当てると *cpcG2* プロモータ下流の遺伝子発現が抑制される。本研究では、EMP と OPP 経路のフラックス比を光照射によって制御するため、*cpcG2* プロモータ下でグルコース 6 リン酸イソメラーゼ (PGI) を発現させた。期待通り、緑色光下では PGI の発現が誘導されるため EMP 経路のフラックスが高く、赤色光下では発現が抑制されるため競合する OPP 経路のフラックスが増えることが確認された。また、光をエネルギー源に利用して代謝反応を駆動する新しい技術も開発した。ATP は代謝経路の様々な反応を駆動するための重要な補酵素である。大腸菌などの従属栄養微生物では、原料を異化する過程で ATP を生産しており、好気条件ではクエン酸 (TCA) 回路を介した呼吸鎖電子伝達によって ATP の大部分が賄われている。しかし、TCA 回路からは炭素が CO_2 として失われてしまうため、目的物質収率が低くなる要因である。そこで、高度好塩菌が有するロドプシンに着目し、光エネルギーを利用して細胞内のプロトン細胞外にくみ出し、生み出されたプロトン濃度勾配によって ATP を生み出すことで、 CO_2 排出なしに ATP を供給できる仕組みを大腸菌に実装した。実際に、生合成に ATP を消費する 3-ヒドロキシプロピオン酸の生産について、光照射によって生産量が増加したことを実証した。

(3)細胞を理想状態に近づけるためのプロセスの開発：培養プロセスを安定に制御するには、リアクタ中の細胞の代謝状態を監視し、理想状態に近づけるように細胞に働きかけることが必要である。そこで、蛍光タンパク質を利用して細胞内代謝を可視化するセンサーの開発した。また、リアクタ中の培養液の蛍光強度をモニタリングする装置を構築し、検出した蛍光強度を指標として、培養プロセスを安定制御する方法を開発し、実証した。

リアクタ中の代謝状態をモニタリングし、目的物質生産にとっての理想状態と比較することでフラックスをどのように変化させるか判断する。さらに、LED によるリアクタへの光照射を操作することで代謝スイッチを働かせ代謝を理想状態に近づけることができるであろう。

Development of microbial fermentation process using light

○Yoshihiro Toya

(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, optogenetics, metabolic flux, *Escherichia coli*

1S03-A3 〈受賞講演（生物工学奨励賞（照井賞））〉

有機-無機界面に着目した複合バイオ材料の創製に関する生物化学工学的研究

○中島 一紀
(北大院・工)

k.naka@eng.hokudai.ac.jp

我々の研究グループでは、有機-無機界面に着目した複合バイオ材料の創製に関する一連の研究を行ってきた。本講演ではその中から下記[A]~[C]に示す研究を紹介する。

[A] バイオミネラルを利用したバイオセメント技術：

建造物・インフラの建設で固化材料として用いられるセメントの製造プロセスでは、大量のCO₂が放出されており、低CO₂排出・低環境負荷の革新的なセメント・固化技術の開発が求められている。自然界では、生物機能が関与した鉱物（バイオミネラル）や固化反応が多く見られる。ウレアーゼは尿素を加水分解してHCO₃⁻とNH₄⁺を生成する酵素であり、その反応系中にCa²⁺イオンが存在するとCaCO₃が析出し、そのCaCO₃がセメント物質となり様々な材料を固化することができる。このような固化技術は「バイオセメント」と呼ばれており、環境負荷の少ないグリーンな次世代固化技術として期待されている。

我々は、海浜から高ウレアーゼ活性を示す *Pararhodobacter* sp. SO1 株を単離し、バイオセメントでの利用を指向して機能解析を行った。*Pararhodobacter* sp. は15日間以上も高いウレアーゼ活性を保持しており、バイオセメントの現場施工において有用な菌株であることが示された。また、バイオセメント技術を用い、重金属（Pb, Zn）汚染土壌の封じ込めについても取り組んでおり、原位置での低エネルギー・低環境負荷の重金属処理法を提案した。その場合、微生物は現地由来のものが望ましいため、重金属土壌汚染が深刻化しているザンビアの廃鉱山からPb耐性を示すウレアーゼ産生菌を単離し、その機能解析を行った。単離菌体はPbを含む培地中でも高い増殖力を示し、高い固化能力や細胞外多糖による重金属吸着能力を有することを明らかにした。

一方、バイオミネラル（甲殻類の外骨格、真珠、骨）では、無機物と有機物のハイブリッド材料を形成することによって、剛性（変形しづらさ）と粘性（粘り強さ）という機械的強度を獲得している。そこで、バイオセメントにおける有機物の複合化を検討した。カチオン性高分子であるポリリジンを添加した系ではフットボール型の結晶に変化することが確認され、同様にカチオン性の天然多糖であるキトサンを添加した系では砂の固化強度が増大した。さらに、バイオセメントにキチンを導入し、キチンとCaCO₃の接着タンパク質をデザイン・添加することで、剛性と粘性を兼ねそろえた強化型バイオセメント材料となることを見出し出している。

[B] カイメン動物由来のシリカ重合酵素：

無機-有機-バイオハイブリッド材料は、電子デバイス、エネルギー関連、バイオメディカルなど様々な分野においてその応用が期待されている先端材料の一つである。特に、チタニアなどの半導体とのハイブリッド材料は、光応答性バイオマテリアルへの展開が可能である。しかし、通常、無機物へ生体分子を固定化する際にはその機能が大きく失活するという問題があった。シリカ重合酵素（シリカチン）は、カイメン動物のガラス骨格中に存在し、温和な条件（常温・常圧・中性pH）でシリカ（SiO₂）やチタニア（TiO₂）の合成を行うことが可能な酵素である。シリカチンは機能性無機材料の作製ツールとして期待されているが、水溶液中で多量体を形成し、凝集・不溶化するという問題点がある。我々はタンパク質融合技術により、シリカチンを可溶化した状態で長期間安定に存在させることに成功した。これによりシリカチンの応用範囲が大きく拡大されると期待される。さらに、固体有機マトリックスに結合するタンパク質を介して可溶性シリカチンを選択的に固定化し、その場でシリカを *in situ* 合成することにより無機-有機ハイブリッド材料を作製する新たな手法を開発した。

[C] 完全バイオベースの金属回収材料：

レアメタルや貴金属は、電子・通信・情報、化学工業、エネルギー、医療など様々な産業に不可欠な元素群であり、電子機器類などの都市鉱山からの有価金属の分離・回収技術は我が国の資源戦略としても極めて重要な意味をもつ。水溶液中からの有価金属イオンの回収では主にイオン交換樹脂による吸着が用いられるが、金属イオンに対する選択性は高くない。また、イオン交換樹脂は石油化学ベースの合成樹脂であり、SDGsの観点からも今後低環境負荷・資源循環型の材料開発が求められる。

我々は、セルロースとペプチド/タンパク質のみからなる完全バイオベースの新規金属イオン回収材料を開発した。金属結合部位として、様々な金属結合ペプチド/タンパク質を用いることができ、有価金属や有害重金属イオンを水溶液中からの効率的に回収可能であった。この吸着材料は、融合タンパク質の分子デザインを変更することで様々な機能を付与することができるため、重金属汚染水の浄化や食品加工分野での有害金属の除去、金属応答性バイオマテリアルの創製など、資源・環境・食品・バイオメディカルなど様々な分野へ応用にも取り組んでいる。

Biochemical engineering for the fabrication of biohybrid materials focusing on organic-inorganic interface

○Kazunori Nakashima
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biomineralization, enzyme reaction, bioremediation

1S04-01 日本生物工学会の100年の振り返り（歴史に学び未来に活かす）

○福崎 英一郎^{1,2}

(大阪院・工,²阪大・先導的学際研機構)

fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

日本生物工学会創立100周年を記念し、学会成長の節目となった出来事を当時の会長とともに振り返るとともに、未来の日本生物工学会の進むべき方向、あるべき姿について議論したい。

Reflections on 100 years of the Society for Biotechnology, Japan (Learning from history and applying it to the future)

○Eiichiro Fukusaki^{1,2}

(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words metabolomics, metabolome analysis, foodloss, food function

1S04-02 メタボロミクスの食品フレーバー解析への応用

○福崎 英一郎^{1,2}

(¹阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

代謝物総体情報（メタボローム）を説明変数としてより下流のマクロ表現型を定量的に解析するメタボリックフィンガープリンティング（代謝指紋解析）は、生体のダイナミックな変動の表現方法として極めて有用である。メタボリックフィンガープリンティングは他のオーム情報（ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム他）を必要としないことも大きな特長である。運用の範囲は広く、例えば、実験動物の発生段階はメタボロームを説明変数として正確に予測することができる。我々はこれまで、ゼブラフィッシュ、線虫、ショウジョウバエ等を実験材料として初期発生胚の発声段階を正確に予測することに成功している。さらに発生段階に重要な役割を担うバイオマーカー探索への可能性を提示している。発生段階をモニタリングできるという性能は、臨床検体（血液、尿等）をサンプルとして疾患の種類と病状レベルを推定することにもつながる。当該技術は疾患バイオマーカー探索や、疾患の早期診断システム開発への応用も期待できる。メタボリックフィンガープリンティングの技術の応用範囲は広く、有用物質生産微生物の菌株改良にも頻用されており、多くの成果があがっている。

さらに、メタボリックフィンガープリンティングは、運用対象は生体に限定されない。当該手法を食品に適用することにより、これまで困難だった複雑な食品機能の記述が可能となり種々の応用展開が期待できる。食品は、多成分から構成される多機能コモディティであり、どの成分がどの機能に関与しているかを限定することは極めて困難である。関与化合物間に相乗効果が存在することから、現在の解析技術では全容解明は至難と言わざるを得ない。これは、近代科学の常とう手段である要素還元科学の適用が必ずしも有効ではないことを示している。一般にはボトムアップの要素還元科学的アプローチで特定された成分によって食品の機能が再構成されることは稀であり、要素還元科学に依らないトップダウンアプローチが求められることは自明である。メタボロームを説明変数とすることにより、従来のケモメトリクスの手法で達成されるパターン認識による食品機能評価の回帰予測モデルの構築は当然のことながら、加えて、多変量解析により食品機能と食品成分の間の相関が可視化できる可能性がある。当該相関情報の有効活用はひいては、食品産業における生産、収穫後処理、加工、保管、流通のすべてのプロセスの最適化に資する知見が得られることが期待できる。上記の前置きの上で、メタボロミクス技術を用いた食品機能解析への応用について事例を踏まえながら言及したい。

Application of metabolomics to food flavor analysis

○Eiichiro Fukusaki^{1,2}

(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words metabolomics, metabolome analysis, food function, foodloss

1S04-03 ロボティックバイオロジーによる生命科学の加速—研究室の自律化と科学的発見の自動化に向けて—

○高橋 恒一^{1,2,3}

(¹理研・生命機能,²慶應大,³阪大)
ktakahashi@riken.jp

ロボティック・バイオロジー（ロボットによる生命科学実験の自動化）は、生命科学全体を加速させる。実現すれば、日々単純作業に時間を費やさざるを得ない多くの研究者を解放し、再現性の危機や研究不正の問題が解決するだけでなく、これまでに手が届かなかったような新たな科学的発見を触発し、研究現場における生産性が飛躍的に向上するだろう。

我々は実験室全体を一つのロボットとして捉え、人間の指示のもと自律的に実験を中心とした研究を遂行する未来を構想している。従来の自動化技術では、個別の実験操作自体は自動化できても、実験プロトコルを俯瞰すればいまだに人が機器と機器の間を「つなぐ」役割から解放されておらず、実験全体を自律化する際のボトルネックとなっている。このような問題を解決するため、我々はJST 未来社会創造事業において、ロボット実験センターのプロトタイプینگ・ラボを整備し、異種のロボットや実験機器を相互に連携させるネットワークシステムや分散並列スケジューリング技術、さらに実験プロトコル共通記述言語の開発を行っている。2030年の将来に向けて「実験を物理・化学過程のプログラミングとして再定義する」ことを目指している。

ロボティックバイオロジーは高精度で均一な品質を保ったバイオデータベースを従来に比べて極めて短時間に構築するための超並列ロボット実験技術と捉えることも出来る。AIと組み合わせることで研究作業自体のより包括的な自動化の契機となるであろう。我々のプロジェクトでは、既にロボットによるiPS細胞の単独自律培養に成功し、さらに網膜色素上皮(RPE)細胞の分化誘導操作の最適条件をAIロボットに自律的に発見させることに成功している。

さらに先の将来を見通せば、実験室の自律化はAI分野における21世紀のグランドチャレンジである「科学研究の自動化」に向けた一歩と捉えることも出来る。実験室を身体と考えれば、その頭脳となるAIと接続することにより実験の遂行や実験計画だけではなく研究の立案や法則性の発見、さらには仮説生成までも含めたより大きなサイクルでの研究の自動化を構想することが出来る。このようないわゆる「AI駆動型科学」の実現に向けた世界的な動向についても紹介する。

Accelerating life sciences by robotic biology

○Koichi Takahashi^{1,2,3}

(¹BDR, RIKEN, ²Keio University, ³Osaka University)

Key words AI-driven science, robotic biology

1S04-04 ビール商品開発設計者を支援する「醸造匠 AI」の開発

○岡田 理志¹, 福沢 周平¹, 柴垣 和広², 成 承炫², 板倉 豊和²,
大勝 信秀¹

(¹キリンホールディングス, ²三菱総合研究所)

Satoshi_Okada@kirin.co.jp

消費者の嗜好が多様化する中、日本市場においてもクラフトビールを中心に多種多様な商品が上市されており、ビール会社はお客様のニーズに合わせ、迅速に質の高い新商品を開発していくことが求められる。キリングループでは1980年台に、ビールの試験醸造を行うパイロットプラントを開設し、2000年頃から試験醸造レシピのデータベース化を進め、技術者が過去のデータを検索できるようにしてきた。

一般的にビールの新商品開発では、コンセプトが策定された後、求められる仕様に合わせて、試験醸造を繰り返し、原料の配合や工程条件等を細かく定めながらレシピの作成を進める。ビール醸造は仕込から発酵、熟成、濾過を経て製品が造られるまで約2~4週間ほど時間を要するため、1回のトライアル&エラーに要する時間が長く、試行錯誤を繰り返す新商品開発には多くの時間を要する。また、試験醸造における試験設計業務は個人の能力（経験・アイデアなどを含む）への依存が高く、熟練技術者が過去に編み出したレシピや技術的な知見は既にデータベース化されていたものの、過去のデータを如何に活用するかは担当する技術者によりバラつきがあり、商品開発の期間や効率に大きな影響を与えていた。このため、新商品開発における熟練技術者と非熟練技術者のバラつきを低減するため、株式会社三菱総合研究所と協働して、技術者を支援する人工知能「醸造匠 AI」の開発に着手した。

「醸造匠 AI」には技術者を支援する機能として、「分析値予測機能」・「レシピ探索機能」の2つ機能を構築・実装した。「分析値予測機能」では機械学習を用いて、試験醸造条件から麦汁および製品の化学分析値を予測できるモデルを構築・搭載した。また、「レシピ探索機能」では最適化手法を用いてレシピ探索を行うことにより、目標とする分析値からレシピを提案するプログラムを構築・搭載した。

本発表では「醸造匠 AI」開発の背景、「分析値予測機能」・「レシピ探索機能」の概要について紹介する。

Development of Takumi AI, an AI tool to support brewers in beer product development

○Satoshi Okada¹, Shuhei Fukuzawa¹, Kazuhiro Shibagak², Seunghyun Seong²,
Toyokazu Itakura², Nobuhide Ohkatsu¹

(¹Kirin Holdings Co., Ltd., ²Mitsubishi Research Institute, Inc.)

Key words Product development, Beer brewing, Machine learning, Optimization methods

10月18日 (火)

受賞講演 (8:45 ~ 9:00)

〈生物工学若手賞〉

受賞者 大城 麦人 (九大院・農)

乳酸菌研究の異分野融合と複合微生物工学アプローチ 2A01-A1 p. 81

〈生物工学若手賞〉

受賞者 相馬 悠希 (九大院・農)

合成生物学を駆使した代謝工学研究の展開 2C01-A1 p. 81

一般講演 (9:00 ~ 12:00)

酵素学, 酵素工学/タンパク質工学	2A01	p. 82
酵素学, 酵素工学	2A03	p. 85
分類, 系統, 遺伝学/遺伝子工学	2B02	p. 88
遺伝子工学	2B04	p. 91
発酵生理学, 発酵工学/代謝工学	2C01	p. 93
代謝工学/発酵生理学, 発酵工学/オミクス解析	2C03	p. 96
醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学	2D02, 2D04	p. 99, 102
環境浄化, 修復, 保全技術	2E01	p. 105
環境浄化, 修復, 保全技術/環境工学, 廃水処理技術	2E03	p. 108
培養工学/生物化学工学/バイオプロセス	2F02	p. 111
バイオプロセス/生物化学工学	2F04	p. 114
生体医用工学/セル&ティッシュエンジニアリング	2G01	p. 117
セル&ティッシュエンジニアリング	2G03	p. 120

シンポジウム (13:30 ~ 15:30 / 16:00 ~ 18:00)

若手とシニアで語る生物工学の未来 【本部企画・生物工学若手研究者の集い】	2A06	p. 123
若手研究者のこれからの「活躍の場」を語ろう 【本部企画・生物工学若手研究者の集い】	2A07	p. 126
未来産業の創造に向けた産学官連携プラットフォーム 【本部企画】	2C06	p. 129
生体分子の相互作用における曖昧さの意義	2C07	p. 131
先端バイオ分析の新潮流	2E06	p. 133
高度に生体を模倣した細胞培養技術 「Microphysiological System (MPS)」が拓く未来社会	2E07	p. 136
持続発展可能な未来社会を創造するバイオプラスチックの最前線	2G06	p. 139
光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究	2G07	p. 141

2A01-A1 〈受賞講演（生物工学若手賞）〉

乳酸菌研究の異分野融合と複合微生物工学アプローチ

○大城 麦人
(九大院・農)
oshiro@agr.kyushu-u.ac.jp

乳酸菌は糖を発酵して多量の乳酸を生産する細菌であり、古くから人類に恩恵をもたらしてきた。米や大豆を分解して甘味や旨味を作る麹菌や、アルコール発酵を行う酵母ほど目立たないかもしれないが、乳酸菌はこれら微生物と複合的に発酵食品の製造に関わる。近年はヒト腸内フローラと健康との関係の解明が進み、腸管免疫系や腸内細菌叢に働きかけるなどの乳酸菌の機能がプロバイオティクス食品などに活かされている。食品だけでなく、農畜産分野では乳酸菌が飼料作物の発酵（サイレージ）に寄与することがよく知られる。乳酸菌は乳酸の製造においても重要であり、発酵生産された乳酸は、医薬品、皮革の脱尻剤などの原料素材に使われている。さらに、生分解性プラスチックの素材であるL体の乳酸を光学異性体選択的に生産する乳酸菌が存在し、L-乳酸発酵は持続可能な開発目標(SDGs)の達成に貢献する発酵技術である。このように多方面の産業に貢献している乳酸菌と乳酸発酵のさらなる発展を目指し、演者は発酵工学に他学問のアプローチを積極的に取り入れ研究を行ってきた。以下に概要を示す。

1. キシロースからのL-乳酸発酵の動的代謝モデル化と律速代謝経路の理論的推定¹⁾

未利用バイオマスの構成糖キシロースから取率良くL-乳酸を生産する乳酸菌 *Lactococcus lactis* IO-1 のL-乳酸発酵をさらに向上させるため、分子育種などによるIO-1株の代謝制御が望まれていた。しかし、IO-1株のキシロース代謝経路は他乳酸菌の経路よりも複雑であり、L-乳酸発酵の律速となる代謝反応を絞り込めなかった。そこで演者は、バイオインフォマティクスの分野で研究が進んでいた代謝のモデル化手法を取り入れた。発酵形式の基本型といえる回分発酵には、擬定常状態を仮定した静的代謝モデルではなく、時間変化する代謝物挙動を記述する動的代謝モデルが適する。Okamoto, Sekiguchi らが開発した代謝シミュレーター WinBEST-KIT (<http://www.winbest-kit.org/>)を用いて、IO-1株のキシロース代謝21反応の各速度式をミカエリスメンテン型速度式で表現し、広範基質濃度(キシロース: 20.3-57.8 g/L)に対応するL-乳酸回分発酵の動的代謝モデルを構築した。そして、構築モデルを用いた感度解析により、L-乳酸発酵の律速となる代謝経路を理論的に推定した。律速と推定された代謝経路の酵素活性を実際に測定し、現実のL-乳酸高生産に重要であることを示し、構築モデルの妥当性を裏付けた。本研究は、乳酸菌の分子育種などを行う際に、標的とする代謝酵素遺伝子をウェット実験に頼らずとも推定する方法となり得る。

2. パン種自然発酵の複合微生物研究

自然発酵パン種(sourdough)は紀元前から続く伝統的なパン種である。自然共生した多様な乳酸菌と酵母の複合微生物系で発酵し、継代により維持される。sourdoughで発酵したパンは複雑な風味を有し、日本を含む世界で一定の人気があるが、安定した継代が難しく、パンの品質が変動しやすい課題がある。この解決には、sourdoughの継代発酵の実態を理解し、さらには、複合微生物発酵を制御する理論の確立が求められる。演者はまず、sourdoughの継代過程における微生物叢と発酵代謝物の実態解明を目指した。微生物生態学分野の研究で用いられていた16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を複合発酵のモニタリングに活用し、2ヶ月にわたる sourdough の変遷を追跡し、乳酸菌叢が3段階で規則的に変遷すること(乳酸菌リレー)を観察・実証した^{2,3)}。乳酸菌リレーに伴って乳酸濃度が上昇し、その他発酵代謝物も菌叢に連動して変化したことから、sourdoughの菌叢を制御することが発酵管理に重要と考えられた。次に、sourdoughの複合微生物発酵の理論を確立するには菌叢変遷のメカニズム解明が必要と考え、sourdough菌叢を *in vitro* 培養することにより、実環境で検証が困難であった pH 因子とリレー進行の関係の一端を示した。また、sourdoughの乳酸菌と酵母の安定的共生に両者の糖への親和性が重要であることなどを *in vitro* 培養系での検証によって示した。このように実環境の緻密な観察と *in vitro* 培養実験による検証を両輪にしたアプローチにより、難解な複合微生物発酵の理論確立に挑戦している。

以上、演者は乳酸菌を対象に単一微生物系から複合微生物系までを範疇とした発酵工学を基盤とする異分野融合研究(情報工学、代謝工学、微生物生態学、食品微生物学など)を進めている。今後は、特に上記2.の研究を進展させ、生物工学会が牽引する新たな学問「複合微生物工学」(複合微生物バイオプロセスを工業、農業、環境、医薬等への応用を目指す学問)の創成に寄与したい。

【参考文献】

- 1) Oshiro, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 376 (2009).
- 2) Oshiro, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 128, 170 (2019).
- 3) Oshiro, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, 131, 333 (2021).

Multidisciplinary study in lactic acid bacteria with an approach of complex microbial engineering

○Mugihito Oshiro
(Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words lactic acid bacteria, fermentation, kinetic modeling, microbial community

2C01-A1 〈受賞講演（生物工学若手賞）〉

合成生物学を駆使した代謝工学研究の展開

○相馬 悠希
(九大院・農)
soma@brs.kyushu-u.ac.jp

この度は第1回生物工学若手賞を受賞させて頂き、身に余る光栄と存じます。恩師の九州大学花井泰三先生、岡本正宏先生をはじめ、今日まで多大な励ましとご指導を頂いた日本生物工学会の先生方、共に研究に取り組んで頂いた皆様に心から感謝申し上げます。受賞の対象となった研究について、以下にその概要を示します。

合成生物学分野では、機能既知の生体分子を任意に組み合わせることで新たな機能性を持つ多くの新規生体分子システムの創出が進められてきた。筆者は大腸菌をモデル微生物として新規代謝経路や代謝制御機構を構築し、微生物バイオプロセスの効率化に資する代謝工学研究に取り組んできた。微生物によるバイオプロセスを用いた再生可能資源から有用化合物生産は、持続可能な社会づくりに向けてその実現が望まれている。代謝工学の分野では、内在性代謝反応の亢進・抑制・欠損などを通じて宿主本来の代謝経路によって生産可能な有用目的代謝物の生産性向上および副産物の削減のための方法論が開発されてきた。ただし、化石資源由来で供給されている多用途化合物の生産を、自然界に存在する微生物の育種だけ実現するのは困難であり、標的化合物種の拡大が不可欠である。合成生物学分野では、異種生物由来の遺伝子を組み合わせる人工的に再構築された「人工代謝経路」を用いることで、宿主が本来は生産できない様々な有用化合物の生産を可能とした。ただし、様々な有用化合物において十分な生産性を達成できておらず、生産性の向上が課題となっている。

人工代謝経路の多くは、解糖系やTCA回路などの内在性代謝中間代謝物を起点として構築されている。これらは、目的生産物の前駆体であるとともに、菌体増殖に重要な代謝物でもあるため、物質生産経路と菌体増殖が競合し、これが生産性の低下の要因となっている。目的生産物の生産性は、菌体当たりの生産量と菌体量の両方に依存するため、生産性の向上には十分な菌体量を確保しながら、この競合関係を解消する必要がある。このためには、十分な菌体増殖の後に、菌体増殖への寄与度の大きいTCA回路への代謝流束を遮断し、物質生産経路への代謝流束を増強するのが望ましい。

これを実現するために筆者は、同じく合成生物学分野で開発されてきた「人工遺伝子回路」に着目した。人工遺伝子回路は、遺伝子発現制御を担うプロモーター・転写調節因子・細胞間シグナル分子などを任意に組み合わせることで再構築される遺伝子発現制御要素である。筆者らは、当時、最も解析が進んでいるが生物工学的応用がなされていなかった「遺伝子トグルスイッチ」を大腸菌のフラコ培養系で安定稼働させ、バイオプロダクションに応用することに成功した(1)。

これにより、人工遺伝子回路を用いて代謝流束を制御することで大腸菌の表現型を「増殖型」から「物質生産型」に可塑的に制御し、バイオ燃料・バイオプラスチック原料・医薬品前駆体など、様々な生産系で生産性の向上を達成した(1-3)。また、微生物の有する細胞間コミュニケーション機構であるクオラムセンシングを人為的に再設計・再構成することで、こういった表現型の切り替えを微生物自身によって自律的に実行させることにも成功した(4,5)。一方で、人工遺伝子回路による代謝動態制御は、標的代謝経路のみならず様々な代謝物の細胞内蓄積や糖質化性の向上など、内在性代謝に対する予期せぬ副次的な影響を生じる。我々は、この様な「設計外」の影響についてメタボローム解析によって精査することで、望ましくない副次的効果を解消し、さらなる生産性向上を達成する新たな回路設計へのフィードバックを試みている(5,6)。

標的化合物種の拡大と生産性の向上とともに、バイオマスの効率的な糖化プロセスの実現も望まれている。筆者らは、神戸大学近藤昭彦教授との共同研究により、人工代謝経路と細胞表層工学を融合することで、リグノセロース系バイオマス由来の難消化性オリゴ糖を原料とした大腸菌によるバイオ燃料の生産に世界で初めて成功した(7)。さらに、酒醸造における平行複発酵を模して糖化と発酵生産のプロセスを異なる2種の大腸菌株に役割分担させた共培養系を構築し、人工クオラムセンシングを介して協調的に糖化・発酵プロセスを進行させることに成功した(8)。このようなボトムアップ再構築型の「人工合成細菌」の設計と応用は近年、代謝工学分野において大きな注目を集めている。以上のように、筆者は多様な合成生物学ツールの開発と機能統合に取り組んできた。これらの成果を基盤として、今後も合成生物学を駆使した生物工学研究のさらなる発展を目指している。

1. Y. Soma *et al.*, *Metab Eng* 23 (2014), 175-184.
2. Y. Soma *et al.*, *Metab Eng* 43 (2017), 54-63.
3. Y. Soma *et al.*, *JBB* 133(1), (2022), 56-63.
4. Y. Soma and T. Hanai, *Metab Eng* 30 (2015), 7-15.
5. Y. Soma *et al.*, *ACS Synth Biol* 10(6) (2021), 1384-1393.
6. Y. Soma *et al.*, *JBB* 123(5), (2017), 625-633.
7. Y. Soma *et al.*, *JBB* 133(1), (2022), 46-55.
8. Y. Soma *et al.*, *JBB* 114(1), (2012), 80-85.
9. H. Honjo *et al.*, *Metab Eng* 55 (2019), 268-275.

Study on synthetic biology for metabolic engineering

○Yuki Soma
(Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words metabolic engineering, synthetic biology, fermentation

2A01-01 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有する 2-phosphoglycolate 代謝関連遺伝子群の解析

○道盛 裕太, 井崎 力久, 三輪 有哉, 濱北 宗太郎, 下坂 天洋, 牧野 勇樹, 竹野 領, 佐藤 喬章, 別府 春樹, 金井 保, 跡見 晴幸 (京大院・工)
atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

Calvin-Benson-Bassham (CBB) 回路を利用する独立栄養生物の多くは、ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の oxygenase 活性によって生成する 2-phosphoglycolate (2-PG) の蓄積を防ぐ代謝経路を有している。例として、光呼吸における glycolate 経路や、glycerate 経路といった 2-PG 代謝経路が知られている。従来、これらの 2-PG 代謝は酸素発生型光合成の進化に伴って出現したと考えられてきた。一方我々は、現存する生物の中でも始原的なグループに属するとされる超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において、Type III Rubisco の存在と、そのペントースビスリン酸経路における生理的役割について報告した。*T. kodakarensis* は絶対嫌気性菌であるものの微好気条件下でも生育可能なことが知られており、細胞内における 2-PG 蓄積を防ぐ何らかのシステムを有していると考えられる。しかし本菌のように Rubisco を利用するものの CBB 回路を持たない生物における 2-PG 代謝経路は、これまでに報告例がなかった。そこで既知の光呼吸経路を参考に、*T. kodakarensis* における 2-PG phosphatase, glycolate dehydrogenase, alanine:glyoxylate aminotransferase, glycine cleavage system, phosphoserine aminotransferase をそれぞれ探索し、各候補遺伝子およびタンパク質を遺伝学的、および生化学的に解析、同定した。既報の酵素遺伝子と併せると、*T. kodakarensis* には光呼吸における経路に類似した新規な 2-PG 代謝経路の存在が示唆され、本経路が酸素発生型光合成システム、あるいは CBB 回路の進化とは独立に出現した可能性が示された。

Analysis of 2-phosphoglycolate metabolism in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*

○Yuta Michimori, Rikihisa Izaki, Yuya Miwa, Sotaro Hamakita, Takahiro Shimosaka, Yuki Makino, Ryo Takeno, Takaaki Sato, Haruki Beppu, Tamotsu Kanai, Haruyuki Atomi (Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words archaea, thermophile, RubisCO, metabolism

2A01-02 高度好塩菌 *Halomicrobium mukohataei* の MazF の機能解析

○中田 健太, 山口 良弘 (大阪大院・理)
yyamaguchi@omu.ac.jp

Toxin-antitoxin (TA) system は、ほぼ全ての原核生物に存在し、ストレス条件下での生存に重要と考えられている。TA system は、自身に毒性を示す toxin と、その毒性を中和する antitoxin によって構成されている。*mazE-mazF* TA system は細菌や古細菌に広く保存されており、toxin である MazF は特定の配列で RNA を切断する RNA 分解酵素である。現在、3、4、5 および 7 塩基を認識する MazF が同定されている。MazF の配列特異的な RNA 切断は、HIV などの RNA ウイルス治療などに応用可能であるが、実現のためには既知の MazF の認識配列は多様性に欠ける。

そこで我々は、新規切断配列を有する MazF を探索し、MazF (MazF-hm) を高度好塩菌 *Halomicrobium mukohataei* に見出した。*mazF-hm* の上流には、antitoxin (MazE-hm) として機能し、*mazF-hm* とオペロンを形成すると考えられる ORF が存在した。MazF-hm を大腸菌内で発現させた結果、誘導後 90 分で大腸菌の生育が阻害された。しかし、MazF-hm および上流 ORF を共発現させると、生育は阻害されなかった。よって、MazF-hm は toxin として機能し、MazE-hm と TA system を構成することが示された。次に *in vitro* で MazF-hm の RNA 分解活性を解析した。その結果、MazF-hm は活性に 50 mM 以上の NaCl を要求し、3 M NaCl 存在下で最も強い活性を示した。一般的に MazF の活性は NaCl によって阻害される。好塩古細菌である *Haloquadratum walsbyi* の MazF も、400 mM 以上の NaCl 存在下で活性は阻害されることから、MazF-hm は高濃度の NaCl 存在下で活性を示す新規 MazF であった。また、MazE-hm の添加により、MazF-hm の RNA 分解活性は阻害された。次に、MazF-hm の切断配列の同定を試みた。その結果、MazF-hm は 5 塩基を認識することが示唆された。

Identification and characterization of MazF homologue in halophilic archaea, *Halomicrobium mukohataei*

○Kenta Nakada, Yoshihiro Yamaguchi (Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words MazF, toxicity, ribonuclease

2A01-03 白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来新規 Flavoprotein monooxygenase の機能解析

○早坂 実夏, 森 玲香, 鈴木 裕満, 加藤 雅士, 志水 元亨 (名城大院・農)
moshimi@meijo-u.ac.jp

【研究背景】

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* は、難分解性樹木成分リグニンをリグニン分解酵素によって種々のリグニンフラグメントへと低分子化し、分解・資化する。*P. chrysosporium* が単独でリグニンを完全分解することは以前より知られているが、リグニンフラグメントの分解に関与する酵素についてはほとんど明らかとなっていない。代表的なリグニンフラグメントであるパニリン酸 (VA) は、脱炭酸・脱メトキシ化を経てトリヒドロキシベンゼンとなり環開裂されると推定されている。しかし、*P. chrysosporium* において、これまでに VA の変換に関与する酵素は同定されていない。40 年前に、*P. chrysosporium* の細胞破砕液に NADPH を添加すると VA を脱炭酸すると報告されたことから、VA の脱炭酸には補酵素として NADPH を用いる酵素が関与すると考えられた。NADPH 依存的に芳香族化合物を変換する酵素として Flavoprotein monooxygenase (FPMO) が知られている。そこで本研究では、*P. chrysosporium* 由来の FPMO をターゲットにリグニンフラグメントの脱炭酸を触媒する酵素の探索とその機能解析を行った。

【方法・結果】

P. chrysosporium のゲノム中には 59 種の FPMO 遺伝子が存在していた。その中から、リグニンフラグメントを基質にする可能性のある FPMO を選別し、種々のリグニンフラグメントと反応させその反応生成物を GC-MS にて分析した。PcFPMO8 は H-Unit, G-Unit, S-Unit それぞれのリグニンフラグメントである 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA), VA, シリンガ酸 (SA) 全てを脱炭酸した。これまでに 4-HBA, VA, SA の全てを脱炭酸できる FPMO は報告されておらず、本研究で初めて、H, G, S-Unit 全てのリグニンフラグメントの酸化的脱炭酸を触媒する PcFPMO8 が発見された。現在、PcFPMO8 の詳細な機能解析を進めている。

Functional Analysis of Novel Flavoprotein Monooxygenase from White-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○Mika Hayasaka, Reini Mori, Hiroimitsu Suzuki, Masashi Kato, Motoyuki Shimizu (Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

Key words *Phanerochaete chrysosporium*, flavoprotein monooxygenase, lignin, vanillic acid

2A01-04 キトサナーゼのグルコース-グルコサミン β -1,4 交互共重合体に対する作用

○千田 舜¹, 森田 大貴¹, 高遠 昌樹¹, 近藤 敬子², 片平 正人², 武田 稜¹
(¹横国大院・工, ²京大・エネ研)
takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp

【目的】 硫酸化細菌 *Thiothrix nivea* は細胞外にマイクロチューブを形成する。溶菌処理でマイクロチューブを調製し、さらに希塩酸処理するとグルコース-グルコサミン β -1,4 交互共重合体 (GG) が得られる。GG はセルロースに不可逆的に吸着してアミノ化をもたらすことができる。本研究では、セルロースアミノ化剤として活用するにあたって予め把握しておくべき GG の生分解性について検討した。

【結果】 GG を唯一炭素源とする培地でスクリーニングを行ったところ糸状菌が得られた。単離株は塩基配列 (ITS 領域) の特徴から *Metapochonia bulbillosa* と推察された。また、キトサンを唯一炭素源とする増殖も可能だった。しかし、セルロースでの増殖は認められなかった。単離株の培養液からはキトサナーゼ活性とともに GG 分解活性が検出された。GG の分解速度はキトサンの 1/10 以下だったものの、環境中での GG の分解はキトサナーゼによってなされると予想した。*Paenibacillus ehimensis* および *Bacillus pumilus* 由来のキトサナーゼでもキトサンには劣るものの GG の分解が可能であることが明らかとなった。切断するグリコシド結合を確認すべく、酵素反応液中の分解物を誘導体化 (ABEE 化) 後に HPLC で精製した。NMR 測定での構造解析により最終分解物は GlcN-Glc と判明し、Glc-GlcN 間の結合が切断されることがわかった。*Bacillus circulans* 由来のキトサナーゼの配座データを用いた分子動力学シミュレーションにより基質-酵素の結合親和性 (平均水素結合数など) を比較した。シミュレーションで示された親和性はキトサン < GG であり、少なくとも複合体形成に関して GG はキトサンに引けを取らないことが予想された。今回の基礎的解析では反応速度の違いを説明することはできないものの、キトサナーゼの反応機構の探求にキトサンと GG の比較は有効と考えられる。

Action of chitosanases on beta-1,4-linked glucosaminoglycan

○Shun Chida¹, Hiroki Morita¹, Masaki Takato¹, Keiko Kondo², Masato Kathira², Minoru Takeda¹
(¹Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., ²IAE, Kyoto Univ.)

Key words chitosanase, beta-1,4-linked glucosaminoglycan

2A01-05 超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* 由来 β -キシロシダーゼの酵素化学的諸性質

○石黒 早紀¹, 長縄 真以¹, 西山 千遥², 岡崎 文美^{2,3}
(¹三重大・生資, ²三重大・理工, ³三重大・先端科学研支セ)
okazaki@bio.mie-u.ac.jp

【背景・目的】 β -1,3-キシロシダーゼ (β -1,3-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.72) は、 β -1,3-キシランおよび β -1,3-キシロオリゴ糖に作用してキシロースを生ずるエキソ型の酵素であり、エンド型で作用する β -1,3-キシラーナーゼ (β -1,3-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.32) と共に、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランの糖化に必要な酵素である。これまでに耐熱性酵素の報告は無い。本研究では、産業利用上有用な耐熱性 β -1,3-キシロシダーゼの開発を目的とし、超好熱性海洋細菌 *Thermotoga neapolitana* のエンド型 β -1,3-キシラーナーゼ遺伝子 (*xyn26A*) の下流に存在する推定 β -1,3-キシロシダーゼ遺伝子 (*xlo3A*) の機能解析を行った。【方法・結果】 目的遺伝子 (*xlo3A*) を大腸菌により発現、精製し、組換え酵素 *Tn*. Xlo3A を得た。本酵素は β -1,3-キシロオリゴ糖および β -1,4-キシロオリゴ糖に特異的に作用してキシロースを生じたことから、 β -1,3-キシロシダーゼ (EC 3.2.1.72) 活性および β -1,4-キシロシダーゼ (EC 3.2.1.37) 活性を有することが明らかとなった。本酵素の至適 pH は 6.0 付近、至適温度は 87.5 °C 付近であり、高い耐熱性を示した。本菌由来の耐熱性エンド型 β -1,3-キシラーナーゼ (*Tn*. Xyn26A) との組合せにより、海藻特有の多糖である β -1,3-キシランの効率的な糖化が可能であると考えられた。今後、海藻未利用資源からのキシロース生産および有用物質の発酵生産技術の開発に取組む。

Biochemical characterization of a thermostable beta-xylosidase from the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana*

○Saki Ishiguro¹, Mai Naganawa¹, Chiharu Nishiyama², Fumiyoshi Okazaki^{2,3}
(¹Fac. Bioresour., Mie Univ., ²Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., ³Adv. Sci. Res. Support Center, Mie Univ.)

Key words beta-xylosidase, xylanolytic enzyme, *Thermotoga neapolitana*, beta-1,3-xylan

2A01-06 *Paenibacillus* sp. A13 由来マイコデキストラナーゼの酵素学的諸性質とカイネティクス

○平田 風子¹, 山内 夢乃², 稲福 隆之², 上地 敬子², 平良 東紀^{1,2}
(¹鹿児島大院・連農, ²琉球大・農)
tokey@agr.u-ryukyuu.ac.jp

Aspergillus 属などの糸状菌細胞壁は、キチンや β -1,3-グルカン、 α -1,3-グルカンなどの多糖を主構成要素としており、細胞の形態維持や外環境からの細胞の保護を担っている。近年、糸状菌細胞壁多糖 α -1,3-グルカンが宿主への病原性発揮や菌糸の凝集・接着に重要であることが報告されている。本研究では、一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属のみが生産する細胞壁多糖ニゲランに注目した。ニゲランは α -1,3-グルカンと同じ α -グルカンに分類され、 α -1,3-/ α -1,4-グルコシド結合を交互に繰り返すユニークな構造を持っており、窒素源飢餓時に活発に生産されるが、生理学的役割は分かっていない。一方、ニゲランを生産しない土壌細菌がニゲラン分解酵素 (マイコデキストラナーゼ) を生産することが報告がされている。本研究では、土壌細菌 *Paenibacillus* sp. A13 由来マイコデキストラナーゼに注目し、組換え体を用いて酵素化学的諸性質を明らかにすることを目的とした。まず、本酵素遺伝子を *Brevibacillus* *In vivo* Cloning 法でクローニング・発現させ、組換え酵素を調製した。本酵素は 3 つの糖質結合モジュール (CBM) および糖質加水分解酵素 family 87 の触媒ドメインから構成されていた。野生型および CBM を 1 つまたは 2 つ欠損させた変異型酵素 (Δ 1_CBM, Δ 2_CBM) の酵素化学的諸性質を解析した。その結果、野生型酵素と変異型酵素の性質は類似していたが、比活性は野生型酵素が最も高く、CBM を欠損することに比活性は低下した。野生型の最大反応速度 V_{max} は 40.2 U/mg, K_m 値は 1.98 mg/mL となった。本研究の結果は、自然界におけるニゲランの生理的役割および糸状菌の細胞壁の生成や分解システムの解明に寄与することが期待される。

Comparison of enzymatic properties of mycodextranases from *Paenibacillus* sp. A13

○Fuko Hirata¹, Yumeno Yamauchi², Takayuki Inafuku², Keiko Uechi², Toki Taira^{1,2}
(¹United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., ²Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words *Paenibacillus* sp. A13, Mycodextranase, alpha-1,3-/1,4-glucan

2A01-07 *Caldanaerobacter* ポリサッカライドデアセチラーゼの反応機構解析

○武田 悠社¹, 佐々木 康平^{1,2}, 水見山 幹基², 森芳 邦彦³, 大本 貴士³, 上垣 浩一⁴, 西矢 芳昭¹, 中村 努²
(¹摂南大院・理工, ²産総研・バイオメディカル, ³大阪技術研, ⁴近畿大・農)
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

酢酸セルロース (CA) は、タバコのフィルターや人工透析の膜材料等に利用される生分解性プラスチックである。CA はアセチル化度の増加に伴い熱可塑性を増すが、アセチル基の立体障害により生分解が抑制される。*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* 由来ポリサッカライドデアセチラーゼ (TTE0866) は、carbohydrate esterase family 4 に属する金属依存性酵素であり、糖の O- または N-アセチル基の加水分解を触媒する。さらに、TTE0866 は他の酵素が反応性を示さない高アセチル化度 CA の脱アセチル化を触媒するため、CA の生分解促進作用が期待される。我々は TTE0866 の結晶構造を解明し、活性中心近傍の芳香族アミノ酸残基 (W264) の特徴的な配向を明らかにした。そして、W264 の役割を基質認識と基質結合部位形成への寄与と考察した。しかしながら、本酵素の反応機構は未だ調べられておらず、反応に関与するアミノ酸残基とそれらの役割についても不明である。本研究では、TTE0866 の変異体解析から各アミノ酸残基の役割と反応機構について考察した。結晶構造より、TTE0866 は一般的な金属酵素の反応機構が予想された。アラニン残基に基づき、酵素活性が消失した D144 と H289 は一般酸/塩基触媒残基、D145, H195, H199 は金属結合残基と同定した。活性中心近傍に存在する W264 のアラニン変異体は、野生型と比較して酵素活性が 5% に低下した。この結果から W264 は触媒活性に必須ではないが、構造情報から基質認識への関与が示唆された。また、W264 に隣接する R265 のアラニン変異体は、基質特異性に変化が見られた。現在 R265 を性質の異なるアミノ酸に置換した変異体を種々作成しており、それらの酵素活性分析と構造面からの考察についても報告したい。

Reaction mechanism analysis of *Caldanaerobacter* polysaccharide deacetylase

○Yuto Takeda¹, Kohei Sasamoto^{1,2}, Tomoki Himiyama², Kunihiko Moriyoshi³, Takashi Ohmoto³, Koichi Uegaki⁴, Yoshiaki Nisiya¹, Tsutomu Nakamura²
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., ²Biomed. Res. Inst., AIST, ³ORIST, ⁴Fac. Agric., Kinki Univ.)

Key words carbohydrate esterase, deacetylation, reaction mechanism

2A01-08 *N*-acetylglucosaminyltransferase IV の C 末端領域の機能と構造の解析

○岡 希望¹, 森 壮太¹, 池谷 真里奈², 朴 龍洙^{1,2,3}, 宮崎 剛重^{1,2,3}
(¹静大院・総合科技, ²静大・創科技院, ³静大・グリーン科技研)
miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp

N 型糖鎖はタンパク質の特定のアスパラギン残基に結合する糖鎖修飾であり、その生合成は小胞体やゴルジ体で行われる。*N*-acetylglucosaminyltransferase IV (GnT-IV) は、N 型糖鎖の成熟に関わるゴルジ体局在型の糖転移酵素のひとつで、アイソザイムである GnT-IVa と GnT-IVb はコア構造の α -1,3-マンノース残基の 2 位に β -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) 残基がある際に、 β -1,4 結合で GlcNAc を付加する活性をもつ。しかし、複数の GnT-IV アイソザイムを含む酵素が属するファミリーの酵素は未だに立体構造の報告がない。我々は、立体構造予測から GnT-IV の触媒ドメインの C 末端側に機能未知ドメインがあることを見出し、その機能と構造の解析を行った。ヒト由来 GnT-IVa とそのカイコガ (*Bombyx mori*) 由来オルソログの C 末端ドメイン (それぞれ HsCBML と BmCBML) を大腸菌発現系で発現させ Ni アフィニティー精製を行った。等温滴定カロリメトリーによる解析により、これらの CBML は GlcNAc, pNP- β -GlcNAc, *N,N'*-diacetylchitobiose に対して結合能を持つことが分かった。また、X 線結晶構造解析によって HsCBML と BmCBML のリガンドフリー構造と BmCBML と β -GlcNAc との複合体構造を分解能 1.15-1.97 Å で決定した。GlcNAc の認識に関与しているアミノ酸残基は、他の生物種オルソログで広く保存されていた。また、全体構造は、*Clostridium perfringens* 由来 β -*N*-acetylhexosaminidase がもつ糖結合モジュールファミリー 32 (CBM32) ドメインが最もよく類似しており、このタンパク質の GlcNAc 結合残基とも空間的に保存されていた。以上の結果から、GnT-IV の C 末端ドメインは N 型糖鎖の非還元末端と結合することで GnT-IV と基質の結合を助ける働きをもつことが予想された。また、既知の CBM とのアミノ酸配列相溶性が低いことから、新規の CBM ファミリーのタンパク質であると示唆された。

Functional and structural analysis of the C-terminal region of *N*-acetylglucosaminyltransferase IV

○Nozomi Oka¹, Sota Mori¹, Marina Ikegaya², Park Enoch Y^{1,2,3}, Takatsugu Miyazaki^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words N-glycan, carbohydrate-binding module, glycosyltransferase, X-ray crystallography

2A01-09 細菌 *Arthrobacter protophormiae* 由来 D-アミノ酸オキシダーゼの塩基性 D-アミノ酸化活性に寄与する構造因子

○松永 陽平, 高橋 祥司
(長岡技術大院・工)
shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景・目的】近年、D-アミノ酸の多様な生理機能が報告されたことから、その分析技術が重要となっている。現在、D-アミノ酸は HPLC を用いて測定されているが、煩雑な前処理と複数試料を一度に分析できないことなどから、D-アミノ酸オキシダーゼ (DAAO) などの酵素を用いた分析法が注目されている。DAAO は中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するが、一般的に塩基性よりも中性 D-アミノ酸に対して高い活性を示す。しかし、細菌 *Arthrobacter protophormiae* 由来の DAAO (ApDAAO) は塩基性 D-アミノ酸に対して高い活性を示す。そこで、塩基性 D-アミノ酸分析に有用な酵素を創出するための構造的知見を得るため、ApDAAO において塩基性 D-アミノ酸に対する活性に寄与するアミノ酸残基の同定を試みた。

【方法・結果】ApDAAO 三次元構造モデルの活性部位において塩基性 D-アミノ酸側鎖との相互作用が考えられる酸性アミノ酸残基を探索したところ、4 個の Asp 残基 (Asp93, Asp210, Asp211, Asp215) が確認された。これら残基を Ala 残基へと置換したバリエーションの塩基性 D-アミノ酸に対する活性を測定したところ、D93A と D211A において顕著な活性低下が確認された。D93A の D-Lys と D-Arg に対する K_m 値はそれぞれ野生型の約 5 倍と 12 倍であり、D211A は約 10 倍と 160 倍であった。また、D93A の D-Lys と D-Arg に対する k_{cat} 値はそれぞれ野生型と同等と半分程度であり、D211A は 1/7 と 1/160 程度であった。一方、両バリエーションの D-Met に対するこれらパラメーターは野生型と同等であった。したがって、Asp93 は主に塩基性 D-アミノ酸の結合に、Asp211 は結合と分子活性の両方に寄与すると考えられた。

Structural factors that contribute to the catalytic activity toward basic D-amino acids of D-amino acid oxidase of the bacterium *Arthrobacter protophormiae*

○Yohei Matsunaga, Shoji Takahashi
(Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ. Technol.)

Key words D-amino acid, D-amino acid oxidase, flavoenzyme

2A01-10 サブユニット間 SS 結合導入による酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼの耐熱化

○財津 奏太, 高橋 祥司
(長岡技術大院)
shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景と目的】近年、様々な生物に D-アスパラギン酸 (D-Asp) が見いだされ、多様な生理的役割を担っていることが明らかになってきた。特に、ヒトにおいて D-Asp が脳内神経伝達物質として機能し、統合失調症などの精神神経疾患に関与することが示唆されたことから、D-Asp の検出・定量法が重要となっている。D-Asp は主に HPLC を用いて測定されているが、簡便かつ迅速な点において酵素を用いた測定法が注目されている。本研究では、酵母 *Cryptococcus humicola* UJI 株に D-Asp に対して高い特異性と触媒活性を示す D-アスパラギン酸オキシダーゼ (ChDDO) を見だし、ChDDO を用いた D-Asp 検出・定量法を開発してきた。しかし、ChDDO は安定性が低く、その利用は制限されている。そこで本研究では、ChDDO のサブユニット間への SS 結合導入による安定化を検討した。

【方法と結果】ChDDO の三次元結晶構造データをもとに、システイン残基導入部位を *in silico* において解析したところ、G87C と Y292C のアミノ酸置換により、サブユニット A-D 間と B-C 間にそれぞれ 2 つの SS 結合の導入が可能と推測された。G87C と Y292C バリエーションと G87C/Y292C バリエーションを大腸菌で発現させて耐熱性を解析したところ、G87C/Y292C においてのみ耐熱性の増加が確認され、精製酵素は野生型よりも至適温度が 5°C、活性半減温度 T50 が 22.1°C 高かった。非還元 SDS-PAGE 解析において、サブユニット結合を示唆するタンパク質バンドが G87C/Y292C においてのみ観察されたことから、サブユニット間の SS 結合形成による耐熱化が示唆された。G87C/Y292C の基質特異性を解析したところ、D-Asp に対する高い特異性が保持されていることが確認できた。

Thermal stabilization of a yeast D-aspartate oxidase by disulfide cross-linking of subunits

○Sota Zaitzu, Shouji Takahashi
(Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ. Technol.)

Key words D-aspartate oxidase, thermal stability, disulfide bond, protein engineering

2A01-11 極限環境微生物 *Candidatus Desulforudis audaxviator* MazF の高度に保存されたアミノ酸の役割

○石塚 寛子, 釣賀 雅子, 野田 尚宏, 横田 亜紀子
(産総研・バイオメディカル)
akiko-yokota@aist.go.jp

トキシシン-アンチトキシシンシステム Type II に分類される MazEF は、広く微生物に保存される環境ストレス応答性の生存制御機構である。トキシシン MazF は一本鎖 RNA に対する配列特異的リボスクレアーゼ活性を有し、通常的环境下では、アンチトキシシン MazE と複合体を形成し、MazF の毒性は抑制されている。一方、ストレスに晒されると MazE はプロテアーゼにより分解され、MazF は MazE から遊離し、配列特異的に標的 RNA を認識・切断することで、細胞の増殖阻害を引き起こしたり、細胞を休眠や細胞死へと導いたりすることが知られている。また、結晶構造解析から MazF と基質 RNA の結合に重要なアミノ酸が存在することが報告されているが、様々な生物種由来の MazF 間で高度に保存されたアミノ酸の役割に関しては不明な点が多い。我々は、極限環境微生物 *Candidatus Desulforudis audaxviator* の MazF (MazF-Da) に着目し、酵素特性および保存されたアミノ酸の役割の解明を目的とし研究を実施した。無細胞タンパク質合成系を用いて発現させた MazF-Da のリボスクレアーゼ活性を調べると、生育環境に近い 60°C 付近で最も高い活性を示すことが分かった。また、次世代シーケンサーを用いた解析や、蛍光プローブを用いた解析により MazF-Da は UACAAA を好んで切断することが明らかとなった。次に、様々な生物種由来 MazF 間で高度に保存されているアミノ酸残基に点変異を挿入した変異体を用いた解析により、G18、E20、R25、P26 のアミノ酸が MazF-Da のリボスクレアーゼ活性に重要であることが明らかとなった。さらに、N36A 変異体の認識配列は、野生型とは若干異なることも明らかになった。この結果は、Asn36 が MazF-Da の切断配列の特異性の決定に寄与することを示唆している。本学会では、MazF-Da から見出された酵素活性および認識配列に影響を及ぼすアミノ酸に関する新たな知見を報告したい。

Determining the role of highly conserved amino acids of extremophile *Candidatus Desulforudis audaxviator* MazF

○Hiroko Tamiya-Ishitsuka, Masako Tsuruga, Naohiro Noda, Akiko Yokota
(Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words Sequence-specific endoribonuclease, Toxin-antitoxin, Cell-free protein purification, MazF

2A01-12 サルコシンオキシダーゼの L-チオプロリン結合様式の解明

○張 宇琪¹, 下澤 勇弥¹, 佐々本 康平¹, 水見山 幹基², 中村 努², 西矢 芳昭¹
(¹摂南大院・理工,²産総研・バイオメディカル)
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

サルコシンオキシダーゼ (Sox; EC:1.5.3.1) はフラビンアデニンジスクレオチド (FAD) を補酵素として持つフラビン酵素の一種であり、コリン、クレアチンなどの代謝に関与している。Sox の触媒反応は二段階で進み、第一反応では基質の酸化と FAD の還元が、第二反応では FAD の酸化と生成物の自発的な分解が起こる。計算科学研究により、第一反応の機構として Hydrogen-Atom-Coupled Electron Transfer (HACET) mechanism が提案されている。我々は、Sox がサルコシンと構造的に類似する 5 員環イミノ酸である L-チオプロリン (TP) に対し、特徴的な反応を示すことを明らかにした。カイネティックパラメーターや吸光スペクトル解析より、その反応様式はサルコシンの場合と異なり、高い阻害作用が認められた。しかしながら、Sox の TP 酸化反応に関する分子レベルでの理解は為されていない。TP との複合体の立体構造決定は、Sox の反応機構の理解を深めると期待される。そこで我々は、X 線結晶構造解析にて Sox-TP 複合体構造の決定を試みた。さらに、TP 反応性に影響を与える変異体の特性を調査した。*Bacillus* 属由来 Sox を結晶化し、TP をソーキング後、結晶構造解析データを分解能 > 1.3Å で取得した。構造精密化の結果、活性中心にて TP は阻害剤ジメチルグリシンと同様に固定され、FAD へ電子移動できる位置にあった。酵素結合 TP はフリーの TP と比べ歪んでおり、近傍の Y254 側鎖が原因と考えられた。複合体構造の TP-FAD 原子間距離は、既報の Sox-サルコシン反応シミュレーションに比して差異が見られ、TP は HACET とは異なる反応機構の可能性が考えられた。Y254 の役割を理解するため、Y254A および Y254G 変異体を精製し、野生型と同様の結晶調製に成功した。TP ソーキングによる結晶の色調変化は、野生型とは明確な差異が認められた。現在、変異体の構造解析を進めている。

Elucidation of L-thioproline binding mode in sarcosine oxidase

○Yuqi Zhang¹, Yuya Shimozawa¹, Kohei Sasamoto¹, Tomoki Himiyama², Tsutomu Nakamura², Yoshiaki Nishiya¹
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., ²Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words sarcosine oxidase, thioproline, crystallization, 3D structure

2A01-13 ダイコン由来グルコース転移酵素のヒドロキシ安息香酸類に対する糖転移活性の解析

○大橋 博之, 駒 大輔, 森芳 邦彦, 山中 勇人, 大本 貴士
(大阪技術研)
hohashi@orist.jp

ヒドロキシ安息香酸類 (HBs) などフェノール環を持つ化合物は、植物体内において遊離型や他の化合物との抱合体として存在しており、食品添加物をはじめとして種々の用途で利用される。特に、グルコースなどの糖がベンゼン環上の特定の水酸基に結合した配糖体は、化合物の水溶性向上や揮発性低下などの性質変化につながり、産業の利用価値が高い。そこで本研究では、ダイコン由来のグルコース転移酵素 (UGT) の HBs に対する酵素学的性質を調査するとともに、配糖体の比生産速度向上を図った。

既報のシロイヌナズナ由来の UGT (AtUGT89B1) を参照配列とし、ダイコンのアミノ酸配列データベースを検索したところ、AtUGT89B1 の 165 番目から 167 番目の 3 アミノ酸残基に相当する部分が欠失しているものの、相同性が高い配列 (RsUGT89B1) を得た。異種発現し、RsUGT89B1 の基質特異性を調査したところ、4 位に水酸基を持つモノ、ジ、トリヒドロキシ安息香酸、および 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-DHB) にグルコースを転移した。RsUGT89B1 の最適 pH、最適反応温度、2 価金属イオン要求性は AtUGT89B1 と同様であった。一方、RsUGT89B1 の各 HBs に対する酵素反応速度論的パラメーターは AtUGT89B1 のそれとは異なっており、特に、2,5-DHB に対する K_m 値は、AtUGT89B1 の 10 倍以上大きな値であった。この酵素と基質の親和性の違いは、RsUGT89B1 で欠失している 3 アミノ酸残基に起因すると推定された。また、配糖体化反応と UDP-グルコース生成反応 (グルコース 1 リン酸 (G1P) + ウリジン 3 リン酸 → UDP-グルコース + ピロリン酸) を同一反応溶液中で同時に行った。大過剰量の G1P を含む反応溶液では、配糖体化反応のみの場合よりも比生産速度が 45% 向上した。

Analysis of glucosyltransferase from *Raphana sativus* towards mono-, di-, and tri-hydroxybenzoic acids.

○Hiroyuki Ohashi, Daisuke Koma, Kunihiko Moriyoshi, Hayato Yamanaka,
Takashi Ohmoto
(ORIST)

Key words enzyme reaction, glycosyltransferase, glycoside, multistep enzyme reaction

2A03-01 大腸菌における異種コハク酸脱水素酵素の発現と機能化の比較

○塩田 悠介¹, 高坂 智之²
(¹山口大学院・創成科学, ²山口大・中高温微生物研究セ)
tkosaka@yamaguchi-u.ac.jp

コハク酸脱水素酵素はコハク酸をフマル酸へと酸化する酸化還元酵素であり、中央代謝やエネルギー生産に深く関わっており、幅広い微生物種において保存されている。コハク酸脱水素酵素がコハク酸の酸化反応を行うには補欠分子族フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) の共有結合が必要であり、その機構は大腸菌など一部の細菌において明らかとなっている。しかし、グラム陽性細菌では未だその機構は不明である。本研究では、いまだ明らかになっていないコハク酸脱水素酵素の FAD 結合機構を解明するため、その機構が不明なグラム陽性細菌である枯草菌、コリネ型細菌、高温性プロピオン酸酸化細菌と、FAD 結合機構が明らかなグラム陰性細菌である酢酸菌の、それぞれのコハク酸脱水素酵素を大腸菌細胞に導入し、導入株においてコハク酸脱水素酵素活性を比較した。その結果、コリネ型細菌のコハク酸脱水素酵素を導入した株のみが活性を示し、他の種のコハク酸脱水素酵素を導入した株では活性を示さなかった。次に、His-tag を用いてコリネ型細菌のコハク酸脱水素酵素を精製し活性を測定したところ、活性を示した。さらに大腸菌の FAD 結合因子である *sdhE* 破壊株にコリネ型細菌のコハク酸脱水素酵素を導入した株においても酵素活性の低下は見られなかった。これらの結果は、コリネ型細菌のコハク酸脱水素酵素は、大腸菌細胞内で *sdhE* に影響を受けることなく FAD が結合している可能性を示唆している。

Comparison of expression and functionalization of various succinate dehydrogenases heterologously expressed in *Escherichia coli*

○Yusuke Shiota¹, Tomoyuki Kosaka²
(¹Grad. Sch. Science Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., ²RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Key words enzyme, protein folding, protein expression

2A03-02 *Paenibacillus* 属由来 *nif* 遺伝子群を導入した組換え大腸菌におけるニトロゲナーゼ活性

○早川 紗和子, 藤井 浩, 本田 裕樹
(奈良女子大・化学生物環境)
honda@cc.nara-wu.ac.jp

【背景・目的】アンモニアは優れた可搬性から水素に次ぐエネルギーキャリアとして注目されている。しかし、その工業的な生産方法はハーバー・ボッシュ法に依存し、高温高压条件下で化石燃料由来の水素を大量に使用する。エネルギー投入と水素使用の点から、省エネルギーな生産方法への転換に期待が寄せられる。ニトロゲナーゼは常温常圧で窒素からのアンモニア生成を触媒する酵素であり、省エネルギーでのアンモニア生産が可能である。演者らは大腸菌でのニトロゲナーゼ遺伝子の発現およびニトロゲナーゼの大量合成を試みており、本講演ではこれまでに得られた知見を報告する。

【方法・結果】NBRC から入手した *Paenibacillus* 属細菌のゲノムからニトロゲナーゼ遺伝子クラスター (*nifBHDKENXhesAnifV*) およびその上流領域 150 bp (約 12 kb) を取得し、pUC19 に挿入してニトロゲナーゼ遺伝子発現用プラスミド (pUnif) を構築した。pUnif を保持する大腸菌を嫌気条件下で培養し、ニトロゲナーゼ遺伝子の異種発現を試みた。ニトロゲナーゼ活性測定には簡易的な測定法として汎用されるアセチレン還元法を用いた。その結果、pUnif を保持する大腸菌において、対照株には見られないアセチレンからエチレンへの変換が確認できた。また、エチレン生成量と培地中のグルコース濃度には相対関係が見られ、大腸菌の代謝経路からニトロゲナーゼへの電子伝達が活性向上に向けて重要であると考えた。そこでニトロゲナーゼの活性中心錯体や FeS クラスター合成に関わる遺伝子群 (*Klebsiella oxytoca* 由来 *nifUSZQ*) や、ピルビン酸からニトロゲナーゼへの電子伝達に関与すると考えられる酵素遺伝子 (*Paenibacillus* 由来 *pfoAB*, *fldA*) を共発現させた結果、アセチレン還元を指標とするニトロゲナーゼ活性の向上を確認できた。

Nitrogenase activity in *Escherichia coli* expressing *nif* genes from *Paenibacillus* sp.

○Sawako Hayakawa, Hiroshi Fujii, Yuki Honda
(Dept. Chem. Biol. Environ. Sci., Nara Women's Univ.)

Key words ammonia, nitrogenase, *Paenibacillus* sp., *Escherichia coli*

2A03-03 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの熱安定性と活性に及ぼす N 糖鎖修飾の影響

○石田 直己¹, 廣田 瑠花¹, 塩野 義人¹, 真壁 幸樹², 小関 卓也¹
(¹山形大・農, ²山形大院・理工)
tkoseki@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

【目的】ルチノシダーゼは、フラボノイドに 6-O- α -L-ラムノシル- β -D-グルコシド (ルチノース) がグリコシド結合したフラボノイドをアグリコンとルチノースに加水分解する、GH5 サブファミリー 23 に分類される酵素である。また、*Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの結晶構造も明らかにされた¹⁾。先行研究より、野生型酵素に比べて、endo-H 処理した酵素の方が高い熱安定性を示すことが分かった。本研究では、N 糖鎖修飾しているアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に置換したルチノシダーゼを造成し、精製酵素を用いて、熱安定性と活性に及ぼす影響を検討した。

【方法】*Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼ N32D、N128D、N176D、N288D、N359D の変異プラスミドを *Pichia pastoris* KM71H 株で発現させ、各種クロマトグラフィーにて精製を行い、精製酵素を得た。この目的タンパク質を用いて活性測定、最適温度、熱安定性の確認を行った。また、アミノ酸置換によって構造に変化が起こったか CD スペクトルを測定した。

【結果】野生型酵素と比べ N32D 変異体はわずかに分子量が減少、N288D 変異体は著しく分子量が減少した。野生型と比べ N128D では活性が上昇し、N288D では低下した。N128D は K_m 値および k_{cat} 値とも低下し、N359D では K_m 値および k_{cat} 値とも上昇するが、 k_{cat}/K_m 値に顕著な違いはなかった。N32D、N176D 変異体の熱安定性は endo-H 処理した野生型酵素よりも高くなった。一方、N128D、N359D 変異体は熱安定性が低下し、2 つの変異体の CD スペクトルは endo-H 処理後の野生型酵素と類似していた。脱 N 糖鎖後の熱安定性の向上には、N32 と N176 に修飾している糖鎖の除去が N128、N359 のそれよりも寄与しており、また、N128 及び N359 に修飾している N 糖鎖はタンパク質の構造維持に関与することが示唆された。

¹⁾Makabe et al., Appl. Environ. Microbiol., 87(3), e02438-20(2021)

Effect of N-glycosylation on the thermal stability and activity of rutinoidase from *Aspergillus oryzae*

○Naoki Ishida¹, Ruka Hirota¹, Yoshihito Shiono¹, Koki Makabe², Takuya Koseki¹
(¹Fac. Agric., Yamagata Univ., ²Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, rutinoidase, thermal stability, N-glycosylation

2A03-04 Extensive analysis of transglutaminase 1 substrate preferences using cDNA display

○T.I.K. Munaweera¹, Jasmina Damjanovic¹, Moeri Nezu¹, Maurizio Camagna¹, Takaaki Kojima², Kiyotaka Hitomi⁴, Hideo Nakano¹, Naoto Nemoto³
(¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ⁴Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)
jasmina@agr.nagoya-u.ac.jp

Mammalian transglutaminases (TGs) are Ca²⁺-dependent enzymes that catalyze the formation of isopeptide cross-linking between glutamine and lysine residues of various or the same proteins. The eight isoforms of the TGs family (TG 1 to 7 and factor XIII) are distributed across a variety of tissues and involved in multiple biological processes. The abnormal activities of TGs are known to occur in various diseases while TG1 mutation has been found to link with lamellar ichthyosis and Alzheimer's disease. Differences in enzyme expression are found in such conditions and it has become important to analyze enzyme activity using isozyme-dependent substrates. We used the *in vitro* cDNA displayed libraries to gain insight into the preferred substrate amino acid sequence by human TG1. The amino acid libraries were randomized at positions -2, -1, +1, +4, +5, +6, and +9 from the glutamine residue, with respect to the consensus residues previously identified within the 12-mer sequence (K5 sequence; Sugimura et al., FEBS J (2008), 275, p. 5667) XXQXKLXXXWPX (where 'X' represent non-conserved amino acids). Library screening and analysis of the selected pool of sequences by next-generation sequencing (NGS) and in-house bioinformatics methods revealed detailed substrate profile of TG1 indicating preferred as well as non-preferred sequences. Furthermore, candidate glutamine donor substrates with a higher enrichment factor than the K5 sequence have been identified and will be evaluated in the near future.

Extensive analysis of transglutaminase 1 substrate preferences using cDNA display

○T.I.K. Munaweera¹, Jasmina Damjanovic¹, Moeri Nezu¹, Maurizio Camagna¹, Takaaki Kojima², Kiyotaka Hitomi⁴, Hideo Nakano¹, Naoto Nemoto³
(¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ³Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., ⁴Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words evolutionary engineering, protein engineering, transglutaminase, substrate specificity

2A03-05 SH 基化学修飾による臨床検査薬酵素の機能改変と特性解析

○外山 二卯佳, 西矢 芳昭
(棋南大院・理工)
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景・目的】 分析分野において、酸化酵素の脱水素酵素化は臨床検査やバイオセンサなどへの用途が見込める。われわれは、腎機能評価マーカーであるクレアチニン測定用酵素として既に実用化されている *Arthrobracter* 属由来サルコシンオキシダーゼ (SoxA) を対象に、SH 基化学修飾にてデヒドロゲナーゼへの機能改変に成功した。修飾 SoxA は未修飾 SoxA と比べ同様の CD スペクトルを示したが、反応混液の O₂ 消費速度が極めて低く、吸光スペクトルも還元型となった。したがって、化学修飾は基質の酸化反応ではなく、続いて起こる O₂ との反応に影響することが確認された。本研究では、SH 基化学修飾 SoxA の特性解析を行った。

【結果・考察】 SoxA を SH 基修飾剤の 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one や N-Ethylmaleimide, Hg²⁺などで処理したところ、全てにおいてオキシダーゼ活性の低下とデヒドロゲナーゼ活性の増加が確認されたが、修飾剤によりデヒドロゲナーゼ活性の増加率に違いが見られた。MALDI-TOF MS でのペプチド解析により、3つの Cys 残基 (C154, C232, C264) の修飾が確認された。Cys 変異体解析の結果は、C232 と C264 の修飾効果による O₂ 取込み阻害を示唆した。還元型 SoxA の計算化学解析により、Cys 残基近傍にある FAD_S 面への O₂ エントランスが修飾により狭まり、O₂ との反応が低下したと予想された。酵素反応後に遊離した生成物濃度を測定したところ、未修飾 SoxA に比べ修飾 SoxA は低下しており、基質結合部位のある FAD_R 面は生成物が残ることで塞がれていると考えられた。

【展望】 修飾 SoxA は溶存酸素の影響を受けなため、様々なバイオセンサ用途が期待できる。この化学修飾技術は、操作が簡便で、修飾剤の選択肢が豊富であり、SoxA 以外にも応用可能と考えられる。現在、他の臨床検査用酵素でも SH 基修飾剤を用いたプロテイン・エンジニアリングを試みている。

Improvement and functional analysis of diagnostic enzyme using chemical modification

○Fuka Toyama, Yoshiaki Nishiya
(Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words dehydrogenase, oxidase, chemical modification, sulfhydryl group

2A03-06 シロイヌナズナ Ca 依存性キナーゼ CPK6 の脂質修飾に関する解析

○増田 賢人¹, 齋藤 俊也¹, 内海 俊彦², 木原 章雄³, 辻井 雅¹, 石丸 泰寛¹, 齋信 信之¹
(¹東北大院・工, ²山口大・農, ³北大院・薬)
uozumi@tohoku.ac.jp

【背景・目的】

パルミトイル化酵素 (PAT) はタンパク質に脂肪酸付加することにより疎水性を向上させ細胞質から生体膜への移行と係留を促す。 *Arabidopsis thaliana* に存在する Ca 依存性キナーゼ CPK6 はパルミトイル化修飾の後に、細胞膜に移行し陰イオンチャネル SLAC1 を活性化する (Saito *et al.*, 2018)。本研究では、Ca シグナリングの主体となるイオン輸送体の制御に重要な分子の一つである CPK6 の脂肪酸修飾による細胞内局在性の変化と PAT による CPK6 の脂質修飾機構の検討を行った。

【方法・結果】

CPK6 の N 末端付近の Cys の置換体 C5S は SLAC1 のイオン電流活性を示さないことから、Cys5 の脂質修飾を受けていることが予想された。この Cys5 を含む CPK6 の N 末端 10 アミノ酸を EGFP に連結した融合タンパク質を COS-1 細胞へ導入し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内における局在性を観察した。野生型 CPK6 は小胞体やゴルジ体の生体膜に局在し、CPK6-C5S の多くは細胞質に局在した。また、パルミトイル化阻害剤である 2-bromo palmitic acid を添加したところ、野生型 CPK6 の局在性が細胞質へ変化した。次に、植物の PAT による CPK6 のパルミトイル化の有無を検討した。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の PAT 欠損株に、FLAG タグを付与した *Arabidopsis thaliana* の PAT と MYC タグを付与した CPK6 を発現させた。この酵母発現系に対してパルミチン酸-ビオチン置換法を施すことで精製したパルミトイル化タンパク質に対して、MYC 抗体、FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングを行い、脂質修飾を検討した。AtPAT は自己パルミトイル化されることを検出した。また、CPK6 は PAT によってパルミトイル化を受けることを観察した。一方、CPK6-C5S の導入株ではパルミトイル化のバンドが消失した。以上より、AtPAT は CPK6 の Cys5 をパルミトイル化し、CPK6 の生体膜への局在に関与していることが示された。

Analysis of lipid modification of the Ca-dependent kinase CPK6 in *Arabidopsis thaliana*.

○Kento Masuda¹, Shunya Saito¹, Toshihiko Utsumi², Akio Kihara³, Masaru Tsujii¹, Yasuhiro Ishimaru¹, Nobuyuki Uozumi¹
(¹Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Fac. Agric., Yamaguchi Univ., ³Grad. Sch. Pharm., Hokkaido Univ.)

Key words *Arabidopsis thaliana*, abscisic acid, Palmitoylation

2A03-07 健康診断用馬尿酸加水分解酵素の開発と構造解析

○奥迫 拓也¹, 大西 諒², 巽 謙太³, 矢倉 一樹³, 西矢 芳昭^{1,2}
(¹棋南大院・理工, ²棋南大・理工, ³ニプロ)
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

塗装業等多用されている有機溶剤は、体内に蓄積すると生体機能障害を引き起こすことが知られている。有機溶剤による健康被害を防止するため、有機溶剤特殊健康診断の実施が労働安全衛生法等により定められている。特殊健康診断の代表的な検査項目として、トルエンやキシレンの代謝産物である馬尿酸・メチル馬尿酸がある。現在これらは HPLC 法によって測定されているが、操作が煩雑でスループットが低く、高コストな測定法である。また、有機溶剤特殊健康診断は年々受診者が増加しており、今後検査体制の逼迫も予想される。そこで、我々はこれらの課題を解決することができる、より高スループットかつ低コストな酵素的測定法を考案し、特許出願 (特開 2019-187285) を行った。しかし、考案した測定法に用いる馬尿酸加水分解酵素 (Hhase) は、既知のものでは実用化の上で低安定性・低比活性の課題があった。そこで我々、本測定法に用いる新規な馬尿酸加水分解酵素として、*Pyrococcus horikoshii* 由来 Hhase1043、*Acetomicrobium mobile* 由来 HhaseAm、*Staphylococcus aureus* 由来 HhaseSa (PDB ID : 4EWT) の 3 種を見出した。HhaseSa は機能未知アミダーゼとして結晶構造が明らかにされている。Hhase1043 と HhaseAm については、酵素構造が明らかにされていないが、ホモロジーモデリングにて立体構造を予測した。

3 種の酵素の構造モデルおよび特性評価結果に基づき、全体構造や活性中心近傍と機能 (特に基質特異性や温度依存性) との相関について考察した。馬尿酸及び各メチル馬尿酸に対する反応性は HhaseSa が最も高く、基質結合ポケットの形状や親水性・疎水性領域の分布が基質親和性に影響を与えたと考えられた。また、活性中心付近の疎水性残基を高高いものに置換したところ、反応性や基質特異性に大きな変化が見られた。

Development and structural analysis of hippuric acid hydrolases for health examination

○Takuya Okusako¹, Ryo Onishi², Kenta Tatsumi³, Kazuki Yagura³, Yoshiaki Nishiya^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., ²Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ., ³Nipro Corp.)

Key words hippuric acid, health examination, hydrolase, structural analysis

2A03-08 ラッカーゼの迅速選抜系構築に向けた基礎検討

○折田 兼成, 徳王 亮太, 大川 優生, 南畑 孝介, 神谷 典穂
(九大院・工)
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【緒言】

ラッカーゼはフェノール類の一電子酸化反応を触媒する酵素であり、バイオセンサーや漂白剤、リグニンの分解など、多方面で利用されている。一方で野生型のラッカーゼは高温での変性や狭い至適 pH 条件により、その使用に際して制限を受ける。そのため、産業利用に向けた機能改変が求められている。近年、目的の機能を発現するタンパク質を効率よく取得する手法として、Water-in-Oil (W/O) emulsion を用いたハイスルーブットな酵素選抜技術の開発が盛んである。しかし、既往の手法では、系の安定性の低さが課題となっている。本研究では、W/O emulsion の内水相をゲル化して得られるハイドロゲルビーズ (Hydrogel Beads: HB) を反応場として用いるラッカーゼの迅速選抜系の構築を目的とする。HB を用いることにより、従来の系と比較して安定性が向上することが期待される。本発表では、ラッカーゼの活性に応じて蛍光を発する基質を探索し、水溶液系とハイドロゲル系双方において、蛍光による酵素活性評価について検討した。

【実験及び結果と考察】

フェノール性基質 (レゾルシノール、カテコール、ピロガロール) と市販ラッカーゼを混合し、蛍光スペクトルの経時変化を追跡した。その結果、レゾルシノールとカテコールを基質として用いた反応溶液から蛍光が検出された。続いて、レゾルシノールあるいはカテコール、ラッカーゼを、末端チオール型 8 分岐ポリエチレングリコール水溶液と混合することで、蛍光染色されたハイドロゲルが得られることを確認した。最後に、上述の結果を踏まえた最適条件下にて、酵素活性に応じた蛍光染色 HB の作製に成功した。

Basic study of high throughput screening system for laccase

○Kensei Orita, Ryota Tokuo, Yui Okawa, Kosuke Minamihata, Noriho Kamiya
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

Key words laccase, high-throughput screening, gelation

2A03-09 フェムトリットドロップレットアッセイを用いた人工リボソーム活性の高感度検出

○小坂 唯心^{1,2}, 宮脇 佑実¹, 森めぐみ¹, 植田 充美¹, 青木 航¹
(¹京大院・農, ²日本学術振興会)
aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

【背景】

試験管内でリボソーム生合成を再構成できれば、新規機能を持つ人工リボソームの創出に繋がると期待される。しかし、リボソーム生合成は極めて複雑なプロセスであり、試験管内再構成は未だ達成されていない。リボソーム生合成の再構成条件を効率的に探索するには、僅かな新生人工リボソームしか形成されずとも、その翻訳活性を特異的かつ高感度に検出することが重要である。そこで本研究では、ひとつの人工リボソームの翻訳活性を簡便に検出可能な方法の開発を目的とした。

【方法】

リボソームが mRNA を翻訳する効率は、Shine-Dalgarno (SD) 配列と anti-SD (ASD) 配列の相互作用によって主に決定される。そこで、野生型 SD/ASD 配列と相互作用しない直交 SD/ASD 配列 (orthogonal SD/ASD: oSD/oASD) を構築し、人工リボソームを特異的に検出できるかどうかを評価した。また、検出感度向上のため、フェムトリット液滴に人工リボソームを封入し、局所的に濃度が高くなった人工リボソームによって蛍光レポーターを翻訳させるアッセイ系を構築した。さらに、深層学習を用いて、フェムトリット液滴の蛍光強度を自動かつ高い精度で測定可能とする解析パイプラインを構築した。

【結果と考察】

先行研究 [1-3] で報告された 7 つの oSD/oASD 配列のペアを評価したところ、ori と名付けられた oSD/oASD ペアを用いることで、人工リボソームの特異的検出を実現することに成功した。次に、フェムトリット液滴を用いた人工リボソームの超高感度検出系を構築した。深層学習による画像解析パイプラインを構築し、人工リボソームを封入した液滴の蛍光強度を評価したところ、ひとつの人工リボソームの翻訳活性を検出できる感度を持っていることがわかった。我々が構築したアッセイ系は、試験管内でリボソーム生合成を再構成する試みに大きく貢献すると期待される。

Highly sensitive detection of the transnational activity of artificial ribosomes using a femto-liter droplet assay

○Yuishin Kosaka^{1,2}, Yumi Miyawaki¹, Megumi Mori¹, Mitsuyoshi Ueda¹, Wataru Aoki¹
(¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Research Fellow of JSPS)

Key words artificial ribosomes, reconstitution of ribosomes, cell-free transcription and translation, droplet assay

2A03-10 質量分析イメージングを用いたマメ科植物の種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化

○篠原 菜穂¹, 生田 宗一郎¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}, 新聞 秀一^{1,2,3}
(¹九大院・工, ²阪大・先端の学際研機構, ³大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

γ -アミノ酪酸(GABA)は神経伝達物質の一つであり、主に健康への寄与が報告され、食品に含有される成分として注目を集めている。さらに、植物において重要な生理活性物質であると考えられており、植物種子の発芽段階において増加することが報告されている¹。GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)によりグルタミン酸から産生される。そこで植物発芽種子における GAD の酵素活性局在を可視化することで植物発芽段階における GABA 生合成に関わるメカニズムの全容解明の一助となることが期待される。近年、酵素活性の局在を測定する方法として試料の表面における質量分析によって、標的となる分子の空間的な位置分布を明らかにする手法である質量分析イメージング(MSI)を酵素組織化学に応用した手法が報告された²。本研究では、MSI を用いてマメ科植物のモデル生物であり、GABA 高含有食品としても消費されているダイズ(Glycine max)種子とアルファルファ(Medicago sativa)種子における GAD 活性の局在を可視化した。両種子の凍結切片上に 50 mM グルタミン酸-d3 をスプレー噴霧した後 40°C で 2 時間インキュベートし、質量顕微鏡を用いて切片上の GABA-d3 を検出することで GAD 活性の分布を可視化した。その結果、発芽後のダイズ発芽種子の胚芽とアルファルファ発芽種子の根において他の種子構造より GAD 活性の局在が可視化された。

- (1) A Yoto *et al.*, *Amino Acids*, 43 (3), 1331-1337 (2012)
- (2) A Nisreen *et al.*, *Turk J Bot*, 45 (2), 124-139 (2021)
- (3) E Takeo *et al.*, *Anal Chem*, 92 (18), 12379-12386 (2020)

Mass spectrometry imaging enables to visualize the localization of glutamate decarboxylase activity in germinating legume seeds

○Naho Shinohara¹, Soichiro Ikuta¹, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}, Shuichi Shimma^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words GABA, glutamate decarboxylase, legume seed, mass spectrometry imaging

2A03-11 質量顕微鏡を用いたオオムギ発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性の可視化

○生田 宗一郎¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}, 新聞 秀一^{1,2,3}
(¹阪大院・工, ²阪大・先端の学際研機構, ³大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

生体内で酵素活性の分布を可視化することは、生理現象の理解のために極めて重要である。近年、酵素活性の局在を可視化する新しい方法として、質量分析イメージング (mass spectrometry imaging: MSI) を、酵素組織化学に応用した手法が開発された¹。 γ -aminobutyric acid (GABA) は近年人間の健康への寄与が報告されているため²、GABA 高含有食品が注目されている。発芽オオムギ種子は、未発芽種子に比べて GABA を多く含有することから³、GABA 高含有食品として商業的に販売されている。そのため、発芽過程における GABA 生合成に関わる酵素とその活性局在を明らかにすることで、発芽種子における GABA 生合成のメカニズムの全容解明の一助となることを期待できる。最終的に GABA 高含有食品の開発につながる可能性がある。そこで本研究ではグルタミン酸を GABA へ変換する反応を触媒するグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) に注目し、MSI を用いて発芽オオムギ種子中の GAD 活性分布の可視化法を確立することを目的とした。オオムギ発芽種子の凍結切片上に 50 mM グルタミン酸-d3 をスプレーし、60°C で 3 分間インキュベートした後に、質量顕微鏡を用いて切片上の GABA-d3 を検出することで GAD 活性の局在を可視化した。その結果、異なる発芽段階におけるオオムギ発芽種子の胚芽及びアリュエロン層において GAD 活性を可視化することに成功した。本発表では、その可視化手法と分布結果について報告する。

- (1) Takeo, E. *et al.*, *Anal. Chem.*, 92 (18), 12379 (2020)
- (2) Yoto, *et al.* *Amino Acids*, 43 (3), 1331 (2012)
- (3) AL-Quraan N, *et al. Sci Res.*, 29, 250-260 (2019)

Visualization of glutamate decarboxylase activity in barley germinating seeds using mass microscope

○Ikuta Soichiro¹, Fukusaki Eiichiro^{1,2,3}, Shimma Shuichi^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words Mass microscope, Enzymatic activity, Glutamate decarboxylase, Barley

2A03-12 質量顕微鏡を用いたネオニコチノイド系薬剤を投与した *Drosophila melanogaster* におけるアセチルコリンとその関連酵素の可視化

○林 大暉¹, 岡澤 敦司², 西脇 寿³, 福崎 英一郎^{1,4,5}, 新聞 秀一^{1,4,5}
 (1)阪大院・工, (2)大阪公大院・農, (3)愛媛大院・農, (4)大阪大学先端
 的学際研究機構, (5)大阪大学島津分析イノベーション協働研究
 所)
 sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ネオニコチノイド系薬剤は農業としてだけでなく家庭用にも広く用いられている殺虫剤であり、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に作用する。また、nAChRに作用する神経伝達物質としてアセチルコリン(ACh)が挙げられる。ここで、ネオニコチノイドによるnAChRへの作用がすでに明らかであることから、ネオニコチノイドはAChの増減には関与しないと考えられていた。しかし、先行研究において、ネオニコチノイドを投与したショウジョウバエでAChの蓄積が観察された。そこで、AChの分解と合成に着目した。この分解と合成にはそれぞれコリンエステラーゼ (ChE) とコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) が触媒として関わっている。これらの酵素活性を調べることは、ネオニコチノイドによる未だ知られていない作用を明らかにすることができると考えられる。

酵素活性の局在を可視化する手法として酵素組織化学法が用いられてきた。しかし、酵素組織化学法の欠点として、酵素反応によって生成された分子に対し呈色反応が必要であり、必ずしもすべての酵素反応に適用できるわけではないことが挙げられる。この欠点を克服するため、酵素活性の局在を可視化する新しい手法として、質量分析イメージング (MSI) を用いた酵素組織化学法が開発された。MSIとは標的分子の空間分布を得ることができる分子イメージング技術であり、蛍光標識等を必要とせず、標的分子を可視化することが可能である。AChを標的分子とした先行研究では、MSIを用いてマウス脳内のChEとChATの活性の分布を可視化したことが報告されている。そこで本発表では、このMSIを用いた酵素組織化学法により、ネオニコチノイド投与の有無でショウジョウバエにおける、AChの分布ならびにChE、ChAT活性の分布を報告する。

Visualization of acetylcholine and associated enzyme activity in neonicotinoids administered *Drosophila melanogaster* using mass microscope

○Hiroki Hayashi¹, Atsushi Okazawa², Hisashi Nishiwaki³, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}, Shuichi Shimma^{1,4,5}
 (1)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., (2)Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agric., Osaka Metro. Univ., (3)Course of Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Ehime Univ., (4)OTRI, Osaka Univ., (5)Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words mass spectrometry imaging, acetylcholinesterase, choline acetyltransferase, *Drosophila melanogaster*

2B02-01 褥瘡患者の創部細菌叢と予後との関連の予備的検討：次世代シーケンサーによるメタ16S解析と機械学習

○加藤 頼子¹, 藤井 隆夫¹, 尾田 友香¹, 平田 善彦¹, 平大輔², 峰松 健夫^{3,4}, 臺 美佐子^{3,5}, 仲上 豪二郎³, 國光 真生^{3,6}, 真田 弘美^{3,4}
 (1)サラヤ, (2)崇城大・生物生命, (3)東大院・医, (4)石川県大, (5)藤田医大, (6)横市大院・医)
 kato-yr@saraya.com

【目的】難治性皮膚潰瘍には膨大な細菌負荷がかかっており、細菌叢が治癒の進行や遅延と関連することが報告されている。しかし、創部細菌叢は複雑であり、治癒遅延メカニズムの解明へ繋げることが難しかった。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて解析した褥瘡滲出液細菌叢と褥瘡の予後との関連を、機械学習を用いて検討した。

【方法】患者5名の褥瘡から複数回サンプリングし、得られた16サンプルを対象とした。1週間の創面積減少率が10%未満またはDESIGN-R値が増加した褥瘡を悪化/停滞、それ以外の褥瘡を改善と定義した。褥瘡滲出液から抽出した細菌DNAのメタ16S解析を行い、褥瘡ごとの細菌の組成解析、および深達度分類やDESIGN-R値、褥瘡の予後に関連する細菌叢を直行部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) などの機械学習から同定した。本研究は、東京大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】褥瘡滲出液は、*Staphylococcus* 属のうち *S. aureus* と *S. epidermidis* が主要菌種であった。また、褥瘡の予後と細菌叢に関連があり、*Enterococcus*, *S. epidermidis*, *Anaerococcus* などが改善に寄与、*S. aureus* や *Bacteroides* が悪化/停滞に寄与することが分かった。データを学習データと評価データ分けて、構築したモデルで検証すると、1、2週間後の褥瘡の改善あるいは悪化/停滞を予測できる可能性が示された。

【結論】褥瘡の細菌叢に特徴的な細菌種と、機械学習による予測モデルから、褥瘡の予後に寄与する細菌種を見出した。データ数を増やすことで、「菌叢からの創部悪化/停滞または改善予測モデル」を構築でき、特定の細菌を指標にした検査や、新しい治療法・予防法の開発へ繋がることが期待される。

Preliminary study of the correlation between microbiome and prognosis in pressure ulcer patients: NGS analysis of 16S ribosomal RNA gene and machine learning

○Yoriko Kato¹, Takao Fujii¹, Yuka Oda¹, Yoshihiko Hirata¹, Daisuke Hira², Takeo Minematsu^{3,4}, Misako Dai^{3,5}, Gojiro Nakagami³, Mao Kunimitsu^{3,6}, Hiromi Sanada^{3,4}
 (1)Saraya Co., Ltd., (2)Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., (3)Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo, (4)Shikawa Pref. Nurs. Univ., (5)Fujita Health Univ., (6)Grad. Sch. Med., Yokohama City Univ.)

Key words microbial flora, microbial diversity

2B02-02 微好気環境を好む新規な有鞘細菌の単離と分類学的特徴付け

○成原 菜, 萩尾 葵, 秋本 凌輔, 武田 穰
 (横国大院・工)
 takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp

【背景・目的】活性汚泥や有機物に富む好気的水圏を好む有鞘細菌 *Sphaerotilus* 属は、マンガン酸化能を有する有鞘細菌である *Leptothrix* 属と近縁で、両者は *Sphaerotilus-Leptothrix* グループにまとめられる。同グループは β -Proteobacteria 綱の有鞘細菌群を成し、水処理と生物鉱物化において重要である。しかし、同グループの分類学的位置付けは未だ不明確であり、新規類縁株の発見が望まれている。当研究室において活性汚泥から単離した有鞘細菌株 (FB-5 株) は *Sphaerotilus* 属に類似の表現型を示したものの、微好気環境を好む点で *Sphaerotilus-Leptothrix* グループとは一線を画すことが判明した。そこで、同株の分類学的特徴づけを試みた。

【方法】FB-5 株と近縁株を比較するにあたって特に重要と考えられる形態学的、生理学および化学分類学的指標を調べた。さらに、全ゲノム配列の解読とこれに基づく系統解析を試みた。

【結果・考察】FB-5 株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列は *Sphaerotilus* 属として妥当であった。脂肪酸組成、主要キノンおよびG+C含量も近縁株とほぼ同じだった。一方、微好気性、鞘形成能の低さ (鞘形成細胞は一部のみのみ)、カタラーゼ陰性の点では同属と異なっていた。ゲノムに加え、一つのプラスミドゲノムの全塩基配列を解読した。既知株とのdDDH解析における類似度は30%以下で *Sphaerotilus* 属への同定は不可能と判断した。ANIおよびAAI解析においては *Sphaerotilus-Leptothrix* グループの分岐群に入らず独自の分岐を形成した。このように、FB-5 株は *Sphaerotilus-Leptothrix* グループとは表現型でも系統分類でも似て非なる存在であり、同グループに近縁な新属と捉えるべきと思われる。すなわち、 β -Proteobacteria 綱の有鞘細菌は好気性の *Sphaerotilus-Leptothrix* グループと微好気性のFB-5 株系に大別できる可能性がある。

Isolation and taxonomic characterization of a novel sheathed bacterium which prefers microaerobic conditions

○Shiori Narihara, Aoi Hagio, Ryosuke Akimoto, Minoru Takeda
 (Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

Key words taxonomy, bacteria, activated sludge, sheathed bacterium

2B02-03 全ゲノム解析に基づく時無し性・極早生コシヒカリの開発

○富田 因則
 (静大・グリーン科技研)
 tomita.motonori@shizuoka.ac.jp

コシヒカリを極早生化してライフサイクルを短縮すれば、北限拡大はもとより、植物工場生産も可能になり、大型台風や豪雨による被害を回避することができる。演者らは、コシヒカリより約2週間早生の突然変異系統「関東79号」から時無し性極早生遺伝子 *el* を見出し、コシヒカリのゲノムに *el* と大粒遺伝子 *Gw2* を組合せて北海道で開花・登熟が可能な大粒のコシヒカリ「コシヒカリ e1Gw2」を初めて開発した (品種登録第28685号)。さらに、コシヒカリの同質遺伝的背景において、*el* のゲノム構造と発現を解析した。

(1)コシヒカリ e1Gw2の育成

コシヒカリの *el* の F_3 で固定した大粒個体にコシヒカリを戻し交雑し B_3F_2 で分離した大粒個体と関東79号との F_2 で分離した極早生大粒型 e1Gw2 ホモ個体を1回親にしてコシヒカリを反復親とする4回の戻し交雑を行った[コシヒカリ*2//コシヒカリ/(コシヒカリ×*el*の F_3 Gw2)/関東79号]の BC_3F_2 において、極早生で大粒の e1Gw2 ホモ型個体、小粒の e1Gw2 型個体、晩生で大粒の e1Gw2 ホモ型個体、小粒の e1Gw2 型個体が、1e1Gw2 : 3e1Gw2 : 3E1Gw2 : 9E1Gw2 に分離し、コシヒカリより15.0%大粒化した「コシヒカリ e1Gw2」を BC_3F_2 で固定した。

(2)コシヒカリ e1Gw2の全ゲノム解析

el との連鎖が認められた第7染色体8.3 Mb 地点の SNP マーカーの近辺には、開花抑制遺伝子 *Ghd7* が座落している。「コシヒカリ e1Gw2」の全ゲノムを解読し、本研究室で構築したコシヒカリの共通配列を参照にしてマッピングして *el* の変異同定を試みた。その結果、e1Gw2 系統の *Ghd7* に変異は無く、野生型であった。しかし、*Ghd7* の5'側35,213 bp 上流にある *Xa21* 様配列 (全長214 bp) 中に e1Gw2 系統特有の SNP が見だし、*Ghd7* の調節に関わっている可能性がある。

Year-round and extremely-early flowering rice variety Koshihikari developed via whole genome sequencing

○Motonori Tomita
 (Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words rice, genome, gene expression analysis

2B02-04 出芽酵母 *Pil* 欠損株が示す 2-デオキシグルコース感受性についての解析

○野村 亘^{1,2}, 宇田 竜成¹, 井上 善晴¹
 (¹京大院・農, ²京大・生理化学研究ユニット)
 nomura.wataru.4r@kyoto-u.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の発酵経路において、*Pil* 欠損株が示す 2-デオキシグルコース (2-DG) に対する高い感受性を示すことを新規に見出した。また、*Pdc1* の核局在には *Pdc1* の C 末端領域が重要であることを見出し、C 末端領域に存在する塩基性アミノ酸の変異により *Pdc1* の核局在が著しく減少することを明らかにした。さらに、C 末端領域の塩基性アミノ酸の変異体は 2-DG に対して高い感受性を示した。これらのことは、*Pdc1* と 2-DG 感受性との関連性において *Pdc1* の細胞内局在性が関与することを示唆している。

Analysis of sensitivity of pyruvate decarboxylase mutant to 2-deoxyglucose in budding yeast

○Wataru Nomura^{1,2}, Ryusei Uda¹, Yoshiharu Inoue¹
 (¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto University)

Key words pyruvate decarboxylase, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, 2-deoxyglucose

2B02-05 ε-ポリ-L-リジンによる酵母 Mpk1 MAP キナーゼの活性化と抗真菌活性の相関性

栗原 優紀¹, 福井 健人¹, 池田 佳代¹, 野村 亘^{1,2}, 竹原 宗範³,
 ○井上 善晴¹
 (¹京大院・農, ²京大・生理化学研究ユニット, ³滋賀県大・工)
 inoue.yoshiharu.5x@kyoto-u.ac.jp

ε-ポリ-L-リジン (ε-PL) は、ある種の放線菌が産生するカチオン性アミノ酸ポリマーで、L-リジンの α-カルボキシ基と ε-アミノ基がアミド結合により 25~35 個重合した化合物である。ε-PL は細菌や真菌などに対して抗菌活性を示すことから食品添加物としての使用が認められているが、その詳細な作用機構はよくわかっていない。ε-PL はヒトに対する毒性はないにもかかわらず、同じ真核生物である真菌に対しては抗菌活性を示すことから、ヒトにはなく真菌に特異的な細胞成分、すなわち細胞壁が ε-PL のターゲットである可能性が考えられる。そこで今回、出芽酵母をモデルとして、ε-PL の作用機構を、酵母の細胞壁完全性維持に関与する cell wall integrity (CWI) 経路に着目して検討した。CWI 経路を構成する MAP キナーゼ経路の構成因子 (Bck1, Mkk1/2, Mpk1) の破壊株はもともと細胞壁合成に欠損があるため、ε-PL に対し感受性が增大することが期待されたが、予想に反し、これらの変異株は ε-PL 耐性を示した。一方、われわれは以前、MAP キナーゼの上流に位置する Pkc1 の構成的活性化変異体の過剰発現株では Mpk1 のリン酸化に伴いキチンが蓄積し細胞死が誘導されること、また Mpk1 欠損株においてはそれが抑圧されることを見いだしている。そこで、ε-PL 処理細胞におけるキチンの分布を観察した結果、ε-PL 処理細胞ではキチンが過剰生産され、細胞壁全体に分布が認められた。また、キチン合成酵素 (Chs3) 欠損株では、ε-PL に対する感受性が低下した。さらに、ε-PL 処理により Mpk1 のリン酸化が確認された。これらのことから、ε-PL は CWI 経路を活性化し、キチンの蓄積を引き起こすことで酵母に対して抗真菌活性を発揮している可能性が考えられた。

Correlation between the activation of Mpk1 MAP kinase and antifungal activity of epsilon-poly-L-lysine in yeast

Yuuki Kurihara¹, Kento Fukui¹, Kayo Ikeda¹, Wataru Nomura^{1,2}, Munenori Takehara³, Yoshiharu Inoue¹
 (¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., ³Dept. Technol., Shiga Pref. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, MAP kinase, signal transduction, ε-poly-L-lysine

2B02-06 微生物由来の抗生物質生産の費用対効果分析

○鄭 美嘉
 (海洋研究開発機構)
 mteil@jamstec.go.jp

病原菌の繁殖は公衆衛生上の大きな懸念である。例えば敗血症などの細菌関連疾患は世界中で 4000 万人以上に影響を及ぼし、年間死亡者数の約 20% を占める。病原体の存在を早期に阻害する有用微生物の活用は、標準的な抗生物質による治療と比較して病原菌の抗生物質耐性がつきにくい等の利点を示唆されている。しかし、多くの環境ではこれらの有用微生物は定着せず、実用性に大きな課題がある。有用微生物の難定着性について明らかにするため、私はモデル微生物である大腸菌に、黄色ブドウ球菌を始めとするグラム陽性菌に特異的に作用する抗生物質 *Vio* の合成回路を実装し疑似有用微生物を作成した (以降 *Vio* 株と呼ぶ)。大腸菌 *Vio* 株とグラム陽性菌を共培養したところ、合成回路を多量発現させた条件では、初期段階ではグラム陽性菌の繁殖を完全抑制したが、*Vio* 株の分裂も停止したため、後期ではグラム陽性菌に淘汰された。一方、少量発現させた条件では初期段階では抑制効果は小さかったが後期ではグラム陽性菌を完全に抑制し *Vio* 株が定着した。これを説明するため、*Vio* 株の細胞内資源配分モデルを構築した。細胞分裂率を生命維持に必要な遺伝子群のタンパク質生成速度に比例すると定義し、かつ細胞内リボソーム数が一定と仮定したとき、合成回路の発現により細胞分裂率が低下する。これにより、*Vio* 株の自己増殖率と *Vio* 合成量の相反関係を導き出した。自己増殖率の低下は *Vio* 株の生存戦略に置いてのコストであり、合成量は便益に通じる。抗生物質で他の細菌の繁殖を抑制することで環境中のリソースを自由に使用できるようになるからである。つまり定着性とは有用物質の産出による便益がコストを上回るかどうかで決定すると考察した。本研究を通して、持続的に感染の脅威と戦う効果的な微生物の解明につながることを期待する。

Cost-benefit analysis of the microbe-based antibiotic production

○Mika Tei
 (JAMSTEC)

Key words microbial community, antibiotics

2B02-07 翻訳制御部位の選択的変異導入による放線菌二次代謝の包括的影響

○大塚 遼¹, 佐藤 悠², 宮崎 健太郎¹, 本田 孝祐^{1,4}, 木谷 茂^{1,3}
 (大阪・生工国際セ, ²山口大院・創成・農, ³青学大・理工・化・生命, ⁴阪大・先端の学際研機構)
 honda@icb.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】放線菌は、生理活性物質を二次代謝産物として生産する工業微生物である。そのゲノム上には、40 種類近い二次代謝産物の合成遺伝子群がコードされているが、実験室環境下では実に 8 割の二次代謝産物を全く生産していないか、もしくは検出水準以下でしか生産していない。これらの二次代謝産物の生産量を増強する方法として、転写制御因子の操作や生合成酵素の翻訳プロファイルを変動させることが有効である。これまでに、放線菌にリボソーム攻撃性薬剤耐性を付与したところ、リボソームに変異が導入されると共に、定常期におけるタンパク質合成が活性化され、新規物質が発見されている。本研究では、放線菌リボソーム RNA 遺伝子への部位特異的な変異導入により代謝変動を誘起し、新たな生理活性物質を見出すことを目指す。

【方法】ゲノム編集技術 Target-AID は、標的配列に含まれるシトシン残基からチミン残基への置換を可能とする。そこで、Target-AID 法により、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の 16S rRNA 遺伝子に含まれる anti-Shine-Dalgarno (anti-SD) 配列に、変異を導入した。

【結果と考察】変異候補株に存在する 6 種類の *rm* 遺伝子群 (*rmA* ~ *rmF*) を解析した結果、*rmF* オペロンの 16S rRNA 遺伝子に含まれる anti-SD 配列に、シトシン残基からチミン残基への置換変異を検出した。現在、同一の置換変異を保持する 3 株について、その二次代謝の変化を 2 種類の色素系抗生物質アクチノロージンとウンデシルプロジギオシンの生産量を指標に精査している。

Global effects of *Streptomyces* secondary metabolism by site-directed mutagenesis of translation regulatory sites

○Ryo Otsuka¹, Yu Sato², Kentaro Miyazaki¹, Kohsuke Honda^{1,4}, Shigeru Kitani^{1,3}
 (¹ICBiotech, Osaka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Agric., Yamaguchi Univ., ³Dept. Chem. Biol. Sci., Aoyama Gakuin Univ., ⁴OTRI, Osaka Univ.)

Key words *Streptomyces*, secondary metabolism, base-editing, HPLC

2B02-08 動物細胞培養廃液のリサイクルに向けた L-乳酸資化性ラン藻の開発

○加藤 悠一¹, 稲辺 宏輔¹, 辻 彩花¹, 原口 裕次², 清水 達也²,
近藤 昭彦^{1,3,4}, 進沼 誠久^{1,3}
(¹神戸大・先端バイオ工研セ, ²東京女子医大・先端生命医, ³神戸大
大院・科技イノベ, ⁴神戸大院・工)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】L-乳酸は動物培養細胞が老廃物として排出する主要な成分である。動物細胞の培養廃液やそれに含まれる L-乳酸の処理は、培養食糧生産やバイオ医薬生産などの産業分野で今後課題になると予想される。持続可能な動物細胞培養の実現に向けて、本研究では光合成微生物であるラン藻・微細藻類による L-乳酸資化技術の開発を目指した。ラン藻・微細藻類は、動物細胞が排出するアンモニアを窒素源として利用可能であり、光合成によって CO₂ から動物細胞の栄養素となる糖類やアミノ酸を生産できる。一方、ラン藻・微細藻類による L-乳酸の資化については、これまでに報告がなかった。

【結果と考察】L-乳酸代謝に関わる遺伝子の保存状況を調べたところ、ほとんどのラン藻・微細藻類が NAD-independent L-lactate dehydrogenase (L-iLDH) などの遺伝子を有しておらず、L-乳酸資化能を有さないことが示唆された。そこで大腸菌 *lldD* (L-iLDH) 遺伝子をラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 に導入し、L-乳酸資化能の付与を試みた。*lldD* 発現株を L-乳酸含有培地で培養した結果、培地中乳酸濃度の減少が確認され、ラン藻によって L-乳酸を消費することに成功した。*lldD* 発現株の L-乳酸消費は、大腸菌 *lldP* (lactate permease) 遺伝子の発現、および培養温度の上昇によって促進した。L-乳酸資化に由来する代謝フラックスの分配を解明するため、*lldD/lldP* 発現株のメタボローム解析を実施した。ピルビン酸やアセチル CoA、2-オキソグルタル酸などの細胞内量が L-乳酸添加条件において増加しており、L-乳酸資化に由来する代謝フラックスが TCA 回路に分配されることが示唆された。本研究では、L-乳酸資化能をラン藻に付与する方法を開発し、光合成微生物によって L-乳酸を処理する戦略を樹立した。これらの知見は今後、動物細胞培養を行う様々な産業分野で活用されることが期待できる。

Development of novel cyanobacteria with L-lactate utilization ability

○Yuichi Kato¹, Kosuke Inabe¹, Ayaka Tsuji¹, Yuji Haraguchi², Tatsuya Shimizu²,
Akihiro Kondo^{1,3,4}, Tomohisa Hasunuma^{1,3}
(¹EGBRC, Kobe Univ., ²Inst. Adv. Biomed. Eng. Sci., TWIns, Tokyo Women's Med.
Univ., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ⁴Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words L-lactic acid, cyanobacteria, metabolic analysis

2B02-09 *Aurantiochytrium* 属のゲノム編集による脂質生産性の向上

○新本 佳子, 渡邊 研志, 秋庸 裕
(広島大院・統合生命科学)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景】海洋性の油糧微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* (オーランチオキトリウム) 属は高度不飽和脂肪酸やカロテノイド類など多様な産業分野で有用な脂質を著量生産する。本研究では、*Aurantiochytrium* 属の更なる脂質生産性の向上を目指し、主に脂質分解に関わる代謝系の遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムで改変して脂質生産に与える影響を評価した。

【方法・結果】*Aurantiochytrium limacinum* SR21 株において脂肪酸の β 酸化の促進機能が予測された AMP-activated protein kinase (Snf1) の 3 つの遺伝子を標的とした。ゼオシン耐性遺伝子の発現カセットを含むドナー DNA を Cas9/guide RNA 複合体を介してゲノム中に挿入して得られた遺伝子破壊株をグルコースまたは酢酸を炭素源として培養し、細胞収量および脂肪酸収量を野生株と比較した。酢酸を炭素源とした場合、Δ*Snf1-2* 株の脂肪酸生産性は培養中期で野生株の 1.5 倍に向上した。一方、Δ*Snf1-3* 株では培養後期に高く、栄養枯渇状態での β 酸化系の活性化を抑制したと考えられた。Δ*Snf1-1* 株の場合は、細胞収量が野生株と比較して顕著に低下したことから、同遺伝子が酢酸資化に重要な役割を果たすことが示唆された。グルコースを炭素源とした場合と合わせて、各遺伝子の改変戦略を考察する。

Improvement of lipid productivity of *Aurantiochytrium* sp. by genome editing

○Kako Niimoto, Kenshi Watanabe, Tsumehiro Aki
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words *Aurantiochytrium* sp., lipid production, genome editing

2B02-10 リン代謝の制御による生物学的封じ込め技術の実用化に向けた研究

○廣田 隆一, 村上 博紀, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 黒田 章夫
(広島大院・統合生命科学)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

近年、遺伝子工学技術や合成生物学の発展を背景に、屋外開放系での遺伝子組換え微生物の開発が行われている。特に微細藻類をはじめとした組換え微生物の第一種使用は、従来のバイオ産業構造を大きく変化させる可能性があるため実用レベルでの運用が期待されている。しかしながら、試験的な例を除き産業化に至った例はまだ無い。一方、現在のカルタヘナ法による規制は、半世紀以上前の技術レベルにもとづいた予防規則に則した運用を基本としており、改めて制度を見直すことも検討されはじめています。「生物学的封じ込め」とは、遺伝子組換え体の培養系外への拡散リスクに備える方法論であり、宿主細胞が限定された環境のみで生育するような性質を遺伝的に付与することで、生物多様性への影響を最小限に抑える効果をもたらす。

我々は、宿主微生物の生育を特殊な還元型リン化合物である亜リン酸 (HPO₃²⁻) に依存させる生物学的封じ込め技術を開発しており、その実用化に向けた研究を展開している。本技術を適用した大腸菌および藍藻は、いずれも完全な亜リン酸依存性を示し、極めて高いレベルの封じ込め効果を発揮するため、第一種使用の検討を進めるための良好なモデルとなる。今回の報告では、主に JST 先端的低炭素化技術開発 (JST-ALCA, 2016~2022 年度) において発表者らが取り組んだ研究によって得られた成果と見出された課題について、技術的側面と規制関係の側面から報告する。そして今後取り組むべき課題や周辺関連技術開発の必要性について議論させて頂きたい。

Application of a biocontainment strategy based on the regulation of phosphorus metabolism

○Ryuichi Hirota, Hiroki Murakami, Takenori Ishida, Takeshi Ikeda,
Hisakage Funabashi, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words biocontainment, phosphorus metabolism, phosphite, biosafety

2B02-11 ポリヒドロキシアルカン酸生成系を利用したスクリーニングによる光合成細菌由来 RuBisCO 高機能変異体の創出

○渡邊 秀平¹, 藤原 悠輝¹, 永田 暁洋¹, 工藤 悠希¹, 松本 直己¹,
齋藤 樹里¹, 喜多 幸², 富田 宏矢³, 蘆田 弘樹³, 松本 謙一郎²
(¹北大院・総合化学,²北大院・工,³神戸大院・人間発達環境学)
mken@eng.hokudai.ac.jp

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) は、光合成の CO₂ 固定反応を触媒する酵素である。本酵素は活性が非常に低く光合成の律速段階であり、CO₂ 資源化の観点からもその活性の向上が望まれている。当研究室では、高活性 RuBisCO 変異体獲得のため、大腸菌を宿主としたポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の生合成系を応用した RuBisCO の酵素活性の迅速な評価系を構築した。本系では、RuBisCO 経路を導入した組換え大腸菌内に蓄積した PHA 顆粒を蛍光色素 Nile Red で染色し、蛍光強度を指標としてポリマー合成量を評価する。ここで、ポリマー合成量が RuBisCO 活性依存的となるため、蛍光強度に基づいて高い活性の RuBisCO 変異体候補が取得できる。本研究では光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来の RuBisCO 遺伝子に、ランダム変異を導入したライブラリーを作製し、これに対して上記スクリーニングを行うことにより RuBisCO 高機能変異体の取得を目的とした。

大腸菌 JW2946 株に、RuBisCO、phosphoribulokinase、PHA 合成酵素、モノマー供給系酵素(PhaA、PhaB)の各遺伝子を導入した。RuBisCO の活性中心残基を含む約 3 分の 1 をコードする領域をターゲットとし、error-prone PCR によりランダム変異を導入した。本ライブラリーを導入した大腸菌株を Nile Red と炭素源である xylose を含む M9 最小培地のプレートで培養し、発生したコロニーの中で蛍光強度が高いコロニーを単離した。取得した変異型 RuBisCO 遺伝子の一つについて、導入株のポリマー合成量の増加をガスクロマトグラフィー分析で確認した。ウェスタンブロットの結果、野生型と変異体で RuBisCO 発現量に優位な差がなく、本変異体は比活性が変化しと推定された。実際、精製酵素を用いた in vitro 解析により、速度パラメーターの変化が確認された。以上より、RuBisCO の高機能変異体の獲得に成功した。

High-throughput screening of highly active RuBisCO mutants using polyhydroxyalkanoate biosynthetic system

○Shuhei Watanabe¹, Haruki Fujiwara¹, Akihiro Nagata¹, Yuki Kudo¹,
Naoki Matsumoto¹, Juri Saito¹, Miyuki Kita², Hiroya Tomita², Hiroki Ashida³,
Kenichiro Matsumoto²
(¹Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,
³Grad. Sch. Hum. Develop. Environ., Kobe Univ.)

Key words RuBisCO, high-throughput screening, PHA, *Rhodospirillum rubrum*

2B04-01 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* によるパーム産業廃棄物を炭素源とした生分解性プラスチックの生産

○中村 優里¹, 壺井 ひかり¹, Prihardi Kahar¹, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹

(¹神戸大・工, ²神戸大院・科技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

パーム油の生産工程で発生する POME(Palm Oil Mill Effluent)と呼ばれる搾油廃水は、高い BOD(生物化学的酸素要求量: 25,000ppm、排水水質基準の 150 倍)および COD(化学的酸素要求量: 40,000ppm)により、環境に大きな負荷を与えている状況である。一方、POME にはオレイン酸やパルミチン酸などの脂肪酸が多く含まれており、これらを有効利用する技術開発が望まれている。本研究では POME に含まれる脂肪酸を炭素源(栄養源)として、生分解性ポリマー(Polyhydroxyalkanoic acid; PHA)の生産を行う酵母株の開発を試みる。我々は、NBRC カルチャーコレクションとの共同研究により、パーム油産業廃棄物バイオマスを原料として、発酵可能な酵母のスクリーニングを行ってきた。その際、発酵阻害物質に耐性をもつ酵母株を網羅的に評価し、油脂酵母株のライブラリーより *L. starkeyi* D35 株を見出した。しかし、選抜した油脂酵母株は PHA 生産能力を持たないため、PHA 生産を確立するために、*phaC1* という外来由来の PHA 合成遺伝子の導入を行った。その後、新たな外来遺伝子 *phaI* の導入に加え、PHA 生産を阻害する POX1 と SCT1 の破壊を行い、PHA 生産量を検討した。得られた組み換え株を培養し、抽出処理を行ったところ、*phaC1* のみを導入した株では PHA と見られる沈殿を確認した。しかし、培養後の乾燥菌体重量からの収率は非常に低い値となった。*phaI* の導入及び POX1, SCT1 の破壊を行った株では、PHA は確認されず、生産量は改善されなかった。今後、PHA 生産経路をより強化するために、新たな *phaP* の導入を行う。また、Lig4 の破壊を行うことで、*L. starkeyi* D35 株の相同組み換え効率を上昇させ、更なる生産量向上を目指す。

Production of Biodegradable Plastics from Palm Industrial Waste as a Carbon Source by the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*

○Yuri Nakamura¹, Hikari Tsuboi¹, Prihardi Kahar¹, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹
(¹Fac. Eng., Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, PHA, PHA synthase

2B04-02 新規生分解性プラスチックの生産に向けた配列制御型共重合が可能な *Ralsotonia eutropha* 改変株の開発

○石原 静流¹, 折田 和泉¹, 松本 謙一郎², 福居 俊昭¹
(¹東工大・生命理工, ²北大院・工)

tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】生分解性高分子である微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の社会実装には、多様な素材種の開発が必要である。近年、キメラ PHA 重合酵素 *PhaC_{AR}* が配列制御重合能を有することが報告された。本研究では PHA 生産能が高い *Ralsotonia eutropha* への *PhaC_{AR}* 導入と代謝改変により、バイオマス原料からブロッコ共重合体が生合成可能な改変株の確立を目指す。

【方法・結果】本研究では *Ilc* 生合成経路中の 2-ケトブタン酸 (2KB) を前駆体とするポリ(3-ヒドロキシブタン酸-b-2-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB-b-2HB)] 生合成に着目した。*R. eutropha phaC_{AR}* 導入株にトレオニンデヒドラターゼのフィードバック阻害を解除する変異を染色体遺伝子に導入し、さらに 2KB を 2HB に還元、ついで 2HB-CoA に変換する外来酵素の遺伝子を発現させた改変株を構築した。この改変株は 2HB 添加培養で最大 30 mol% の 2HB ユニットを含有し、高いブロック性が示唆される共重合体を生合成した。しかし、グルコース単一炭素源培養での 2HB 分率は 0.1 mol% 以下にとどまった。培養上清中の有機酸分析および導入した外来酵素の活性測定から、低 2HB 分率の原因として、2HB から 2HB-CoA を生成する CoA 転移酵素の活性が十分ではないことが強く示唆された。現在、由来の異なる複数の CoA 転移酵素について *R. eutropha* における機能発現を比較し、2HB-CoA 供給に最適な酵素の選別を行っている。また、2HB-CoA 生合成強化のため、内在性の 2KB-2HB 間相互変換について解析を行っている。

Engineering of *Ralsotonia eutropha* for biosynthesis of sequence-regulated copolyesters potentially useful as novel biodegradable plastics

○Shizuru Ishihara¹, Izumi Orita¹, Ken'ichiro Matsumoto², Toshiaki Fukui¹
(¹Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words PHA, PHA synthase, *Ralsotonia eutropha*, biodegradable polymer

2B04-04 コドン最適化による、麹菌 *Aspergillus oryzae* による *Ideonella sakaiensis* 由来 PET 分解酵素の異種発現

○伊出 健太郎¹, 戸所 健彦¹, 佐貫 理佳子², 南はつね², 河野 恵美³, 小高 敦史¹, 吉田 昭介², 石田 博樹¹

(¹月桂冠・総研,²奈良先端大・バイオ,³京工繊大・工芸科学)
ide@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】Polyethylene terephthalate (PET) は石油を原料に製造され、ペットボトルや衣類などに汎用されている合成樹脂である。PET 廃棄物は環境汚染の原因となることから、より効率的なりサイクル方法の開発が望まれる。近年、PET を分解質化する細菌 *Ideonella sakaiensis* が単離された⁽¹⁾。*I. sakaiensis* は PETase により PET を mono (2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) へ分解し、更に MHEase によりエチレングリコールとテレフタル酸に分解する。麹菌 *Aspergillus oryzae* は伝統的発酵産業に古くより用いられてきた糸状菌であり、高い酵素生産・分泌能力を有する。本研究では *A. oryzae* をホストに PETase, MHEase を異種発現させ、麹菌の PET 分解への活用の可能性を検討した。

【方法・結果】麹菌での異種発現のためのコドンを自動生成・採点するアルゴリズムを構築し、これにより PETase, MHEase のコドンを最適化した。この N 末端に菌体外排出シグナルを結合したものを *sodM* プロモーター下で恒常発現するコンストラクトを *A. oryzae* OS11013 *leu-* 株へ導入した結果、PETase, MHEase の菌体外分泌が確認できた。本アルゴリズムは異種たんぱく質のコドンを簡便に麹菌に最適化する手法として汎用性があるものと考えられた。分泌された酵素には MHEase への分解活性が確認されたが、PET への分解活性は見られなかった。しかし水溶性 PET 共重合体への分解活性を有しており、Western blot 解析のバンドサイズからも PETase への糖鎖付加が疑われた。現在、*Hypocrea jecorina* 由来 endo-β-N-acetylglucosaminidase との共発現による PETase の糖鎖除去⁽²⁾についても検討しており、その結果も併せて報告する。

(1) Yoshida S et al., Science, 351, 1196–1199 (2016).

(2) Higuchi Y et al., J. Biosci. Bioeng., 129, 573-580 (2020)

Heterologous expression of *Ideonella sakaiensis* PET-degrading enzymes in *Aspergillus oryzae* with codon optimization

○Kentaro Ide¹, Takehiko Todokoro¹, Rikako Sanuki², Hatsune Minaim², Emi Kawano², Atsushi Kotaka¹, Shosuke Yoshida², Hiroki Ishida¹

(¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., ²Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ³Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, *Ideonella sakaiensis*, PET, codon optimization

2B04-05 有用タンパク質の高生産化に向けた新たなビキア酵母株の開発方針

○伊藤 洋一郎^{1,2}, 石上 美佐³, 寺井 悟朗⁴, 中村 泰之², 橋場 倫子³, 西輝之³, 中澤 光³, 蓮沼 誠久^{1,2}, 浅井 潔⁴, 梅津 光央⁵, 石井 純^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2}

(¹神戸大・先端バイオ工研七,²神戸大院・科技イノベ,³高機能遺伝子デザイン技術研究組合,⁴東大院・新領域,⁵カネカ, 東北大院・工)
yito@dragon.kobe-u.ac.jp

【背景】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* (ビキア酵母) は、菌体増殖能に優れ、タンパク質の分泌生産能が高い特性を有することから、バイオ医薬品としての抗体や産業用として有用な酵素などを生産させる試みが世界的に行われている。しかし目的とするタンパク質によっては、ビキア酵母での生産性が低い、または困難であることが知られている。本研究では、難分泌性タンパク質のビキア酵母での高生産化に向けた 3 つのアプローチ (i) ランダム遺伝子破壊ライブラリーのゲノムワイドスクリーニング、(ii) 得られた遺伝子の多重破壊、(iii) 植え継ぎ培養による分泌生産性向上) を検討した。

【方法・結果】ビキア酵母の非同組換え機構を利用した REMI 法 (restriction enzyme mediated integration) を用いて、ランダム遺伝子破壊株ライブラリーを作製した。今回、難分泌タンパク質である抗リゾチウム scFv 抗体をスクリーニング用のターゲットタンパク質として用い、96 ヶディープウェルプレートを用いたハイスループット評価系を立ち上げて、ランダム遺伝子破壊ライブラリーのスクリーニングを行った。約 19,000 株のランダム遺伝子破壊株をスクリーニングし評価したところ、破壊により抗体生産量を増加させる遺伝子が 6 種類見つかった (野生株と比較して 1.2~1.6 倍)。これらの遺伝子を順に破壊したところ、遺伝子破壊を重ねるごとに抗体生産性が向上した。しかし得られた各遺伝子 (多重) 破壊株は、遺伝子破壊が積み重なるたびにビキア酵母の増殖速度が低下していた。そこで、フレッシュな培地への植え継ぎ培養を 50 回以上繰り返したところ、多くの遺伝子破壊株で増殖が回復し、更に抗体生産性が向上した。本大会では、酵母におけるタンパク質分泌過程でのボトルネックに関しても議論したい。

A streamlined strain engineering workflow with genome-wide screening detects enhanced protein secretion in *Komagataella phaffii*

○Yoichiro Ito^{1,2}, Misa Ishigami², Goro Terai¹, Yasuyuki Nakamura², Noriko Hashiba³, Teruyuki Nishi³, Hikaru Nakazawa⁴, Tomohisa Hasunuma^{1,2}, Kiyoshi Asai⁴, Mitsuo Umetsu⁶, Jun Ishii^{1,2}, Akihiko Kondo^{1,2}

(¹EGBC, Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ³TRAHED, ⁴Grad., Sch., Frontier. Sci., Univ. Tokyo, ⁵Kaneka Corp., ⁶Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words *Pichia pastoris*, high-throughput screening, gene disruption, adaptive evolution

2B04-06 酢酸菌を宿主としたウレアプラズマ由来タンパク質発現の試み

○棚倉 有哉
(関西学院大・理工)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

[目的]酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は食酢製造に用いられ安全性が高く、合成培地での菌体収量も高い。本菌は共存可能な3種の内在性プラスミド (pGE1, pGE2, pGE3) を持ち、これらを用いた遺伝子操作法が確立されており、酸性環境下で機能する組換えタンパク質の取得に有効と期待される(1)。*Ureaplasma parvum* は、膈内などの酸性環境に生息し流産や早産の原因となる。本菌から DNA 修飾酵素 (UPV229) と制限酵素 (UPV230) の活性が確認されているが、大腸菌を宿主とした場合、効率的発現は達成されていない。本研究では *U. parvum* と同じく酸性環境下で生育する *K. europaeus* を宿主に UPV230 を発現させ、機能分子の効率的発現と精製酵素を用いた機能解析を試みた。

[実験方法] pGE2 に UPV229 をクローン化したプラスミド、及び pGE1 をもとに酢酸菌の高発現 *groES* プロモーター下に UPV230 を挿入したプラスミドを構築した。UPV230 が発現した酢酸菌細胞を破碎し Ni-NTA カラムによる精製を行い、切断配列を解析した。

[結果と考察] *K. europaeus* で UPV230 をクローン化するには、事前に UPV229 の発現が必須であった。酢酸菌においても UPV230 の発現には UPV229 による塩基修飾が必要と考えられる。次に UPV229、UPV230 共発現株を用いて UPV230 の発現を行い、本酵素を精製した。精製された UPV230 を用いて DNA 切断における pH 依存性を調べたところ、pH7.5 ではこれまででイソソゾマーとされてきた NlaIII の認識配列 (CATG) と一致したが、pH 6 では認識される配列が異なっていた。

(1) Akasaka, N. et al., *J. Biosci. Bioeng.* 119, 661 (2015)

Trial to express *Ureaplasma parvum* - derived restriction enzyme, UPV230 in acetobacter

○Yuya Tanakura
(Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words acetic acid

2B04-07 *Aspergillus nidulans* 由来新規 aminopeptidase の機能解析

○古澤 晃史¹, 鈴木 貴之¹, 半田 敦也¹, 小林 吉生¹, 加藤 大志¹, 鈴木 裕満¹, 志水 元亨¹, 加藤 雅士¹, 山形 洋平²
(¹名城大院・農, ²農工大院・農)
mkato@meijo-u.ac.jp

【緒言】

糸状菌は細胞外に糖質分解酵素、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素など様々な酵素を分泌する。種々の培養条件にて糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養後、セクレトーム解析したところ、機能が明らかになっているタンパク質とアミノ酸配列レベルで相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。その中で、HP1 から HP4 のリコンビナントタンパク質を *Pichia pastoris* を宿主にして発現させ、それらの機能を解析した。

【方法・結果】

HP1~HP4 の機能を明らかにするために、種々の多糖、*p*-ニトロフェニルグリコシド、アミノ酸-*p*-ニトロアニリド、ペプチド等と反応させた。HP1 とアミノ酸-*p*-ニトロアニリドを反応させたところ、405 nm の吸収が増大した。そこで、alanine-tripeptide および alanine-pentapeptide と反応させ、反応産物を TLC にて分析したところ、どちらでも alanine が生成した。さらに、lysyl-bradykinin と反応後、反応産物を TLC および MALDI-TOF-MS にて分析したところ、N-末端のアミノ酸である lysine が加水分解によって除去されたペプチドが同定された。さらに、N-末端から2番目のアミノ酸である Arg まで除去されたペプチドも生成した。以上から、HP1 は新規の Aminopeptidase (AnAP) であることが明らかになった。現在、AnAP の基質特異性や酵素学的パラメータを測定している。また、AnAP の遺伝子破壊株を作製し、ペプチドやタンパク質分解における AnAP の役割について解析している。

Functional analysis of novel aminopeptidase from *Aspergillus nidulans*

○Terumi Furusawa¹, Takayuki Suzuki¹, Atsuya Hannda¹, Yoshio Kobayashi¹, Hiroyuki Kato¹, Hiromitsu Suzuki¹, Motoyuki Shimizu¹, Masashi Kato¹, Youhei Yamagata²
(¹Grad. Sch. Agric., Meijo Univ., ²Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words *Aspergillus nidulans*, aminopeptidase, peptide

2B04-08 黒麹菌細胞壁構成多糖ニゲランの高生産化に関する研究

○水谷 治, 奥古田 佳世, 阿部 多恵, 外山 博英, 上地 敬子
(琉球大・農)
mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp

ニゲランとは、グルコースが α -1,3-結合と α -1,4-グリコシド結合を交互に連結する直鎖状の多糖であり、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の一部の糸状菌が窒素飢餓時に生産する細胞壁多糖である。我々は、これまでに黒麹菌よりニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) や合成に関与する遺伝子 (*agtC*, *gnsA*) を同定、報告してきた。また、ニゲランのエステル誘導体化物が、透明性と伸縮性を持ったバイオマスプラスチックの製造に適していることも報告している²⁾。このようなニゲランの応用利用を目指すにあたり、黒麹菌野生株のニゲラン生産量は窒素飢餓時でも 50 mg/g dry cell と少なく、ニゲランの生産量を上げることは、ひとつの課題となっている。そこで本研究では、黒麹菌及び黄麹菌を宿主としたニゲラン高生産株の造成を試みた。

マルトース存在下で誘導がかかる麹菌の高発現用プロモーター *PenoA142* の下流に *nisA* 遺伝子を連結した高発現カセットを黒麹菌に導入したところ、親株の約2倍のニゲランを生産した。一方、 α -1,3-グルカン合成酵素遺伝子群を破壊した黄麹菌、 Δ AG 株を宿主に *nisA* 高発現カセットを導入したところ、黒麹菌 *nisA* 過剰発現株より約1.5倍のニゲランを生産した。さらなる高生産を目指して、液体培養で完全に菌糸が分散する黄麹菌、 Δ AG-GAG 株を宿主としたニゲラン高生産やそれぞれの宿主で得られたニゲランの分子量についても報告したい。

1) Uechi et al., *Applied and Environmental Microbiology*. (2021) e0114421

2) Togo et al., *Polymer*. (2021) 123343

Construction of high-producing strains of nigeran in *Aspergillus luchuensis* and *Aspergillus oryzae*.

○Osamu Mizutani, Kayo Yokoda, Tae Abe, Hirohide Toyama, Keiko Uechi
(Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words *Aspergillus luchuensis*, nigeran, gene expression, *Aspergillus oryzae*

2B04-09 *Streptomyces* 属放線菌 NBRC14001 株は lucensomycin を生産するーゲノムマイニングによる発見ー

西村 祥¹, 中村 和音², 山本 美也子², 森田 大地², 黒田 照夫²,
○熊谷 孝則²
(¹広島大・薬, ²広島大院・医系科学)
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】私たちはこれまで、放線菌 *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus* NBRC14001 のゲノム解析により、ポリエンマクロライドである natamycin (NTM) の生合成遺伝子クラスターと類似性を示す I 型ポリケチド生合成遺伝子クラスターを見出し、本株が抗真菌化合物を生産することを報告している [1]。本研究では、NBRC14001 株が生産する抗真菌化合物を明らかにすることを目的とした。【方法および結果】NBRC14001 株の培養上清の1-ブタノール抽出物について、順相カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、および、分取 HPLC を順次実施することにより、*Candida albicans* に対して抗真菌活性を示す化合物を取得した。取得した化合物は、テトラエンマクロライドに特徴的な吸収スペクトルを示し、HPLC 解析により NTM とは異なることが明らかになった。そこで、高分解能 MS 分析を実施し、得られた化合物の分子式を $C_{36}H_{53}NO_{13}$ と推定した。PubChem データベースにて当該分子式を検索した結果、取得した化合物はテトラエンマクロライドである lucensomycin (LCM) ではないかと考えられた。そこで、MS/MS 分析を実施したところ、得られた化合物が LCM であることを支持した。ごく最近、*S. cyanogenus* S136 において、LCM 生合成遺伝子クラスターが報告されている [2]。そこで、NBRC14001 株のクラスターと比較解析を行ったところ、両者は高い類似性を示した。以上の結果から、今回取得した化合物は LCM であると結論付けた [3]。

【文献】

[1] 山本ら, 第70回日本生物工学会大会講演要旨集, p148 (2018).

[2] Yushchuk, O. et al., *Sci. Rep.*, 11, 3507 (2021).

[3] Nishimura, S. et al., *Microorganisms*, 10, 37 (2022).

A *Streptomyces* strain NBRC14001 produces lucensomycin – Finding by genome mining –

Sho Nishimura¹, Kazune Nakamura², Miyako Yamamoto², Daichi Morita², Teruo Kuroda², ○Takanori Kumagai²

(¹Sch. Pharm. Sci., Hiroshima Univ., ²Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words *Streptomyces achromogenes*, genome analysis, polyene macrolide, lucensomycin

2B04-10 プラズマローゲン生産株の探索と効率的プラズマローゲン生産法の検討

○桑原 芽美¹, 入交 伶¹, 藤野 泰寛¹, 本庄 雅則², 馬渡 志郎³, 藤野 武彦³, 土居 克実¹
(¹九大院・生資環, ²九大院・医, ³レオロジー機能食品研)
doi@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】 ビニルエーテル結合を含むグリセロリン脂質であるプラズマローゲン(Pls)は、殆どの哺乳類細胞においてみられ、組織中の総リン脂質の約20%を占める。また、Plsは様々な重要生理機能を持ち、哺乳類では不可欠なリン脂質である。一方、近年腸内菌叢中の絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属や *Bifidobacterium* 属細菌で Pls の存在が明らかとなっているが、生合成経路や機能などは不明である。当グループは Pls 摂取による健康機能や Pls の薬理作用に注目し、Pls 合成能を有する腸内細菌を広く同定する技術を開発している。本研究では、通性嫌気性の乳酸菌に着目し、Pls 生産株の探索と関連遺伝子の解明を目的とした。

【方法・結果】 約50株の乳酸菌培養細胞から脂質を抽出し、HPLC解析によりPls生産を確認したところ、複数株でPlsが検出され、株特異的なPls由来のアルデヒドのピークパターンが認められた。特に耐熱性の *Enterococcus faecalis* K-4株はPlsを高生産したことから、本株の全ゲノムシークエンスを行い、既報のウエルシュ菌のPls合成に機能する遺伝子と比較した。その結果、ウエルシュ菌ゲノム上には2遺伝子からなるPls合成遺伝子(*plsA*, *plsR*)が座乗しているのに対し、K-4株では単一の *plsA* が座乗していた。そこでK-4株の *plsA* を pETite N-His SUMO Kan ベクターに挿入し、大腸菌 BL21(DE3)株を用いて発現を試みた。本組換え株は、ウエルシュ菌 Pls 合成遺伝子組換え株では見られなかった好気培養下での Pls 生産が認められた。これは *Clostridium* 属と *Enterococcus* 属の酸素要求性の違いに因ると考えた。現在、K-4株のPls最適生産条件を検討している。

Isolation of plasmalogen-producing strains and development of its efficient production methods

○Meimi Kuwabara¹, Rei Irimajiri¹, Yasuhiro Fujino¹, Masanori Honsho², Shiro Mawatari³, Takehiko Fujino³, Katsumi Doi¹
(¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ., ³Inst. Rheologic. Funct. Food.)

Key words Plasmalogen, *Enterococcus faecalis*, bioproduction, facultative anaerobic

2B04-11 蛋白質高分泌をもたらす黒コウジカビ *Ire1* 変異体、および出芽酵母を用いた機能解析

○中原 尚太¹, 木俣 有紀¹, 寺本 寛², 中西 貴士², 木俣 行雄¹
(¹奈良先端大・バイオ, ²ノボザイムズ・ジャパン)
kimata@bs.naist.jp

Aspergillus niger は、高い蛋白質分泌能を有し、分泌蛋白質生産のホストとして用いられる。本研究では、*A. niger* の蛋白質分泌能をさらに高めることを目指し、まず、異種性グルコアミラーゼを高分泌する変異株を取得し、*Ire1* (*IreA*) 遺伝子のミスセンス点変異が蛋白質分泌量を増大させることを見出した。*Ire1* は小胞体局在のI型膜貫通蛋白質であり、小胞体ストレスに応じてRNA切断活性を呈することが知られている。*Aspergillus* 属真菌類の細胞内では、*Ire1* は転写因子 Hsc1(HacA) mRNA をスプライシングにより成熟させ、小胞体内在性分子シャペロンなどの発現量を上昇させるとともに(unfolded protein response: UPR)、小胞体を通過する分泌蛋白質などの mRNA を分解する(Regulated *Ire1*-dependent decay of mRNA: RIDD)。各種の遺伝子の発現量を RT-qPCR 法にて調べたところ、本研究で得られた *Ire1* 点変異株では UPR も RIDD も低下していることが示唆された。*Ire1* は小胞体内腔ドメインの末端に位置する天然変性領域 (*Ire1* の活性に対して抑制的に働く) に位置する。本研究ではさらに、その変異部位が *Ire1* の活性に与える影響を精査するため、小胞体内腔ドメインが *A. niger* 由来、サイトゾル側ドメインが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のキメラ *Ire1* を作製した。キメラ *Ire1* は出芽酵母内で小胞体ストレスに応じてホモ多量体化および活性化し、上述の点変異により活性が低下することが分かった。また、天然変性領域による *Ire1* 活性抑制が、その点変異により増強されていることも見いだされた。よって、従来から知られているように UPR を活発化させるだけでなく、*Ire1* の活性を低下させる (RIDD を抑える) ことにより、*A. niger* における蛋白質分泌量を増大させると結論づけた。

An *Aspergillus niger* *Ire1* mutation for high protein secretion and its further analysis in *Saccharomyces cerevisiae* cells

○Shota Nakahara¹, Yuki Kimata¹, Hiroshi Teramoto², Takasi Nakanishi², Yukio Kimata¹
(¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²Novozymes Japan)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, protein folding

2C01-01 CO₂/H₂ 資化性ホモ酢酸菌 *Acetobacterium woodii* の発酵生産向上に向けた酢酸耐性株の単離と解析

○渡辺 直己¹, 加藤 節¹, 青井 謙輝¹, 加藤 淳也¹, 秋庸 裕¹, 松浦 将史², 沢田 健², 中島 豊¹
(¹広島大院・統合生命科学, ²中国電力)
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

化石燃料への過度な依存による多量の排出二酸化炭素 (CO₂) が大きな問題になっている。問題解決の手段の一つとして CO₂ の有効活用を行うカーボンリサイクルが挙げられる。酢酸生産菌である *Acetobacterium woodii* は水素 (H₂) をエネルギー源として CO₂ を資化し、酢酸を生産する。酢酸は油糧微生物オーランチオキトリウム属などを用いた発酵生産により油脂などの有用物質に変換できる。我々はこの特徴を排出 CO₂ の有効活用に貢献するものづくりの技術として応用し、実用化を目指している。

実用化を目指した検討の中 *A. woodii* を用いた酢酸生産の課題として、生産物蓄積(酢酸)による *A. woodii* の増殖阻害が挙げられた。そこで本研究では、糖を基質として高濃度酢酸条件下である 35 g/L で培養を行い、生育してきた株を同濃度の酢酸添加培地に繰り返し継代するという方法で酢酸順応培養を行うことで酢酸耐性株の育種を目指した。その結果、増殖阻害濃度である 35 g/L の酢酸を添加しても高い増殖能を示す株を取得した。*A. woodii* の野生株と獲得した酢酸耐性株で酢酸を 30 g/L 含む培地条件下で糖培養を行い、比較したところ酢酸耐性株の方が約 1.4 倍高い増殖速度、約 1.5 倍高い最高到達菌体濃度を示した。次に、実用により近いかたちの H₂/CO₂ 連続供給型リアクターで野生株と獲得した耐性株を用いて酢酸発酵試験を行ったところ、耐性株の方が高い酢酸生産速度を示した。本発表ではさらに、酢酸発酵により適した酢酸耐性株の開発のために、得られた酢酸耐性株のゲノム解析結果について議論する。

Isolation and analysis of acetate-tolerant strains of *Acetobacterium woodii* to improve bioprocesses of acetate production from CO₂/H₂

○Naoki Watanabe¹, Setsu Kato¹, Yoshiteru Aoi¹, Junya Kato¹, Tsunehiro Aki¹, Masashi Matsuura², Takeshi Sawada², Yutaka Nakashimada¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²The Chugoku Electric Power Company, Incorporated)

Key words acetate, H₂-CO₂

2C01-02 糖消費速度が変化した時のコリネ型細菌中央代謝酵素の量的変動

○森下 風香¹, 浜岸 麻衣², 松田 史生³, 豊田 晃一⁴, 和田 大⁵, 乾 将行⁴, 横田 篤⁶, 植植 陽太^{1,7}
(¹金沢大院・自科, ²金沢大・理工, ³阪大院・情報, ⁴RITE, ⁵摂南大・農, ⁶北大院・農, ⁷金沢大・新学術)
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

微生物が糖消費速度を感知してハウスキーピング遺伝子である中央代謝経路の遺伝子の発現レベルを制御しているかは不明な点が多い。我々はアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) を用いて糖消費速度を感知するフラクセスセンサーを探している。本研究では中央代謝経路の酵素のタンパク質レベルがグルコース消費速度の変化に応じて変動するかを調べることを目的とした。使用菌株として野生株 ATCC 13032 に加えて、単位菌体量当たりのグルコース消費速度が増加する株として H⁺-ATPase 活性を低下させた *atpG* 一塩基置換株 (*atpG*^{817c} 株) を、グルコース消費速度が低下する株としてグルコースの取り込みとリン酸化に関わるホストランスフェラーゼシステムの遺伝子 (*ptsG*) の欠損株を使用した。二次元電気泳動を用いた先行研究では *C. glutamicum* ATCC 14067 株の H⁺-ATPase 活性を低下させると解糖系と TCA サイクルに存在する多くの酵素のタンパク質レベルが増加すると報告されている²。本研究では定量プロテオミクス消費速度の変化に応じて変動するかを調べた。その結果、*atpG*^{817c} 株では野生株と比較して6種類の解糖系酵素と5種類のTCAサイクルの酵素のタンパク質レベルが顕著に増加した。一方、*ptsG* 欠損株ではペントースリン酸経路の酵素群のタンパク質レベルが増加した。グルコース消費速度との相関を調べたところ、5つの酵素が正の相関を、1つの酵素が負の相関を示した。以上の結果から、コリネ型細菌が糖消費速度を感知して中央代謝経路のタンパク質レベルを制御していることが示唆された。

¹Sawada et al., J. Biosci. Bioeng., 113:467-473, 2012

²Li et al., Proteomics, 7:3348-3357, 2007

Quantitative proteomics of central metabolic enzymes in response to modulation of glucose consumption rate in *Corynebacterium glutamicum*

○Fuka Morishita¹, Mai Hamagishi², Fumio Matsuda³, Koichi Toyoda⁴, Masaru Wada⁵, Masayuki Inui⁴, Atsushi Yokota⁶, Yota Tsuge^{1,7}
(¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., ³Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ⁴RITE, ⁵Grad. Sch. Agric., Setsunan Univ., ⁶Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., ⁷InFiniti)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, glucose consumption, proteomics

2C01-03 コリネ型細菌における代謝フラックスセンサーの探索

○山敷 拓人¹, 山口 陽¹, 佐々木 大介², 佐々木 建吾², 豊田 晃一³, 和田 大⁴, 乾 将行³, 近藤 昭彦², 横田 篤⁵, 柘植 陽太^{1,6}
 (1)金沢大院・自科, (2)神戸大院・科技イノベ, (3)RITE, (4)撰南大・農,
 (5)北大院・農, (6)金沢大・新学術)
 ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

微生物が糖消費速度を感じてハウスキープング遺伝子である中央代謝経路の遺伝子の発現レベルを制御しているかは不明な点が多い。本研究ではアミノ酸生産菌のコリネ型細菌において糖消費速度を感じするフラックスセンサーを探索することを目的とした。使用菌株として野生株 ATCC 13032 に加えて、単位菌体量当たりのグルコース消費速度が増加する株として H⁺-ATase 活性を低下させた *atpG* 一塩基置換株 (*atpG*^{817c} 株)¹ を、グルコース消費速度が低下する株としてグルコースの取り込みとリン酸化に関わるホスホトランスフェラーゼシステムの遺伝子 (*ptsG*) の欠損株を使用した。これら 3 株をグルコースを単一炭素源とする合成培地で培養して転写解析を行ったところ、中央代謝経路の 41 遺伝子のうち 13 遺伝子の発現レベルがグルコース消費速度と正の相関を示し、3 遺伝子の発現レベルが負の相関を示した。従って、本菌では糖消費速度の変化に応じて多くの中央代謝経路遺伝子の発現レベルが変動した。これは細胞が糖消費速度を感じてその発現レベルを調整していることを示唆している。糖消費速度を感じするセンサーの候補の一つとして細胞内代謝物が考えられる。そこで次に質量分析計を用いて代謝解析を行い、中央代謝経路の代謝物の細胞内濃度を分析した。その結果、細胞内濃度がグルコース消費速度と相関を示す代謝物として解糖系のホスホエノールピルビン酸とピルビン酸、TCA サイクルのイソクエン酸、フマル酸、コハク酸の 5 つが見出された。以上のようにコリネ型細菌では糖消費速度の変化に応じて中央代謝経路の計 16 遺伝子の転写レベルが変動し、5 種類の細胞内代謝物の濃度が変動した。これらの結果から、細胞内濃度が変動する 5 つの代謝物の中にフラックスセンサーが存在する可能性が考えられた。

¹Sawada et al., J. Biosci. Bioeng., 113:467-473, 2012

Search for metabolic flux sensor in *Corynebacterium glutamicum*

○Takuto Sanjiki¹, Akira Yamaguchi¹, Daisuke Sasaki², Kengo Sasaki², Koichi Toyoda³, Masaru Wada⁴, Masayuki Inui², Akihiko Kondo², Atsushi Yokota⁵, Yota Tsuge^{1,6}
 (1)Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., (2)Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., (3)RITE, (4)Coll. Agric., Setsunan Univ., (5)Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., (6)Coll. InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, flux sensor, metabolomics, glucose consumption

2C01-04 チロシン高生産に向けたコリネ型細菌の代謝工学

○片岡 尚也^{1,2,3}, 谷口 和彌³, 松下一信^{2,4}, 薬師 寿治^{1,2,3}
 (1)山口大・研究推進機構, (2)山口大・中高温微セ, (3)山口大院・創成科学, (4)山口大・農)
 nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

【背景・目的】チロシン (Tyr) は、シキミ酸経路を経て合成される芳香族アミノ酸の一つで、植物ではフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物の前駆体となる。本研究では、コリネ型細菌での植物二次代謝産物の効率的生産を実現すべく、その第一段階として Tyr を高生産可能なコリネ型細菌の代謝工学による造成を目的に研究に着手した。

【方法】フェニアラニン (Phe) 生産に有用であった *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 派生株 AD3 を親株として用いた。Phe 生産コリネ型細菌 KY 10694 由来のフィードバック制御が解除された 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトツソン酸-7-リン酸合成酵素遺伝子 (*arolI^{tr}*) およびコリスミ酸ムターゼ遺伝子 (*csm^{tr}*) をクローニングしたプラスミド pTyr を Tyr 生産プラスミドとして用いた。培養は、444 mM のグルコースを含む 1 L の発酵培地で 2 L 容ジャーフェメンターを用いて行った。

【結果】AD3 を親株に、Phe 生産で有効であった変異である *rmj*, *ppc*, *pyc* 遺伝子の欠損, Phe の Tyr へのリダイレクションを目的としたプレフェン酸脱水酵素遺伝子 *phe4* 欠損の Tyr 生産に及ぼす効果を検証した。その結果、 Δrmj , $\Delta phe4$, Δppc の順で変異を重ねることで、チロシン生成量は、5.5 (AD3), 10.0, 21.7, 24.8 mM と増加していった。意外にも Δpyc の効果は確認されず、これは、生産標的や遺伝子型が違えば、同じ経路を経由して生成される物質でも効果が異なることを示していた。また、 Δrmj を導入した際に、シキミ酸経路の中間代謝物の生成が低下した一方で、Tyr および Phe 生成開始時期が早くなり生成量の増加も確認された。これは、シキミ酸以降の代謝に関連する遺伝子の発現が RNase J により制御されていることを示唆していた。現在、構築した Tyr 生産株を活用して、フェニルプロパノイド類の生産を試みている。

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of tyrosine

○Naoya Kataoka^{1,2,3}, Kazuya Taniguchi³, Kazunobu Matsushita^{2,4}, Toshiharu Yakushi^{1,2,3}
 (1)Org. Res. Initiatives, Yamaguchi Univ., (2)RCTMR, Yamaguchi Univ., (3)Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Yamaguchi Univ., (4)Fac. Agric., Yamaguchi Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, tyrosine, ribonuclease J

2C01-05 *Citrobacter braakii* TB-96 の代謝経路改変による電気発酵における発酵産物の変化

○柳瀬 卓馬, 井上 謙吾, 吉田 ナオト, 清 啓自
 (宮崎大院・農)
 kiyoshi.keiji.p8@cc.miyazaki-u.ac.jp

電気発酵は外部から還元力として電子を与えることで微生物の代謝バランスを変化させる技術として注目されている。*Citrobacter braakii* TB-96 株は、グリセロールからの 1,3-プロパンジオール (1,3-PD) 生産能を有するが、副産物の多さが課題である。当株におけるグリセロールからの 1,3-PD 生産は 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) を中間体とした 2 段階の反応のみで成り立っている。グリセロールから 3-HPA への反応はグリセロールデヒドラターゼ (DhaB)、3-HPA から 1,3-PD への反応はプロパンジオールデヒドロゲナーゼ (DhaT) がそれぞれ関与している。またこの反応では NADH が要求されており、これがグリセロールから 1,3-PD 生産への主要な律速要因である。そのため、電気発酵は当株での律速要因の緩和、1,3-PD 発酵効率の改善に寄与する可能性が高い。本研究では遺伝子組み換え体を用いて電気発酵における 1,3-PD 生産の増強を試みた。

野生株における電気発酵では主な副産物である乳酸の生産量が抑制されたが、1,3-PD の生産量に変化は生じなかった。乳酸生産経路を破壊した Δdh 株においては、電気発酵によって乳酸生産が増大した。また、 Δdh 株からさらにギ酸生産経路を破壊した $\Delta dh\Delta pfl$ 株では、電気発酵により 1,3-PD 生産は増大した。以上の結果から、解糖系以降の代謝経路の改変は電気発酵の結果に有意に影響を与えることが示された。

一方、グリセロールからの 1,3-PD 生産をより効率化するため、グリセロールから 1,3-PD への生産経路である *dhaT* の過剰発現株を作成し、電気発酵による培養試験を行ったところ、1,3-PD 生産の増大は見られず、より上流の代謝である *dhaB* も同様に発現を強化する必要があると示唆された。現在 *dhaB* および *dhaB-dhaT* の各過剰発現株の育種および電気発酵への影響について検討しており、本会においてあわせて報告を予定している。

Changes in fermented products in electro-fermentation by metabolic pathway modification of *Citrobacter braakii* TB-96

○Takuma Yanase, Kengo Inoue, Naoto Yoshida, Keiji Kiyoshi
 (Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki.)

Key words electro-fermentation, 1, 3-propanediol, glycerol, *Citrobacter braakii*

2C01-06 超高ホルムアルデヒド耐性細菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株における C₁ 毒性および C₁ 代謝制御機構の解明

○根本 侑知¹, 井本 誠志³, 島本 真奈³, 米光 裕³, 島田 昌也^{1,2}, 中川 智行^{1,2}
 (1)岐阜大院・自然科学, (2)岐阜大・応生科, (3)和歌山高専)
 t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【目的】

Methylobacterium sp. FD1 株はシックハウス症候群の原因物質ホルムアルデヒド (FA) に対して高い耐性と消去能力をもつことが知られており、2.7 M の FA 溶液をも処理できるこれまでに報告例のない「スーパーメチロトロフ」である。FD1 株は、FA ジスムターゼ (Fdm) により高い FA 消去活性をもつことが報告されているが、Fdm 活性発現がどのように制御されているか、またメタノール代謝において FA 消去系がどのように機能するか、その見解はない。そこで本研究では、FD1 株の FA 消去系の発現制御とメタノール代謝系における機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

FA 消去系の誘導発現制御を調べるため、FA を添加した条件で FD1 株のコハク酸およびメタノール生育と FA 消費を観察した。その結果、コハク酸を炭素源とした場合、FD1 株は FA を速やかに消費し、FA を添加しない場合と同等の生育を示したが、メタノールを炭素源とした場合、FA を添加することでメタノール生育と FA 消費の遅延が観察された。また、メタノール生育細胞におけるメタノール脱水酵素 (MDH) 活性は FA の有無に関わらず同等に誘導されたものの、FA による Fdm 活性の誘導はメタノールにより有意に抑制された。一方、FA による Fdm 活性の誘導はコハク酸では抑制されなかった。以上、FD1 株は Fdm を FA の存在下で誘導するが、メタノールにより発現が抑制されることが明らかとなった。その理由は、メタノール代謝の重要代謝中間体である FA を Fdm が消去することでメタノール代謝を混乱させることにあると思われる。つまり FD1 株は、メタノール/FA 条件下では FA 毒性回避よりもメタノール代謝による生育を優先していることが示唆された。

Analysis of regulation mechanism for C₁ toxicity and C₁ metabolism in the hyper formaldehyde-tolerant bacterium *Methylobacterium* sp. FD1

○Yuchi Nemoto¹, Seiji Imoto³, Mana Shimamoto³, Hiroshi Yonemitsu³, Masaya Shimada^{1,2}, Tomoyuki Nakagawa^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ., (2)Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., (3)Wakayama Natl. Coll. Technol.)

Key words methylotroph, formaldehyde, *Methylobacterium* sp.

2C01-07 コリネ型細菌を用いたカロテノイド化合物生産における糖源の影響

○山口 慎一郎¹, 弘埜 陽子², 原 清敬³, 柘植 陽太^{1,3}
 (¹金沢大院・自科, ²静大・食栄, ³金沢大・新学術)
 ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

カロテノイドは微生物、植物、動物、藻類など多くの生物が有する天然色素であり、高い抗酸化能を示すことから医薬品、化粧品、食品などの産業分野で利用されている。カロテノイドの化学合成はその複雑な構造から困難な場合が多く、生物からの分離・抽出では十分な量が得られないため、微生物による生産が期待されている。微生物を用いたカロテノイド生産は多くの宿主で行われているが、本研究ではアミノ酸生産菌であるコリネ型細菌を用いてカロテノイド化合物の生産株を作製すると共に、生産における糖源の影響を検証することを目的とした。コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 株は非メバロン酸経路を経由してデカブレノキサンチンを最終産物とするカロテノイド合成遺伝子群を有する。はじめに *crtEb* 遺伝子を欠損させることでリコピニン生産株を作製した。作製したリコピニン生産株は、栄養培地を用いたプレート培養ではスクロースを炭素源とした場合にグルコースやフルクトースを炭素源とした場合よりも菌体が赤色に呈色した。液体培養においても、栄養培地にスクロースを加えた場合に強い菌体の赤色化が見られた。しかし、合成培地を用いた液体培養ではスクロースとグルコース、フルクトース間で色の違いは見られなかった。次に *crtEb* 欠損株に *Pantoea ananatis* 由来の *crtY* 遺伝子を導入することでβ-カロテン生産株を、さらに環境 DNA 由来の *blh* 遺伝子を導入することでレチナル生産株を作製した。現在、これらの生産株について詳細な検証を行っているところである。

Effect of sugar source on production of carotenoid compounds using *Corynebacterium glutamicum*

○Shinichiro Yamaguchi¹, Yoko Hirono², Kiyotaka Hara², Yota Tsuge^{1,3}
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., ³Coll. InFiniti, Kanazawa Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, carotenoid, carbon source, metabolic engineering

2C01-08 好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* の代謝改変エタノール生産において可逆性ヒドロゲナーゼ活性が細胞内酸化還元バランスを補正する

○加藤 淳也¹, 小林 駿介¹, 和田 圭介², 竹村 海生¹, 加藤 節¹, 藤井 達也², 岩崎 祐樹³, 青井 謙輝¹, 森田 友岳², 松尾 昭則⁴, 村上 克治², 中島田 豊¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²産総研, ³呉高専, ⁴近畿大・工)
 nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【背景】ホモ酢酸菌は糖と同時に H₂ をエネルギー源および還元力供給源とすることで CO₂ を資化することが可能であり、低炭素指向の混合栄養型発酵生産プロセスの構築が期待される。

【目的】我々は好熱性ホモ酢酸菌 *M. thermoacetica* 代謝改変によって創出したエタノール生産株をモデルに、混合栄養型発酵プロセスの開発を進めている。本研究では、糖に H₂ と CO₂ を追加した培養におけるエタノール生産株の菌体増殖や代謝状態を把握することを目的とした。

【結果・考察】野生株と異なり、エタノール生産株では糖に H₂ と CO₂ を追加すると糖消費速度、エタノール生産速度の低下とともに増殖阻害が見られ、阻害効果は H₂ の分圧に依存した。メタボローム解析の結果、H₂ 添加により NADH が顕著に蓄積されていることが分かった。電子受容体として作用するジメチルスルホキシドを添加したところ、予想通り NADH 量が低下しただけでなく、増殖も回復した。この結果から、増殖阻害の原因は酸化還元バランスの崩壊である可能性が示唆された。さらに、培養中の気相 H₂ 濃度を分析した結果、野生株は添加した H₂ を消費するのに対し、エタノール生産株は H₂ を消費せず、H₂ を添加しない条件下では H₂ を生成していることが分かった。*M. thermoacetica* は糖代謝での NADH 生成に加え、ヒドロゲナーゼ HydABC を持っているため H₂ を還元力とした NADH 生成が可能である。一方、この HydABC の反応は可逆的であることが知られており、エタノール生産株では NADH 消費による H₂ 生成が起こったと考えられる。以上より、エタノール生産株は H₂ 生成で酸化還元バランスを補正しており、結果的に H₂ 添加による生育阻害が生じていると考えられる。混合栄養型発酵プロセスの開発に向けて、代謝改変に応じて変化する酸化還元バランス補正機構を考慮した改良株の開発が重要であることが示された。

Reversible Hydrogenase Activity Confers Flexibility to Balance Intracellular Redox in *Moorella thermoacetica*

○Junya Kato¹, Shunsuke Kobayashi¹, Keisuke Wada², Kaisei Takemura¹, Setsu Kato¹, Tatsuya Fujii², Yuki Iwasaki², Yoshiteru Aoi¹, Tomotake Morita², Akinori Matsushika¹, Katsuji Murakami², Yutaka Nakashimada¹
 (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²AIST, ³Kure Natl. Coll. Technol., ⁴Fac. Eng., Kinki Univ.)

Key words acetogen, metabolic engineering, ethanol fermentation, redox balance

2C01-09 *Rhodococcus jostii* RHA1 におけるエチレングリコール酸化酵素の解析

鈴木 快¹, 清水 哲², 乾 将行^{1,2}
 (¹奈良先端大・バイオ, ²RITE)
 inui@rite.or.jp

【背景および目的】前回大会にて我々は土壌細菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のエチレングリコール酸化経路を利用したグリコール酸生産について報告した。一方で同株のエチレングリコール酸化反応を担う酵素 EgaA の電子受容体、基質特異性といった諸性質は不明であった。そこで今回、EgaA の機能について解析を行った。

【方法と結果】RHA1 株を宿主として EgaA を His タグ融合タンパク質として発現・精製した。精製タンパク質を用いて NAD(P)⁺、ジクロロフェノールインドフェノール、*N,N*-ジメチル-4-ニトロソアニリンを電子受容体とした活性をそれぞれ測定した結果、いずれの条件でもエチレングリコール酸化活性を検出することは出来なかった。次に一部の放線菌が生成するマイコファクトシンが EgaA の生理的な電子受容体として機能する可能性を検討した。RHA1 のゲノムに見出したマイコファクトシン前駆体ペプチド (*mftA*) および前駆体ペプチド認識因子 (*mftB*) の破壊株、糖鎖修飾酵素遺伝子 (*mftF*) 破壊株をそれぞれ作製し、エチレングリコールを炭素源とした生育を観察した結果、いずれの株もエチレングリコールを炭素源として生育できなかった。このことから、マイコファクトシンが EgaA の生理的な電子受容体であることが強く示唆された。次に RHA1 株と *egaA* 破壊株を様々なアルコールを炭素源として培養し、生育を比較した。その結果 *egaA* 破壊株はエチレングリコールを資化できなくなったほか、エタノール、1-プロパノール、1-ブタノール、プロピレングリコールを炭素源とした生育に大幅な遅延が見られた。以上の結果から EgaA はエチレングリコールを含む様々なアルコールの資化に関与することが明らかとなり、これらの化合物を酸化する活性を有することが推察された。

Analysis of the ethylene glycol oxidizing enzyme in *Rhodococcus jostii* RHA1

Kai Suzuki¹, Tetsu Shimizu², Masayuki Inui^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, ²RITE)

Key words glycolic acid, ethylene glycol, *Rhodococcus*

2C01-10 膜脂質組成改変によるマグネトソーム上の膜受容体の活性制御

○森本 啓太, 巴 暁斗, 脇 駿也, 田中 剛, 吉野 知子
 (農工大院・工)
 y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【目的】

磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株は細胞内にリン脂質膜で被覆された磁気微粒子 (マグネトソーム) を生成する。当研究室ではマグネトソーム膜上にヒト細胞由来の膜受容体を発現させることで、創薬研究への応用を目指している。しかし、発現させた膜受容体のリガンド結合能が低下しており、原因の一つとしてヒト細胞とマグネトソームの膜脂質組成の違いが挙げられる。そこで、本研究ではヒト細胞膜に豊富に存在するホスファチジルコリン (PC) とコレステロールを導入することで膜脂質の組成改変を行い、膜受容体の 1 種であるトロポミオシン受容体キナーゼ A (TrkA) 活性への影響を評価した。

【方法】

TrkA または TrkA および PC synthase (PCS) 遺伝子を含むプラスミドを *M. magneticum* AMB-1 株に導入し、TrkA 株と TrkA-PCS 株を得た。これらの株から得られたマグネトソーム (TrkA-MNPs, TrkA-PCS-MNPs) に対して Methyl-β-cyclodextrin を用いたコレステロール導入を行い、コレステロールを導入したマグネトソーム (TrkA-chole-MNPs, TrkA-chole-PCS-MNPs) を得た。4 種類のマグネトソームに対して脂質組成改変および TrkA の発現確認を行った後、TrkA の機能を解析した。

【結果と考察】

TrkA-PCS-MNPs において全リン脂質の約 23% にあたる PC 合成が確認された。また、TrkA-chole-MNPs および TrkA-chole-PCS-MNPs において 5.0, 5.7 μg/mg-MNPs のコレステロール導入が確認された。発現確認の結果、各粒子上に同等量の TrkA が発現していることが示された。そこで TrkA のリガンドとの結合量を確認したところ、膜脂質組成改変により TrkA の比活性が向上し、結果として TrkA の自己リン酸化能およびキナーゼ活性の向上が確認された。従って、膜脂質組成改変によりマグネトソーム膜上の受容体活性の制御が可能であることが示唆された。

Activity control of membrane receptor expressed on magnetosome by modifying membrane lipid composition

○Keita Morimoto, Ryoto Tomoe, Syunya Waki, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino
 (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words membrane proteins, membrane lipids, magnetosome, magnetotactic bacteria

2C01-11 有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 代謝改変株を利用した芳香族化合物生産

○戸田 弘, 金井 保
(富山県大・生医工研セ)
htoda@pu-toyama.ac.jp

【目的】近年、バイオプロセスによる各種化合物の生産が盛んに研究されている。その宿主としては大腸菌が広く利用されているが、疎水性の高い化合物の生産・変換においてはその細胞毒性などにより触媒菌体の失活、死滅を引き起こし、生産効率の低下に繋がる。こうした課題を解決するために、有機溶媒耐性菌を利用したバイオプロセスの開発が研究されている。我々が研究する *Kocuria rhizophila* DC2201 は高い有機溶媒耐性および耐塩性を持ち、また高密度培養が可能なことなどから様々なバイオプロセスへの応用が可能であると考え、その代謝機能を利用した芳香族化合物生産を検討した。

【方法】フェニルアラニンからのスチレン生産を目的として、フェニルアラニン-アンモニリアーゼ(PAL)およびフェニルアラニル炭酸酵素(FDC)の発現を検討した。データベースより各種微生物、植物、酵母由来 PAL 遺伝子および FDC 遺伝子を探査し、その合成遺伝子を *K. rhizophila* DC2201 へ導入しその活性発現を検討した。トリプトファンおよびチロシン合成に関与する *trpE*, *tyrA* をそれぞれ破壊することによりフェニルアラニン高生産株を作成し、破壊株による PAL および FDC 発現とスチレン生産を検討した。

【結果】*K. rhizophila* DC2201 における各種 PAL 遺伝子の発現を検討した結果、AtPAL2(*A. thaliana*), RgPAL(*R. glutinis*), RtpAL(*R. toruloides*) において優れた PAL 活性が確認された。また、*S. cerevisiae* 由来 FDC1 および PADI(フェニルアラニル炭酸酵素)を共発現させることで、桂皮酸からスチレンの生産が確認された。PAL および FDC1/PADI の共発現株において、フェニルアラニンからのスチレン生産が確認されたが、FDC 活性の低下によりその生産量はごく微量であった。現在 *trpE*, *tyrA* 破壊株を用いたスチレン生産および二相系培養における生産性向上について検討中である。

Metabolic engineering of organic solvent-tolerant microorganism *Kocuria rhizophila* DC2201 for producing phenolic compounds

○Hiroshi Toda, Tamotsu Kanai
(Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

Key words metabolic engineering, organic solvent, *Kocuria rhizophila*

2C01-12 ランタノイド依存型 C_1 細菌の植物共生と生育促進技術への応用

○久田 健司¹, 野村 颯人², 根本 侑知¹, 水野 洸介¹, 三井 亮司³, 谷 明生⁴, 井口 博之⁵, 清水 将文^{1,2}, 島田 昌也^{1,2}, 中川 智行^{1,2}
(¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜大・応生科, ³岡山理大・理, ⁴岡山大・資源植物科, ⁵京都先端大・バイオ環境)
t_nakaga@gifu-u.ac.jp

【背景・目的】

メタノールなどの還元型 C_1 化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として利用できる C_1 細菌は、土壌や水圏、植物圏など広く自然界に生息している。 C_1 細菌の一種 *Methylorubrum* 属細菌は植物圏において宿主が放出するメタノールを利用し生育すると考えられている。本細菌のメタノール代謝の初段階酵素であるメタノール脱水素酵素 (MDH) は、補因子としてランタノイド (Ln) を要求する XoxF と Ca を要求する MxaFI があり、両 MDH 共に植物葉上における細菌由来主要タンパク質として同定されている。一方、一部の *Methylorubrum* 属細菌は様々な方法にて植物の成長を促進する働きをもつ。本研究では、私たちが単離した *M. extorquens* GM97 株が植物成長促進能力を示したことから、Ln および Ca 依存型メタノール代謝と植物成長促進機能の関係性を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

GM97 株のシロイヌナズナの成長促進能力を評価した。GM97 株は、シロイヌナズナに接種した場合において、葉や茎の長さ、重量については有意な差は見られなかったものの、根を有意に伸長させた。つまり、GM97 株には根に特化した植物成長促進能力をもつことが明らかとなった。一方、GM97 株の植物成長促進能力においてメタノール代謝系が関与するかどうか観察するため、MDH 遺伝子欠損株 $\Delta mxaF1$ 株および $\Delta xoxF1$ 株を構築し、シロイヌナズナの成長促進能力を観察した。その結果、 $\Delta mxaF1$ 株および $\Delta xoxF1$ 株は野生株と同等の根を伸長させる能力をもち合わせており、メタノール代謝系の欠損は GM97 株のシロイヌナズナの成長促進能力に影響を及ぼさなかった。これら結果から、GM97 株の植物成長促進能力は Ln および Ca 依存型メタノール代謝系とは独立して機能していることが明らかとなった。

Analysis of plant symbiosis of lanthanide-dependent C_1 bacteria and its application to plant growth promotion technology

○Takeshi Hisada¹, Hayato Nomura², Yuchi Nemoto¹, Kosuke Mizuno¹, Ryoji Mitsui¹, Akio Akio¹, Hiroyuki Iguchi¹, Masafumi Shimizu^{1,2}, Masaya Shimada^{1,2}, Tomoyuki Nakagawa^{1,2}
(¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ., ²Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ³Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ⁴IPSR., Okayama Univ., ⁵Fac. Bioenviron. Sci., KUAS)

Key words methylotroph, plant growth promotion, lanthanide

2C03-01 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の有機酸と水素生産の解析

○秋山 実里, 小山内 崇
(明治大院・農)
tosanai@meiji.ac.jp

【目的】ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803(以下 *Synechocystis*)は、光合成を行うバクテリアであり、暗・嫌気条件下では解糖系を用いたエネルギー獲得を行う。解糖系では、NAD⁺の利用が生じるため、NADH の再酸化が重要である。NADH を補酵素として用い、再酸化を担う酵素として、乳酸デヒドロゲナーゼ(DDH)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、ヒドロクサナーゼが挙げられる。また、解糖系では代謝産物が生じ、その生成関連酵素には、DDH、MDH、酢酸キナーゼがある。よって、DDH と MDH は NADH 再酸化と代謝産物生成の両方に関わる酵素であると言える。これらの酵素に関する研究は有用物質生産に関連するものがこれまでも多く行われているが、NADH 再酸化との関係については十分ではない。先行研究により、DDH 遺伝子を欠損させた *Addh* 株と MDH(遺伝子名 *citH*)を過剰発現させた *CitHox* 株が作出された。両変異株は、野生株である *Synechocystis* における NADH 再酸化と代謝産物生成の関連を解析した。

【方法・結果】菌株は *Synechocystis* の GT 株、*Addh* 株、*CitHox* 株、培地は BG-11 培地を使用し、明・好気培養を行った。培養液を濃縮し、暗・嫌気条件下での振とう培養を行った。暗・嫌気培養後、ガスクロマトグラフィー熱伝導度検出器による水素生成量測定と、高速液体クロマトグラフィーによる培地中の乳酸と C4 ジカルボン酸濃度の測定を行った。暗・嫌気培養後では、両変異株の C4 ジカルボン酸、乳酸、水素生成量が関連して変化することが分かった。よって、各酵素が利用した NADH 量が代謝産物量に表れると考えられ、NADH 再酸化と代謝産物生成の関連が示唆された。

Analysis of organic acid and hydrogen production in *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Minori Akiyama, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, organic acid, hydrogen

2C03-02 ラビリンチュラ類による植物残渣を活用したドコサヘキサエン酸 (DHA) 生産系の開発

○樋口 響, IP CHI HEI, WU CHANGYU, 奥田 知生, 勝矢 祥平, 安藤 晃規, 小川 順
(京大院・農)
ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp

ドコサヘキサエン酸 (DHA) はオメガ 3 脂肪酸の一種であり、海水魚の成長に必要な栄養素である。現在の養殖飼料は、主に魚油から抽出された DHA と魚粉を必要とするため、結果として魚を大量に使用することになり、持続性の観点で課題があった。この課題の解決策として、我々は魚粉及び魚油を用いない新規飼料の開発に取り組んでいる。本研究では、魚油を代替する DHA を含有する微生物発酵油脂の生産の検討を行った。具体的には、DHA 蓄積性の油種微生物ラビリンチュラ類に着目し、高い DHA 及び脂肪酸生産性を示す株の単離と、窒素源として様々な植物残渣の活用を検討した。

海水を分離源として微生物のスクリーニングを行い、DHA 高含有油脂生産能と旺盛な生育を示す 6-2 株を選抜した。18S rRNA 配列を対象とした簡易同定の結果、6-2 株が *Aurantiochytrium* sp.であることを明らかにした。本菌は、GYA 培地 (Glucose 15%, Yeast Extract 2%, Artificial sea water 1.8%, Initial pH 6-9) において、安定した生育と高い脂肪酸生産性を示した。続いて、安価で大量に供給可能な窒素源として様々な植物残渣を検討した。脱脂大豆 (Defatted soybean, DS) を麴で発酵させた発酵脱脂大豆 (Fermented Defatted Soybean, FDS) を窒素源として *Aurantiochytrium* sp. 6-2 株の培養を行い、脂肪酸生産性を評価した。結果、6-2 株は DS を直接窒素源として資化できないが、FDS を効率的に資化し、旺盛な生育および高い脂肪酸生産性を示すことがわかった。FDS を用いた最適培養条件において、6-2 株は 31.6 g/L の脂肪酸生産性を示し、総脂肪酸あたりの DHA 含油量が 27.2% となることを明らかにした。*Aurantiochytrium* sp. 6-2 株は、脱脂大豆などの植物残渣を窒素源とした DHA 高含有油脂の生産が可能であり、魚油を代替する植物残渣発酵油脂を提供する有望な株であると考えられた。

Development of docosahexaenoic acid (DHA) production system utilizing plant residues by *Labyrinthula*

○Hibiki Higuchi, Chi Hei Ip, Changyu Wu, Tomoyo Okuda, Shohei Katsuya, Akinori Ando, Jun Ogawa
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words polyunsaturated fatty acid, fermentation, DHA, *Labyrinthula*

2C03-03 シアノバクテリアにおけるカルビン回路活性化時の高速代謝変化の解析

○田中 謙也¹, 白井 智量^{2,3}, 松田 真実³, 近藤 昭彦^{1,2,3,4}, 蓮沼 誠久^{1,2,3}

(¹神戸大・先端バイオ工研セ,²理研・環境資源,³神戸大院・科技イノベ,⁴神戸大院・工) hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

光合成生物のCO₂固定経路であるカルビン回路の酵素は暗期から明期に移ると活性化される。植物の葉緑体では、光照射に伴って光合成電子伝達鎖で生じる電子が被制御酵素のジスルフィド結合を還元・切断することで活性化が起こる。一方、酸素発生型光合成を行う唯一の原核生物であるシアノバクテリアでは、植物で制御されるシステイン残基が保存されていないことや、明期と暗期で抽出したタンパク質の活性には差がなかったことが報告されており、植物と同様な制御系の寄与は少ないと考えられている。精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験によって制御機構解明を目指した報告は散見されるが、*in vivo* で暗期から明期への環境変化に対してシアノバクテリアの代謝状態がどのように変化し、制御されるのかについては十分に理解されていない。

本研究ではシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における暗期から明期へのシフト後の中心代謝物濃度の高速時間変化を、同位体炭素 (¹³C) で標識された標品を用いたキャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)によって絶対定量した。さらに ¹³C の標識ダイナミクスの測定により明期へのシフト直後に活性な代謝経路の同定と CO₂ 固定速度変化の決定を行った。これらの結果から明期へのシフト直後の非定常代謝フラックス変化の可視化に成功した。また、絶対代謝物濃度から各代謝反応の熱力学的自発性を調べた。これらの解析からシアノバクテリアでも暗期から明期に活性化を受ける代謝経路の存在が確かめられた。暗期に蓄積した3ホスホグリセリン酸(3PG)が明期へのシフト後、急激にカルビン回路の中間代謝物へと変換されることが明らかとなった。これらのことから、カルビン回路酵素の活性制御が暗期で3PGを蓄積させ、明期へのシフト後のスムーズな光合成代謝の開始を可能にしているというモデルを提案する。

A quantitative characterization of rapid metabolic dynamics during activation of Calvin cycle in cyanobacteria

○Kenya Tanaka¹, Tomokazu Shirai^{2,3}, Mami Matsuda³, Akihiko Kondo^{1,2,3,4}, Tomohisa Hasunuma^{1,2,3}

(¹EGBRC, Kobe Univ., ²CSRS, RIKENS, ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ⁴Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words Calvin cycle, cyanobacteria, metabolic flux analysis

2C03-04 ハプト藻 *Pavlova* sp. の代謝解析に基づくフコキサンチン高生産技術の開発

○吉田 江里菜¹, 加藤 悠一², 金本 昭彦³, 近藤 昭彦^{1,2,4}, 蓮沼 誠久^{1,2}

(¹神戸大院・科技イノベ,²神戸大・先端バイオ工研セ,³OPバイオファクトリー,⁴理研・環境資源) hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

フコキサンチンは、機能性食品、医薬品、化粧品の添加剤など、幅広い用途に使用されている。ハプト藻 *Pavlova* sp. OPMS30543 (OPMS30543) は、CO₂ からバイオマスを光合成で生産する能力が高く、フコキサンチン蓄積量が多いことから、フコキサンチン生産者として期待されている。以前の研究では、OPMS30543 のフコキサンチン生産に適した窒素源は NaNO₃ であると示唆された。しかし、窒素源がフコキサンチン生産に影響を与えるメカニズムについては解明されていない。本研究では、フコキサンチン生産のための窒素補給戦略を開発するために OPMS30543 に対する窒素源の影響とその背景にある代謝現象と共に解析した。唯一の窒素源として NaNO₃ または NH₄Cl を添加した場合、OPMS30543 細胞のフコキサンチン含有量は NaNO₃ 培地でより多くなった。メタボローム解析の結果、PEP と DXP の蓄積量は NaNO₃, NH₄Cl 培地で有意差はなかった。一方、β-カロテンの蓄積量は NaNO₃ 培地で多く、DXP 代謝後の下流過程が窒素源に影響されることが示唆された。異なる濃度の NaNO₃ を添加した場合、OPMS30543 のフコキサンチン含有量は初期段階ではこれらの条件間でほぼ同じであり、低濃度から順に減少した。メタボローム解析により、DXP と MeCpP は、窒素枯渇後に減少することが明らかになった。このように窒素源とその濃度は OPMS30543 のフコキサンチン生成過程に影響を与えることがわかった。これらの知見から、OPMS30543 を豊富な NaNO₃ で培養する窒素補給戦略は、この微細藻類によるフコキサンチンの商業生産の実現性を高める可能性がある。

Development of high fucoxanthin production technology using Haptophyta *Pavlova* sp. based on metabolome knowledges

○Erina Yoshida¹, Yuichi Kato², Akihiko Kanamoto³, Akihiko Kondo^{1,2,4}, Tomohisa Hasunuma^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBRC, Kobe Univ., ³OP Bio Factory Co., Ltd., ⁴CSRS, RIKENS)

Key words fucoxanthin, marine microalgae, metabolic analysis, nitrogen source

2C03-05 シアノバクテリアにおける Entner-Doudoroff 経路の生理学的役割

○今田 辰海, 戸谷 吉博, 清水 浩 (阪大院・情報)

shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Synechocystis sp. PCC 6803 は、有用物質生産宿主として注目されている光合成微生物である。より合理的な有用物質生産を行う上で、主要な炭素源である糖の異化経路は重要である。解糖経路の1つの Entner-Doudoroff (ED) 経路は、光合成生物においては比較的近年に発見された経路であり、その生理学的機能は従属栄養生物とは異なっていると予測されている。光合成微生物においては、明暗変化が生じたときの光合成暗反応の再活性化に必要な中間代謝物を補充する機能を持つと考えられている。しかしながら、これらの仮説は十分に検証されているとはいえず、代謝フラックス解析による光合成微生物における ED 経路の評価を行った研究は少ない。

本研究では、ED 経路の機能を表現系により反映させるため、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を短期的な光変動条件で培養した。そして、光変動条件における ED 経路の生理学的役割を、ED 経路破壊株との表現型の比較と ¹³C 代謝フラックス解析によって調査した。代謝フラックス分布から、定常光と変動光いずれの条件においても、ED 経路の代謝フラックスが小さく、糖の異化経路としての ED 経路の寄与は小さいことが明らかとなった。一方で、同一条件で ED 経路破壊株の表現系を比較したところ、定常光条件において ED 経路破壊株で増殖の遅れが見られた。また、変動光条件においても ED 経路破壊による増殖低下は大きくなく、代謝フラックス解析で示された結果とは一致しなかった。これらの結果から、ED 経路の中間体補充能力は代謝フラックスに反映されないほど微量であり、CO₂ 固定を補助する役割であることが示唆された。

The physiological role of Entner-Doudoroff pathway in cyanobacteria

○Tatsumi Imada, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words cyanobacteria, metabolic flux analysis

2C03-06 柑橘から分離した *Enterococcus faecalis* DB-5 株のゲノム構造と乳酸生産性に関する解析

○福田 大介¹, Nolasco-Hipolito Cirilo²

(¹GlaxoSmithKline K.K., ²Universidad del Papaloapan Campus Tuxtpec)

daisuke.x.fukuda@gsk.com

【背景】多様な工業的用途を有する乳酸の生産コスト低減は重要な課題である。我々は、高温で乳酸発酵が可能な *Enterococcus faecalis* DB-5 株についてゲノム解析を行うと共に、45°Cでの繰り返し回分発酵により、その乳酸生産能を検証した。

【方法】*E. faecalis* DB-5 株はミカンの果皮より分離し、各種炭素源の資化性は API50 CH にて確認した。ゲノム解析は DNBSQ platform を用いて実施した。SPAdes でアセンブリを行った後、DFAST と RAST server にてアノテーションした。DB-5 株および近縁株の L-乳酸脱水素酵素 (L-LDH) のアミノ酸配列は ClustalW でアラインメントし、MEGA X を用いて最尤法にて分子系統樹を描画した。繰り返し回分発酵による乳酸生産は、stirred tank bioreactor を用いて 4L の培地で実施した (回転数 300 rpm、温度 45°C)。炭素源として sucrose を用いた (Run 1 は 25 g/L、Run 2-11 は 125 g/L)。また窒素源としては yeast extract 5 g/L を使用して培地を構成した。

【結果と考察】*E. faecalis* DB-5 株は glycerol を含む様々な炭素源を利用した。解読ゲノム長は 3,048,630 bp であり、GC 含量は 37.2%であった。アノテーションの結果、ゲノム上に L-LDH が二つ検出されたのに対して、D-乳酸脱水素酵素は存在しなかった。二つの L-LDH 配列は酵素活性にとって重要な領域を高度に保存していた。これらの結果から、本菌株はホモ型発酵性で L-乳酸を生産することが推察された。45°Cでの繰り返し回分発酵では、*E. faecalis* DB-5 株は 26 時間で約 100 g/L の乳酸を生産することが確認された。本菌株はコンタミネーションの懸念が少ない高温条件下 (45°C) でも効率的に乳酸を生産できることから、スケールアップを実施し、バイオマス材料からの乳酸生産系の構築に取り組んでいる。

Whole-genome based characterization of *Enterococcus faecalis* DB-5 isolated from Japanese mandarin orange: an assessment of potential application in lactic acid fermentation

○Daisuke Fukuda¹, Cirilo Nolasco-Hipolito²

(¹GlaxoSmithKline K.K., ²Universidad del Papaloapan Campus Tuxtpec)

Key words lactic acid bacteria, lactic acid fermentation, *Enterococcus*, genome

2C03-07 乳酸菌における環状ジアドニル酸合成および分解酵素の解析

○川本 翔希¹, 藤井 直紀¹, 松原 未佳¹, 甲斐 達己¹, 國枝 尚弘¹,
池松 充基¹, 西村 聡子¹, 三宅 克英², 飯島 信司¹
(¹愛工大・工, ²名城大・理工)
ijimarecdna@aitech.ac.jp

環状ジアドニル酸は細菌で機能するセカンドメッセンジャーとして注目されている。環状ジアドニル酸はグラム陽性菌を中心に広く分布しており、カリウムチャンネルを介する浸透圧の調節、細胞壁や菌体外多糖合成制御などに関与する。通常一種類の環状ジアドニル酸合成酵素を持つが、枯草菌には3種類の合成酵素が存在する。また、分解酵素としてGdpP、PDEなどが報告されている。我々は*Bacillus coagulans*と*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*に注目し、環状ジアドニル酸の生理機能を解明するために研究をおこなっている。まず、両菌株で菌体内環状ジアドニル酸の蓄積を確認した。次に、NCBIデータベースにより環状ジアドニル酸合成及び分解酵素を検索したところ、両株とも唯一の合成酵素CdaAと2種の分解酵素GdpP及びPde2の存在が予想された。このうちcdaA遺伝子は、他のグラム陽性菌と同様にcdaR及びホスホグルコサミンターゼ遺伝子glmMと、また、gdpPはリボソームL9タンパク遺伝子とオペロンを形成していた。想定されるアミノ酸配列から、CdaAには活性中心のDGAモチーフとRHRモチーフが、GdpPとPde2にはDHH/DHHA1ドメインが保存されており活性を有すると考えられた。*B. coagulans*のcdaA遺伝子から膜結合配列を除去したDNA断片をpETBlue2にクローン化し、大腸菌で発現した。大腸菌は環状ジアドニル酸を合成できないが、cdaAクローン化株では環状ジアドニル酸の蓄積が観察されたことより、CdaAが合成酵素活性を持つと推定した。現在、gdpPのノックアウトにより、環状ジアドニル酸の生理機能について解析を進めている。

Analysis of enzymes involved in cyclic-di-AMP synthesis and degradation in lactic acid bacteria

○Shoki Kawamoto¹, Naoki Fujii¹, Mika Matsubara¹, Tatsuki Kai¹,
Naohiro Kunieda¹, Mitsuki Ikematsu¹, Akiko Nishimura¹, Katsuhide Miyake²,
Shinji Iijima¹
(¹Fac. Eng., Aichi Inst. Technol., ²Fac. Sci. Technol., Meijo Univ.)

Key words lactic acid bacteria, signal transduction

2C03-08 食物繊維キシランに対して高い凝集性を示す乳酸菌の特性解析

○山本 万結¹, 矢野 嵩典², 三井 亮司^{2,3}
(¹岡山理大院・理, ²岡山理大・理, ³岡山理大・生命)
tyano@ous.ac.jp

【目的】近年植物由来乳酸菌の保健機能に注目が集まっており、食品への積極的な利用が見られる。本研究では乳酸菌が植物や植物成分と相互作用することに興味を持ち、食物繊維に対して高い凝集性を示す乳酸菌の選抜しその特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】植物由来の物質から機能性物質（フェルラ酸などのフェニルプロパノイド）を遊離するフェルラ酸エステラーゼ（FAE）を生産する菌株を中心に、キシラン（トウモロコシ芯由来）に対する凝集作用を解析した。610 nmにおける濁度が2になるように調整した菌懸濁液と1.2%(w/v)キシラン溶液を試験管内で等量混合し静置する方法でキシラン添加の有無による凝集性の違いを経時的に観察して評価した。その結果、FAE生産菌である*Companilactobacillus alimentarius* KH4（発酵食品キムチ由来）では、キシラン添加条件においてのみ早い凝集とそれによる沈殿が確認できたことから、KH4株は食物繊維キシランに対して特異的な凝集性を示すことが明らかとなった。試験した*C. alimentarius*の中でもKH4株のように凝集性が見られる菌株と見られない菌株があった。KH4株はキシラン（トウモロコシ芯由来）、アラビノキシラン（小麦由来）に対して凝集性を示した一方で、アラビノガラクトン（カラマツ材由来）では凝集性が見られず、キシランの主鎖構造が凝集に関わっている可能性が考えられた。次に、人工基質（フェルラ酸エチル）の分解に伴う培地のクリアゾーン形成により試験菌のFAE活性が評価できることを利用し、選抜菌株のキシランに対する凝集が特定酵素の活性上昇に関与する可能性を実験的に検証した。その結果、KH4株を用いた場合にキシラン添加条件で非添加条件よりも培養後における培地の透明度が高くなったことから、食物繊維キシランと共存させることでKH4株のFAE活性が上昇することが示唆された。

Characterization of xylan-mediated aggregation in lactic acid bacteria

○Mayu Yamamoto¹, Takanori Yano², Ryoji Mitsui^{2,3}
(¹Grad. Sch. Sci., Okayama Univ. Sci., ²Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ³Fac. Life Sci., Okayama Univ. Sci.)

Key words lactic acid bacteria, *Companilactobacillus alimentarius*, aggregation, xylan

2C03-09 乳酸菌 *Lactobacillus curvatus* WDN19 株の D-アスパラギン酸高生産機構の解析

梶谷 賢吾¹, 小林 智宏¹, 高屋 朋彰², 柴田 公彦³, 〇高橋 祥司¹
(¹長岡技術大, ²小山高専, ³福島高専)
shoutaka@vos.nagaokauta.c.jp

【背景と目的】D-アスパラギン酸（D-Asp）は抗生物質原料として有用であり、精子運動性能向上や美容効果を含む多様な生理効果を示すことから、様々な応用的利用が期待されている。ある種の乳酸菌は、アスパラギン酸ラセマーゼ（RacD）により、L-Asp から D-Asp を生産することが知られている。したがって、D-Asp を多量に生産する乳酸菌は D-Asp の工業的な発酵生産に有用と考えられる。我々はこれまでに、高い D-Asp 分泌生産能を有する乳酸菌 *Lactobacillus curvatus* WDN19 株を単離することに成功している。そこで本研究では、*L. curvatus* 基準株である DSM 20019 株と比較することで WDN19 株の D-Asp 高生産機構について解析した。

【方法と結果】MRS 培地において、WDN19 株の D-Asp 分泌生産能は DSM 20019 株の約 14 倍であった。WDN19 株における RacD 活性は DSM 20019 株よりも約 13 倍高かった。これは、WDN19 株における racD 遺伝子の高い転写レベルと RacD 自身の高い触媒活性に起因することが示された。また、WDN19 株における L-Asn からの L-Asp 生合成を担うアスパラギナーゼ（AnsA）の活性は、DSM 20019 株よりも高かった。WDN19 株ゲノムにおいて、L-Asp からの L-Glu 生合成を担うアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspC）遺伝子はアスパラギン酸：アラニン交換輸送体（aspT）遺伝子を含むトランスポゾンにより破壊されており、細胞内 D, L-Asp 濃度は WDN19 株の方がはるかに高かった。以上の結果より、WDN19 株の高い D-Asp 分泌生産能は高い RacD 活性と L-Asp 供給の両方に起因すると考えられた。

The mechanism of high D-aspartate production in the lactic acid bacterium *Lactobacillus curvatus* strain WDN19

Kengo Kajitani¹, Tomohiro Kobayashi¹, Tomoaki Kouya², Kimihiko Shibata³,
〇Shouji Takahashi¹
(¹Nagaoka Univ. Technol., ²Oyama Natl. Coll. Technol., ³Fukushima Natl. Coll. Technol.)

Key words D-aspartate, lactic acid bacteria, aspartate racemase, *Lactobacillus curvatus*

2C03-10 乳酸菌の生育に対する酵母エキスの影響

○齊藤 悠希, 富高 美佐, 二田 昂志郎, 深野 和紘, 梶 直人,
勝又 忠与次
(三菱商事ライフサイエンス)
yuki.saito@mcls-ltd.com

乳酸菌は古くから人類にとって最も身近な微生物種のひとつである。特に近年はプロバイオティクスとしても有用性が見いだされ、乳酸菌自体の需要も高まっており、これら乳酸菌の工業生産においては、菌体生育の効率化は命題である。酵母エキスは、様々な微生物の培地栄養源として広く用いられている。我々は、種々酵母エキスを培地に用いて乳酸菌の増殖を評価し、酵母エキスと乳酸菌の生育との関わりについて調査した。

具体的には、ホモ発酵、ヘテロ発酵それぞれ2種、計4種の乳酸菌について調査した。培地に用いたのは、市販されている酵母エキス7種であり、これらはそれぞれ由来酵母種や、製法の異なるもの（自己消化タイプ、酵素分解タイプ）である。培養試験は主にバイオフォトレコーダーを用いて実施し、それぞれの乳酸菌に対して培地中の酵母エキス種を変えて培養した際の増殖効果を、濁度によって評価した。また、いくつかの酵母エキスについては複数種の組み合わせによる増殖効果を確認した。同時に、使用した各種酵母エキスに含まれる化合物についてはメタボローム解析を行い、それぞれの成分特性を主成分分析にて確認した。

その結果、酵母エキスはその由来酵母種や製法によって成分特性が異なり、それぞれの成分の違いによって各乳酸菌に対する増殖効果に差があることが示唆された。また、使用する酵母エキスを複数種併用することによって、その増殖効果が変化することも示された。本発表ではこれらのメタボローム解析の結果や、各種乳酸菌に対する培地中の酵母エキスの影響についてより詳細に報告する。

Effect of yeast extract on the growth of lactic acid bacteria

○Yuki Saito, Misa Tomitaka, Koshiro Futada, Kazuhiro Fukano, Naoto Kaji,
Tadayoshi Katsumata
(Mitsubishi Corporation Life Sciences Ltd.)

Key words yeast extract, lactic acid bacteria

2C03-11 Fermented stevia improved alcohol-poisoning symptoms in association with changes in the gut microbiota of mice

○Qingmiao Ma, Masafumi Noda, Narandalai Danshiitsoodol, Masanori Sugiyama
(Div. Integr. Health. Sci., Hiroshima Univ.)
sugi@hiroshima-u.ac.jp

When ethanol is administered to mice that cause alcohol poisoning, putrefactive substances are created in the intestinal. In this study, we hypothesized that the plant-derived lactic acid bacterial (P-LAB) strains might convert the substance contained in the herbal extract to a new compound. In the study, mice were fed an ethanol-containing diet with or without stevia extract fermented by P-LAB strain LY45. The mice were euthanized after 14 days and blood was collected. The cecum was also obtained and analyzed their microflora and trimethylamine (TMA). Blood biochemical test showed that intake of ethanol raised the serum aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels. In contrast, both were reduced by the administration of the fermented stevia extract. When the cecum content was cultured, a concentration of TMA was created in the medium. On the other hand, the elevated TMA productivity was reduced in the LY45-fermented stevia-fed mice. Analysis of the microflora implied that the flora was modified by liquor intake. On phylum levels, Bacteroidetes and Proteobacteria phyla were widened, Firmicutes and Verrucomicrobia phyla were diminished. Alcohol intake also raised the abundance of Bacteroides, Lactococcus and Escherichia genera, the genera of Ruminococcus was reduced. All these changes were moderated in the fermented stevia-fed group. In short, the fermented stevia ameliorated the intestinal microflora disturbance and resulted in hepatic inflammation by modifying the intestinal microflora.

Fermented stevia improved alcohol-poisoning symptoms in association with changes in the gut microbiota of mice

○Qingmiao Ma, Masafumi Noda, Narandalai Danshiitsoodol, Masanori Sugiyama
(Div. Integr. Health. Sci., Hiroshima Univ.)

Key words *Lactobacillus plantarum*, alcohol, plant origin lactic acid bacteria

2C03-12 ヘテロ発酵型乳酸菌 *Weissella cibaria* YN2 株の新規なフェルラ酸変換機構の解明

○丸子 ひかる¹, 若槻 壮哉¹, 栢木 宏之², 阿波 里佳², 西谷 洋輔², 栗原 浩誠², 矢野 嵩典¹, 三井 亮司^{1,3}
(¹岡山理大・理, ²丸善製薬・総研, ³岡山理大・生命)
rmitsui@ous.ac.jp

【目的】 ヒトに対する生理活性が知られるクルクミン、クロロゲン酸、フェルラ酸などのフェニルプロパノイド類は水への溶解度が低いものが多く吸収されにくいことから生理活性との矛盾がしばしば議論される。これらは経口摂取すると血中から 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) が検出され、この変換には腸内細菌が関与することも明らかになっている。また直接投与により抗肥満や抗高血糖効果が発現することから HMPA は活性本体化合物の一つであると予想されている。今回ヒト腸内における HMPA 生成について、フェルラ酸と乳酸菌の組合せをモデルとしてホモ型とヘテロ型の乳酸発酵菌において異なる機構があることを明らかにしたので報告する。

【方法と結果】 これまでに *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3 株を用いてホモ乳酸発酵型 HMPA 生成機構を報告しており、乳酸発酵と競合したフェルラ酸還元機構があることを明らかにしてきた。今回は高濃度フェルラ酸を HMPA に変換するヘテロ乳酸発酵菌 *Weissella cibaria* YN2 株の HMPA 生成機構について検討した。ゲノム中には *L. plantarum* と同様のフェルラ酸還元酵素は見いだされなかったことからトランスクリプトーム解析を行い、フェルラ酸の添加により誘導される遺伝子を検索した結果、アセチル CoA が関与する新たな酵素遺伝子を見いだした。また、ヘテロ乳酸発酵との競合を予想し、発酵産物の変化を測定した。その結果、フェルラ酸の添加によりエタノールと乳酸の生成が減少する一方で新たに酢酸の生成が確認できた。以上よりトランスクリプトーム解析の結果と代謝産物の変化から、新規なヘテロ乳酸発酵と競合したフェルラ酸還元による HMPA 生成機構が予想された。

Analysis of novel ferulic acid metabolism in heterolactic fermentation bacterium *Weissella cibaria* YN2.

○Maruko Hikaru¹, Wakatsuki Hiroya¹, Kayaki Hiroyuki², Awa Riyo², Nishitani Yosuke², Kuwahara Hiroshige², Yano Takanori¹, Mitsui Ryoji^{1,3}
(¹Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., ²Research center. Maruzen Ferma., ³Fac. Life Sci., Okayama Univ. Sci.)

Key words lactic acid bacteria, lactic acid fermentation, Ferulic acid, Intestinal metabolites

2D02-01 二次元ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析による清酒香気成分の網羅的分析法の検討

○小林 拓嗣¹, 岩原 信之^{1,2}, 児玉 千聡¹, 岩下 和裕^{1,2}
(¹酒総研, ²広島大・工)
t-kobayashi@nrib.go.jp

【背景・目的】

清酒には 300 以上の成分が含まれており、それらが原料や製造方法によって変化することに加え、多成分の組合せにより味・香りや品質が決まる。そこで、清酒成分と製造条件や味・香りとの関係を解析するため、網羅的な成分解析方法が報告されている。中でも GC-MS を用いた方法は、多くの揮発性成分を検出可能であるが、比較的長い分析時間が必要である。そこで我々は、2次元分離及び高分解能の質量検出が可能である GC×GC-TOFMS を用いて、よりハイスループットな清酒香気成分の網羅的解析方法の開発に取り組んでいる。本発表では、香気成分の抽出方法の検討結果について報告する。

【方法】

香気成分の抽出方法を評価するために香気成分標準品を調製した。香気成分標準品に含まれる成分は、清酒を中心にワインや焼酎の官能評価に重要な成分を選択した計 40 成分について、酒類中に含まれる濃度を参考に 10% エタノール中に混合した。香気成分の抽出方法は、ジクロロメタン抽出 (DCM) とヘッドスペース (HS)、Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)、Solvent Assisted SBSE (SA-SBSE)、SA-SBSE 逆抽出 (逆抽出) を用い、内部標準には 3-Octanol を用いた。GC×GC-TOFMS の分析は Pegasus BT 4D (LECO) により n=3 で行い、分析データは ChromaTOF によりピークピッキング及びピーク同定 (NIST, Wiley) を行った。

【結果】

香気成分標準品に含まれる 40 成分のうち、各抽出方法で検出された成分数は、多い順に 34 成分 (SA-SBSE, SBSE)、32 成分 (DCM)、30 成分 (逆抽出)、26 成分 (HS) であった。現在、分析時間が短く作業が容易な方法として HS、比較的時間がかるがより網羅的なデータを取得可能な方法として SA-SBSE について、最適な分析条件を検討している。

Comparison of extraction methods for comprehensive analysis of sake flavor components by two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry

○Takuji Kobayashi¹, Nobuyuki Iwahara^{1,2}, Chisato Kodama¹, Kazuhiro Iwashita^{1,2}
(¹NRIB, ²Sch. Eng., Hiroshima Univ.)

Key words sake, flavor components, comprehensive analysis, two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry

2D02-02 (講演中止)

2D02-03 麴甘酒中の麴菌体は、マウス樹状細胞を刺激して IL10/IL12 を誘導する

村山 芳香¹, 榎本 利彦¹, 小平 一也¹, 辻 典子^{2,3}, 倉橋 敦¹

(¹海醸造, ²十文字・食品開発, ³日大・医・微生物学/粘膜炎疫・共生微生物学)

a.kurahashi@hakkaisan.jp

麴甘酒は、日本の伝統甘味飲料として古来親しまれてきたが、その健康機能性についても着目されてきている。例えば、消費者が実感している便通改善効果や肌保湿効果があり、機能性関与成分として麴菌体¹やその構成成分²が報告されている。近年、この麴菌の健康機能として抗炎症効果が動物試験にて報告されている³。そこで、本研究では麴菌体を含む麴甘酒にも抗炎症作用があるかどうかを細胞試験にて検討した。マウスより骨髄中の細胞を得て、未分化細胞集団を選択的に回収し、樹状細胞分化培地で分化させて骨髄由来樹状細胞(BMDC)を調製した。96 well plate に 2×10^5 cells/well になるように BMDC 100 μ L を加え、さらに麴甘酒および米糖化液、米糖化液に麴甘酒と同量の麴菌を加えたもの(米糖化液+麴菌)を凍結乾燥して希釈調製した試料を 100 μ L ずつ添加した。これを 24 時間培養し、培養上清中の IL-10 および IL-12 を ELISA にて測定した。その結果、麴甘酒では添加濃度依存的に IL-10 および IL-12 が誘導されるのに対して、米糖化液では誘導されなかった。米糖化液+麴菌では、麴甘酒と同様に添加濃度依存的に IL-10 および IL-12 が誘導された。これらの結果は、麴甘酒に IL-10 および IL-12 の誘導能があり、その機能性関与成分が麴菌体であることを示した。よって既報によって示された抗炎症作用は、麴菌体による IL-10 誘導の結果の可能性が考えられた。次の展開として、TLR2 および TLR4 の中和抗体や Dectin-1 の阻害剤を用いて IL-10 の誘導作用機序を確認したい。引用文献 1) *J. Fungi*, 7, 782(2021), 2) *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 15, 1283-1291(2022), 3) *Food Chem.*, 4, 100063(2022)

Aspergillus oryzae cells in koji amazake stimulate mouse dendritic cells to induce IL10/IL12

Yoshika Murayama¹, Toshihiko Enomoto¹, Kazuya Kodaira¹, Noriko Tsuji^{2,3},

○Atsushi Kurahashi¹

(¹Hakkaisan Brewery Co., Ltd., ²Jumonji Univ., ³Nihon Univ.)

Key words koji amazake, *Aspergillus oryzae*, IL10, IL12

2D02-04 酒粕の長期熟成が香気成分及び呈味成分に与える影響

○榎本 利彦, 小平 一也, 小黒 芳史, 倉橋 敦

(海醸造・研究開発室)

a.kurahashi@hakkaisan.jp

【背景】酒粕は清酒製造の副産物であるが、古くから肉や野菜の漬け込みに利用されてきた。例として奈良漬があり、熟成した酒粕に食品を漬け込むことで、独特な香味の付与と保存性が向上される。近年、酒粕が日本食の枠を超えた食品素材として活用され、酒粕を使用したチーズの開発等が行われてきた。このように酒粕の食品利用は広がってきているが、酒粕そのものの知見、特に熟成についてまとめた報告は少ない。したがって、本研究では熟成によって酒粕中の酵素活性や香気成分、呈味成分がどのように変化するかを把握することを目的に行った。

【方法】令和 1 酒造年度に醸造した特別本醸造と純米大吟醸(海醸造株式会社)の酒粕を踏込み、25℃で 180 日間熟成させた。熟成期間中、経時的なサンプリングを行い、色味は色彩計測器、酵素活性は市販の醸造分析キット、香気成分、アミノ酸と糖類(単糖・二糖)は HPLC, HPLC-MS および GC-MS を用いて測定した。

【結果】熟成期間が長くなるにつれて酒粕の赤、黄色味が増加し、酵素活性が低下することが明らかとなった。香気成分に関して、清酒の吟醸香や脂肪酸エステルは熟成期間を通じて維持、ないしは減少し、熟成香、アルデヒドや硫黄化合物は熟成期間を経て増加した。アミノ酸量と単糖・二糖量は、熟成開始から 7 日目で急激に増加し、麹の残存酵素によって酒粕中のタンパク質やデンプンが分解されたと考えられる。今回の結果から、既報にて報告されている酒粕の熟成に伴う色彩や呈味成分の変化に加え、アミノ酸と糖の種類別の挙動や、清酒の熟成香が酒粕熟成中においても生成されることを明らかにし、酒粕熟成に関する一般的な理解が進んだといえる。今後は、熟成の分子メカニズムについての詳細を解明することで酒粕の食品利用への基礎データとしていきたい。参考文献 1) 醸造協会誌 77 825-830 (1982)

The effects of long aging of Sake lees on volatile and taste components

○Toshihiko Enomoto, Kazuya Kodaira, Yoshifumi Oguro, Atsushi Kurahashi

(R&D Hakkaisan Brewery Co. Ltd)

Key words sake lees, aging, volatile organic compound, oligosaccharide

2D02-05 低温性接合菌 *Helicostylum* sp. JW-1 株における熟成肉製造時に発現する protease 遺伝子の解析

○服部 真帆¹, 村上 周一郎²

(¹明治大院・農, ²明治大・農)

smura@meiji.ac.jp

【目的】低温性の接合菌である *Helicostylum* sp. JW-1 株は熟成肉の製造に使われており、本菌の protease が肉質の軟化に寄与していることが示唆されている。しかしそのプロテアーゼに関する知見はない。また、低温 protease は、低温条件下での食品の加工や肉の軟化、さらに低温で使用できる洗浄用洗剤への配合等が期待される。このような背景から、本研究では、熟成肉製造時に発現している JW-1 株の低温 protease を特定し、その特性を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】JW-1 株において熟成肉の軟化に関与している protease を明らかにするために、まず、JGI のデータベースから *Helicostylum pulchrum* が有するプロテアーゼ(全 55 個)の塩基配列、およびアミノ酸配列を収集し、これらの protease のアミノ酸配列について SignalP ver.5.0 ソフトウェアを用いて、細胞外に分泌生産されると予想される protease 17 個(aspartic protease 9 個, serine protease 8 個)を抽出した。次に、これらのプロテアーゼ遺伝子が本菌のゲノム上に存在するかを確認するために得られた配列データに基づいてプライマーを設計し、本菌ゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。その結果、すべての遺伝子が増幅したことから、候補となる遺伝子が本菌に存在することを確認した。本菌をオーストラリア産モモ肉に生育させ、回収した菌糸体から total RNA を調製し、RT-PCR を実施した。その結果、6 個の aspartic protease および、3 個の serine protease をコードする cDNA の全長の増幅を確認した。今後は得られた cDNA をクローニングし、シーケンシングによって配列を確認するとともに、遺伝子発現系を構築していく予定である。

Analysis of protease genes expressed in production process of dry aging beef in the psychrophilic zygomycetes *Helicostylum* sp. JW-1

○Maho Hattori¹, Shuichiro Murakami²

(¹Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., ²Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words serine protease, aspartic protease, dry aging beef, *Helicostylum*

2D02-06 好熱菌発酵産物の給与が真鯛の肉質と養殖水質に与える影響評価

○碓井 茉依¹, 河内 伸浩², 宮本 浩邦^{1,3,4}, 児玉 浩明¹

(¹千葉大院・園芸, ²河内水産, ³サーマス, ⁴理研・生命医科学)

kodama@faculty.chiba-u.jp

未利用の海産資源を高温・好気条件下で発酵させて得られる好熱菌発酵産物(以下、発酵産物)を家畜や養殖魚に給与すると、成長促進、筋肉中の脂肪量の減少、死亡率の低下などの効果が確認される。さらに養殖魚の場合、養殖排水の汚染の減少が観察される。そこで本研究では、発酵産物の養殖魚への利用拡大を目的とし、養殖真鯛に発酵産物給与試験を実施し、発酵産物給与による排水中の菌叢の変化と魚体に与える影響を調べた。

通常飼料 EP もしくは EP に 5% の発酵産物を含有した飼料を真鯛に 2 か月給与した後、養殖排水及び真鯛の運筋を採取した。採取した排水は Marine 培地に塗布し、培養後得られたコロニーについて 16S rRNA 遺伝子配列から菌種の同定を行った。その結果、非給与群と比較して、給与群では病原性細菌 *Vibrio* に対して抗菌活性をもち、養殖魚に対するプロバイオティクスとしての利用例もある *Phaebacter* が単離された。このことから、発酵産物の給与は養殖魚に対して有益な効果をもたらす微生物の割合を増加させる効果があることが示唆された。

一方、採取した運筋に対し、プロテオーム解析を行った結果、2181 個のタンパク質が検出された。給与群ではリボソーム・翻訳に関わるタンパク質、非給与群では免疫応答に関わるタンパク質が特異的に検出され、発酵産物給与により、運筋において発現するタンパク質に違いが見られることが明らかとなった。

Evaluation of the effect of feeding thermophile fermented products on the meat quality of *Pagrus major* and cultured water quality

○Mai Usui¹, Nobuhiro Kawauchi², Hirokuni Miyamoto^{1,3,4}, Hiroaki Kodama¹

(¹Grad. Horticult., Chiba Univ., ²Kawauchi suisan, ³Sermas, ⁴IMS,RIKEN)

Key words *Pagrus major*, *Phaebacter*, Compost

2D02-07 ヒト腸内細菌叢培養モデルを用いたグリコサミノグリカンの機能性評価

○猪熊 健太郎¹, 佐々木 大介¹, 市川 めぐみ², 大塚 祐也²,
佐々木 建吾¹, 近藤 昭彦¹
(¹神戸大院・科技イノベ,²生化学工業)
daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【背景】グリコサミノグリカンは、アミノ糖を含む2糖の繰り返し構造を持つ直鎖状の多糖であり、動物細胞が分泌する細胞外マトリックスの主要成分である。グリコサミノグリカンは、一部の腸内細菌によって分解、利用されることが報告されている。しかしながら、グリコサミノグリカンの構造は多種多様であり、具体的にどのグリコサミノグリカンのような影響をヒトの腸内環境に及ぼすのかについては、十分に解明されていない。そこで本研究では、神戸大学が開発してきた、ヒトの大腸内に生息する腸内細菌叢やその代謝を *in vitro* で模擬できる KUHIMM (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model) を用いて、グリコサミノグリカンの添加がヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。

【方法・結果】10人の健康者のヒト糞便を接種源とするそれぞれの培養モデルに、7種類のグリコサミノグリカンを0.3% (w/v) ずつ別々に添加して培養し、短鎖脂肪酸の生産量や菌叢構造に及ぼす影響について、非添加培養系と比較した。その結果、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸E、およびヘパロサンの添加によって、酢酸、プロピオン酸の産生が増加した。また、コンドロイチン硫酸Eの添加によって、これらの産生に関与する *Bacteroides* 属細菌の割合が有意に増加した。さらに、培養液上清に含まれる代謝産物について、メタボローム解析による網羅的な相対定量を実施したところ、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸C、コンドロイチン硫酸E、およびヘパロサンの添加によって、リシン、オルニチンなど、側鎖にアミノ基を持つ一部のアミノ酸が顕著に増加していた。これらの結果から、これらのグリコサミノグリカンはヒト腸内細菌を制御する有益な機能性を有することが示唆された。

Evaluation of the functionality of glycosaminoglycans using a human intestinal *in vitro* fermentation model

○Kentaro Inokuma¹, Daisuke Sasaki¹, Megumi Ichikawa², Yuya Otsuka²,
Kengo Sasaki¹, Akihiko Kondo¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²Seikagaku Corp.)

Key words human colonic microbiota, glycosaminoglycan, *in vitro* fermentation model

2D02-08 ヒト腸内細菌叢培養モデルによるガーガム加水分解物の機能性評価

○佐々木 大介¹, 安部 綾², 小関 誠², 佐々木 建吾¹, 近藤 昭彦¹
(¹神戸大院・科技イノベ,²太陽化学株式会社)
daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【背景】食物繊維は胃や小腸で分解・吸収されずに大腸まで届くプレバイオティクスであり、大腸の腸内細菌に分解されることで菌叢・宿主に影響を与え、有益な健康効果を発揮することが報告されている。ガーガム加水分解物 (PHGG) は、グアー豆の種子から抽出された高分子多糖類を部分分解した水溶性食物繊維で、直鎖状にβ-1,4結合したマンノース2分子の側鎖に1分子のガラクトースがα-1,6結合した構造を持つガラクトマンナンである。これまでにPHGGの *in vitro* 分解試験や *in vivo* 摂取試験による腸内細菌叢への影響と生理効果が解析されているが、試験毎に影響を受ける菌種の報告が異なっていた。そこで本研究では、神戸大学が開発したヒト大腸内の腸内細菌叢やその代謝を *in vitro* で模擬できる KUHIMM (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model) を用いて、PHGGがヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を解析した。

【方法・結果】15名の健康者の糞便を接種源とした別々の培養に、分子量の異なる2種類のPHGGをそれぞれ0.2% (w/v) 添加し、その分解率や腸内細菌叢、代謝物への影響を解析した。その結果、どのPHGGも他の水溶性食物繊維よりも腸内細菌の分解を受けやすく、9割程度の分解率が観察された。また、高分子多糖類を分解できる *Bacteroides* 属内の特定菌種の増加と短鎖脂肪酸の中でもプロピオン酸産生のみが増加が観察された。さらに、有用菌として知られる *Faecalibacterium* 属、*Bifidobacterium* 属、*Lachnospiraceae* 科細菌など、一部、高分子多糖類を分解できない菌種の増加が、他の報告と同様に検出された。これらの結果から、KUHIMMによる機能性評価によって、実際にヒトが摂取することなく介入試験の結果と同等且つ追加情報が得られることが示され、分子量の異なる2種類のPHGGがいずれもヒトの健康に有益なプレバイオティクスであることが確認された。

Partially hydrolyzed guar gums with different molecular weights influence a human intestinal *in vitro* fermentation model

○Daisuke Sasaki¹, Aya Abe², Makoto Ozeki², Kengo Sasaki¹, Akihiko Kondo¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²Taiyo Kagaku Co., Ltd.)

Key words human colonic microbiota, partially hydrolyzed guar gum (PHGG), *in vitro* fermentation model, dietary fiber

2D02-09 微細藻類サプリメント Pavlova MCT+の機能性評価

○宮古 圭, 倉場 静子, 豊里 恵, 秋山 清隆, 藤原 健史, 渡邊 崇史,
金本 昭彦
(オービーバイオファクトリー)
kiyotaka.akiyama@opbio.com

近年、光合成による高い物質生産効率を誇る微細藻類がSDGs (持続可能な開発目標) の観点から注目され、食品・化粧品等の分野において世界中で研究開発が進められている。我々は沖縄をメインフィールドとして微細藻類を採集、ライブラリーを構築し、上記分野におけるシーズ探索を行っている。その中で沖縄にて採集された微細藻類 *Pavlova* sp. OPMS30543 株が、高い抗酸化作用や抗肥満作用を有する海洋性カロテノイドのプロキサンチンを高生産することを見出した。さらにOPMS30543株の高密度培養に成功し、本株の乾燥藻体をMCTオイル中に分散させたサプリメント (Pavlova MCT+) を開発した。本サプリメントの機能性を調べることを目的としてサプリメント内容物の各種生理活性試験を行ったところ、ヒスタミンH1受容体阻害活性 (抗アレルギー)、β-セクレターゼ阻害活性 (抗アルツハイマー) および免疫亢進活性を有することを見出した。花粉症などのI型アレルギーは過剰に分泌されたヒスタミンが原因となり発症するため、ヒスタミンの作用標的であるH1受容体の機能阻害は抗アレルギー活性の指標となる。H1受容体を強制発現させたHEK293細胞に内容物およびヒスタミンを添加したところ、ヒスタミンシグナルの減弱が確認された。β-セクレターゼはアルツハイマー病の原因と考えられているアミロイドβの産生に関わる酵素であり、この酵素の働きを阻害する化合物はアルツハイマー病の予防・治療への応用が期待される。内容物は *in vitro* でのアッセイ系において本酵素の阻害活性を示した。免疫亢進活性ではマウスマクロファージ様細胞J774.1細胞を用いて、免疫亢進に関与する遺伝子群の発現上昇の有無を調べた。その結果、内容物を添加した細胞において各種白血球の活性化や分化、および走化活性を有するIL-1β、IL-10、IL-12β、CCL2遺伝子の発現上昇が確認された。

Biological activities of the microalgae supplement Pavlova MCT+

○Kei Miyako, Seiko Kuraba, Megumi Toyozato, Kiyotaka Akiyama,
Takeshi Fujiwara, Takafumi Watanabe, Akihiko Kanamoto
(OP BIO FACTORY)

Key words microalgae, alzheimer's disease, allergy, immune activation

2D02-10 *Bacillus macerans* 由来のシクロデキストリン合成酵素によるオレウロペインへの糖転移反応

○張 易軒, 張 羽嘉, 吉田 滋樹
(筑波大院・生命環境)
yoshida.shigeki.gf@u.tsukuba.ac.jp

地中海式食事はオリーブオイルの使用により、心血管疾患や糖尿病、癌などの予防になることが知られている。その有効成分の一つであるオレウロペインは天然抗酸化化合物であり、アテローム性動脈硬化症のリスクを軽減し、冠状動脈性心疾患の発症率を下げることができる。また、優れた抗炎症作用を示し、低濃度条件下で腫瘍壊死因子TNF-α産生の有意な阻害効果も報告されている。オレウロペインはオリーブオイルよりオリーブ葉の方に豊富に含まれているため、オリーブの葉の利用に注目が集まっている。しかし、オレウロペインは強い渋味を持っているため、オリーブ葉製品は広く消費者に受け入れられていない。渋味はポリフェノールが人の唾液タンパク質との結合・凝集によって呈味されるが、生体成分間との分子間相互作用により結合するため、分子の極性を変化させることで味質を変化させることが可能となる。そこで本研究では疎水性を低下させることに着目し、渋味を抑制するためオレウロペインに糖を付加することで親水性を増加させることを試みた。

Aspergillus kawachii (NBRC 4308)、*Bacillus macerans* (NBRC 3490)、*Streptomyces* sp. K19-1の3種類の菌は糖転移酵素を生産するため、本研究ではこれらの酵素を用いて、オレウロペインと反応させその糖付加能を確認した。その結果、*Bacillus macerans* (NBRC 3490) が生産するシクロデキストリン合成酵素のみ、オレウロペインに糖を付加することが可能であった。またLC-MS、NMRで構造を確認したところ、オレウロペインのグルコース部位にさらにグルコースを数残基付加した化合物の生成が確認された。この新規化合物はオレウロペインに比べて味質の改善が期待され、豊富な機能性を持つオレウロペインを食品、医薬品への用途開発を促進し、人々の健康および寿命の延長に貢献することが期待される。

Transglycosylation reaction of oleuropein by cyclodextrin glucanotransferases from *Bacillus macerans*

○Yiqian Zhang, Yujia Zhang, Shigeki Yoshida
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words oleuropein, cyclodextrin glucanotransferase, transglycosylation

2D02-11 Multidisciplinary metabolomics of meglutol: From foodomics to epidemiology

○Marvin Nathanael Iman¹, Danielle E. Haslam^{2,3},
Shilpa N. Bhupathiraju^{2,3}, Jessica Lasky-Su², Sastia Prama Putri¹,
Eiichiro Fukusaki¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Med., Brigham and Womens Hosp. and Harvard Med. Sch., ³Dept. of Nutrition, Harvard T.H. Chan Sch. of Public Health)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Meglutol (3-hydroxy-3-methylglutarate) is a natural compound with plasma LDL-lowering potential. To date, only few foods with dense concentrations of this metabolite have been identified. In addition, its association with the risk of incident cardiovascular diseases remains unknown. In this study, we used gas chromatography/mass spectrometry-based analysis to determine the meglutol concentrations of various foods, particularly those belonging to the legume groups. We show that tempe fermentation using *Rhizopus oligosporus* can significantly increase meglutol concentrations of legumes. Furthermore, we report the association of plasma meglutol with lower LDL concentrations. We expect these findings to increase tempe's value as a healthy food source.

Multidisciplinary metabolomics of meglutol: From foodomics to epidemiology

○Marvin Nathanael Iman¹, Danielle E. Haslam^{2,3}, Shilpa N. Bhupathiraju^{2,3},
Jessica Lasky-Su², Sastia Prama Putri¹, Eiichiro Fukusaki¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Dept. Med., Brigham and Womens Hosp. and Harvard Med. Sch., ³Dept. of Nutrition, Harvard T.H. Chan Sch. of Public Health)

Key words Meglutol, Tempe fermentation, Food metabolomics, Epidemiology

2D04-01 *Aspergillus luchuensis* の株間比較による色素関連遺伝子の解析

○塚原 正俊¹, 久貝 樹幹¹, 東 春奈¹, 水谷 治², 外山 博英²
(¹バイオジェット, ²琉球大・農)
tsuka@biojet.jp

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を含む黒色アスペルギルス類は、黒色色素を生産するという特徴がある。これまでに、*A. niger* において色素生産に関連する4つの遺伝子 (*pksP/fwnA*, *pptA*, *olvA*, *brnA*) が見いだされ、また、白麹菌 *A. luchuensis* NBRC4308 (カワチ株) では、*pksP/fwnA* の変異が白色化の原因であることが報告されている。一方、多くの *A. luchuensis* については色素生産性と遺伝子についての関係性は明らかになっていない。今回、*A. luchuensis* の詳細な系統解析により、それぞれの株の系統と色素生産性について検討した。詳細な系統解析では、*A. luchuensis* は A および SK の2グループに大別され、さらに、SKグループは SK1 および SK2 グループに分かれることがわかった。これらのうち、カワチ株を含む SK2 グループの株は共通する *pksP/fwnA* の変異を有し、これらの株のコロニーは全て白色系であった。一方、SK2 グループ以外で白色系の株があるかどうか検討したところ、白色系のコロニーを呈する RIB2642 が A グループに属することが確認された。この RIB2642 において、色素生産に関連する4遺伝子 (*pksP/fwnA*, *pptA*, *olvA*, *brnA*) を確認したところ、いずれも白色化の原因と考えられる変異は確認できなかった。そこで、全ゲノム情報を用いて新たな白色化の原因遺伝子を検討し、4遺伝子を候補として抽出した。現在、これらの遺伝子について、色素生産との関連性の解析を進めている。

1) 塚原正俊、東春奈、水谷治、山田修、外山博英、全ゲノム情報を用いた黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の系統解析、日本醸造協会誌、117、6、413-421、2022

Analysis of pigment-related genes by comparative phylogenetic analysis of *Aspergillus luchuensis*

○Masatoshi Tsukahara¹, Tatsumoto Kugai¹, Haruna Azuma¹, Osamu Mizutani²,
Hirohide Toyama²
(¹Biojet, ²Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words *Aspergillus luchuensis*, phylogenetic analysis, pigment

2D04-02 亜麻仁粕の麴化によるシアン化合物の低減とその推定メカニズムの解析

戴 鳳凰^{1,2}, 曾 聲儀¹, 満生 萌水¹, 稲葉 繁樹¹, 柳田 晃良³,
古澤 省吾⁴, ○北垣 浩志^{1,2}
(¹佐賀大・農, ²鹿児島大院・連農, ³西九州大健康栄養学部, ⁴株式会社エヌ・ピー・アール)
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

亜麻仁には心疾患予防効果のあるオメガ3多価不飽和脂肪酸が豊富に含まれることから、近年生産や輸入が急増している。そのため亜麻仁粕も急増しており、その有効活用策が求められていたが、シアン化合物が含まれるためその利用が制限されてきた。植物の種子に含まれるシアン化合物の害は古来より認識されていたことから、シアン化合物除去の技術はこれまでにも多く開発されてきた。例えば西暦1117年に中国で成立した北山酒経には漢方薬としても使われる、あんずの種である杏仁を麴化した杏仁麴が記載されている。しかしこれまで亜麻仁やその粕の麴化によるシアン化合物分解活性があるかについての報告はなくそのメカニズムの報告もなかった。そこで亜麻仁粕に麹菌 *Aspergillus oryzae* を繁殖させそのシアン化合物濃度を測定したところ、シアン化合物が低減していることが確認できた。この低減が酵素によって起きるとする仮説を検証するため亜麻仁粕からタンパク質を抽出・粗精製し、シアン化合物のリナリンに作用させたところ確かに反応時間に応じて分解された。この分解は亜麻仁粕から同様に抽出したタンパク質画分では起きなかったことから、麹菌がシアン化合物分解酵素を生産したと考えられた。この分解は100°C10分の加熱で阻害されたことからシアン化合物の低減が酵素によるという仮説は支持された。これらの結果から、亜麻仁粕に含まれるシアン化合物が麹菌の生産する酵素により分解されるというメカニズムが初めて明らかになった。

Estimation of the mechanism for the decrease of cyanides in flaxseed cake fermented with koji *Aspergillus oryzae*

Huanghuang Dai^{1,2}, Hsin Tseng¹, Moemi Mansho¹, Shigeki Inaba¹,
Teruyoshi Yanagita³, Shogo Furusawa⁴, ○Hiroshi Kitagaki^{1,2}
(¹Fac. Agric., Saga Univ., ²United Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ.,
³Department of Health and Nutrition Science, Nishikyushu University, ⁴N.B.R. Co. Ltd.)

Key words Koji making

2D04-03 乾節製造に用いられる糸状菌 *Aspergillus chevalieri* の生活環に關与する遺伝子の解析

○平松 健太郎¹, 門岡 千尋², 森 一樹³, 田代 康介³, 奥津 果優¹,
吉崎 由美子¹, 高峯 和則¹, 玉置 尚徳¹, 二神 泰基¹
(¹鹿児島大・農, ²崇城大・生物生命, ³九大院・農)
futagami@agri.kagoshima-u.ac.jp

乾節はカビ付けと天日干し工程の有無により、枯節と荒節に分類される。カビ付けと天日干しを繰り返すことで、枯節の風味はまろやかになる。カビ付けの方法は、優良カビを噴霧する方法とカビ付け室で自然に生育するカビを用いる方法がある。先行研究において、後者の方法でカビ付けを行った枯節表面の菌叢解析が行われ、*Aspergillus chevalieri* の有性世代の菌株が優勢であることに加えて、無性世代の菌株も存在していることが分かった。一般的に乾節の製造に用いられるカビは有性世代であることが知られている。先行研究における無性世代の *A. chevalieri* は、カビ付け室という乾節カビにとって生育しやすい環境で有性生殖の能力を失ったために出現したのではないかと考えた。そこで本研究では、*A. chevalieri* の生活環に關与する遺伝子の同定を目的とした。まず、枯節表面より分離された *A. chevalieri* の有性世代と無性世代の菌株のゲノムを比較したところ、無性世代の菌株には4つの遺伝子 (*ACHE_40145A*, *ACHE_40420A*, *ACHE_50514S*, *ACHE_70660A*) に機能が失われるような大きな変異が入ることが示唆された。これらの遺伝子を解析対象として、有性世代をもつモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるホモログ遺伝子の破壊と *A. chevalieri* の無性世代の菌株に有性世代由来の遺伝子導入を行ったが、生活環に關与する遺伝子の同定には至らなかった。また、形質転換効率が低いことを実感したため、CRISPR-Cas9 技術を利用してゲノム編集によって、*A. chevalieri* の実験用宿主を構築することにした。含硫アミノ酸の合成に關与する *sC* 遺伝子のノックアウトを試み、ORF とその上流を含む1536 bp が欠損した株を取得した。この株はメチオニン要求性を示したため、今後は *sC* 遺伝子をマーカーとして NHEJ に關与する *ligD* 遺伝子のノックインを行う予定である。

Analysis of the genes involved in the life cycle in *Aspergillus chevalieri* used for the production of katsuobushi

○Kentaro Hiramatsu¹, Chihiro Kadooka², Kazuki Mori³, Kosuke Tashiro³,
Kayu Okutsu¹, Yumiko Yoshizaki¹, Kazunori Takamine¹, Hisanori Tamaki¹,
Taiki Futagami¹
(¹Fac. Agric., Kagoshima Univ., ²Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Aspergillus chevalieri*, katsuobushi, life cycle

2D04-04 黄麹菌および黒麹菌の分生子への音波照射と酵素活性に及ぼす影響

○松本 拓¹, 坂本 響², 橋本 萌加², 小島 幸治¹, 三枝 敬明¹, 寺本 祐司¹
(¹崇城大院・工, ²崇城大・生物生命)
kojimak@bio.sojo-u.ac.jp

【背景・目的】近年、醸造分野では「音」を利用した食品開発が行われている。例えば、ワインの発酵過程において乳酸菌に対する音波照射が乳酸の生産量増加や増殖速度の促進に寄与することが報告されている(Noguchi *et al.* 2012)。当研究室では、音波が麹菌の酵素生産能に与える影響について研究を行ってきた。酒造用黄麹を用いた製麹過程において音波照射した結果、米麹のグルコアミラーゼ活性の低下が確認された(Saigusa *et al.* 2015)。予め音波照射をした分生子で製麹を行っても、音波の効果が反映され、グルコアミラーゼ活性が低下することがわかった。また、酒造用白麹を用いて製麹するとグルコアミラーゼ活性は増加する結果が得られた(Matsumoto *et al.* 2021)。本研究では、泡盛や焼酎醸造に使用される黒麹菌に対する音波照射の影響について黄麹菌と比較した。【方法・結果】黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 NBRC100959 株と黒麹菌 *A. luchuensis* NBRC4119 株を使用した。PDA 固体培地で培養し、分生子 0.1 g を回収し、特定の周波数の音波を 5.0 dB の音圧にて 25°C で 24 時間照射した。この分生子を蒸米に散布し、黄麹菌の製麹条件に合わせて 30°C で 36 時間静置した。抽出した酵素の活性を測定した。音波照射なしの条件では、黄麹菌と黒麹菌のグルコアミラーゼ活性はそれぞれ 374±17.0 (U/g 米麹)、114±11.1 (U/g 米麹)であった。一方、酸性プロテアーゼ活性はそれぞれ 54.0±16.6 (kU/g 米麹)、66.7±18.2 (kU/g 米麹)であった。16.0 kHz の音波照射により、グルコアミラーゼ活性は黄麹菌で 0.87 倍に低下し、黒麹菌では 1.02 倍と変化は見られなかった。酸性プロテアーゼ活性は 1.0 kHz の音波照射により、黄麹菌は 1.04 倍と変化はみられず、黒麹菌は 0.87 倍に低下した。これらの結果から、音波が麹菌の酵素活性に与える影響は菌種ごとに異なることが確認された。

Irradiation of sound waves to conidiospores of yellow-*koji* and black-*koji* and characterization of enzyme activities

○Taku Matsumoto¹, Hibiki Sakamoto², Moeka Hashimoto², Kouji Kojima¹, Noriaki Saigusa¹, Yuji Teramoto¹
(¹Grad. Sch. Eng., Sojo Univ., ²Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus luchuensis*, glucoamylase, acid protease

2D04-05 *Aspergillus oryzae* の実用株における窒素源の資化に関する解析

○三木 翔平¹, 山下 秀行¹, 田中 拓未², 劉 利雲², 酒井 香奈江², 楠本 憲一²
(¹樋口松之助商店, ²阪大院・工)
s.miki@higuchi-m.co.jp

<背景>

樋口松之助商店は 1855 年から続く種麹メーカーであり、清酒、味醂、焼酎、味噌、醤油用の種麹の製造販売を行っており、保存菌株は数百種類存在する。*A. oryzae* 実用種麹株の中で主に清酒と味醂で使用されており、米麹において amylase 活性や protease 活性、特に peptidase 活性が最も高く、他とは異なる独特な風味を呈する菌株がある。本株は事前の各種培養試験の結果、ツァベックドックス寒天培地で生育が極めて悪く、同培地の窒素源である硝酸塩に代えて亜硝酸塩の添加により生育が回復した。そのため本株は窒素源の資化に関する変異を有する可能性がある。現在実用株における窒素源資化に関する変異は知られていない。そこで各種培地を用いた窒素源の資化試験を行い、原因遺伝子の推定を行った。

<方法>

窒素源を硝酸塩、亜硝酸塩、アンモニウム塩、ヒポキサンチンにしたツァベックドックス平板寒天培地を用いて、本株を 7 日間 30°C で培養し、ノギスでの 1 日 1 回のコロニー直径測定と、7 日後の性状の確認により成長能力の評価を行った。また本株と RIB40 の窒素源の資化に関連する遺伝子を比較し、置換や欠損の有無を解析した。

<結果>

ツァベックドックス平板寒天培地の窒素源を変えた試験の結果、亜硝酸塩、アンモニウム塩、ヒポキサンチンでは生育が良好である一方、硝酸塩ではコロニー直径及び菌糸密度が低下した。このことから、亜硝酸塩資化に関する *niaA* とモリブデンコファクター生産遺伝子は正常に機能しており、硝酸塩資化に関する *niaD* に変異があると考えられる。今後、本株のゲノム情報窒素源代謝に関する遺伝子の塩基配列を確認することにより、変異箇所の特定を行う予定である。

Analysis of nitrogen source assimilation in practical strains of *Aspergillus oryzae*

○Shouhei Miki¹, Hideyuki Yamashita¹, Takumi Tanaka², Liyun Liu², Kanae Sakai², Ken-ichi Kusumoto²
(¹Higuchi Matsunosuke Shoten, ²Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, nitrogen source assimilation, practical strains

2D04-06 Effect of soil organic matter on the growth of *Aspergillus oryzae*

Liyun Liu, Takumi Tanaka, Kanae Sakai, ○Ken-ichi Kusumoto
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
kenichi_kusumoto@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Soil organic matters provide a slow-release form of nutrients for microorganisms after decomposed by themselves. *Aspergillus oryzae*, which has been widely used in the production of fermented Asian foods and alcoholic beverages for more than 1,000 years, is a domesticated filamentous fungus from *Aspergillus flavus*. *A. oryzae* can be classified into three groups depending on the structural analysis of aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster (Kusumoto *et al.*, 2000). In this study, the effects of several soil organic matters on the giant colony diameter of *A. oryzae* RIB40 were tested and one of humic acids was the most efficient soil organic matter for stimulating the growth of RIB40 from day 3 to day 7. This humic acid was further used to determine its effect on giant colony diameters of 4 strains in Group 1 and 4 strains in Group 3 from day 3 to day 7. The results showed that this humic acid stimulated the giant colony diameters of some strains (including RIB40) in Group 1, or inhibited the giant colony diameters of some strains in Group 3 at the optimum concentration. Depending on the results of giant colony growth study, some potential components of humic acid will be tested, and possible genes in *A. oryzae* will be identified to investigate its stimulative effects on the growth of strains in Group 1 and inhibitive effects in the case of Group 3.

Effect of soil organic matter on the growth of *Aspergillus oryzae*

Liyun Liu, Takumi Tanaka, Kanae Sakai, ○Ken-ichi Kusumoto
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, soil, organic matter decomposition, screening

2D04-07 麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生するフェルロイルエステラーゼ FaeA による清酒のオフフレーバー 4-VG 前駆体の生成

○戸所 健彦, 根来 宏明, 小高 敦史, 秦 洋二, 石田 博樹
(月桂冠・総研)
todokoro@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】4-ビニルグワイヤコール (4-VG) は「煙臭」「薬品臭」のような香りの特徴をもつ化合物である。清酒醸造において 4-VG は(1)原料の米からのフェルラ酸の遊離、(2)フェルラ酸からの 4-VG 生産、を経て生成すると示唆されている。清酒酵母は長年の選抜により(2)の 4-VG 生産能をもたないが、杜氏・蔵人による手作業が重要視される大吟醸酒製造などでは野生酵母や乳酸菌(それらの多くが 4-VG 生産能をもつ)の混入を完全に防ぐことが難しく、今日においても 4-VG は清酒中の主要なオフフレーバーの一つである。そのため(1)のフェルラ酸遊離自体を抑える方法を開発するために、その機構の解明が期待されていた。

【方法・結果】麹菌 (*Aspergillus oryzae*) のゲノム情報と先行研究をもとに、米からのフェルラ酸遊離に寄与する候補遺伝子を *in silico* 予測し、最も可能性が高いと考えた feruloyl esterase 遺伝子 *faeA* を、*thi1* マーカー遺伝子を用いた genome co-editing により破壊した。RIB40/*faeA* 破壊株を用いて製麹したところ、糖化酵素などの力価や増殖には親株との差は見られなかった。また、4-VG 生産能をもつ酵母を用いた醸造試験の結果、アルコール発酵などにも大きな影響は見られなかったものの、清酒中のフェルラ酸と 4-VG が有意に減少し、官能閾値以下となることが確認できた。*faeA* が清酒中のフェルラ酸遊離原因遺伝子であること、*faeA* 欠損により清酒醸造上ならデメリットを生じない事を明らかにした。本研究で得られた知見をもとに *faeA* 活性の低い麹菌の育種を行うことで、清酒での望ましくない 4-VG の生産を抑えることが可能になると期待される。さらには、4-VG 生成能を持つために利用できなかった野生酵母を用いた清酒醸造も可能になるため、清酒の多様性を広げることも期待される。

Aspergillus oryzae FaeA liberate ferulic acid, a precursor of off-odor 4-vinylguaiacol in sake brewing

○Takehiko Todokoro, Hiroaki Negoro, Atsushi Kotaka, Yoji Hata, Hiroki Ishida
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, genome editing, sake, feruloyl esterase

2D04-08 糸状菌における鉄代謝制御機構：転写制御因子 HapX とその結合タンパク質の機能解析

○三浦 綾夏¹, 小林 吉生¹, 柳原 誠也¹, 深津 奈々¹, 津島 玲奈¹, 加藤 雅士¹, 志水 元亨¹
(名城大院・農)
mkato@meijo-u.ac.jp

【緒言】

HapX は我々が見出した真菌類特有の bZIP 型転写因子である。HapX は鉄欠乏条件下において HapB/C/E 複合体と相互作用し、鉄含有タンパク質遺伝子の転写抑制ならびに鉄取り込み系遺伝子の転写誘導に働く鉄恒常性維持機構の主要な転写制御因子である。鉄含有タンパク質の制御を通じて TCA 回路、呼吸鎖、酸化ストレス応答、アミノ酸合成系等の主要な生命活動に影響を及ぼす。本研究では、HapX による鉄恒常性維持機構の解明を目的とし、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を用い、鉄欠乏条件下において HapX と相互作用するタンパク質を網羅的に探索し、HapX と相互作用する新規タンパク質の機能について解明する。

【方法・結果】

A. nidulans において、3 x FLAG-His タグを付加した HapX の高発現株を作製した。この株を鉄欠乏条件下で 2 日間培養後、3 x FLAG-His タグによるアフィニティー精製を行った。得られた溶出画分に含まれるタンパク質をトリプシン消化後、LC-MS/MS にて HapX との相互作用タンパク質を解析した。その結果、これまで HapX との相互作用が報告されていない新たな相互作用候補タンパク質を 10 種同定した。HapX との物理的相互作用を確認するため、strep タグを付加した候補リコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて調製し、プルダウンアッセイ法による *in vitro* での解析を進めている。同様に、*A. nidulans* においても strep タグを付加した候補タンパク質を発現させ、IP-ウエスタン法による HapX との相互作用の解析から、鉄濃度に応じた相互作用の変化を調べるなど、*in vivo* での解析も併せて進めている。

Regulatory mechanism of the fungal iron metabolism : functional analysis of the transcriptional regulator HapX and its binding proteins

○Ayaka Miura, Yoshio Kobayashi, Seiya Sakakibara, Nana Fukatsu, Rena Tsushima, Masashi Kato, Motoyuki Shimizu
(Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

Key words HapX, *Aspergillus nidulans*, transcriptional regulator gene, protein interaction

2D04-09 麹菌脂質抽出物による白血病細胞における細胞死誘導作用

○竹口 徹¹, 竹下 美愛¹, 三浦 真帆¹, 小境 敏揮², 甲斐 久博³, 小川 健二郎⁴, 西山 和夫^{1,4}, 山崎 正夫^{1,4}
(¹宮崎大院・農, ²霧島酒造, ³九州保健福祉大・薬, ⁴宮崎大・農, ⁵宮崎大・TT推進機構)
myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

本研究室は、焼酎製造において排出される焼酎粕を麹菌培養の培地として利用し、麹菌の機能性を評価してきた。その成果としてこれまでに、麹菌脂質抽出物のかん細胞致死作用を報告してきた。本研究では、がん致死作用を有する活性成分及び作用機序の探索を目的とした。

ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞を使用し、培地には 10% 牛胎児血清含有 RPMI1640 を用い、37°C、CO₂ 濃度 5% の条件下で培養を行った。麹菌からの脂質抽出物およびそのシリカゲルによる分画物(Fr.1-15)を添加して 24 時間培養し、活性成分の探索を行った。また、細胞死の形態についてフェロトシスの観点から評価した。

脂質抽出物およびその分画物の Fr.5 の処理によって細胞死誘導作用が確認された。また、フェロトシス阻害剤である ferrostatin1 によって Fr.5 による細胞死が抑制されたため、Fr.5 はフェロトシスの誘導作用があると推定した。フェロトシスとは、鉄と ROS に依存した細胞死であり、Glutathione peroxidase 4 (GPx4) タンパク質の発現量の減少と細胞膜脂質の過酸化が特徴の細胞死である。そこで、鉄キレート剤の deferoxamine による細胞増殖への影響、GPx4 の発現量、liperfluo を用いた過酸化細胞膜脂質を評価した。脂質抽出物と Fr.5 の 3 時間処理によって GPx4 の発現量が低下した。さらに、Fr.5 による細胞死のみ鉄キレート剤によって抑制され、同時に過酸化細胞膜脂質の上昇が確認された。これらのことから、脂質抽出物と Fr.5 によって誘発される細胞死は経路が似ているものの、最終的には異なる細胞死が引き起こされており、Fr.5 はフェロトシスを誘発することが示唆された。

Induction of cell death of leukemia cells by lipid extracts from koji mold

○Toru Takeguchi¹, Michika Takeshita¹, Maho Miura¹, Toshiaki Kosakai², Hisahiro Kai³, Kenjiro Ogawa⁵, Kazuo Nishiyama^{1,4}, Masao Yamasaki^{1,4}
(¹Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki, ²Kirishima Shuzo Co., Ltd., ³Pharm., Kyushu University of Health and Welfare, ⁴Fac. Agric., Univ. Miyazaki, ⁵Organization for Promotion of Tenure Track., Univ. Miyazaki)

Key words Cancer, Ferroptosis, Glutathione peroxidase 4, lipid extracts from koji mold

2D04-10 RP 含量を高めた甘酒製造法の開発

○中嶋 唯人^{1,2}, 坂本 篤彦², 佐藤 美紗³, 尾関 健二^{1,2}
(¹金工大院・工, ²金工大・ゲノム研)
ozeeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的及び方法】

麹甘酒は米と米麹、水を混ぜたものを 55-60 °C で糖化し、作られる。この糖化工程中に RP が分解されることが先行研究で明らかとなった。本研究では低グルテリン米やコシヒカリ米を用いて、甘酒を作製した。低グルテリン米とは、消化されやすいタンパク質であるグルテリンの含有割合が通常の品種より少なく、RP であるプロラミンの割合が多い腎臓病患者向けの米である。本研究ではこれらの米や異なる麹米 (米こうじ B、玄米麹、米こうじ UP、白麹) を用いて、糖化温度・時間の条件を糖化条件 55 °C 22 h を control とし、コシヒカリ (Condition A) : 35 °C 2 h、45 °C 2 h、55 °C 18 h、低グルテリン米 (Condition B) : 35 °C 1 h、45 °C 1 h、55 °C 20 h の条件で甘酒を作製することで甘酒中の RP 含量を高める方法を検討した。

【結果及び考察】

コシヒカリは Condition A、低グルテリン米は Condition B においてともに甘酒 100 mL 中の RP 量、残存率ともに Control よりも増加した。糖化条件を変更した後は米こうじ B、UP、白麹の甘酒で RP 量と残存率が有意に増加した。α-アミラーゼとグルコアミラーゼの至適温度範囲はそれぞれ 50-55 °C と 50-60 °C である。35 °C から温度を徐々に上げて糖化を行うことで、55 °C 一定で糖化を行う時より至適温度に到達するまでの反応時間が長くなり、麹の糖化酵素がよりはたらき、米のデンプンが分解されて胚乳中の RP が濃縮されたことで、残渣 1 g 当たりの RP 量が高まったと考えられた。米の胚乳中のタンパク質はデンプン粒の周囲に顆粒状に蓄積されており、タンパク質とデンプンは混在している。糖化を行う amylase やタンパク質を分解する protease が徐々に温度を上げること、混在しているデンプンやタンパク質に少しずつ作用し、より糖化され難消化性である RP が濃縮されたと考えられた。

Development of amazake manufacturing method with increased RP content

○Yuito Nakashima^{1,2}, Atuhiko Sakamoto², Misa Sato², Kenji Ozeki^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., ²Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words resistant protein

2D04-11 *Aspergillus pseudoglaucus* 由来カルボキシエステラーゼ/リパーゼの特性解析と異種発現

○豊嶋 暲太¹, 仙波 弘雅¹, 上村 真理子¹, 木村 行宏¹, 土居 幹治², 竹中 慎治¹
(¹神戸大院・農, ²マルトモ)
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】日本の伝統食品である饅節には、大きく分けて荒節と枯節の 2 種類が存在する。カツオをおろし、煮熟・焙乾させたものが荒節であり、*Aspergillus* 属糸状菌 (饅節カビ) を使ってさらに荒節をかびつけ発酵させたものが枯節である。同工程では、饅節中の脂質の分解が進むことから、饅節カビの分泌する脂質分解酵素について調べてきた¹。本研究では、*A. pseudoglaucus* 由来酵素 (pLip_1~pLip_3) の特性解析を目的とした。

【方法】親株は饅節粉末固体培地で培養した¹。組換え酵素を生産する *A. oryzae* 形質転換体は 2xDPY 培地にて培養した。pLip_1~pLip_3 は、抽出液を透析して得られた粗酵素液を各種クロマトグラフィーによって精製した¹。酵素活性には主に *p*-nitrophenyl ester を基質として用い、低水分活性環境を擬似的に再現するためにグリセロールまたはソルビトールを反応液に添加した。

【結果および考察】親株を固体培養し、粗酵素液から pLip_1~pLip_3 を精製した。いずれも cod liver oil に対する加水分解活性を示したが、触媒化学的性質に相違が見られた。つまり、3 種の酵素は、*p*-nitrophenyl ester に対する基質特異性は異なっているだけでなく、pLip_2 および pLip_3 は低水分活性下において活性を維持していた。pLip_1~pLip_3 の特性をさらに調べるために、異種発現を種々の発現系にて検討した結果、*A. oryzae*-pUNA の発現系にて、pLip_1~pLip_3 の発現形質転換体を取得できた。高活性の組換え酵素については、現在、それぞれの培養上清中から精製を行うとともに特性解析を進めている。

1) Takenaka et al., Int. J. Food Microbiol., (2020) 327: 108654

Characterization and heterologous expression of lipolytic enzymes from *Aspergillus pseudoglaucus*

○Ryota Toyoshima¹, Hironori Semba¹, Mariko Uemura¹, Yukihiro Kimura¹, Mikiharu Doi², Shinji Takenaka¹
(¹Grad.Sch. Agric., Kobe Univ, ²Marutomo Co., Ltd.)

Key words katsuobushi fermentation, lipolytic enzyme, xerophilic *Aspergillus*, *Aspergillus pseudoglaucus*

2E01-01 ステンレス鋼材料における腐食発生とバイオフィーム形成のトレードオフ関係

○若井 暁^{1,2}, 小川 真弘¹
 (¹海洋研究開発機構, ²JST・さきがけ)
 wakais@jamstec.go.jp

ステンレス鋼は、一般的な使用環境では表面に形成されたクロム酸化層によって腐食が抑制されている。一方で、このクロム酸化層は塩化物イオンなどに対して脆弱であり、高塩化物イオン濃度環境では安定なクロム酸化層が破壊されて腐食が進行する。したがって、ステンレス鋼の使用には低塩化物イオン濃度環境が推奨されるが、低塩化物イオン濃度環境でも微生物が関わることで腐食が発生することがある。微生物によるステンレス鋼の腐食が進行する場合には、ステンレス鋼表面に形成されるバイオフィームが重要であると考えられているが、ステンレス鋼表面上のバイオフィーム形成についての詳細な研究は少ない。さらに、本研究では塩化物イオン濃度とバイオフィーム形成に着目した。ステンレス鋼腐食が問題となっている環境から入手した環境水に任意の塩化物イオン濃度になるように NaCl を添加し、ステンレス鋼試験片 (1×1×0.1 mm) を浸漬し、25°C で培養した。培養後、培養液とステンレス試験片上の微生物細胞それぞれから DNA を抽出し、定量 PCR により遺伝子コピー数を測定し、アンプリコンシーケンシングにより微生物群集構造を解析した。溶液中の遺伝子コピー数は塩化物イオン濃度別で優位な差がなかったが、バイオフィーム中の遺伝子コピー数は塩化物イオン濃度が 2000 ppm 以上の時に著しく減少した。さらに、微生物群集構造は 5000 ppm 以上になると劇的に変化した。本研究により、高い塩化物イオン濃度はクロム酸化層の破壊によって腐食のリスクが高まる一方で、1000 ppm 以下の低塩環境ではバイオフィーム形成が助長され微生物による腐食発生リスクが高まることが明らかになった。一般的にステンレス鋼の使用環境では低塩環境が推奨されるが、その環境ではバイオフィーム形成による微生物腐食に対して薬剤処理等を実施するなど付加的な対応が必要と言える。

Trade-off relationship between corrosion occurrence and biofilm formation on a stainless steel

○Satoshi Wakai^{1,2}, Masahiro Ogawa¹
 (¹JAMSTEC, ²PRESTO, JST)

Key words biofilm, biocorrosion, microbial consortia, salt

2E01-02 軟質塩ビシートの硬化劣化への土壌細菌の関与

○平田 悠大¹, 別宮 浩之², 天牛 英清³, 八木 敬祐⁴, 岡野 憲司¹, 岩木 宏明¹
 (¹関西大・化生工, ²住ベシート防水)
 iwaki@kansai-u.ac.jp

屋外建物の屋上、ベランダで使用された軟質塩ビシートは、紫外線、温度によって、可塑剤量の減少を伴って劣化が進行することが知られている。一方、排水溝、ドレン周辺では、土壌の堆積によって、紫外線への曝露が少なくにも関わらず、軟質塩ビシートの可塑剤量の減少を伴う硬化劣化が確認されている。我々は後者の原因について、次の2つの仮説を立てた。1. 堆積した土壌に可塑剤が自然に拡散する。2. 土壌に存在する微生物が可塑剤を分解する。これらを確かめるため、まず、人工環境下でシート中の可塑剤の減少試験を行った。その結果、揮発および移行が促進される高温下 (80°C) では可塑剤の顕著な減少が見られたが、常温では顕著な減少は見られず、可塑剤の減少は単純な揮発および移行によるものではないことが示唆された。次に、土壌微生物による分解の可能性を検討するため、フタル酸系可塑剤の減少が見られた4カ所の現場 (実邸) から採取した土壌とランダムに採取した5カ所の土壌からフタル酸エステル分解菌のスクリーニングを試みた。その結果、全ての土壌から分解菌が検出された。フタル酸エステル分解菌は土壌環境に普遍的に存在していることが示唆された。次に、2カ所の実邸土壌由来のフタル酸エステル分解菌の単離を試み、それぞれの土壌から1株ずつ分解菌を単離した。16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、単離菌は *Gordonia* 属と *Rhodococcus* 属の細菌であると同定された。これら2菌株によるフタル酸エステル系可塑剤の分解性を確認したところ、2株の分解傾向は異なっているが試験した全てのフタル酸系可塑剤を分解することが明らかとなった。以上の結果より、土壌細菌の塩ビシート劣化への関与が強く示唆され、塩ビシートの品質保持のためには土壌との接触状態を取り除くことが重要であると考えられた。

Involvement of soil bacteria in hardening due to aging of flexible PVC sheet

○Yudai Hirata¹, Hiroyuki Bekku², Hidekiyo Tengyu², Keisuke Yagi², Kenji Okano¹, Hiroaki Iwaki¹
 (¹Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., ²S.B. Sheet Waterproof Systems)

Key words plasticizer, phthalate esters, flexible PVC sheet, biodegradation

2E01-03 微生物群集の好適制御に向けた複合微生物系の機能的構造解析

○池田 麗¹, 天野 光喜¹, 本荘 雅宏², 高橋 宣博³, 鈴木 研志⁴, 栗栖 太⁵, 木村 元彦¹, 田代 陽介¹, 二又 裕之⁶
 (¹静大院・総合科技, ²静大・創科技学院, ³静大・工, ⁴東大院・農生科, ⁵東大院・工, ⁶静大・グリーン科技研)
 futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

複合微生物系はヒトの健康維持や環境浄化など様々な分野で活用されている。しかし、これらの制御は経験則に委ねている面があり、複合微生物系の好適制御実現に向けた機能安定化機構の解明が希求されている。これまで当研究室の合成微生物群集系を用いた先行研究により、供試菌株の共存を可能とする微生物間不完全代謝補完機構形成による機能安定化が示唆されている。しかし、わずか数菌株の群集系で得られた知見がより複雑な系に適用できるかは不明である。そこで本研究では、phenol を唯一の炭素源、森林土壌を接種源とした連続集積培養系を用いて複合微生物系の機能安定化に寄与する特性の理解を目的とした。

上記培養条件により二基の連続集積複合微生物系を構築した。Phenol 蓄積を機能の不安定化と定義した結果、リアクター1 (R-1) は安定系、リアクター2 (R-2) は不安定系と判断された。Phenol に対する動力学的解析の結果、R-1 の親和定数 (K_s) 値は広範囲であり、R-2 ではより低 K_s 値を示した。16S rRNA 遺伝子を標的とする Amplicon Sequence により微生物群集構造を解析 (AS 解析) した結果、R-1 は群集構造が平衡状態であった一方、R-2 は劇的な変遷を示した。この状態を反映した培養 253 日目由来分離微生物の phenol 分解能、16S rRNA 遺伝子を標的とした系統学的解析および AS 解析結果から、群集全体において少なくとも R-1 では 14%、R-2 では 70% による phenol 分解への関与が推定された。また、代謝産物のみを資化する細菌は R-1 からのみ分離された。これらの結果から、R-1 は phenol 分解と代謝産物分解の役割分担に基づく不完全代謝補完機構構築による安定化が推定された。一方、R-2 は基質を巡る競争による不安定化が推定された。以上の結果から、不完全代謝を補完する代謝ネットワーク構築がシステムの機能的安定性発揮に重要であることが示唆された。

Functional structure analysis of complex microbial systems for suitable control of microbial community

○Rei Ikeda¹, Koki Amano¹, Masahiro Honjo², Nobuhiro Takahashi³, Kenshi Suzuki⁴, Futoshi Kurisu⁵, Motohiko Kimura¹, Yosuke Tashiro¹, Hiroyuki Futamata⁶
 (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ³Fac. Eng. Shizuoka Univ., ⁴Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, ⁵Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, ⁶Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words microbial community, complex microbiological system, microbial interaction, metabolic network

2E01-04 *Ralstonia* sp. C16 株を用いたポリヒドロキシ酪酸の最適分解条件の検討

○佐野 夕貴, 大上 嵩洋, 張 倍誌
 (室工大院・工・環境創生)
 ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

[背景・目的] 現在普及しているプラスチックは石油から製造されており生分解性を持たないことから、環境中へ流出すると回収が困難であり、生態系へ悪影響を及ぼしている。そのためポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) などの生分解性プラスチックが注目されている。今後 PHA の普及が拡大すると環境中への流出も増大する可能性があるため、先行研究では自然環境中から PHA の一種であるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 分解菌を単離することを目的とし、北海道大雪山黒岳の土壌から PHB 分解菌である *Ralstonia* sp. C16 株を単離した。本研究は C16 株を用い、PHB の最適分解条件を検討することを目的とした。

[方法] はじめに LB 液体培地 (pH 7.0) を用いて、27 時間、100 rpm、30°C の条件下で前培養を行った。次に遠心分離 (10000 rpm、5 分、4°C) と無機塩培地による洗浄を 2 回行い、前培養培地由来の栄養源を取り除き、無機塩培地に菌体を懸濁させた。PHB (5 g/L) を添加した無機塩培地 (pH 7.0) に C16 株懸濁液を 0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、10.0、15.0、20.0% (v/v) となるように添加し、72 時間、150 rpm、30°C の条件下で培養を行った。サンプリングは 0、12、24、48、72 時間に行い、pH と PHB 濃度及び PHB 分解産物である 3-ヒドロキシ酪酸 (3-HB) 濃度を経時的に測定した。

[結果] PHB の分解については、菌体濃度が高いほど分解速度が速く、8.0% 以上の菌体濃度では、72 時間までにほぼ全ての PHB が分解された。菌体濃度 0.5-5.0% の条件では、PHB の分解が 24 時間までに停止したが、これは 12 時間までの pH の大幅な低下により増殖環境が悪化したためであると考えられる。全ての条件において 3-HB の生産が確認され、菌体濃度 5.0% の条件において最大の 3-HB 生産 (2.4 g/L) が確認された。今後は培養中における生菌数の経時変化を評価した後、PHB 分解に最適な pH、温度、振とう数についても検討を行う。

Determination of optimal conditions on polyhydroxybutyrate degradation using *Ralstonia* sp. C16

○Yuki Sano, Takahiro Oogami, Young-Cheol Chang
 (Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words PHB, *Ralstonia*, biodegradable polymer, biodegradation

2E01-05 PHB フィルムの土壌分解中におけるフィルム上菌体量の影響

○寺山 拓臣, 張 倍誌
(室工大院・工・環境創生)
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

[背景・目的] 生分解性プラスチックの一つであるポリヒドロキシ酪酸 (PHB) は環境中において数か月から数年で分解が行われ、この分解過程では微生物の産生する分解酵素が重要な役割を果たしている。一方、環境中における PHB 分解菌は他の微生物との相互作用から異なる分解能を示すこともあり、生分解に関わる因子の影響も検証する必要がある。本研究では北海道大雪山黒岳の土壌より単離した *Ralstonia* sp. C16 株を利用して土壌中における PHB の生分解能と生菌数との相関関係を検討した。

[方法] 土壌は大学敷地内より採取したものを使用し、一部を滅菌処理した。C16 株を添加した土壌 (0.1 mL/g) と未添付の土壌を用意し PHB フィルムを埋没した。30°C、土壌水分量 40~45% の条件下で静置し、一定期間ごとに PHB フィルムを採取することで分解能を調査した。時間経過ごとの土壌及びフィルム表面の生菌数調査は細菌計測用として NB 寒天培地、真菌計測用としてポテトデキストロース寒天培地を使用して行った。

[結果] 非滅菌土壌に C16 株を供した条件では 20 日間で約 93% の分解が観察された。一方、C16 株を添加した滅菌土壌及び C16 株を添加していない非滅菌土壌ではそれぞれ 29%、30% と比較的低い分解率を示した。土壌の生菌数においては明確な分解率との相関関係は見られなかったものの、フィルム表面の生菌数では細菌及び真菌の増加が確認された。以上より、C16 株はフィルム表面に付着し土壌先住菌との相互作用から分解率を上げ、PHB 廃棄物のバイオレメディエーションに利用できる可能性が示唆された。

The effect of biomass proliferation on PHB film during its degradation in soil

○Takumi Terayama, Young-Cheol Chang
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words PHB, biodegradable polymer, bioaugmentation, biodegradation

2E01-06 *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 株由来ポリアミド 4 分解酵素遺伝子のクローニングと組換え大腸菌における発現検討

○佐藤 駿光¹, 佐々浪 由梨香¹, 山下 哲郎¹, 外村 彩夏², 山田 美和¹
(¹岩手大・農, ²東海大・農)
myamada@iwate-u.ac.jp

[背景・目的]

ポリアミド 4 (PA4) は、優れた物性を有するバイオベースポリマーであり、高い生分解性を有することから、現在注目されている素材である。我々は、土壌から単離した PA4 分解菌 *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 株が分泌する PA4 分解酵素の精製系を構築し、諸性質を解析した[1]。本研究では、本酵素の大量発現系の構築を目指し、遺伝子クローニングおよび組換え大腸菌における発現を検討した。

[方法・結果]

まず、TN-N1 株由来の精製酵素のトリプシン分解ペプチドをナノ LC-MS/MS に供し、TN-N1 株ドラフトゲノムの全 ORF アミノ酸配列に対して MASCOT 検索を行い、本酵素の ORF を同定した。同定した ORF の遺伝子をプラスミド pET26b(+) にクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) に導入した。形質転換体を培養し、イソプロピル-β-チオオガラクトピラノシドによる遺伝子の発現誘導を行った。培養液の培養上清、集菌した菌体の細胞破砕液の可溶画分、不溶画分を回収し、PA4 エマルションを基質とした活性測定と SDS-PAGE を行い、各画分における酵素の発現を確認した。その結果、発現した酵素の大部分は不溶化していたが、細胞破砕液の可溶画分においてわずかに活性を示す酵素の発現が確認できた。よって、クローニングした遺伝子が目的の PA4 分解酵素であると確認できた。

次に、クローニングした遺伝子から本酵素の全アミノ酸配列を決定し、BLAST 検索に供したが、ヒットしたタンパク質のほとんどが機能未知であった。そこで、AlphaFold2 によって立体構造モデルを予測し、モデルを DALI server に供して類似した構造を持つタンパク質を検索した結果、本酵素の一部の構造が 6-アミノヘキサン酸オリゴマーを加水分解する NyIB(PDB ID code: 4GB7) と類似していることが示唆された。

[参考文献]

[1] Y. Sasanami et al., Polymer Degradation and Stability, 197, 109868, 2022

Cloning of polyamide 4-degrading enzyme gene from *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1 and heterologous expression of the gene in recombinant *Escherichia coli*

○Sato Shunko¹, Sasanami Yurika¹, Yamashita Tetsuro¹, Hokamura Ayaka², Yamada Miwa¹
(¹Fac. Agric., Iwate Univ., ²Sch. Agric., Tokai Univ.)

Key words polyamide 4, biodegradable plastic, biodegradation

2E01-07 海洋生分解性プラスチック ポリアミド 4 分解菌の探索および分解酵素の諸性質解明

○齋藤 祐介¹, 山下 哲郎², 山田 美和²
(¹岩大院, ²岩大・農)
myamada@iwate-u.ac.jp

近年、海洋プラスチックごみ問題への解決策のひとつとして海洋生分解性プラスチックが注目されている。ポリアミド 4(PA4)は、海洋で生分解する数少ないプラスチックであり、実用化が期待されている環境調和型のバイオベースポリマーである。しかし、海洋からの PA4 分解菌の報告は一例しかなく、分解メカニズムが明らかになっていない。そこで本研究では、PA4 の海洋環境における分解メカニズムの解明を目指して、海洋環境から新規の分解菌の探索と、見出した分解菌由来の分解酵素の諸性質解明を行った。

岩手県山田湾にて浸漬試験を行い、PA4 表面から多数の菌を単離した。単離した菌を PA4 粉末含有寒天培地で 15°C もしくは 25°C で培養し、クリアゾーンを形成した 29 株の分解菌を選抜した。選抜した菌の 16S rDNA 配列を解析したところ、*Pseudoalteromonas* 属細菌(2022 年農芸化学会で報告)や *Dasania* 属などが推定され、いずれも新規の分解菌であることが示唆された。

続いて、15°C で最も酵素を産生した株(*Pseudoalteromonas* 属細菌)の培養液上清から硫酸塩析により PA4 分解酵素を精製することに成功した。精製酵素の諸性質は、分子質量 75 kDa、最適温度 55°C、最適 pH 8.0、最適 NaCl 濃度 0 M であった。また、本酵素は、Ca²⁺非存在下では自己分解し、分子質量 61 kDa、最適温度 35°C、最適 pH 9.0、最適 NaCl 濃度 0.7 M と諸性質が変化した。さらに、精製酵素の内部アミノ酸配列とドラフトゲノム情報からオープンリーディングフレーム(ORF)を特定した。ORF のアミノ酸配列を BLAST 検索に供したところ、ヒットしたタンパク質はほとんどが機能未知であった。一方で、本酵素の部分的なアミノ酸配列は、セリンヒドロラーゼや β ラクタマーゼと相同性が確認されたため、PA4 のアミド結合を加水分解することが示唆された。本研究は、海洋から見出された PA4 分解酵素に関する初めての報告である。

Isolation of polyamide 4 (PA4)-degrading bacteria from marine environment and characterization of PA4-degrading enzyme's properties

○Saito Yusuke¹, Yamashita Tetsuro², Yamadada Miwa²
(¹Iwate Univ., ²Fac. Agric., Iwate Univ.)

Key words polyamide 4, biodegradable plastic, biodegradation, marine environment

2E01-08 ハイドロキノンスルホン酸分解菌 *Delftia lacustris* HQS1 のゲノム解析と芳香族酸分解遺伝子群の染色体上での分布

○黒江 真由, 大滝 世和, 石澤 秀紘, 武尾 正弘
(兵庫県大院・工)
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

[背景と目的] 芳香族スルホン酸は、染料や洗剤の骨格を形成する重要な化学物質の一群であるが、水環境の主要な汚染物質でもある。*Delftia lacustris* HQS1 株は、活性汚泥から、ハイドロキノンスルホン酸 (HQS) を単一炭素源とする無機塩培地で分離された菌株で、化学工業的に重要な芳香族スルホン酸である p-フェノールスルホン酸 (PS) も分解することができる。本菌株の芳香族スルホン酸分解に関する遺伝子情報を取得するため、本菌株のゲノム配列の解析を実施し、ゲノム上にある芳香族酸分解関連遺伝子群の分布を調べるとともに、HQS や PS の分解に関わる遺伝子の同定を試みた。

[方法] MiSeq (illumina) を用いたショートリードシーケンシングと FLO-MIN106 R9.41 flow cell (Oxford Nanopore Technologies) を用いたロングリードシーケンシングを併用して、本菌株のゲノム配列の解析を行った。また、得られた配列からアノテーションにより遺伝子機能を推定後、芳香族酸分解関連遺伝子群を探索するとともに、HQS や PS の分解との関連を調べるため、いくつかの遺伝子については PCR による増幅とクローニングを実施した。

[結果と考察] ゲノム配列の解析の結果、本菌株は約 7.0 Mb の環状染色体 (GC 含量 66.5%) と約 40 kb の環状プラスミド (GC 含量 62.3%) をそれぞれ 1 つずつ持つことがわかった。また、その染色体上には、安息香酸、3-ヒドロキシ安息香酸、サリチル酸、ゲンチジン酸、プロトカテク酸などの芳香族酸の分解に関わる遺伝子クラスターが見い出された。これらの遺伝子クラスターには、基質の取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子も含まれていた。これらの遺伝子クラスターの中の芳香環開裂酵素の遺伝子の一つを増幅し、大腸菌に導入したところ、その菌株の細胞懸濁液 (OD₆₀₀=4.0) を用いた分解試験で 0.5 mM の HQS が約 6 時間で完全消失した。

Genomic analysis of a hydroquinonesulfonate-degrading bacterium *Delftia lacustris* HQS1 and distribution of aromatic acid degradation gene clusters on the chromosome

○Mayu Kuroe, Seiwa Ohtaki, Hidehiro Ishizawa, Masahiro Takeo
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words biodegradation, aromatic sulfonate, gene assembly, *Delftia lacustris*

2E01-09 強酸性条件下でのバイオソープションによる水圏の汚染重金属除去の検討

○岩間 蒼平¹, 高野 力^{1,2}, 中島 一紀^{1,2}, 川崎 了^{1,2}, 青柳 秀紀³
 (¹北大・工, ²北大院・工, ³筑波大・生命環境系)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景・目的】IT化が進む現代では、鉱山開発の促進や、電子廃棄物の不適切な処理に起因する、河川の重金属汚染が懸念される。この問題に対して、現在、中性条件下でのBiosorptionによる金属回収処理について、多くの研究がされているが、強酸性の実環境とはpHが異なるため、実用に際しては中和処理が必要となる。そこで本研究では、中和処理を不要とするため、酸性条件下でのBiosorptionによる金属回収プロセスの開発と金属回収の検討を、電子機器に多く含まれる5つの元素を対象に行った。

【方法・結果】独自の培養法¹⁾によって単離培養した耐酸性細菌を、金属イオンを含む酸性河川水(Co, Cu, Li, Mn, Ni各100 mg/L, pH 2.38)に懸濁し、一定時間、金属の吸着処理を行った後、遠心分離によって菌体を除去した。各元素の吸着量を、誘導結合プラズマ発光分光分析により定量した。その結果、10 [g-dry cell/L]の菌体を用いてCo: 12.1% Cu: 13.4%, Li: 9.3%, Mn: 11.9%, Ni: 10.4%の吸着に成功した。5種類の金属元素をそれぞれ10%前後回収したことから、強酸性条件下でのBiosorptionによる金属回収が可能であることが示された。本法は中性条件下での金属回収処理と比べて回収割合は低いが、中和処理を不要とすることで、中和剤の使用量やコストの低減ができる。今後、より金属回収能力の高い菌体の取得や、金属の脱離プロセスの構築により、更なる効率向上が期待できる。本法は、河川水の処理だけでなく、酸性鉱山廃水に含まれる重金属除去に応用することで、将来、持続可能な環境保全や資源開発にも貢献可能である。

1) 第70回日本生物工学会大会要旨集 p. 183

Metal biosorption process under acidic conditions for polluted water treatment

○Sohei Iwama¹, Chikara Takano^{1,2}, Kazunori Nakashima^{1,2}, Satoru Kawasaki^{1,2}, Hideki Aoyagi³
 (¹Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ³Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bioremediation, biosorption, acid tolerance, water pollution

2E01-10 車軸藻 *Penium margaritaceum* の二価鉛イオンの吸着に関する研究

○Byamba Tsogjargal, 前田 勇
 (宇都宮大院・農)
 i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

本研究では *Penium margaritaceum* の4株 (NIES 303, NIES 2667, NIES 207, Skidmore Algal Culture Facility Strain 8) を使用した。*P. margaritaceum* は細胞壁の成分として、ガラクトロン酸が α -1,4-グリコシド結合で連結したポリガラクトロン酸が主成分であるペクチンを合成する。ペクチンが鉛など重金属を良く吸着するため、*P. margaritaceum* のペクチンを含む細胞壁が汚染水に含まれる鉛などの重金属を吸着する能力を検討する事を目的とした。*P. margaritaceum* の細胞壁で合成されるペクチンは細胞乾燥重量に対して20%以上含まれていた。4株に対して1 mg/Lの鉛イオンを含有した100 mLの溶液に細胞を加え、緩やかに攪拌しながら2時間後、または0-8時間の一定間隔で、溶液中の鉛を原子吸光分析で定量した。また、最終的に回収した細胞を酸分解、または燃焼し細胞に吸着した鉛も定量した。その結果、細胞に鉛が部分的に吸着することで溶液中の鉛が経時的に減少することを明らかにした。エネルギー分散型X線分析装置を用いて元素マッピングをし、藻の細胞壁に鉛が分布することが分かった。鉛を吸着した藻を水溶液から分離するのが困難であったため、細胞を固定化したる紙の鉛吸着を調べたところ、鉛吸着と細胞の固液分離が可能となった。また、ペクチン含量が4株中最も低いStrain 8では細胞への鉛の吸着量が最も低かった。植物の果皮にはペクチンが乾燥量に対して30%以上含まれる。*P. margaritaceum* の実験と同様にリングあるいはミカンの果皮で比較実験を行ったところ、裁断した果皮は水溶液中の鉛を *P. margaritaceum* の細胞のように吸着しないことが明らかになった。このことから微細藻類の細胞と果皮は高含量のペクチンを有する点で共通しているが、鉛の結合においては違いがあると考えられる。

Study on adsorption of divalent lead ions of charophycean green alga *Penium margaritaceum*

○Tsogjargal Byamba, Isamu Maeda
 (Grad. Sch. Agric., Utsunomiya Univ.)

Key words bioremediation, phytoremediation, immobilized cell

2E01-11 キチンと融合タンパク質を複合化した重金属イオン吸着材料の作製

○重政 友貴, 中島 一紀, 青木 孝祐, 高野 力, 川崎 了
 (北大院・工)
 k.naka@eng.hokudai.ac.jp

【緒言】水溶液中の重金属イオンを取り除くためのキレート樹脂は石油化学をベースとして製造されているが、SDGsの観点から低環境負荷・資源循環型の重金属吸着剤の開発が求められている。本研究では、天然高分子であるキチンと融合タンパク質から構成されるバイオベースの新規重金属吸着剤を開発した。金属吸着部位に重金属結合タンパク質であるMetallothionein(MT)を、MTをキチンに結合するためのアンカー分子にキチン結合ドメイン(ChBD)を選択し、それらの融合タンパク質(MT-ChBD)を作製した。その融合タンパク質を吸着したキチンを用い、水溶液中の重金属イオンの除去を検討した。

【方法・結果】*Synechococcus elongatus* 由来MTと *Bacillus circulans* 由来ChBDの融合遺伝子を挿入したpCold Iベクターで大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、15°Cでタンパク質発現を行った。発現したMT-ChBDは、従来のHisタグ精製だけでなく、ChBDのキチンへの結合能力を用いた簡便な精製も可能であった。精製MT-ChBD(340 µg/ml)をキチン(0.1 g)へ添加し、2 h振盪した後、MT-ChBDを修飾(吸着率79%)したキチンに0.1 mM Pb²⁺溶液を添加し、重金属イオンの吸着を行った。キチンのみではPbの吸着率は7.5%であったが、MT-ChBD修飾キチンでは、89%の吸着率が得られた。さらに、Cd, Cu, Pb, Znイオン共存下(各10 ppm)での吸着実験においてもそれぞれ70%, 42%, 86%, 80%と高い吸着性が得られた。また、重金属イオンを吸着したキチンを20 mM EDTAや20 mMクエン酸で処理することで、重金属イオンを脱着することが可能であった。本研究で開発した重金属イオン吸着剤は、タンパク質のデザインを変更することで、別の種類の金属イオンの回収が可能であり、吸着剤の機能強化や改変も可能であるため、環境分野のみならず様々な分野への応用が期待される。

Heavy metal adsorbent composed of chitin and fusion proteins

○Yuki Shigemasa, Kazunori Nakashima, Kosuke Aoki, Chikara Takano, Satoru Kawasaki
 (Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words heavy metal ions, Biosorption

2E01-12 Removal of phosphate from wastewater by cyanobacteria for biotechnological applications

○Devi Asih^{1,2}, Tina Summerfield², Julian Eaton-Rye¹
 (¹Dept. Biochem., Med. Sch. University of Otago, ²Dept. Botany, Sci. Div. University of Otago)
 aside269@student.otago.ac.nz

The present research integrates phosphorus remediation by cyanobacteria with biomass and polyhydroxybutyrate (PHB) production. Our approach can be directed towards overcoming water quality issues due to anthropogenic phosphorus enrichment in water bodies. This research aims to understand the mechanism of phosphate uptake in cyanobacteria and evaluate it as an eco-friendly bioremediation agent that can produce valuable products. We have adopted two approaches. The first approach involves the inactivation of the sphU gene that acts as a negative regulator of the pho-regulon leading to the constitutive uptake of inorganic phosphate to study the role of the pho-regulon in phosphate accumulation in polyphosphate bodies (PolyP) within cyanobacterial cells. Preliminary data using the model organism *Synechocystis*. PCC 6803 has shown that the Δ SphU strain removed 96% phosphate from the growth medium in 36 h whereas a similar depletion by wild-type cells took >100 h. Our second approach involves growing model cyanobacteria in phosphate-depleted and phosphate-replete BG-11 media to observe PolyP and PHB production through transmission electron microscopy. Our long-term goal is to identify suitable cyanobacteria for introduction into wastewater treatment systems. This will be achieved through mesocosm studies designed to assess the ability of the cyanobacteria to selectively remove phosphate with the accompanying generation of biomass and PHB that can be used for various biotechnological applications.

Removal of phosphate from wastewater by cyanobacteria for biotechnological applications

○Devi Asih^{1,2}, Tina Summerfield², Julian Eaton-Rye¹
 (¹Dept. Biochem., Med. Sch. University of Otago, ²Dept. Botany, Sci. Div. University of Otago)

Key words cyanobacteria, phosphate uptake, polyphosphate, PHB

2E03-01 アンモニアガス耐性細菌 *Paenibacillus lentus* NH33 のアンモニア耐性機構の解明

○安東 剛, 清 啓自, 吉田 ナオト
(宮崎大院・農)
a04109u@cc.miyazaki-u.ac.jp

アンモニアガス耐性細菌である *Paenibacillus lentus* NH33 は混合栄養も可能なアンモニアガス要求性独立栄養生物である。NH33 のアンモニアガスストレス耐性機構の解明を目的とし、ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行った。トランスクリプトーム解析から、独立栄養条件下で発現量が増加した遺伝子を確認した。その中でも tmRNA および lantibiotic subtilin, cspD2 といった遺伝子の発現量が大きく増加したことから、これらの遺伝子のアンモニアガスストレス耐性との関連性を調査した。tmRNA 遺伝子を導入した大腸菌 JM109 ではアンモニアガス耐性の獲得を確認した。よって tmRNA はアンモニアガスストレスに対して耐性を付与すると考えられる。tmRNA は mRNA の異常翻訳を停止し、リボソームのペプチド合成を停止させる核酸分子である。これらの働きは細胞内の機能を正常化させると考えられており、tmRNA はアンモニアガスストレスによる mRNA の分解から細胞を守ることで耐性を与えていると考える。また cspD2 遺伝子を導入した大腸菌 JM109 ではアンモニアガスストレス条件下でありながら、野生株の非アンモニアガスストレス条件下よりも増殖 (OD) は高かった。光学顕微鏡を用いて菌体を観察したところ、菌体の肥大は確認されなかったことから、cspD2 遺伝子の高発現により分裂回数の増加が起きたことになる。これは cspD2 遺伝子が調節機能を持ち、複数の遺伝子の発現を制御することで、菌体数を増やしていると考えられる。菌体数を増やすことはアンモニアガスストレスから種を守るための生存戦略であると考えられる。

Elucidation of the ammonia tolerance mechanism in ammonia gas tolerant bacteria *Paenibacillus lentus* NH33

○Takeshi Ando, Kaji Kiyoshi, Naoto Yoshida
(Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki.)

Key words *Paenibacillus lentus*, ammonia gas, tmRNA, cspD

2E03-02 洗濯工程から単離したバクテリア細胞の綿布付着における界面活性剤の影響

○橋本 稜知¹, 奥田 裕暁^{1,3}, 松村 吉信^{1,2}, 脇田 克也³
(¹関西大院・理工, ²関西大・ORDIST, ³パナソニック・くらしアプライアンス社)
ymatsu@kansai-u.ac.jp

【背景】洗濯を繰り返した繊維製品からの悪臭の発生が報告されている。一般に、その原因が衣類に付着した微生物細胞であると予想されている。これまでに、我々は綿布に付着しやすい吸着菌と付着しにくい通過菌を洗濯工程から単離している。そこで本研究では、細胞の綿布に付着しやすい環境条件の探索と付着に関与する細胞運動性を調査した。さらに、界面活性剤共存時の細胞の綿布付着への影響を調査した。

【方法/結果】研究室で単離した通過菌と吸着菌を細胞付着実験に使用した。界面活性剤には陰イオン界面活性剤 linear alkylbenzene sulfonate (LAS) と非イオン界面活性剤 polyoxyethylene alkylether (AE) を用いた。細胞 (1.00×10⁷ cells/mL) はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁した。細胞付着実験では細胞懸濁液に綿布を浸した (120 rpm, 15-45°C, 0-60 min)。懸濁液に残存する細胞数を細胞自動カウント装置 Cellometer X2 (トミーデジタルバイオロジー株式会社) で測定し、付着細胞数を算出した。温度および pH の細胞付着に及ぼす影響を調べた結果、実験に用いた条件では細胞付着に大きく影響しなかった。界面活性剤が細胞付着に及ぼす影響を調べた結果、細胞付着を抑制する最適な濃度が存在していた。界面活性剤含有 PBS の表面張力を自動表面張力計 CBVP-A3 型 (協和界面化学株式会社) で測定した結果、付着抑制効果が高かった界面活性剤濃度は臨界ミセル濃度よりも低い濃度であった。通過菌および吸着菌の運動性を TSB 軟寒天培地 (0.3-1.0% agar) での培養におけるコロニー形成能で評価した結果、細胞運動性の低下が綿布への付着を促進させると予想された。今後、界面活性剤による細胞脱離効果を検証し、衣類における付着細胞数抑制と異臭発生抑制のシステム構築を目指す。

Effect of detergents on the adhesion of bacterial cells isolated from cotton cloths in the laundry process.

○Ryochi Hashimoto¹, Hiroaki Okuda^{1,3}, Yoshinobu Matsumura^{1,2}, Katsuya Wakita³
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., ²ORDIST, Kansai Univ., ³Panasonic Living Appliances & Solutions)

Key words Laundry, adhesion, biofilm, cell mobility

2E03-03 糸状性細菌 *Leptothrix* 属細菌によるペリクル形成

○久能 樹¹, 小野 絵里香¹, Li Xiaojie¹, 山本 達也¹, Prasad Manoj¹, 杉本 真也², 尾花 望³, 野村 暢彦¹, Utada Andrew¹
(¹筑波大院・生命環境, ²慈恵医大・医, ³筑波大・医)
kuno.tatsuki.gb@u.tsukuba.ac.jp

糸状性細菌は、異常な糸状成長により活性汚泥のフロックを綿状化し、固液分離障害を引き起こす。好気性の *Leptothrix* 属糸状性細菌は、静置培養により気液界面に網状ペリクルを形成する。この網状ペリクルは、浮遊細胞をトラップした小さなクラスターが、他のクラスターとランダムにドッキングすることで階層的に拡大する。変異株を作製して解析したところ、極性鞭毛の変異細胞はペリクル形成できないことから、極性鞭毛を使って泳ぐことで気液界面に集積することがわかった。一方、分泌ナノ繊維で構成される鞘構造を持たない変異細胞は、気液界面に集積後動きが止まり模様のないペリクルを形成した。この変異細胞のペリクルは、時間経過と共に細胞が集積することで崩壊したが、野生型細胞のペリクルは細胞の集積が抑制され崩壊しなかった。鞘の有無による細胞表面の違いを調べた結果、鞘構造により細胞表面の疎水性を 60%低下させることがわかった。従って、ナノ繊維の分泌により、気液界面への細胞の吸着を抑制することで、浮遊細胞が自由に移動し、強固な網状ペリクルを形成できることが示唆された。これらの知見を生かした活性汚泥の綿状化抑制制御が期待される。

Pellicle formation of a filamentous bacterium *Leptothrix*

○Tatsuki Kunoh¹, Erika Ono¹, Xiaojie Li¹, Tatsuya Yamamoto¹, Manoj Prasad¹, Shinya Sugimoto², Nozomu Obana³, Nobuhiko Nomura¹, Andrew Utada¹
(¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Med., Jikei Univ., ³Med., Univ. Tsukuba)

Key words filamentous bacterium, pellicle, sheath, hydrophilicity

2E03-04 SOFIX 有機標準土壌等を用いた土壌の物理性の解析

○高橋 海, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
(立命館大院・生命科学)
kubo@sk.ritsumeikai.ac.jp

【背景・目的】

土壌中の炭素量が増えると、保水容量が向上することが知られている。それは、炭素が土壌に含まれることで土壌の団粒構造の形成が促進され、孔隙率が上昇し、保水性 (水分を保持する性質)、通気性などの物理性が向上するためである。しかし、土壌の全炭素量(TC)と最大保水容量(AWHC)に関連性があることは明らかであるが、それらが農法や土壌の種類によってどの程度異なるか明らかでない。本研究では、様々な農地のデータから農地ごとの TC と AWHC の関係を明らかにし、また、土壌の種類の違いによる AWHC の変化と、同じ土壌での TC の違いによる AWHC の変化を解析することで、土壌の TC と AWHC の関連性を解明することを目的とした。

【方法・結果】

はじめに既存の畑、樹園地、水田の土壌分析データ (データ数: 1,357, 133, 302) を用いて TC, AWHC の相関関係を調べた。その結果、畑と樹園地では強い相関があり (それぞれ $r = 0.78$, $r = 0.90$)、水田では弱い相関があった ($r = 0.36$)。次に、様々な土壌 (真砂土、黒土、粘土、農地の土壌) を用いて、TC の違いによる AWHC の値を測定するため、以下の実験を行った。各土壌について、700°C、15 min で加熱処理した土壌を作製し、比較対象として乾燥させた土壌 (未処理土壌) を用いて、それらの AWHC を測定した。その結果、未処理の土壌では、農地の土壌の TC は 41,978 mg/kg で AWHC が 911 mL/kg であったのに対し、真砂土の TC は 6,828 mg/kg で AWHC が 504 mL/kg であり、TC が大きい土壌の方が、AWHC が高くなった。また、加熱処理により全ての土壌で TC は低下し、それに伴い AWHC の値も低下した。黒土でも同様の結果が出た。次に、AWHC に影響を与える他の要因として、各土壌をふるいにかけて、土壌の粒径による AWHC の違いを調べた。結果、全ての土壌について、粒径が小さいほど AWHC の値が大きくなった。

Analysis of soil physical properties using SOFIX organic standard soils, etc.

○Kai Takahashi, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil, water, carbon, clay

2E03-05 森林整備による池の水質浄化

○岡崎 飛鳥, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
(立命館大院・生命科学)
kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

【背景】

近年、湖沼などの止水域における水質汚濁が問題となっている。汚濁の原因物質は、落ち葉などの有機態窒素や有機態炭素である。これらの汚濁物質は本来、自然浄化能（好気性細菌などの浄化効果）によって分解される。しかし、止水域では水の流れが緩やかであり、自然浄化能が阻害される。従って、汚濁物質が分解されずに堆積し、自然流入量（池へと流れ込む汚濁物質質量）が増加する。このバランスが自然流入量に傾くことで、水質は悪化すると考えられる。そこで、本研究では森林整備を行うことによって、自然流入量の減少とともに、池の流入量を増加させることによる、池の水質向上を目的とした。

【方法・結果】

本実験では、立命館大学びわこ草津キャンパス内の北野新池で実験を行った。北野新池は、周りが森林に囲まれており、家庭用排水などの流入がない自然止水域である。これまでに、対流水処理装置を用いて人工的な対流を起こし、微生物増殖を促す自浄作用を活性化させた。この装置によって有機炭素量（TOC）、および全窒素量（TN）は装置稼働前と比較して、約2倍減少した。その後、装置を停止させたところ、TOCとTNは約1.5倍増加した。このことから、処理装置により炭素では年間42.4 kg、窒素では6.7 kg除去されていることが算出された。また、装置を利用せず、森林整備により、約2万本ある雑木を半数にすることで、自然浄化能が流入量を上回ると算出された。

2021年9月から北野新池周辺森林にて、胸高直径5 cm以下の木を整備対象として、森林整備を行った。水質への影響を解析するために、流入口、流出口の二箇所ですamplingを行い、水サンプルからTOC、TN、化学的酸素要求量（COD）など全7項目を測定した。その結果、例年に比べ流入量の増加は確認できなかったが、TOCおよび、CODは減少傾向にあることが確認された。

Purification of pond water quality by forest maintenance

○Asuka Okazaki, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words purification, water quality

2E03-06 南極地域における大気バイオエアロゾル種組成変化

○小林 史尚
(弘前大院・理工)
fumihisa@hirosaki-u.ac.jp

【緒言】大気バイオエアロゾルとは、大気中を浮遊する生物粒子のことで、昨今では大陸間を長距離輸送し沈着地の生態系を含め環境影響を及ぼす要因として注目されている。南極は周りを海に囲まれた孤立した大陸で、ほとんどが氷床で覆われているほど寒冷なため貧弱な生態系をもつ。本研究では、バイオエアロゾル観測の経験をもつ筆者が第54次南極地域観測隊に参加し、昭和基地と南極特別保護地区であるラングホプデ雪鳥沢におけるバイオエアロゾル経時観測を実施し、超並列シーケンサーを用いたアンプリコン解析を行った。

【実験方法】発表者が第54次南極観測隊に参加し、昭和基地（60°00'S, 39°36'E）においては2012年12月26日から2013年1月10日まで毎日1時間、雪鳥沢（69°15'S, 39°43'E）においては2013年1月26日から30日まで観測を実施した。フィルターサンプルは密閉して日本に持ち帰り、超並列シーケンサーを用いた16SrRNAアンプリコン解析を行った。

【結果と考察】昭和基地における観測では、種組成が激しく変化し、例えば2013年1月12日から15日においては、Betaproteobacteria網の占有率が急激に高くなることわかった。ラングホプデ雪鳥沢では、人の居住区から遠く離れており、南極特別保護地区に指定され南極地域の中でも極端に人の立ち入りが制限されていることから、昭和基地にみられた著しい種組成の変動はみられなかった。昭和基地とラングホプデ雪鳥沢を比較した結果、一部のヒト起源と思われる細菌群は有意差があり、他の細菌群でも有意差があった。有意差のない細菌群の方が割合も種類も多いため、本研究のバイオエアロゾル観測結果から、昭和基地では人為的な細菌の影響はほとんどないと判断した。本研究は国立極地研究所公開利用研究（AAO-54-03）によって行われ、科研費23405003の助成を受けたものです。

Variations in Bacterial Communities of Atmospheric Bioaerosols on Antarctica

○Fumihisa Kobayashi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Hirosaki Univ.)

Key words atmospheric bioaerosol, Antarctica

2E03-07 道志川における2-メチルイソボルネオール生成微生物と環境要因に関する解析

○奥野 凌, 大槻 隆司
(山梨大院・医工農)
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】2-メチルイソボルネオール(2-MIB)は、飲料水のかび臭さや味の原因物質である。2-MIBは藍藻類や放線菌などが生成し、湖沼では水温や窒素、リンの増加に伴って生成量が増大することが多く報告されている。神奈川県横浜市の上水道水源である道志川は山間地の清流であるにもかかわらず、近年、2-MIBの発生が問題となっており、従来多く報告されてきた湖沼の富栄養化とは生成機序が異なることが予想された。本研究では、道志川河床の経時的な微生物変動をアンプリコン解析によって調査するとともに、試料採取時の2-MIB濃度や環境因子などの実測データから、2-MIB生成微生物の特定と生成に及ぼす環境要因解析を試みた。

【方法と結果】横浜市水道局の取水口から上流側の4地点で、2021年7-9月に毎週採取した河底付着物から総DNAを抽出し、ナノボアシーケンサーを用いてアンプリコン解析を行なった。また試料採取から総DNAを抽出し、ナノボアシーケンサーを用いてアンプリコン解析を行なった。また試料採取の河川水温やpH、2-MIB濃度の測定データと共に、流域の気温、降水量、日照時間、降水量などの気象データ等もパラメーターとして加え、微生物相変動データとの相関相変動データとの相関解析を行った。その結果、2-MIB生成に強く相関する微生物種として *Phormidium autumnale* が示された。2-MIB生成に影響を及ぼす環境要因についてもいくつかの知見が得られたので報告する。本研究は横浜市水道局と共同で行った。

Multivariate analysis among 2-methylisoborneol production, microbial communities and environmental factors in Doshi river

○Ryo Okuno, Takashi Ohtsuki
(Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi)

Key words environmental bacteria, cyanobacteria

2E03-08 Effect of fertilizer application for the volatile organic compounds (VOCs) formation in plant leaves

○Ju Yeon Lee, Jeong Wook Jo, Seung Woo Yang, Hyung Joo Kim, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi
(Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)
hyungkim@konkuk.ac.kr

This study presents the effect of fertilizer application for the biological volatile organic compounds (BVOCs) formation in plant leaves. Nitrogen, phosphorus and potassium are essential nutrients for plant growth and metabolisms. Using *Hedera helix*, various nutrients with different concentration were applied to control the BVOC concentration in the plant leaf. When the leaves were analyzed with GC-FID after the nutrition, the plants produced different BVOC concentration with the leaves with the different nutrition conditions. In the case of nitrogen and phosphorus, the plant produced maximum BVOC in the leaves with the 1.125g/m², 0.9g/m² (about 1/8 amount of recommended concentration for the plant nutrition each) of application. In the case of potassium, the plant produced the maximum BVOC with 0.9g/m² (about 1/4 amount of recommended concentration for the plant nutrition) of application. Our study demonstrated that the application of different type and concentration induced different BVOC formation in the plant leaf, and could be applied for the improving the fragrance condition of indoor plants.

Effect of fertilizer application for the volatile organic compounds (VOCs) formation in plant leaves

○Ju Yeon Lee, Jeong Wook Jo, Seung Woo Yang, Hyung Joo Kim, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi
(Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

Key words physical stimulation of plant, plant volatile organic compounds

2E03-09 異化的亜リン酸酸化を行う化学独立栄養細菌の探索と解析

○山中 享史, 加藤 淳也, 田島 誉久, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 中島田 豊, 黒田 章夫, 廣田 隆一
(広島大院・統合生命科学)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】

異化的亜リン酸酸化(Dissimilatory Phosphite Oxidation, DPO)とは、亜リン酸(HPO₃²⁻)の酸化によってATP及び還元力を得るエネルギー獲得様式であり、同化的な亜リン酸酸化と区別される。DPOを行う微生物(DPOM)として2002年にDesulfotignum phosphitoxidansが発見され、近年のメタゲノム解析により新たな分類に属するDPOMの存在も示唆されている。DPOMはまだ発見されて間もない細菌であるため、環境中での分布や存在量など不明な点が多い。本研究では、既知のDPOMの情報を基にPCRによるDPOMの検出系を構築し、様々な環境土壌からDPOMの検出を試みた。また次世代シーケンサーを用いた菌叢解析によりDPOMの同定を試みた。

【方法・結果】DPOMに特異的な亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子ptxD及び亜リン酸特異的輸送体遺伝子ptdCを対象としたプライマーを作製し、様々な環境土壌から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、汽水湖底泥由来の嫌気消化汚泥サンプルから陽性増幅産物が得られ、DPOMの存在が示唆された。亜リン酸を電子供与体とした合成培地に、この汚泥を接種し培養した結果、経時的に亜リン酸の消費が観察された。また、亜リン酸の減少に伴って硫酸塩が減少したことから、このDPOMは硫酸を電子受容体とすることが示唆された。この培養サンプルから抽出したDNAについて16S rDNA配列に基づく菌叢解析を行った結果、既知のDPOMに近縁の細菌が増殖していることが示唆された。

Screening and characterization of chemoautotrophic bacteria that grow by dissimilatory phosphite oxidation

○Takafumi Yamanaka, Junya Kato, Takahisa Tajima, Takenori Ishida, Takeshi Ikeda, Hisakage Funabashi, Yutaka Nakashimada, Akio Kuroda, Ryuichi Hirota
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words phosphite oxidation, sulfate reduction, metagenomics, 16S rRNA

2E03-10 アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸合成・分解酵素の解析

○西村 聡子¹, 水崎 圭¹, 清水 博史¹, 三宅 克英², 飯島 信司¹
(¹愛工大・工, ²名城大・理工)
ijimarecdna@aitech.ac.jp

アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* は、アンモニアの酸化によってエネルギーを得る化学合成独立栄養細菌であり、増殖に有機物を必要とせず、生物学的排水処理において窒素化合物の除去に利用されている。この菌は、排水処理プラントなどでは通常バイオフィルムを形成しているが極めて増殖が悪く、この点を克服できれば排水処理の効率化が期待できる。一方、細菌の運動性やバイオフィルム形成は、グラム陰性細菌を中心に広く分布するセカンドメッセンジャーである環状ジグアニル酸で制御される事が多い。そこで我々は、アンモニア酸化細菌における環状ジグアニル酸の生理作用について研究を行っている。

NCBI データベースの解析及び活性中心のアミノ酸の保存性などから、アンモニア酸化細菌 *N. europaea* NBRC14298 が5種の環状ジグアニル酸合成酵素と5種の分解酵素を持ち、さらに8種の不活性型酵素を持つと推定した。また、これらの一部はヘムと結合して酸素センサーとして働くPASドメインなど、シグナル伝達に関与するドメインを有していた。このように多岐にわたる環状ジグアニル酸合成・分解酵素の存在は大腸菌などでも報告されているが、この菌における環状ジグアニル酸の生理機能を明らかにするためには、まず酵素活性の有無など基本的特性を調べる必要がある。そこで、これらのうち合成酵素1種、分解酵素2種をT7ファージプロモーターを用いた発現ベクターにHisタグ融合タンパクとしてクローニングし、そのうち合成酵素を大腸菌BL21株で大量生産した。タロンカラムでHisタグ融合タンパクを精製し、酵素反応を行いELISAで定量した結果、環状ジグアニル酸の合成を確認することができた。今後、他の酵素についても酵素活性を検討する予定である。

Analysis of enzymes involved in c-di-GMP synthesis and degradation in an ammonia oxidizing bacterium

○Akiko Nishimura¹, Kei Mizusaki¹, Hiroshi Shimizu¹, Katsuhide Miyake², Shinji Iijima¹
(¹Fac. Eng., Aichi Inst. Technol., ²Fac. Sci. Technol., Meijyo Univ.)

Key words nitrogen removal, wastewater treatment, biofilm

2E03-11 *Aspergillus oryzae*によるβラクタム系抗生物質の除去

○星野 里帆¹, 満保 拓実², 佐野 元昭^{1,2}
(¹金工大院・工, ²金工大)
msano@neptune.kanazawa-it.ac.jp

近年、世界的に抗菌薬耐性(AMR)が問題となっており、2050年には1,000万人の死者が出るとされている。耐性菌が発生する要因の一つとして、河川に流出した抗生物質である。抗生物質が多量に排出されることにより、ヒトや家畜の体内で分解されきれずに排泄物と共に排出される。排出された抗生物質の一部は下水処理場で分解されることなく、河川に流出し、耐性菌が発生する原因となる。*Aspergillus oryzae* は、β-ラクタマーゼ遺伝子を持っているため、βラクタム系の抗生物質を分解することができると推測される。また、日本酒や醤油などの食品の製造に利用されるため、人体や環境への安全性も高い。本研究では、*A. oryzae* を利用しβラクタム系抗生物質を除去するための基盤構築を目指す。*A. oryzae* RIB40を、βラクタム系抗生物質の一種であるアンピシリンを含むLB培地で培養し、培養した後のLB培地で*Escherichia coli* DH5αを培養を行い、*E. coli* DH5αの生育によりアンピシリン分解の確認を行った。その結果、*A. oryzae* RIB40を4日間培養したLB培地では、アンピシリン濃度が50 µg/mlの場合まで*E. coli* DH5αの生育が確認できた。また、*A. oryzae* RIB40を6日間培養したLB培地では、アンピシリン濃度が677 µg/mlの場合まで*E. coli* DH5αの生育が確認された。これらの結果より、*A. oryzae* RIB40によるアンピシリンの分解が確認できた。そこで次に、分解に関わる遺伝子を特定するためRNA-seq解析を行った。その結果、アンピシリンを添加することで*A. oryzae* RIB40の遺伝子14,005個の内6,161個の遺伝子の発現上昇が確認された。現在、遺伝子破壊実験によりアンピシリン分解に関与する遺伝子の特定を行っている。

Removal of beta-lactam antibiotics by *Aspergillus oryzae*

○Riho Hoshino¹, Takumi Mambo², Motoaki Sano^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., ²Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Aspergillus oryzae*, antibiotics, beta lactamase

2E03-12 海洋生分解性プラスチックの開発

○常盤 豊
(グリーンテクノプラス)
tokiwayu@ozzio.jp

【背景と目的】最近、サンゴ礁が広がる美しい海や陸地から遠く離れた外洋においても、プラスチックごみ問題が深刻になっている。その解決策の一つとして、海洋生分解性プラスチックの研究開発が注目される。一般に、海洋では微生物が必要とする栄養素が少なく、特に熱帯・亜熱帯海域の表層では、窒素とリンの元素が不足しており、有機物の生分解活性が弱い状態にあると考えられる。今回、窒素とリンの元素を含んだ各種の生分解性プラスチックを開発し、沖縄県うるま市の中城湾から採取した海水を用いて、それらの生分解性を評価した。

【方法】生分解性の評価は、BOD測定装置(VELP Scientifica BOD Sensor System)を用いて行った。海水250 mlが入った500 ml容の褐色ビンに被試験試料40 mgを加えた後、酸素用の圧力センサーをセットし、27°Cで攪拌しながら反応を行った。試料の生分解に伴う酸素消費量を測定してppmで表示した。被試験試料の分解率は、それぞれの理論的酸素要求量を100%として求めた値である。クロロホルムやトリフルオロエタノールに溶かした各種の生分解性プラスチックに、硫酸アンモニウムとリン酸二水素カリウム(重量比5:1)からなるNP添加剤を混ぜた後、溶媒を飛ばして一定量の窒素とリンを含むフィルムあるいは粉末を調製した。

【結果と考察】NP添加剤を含む場合のみ、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)とその共重合体、ポリプロラクトン、ポリ(ブチレンサクシネート-co-アジペート)、バイエル社のナイロン6系BAK1095、ナイロン6,6系BAK2195は、亜熱帯海域の沖縄の海水により生分解されることが明らかとなった。また、イーストマンケミカル社のEaster BIO(Copolyester14766)およびノバモント社のデンペン系Mater Biについても、NP添加剤を含む場合のみ、沖縄の海水によりある程度の生分解性が認められた。

Development of marine biodegradable plastics

○Yutaka Tokiwa
(Green Technology Plus)

Key words marine, biodegradable plastic, nitrogen, phosphorus

2F02-01 糸状菌における攪拌翼形状とタンパク質生産分泌生産の相関解析

○小野 太暉¹, 鈴木 智大¹, 松本 琴音², 荻野 千秋¹, 若井 暁³,
近藤 昭彦³, 坊垣 隆之², 坪井 宏和², 加戸 悠^{2,3}, 幸田 明夫²,
辻野 義雄³
(¹神戸大院・工, ²大関総研, ³神戸大院・科技イノベ, ⁴海洋研究
開発機構, ⁵神戸大・工)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】近年、微生物培養により有用物質を作り出すバイオプロセスを効率化する事は、工学的立場から非常に重要である。工業的なバイオプロセスにおいて、攪拌操作は微生物の培養環境における不均一性をできるだけ小さくするために非常に重要な操作である。本研究では酸化還元酵素を分泌生産する糸状菌をモデル評価系として用い、攪拌翼によるタンパク質の分泌生産への影響の相関関係を検討する。

本研究で用いる糸状菌は、培養経過に応じて生産物が蓄積し、培養液の粘度が上昇することによって、攪拌槽内の均一な混合が難しくなる問題がある。そのため、一般的なバイオプロセスに用いられるディスクタービン翼を用いた培養槽の混合では、より均一な混合を達成させるためには、攪拌翼の回転数を上げる必要があるが、せん断応力により菌が損傷するため酵素生産性が低下してしまう。一方、大型攪拌翼は低い回転数で、高粘度域の培養液において高い混合効率が期待できる。そのため、MaxBlend (MB)翼と Fullzone (FZ)翼を代表とする様々な形状や混合特性を持つ大型攪拌翼が開発されてきている。しかしながら、大型攪拌翼による化学反応への攪拌特性解析の研究報告はあるが、その混合特性がどのように糸状菌の酵素生産に影響を及ぼすのか調べた研究例は少ない。

【実験方法】本研究では、5 L ジャーファーマンターでディスクタービン翼、MaxBlend (MB)翼、そして Fullzone (FZ)翼を用いた培養を行い、外来性酸化還元酵素の分泌生産性に及ぼす影響を検討した。酵素活性は1分間に1 μmol の ABTS 基質溶液を酸化する酵素量を1 U と定義した。

【結果】MaxBlend (MB)翼を用いた回分培養では、約1.5 g/L 程度の外来性酸化還元酵素の生産が見られた。今後はシミュレーションソフトを用い、攪拌翼形状による外来性酸化還元酵素の生産性への影響を解析する予定である。

Correlation analysis of stirring blade shape and protein production secretory production in filamentous fungi

○Taiki Ono¹, Tomohiro Suzuki¹, Matsumoto Kotone², Chiaki Ogino¹,
Satoshi Wakai^{3,4}, Akihiko Kondo³, Takayuki Bogaki², Hirokazu Tsuboi²,
Haruka Kado^{2,3}, Akio Koda², Yoshio Tsujino³
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Gen. Res. Lab., Ozeki Corp., ³Grad. Sch. Sci.
Technol. Innov., Kobe Univ., ⁴JAMSTEC, ⁵Fac. Eng., Kobe Univ.)

Key words shear stress, filamentous fungi, protein

2F02-02 麹菌の液体培養における菌糸分散株の酸素移動度改善がもたらす一次代謝への影響

○薄田 隼弥¹, 武藤 清明¹, 荒木 聡馬², 市川 暉¹, 宮澤 拳¹,
吉見 啓^{3,4}, 加藤 好一⁵, 熊谷 俊高⁶, 油谷 幸代⁶, 阿部 敬悦^{1,4}
(¹東北大院・農, ²東北大・農, ³京大院・農, ⁴東北大・未来研, ⁵佐
竹マルチミクス, ⁶産総研)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

糸状菌の液体培養では、糸状の形態が培養液粘度を上昇させ、培養槽内の酸素の移動を制限することが知られる¹⁾。当研究室では、麹菌 *Aspergillus oryzae* において細胞壁多糖 α-1,3-グルカン (AG) とガラクトサミノガラクトン (GAG) が菌糸凝集因子であることを明らかにした²⁾。ジャー型発酵槽において、AG、GAG を共欠損した AGΔ-GAGΔ 株は野生型株に比べて酵素生産量が増加し³⁾、培養液粘度が低下することが示された³⁾。培養槽内の流動を CFD 計算により解析したところ、AGΔ-GAGΔ 株の培養液は野生型株と比べてガス分散性が良いことが示唆された⁴⁾。そこで本研究では、培養槽内のガス移動が AGΔ-GAGΔ 株の酵素生産性に与える影響について解析した。

モデル組換え酵素のクチナーゼを高発現させた野生型株および AGΔ-GAGΔ 株を、4 L 容のジャー型発酵槽にて 60 時間培養し、酵素生産量を定量した。このとき、攪拌速度を 400 rpm から 1200 rpm まで段階的に設定し、培養槽内の溶存酸素濃度および排気ガス中の酸素濃度に基づき酸素移動容量係数 (K_{La}) を算出した。その結果、酵素生産量は 400 rpm では培養 60 時間目まで株間に有意差は見られなかったが、800 rpm においては培養 36 時間目以降で AGΔ-GAGΔ 株が野生型株を有意に上回った。 K_{La} は各攪拌速度の 24 から 48 時間において AGΔ-GAGΔ 株の K_{La} が野生型株を上回った。また、 K_{La} が約 80 hr⁻¹ を超える条件では AGΔ-GAGΔ 株の酵素生産量が上回った。以上より、AGΔ-GAGΔ 株は培養液粘度の低下によりガス交換効率が向上して K_{La} が上昇し、酵素生産量の増加に帰結したことが示唆された。現在、有機酸生産量の定量と網羅的な転写解析に基づき、AGΔ-GAGΔ における一次代謝と酵素生産の相関関係を調査している。1) Anteckka et al. (2016), 2) Miyazawa et al. (2019), 3) Ichikawa et al. (2022), 4) 市川ら、日本生物工学会大会 (2019)

Effects of oxygen mass transfer improvement on primary metabolism in the hyphal dispersed mutant of *Aspergillus oryzae* in a lab-scale bioreactor

○Shunya Susukida¹, Kiyooki Muto¹, Soma Araki², Hikaru Ichikawa¹,
Ken Miyazawa¹, Akira Yoshimi^{3,4}, Yoshikazu Kato⁵, Toshitaka Kumagai⁶,
Sachiyo Aburatani⁶, Keietsu Abe^{1,4}
(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Dept. Agric., Tohoku Univ., ³Grad. Sch.
Agric., Kyoto Univ., ⁴NiCHE, Tohoku Univ., ⁵SATAKE Multimix Corp., ⁶AIST)

Key words *Aspergillus oryzae*, bioreactor, recombinant protein production, computational fluid dynamics

2F02-03 *Cupriavidus necator* を宿主とした乳酸ベースポリマーの合成

○板倉 真優¹, 宮原 しろ沙², 岡本 沙樹¹, 田中 賢二³, 田口 精一⁴,
松崎 弘美^{1,2}
(¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生, ³近畿大・産理
工, ⁴神戸大院・科技イノベ)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【背景および目的】環境汚染が問題視されている化石燃料由来プラスチックの代替品として、自然界に存在する微生物により二酸化炭素と水にまで分解される生分解性プラスチックが注目されている。生分解性プラスチックの1つに微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) があるが、一般に不透明であり、その使用用途は制限される。一方、乳酸 (LA) および3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) ユニットからなる共重合ポリエステル P(LA-co-3HB) は LA 分率を 15~30 mol% に高めると透明性・柔軟性に優れる。さらに、現在最も実用化されている生分解性プラスチックであるポリ乳酸 (PLA) と比較して生分解性にも優れることから、食品包装やペットボトルなど幅広い用途での実用化が期待される。本研究では、PHA 生産性に優れる *Cupriavidus necator* を宿主として、高性能で実用的な LA ベースポリマー P(LA-co-3HB) を合成することを目的とした。

【方法および結果】*C. necator* H16 の短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子 (*phbC*) を破壊した H16Δ*phbC* 株および *phbC* を *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素改変体遺伝子 [*phaCl(STQK)*] に置換した H16Δ*STQK* 株を宿主として、プロピオニル CoA 転移酵素遺伝子 (*pci*)、D-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhD*) および *phaCl(STQK)* 遺伝子を導入した組換え株を培養した。これらの組換え株を、窒素源を制限したミネラル塩 (MS) 培地にて糖を唯一の炭素源として培養した結果、LA 分率が 0.1~4.5 mol% の P(LA-co-3HB) を合成した。また、*ldhD* 遺伝子をコード最適化した組換え株においては、LA 分率は向上しなかった。現在、ポリマー鎖中の LA 分率の向上のために、宿主の代謝改変を含めたさらなる分子育種を進めている。

Biosynthesis of lactate-based polymers using *Cupriavidus necator* as a host

○Mahiro Itakura¹, Shirosa Miyahara², Saki Okamoto¹, Kenji Tanaka³,
Seiichi Taguchi⁴, Hiromi Matsusaki^{1,2}
(¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ²Fac. Environ. Sym. Sci.,
Pref. Univ. Kumamoto, ³Fac. Humanity-Oriented Sci., Eng., Kindai Univ., ⁴Grad.
Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactate-based polymers, *Cupriavidus necator*

2F02-04 コリネ菌を用いたグルコースからのフロログルシノール生産技術の開発

○堀田 真代¹, 道家 美紗¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

フロログルシノール (1,3,5-トリヒドロキシベンゼン) は医薬品や食品、化粧品など多岐にわたり用いられる物質である。本研究ではコリネ菌を用いて遺伝子の導入・破壊による代謝改変を行うことにより、グルコースからフロログルシノールを生産する技術の開発を目指した。

研究戦略として1. 生産経路の構築、2. 消費遺伝子の特定、3. フラックスの強化の3つに取り組んだ。1. コリネ菌はフロログルシノール生産能を持たないため、外来遺伝子 *phlD* を導入することでフロログルシノール合成経路を構築した。結果、フロログルシノール生産成功したことが、時間経過と共に濃度が減少したことから、フロログルシノールはコリネ菌によって消費されることがわかった。そこで、2. 芳香族化合物消費遺伝子に注目し、*cg1309* がフロログルシノール消費に関与していることを解明した。*cg1309* を破壊することで、消費抑制に成功したが、依然として消費されることから、他にも消費遺伝子があると考えられる。更なる生産量増加を目指して、3. ビルビン酸蓄積量増加を目的として、*acc* 制御および脂肪酸合成に関与する *fasR* の破壊、副生成物である乳酸合成遺伝子 *ldh* の破壊を試みた。また、フロログルシノールの前駆体であるマロニル CoA 蓄積量増加を目的として、*acc* の過剰発現およびプロモーターの検討を試みた。これらの研究戦略により、最終的に培養開始 24h 後に 938 mg/L のフロログルシノール生産を達成した。

現在、フロログルシノール消費抑制・阻止を目指して、遺伝子発現量解析に基づいた RNA-seq 法により、消費遺伝子の特定および破壊を行っている。加えて、更なる生産量向上に向けて、補酵素 (ATP や NADH) 増加に注目したフラックスの強化に取り組んでいる。

Phloroglucinol production from glucose using *Corynebacterium glutamicum*

○Horita Mayo¹, Doke Misa¹, Kondo Akihiko², Tanaka Tsutomu¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*

2F02-05 コリネ菌を用いたスチレン生産技術の開発

○岡田 海斗¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大・先端バイオ工研セ)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

スチレンは多くの合成樹脂の原料として利用されており、ラジカル重合により得られる重合体のポリスチレン樹脂は熱可塑性樹脂としてポリエチレン、ポリ塩化ビニルと並んで重要な合成樹脂である。本研究では、微生物であるコリネ菌 (*Corynebacterium glutamicum*) の生体内代謝経路を用いて、グルコースからの合成を目指した。

スチレンは、phosphoenolpyruvate (PEP) と erythrose-4-phosphate (E4P) の縮合反応に始まり、chorismic acid, L-phenylalanine, trans-Cinnamic Acid (tCA) を経て合成される。*C. glutamicum* は元来、tCA 生産能を有していないことから、本研究では第一段階としてフェニルアラニンアンモニオアリアラーゼの過剰発現によりグルコースを原料とする tCA 合成経路の構築を行った。次に第二段階として、tCA のスチレンへの転換における脱炭酸反応に注目した。この脱炭酸反応において、フェルラ酸デカルボキシラーゼ (FDC) に補酵素プレニル化フラビンモノスクレオチド (prFMN) が結合した prFMN 結合 FDC が触媒として機能することが知られている。このことを踏まえて、本研究では *ubiX* 遺伝子および *FDC* 遺伝子を過剰発現させることで、tCA のスチレンへの転換を目指した。以上の戦略を進めた結果、*pheA* 遺伝子と *RgTAL* 遺伝子の導入によるグルコースからの tCA 合成経路の確立及び、tCA のスチレンへの転換に成功した。そして、この2つの戦略を組み合わせることでグルコースを原料とするスチレン生産を達成し、最大で 1.82 g/L のスチレンの生産が確認された。

本研究では、*C. glutamicum* を用いて初めて、グルコースからスチレンを合成する経路を確立することができた。そして、この結果は *C. glutamicum* が付加価値の高い化学物質の生産宿主として大きな可能性を持っていることを示すものである。

Direct styrene production from glucose using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*

○Kaito Okada¹, Akihiko Kondou², Tsutomu Tanaka¹
(¹Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ²EGBRC, Kobe Univ.,)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, styrene, metabolic engineering

2F02-06 PHB production from CO₂-derived acetate via acetogen

○Huan Ren^{1,2}, Kazuaki Ninomiya^{1,2}
(¹Grad. Sch. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

[Objective] Recently, CO₂ bio-recycling into chemicals has been paid great attention. Acetogen is chemoautotrophic bacteria utilizing CO₂ and H₂ as carbon source and energy source, respectively. Especially, homoacetogen produce acetate as sole product during the culture. In the present study, CO₂-derived acetate by homoacetogen was converted into biodegradable polymer polyhydroxybutyrate (PHB). Concretely, in the first step, culture of homoacetogen was conducted to convert CO₂ to acetate; in the second step, the acetate-containing supernatant was used as culture medium to cultivate the PHB producing strain.

[Methods and results] Thermoanaerobacter kivui DSMZ2030 and Cupriavidus necator NCIBM11599 were used as homoacetogen and PHB accumulating strain, respectively. T. kivui was cultivated anaerobically with 20 % CO₂ and 80% H₂ at 60°C using shaker at 200 rpm, in 25 mL of the synthetic mineral medium excluding carbon source, amino acids and vitamins. Closed culture vial (125 mL) was over-pressured everyday with mixed gas (20 % CO₂ and 80% H₂) at 0.2 MPa. The anaerobic culture was continued until when the over-pressuring was impossible. Acetate concentration increased along with the culture time, reaching 5 g/L at 8 days. After the anaerobic culture of T. kivui, the culture supernatant was recovered. The supernatant was used as medium for C. necator after pH adjustment and autoclave. C. necator consumed the acetate and showed the growth in the prepared medium. The PHB content was 35% at culture time of 24 h.

PHB production from CO₂-derived acetate via acetogen

○Huan Ren^{1,2}, Kazuaki Ninomiya^{1,2}
(¹Grad. Sch. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words CO₂, H₂, acetate

2F02-07 *Bifidobacterium dentium* が生産する MVs の特性

○前田 瑞歩¹, 小西 莉子², 入江 健太², 岡田 美玖², 福田 隆志², 川本 純³, 今井 友也⁴, 栗原 達夫³, 倉田 淳志², 上垣 浩一²
(¹近畿大院・農, ²近畿大・農, ³京大・化研, ⁴京大・生存研)
095605@nara.kindai.ac.jp

[目的] 多様な腸内細菌は、脂質二重膜から成るナノサイズの小胞 (Membrane vesicles; MVs) を生産する。現在、腸内細菌由来の MVs の特性や MVs による宿主への影響はほとんど解明されていない。本研究では、*Bifidobacterium dentium* の MVs に注目して、ヒト白血球 T 細胞への影響を検討した。

[方法・結果] *B. dentium* の培養液から分画遠心法を用いて、MVs の回収を試みた。細胞膜特異的な染色色素 FM4-64 による発色と透過型電子顕微鏡を用いた観察によって、この回収した画分に MVs を検出できた。ナノ粒子トラッキング分析により、本菌株の培養液上清中に 6.9×10^8 個/mL の MV (平均 113.2±3.6 nm) を検出できた。GC-MS によって本 MVs を構成する脂肪酸を分析した結果、本菌体を構成する脂肪酸と同様に、14-メチルペンタデカン酸、パルミチン酸、10-オクタデセン酸、エライジン酸、ステアリン酸を検出できた。一方、WST-1 アッセイにより本 MVs のヒト白血球 T 細胞の増殖抑制能を評価したところ、増殖抑制率 62% (MVs: 69 µg/mL) を示し、本 MVs は濃度依存的なヒト白血球 T 細胞増殖抑制作用を示した。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて本 MVs によるヒト白血球 T 細胞への影響を検討した結果、ミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ 3/7 の活性化、核の形態変化を確認できた。さらにアネキシン V を用いて、ホスファチジルセリンの細胞表層への提示を確認できたので、本 MVs によってヒト白血球 T 細胞は細胞死が誘導されたと考えられた。

Characterization of membrane vesicles produced by *Bifidobacterium dentium*

○Mizuho Maeda¹, Riko Konishi², Kenta Irie², Miku Okada², Takashi Fukuda², Jun Kawamoto³, Tomoya Imai⁴, Tatsuo Kurihara², Atsushi Kurata², Koichi Uegaki²
(¹Grad. Sch. Agric. Kinki Univ., ²Fac. Agric., Kinki Univ., ³Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., ⁴RISH, Kyoto Univ.)

Key words bifidobacterium, membrane vesicles, cell death, cell morphology

2F02-08 カイコを用いたブタロウイルス構造タンパク質の発現

○加藤 竜也^{1,2,3}, 角田 達紀², 米塚 亜美², 町田 佑樹³, 関口 智史³, 徐 剣⁴, 鈴木 亨⁵, 朴 龍洙^{1,2,3}
(¹静大・グリーン科技研, ²静大・農, ³静大院・総合科技, ⁴静大・グリーン科技研 (現・華東師範大学), ⁵農研機構・動衛研)
kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp

ブタロウイルス A は生産現場で最も多く検出され、特に子豚に嘔吐や下痢を引き起こす主要病原体の一つである。感染した個体は、発育遅延に加え重症化するに至るため、その経済的損失は甚大である。本研究では、ブタロウイルス A ワクチン開発の基盤を整備するために、群抗原である内殻タンパク質 VP6 と中和誘導抗原である外殻タンパク質 VP7 をカイコ幼虫で発現および精製した。VP6 については、N 末端側にタグ配列のみ (T-VP6)、もしくはタグ配列とカイコ 30K タンパク質 (30K6G) のシグナル配列を付加した融合タンパク質 (30k-T-VP6) として発現させた。VP7 については、C 末端側にタグ配列を付加 (VP7-PA)、もしくは N 末端側にタグ配列と 30K6G シグナル配列を付加した融合タンパク質 (30k-T-ΔVP7) として発現させた。それぞれの VP6 と VP7 は、カイコ体液および脂肪体内に予想される分子量 (VP6: 約 45 kDa、VP7: 約 40 kDa) で発現が確認された。アフィニティクロマトグラフィーにより、カイコ体液および脂肪体抽出液からはほぼ単一バンドとして精製した。T-VP6 と 30k-T-VP6 はカイコ頭あたりそれぞれ 330 µg および 50 µg、VP7-PA と 30k-T-ΔVP7 は 26 µg および 49 µg 精製できた。T-VP6 は透過型電子顕微鏡で直径約数十 nm のウイルス様粒子として確認できたが、30k-T-VP6 はそのような粒子は確認できなかった。その理由として、30k-T-VP6 は T-VP6 とは異なり N 型糖鎖付加が確認されたことから、その N 型糖鎖付加がウイルス様粒子の形成を妨げていることが示唆された。また VP7-PA と 30k-T-ΔVP7 はどちらも N 型糖鎖は付加されていたが、形態が若干異なることが示唆された。今後これら組換えタンパク質をワクチンとして動物に接種し、その効果を検証する予定である。

Expression of structural proteins of porcine rotavirus A in silkworm larvae

○Tatsuya Kato^{1,2,3}, Tatsuki Kakuta², Ami Yonezuka², Yuki Machida³, Tomofumi Sekiguchi³, Jian Xu⁴, Tohru Suzuki², Enoch Y. Park^{1,2,3}
(¹Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Fac. Agric., Shizuoka Univ., ³Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ⁴Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ. (East China Normal Univ.), ⁵NIAH/NARO)

Key words silkworm, virus, virus-like particle, protein expression

2F02-09 カバノアナタケ培養菌糸体の生理活性物質が線虫の寿命・脂肪蓄積・糖化に及ぼす影響

○杉森 康一¹, 藤 あかね¹, 櫻井 明彦¹, 畑下 昌範²
 (¹福井大院・工, ²狭エネ研)
 a_sakura@u-fukui.ac.jp

【緒言】

カバノアナタケは抗酸化作用や免疫賦活作用を示すことから、古くから薬用キノコとして用いられている。当研究室では、カバノアナタケ培養菌糸体には *in vitro* において抗糖化作用を示す物質が含まれていることを発見し、その主成分を 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL) と同定した。本研究では、DBL やその他のカバノアナタケの成分の生理活性について、線虫を用いて寿命、脂肪蓄積量、糖化の面から解析した。

【実験方法】

DBL を含有するカバノアナタケ (*Inonotus obliquus* NY-1) の画分は、30 日間の液体表面培養で得られた菌糸体の多段階抽出により調製した。得られた抽出物や DBL を生後 0 日目から線虫 (*Caenorhabditis elegans* N2) に与えて 20°C で培養し、寿命や脂肪蓄積量への影響を解析した。線虫の生存は実体顕微鏡を用いて運動性により確認し、脂肪蓄積量については、GPO・DAOS 法を用いて線虫のトリグリセリド量として測定した。また、抗糖化活性については、糖化物に由来する線虫の自家蛍光の蛍光強度から解析した。

【実験結果】

DBL を与えた線虫は、サンプル無添加の線虫に比べ 10 日目以降の生存率が大きく、DBL により寿命が延長している可能性がある。また、グルコースと同時に菌糸体抽出物を与えた線虫のトリグリセリド量は、グルコースのみを与えた線虫に比べ、生後 8 日目において有意に減少した ($p=0.015$)。カバノアナタケ菌糸体には、DBL 以外の脂肪蓄積を抑制する有効成分が含まれている可能性が高い。グルコースを与えた線虫は、糖化物に由来する自家蛍光が有意に増加することから ($p=0.00024$)、現在線虫に菌糸体抽出物または DBL をグルコースと同時に投与し、グルコースによる糖化に対する抑制効果を自家蛍光により確認しているところである。

Effects of bioactive substances from the cultured mycelium of *Inonotus obliquus* on lifespan, fat accumulation and glycation in *Caenorhabditis elegans*

○Koichi Sugimori¹, Akane Fuji¹, Akihiko Sakurai¹, Masanori Hatashita²
 (¹Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., ²Wakasa Wan Energy Res. Center)

Key words *Inonotus obliquus*, 3, 4-dihydroxybenzalacetone, *Caenorhabditis elegans*, Anti-glycation

2F02-10 カルボン酸無水物を用いたコルジセピンの誘導体化とその増殖抑制効果

○井上 元希, 鈴木 章弘, 櫻井 明彦
 (福井大院・工)
 a_sakura@u-fukui.ac.jp

【緒言】

冬虫夏草が生産するコルジセピンは、抗菌性や抗腫瘍性を示すため、新たな医薬品の原料として期待されている。しかしコルジセピンは、生体内でアデノシンデアミナーゼによって 3'-デオキシイノシンへと分解され失活する。そこで本研究では、コルジセピンの薬理活性向上を目的としてカルボン酸無水物を用いた誘導体化を検討し、日和見感染菌に対する増殖抑制効果と分解耐性を評価した。

【方法】

ピリジンに溶解したコルジセピンに 4 等量の無水プロピオン酸あるいは、5 等量の無水フタル酸を加え、コルジセピンのアミノ基を保護し (40°C, 120 或 180 min, 窒素雰囲気下)、得られた合成物をプロピオニルコルジセピン、コルジセピンフタレートとした。合成物の抗菌性を日和見感染菌 (*Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) の振盪培養における増殖抑制効果で評価した。増殖は濁度 (615 nm) で評価し、各合成物の濃度は HPLC (260 nm) および LC/MS (ESI) で測定した。

【結果と考察】

コルジセピンと無水フタル酸の反応により、コルジセピンのアミノ基だけが反応した 1 置換体 (約 67%) と、アミノ基と 1 つのヒドロキシ基が反応した 2 置換体 (約 12%) を含む混合物が得られた。コルジセピンフタレートの日和見感染菌に対する IC₅₀ 値を算出したところ、*B.cereus*, *E.aerogenes*, *Pa.aeruginosa*, *S.enterica*, *S.aureus* については 1.4~1.5 g/L であった。しかし、*E.coli* に対しては 2.0 g/L の濃度でも増殖を抑制しなかった。また、コルジセピンフタレートは菌の増殖を抑制できない場合でも培養終了まで濃度が変わらなかったことから、コルジセピンフタレートは分解耐性が高いと考えられる。現在、プロピオニルコルジセピンについても日和見感染菌に対する増殖抑制効果を解析している。

Derivatization of cordycepin with carboxylic anhydride and its growth inhibitory effect

○Motoki Inoue, Akihiro Suzuki, Akihiko Sakurai
 (Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

Key words *cordyceps militaris*, cordycepin derivative, antibacterial

2F02-11 Green synthesis of gold nanoparticles via fungal cell extract and their dye degradation potential

○Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi
 (Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

Green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) was undertaken by using the aqueous fungal cell extract of *Talaromyces purpurogenus*. The biosynthesis conditions were optimized in order to maximize the yield, without compromising the stability. The purified AuNPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering, Fourier transform-infrared spectroscopy, and inductively coupled plasma-mass spectrometry. The TEM analysis indicated that particles comprised of various irregular shapes, ranging from ~20 to 40 nm. The alcoholic/phenolic groups and amine groups, among others, present in the cell extract were found to be responsible for reduction and capping of AuNPs. The catalytic dye degradation potential was studied in the presence of sodium borohydride, with AuNPs acting as a catalyst. Several dyes and organic pollutants (p-nitrophenol, p-nitroaniline) were used to understand the kinetics of degradation, and all the compounds decomposed within 30 min. Degradation of Sudan III and IV dyes, known as potential carcinogens, was found to be slowest among the other tested dyes, and therefore LED exposure was used to enhance the rate of degradation. Blue (~80 mW/cm²) and Green (~70 mW/cm²) LED treatments were able to degrade ~15% and ~11% more Sudan III, and ~24% and ~11% more Sudan IV, respectively, compared to control (no active light exposure), within 30 min. The results reveal that *T. purpurogenus* has potential to produce catalytically active AuNPs in an environmentally friendly manner.

Green synthesis of gold nanoparticles via fungal cell extract and their dye degradation potential

○Sharad Bhatnagar, Hideki Aoyagi
 (Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words gold nanoparticles, green synthesis, dye degradation, filamentous fungi

2F02-12 海洋性細菌による含セレン・テルル重金属微粒子の合成

○小川 岳紘¹, 豊田 達哉¹, 岡村 好子², 富永 依里子³, 前田 誠⁴, 阪口 利文¹
 (¹県大広島・生命科学, ²広島大院・統合生命科学, ³広島大院・先進理工系科学, ⁴広島大・自然科学研究支援開発センター)
 sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp

【背景・目的】これまで演者らは、セレン・テルルオキサニオンに対して還元能を有する微生物の探索・分離を行い、海洋をはじめとする様々な環境から多くの分離株を獲得してきた。これらの分離株を用いてカルコゲン元素の回収やそれらの元素を用いた材料合成の可能性について検討してきた。特に、海洋魚類の腸内から分離された KND-1 株による含セレン重金属微粒子の形成について調査したところ、セレン化鉛 (PbSe) の形成が予想される結果が得られている。そこで、本研究では、海洋分離株を中心にセレン・テルルと重金属を含むナノ微粒子の微生物を用いた常温・常圧下での形成可能性について調査した。

【方法・結果】本研究では東シナ海で採取した魚類から分離された KND-1 株を中心に海洋環境から分離された微生物株を本研究に使用した。これらの分離株の培地にセレンもしくはテルルオキサニオンと重金属イオンを様々な濃度で添加して、嫌気状態において 25°C で静置培養を行い、培地内に形成された沈殿物の観察を行った。観察後、遠心集菌して上清を除去後、リゾチームなどを用いた酵素処理によって菌体を破碎した。再度遠心処理により抽出した生成物を透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察・エネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を用いた生成物の元素解析を行った。その結果、KND-1 株をセレンオキサニオンと鉛イオン存在下で培養した場合、セレン化鉛 (PbSe) と思われる結晶性、もしくはアモルファス性の微粒子の形成を確認できた。また、コバルト、ニッケルイオンを添加した場合にも同様のナノサイズの沈殿凝集体の形成が確認できた。これに対して、テルルオキサニオンと重金属イオン種を混在させて培養した場合は、テルルのみで形成される針状結晶のみが形成され、テルルをベースとする重金属との混在結晶を確認できなかった。

Synthesis of heavy metal and selenium or tellurium containing nanoparticles by marine microbes

○Takehiro Ogawa¹, Tatsuya Toyota¹, Yoshiko Okamura², Yoriko Tominaga³, Makoto Maeda⁴, Toshifumi Sakaguchi¹
 (¹Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima, ²Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ³Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Hiroshima Univ., ⁴N-BARD, Hiroshima Univ.)

Key words biosynthesis, chalcogen, nanoparticle, biomineralization

2F02-13 Production of glyceric acid from glucose using engineered *Escherichia coli*

○Bui Hoang Dang Long, Kotaro Matsubara, Yuji Aso
(Kyoto Inst. Technol.)
aso@kit.ac.jp

In this study, glyceric acid (GA) was produced from glucose, which is a common carbon source in fermentation, using engineered *Escherichia coli*. The production of GA from glucose was performed by expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*gpd1*) and glycerol 3-phosphatase gene (*gpp2*) from *Klebsiella pneumoniae*, and alditol oxidase gene (*aldO*) from *Streptomyces coelicolor*. The resulting *E. coli* produced up to 0.50 g/L of GA with the specific productivity at 0.44 g-GA/g-cells from 10 g/L of glucose after 72 h cultivation whereas the GA production titer and specific productivity of the wild type were 0.14 g/L and 0.16 g-GA/g-cells, respectively. Next, GA-2-kinase 1 gene (*gark*), GA-2-kinase 2 gene (*glxK*), and the glycerol facilitator gene (*glpF*) were sequentially disrupted in order to improve the GA production. Disruption of both *gark* and *glxK* genes impaired the growth potential of *E. coli* and consequently decreased the production titer of GA at 0.30 g/L. However, the addition of casamino acid to the minimal medium improved the growth of disruptants. The further disruption of *glpF* gene resulted in improvement of the GA production up to 0.80 g/L with the highest specific productivity at 0.72 g-GA/g-cells. This study proved the possibility of GA production from glucose and recommended further studies on the optimization of culture conditions to achieve higher purity GA on upper scales.

Production of glyceric acid from glucose using engineered *Escherichia coli*

○Bui Hoang Dang Long, Kotaro Matsubara, Yuji Aso
(Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, glycerate, alditol oxidase, microbial production

2F04-01 原生生物の捕食圧下における海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 の形態変化メカニズムの解析

○吉田 亮介¹, 渡辺 智², 石田 丈典¹, 池田 丈¹, 舟橋 久景¹,
黒田 章夫¹, 廣田 隆一¹
(¹広島大院・統合生命科学,²東農大・バイオ)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 藍藻は光合成により CO₂ を固定し、有用物質を生産できることから持続可能な物質生産システムのホストとしての利用が期待されている。藍藻の実用レベルの培養は、大型の培養槽で行われる場合が主である。しかし、規模が大きくなると完全な滅菌は困難であるため、捕食性原生生物のコンタミネーションによる、藍藻の増殖低下が大きな課題となっている。当研究室では、黄金色藻の捕食圧下で培養を継続すると、淡水性藍藻が伸長・分枝するなどの形態変化を起こし、捕食から免れるということを明らかにしている。この現象を応用することで、捕食圧による増殖低下の問題を解決できる可能性がある。そこで本研究では、高密度培養が可能であるなどの実用的な利点を有する海洋性藍藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 においても捕食圧下で同様の変化が起きるのかを調べ、そのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】 広島県内の2か所で海水を採取し、未滅菌のまま PCC 7002 の培養系に添加した。その結果、2種類の繊毛虫類の捕食性原生生物を単離、同定した。これらを改めて PCC 7002 と共培養したところ、培養経過6日後あたりから PCC 7002 の細胞形態に変化が現れた。その細胞形態は、分裂した細胞が連続的に並んで糸状化したものや、単一細胞が分裂せずに伸長したものであった。これらの株を単離し、ゲノムリサーチを行ったところ、複数の遺伝子に変異が見出された。これらの遺伝子と形態変化の関係を調べるために、見出された変異遺伝子のうち、細胞壁溶解に関わると考えられる遺伝子に着目した。その遺伝子を破壊した株を作製し、細胞形態を観察した結果、遺伝子破壊株は細胞が連続的に並んで、数百 μm にまで糸状化していた。この形態は、捕食者との共培養系で出現したものと同様であり、当該遺伝子の欠損が細胞の伸長を引き起こすことが示された。

Analysis of the morphological changes of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 under grazing pressure by protozoa.

○Ryosuke Yoshida¹, Satoru Watanabe², Takenori Ishida¹, Takeshi Ikeda¹,
Hisakage Hunabashi¹, Akio Kuroda¹, Ryuichi Hirota¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Synechococcus*, marine microalgae, symbiosis, cell morphology

2F04-02 油性酵母を用いた三酢酸ラクトン生産技術の開発

○松岡 宥汰¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
(¹神戸大院・工,²神戸大院・科技イノベ)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

三酢酸ラクトン(4-ヒドロキシ-6-メチル-2-ピロン)(TAL)は食料添加物、抗生物質の原料等に用いられる有用物質である。本研究における宿主としては、油性酵母(*Yarrowia lipolytica*)を用いた。油性酵母は多量の脂肪酸を生産することができる特徴があるため、脂肪酸生成の前駆体である Acetyl-CoA、Malonyl-CoA を生産するための優れた宿主とされる。そして、TAL は Acetyl-CoA、Malonyl-CoA から生産されるため、油性酵母は TAL 生産の微生物として最適であると考えられる。本研究の目的は、代謝工学的手法を用いることで油性酵母における TAL 生産技術を確立することである。

遺伝子組み換えを行っていない油性酵母は、TAL を生産する能力を有していない。したがって、TAL 生産に必要な酵素を発現する *Gerbera hybrida* 由来の遺伝子 2-*ps*(2-ピロンシンターゼ)を油性酵母へ導入し、TAL 生産菌株を構築することで、グルコースからの TAL 生産に成功した。TAL 生産量を改善するために、本研究では TAL の前駆体である Acetyl-CoA に着目し、遺伝子破壊・遺伝子導入を行った。遺伝子破壊に関しては、オキサロ酢酸と Acetyl-CoA からクエン酸に変換する反応を触媒する酵素を発現する遺伝子である *cit1* を破壊した株を構築し、TAL 生産量増加に成功した。遺伝子導入に関しては、脂肪酸を Acetyl-CoA に変換する β 酸化に着目し、ペルオキシソーム生合成因子をコードする遺伝子 *pex10*, *A.flavus* という宿主でポリケチド形成を増加させると報告された転写因子 *por1* を導入した株を構築し、TAL 生産量増加に成功した。本研究では、油性酵母においてグルコースからの TAL 合成経路の確立および TAL 生産量増加に成功した。

Triacetic acid lacton production using *Yarrowia lipolytica*

○Yuta Matsuoka¹, Akihiko Kondou², Tsutomu Tanaka¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Yarrowia lipolytica*, metabolic engineering

2F04-03 出芽酵母機能未知転写因子 *Ygr067C* の標的遺伝子の同定

○栗田 涼子¹, 河原崎 泰昌^{1,2}, 田中 瑞己³
(¹静大院・薬食生命,²静大院・食采,³農工大院・農)
kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景と目的】 出芽酵母の *Ygr067C* は diauxic shift 後に発現する機能未知の転写因子である。配列相同性より *Ygr067Cp* は炭素源に応答する広域転写因子である *Adr1p* と同様の配列を認識すると予想されるが、実際に *Ygr067C* により制御される遺伝子は不明である。そこで我々は、*Ygr067Cp* の機能解析、特に標的遺伝子の同定を目的として以下の検討を行った。

【方法と結果】 銅応答性 *Cup1* プロモーターの下流に *Ygr067C* の蛋白質コード領域を置き、様々な生育時期に発現誘導をかけて *Ygr067Cp* の細胞内安定性を調べたところ、*Ygr067Cp* は指数増殖期に不安定であり、diauxic shift 後に安定化することがわかった。酵母 2 ハイブリッド法より、*Ygr067Cp* は *Ubc9p* と相互作用し、SUMOyl 化され、細胞周期に連動して分解されることが示された。RNA-seq より、*Ygr067c* 遺伝子欠損株ではミトコンドリア(呼吸)に関連した遺伝子の発現量が顕著に増大していた。*Ygr067Cp*-His を用いた ChIP-seq の結果も、ミトコンドリア(呼吸)関連遺伝子領域に *Ygr067Cp* が結合する可能性が示唆された。そこで、*Ygr067Cp* 標的遺伝子候補をいくつか選出してリアルタイム PCR を行ったところ、カルニチンアセチルトランスフェラーゼ *CAT2* やミトコンドリアの動きに関与する *ICY1* の mRNA 量が定常期における遺伝子欠損株で増大しており、これらが *Ygr067Cp* 標的遺伝子である可能性が示唆された。*Ygr067c* 欠損株は、無酸素下から通気培養を再開した場合、野生株よりも早く再増殖した。

【考察】 以上より、*Ygr067Cp* は diauxic shift 後に安定的に発現し、定常期を迎えるまでに呼吸に関連した遺伝子の発現を抑制すると考えられた。また *Ygr067Cp* は、無酸素下での呼吸関連遺伝子群の発現抑制に関わっている可能性が示唆された。

Identification of *Ygr067C* target genes: a characterization of yeast's diauxic-shift related transcription factor

○Ryoko Kurita¹, Yasuaki Kawarasaki^{1,2}, Mizuki Tanaka³
(¹Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, ²Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., ³Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, transcriptional regulator gene, transcriptional regulation, mitochondria

2F04-04 リン高蓄積酵母のリン含有量や貯蔵形態に関する解析

○尾島 由紘, 直井 喬平, 東 雅之
(大阪公大院・工)
ojima@omu.ac.jp

【背景と目的】

リンはあらゆる生物に必須である一方、枯渇が懸念されており、経済的かつ低環境負荷な回収法が求められている。酵母の PHO 経路の変異株は、水溶液中で多量のリン酸を菌体内へ取り込むことが報告されている。本研究では、これら変異株における細胞内のリン含有量を定量的に評価することで比較し、貯蔵形態や局在等の解析を行った。さらにはリン高蓄積酵母をリン飢餓条件や Co^{2+} 存在下で培養し、増殖能や Co^{2+} 取り込みを評価した。

【方法と結果】

酵母の pho81 変異株、pho4 変異株、それらを掛け合わせ作製した二重変異株を高リン酸含有培地で培養し、ICP 発光分光分析により細胞内リン蓄積量を評価した。親株の乾燥菌体重量当たりのリン含有率が約 2wt% であるのに対し、pho4 変異株や二重変異株は約 6wt%、pho81 変異株が最も高く約 8.5wt% となり、親株の約 4 倍量が細胞内に蓄積することを見出した。またリン貯蔵形態の解析として、変異株の細胞では 540 nm に DAPI の蛍光ピークが確認され、ポリリン酸が存在すること、さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察で、ポリリン酸が液胞内に局在している様子を確認した。続いて、酵素法によるポリリン酸の定量評価では、pho81 変異株の乾燥菌体重量当たりのポリリン酸含有率は約 5wt% で、細胞内全リンの 3分の2 を占めることを明らかにした。続いて、リン蓄積酵母の特徴として、リン酸不含有培地で増殖可能なことや、重金属イオンの一種である Co^{2+} も同時に蓄積可能であることを実証しており、バイオアキュムレーションとしても有望であると考えられる。

Quantitative analysis of phosphorus accumulation in PHO regulatory system mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*

○Yoshihiro Ojima, Kyohei Naoi, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, phosphate, mutation, PHO regulatory system

2F04-05 耐酸性細菌を用いた強酸性条件下での金属吸着プロセス

○高野 力¹, 中島 一紀¹, 川崎 了¹, 青柳 秀紀²
(¹北大・工, ²筑波大・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【背景と目的】

金属需要の急増や、重金属による環境汚染の解消、持続可能な社会形成の観点等から、金属を含む電子廃棄物等のリサイクルが注目されている。環境親和的な金属リサイクル技術として、細菌を用いた Biosorption によって金属を分離回収するプロセスが研究されているが、中性条件下での検討が主流である。そのため、強酸性の浸出液の pH との隔たりが大きく、多量の中和剤を要する中和処理が必須となる。我々は、中性条件下で生育し、強酸性条件下で生存可能な金属吸着能を有する耐酸性細菌を活用した、強酸性条件下での Biosorption を基にした新規な金属リサイクル技術の開発に取り組んできた¹⁾。本研究では、強酸性条件下での金属吸着効率の向上を目的として、強酸性条件下で金属吸着に関するタンパク質の特定と、その機能解明を試みた。

【方法と結果】

これまでに我々が独自に単離培養、獲得した、耐酸性と金属吸着能力を有する、*Comamonas* 属、*Enterobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Priestia* 属の各菌株と、中性条件下での金属吸着能力を有するモデル菌株の *Micrococcus luteus* JCM1464 を用いて、模擬金属浸出液 (pH 1.5, Co, Cu, Li, Mn, Ni を各 1 g/L 含む) からの金属分離回収系を構築し、各金属に対する吸着能力を評価した。また、各菌株の金属吸着処理の前後でのタンパク質発現の違いを、二次元電気泳動を用いて比較解析した。種々検討した結果、複数の菌株において、金属吸着処理後に新たに発現したバンドが複数存在した。また、金属イオンを含まない、pH 1.5 の酸処理を行った場合と比較しても、金属存在下で特異に発現するバンドが存在した。現在、これらのタンパク質を金属結合タンパク質の候補として、質量分析によるアミノ酸配列の同定と機能解明について検討中である。1) 第 73 回日本生物工学会大会要旨集 p. 200

Metal biosorption process under strong acidic condition using acid-tolerant bacteria

○Chikara Takano¹, Kazunori Nakashima¹, Satoru Kawasaki¹, Hideki Aoyagi²
(¹Fac. Eng., Hokkaido Univ., ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words acid tolerance, biosorption, metal recycling, urban mining

2F04-06 ゴム分解微生物 MOE-1 の有するゴム分解酵素の抽出・精製

○桑野 光明, 笈木 宏和
(久留米高専)
oiki@kurume-nct.ac.jp

ゴムの消費量は年々増加しており、2021 年の日本国内での新ゴム消費量は約 125 万トンに及んでいる¹⁾。廃棄されたゴムの大部分はサーマルリサイクルに活用されるが、加硫のために加えた硫黄の酸化により発生する SO_2 は酸性雨や $\text{PM}_{2.5}$ の原因となる。そこでゴムの加工や処理を行う方法として微生物を利用した分解が考えられている。我々の研究室で発見したゴム分解微生物 *Enterobacter* MOE-1 は、合成汎用ゴムとして広く利用されているスチレンブタジエンゴム (SBR) を分解する能力を有している。同菌は SBR のブタジエン部の C=C 結合を切断することによりゴムの分解・低分子化を行う²⁾。また SBR の分解反応によってアルデヒドを生成し、これが分解反応を阻害するため分解速度は遅い。そこで、ゴム分解酵素をコードする遺伝子を特定して分解機構を解明するとともに、他の微生物への組み替えなどによる分解速度の向上を試みるべく、ゴム分解酵素の構造解析に向けた抽出・精製操作の検討を行う。精製により得られたゴム分解酵素はアミノ酸配列の解析が可能であり、そこから逆算してゴム分解酵素の遺伝子領域の特定が可能である。1 l の LB 培養液より硫酸沈殿を行うことで 1.99×10^4 IU/mg の酵素を 40 mg 得た。さらに、イオン交換およびゲルろ過を行うことにより、酵素活性は硫酸沈殿時の 20.8 倍まで増大した。しかし、最終的に回収できた酵素は 0.2 mg と少なく、構造解析にかけるために必要な量を得ることができなかった。今後は 3 l の培地を用いて同様の手順で精製を行うことで、より活性の高い画分を回収し構造解析を行う予定である。

参考文献

- (1) 日本ゴム協会 2022 年の新ゴム消費予想量
https://www.rubber.or.jp/kanri/download.php?file=page3.7.27.pdf&org=consume-202203_rev-04_rev.pdf
- (2) 江藤見嗣 専攻科研究論文 (1998)

Purification of rubber-decomposing enzymes from the rubber-decomposing microorganism MOE-1

○Kuвано Koumei, Oiki Hirokazu
(Kurume Natl. Coll. Technol.)

Key words *Enterobacter*, purification

2F04-07 ゴム分解菌を用いた様々な SBR 分解条件の AI 解析

○山根 周弥, 笈木 宏和
(久留米高専)
oiki@kurume-nct.ac.jp

近年、AI を用いた作業の効率化を目指した取り組みが盛んに行われており、医療、農業など様々な分野での応用が期待されている。例えば、AI によって遺伝子の変異から病気のリスクや、作物の生育状況から最適な環境条件を導くことができる。発酵工学においても、最適な培養手法や培養効率を AI によって予測するという研究が行われている。我々はこうしたプログラムが微生物の最適生育条件の探索にも適用できるのではないかと考え、我々の研究室に有するゴム分解菌への応用を試みた。微生物によるゴム分解は環境負荷が小さく、ゴム廃棄物処理問題に貢献できると期待されるが、同微生物はゴム分解速度が低いという課題を抱えている。ゴム分解菌の生育条件のデータを蓄積することにより、同微生物の最適生育条件及び最適分解条件を AI によって見つけ出すことが可能となり、ゴム分解の効率化を図ることができると考える。過去の研究により同微生物は培地に酸素を過剰供給した場合やガラスビーズなどの担体を添加した場合において、生育及びゴム分解が促進されることを確認しているが、その最適条件の決定は行われていない。そこで、ゴム分解効率の向上を目的とした新たなアプローチとしてこの分解条件を基にした AI を用いた分解条件の数値化を試みた。現段階では、反応器の大きさや培地に担体として加えるガラスビーズの粒径や量を変化させた際の菌の生育度及びゴム分解率のデータを AI によって解析することにより、それぞれの条件から予測されるゴム分解率を導くことができているが、正確率 (accuracy)、予測値と実測値が一致する確率は 0.60 であり、まだ十分な値とは言えない。AI の accuracy 及びゴム分解率の向上を図るため、現在、さらに攪拌速度や酸素供給量を変化させた場合及び大型装置を用いた場合の反応条件解析を試みている。

AI analysis of various SBR decomposing conditions from rubber-decomposing bacteria

○Shuya Yamane, Hirokazu Oiki
(Kurume Natl. Coll. Technol.)

Key words *Enterobacter*, bioreactor

2F04-08 Tet 転写活性化システムを用いた微細藻類クラミドモナスにおける人工遺伝子発現制御技術の開発

○秋山 立幹, 河邊 佳典, 宮副 こころ, 上平 正道
(九大院・工)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

我々は微細藻類 *Chlamydomonas* における遺伝子・核ゲノム改変のための技術開発を行っており、外来遺伝子を安定的に高発現可能な *Chlamydomonas* 細胞株の開発に成功している[1-2]。一方、*Chlamydomonas* で高発現を誘導するための人工プロモーターシステムについては、これまでほとんど検討されていない。Tet 転写活性化システムは、Tet リプレッサーを転写活性化タンパクとの融合タンパク質として構成された人工転写因子であり、目的遺伝子の高発現を強力に誘導可能な遺伝子発現システムとして動物細胞でよく使われている。本研究では、Tet 転写活性化システムを用いて *Chlamydomonas* での人工遺伝子発現システムの開発を目的とした。

動物細胞で頻用される単純ヘルペスウイルス由来 VP16 や藻類ウイルス由来等複数の転写活性化ドメイン (TAD) を選抜し、人工転写活性化因子発現ベクター (pHR/TetR-TAD) を作製した。pHR/TetR-TAD を、TRE 応答配列を有する分泌型シフェラーゼ (gLuc) 発現ベクター (pTRE/gLuc) とともにエレクトロポレーション法で *Chlamydomonas* に遺伝子導入したところ、導入 6 時間以内に培養上清中で gLuc が検出された。これより、TAD スクリーニング評価系が構築できた。VP16 由来転写活性化ドメインを繰り返したところ、繰り返し数に応じて gLuc 活性値が変化した。VP192 を TAD として用いた場合に、高発現とされている HR プロモーターを用いた場合に比べ約 3 倍高い gLuc 活性値を示した。加えて、DNA 結合ドメインをリバース TetR (rTetR) としたところ、Dox 添加による遺伝子発現誘導可能であることがわかった。

[1] Shirakawa, K. *et al.*, *MATEC Web Conf.*, 333, 07003 (2021).

[2] Huang, G. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 132, 469-478 (2021).

Artificial transgene expression system using Tet-transactivation system in microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*

○Tatsuki Akiyama, Yoshinori Kawabe, Kokoro Miyazoe, Masamichi Kamihira
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

Key words *Chlamydomonas reinhardtii*, algae, Tet-transactivation system, transcriptional regulation

2F04-09 (講演中止)

2F04-10 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の培養に伴うエンドトキシンの遊離挙動の解析とその利用

○吉澤 莉奈¹, 青柳 秀紀^{1,2}
(¹筑波大院・生物資源科学学位P, ²筑波大・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】

我々は、独自に開発したエンドトキシン (ET) の高感度・迅速測定法 (LAL 固体化ビーズ法) を用いて、種々の腸内細菌の培養に伴う ET の挙動を解析した結果、“主に溶菌によって ET が漏出する”タイプと、“溶菌だけではなく、増殖に伴い ET が菌体外へ顕著に遊離する”タイプの 2 種類が存在することを見出した。菌周病菌由来の ET は、菌周病やその他の重篤な症状を引き起こすことが知られているが、菌周病菌の ET の挙動は未解明である。本研究では、菌周病菌のモデルとして *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に着目し、培養に伴う ET の挙動の定量的解析とその利用を試みた。

【方法と結果】

A. actinomycetemcomitans を BHI 培地で培養し、遊離 ET 濃度 (Extracellular ET) と菌体内の ET 濃度 (Intracellular ET) を LAL 固体化ビーズ法を用いて測定した (比較として *Escherichia coli* を用いて同様な実験を行った)。種々検討した結果、*A. actinomycetemcomitans* の増殖に伴い ET の菌体外への遊離が認められた (溶菌だけではなく、増殖に伴い ET が菌体外へ顕著に遊離するタイプであることが示された)。また、口腔内環境により近づけた条件にするために、菌の成分であるヒドロキシアパタイト (HA) ディスクを用いた培養系を構築し、*A. actinomycetemcomitans* の培養を行い、ET の挙動を解析した。その結果、コントロール (HA ディスク無添加) と比べて増殖には変化が見られなかったが、Extracellular ET 量の低下が認められた。現在、培養環境が *A. actinomycetemcomitans* の ET 遊離量に及ぼす影響の解析と ET の除去について検討中である。

1) H29 日本生物工学会講演要旨集 p. 243.

Analysis of endotoxin-releasing characteristics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its application

○Rina Yoshizawa¹, Hideki Aoyagi^{1,2}

(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, endotoxin, Limulus amoebocyte lysate, periodontal disease

2F04-11 *Weissella minor* COM 株が生産する 2 種の新奇バクテリオリシンの異種発現系の構築と諸特性の解析

○内藤 温貴¹, 竹内 愛子¹, 野見山 泰成¹, 庄野 陸太¹, 吉田 遥海¹, 中山 二郎², 善藤 威史²
(¹九大院・生資源, ²九大院・農)
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

バクテリオシンは細菌がリボソーム上で合成する抗菌性ペプチドあるいはタンパク質であり、中でも乳酸菌由来のバクテリオシンはその優れた抗菌作用や高い安全性などから医薬品や食品保存料への応用が期待されている。ツユクサの花弁から単離された乳酸菌 *Weissella minor* COM 株は、いずれも溶菌活性を有するタンパク質である 2 種の新奇クラス III バクテリオシン (バクテリオリシン) を生産する。培養液上清からの精製と構造解析、COM 株の全ゲノム解析などから、2 種の新奇バクテリオシンの一次構造が決定された。一方で、得られる精製物の少なさや低い安定性のため、作用機構や生合成機構の詳細は明らかになっていない。そこで、大腸菌を宿主とした 2 種のバクテリオシンの異種発現系の構築を図るとともに、異種発現系で得られるバクテリオリシンを用いて、作用機構を含む諸特性の解明を試みた。

大腸菌による異種発現系の構築には、各バクテリオリシンについて BL21 株と pCold I ベクター、もしくは BL21(DE3)株と pET-14b ベクターの組み合わせを用い、回収した菌体内の可溶性画分と不溶性画分について、SDS-PAGE、Western blotting、抗菌活性試験を行った。その結果、宿主である大腸菌への毒性も懸念されたが、いずれのバクテリオリシンも pCold I の可溶性画分で最大の発現量と抗菌活性が確認された。続いてアフィニティークロマトグラフィーによる精製画分を用いて種々のグラム陽性菌に対する抗菌活性試験を行い、作用機構の解析を行った。その結果、いずれのバクテリオリシンも細胞壁のペプチドグリカン中の架橋ペプチドに Ala-Ala 配列を持つグラム陽性菌を中心に抗菌活性が見られた。一方で、両バクテリオリシンは C 末端側に高い相同性を有するものの、一部の検定菌が異なる感受性を示したことから、異なる認識機構や作用機構を有する可能性も推察された。

Heterologous expression and characterization of two bacteriolysins produced by *Weissella minor* COM

○Atsuki Naito¹, Aiko Takeuchi¹, Taisei Nomiyama¹, Rikuta Shono¹, Harumi Yoshida¹, Jiro Nakayama², Takeshi Zendo²

(¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words antibacterial, bacteriocin, lactic acid bacteria, heterologous production

2F04-12 最小サイズの発光酵素「picALuc」の開発とその応用

○大室 (松山) 有紀¹, 古田 忠臣², 松井 勇人¹, 叶井 正樹¹,
上田 宏³
(¹島津製作所, ²東工大・生命理工, ³東工大・化学生命研)
omuro.yuki.cc9@shimadzu.co.jp

【背景と目的】

発光酵素は、幅広い分野でレポータータンパク質として使用されている。発光酵素には、高い発光値、高い熱安定性、そして立体障害による標的の機能阻害を防ぐサイズの小ささが求められる。

我々は本研究において、発光値を維持しつつALucを削った小サイズの新規発光酵素の作製、及びその小サイズの発光酵素を用いたアプリケーション開発を狙った。

【結果と考察】

21 kDa のALuc を 13 kDa まで削ることで最小サイズの発光酵素「picALuc」を作製した。NanoLuc との比較では高濃度の基質を必要とするものの、picALuc・NanoLuc・ALuc の最大発光値は同程度であった。

アプリケーションとして、picALuc または NanoLuc と蛍光タンパク質とをプロテアーゼ認識配列を介して融合させたプローブを作製しプロテアーゼ処理した結果、picALuc プローブにおいてより高い BRET signal が得られた。また、picALuc を用いた分子間相互作用検出系 Protein-fragment Complementation Assay (PCA) により、rapamycin 依存的な FKBP-FRB 間相互作用を測定した結果、最大で 12 倍の Signal/Background 比を示した。

これらの結果から、picALuc は、レポータータンパク質として、及び分子間相互作用の検出において、とても有用性の高い新規発光酵素であると考えられる。[Ref.] Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Furuta *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 17, 864-872 (2022).

Development and applications of the smallest luciferase "picALuc"

○Ohmuro-Matsuyama Yuki¹, Furuta Tadaomi², Matsui Hayato¹, Kanai Masaki¹,
Ueda Hiroshi³
(¹Shimadzu Corp., ²Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech, ³CLS, Tokyo Tech)

Key words luciferase, BRET, PCA

2G01-02 がん細胞における低酸素状態での過酸化水素の寄与に関する解析

○鷲尾 周¹, 森下 琢麻¹, 山手 康輝², 森田 健太¹, 西村 勇哉²,
佐々木 良平³, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ, ³神戸大院・医, ⁴神戸大・工)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 がんの主な治療法である放射線療法は、深部がんや大きく成長したがんには弊害がある。特に、腫瘍内部の低酸素領域は放射線療法の要であるラジカルの発生源となる酸素が少なく、治療効果が最大で三分の一にまで低下してしまう。先行研究から、細胞中の過酸化水素が放射線増感効果を示すことが示唆されている。しかし、その詳細な作用機序は明らかになっていない。本研究では過酸化水素が、どのような仕組みで放射線増感効果を示すのかを、腫瘍が放射線抵抗性を示す低酸素状態を再現し、検証を行った。

【実験方法】 ヒト膀胱がん細胞 MIAPaCa-2 を酸素濃度 1% で 24h 培養(以後、低酸素条件と呼ぶ)し、ウェスタンブロッティングにより低酸素誘導因子 HIF-1 α の発現量を通常酸素雰囲気下と比較した。また、コロニーアッセイ法により、通常酸素条件と低酸素条件の比較検討を行った。

【結果と考察】 ウェスタンブロッティングでは、HIF-1 α の発現が低酸素条件のサンプルにおいて確認できた。このことから、酸素濃度 1%、24h 培養によって低酸素状態を再現できたと考えた。続いて、確立した低酸素条件と通常酸素条件の比較をコロニーアッセイ法により行った。通常酸素条件のコントロールに比べ、低酸素条件のサンプルは細胞生存率が大きく、低酸素条件での細胞の放射線抵抗性が示された。さらに、低酸素条件において、過酸化水素の寄与を調べるために、低酸素条件において PBS と過酸化水素を比較した。過酸化水素接触、5 Gy 照射サンプルに関しては細胞生存率が低下していることがわかった。このことから、過酸化水素は低酸素条件において放射線増感効果を示すことが示唆された。今後は抗酸化酵素ノックアウト株を用いて、抗酸化酵素と放射線増感効果の関係性を調べる。

Effect of hydrogen peroxide to cancer cells in hypoxic state

○Amane Washio¹, Takuma Morishita¹, Koki Yamate⁴, Kenta Morita¹,
Yuya Nishimura², Ryohei Sasaki³, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ³Grad. Sch. Med., Kobe Univ., ⁴Fac. Eng., Kobe Univ.)

Key words hypoxia, radio-sensitization, hydrogen peroxide

2G01-01 グルクロン酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞損傷効果の検討

○森下 琢麻¹, 鷲尾 周¹, 山手 康輝², 森田 健太¹, 西村 勇哉²,
大谷 亨¹, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大・工, ³神戸大院・科技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 がん治療法の1つである放射線療法は、身体の深部にある切除困難な腫瘍に対して有効であると期待されているが、過剰な放射線量によって、周囲の放射線感受性の高い組織への治療リスクが高くなる。そこで、低線量で高い治療効果を得るために、当研究グループは放射線増感剤であるポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子 (PAA-TiOx) を開発した。PAA-TiOx は *in vivo* で放射線増感効果を示したが、腫瘍に送達されなかった粒子は肝臓に蓄積され、体外に排泄されないことが課題となっていた。本研究では、修飾剤を変更することで治療後に体外へ排泄される粒子を作製することを目的とし、新たな修飾剤としてポリエチレングリコール (PEG) とグルクロン酸 (GlcA) を導入した。PEG は分散力かつ血中安定性を有しているため、網内系での捕食を回避できる効率よく腫瘍に送達できると考えられる。GlcA は肝臓内の代謝過程で異物と結合し、水溶性を増大させ、胆汁排泄を促進させ、GlcA 修飾粒子とすることで迅速に排泄できると考えられる。

【実験方法および結果】 目的に従い、グルクロン酸・PEG 修飾過酸化チタンナノ粒子 (GlcA-PEG-TiOx) の作製を目指した。GlcA-PEG-TiOx は、PEG-TiO₂ とグルクロン酸をルイス酸を用いて結合させ、過酸化水素で過酸化することで作製した。DLS での粒子径測定では、合成前後での分散性の違いから、結合の確認が示唆されたが、FT-IR や NMR での測定が困難で、まだ結合の確認が不十分である。また、*in vitro* で X 線照射実験を行い、GlcA-PEG-TiOx は従来の PAA-TiOx と同等以上の放射線増感効果を示した。今後の展望としては、*in vivo* での薬物動態実験を行い、粒子の肝臓蓄積回避の評価を行う。

Examination of cell damage effect by glucuronic acid-modified titanium peroxide nanoparticles

○Takuma Morishita¹, Amane Washio¹, Koki Yamate², Kenta Morita¹,
Yuya Nishimura³, Tooru Ooya¹, Akihiko Kondo³, Chiaki Ogino¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Fac. Eng., Kobe Univ., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words drug delivery system, titanium peroxide, glucuronic acid, PEG

2G01-03 アニサキスと C.elegans の表面機能化法の開発と Living Drug Delivery System への応用可能性の検討

○境 慎司, Mubarak Wildan, 小嶋 勝
(阪大院・基礎工)
sakai.shinji.es@osaka-u.ac.jp

【緒言】 細胞や生物の持つ様々な機能を人間が有効に利用するため、交配・選抜や遺伝子組換えなどが行われている。本研究では、生物の持つ機能を利用するための新しい技術として、表面をゲル薄膜で覆うことにより機能化することに取り組んだ。具体的には、線虫 (*C. elegans*) とアニサキスをターゲットとし、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) が微量の過酸化水素存在下で触媒するフェノール性水酸基同士の架橋形成反応によるゲル形成により、機能化された表面を有する線虫を作製することを目指した。

【実験・結果】 細胞膜修飾剤と結合させた HRP を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に *C. elegans* を 10 分間浸した。洗浄後、フルオレセインとフェノール性水酸基を導入したアルギン酸と微量の過酸化水素を含む PBS に 10 分間浸した。洗浄後、蛍光顕微鏡で観察したところ、*C. elegans* 表面に厚さ 0.01 mm 程度の蛍光を示す層が確認され、本手法により線虫表面にゲル薄膜を形成可能であることが明らかになった。次いで、ゲル薄膜形成後の *C. elegans* の走化性を、イソアミルアルコールを用いて評価したところ、未処理のものと比較して低下が生じなかった。さらに、アニサキス表面に形成させるゲル薄膜中に、グルコースオキシダーゼを固定化し、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞を含む培養液の中に入れて 24 時間後には大部分の細胞を殺すことができた。アニサキスは最近がん検査に利用されている *C. elegans* と同様がんの匂いに対する走化性を有することを示唆する結果が報告されている。したがって、不要になった際の殺傷法や適当な担持物質など、今後検討が必要な課題はあるものの、この結果は、将来、アニサキスをがん組織への薬物送達に利用できるようになる可能性を期待させるものである。

Development of Surface Functionalization Methods for Anisakis and C. elegans and the studies for its potential application to Living Drug Delivery System

○Shinji Sakai, Wildan Mubarak, Masaru Kojima
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words cell surface engineering, A. simplex, C. elegans, drug delivery system

2G01-04 フェロセン含有リン脂質ポリマーによるがん細胞の免疫原性細胞死誘導

○山口 明生, 金子 真大, 井藤 彰
(名大院・工)
ito.akira@material.nagoya-u.ac.jp

近年、がんの治療戦略として免疫原性細胞死 (ICD) が注目されている。ICD はダメージ関連分子パターン (DAMPs) 分子群を放出し、抗腫瘍免疫を賦活化する細胞死である。ICD を誘導する薬剤は、残存したがん細胞や転移したがん細胞の根絶にも有望である。ICD の誘導メカニズムには議論の余地があるが、細胞内における活性酸素レベルの上昇が ICD を誘導し得ることが知られている。我々は、細胞内から電子を奪う機能を有する酸化還元活性リン脂質ポリマーを用いて ICD 誘導を試みた。本研究では、親水性の 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と酸化還元活性を有する vinyl ferrocene (VFc) により構成される poly(MPC-co-VFc) (pMFc) を利用した。両親媒性の MPC ポリマーは単純拡散により細胞膜を透過するため、pMFc は細胞質内に侵入しフェロセン部位を介して細胞内の酸化還元種から電子を奪うことができる。マウス結腸がん CT26 細胞に対して、電子を奪うことのできる酸化型 pMFc と、電子を奪うことができない還元型 pMFc が与える影響を検討した。酸化型の pMFc を CT26 細胞培地に添加したところ、CT26 細胞内の活性酸素レベルが上昇し、アポトーシスの誘導、ひいては DAMPs であるカルレチキニンや ATP などの放出が認められた。一方、還元型 pMFc を添加した CT26 細胞では、活性酸素レベルの上昇や細胞死、DAMPs の放出は認められなかった。酸化型 pMFc により処理された CT26 細胞をマウスの腹部皮下にがんワクチンとして注射し、一週間後に反対側の腹部皮下に CT26 細胞を注射したところ、腫瘍の形成が阻害された。さらに、腫瘍への直接注射に基づく pMFc の治療効果を検討したところ、酸化型 pMFc を投与した群でのみ腫瘍の成長が抑制される個体が認められた。以上の結果から、酸化型 pMFc は ICD を介して抗腫瘍免疫を活性化することが示された。

Induction of immunogenic cell death in cancer cells by ferrocene-containing phospholipid polymers

○Akio Yamaguchi, Masahiro Kaneko, Akira Ito
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words Cancer, Redox reaction, Immunogenic cell death

2G01-05 Synthesis and characterization of a novel self-assembled amphiphilic alpha-1,3-glucan nanomicelles for drug delivery

○Zhengyu Su, Yosuke Toyotake, Daisuke Matsui, Yoichi Takeda, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

Polysaccharide-based amphiphilic polymers self-assemble in aqueous solution to form micelle-like structures. Due to their biocompatibility, biodegradability, and nontoxicity, they are expected to be used as nanocarriers in the biomedical field. Alpha-1,3-glucan is a water-insoluble glucose homopolymer that can be generated through environmentally friendly enzymatic polymerization and easily purified without using organic solvents. Thus, it is attracting attention as new bio-based material. Here, we developed new nanomicelles based on alpha-1,3-glucan. Alpha-1,3-glucan was synthesized from sucrose solution using glycosyltransferase I from *Streptococcus mutans*, and a series of amphiphilic alpha-1,3-glucan copolymers were synthesized with different lactide supply ratios in the ionic liquid, BmimCl. The obtained amphiphilic copolymers were able to form micelles (57-125 nm) in aqueous solution. The self-assembling behavior of the copolymers was investigated and characterized using a fluorescence probe, dynamic light scattering, and transmission electron microscope. Furthermore, the self-assembled micelles were investigated as drug carriers by dynamic membrane dialysis using prednisone acetate as a model drug, and their sustained drug release behavior for 9 days was confirmed. These results indicate that amphiphilic alpha-1,3-glucan copolymers are promising nanocarriers for efficiently loading and delivering hydrophobic drugs and extend the actual applications of alpha-1,3-glucan.

Synthesis and characterization of a novel self-assembled amphiphilic alpha-1,3-glucan nanomicelles for drug delivery

○Zhengyu Su, Yosuke Toyotake, Daisuke Matsui, Yoichi Takeda, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words enzymatic polymerization, extracellular polysaccharide, self-assembly, nanomicelles

2G01-06 メチルグリオキサールによるヒト間葉系幹細胞の増殖促進効果の解明

○Ang Kai Torng, 金 美海, 紀ノ岡 正博
(阪大院・工)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】 ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) の再生医療における利用拡大に伴い、質と量の両面で安定に細胞を増幅する培養技術の確立が求められている。しかし、hMSCs の増幅培養では、培養容器内の細胞密度の局所的な上昇に伴い、接触阻害による増殖低下が起こる。これまでの幹細胞の増殖に関する研究では、細胞外マトリックス (ECM) の分泌と構造変化が増殖能を維持する上で重要であることが報告されている。本研究では、ECM 構造を変化させる作用をもつメチルグリオキサール (MG) を用い、hMSCs の増殖促進効果を検討した。

【方法と結果】 hMSCs を 3.0×10^3 cells/cm² で播種し、培養 48 時間目に 24 時間 0.125 nM MG を添加し、144 時間培養を行った。細胞密度と培養初期 ($t = 48-72$ h) と培養後期 ($t = 72-144$ h) の見かけの比増殖速度 μ_{app} (h⁻¹) を算出したところ、MG 添加なしの条件では、培養初期の見かけの比増殖速度が増加したが、培養後期の見かけの比増殖速度は減少した。一方、MG 添加ありの条件では、培養後期の見かけの比増殖速度が MG 添加なしの条件と比べ 1.69 倍高いことが分かった。また、増幅率 (N_{144}/N_{48}) を MG 添加なしの条件と比較したところ、MG 添加ありの条件で 1.61 倍高いことが示され、MG 添加ありの条件での増殖促進効果が確認できた。また、MG を添加する前後 ($t = 48$ h と 72 h) の ECM の主要成分である collagen type I の構造変化を免疫蛍光染色で検討した。MG 添加なしの条件では $t = 48$ h で collagen type I が細胞内にスポット状態で観察され、 $t = 72$ h ではスポットの数が増えていたが、MG 添加ありの条件では $t = 72$ h で collagen type I のスポットが減少していることが確認された。以上の結果から、MG の添加が増殖促進効果を持ち、足場環境の再構築が細胞増殖能の維持に繋げることを示唆しており、今後増幅培養系の確立に有益であると思われる。

Effect of Methylglyoxal on Growth Promotion of Human Mesenchymal Stem Cells.

○Kai Torng Ang, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, methylglyoxal, cell growth

2G01-07 培養画像を用いた培養工程評価技術の開発

○幡多 徳彦^{1,3,4}, 張本 乾一^{2,3,4}, 上岡 博也³, Ang Kai Torng³, 宮本 風俊³, 紀ノ岡 正博^{3,4}
(¹ローツェライフサイエンス,²ローツェ,³阪大院・工,⁴阪大・テクノアリーナ細胞製造コトづくり拠点)
hata.norihiko@rorze-ls.com

【背景と目的】

再生医療分野で広く実施されている接着細胞の継代培養において、増殖や分化に影響する律速因子は培養初期の接着細胞濃度であり、本来は培養初期の接着細胞濃度を制御因子すべきだが、現在接着細胞濃度を直接制御できる技術や方法は存在しない。そのため代替として、剥離回収された細胞懸濁液の生細胞数を測定することで、接種後の接着細胞濃度を推定した細胞懸濁液の接種量を算出し、これを制御因子としている。そこで本研究では、接着細胞の継代培養を安定的に行うため、客観的かつ直接的な培養工程評価技術の構築を目的とした。

【方法】

本実験では、株化された臍帯血由来の間葉系幹細胞 JCRB1546 株を用いて、90mmDish(SUMILON)による 6 および 7 日間の培養を行った。培養 1 日目および剥離前の培養最終日に、CellShot を用いて 90mmDish の撮影可能な培養面を全面撮影し、LabView を用いた画像処理により得られた培養画像における接着細胞数を計測した。

培養最終日の培養画像を用いて、細胞懸濁液にて回収される生細胞数の算出方法について検討を行った。さらに培養 1 日目の培養画像を用いて、接種操作による接着細胞の均一性 (ばらつき) について評価方法を検討した。

【結果と考察】

その結果、培養画像を用いた回収細胞数の算出方法では、同心円状に培養面を分割し、各区画から面積比に応じた培養画像を選択し算出することで、実際の回収細胞数と高い相関を得ることができた。また培養初期の接着細胞の均一性では、変動係数を用いることで客観的な評価が可能となった。本研究では、細胞懸濁液にて回収される細胞数について培養画像を用いて算出する方法および培養初期での接着細胞の均一性について評価する方法を開発し、客観的かつ直接的な培養工程評価が可能となった。

Development of culture process evaluation method using culture images

○Norihiko Hata^{1,3,4}, Kenichi Harimoto^{2,3,4}, Junya Kamioka³, Kai Torng Ang³, Fushun Miyamoto³, Masahiro Kino-oka^{3,4}
(¹RORZE Lifescience Inc., ²RORZE CORPORATION, ³Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Res. Base Cell Manufacturability, Osaka Univ.)

Key words culture image, adherent cell, culture process evaluation, cell dispersion

2G01-08 塑性流体を用いたヒト iPS 細胞の大量培養

○山本 陸¹, 都倉 知浩^{1,2}, 紀ノ岡 正博¹
(¹阪大院・工, ²藤森工業)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) は再生医療などへの応用が期待され、実用化に向けた大量培養工程の構築が必要とされている。これまで微生物や動物細胞に広く用いられてきたタンク型の三次元懸濁培養装置は、高密度かつ、省スペース、省コストで培養が可能であり、スケラビリティの高さから hiPS 細胞の大量培養にも応用が期待される。本細胞の培養では低せん断応力環境が要求され、現在報告されている主な規模である $< 10^4$ L の培養装置では、おだやかな巡回流攪拌と上面通気による培養系が用いられている。一方でスケールアップに伴い、攪拌翼周りのせん断応力は増加し、また上面通気による酸素供給能は低下する。下部からの気泡導入による酸素供給能の向上が一般的だが、高分子タンパク質を多量に含む hiPS 細胞培地は起泡性が高く、気泡破裂によるせん断応力や通気フィルターの浸潤による圧力損失など、様々なリスクが想定される。そのため、hiPS 細胞の大規模な培養装置の設計には、低せん断応力を維持し、かつ低泡沫での酸素供給が可能な培養系の構築が要求される。本研究では、一定以上の力が加わると流動する特性を持つ塑性流体を用いることで、hiPS 細胞の大量培養に適した培養系の構築を目指した。下部からの気泡導入を行った塑性流体中では、流動は上昇する気泡周囲に限定され、細胞集塊の無攪拌浮遊維持が可能であった。低通気頻度において、気泡上昇速度は抑制され、ガスホルドアップは向上した。酸素供給により hiPS 細胞は増殖を示し、スケラビリティの高い無攪拌通気培養系が構築された。加えて、 $\sim 10^4$ L 規模の培養装置では、塑性流体を用いることで低頻度の攪拌によるせん断応力を抑えた酸素供給が可能であった。これにより播種や培地交換操作などの周辺技術を含めた閉鎖系での培養装置を設計し、 10^{10} 個の hiPS 細胞の大量培養を達成した。

Large scale culture of human induced pluripotent stem cell using a plastic fluid

○Riku Yamamoto¹, Tomohiro Tokura^{1,2}, Masahiro Kino-oka¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fujimori Kogyo Co., Ltd)

Key words bioreactor, plastic fluid, hiPSCs

2G01-09 ヒト iPS 細胞分化過程における上皮間葉転換の機構解明と新規分化誘導法開発への応用

○坂谷 優奈, 金 美海, 紀ノ岡 正博
(阪大院・工)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】ヒト iPS 細胞由来の分化細胞は、再生医療での応用及び産業での利用が期待されている。しかし、従来の分化誘導法では初期段階の細胞運命決定が困難であるため効率と再現性は低く、目的細胞を十分に確保できないことから、効率的な臨床応用が行えないという課題がある。よって本研究では、ヒト iPS 細胞から目的細胞を安定して効率的に生成することが可能な新規分化誘導法の確立を目指して、分化初期段階における細胞間接着の制御が上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 及び細胞運命の決定に与える影響を検討する。

【方法及び結果】細胞間接着の制御が EMT 及び分化に与える影響を検討するために、ヒト iPS 細胞を 1.23×10^6 cells/cm² で iMatrix 面上に播種し、通常の培養と分化初期 7 日間の培地交換時に HA を添加する培養の 2 つの条件を設け、16 日間の心筋分化培養を行った。カドヘリンの発現の変化を観察するため、Day 1 及び Day 7 について E-カドヘリンと N-カドヘリンの発現を抗体免疫染色法で解析した。その結果、通常の培養では E-カドヘリンの発現を維持していた一方で、HA の添加があった培養では Day 1 から Day 7 にかけて E-カドヘリンから N-カドヘリンへの発現の切り替えが見られ、カドヘリンスイッチが示された。また、心筋分化を観察するため、Day 16 について心筋分化マーカー (cardiac troponin T; cTnT) の発現を抗体免疫染色法で解析した。その結果、通常の培養では心筋分化マーカーの発現がなかったことに対して、HA を添加した培養では cTnT の発現が重層化している培養面に幅広く観察された。以上の結果から、分化培養初期における細胞間接着の破壊が EMT を促進し、このことが心筋細胞への分化を促進する可能性が示された。

Elucidation of the mechanism of epithelial-mesenchymal transition in the process of hiPSC differentiation and development of efficient differentiation induction method

○Yuna Sakatani, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words cell-cell interactions, epithelial-mesenchymal transition, differentiation

2G01-10 ヒト間葉系幹細胞の培養におけるエクソソームを含む細胞外小胞の生産能の検討

○木山 実優, 金 美海, 紀ノ岡 正博
(阪大院・工)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】近年、幹細胞に由来するエクソソームに治療効果が存在することが示されたことから、エクソソームを安定に大量に生産するための技術が模索されている。しかしながら、培養条件ならびに継代操作に応じて分泌される粒子の性質や分泌量も変化すると報告はあるが、細胞培養工程にて、培養特性と細胞特性の変動が粒子の生産能に与えている影響は明らかではない。そこで本研究では、異なる継代回数のヒト間葉系幹細胞を用い、培養中における粒子の生産能に及ぼす影響について検討した。

【方法及び結果】継代数 1 と 4 のヒト間葉系幹細胞を 5.0×10^3 cells/cm² の濃度で播種し、増殖培地を用いて 120 時間培養を行った。継代数 1 と継代数 4 の培養 120 時間までのみかけの比増殖速度を比較したところ、二つの条件間で有意差は見られなかった。次に継代数 1 と継代数 4 の二つの条件において、培養開始から培養 120 時間目の培養上清を回収し、その上清を $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで処理した後、ナノ粒子解析システムを用いて細胞外粒子の粒径分布と濃度を測定した。粒子径分布の積算値が 10%, 50%, 90% に相当する粒子径をそれぞれ D_{10} , D_{50} , D_{90} として、 $(D_{90} - D_{10})/D_{50}$ で算出される SPAN 値を比較したところ、二つの条件間で有意差は見られなかった。しかしながら、120 時間の培養で粒子の比生産速度を比較すると、継代数 4 の細胞で 1.2 倍低下していることが確認できた。以上の結果より、継代培養を繰り返すことで老化させた細胞では、エクソソームを含む細胞外小胞の生産能が低下する可能性が示唆された。

Production of extracellular vesicles containing exosomes in human mesenchymal stem cell cultures

○Miyu Kiyama, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words extracellular vesicles, mesenchymal stem cell, apparent specific growth rate, apparent specific production rate

2G01-11 コラーゲン塗布面を用いたヒト間葉系幹細胞の細胞外マトリックスのリモデリング効果の検討

○Tan Shao Ying, 金 美海, 紀ノ岡 正博
(阪大院・工)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】ヒト間葉系幹細胞 (Human mesenchymal stem cells, hMSC) は細胞治療の有望な候補細胞として注目され、近年組織の恒常性、修復・再構築における hMSC による細胞外マトリックス分解能を有する酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) の役割が徐々に報告されている。しかし、培養した hMSC の細胞外マトリックスのリモデリングのポテンシャルを評価するための手法はまだ確立されていない。そこで本研究では、コラーゲン塗布面を用い hMSC の細胞外マトリックスのリモデリング効果を検討した。

【方法及び結果】通常の培養面と 1 型コラーゲンを高濃度 (1.05 mg/cm^2) で塗布した面 (塗布面) を用い、培養を行った細胞の形態を観察したところ、塗布面では小さい紡錘状の形態を示し、細胞骨格であるアクチンは点在することから、細胞骨格形成が未熟であることが分かった。一方、通常の培養面では細胞が大きく伸展し、はっきりとしたアクチンストレスファイバーの形成が確認できた。一方、蛍光染色によりコラーゲン分解に関与する細胞分泌型酵素 MMP-1 を観察したところ、塗布面上の小さい紡錘状の hMSC は細胞と細胞周辺に MMP-1 が確認されたが、通常の培養面上での伸展した細胞では MMP-1 が確認されなかった。ELISA 法により MMP-1 と MMP の特異的な内在性の阻害物質 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1) の産生を測定したところ、塗布面で培養を行った細胞は、通常の培養面と比べ MMP-1 産生が高い一方で、TIMP-1 の産生が低いことが確認された。また、分解されたコラーゲン検出用プローブを用い、塗布面上で培養された細胞により分解されたコラーゲンが多く観察された。これらのことから塗布面は MMP の産生を促進させることができ、hMSC の細胞外マトリックスのリモデリングを誘導させることが示された。

Investigation of Extracellular Matrix Remodeling Effect of Human Mesenchymal Stem Cells on Collagen-Coated Surface

○Shao Ying Tan, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words human mesenchymal stem cell, extracellular matrix remodeling, collagen coating, matrix metalloproteinase

2G01-12 幹細胞の拡大培養時における細胞特性の“揺らぎ”を表す速度論モデル構築

○今井 綾¹, 佐々木 啓^{1,2}, 上岡 惇也¹, 紀ノ岡 正博¹
 (¹阪大院・工, ²阪大・MEIセ)
 kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

近年、再生医療や創薬・病理研究の発展に伴い、ヒト間葉系幹細胞の安定した大量培養技術の確立が求められている。しかし、拡大培養工程において細胞ごとに異なる特性をもつと考えられ、細胞特性の揺らぎと呼ばれている。拡大培養中に生じる揺らぎの要因を解明することが、安定した細胞製品を製造する上で重要である。メカノトランスダクションは外部の機械的な刺激が細胞骨格を通して細胞核内に達し、遺伝子発現が制御される一連の機構であり、ヒストンメチル化は遺伝子発現を制御する細胞特性の一つとして知られている。本研究では、細胞が受けた機械的な刺激の程度をヒストンメチル化のレベルとして評価し、揺らぎを表す速度論モデルの構築を目的とした。

我々は各細胞がルールに則って自律的に動くエージェントベース・セルラーオートマトンモデルを構築してきた。本モデルのルールは、細胞挙動は細胞-細胞間結合、細胞-基質間結合および細胞遊走速度の3つのバランスにより制御されるという仮定に基づく。本研究では、細胞挙動を制御する3つのエネルギーの変化量を、細胞に加わる機械的な刺激として計算するメカノトランスダクションモジュールを実装した。また、機械的な刺激の程度に応じて値が上昇するメチル化モジュールを実装した。これらモジュールを組み込んだシミュレータを用いて、細胞均一播種条件において100回計算を行ったところ、バッチ間のメチル化レベルにばらつきが生じていることが確認された。さらに、1回の計算内では、培養時間の経過につれて、細胞ごとにメチル化レベルが異なることが確認され、バッチ内の揺らぎを表現した。中でも、メチル化レベルが大きく上昇している細胞が確認されたことから、実際の培養実験系でも均一播種において細胞特性が著しく異なる細胞が存在することが示唆された。

Development of a kinetic model expressing disorder of cell properties in human mesenchymal stem cell culture

○Aya Imai¹, Kei Sasaki^{1,2}, Junya Kamioka¹, Masahiro Kino-oka¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²MEI center, Osaka Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, *in silico*, histone methylation

2G03-01 自動培養装置を活用した分化誘導工程の最適化

○丹原 慎司, 福守 一浩, 紀ノ岡 正博
 (阪大院・工)
 kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】再生医療が今後、産業として本格化するためには、均質な細胞加工製品の大量製造が求められるが、細胞製造では、手作業ベースの小規模な製造が多く存在するのが現状であり、培養環境や培養操作の変動の蓄積が製品の不均質性を生むと考えられている。本研究では、人工多能性幹細胞(iPS)由来網膜色素上皮(RPE)細胞製造を例に、重要な工程パラメータを含む培養操作の機械化によるRPE分化誘導工程の最適化を目的とする。今回、分化誘導開始時の播種密度を工程パラメータに設定し、初期外胚葉分化への影響を分化マーカーにより定量的に評価した。また培養操作の機械化による安定性を自動培養装置を用いて検証した。

【方法】iPS細胞(201B7株)を播種密度 $X = 1.2 \times 10^5$ cells/cm² で手作業と機械作業で播種し、分化誘導培地で培養した。RT-PCR法により、未分化マーカー *Oct3*, *Nanog*, 外胚葉マーカー *PAX6*, 中胚葉マーカー *Brachyury*, 内胚葉マーカー *Sox17* を24hごとに定量した。また、播種後7日目の細胞を回収し、FACSによってRPE前駆体である神経外胚葉マーカー *PAX6*, 非RPE前駆体である表皮外胚葉マーカー *CK18* を解析した。

【結果と考察】未分化マーカーは、経時的に発現が低下しており、中/内胚葉マーカーは、ほとんど発現していなかった。また、*PAX6*の発現が培養7日目まで上昇していたことから、主に外胚葉に分化が誘導されていることを確認した。さらに、播種密度依存的に *PAX6* 陽性細胞の収率が変動していたことから、神経/表皮外胚葉の分岐が起きていると考えられる。そして、培養7日目の各マーカー陽性率をFACSによって解析したところ、RPE分化誘導初期における分化の方向性を定量的に評価することができた。本研究では、培養操作の機械化による安定性について詳細に検討し、分化誘導工程の最適化手法について議論する予定である。

Optimization of differentiation induction process by using automated cell culture system

○Shinji Tanbara, Kazuhiro Fukumori, Masahiro Kino-oka
 (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words iPS cell, Differentiation induction culture, Mechanization

2G03-02 iPS細胞培養におけるコロニー成長挙動の解析技術の開発と有用性検証

○鳥羽 修平¹, 山本 陽治¹, 櫻井 康雄², 塚原 正義³
 (¹キヤノン, ²キヤノンメディカルシステムズ, ³京都大学iPS細胞研究財団)
 yamamoto.yoji@mail.canon

【背景】

iPS細胞培養では、作業者が細胞の様子を観察し細胞処理のタイミングを主観的に判断して決定することが多い。このことが細胞培養の再現性および安定性を損なう一因となっており、再現性や安定性を担保するためには作業者の主観によらない客観的な判断方法が求められている。そこで、本研究では、培養中のiPS細胞コロニーが成長するにつれ成長速度が抑制されることに着目し、個々のコロニーの成長抑制タイミングを培養中のタイムラプス画像から解析する技術の開発を目指した。

【解析方法】

培養細胞の観察には、IncuCyte装置(ザルトリウス社)を用いた。本装置によって得られるタイムラプス画像に対して、独立した細胞領域(以下、コロニー)を抽出およびトラッキングすることにより、個々のコロニーの面積の時系列変化を計測した。さらに、コロニー面積と倍加時間の関係性を曲線近似モデルで表現することで、個々のコロニーの成長抑制のタイミングを検出した。

【実験内容・結果】

iPS細胞の維持培養プロセスにおいて、培養条件(培地量、播種量、マトリクスコート量)を変えて個々のコロニーの成長抑制タイミングを評価した。その結果、培地量が少ない、もしくは播種量が多い場合に、個々のコロニーの成長抑制タイミングのばらつきが大きくなることを確認した。また、マトリクスコート量を増やすと、成長抑制がより小さいコロニーサイズで起こることを見出した。

【考察】

これらの結果により、個々のコロニーの成長挙動に着目した本技術は、コンフルエンスや細胞数といった培養状態をバルクで評価する従来の指標とは異なる指標として活用可能であることが示唆された。大量のiPS細胞を製造する場合に重要な in process monitoring への適用が期待される。

Image analysis of iPS colony growth and its usefulness in cell manufacturing.

○Shuhei Toba¹, Yoji Yamamoto¹, Yasuo Sakurai², Masayoshi Tsukahara³
 (¹Canon Inc., ²Canon Medical Systems Corp., ³CIRAF)

Key words iPS cells, image analysis, in process monitoring, cell culture

2G03-03 ヒト毛包幹細胞の機能維持培養法

○山内 万貴¹, 景山 達夫^{1,2,3}, 笠井 敬一郎⁴, 福田 淳二^{1,2}
 (¹横国大院・工, ²神奈川県産業技術総合研, ³JST・さきがけ, ⁴湘南美容外科)
 fukuda@ynu.ac.jp

脱毛症治療の社会的ニーズは国内外において非常に大きく、現在は植毛や薬剤治療が行われている。これらの治療法では症状の進行抑制は可能であるものの、大幅な毛髪数の増加は期待できない。そこで近年、毛髪数の増加が可能な新たな治療法として、患者自身の毛包幹細胞を生体外で増殖させ、これを移植する毛髪再生医療に期待が寄せられている。この方法では、毛包幹細胞の機能と数が毛髪再生効率に直結するため、細胞の機能維持増殖法が重要である。一般に、毛包幹細胞は、平面培養では増殖と共に機能を失うことが分かっている。先行研究では、マウス毛包幹細胞をマトリゲル内で増殖させると、平面培養で失った機能が回復することが示された。本研究では、独自の培養器を用いて毛包幹細胞のゲル包埋培養法を確立するとともに、脱毛症患者の毛包幹細胞を用いて適用可能性を評価した。

培養底面にマイクロウェル構造(高さ1.0mm, 直径1.0mm, ピッチ間1.3mm)を有する培養器を作製し、このウェル内でマウス毛包幹細胞に凝集体を形成させた。この凝集体をマトリゲルで包埋し、増殖培養後の毛包幹細胞の機能を評価した結果、懸濁細胞をマトリゲルに包埋する先行研究と比較し、毛包幹細胞マーカーの発現が向上するとともに、マウス移植後の再生毛髪数が有意に増加した。また、脱毛症患者の毛包幹細胞を同様に培養した結果、培養7日間において凝集体の直径が増大し、細胞数は約1.8倍に増加した。また、毛包幹細胞マーカーであるCD200の発現が、播種前と比較して大きく増加した。今後さらなる検討が必要であるが、本手法がヒト毛包幹細胞の培養法となりうる可能性が示された。

Expansion and maintenance of stemness for human hair follicle stem cells

○Maki Yamanouchi¹, Tatsuto Kageyama^{1,2,3}, Keiichiro Kasai⁴, Junji Fukuda^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., ²Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, ³PRESTO, JST, ⁴Shonan Beauty Clinic)

Key words hair regeneration, cell

2G03-04 細胞自己凝集化技術を用いた造影剤担持型細胞凝集塊の作製

○藤 魯 鶴¹, 福島 宗一郎³, 岡野 ジェイムス洋尚^{1,2}, 岩井 良輔^{1,2}
 (1)岡山理大院・工, 2)岡山理大・フロンティア理工研, 3)東京慈恵
 会医大・再生医学研)
 iwai@ous.ac.jp

【背景と目的】数千個程度の細胞から成る細胞凝集塊の移植による組織再生効果が様々な疾患において示され、本邦においても数例の臨床研究が実施下にある。ここで、移植手法によっては細胞凝集塊の患部への留置状況を確認できない場合もある。本研究では、我々が開発した細胞自己凝集化技術 (CAT) を用いて、X線透視下にて患部における留置状態を目視可能な造影剤を担持した細胞凝集塊を作製することを目的とした。【方法と結果】CAT用のポリマーを培養表面の全面にコートした培養ウェル (平底型 96 ウェル) にヒト骨髓液由来間葉系幹細胞を播種し約 1 時間培養することでウェル底面に隙間の無い細胞単層を形成させた。ここで、タンゲステンカーバイド (WC) の粉末を含む培地に交換して数分静置すると、黒色の WC 粉末が沈降して細胞単層の上面に吸着した。培養を続けると、細胞単層は WC を吸着した状態で外縁部から剥離すると同時に凝集化して、播種から約 1 日後には添加した WC のほぼ全てを担持した球形の細胞凝集塊が形成し培養液中に浮遊した。そこで、細胞凝集塊を X 線下にて観察した結果、WC の細胞単層への添加密度が概ね 0.5 mg/cm² より高ければ透視像として目視し得ることが分かった。一方、WC 添加密度が 1 mg/cm² より低ければ無添加と同等の細胞代謝活性と増殖性が維持されることを確認した。さらに、細胞凝集塊は培養皿に静置して培養すると、1 時間以内に表面に付着し、数日かけて細胞が浸出してくることも確認した。【まとめと展望】“単層形成を経た細胞の自己凝集”という CAT 特有の細胞凝集塊形成過程を利用することで、造影剤を培地に添加するだけで X 線透視下にて目視可能な造影剤担持型細胞凝集塊を作製することができた。今後は動物実験モデルを用いて体内での視認性、組織再生効果や安全性に関して検証していく予定である。

Preparation of contrast agent-loaded cell aggregates by using cell self-aggregation technology

○Lupeng Teng¹, Soichiro Fukushima¹, J.Hirota Okano³, Ryosuke Iwai^{1,2}
 (1)Grad. Eng., Okayama Univ. Sci., 2)Inst. Front. Sci. Tech., Okayama Univ. Sci., 3)Div.
 Regenerative Med., The Jikei Univ. Med.)

Key words tissue engineering, cell aggregate, regenerative medicine, contrast agents

2G03-05 クラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターによる三次元組織の作製

○大野 莉歩¹, 仁宮 一章²
 (1)金沢大院・自科, 2)金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】薬剤評価系として、培養細胞から作製される三次元組織の利用が必要とされている。特に多細胞スフェロイドからなる三次元組織が注目されている。ここで、スフェロイド積層用バイオ 3D プリンターとは、スフェロイドを剣山 (支持体) に刺すことで、デザインナブルな三次元組織を作製するものである。しかし、既存のスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターでは、剣山自体が観察の妨げになることや、三次元組織に穴が開くことで、薬剤評価に影響がある。そこで、本研究では、ハイドロゲルを物理的に粉砕したクラッシュゲルを支持体として用いた新規なスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターを開発した。また、このクラッシュゲルを支持体として用いたスフェロイド積層用バイオ 3D プリンターをモデル腫瘍三次元組織の作製へ応用した。

【方法および結果】ゲランガムのハイドロゲルをホモジナイズし、クラッシュゲルを作製し、自作培養器内に充填した。また、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)および GFP 発現ヒト乳がん細胞株(MCF-7/GFP)の 2 種の細胞を用いて、正常細胞スフェロイドおよびがん細胞スフェロイドを作製した。そして、スフェロイド積層用バイオ 3D プリンターを用いて、クラッシュゲル内に 3×3×1 (合計 9 個) でスフェロイドを配置し、スフェロイド積層評価を行った。培養中のスフェロイド融合評価やがん浸潤評価を行った。培養終了後、スフェロイド融合物を透明化し、多光子顕微鏡により 3D 観察を行い、内部構造評価を行った。クラッシュゲル内にデザイン通りにスフェロイドが配置でき、培養によりスフェロイドの融合やがんの浸潤が起こることが分かった。また、培養終了後の内部構造評価の結果、剣山の穴がない状態で、三次元組織内のがん細胞の 3 次元的な遊走を評価することができた。

Spheroid-based bio 3D printing using hydrogel slurry as support.

○Ohno Rihō¹, Ninomiya Kazuaki²
 (1)Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., 2)Ints. Frontier Sci. Initiative,
 Kanazawa Univ.)

Key words spheroid, bio-3D printer, hydrogel slurry

2G03-06 酵素による架橋形成反応を用いた液体金属内包ヒドロゲルの作製

○松田 幸大¹, 小嶋 勝¹, 中畑 雅樹², 堀口 一樹¹, 境 慎司¹
 (1)阪大院・基礎工, 2)阪大・理)
 kojima@cheng.es.osaka-u.ac.jp

組織工学では、細胞の増殖や分化を行うためにヒドロゲルのような細胞外マトリックスを模した足場材料を使用する。ヒドロゲルは、高分子の架橋によって作製される 3 次元の構造体であり、高い吸水性や生体適合性など生体組織と類似した特徴を持っていることから、組織工学の分野で注目されている。ヒドロゲルの作製には様々な架橋法が用いられているが、特に酵素である西洋なしび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を用いた架橋は、迅速かつ細胞に優しい温和な条件で反応が進行するため、バイオメディカル分野で有用とされている。一方、細胞の挙動制御に重要な要素の一つとして電気刺激がある。筋肉細胞や神経細胞などの電気活性を有する細胞は、電気刺激や足場の導電性により増殖や分化が促進されることが知られている。これまで、HRP 酵素を用いて作製されるヒドロゲルに導電性を持たせるため、炭素材料などの導電性物質の導入が行われてきた。

そこで本講演では、低毒性のガリウム系液体金属を導電性物質として使用した、新しい導電性ヒドロゲルについて報告する。このヒドロゲルは、フェノール性水酸基を導入したアルギン酸やポリビニルアルコールなどの高分子に、微粒子にした液体金属を分散させた後、HRP 酵素と H₂O₂ を加えることで作製した。導電率を測定したところ、液体金属を含まないヒドロゲルよりも高い導電性を有していた。また、このヒドロゲル上に骨格筋へと分化する筋芽細胞を播種したところ、4 日後でも高い生存率を維持していた。さらに、3D プリンティングによりヒドロゲル構造体の作製に成功した。これらの結果は、HRP 酵素を用いて作製されたガリウム系液体金属含有ヒドロゲルが細胞適合性を有しており、組織工学の 1 つの手法である 3D バイオプリンティングへ応用できる可能性を示唆している。

Fabrication of liquid metal-encapsulated hydrogel via enzyme-mediated crosslinking

○Matsuda Yukihiko¹, Kojima Masaru¹, Nakahata Masaki², Horiguchi Ikki¹, Sakai Shinji¹
 (1)Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., 2)Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words liquid metal, hydrogel

2G03-07 SpyTag/SpyCatcher システムを用いた SARS-CoV-2-VLP ワクチンの開発

○NAM SEOYEON¹, 保木本 達也¹, Nguyen Bich Thao¹,
 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (1)阪大院・工, 2)阪大・OTRI)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

2019 年 12 月に中国で初めて発病した COVID-19 は 2022 年 7 月までに 5 億人以上の感染者数と 636 万人以上の死者数が報告されている。現在、COVID-19 の終息に向けて、様々なワクチン開発への研究が行われている。ワクチンの一種である VLP (Virus-Like Particle) ワクチンはウイルスと類似の外部構造を持ち、高い免疫効果が期待されている。また、ウイルスの遺伝情報を欠いており感染力を持たないため安全性が高い。しかし、遺伝子組換え技術を用いて VLP を生産する際に、細胞内における VLP 粒子のアセンブリが難しく、生産系を構築するまでに多くの時間と費用を要するなどの課題がある。そこで、VLP をナノキャリアとして用いた VLP ワクチン生産のモジュール化が注目を集めている。中でもノロウイルスの VLP は高い安定性と生産性が実現可能なことから、ナノキャリアとして注目されている。そこで本研究では、*in vitro* でペプチド断片とタンパク質との不可逆的な結合を可能とし、モジュール化によく活用されている SpyTag/SpyCatcher システムとチャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞を用いてノロウイルスの VLP をナノキャリアとし、SARS-CoV-2 の抗原を SpyTag/SpyCatcher で付着させることによる効率的なワクチン生産系構築を試みた。CHO 細胞発現ベクター Mammalian PowerExpress System[®] (Toyobo) を使用し、VP1-SpyTag003-VP2 と S1-SpyCatcher003 の発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターを無血清培地に馴化した CHO-K1 にトランスフェクションし、抗生物質の添加によって安定発現株を選択した。今後、Western-blotting 法を用いて各タンパク質の発現を確認した後、タンパク質の精製を行い、*in vitro* でキメラ VLP を形成する予定である。

Development of a COVID-19 vaccine candidate based on the SpyTag/SpyCatcher system

○Seoyeon Nam¹, Tatsuya Hokimoto¹, Bich Thao Nguyen¹, Guirong Kanai¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Takeshi Omasa^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., 2)OTRI, Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, Virus-like particle, SARS-CoV-2

2G03-08 バイオリクターを用いたヒト iPS 細胞からの NK 細胞分化誘導の検討

○畑岡 亮也¹, 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (¹阪大院・工, ²阪大・先導的学際研機構)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

NK (Natural Killer) 細胞は白血球の一種で、がん細胞攻撃能力を持つ。NK 細胞を利用したがん治療法として患者の NK 細胞を体内から採取、増殖させ、体内に戻す NK 細胞療法があるが、NK 細胞の増殖率が低いという課題がある。そこで着目されているのが、大量に作製した iPS 細胞ストックから NK 細胞を効率的に大量作製する手法である。先行研究¹⁾では EB (embryoid body)法を用いた小スケール (6 ウェルプレート) での NK 細胞分化プロトコルが確立されているが、臨床治療に必要とされる 1×10⁹ 細胞を得ることは困難であった。そこで本研究では NK 細胞の大量生産法の構築を目指し、バイオリクターを用いた EB 培養を行った。

ヒトの末梢血単核球(PBMC)から本研究室にて樹立した iPS 細胞クローン No.11 株を用い、30ml シングルユースバイオリクターに iPS 細胞を 2×10⁵ cells/ml の細胞密度で播種し、AK02N 培地 30ml で 3 日間、その後 4 日間 SCF 40ng/ml, VEGF 20ng/ml, BMP4 20ng/ml のサイトカインを添加した 20%FBS 含有 RPMI1640 培地 30ml で計 7 日間培養した後、EB 形成を顕微鏡で確認した。その結果、培養 3 日目までは、約 100μm を中心に 100-300μm の様々なサイズの EB が形成されたが、7 日目では 100μm サイズの EB が著しく減少し、300μm EB の割合が増加した。この原因として、AK02N 培地から RPMI1640 培地への変更、もしくは高 FBS 濃度であるとして、後半 4 日間の RPMI1640 培地を AK02N 培地に変更した培養および、後半の FBS 濃度を 10%に低下した RPMI1640 培地での培養を行った。しかし、EB のサイズ変化は引き続き観察され、培地変更もしくは FBS 濃度による影響でないと推定された。今後、CD34 陽性の造血幹細胞を作製し、その後、NK 細胞への分化誘導の条件を検討する。

1)Zhu, H. and Kaufman D.S., Methods Mol. Biol. 2048:107-119 (2019).

Study of bioreactor-based induction of differentiation into NK cells from hiPS cells

○Takaya Hataoka¹, Guirong Kanai¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Takeshi Omasa^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words differentiation, bioreactor

2G03-09 チャイニーズハムスター肺細胞由来の iPS 細胞の樹立

○藤岡 晴生¹, 吉田 貴美¹, 金井 貴蓉¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 古賀 雄一³, 大政 健史^{1,2}
 (¹阪大院・工, ²阪大・先導的学際研機構, ³岡山理大・工)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞は、タンパク質のフォールディングや糖鎖形成に必要な細胞機構を備えているため、抗体医薬品生産の宿主細胞として広く利用されている。しかし、CHO 細胞は微生物と比較して増殖速度が遅いため生産性が低いという問題が存在する。CHO 細胞の生産性に影響を与える重要な要因のひとつにエピジェネティック修飾がある。そこで、本研究では宿主細胞から人工多能性幹細胞 (iPSC) への初期化を行うことで、エピジェネティックな修飾による遺伝子発現阻害を回避できると考えた。さらに初期化した細胞を分泌細胞へ分化させることで遺伝的に安定かつ組換えタンパク質生産性の高い細胞株を作製することが可能であると考えられた。

対象とする宿主細胞としてチャイニーズハムスター肺 (CHL) 細胞を選択し、OCT3/4, SOX2, KLF4, そして L-MYC を導入することで初期化を行った。さらに構築した iPS 様細胞の多能性を確認するため、アルカリホスファターゼ (AP) 染色、RT-PCR、免疫染色を行い、FACS により iPS 様細胞の単離を試みた。AP 染色の結果、CHL 細胞由来の iPS 様細胞のみで細胞が染色された。次に構築した iPS 様細胞から RNA を抽出し、RT-PCR によって多能性マーカー遺伝子、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, Nanog の発現を調べた。その結果、構築した細胞においてすべての遺伝子の発現が確認できた。さらに免疫染色の結果、KLF4 のみ発現が確認できたが、SSEA1, OCT3/4, c-MYC, Nanog では確認できなかった。FACS による細胞単離を試みたところ、iPS 様細胞の単離は確認できたが、その後の培養途中で細胞が死滅した。

本研究から、CHL 細胞の初期化により多能性遺伝子を持った iPS 様細胞が構築できた。免疫染色においては発現量が少ないため、多くの多能性マーカー遺伝子で発現が確認できなかったと考えられる。

Establishment of Chinese hamster iPS cell from lung cells

○Haruki Fujioka¹, Takami Yoshida¹, Guirong Kanai¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Yuichi Koga³, Takeshi Omasa^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words cell sorter

2G03-10 立体内子宮内膜様組織構築のための 灌流培養の有効性の検討

○若林 憲信¹, 坂口 勝久¹, 戸部 友輔¹, 藤間 千尋², 藏本 吾郎², 本間 順², 岩崎 清隆¹, 清水 達也²
 (¹早大院・先進理工, ²東京女子医大・先端研)
 katsuhisa@toki.waseda.jp

現在、晩婚化に伴い女性の初産年齢が高くなっており、同時に不妊治療数も増加傾向にある。しかしながら、現行の不妊治療技術では 20 代でも妊娠率が 30% に届かず、30 代半ばからは低下の一途を辿る。主な原因としては卵子や子宮内膜の質の低下とされているが、着床や妊娠の過程については未解明の点が多い。本研究の目的は、体外で子宮内膜様組織を構築し受精卵が着床する過程を観察および評価することで、着床不全の原因を解明することである。まずはその基礎実験として、子宮内膜様組織の構築と維持を目指した。具体的には受精卵の径より大きい 100μm 以上の厚みを保持し、着床期間である 3-6 日間維持することと定めた。

以上の目的を達成するため、培養過程において細胞シート工学と灌流バイオリクターを応用した。細胞シートとはシート状に形成された細胞塊のことで、積層化により 3 次元の組織を構築することができる。子宮内膜の細胞も同様にシート状に回収し、積層によって立体組織を構築することを行った。また、積層化した子宮内膜細胞シートを維持するため、培養液を灌流できる微小管路を有するコーラーゲル上で灌流培養を行った。

上記の灌流バイオリクターの基礎検討として、灌流培養による細胞シートへの培養液拡散を検証した。子宮内膜の成熟と胎児の生育維持には Death Effector Domain containing DNA binding (DEDD) が必須であり、その分子量は 63kDa と大きく増加している。そのため、分子量が増加してもコーラーゲルを拡散するかを検証した。その結果、0.3mL/min の流量での灌流が培養に適していることが確認できた。次に、同コーラーゲル上で灌流培養を行った結果、立体内子宮内膜組織の内部は壊死することなく、100μm 以上の厚みを 6 日間保つてることが分かった。

Evaluation of the efficacy of perfusion culture for the construction of three-dimensional endometrial-like tissue

○Kenshin Wakabayashi¹, Katsuhisa Sakaguchi¹, Yusuke Tobe¹, Chihiro Toma², Goro Kuramoto², Jun Homma², Kiyotaka Iwasaki¹, Tatsuya Shimizu²
 (¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²ABMES)

Key words 3D structure, perfusion culture, Endometrium

2G03-11 CHO 細胞灌流培養における組換え IgG1 抗体特性の動的変化解析

○岡本 棟悦¹, 樋口 拓哉², 鈴木 真史², 奥谷 聡志², 塚塚 正義³
 (¹徳島大院・創成科学研究, ²味の素・バイオファイン研, ³徳島大院・社会産理工)
 onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景・目的】現在、バイオ医薬品の生産技術は大きな転換点を迎えており、従来の流加培養法(Fed-batch 培養)から次世代の培養法である連続培養法(主に灌流培養、Perfusion 培養)への移行のための技術開発が進んでいる。一方で、灌流培養法における抗体生産細胞や生産抗体の特性変化は十分に解明されていない。本研究では、近年注目されている灌流培養に着目し、CHO 細胞における長期間の細胞培養や培養条件の変動が、組換え IgG1 抗体の生産量や品質特性に与える影響を解析した。

【実験方法】IgG1 産生 CHO 細胞・ATF システムを用い、培地量 1L に灌流培養を行い、培養途中に培地交換率を変更した。培地には味の素(株)製 CELLiST ブレンド培地を使用した。培養液中の抗体生産濃度はバイオレイヤー干渉法により測定した。また培養液から Protein A クロマトグラフィーにより抗体精製を行い、サイズ排除クロマトグラフィー、Fc レセプタークロマトグラフィーにより、抗体の凝集体量や抗体糖鎖構造等の重要品質特性を分析した。

【結果並びに考察】灌流開始後 IgG1 生産量は平均して 0.35 g/L/day であり、培地交換率を 1 V.V.D. から 0.5 V.V.D. に低減させても大きく減少しなかった。一方で培地交換率を下げると抗体由来不純物量 (高分子量凝集体、オリゴマー、断片化抗体)が増加し、同時に抗体の Fc 領域における N-型糖鎖のガラクトース付加量も減少した。また、培地交換率低下後、平均細胞サイズが増加していたことから、細胞はストレス状態にあると考察される。これらの結果より、生細胞数に対する栄養源量の相対的な減少や細胞内ストレスが生じると、抗体品質が劣化する可能性が示唆された。現在、生細胞数に対する栄養源量の相対関係の異なる検証として、培地交換率を固定しながら維持細胞密度を変更した培養を進めており、本結果も合わせて報告を行う。

Dynamic analysis of recombinant IgG1 properties in CHO perfusion culture

○Okamoto Muneyoshi¹, Higuchi Takuya², Suzuki Masashi², Okutani Satoshi², Onitsuka Masayoshi³
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Tokushima Univ., ²Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., ³Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)

Key words perfusion, Chinese hamster ovary cell, monoclonal antibody, protein quality

2G03-12 中間径フィラメントのテール領域における二次構造とアクチン結合の関係

○内田 幸希¹, 山岸 彩奈^{1,2}, 長崎 晃³, 上田 太郎⁴, 中村 史^{1,2}
 (1)農工大院・工, (2)産総研・細胞分子工学, (3)産総研・バイオメディカル, (4)早大院・先進理工)
 chikashi-nakamura@aist.go.jp

中間径フィラメント(Intermediate filament, IF)の一種であるビメンチンは間葉系細胞のマーカーである。IFを構成するタンパク質はN末端側からヘッド・ロッド・テールの3領域で構成されており、ビメンチンはテール領域のC末端17残基でアクチンと結合することで細胞質に網目構造を形成する。一方で、この領域で欠失したビメンチンは凝集塊を形成することが報告されている。これまでに我々の研究室では、神経幹細胞マーカーのIFであるネスチンにおいても、テール領域のC末端側1/2の配列を欠失させることで、細胞内での繊維形成能を失うことを見出している。このことから、テール領域によるアクチン結合はIFに共通の機能であることが示唆されたが、その結合様式は不明である。そこで本研究では、ビメンチンを含むIII型IFテール領域に共通して存在する二次構造に注目し、この構造がIF-アクチン間の結合に与える影響を調査した。AlphaFold2を用いてIII型IFテール領域の構造予測を行った結果、アクチン結合領域であるビメンチンC末端17残基に存在するβシート構造が、III型IF間において共通の構造であることが確認された。この構造の配列を確認すると、RDGという保存配列がβシート構造のループ内に存在しており、RDGを欠失させると同構造が消失することが予測された。そこで、マウス乳がん細胞株を用いて作成したビメンチンノックアウト株でRDG欠失ビメンチンを発現したところ、細胞内で凝集塊を形成した。一方RDG配列をアラニンに置換すると同構造は維持されることが予測され、同様の相補実験においても変異ビメンチンは細胞内で網目構造を形成することが確認された。よってビメンチン-アクチン結合にはテール領域のβシート構造が重要であり、同様の構造を持つIII型IFはβシート構造によってアクチンと結合し、細胞内に網目構造を形成すると考えられる。

Relationship between secondary structure in the tail domain of intermediate filaments and actin binding.

○Koki Uchida¹, Ayana Yamagishi^{1,2}, Akira Nagasaki³, Taro Ueda⁴,
 Chikashi Nakamura^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., (2)Cell. Mol. Biotech. Res. Inst.,
 AIST, (3)Biomed. Res. Inst., AIST, (4)Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words protein-protein interaction, intermediate filament, actin, alpha fold

2A06-01 日本生物工学会が果たすべき役割とは？

○福崎 英一郎^{1,2}
 (1)阪大院・工, (2)阪大・先導的学際研機構)
 fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

「選択と集中」、「ダイバーシティ」はそれらによって日本の諸問題が解決できる手段のはずだが、単なる数値目標と捉えられている場合が多い。近未来におけるバイオテクノロジー社会活用最大化のために、「選択と集中」、「ダイバーシティ」という手段をどのように使いこなすべきなのか？「選択と集中」、「ダイバーシティ」で環境が激変するステークホルダーをどう救済するのか？今すべきことを議論したい。

What role should SBJ play?

○Eiichiro Fukusaki^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., (2)OTRI, Osaka Univ.)

Key words metabolomics, metabolome analysis, food function, foodloss

2A06-02 生物工学分野における産学連携の未来

○秦 洋二
(月桂冠・総研)
y_hata@gekkeikan.co.jp

我が国の生物工学分野においては、これまで密接な産学連携により、多数の業績を挙げてきた。しかし近年は、研究成果の社会実装までに多くの時間を要するようになり、新たな産学連携のあり方が求められるようになってきた。学会創立 100 周年を機に、今後の生物工学分野における産学連携について議論したい。

2A06-03 次世代生物工学会を支える若手研究者のダイバーシティとは？

○竹山 春子
(早大・先進理工)
haruko-takeyama@waseda.jp

ダイバーシティの実現が求められる昨今、生物工学会においても次の世代に向けた改革が求められている。日本においても女性研究者を積極的に助成する取り組みが進められているが、真の意味でのダイバーシティを実現するためには、より多様な視点からの活動が必要になると考えられる。生物工学会 100 周年を記念する本シンポジウムにおいて、次の 100 年を見据えた「これから」について、若手研究者と一緒に想像したいと思います。

The future of industry-academia collaboration in the field of biotechnology

○Yoji Hata
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words industry-academia collaboration

What is needed to realize the diversity for young researchers in the Society for Biotechnology?

○Haruko Takeyama
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words diversity

2A06-04 ダイバーシティを生かした生物工学のシナリオ作り

○吉野 知子
(農工大院・工)
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

内閣府が2030年の世界最先端のバイオエコノミー社会の実現を目指した「バイオ戦略」を策定している中で、食料・エネルギー・医療など幅広い分野を網羅する生物工学が担う役割は非常に大きい。さらに気候変動やCOVID-19による社会への打撃が、逆に当該分野への期待を加速していると考えられる。このような状況においても、日本における当該分野のダイバーシティ戦略は見てこない。2010年の生物工学会誌88巻10号において「女性研究者のキャリアを考える」という特集で、自身が奮闘する日々をつらつらと執筆したことを思い出す。記載している内容も、感じている感情も10年以上経過した現在と殆ど変わっていない。ドラスティックな改革が無ければ、これから10年後も同様の議論をしていることは容易に想像できる。半ば強制的にでも進めなければ、日本の根強い風潮のもとではダイバーシティ戦略は推進しないと感じる。本発表ではダイバーシティ推進による新たな生物工学分野の開拓を目指し、自身の経験を紹介しながら「ダイバーシティを生かした生物工学のシナリオ作り」について議論する場とした。

Creating a scenario for biotechnology that takes full advantage of diversity

○Tomoko Yoshino
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words 生物工学, ダイバーシティ, バイオエコノミー

2A06-05 オンとオフでの生物工学若手会 ―昔と今, そして次の世代へ―

○中島 一紀
(北大院・工)
k.naka@eng.hokudai.ac.jp

生物工学若手会では、若手会夏のセミナーをはじめとする様々なイベントを開催し、年齢や分野にとらわれずフラットな環境で全国の若手研究者が切磋琢磨し、刺激し合い、協力しあえる場を提供してきた。密な交流が不可能になったコロナ禍では、いち早くオンラインでの学術・人的交流の場を提供してきた。それらを踏まえ、本シンポジウムでは次世代のための若手会について膝を突き合わせて話し合いたい。

Young researcher's community for biotechnology via online and offline meeting - dynamic blend for the next generation

○Kazunori Nakashima
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words interaction between young bioengineers

2A06-06 若手研究者がワクワクする生物工学の未来について考える

○曾宮 正晴
(阪大・産研)
msomiya@sanken.osaka-u.ac.jp

生物工学は、発酵・物質生産・環境・医療など幅広い分野を包含し、我々の生活にも直結する大変魅力的な学問です。生物工学分野の発展のためには、バイオテクノロジーに興味を持つ優秀な若手人材が研究者のキャリアに魅力を感じ、参入してくれることが重要です。一方で学生や若手研究者にとって、特にアカデミアを取り巻く環境は決して安泰とは言えません。短期雇用と成果を上げるプレッシャー、ライフワークバランスなど、若手研究者特有の問題の改善には、シニア研究者の方々の理解が不可欠です。また若手研究者が自分のアイデアを実現して、画期的な研究成果を上げることができる環境の整備が重要ではないかと思えます。

本シンポジウムでは、米国留学中の演者が日本国内外で感じたアカデミアの違いや若手研究者を取り巻く環境を紹介しながら、かつて若手だったシニア研究者の皆様と、日本の若手研究者がワクワクして研究に取り組めるためにはどうすればよいか、一緒に考える機会になればと思います。

2A07-01 インダストリー研究者のキャリアパス紹介～ご参考までに～

○佐藤 俊輔
(カネカ)
Shunsuke.Sato@kaneka.co.jp

18年のインダストリー研究者としての経験を通して、今考えていることを伝えます。

そして、無限の可能性と高い志を持つ若手研究者への期待を伝えさせて頂きます。

Exciting future for early stage investigators in biotechnology field

○Masaharu Somiya
(SANKEN, Osaka Univ.)

Key words early stage investigator

Career path of the researcher in industry

○Shunsuke Sato
(Kaneka Corp.)

Key words Innovation, Bio-manufacturing

2A07-02 "ウェット×ドライの二刀流"の現在地～製薬企業における博士のキャリアパス紹介～

○佐々木 寛人
(塩野義製薬)
hiroto.sasaki@shionogi.co.jp

私が目指す生物工学者の姿は、“プロをつなぐプロ”である。学生時代から社会人になった現在も、その理想は変わらない。自ら実験して取得・蓄積したデータをインフォマティクスで解析する、“ウェット×ドライの二刀流”として製薬企業に入社した経験と、現在に至るまでのキャリアパスを若手研究者、特に修士・博士学生に向けて紹介し、「若手研究者のこれからの活躍の場」に関する話題を提供する。

広い学問領域を取り入れ、総合的に新たな問題解決にアプローチする生物学との出会いは、自身のキャリアパスにおいて大きなターニングポイントである。将来への期待と不安が入り混じっていた学生生活において、“プロをつなぐプロ”としての生物工学者の姿は道標であり、憧れであった。生物工学学生優秀賞（飛翔賞）の受賞をきっかけに強く抱いてきた思いは、現在の私の原点であり、大きな原動力となっている。

「創業」は様々なバックグラウンドを持つ研究者の共同作業である。創業の現場は、複数の研究を理解し通訳できる、まさに生物工学者が躍動する場であると考える。本講演では、“プロをつなぐプロ”を目指してきた紆余曲折を交えながら、私が考える理想のPh.D.像や目指す姿についての思いをお伝えしたい。

2A07-03 博士のひとりとして、行政の世界で仕事をしてきた経験と個人的な感想

○勝山（高橋）めぐみ
(内閣府食品安全委員会事務局)
0123abc.takahashi.xyz@gmail.com

博士課程に在学中の学生が、「自分にはどうやらアカデミアは向いていないらしい」と感じたとき、あるいは金銭的理由その他の理由によりアカデミアでは無い職に就こうと考えたとき、アカデミア以外の具体的な職業について考えること、また、そこで働いている自分の姿を思い描くことはなかなか難しい。研究室にいと、研究に関係のない職に就いた先輩方の話はなかなか入ってこないため単純に情報がないということも理由の一つではあるが、途中までは本気でアカデミアで生きていくことを考えていた学生（私を含む）にとっては、夢を諦めて別の道に進むというのはなかなか負けたような、逃げ出したような感覚もあり、積極的に情報収集するのも億劫だったりもする。とはいうものの、何もしなければ何も始まらない。今回は、アカデミア以外に就職しようと考えている博士課程の学生さんはもちろん、このままアカデミアに残るか迷っている若手研究者の皆さんにも、いま一度立ち止まり、自分の前には自分が考えている以上に広い選択肢が広がっていることを認識していただければ嬉しいと思う。私は、博士課程3年の時に国家公務員試験（総合職）に合格し、満期修了の後、農林水産省で働きながら2年間かけて論文を書き、学位を取得した。働き始めてから現在まで6年半、国家公務員として行政の世界で働いている。行政の仕事というのは、簡単に言えば法律に基づいて世の中の具体的なルールを決めることで、特に中央官庁では、法律の改正などにも携わる。省庁によよるとは思うが、私が身を置いていた食品安全行政の世界では、科学的な知見に基づいて方針が決定されることも多く、理系的な考え方ができる人は必要とされていると感じる。とはいえ、博士号を持っていることのメリットはなかなかあるかと聞かれると、実のところ特になくとも思う。働き始めてから今までで、私が博士であることを実感したのは、「博士（理学）」と書かれた名刺を差し出す時と、国際会合の出席者名簿の肩書に「Dr.」と入っているのを見たときだけだ。博士にしかできない仕事があるということは全くない。給料も特に上がったりはしない。

これ以降は特に個人的な感想になるが、博士であるメリットというのは、外から受ける待遇などではなく、自分の個性の一つとして、「研究に取り組んだ経験がある」「博士号取得をやり遂げたという自信がある」ということに尽きるのではないかと考えている。公務員に限らず、仕事において、また、日々生活の中でいろいろな困難や障害に出会ってしまうものだ。そんなとき、「研究をやり遂げた」という成功体験は、苦しい状態の中で自分を支える軸になるものであるし、転職などで新しい環境に移るための原動力になるものではないかと思う。アカデミア以外の職に就く人だけではなく、アカデミアで働いている人も当てはまると思うが、博士課程までの研究で身に付けた技術・知識だけでなく、ずっと生きていけることはまずない。常に新しいことを学んでいかないといけないし、ずっと努力は続けていかなくてはならない。博士課程まで進学している、どうしても「博士であることを生かせる職に就きたい」と考えてしまいがちではあるが、博士課程で学んだことは、必ず自分の一部になり、その後の人生で何らかの形で生かされると思うので、『博士である自分』には捕らわれず、一つの個性を得たのだと考え、仕事を含めた今後の生き方を考えてみるといいのかなと思う。

後回しになってしまったが、参考までに私がこの仕事を続けている理由をお伝えしておこうと思う。まず、農林水産行政の中でも食品安全という科学的な視点を重要とされる分野に配置されたということ（個人的に興味があり、勉強するのも楽しい）。短期（2～3年）で異動があり、新しい仕事ができるという点（飽きっぽい性格なので）。そしてなんとといっても公務員、基本的には終身雇用、大きな問題さえ起こさなければずっと働けるといっても大きな魅力である（任期付きの職で必死に働くのも否定しないが、私には合わないと思った）。これらの点は、私にとってはメリットではあるものの、もしかしたらデメリットと感じる人もいるかもしれないし、また、すべての公務員に当てはまる内容というわけでもない、就職先を探している人は注意深く情報収集していただきたい。

最後に蛇足ではあるが、国際関係の仕事をする際、博士の肩書が重視されることはお伝えしておきたい。今のところ私もまだ若手の部類なので国際会合に出席する機会はほとんどないが、国際会合に出席している海外の代表者を見ると、やはりドクターが多かったように思う。今後の私のキャリア次第であるが、将来、国際関係のポストに就いたときに、博士を持っていてよかったと思う未来があるような気もしている。

Career path in a pharmaceutical company

○Hiroto Sasaki
(SHIONOGI & CO., LTD.)

Key words career paths, bioinformatics

As one of the PhD's, my experience working as an administrative officer and my personal opinion

○Megumi Katsuyama-Takahashi
(Cabinet Office, Food Safety Commission Secretariat)

Key words career path

2A07-04 ダブルメジャー、トリプルメジャーを目指そう！女性研究者のDXの活用の仕方

○向田 志保^{1,2}

(¹三井化学,²信州大・工)

Shiho.Mukaida@mitsuichemicals.com

昨今、AI 人材の不足が叫ばれ、獲りあひになっている。ところが、テクノロジーの進歩も相まって、ノーコード、ローコードといった AI ツールの導入が進み、AI の民主化が進んでいる。今は人材が枯渇しているように見えるが、機械学習をメインとする AI やプログラミングができればよいかというと、それだけでは生き残れないようにも思う。その分野で頂点を極めるには、資質なども大いに問われてくるからだ。ところが、生物×AI、化学×AI、強いては、生物×化学×AI ではどうか。ベン図を想定すると、積集合はどんどん小さくなるのが容易に想像できる。その中では戦えるフィールドがあるかもしれない。ベン図の“門”をどんどん増やしていけば、“オンリーワン”になれる可能性が高まるのである。一昔前と異なり、今は分野融合型の人材のニーズが高まっている。もちろん専門性が高いに越したことはないが、垣根を少しでも越えようと、さっぱり分かりませんが、と済ませることが難しくなっているのではないかと。殊に、DX・AI 領域に関してはその傾向が強い。中学・高校でもデータサイエンスの必修化が進み、誰もが当たり前の領域となりつつある。彼らが社会人になった時に、履修していない世代は置いてけぼりを食らってしまう可能性もある。私自身、数学科出身で、たまたま DX 関連の仕事に関わることができた。特に女性は、DX 技術を習得することでライフキャリア、ワークライフバランスといった視点からも恩恵を受けることができるのではないかと感じている。もちろん専門性が高く、より多くの方に、今までのご専門に加え、DX 技能も合わせて取り組んでいただければと願っている。そして、多方面で専門性を磨いていくことで、ダブルメジャー、トリプルメジャーといったようにオリジナリティを発揮したキャリア形成を構築していくのも面白いのではないかと感じている。

これまで、よく変わっていますね、と言われた自身のキャリアがコンプレックスであったが、逆に強みに活かされた経緯として、拙文をご紹介したい。修士まで情報科学を専攻し、バイオインフォマティクスをかじった。当時は、数学と生物の隔たりが大きく、川岸の向こう側にある生物分野に興味をもち、博士からは生物工学のウェット実験にどっぷりつかることになった。人生で初めてピペットマンを握り、培養プレート作り、白金耳による大腸菌の植菌、PCR、遺伝子組換え実験などを行った。個人ブレイクの要素が強い数学からチームワーク形成が重視される生物実験分野へ。文化や人の特性もまるで異なり、戸惑いだらけであった。当初は何故この分野に？と変人扱いされたが、それこそ脇目も振らず昼夜実験に没頭し、周囲の協力を得て、何とか無事に3年で学位を取得できた。その後、しばらく生物方面でキャリアを構築することになった。しかし、自分の中では、数学も生物もどちらも中途半端に感じ、真に専門性の高い方と関わると、自身の至らなさを嘆くことが多かった。ところが、その後、原点復帰してバイオインフォマティクス、データサイエンスという職に関わり、これまでの経験が何一つ無駄ではなかったことを感じた。2017年に三井化学に入社後はマテリアルズ・インフォマティクスやバイオインフォマティクスに関わる機会を得た。それまでに実験の経験がなかったら、まったく現場のイメージが湧かず、解析に困難をきたしていたであろう。例えば俄かであっても、データサイエンスをする際には、引き出しが多ければ多い方が、色々な問題に対応できてよいと感じている。さらに、修士在籍時より、数学の高校教員を担ったこともあり、人材教育の場では、大いに役立っている。コロナ禍では、全世界的にテレワークの導入が進んだ。多分に漏れず、データサイエンティストの業務形態はテレワークに適している。特に私は、母親として、テレワークの恩恵を最大限にあずかることができた。それまでは、仕事の帰りが遅かったり、出張が重なったりすると、子供に寂しい思いをさせているのでは、と罪悪感を覚えることがあったが、テレワークが中心となり、多少は緩和することができた。入社した際にも、よほどの緊急の解析依頼が来ない限りは、自身で調整してジョブを投げ、定時に帰ることもできる（社内の解析依頼ということで、顧客対応とは異なるので、この辺りも融通が利きやすかったのかもしれない）。最近では、小さいお子さんをお持ちのお母さんに、データサイエンティストやプログラマーとしてセカンドキャリアを築きたい、というご相談を受けることがある。その多くは食わず嫌いで、「私にできるのでしょうか」「数学が苦手です」といった点からやってみようものの二の足を踏んでいる。そこで、是非やってみましょう、何でも挑戦してみよう！とお答えしている。年齢は関係なく、やりたいたった時からキャリア構築のチャンスである。散漫になってしまふ、という危険性もなくはないが、様々な分野の「橋を架ける仕事」に関わっていくのもこれからは重要な要素ではないかと考えている。

Let's aim for double and triple major! Making way for more female researchers in digital transformation

○Shiho Mukaida^{1,2}

(¹Mitsui Chemicals, Inc., ²Eng. Fac. Eng., Shinshu Univ.)

Key words digital transformation, career, female researcher

2A07-05 科学・技術と政策をつなぐキャリアの探索～シンクタンク研究員の事例紹介～

○仲嶋 翼

(三菱UFJリサーチ&コンサルティング)

tsubasa.nakajima@murc.jp

本発表では、若手研究者の活躍の場として、民間シンクタンク研究員の立場からキャリアについて紹介をさせていただきます。

シンクタンクとは、社会課題や政策課題について調査・研究・発信活動を行う機関である。民間企業としてのシンクタンクの場合は、官公庁を主な顧客として、受託調査や施策の実行支援、政策提言等を行うことが業務の中心となる。加えて、民間企業向けのコンサルティングや情報発信等も行っている。当社は、三菱UFJフィナンシャルグループのシンクタンク・コンサルティングファームとして、政策研究・提言、マクロ経済調査、コンサルティング、セミナー等を通じた人材育成支援などのサービスを行っている。当社では政策研究事業本部がシンクタンク（リサーチ）部門に当たり、発表者は当本部の環境エネルギーユニット地球環境部に所属している。本事業本部では所属する研究員が自ら調査研究テーマを設定することができ、独自の専門性を高めていくことができるのが特徴となっている。発表者は、生物工学分野で博士の学位を取得したのち当社に入社し、現在、バイオプラスチックをはじめとするプラスチック資源循環、バイオテクノロジー（主に微生物によるものづくり分野）等の分野で調査研究業務に従事している。個人として意識している点は技術と社会の接合であり、技術面及び政策面を両方理解しているからこそその課題発見・課題解決力を発揮することを目指している。以下、その内容について説明する。

新技術が社会に実装される際、社会側では新たな制度設計や既存制度との整合等の課題が生じ、その公共性が高い場合は政府による政策的な対応が求められる。例えばバイオプラスチック分野については、植物等の再生可能原料をもとにつくられるバイオマスプラスチックや微生物等により分解される生分解性プラスチックの開発及び社会導入が盛んに進められているところだが、その普及にあたっては以下のような課題が挙げられる。

- ・どのようなバイオマスプラスチックによりどの程度の温室効果ガス（GHG）排出量が削減されるのか。
- ・マスマス方式のバイオマスプラスチックや、CO₂から生物プロセス・化学プロセスにより製造されるプラスチックはGHG削減効果があると言えるのか。
- ・国が取りまとめる我が国のGHG排出量データにどのようにバイオマスプラスチックの効果を反映するか。
- ・バイオマスプラスチックによりGHG排出削減を達成したことを主張できる権利者は誰なのか（樹脂製造事業者/最終製品製造事業者/消費者/廃棄物処理事業者）。
- ・2050年にカーボンニュートラル社会を実現するためにはどのくらいのバイオマスプラスチックを導入する必要があるのか、またそのために必要なバイオマスを持続可能な様式で調達するにはどのような点に考慮する必要があるのか。
- ・バイオプラスチックが製品に使用された際、既存のプラスチックリサイクルシステムを阻害しないか。
- ・バイオプラスチックにも様々な素材があるが、素材の特性を活かしてそれぞれどのような用途に用いることが望ましいのか。
- ・肥料を製造する際に生分解性プラスチックが使用される場合に、肥料法上の異物にあたるのか。

以上のような課題はその公共性から政策的に対応する必要があり、政策形成にあたって適切な知見をもった専門家の支援が重要と考える。そこで発表者は、このような課題に対して、技術的な内容も理解した上で、現在及び将来の社会的課題を特定してその解決に向けて取り組むことを業務にしている。調査活動のなかでは、国内外の政策動向や民間企業の取組動向に加え、学術論文から直近の研究開発動向なども確認し、適切な政策形成がなされるように官公庁の政策担当者の支援を行っている。

以上は、上流（技術開発）から下流（社会実装）に向けた流れであるが、その逆の流れも志向していきたい。すなわち、現在及び将来の社会的な課題から、さらなる技術課題を特定し、研究者や企業の皆様とともに技術開発に取り組んでいくという流れである。各分野には様々な優れた専門家がいて、発表者が信じているのは、ひとりの頭のなかには技術・法制度・社会環境等の情報をストックし整理していくことが、新しい構想を生み出す力になるということである。このように、技術開発から社会実装までの流れを回遊して、本分野の技術的・社会的な課題解決につなげ、より環境に調和したバイオエコノミー社会の実現に貢献することを目指している。

民間シンクタンクの一研究員の立場から、生物工学分野の研究経験を活かしたキャリアパスの探索例を紹介した。技術開発と社会課題解決の両面に積極的に関わっていくという新しいモデルを目指している最中である。自分自身でも試行錯誤している段階であるが、このような世界があることが参考になれば幸いです。

Exploring a career connecting science, technology and policy: the case of a think tank researcher

○Tsubasa Nakajima

(Mitsubishi UFJ Research and Consulting)

Key words career, policy

2A07-06 公的研究機関での研究系キャリアパス紹介～大学と研究所の違いって？～

○千葉 洋子
(理研・環境資源)
yoko.chiba.ey@riken.jp

私は博士課程終了後、3つの公的研究所で研究してきました。まず、筑波大学のいわゆる特任助教（科研費での雇用、任期付き）として雇用され、扱う生物が寄生虫だったため、ほぼ毎日国立感染症研究所で実験しました。その後ポストドクとして国立研究開発法人海洋研究開発機構（JAMSTEC）に異動しました（当時国際ポストドクトラル研究員、現 JAMSTEC Young Research Fellow という名前のポジション）。現在は国立研究開発法人理化学研究所で上級研究員として働いています。大学と同じアカデミックな組織でありながら、大学にいるとちょっとイメージがつかみにくい・・・かもしれない公的研究機関での研究系キャリアパスについて、私の体験をご紹介します。

2C06-01 研究成果の社会実装を進める知識製造

○井上 浄
(株式会社リバネス)
ikkan@lne.st

近年、科学技術が急速に発展する一方で、研究者と市民間の知識格差は広がっています。最先端の科学技術が社会に根付き、豊かな生活をもたらすためには、研究現場から社会への「橋渡し」が必要です。産業界においても、研究開発から生まれた製品の魅力を市場に的確に伝えるためには、専門性の高いコミュニケーション力が必要となります。同じことは、新規事業を生むために異分野の技術シーズを発掘し、それを育成していく場合にも当てはまるでしょう。また、アカデミアにおいて学際的な研究を進めるときにも、あるいは学校現場での先端科学教育においても、同様のコミュニケーション力が求められます。そこで株式会社リバネスでは、先端科学に関する正しい知識を身につけ、やりとりをする対象に合わせてわかりやすく伝えることを『サイエンスブリッジコミュニケーション』と名付けて概念化するとともに、そうしたスキルを持つ人材の育成に取り組んでいます。

例えば、最先端の研究成果を子どもたちにもわかるように伝えれば、子どもたちの頭の中には新たな「知識」が生まれることとなります。また、技術シーズを探索している企業に伝えれば、知識の組み合わせによって新たな「事業」が生まれます。こうした自らの営みを、リバネスでは「知識製造業」と呼んでいます。特に大学等の研究者が持つ課題と情熱が重要であり、それは異なる分野の研究者と異なる視点で議論し、未来を語ることが新たな研究アイデアにつながることから、異分野・異業種、所属などあらゆる垣根を超えて議論し、新たな知識を生み出す場となる「超異分野学会」を開催しています。さらに、2014年からは「TECH PLANTER」と称し、研究成果の社会実装に取り組んでいます。これらの活動では、学校教育、大学、研究機関、ベンチャー、町工場、大企業など、通常は混ざり合うことのない存在が、リバネスというコミュニケーターを介して、それぞれの知識を提示し、交換し、組み合わせていきます。そうすることで、誰も見たことのない新たな知識が次々に誕生し、世界の課題を解決しているのです。

Research Career Paths at Public Research Institutes - What is the difference between universities and research institutes?

○Yoko Chiba
(CSRS, RIKENS)

Key words career path

Knowledge Manufacturing to develop science and technology and to implement the power of them to our society

○Joe Inoue
(Leave a Nest Co.,Ltd.)

Key words knowledge manufacturing

2C06-02 社会的課題コロナに対しての連携～飛沫防止フェイスシールドの迅速開発～

○山田 賢治¹, 齊藤 昌典², 白井 宏樹³
 (1)サントリーホールディングス, (2)凸版印刷, (3)理研
 Kenji_Yamada@suntory.co.jp

サントリー酒類株式会社（以下、サントリー酒類）、凸版印刷株式会社（以下、凸版印刷）および理化学研究所（以下、理研）は、飲食店における新型コロナウイルス感染症拡大防止という社会課題に対して、産学連携によって飲食の場に適したフェイスシールドの形状に関する共同研究を実施した。

新型コロナウイルス感染症においては、感染拡大防止と経済活動の両立が大きな課題となっており、特に飲食店における感染拡大防止は、日本のみならず世界においても重要な課題であった。

飲食店と共に日本の飲酒文化を創造してきたサントリー酒類は、コロナ禍においても、飲食店における飲用時品質の更なる向上など、飲食店を応援する取り組みを実施していた。そのような中、飲食の場に適した感染対策を模索する中で2020年7月、同じく感染対策に対する様々な取り組みを実施していた凸版印刷と共同でフェイスシールド開発に着手した。ところが開発を進めるに当たり、科学的検証が出来ないという課題に直面した。

当時、理研では、2021年度の共用開始を目指し開発・整備を進めるスーパーコンピュータ「富岳（ふがく）」を用いて「室内環境におけるウイルス飛沫感染の予測とその対策」についての研究開発を実施していた。その研究成果の一部を活用することによって、本フェイスシールドの飛沫防止効果に科学的検証を行うことが可能となった。

サントリー酒類と凸版印刷から提供された計算に必要な情報をもとに、理研が最適なマスクの形状による感染防止効果の科学的検証を行うという産学連携の協働体制で共同研究を進め、一方でこの成果を踏まえて凸版印刷がフェイスシールドを製作するとともに、サントリー酒類が飲食店での実証実験を行い、開発着手から5ヶ月後の2020年12月には凸版印刷による開発したフェイスシールドの設計情報のオープンデータ化、及びサントリーのグループ会社を通じた販売を開始することで社会実装を実現した。また、2021年3月には、凸版印刷により小売業向けに卸売り販売を開始した。

本講演では、今回の飲食用フェイスシールド開発に関して、協働取り組みに至った背景、開発にあたり留意したポイント、「富岳」を用いた科学的検証に関して紹介する。

Collaboration on social issues Covid-19-Development of splash-proof face shield-

○Kenji Yamada¹, Masanori Saito², Hiroki Shirai³
 (1)Suntory Holdings Ltd., (2)Toppan Inc., (3)RIKEN

Key words COVID-19, open innovation

2C06-03 「大分宇宙港」実現に向けた挑戦 宇宙規模で愛される「おんせん県おいた」を目指して

○堀 政博
 (大分県庁)
 hori-masahiro@pref.oita.lg.jp

大分県は、2020年4月に米国の小型人工衛星打ち上げ企業である、Virgin Orbit社と大分空港をアジア初の水平型宇宙港として活用することを目指す、パートナーシップを発表しました。

「宇宙港」について、馴染みのない言葉かもしれませんが、その名の通り、宇宙につながる「港」を意味しており、ロケットをその場で打ち上げる「垂直型宇宙港」と、滑走路を活用する「水平型宇宙港」の2つの種類が定義されています。米国では、連邦航空局において、ライセンス制度が設けられており、10ヶ所以上の「宇宙港」が認証されています。

Virgin Orbit社は、航空機（ボーイング747）の左翼下にロケットを吊り下げ、離陸後、空中で発射するという打ち上げサービスを展開しており、米国では、既に商業化が進められています。

(2021年1月に打ち上げ成功、以降4回連続して打ち上げ成功中)

本県は、Virgin Orbit社および同社と連携するANAホールディングス株式会社とも連携し、本プロジェクトの実現に向けて、調査、調整を進めています。また、2022年2月には、米国の宇宙企業であるSierra Space社、兼松株式会社ともパートナーシップを発表し、Sierra Space社の宇宙往還機Dream Chaserの活用検討も開始しています。これは、国際宇宙ステーションから物資を地球に持ち帰るプロジェクトであり、来年から米国で打ち上げ、着陸が開始される予定です。

こうした取組によって、大分県は、「宇宙港を通じ、アジアにおける宇宙ビジネスの中核拠点となることで、日本を含むアジアの企業や人々に、地球を超えた新たなビジネスや暮らしの選択肢を提供する」というビジョンを実現したいと考えています。

このほか、地域において、宇宙港を核としたエコシステムの創出にも取り組むこととしています。

宇宙港に直接関するサプライチェーンの構築や衛星データの活用促進、宇宙食や宇宙をキーワードとしたビジネス創出のほか、宇宙港の観覧客やビジネス客をターゲットとした観光プログラムの創出にも取り組むこととしています。

加えて、様々な科学分野と密接に関連する宇宙と教育は、相性が良く、本県では、高校生向けのSTEAM教育、英国の宇宙港を有する地域との国際交流などを進めています。今後も子どもたちが未来や地域にワクワクできるような体験ができるよう取組を進め、将来的に県内に根付いた宇宙産業を担える人材育成にもつなげたいと考えています。

以上により、宇宙を活用した持続可能な地域づくりを目指します。

Challenge for the establishment of Spaceport Oita

○Masahiro Hori
 (Oita prefectural government)

Key words spaceport

2C07-01 序章：非特異的接着性を示すバクテリオナノファイバータンパク質 AtaA

○堀 克敏
(名工大院・工)
khorii@chembio.nagoya-u.ac.jp

細胞接着は、細胞が存在するロケーションを決定し、増殖、分化、生理活性など様々な細胞機能を決定づける重要なプロセスである。細胞接着は特定の相手とのみ結合する特異的なものと、幅広い相手に結合する非特異的なものがある。動物細胞は細胞表面タンパク質であるインテグリンを介して ECM の RGD 配列に、カドヘリンや免疫グロブリンを介して他細胞の表面分子に特異的に結合する。これらの細胞接着は組織形成や免疫などにおいて重要な役割を持つ。特定の組織を形成しない微生物も「鍵と鍵穴」に例えられる生体分子同士の非特異的接着を介して宿主細胞やその ECM に特異的に結合することで感染や共生を有利に進めている。

その一方で、微生物はその生息域が自然環境全体にわたる。そのため微生物は様々な環境で優先化したり安定なコミュニティを形成したりするために、固体表面に対する非特異的な接着性も獲得している。微生物の非特異的接着も特異的な結合と同様にアドヘシンの一種が促進する。例えば *Candida albicans* の Als や *Enterobacteriaceae* の Curli、その他 pili や flagella などが微生物非特異的接着に関与することが報告されている。「鍵と鍵穴」に例えられる生体分子同士の非特異的接着と比べると、固体表面に対する水中での微生物非特異的接着機構に関する研究は少ないが、(1) 多点吸着による弱い相互作用の積算、(2) 各ドメインが異なる対象に特異的に結合、(3) やわらかい分子構造で様々な表面にフィット、などといった様式で接着しているのではないかと考えられている。

Acinetobacter 属細菌 Tol 5 は、三量体型オートトランスポートアドヘシン (TAA) ファミリータンパク質 AtaA を介して疎水性のプラスチックやポリウレタン、親水性のガラス、さらには金属など様々な非生物表面に対し高い接着性を示す。TAA のほとんどは病原性グラム陰性細菌が宿主由来の生体分子 (ECM, インテグリン, 免疫関連分子, アクチン) に接着することが報告されており、環境細菌から同定された AtaA は様々な固体表面に対し高い接着性を示す点でユニークである。TAA は細胞表面に提示される N 末端側パッセンジャードメインと、その分泌と膜アンカリングに必要な C 末端膜貫通ドメインから成り、接着機能はパッセンジャードメインが担う。AtaA は 3630 アミノ酸からなる TAA の中でも大きいタンパク質であり、そのパッセンジャードメインは多くのドメイン (N-terminal Yhead, 21 necks, five FGGs, 10 GANGs, 12 Trp-rings, 15 GINs, 10 DALLs, C-terminal Yhead, and several coiled coils) を含む。他の非特異的接着性を示すアドヘシンで議論されているように、AtaA もこれら多数のドメインを介して多点吸着により様々な表面に対する接着を達成していると推測されていた。しかし本研究で AtaA の接着部位を調べた結果、AtaA はファイバー先端の N-terminal head domain 上 (Nhead) の構造が固定されたループ領域のみで非特異かつ強力な接着を達成しており、その接着様式は上述した 3 つの微生物非特異的接着様式で説明できないことが明らかになった。そこで、Nhead と材料表面との相互作用を、分子動力学計算によりシミュレーションした。その結果、三量体を形成する Nhead は、様々な角度や配向面で接着可能であることが、自由エネルギー計算から明らかになった。

このような AtaA の接着メカニズムについての最新の知見を通して、タンパク質の材料表面に対する曖昧認識の意義について導入、本シンポジウムの趣旨を説明する。

2C07-02 バイオミネラリゼーションタンパク質の無機物吸着機能

○新垣 篤史
(農工大院・工)
arakakia@cc.tuat.ac.jp

生物は、環境中に存在する無機イオンを体内に取り込み、濃縮することで無機物を合成する。生物による無機物合成の作用はバイオミネラリゼーションと呼ばれ、その形成には特異的なタンパク質の関与が示されている。特に、無機物のサイズや形態を決定する結晶成長過程においては、タンパク質と無機物の間に直接的な相互作用が存在すると考えられているが、その詳細は現在も明らかにされていない。磁性細菌は、細胞内に酸化鉄 (Fe_3O_4) から成る磁気微粒子を合成し、磁場に応答する性質を持つ細菌である。磁性細菌が合成する磁気微粒子の形態は、球状、柱状、弾丸状など多様であり、細菌の種類によって定まっている。磁気微粒子のサイズや形態は粒子の磁気的な性質に大きく影響することから、磁性材料の開発分野においてこの制御機構が興味を持たれている。演者らは、球状の磁気微粒子を合成するモデル磁性細菌株 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株の磁気微粒子表面のプロテオーム解析を行う中で、共通のアミノ酸配列を有する複数の新規タンパク質の存在を見出し、Mms タンパク質と命名した。その遺伝子を欠損した株においては、野生株とは異なる形態やサイズの磁気微粒子の合成が確認されている。したがって、Mms タンパク質は結晶の表面に局在しながら、何かしらの相互作用によって、磁気微粒子の結晶成長に関与していることが考えられた。そこで、大腸菌を用いて調製した Mms タンパク質と、人工合成した酸化鉄粒子を用いて水溶液中における吸着アッセイを行ったところ、Mms タンパク質が酸化鉄粒子に高い吸着能を有することがわかった。さらに、 TiO_2 や ZnO の粒子に対しても吸着することが確認され、酸化物の種類における特異性はないことが示唆された。また、複数の Mms タンパク質の吸着の比較解析から、親水性領域に存在する酸性アミノ酸側鎖末端のカルボキシル基と、酸化物表面の正電荷との静電的相互作用が吸着に大きく寄与していることが考えられた。ここで見出された酸化物結晶への吸着能は、無機材料合成における形態制御剤としての利用の他、結晶表面への生体分子の固定化、タンパク質等の精製用タグとしての利用が考えられる。

Introduction: Bacterionanofiber protein AtaA exhibiting nonspecific adhesiveness

○Katsutoshi Hori
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Technol.)

Key words protein, adhesion, nonspecific interaction, ambiguity

Adsorption function of biomineralization protein with inorganic materials

○Atsushi Arakaki
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words protein, biomineralization

2C07-03 不凍タンパク質とは何か？

○津田 栄
(東大院新領域)
s-tsuda@edu.k.u-tokyo.ac.jp

不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP) は、1969年に米国イリノイ大学の Arthur DeVries 教授が南極魚類の血液から発見した凍結保護物質の1つである。日本国内の動植物に関する AFP の研究は主として 2000年に以降に行われ、それらの分子機能と応用技術に関する多くの成果が発表されてきた。日本産魚類を原材料とする AFP の大量生産技術も開発され、現在国内企業1社がこれを試薬として販売している。「不凍」という言葉から、AFP の水溶液がグリセリン液のような不凍性を示すと誤解されることが多いが、そうしたものと AFP の不凍機能は全く異なる。そのような誤解を防ぐ為に AFP を氷結晶結合蛋白質 (Ice-binding protein, IBP) と呼んで区別するケースも増えてきた。本講演では「AFP とは何か？」を知るために、(1) 水は如何にして氷になるのか？ (2) AFP は氷に対してどう働くのか？に関する最新の研究成果を紹介する。(1) を調べる方法の1つは、温度可変ステージを備えた顕微鏡を使った水凍結現象の観察である。ステージ上に置いた水滴の温度を過冷却温度域 (0°C以下) に下げて行くと、しばらくは水中に何も変化が起きているように見えない。しかし、凍結の瞬間に無数のツブ状のもの、即ち単結晶氷が発生する様子が写し出される (Sci. Rep., (2019), 9, 2212)。つまり、我々が普段目にする氷は無数の単結晶氷の融合物 (多結晶氷) である。個々の単結晶氷は周囲の水分子を吸着して成長し多結晶のサイズを大きくする。0°C以下さえ維持されていれば、多結晶氷は1つの星を覆い尽くすまで大きく成長する。水分子以外の物質が存在しているとき、水が細胞や組織の中にあるときに多結晶氷がどのように変化するかを知ることが、AFP の機能を理解する重要な手がかりになる。(2) には氷の物理学と構造生物学が特に重要な情報を提供してきた。すなわち AFP の分子表面には、規則的に配列した結合水が存在する。例えば昆虫 AFP の表面にある結合水は、単結晶氷を構成する水分子と同じ空間配置をとることが明らかになっている (Int. J. Mol. Sci., (2022), 22, 3637)。即ち、AFP は表面に小さな氷をまとったタンパク質である。この氷が単結晶の表面に接触した瞬間に AFP は単結晶氷に対して強く特異的に結合し、動植物の体内に多結晶氷が形成することを防げると考えられている。この酵素基質反応に例えられる AFP の単結晶氷結合メカニズムが、AFP の不凍機能の本質と言える。こうした AFP 機能に関する推察に加えて、日本産動植物由来の AFP について下記のような知見が得られている。(A) 日本国内に生息する魚類、昆虫、植物、菌類のなかに AFP を有するものが数多く存在する (Adv. Exp. Med. Biol., (2018), 1081, 321)。特に、北海道石狩平野の牧草地等に生息する担子菌類チフラ・イシカリエンシスが分泌する菌類 AFP は極めて不規則な β ラせん構造を形成しているにも関わらず、強く単結晶氷に結合してその成長を抑制する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2012), 109, 9360)。この β ラせん型 AFP は、近年世界各地のバクテリアや珪藻に含まれていることが近年明らかになっている。(B) 昆虫 AFP のみならず魚類 AFP の分子表面にも氷と良く似た水分子のネットワークが形成されている。これは 5 角形に配置した水分子群で構成されるもので、水分子ネットワークが氷の成長界面を形成する不規則な水分子群と混ざり合うことで、AFP は瞬時に氷結晶面に結合できると推察される (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2018), 115, 5456)。(C) AFP の天然物は複数のアイソフォームの混合物だが、日本産動植物由来の AFP と極地生物由来の AFP では、アイソフォームの数やアミノ酸配列が大きく異なる。(D) ある種の菌類はバクテリアからの水平伝播によって AFP を獲得したと考えられる (FEBS J, (2019), 286, 946)。(E) AFP は氷のみならず脂質二重膜にも結合することで非凍結状態で保存中の細胞の寿命を延長する (Int. J. Mol. Sci., (2021), 22, 12680)。(F) ウシ黒毛和種の受精卵は AFP を含む細胞保存液に浸すことで +4°C で 10 日間生き続けられる (Sci. Rep., (2013), 3, 1)。(G) AFP とセラミックス粉を含ませた寒天ゲルを凍結後に焼結することで高気孔率セラミックス多孔体を製造できる (J. Am. Ceram. Soc., (2013), 96, 1029)。(H) AFP を体内に発現するように改変した線虫は凍結耐性を有する (Sci. Rep., (2019), 9, 6246)。分子生物学から計算機シミュレーションまでの広範な科学技術を使った AFP の機能解明は、それが生体内にあるときの機能と、生体外に取り出したときの機能を浮き彫りにする。柔軟な発想に基づく新たな研究の切り口が、AFP の素性を一層明らかにしていくに違いない。

What is antifreeze protein?

○Sakae Tsuda
(Faculty of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

Key words antifreeze protein, cold-survival, ice-binding, structural analysis

2C07-04 変性タンパク質工学から見てきた天然変性タンパク質の姿

○二見 淳一郎
(岡山大院・統合科学)
futamij@okayama-u.ac.jp

【背景：変性タンパク質の可溶化技術】

大腸菌を宿主としたヒトタンパク質の生産系は、しばしば不溶性のインクルージョンボディ (IB) として発現するため多くの研究者を悩ませてきた。この課題に対して、可溶化を促進するタグの活用や低温での発現、分子シャペロンとの共発現等の様々な提案がなされてきている。一方で IB は過剰発現をしやすく、プロテアーゼによる分解抑制にも有利であり、用途によっては利用価値が高い。我々は IB 中のタンパク質を高度に利用する各種の技術開発に取り組んでいるが、そのコアとなる技術が可溶化技術である。IB を高濃度の変性剤中で溶解した後、Cys 残基特異的に正電荷を付与する S-カチオン化技術を活用することで変性状態のタンパク質に高い水溶性を付与することができる。この際、可逆的な SS 結合を介して調製すると、変性状態での高純度精製、試験管内および細胞内での活性構造への巻き戻しが可能である。さらにこの技術は以下に紹介する自己抗体測定パネルの高精度化に非常に貢献している。本講演では変性状態のタンパク質を取り扱う技術の中から見てきた天然変性タンパク質の特徴と、工学的な応用例についてご紹介したい。

【免疫状態をプロファイリング・モニタリングする自己抗体測定パネル】

免疫系は常に自己と非自己を識別して個体の恒常性を維持しているが、本来は排除すべき異常な細胞を排除できなくなると「発がん」し、守るべき自己細胞を誤って攻撃して「自己免疫疾患」となる。いずれも「免疫系とがん細胞」との長い戦いの末、または「免疫系と自己抗原」との長い相互作用を経て発症する。この免疫応答をリアルタイムに評価して、免疫が関わる各種の疾患を早期に発見し、適切な治療法の選択をサポートするツールがぜひとも必要である。臨床検体を用いた解析から、がんや自己免疫疾患の患者の末梢血中には様々な自己抗体が存在することが判明している。これらの自己抗体は未病の段階からも検出されることから「免疫監視履歴」と「活動度」を反映するバイオマーカーとして注目されている。自己抗体の出現パターンの個人差は大きく、免疫状態の評価にはある程度の網羅性が必要である。我々は cancer-testis(CT)抗原をはじめとした多種多様な自己抗原を生産しているが、大半の自己抗原が天然変性タンパク質であり、取り扱いには様々な工夫が必要であった。組換えタンパク質として発現させた CT 抗原は凝集しやすいが S-カチオン化法による可溶化技術との相性が良く、高純度に水溶性・全長自己抗原が調製できる体制が整った。こうして整備された自己抗体測定アレイで臨床検体を評価すると、自己抗体の変動率は微小でも臨床効果との相関がある例が多く観察された。この臨床情報を有効活用するためには、網羅的な自己抗体の測定精度を保証できるバリレーション系の整備が必要である。現在、これらの技術的課題をほぼクリアしたプラットフォームを完成しており、免疫が関わる各種の疾患における個別化医療を実現するためのツールとして実用化を進めている。

【天然変性タンパク質の調製と利用に関する考察】

CT 抗原の大半は天然変性タンパク質であるがヒト細胞内で強制発現すると凝集塊を形成する。もともとが精製に局限した発現を示すタンパク質群であるため、相互作用パートナーが揃わない異所性発現の状況では活性構造の複合体を形成できずに凝集した可能性が高い。これらの CT 抗原を大腸菌で発現させると、大半が IB を形成するが、凝集性が緩く、分解を伴うものも多い。天然変性タンパク質は低複雑性配列が多く、凝集と分解が起こりやすい物性といえる。この物性はがん抗原だけではなく、自己抗原にも共通する傾向の様である。ヒトのタンパク質は本来、免疫寛容によりヒトでは抗原性を示さないはずであるが一部のタンパク質が抗原性を示す。この理由がタンパク質の物性と大きく相関している可能性がある。また、天然変性タンパク質は一般に疎水基が少ない傾向にあり、核酸などのイオン性の夾雑物が存在しない純水中では高い水溶性を示すことがある。この特性を活用した変性タンパク質工学についてもご紹介したい。

Properties of intrinsically disordered proteins revealed by denatured protein engineering

○Junichiro Futami
(Grad. Sch. ISEHS., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, chemical modification, inclusion body, IgG

2C07-05 総括と将来展望：秩序と無秩序の間の「曖昧さ」

○高木 昌宏
(北陸先端大・マテリアル)
takagi@jaist.ac.jp

混沌（カオス）と秩序は相反する言葉であると思われがちだが、実は、決定論的システムにおいて起こる確率論的振る舞いであるカオスの持つダイナミックな性質が、秩序形成の根源なのである事は、意外に知られていない。最近注目されているデータサイエンスや AI も、「カオスの中から秩序を見出すアプローチ」であると考えられる。生命現象に目を向けると、その最大の特徴は「階層性」と「秩序性」である。分子、細胞、組織、個体、生態系、コミュニティ、社会などの階層性、その背景にある発生・進化過程などの階層性と秩序性を理解するには、カオスから秩序を生み出す非線形性に注目する必要がある。

物理学が物質の根源に迫った結果、量子力学が発達し、自然界を決定論的（粒子）にも確率論的（波動）にも（あるいは、その組み合わせによって）理解できるようになったのと同じく、生物学も 20 世紀後半から目まぐるしく進んだ分子、原子レベルでの生命現象の理解（決定論的線形性）から、量子レベルの理解（確率論的非線形性）に移行して、秩序形成の本質を解明・利用しなければならぬ。生物といえども、それを構成するのは、物質であるからには、物質の神秘と生命の神秘には、共通性があるはずである。

これらの考え方に基づいて、「曖昧さ」の持つ不思議さと魅力について、講演者の内容を踏まえて総括したいと考える。

人間には二つの型があって、生命の機械論が実証された時代がもし来たと仮定して、それで生命の神秘が消えたと思う人と、物質の神秘が増したと考える人がある。そして科学の仕上げ仕事は前者の人によってもできるであろうが、本当に新しい科学の分野を開く人は後者の型ではなかろうか。（「簪（かんざし）を挿した蛇」中谷宇吉郎）

Summary and future prospects: "Ambiguity" between order and disorder

○Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words evolution, functional property

2E06-01 パターン認識を活用した超分子化学センシング

○南 豪
(東大・生研)
tminami@iis.u-tokyo.ac.jp

誰でも・どこでも・簡便に化学情報を可視化するセンサの普及は、環境分析、食品管理のみならず日常的な健康維持に貢献し得る。ユビキタスな化学センサの実現は、化学情報を簡便に取得し、その膨大な情報を処理する技術開発に委ねられている。しかし、化学情報を可視化する超分子センサの具現化は、未だ萌芽段階にある。例えば、ワイン、日本酒などの利き酒ですら、自前の化学センサである味覚・嗅覚によって認識した後、経験則に従ってそれらの風味を判断している。これは、多元混合化学情報を定量的に取得する仕組みと取得情報を解析する技術を搭載した超分子センサのシステムが、未だに社会実装されていないことに起因する。本課題に対して登壇者は、超分子材料を実装した小型センサデバイスとパターン認識を組み合わせた超分子センシングシステムを提案し、実サンプル分析への実現可能性を証明してきた。¹⁾²⁾

超分子センサは、「化学種認識部位（レセプター）」と「情報変換部位（レポーター）」から構成される分子レベルのセンサであり、認識部位で標的の化学種が捕捉されると、その化学情報はトランスデューサを介して、光学応答や電気的応答として我々が可視化できるレベルまで増幅される。とりわけ人工分子認識材料で作製される超分子センサデバイスは、緩やかな選択性（=交差応答性）を示すことから、多成分の標的種を同時に捕捉する化学センサの基盤となり得る。これは、天然の分子認識機構の一つである嗅覚系で行われている多成分の識別に着目したアプローチである。さらに、当該センサにパターン認識技術を導入することで、学習データに基づいて正確な多成分検出・判別を可能とする強力な分析システムが確立される。上述のように、超分子化学センサを多変量解析へと展開する取り組みは、超分子材料に分析ツールとしての機能拡張をもたらした一方で、超分子化学の概念提唱からおおよそ半世紀経過した現在でも、当該材料の社会実装の実現には課題を残したままである。

そこで登壇者は、オンサイトで使用可能な超分子センサの具現化に向けて、大きく分けて 2 種のデバイス開発に注力している。1 つ目に選定したセンサプラットフォームは、光学応答を活用したケモセンサアレイである。アレイ状に並んだケモセンサ（分子サイズの超分子センサ）は、標的種の添加に伴って色とりどりの指紋応答パターンを示すため、パターン学習を用いた解析によって、多成分の同時定性・定量分析を可能とする分析ツールとなる。固相基板上に当該アレイを並べることで、大型の分光器を用いなくとも小型の撮影装置によって、化学情報を画像として取得することができるため、オンサイト分析用化学センサシステムを実現するための有効的アプローチとなる。³⁾ とりわけ登壇者は、どこでも安価に手に入る紙基板を用いて、誰もが簡便に作製できるセンサデバイスを目指しており、その具体的アプローチとして、市販のオフィスプリンターによって作製される印刷型ケモセンサアレイデバイスを提案している。³⁾

2 つ目のセンサデバイスとして、登壇者は有機トランジスタを活用した電気的応答に基づく化学センシングを提案している。本デバイスの特性は、構成部材（有機半導体層、絶縁体層、電極）の協奏的な相互作用によって決定づけられるため、分子が集合することで機能発現する当該デバイスを「超分子デバイス」と名付けることができる。²⁾ これまでに、本デバイスの電極なし有機半導体の界面に適切に分子認識材料を導入した有機トランジスタ型センサを開発しており、固液界面での多成分検出を達成している。⁴⁾ 当日の発表では、超分子センサの設計ならびにデバイス化への指針、当該センサを用いた実サンプル分析に関する取り組みについて報告する。

1) Review see: T. Minami et al., *Coord. Chem. Rev.* 2021, 429, 213607.

2) Review see: T. Minami et al., *ACS Sens.* 2019, 4, 2571.

3) For example, see: T. Minami et al., *Anal. Chem.* 2021, 93, 1179.

4) For example, see: T. Minami et al., *J. Mater. Chem. C* 2021, 9, 11690.

Supramolecular chemical sensing utilizing pattern recognition

○Tsuyoshi Minami
(IIS, Univ. Tokyo)

Key words supramolecular sensor, chemical sensing, pattern recognition, real-sample analysis

2E06-02 Chemical tongue: 味覚の模倣によって試料の特徴を捉えるバイオ分析ツール

○富田 峻介
(産総研・健康医工学)
s.tomita@aist.go.jp

ヒトは、わずかな種類の味細胞で膨大な種類の食物を味わい、識別することができる。この機能の中核をなすのは、特定のクラスに属する化学物質群を広く感知できる味細胞の働きと、味細胞によって生じた食物固有の「応答パターン」を過去の食経験と照合することで食物を同定する脳の働きにある。我々は、こうした動作機構に着目して、味覚を模倣したバイオ試料認識技術「chemical tongue」の開発を推進してきた¹。典型的な chemical tongue は、多様な構造の蛍光ポリマーの溶液を配置したアレイである。このアレイに試料を加えると、各ポリマーが様々な強さで試料中の成分と相互作用し、その結果、試料の個性を反映した「蛍光応答パターン」が出力される。このパターンを、脳の代わりに多変量解析や機械学習によって処理することで、試料を正確に分類・識別できる。chemical tongue は、味覚と同様に、対象の試料がどんな組成なのか未知であっても、応答パターンが得られさえすれば、試料を比較分析できるという特長をもつ。本講演では、chemical tongue のための材料開発と、構築した chemical tongue による種々の複雑性バイオ試料評価に関する最近の成果を紹介したい。

ポリマーの設計：これまでに様々なポリマー材料が、chemical tongue の構築に利用できることを報告してきた^{2,3}。なかでもポリリジンは、そのカチオン性と疎水性のために、タンパク質や細胞と強く相互作用できるため、応答パターンの取得に適した材料骨格である。このポリリジンに対して、(i) 周辺環境の情報を蛍光に変換するための出力ユニット、さらに、(ii) 相互作用能を多様化するための認識ユニットを導入することで、chemical tongue を構築するためのポリマーセッパを作製した。これらを用いることにより、タンパク質や細胞固有の蛍光応答パターンを取得することができ、試料を高精度に識別できることを見出した^{4,6}。

複雑性バイオ試料への適用：chemical tongue に試料を加えたときに出力される応答には、生じた相互作用の総和が反映される。つまり、本手法は試料の「組成」に関する情報を出力できる。この点に着目し、これまでに我々は、血清²や劣化した治療用抗体⁷、培養細胞の分泌成分⁸⁻¹¹など、様々な複雑性バイオ試料に chemical tongue を適用してきた。ここでは、細菌の集合である細菌叢の評価に利用した例を紹介する¹²。

近年、ヒトの腸内に生息する細菌叢が疾患と深く関わっており、その組成の改善によってがんの治療や生活習慣病の改善などに繋がる可能性が明らかになりつつある¹³。我々は、こうした細菌叢の特徴を簡易に認識可能な chemical tongue を開発することを目的に、ポリエチレングリコールとポリリジンが連結したポリマーを骨格とした、12種類の蛍光ポリマー群を合成した。ここでは認識ユニットとして、荷電性や疎水性が異なる多様な構造の官能基を、出力ユニットには、細菌と結合すると蛍光を発する凝集誘起発光性の蛍光色素を導入した。合成した蛍光ポリマー群によって chemical tongue を構築し、正常マウスと睡眠障害モデルマウスから採取した腸内細菌叢を分析することで、マウスの健康状態を判定できるかどうかを調査した。その結果、正常マウスと睡眠障害モデルマウスの応答パターンに差異が認められ、識別の精度を交差検証と呼ばれる方法によって評価したところ、97%の精度でマウスの健康状態が同定できることが判明した。

このように chemical tongue は、従来技術とは異なる切り口で迅速、簡便、かつ安価に試料を分析できるため、これまでは評価が困難であった複雑性バイオ試料のための新しい基盤技術になると期待される。

[1] S. Tomita, *Polym. J.*, 2022, 54, 851–862. [2] S. Tomita et al., *Anal. Chem.*, 2016, 88, 9079–9086. [3] S. Tomita et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11, 47428–47436. [4] S. Tomita et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9, 22970–22976. [5] S. Tomita et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11, 6751–6758. [6] H. Sugai et al., *ACS sensors*, 2019, 4, 827–831. [7] S. Tomita et al., *Anal. Chem.*, 2017, 89, 7818–7822. [8] S. Tomita et al., *Chem. Sci.*, 2015, 6, 5831–5836. [9] S. Tomita et al., *Anal. Chem.*, 2018, 90, 6348–6352. [10] H. Sugai et al., *Anal. Chem.*, 2020, 92, 14939–14946. [11] S. Tomita et al., *J. Mater. Chem. B*, 2022, DOI:10.1039/d2tb00606e. [12] S. Tomita et al., *Chem. Sci.*, 2022, 13, 5830–5837. [13] B. A. Helmink et al., *Nat. Med.*, 2019, 25, 377–388.

Chemical tongue: A bioanalytical tool mimicking the taste system to recognize the characteristics of bioanalytes

○Shunsuke Tomita
(Health Med. Res. Inst., AIST)

Key words protein, biosensor, poly(amino acid)

2E06-03 安定性駆動型バイオセンサの機能的可塑性

○梅野 太輔, 木村 友紀, 関 貴洋
(早大院・先進理工)
umeno@waseda.jp

バイオセンサーは、環境モニタリングや診断の重要なツールとしてのみでなく、生物ものづくりにおけるプロセス最適化や新規生成経路の探索ツールとして、その需要は高まり続けている。自然界には、おびただしい数のレセプター（受容器）と呼ばれるタンパク質群が知られているが、それを遥かに超える数の化合物を生物は生合成している。天然物は知られるだけで40万を超え、CASに登録されている分子の数は、2億に迫る勢いである。次々に生み出される（あるいは発見される）新規な分子の自然界や健康への影響を把握するために、そしてそれらのバイオ生産経路の開通と改良のためのスクリーニング系を開発するために、バイオセンサーの迅速な供給プラットフォームを確立することは、生物工学分野の飛躍における不可欠な技術課題といえる。

センサは、標的分子を選択的に捕獲する「分子認識」に加え、その標的分子の結合に伴って、その部分あるいは全体構造に読み出し可能な変化を伴う必要がある。それゆえ、吸着剤設計などにくらべて、そのデザイン負荷が高いという課題があった。我々は、この問題に、スクリーニングのスループット向上という、ある種短絡的な発想で長年にわたって挑戦してきた。様々な転写因子の進化リデザインに成功はしたものの、「あらゆる分子に対する」「任意の感度と選択性で」応答するセンサーを短期間に開発するという理想には程遠い状態である。各種ディスプレイ技術がもたらしてきたように、いまや、何かに特異的に結合するペプチド・タンパク質の開発は確立している。センサ開発における最大の問題はやはり、アロステリシティのリデザイン技術にあると考えられる。

最近我々は、標的分子の結合がもたらす安定化を読み出すかたちならば、アロステリックデザインをすることなく、バイオセンサーが構築できること、そしてそれがランダム変異によって極めて高頻度に現れ得ることを発見した。そしてこうして生まれた（改良された）バイオセンサーが、「標的結合によるフォールディング誘導」によって動作していることを確認した。ふつう、バイオセンサーの機能選抜は、標的分子あり/なしの条件でのスクリーニングスコアの比（あるいは差）に対して実施されるため、そのスループットには限界があった。本講演では、「標的分子があるとき」のセンサ出力に対する一値選択のみによって、優れたセンサ機能が簡単に生まれ得ることをお示しする。

さらに我々は、この原理で働くバイオセンサーが、驚くほど高い進化能を持つことを見出した。センサーの作動原理からアロステリシティを撤廃し、上記「安定化駆動型」のセンサに切り替えることによって、センサタンパク質は、アゴニスト（作動剤）とアンタゴニスト（拮抗剤/遮断物質）の両者に対して、区別することなく応答するようになる。これは「結合」さえすれば、それに伴う安定化が得られ、その安定化の程度（ $RT \ln K_D$ ）に従った出力を示すようになるからである。本講演では、アラビノース応答型の転写調節因子 AraC に対して我々が行った、アロステリック型・非アロステリック型の進化能比較の結果を報告する。非アロステリック型（安定性駆動型）のセンサ機能は、アロステリック型よりも遥かに高い可塑性を持つことが明らかになった。

Evolutionary design of non-allosteric biosensors

○Daisuke Umeno, Yuki Kimura, Takahiro Seki
(Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words biosensor, enzyme, mutagenesis, bacteria

2E06-04 新規蛍光プローブによるアミロイド多型認識

○座古保

(愛媛大院・理工)

zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

近年、ミスフォールディング状態のタンパク質が自己集合する事によって形成するアミロイド凝集が原因となる疾患(アミロイドーシス)が問題視されている。現在までに20種類以上の疾患において、タンパク質やペプチドのアミロイド凝集が関与する事が分かっており、これまで疾患とは無関係と考えられてきた多くのタンパク質においても、酸性・高温などの変性条件下においてアミロイド凝集を形成することが明らかとなっている。アミロイド凝集は、一般的に枝分かれのない直鎖状の外見を示し、 β シートが長軸に対して垂直に積層した構造(積層 β シート構造)を有し、チオフラビン T (Thioflavin T, ThT) やコンゴレッドなどで染色される。そのほかにも不溶性である事や細胞毒性を保持している事などが共通点としてあげられる。一方で、アミロイド凝集の構造には多様性があり、ThT では認識できないアミロイド凝集の例も報告されている[1]。それに対し近年、ThT に代わるチオフェン系新規蛍光プローブ Luminescent Conjugated Polythiophene(LCP)や Oligothiophene(LCO) を用いたアミロイド凝集の検出および評価が注目されている。例えば、LCP や LCO を用いることにより、アルツハイマー病の原因物質である、アミロイド β の様々な構造のアミロイド凝集に関して、ThT では区別できない構造の差異が認識された[1]。

インスリンは、糖尿病治療に用いられるペプチドホルモンであり、アミロイド凝集を形成することが知られている。近年、糖尿病治療患者においてインスリン製剤の皮下注射部位にアミロイド凝集による皮下腫瘍(インスリンボール)が形成されることが報告されている[2]。インスリンボールはインスリンの皮下吸収を低下させる他、周辺組織に炎症をおこすなどの問題がある。我々は、これまでにインスリンが高毒性の針状 Fibril および低毒性の麺状 Filament という、異なる毒性および構造のアミロイド凝集を形成することを見出している[3]。興味深いことに、Fibril の成長過程においてのみ液滴形成が観察され、アミロイド毒性と液滴相分離が関係していることが示唆された[4]。

これら構造が異なるインスリンアミロイドに関して、LCP、LCO による解析を行った。Filament は Fibril に比べて ThT 蛍光強度が低かったが、LCP の一種である PTAA を用いたところ、PTAA は Fibril および Filament に対して、異なる蛍光スペクトルを示した[5]。また、LCO の 1 種である pFTAA および BTD21 が、それぞれ Fibril および Filament 特異的に結合しすることが分かった[6]。これらの結果は、LCP および LCO によりアミロイド構造多型を認識できたことを示唆する。pFTAA および BTD21 を用いて、糖尿病治療に用いられるインスリン製剤を加熱したサンプルの蛍光強度を測定すると、pFTAA もしくは BTD 21 に対して強い蛍光を示した[6]。これらのサンプルにおいては、ThT では高い蛍光を示さなかったため、LCO によりアミロイド凝集および構造多型を検出できたことが示唆された。

[1] Nilsson, P. et al. ACS Chem. Biol. 2, 553 (2007)

[2] Nagase, T. et al. Lancet. 373, 184 (2009)

[3] Zako, T. et al. Biophys. J. 96, 3331 (2009)

[4] Mori, W. et al. Sci. Rep., 12, 8556 (2022)

[5] Zako, T. et al. ChemBioChem 13, 3583 (2012).

[6] Yuzu, K. et al. RSC Adv., 10, 37721 (2020)

Observation of amyloid polymorphs using luminescent conjugate fluorescent probes

○Tamotsu Zako

(Grad. Sch. Sci. Eng., Ehime Univ.)

Key words amyloid, fluorescence spectra

2E06-05 各種食中毒から生活者を守る「パトロール酵母」の開発

○上田 宏¹, 蘇九龍¹, 朱博¹, 井上 暁人¹, 大山 浩之²,森田 いずみ², 董 金華¹, 小西 良子³, 北口 哲也¹, 小林 典裕²,三宅 司郎⁴

(1)東工大・化学生命研, (2)神戸薬大・薬, (3)東農大・応生科, (4)麻布大・生命環境)

ueda@res.titech.ac.jp

【はじめに】細胞を用いたバイオセンサーは、精製タンパク質ベースのセンサーに比べて細胞を増殖させるだけで簡便安価に調製でき、さらに細胞内の信号伝達系により信号を増幅できることから高感度化が期待出来る利点がある。しかしこれまで、信号受容部位として各種受容体を用いる場合、ホストとしては動物細胞が必要とされ、その培養のためには厳密に制御された環境と高価な培地が必要であること、またその利用においても物理的に弱い細胞膜を保持して生存率を維持する必要がある問題があり、その幅広い利用は困難と考えられた。そこで本研究では、真核細胞でありながら細胞膜の外側に堅い細胞壁を持ち、頑丈で増殖も早く扱いやすい酵母を宿主細胞として用い、これに組換え抗体をベースとした検出部位を付加した新規免疫センサー「パトロール酵母」の構築を試みた。

【戦略】今回は酵母を用いたレポーター(信号増幅)系として、Split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid (mY2H) system を利用した。mY2H システムにおいては、酵母細胞膜上のタンパク質間相互作用を分割ユビキチンの再構成による活性化と人工転写因子の切断、さらに切断された人工転写因子の核移行とプロモーター部位への結合によるレポーター遺伝子の活性化を、発色あるいは蛍光・発光信号として検出する。我々は、低分子認識抗体の可変領域 (VH と VL) の抗原依存的相互作用、あるいは一本鎖抗体(scFv)の多価抗原によるクロスリンクと mY2H システムを組み合わせて、酵母を用いて各種抗原、特に食品中の有害物質依存的なレポーター酵素のシグナル生成を試みた。

【結果】mY2H システムの細胞膜外部分を抗体に変更した発現ベクター 2 種類 (pBT, pPR) をレポーター酵母 NMY51 に共導入し、形質転換酵母を各種濃度の抗原と 30°C, 16 h 共培養した。まず細胞膜上に過剰摂取による毒性が懸念されるカフェインを認識し二量体を形成する抗カフェインナノ抗体 (VHH) を発現させることで、カフェイン依存的な細胞内 β -galactosidase (β -gal) 活性の増加が認められ、各種飲料中の濃度以下のカフェインの検出に成功した。さらに免疫マウス由来の VH/VL 断片を用いて、強力な毒であるアフラトキシン B1 と M1 を食品中の検出基準以下の pM レベルの感度で検出することに成功した。また検出部として細胞膜上に腸管出血性大腸菌 O157 上の特異的抗原に対する scFv を用い、かつ培養中に酵母細胞壁を分解する Zymolyase を適量添加することで、大腸菌 O157 を特異的かつ高いシグナルで検出することに成功した。さらにレポーター酵素として、細胞内の β -gal の代わりに分泌型ウミホタル発光酵素 CLuc を用いることで、反応後の細胞を破壊せず培養液に基質を加えるだけで抗原検出が可能となった。

【結論】酵母をベースとした免疫センサー細胞「パトロール酵母」の構築に成功した。これまで抗体を酵母細胞壁に提示し分子進化などの選択に用いた例は多数あるが、特に菌体など高分子を含む抗原結合を細胞内へ信号伝達させ検出した報告はなく、今回が初めての成功例と考えられる。カフェイン、アフラトキシンさらには大腸菌 O157 の検出に成功したことから、本パトロール酵母システムは食品安全分野における新しいツールとして利用可能と考えられる。低分子から菌体まで、幅広いサイズの抗原検出が可能なる事から、今後ウイルスの簡便検出など他分野への応用も可能と期待される。

【謝辞】本研究は JST 未来社会創造事業により行われた。mY2H システムをご提供いただいた神戸大学近藤昭彦教授、石井純准教授にこの場をお借りして感謝する。

Development of "Patrol Yeasts" for saving people from various food poisonings

○Hiroshi Ueda¹, Jiurong Su¹, Bo Zhu¹, Akihito Inoue¹, Hiroyuki Oyama²,Izumi Morita², Jinhua Dong¹, Yoshiko Sugita-Konishi³, Tetsuya Kitaguchi¹,Norihiko Kobayashi², Shiro Miyake⁴

(1)CLS, Tokyo Tech, (2)Kobe Pharm. Univ., (3)Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.,

(4)Sch. Food Life Sci, Azabu Univ.)

Key words biosensor, yeast, antibody, food safety

2E07-01 ヒト iPS 細胞由来腸細胞を用いた生体模倣システムの開発

○松永 民秀
(名古屋市大・院薬)
tmatsu@phar.nagoya-cu.ac.jp

薬の経口投与は、非侵襲的かつ利便性に優れた投与経路であり、医薬品の投与方法として最も多く用いられている。経口投与された薬は、通常小腸から吸収され、門脈を経て肝臓に達する。肝臓において、一部は代謝を受けてそのまま排泄されるが、他は肝静脈を経由して全身循環血液の中に入り、作用部位に運ばれ効果を発揮する。そのため、薬の生物学的利用率は薬の効果や副作用を予測する上で非常に重要である。薬物代謝の主要な臓器である肝臓の評価は、初代肝細胞の入手が可能であり、創薬研究においても凍結肝細胞やヒト肝細胞キメラマウス由来新鮮肝細胞等が広く用いられている。一方、小腸においては初代細胞の入手が困難であることから、医薬品開発の非臨床試験における経口薬の薬物動態試験や安全性試験においては、結腸がん由来の株化細胞 Caco-2、小腸ミクロソームあるいは実験動物がこれまで用いられてきた。Caco-2 細胞は小腸の円柱上皮細胞に似た刷子縁やタイトジャンクションの形態学的特徴を示し、薬物トランスポーターも発現する単層の細胞層を形成する。しかし、主要な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) の発現が顕著に低く、トランスポーターの発現パターンも正常細胞とは大きく異なることから、正確な生物学的利用率の予測が困難である。また、ミクロソームは膜結合酵素による代謝のみで吸収の評価が出来ず、実験動物は種差が有りヒトへの外挿が困難である。一方、食品企業においては、食品成分の安全性あるいはサプリメントや保健機能食品の機能性評価において実験動物が用いられていたが、動物愛護の高まりにより動物実験を廃止する企業が拡大しており、それに代わる評価系が求められている。ヒト iPS 細胞は高い増殖性を有し、生体を構成する様々な細胞に分化誘導する能力を有する。これらの性質から、再生医療のみならず、創薬研究などへの利用が期待されている。演者らは小腸様の機能を有する腸管上皮細胞と *in vitro* 小腸組織類似体である腸管オルガノイドの簡易な作製法を確立した。これらは、Caco-2 細胞と異なり小腸を構成する様々な細胞を有し、小腸マーカータンパク質のみならず、薬物代謝酵素、薬物トランスポーターの mRNA 発現がほぼ成人小腸と同じレベルであることを明らかにしている。特に、最も主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現が Caco-2 細胞よりも顕著に高く、CYP3A4/5 活性もヒト初代小腸細胞に匹敵することから腸管毒性を示す医薬品の評価も可能であることを明らかにしている。また、ヒト iPS 細胞由来腸管オルガノイドは腸管組織と類似した三次元構造を有することから、より生体に近いモデルとして期待されている。しかし、腸管オルガノイドの多くは内腔が腸管腔側 (apical 側) であることから、薬物や食品成分等の吸収評価には向きであり、スルーブット性に欠けるのが欠点である。したがって、腸管オルガノイドの構造と機能を保持したままスルーブットスクリーニングに対応可能なモデルが期待されている。また、演者らは *in vivo* における小腸と肝臓の薬物動態を模倣するために、これら臓器連関を評価可能な MPS に着目し、循環式小腸-肝臓連結デバイスを開発した。本デバイスは、肝細胞播種部分が二次培養とスフェロイドを形成して三次元培養が行える工夫を施した。

本講演においては、ヒト iPS 細胞から小腸の性質を有する腸管上皮細胞 (ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞) 及び腸管オルガノイドの作製とその機能について紹介する。また、循環式小腸-肝臓連結デバイスの特性についても紹介する予定である。

Development of microphysiological systems using human iPS cell-derived enterocytes

○Tamihide Matsunaga
(Nagoya City Univ.)

Key words microphysiological system, human iPS cell, enterocyte

2E07-02 三次元微小血管モデルにおけるマルチスケール解析

○松永 行子
(東大・生研)
mat@iis.u-tokyo.ac.jp

直径サイズの小さい微小血管は組織の再生・修復、がんの増悪化など、生体における重要な現象に深く関与しており、細胞から組織レベルでのマルチスケールでの血管の制御機構を解析する新規評価系の必要性が高まりつつある。この解決方法として近年注目されているのが臓器チップ (OoC: organ-on-a-chip) や生体模倣システム (MPS: microphysiological system) とよばれる *in vitro* 組織モデルである。その名の通り、微小な組織構造体がスライドガラスなどのチップ上に集積されたものを指し、マイクロ加工技術により、複雑で動的な生体の微小環境、構造および機能を再現する試みがなされている。本研究では、微小血管モデルを作製し、血管機能において重要な血管新生と血管透過性を同時に評価することを試みた。

マイクロニードル法によりコラーゲンゲル内に直径 200 マイクロメートルの貫通孔を形成し、ヒト臍帯静脈内皮細胞を播種することで微小血管モデルを作製した。微小血管モデルを血管内皮増殖因子 (VEGF: Vascular endothelial growth factor) で処理し、血管新生阻害薬であるスニチニブおよびソラフェニブで処理を行い、血管新生および血管透過性について評価を行った。

微小血管モデルに VEGF を一定期間添加すると血管内皮細胞がデバイス中のコラーゲンゲル領域へ出芽し新生血管が形成され、抗血管新生薬 (ソラフェニブおよびスニチニブ) で処理すると血管新生は抑制されることを確認した。蛍光デキストラン分子 (70 kDa) を血管内へ導入することで血管透過性を評価したところ、スニチニブで処理した血管はバリア機能を有するのに対し、ソラフェニブで処理した血管ではバリア機能が充進していることを確認した。以上より、微小血管チップは、血管新生誘導因子および抑制因子に応答を示し、血管新生および血管透過性の双方を観察可能なモデルとして有用であることが実証された。本モデルは、内腔の圧力、間質の硬さなど様々なパラメータを変化することができるため、微小環境の変化に対する血管機能を評価する強力なツールとして期待できる。

Multiscale analysis of 3D microvessel model

○Yukiko Matsunaga
(IIS, UTokyo)

Key words microfluidic device, tissue engineering

2E07-03 リバースバイオエンジニアリングによる生体再構成への挑戦

○亀井 謙一郎
(京大・アイセムス)
kamei.kenichiro.7r@kyoto-u.ac.jp

我々の研究室では、生物を人工的に再現し、ボトムアップ的に生物を理解する「リバース・バイオエンジニアリング」という研究分野を切り拓くことを目指している。中でも「ボディー・オン・チップ」は、親指ほどの大きさのデバイスの中に生体組織を再現するリバース・エンジニアリングの代表的な技術であり、創薬や薬物毒性試験、更には動物実験代替法となりうる「生体外ヒトモデル」としての応用も期待されている。

このチップは細胞生物学やマイクロ・ナノ工学など学際的研究から開発され、従来の細胞培養実験では困難であった、細胞・組織が機能発現するために必要な微小環境の創出や、時空間的に厳密な薬物送液制御、組織間相互作用の再現だけでなく、ヒトの生理・病理的反応を生体外において再現・検証することが可能となる。がんの転移や抗がん剤の副作用、生活習慣病を始めとした多臓器疾患においては、組織間相互作用が疾患メカニズムを解明するために重要であり、複数組織を搭載したボディー・オン・チップがそれを解く鍵となることが期待されている。

ボディー・オン・チップの開発には、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞や iPS 細胞) も細胞倍量として重要である。近年では、再生医療等への応用展開が進んでいるが、同時に創薬などの生体外細胞試験モデル開発においても期待されている細胞であり、ボディー・オン・チップ開発においてもその重要性は変わらない。本講演では、我々のこれまでのボディー・オン・チップの要素技術開発や、それを用いた複数組織連関が関与する疾患モデルの開発、最後に今後の展開について紹介したい。

Reverse bioengineering to re-construct living systems

○Ken-ichiro Kamei
(iCeMS, Kyoto U.)

Key words microfluidic device, stem cells, tissue engineering

2E07-04 多能性幹細胞からの機能的組織誘導

○永樂 元次^{1,2}
(¹京大・医生研, ²京大・ASHBi)
eiraku@infront.kyoto-u.ac.jp

マウスおよびヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から培養ディッシュ内で大脳皮質組織を形成する技術について初めて報告されて以降 (Eiraku et al., 2008)、神経オルガノイド研究は世界的に広がり、現在では再生医療の移植用途や病態モデル、創薬プラットフォームなどの応用を目指したものから、ヒト脳形成の進化発生生物学的モデルとしての有用性を示すものまで、幅広い研究分野で受け入れられ多くの報告がなされている。神経オルガノイドは多くの場合、多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) をソースとして使用し、神経誘導、神経上皮形成、パターン形成、神経産生、組織形態形成、層構造形成などの多細胞現象を培養ディッシュ内で再現する。以前から、神経幹細胞は 1 細胞からニューロスフェアと呼ばれる神経細胞塊を形成することは知られていたが、ニューロスフェアでは層構造形成や組織形態形成などの生体の神経発生過程において観察される複雑な多細胞現象を再現することはできない。この点は、腸管オルガノイドなどの体性幹細胞をソースとし 1 細胞からオルガノイド形成が可能な実験系とは異なる。本講演では、哺乳類の神経発生過程と神経オルガノイドの形成原理を概説し、われわれの最近の成果である中枢時計の機能を有するオルガノイド形成技術について紹介したい。

Self-organized induction of functional tissues from pluripotent stem cells

○Mototsugu Eiraku^{1,2}
(¹Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto Univ, ²WPI-ASHBi, Kyoto Univ)

Key words Stem Cells, Organoid

2E07-05 ヒト iPS 細胞のライブセルレポーターアッセイと仮想人体構築学

○福田 淳二
(横国大院・工)
fukuda@ynu.ac.jp

MPS 技術は、その定義が拡大されつつ製品化を含め世界的に広く展開されてきている。文科省科研費・学術変革領域 B「仮想人体構築学」では、MPS チップと数理モデルを組み合わせ、生体の非線形動的・動的な応答を再現し、生体が獲得してきた合理性を理解することを目的として、比較的小さなグループ研究を推進している。本講演では、まず仮想人体構築学の取組み、特に個別臓器の構築を目指している計画研究 A02 班の成果について、冒頭にて簡単に紹介する。ここでは、微細加工技術や電気化学的なアプローチなどを用いた 3 次元組織の構築に取り組んでおり、肝、心筋などのスフェロイド、腎や皮膚オルガノイドなどを含む。また酸素供給を念頭に設計した培養器や成熟化のためのエネルギー代謝に基づく培養培地の設計に触れたい。

仮想人体構築学では、メタボロームやトランスクリプトームなどのオミックス解析を用いた網羅的な分析と数理モデル構築が中心となっているが、オミックス解析を時間軸に沿って実施することは一般に困難である。一方、キーとなる限られたマーカーについて、そのダイナミクスをモニタリングすることも生体応答を理解する上で重要と考えられる。そこで本講演では、キーとなるシグナル活性の変動を捉えるためのヒト iPS 細胞を用いたライブセルレポーターアッセイについて詳しく紹介する。近年、ヒト iPS 細胞の操作が容易になり、またゲノム編集技術が向上するとともに、高輝度の発光酵素と基質が開発されている。我々はこれらの技術を用いて、ヒト iPS 細胞に高輝度シフェラーゼとユビキチン分解系を組み込むことで、培養しながら連続的にシグナル伝達経路の活性をモニタリングできるようにした。本研究では、シグナル伝達経路の攪乱の大きさが、生体の有する堅牢性の許容範囲を超えた場合に、正常な生体組織形成が阻害されるという仮説を立て、このレポーター iPS 細胞を催奇形性物質の評価に用いた。催奇形性物質とは、妊婦に暴露されると胎児の正常な形態形成を阻害し、奇形を誘導する危険性のある化学物質のことである。母体の肝臓で代謝を受け、胎盤を介して胎児に暴露され催奇形性が発現するような化学物質も知られており MPS への展開も考えられるが、ここではまず上記仮説を検証した。つまり、これまでに ECVAM や ICH、論文などで報告されている既知の催奇形性物質について、まずは当該レポーター細胞のみを未分化のまま一般の培養プレートに播種して、発生毒性の有無を予測可能かどうか評価した。

具体的には、FGF に応答する iPS レポーター細胞を樹立し、30 種類の催奇形性陽性および陰性物質についてシグナル攪乱を評価した。これらの化合物は、動物実験において四肢奇形を引き起こすことが知られているもの(13 種)、それ以外の催奇形性物質(5 種)、非催奇形性物質(12 種)に分類される。特に、四肢奇形を引き起こす物質には、げっ歯類の実験動物および細胞試験では検出できないサリドマイドおよびその誘導体を含めた。これら 30 種類の化学物質について、予備実験により決定した濃度希釈系列を作製し、FGF レポーター細胞へ暴露した。そして、その後の経時的な発光強度の変化を計測し、データを詳しく解析した。データ処理では、発光量の経時変化データを溶媒対照で標準化し、化学物質に暴露した場合との発光量の差を時間積分(Area Between Curves, ABC)した。この時、増強および抑制されたどちらの場合も ABC は大きくなる。そして、化学物質の各濃度に対して ABC の和を計算し、さらにすべての濃度の ABC の総和を算出することで、シグナル攪乱の大きさを表す指標とした。最後に、陽性および陰性の化学物質に対して ROC 曲線解析を行うことで、閾値を設定するとともに、本判定法のパフォーマンスを決定した。その結果、四肢奇形物質の検出において、AUC は 0.93、正確度は 92%であった。一方、従来の 24 時間目のエンドポイント 1 点のみで評価すると、AUC は 0.86、正確度は 62%と著しく低下した。つまり、シグナル経時変化を連続モニタリングすることが重要であることが示された。また、他の *in vitro* 催奇形性試験と比較して、本手法の正確度がより優れていることが示された。特に、既報ではサリドマイドとその誘導体が偽陰性となっていたが、本手法では 3 物質とも検出可能であった。今後、他の臓器オルガノイドとともに当該レポーター細胞を搭載した MPS チップを構築することで、生体内の動態や代謝産物を考慮した催奇形性試験が可能となると考えられる。

Live-cell reporter assay using human iPS cells and virtual human science project

○Junji Fukuda
(Grad. Sch. Eng., Yokohama National Uni.)

Key words Organs on a chip, Microphysiological system

2E07-06 運動神経支配されたヒト骨格筋組織モデルの開発

○清水 一憲
(名大院・工)
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

現在の疾患・創薬研究では、平面培養したヒト細胞や疾患モデル動物が利用されることが多いが、こうした技術ではヒトの生理応答を正確に模倣できない場合があり、治療法開発において大きな障壁のひとつとなっている。こうした背景から、マイクロスケール技術を用いて高度に生体を模倣した細胞培養技術である Microphysiological System (MPS)が期待されている。

骨格筋は身体の約 40%を占める最大の組織である。生体内で骨格筋は運動ニューロンの軸索末端と、神経筋接合部 (NMJ) を形成している。身体の自発的な運動は、運動神経細胞の活動電位が NMJ を介して骨格筋細胞に伝わることで誘導される。様々な神経筋疾患では、運動神経や NMJ、骨格筋に何らかの機能不全が生じ、これにより身体の運動機能が損なわれ、生活の質が大きく低下し、死に至ることもある。国内外において、高齢者人口の増加に伴い、例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) やサルコペニア (加齢が原因の筋萎縮) などの神経筋疾患の患者数が増加している。

我々はこれまでに骨格筋の MPS を開発してきた[1-6]。例えば、三次元筋組織の収縮力を測定可能なマイクロデバイスを利用し、筋萎縮モデルの構築やそれを用いた抗筋萎縮ペプチドのスクリーニングなどを行った[1-4]。また、骨格筋細胞と運動神経細胞を共培養するためのマイクロデバイスも複数開発し[5,6]、運動神経細胞の活動電位で収縮する筋組織 (運動神経支配された筋組織) の力を定量評価することに成功した[6]。

本講演では、運動神経支配されたヒト骨格筋組織モデル開発について、最新の研究成果も交えて紹介する。

- [1] Shimizu, K., et al., *Bioengineering*, 4, 56 (2017)
- [2] Nagashima, T., et al., *Adv. Biosyst.*, 4, 2000121 (2020)
- [3] Shimizu, K., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 129, 632 (2020)
- [4] Yamamoto, K., et al., *Biotech. Bioeng.*, 119, 2196 (2022)
- [5] Yamaoka, N., et al., *BioChip J.* 13, 127 (2019)
- [6] Yamamoto, K., et al., *Lab Chip*, 21, 1897 (2021)

Development of innervated human skeletal muscle tissue models

○Kazunori Shimizu
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words Microphysiological system, Cell-based assay, In vitro model, iPS cell

2G06-01 天然ゴムの生分解とバイオプラスチックへの変換

○笠井 大輔
(長岡技科大)
dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

樹木成分の1つである天然ゴムは、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)を基本骨格として持ち、パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)をはじめタンポポやワユレなど約2,500種の植物や菌類によって合成されている。特にパラゴムノキが合成する天然ゴムは、自動車産業や免震技術などの幅広い分野で利用されている不可欠な資源である。天然ゴムや石油由来合成のイソプレンゴムは、様々な分野で利用されているものの、それらを含む廃棄物の再利用は極めて限定的であり、多くは焼却や埋立により処分されている。また、海洋汚染の原因の一つとされているマイクロプラスチックの約3割はタイヤ等のゴム片に由来するとされており、環境負荷の観点からポリイソプレン廃棄物の処理技術の革新が求められている。近年、ポリイソプレンを資化できる複数の微生物が単離されており、それらの酵素機能を利用したポリイソプレンゴムの生分解処理技術に注目が寄せられている。本研究では、ポリイソプレン資化性細菌のポリ(*cis*-1,4-イソプレン)分解機構を酵素および遺伝子のレベルで明らかにすることで、微生物を用いたポリイソプレン生分解技術の確立を目指している。加えて、それらの酵素系を利用して、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)からの生分解性プラスチック(ポリヒドロキシアルカン酸)生産系を確立することで、有機性廃棄物から有価物を生産する資源循環系の確立に貢献できると考えられる。これまでに、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)とポリイソプレンを唯一の炭素源として生育する *Nocardia farcinica* NBRC15532 株を特定した (Linh et al, J Biosci Bioeng, 123(4), 412-418, 2017)。本株は、細胞外分泌型の酸素添加酵素(Lcp)によってポリ(*cis*-1,4-イソプレン)のイソプレン鎖に酸素分子を導入することで、末端にケト基とアルデヒド基をもつ C₂₀ から C₃₀ のオリゴイソプレノイドへと低分子化することが示された。Lcp をコードする遺伝子の破壊株は、ポリイソプレンゴムの資化能を失ったことから、本遺伝子が NBRC15532 株のポリイソプレノイド代謝に必須であることが示された。Lcp によって生じたオリゴイソプレノイドは、NBRC15532 株の細胞内で機能する複数のアルデヒドデヒドロゲナーゼが関与する酸化反応によって、末端のアルデヒド基がカルボン酸へと変換されることが示唆された。これまでに、3つのアルデヒドデヒドロゲナーゼ(OiaA1, 2, 及び3)を特定しており、特にOiaA1をコードする遺伝子の欠損によってポリイソプレンゴムの資化能が顕著に低下したことから、本遺伝子がオリゴイソプレノイドの酸化に主に関与していることが示唆された。また、本遺伝子は NBRC15532 株内で構成的に発現していたことから、細胞内に取り込まれたオリゴイソプレノイドが速やかに代謝されていると推察される。これは、細胞に対して毒性を示すアルデヒド化合物を迅速に分解するための戦略であると考えられた。

N. farcinica NBRC15532 株では、Lcp 及び OiaA によってポリ(*cis*-1,4-イソプレン)から生じた脂肪酸はベータ酸化経路によって代謝されることが示唆された。NBRC15532 株以外のポリイソプレン資化性細菌である *Rhizobacter gummiphilus* NS21[†] 株でも、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)の細胞内代謝にベータ酸化経路が関与することが示唆された (Imai et al, J Gen Appl Microb, 59(3), 199-205, 2013; Kasai et al, Biosci Biotechnol Biochem, 81(3), 614-620, 2017)。NS21[†] 株は、NBRC15532 株と異なりポリイソプレン代謝時にポリヒドロキシアルカン酸を生産する。本株のゲノム配列を解析した結果、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)合成遺伝子(*phaCAB*)が見出された (Linh et al, Biotechnol Rep, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00332)。 *phaCAB* はアセチル CoA からの PHB 合成に関与することから、NS21[†] 株では、ポリ(*cis*-1,4-イソプレン)代謝時にベータ酸化経路で生じるアセチル CoA から PHB が生産されていると考えられた。さらに、本株には PHB 分解に関わる PHB デポリメラーゼ遺伝子(*phaZ1* 及び *phaZ2*)が存在した。*phaZ1* 及び *phaZ2* を破壊した結果、PHB 生産量が向上したことから、これら遺伝子が NS21[†] 株の PHB 分解に関与すること、それらの欠損により PHB 生産性を向上できることが明らかとなった。本結果は、ポリイソプレンからの PHB 生産性の向上に関わる基礎的知見となると考えられた。

Biodegradation of natural rubber for conversion to bioplastics

○Daisuke Kasai
(Nagaoka Univ. Technol.)

Key words natural rubber, polyisoprene, polyhydroxyalkanoate

2G06-02 粘弾性 PHA ブロック共重合体の合成と生分解

○松本 謙一郎
(北大院・工)
mken@eng.hokudai.ac.jp

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) はプラスチック材料として利用可能な微生物産生ポリエステルであり、一部実用化されており、近年その優れた生分解性が注目されている。さらなる PHA の利用拡大のためには、多様な材料物性を発揮させることが求められる。PHA の合成は、DNA やタンパク質とは異なり鑄型分子を持たない重合系であるので、通常は二種類以上のモノマーが含まれる場合にはモノマー配列がランダムとなる。一方、高分子化学の知見から、2つのポリマー (セグメント) が結合した構造を有するブロック共重合体が有用な物性を示すことが知られていたため、PHA ブロック共重合体の合成が試みられてきた。一見、ブロック共重合体は二種類のモノマー供給系を順番に働かせれば合成できるように思われるが、PHA の分子鎖一本の合成に必要な時間が、微生物の培養の時間スケールよりも短いため、合成条件の切り替えによりブロック共重合体を得ることは容易ではない。我々は、ある PHA 合成酵素の改変体 (PhaCAR) が複数モノマーの混合物から自発的にブロック共重合体を合成することを発見した。本酵素のように、ランダムではない配列のポリマーを合成可能な PHA 合成酵素を配列制御型重合酵素と定義した。PhaCAR を用いて合成された最初の PHA ブロック共重合体は、2-hydroxybutyrate (2HB) と 3-hydroxybutyrate (3HB) から構成される P(2HB)-b-P(3HB)であった。PhaCAR とモノマー供給を担う CoA 転移酵素を発現する組換え大腸菌を、2HB と 3HB を添加した培地で培養することで本ポリマーが得られる。一方、同じ PhaCAR を用いて 3-hydroxyhexanoate (3HHx) と 3HB との共重合体を合成すると、ランダム共重合体を得られたことから、PhaCAR が必ずブロック共重合体を合成するのではなく、ブロック配列が生じるモノマー基質の要因があることが示唆された。ブロック配列になる条件を明らかにするため、主鎖の長さの異なる 3-hydroxypropionate (3HP)、4-hydroxy-2-methylbutyrate (4H2MB)、5-hydroxyvalerate (5HV)、6-hydroxyhexanoate (6HHx) をモノマー前駆体として様々な条件下で共重合を試みた。その結果、PhaCAR はこれら4種のモノマーと3HBとの共重合を合成可能であり、そのモノマー配列はランダムになることが分かった。これらの2元共重合体に2HBを第三成分として加えると、P(2HB)ホモポリマーセグメントを含むブロック共重合体が合成された。すなわち、ブロック配列が生じる条件は2HBモノマーが供給されることであることが分かった。

上で述べたように、PhaCAR は2HBから6HHxまでのモノマーユニットを取り込み可能であり、主鎖長についてはPHA合成酵素の中でも極めて幅広い基質特異性を有する。一方、側鎖構造の基質認識については、炭素数2の側鎖までが活性が高く、炭素数3の側鎖を有する3HHxはわずかに取り込み可能であるものの、取り込み量が少ないことが弱点だった。そこで、PhaCAR に対して3HHxモノマー重合能を指標とした定方向進化を行い、ランダム変異体ライブラリーから優良変異体候補を取得した。単離された候補の中で、活性中心残基であるC315に隣接する部位であるF314H変異体は、3HHx-CoAに対して親酵素よりも高い活性を示し、任意の3HHx分率のポリマーの合成も可能となった。また、本変異により配列制御性にとくに変化は見られなかった。この結果から、配列制御型重合酵素の機能を拡張することが可能であることが示された。ブロック共重合体は、性質の異なるセグメント同士を結合させ、さらにそれらのセグメントが混合せずに相分離すると特徴的な物性を示すことが知られている。そこで、得られたブロック共重合体 P(2HB)-b-P(3HB)の機械物性を評価した。P(2HB)とP(3HB)は非相溶で、相分離可能なポリマーであったことから、これらのセグメントを相分離させ、P(2HB)が軟質の非晶、P(3HB)が硬質の結晶になるように熱処理したフィルムを作成した。本フィルムおよび近いモノマー分率のランダム共重合体の引張試験を行ったところ、ランダム共重合体が塑性変形をしたのに対して、ブロック共重合体は弾性変形を示したことから、モノマー配列によって機械物性が変化することが分かった。これらの結果により、PHAは、モノマーユニットの一次構造とモノマー配列の両面で、天然構造よりもかなり拡張可能であり、天然型ポリマーとは異なる物性を示す材料を合成可能であることが示された。

P(2HB)はブロック共重合体を合成するための重要な構造であるが、非天然ポリマーであることから天然型PHAと同様の生分解性を持つとは限らない。そこで、2HBベースポリマーの分解菌の探索を行った。土壌サンプルの集積培養により、ポリマーエマルジョンを透明化させる菌が数種分離されたことから、本ポリマーが生分解性を有する可能性が示唆された。

Biosynthesis of elastic and biodegradable polyhydroxyalkanoate block copolymers

○Ken'ichiro Matsumoto
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words polyhydroxyalkanoate, biosynthesis, biodegradable plastic, enzyme

2G06-03 メタオミクス解析で解き明かす実海洋環境でのプラスチックの生分解プロセス

○石井 俊一¹, 鈴木 美和², 粕谷 健一²
 (¹海洋研究開発機構, ²群大院・理工)
 sishii@jamstec.go.jp

約 40 億年前に地球に生命が誕生後、環境の劇的変遷に曝されながら適応し、微生物は多種多様な代謝機能を進化・創出させてきた。それら多様な代謝機能の創出、進化の結果として、現在も微生物は地球表層から成層圏、地球深部、地殻内など、各種物理・化学的制約の異なるありとあらゆる生命圏に生息可能となっている。近年の人類文明の発展に伴い、それまでの地球上にはほとんど存在しなかった新たな物質が生み出され、現在、地球環境中に放出され続けている。そのような物質に対して、地球に生息する微生物は適応進化を続けており、現在も、新たな代謝機能が創出、進化、適応がなされていると考えられている。中でも、海洋におけるプラスチックの分解は、環境中の微生物による分解が特に困難である事が知られている。近年、海洋において生分解性を示すプラスチックの開発が進められているが、その生分解性に寄与する微生物群や分解遺伝子に関する理解は未熟である。そこで本研究では、港湾岸壁等で行う浅海でのプラスチック海洋浸漬試験や、研究船を用いた深海でのプラスチック浸漬試験、あるいはしんかい 6000 にて回収された深海底にあるプラスチックごみ上に形成されるバイオフィーム (プラスティスフェア, Plastisphere) のマルチメタオミクス解析を行い、微生物群集内のプラスチック分解菌と分解に関与する遺伝子群に迫った。

回収したプラスチック上に形成されるバイオフィーム中の微生物および微生物が持つポリマー分解遺伝子を明らかにするため、DNA と RNA を共抽出し、それぞれ、次世代シーケンサを用いて網羅的に解読した。得られたショートリード情報は、de novo アセンブリに供し、プラスチック素材上に素材特異的に増殖している微生物のドラフトゲノム (Metagenome-assembled genome, MAG) を決定した。その後、ゲノム中にコードされている推定プラスチック分解遺伝子 (エステラーゼ等) の同定を行い、プラスチック分解微生物と分解遺伝子情報を抽出した。また、RNA シーケンスから得られたショートリードを、ドラフトゲノム中にコードされている遺伝子にマッピングする事により、遺伝子発現プロファイルの解析を行った。その後、環境において高発現の遺伝子群を網羅的に解析し、プラスティスフェア中の各優占微生物が、どのような代謝機能を行っているかを明らかにした。特に、メタゲノム解析によって見出された推定プラスチック分解遺伝子が実際に環境中で発現しているのかどうかは、その海洋生分解性を理解する上で非常に重要な知見である。

これらのメタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析、その他のメタデータを統合的に解析することで、実環境におけるプラスチック分解微生物とその随伴微生物の微生物系統とその機能遺伝子 (= 酵素情報) を同定し、環境中に既に放出されたプラスチック上、および新規に開発された生分解性プラスチック上における、海洋中での微生物分解機序を明らかにする。

2G06-04 海洋生分解性プラスチック製品の社会実装のための生分解評価法の ISO 規格化

○国岡 正雄
 (産総研)
 m.kunioka@aist.go.jp

1. 緒言: 以前から海岸、海洋中のプラスチック廃棄物の存在は、問題視されていた。2018 年頃から、海に浮遊するマイクロプラスチックがどの海域でも発見され、ウミガメの鼻からストローを抜く動画や海洋中のプラスチック廃棄物が魚の量を超えると予測されるなど海洋中のプラスチック廃棄物の問題が顕在化した。日本政府も海洋プラスチック廃棄物問題の解決のために多くの施策を行った。プラスチック資源循環戦略 (2030 年にバイオマスプラスチック 200 万トン)、2019 年の大阪サミットで採択された大阪ブルーオーシャンビジョン (2050 年に新たな海洋プラスチックゴミゼロ) 等の施策を実施し、海洋生分解性樹脂を製造する企業を補助金等で支援している。また、いくつかの新素材の研究開発もスタートした。産総研、NITE、東大、愛媛大、静岡県、島津テクノによる新たな海洋生分解評価法を開発する NEDO プロジェクトもスタートした。2022 年に施行されたプラスチックに係わる資源循環の促進等に関する法律 (プラスチック資源循環促進法) も定められ、バイオプラスチックを含むプラスチックのさらなる資源循環を目指すことになる。

2. 生分解度評価法の ISO 国際標準: 生分解性の評価法は、サンプルの前処理や培養条件によって大きく変化するので、異なる研究機関や分析機関が実施した結果を比較検討しにくい。そのため、可能な限り試験条件を統一化した ISO 国際規格に則った生分解性評価法が必要である。生分解に関わる標準化は、国際標準化機構 (ISO) の専門委員会 TC 61 (プラスチック)、SC 14 (環境側面)、WG 2 (生分解度) で国際審議されている。筆者は、WG 2 の議長を務めている。また、国内審議は、日本バイオプラスチック協会が担当している。WG 2 で多くの生分解に関わる ISO が発行しているが、図 2 に示すように種々の環境条件 (水系 (海水、淡水、汚泥 (活性汚泥、消化汚泥))、陸系 (土壌、コンポスト)) に分かれて設定されているため多くの評価法が ISO 規格として発行している。また、最近ではイタリア、ドイツから海洋中 (浅い海底面、海水中) を模した実験室試験、実海域試験) の生分解度評価法、海洋生分解の要求事項 (2 年間で 90% 以上生分解) の規格が提案され規格化されている。前述した NEDO プロの成果として日本からも、簡易実海域フィールド試験、実験室内海洋生分解加速評価試験を提案している。

ISO に定められている「生分解度」の評価法は、実験室内に対象とする環境条件を模擬した密閉系を構築し、生分解により発生する二酸化炭素や消費された酸素量 (BOD) を測定することにより評価する。生分解性樹脂がどの程度、二酸化炭素まで分解が進行しているかを理論二酸化炭素発生量と実際に発生した量の割合で計算する。樹脂サンプルを含まないブランケットからも、二酸化炭素が発生するので、その量を差し引いて計算する。ラボ試験や実環境試験における単純な残存量から求める分解率は「崩壊度」として区別して定義している。バイオマスプラスチック (英語では Bio-based plastics と記載することが多い) は、海洋生分解性樹脂とは、全く異なるカテゴリーの樹脂であるが、環境問題の高まりの中、枯渇性資源である石油を使用しない樹脂であり、大気中の二酸化炭素削減効果も望めることから、注目されている。バイオマスプラスチックを使用した製品は、すべてがバイオマス原料からできているとは限らない。現状では、バイオマスプラスチックのコストは、石油由来プラスチックに比べて高いため使用量を制限している場合も多い。そのため、どの程度バイオマス原料由来であるかが重要なパラメーターになっている。バイオベース度は、水溶液の濃度にモル濃度と質量%濃度があるように、何を基準に計算するかによって複数の種類がある。これらの計算法は、ISO 16620 シリーズ (パート 1 から 5) として、筆者が提案して (1-3)、ISO、TC 61、SC 14、WG 3 (バイオベース高分子) で審議され、発行している。

これらのバイオベース度を活用して、LCA やカーボンフットプリントを計算する ISO 22526 シリーズ (パート 1-4、日本提案) や焼却した際の燃焼熱やバイオマス由来の発生二酸化炭素量を求める ISO 20463 (日本提案) が発行している。

3. マイクロプラスチックの ISO 国際標準化: 近年、海水中や飲料水 (地下水、水道、ボトル) 中にマイクロプラスチックが存在することが問題となっている。サンプリング法、複数の網目サイズのネットの組み合わせ、プラスチック以外の有機物を分解する前処理法、評価分析法等の ISO 規格化が様々な分野毎 (繊維、プラスチック、水質) の ISO 専門委員会 (TC 38, 61, 147) で進みつつある。生分解度やバイオベース度、マイクロプラスチック化の是非等は、数値のみではその製品の市場での優位性を主張することは難しく、認証機関による認証 (マーク等で明示を許諾) が重要である。

Biodegradation process of plastics in the marine environment revealed by Meta-Omics analysis

○Shun'ichi Ishii¹, Miwa Suzuki², Kenichi Kasuya²
 (¹JAMSTEC, ²Grad. Sch. Sci. Eng., Gunma Univ.)

Key words biodegradable plastic, metagenome, metatranscriptomics

ISO Standardization related to marine biodegradable plastics for social implementation

○Masao Kunioka
 (AIST)

Key words biodegradable plastic, ISO standardization

2G06-05 バイオものづくりによる新ポリマー産業創出への挑戦

○佐藤 俊輔
(カネカ)

Shunsuke.Sato@kaneka.co.jp

欧州では使い捨てプラスチック製品の生産制限に関する EU 指令が採択、我が国においてもプラスチック資源循環促進法が成立するなど、石油資源から生産され、且つ環境中で生分解されずに蓄積されるプラスチック製品の在り方が問われる時代が来している。株式会社カネカでは、自然環境で分解し、且つ再生可能原料から生産されるポリマー材料としてカネカ生分解性バイオポリマー Green Planet®の実用化を進めている。Green Plane は炭素数 4 の(R)-3-ヒドロキシブチレート (3HB) 及び炭素数 6 の(R)-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HHx) から構成される共重合ポリエステルであり、微生物が炭素、およびエネルギー貯蔵物質として細胞内で合成、蓄積するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の一種である。

本講演では、Green Planet の基となる新規ポリマー生産微生物の発見から材料化の歴史、並びに生産プロセスにおいてポリマー物性制御技術の鍵となる微生物の代謝制御技術に関して紹介する。

Green Planet 事業を通じて、持続発展可能な未来社会の創造に貢献することを目指している。

2G07-01 イタコン酸由来光スイッチ分解性ナイロンの分子設計

○金子 達雄, Mohammad Asif Ali, 岡島 麻衣子, Yin Hongrong,
Maninder Singh, 高田 健司
(北陸先端大・マテリアル)
kaneko@jaist.ac.jp

生分解性プラスチックの歴史は古く、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) などを代表とする脂肪族系ポリエステルが挙げられる。特に PHA の共重合体は海洋分解性の確認されている数少ないプラスチックを含む。しかし、これらの軟化温度は室温より低いなど工業化には多くの工夫を要し、その開発推進には困難が伴っていた。一方、昨今の海洋プラスチックごみ問題の深刻化により、再度注目され生産規模の増加が見込まれている。それは、年間 800 万トン (80 億 kg) もの海洋プラスチックゴミが増え続けている状況で、約 80 億人にも上る全人類が年間 1kg の海洋ゴミの回収を行っても追いつかない状況となっている。実際に、多くの社会工学的な回収プロジェクトが推進される中で、海洋分解性プラスチックの利用がなされないと根本解決には至らないことが分かる。一方、海洋分解性をだけを追及しても、耐久性、耐熱性、高力学性能が低ければ用途が狭く従来品に取ってかわることはなく、生分解性の意義を最大限に発揮できない。このような中、我々は高性能・高機能分解性プラスチックに関する研究を進めイタコン酸由来のナイロンが光照射による軟化分解性というユニークな機能を示すことを見出してきた。

先に、我々はバラクマル酸およびカフェ酸からなる共重合ポリエステルが紫外線照射による構造変化により加水分解性を示すことが分かり廃棄後に分解性が促進される材料として注目されてきた。この知見をナイロン系物質に拡張し、イタコン酸という生体分子に注目した。イタコン酸はカビを用いた発酵により安価に生産され、バイオリファイナリーの分野において特に注目されており、米国エネルギー省の提案するバイオリファイナリー戦略物質に含まれる。その理由として古くからビニル系モノマーとして広く活用されその生産量は数万トンにも上り年々増産されていることが挙げられる。一方、ナイロン原料としての利用に関しては、我々の報告以外には学術論文は皆無であった。そこで、我々はイタコン酸を出発物質として一般的な方法論でナイロンを合成してみた結果、副反応が激しく起こりオリゴマーしか得られなかった。これが、報告の無い一つの理由と考えられる。この問題を解決するべく反応条件を検討した結果、副反応を抑えて効率よくナイロンを得る手法として塩モノマー法を提案した。具体的には、イタコン酸と各種ジアミンのそれぞれの均一なアルコール溶液を混合することで瞬時に析出する塩モノマーの結晶を加熱し、バルク重合する方法である。これにより、5員環であるピロリドン環が主鎖中に導入された珍しい構造のナイロンが得られた。得られたナイロンの熱物性および力学物性は既存のナイロンである PA66 や PA6 の示す性能を超える値であった。さらに、これらの分解性を調べた結果、加水分解に伴いピロリドン環の開環反応が起こり疎水性から水溶性へと物性変化することが分かった。これをさらに拡張し、土壌分解性、消化酵素分解性が確認された上、光と水の刺激によりピロリドン環の開環反応が起こり、水中に溶解しながら分解する現象が観察された。現在、この分子システムを拡張するためにナイロンの構造を拡張して研究を進めている。

Challenge to create a new polymer industry through bio-manufacturing

○Shunsuke Sato
(Kaneka Corp.)

Key words biodegradable polymer

Molecular design of itaconic acid-derived Nylon with photo-switching degradability

○Tatsuo Kaneko, Mohammad Asif Ali, Maiko Okajima, Hongrong Yin,
Maninder Singh, Kenji Takada
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words poly(amino acid), biodegradable plastic, Itaconic acid, Photoreaction

2G07-02 光スイッチを可能にする光触媒の開発

○勝又 健一¹, 町田 慎悟¹, 中田 一弥², 小川 誠³
 (¹東理大・先進工, ²東農大・農学院, ³VISTEC)
 k.katsumata@rs.tus.ac.jp

光触媒は光励起半導体のバンドギャップ以上の光子エネルギーを吸収して生じる光励起電子と正孔による還元・酸化力により環境浄化や人工光合成分野で基礎から応用実用化まで幅広く研究開発が行われている。これまで、ほとんどの有機物を酸化分解できる機能（酸化分解活性）と粒子表面の水との親和性が高くなる光誘起超親水性の機能により発現するセルフクリーニング効果を利用し、ビルや家屋の外壁、窓ガラスの汚れ防止、自動車のサイドミラー等の曇り防止に応用されてきた。最近では、酸化分解活性の機能向上により屋内の脱臭や抗菌・抗ウイルスに展開されている。しかしながら、全ての光触媒が酸化分解活性と光誘起超親水性の両方の機能を有するわけではなく、実用化されている光触媒のほとんどが両方を兼ね備えている酸化チタンである。

一方、光触媒の酸化分解活性と光誘起超親水性の関係性については、酸化チタンを中心として行われてきたが、未だ未解明なことが多い。例えば、酸化チタンとほとんど同じバンド構造を持つチタン酸ストロンチウムは、酸化チタンと同等の酸化分解活性を有するが光誘起超親水性は示さない（光により親水化するが高度な親水性には至らない）。粒子表面の最表面の原子配列から、不安定なブリッジ酸素がある結晶面は親水化が早いという報告はあるが、他の光触媒の表面との関係性は分かっていない。

私たちのグループは、NEDO ムーンショット型研究開発事業で遂行している光スイッチ型海洋分解性プラスチックの開発研究において、光スイッチを担う光触媒の開発を担当している。本プロジェクトで目指すのは、光触媒の酸化分解活性によるポリマーの酸化分解ではなく、光誘起超親水性を利用した光スイッチシステムによる分解であり、プラスチックに対して悪影響を及ぼさず、海洋に出るまでの間の物理的、化学的、生物学的な刺激により表面が破損した時に初めて光触媒活性を発現し、光誘起超親水性効果により、内部に水と菌を入り込みやすくさせることで、内部から生分解を起こすような光触媒の開発とそのメカニズムを明らかにすることである。実用化されている酸化チタン光触媒は光誘起超親水性を示すが、高い酸化分解活性によりポリマーを酸化分解するため適切ではない。私たちのグループでは、酸化チタンよりも酸化分解活性が低いが、光により高度な親水性を示す光触媒を進めており、その候補の一つについて当日報告する。

Development of photocatalysts with photo switches

○Ken-ichi Katsumata¹, Shingo Machida¹, Kazuya Nakata², Makoto Ogawa³
 (¹Fac. Adv. Eng., Tokyo Univ. Sci., ²Inst. Agric., Tokyo Univ. Agric., ³Sch. Sci. Energy, VISTEC)

Key words photocatalyst, hydrophilicity

2G07-03 イタコン酸由来光スイッチポリアミドの酵素分解

○加藤 太郎¹, 柴田 直樹², 根来 誠司³
 (¹鹿大院・理・化学, ²兵庫県大院・理, ³兵庫県大院・工)
 k0035454@kadai.jp

【ナイロン素材の置かれた現状とイタコン酸由来ナイロン 6i の可能性】

プラスチックは基本構造となるモノマーの化学構造やそれらの結合様式、重合度の違い等によって様々な性質を発現しうる。そのなかでポリアミドの一種であるナイロンは、1935年に絹に代わる人工繊維としてデュポン社にて開発された高分子素材であり、イブシロン-カプロラクタムの開環重合によって合成されるナイロン 6 や、ヘキサメチレンジアミンとアジピン酸の縮重合によって合成されるナイロン 66 が有名である。これらは強靱性と柔軟性に加えて耐熱性と耐薬品性も併せ持つことから、繊維・プラスチック素材として我々の身の回りのいたる所で使用されている。合成ポリアミドの世界市場は2020年に890万トンと推計されているが、これら2種類のナイロンだけで市場全体の90%以上を占めている。このように生活に密着した素材であるが故に、近年の環境・ゴミ問題とも関りが深い。特に既存の合成ナイロンは生分解を受けないため、使用後はほとんどが焼却あるいは埋め立て処分されている。またそれらの一部が環境中に漏れ出ることによって、深刻な海洋プラスチックごみ問題を引き起こしている。合成ポリエステル的一种であるポリエチレンテレフタレート(PET)が日本国内において高いリサイクル率を示し、またモノマーに戻して再重合を行うケミカルリサイクル手法の提案論文を見かけることが多くなってきた状況とは対照的である。既存のナイロンが生分解を受けないだけでなく、石油資源から合成されていることを考えても、今後はバイオマス由来で海洋生分解性を示す次世代型ポリアミドの提案と、それらに対する現実的なリサイクル手法の確立が必要不可欠である。

このような状況のもと我々は、2020年度より北陸先端科学技術大学院大学の金子達夫教授をリーダーとして、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)のムーンショット型研究開発事業における目標4「2050年までに、地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現」の達成を目指す研究開発プロジェクトの一つに採択され、世界規模の海洋プラスチックごみ問題の対策に寄与する研究開発を加速させてきた。特にヘキサメチレンジアミンとバイオマス由来のイタコン酸を原料とした新提案のポリアミド素材「ナイロン 6i」に着目し、本素材をベースとしたナイロン資源循環システムの構築を目指した研究を行っている。ナイロン 6i は、使用中は既存のナイロンと同等の耐久性を示す一方、使用後、海洋に放出された際に光と塩分によって自己分解スイッチがONになり、微生物等による生分解を受けやすくなることが示唆されている。海洋生分解性を示す次世代型ポリアミドの有力候補として、現在注目を浴びているナイロン素材である。

【イタコン酸由来ナイロン 6i の生分解性】

我々の研究グループでは1972年に *Arthrobacter* sp. KI72 株を単離して以来、ナイロン 6 の合成過程で生じる 6-アミノヘキサン酸(Ahx)オリゴマーを資化する多数の微生物を単離すると共に、その分解に関わる酵素タンパク質の遺伝的・生化学的研究を行ってきた[1]。例えば KI72 株では、pOAD2 と呼ぶ環状プラスミド上に Ahx オリゴマーに対する作用様式が異なる 3 種の酵素遺伝子(*nylA*, *nylB*, *nylC*)がコードされている。これらの遺伝子から誘導される酵素タンパク質の内、エンド型加水分解酵素である NylC が、オリゴマーだけでなく不溶物である高分子量ナイロンに対しても加水分解活性を示すことを2012年に発見し、ナイロンハイドrolラーゼ(Nylon hydrolase)として発表した。特に4カ所にアミノ酸置換を施した変異体(NylC-GYAQ)は、高分子量ナイロンに対して明確な加水分解活性を示すと共に、高い熱安定性も有している。また酵素反応前にナイロン素材に対して化学的前処理や水中微細分散処理を施すことによって、市販のナイロンであっても概ねモノマーにまで戻すことが可能となりつつある。ナイロンの実用的な酵素的モノマーリサイクル技術の確立が視野に入ってきた段階である。

本シンポジウムでは、海洋生分解性を示す次世代型ポリアミドであるナイロン 6i やその誘導体に対するナイロンハイドrolラーゼを用いた酵素加水分解反応とモノマーリサイクルの可能性について発表する[2]。また、ナイロン 6i が環境中で分解を受けた際に放出するモノマー構成ユニットを資化可能な微生物を海洋資源から探索した結果、新種の海洋性細菌を得ることに成功したのであわせて紹介したい[3]。

1) D.Kato *et al.*, (Ed. by T.Kaneko) in “Photo-switched Biodegradation of Bioplastics in Marine Environments”, Springer Nature (in press)

2) D.Kato *et al.*, JP2022-032566.

3) D.Kato *et al.*, JP2022-034081.

Nylon hydrolase catalyzed enzymatic hydrolysis of itaconate derived photo-switched polyamides

○Dai-ichiro Kato¹, Naoki Shibata², Seiji Negoro³
 (¹Dept. Sci., Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ., ²Grad. Sch. Sci., Univ. Hyogo, ³Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words Nylon, enzymatic hydrolysis, itaconic acid, polyamide

2G07-04 新しいバイオプラスチック開発のための植物バイオマスを原料とする発酵プロセス

○川口 秀夫¹, 佐塚 隆志²

(¹神戸大・先端バイオ工研セ,²名大・生物機能開発セ)

kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp

バイオプラスチックは生分解性を特長とする一方で、市販の石化プラスチックと比べて耐熱性及び機械的強度が劣る。この狭域な物理化学的特性は、バイオプラスチック普及の障壁のひとつとなっている。石化プラスチックをバイオプラスチックで代替した持続可能な社会を実現するために、以下の2つの技術的課題を解決する必要がある：(1) 機能性(生分解性及び耐熱性、機械的強度など)の向上、(2) 再生可能資源を原料とする生産体系の構築。本研究では、課題(1)への対応として、新規な高機能プラスチックの分子設計をもとに原料となるモノマーあるいはその前駆体を選定し、目的化合物を糖から発酵生産する微生物を代謝工学的に作製した。また課題(2)への対応として、高バイオマス植物であるソルガムをリグノセルロースのモデルとして、セルロースを主成分とする茎部残渣から酵素糖化液を調製して、発酵の炭素源として利用した。また、バイオマス由来成分が発酵に与える影響についても解析した。

これまでに、耐熱性バイオプラスチックの原料として、希少天然化合物であるフェニル乳酸とカフェエ、さらに抗生物質の前駆体である 3-amino-4-hydroxybenzoic acid (3,4-AHBA) などの芳香族化合物をバイオマス糖化液から発酵により生産した。フェニル乳酸の生産では、糸状菌 *Wickerhamia fluorescens* 由来の phenylpyruvate reductase を大腸菌に高発現させた組換え株を作製した⁽¹⁾。ソルガムの糖化液はフェニル乳酸発酵の阻害作用を示したため、メタボローム解析によりその阻害作用点を特定した。また、セルロースの酵素糖化と発酵を one-pot で行う同時糖化発酵プロセスを用いて、発酵阻害を抑制できることを明らかにした⁽²⁾。同時糖化発酵による発酵阻害の抑制は、遺伝子組換え大腸菌によるカフェエ発酵においても有効で、セルロースバイオマスから 233 mg/L のカフェエを直接生産することができた⁽³⁾。

超耐熱性プラスチックの原料となる 3,4-AHBA を発酵生産するために、放線菌 *Streptomyces griseus* 由来の抗生物質合成に関与する2つの遺伝子 *griH* を、*Coli* 型細菌で高発現させた遺伝子組換え株を作製した⁽⁴⁾。遺伝子組換え *Coli* 型細菌による 3,4-AHBA 発酵は、溶存酸素濃度 (DO) と負の相関を示した。Jar を使った DO-stat 培養では、3,4-AHBA の生産は酸素供給律速である DO = 0 ppm で最大となり、好気条件 (DO ≥ 2.66 ppm) の4倍の生産性が得られた⁽⁵⁾。DO = 0 ppm と 2.66 ppm におけるメタボローム解析では、酸素制限では補酵素の再生やピルビン酸の代謝が好気条件と比べて著しく変動していた⁽⁶⁾。酸素制限による 3,4-AHBA 発酵促進作用はバイオプラスチックの合成に応用し、セルロースバイオマスから世界最高の耐熱性プラスチック (10% 重量減少温度 Td10 = 745°C) を開発することに成功した⁽⁶⁾。

また、海洋生分解性バイオプラスチックの開発では、環境刺激に反応して生分解性が発現する新しい分子設計をもとに、原料となるイタコン酸の生産を研究した。工業的なイタコン酸生産は糸状菌 *Aspergillus terreus* 等が利用されているが、原料がデンプンなどの可食資源であること、発酵阻害感受性が高く非可食資源であるリグノセルロースを利用できないことが課題となっている。そこで、リグノセルロースからイタコン酸を生産するために、発酵阻害耐性が高い *Coli* 型細菌を宿主に選定した。*A. terreus* 由来の *cis*-aconitate decarboxylase を高発現させた組換え株は、草本バイオマスであるソルガムの残渣糖化液と木本バイオマスである紙パルプの糖化液から、グルコースを炭素源とした場合と同程度あるいはそれ以上のイタコン酸を生産し、非可食資源であるリグノセルロースの糖化液を効率的に発酵原料として利用できることを明らかにした。発酵液から得たイタコン酸精は現在、海洋生分解性バイオナイロン合成に試供している。以上の異分野連携による学際的研究を通じて、バイオプラスチックは石化プラスチックで必要とされる物理化学的特性を満たせること、これらの新しいプラスチックは再生可能な植物バイオマスから生産可能であることを概念実証した。今後、さらなる微生物の機能改変と反応プロセスの効率化を進めることで、価格競争力のある生産体系の構築による早期社会実装を目指していきたい。

【謝辞】本研究は NEDO ムーンショット型研究開発事業 (JPNP18016)、JST 未来社会創造事業 (JPMJM17EG)、JSPS 科学研究費助成事業 基盤研究(B) (特設分野) (19KT0009) の支援を受けて実施した。

【Reference】

1. H. Kawaguchi et al., *Biochem Eng J.*, 88, 188-194 (2014).
2. H. Kawaguchi et al., *Bioresour Technol.*, 182, 169-178 (2015).
3. H. Kawaguchi et al., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 101, 5279-5290 (2017).
4. H. Kawaguchi et al., *Bioresour Technol.*, 198, 410-417 (2015).
5. H. Kawaguchi et al., *Microb Cell Fact.*, 20, 228 (2021).
6. A. Nag et al., *Adv Sustain Syst.*, 5, 2000193 (2021).

Microbial fermentation and bioprocessing for the production of unique bioplastics from cellulosic biomass

○Hideo Kawaguchi¹, Takashi Sazuka²

(¹EGBRC, Kobe Univ., ²Biosci. Biotech. Cent., Nagoya Univ.,)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, biomass, metabolic engineering, itaconic acid

2G07-05 光スイッチ機能を有するプラスチックの社会実装を目指す

○佐藤 治

(東理大・経営)

osato@rs.tus.ac.jp

内閣府が主導する「ムーンショット型研究開発制度」は、人々を魅了する野心的目標 (ムーンショット目標) を国が設定し、我が国発の破壊的イノベーションの創出を目指して、従来技術の延長にない、大胆な発想に基づく挑戦的な研究開発 (ムーンショット) を推進するものである。リ「ムーンショット型研究開発制度」には9つの目標が設定されている。われわれは、北陸先端科学技術大学院大学の金子達雄教授をプロジェクトマネージャーとし、8機関が共同して、目標4「2050年までに、地球環境再生に向けた持続可能な資源循環を実現」に対し、「光スイッチ型海洋分解性の可食プラスチックの開発研究」と題する研究開発提案を行い、採択された。本プロジェクトでは、海洋プラスチック問題解決への貢献を目指し、「使用時は十分な耐久性を持つ一方、海洋環境中における強い太陽光照射の下で光スイッチ生分解性を示すようになるプラスチック」の開発に取り組み中であり、ON型光スイッチ機能、OFF型光スイッチ機能を有するプラスチック、ON型とOFF型光スイッチ機能を併せ持つプラスチックの3つのタイプのプラスチックの実現を目指している。本プロジェクトでは、光スイッチ生分解性プラスチックや光触媒などの材料研究、バイオマス作物の品種改良研究、発酵研究、海洋での生分解性・安全性研究などの自然科学系の研究が推進されている。一方、「ムーンショット型研究開発制度」では、ハイリスク・ハイインパクトな研究開発の成果として、社会課題解決と我が国発の破壊的イノベーション創出の両立が期待されていることから、研究項目の一つとして「事業基盤強化・環境醸成」が盛り込まれており、自然科学系の研究と並行して社会実装に向けた活動に取り組んでいる。

イノベーションとは「社会的・経済的価値を創出すること」である。本プロジェクトでは、光スイッチ生分解性プラスチックを社会実装 (経済的価値の創出) することによって、海洋プラスチック問題の解決 (社会的価値の創出) を図るとともに、我が国発の破壊的イノベーションの創出に資することを目指している。イノベーションの端緒は研究シーズと社会・市場ニーズとのマッチングである。本プロジェクトは、光スイッチ生分解性プラスチックという研究シーズを基に発案されたものであり、研究シーズと社会・市場ニーズのマッチングを実現するためには、光スイッチ生分解性という原理を十分に理解し、原理を好適に活用できる用途を発見することが必要である。用途発見後は、その用途で求められる機能・特性 (要求機能・要求特性)、および制約条件を十分把握したうえで、要求機能・要求特性を実現するよう、機能構成を設計するとともに、それらの機能を実社会で実現する技術・部材の開発に取り組むこととなる。一方、社会実装を実現するためには企業の参画がかかせない。企業が本プロジェクトに参画し、実用化を成し遂げるためには、技術革新、資源動員などの革新的な企てを当該組織で継続することに対する妥当性を得る活動 (正当化) が必須であり、光スイッチ生分解性プラスチックの技術的な可能性を訴えることに加え、その用途や市場規模、さらにはバリューチェーンの構築などについて説得力のある説明を行い、組織内の合意を得る活動を推進する必要がある。加えて、本プロジェクトが目指す革新的な新技術を社会実装するには、本プロジェクトの技術・コンセプトが社会や国民の理解・賛同を得て受け入れられるよう、社会的受容性を高める活動が重要である。

社会実装に向けた上記課題を踏まえ、プラスチックのサプライチェーンを構成する企業や関連する研究に取り組む大学・公的研究機関からなる研究会「プラスチックの未来を考える会」を創設した。本研究会には、プラスチックの製造企業、使用企業、リサイクルに取り組む企業、リサイクル装置を製造・販売する企業などが参画し、プラスチックのサプライチェーンを幅広く包含する体制が構築されつつある。研究会を隔週1回開催し、プラスチック問題の全体像を把握するとともに、解決すべき課題を抽出し、その解決方法の議論を通して、光スイッチ生分解性プラスチックの原理を好適に活用できる用途の発見に努めている。また、プラスチックのサプライチェーンを構成する幅広い参画者の議論に基づく合意は企業の正当化活動を後押しする。合意された用途は社会・市場ニーズ、および実用化の可能性が高いことに加え、研究開発段階からサプライチェーン間の共創体制が築かれ、将来のバリューネットワーク構築の準備が整っていく。加えて、プラスチック問題の全体像を見据えつつ交わされる議論によって、見落としがちな課題や倫理的な問題にも焦点があてられ、社会的受容性が自ずと高まっていく。

今後も、自然科学系研究の進捗と歩調を合わせつつ、事業基盤強化・環境醸成活動を推進し、本プロジェクトの研究成果を基に我が国発の破壊的イノベーションを実現したいと考えている。

参考文献

- リ 国立研究開発法人科学技術振興機構ムーンショット型研究開発事業ホームページ, <https://www.jst.go.jp/moonshot/> (2022年7月17日参照)

Aiming for social implementation of photo-switching plastics

○Sato Osamu

(Sch. Mgmt., Tokyo Univ. Sci.)

Key words innovation, social implementation, photo-switching, marine-degradable

10月19日(水)

受賞講演 (8:45 ~ 9:00)

〈生物工学若手賞〉

受賞者 高橋 将人 (筑波大・生命環境系)

ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開 3A01-A1 p. 147

〈生物工学若手賞〉

受賞者 徳山 健斗 (中外製薬)

バイオ生産プロセスのデジタルトランスフォーメーションに向けた先進技術研究
3C01-A1 p. 147

一般講演 (9:00 ~ 12:00)

酵素学, 酵素工学	3A01, 3A03	p. 148, 151
遺伝子工学	3B02, 3B04	p. 154, 157
発酵生理学, 発酵工学/代謝工学	3C01	p. 159
発酵生理学, 発酵工学/代謝工学/オミクス解析	3C03	p. 163
醸造学, 醸造工学/食品科学, 食品工学	3D02, 3D04	p. 166, 168
環境工学, 廃水処理技術/バイオマス, 資源, エネルギー工学	3E01	p. 171
バイオマス, 資源, エネルギー工学	3E03	p. 174
生物化学工学/バイオプロセス/培養工学	3F02	p. 177
培養工学/生物化学工学	3F04	p. 180
セル&ティッシュエンジニアリング	3G01, 3G03	p. 183, 186

シンポジウム (13:30 ~ 15:30 / 16:00 ~ 18:00 (18:15))

シンポストバイオの潮流～腸内代謝物の有益性と商品化	3A06	p. 190
健康長寿に貢献するこれからの醸造発酵技術【本部企画】	3A07	p. 192
KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 第一部		
メタボリックエンジニアリングを用いた持続可能なバイオテクノロジーの展開		
【本部企画・国際シンポジウム】	3C06	p. 194
〈招待講演 (台湾生物工学会)〉	3C06-01	p. 194
〈招待講演 (韓国生物工学会)〉	3C06-02, 3C06-04	p. 195, 196
アジアにおけるバイオプロダクションの現状と未来		
～SDGsの達成を目指して～【国際シンポジウム・関西支部】	3C07	p. 197
ゲノム編集食品の未来を語り合う		
～技術から法規制, 実用化事例まで～【関西支部】	3E06	p. 200
植物由来のバイオプロダクションの新潮流	3E07	p. 202
加速する次世代抗体の実用化に向けた取り組み	3G06	p. 204
KSBB-BEST-SBJ ジョイントシンポジウム 第二部		
ナノバイオテクノロジーとナノメディシンの最先端研究		
【本部企画・国際シンポジウム】(～18:15)	3G07	p. 206
〈招待講演 (韓国生物工学会)〉	3G07-01, 3G07-03, 3G07-05	p. 206, 207, 208
〈招待講演 (台湾生物工学会)〉	3G07-04	p. 208

受賞講演 (15:45 ~ 16:00)

〈生物学アジア若手賞〉	3G07-A1	p. 206
受賞者 Jonghoon Choi ^{1,2,3} (1 Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., 2 Dept. Chem. Bio. Eng., Univ. of Pennsylvania, 3 Nanomedicine Corp.)		
“Nanoscale liposomes encapsulating oxygen saturated buffers for the reverse of hypoxia and drug delivery”		
〈生物学アジア若手研究奨励賞 (DaSilva 賞)〉	3C07-A1	p. 197
受賞者 Yu Wang (Tianjin Inst. Ind. Biotechnol., Chin. Acad. Sci.)		
“Development of genome engineering technologies for de novo design and construction of microbial cell factories”		

3A01-A1 <受賞講演 (生物工学若手賞)>

ガス環境に着目したラボスケールの液内振盪培養法の深化と新展開

○高橋 将人

(筑波大・生命環境系)

takahashi.masato.fn@u.tsukuba.ac.jp

本テーマの原点は、私が学生時代に見出した新奇な現象（振盪フラスコ培養中のサンプリング操作に含まれる培養栓の閉封により、培養微生物群集構造が変化する）である。この新奇な現象を起点に、現在に至るまで以下の4つの研究を展開している。

A. 新奇な現象の解析と利用

サンプリング過程の培養栓の閉封に注目し、培養栓の閉封操作（無菌的な30秒間）の厳密な対照実験を通じて、同様の新奇な現象が生じることを明らかにできた。新奇な現象の解明には既存の実験機器では不十分であり、振盪を中断せずに気相部や培養液の酸素（O₂）や二酸化炭素（CO₂）濃度をモニタリングでき、培養液のサンプリングもできるシステム（Circulation Direct Monitoring and Sampling System: CDMSS）を開発した。開発したバイパス型モニタリングシステム CDMSS を用いて新奇な現象の解明に取り組んだ結果、振盪培養中のフラスコ気相部のガス組成は新鮮空気と比べて大きく異なり、経時的に変動することが明らかとなった。本来、振盪培養中のフラスコ気相部は培養液中の微生物の呼吸活性に依存して変化するが、新奇な現象は外因的要因（強制換気による溶存 CO₂ 濃度の低下）により引き起こされることが明らかとなった。このような外因的要因を模倣することで振盪培養中に形成する培養微生物群集構造を変化させるシステムも開発した。間欠的なガス通気によって、これまでとは異なる新たな微生物群集の集積が期待できる。現在、得られた知見に基づき集積させた放線菌群から新種の放線菌の分離に取り組んでいる。

B. サンプリング過程の詳細な解析と利用

本研究の原点である振盪フラスコ培養中のサンプリング過程の理解を深めるために、これまでに得られた知見から CO₂ に注目し、培養栓の閉封ではなく、火災殺菌に焦点をあてた。無菌操作中の火災殺菌で生じる高濃度の CO₂ を含む燃焼ガスが、フラスコ気相部へ巻き込まれることを CDMSS による実測と Computational Fluid Dynamics によるシミュレートで実証した。また、フラスコ口をガスバーナーで炙る際の操作時間や操作角度によってフラスコ内の CO₂ 蓄積が異なることが明らかとなった。火災殺菌で生じる CO₂ の濃度上昇のみを模倣し、振盪フラスコ培養した結果、増殖が増大する微生物種とほとんど変化しない微生物種が存在した。現在、予備実験の段階ではあるが、CO₂ の間欠的通気を活用し得られた放線菌の培養懸濁液から従来とは異なる抗菌活性を見出している。

C. 気相部に着目した様々なフラスコ条件の詳細な解析

振盪フラスコ培養中の気相部は複雑であり、CDMSS のモニタリング条件を種々検討し、CO₂ や O₂ の鉛直方向への濃度勾配の存在を明らかにした。これは、従来のダイレクト型（独自に開発した CDMSS はバイパス型）のモニタリングでは解明できなかった重要な知見の一つである。鉛直方向の濃度勾配が形成しにくいフラスコ（≒CO₂ が蓄積しにくい形状）を作成するために換気能力を評価した結果、既存のフラスコを用いた振盪条件下では、CO₂ 換気能力は O₂ 供給能力とトレードオフの関係にあった。また、種々の通気性のある培養栓も評価しているが発泡素材や形状により換気能力が異なり、その能力差は振盪培養に影響を及ぼすことが明らかとなった。現在、新奇なフラスコを創出するためにトレードオフの関係性を打破する小型デバイスを開発している。

D. 振盪培養中のフラスコ気相部のガス濃度を一定にした制御

フラスコ気相部のガス環境は培地と同様に重要な培養因子であることは、好気的な培養でも強く示唆される。気相部をモニタリングしている CDMSS に CO₂ 吸着剤を付与することで、気相部の CO₂ 濃度を低く抑え、溶存 CO₂ 濃度を低く維持して振盪培養できた結果、増殖が増大した微生物が存在した。一方で、CDMSS とガスシリンダーを Proportional-Integral-Differential 制御で連結し、フラスコ気相部の CO₂ 濃度を一定に維持することで、増殖が増大した微生物種も存在した。現在、大掛かりな制御システムを用いることなく、液内振盪培養法の利便性を維持した培養器内のガス環境制御システムを構築している。

約95年前に考案された振盪フラスコ培養法は、微生物培養の根幹の技術であり国内外に普及しているが、発展途上であると考えられる。その要因として、専用の解析機器やモニタリングシステムが少なかったことが挙げられる。近年では、欧州を中心に次世代型の振盪フラスコ培養法が提案されつつあるが、従来法との互換性が乏しい。そのような背景の中、私は独自に見出した現象を活かし、上述のように従来法で設定できる培養条件（意図せず設定している条件を含める）を明確化し、液内振盪培養法の改革を試みている。

今後、上述で得られた知見や開発したデバイスやシステムを、バイオプロセス開発の上流で実践し、生物学会会員として社会実装できる研究に昇華させ、産官学を介して積極的に培養工学に貢献する所存です。最後になりますが、数多くの方々のご協力のもとで研究を遂行しております、心より厚く御礼申し上げます。

Deepening and development of submerged-shaking culture focused on gaseous environment at lab-scale

○Masato Takahashi

(Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words carbon dioxide, gas-controlled device, monitoring device, shake-flask culture

3C01-A1 <受賞講演 (生物工学若手賞)>

バイオ生産プロセスのデジタルトランスフォーメーションに向けた先進技術研究

○徳山 健斗

(中外製薬)

tokuyama.kento26@chugai-pharm.co.jp

人工知能やクラウドなど高度なデジタル技術の発展により、ここ数年の間で社会や人々の暮らしは著しく変化してきた。生物工学分野においても、実験室における研究開発プロセスから実際の生産現場の製造プロセスに至るまで、デジタルトランスフォーメーション (DX) によるプロセス革新が進んでいる。

研究開発プロセスでは、化合物の設計や宿主の育種、培養プロセスや精製プロセスの開発を対象とした技術開発が進んでいる。育種においては、ゲノムスケール代謝モデルを用いることで、生産宿主とターゲット化合物を入力とした、生合成に必要な外来遺伝子と破壊または強化すべき代謝反応や遺伝子のゲノムワイドな探索が *in silico* で行えるようになった。タンパク質工学においては、AlphaFold2 によるアミノ酸配列からの高次構造推定モデルが登場すると共に、アミノ酸配列を入力とする深層学習を用いた配列最適化技術の開発によりペプチドや抗体、酵素などの機能改善がデータ駆動型で行えるようになった。プロセス開発においては、マテリアルズインフォマティクス業界で実績のある機械学習モデルの逆解析やベイズ最適化によるデータ駆動型の条件探索や最適化技術の利用も進んでいる。これらの手法とラボオートメーション技術を組み合わせることで、より高効率にプロセス開発やバイオ化合物の配列設計が行える。

バイオ生産プロセスの製造現場では、機械学習やシミュレーターを用いた計測と制御のデジタル化が進んでいる。計測技術においては、既存の計装設備からオンライン取得可能なプロセス運転データから、培養槽内の目的物質濃度や菌体濃度、残糖濃度などを機械学習により推定するソフトセンサを開発した。機械学習による推論パイプラインを作ることで、実プラントに適した複雑な数理モデルや化工計算を行わず、生データから直接での推定が可能となった。敷設済みの計装設備から取得可能なデータのみでソフトセンサモデルを開発したが、培養プロセスの監視目的に対して十分高い推定精度が得られており、他のハードセンサの追加投資は不要であることが示唆された。制御技術においては、次の制御区間までの目的物質生産量を推定するアンサンブルモデルを構築し、モデル予測制御による軌道追従制御技術を実証した。従来の実生産プロセスでは、培養途中で人為的に生産条件を変更する事が難しく生産量が不安定になりがちであったが、本技術により自律的に生産の振れを安定化できることが示唆された。人工知能をはじめとするデジタル技術の成長は著しく、生物工学分野においても様々な技術開発や応用が進んでいる。GitHub などのパブリックリポジトリにおいて、様々なソフトウェアやツールがオープンソースソフトウェアとして公開されており、web サイトや youtube などでの学習コンテンツも多く存在している。従来は、計算リソースの確保や環境構築も課題であったが、近年のクラウドサービスの普及によりオンデマンドで手軽に利用できるようになった。これらの状況を鑑みて、今の時代の研究者は実験手法や材料を選ぶのと同様に、研究テーマに併せて適切なデジタル技術を活用するのが当たり前になる。本講演では生物工学分野におけるデジタル技術開発事例について紹介し、今一度私たちの未来に目指す姿を議論したいと思います。

Advanced technology for digital transformation of bio-production process

○Kento Tokuyama

(Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.)

Key words digital transformation, machine learning, data science, bioproduction

3A01-01 光増感剤/組換え大腸菌ハイブリッド系による可視光駆動型水素生産

○丸山 季穂, 藤井 浩, 本田 裕樹
(奈良女子大・化学生物環境)
honda@cc.nara-wu.ac.jp

【目的】無機半導体や色素等の非生体触媒による光増感反応と、酸化還元酵素を組み合わせたバイオハイブリッドは、非生体触媒の安定性と、酵素の高効率な物質生産の両者の長を組み合わせた革新的なバイオ技術の創製につながる。本公演では、光増感剤(色素エオシン Y)と水素生成酵素[FeFe]-ヒドロゲナーゼを組み合わせた可視光駆動型水素生産系の構築について報告する¹⁾。また、光増感剤から酵素への電子伝達経路の解析について併せて報告する。

【方法】*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来の[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群を導入した組換え大腸菌を用いた。当該菌体(湿菌体 0.1 g)、光増感剤[色素エオシン Y(EY)] (0.1 mM)、電子供与剤トリエタノールアミン(TEOA) (100 mM)を含む反応溶液(pH 8)を調製(30 ml)し、ヘッドスペースを Ar に置換し、反応溶液へ照射し水素生成量を経時的に測定した。光源には 530 nm LED を用い、反応は 25°C で実施した。電子伝達経路の解析に向け、励起 EY (EY*) の蛍光寿命の TEOA や精製ヒドロゲナーゼの量への依存性を検討した。

【結果と考察】反応溶液への照射による水素生成が確認された。一方、ネガティブコントロール群(遺伝子未導入の大腸菌、暗条件など)では水素は検出されず、光増感剤/組換え大腸菌細胞系による可視光駆動水素生産に成功した¹⁾。本系水素生成の見かけの量子収率(530 nm)は 14%程度を示し、高活性な酵素を用いるハイブリッドの有効性を示した。本反応系の電子伝達を EY の蛍光強度や蛍光寿命の点から調べた。EY* は TEOA により還元されて EY^{-•} を生じ、EY^{-•} から酵素に電子伝達されて水素が生成する機構が示唆された。

1) *Catal. Sci. Technol.*, 2020, 10, 6006-6012.

Visible light-driven hydrogen production by abiotic photosensitizer/recombinant *Escherichia coli* hybrid system

○Kiho Maruyama, Hiroshi Fujii, Yuki Honda
(Dept. Chem. Biol. Environ. Sci., Nara Women's Univ.)

Key words Eosin Y, hydrogen production, hydrogenase, photosensitizer

3A01-02 Biochemical analysis of citrate synthase from the red alga *Cyanidioschyzon merolae* for increased organic acid production

○Maki Nishii, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)
tosanai@meiji.ac.jp

In recent years, with the demand for sustainable material production, the photosynthetic red alga *Cyanidioschyzon merolae* has attracted attention. In *C. merolae*, there has been much research on material production, such as lactate for bioplastics, but not much basic research on the enzymes that make up the metabolic pathways. Among metabolic pathways, the tricarboxylic acid (TCA) cycle is an important metabolic pathway for energy production, in which the enzyme citrate synthase catalyzes the first step, the conversion of oxaloacetate and acetyl CoA to citrate. In this study, we biochemically characterized citrate synthase (*CmCS*) from *C. merolae* and elucidated the effects of ions and amino acids.

CmCS was purified from *Escherichia coli* as a recombinant protein by affinity chromatography, and *CmCS* activities were measured by absorbance change at 412 nm.

CmCS activities were measured under optimal conditions for *CmCS* activity (48°C, pH 7.8), with substrate concentrations fixed at K_m values and various metabolites added. *CmCS* activity decreased to 19% in the presence of 100 mM KCl. *CmCS* activity showed no catalytic activity in the presence of 100 mM MgCl₂, CaCl₂ and MnCl₂, respectively. The effect of basic amino acids on *CmCS* activity were examined. *CmCS* activity decreased to 84% in the presence of 100 mM arginine and to 89% in the presence of 100 mM lysine. In the future, we will investigate the effect of cations on *CmCS* activity at pH other than the optimal pH for *CmCS*.

Biochemical analysis of citrate synthase from the red alga *Cyanidioschyzon merolae* for increased organic acid production

○Maki Nishii, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words TCA cycle, citrate synthase, biochemistry, *Cyanidioschyzon merolae*

3A01-03 Study on the enzymatic synthesis of chiral trifluorolactic acid by lactate dehydrogenase

○Jingfei Wu¹, Aem Nuylert¹, Misako Iwaki¹, Shinsuke Miki², Yasuhisa Asano¹
(¹Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ²Central Glass Co., Ltd.)
asano@pu-toyama.ac.jp

Chiral trifluorolactic acid (TF-LA) is a versatile intermediate for the synthesis of pharmaceuticals and materials. For the synthesis of chiral trifluorolactic acid, reduction of the corresponding pyruvate is a feasible strategy. Lactate dehydrogenase belongs to the class of oxidoreductases. This study aims to synthesize chiral trifluorolactic acid from trifluoropyruvate catalyzed by lactate dehydrogenase and formate dehydrogenase in high yield and excellent stereoselectivity. Lactate dehydrogenases were screened from the database. The *ldh* genes encoding LDHs from *Rattus norvegicus* (4AJ1), *Gallus gallus* (5K0Z), *Sus scrofa* (5LDH), *Leuconostoc mesenteroides* (DLmLDH), *Lactiplantibacillus plantarum* (DLpLDH), and *Ligilactobacillus saerimneri* (LsLDH) were cloned, and all recombinant LDHs were successfully expressed with a histidine tag in *Escherichia coli* (DE3). After adding NADH-regeneration system with formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, 50 mM of (S)-TF-LA can be synthesized by L-LDH as well as 50 mM of (R)-TF-LA can be synthesized by D-LDH with a > 99.9% ee value. In this study, asymmetric synthesis of TF-LA has successfully achieved via L-LDH and D-LDH combination with FDH for NADH-regeneration, which expanded the asymmetric synthesis of chiral fluoroorganic compound.

Study on the enzymatic synthesis of chiral trifluorolactic acid by lactate dehydrogenase

○Jingfei Wu¹, Aem Nuylert¹, Misako Iwaki¹, Shinsuke Miki², Yasuhisa Asano¹
(¹Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ²Central Glass Co., Ltd.)

Key words lactate dehydrogenase, asymmetric synthesis

3A01-04 微生物酵素反応による新たな有用 S-置換システインスルフォキシド供給経路の構築

○水谷 拓¹, 原 良太郎¹, 竹内 道樹¹, 日比 慎², 上田 誠³, 小川 順¹
(¹京大院・農, ²富山県大・工, ³小山高専)
ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】ネギ属植物に由来する S-置換システインスルフォキシドは、抗糖尿病活性などの有用な生理機能を有するため、注目を集めている。本化合物の主な供給源は植物であり、栽培や抽出の煩雑さなど課題が多いため、実用的な生産法が求められている。我々はこれまで、安価な原料から S-置換システインスルフォキシド合成に必要な酵素を探索し、S-置換システイン合成にトリプトファンシクターゼ(TrpAB)¹⁾、スルフォキシド化に L-イソロイシンジオキシゲナーゼ(IDO)を見出している。本研究では、当該酵素遺伝子の共発現大腸菌を触媒とし、多様な S-置換システインスルフォキシドをワンポットで合成するバイオプロセスの構築と反応条件の最適化を行った。

【方法・結果】まず、モデル反応としてアリイン合成を検討した。アリルメルカプタン、L-セリン、および α-ケトグルタル酸を原料とし、*trpAB*・*ido* 共発現大腸菌を触媒とし反応を行ったところ、ワンポットでアリインを合成できた。しかし、中間体の分解に起因すると考えられる収率の低下が見られた。我々は、宿主内トリプトファンシクターゼ遺伝子が中間体 S-アリルシステインの分解を担うことを見出している²⁾。そこで、当該遺伝子破壊株を宿主とし反応に供した結果、アリイン合成量は最大 60 mM (10 g/L) に達した。一方、アリルメルカプタン以外に様々なチオールを検討したところ、対応する S-置換システインスルフォキシドが合成できた。具体的には、メチンなど天然物のみならず、天然には報告のない S-フェニルシステインスルフォキシドなどの化合物も合成可能であった。よって、本プロセスは多様な S-置換システインスルフォキシドの合成法として期待できる。

1) 水谷ら、日本農芸化学会 2022 年度大会 (4B09-05)
2) T. Mizutani *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* in press, doi: 10.1016/j.jbiosc.2022.06.001

Development of microbial enzyme process for bioactive S-substituted cysteine sulfoxides synthesis

○Mizutani Taku¹, Hara Ryotaro¹, Takeuchi Michiki¹, Hibi Makoto², Ueda Makoto³, Ogawa Jun¹
(¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., ³NIT, Oyama College)

Key words S-substituted cysteine sulfoxide, bioactive compound, garlic, bioprocess

3A01-05 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来グルコース転移酵素 XgtA を用いた alpha-グルコシルグリセロールの酵素的合成

○坂野 正季¹, 曹 偉¹, 石井 義孝², 桐村 光太郎^{1,2}
(¹早大院・先進理工・,²早大・理工総研)
kkohtaro@waseda.jp

【目的および方法】

XgtA は、当研究室保有菌株である *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来の α -グルコース転移酵素(EC 3.2.1.20)であり、マルトースをグルコース供与体としてアルコール性またはフェノール性のヒドロキシ基に対してグルコース転移活性を示す[1,2]。一方、グルコシルグリセロール(GG)は保湿効果など有用な機能を示すことから、機能性食品等への応用が期待されている。本研究では、マルトースとグリセロールを基質として、XgtA を利用した α GG の酵素的合成について検討した。

【結果および考察】

α GG 生産のための最適反応条件について検討した。また、反応の進行とともに増大するグルコースによって XgtA が阻害されることが明らかになっているため[2]、グルコースイソメラーゼ(GI)を反応溶液に添加してグルコースをフルクトースに変換し、阻害の軽減を試みた。pH 8.0、温度 40 °C、マルトース濃度 1.2 M、グリセロール濃度 1.8 M、XgtA 濃度 5.0 U/mL、GI 濃度 3000 GIU/mL を最適条件と決定し、24 時間の反応では 794 mM の α GG が生産された。XgtA による反応の特長として、マルトリオース等のマルトリオ糖の副生は見られなかった。一方、生成物を HPLC で単離し、NMR によって構造決定を行った。生成物は、(2R)-1-O- α -glucosylglycerol、(2S)-1-O- α -glucosylglycerol、2-O- α -glucosylglycerol であり、この順番に 70 : 25 : 5 の割合で生成していることが判明した。1-O- α GG の生産量としては 754 mM であり、既報の酵素的合成では最大量を達成した。

[1] T. Sato, et al., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 80, 20-27 (2012).

[2] K. Kiritura, et al., J. Biosci. Bioeng., (2022) <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.06.012> (in press)

Enzymatic synthesis of alpha-glucosylglycerol using XgtA, an alpha-glucosyl transfer enzyme, derived from *Xanthomonas campestris* WU-9701

○Sakano Masaki¹, Cao Wei¹, Ishii Yoshitaka², Kiritura Kohtarou^{1,2}

(¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *Xanthomonas campestris*, glucoside, alpha-glucosidase, glucosylglycerol

3A01-06 化学酵素的アミド結合形成反応を利用したポリアミド合成への展開

○鈴木 達也¹, 唐鎌 翔大¹, 鈴木 伸², 木野 邦器^{1,2}
(¹早大院・先進理工・,²早大・理工総研)
kkin@waseda.jp

【背景】

アミド化合物は医薬品や機能性素材など幅広い用途に利用される有用化合物である。我々はアデニル化酵素を利用した革新的な化学酵素的アミド結合形成反応を開発しており、キラリティを制御したジペプチドをはじめ構造多岐にわたる様々なアミド化合物の合成に成功している¹⁾。本研究では、当該技術をさらに拡張させて、機能性素材として工業的利用が期待されるポリアミド化合物の合成法への展開を目指し、その可能性を検証した。

【方法・結果】

化学酵素的アミド結合形成反応では、アデニル化酵素による基質カルボン酸のカルボキシ基の活性化と他基質のアミノ基による求核置換反応によりアミド結合が形成される。したがって、本反応において、アデニル化されるカルボキシ基に加え求核攻撃を担うアミノ基を有する化合物を基質とすればホモポリアミドの合成が可能と考えた。そこで、8 種類の L-アミノ酸及びその D-アミノ酸を単独基質として反応させたところ、全てのアミノ酸に対してオリゴマー生成を確認できたが、生成したポリアミノ酸の鎖長は基質アミノ酸の嵩の大きさに相関して 4-9 残基となった。

また、アデニル化酵素を利用するアミド化合物合成とクリック反応を連携させたポリアミド合成も検討した。両末端にクリック反応の反応部位を有する二官能性アミド化合物の合成を試みたところ、クリック反応の 1 種である Huisgen 反応の反応部位 N₃ および C=C を有するアミド化合物や、Thiol-ene 反応の反応部位 SH および C=C を有するアミド化合物の合成に成功した。これら化合物を基質としてクリック反応を引き起こすと、そのアミド化合物をモノマー単位とするオリゴマーの合成が確認でき、クリック反応との連携によるポリアミド合成への展開の可能性を見出した。

1) R. Hara, et al., Sci. Rep., 8:2950 (2018)

Application of chemoenzymatic amide bond formation to polyamide synthesis

○Tatsuya Suzuki¹, Shota Karakama¹, Shin Suzuki², Kuniki Kino^{1,2}

(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words chemoenzymatic reaction, amide bond formation, adenylation, polyamide

3A01-07 固定化ラン藻 *Nostoc* sp. 由来酵素 (NsPCS) を用いた機能性食品素材候補化合物 γ -グルタミルシステインの生産

○中井 拓也¹, 大野 萌華¹, 村岡 未彩¹, 松浦 秀幸¹, 長野 一也^{1,3}, 荒井 雅吉¹, 宇山 浩⁴, 平田 善彦^{1,2}, 平田 収正^{1,3}
(¹阪大院・薬,²サラヤ (株), ³和歌山医大・薬,⁴阪大院・工)
araim@phs.osaka-u.ac.jp

慢性的な酸化ストレスが、アルツハイマー病などの慢性疾患の発症・増悪と関連していることは広く報告されており、抗酸化物質による食品への機能性付与は重要な課題であると考えられる。グルタチオン (GSH) は、生体内の酸化ストレス防御において重要な役割を果たしており、慢性疾患の進行を緩やかにするために、GSH レベルを正常に維持することが有効だと考えられるが、これまでの研究から外部から GSH を投与しても細胞内 GSH 量は変化し難いことが示されている。最近、GSH の生合成前駆体である γ -グルタミルシステイン (γ EC) の投与により GSH レベルが上昇し、認知症の改善や神経細胞の保護が示されることが報告され、慢性疾患の予防や緩和作用が期待されている。しかし、 γ EC は、GSH に比べて非常に高価であり機能性食品として利用が難しい。そこで我々は補因子等を必要とせず GSH から加水分解によって Gly を切り出し、 γ EC を生産する淡水生ラン藻 *Nostoc* sp. 由来の酵素 (NsPCS) に着目した。過去の研究で発表者らは γ EC 生産系として NsPCS のセルロースへの固定化を実施し、0.1 mL スケールにおける γ EC 生産系の構築に成功していた。本発表では、反応条件を検討することにより、生産系を 10 mL スケールまで拡大し、時間あたり γ EC の生産量を従来の 100 倍以上に高めることに成功したため、これを報告する。

まずバッチ生産によりセルロース基材を選抜し、反応温度・基質濃度の検討の最適化を行った後、連続生産系でも同等の結果を示すことを確認した。これにより、従来のモノリスカラムでは困難であったスケールアップに対応可能なバックカラムの作成を達成し、カラム体積あたりの γ EC 変換量がモノリスカラムと同等程度であることを確認した。また、過去のモノリスカラムよりも大スケールでの変換を実施し、スケールアップが容易であることも確認した。

Gamma-glutamylcysteine, a candidate for functional food ingredients, production using immobilized NsPCS enzyme derived from *Nostoc* sp.

○Takuya Nakai¹, Moeika Ohno¹, Misa Muraoka¹, Hideyuki Matsuura¹,

Kazuya Nagano^{1,3}, Masayoshi Arai¹, Hiroshi Uyama⁴, Yoshihiko Hirata^{1,2}, Kazumasa Hirata^{1,3}

(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ²Saraya Co., Ltd., ³Sch. Pharm., Wakayama medical Univ., ⁴Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words enzyme, enzymatic hydrolysis, immobilized enzyme

3A01-08 長鎖ポリアミンの鎖長がシリカ重合活性に与える影響の評価

○中杉 行秀, 舟橋 久景, 石田 文典, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 池田 文
(広島大院・統合生命科学)
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

ケイ素は地殻中に酸素に次いで 2 番目に多く存在する元素であり、主に鉱物の主成分として存在している。一部の生物は可溶性のケイ酸 ($\text{Si}(\text{OH})_4$) を生体内に取り込み、重合したシリカ (SiO_2) を骨格や殻などとして利用している。代表的なシリカ形成生物である珪藻や海綿のシリカ内部からは共通して長鎖ポリアミン (LCPA) が発見されており、本物質がシリカ形成に何らかの役割を果たしていると考えられる。当研究室では、土壌細菌である *Bacillus cereus* が胞子表面にシリカの層を形成することを発見した。また、本菌のシリカ内部にも同様に LCPA が存在することを明らかにした。本菌の LCPA は一般的なポリアミンであるプロレシンの一端にアミノプロピル基が多数連結した構造を持っていた。当研究室のこれまでの研究によって、LCPA 合成酵素を世界で初めて同定し、組換え大腸菌を用いた LCPA の生産が可能になった。

現在、LCPA の機能解明に向けて、LCPA がシリカ重合に与える影響の評価を行っている。前回の本大会にて、組換え大腸菌で生産した LCPA をシリカ粒子との静電的な親和性を利用して精製する方法を開発したことを報告した。精製した LCPA は一般的な短鎖のポリアミンと比較して非常に高いシリカ重合活性を示した。本発表では LCPA の鎖長がシリカ重合に与える影響について報告する。HPLC を用いて LCPA を鎖長に応じて分離し、各成分のアミノ基濃度をそろえてシリカ重合活性を比較した。その結果、10 前後のアミノ基を有する LCPA が最も高い活性を示すことが明らかとなった。LCPA が有している複数のアミノ基が複数のケイ酸分子と同時に相互作用し、ケイ酸分子同士を近接させてシリカへの重合を促していると考えられる。

Effect of chain length of long-chain polyamines on silica polymerization activity

○Yukihide Nakasugi, Hisakage Funabashi, Takenori Ishida, Ryuichi Hirota,

Akio Kuroda, Takeshi Ikeda

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

Key words long-chain polyamine, silica, *Bacillus cereus*, biomineralization

3A01-09 クラウディング環境が微生物由来トランスグルタミナーゼの架橋触媒挙動に与える影響

○佐藤 峻¹, 南畑 孝介¹, 若林 里衣¹, 後藤 雅宏^{1,2}, 神谷 典穂^{1,2}
 (¹九大院・工, ²九大・未来化セ)
 kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【緒言】

タンパク質の機能評価は、通常、希薄水溶液中で実施される。しかし、生体内でタンパク質が機能を発揮する環境は、生体高分子が高濃度含まれる分子クラウディングの状態にある。当該環境中では酵素の触媒挙動が変化することが知られ、主に小分子の加水分解や転換反応についての報告がなされてきた。しかし、架橋反応を触媒する酵素についての報告は少ない。本研究では、異なる基質間を共有結合で連結する酵素、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に注目した。MTG は特定のグルタミン (Q) 及びリジン (K) 残基間でイソペプチド結合形成反応を触媒する。本発表ではクラウディング環境において分子量の異なる様々な基質を MTG によって架橋し、その触媒挙動の理解を目指す。

【実験及び結果と考察】

遺伝子工学的手法により、MTG の反応点を含む青色及び緑色蛍光タンパク質を構築した (TagBFP-LLQG, EGFP-MRHKGS)。ここで、MTG により両者が架橋され、ヘテロ二量体 (mTagBFP-EGFP) になると蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が観察されることから、FRET 挙動をもとに架橋産物の生成速度を評価した。また、クラウディング環境は Dextran 60kDa (Dex) を用いて調製した。基質タンパク質と MTG を、PBS 及び 15 wt% の Dex を含む PBS 溶液に混合し、2-60 分後に各水溶液中に生じたヘテロ二量体の生成速度を、FRET によって追跡した。その結果、Dex を含む PBS 溶液中では、PBS 中と比較してヘテロ二量体の形成速度が早くなる挙動が確認された。これは Dex による排除体積効果により、MTG とタンパク質基質間の複合体形成が促進された結果であると考えられる。本発表では、クラウディング環境における蛍光小分子同士、蛍光小分子とタンパク質間の架橋挙動と、MTG の触媒挙動が変化するメカニズムについて併せて考察する。

Effect of molecular crowding environment on cross-linking reaction catalyzed by microbial transglutaminase

○Ryo Sato¹, Kosuke Minamihata¹, Rie Wakabayashi¹, Masahiro Goto^{1,2},
 Noriho Kamiya^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²FCF, Kyushu Univ.)

Key words micribial transglutaminase, molecular crowding

3A01-10 鯉節カビ *Aspergillus* 属糸状菌による鯉節(荒節)の燻煙香成分の代謝分解

○米子 響¹, 藤原 卓巳¹, 木村 行宏¹, 竹中 慎治¹, 土居 幹治²
 (¹神戸大院・農, ²マルトモ)
 stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】鯉節は鯉肉を煮熟・焙乾した荒節と荒節に *Aspergillus* 属糸状菌を利用してかび付け発酵を行った枯節に大別される。この発酵熟成に関わる好乾性糸状菌は、鯉肉を煮熟・煤乾した際に付着する燻煙香成分 (メトキシフェノール類; MPs, ピラジン類; Pyzs) の分解や低減を担っている。本研究では、MPs および Pyzs の代謝産物の同定を行い、鯉節カビにおける代謝系を推定することを目的とした。

【方法】既報の方法^{1,2)}を参考に、当研究室保有株を MY20 培地に液体培養した後、MPs または Pyzs を添加し、更に数日間培養後、ジエチルエーテルを用いて抽出を行った。生成物の同定と定量は、GC-MS 分析による。また、培養した菌体から RNA を抽出し、パニリン代謝に関わる遺伝子の発現解析を行った。

【結果と考察】試験した 5 種類の化合物の中で、パニリン以外の 4 種類はその水酸基が O-メチル化された化合物へと代謝された。一方、パニリンは、パニリン酸やメトキシヒドロキノンを等を経て代謝されることがわかった。パニリンの代謝に関わる遺伝子群の発現解析とともに、パニリン酸がさらにプロトカテキン酸に代謝される経路とメトキシヒドロキノンに代謝される 2 種類の経路が存在すると考えた。一方、Pyzs は 20~30% が代謝されていたが、代謝中間体の蓄積は見られなかった。したがって、5 種の試験菌株間において、MPs および Pyzs に対する代謝特性に相違は見られたことから、燻煙香の低減には複数種のカビが関わると思われる。

1) Yamauchi and Doi, Biosci. Biotechnol. Biochem., (1997) 61: 1386-87
 2) Takenaka et al., Int. J. Food Microbiol., (2020) 327: 108654

Metabolism of *O*-methoxyphenolic compounds in smoked katsuobushi in *Aspergillus* spp.

○Yonago Hibiki¹, Fujiwara Takumi¹, Kimura Yukihiro¹, Takenaka Shinji¹,
 Doi Mikiharu²
 (¹Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., ²Marutomo Co., Ltd.)

Key words katsuobushi fermentation, *O*-methoxyphenol, vanillin, xerophilic *Aspergillus* spp.

3A01-11 ブタ糞から単離された乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の遺伝的多様性と有機酸産生

○保科 涼¹, 板谷 かねで¹, 宮本 浩邦^{1,2,3}, 児玉 浩明¹
 (¹千葉大院・園芸, ²理研・生命医科学, ³サーマス)
 kodama@faculty.chiba-u.jp

未利用の海産資源を高温下で発酵させた好熱菌発酵産物をブタに給与すると、死産率の低下、成長促進、筋肉中の余分な脂肪分の減少などの生理作用を示す。同時にブタ排泄物中の乳酸含量が低下することから、乳酸代謝に関わる腸内細菌叢の変化が示唆された。実際に菌叢を解析すると、好熱菌発酵産物給与区では、ブタで代表的な乳酸資化菌 *Megasphaera elsdenii* の有意な増加が確認され、当研究室では、独自の選択培地を用いて、rep-PCR で区別される *M. elsdenii* 株 (Y1, Y2, Y6, M11, M17, M215) をブタの糞から単離した。標準菌株と比較して、これらの単離株はすべて、吉草酸を多く産生した。これらの単離株を代表して Y2 株および標準菌株の全ゲノム配列解析を行い、標準菌株と Y2 株の間に、大規模に変異がみられるゲノム領域を見出した。本研究では、当該ゲノム領域の構造を単離株ごとに同定し、単離株に共通して観察される吉草酸産生との関連について検討した。

Y2 株の変異領域には、ORF が 11 個あり、そのすべての ORF が、標準菌株の当該ゲノム領域に見いだされる ORF とは異なっていた。PCR により、これらの ORF が他の単離株でも存在するかを確認したところ、Y1 と M17 株には Y2 株と同様に存在していたが、その他の単離株からは PCR 増幅産物が得られなかった。そのため、Y6, M11, M215 株では、当該ゲノム領域の配列が大きく異なると考えられた。そこで、これらの単離株において、プライマーウォーキングによる当該ゲノム領域の配列の同定を行った。Y6, M11, M215 株の当該ゲノム領域の長さは、Y2 株とも標準菌株とも、さらにこの 3 株間でも、異なっていた。Y2, Y6, M11, M215 株の当該ゲノム領域において、吉草酸産生に関わると予想される共通した遺伝子はなく、当該ゲノム領域は吉草酸産生に直接的には関連していないと考えられた。

Genetic diversity and organic acid production of *Megasphaera elsdenii*, a lactic acid-utilizing bacterium isolated from pig feces.

○Hoshina Ryo¹, Itaya Kaede¹, Miyamoto Hirokuni^{1,2,3}, Kodama Hiroaki¹
 (¹Grad. Horticult., Chiba Univ., ²IMS,RIKEN, ³Sermas Co., Ltd)

Key words lactic acid, short-chain fatty acids, microbe

3A01-12 ヒドロキシエクオール類の酵素合成と生物活性の評価

○古屋 俊樹¹, 野澤 大樹¹, 松山 彰取²
 (¹東京理科大・理工, ²(株)ダイセル)
 tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】大豆イソフラボンの腸内細菌による代謝物として得られるエクオールは、抗酸化作用やエストロゲン様作用などの有用な生理活性を有している。一方、フラボノイド類の生理活性は水酸基の位置や数に大きく左右されるため、エクオールの水酸化体では生理活性の変化が予想され、その向上も期待できる。当研究室ではこれまでに、細菌由来フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaB の二種類のホモログ酵素 HpaB₆₋₃ および HpaB₆₋₁ が、エクオールの 3'位および 6'位をそれぞれ位置選択的に水酸化することを見いだしている¹⁾。本研究では、二種類の HpaB ホモログ酵素を組み合わせることににより、ジヒドロキシエクオールの合成を試みた。さらに、合成したヒドロキシエクオール類の生物活性を評価した。

【方法・結果】HpaB₆₋₃ 発現大腸菌および HpaB₆₋₁ 発現大腸菌を同時に添加して (S)-エクオールと反応させたところ、HPLC により新たな生成物が検出された。NMR により分析したところ、(S)-6,3'-ジヒドロキシエクオールと同定された。フラスコスケールでの反応を検討したところ、24 時間で 2.4 g/L の (S)-6,3'-ジヒドロキシエクオールを合成できた。さらに、酵素合成したヒドロキシエクオール類の抗酸化活性を評価したところ、水酸基の数が多いほど高い抗酸化活性を示した。また、6'位ヒドロキシ体はグラム陰性の大腸菌に対して高い抗菌活性を示すという興味深い性質が明らかとなった。

1) Hashimoto T, et al., RSC Adv, 9, 21826-21830 (2019).

Biocatalytic synthesis and evaluation of biological activities of hydroxyequols

○Toshiki Furuya¹, Daiki Nozawa¹, Akinobu Matsuyama²
 (¹Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., ²Daicel Corp.)

Key words equol, flavonoid, hydroxylation, monooxygenase

3A01-13 腸内細菌における葉酸合成に関わる酵素の同定

○佐藤 喬章, 加地 楓, 跡見 晴幸
(京大院・工)
takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp

ヒトの腸内には多様かつ膨大な数の細菌が存在しており、腸内細菌叢を形成している。その構成については加齢と共に変化することが分かっており、また細菌叢のバランスを保つことがヒトの健康にとって良い影響を与えることも示唆されている。悪玉菌や善玉菌に特異的な代謝酵素を同定できれば、悪玉菌の増殖のみを抑制する、もしくは善玉菌の増殖のみを活性化するなどして腸内細菌叢を制御できるようになる可能性がある。そこで、我々はまず個々の腸内細菌の代謝を理解することを旨として研究を進めている。

葉酸はビタミン B 群の一つで、その還元体であるテトラヒドロ葉酸は 1 単位の炭素を受け取り、それを様々な代謝中間体へ付加することによってアミノ酸や核酸の生合成に寄与している補酵素である。ヒトは葉酸を生合成できないことから、腸内細菌が生合成するものを利用していることが知られている。善玉菌とされる乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* は既知の葉酸生合成遺伝子のほとんどをゲノム上に有しているにもかかわらず、その生合成中間産物である 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate (DHNTTP) を変換する酵素のホモログを持たない。そこで、本研究では乳酸菌 *L. reuteri* における DHNTTP 変換酵素を同定し、葉酸生合成機構を解明することを目的とした。ゲノム情報から候補遺伝子を選抜し、それがコードする組換え型タンパク質を大腸菌で調製した。各種カラムクロマトグラフィーにより精製した組換え型タンパク質を解析したところ、DHNTTP 変換活性を示すことが明らかとなった。さらに、反応温度や pH に対する依存性、金属イオン要求性など各種酵素学的特性の解析を行ったので、それらの結果を報告する。

Identification of an enzyme involved in folate biosynthesis in the intestinal bacterium

○Takaaki Sato, Kaede Kachi, Haruyuki Atomi
(Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words folate, biosynthesis, intestinal bacteria, vitamin

3A03-01 直接電子移動型酵素の電極触媒活性向上変異体の設計を目指した多変量解析による変異体ライブラリ解析

○後藤 翼¹, 高村 映一郎¹, 坂元 知里², 坂元 博昭¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦³, 末信 一朗¹
(¹福井大院・工, ²福井高専, ³香川大・農)
e_takamr@u-fukui.ac.jp

[背景]

酵素反応によって燃料から電気エネルギーを得るバイオ電池は、温和な条件下で動作可能、小型化が容易などの利点を持つが、短寿命、低電池電圧および低出力密度が課題である。電圧および出力向上のアプローチの一つとして、電極触媒活性の高い酵素の探索もしくは変異導入による取得が挙げられる。カソードに用いる酵素として、マルチ銅オキシターゼ (MCO) が広く用いられている。さらに、常温由来の酵素は長期安定性が低いため、本研究グループでは高い長期安定性を有する超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来 MCO (McoP) を用いてランダムもしくは部位特異的変異導入によって高電極触媒活性の McoP 変異体を取得してきた。従来の変異体スクリーニングでは、酵素を特定の基質と反応させる酵素活性測定が用いられる。しかし、この方法では基質に対する活性が向上した変異体は取得できるが、電極触媒活性が向上した変異体を取得できるとは限らないため、デバイス用酵素改変のための適格な情報を取得することが困難である。

本研究では、従来の酵素活性測定に加え、酵素電気化学反応に基づくスクリーニングを行った。得られた酵素活性、電極触媒活性のデータをクラスタリングにより解析・評価し、高電極触媒活性に起因する部位の特定を行った。

[実験・結果]

McoP ランダム変異体ライブラリに対して、比色法による酵素活性スクリーニングと、各 McoP 修飾電極を用いたサイクリックボルタメトリーによる電気化学スクリーニングを行った。各変異体の活性・電極触媒活性を階層クラスタ分析によって解析した。その結果、高電極触媒活性をもつ変異体を含むクラスターに同部位への変異導入がされているものが複数確認された。これらの変異部位は、これまで報告された高電極触媒活性変異体にはない部位であった。

Mutant library analysis by multivariate analysis for the design of mutants with enhanced electrocatalytic activity of direct electron transfer enzymes

○Tsubasa Goto¹, Eiichiro Takamura¹, Chisato Sakamoto², Hiroaki Sakamoto¹, Takenori Satomura¹, Haruhiko Sakuraba³, Shin-ichiro Suye¹
(¹Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., ²Fukui Natl. Coll. Technol., ³Fac. Agric., Kagawa Univ.)

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, Electrochemical Screening, multivariate analysis

3A03-02 配列保存度情報を組み入れた酵素工学

○二井手 哲平, 杉木 創, 宮脇 佳汰, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

天然のタンパク質を本来の宿主外で使用する場合、耐熱化や触媒活性の向上など使用環境に合わせてタンパク質機能を改変することが求められる。これには従来、機能や安定性の決定的な損失を避けながら突然変異を特定の順序で蓄積させる進化分子工学手法が用いられてきたが、タンパク質の膨大な探索空間から目的機能に関わるアミノ酸残基を同定することは通常困難であり、完全無作為な error-prone PCR や結晶構造観察による半合理的変異導入に依存している。我々は、タンパク質を同じファミリー内で機能様式毎に分類することで、タンパク質の機能や構造形成に強く関わるアミノ酸残基を抽出し、変異位置と候補アミノ酸を大幅に限定できると考えた。本発表では分類したタンパク質群のアミノ酸情報を機械学習や構造モデリングの技術に適用することで、選択操作無しに酵素の触媒機能の改変や構造安定化を達成できることを示す。まず、リンゴ酸酵素 (ME) の補酵素特異性に関わる残基を機械学習により抽出し、NADP⁺を補酵素に用いる大腸菌由来 ME を NAD⁺型に変換することに取り組んだ。機械学習モデルから提案された通りに変異導入することで、補酵素特異性を完全にスイッチできた。次に、L-リジンの C4 位を塩素化する放線菌由来 L-lysine 4-chlorinase (BesD) の耐熱化に取り組んだ。ここでは、BesD と同様なアミノ酸配列セットから位置特異的スコア行列を作成し、Rosetta ソフトウェアを組み合わせた in silico での変異導入を実施した。その結果、BesD の触媒活性を低下させることなく変性中点温度を約 10°C 向上できた。以上の二つの研究結果より、機能や構造毎に分類したタンパク質から抽出される保存度の高いアミノ酸残基は機能や構造形成に強く寄与することを示し、これらの情報を利用して効率的にタンパク質改変を実施できることが分かった。

Enzyme engineering incorporating consensus sequence information

○Tepei Niide, Sou Sugiki, Miyawaki Keita, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words enzyme, protein engineering, coenzyme

3A03-03 異種生物由来酵素の発現量向上を目指した酵素設計プロセス開発

○宮脇 佳汰, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

微生物を用いた物質生産では様々な生物種の酵素を用いて新規代謝経路を設計するが、必ずしも導入先の宿主細胞で全ての異種生物由来酵素が活性体として発現できるわけではない。これまで、スクリーニングをベースとしたタンパク質工学による酵素の発現量向上の試みが実施されてきたが、スクリーニング規模の制限から、これまでの知見や研究者の知識を元に、変異箇所を同定する必要があった。そこで本研究では、変異導入の位置・種類・数をアミノ酸配列の保存度と構造モデリングから効率的に探索する酵素設計プロセスの開発を目指した。大腸菌発現が困難なホウレンソウ由来 NADPH 型グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH:EC1.2.1.13) を対象に、特異性を変化せずに高発現量化と安定化を試みた。

まず GAPDH のアミノ酸配列を query として BLAST 検索を実施し、各アミノ酸残基の進化的頻度を表す行列 (位置特異的重み行列-PSSM) を作成した。次に、Rosetta ソフトウェアを用いて、アミノ酸配列の各位置に PSSM で進化的頻度が高いアミノ酸残基を GAPDH の構造に点変異導入し、安定化した変異候補アミノ酸を PSSM から抽出した。続いて、選ばれた変異候補アミノ酸を組み合わせて変異導入し、Rosetta 内で変異導入した時の構造の安定性を表すスコア (Rosetta energy units; REU) が低い安定な構造を獲得した。このとき、ホモ 4 量体である GAPDH のサブユニット界面のアミノ酸残基は変異導入を無効とした。また、活性部位周辺のアミノ酸残基や NADPH 型 GAPDH にみられる機能保存性残基の変異を無効とした構造も同時に作製し、安定性を評価した。設計の結果、REU の値から固定残基の数によらず野生型の GAPDH と比較して安定化したことが示唆された。最後に、設計した変異体を実際に大腸菌発現系で調製し、実験的に発現量、熱安定性、酵素活性を評価した。

Enzyme design process development for improving the expression level of an enzyme from heterologous species

○Keita Miyawaki, Tepei Niide, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words enzyme reaction, protein engineering

3A03-04 リンゴ酸酵素の補酵素特異性変換を先導する機械学習手法の提案

○杉木 創, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

天然のタンパク質は本来の宿主やその生活環境外で利用されることは想定されていないため、目的の環境条件に合わせて機能を調整することが求められる。酵素の基質特異性の変換はタンパク質工学の中でも難易度が高く、これまでハイスループットスクリーニングや計算機による合理的設計が開発されてきたが、適用できる酵素の制限や成功率の低さに課題があった。本研究では、異なる基質特異性を持つ構造的に相同な酵素間の保存残基は交換可能であると仮定し、基質特異性を切り替えるための機械学習ベースの酵素設計を試みた。機械学習モデルは、複雑な特徴を持つ酵素の各位置に対応するアミノ酸のランキングリストを提供し、優先的な変異設計と効率的な検索空間の限定を可能にする。本研究ではモデル酵素として大腸菌リンゴ酸酵素 (MaeB) を選択し、MaeBの補酵素特異性を NADP 依存型から NAD 依存型に変更することで、我々の仮説の検証を試みた。

まず、KEGG データベースから様々な生物種に由来するリンゴ酸酵素のアミノ酸配列を取得し、その補酵素特異性を教師とした学習モデルより、各アミノ酸残基の位置ごとの補酵素選択性に関わる寄与度を求めた。この寄与度をランク付けし、MaeBの補酵素特異性が NADP から NAD に変化する様に、10ヶ所ずつ MaeB に変異導入した。この時、触媒機能に関係しないことが示唆された PTA ドメインを MaeB から切り取った trcMaeB を用いた。次に、この変異体が大腸菌発現系で調製し、その補酵素特異性を評価した。その結果、30ヶ所変異導入した trcMaeB30 は補酵素特異性が NADP から NAD へ完全に切り替わった。この機械学習法は、様々な生物種由来のアミノ酸配列を含むデータセットを用意することで、スクリーニング操作や構造情報なしに酵素の機能を変換するものであり、アミノ酸配列情報の拡充により汎用技術になることが期待できる。

Machine learning-guided cofactor specificity conversion of malic enzyme

○Sou Sugiki, Teppei Niide, Yoshihiro Toya, Hirishi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words malic enzyme, amino acid, coenzyme, substrate specificity

3A03-05 炭素間二重結合を酸化開裂する酵素の機能改変とバニリン合成への応用

○坂本 紗津記¹, 木野 邦器², 古屋 俊樹¹
(¹東京理科大学・理工, ²早大・先進理工)
tfuruya@rs.tus.ac.jp

【背景・目的】香料や食品素材として有用なバニリンは、天然のバニラビーンズから抽出できる量が限られているため、その多くは化石資源からの有機合成法に依存している。ナチュラルバニリンの市場での付加価値は高く、バイオマス資源を原料とするバイオプロセスによる生産に期待が寄せられている。そのため、フェルラ酸を原料とするバニリン合成法が検討されているが、我々はこれまでに、フェルラ酸から4-ビニルグアヤコール (4-VG) を經由してバニリンに至る合成経路を新たに考案し、この二段階の反応を触媒する補酵素非依存型の脱炭酸酵素と酸化酵素を見出している¹⁾。本研究では、二段階目の4-VGの炭素間二重結合を開裂する酸化酵素に着目し、変異導入による機能改変を試みた。

【方法・結果】真菌 *Thermothelomyces thermophila* 由来の酸化酵素 Ado を選択した。モデリングにより得られた Ado の立体構造に対して4-VGを結合させたモデルを AutoDock Vina を用いたドッキングシミュレーションにより構築した。その結果、Phe82、Tyr124、Lys157のアミノ酸残基が基質である4-VGの近傍に位置することが示された。この情報に基づいて部位特異的な変異を導入した Ado を大腸菌内で発現させた。さらに、当該組換え大腸菌を4-VGを含む種々の化合物と反応させた結果、変異導入により Ado の活性や基質特異性に変化が生じていることが示唆された。現在、詳細な解析を進めているところである。

1) Furuya T, et al., *ChemBioChem*, 15, 2248-2254 (2014).

Mutagenesis of a C=C bond cleavage oxygenase and its use in vanillin synthesis

○Satsuki Sakamoto¹, Kuniki Kino², Toshiki Furuya¹
(¹Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., ²Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words biocatalysis, oxidation, oxygenase, vanillin

3A03-06 プラズマニルエタノールアミン不飽和化酵素の可溶性発現

○齊藤 彩¹, DAMNJANOVIC Jasmina¹, 中野 秀雄¹, 岩崎 雄吾²
(¹名大院・生命農学, ²中部大院・応生)
iwasaki@isc.chubu.ac.jp

【背景・目的】リン脂質は、生体膜の主要な構成成分であるほか、生理機能物質として多様な生命現象を担っている。プラズマローゲン (PLs) は、アルケニルエーテル結合を構造的特徴とする機能性リン脂質であり、医学分野ではアルツハイマー病との関連において注目されている。その機能解析や利用には高純度標品が必要であるが、既に提案されているいくつかの PLs の化学合成法は、いずれも複雑な多段階反応であるという問題がある。近年、PLs の生合成経路の最終段階を触媒するプラズマニルエタノールアミン不飽和化酵素 (PEDS) が細菌と動物から同定された [Science 2019; PNAS 2020]。PEDS は PLs の前駆体である 1-アルキル-2-アルシルリン脂質を不飽和化して PLs を生成する酵素で、非ヘム鉄を含む4回膜貫通型蛋白である。また、シトクロム B5 (CB5) などの電子供与体を要求する。本研究では PEDS の可溶性発現を目指した。

【方法・結果】

Mycococcus 属細菌由来 PEDS 遺伝子 (CarF) を、pET システムを用いて発現させたところ、組換え大腸菌の膜画分に発現し、界面活性剤処理で可溶化できた。一方、ヒト由来 PEDS 遺伝子 (TMEM189) は界面活性剤存在下での無細胞蛋白質合成により可溶性発現に成功した。しかしながら、酵素調製の煩雑さ、コスト、スケールアップの困難さ等を考慮すると、PLs 合成への応用は困難であると考えた。

そこで、膜貫通型蛋白質をアポリポロタン AI 等と融合して可溶性蛋白質化する SIMPLEX 法 [Nat. ChemBiol. 2017] に着目した。CarF および TMEM189 を SIMPLEX 法で発現させたところ、可溶性蛋白質として発現し、His-タグを利用した精製も可能であった。また、精製タンパクの CD スペクトル解析から、SIMPLEX 型 CarF は一定の二次構造を形成していることも推定された。

Soluble expression of plasmamylethanolamine desaturase

○Aya Saito¹, Jasmina Damjanovic¹, Hideo Nakano¹, Yugo Iwasaki²
(¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

Key words expression, membrane protein, plasmalogen

3A03-07 糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来クチナーゼのアミノ酸変異による反応特性の改良

○鳥 帆花, 野崎 功一
(信州大院・総理工研)
knoza@shinshu-u.ac.jp

【背景と目的】微生物が生産するクチナーゼには生分解性プラスチックを分解するものがある。糸状菌 *Trichoderma reesei* が生産するクチナーゼ (TrCut) は、高い耐熱性を示すが、プラスチックに対する分解活性は存在しない。また、生分解性プラスチックを分解する酵素に比較して *p*-Nitrophenyl (pNP) butyrate に対する活性が低い。これらの原因は、酵素の活性部位近傍の立体構造にあると推定した。そこで、本研究ではプラスチックを分解できるクチナーゼの立体構造を参考にして、活性部位クレフトに存在する Leu82 と Phe114 を Gly に変異させ、基質結合に及ぼす立体障害を軽減することで反応性の改善を試みた。

【方法】L82 と F114 の単一変異 (L82G、F114G) と二重変異酵素の発現用プラスミドをそれぞれ作製し、*Pichia pastoris* に導入して形質転換体を得た。形質転換体の培養上清から各変異酵素を精製した。変異酵素の反応性は、各種炭素鎖長の pNP 基質と各種生分解性プラスチックフィルムを使用して調査した。

【結果と考察】野生型酵素に比較して変異酵素の pNP-butyrate に対する比活性は、L82G 変異酵素は 81 倍、F114G 変異酵素は 200 倍、二重変異酵素は 179 倍に増加した。また、炭素鎖長が長い pNP-hexanoate に対する反応性は、L82G 変異酵素は 17 倍、F114G 変異酵素は 26 倍、二重変異酵素は 15 倍に増加した。これら反応性が増加した要因は、変異により活性部位が広がり、基質が入り込みやすくなったためだと考えられる。しかし、いずれの変異型酵素も生分解性プラスチックを分解することはできなかった。これらのことから、長鎖のプラスチック分子の分解には、活性部位クレフトの構造だけではなく、基質結合に関与するその周辺の立体構造も影響していると推定した。

Improvement in reactivity of *Trichoderma reesei* cutinase by site-directed mutation

○Honoka Shima, Kouichi Nozaki
(Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ.)

Key words *Trichoderma reesei*, cutinase, mutation, enzyme activity

3A03-08 様々な炭素鎖長のアルデヒドに対応可能なアルカン合成酵素の開発

○工藤 恒¹, Christopher J. Vavricka¹, 伏見 圭司¹, 蓮沼 誠久², 近藤 昭彦¹
(¹神戸大院・科技イノベ,²神戸大・先端バイオ工研セ)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

医療や産業など幅広い分野でのニーズに応じたバイオ生産技術を開発するには、基質特異性が広く、触媒効率の高い酵素の創出が必要である。汎用性が高く、様々な有用化合物の合成に応用できる反応として脱炭酸反応があげられる。この反応を担う酵素の一つとして、アルデヒドからアルカンを合成できる唯一の酵素であるアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ (ADO) に注目した。アルカンは炭素鎖の長さなどによって物性が異なるため、天然ガスやガソリン、軽油といった燃料などの生産に応用可能である。そこで ADO の基質特異性の改変に注目し、さまざまな炭素鎖長のアルデヒドに対応可能な ADO を創製することを目的とした。

まず代表的な ADO20 種類を選定し、基質 4 種類 (C12, 14, 16, 18 アルデヒド) に対する活性測定を行った (ADO20 種類×基質 4 種類 = 80 種類)。活性測定では合成されるアルカン各種を GC-MS によって定量することで評価した。その結果 ADO20 種類の中で、NpADO が基質 4 種類全てに対して最も高い活性を示すことが分かった。また、ADO20 種類全てで C16 アルデヒドに対しての特異性が最も高いことが分かった。次に NpADO に注目して基質特異性の改変を行った。基質との親和性計算などを行うことで、C16 アルデヒドでなく C12 アルデヒドに対する活性を向上させるようなアミノ酸置換変異体 31 種類を設計した。これら変異体について、C12, C16 アルデヒドに対する活性測定を行った (ADO31 種類×基質 2 種類 = 62 種類)。その結果、C16 アルデヒドに対する活性が全くなく、C12 アルデヒドに対する活性のみを示す変異体を得ることができた。また先行研究で知られている変異体よりも C12 アルデヒドに対する活性が高い変異体の獲得にも成功した。現在、組み合わせ変異体を構築することで、より C12 アルデヒドに高い特異性と活性を示す ADO の創製を目指している。

Development of aldehyde-deformylating oxygenase with substrate specificity toward various carbon chain length aldehydes

○Hisashi Kudo¹, Christopher J. Vavricka¹, Keiji Fushimi¹, Tomohisa Hasunuma², Akihiko Kondo¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBRC, Kobe Univ.,)

Key words enzyme activity, substrate specificity, alkane

3A03-09 フルオロケトン還元する酵母由来新規カルボニルレダクターゼの発見と諸性質の検討及び合理的改変型酵素の X 線結晶構造解析

○渡邊 幸夫¹, 釜井 彩花¹, 三木 慎介¹, 日比 慎¹, 浅野 泰久¹
(¹富山県大・生医工研セ,²セントラル硝子 (株))
asano@pu-toyama.ac.jp

【目的】本研究では、3-クロロ-1,1,1-トリフルオロアセトン(MCTFA)を還元し、R 立体選択的なフッ化アルコールである (R) -3-クロロ-1,1,1-トリフルオロプロパノール (MCTFIPA) の合成を触媒する新規酵素を取得し、諸性質の検討を行い、産業利用を図ることを目的とした。

【方法】保存菌株のスクリーニングにより、MCTFA に活性のある酵母 *Rhodotorula toluroides* を得た。RiCRD のペプチド配列解析によりアミノ酸配列を決定し、配列情報をもとに、大腸菌による異種発現系を構築した。野生型 RiCRD 及び組換え RiCRD は各種クロマトグラフィーにより精製した。当研究室で開発されたプログラム INTMSAlign、および結晶化改善変異点を探索する SERp を用いて変異型酵素を設計した。酵素活性は MCTFA を基質とし、340 nm における NADPH の吸光度変化として測定した。酵素 1U は 1 分間に 1 μmol の MCTFA を還元する酵素量と定義した。還元反応生成物の光学純度は GC/MS の分析結果から算出した。

【結果】RiCRD の推定アミノ酸配列の解析結果より、本酵素は短鎖型脱水素酸化還元酵素 (SDR) ファミリーに属する酵素であり、データベース解析により、相同性は最大 28% であった。諸性質としては、MCTFA を基質とし、(R) -MCTFIPA を 96% ee で与え、最適 pH が 6.5、最適温度が 45°C であることが明らかとなった。変異型酵素 (E48A, K51A, K52A の 3 点変異体) は活性に影響がなく、かつ結晶化が可能であった。X 線構造解析により、二量体のリガンドフリー構造を得、立体構造の比較から、鳥脂肪由来レダクターゼと類似していることを明らかにした。

Discovery and characterization of a new carbonyl reductase from yeast reducing fluoroketones, and X-ray analysis of the variant by rational engineering.

○Yukio Watanabe¹, Sayaka Kamai¹, Shinsuke Miki², Makoto Hibi¹, Yasuhisa Asano¹
(¹Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ²Central Glass Co., Ltd.)

Key words enzymatic conversion, enzyme activity, crystallization, protein engineering

3A03-10 酵母由来カルボニルレダクターゼの部位特異的変異導入による可溶性発現

○池田 宇宙¹, Kunwadee Palasin¹, 三木 慎介², 浅野 泰久¹
(¹富山県大・生医工研セ,²セントラル硝子 (株))
asano@pu-toyama.ac.jp

【目的】異種発現系で酵素遺伝子を発現させると封入体が形成され、不溶化し活性が損なわれてしまうことが多く、酵素の大量発現を行う際の課題となっている。当研究室ではこれまでに不溶性の原因となっているアミノ酸残基 (ホットスポット) を予測する「Hydropathy contradiction rule」を開発し、可溶性発現に有用であることを示してきた。本研究でターゲットとする Ogataea polymorpha 由来カルボニルレダクターゼ (OpCRD-A) 1) は、1,1,1-トリフルオロアセトン (TFA) から (S)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノール ((S)-TFIPL) を合成する有用酵素であるが可溶性発現の改善を行う必要がある。そこで本研究では、当研究室で開発したホットスポット予測法を用いて OpCRD-A の変異体を作製し、可溶性発現の改善を行った。

【方法及び結果】OpCRD-A の一次構造を基に「Hydropathy contradiction rule」2) が算出する HiSol score の結果からホットスポットにおける変異体を作製し、大腸菌を宿主として遺伝子発現を行った。発現した各変異体は、活性測定と SDS-PAGE により可溶性発現の評価を行った。その結果、野生株と比較して可溶性発現量が向上し、高い活性を示した変異体を獲得した。また、OpCRD-A の可溶性が改善した変異体の立体構造 (SWISS-MODEL) を解析すると表面に位置するアミノ酸残基が疎水性から親水性に置換されており、そのために可溶性発現が改善されたと考えた。以上の結果より HiSol score を用いた可溶性発現予測法は OpCRD-A の可溶性に有用であることが分かった。

- 1) Isobe et al. (2018) Appl. Microbiol. Biotechnol. 102,1307–1316.
- 2) Matsui et al. (2017) Sci. Rep. 7, 9558-9569.

Soluble expression of carbonyl reductase derived from yeast by rational mutagenesis

○Sora Ikeda¹, Palasin Kunwadee¹, Shinsuke Miki², Yasuhisa Asano¹
(¹Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ²Central Glass Co., Ltd)

Key words rational mutagenesis, reductase, soluble expression

3A03-11 超好熱性マルチ銅オキシダーゼの T1 銅周辺への部位特異的導入による酸化還元電位の改変

○平中 佑磨¹, 多喜 俊介¹, 高村 映一郎¹, 坂元 博昭¹, 里村 武範¹, 櫻庭 春彦², 末 信一郎¹
(¹福井大院・工,²香川大・農)
e_takamr@u-fukui.ac.jp

【背景】バイオ電池 (BFC) は酸化還元酵素の働きによって燃料から電気エネルギーを取り出す燃料電池である。小型化が容易、常温で作動可能なため安全、などの利点を持つことからウェアラブルデバイス用電源としての応用が期待されている。しかし、低出力や短寿命が課題であり、実用化には至っていない。BFC のカソードには一般的にマルチ銅オキシダーゼ (MCO) が用いられている。本研究グループでは高い安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来の MCO (McoP) を電極触媒として用いることで BFC の長寿命化を目指してきた。しかし、McoP の酸化還元電位 (+398 mV) は他の MCO と比較して低いため、電極触媒として用いた際に BFC の低電池電圧に繋がる。MCO の酸化還元電位は T1 銅の酸化還元電位に大きく影響を受けるため、BFC の電池電圧向上には McoP の T1 銅の酸化還元電位の正側へのシフトが必要となる。先行研究においては McoP の T1 銅の軸配位子を酸化還元電位の高い酵素に見られるアミノ酸に置換することで酸化還元電位を約 70 mV 正側にシフトすることに成功した。

本研究では、McoP の酸化還元部位である T1 銅周辺の第 2 配位圏に着目し、酸化還元電位の高い酵素のアミノ酸配列を参考に変異を導入することで酸化還元電位の正側へのシフトを目的とした。

【実験・結果】McoP 変異体修飾電極を作製し、作製電極を作用極としてアルゴン飽和条件下のサイクリックボルタメトリーによる電気化学的評価を行った。その結果、McoP 1435T, N462I, E464F は T1 銅の還元電位の正側へのシフトがみられた。また、還元電位がシフトした変異体を組み合わせた 1435T/N462I は還元電位が 123 mV 正側にシフトした。このシフトは変異導入によって第 2 配位圏の疎水性相互作用の低下及び水素結合の消失が起きたことにより T1 銅周辺構造が柔軟化したことに起因すると考えられる。

Modification of redox potential by site-directed mutagenesis of hyperthermophilic multicopper oxidase around T1 copper

○Yuma Hiranaka¹, Syunsuke Taki¹, Eiichiro Takamura¹, Hiroaki Sakamoto¹, Takenori Satomura¹, Haruhiko Sakuraba², Shin-ichi Suye¹
(¹Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., ²Fac. Agric., Kagawa Univ.)

Key words biofuel cell, multicopper oxidase, redox potential, mutagenesis

3A03-12 シリカ形成細菌における長鎖ポリアミン合成酵素の進化に関する研究

○池田 丈¹, 西本 健太郎², 中杉 行秀¹, 石田 文典¹, 舟橋 久景¹, 廣田 隆一¹, 黒田 章夫¹
(¹広島大院・統合生命科学, ²広島大・工)
ikedakeshi@hiroshima-u.ac.jp

一部の生物は可溶性のケイ酸 (Si(OH)₄) を生体内に取り込み、固体のシリカ (SiO₂) へと重合して殻や骨格などとして利用している。代表的なシリカ形成生物である珪藻や海綿のシリカの内部には長鎖ポリアミンと呼ばれる物質が共通して存在することが知られており、本物質がシリカ形成に重要な役割を果たしていると考えられている。一方で、長鎖ポリアミンの生合成経路は長らく不明のままであった。

我々は、土壤細菌である *Bacillus cereus* とその近縁種が、胞子形成期にケイ酸を取り込み、胞子表面にシリカの層を形成することを発見した。また、本菌のシリカの内部にも長鎖ポリアミンが存在することを明らかにした。これまでの研究において、本菌の長鎖ポリアミン生合成経路の解析を行い、長鎖ポリアミン合成酵素を同定することに初めて成功した。本酵素をコードする遺伝子は、ポリアミン合成に関与する別の酵素 (S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素) の遺伝子とオペロンを形成していた。

B. cereus とその近縁種にはこのオペロンが共通して存在しているのに対し、同属ながら系統的に少し離れたシリカ形成細菌である *B. megaterium* には本オペロンに相当する遺伝子が存在しなかった。本菌のゲノム配列を詳細に解析したところ、オペロンの代わりに、長鎖ポリアミン合成酵素の活性ドメインと S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素とが融合した形の遺伝子が存在することが判明した。本遺伝子を大腸菌に導入したところ、発見した組換えタンパク質は長鎖ポリアミン合成活性を有することが確認された。代表的なシリカ形成生物である珪藻のゲノム上にも、*B. megaterium* と同様の融合遺伝子が存在することから、長鎖ポリアミン合成酵素は S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素との融合を経て、真核生物である珪藻に伝播した可能性が強く示唆された。

Evolutionary relationship of the enzymes that synthesize long-chain polyamines in biosilicifying bacteria

○Takeshi Ikeda¹, Kentaro Nishimoto², Yukihide Nakasugi¹, Takenori Ishida¹, Hisakage Funabashi¹, Ryuichi Hirota¹, Akio Kuroda¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Fac. Eng., Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus megaterium*, biomineralization, long-chain polyamine, silica

3A03-13 多様な機能を有する祖先型 meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素群の設計

○荒関 隼人, 川崎 真由, 神戸 彬光, 中野 祥吾, 伊藤 創平
(静大院・薬食生命)
snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp

酵素は環境に優しい次世代触媒として注目され、バイオプロセスによるファインケミカル (光学活性化合物など) 合成への応用が期待されている。一方で天然型酵素の多くは安定性や活性が低いため産業応用が難しい。上記課題を解決する高機能酵素の取得のため、今日まで様々な改変手法が開発されてきた。中でも祖先型設計法 (ASR 法) を代表とする配列ベースの酵素デザイン法は高い汎用性と設計の容易さから広く利用されてきた。しかし、ASR 法による酵素デザインの成否に関わる指標については報告が少なく、本法による酵素デザインは経験的に行われているのが現状である。本研究では meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) をモデルに 4 個の異なる配列ライブラリを用いて設計した祖先型 DAPDH (AncDAPDH-N1-N4) の構造機能解析と配列比較を行った結果について報告する。ASR 法で高機能酵素を取得する際に参考となる指標についても報告する。

設計した 4 つの AncDAPDHs は、いずれも大腸菌発現系を用いて可溶性酵素として取得することができた。次に AncDAPDHs の物理学的諸性質について検討を行った。結果、鋳型とした天然型 DAPDH と比べ、AncDAPDHs は熱安定性が向上したものの、活性は低下していた。設計の過程で DAPDH の活性発現に重要な部位に数残基のインデルが導入されることで、活性と耐熱性のトレードオフが生じたことが示唆された。一方で、4 つの AncDAPDHs のうち、N4 が比較的高い耐熱性と活性を有することが判明した。また、配列解析を行い、X 軸に好熱菌由来酵素群と中温菌由来酵素群の、Y 軸に AncDAPDHs と鋳型酵素のアミノ酸分布の差をプロットすると N4 にのみ強い正の相関が見られた。本結果は対象酵素を好熱菌由来酵素と類似したアミノ酸分布になるよう ASR 法にて設計することで、より高い確率で高機能酵素をデザインできる可能性を示唆している。

Design of a group of ancestral meso-diaminopimelate dehydrogenases with diverse functions

○Hayato Araseki, Mayu Kawasaki, Akira Kambe, Shogo Nakano, Sohei Ito
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words meso-Diaminopimelic Acid Dehydrogenase, Sequence based protein design, Ancestral reconstruction

3B02-01 Cas11d の設計・発現による新規ゲノム編集技術 CRISPR-Cas type I-D (TiD) の高効率化

○和田 直樹¹, 村上 愛美¹, 丸井 和也¹, 刑部 祐里子¹, 刑部 敬史¹
(¹徳島大院・社会産理工,²東工大・生命理工)
kosakabe@tokushima-u.ac.jp

近年、ゲノム情報を正確かつ効率的に改変するゲノム編集技術が開発され、医療や農業分野をはじめとした様々な産業分野での応用が進んでいる。最も汎用的に利用されているゲノム編集技術として、CRISPR-Cas9 が挙げられる。しかし、配列選択性や特異性、さらに知的財産の問題などの課題も残されており、これらの課題を克服する新規国産ゲノム編集ツールの開発が期待されていた。我々はこれまで、*Microcystis aeruginosa* 由来の CRISPR-Cas type I-D をもとに、ユニークな特性を持つ国産ゲノム編集技術 TiD を開発し、動植物ゲノム編集への利用を報告してきた (1, 2, 3)。本研究では、新規 *cas11d* 遺伝子の設計・共発現による、TiD の更なる効率化を報告する。Cas11 は、近年、他の type I system において、*cas8* や *cas10* 遺伝子内の ORF から独立して発現、真核生物におけるゲノム編集での必要性が示された約 14 kDa 程度のタンパク質である。しかし、我々が構築した動植物における TiD では、Cas11d は発現していないが、変異導入は可能であった。そこで、TiD における Cas11d の効果を詳細に解析するため、他種 type I の情報をもとに *cas11d* 遺伝子を新規に設計し、ヒト細胞におけるゲノム編集に利用した。その結果、Cas11d の共発現によって DNA 切断効率が 2-5 倍向上することが明らかになった。また、大腸菌を用いた Cas-crRNA 複合体の発現・精製において、Cas11d の発現により複合体の安定性が向上していることが明らかとなった。これらの結果より、Cas11d 発現は、複合体形成の安定化を通してゲノム編集効率を向上させると考えられる。さらに、本発表では、他種の菌由来の CRISPR-Cas type I-D との比較についても議論したいと考えている。

1. Osakabe, Wada et al., (2020) Commun. Biol.
2. Osakabe, Wada et al., (2021) Nucleic Acids Res.
3. 特許第 7017259 号 刑部敬史, 刑部祐里子

Design and co-expression of Cas11d gene enable highly efficient genome editing by CRISPR-Cas type I-D (TiD)

○Wada Naoki¹, Murakami Emi¹, Marui Kazuya¹, Osakabe Yuriko², Osakabe Keishi¹
(¹Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ., ²Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words genome engineering, mammalian cell

3B02-02 海洋珪藻 *Fistulifera solaris* におけるゲノム編集の効率化に向けた CRISPR-Casφ system の利用

○鈴木 沙和, 藤井 大河, 前田 義昌, 田中 剛
(農工大院・工)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【目的】
海洋珪藻 *Fistulifera solaris* はオイル含有量が 60% (w/w) と高いことから、バイオ燃料生産ホストとして期待されている。オイル生産性を向上させるため、CRISPR/Cas9 system によるゲノム編集が試みられてきた。しかし、*F. solaris* において、Cas9 タンパク質の発現が困難であり、ゲノム編集効率が低いことが課題であった。そこで、Cas9 タンパク質の分子量の約半分である Casφ タンパク質に着目した。本研究では、*F. solaris* における CRISPR-Casφ system によるゲノム編集の確立に向け、その基礎検討として、核移行シグナル (NLS) の有効性評価、*F. solaris* における casφ 遺伝子と cas9 遺伝子の導入効率の比較を行った。

【方法】
NLS の有効性評価として、*gfp* 遺伝子の上位に SV40 NLS、下流に nucleoplasmic NLS を融合し、パーティクルガン法によって *F. solaris* へ導入した。得られた形質転換体を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、*g418* 耐性遺伝子、*cas9* 遺伝子または *F. solaris* ゲノムにコード最適化した casφ 遺伝子、NLS、FLAG Tag を含むプラスミドを用いて *F. solaris* をパーティクルガン法により形質転換した。薬剤耐性クローンにおける casφ/cas9 遺伝子の導入確認は PCR により行った。

【結果と考察】
顕微鏡観察の結果、NLS を付加した GFP の核局在が確認され、NLS が *F. solaris* に有効であり、Casφ タンパク質の核移行へ応用可能であることが示唆された。次に、Casφ タンパク質のうち、Casφ-1、-2、-3 と Cas9 との遺伝子の導入効率を比較した。その結果、全 102 クローンにおいて cas9 遺伝子の導入は確認されなかったのに対し、casφ-1、-2、-3 遺伝子はそれぞれ PCR 増幅を行った 48 クローン中、9、5、13 クローンにおいて casφ 遺伝子の導入が確認された。したがって、*F. solaris* において、casφ 遺伝子は cas9 遺伝子よりも効率的に導入可能であることが示唆された。

Evaluation of CRISPR-Cas phi system in marine diatom *Fistulifera solaris* towards efficient genome editing

○Sawa Suzuki, Taiga Fujii, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words microalgae, CRISPR-Casφ system, genome editing, biojet fuel

3B02-03 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術の開発

○丸山 魁斗¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹, 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²不二製油, ³産総研・生物プロセス)
htakaku@nupals.ac.jp

近年、世界の人口増加によるエネルギー問題等に伴い油脂需要は増加しており、油脂低自給率国である日本においては、安定供給へ向けた独自の油脂生産システムの構築が必要である。そこで我々は、菌体内に油脂を高蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* による油脂生産に着目した。*L. starkeyi* を産業的に活用するためには、遺伝子工学的ツールを用いた油脂高蓄積株や高付加価値油脂蓄積株の創製が必要である。本研究では、従来の形質転換法と比較して、操作が簡便かつ形質転換効率が格段に向上したエレクトロポレーション法 (EP 法) を開発した。現在の遺伝子組換えシステムは、形質転換体の選抜に薬剤耐性遺伝子マーカーを利用しているため、マーカー遺伝子不足や食用油脂産業への応用が課題であった。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を開発し、*L. starkeyi* の食用油脂産業への利用の可能性を広げることを目的とした。簡易的に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を評価するシステム構築に向け、*L. starkeyi* 野生株に標的的 *GFP* 遺伝子及び SV40 由来 NLS を有する Cas9 をコードする遺伝子を導入し、ゲノム編集簡易評価株を作製した。次に、*GFP* 遺伝子を標的とした 2 種類の sgRNA をデザインし、*in vitro* *GFP* DNA 切断活性を検証し、目的の位置で切断できる sgRNA を見出した。その 2 種類の sgRNA を EP 法を用いて評価株へ導入した結果、*GFP* 蛍光が消失したコロニーが検出された。それぞれ 3 μg の sgRNA を導入した株で最も高い消失率を示し、19.8%、10.2% であった。以上より、*L. starkeyi* で CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が可能であることが明らかとなった。本研究の一部は NEDO プロジェクト「データ駆動型統合バイオ生産マネジメントシステム (Data-driven iBMS) の研究開発」の一環として実施された。

Development of genome editing using the CRISPR/Cas9 in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Kaito Maruyama¹, Rikako Sato¹, Satoshi Ara^{1,2}, Harutake Yamazaki¹, Hideo Araki², Koji Ishiya³, Sachiyo Aburatani³, Takaku Hiroaki¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Fuji Oil Co., Ltd., ³BPRI, AIST)

Key words CRISPR/Cas9, *Lipomyces starkeyi*, genome editing, GFP

3B02-04 オオミジンコにおける CRISPR/dCas9 を利用した遺伝子発現活性化システムの開発

○原 あや乃, アディタマニッコ, 加藤 泰彦, 渡邊 肇
(阪大院・工)
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景と目的]

オオミジンコ (*Daphnia magna*) は、環境指標生物として用いられている淡水性の甲殻類である。近年ではオオミジンコの環境応答機構を解析するために全ゲノムが解読され、また RNA 干渉や人工スクリューアーゼによる標的遺伝子の機能欠失実験系 (loss of function) が確立された。さらに、機能獲得実験系 (gain of function) も開発され、外来遺伝子をゲノムの任意の箇所にノックインし異所的に発現させる系が構築された。しかしながら、ゲノム上の遺伝子を狙って活性化するための技術はこれまで開発されていない。そこで本研究では CRISPR/dCas9 を用いた内在性遺伝子の発現を活性化するための技術の開発を目的とした。

[方法と結果]

CRISPR/dCas9 がオオミジンコの生体内で正常に働くかどうかを確認するために、オオミジンコでユビキタ素に発現する elongation factor 1 α -1 (EF1 α) プロモーターの制御下で転写活性化ドメインが融合した dCas9 を発現するプラスミドを構築した。また、すでにゲノムにノックインされている *GFP* 遺伝子のプロモーター領域を認識するガイド RNA の設計を行った。これらのプラスミドとガイド RNA をオオミジンコ胚に注入すると *GFP* 蛍光が胚全体で観察され、本システムがオオミジンコ体内で機能することが判明した。現在は dCas9 発現に必要な最小限の EF1 α プロモーターの制御領域を検討し、dCas9 発現プラスミドの最適化を行っている。今後はゲノム編集により dCas9 発現プラスミドをノックインし、ガイド RNA 依存的に標的遺伝子の発現を活性化できる組換え体の作製を行う。本組換え体を、オオミジンコの環境応答機構を解明や遺伝子レベルからの定量的な環境影響評価法の開発へと利用することで、SDGs において重視されている生態系の保護・回復やその産業応用へも貢献できると期待される。

Development of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional activation system in *Daphnia magna*

○Ayano Hara, Nikko Adhitama, Yasuhiko Kato, Hajime Watanabe
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Daphnia magna*, genome engineering, transcriptional regulation, crispr/dcas9

3B02-05 オオミジンコにおける有用タンパク質高発現ベクターの構築と利用

○柴田 成樹¹, リー デイビッド², アディタマニッコ¹, 加藤 泰彦¹, 渡邊 肇¹
(¹阪大院・工, ²University of California, Berkeley)
watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景と目的] オオミジンコ (*Daphnia magna*) は淡水に生息する甲殻類で、近年では遺伝子編集技術である TALEN や CRISPR/Cas9 による遺伝子のノックアウトやノックインが可能となっている。この生物における外来タンパク質の異所的発現は、生体内における標的タンパク質の機能評価だけでなく、環境センサーなどの新たな形質を付加した有用な組み換え個体の作出に必須の技術である。そこで本研究では、オオミジンコの形質転換用の高発現ベクターの構築を目指した。

[方法と結果] オオミジンコの全身で高発現することがわかっている EF1 α (elongation factor 1 α) 遺伝子のプロモーター、5' UTR および 3' UTR を採用することに決め、プロモーターの最適化を行った。EF1 α プロモーター、5' UTR、3' UTR の制御下で緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するプラスミドにおいて、全長が 2.3 kbp の EF1 α プロモーターを 5' 末端から段階的に欠失させたプラスミドをオオミジンコの初期胚に注入し、24 時間後の GFP 蛍光を比較した。結果として、0.8 kbp 欠失させたプロモーターでも全長のプロモーターと変わりなく、遺伝子発現を活性化できることがわかった。以上の実験から EF1 α の制御領域を用いたベクターの最適化に成功した。また、現在は本最適化ベクターを用いて、Cas9 発現ミジンコの作出に取り組んでいる。この Cas9 発現ミジンコの作出を含めたオオミジンコにおける一連のゲノム操作は、遺伝子の機能解析だけでなく産業利用に向けた有用ミジンコの開発の基盤となる。

Construction of a vector for protein expression in *Daphnia magna*

○Naruki Shibata¹, David Lee², Nikko Adhitama¹, Yasuhiko Kato¹, Hajime Watanabe¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²UC Berkeley)

Key words expression vector, promoter, UTR

3B02-06 細菌 1 細胞レベルの微量 RNA からの RNA-seq 手法の開発

○西村 美都¹, 西川 洋平^{2,3}, 竹山 春子^{1,2,3,4}, 細川 正人^{1,2,3,4}
(¹早大院・先進理工, ²早大・ナノライフ創研, ³産総研・早大 CBBDOIL, ⁴早大・生命動態研)
masahosokawa@aoni.waseda.jp

細菌集団は遺伝的に均一であっても、遺伝子発現状態の不均一性により細胞ごとに異なる表現型を示す。機能的な亜集団への分化は、環境変化に対する細菌集団の適応力を高める生存戦略であり、ごく一部の細胞から形成される。多様な表現型を検出する方法として、1 細胞解析技術が注目されている。その中でも 1 細胞 RNA-seq は、包括的な遺伝子発現状態を捉える優れた手法であるが、技術的課題により細菌への応用は進んでいない。細菌 mRNA は、存在量が真核生物の 1/100 程度と微量であり、半減期が数分と短く非常に不安定である。さらに、mRNA の 3' 末端にポリ A テールを持たず、大多数を占める rRNA との分別が困難である。

そこで、本研究では、高感度な真核 1 細胞 RNA-seq 法 (RamDA-seq) を CRISPR-Cas9 を用いた rRNA 除去と統合し、細菌 1 細胞レベルの微量 RNA からの RNA-seq 手法を開発することを目的とした。大腸菌 total RNA 用いた評価の結果、最小 0.02 pg の鋳型 RNA からライブラリ作製が可能であった。CRISPR-Cas9 処理はライブラリから rRNA 配列を選択的に除き、mRNA リードの割合を 10 倍以上に濃縮した。最適化した解析条件において、1 細胞レベルの RNA を鋳型として作成したライブラリは、バルクレベルのライブラリと比較して、リファレンス配列へのマッピング率を下げず、推定遺伝子発現量の相関を高く維持した ($R > 0.98$)。

以上より、本手法は細菌 mRNA の技術的課題を克服する細菌 1 細胞レベルの RNA-seq 手法として活用できることが示唆された。今後は、環境細菌に適用可能な細菌 1 細胞 RNA-seq 技術の確立を目指す。

Development of bacterial RNA-seq technologies for single-cell level low input RNA

○Mika Nishimura¹, Yohei Nishikawa^{2,3}, Haruko Takeyama^{1,2,3,4}, Masahito Hosokawa^{1,2,3,4}
(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., ³CBBDOIL, AIST-Waseda Univ., ⁴Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words bacteria, transcriptome

3B02-07 1細胞ゲノム情報から設計した細菌種特異的標識ツールの開発

○岩井直哉¹, 竹山春子^{1,2,3,4}, 細川正人^{1,2,3,4}

(¹早大院・先進理工,²早大・ナノライフ創研,³産総研・早大 CBBB-OIL,⁴早大・生命動態研)
masahosokawa@aoni.waseda.jp

当研究室では、環境中に存在する多種多様な未培養細菌の理解に向けて、1細胞ゲノム解析手法を開発してきた。本手法により、従来の多種多様な細菌集団からの高品質ゲノムの獲得が可能となった。取得された1細胞ゲノムからは、細菌に感染するウイルスであるファージの配列も検出でき、ファージと宿主細菌の関係を明らかにできる。そこで、本研究では、大量に獲得した未培養細菌由来ゲノムから宿主特異的なファージ配列を取得し、ファージの細菌選択性に関わる分子を人工的に合成し、細菌種特異的な標識ツールとして開発・応用することを目指した。

当研究室で開発したSAG-gel法(Chijiwa et al., Microbiome 2020)を用いて、ヒト皮膚常在細菌およびヒト口腔内細菌の1細胞ゲノムを獲得した。得られた細菌ゲノム配列から、細菌種別(ブドウ球菌またはレンサ球菌)にファージ由来細胞接着ドメインを *in silico* で探索し、細菌標識ツールを設計した。大腸菌を用いた遺伝子組換え発現により Superfolder GFP (sfGFP) と細胞接着ドメインを融合させた標識ツールを複数種作製した。レンサ球菌標識ツールを大腸菌懸濁液に添加し顕微鏡観察を行った結果、菌体から蛍光は確認されなかった。一方、ヒト口腔内の常在菌であるレンサ球菌数種に標識ツールを添加した結果、菌体輪郭に沿って緑色蛍光が確認された。次に、蛍光標識菌体のセルソーターを用いた分取性能を評価した。

本研究で開発した細菌標識ツールは、特異的な細菌種の標識と細菌集団からの分離に有効であることが示唆され、ゲノム配列から様々な標識ツールを生み出すことができる。本手法は、多様な細菌集団からの有用菌や病原菌の検出や分離解析などへの応用が期待される。

Development of bacterial species-specific labeling tools designed from single-cell genome information

○Naoya Iwai¹, Haruko Takeyama^{1,2,3,4}, Masahito Hosokawa^{1,2,3,4}

(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., ³CBBB-OIL, AIST-Waseda Univ., ⁴Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words single-cell genome, synthetic biology, bacteria, phage

3B02-08 確率的 Cre-lox 組換え反応の機械学習ドリブンエンジニアリングによる任意の割合でのスパースラベリングの実現

○山内悠至^{1,2}, 植田充美¹, 青木航¹

(¹京大院・農,²日本学術振興会)
aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

【背景】

スパースラベリング法とは、全細胞集団のうち一部の細胞のみをまばらに標識することで、1細胞レベルの解析が可能とする方法である。スパースラベリング法は、神経科学をはじめ様々な分野で重要な手法となっている。しかし、これまでの方法は、標識率を自由に制御できず、応用可能性が低い課題があった。そこで私たちは、機械学習を用いて Cre-lox 組換え系をエンジニアリングすることで、任意の標識率を自由に選択可能な新規スパースラベリング法を確立した。

【方法】

我々は、2組の lox 配列 (*lox2272* と *loxP*) を交互に配置し、*loxP* 間に転写因子を配置した遺伝子配列を構築した。Cre は *lox2272* と *loxP* 間のどちらか片方を認識し、切断する。*lox2272* 間が切断された場合のみ転写因子が発現し、遺伝子発現を誘導する。標識率は Cre による *lox2272* と *loxP* の切断比率により決定されるため、*lox2272* に網羅的変異を加えることで、様々な標識率を示す変異配列が得られると仮説を立てた。変異 *lox2272* ライブラリを構築し、各変異配列の Cre 切断率を NGS で評価した。次に、任意の *lox2272* の Cre 切断率を予測するために、評価した変異体を用いてガウス過程回帰 (GP) モデルを構築した。

【結果】

約 2300 個の *lox2272* を NGS で評価した結果、Cre 切断率が、0.05%–100% の多様な変異体を取得した。これらの変異体を学習データとして構築した GP モデルは、テストデータに対して R=0.93 の優れた予測性能を示した。GP モデルで予測した未評価変異体の Cre 切断率を qPCR で評価したところ、予測値と実測値の相関係数は R=0.91 であった。この GP モデルを利用することで、任意の割合でのスパースラベリングが可能になると期待される。

Machine-learning-driven engineering of stochastic Cre-lox recombination to enable sparse labeling at desired rates

○Yuji Yamauchi^{1,2}, Mitsuyoshi Ueda¹, Wataru Aoki¹

(¹Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Research Fellow of JSPS)

Key words Machine learning, Illumina sequencing, Cre-lox, sparse labeling

3B02-09 電気穿孔法で形質転換可能な好熱菌 (*Geobacillus thermodenitrificans* K1041) の特性評価と遺伝学的考察

○小山幸祐¹, 中川翔太², 大城隆², 鈴木宏和²

(¹鳥取大院・持続創生,²鳥取大・銘)
hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp

【目的】 *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 は、電気穿孔法による形質転換が可能な中等度好熱菌で、それを利用した好熱菌研究の展開を我々は目指している。本研究では、K1041 株に関する基本情報の整備を目的とし、その生物学的特徴とゲノム配列を解析した。

【実験と結果】 電気穿孔法が有効な点は、K1041 株の注目すべき特徴の1つである。K1041 株は、非メチル化 DNA を用いることで効率よく形質転換できるが (10^3 – 10^5 cfu/μg)、その効率は K1041 株由来の自己 DNA より 10^2 ほど低い。この現象は、K1041 株が一般的な制限修飾系 (I–III 型) と異種メチル化 DNA を認識する IV 型制限系をもつことを示唆する。そこで K1041 株のゲノム配列中に見出された *resA* (III 型) と *mcrB* (IV 型) を破壊したところ、*resA* 破壊株においては形質転換効率が上昇したが、*mcrB* 破壊株においては変化が見られなかった。よって K1041 株は、未知の制限系をもつ可能性がある。さらに *Geobacillus thermodenitrificans* の 4 株 (K1041, T12, OS27, および DSM465) の比較ゲノムを行なった。K1041 株と T12 株は電気穿孔が有効で、DSM465 株と OS27 株は無効である。本解析からは、効率的な電気穿孔に細胞壁 (タイコ酸) 合成の遺伝子が関わっている可能性が見出された。そこで、K1041 株と T12 株が有するそれら遺伝子の1つ (*tagGH*) を破壊したところ、電気穿孔の効率が減少した。よって K1041 株と T12 株は、細胞壁がわずかに改変されることで電気穿孔効率が向上している可能性がある。K1041 株の他の特徴として、低い芽胞形成と 65°C に特異的な遊走性が見出された。前者については、*cmpA*, *spo0E*, *spoVM*, および *ycjZ* の欠失が理由と思われる。後者の理由は不明だが、遊走に関わる遺伝子 (*flg* 遺伝子群や *flj* 遺伝子群など) の高温特異的な発現制御があるのかもしれない。

Characterization and genetic consideration of a thermophile that is highly transformable via electroporation (*Geobacillus thermodenitrificans* K1041).

○Kosuke Koyama¹, Nakagawa Shota², Takashi Ohshiro², Hirokazu Suzuki²

(¹Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., ²Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words electroporation, genome sequence, restriction-modification, transformation

3B02-10 *Leptothrix* 属細菌の糸状成長に必須な鞘形成メカニズムの解明

○小野絵里香¹, 山本達也², 尾花望^{2,3}, 杉本真也⁴,

Andrew S. Utada^{2,5}, 久能樹², 野村暢彦^{2,5}

(¹筑波大院・生命環境,²筑波大・生命環境系,³筑波大・医学医療系・TMRC,⁴東京慈恵大・医学,⁵筑波大・MiCS)
nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的・背景】 活性汚泥法では、好気性微生物叢を用いて、汚水中の窒素、リン、有機物を除去している。ところが、活性汚泥中の糸状性細菌の異常増殖は、群集体の形成異常を引き起こし、固液分離障害によって浄水効率を低下させる。そこで糸状性細菌を排除せず糸状成長を抑制することが求められる。*Leptothrix* 属糸状性細菌は、細胞表面から多糖を主成分とする微小繊維を分泌し、その繊維が重合したチューブ状鞘構造を形成することで糸状成長する。さらに細胞鎖が折り重なること、固液界面や気液界面において特徴的な網目状マットを形成する。しかし、微小繊維分泌や鞘形成を制御する分子機構の詳細は未解明である。そこで本研究では、遺伝子破壊系の構築によりこれらの制御因子を同定することで、糸状成長の分子制御機構の解明を目的とした。

【方法・結果と考察】 大腸菌との異種間接合伝達により *L. cholodnii* SP-6 株の遺伝子破壊系を構築した。糖転移酵素をコードする *lthA* 遺伝子破壊株は、微小繊維分泌による鞘構造の形成が出来ないことが分かった。そのため、糸状成長出来ず、気液界面に集積しても特徴的なマットを形成しなかった。以上の結果は、*LthA* によって重合される微小繊維が、糸状成長および網目状マット形成に必須であることを示唆している。次に、PEP-CTERM ドメインを切断することで細胞外高分子物質 (EPSs) 形成関連因子の分泌を制御するエキソソルターゼ XrtA に着目した。*xrtA* 破壊株は、微小繊維は分泌するが、鞘構造形成を伴った糸状成長が出来ないことで、気液界面部に *lthA* 破壊株と類似したマットを形成した。従って、網目状マット形成には、鞘構造が必須であることが示唆された。今後は、微小繊維の架橋など鞘構造形成に関わる PEP-CTERM を有する因子を同定することで、分泌微小繊維からなる鞘形成の分子制御機構を明らかにしたい。

Mechanism of sheath formation essential for filamentous growth of *Leptothrix* sp.

○Erika Ono¹, Tatsuya Yamamoto², Nozomu Obana^{2,3}, Shinya Sugimoto⁴,

Andrew S. Utada^{2,5}, Tatsuki Kunoh², Nobuhiko Nomura^{2,5}

(¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ³TMRC, Med., Univ. Tsukuba, ⁴Med., Univ. Jikei, ⁵MiCS, Univ. Tsukuba)

Key words *Leptothrix cholodnii*, filamentous bacteria, filamentous growth, nanofibers

3B02-11 キンギョにおける細菌感染時に誘導される免疫グロブリン遺伝子の比較

○山田 紗里奈, 田丸 浩
(三重大院・生資)
ytamaru@bio.mie-u.ac.jp

【背景】抗体医薬品として利用される抗体 (Immunoglobulin: Ig) は、免疫系の中でも獲得免疫で主要な役割を果たす分子である。当研究室では哺乳類と類似の獲得免疫を保有し、多様な免疫応答を持つと考えられる魚類に着目した。哺乳類の抗体は5つのアイソタイプに分類され、それぞれ働きが異なっているが、硬骨魚類は2つのアイソタイプを有しており、魚種によって特異的なアイソタイプを持つことが近年報告されている。コイ科魚類であるゼブラフィッシュやコイで同定された抗体アイソタイプの一つである IgZ は病原体や感染症の曝露によって発現が誘導されることが報告されている。そこで本研究では、大腸菌曝露前後におけるキンギョの皮膚、鰓、および血清中の粘膜型抗体遺伝子の発現について比較検討した。

【方法・結果】体長3~4cmのゼブラフィッシュから鰓、皮膚、血液を採取し、RNA抽出、cDNA合成を行なった。IgZ、IgZ2、IgMについてリアルタイムPCRで発現量を測定した。同様の操作を体長9cm程度のキンギョ (ワキン) でも行った。大腸菌曝露アッセイでは大腸菌 BL21 株を用いて28°Cで8時間浸透感染を介して実施した。感染前と同様にサンプル採取からリアルタイムPCRを行い、大腸菌曝露前後での IgZ、IgZ2、IgM の遺伝子発現量を比較した。その結果ゼブラフィッシュにおいて、IgM 遺伝子の発現量は全サンプルで増加した。一方、IgZ、IgZ2 では鰓サンプルのみ曝露後の遺伝子発現量の増加が見られた。また、キンギョでは IgM 遺伝子のみ発現量が増加したが、ゼブラフィッシュほどの発現増加はなかった。以上の結果から、ゼブラフィッシュでは大腸菌を異物として認識し、粘膜や菌叢への影響が少なかったと推察された。キンギョも同様に推察されるが、ゼブラフィッシュに比べ体長の違い等を考慮した曝露条件を検討する必要があると考えられる。

Comparison of immunoglobulin genes induced during bacterial infection in goldfish

○Sarina Yamada, Yutaka Tamaru
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words antibody, FISH

3B04-01 日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* の細菌細胞間シグナル伝達物質に対する走性応答

○永井 敦也¹, 荷方 稔之², 酒井 保蔵²
(¹宇都宮大院・工, ²宇都宮大・工)
nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【目的】運動性を有する多くの細菌種は、化学物質の濃度勾配に対して走化性と呼ばれる行動的応答を示す。本研究では、生態系における細菌の挙動に関する走化性の持つ役割に着目し、細菌細胞間のシグナル伝達物質に対する走化性を測定することで、その基礎的知見を得ることを目的とした。

【実験方法】日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* を試験細菌とし、合成培地で30°C、18時間振とう培養後菌体洗浄を行った。0.5%アガロースを含む試験物質をキャピラリーに充填、固化し、菌体が集積する様子を顕微鏡で撮影し、単位濁度当たりの集積初速度である比集積初速度で走化性を評価した。

【結果と考察】*S. maltophilia* は大腸菌群のシグナル伝達物質 (オートインデューサー) であるインドール、および緑膿菌のオートインデューサーである PQS に対して弱いながらも集積応答を示した (それぞれ9.04, 15.8 cells/ (sec OD₆₀₀))。このことから *S. maltophilia* が、例えば多種類の細菌が複合的に関与するバイオフィーム形成に走化性を利用して参加し得る可能性が考えられた。また枯草菌においてバイオフィーム形成の阻害への関与が報告されている D-ロイシンに対して本細菌は集積応答を示した。さらにこれらの物質の感知に関与する走化性センサー遺伝子特定するため、欠損変異株を用いて走化性を測定したところ、本細菌の有する12の走化性センサー遺伝子のうち *mcp05* 欠損株におけるインドール、PQS、D-ロイシンに対する集積応答が著しく減少したことから、走化性センサー MCP05 がこれらの物質の感知に関与していることが示唆された。本細菌の D 体アミノ酸に対する走化性応答の生物学的意義は現在のところ不明であるが、これらを詳細に調査することで、微生物生態系での細菌間相互作用における走化性の関与の足掛かりになると考えられる。

Chemotactic response of *Stenotrophomonas maltophilia* toward bacterial intercellular signaling chemicals

○Atsuya Nagai¹, Toshiyuki Nikata², Yasuzo Sakai²
(¹Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., ²Fac. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words chemotaxis, *Stenotrophomonas maltophilia*, D-amino acid, quorum sensing

3B04-02 酵母の増殖における芳香族アルコールの効果とクオラムセンシング

○崎濱 由梨¹, 西村 洗樹¹, 望月 貴博¹, 三岡 哲生¹, 加藤 拓²,
只見 秀代², 永富 康司², 阿部 文快¹
(¹青山学院大・理工, ²アサヒクオリティードアンドイノベーションズ)
abef@chem.aoyama.ac.jp

クオラムセンシング (QS) は、微生物が同種の菌の細胞密度を検知し増殖や物質生産をコントロールする仕組みであり、分泌性の液性因子を介して行われる。細菌の場合、自己誘導因子がシグナル分子となり、集団の菌体密度を感知することで特定の遺伝子発現を調節したり増殖を正や負に制御したりしている。酵母では日和見真菌 *Candida albicans* において、ファルネソールが QS 分子として働いており、バイオフィーム形成や病原性に関与している。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の場合、トリプトフォールなどの芳香族アルコールが QS 分子と考えられている。しかし、Σ1278b 系統以外の株はトリプトフォールに対する明確な表現型を示さないため、研究は立ち遅れている。そこで本研究では、芳香族アルコールによる *S. cerevisiae* の増殖制御や受容体の同定を目的とし、それらの増殖に及ぼす効果を定量的解析した。また、酵母遺伝子破壊ライブラリーを用いてトリプトフォール耐性株の単離と特性評価もあわせて行った。3種の芳香族アルコールの中ではトリプトフォールによる増殖阻害が最も強く、調べた *Saccharomyces* 属酵母の増殖は10 mM (0.16%) で完全に停止した。増殖可能な4 mM トリプトフォールを投与したところ、フェニルエタノールやクロソールを合成・分泌することが確認された。この結果は、芳香族アルコールの生産が正のフィードバック制御下にあるというこれまでの知見を支持している。遺伝子破壊ライブラリーのスクリーニングから、トリプトフォール耐性を示す5個の破壊株が取得された。現在、遺伝子破壊の再検証と、トリプトフォールによる正のフィードバック機構について、*ARO10* レポーターアッセイを用いた解析を行っている。

Effects of aromatic alcohols on yeast growth and quorum sensing

○Yuri Sakihama¹, Koki Nishimura¹, Takahiro Mochizuki¹, Tetsuo Mioka¹,
Taku Kato², Hideyo Tadami², Yasushi Nagatomi², Fumiyoshi Abe¹
(¹Coll. Sci. Eng., Aoyama Gakuin Univ., ²Asahi Quality & Innovations, Ltd.)

Key words quorum sensing, aromatic alcohols, yeast

3B04-03 ビフィズス菌における二成分制御系の環境応答についての検証

○末松 和真¹, 和泉 絢子², 下総 葉子¹, 岩橋 均³, 小西井 智也⁴
(¹岐阜大院・自然科技, ²岐阜大院・応生科, ³岐阜大・応生科, ⁴岐阜大院・連農)
tomoya.kozakai.5@gmail.com

【背景と目的】ビフィズス菌はヒト腸内細菌叢の主要な構成細菌であり、プロバイオティクスとして広く利用されているにも関わらず、腸内環境への適応機構については未だに不明である。二成分制御系 (TCS) は環境応答システムの一つであり、菌体外環境を感知して自己リン酸化するヒスチジンキナーゼ (HK) と、転写調節因子であるレスポンスレギュレーター (RR) から構成されている。当研究室では、*Bifidobacterium longum* NCC2705 株が有する TCS の RR である BL0005 が、腸内生存の鍵となる、高浸透圧環境と胆汁酸に応答し、30 を超える遺伝子の発現を調節することを明らかにしている。今回は BL0005 と協同する HK である BL0006 の機能を検証し、本 TCS の活性化メカニズムの解明を目指した。

【方法】*B. longum* NCC2705 株の野生型と、HK 遺伝子欠損株 (Δ BL0006) を各種ストレス存在下で培養し、OD₆₀₀ の値を計測した。さらに、野生型を用いたレポーターアッセイによって、TCS の制御下にあるプロモーターの転写活性を測定した。また、HK のリン酸化ドメインに存在する3つのヒスチジン残基をそれぞれアラニンに置換し、HK の活性への影響について検証した。

【結果と考察】 Δ BL0006 は、界面活性剤の一種である Triton-X 100 存在下において増殖が抑制され、50°C の高温条件下において生存率が低下した。レポーターアッセイの結果、Triton-X 100 存在下で本 TCS の活性化を確認したが、50°C の条件下では活性化を確認できなかった。本 TCS は、非ストレス下においてもある程度の転写制御活性を持つ。このため、本 TCS の有無が生存率に影響した可能性がある。リン酸化ドメインへの変異導入では、His310 を置換した場合のみ、ストレス下における増殖が抑制された。これは、His310 が BL0006 中で唯一リン酸化されるヒスチジン残基であることを示唆している。

Verification of the environmental response of the two-component regulatory system in *Bifidobacterium*

○Kazuma Suematsu¹, Ayako Izumi², Yoko Shimofusa¹, Hitoshi Iwahashi³,
Tomoya Kozakai⁴
(¹Grad. Sch. Natl. Sci. Technol., Gifu Univ., ²Grad. Sch. Appl. Biol. Sci. Technol., Gifu Univ., ³Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ⁴United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ.)

Key words bifidobacterium, two component regulatory system

3B04-04 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養性に関与する遺伝子発現と栄養源の関係

○池田 裕布里, 岸本 真奈, 新谷 政己, 吉田 信行
(静大・創科技院)
yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素・窒素・硫黄源を含まない無機塩固体培地 (BM 培地) 上で良好に生育する。当研究室での先行研究におけるトランスクリプトーム解析により、メタノール脱水素酵素 (MDH) とアルデヒド脱水素酵素をコードする2つの遺伝子 (それぞれ *mnoA*, *aldA*) が低栄養条件下で高発現することが明らかとなっている。*aldA* は欠損させると BM 培地での生育を示さなくなることから低栄養生育に必須な遺伝子であり、*mnoA* も欠損させると生育が低下するため、低栄養生育に重要な遺伝子として研究を進めてきた。しかしながら、本菌は BM 培地上で良好な生育が可能ということだけで、低栄養性に関与する具体的な培地成分は実は曖昧なままであった。そこで本研究では、*aldA*, *mnoA* の発現を低栄養生育の指標として用いることで、本菌の低栄養生育のメカニズムを解明することを目指した。両遺伝子の転写レベルを定量的かつ簡便に解析するため、蛍光タンパク質を生成する EGFP 遺伝子を両遺伝子のプロモーター領域の下流にそれぞれ導入したプラスミドを作成した。それらのプラスミドを持つ N9T-4 株を様々な栄養源を含む培地で培養し蛍光を測定したところ、アルコールやリンゴ酸が両遺伝子を強く発現をさせること、トリプトンとカザミノ酸の添加によりいずれも良好な生育を示すが、トリプトンでは発現が強く抑制されるのに対し、カザミノ酸では発現が見られることなどが明らかとなった。前者の結果から、低栄養生育とグリオキシリ酸経路の関連が示唆され、後者からは低栄養代謝を抑制する物質の存在が予想された。

Expression of the genes involved in oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 under various nutrient conditions

○Yuri Ikeda, Mana Kishimoto, Masaki Shintani, Nobuyuki Yoshida
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*, methanol dehydrogenase, alcohol dehydrogenase

3B04-05 黒麹菌細胞壁多糖ニゲランの合成酵素遺伝子発現に関わる転写因子の探索

○上地 敬子, 平良 東紀, 水谷 治
(琉球大・農)
k-uechi@agr.u-ryukyuu.ac.jp

ニゲランとは、グルコースが α -1,3-結合と α -1,4-グリコシド結合を交互に繰り返す直鎖状の多糖であり、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の一部の糸状菌が窒素源飢餓時に生産する細胞壁多糖である。我々は、これまでに黒麹菌よりニゲラン合成酵素遺伝子 (*nisA*) や合成に関与する遺伝子 (*agtC*, *gnsA*) を同定、報告してきた。しかしながら、これらのニゲラン合成関連遺伝子の発現がどのように制御されているのか知見がなかった。そこで本研究では、窒素源飢餓条件下で培養した黒麹菌を用いた RNA-seq 解析で発現量が変動した転写因子 (様) 遺伝子および糸状菌で窒素源代謝に関連することが報告されている転写因子をコードする遺伝子の破壊株をアグロバクテリウム法により作製し、ニゲラン生産性への影響について検討を行った。その結果、RNA-seq 解析で発現量が変動した転写因子をコードする遺伝子の破壊株ではニゲラン生産性に影響を与えなかった。一方、窒素源飢餓時にさまざまな窒素源代謝に関わる酵素遺伝子の発現を活性化させる遺伝子 *areA* の破壊株は、ニゲランを生産しなかった。つまり、ニゲラン合成関連酵素遺伝子も *areA* の制御下にあることが示唆された。

1) Uechi et al., Applied and Environmental Microbiology. (2021) e0114421

Searching for transcription factors involved in the expression of the nigeran synthase gene of *Aspergillus luchuensis*

○Keiko Uechi, Toki Taira, Osamu Mizutani
(Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words *Aspergillus luchuensis*, nigeran, transcriptional regulator gene

3B04-06 通常飼育マウス消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の INSeq 法による同定

○山口 颯人¹, 倉持 碧海¹, 後藤 恭宏², 小椋 義俊³, 前田 智也¹, 林 哲也², 横田 篤¹, 吹谷 智¹
(¹北大院・農, ²九大院・医, ³久留米大・医)
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

【目的】

健康増進効果を示すビフィズス菌が消化管で生存・定着する分子機構には不明な点が多い。この解明を目指した戦略として、我々は insertion-sequencing (以下 INSeq) 法を用いて、消化管における生存と定着に寄与する遺伝子の同定を進めてきた。INSeq 法とは、トランスポゾン変異株集団と次世代シーケンズ解析を組み合わせて、特定の環境下での細菌の生存に寄与する遺伝子を網羅的に同定する手法である。これまでに、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株 (以下 105-A 株) のトランスポゾン変異株集団の作製と無菌マウスへの投与試験を行い、単独定着での消化管における生存と定着に寄与する遺伝子を同定した。続いて本研究では、通常飼育マウスに INSeq 法を応用することで、常在の腸内細菌叢が存在する消化管での、生存と定着に寄与する遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】

(1) 通常飼育マウスでは、105-A 株変異株集団の腸内占有率が一定ではなく、INSeq 解析用サンプルの作製が困難であるため、サンプル調製方法の改善を試みた。また、105-A 株変異株集団の通常飼育マウス消化管での占有率を経時的に観測し、INSeq 解析に適切な飼育日数を検討した。
(2) 105-A 株の変異株集団を雌性 BALB/c 通常飼育マウスに投与後、3・4 日目に盲腸内容物を採取した。変異株集団および盲腸内容物から調製したサンプルを次世代シーケンズ解析に供し、両者の解析データを比較することで、目的の遺伝子を同定した。

【結果】

(1) の検討を踏まえ、(2) の INSeq 解析を行った結果、「通常飼育マウス消化管における生存と定着に重要な遺伝子」を投与後 3 日目解剖群で 169 個、4 日目解剖群で 185 個同定した。これらの遺伝子のうち、無菌マウスにおける INSeq 法で同定された遺伝子を除いた 81 個を、通常飼育マウス消化管での生存と定着に特異的に重要な遺伝子として同定した。

Identification of bifidobacterial genes that contribute to survival and colonization in the gastrointestinal tract of conventional mice using insertion-sequencing

○Hayato Yamaguchi¹, Tamami Kuramochi¹, Yasuhiro Gotoh², Yoshitoshi Ogura³, Tomoya Maeda¹, Tetsuya Hayashi², Atsushi Yokota¹, Satoru Fukiya¹
(¹Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Med., Kyushu Univ., ³Fac. Med., Kurume Univ.)

Key words bifidobacterium, transposon mutagenesis, screening

3B04-07 好熱菌由来のヒートショックタンパク質による大腸菌のストレス耐性強化

○佐藤 悠¹, 岡野 憲司², 本田 孝祐^{3,4}
(¹山口大院・創成・農, ²関西大・化生工, ³阪大・生工国際, ⁴阪大・先導的学際研機構)
yusato@yamaguchi-u.ac.jp

原核生物の多様なストレス耐性機構の1つに、熱ショックタンパク質(HSP)が挙げられる。特に、低分子量の HSP (sHSP) は、他のシャペロンと共にタンパク質のリフォールディングなどを促進し、細胞内のタンパク質の恒常性に寄与している。そのため、sHSP は耐熱性を含む種々のストレス耐性の向上に重要であり、中には線虫由来の sHSP の発現により大腸菌の最高生育温度を上昇させた例 [Ezemaduka et al. (2014) J. Bacteriol.] も報告されている。「より過酷な環境下で増殖可能な微生物由来の sHSP であれば宿主のストレス耐性をさらに強化できる」と考え、本研究では好熱性バクテリア由来の HSP20 の機能解析を試みた。はじめに、原核生物の生育温度データベース (<http://togodb.org/db/tempura>) を利用して、大腸菌と系統的に近縁から遠縁まで多様な好熱菌 13 種を選抜した。一部の好熱菌は複数の HSP20 を有していたため、計 18 種類の HSP20 を使用した。また、HSP20 の発現には、pET28a ベクターおよび大腸菌 Rosseta2 pLysS 株を使用した。SDS-PAGE により確認したところ、可溶性画分に 17 種類の HSP20 の発現が確認でき、いずれも熱処理 (70-80°C, 30 分) に耐えうる熱安定性を示した。これらの発現株を多様な条件 [高温、凍結融解、酸性 (pH3)、アルカリ性 (pH11)、高浸透圧] に暴露し、暴露前後の生菌数から生存率を算出した。空ベクターを含むコントロール株と比較して、いずれの条件においても各発現株の生存率の方が 1 桁から 3 桁ほど高いことが明らかとなった。残念ながら最高温度の上昇は見られなかったが、本成果から宿主のストレス耐性を向上させる際の HSP20 の有用性が示された。現在、系統解析やアミノ酸配列の比較、立体構造予測モデルをもとにして HSP20 のどの部位が各種ストレス耐性に重要かを調べている。

Small heat shock protein 20 from thermophilic bacteria improve stress resistance in *Escherichia coli*

○Yu Sato¹, Kenji Okano², Kohsuke Honda^{3,4}
(¹Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Agric., Yamaguchi Univ., ²Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., ³ICBiotech, Osaka Univ., ⁴OTRI, Osaka Univ.)

Key words heat shock protein, stress resistance, thermophile, protein expression

3B04-08 *Methylosinus trichosporium* OB3b のランタノイド依存性な発現制御に関与する TonB 依存性レセプター遺伝子の同定

椎名 涉, 伊藤 榮統, ○蒲池 利章
(東工大・生命理工)
tkamachi@bio.titech.ac.jp

多くのメタン酸化細菌やメタノール酸化菌は、ランタノイド(Ln)依存型メタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)である XoxF およびカルシウム依存型 MDH である MxaFI を有している。両酵素をコードする遺伝子は Ln³⁺ 依存的に制御されることが知られており、Ln switch と呼ばれている。メタン酸化細菌 *Methylosinus trichosporium* OB3b (OB3b 株)では、Ln³⁺ 存在下で *xoxF1* と *xoxF2* の発現量が増加し *mxoA* と *mxoB* の発現量が低下することが知られている。しかし、OB3b 株の Ln switch に関する研究はあまり進んでおらず、特に Ln 輸送に関与する遺伝子は報告されていない。

本研究では OB3b 株の継代培養の過程で単離された変異株の解析を行った。この変異株は、Ln の一種である Ce³⁺ 存在下においても MDH の発現パターンが変わらず XoxF1 が発現しなかった。全ゲノムリシーケンシング解析で同定された変異のうち、TonB 依存性トランスポーターをコードする CQW49_RS02145 遺伝子上の変異に着目した。このトランスポーター遺伝子の破壊株および補充株を構築し MDH 発現パターンをウエスタンブロットングにより分析した。破壊株は、Ce³⁺ の有無によらず MxaF が発現し XoxF1 が発現しなかった。補充株では Ce³⁺ 存在下で XoxF1 が発現していたことから、Ln switch にこのトランスポーター遺伝子が必要であることが明らかとなった。また既知の Ln トランスポーター遺伝子との同源性から、Ln 取り込みへの関与が予測された。さらに OB3b 株の増殖解析および進化実験から、凍結保存菌体の立ち上げがトランスポーター遺伝子の変異に関与している可能性が示唆された。

Identification of TonB dependent receptor involved in lanthanide dependent gene regulation in *Methylosinus trichosporium* OB3b

Wataru Shiina, Hidehiro Ito, ○Toshiaki Kamachi
(Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words methylotroph, transporter, lanthanide

3B04-09 PromA 群プラスミドの「天然の宿主」を同定するためのシングルセル解析

○川北 鈴香^{1,2}, 高木 妙子², 大田 悠里², 陶山 哲志², 野田 尚宏², 金原 和秀¹, 新谷 政己¹
(¹静大院・総合科技,²産総研・バイオメディカル)
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

2009年に提唱された PromA 群プラスミド¹⁾は、これまで報告例が少なかったが、我々の先行研究で培養を介さない方法で日本の種々の環境試料から多数取得された。異なる網の細菌間を水平伝播することも明らかにした²⁾。従って、PromA 群プラスミドは、これまで見過ごされてきたが広範な環境に存在する宿主域の広いプラスミド群であると推定される。自然界では PromA 群プラスミドを保有する細菌(天然の宿主)が未培養・難培養性で、その天然の宿主とともに見出されることが少ないことが理由と考えられる。そこで本研究では、培養を介さない water-in-oil droplet を利用したシングルセル解析を行い、PromA 群プラスミドの天然の宿主の同定を試みた。蛍光プローブを含み、プラスミドと 16S rRNA 遺伝子領域の特異的な遺伝子の一部を増幅させる PCR 反応液と環境細菌を混合した。このとき、単一 droplet (約 14 ピコリットル)内に 1 細胞以下となるように細菌密度を調整した。続いて、反応液を droplet に封入し multiplex droplet PCR を行った。その後、蛍光を指標に標的プラスミドを含む droplet を 96 穴プレートに各ウェルにシングル注した。分取した droplet から DNA を抽出し、PromA 群プラスミドの部分配列と 16S rRNA 遺伝子領域 (V3-V4 領域) を個別に PCR 増幅し、塩基配列の解読を行った。その結果、Actinomycetales 目細菌など異なる未培養性細菌に由来する 16S rRNA 遺伝子と高い同一性を示す配列を複数の droplet から検出した。従って、期待されたように PromA 群プラスミドが、環境中で未培養・難培養性細菌を宿主として水平伝播していることが示唆された。現在、シングルセル解析の結果と PCR 陽性 droplet を 1000 近く収集して解析した結果を照合する実験を試みている。

¹⁾Van der Auwera et al, 2009, *Antonie van Leeuwenhoek*. 96:193

²⁾Yanagiya et al, 2018, *Front. Microbiol.* 9:2602

Single cell analysis to identify the original hosts of PromA plasmids in nature

○Suzuka Kawakita^{1,2}, Taeko Takagi², Yuri Ota², Tetsushi Suyama², Naohiro Noda², Kazuhide Kimbara¹, Masaki Shintani¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words plasmid, original host, droplet, environmental bacteria

3B04-10 Replication-Cycle Reaction 法による環境試料からのプラスミドの収集とその性状解析

○一瀬 拓海¹, 池田 奈菜子², 森 光矢¹, 奈良 聖亜³, 末次 正幸³, 金原 和秀^{1,2}, 新谷 政己^{1,2,4}
(¹静大院・総合科技,²静大・工,³立教大院・理,⁴静大・グリーン科技研)
shintani.masaki@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】実環境中のどこにどのようなプラスミドが存在するのか明らかにすることは、プラスミドを介した細菌の進化・適応機構を理解するうえで重要である。従来、環境中のプラスミドは、種々の手法で収集されてきたが、プラスミドの複製・維持・接合伝達に依存した方法が主流であった。そこで我々は、複製・維持・接合伝達に依存しない、環状プラスミド DNA を環境中から直接収集する方法の確立に取り組んでいる。

【方法・結果・考察】環境試料から環状 DNA 画分を抽出し、Replication-Cycle Reaction(RCR)法¹⁾によって環状 DNA のみを増幅させ、その塩基配列を解読した。その結果、活性汚泥と牛糞肥肥から、1-12 kb の環状 DNA 計 18 種類の完全塩基配列を取得した。また、取得した環状 DNA のうち 13 種類には、プラスミドの複製・維持・接合伝達に関与する推定遺伝子が含まれ、プラスミドであると示唆された。そこで、得られたプラスミドの複製開始タンパク質(Rep)をコードすると推定される rep 遺伝子配列に基づき、公的データベースを探索した結果、6 種類には類似のプラスミドが見当たらず、新規性が高いことが示唆された。一部のプラスミドは、*Escherichia* や *Pseudomonas* 由来の Rep と同源性を示したため、*E. coli* DH5α 株、*P. putida* KT2440 株を宿主とするか検証した結果、1 種類は DH5α 株を、8 種類は KT2440 株を宿主とした。これは、各プラスミドの Rep と推定 oriV 領域が複製機能をもつことも示していた。また、Rep のアミノ酸配列を用いて、類似の配列がメタゲノム配列内に存在するの、PZLAST²⁾を用いて検索した。検索条件を E-value 10⁻⁸ 以下とした結果、腸内環境や水環境に類似の配列が 100 以上存在することが示唆された。

(1)Su'etsugu et al., 2017, *Nucleic Acids Res.* 16;45(20):11525-11534.

(2)Mori et al., 2021, *Bioinformatics.* 7;37(21):3944-3946.

Collection and feature analysis of plasmid DNAs from environments by Replication-Cycle Reaction(RCR)

○Takumi Ichinose¹, Nanako Ikeda², Mitsuya Mori¹, Seia Nara³, Masayuki Su'etsugu³, Kazuhide Kimbara^{1,2}, Masaki Shintani^{1,2,4}
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Fac. Eng. Shizuoka Univ., ³Grad. Sch. Rikkyo Univ., ⁴Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words plasmid, Replication-Cycle Reaction, plasmidome, Southern Blotting

3C01-01 ATP 浪費による出芽酵母バイオアルコール生産能の向上

谷田部 楓太¹, 岡橋 伸幸¹, 清家 泰介¹, 石井 純², ○松田 史生¹
(¹阪大院・情報,²神戸大院・科技イノベーション)
fmatsumura@ist.osaka-u.ac.jp

【はじめに】ATP「浪費」とは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 13C-代謝フラックス解析から、日本酒酵母が持つエタノール高生産能の背景として見出された現象である。協会酵母 7 号は、実験室酵母株の約 2 倍の ATP を未知の用途に消費しており、この浪費を賄うためにエタノール生産に伴う ATP 再生を活性化していると考えられた。そこで、本研究では人工的に ATP 浪費を起こすことで、エタノール及び 2,3-ブタンジオール (BDO) 生産能の向上を試みた。

【方法】*S. cerevisiae* 実験室株 (BY318) および BDO 生産代謝改変株 (YHI030, Ishii et al. 2018) を親株として用いた。大腸菌由来のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) と ATPase 遺伝子断片を大腸菌からクローニングした。これらを発現するためのプラスミドベクターを作成し、酢酸リチウム法で親株に導入した。50 mL の SD 培地中で形質転換酵母を培養し、GCMS を用いてエタノール及び BDO 生産量を測定した。

【結果】FBPase の発現で代謝経路に ATP 消費の無益回路を構築できる。そこで、コドン最適化した大腸菌由来 *fbp* 遺伝子を導入した *S. cerevisiae* 実験室株を構築した。好気条件下、回分培養で発酵試験を行ったところ、グルコース比消費速度は 32%、エタノール比生産速度は 24% 上昇した。また、ATP の加水分解反応を触媒する大腸菌由来 ATPase 導入株のエタノール比生産速度は 41% 上昇した。そこで、BDO 生産代謝改変株 YHI030 に ATPase を導入した株を構築したところ、2,3-ブタンジオール比生産速度は 36% 上昇した。ATP 浪費が、出芽酵母の発酵的物質生産能の向上に向けたツールとして有用であると示唆された。

Improvement of bioalcohol production in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP wasting

Futa Yatabe¹, Nobuyuki Okahashi¹, Taisuke Seike¹, Jun Ishii², ○Fumio Matsuda¹
(¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, metabolic engineering, ATP, ethanol production

3C01-02 分子育種による油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 生産油脂の脂肪酸組成改変

○河野 翔吾¹, 中島 由莉奈¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹, 荒木 秀雄², 石谷 幸代³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²不二製油, ³産総研・生物プロセス)
htakaku@nupals.ac.jp

我々の生活を支える植物油脂の需要は、世界人口と共に増加傾向にあるが、その油糧植物による油脂生産は天候条件と国土に恵まれた数少ない国に限定されている。油脂自給率の低い国は、油脂生産国の情勢の影響を大きく受けることから、自給率向上が課題である。食品残さ由来の糖から油脂を発酵生産することのできる油糧微生物の油脂生産は、天候に左右されず、広大な土地を必要としない。本研究では、油糧微生物の中でも油脂含有率が70%以上の油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* に注目した。*L. starkeyi* の生産油脂の脂肪酸組成はパーム油と類似しているため、パーム代替油脂として有望である。また、遺伝子工学的手法が確立されているため、脂肪酸組成を改変し、複数の植物代替油脂を生産できる可能性がある。そこで本研究では、*L. starkeyi* の脂肪酸合成経路を改変し、1.オレイン酸の含有率向上、2.ω6 脂肪酸のリノール酸の含有率向上、3.ω3 脂肪酸のα-リノレン酸の含有率向上による脂肪酸組成の異なる油脂の生産を試みた。*L. starkeyi* の脂肪酸伸長酵素遺伝子 *LsELO2* を高発現させ、脂肪酸不飽和化酵素 $\Delta 12$ desaturase コードする *LsFAD2* を破壊した組換え株の油脂のオレイン酸含有率は、野生株より約14%向上した。また、*L. starkeyi* にリノール酸高生産酵母 *Pseudozyma antarctica* 由来 $\Delta 12$ desaturase をコードする *PaDI2D* を導入した組換え株のリノール酸含有率は野生株より約39%向上した。さらに、この *PaDI2D* 導入株に、脂肪酸不飽和化酵素 $\Delta 15$ desaturase をコードする *LsFAD3*、または糸状菌 *Magnaporthe grisea* 由来 *MgDI15D* を導入した組換え株のα-リノレン酸含有率は、野生株よりもそれぞれ約6%、16%向上した。以上のように *L. starkeyi* は脂肪酸合成経路の改変により様々な脂肪酸組成の油脂を生産できることが明らかとなった。本研究の一部は NEDO の支援を受けている。

Improvement of fatty acid composition of lipids produced by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using molecular breeding

○Shogo Kono¹, Yurina Nakajima¹, Rikako Sato¹, Satoshi Ara^{1,2}, Harutake Yamazaki¹, Hideo Araki², Koji Ishiya³, Sachiyo Aburatani³, Hiroaki Takaku¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Fuji Oil Co., Ltd., ³BPRI, AIST)

Key words lipid, *Lipomyces starkeyi*, polyunsaturated fatty acids, desaturase

3C01-03 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の不飽和脂肪酸合成遺伝子 *OLE1* プロモーター解析

○渡部 凌¹, 佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹, 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²不二製油, ³産総研・生物プロセス)
htakaku@nupals.ac.jp

近年、世界人口の増加や食生活の変化に伴い、油脂需要が増加している。そこで本研究では、菌体内に油脂を高蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* による油脂生産に注目している。*L. starkeyi* は、食品・醸造残さなどの廃棄物由来の様々な糖を油脂に変換でき、その油脂の脂肪酸組成は植物油と類似しているため植物代替油脂となりうる。また、培養槽による発酵生産であるため、天候や気候に非依存的で、広大な土地も不要である。*L. starkeyi* による油脂生産にはこのような利点があるが、実用化に向け、油脂生産メカニズムを解明し、その知見を活用した油脂生産性向上の課題が残されている。本研究で発見した *L. starkeyi* の転写調節因子 *LsSpt23p* は、油脂生産の重要な因子であり、*LsSPT23* 遺伝子の高発現は油脂生産性を大きく向上させた。本研究では、*LsSpt23p* が転写を調節する脂肪酸不飽和化酵素 $\Delta 9$ デサチュラーゼ (ステアリン酸からオレイン酸を生成) をコードする遺伝子 *OLE1* のプロモーター解析を介して、その転写調節に関与する領域を明らかにすることを目的とした。様々な長さの *OLE1* プロモーターを大腸菌 *lacZ* (レポーター遺伝子) に連結したコンストラクトを構築後、*L. starkeyi* 野生株に導入し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、活性に関与する複数の領域を見出し、中でも特に 18 bp の領域が活性に大きな影響を与えた。また、プロモーター解析の結果を利用し、内在性の *OLE1* の転写を低下させるようにプロモーターを改変したところ、生産油脂のオレイン酸含有量を低下させ、ステアリン酸含有量を向上させることに成功した。このようなプロモーターの改変は、*L. starkeyi* で様々な種類の植物代替油脂を生産させる可能性をもつ。本研究の一部は NEDO の支援を受けている。

Promoter analysis of the delta 9 fatty acid desaturase gene *OLE1* in the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Ryo Watabe¹, Rikako Sato¹, Satoshi Ara^{1,2}, Harutake Yamazaki¹, Hideo Araki², Koji Ishiya³, Sachiyo Aburatani³, Hiroaki Takaku¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Fuji Oil Co., Ltd., ³BPRI, AIST)

Key words *Lipomyces starkeyi*, *OLE1*, promoter analysis, beta-galactosidase

3C01-04 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* 油脂低蓄積原因因子による油脂生産低下メカニズムの解明

○佐藤 里佳子¹, 荒学志^{1,2}, 山崎 晴丈¹, 荒木 秀雄², 石谷 孔司³, 油谷 幸代³, 高久 洋暁¹
(¹新潟薬大・応生命, ²不二製油, ³産総研・生物プロセス)
htakaku@nupals.ac.jp

近年の世界人口増加や新興国の成長に伴い、様々な産業において高汎用性であるパーム油の需要は増加している。一方、アブラヤシ農園は、環境・社会面で問題を抱えることから、需要増加に対応できる代替油脂生産技術の開発は重要な課題である。その油脂生産技術としてパーム油と類似した油脂を生産する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の活用が期待される。しかし、実用化へ向けた油脂生産性向上の改変対象遺伝子情報など、油脂生産機構に関する知見は不十分である。本研究では、油脂低蓄積原因因子の油脂生産低下メカニズムの解明を目的とした。本研究グループが同定した油脂低蓄積原因因子 Protein Id:69187 は、641 番目のロイシンがプロリンに置換した影響で油脂合成経路 (アシル-CoA 合成経路) 関連遺伝子の発現量と油脂生産性が低下することが明らかとなっている。69187 の機能を推定するために一次構造情報を取得したところ、Acyltransferase motif 及び Lipase motif が見出された。それらと油脂低生産の関連性を明らかにするために、油脂低生産変異と Acyltransferase motif のアラニン置換 (L641P/H643A)、或いは Lipase motif のアラニン置換 (L641P/S728A) を組み合わせた motif 不活性化株を作製し、その油脂生産性を評価した。L641P/H643A 及び L641P/S728A 株は、いずれにおいても野生株と同様な油脂生産量を示し、油脂生産性の回復が確認された。さらに、油脂合成経路の遺伝子発現比較解析を実施したところ、L641P/H643A 及び L641P/S728A 株は野生株と同様な遺伝子発現量を示した。すなわち、L641P/H643A 及び L641P/S728A 株の油脂生産性の回復は、アシル-CoA 合成経路関連遺伝子の発現量の回復によって生じたことが考えられた。従って、各 motif の触媒残基は油脂低生産に重要であることが明らかとなった。本研究の一部は NEDO の支援を受けている。

Elucidation of mechanism of reduced lipid production by the factor responsible for low lipid accumulation in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Rikako Sato¹, Satoshi Ara^{1,2}, Harutake Yamazaki¹, Hideo Araki², Koji Ishiya³, Sachiyo Aburatani³, Hiroaki Takaku¹
(¹Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., ²Fuji Oil Co., Ltd., ³BPRI, AIST)

Key words oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid, Lipase

3C01-05 酵母の多層化した細胞壁の解析とその形成メカニズムについて

○細田 景太¹, 尾島 由紘¹, 田原 悠平², 宮田 真人², 東 雅之¹
(¹大阪公大院・工, ²大阪公大院・理)
azuma@omu.ac.jp

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は細胞膜側から順にキチン層、β-グルカン層、マンナン層で構成されている。細胞壁は機能性タンパク質の表層ディスプレイの場として注目されているが、その他にも主要成分であるβ-グルカンの免疫賦活作用の応用についても研究が進められている。Tang らは *S. cerevisiae* の *SLA1* 遺伝子の C 末端領域を過剰発現させると細胞壁が多層化することを報告している¹⁾。しかし、それ以降細胞壁成分の構成など詳細については報告がない。我々は高い細胞壁含量を持つ酵母は上記のような応用面で有用であると考え、*SLA1* 遺伝子の C 末端領域の過剰発現株を用いて細胞壁構造を中心に解析を進めた。*SLA1* の C 末端領域を過剰に恒常発現する株を構築し、細胞サイズが大きくなり、培養時に細胞が凝集することを確認した。菌体の細胞壁画分を回収し、主な細胞壁構成成分であるグルカン、マンナン、キチン、細胞壁タンパク量を分析した。細胞壁重量当たりの各成分量は野生株と大きな違いはなく、細胞壁が増加してもその組成はあまり変化していないことが分かった。また、細胞当たりの細胞壁量は増加していた。次に、視覚的に構造を把握するために、急速凍結レプリカ法による電子顕微鏡観察を行なった。全ての細胞ではないが、細胞壁の厚みが増加し、細胞壁の最外層にマンナン層と予想される層が観察され、一部はそれと同じように見える層が細胞壁層の内側にも観察された。また、このような現象が見られた細胞は、細胞内部に多量の小胞を含んでいる様子が観察された。このような異常な細胞壁の形成メカニズムを理解するために、細胞壁合成に関連する遺伝子発現量の評価を qRT-PCR を用いて検討している。1) Tang et al., Mol. Cell. Biol., 20(1), 12-25 (2000).

Analysis of multilayered cell wall of yeast and its mechanism

○Keita Hosoda¹, Yoshihiro Ojima¹, Yuhei Tahara², Makoto Miyata², Masayuki Azuma¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ., ²Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall, *SLA1* gene

3C01-06 発酵阻害物質に高い耐性を持つスリランカの酵母の胞子形成と交配育種

○山田 博英¹, 高里 良将¹, スポジニー マドッカ², 水谷 治¹
(¹琉球大・農,²ルフナ大学)
toyama@agr.u-ryukyuu.ac.jp

我々は、以前にスリランカのトッディから耐塩性や耐熱性を持つ *Saccharomyces cerevisiae* の5つの株 (SLY-3, SLY-4, SLY-8, SLY-9, SLY-10) を単離している。これらの株は、発酵阻害物質として知られる、バニリンやフルフラール、ギ酸などにも耐性を示すが、耐性の程度は株ごとで異なっていた。SLY-10 株はバニリンに特に高い耐性を示し、SLY-3 と SLY-4 はギ酸やフルフラールに高い耐性を示した。そこで、SLY-10 株と SLY-3 または SLY-4 株を交配することで、複数の阻害物質に高い耐性を持つような新しい酵母株の作成を試みることにした。まず、一倍体が取得可能かどうか検討した。3つの株で胞子形成能があることが確認できたが、ザイモリエース処理をして生菌体を除去したのちに寒天培地に塗布し、出現したコロニーが一倍体かどうか PCR 法で確認したところ、ほぼすべてが二倍体であることが確認された。このことから、3つの株はすべてホモトリックであると考えられた。一倍体酵母を得ることが難しいと考えられたので、3つの菌株を胞子形成させザイモリエース処理をした後、直接混合して接合体を得るランダム胞子接合法を試みることにした。結果、現在のところまだバニリンとギ酸の両方に高い耐性を示す菌株の取得には至っていないが、ランダム胞子接合法の条件を検討して両阻害剤に耐性を持つ酵母菌株の取得を試みる。

Sporulation and intercross breeding of yeast strains isolated from Sri Lanka with high tolerance to fermentation inhibitors

○Hirohide Toyama¹, Ryousuke Takazato¹, Subodinee Maduka², Osamu Mizutani¹
(¹Fac. Agric., Univ. Ryukyus, ²Univ. Ruhuna)

Key words yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

3C01-07 酵母由来 Gas タンパク質の乳化能と糖鎖構造の関係

○二塚 美紀, 高田 真穂, 尾島 由紘, 東 雅之
(大阪公大院・工)
azuma@omu.ac.jp

乳化現象は食品や化粧品などの多くの産業で応用されており、エマルジョン形成に乳化剤が利用されている。多くの場合低分子化合物が用いられているが、食品分野ではカゼインや鶏卵由来のタンパク質も利用される。タンパク質は低分子に比べ嵩高く乳化を安定させる効果がある。一方、低分子に比べ構造が複雑で水相と油相の界面における乳化タンパク質の構造と機能について理解は進んでいない。我々の研究室ではパン酵母由来の乳化タンパク質に着目して研究を進めている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁抽出物から乳化能を持つタンパク質 Gas1 を同定し¹⁾、2021 年度日本生物工学会大会で報告した。本研究では Gas1 に加えて同じ Gas ファミリータンパク質の Gas5 も研究対象として解析を進めた。これらは GPI アンカーを介して細胞壁に固定されるが、実験では GPI アンカー固定シグナルを除去し、培地に分泌したタンパク質を用いて解析を進めた。どちらも多量の糖鎖を持つタンパク質であり、例えば Gas5 のタンパク質部分は約 52 kDa で、糖鎖量には幅があるがおおよそ 80-130 kDa 程度の糖鎖が結合している。また、C 末端側にはセリンに富んだ領域を持ち、この領域には O-結合型糖鎖が結合していると考えられる。これらの領域を除去するなど変異タンパク質を構築し分泌生産した後、His タグを介して精製し、糖鎖量や乳化能を詳細に解析した。また、N-結合型糖鎖切断酵素である Endo H で処理した後の各種変異タンパク質の糖鎖量の変化と乳化能についても解析した。これら結果から Gas タンパク質を用いた乳化における糖鎖の役割を考察する。

1) Onishi, et al., Food Hydrocoll., 112,106321 (2021).

Relationship between emulsifying ability and sugar chain structure in yeast-derived Gas protein

○Minoru Nizuka, Mao Takata, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

Key words yeast, emulsification, glycosylated peptide, cell wall protein

3C01-08 ビキア酵母によるプレニル化フェノール高生産に向けた代謝経路の最適化

○右城 夕海哉¹, 雲北 涼太¹, 棟方 涼介¹, 矢崎 一史¹,
近藤 昭彦^{1,2}, 進沼 誠久^{1,2,3}
(¹神戸大院・科技イノベ,²神戸大・先端バイオ工研セ,³理研・環境資源,⁴京大・生存研)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

プレニル化フェノールとは、「フェノール類」がテルペノイド由来の炭素鎖「プレニル基」によって修飾を受けた化合物群の総称であり、プレニル基の存在が生理活性の向上および新規活性の付与等の効用をもたらすと報告されている。現行のプレニル化フェノール製造法は、植物からの直接抽出に依存しているが、植物乾燥重量当たりの含量が低く、生育に長い年月を要するため高生産が難しい。そこで近年新たな製造法として、狭い敷地でも密に生産でき、生育の速い微生物を用いた高収率な生産プロセスが注目されている。本研究では、プレニル化フェノール生産のモデルケースとして免疫賦活作用、脂肪燃焼作用など様々な生理活性をもつアルテピリン C の発酵生産に取り組む。アルテピリン C は、シキミ酸経路由来のフェノール類「*p*-クマル酸」が2つのプレニル基「ジメチルアリルリニリン酸 (DMAPP)」によって修飾された化合物である。モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした先行研究では、アルテピリン C 生産量が 34 mg/L と低い。これは生産された *p*-クマル酸がほぼ全て細胞外に排出され、DMAPP による修飾を受けにくいことや、炭素源の競合となるエタノール発酵が原因だと考えられる。そのため本研究では、*S. cerevisiae* に比べ *p*-クマル酸を細胞内に蓄積する割合が高く、好気条件下でエタノールを生産しないといった特徴を持つため、高収率でのアルテピリン C 生産を期待できる酵母 *Pichia pastoris* を宿主に選択した。しかしながら、*P. pastoris* の遺伝子発現経路の遺伝子を導入したところ、アルテピリン C の生産は確認することはできなかった。これは、DMAPP が生育に必須なステロール類の生産に利用され、アルテピリン C 生産に利用できていないためと考えられる。そこで、酵素の改善や代謝工学的なアプローチによって DMAPP の蓄積量向上、及びアルテピリン C の高生産を試みた。

Optimization of metabolic pathways for high production of prenylated phenolic metabolites in *Pichia pastoris*

○Yuya Ushiro¹, Ryota Kumokita¹, Ryosuke Munakata¹, Kazushi Yazaki¹,
Akihiko Kondo^{1,2}, Tomohisa Hasunuma^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBC, Kobe Univ., ³CSRS, RIKENS, ⁴RISH, Kyoto Univ.)

Key words *Pichia pastoris*, prenyl transferase, aromatic amino acid

3C01-09 分裂酵母を用いたグルコースからのアントラニル酸メチル生産技術の開発

○松本 知歩¹, 川村 和佳菜¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
(¹神戸大院・工,²神戸大院・科技イノベ)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

アントラニル酸メチル (2-アミノ安息香酸メチル, Me-ANTH) はブドウの香りがする化合物である。その香りを利用して、食品や医薬品にブドウフレーバーとして広く用いられている。本研究では、*S. pombe* に遺伝子組換えを施し、グルコースからの Me-ANTH を生産することを目標とした。まず、*S. pombe* に Me-ANTH の前駆体であるアントラニル酸 (ANTH) を Me-ANTH に変換する外来遺伝子 *AMT1* (アントラニル酸メチルトランスフェラーゼ 1) を導入した。このとき、2種類の植物由来の *AMT1* (*Z-AMT1*, *M-AMT1*) を4種類のプロモーター (eFla-c, tdh1, gpd3, hsp) で導入し、Me-ANTH 生産に最適な遺伝子とプロモーターの組み合わせを検討した。次に、前駆体の ANTH 消費を抑制するためにトリプトファン合成経路を破壊した (*Atrp4*)。これにより、グルコースからの Me-ANTH 生産を達成した。生産量を向上させるため、更なる ANTH 量増加を図り、シキミ酸経路フラックスを強化するフィードバック阻害非感受性の *ARO3*^{K222L} の導入、ANTH を消費するチロシン、フェニルアラニン合成経路の破壊 (*Atrp7*) を行った。これらの結果、生産量が増加し 22 mg/L の Me-ANTH が生産された。今後は更なる ANTH 消費経路の破壊、ANTH 合成遺伝子の導入を行い、Me-ANTH 生産量の向上を目指す。

Engineering of *Schizosaccharomyces pombe* for methyl anthranilate production

○Chiho Matsumoto¹, Wakana Kawamura¹, Akihiko Kondo², Tsutomu Tanaka¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, metabolic engineering

3C01-10 油性酵母を用いたグルコースからのエステル生産技術の向上

○小柴 歩実¹, 松岡 宥汰¹, 近藤 昭彦², 田中 勉¹
 (¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベーション)
 tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

エステルは化粧品や香水、食品などの身近な場面や、工業用溶剤や可塑剤などの化学産業で利用される幅広い用途を持つ化学物質である。また、油性酵母には脂肪酸を大量に生産するという特徴があり、脂肪酸の前駆体であるアセチル CoA は、目的生産物質であるエステルの前駆体でもある。そこで、エステルの生産には油性酵母が適していると考え、本研究での宿主に油性酵母を選択した。よって本研究では、油性酵母(*Yarrowia lipolytica*)に対して、CRISPR Cas9 system を用いて外来遺伝子の導入を行うことで、グルコースからエステルを生産する技術の開発を目指す。まず、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)由来の四つの外来遺伝子 *atf1*, *atf2*, *eat1*, *ehl1* のエステル生産能を比較し、エステル生産に最も効果的な遺伝子の同定を行った。四つの遺伝子をそれぞれ導入した株において、72 h 培養を行った結果、*atf1* 遺伝子を導入した株が最もエステルを生産し、酢酸エチルを 56 mg/L、酢酸イソブチルを 252 mg/L、酢酸イソアミルを 613 mg/L 生産することができた。さらに、前駆体であるアセチル CoA の蓄積量向上のため、*pex10*, *por1* 遺伝子の追加導入や *aro*, *pyc* 遺伝子の破壊によって生産能の向上を目指したが、生産量は向上しなかった。そこで、前駆体の蓄積量ではなく、前駆体であるアセチル CoA からエステルへの変換能に着目し、*atf1* 遺伝子の追加導入を試みた。その結果、各エステルの生産量を向上させることができ、特に酢酸イソアミルでは生産量が 2.3 倍の 1.41 g/L を達成することができた。そして、今後は *atf1* 遺伝子の発現量が十分になった後、他の遺伝子の追加導入や遺伝子破壊、培養条件の検討を行い、更なるエステル生産量の向上を目指す。

Improvement of ester production technology from glucose using *Yarrowia lipolytica*

○Ayumi Koshiba¹, Yuta Matsuoka¹, Akihiko Kondo², Tutomu Tanaka¹
 (¹Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Yarrowia lipolytica*, metabolic engineering, esterification

3C01-11 分岐鎖アルコール生産量のバイオアッセイ系に向けたイソブタノール超感受性を示す酵母二重破壊株の同定

○佐藤 源気, 黒田 浩一
 (京大院・農)
 kuroda.kouichi.6s@kyoto-u.ac.jp

持続可能な資源循環に向け、バイオ燃料生産が有望視されている。中でも分岐鎖アルコールがガソリンやジェット燃料として有用な特性を有し注目を集めている。高生産性の実現に向け、酵母に代表される微生物株開発の重要性が増している一方、開発プロセスには分岐鎖アルコールの定量手法が高価な分析機器を用いた低効率なものに限られるというボトルネックが存在する。このため、安価さとスループットを併せ持つバイオアッセイ系が待望され、酵母の分岐鎖アルコール生産量に間接的に応答可能な転写因子を利用したバイオセンサーが近年実証されている。しかし酵母の発酵上清中に存在する分岐鎖アルコールの直接的な定量を可能としたバイオアッセイ系の報告はない。

本研究ではイソブタノールによる出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育阻害を利用することで、この未開拓な直接的な定量に対する新規手法の確立を試みた。我々は酵母一遺伝子破壊株の幾つかで、エタノールに対する耐性を維持しながらもイソブタノールに対する感受性が高い表現型を見出してきた(K. Kuroda, et al., *Cell Systems* 2019)。そこで、酵母遺伝子破壊株の生育阻害を指標として、酵母発酵上清中の分岐鎖アルコール濃度の直接的なバイオセンシングが可能ではないかと考えた。分岐鎖アルコール生産酵母株の生産能評価に利用するには既知遺伝子破壊株のイソブタノール感受性が低いため、さらなる感受性を有するような酵母二重破壊株を構築した。その結果、0.2%以下のイソブタノールに対して感受性を示し、かつその生育阻害が酵母の発酵上清下においても維持されるような酵母株を同定した。さらに、分岐鎖アルコール生産酵母株群から得られた発酵上清下において同定した酵母株を生育させることで、酵母の分岐鎖アルコール生産量の直接的なバイオアッセイの可能性を提示した。

Identification of yeast double deletion strains with isobutanol hypersensitivity for application in bioassay system for evaluating branched-chain alcohols titer

○Genki Sato, Kouichi Kuroda
 (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words isobutanol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*, growth inhibition, biosensing

3C01-12 液胞膜へのロドプシン発現による出芽酵母のエネルギー代謝の改善

○大長 薫, 弘埜 陽子, 菊川 寛史, 田村 謙太郎, 原 清敬
 (静大院・薬食生命)
 k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

現在、微生物を用いた有用物質生産において、遺伝子工学的改変により物質生産性を向上させる方法が広く用いられている。しかし、物質生産を行う場合に、根本的に細胞内のエネルギー不足に陥ることが少なくない。そこで本研究では、内部の酸性化のために多くの ATP を消費していると考えられる出芽酵母の液胞に注目して、細胞内エネルギー不足の改善を目指した。液胞膜には V-ATPase が存在し、ATP を消費してプロトン液胞内に輸送することで、液胞内を酸性に維持している。我々は、光駆動型プロトンポンプであるデルタロドプシンを出芽酵母の液胞膜に局在させることで、液胞での ATP 消費を抑えることを試みた。本発表では、その結果について報告する。また、本研究では、さらに V-ATPase の部分欠損株にデルタロドプシンを発現させ、その影響についても検証したので、それらの結果についても併せて紹介する。

Improvement of energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by expressing rhodopsin in vacuolar membrane

○Kaoru Daicho, Yoko Hirono, Hiroshi Kikukawa, Kentaro Tamura, Kiyotaka Hara
 (Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words ATP, yeast, vacuole, rhodopsin

3C01-13 酵母による高効率 D-乳酸生産を目指した機械学習モデルの構築

○山本 祥輝, 山田 亮祐, 松本 拓也, 荻野 博康
 (大阪公大院・工)
 ryamada@omu.ac.jp

【背景と目的】
 種々の環境問題を背景に、生分解性プラスチックへの関心が高まっている。そこで、高機能な生分解性プラスチックの原料として利用される、高純度な D-乳酸の生産技術の確立が必要とされている。既往の研究において、酵母に D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が発現されることで、D-乳酸が生産可能であることが報告されている。また、解糖系の 12 種類の酵素遺伝子の発現量を改変することで、酵母による D-乳酸生産量が向上することも報告されている。しかし、D-乳酸を生産するための計 13 種類の酵素遺伝子の発現量は多様であり、網羅的に検証し最適化することは非常に困難である。そこで、本研究では限られた実験により遺伝子発現量と D-乳酸生産量に関するデータを取得し、そのデータを基に、遺伝子の発現量から D-乳酸生産性を予測する機械学習モデルを構築することを旨とした。

【方法と結果】
 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に 12 種類の解糖系酵素遺伝子および D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子をランダムに導入し形質転換体を作製した。作製した 200 個の形質転換体の D-乳酸生産量および遺伝子発現量を測定し、機械学習に用いるデータを取得した。取得したデータを用い、アンサンブル学習により機械学習モデルを構築した。構築した機械学習モデルを用いることで、13 種類の酵素遺伝子の発現量から D-乳酸生産性を予測することに成功した。また、*PFK1* と *ENO2* の発現量が D-乳酸生産性に特に大きな影響を与えることが示唆された。

【謝辞】
 本研究の一部は、JST さきがけ (JPMJPR20KB) および JSPS 科研費 (JP22H03803) の助成を受けて実施した。

Construction of machine learning model for highly efficient D-Lactic acid production by yeast

○Yoshiki Yamamoto, Ryosuke Yamada, Takuya Matsumoto, Hiroyasu Ogino
 (Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

Key words D-lactic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, machine learning, metabolic engineering

3C03-01 *Aspergillus oryzae* のアルギニン脱炭酸酵素の同定

○村上 優衣¹, 吉岡 美紗¹, 赤坂 直紀², 福田 青郎^{1,2}, 藤原 伸介^{1,2}
(¹関西学院大・理工, ²関西学院大・理工, ³京大・循環型バイオ事業開発研究部門)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【背景と目的】 アグマチンは神経疾患や記憶・学習障害を緩和するポリアミンである。A. oryzae は低 pH 下で固相培地特異的にアグマチンを生産するが、本菌ではゲノム上にアルギニン脱炭酸酵素 (ADC) の遺伝子は存在しない。本研究では、A. oryzae RIB40 の ADC が高発現する部位の探索を行い、ADC の精製と同定を目指した。また、特定した遺伝子から系統的な位置付けを解析した。

【方法】 米を製米し、A. oryzae RIB40 を用いて製麹した試料を気菌糸、栄養菌糸部分に分け、局在性を検証した。次に栄養菌糸を含む画分を粉砕し、この細胞破砕液を用いて硫酸画分を行い、各種クロマトグラフィーによって活性画分を濃縮した。精製画分を用いて LC/MS 解析を行い、タンパク質を同定した。同定したタンパク質からその遺伝子特定し、アミノ酸配列を用いた系統解析を行った。

【結果と考察】 気菌糸、栄養菌糸を比較すると栄養菌糸から高い ADC 活性が検出された。各種クロマトグラフィーを行い、ADC 活性画分を濃縮し精製し、LC/MS 解析を行った。本タンパク質はフォスファチジルセリンデカルボキシラーゼ (PSD) と一致した。PSD は脱炭酸酵素であり、ヒルポイル型の自己切断を受けるが、本菌では ADC として機能すると考えられた。本遺伝子を大腸菌で発現させたところ、37 °C ではプロセス化されず不溶化した。20 °C では自己切断後の β サブユニットと推定される分子が確認でき、ADC 活性もみられた。機能分子の成熟には温度が関与すると考えられる。また系統解析から、今回得られた酵素 (Ao-ADC1) は、細菌のアルギニン脱炭酸酵素 (SpeA) とは系統的な位置付けが異なることが示された。また麹菌には Ao-ADC1 のパラログが存在しており、いくつかが ADC として機能していると思われる。

1) Akasaka N. et al., Appl. Environ. Microbiol. 84: e00722 (2018)

Identification of Arginine Decarboxylase from *Aspergillus*

○Yui Murakami¹, Misa Yoshioka¹, Naoki Akasaka², Wakao Fukuda^{1,2}, Shinsuke Fujiwara^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansai Gakuin Univ., ²Sch. Sci. Technol., Kwansai Gakuin Univ., ³Kyoto Univ., Office of society academia collaboration for innovation)

Key words poly(amino acid), *Aspergillus oryzae*

3C03-02 分散型麹菌の発達したミトコンドリア形成からわかる呼吸活性との相関

○鈴木 智大¹, 小野 太暉^{2,3}, 若井 暁^{2,3}, 近藤 昭彦^{2,3}, 萩野 千秋¹
(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技術イノベ, ³海洋研究開発機構)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景】

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は高いタンパク質生産能を持つ糸状菌であるが、液体培養において菌糸が絡まることで菌糸塊を形成する。これにより、培養時の形態制御が難しく物質生産能の低下が懸念されている。先行研究において、菌糸塊形成に関わる菌糸接着因子を破壊した分散型麹菌が構築された。この分散型麹菌では、従来型麹菌より酵素生産量と菌体増殖量が多いことや糖代謝フラックスがスムーズになっていることが明らかになっている。また、菌体重量当たりの酸素消費量が大きくなっている実験結果を得ているが、細胞内動態との関連付けができていない。本研究では、細胞表面に特徴的な表現型を持つ分散型麹菌の物質生産という細胞内の能力について細胞内小器官との関係性に注目した。

【実験方法】

麹菌の従来型株と分散型株を 3% GYP 培地で 24 時間培養し、培養中の菌糸を採取した後、生細胞用蛍光プローブ (Mito-Tracker および ER-Tracker) を用いて染色した。蛍光顕微鏡を用いてタンパク質分泌が盛んな菌糸先端の細胞を観察した。

【結果および考察】

小胞体の染色像では、両方の株で菌糸全体に強い蛍光シグナルが観察された。小胞体の発達は、麹菌の特徴である高いタンパク質生産能と一致する。一方、ミトコンドリアの染色像では、分散型株において菌糸先端に強い蛍光シグナルが観察され、従来型株では全体的に弱い蛍光シグナルが見られた。したがって、分散型株の菌糸先端においてミトコンドリアが発達していることを示しており、分散型麹菌が従来型より高い呼吸活性を持つ特徴と一致する。分散型麹菌の高い物質生産能は、基質との接触する表面積が多く有効な生細胞の比率が高いためと推察されていたが、代謝解析や本研究での細胞内観察により、発達したミトコンドリアが高い物質生産に必要な活発なエネルギー代謝に貢献していることが示された。

Correlation with respiratory activity as revealed by developed mitochondria formation in hyphae-dispersed type of *Aspergillus oryzae*

○Tomohiro Suzuki¹, Taiki Ono¹, Satoshi Wakai^{2,3}, Akihiko Kondo², Chiaki Ogino¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ³JAMSTEC)

Key words *Aspergillus oryzae*, fluorescent microscopy, mitochondria, protein overproduction

3C03-03 糸状菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L におけるクエン酸排出タンパク遺伝子 *cexA* の高発現によるメタノール効果非依存性のクエン酸高生産

○吉岡 育哲^{1,2}, 岡村 隼志³, 桐村 光太郎^{1,3}
(¹早大・理工学術院, ²千葉大・真菌センター, ³早大院・先進理工)
kkohtaro@waseda.jp

【目的と方法】

クエン酸は *Aspergillus* section *Nigri* に属する糸状菌 (*A. niger* や *A. tubingensis*) を用いて工業的に発酵生産されている。クエン酸高生産菌 *A. tubingensis* WU-2223L は、グルコースを炭素源とする場合にメタノールを 2% (v/v) 添加することでクエン酸生産量が增大する (メタノール効果を示す) 菌株である。しかし、メタノール効果がどのような遺伝子と関連しているのかは不明であった。本研究では、*A. niger* のクエン酸排出タンパク遺伝子 *cexA* に着目し、WU-2223L 株のオルソログ遺伝子¹⁾がメタノール効果の標的の 1 つであることを明らかにした。

【結果および考察】

WU-2223L 株はグルコース 120 g/L を含む SLZ 培地で 12 日間培養すると、メタノール無添加条件では 19 g/L、2% (v/v) 添加条件では 64 g/L のクエン酸を生産した。WU-2223L 株を宿主として、ゲノム編集システム²⁾により *cexA* をノックアウトすると、クエン酸の生産量が 99% 減少した。すなわち、*CEXA* が (サイトゾルから細胞外への) 唯一のクエン酸排出タンパクであること、さらにリアルタイム PCR による測定によってメタノール添加により *cexA* の転写量が增大することを明らかにした。さらに、*tef1* プロモーターを用いて *cexA* を恒常的に高発現する株を作製すると、メタノール無添加条件で 68 g/L のクエン酸を生産した。すなわち、*cexA* を利用してメタノール効果非依存性のクエン酸高生産菌の育種に成功した。

本研究の一部は、科研費基盤研究 (B) (課題番号 20H02906)、(公財) 発酵研究所大型研究助成 (課題番号 L-2020-3-021) およびみずほ学術振興財団工学研究助成の援助を受けて実施した。

1) I. Yoshioka et al., Microbiol. Resour. Announc., 9, e00702-20 (2020).
2) I. Yoshioka et al., J. Biosci. Bioeng., 131, 579-588 (2021).

Methanol effect-independent citric acid hyperproduction by overexpression of *cexA* encoding citrate exporter protein in *Aspergillus tubingensis* WU-2223L

○Isato Yoshioka^{1,2}, Hayato Okamura³, Kohtaro Kirimura^{1,3}
(¹Fac. Sci. Eng., Waseda Univ., ²MMRC, Chiba Univ., ³Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, citric acid, citrate exporter

3C03-04 固体培養に適したクエン酸高生産糸状菌 *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 のゲノム配列の決定

○柴田 朗¹, 吉岡 育哲^{2,3}, 高橋 弘喜^{2,4,5}, 矢口 貴志³, 桐村 光太郎^{1,2}

(¹早大院・先進理工・応化, ²早大・理工総研, ³千葉大学真菌医学研究センター, ⁴千葉大学分子キラリティ研究センター, ⁵千葉大学植物分子科学研究センター)
kkohtaro@waseda.jp

【目的と方法】

当研究室で保有している *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020 は、*Aspergillus* section *Nigri* に分類され、固体培養に適したクエン酸高生産糸状菌である。本研究では、クエン酸生産機構の解明に利用することを目的として、*A. lacticoffeatus* WU-2020 のゲノム配列を決定した。ゲノム配列は、抽出した *A. lacticoffeatus* WU-2020 のゲノム DNA を、Illumina sequencing と Nanopore sequencing を併用した高精度なロングリードベースのアセンブリに供することで決定した。

【結果および考察】

A. lacticoffeatus WU-2020 の染色体ゲノム (8 本) について、11 個の scaffold を取得した。全長 35.9 Mb のゲノム配列を決定し、遺伝子アノテーションによって 11490 個の遺伝子を見出した。また、全長 31.3 kb のミトコンドリアゲノムの配列も決定し、シトクロム系や ATP 合成酵素を全てアノテーションした。WU-2020 株の染色体ゲノムを、基準菌株 *A. lacticoffeatus* CBS101883 のものと比較したところ、4431 箇所 SNP が見出され、そのうち 20 箇所はフレームシフトやナンセンス変異を生じるものであった。また、得られたゲノム情報を、既に登録済みのクエン酸高生産菌 *A. tubingensis* WU-2223L¹⁾ および *Aspergillus* section *Nigri* 菌株のものと比較し、クエン酸高生産菌に共通して存在する 16 個のオルソログ遺伝子を見出した。また、*Aspergillus* section *Nigri* 菌株および一部の *Aspergillus* 属糸状菌とのゲノム情報の比較により、*A. lacticoffeatus* WU-2020 に固有の 69 個の遺伝子を見出した。

1) I. Yoshioka et al., Microbiol. Resour. Announc., 9, e00702-20 (2020).

Draft Genome Sequence of *Aspergillus lacticoffeatus* WU-2020, a Hyperproducer of Citric Acid in Solid Cultivation

○Akira Shibata¹, Isato Yoshioka^{2,3}, Hiroki Takahashi^{3,4,5}, Takashi Yaguchi³, Kohtaro Kirimura^{1,2}
(¹Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., ³Medical Mycology Res. Center, Chiba Univ., ⁴Molecular Chirality Res. Center, Chiba Univ., ⁵Plant Molecular Res. Center, Chiba Univ.)

Key words *Aspergillus*, Citric Acid, fermentation, gene assembly

3C03-05 *Mucor lusitanicus* における糖により誘導される発芽に関わる転写因子の解析

○大澤 亮¹, 村上 周一郎²
 (¹明治大院・農, ²明治大・農)
 smura@meiji.ac.jp

[目的] 糸状菌を用いた有用物質の生産は一般的に液体培地で行われるが、糸状菌の多くは、液体培養下でペレットを形成し、ペレットサイズは培養条件に依り変化することが知られている。これまでの研究で、ペレットサイズの相違は培養初期の胞子の発芽、菌糸の伸長の仕方により影響を受けている可能性が示唆された¹⁾。真菌において、菌糸の伸長などに影響を与える要因として、APSES protein family に属する転写因子による制御が挙げられる。本研究では、接合菌のモデル生物である *Mucor lusitanicus* において、培養初期における形態変化に関与する転写因子を探索し、その遺伝子の発現と形態変化の関係を明らかにすることを目的に研究を進めた。

[方法・結果] 本菌における APSES protein family のホモログをデータベースで検索したところ、12 種類の候補タンパク質が見出された。次に、前培養した PDA プレートから胞子を回収し、生理食塩水に懸濁させることで、胞子懸濁液を調製した。唯一炭素源として D-glucose および D-trehalose が終濃度 1% になるように調整した培地に胞子懸濁液を接種し、30°C で振とう培養した。培養 6 h と 12 h 後に形態の観察、および total RNA を調製し、見出した各転写因子をコードする遺伝子の発現量を RT-qPCR により調べた。その結果、Protein ID 44314 および 160938 の遺伝子において、培養 6 h では D-glucose 培地でのみ発現が見られ、培養 12 h 後では D-trehalose 培地において急激な発現量の増加が見られた。一方、本菌の発芽時の形態は、培養 6 h 後では D-glucose 培地でのみ胞子の膨張(発芽)が見られ、12 h 後では D-trehalose において急激な菌糸の伸長が観察された。以上の結果から、これらの転写因子が胞子の発芽および菌糸の伸長に関与している可能性が示唆された。

1) 大澤ら、第 73 回日本生物工学会大会 大会講演要旨集 p. 194 (2021 年)

Analysis of transcription factors related to germination depending on sugar types in *Mucor lusitanicus*

○Ryo Osawa¹, Shuichiro Murakami²
 (¹Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., ²Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words APSES protein family, germination, *Mucor lusitanicus*

3C03-06 界面バイオプロセスによる *Monascus* 橙黄色色素の選択的高生産

○澁谷 駿太, 上野 拓夢, 松浦 将介, 小田 忍
 (金工大・ゲノム研)
 odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp

[背景・目的]

Monascus 色素はアザフィロン系の化合物であり、主要な色素に赤、橙黄、黄がある。これら色素には様々な生物活性を有するが、特に橙黄色色素である rubropunctatin には抗ガン作用などの生物活性を有することが報告されている。現在、*Monascus* 色素の生産プロセスは液体培養法が主流であるが、この方法では主に赤色色素が生産される。そこで本研究では、変異株と固/液界面発酵法による橙黄色色素の選択的高生産プロセスを開発することを目的とした。

[方法]

Monascus pilosus NBRC 4520 の変異株である UM0070 株のシード培養を 30 °C、200 rpm で 3 日間行った。その後、60 ml 容 PP ボトルに Mn²⁺ などで補強した修正サブロー培地 20 ml を分注し、その上にシード液 200 μl を接種した。接種後、dimethylsilicone oil (KF-96L-1CS; 信越化学工業) を 4 ml 重層し、30 °C で 7 日間培養を行った。培養後、有機層を回収し、脱溶媒した。脱溶媒したサンプルを HPLC-PDA 分析に供した。この実験方法で炭素源、窒素源、炭素源量、窒素源量、pH、本培養温度、前培養期間などの最適化をそれぞれ行った。

[結果]

UM0070 株を用いて最適化を行なった結果、glucose 60.0 g/L、peptone 5.0 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.5 g/L、CaCl₂·2H₂O 1.0 g/L、MnCl₂·4H₂O 2.0 g/L、pH 6.0、本培養温度 25 °C、前培養期間 1 h、シード培養期間 2 日間、シード培養温度 30 °C の時に rubropunctatin の生産量が 3.2 g/L となり、最適化前と比較すると約 5 倍の生産量となった。一方、黄色色素である monascin の生産量は、90 mg/L となり最適化前と比較すると約 1/4 まで減少した。また、rubropunctatin と monascin の割合を比較すると 9.6%、0.4% となり選択的に生産することに成功した。

Enhanced and selective production of *Monascus* orange pigment in an interface bioprocess

○Shunta Shibuya, Takumu Ueno, Shosuke Matsuura, Shinobu Oda
 (Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words rubropunctatin, interface bioprocess, fermenter, *Monascus pilosus* NBRC 4520

3C03-07 ターゲットプロテオミクスを用いた油脂酵母増殖期と定常期の酵素発現プロファイル比較解析

○岩倉 崇文¹, 清家 泰介¹, 岡橋 伸幸¹, 佐藤 里佳子², 高久 洋暁², 松田 史生¹
 (¹阪大院・情報, ²新潟薬大・応生命)
 fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

[背景・目的]

油脂酵母は培地中窒素が枯渇した定常期に油脂生産を開始することが知られているが、酵素発現プロファイルとの関連は未解明である。そこで本研究では油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* を対象としてターゲットプロテオミクスを実施し、増殖期と定常期の間で中心炭素代謝及び脂質代謝経路の酵素発現量を比較することで、油脂生産に寄与する酵素を探索した。

[方法]

L. starkeyi の基準株である NBRC10381 を 50 mL の窒素制限合成培地中で 30°C、120 rpm で回分培養した。増殖期と定常期で回収した菌体からタンパク質を抽出し、トリプシンを作用させてペプチドサンプルを得た。これを脱塩処理し、液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析装置を用いて分析した。解析には skyline を使用し、¹³C 標識ペプチドを内部標準物質として相対定量を行った。

[結果・考察]

L. starkeyi を培養したところ、増殖期の菌体には油脂の蓄積が見られなかったのに対し、定常期の菌体は油脂を蓄積することを確認した。またビーズ破砕と凍結破砕でのタンパク質抽出効率を比較した結果、凍結破砕が優れた破砕効率を示したため、本研究ではタンパク質抽出の際に凍結破砕を行った。ペプチドサンプルを分析した結果、106 の酵素が発見された。増殖期と定常期で発現量の比較を行ったところ、中心炭素代謝を触媒する酵素は条件間での発現量に大きな差が無い傾向が見られた。この結果と先行研究から、*L. starkeyi* の中心炭素代謝の活性が酵素発現以外の方法で制御されている可能性が示唆された。一方、ピルビン酸から酢酸を経由してアセチル CoA を生産する経路 (PDH bypass) の酵素の発現量が定常期で顕著に増加していた。この結果から *L. starkeyi* の脂肪酸合成に PDHbypass の酵素が寄与している可能性が見出された。

Targeted proteomics analysis of enzyme expression profiles in oleaginous yeast at growth and stationary phases

○Iwakura Takafumi¹, Seike Taisuke¹, Okahashi Nobuyuki¹, Sato Rikako², Takaku Hiroaki², Matsuda Fumio¹
 (¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words protein expression, metabolic shift, yeast

3C03-08 アミノ酸添加培地で培養した出芽酵母の ¹³C 代謝フラックス解析

○藤原 逸人, 岡橋 伸幸, 松田 史生
 (阪大院・情報)
 fmatsudaa@ist.osaka-u.ac.jp

[背景および目的]

培地へのアミノ酸添加は出芽酵母の代謝状態や物質生産性に影響を与える。アミノ酸添加時の代謝の流れを知ることは、より正確な物質生産性向上戦略の立案につながる。そこで本研究では、アミノ酸 20 種類を添加した培地中での酵母の ¹³C 代謝フラックス解析法の開発に取り組んだ。

[方法]

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4947 を [1-¹³C]グルコースもしくは 20 種類のアミノ酸を添加した [U-¹³C]グルコース含有 SD 培地で回分培養した。細胞濁度、培地成分、菌体構成成分の測定から解糖収支を決定し、代謝物の ¹³C 標識割合を用いて代謝フラックス分布を推定した。

[結果および考察]

20 種類のアミノ酸を添加した SD 培地で回分培養した *S. cerevisiae* の比増殖速度は 0.455 h⁻¹ と非添加の場合に比べて 1.2 倍大きくなった。また培地成分の分析から、20 種類のアミノ酸すべての取り込みが確認できた。次に、培地から取り込んだアミノ酸の行方を調べるために、[U-¹³C]グルコース含有培地で酵母を培養し、タンパク質由来アミノ酸と細胞内代謝物の ¹³C 標識割合を計測した。その結果、タンパク中の Tyr や Thr には ¹³C 標識が含まれておらず、培地から取り込んだことが分かった。中心炭素代謝中間体の ¹³C 標識割合を見ると、解糖系とペントースリン酸経路の中間体の ¹³C 標識率はおよそ 100% であったのに対し、TCA 回路の ¹³C 標識割合は 30-60% 程度に希釈されており、細胞内のアミノ酸が TCA 回路に流入していたことが分かった。これらの情報をもとに既存の代謝モデルに Glu, Gln, Asp, Asn の取り込み反応を追加し、¹³C 代謝フラックス解析を行った。その結果、グルコースから解糖系とペントースリン酸経路への分岐比はアミノ酸非添加で 5.7、アミノ酸添加で 5.3 と誤差 10% 以内で保存されており、中心代謝経路の代謝の流れは大きく変化しないことがわかった。

¹³C metabolic flux analysis of the central carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* supplemented with amino acids in the culture medium

○Hayato Fujiwara, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
 (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic flux analysis, yeast, central metabolism

3C03-09 バクテリアに曝露した大腸菌細胞の形態解析による新たな細胞死機構の解明

○新里 海咲¹, 川畑 龍司¹, 荒木 勇登², 青井 謙輝¹, 中島 豊¹, 加藤 節¹
(¹広島大院・統合生命科学, ²広島大・工)
setsukatohiroshima-u.ac.jp

【目的】低炭素社会実現への取り組みの中で、バクテリアの発酵生産に注目が集まっている。しかしバクテリアは強い細胞毒性を持つため、実用的な発酵生産には至っていない。バクテリアが細胞を死滅させる詳細な機構は明らかにされていないことから、バクテリアの発酵生産には毒性機構の解明とそこから得られた知見をもとにした細胞への耐性付与が重要である。これまでに当研究室では、大腸菌をバクテリアに曝露すると、細胞質成分が不均一に局在した異常構造を形成し死に至ることを見出していた。この知見をもとにバクテリアに対する細胞の脆弱な点を特定することで、耐性付与技術の開発に貢献できると考えた。そこで本研究では、バクテリア毒性機構の解明を目的として、異常構造の形成機構と細胞への影響について解析した。

【方法・結果】異常構造は変性したタンパク質ではないかと考え、変性タンパク質と共凝集するIbpAという熱ショックタンパク質に、msfGFPを融合したタンパク質を発現する大腸菌を作製した。バクテリアに曝露した大腸菌細胞内のIbpAの局在を観察した結果、異常構造とIbpAの局在は一致した。さらに異常構造の局在は、DNAを染色する試薬であるDAPIの蛍光局在とも一致した。よって、バクテリアは細胞内タンパク質を変性させ、DNAと凝集体を形成することで細胞を死滅させると考えた。これまでにバクテリアによる細胞死に細胞膜損傷が関係することが報告されていたため、異常構造を形成し死滅した細胞における細胞膜損傷について調査した。異常構造形成率が100%の細胞集団に細胞膜損傷の指標とするヨウ化プロピジウム(PI)を添加したところ、細胞集団の死亡率は100%であるのにも関わらずPIで染色されない細胞が20%存在した。以上の結果より、異常構造の形成による細胞死は、細胞膜損傷とは別の新たな細胞死機構であることが示唆された。

Analysis of morphological change in *Escherichia coli* cells exposed to butanol

○Misaki Shinzato¹, Ryuji Kawabata¹, Yuto Araki², Yoshiteru Aoi¹, Yutaka Nakashimada¹, Setsu Kato¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Sch. Eng, Hiroshima Univ.)

Key words *Escherichia coli*, single-cell analysis, butanol, protein aggregation

3C03-10 低エネルギー電子線が微生物細胞に及ぼす影響

○片井 順也¹, 長野 祐太¹, 鈴木 研志², 安池 一貴¹, 林 俊也¹, 田中 朝陽³, 佐々 文洋⁴, 鳴海 哲夫¹, 新谷 政己¹, 田代 陽介¹, 川田 善正⁵, 居波 渉⁶, 二又 裕之⁶
(¹静大院・総合科技, ²静大・創科技院, ³静大院・光医工, ⁴九大・シス情報院, ⁵静大・電工研, ⁶静大・グリーン科技研)
katai.junya.18@shizuoka.ac.jp

微生物の産業利用において代謝機能制御は極めて重要な課題であり、複数の制御技術を有することが望ましい。これまでX線による微生物不活化および腸内菌叢変化が報告されている。同じく放射線に分類される電子線も殺菌に利用されているが、非致死強度の電子線による微生物への影響は不明である。そこで本研究では、低エネルギー電子線が微生物の代謝に及ぼす影響評価を目的とした。

真空管中の電子銃から放出された電子を基板で隔てられた大気中の生物試料へ照射できるElectron-beam Excitation Assisted(EXA)顕微鏡およびAGUN30K-S(AGUN)を利用した。EXAは電子線照射された細胞をリアルタイムで観察できるが、AGUNはEXAより1万倍広い照射面積を持つ。供試菌株には*Escherichia coli* MG1655株を用いLB液体培地で培養した。EXAでの照射条件は、加速電圧および照射電流量をそれぞれ3kVおよび0.5nAとした。照射後60分培養した結果、細胞は棒状に伸長し分裂頻度が減少し、さらに照射回数増加に伴い細胞がより伸長した。一方、照射回数が100回を超えると細胞サイズが小さくなり、1000回では細胞数が減少した。伸長細胞をDAPI染色した結果、核酸が全体に分散した細胞や一定間隔に点在した細胞が確認された。また、AGUNを用いて加速電圧25kV、照射電流量70nAで照射した結果、膜損傷のある球状細胞や伸長細胞が確認された。

以上より、電子線照射による細胞伸長の誘導が確認された。また、伸長細胞ではDNAの複製および分配が確認されたことから、伸長の要因として隔壁形成阻害による分裂抑制が示唆された。さらに、AGUNでは膜損傷および細胞形態変化が観察され、電子線による影響が確認された。以上の結果から、電子線照射条件に応じた細胞形態への影響の差異が認められ、直接的電子供与による微生物細胞の生育および代謝活性制御の可能性が示唆された。

Effects of low energy electron irradiation on bacterium cells

○Katai Junya¹, Nagano Yuta¹, Suzuki Kenshi², Yasuie Kazuki¹, Hayashi Ryoya¹, Tanaka Asahi³, Sassa Fumihiko⁴, Narumi Tetsuo¹, Shintani Masaki¹, Tashiro Yosuke¹, Kawata Yoshimasa⁵, Inami Wataru⁶, Futamata Hiroyuki⁶
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Coop. Maj. Med. Photo., Shizuoka Univ., ⁴Grad. Sch. Fac. Inf. Sci. Elec. Eng., Kyushu Univ., ⁵Res. Inst. Elec., Shizuoka Univ., ⁶Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words electron beam-irradiation, EXA, cell elongation, metabolism

3C03-11 質量分析を基盤としたヒト初代肝細胞の薬物誘発性肝障害評価法の開発

○高橋 政友^{1,2}, 池田 和輝², 秦 康祐¹, 中谷 航太¹, 油屋 駿介³, 富安 範行³, 相馬 悠希⁴, 馬場 健史^{1,2}, 和泉 自泰^{1,2}
(¹九大・生医研, ²九大院・シス生科, ³学振, ⁴九大院・農)
izumi@bioreg.kyushu-u.ac.jp

薬物性肝障害(DILI)の発症を早期に予測、回避するためのin vitro肝毒性評価法が各種開発されてきている。しかし、従来の評価法で使用されている肝がん細胞株は、薬物代謝応答を正確に模倣できていない。また、従来法では複合的な毒性評価やMoA解析は困難とされている。これらの課題を解決する方法論として、我々はヒト肝組織に近い生理機能を有するヒト初代肝細胞(PHH)を用いた質量分析マルチオミクス(薬物代謝, メタボローム, プロテオーム)解析に着目した。一方で、従来の質量分析オミクス計測では、技術的限界から10⁶程度の細胞数が必要であるため、継代培養ができないPHHを用いたマルチオミクス解析の実施には至っていない。本研究では、96-well plateで培養した10⁴個のPHH(従来の100分の1の細胞数)からの前処理法および試料導入法を開発することで、質量分析マルチオミクス解析を基盤とした肝毒性評価法の樹立を目指した。

96-well plateの同一well内から代謝物・タンパク質を高効率で抽出・分画できる前処理法の最適化を行った。さらに、96-well plate上で抽出した少量の試料をLC/MSに安定的に導入できる試料導入法を改良した。薬物代謝物およびメタボローム解析には、親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー高分解能質量分析を使用し、プロテオーム解析はデータ非依存取得によるナノ液体クロマトグラフィー高分解能質量分析により実施した。以上の検討結果により、5×10⁴細胞数からのマルチオミクス解析法の開発に成功した。本分析システムを薬物暴露したPHHに適用したところ、薬物代謝物を検出するとともに、有意に変動する内生の代謝物やタンパク質の発見に至った。本手法は、PHHを用いて薬物代謝物の検出とメタボロームおよびプロテオーム情報の同時取得が可能であることから、新しいDILI評価法としての利用が期待される。

Development of drug-induced liver injury evaluation method based on mass spectrometry using human primary hepatocytes

○Masatomu Takahashi^{1,2}, Kazuki Ikeda², Kousuke Hata¹, Kota Nakatani¹, Shunsuke Aburaya³, Noriyuki Tomiyasu², Yuki Soma⁴, Takeshi Bamba^{1,2}, Yoshihiro Izumi^{1,2}
(¹Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., ³JSPS, ⁴Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words Mass spectrometry, DILI (drug-induced liver injury)

3C03-12 低温で活性の高いβ-ガラクトシダーゼの探索

○執行 崇志, 辻 雅晴
(旭川高専)
tsuji@edu.asahikawa-nct.ac.jp

南極域は極度の低温と乾燥に晒される世界で最も過酷な環境の1つである。この地域に生息する微生物は、低温でも活性のある酵素を保持することから新しい微生物資源として注目を集めている。牛乳には、ヒトの生命活動や健康維持に大切な役割をもつ成分が多く含まれている。牛乳に含まれている乳糖はβ-ガラクトシダーゼ(EC 3.2.1.23)の働きによりガラクトースとグルコースまで加水分解される。しかし日本人の多くは成長するにつれ、β-ガラクトシダーゼの分泌不足により小腸で乳糖が十分に分解できないことが原因の消化不良・腹部不快感・腹痛・下痢などが起こる「乳糖不耐症」という症状が出る。この「乳糖不耐症」により牛乳を摂取することができない人が多く存在する。そのような人のために乳糖不耐症用の牛乳が発売されている。現在市販されている乳糖不耐症用の牛乳は、牛乳を10°Cでβ-ガラクトシダーゼにより処理することで製品中の乳糖を約80%分解したものである。本研究では、日本の南極観測拠点である昭和基地周辺から分離した菌類から、4°Cという低温で活性の高いβ-ガラクトシダーゼを持った菌の探索を試みた。南極、昭和基地周辺から分離した33株の真菌類及び細菌類について、まずはYM寒天培地を用いて各菌株の4°C-20°Cにおける増殖能の確認を行った。その結果、実験に供試した33株全てが4°Cで明確な増殖能を示すことを確認した。次に乳糖を単一の炭素源とした培地(乳糖培地)を用いて4°C-20°Cでの増殖能の確認を行った。担子菌酵母の1種*Mrakia blollopis*の3株が4°Cという低温でも高い乳糖分解能を示した。今後は、スクリーニングにより得た低温でも高い乳糖分解能を示した3株が持つβ-ガラクトシダーゼを精製し、その至適活性温度や至適pHを明らかにしていきたい。

Search for beta-galactosidase with high activity at low temperatures

○Takashi Shigyou, Masaharu Tsuji
(Asahikawa Natl. Coll. Technol.)

Key words beta-galactosidase, yeast

3D02-01 酒粕における D-アミノ酸の分析とその生理機能の評価

○佐藤 友紀¹, 森 あすか², 前川 佳花², 伊藤 謙³, 中村 啓哉⁴,
濱口 裕明⁴, 福崎 英一郎², 進藤 昌¹
(¹秋田県総食研, ²阪大院・工, ³秋田県大院・生資, ⁴岩手医科大学医学部)
tomonori@arif.pref.akita.jp

【背景】清酒は清酒酵母、米、米麴、水、場合によっては乳酸菌から成るもろみを圧搾して製成されるが、その際に残渣である「酒粕」が生じる。近年、酒粕の有効活用が重要化しており、新たな加工法や付加価値を見出すことが重要である。清酒、味噌、醤油といった発酵食品には、L-アミノ酸の光学異性体である D-アミノ酸が豊富に含まれることが報告されたが、酒粕の D-アミノ酸含有量を調査した事例はない。そこで本研究では、酒粕中の D-アミノ酸量と酒粕の機能性を明らかにすることを目的として実験を行った。

【方法】清酒製造場より、圧搾後 24 時間以内に 7 点の酒粕を採取した。また、各酒粕と同一もろみから製成された清酒もサンプルとして得た。熟成による影響を評価するため、採取した酒粕 1 点を 30°C で 1 ヶ月間熟成させた。清酒と酒粕の総アミノ酸濃度を全自動アミノ酸分析装置で、各 D/L-アミノ酸の存在比を LC-MS/MS で分析した。

凍結乾燥した酒粕を配合した実験飼料を調製し、1 ヶ月間正常ラット (Wistar 系、雌性) に供与した。ラットは、麻酔下で安楽死させ、血漿と組織を採取した。肝臓からは脂質を抽出し、トリグリセリドを測定した。

【結果と考察】酒粕から、15 種類の D-アミノ酸が検出された。さらに熟成させることで、通常の酒粕と比較して、D-アミノ酸も数倍から数十倍増加した。ラットに酒粕添加飼料を与えた結果、標準飼料と比べて摂食量には差がなかった一方で、体重は 14 日目から有意に低値を示した。組織重量は、骨格筋には差がなかった一方で、肝臓と内臓脂肪の重量が酒粕摂取群で有意に低値を示した。以上の結果から、清酒の圧搾で生じた酒粕は豊富な D-アミノ酸が含まれており、熟成によってさらに増加することが示された。また、酒粕を経口摂取した場合には抗肥満・抗脂肪肝効果が得られることが示唆された。

The quantitative analysis of D-amino acids and the evaluation of the physiological function in sake lees.

○Tomonori Sato¹, Asuka Mori², Yoshika Maekawa², Ken Ito³, Hiroya Nakamura⁴, Hiroaki Hamaguchi⁴, Ei-ichiro Fukusaki², Sho Shindo¹
(¹Akita Research Institute of Food and Brewing, ²Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., ⁴Iwate Medical University)

Key words D-amino acid, sake lees, sake, amino acid

3D02-02 *Tetragenococcus halophilus* における自然挿入変異のターゲットスクリーニング

○額川 裕矢¹, 脇中 琢良², 茂木 喜信², 渡部 潤^{1,2,3}
(¹福島大・食農, ²ヤマサ醤油, ³福島大・食農・発酵研)
watanabe@agri.fukushima-u.ac.jp

【背景】耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は醤油や味噌などの伝統的な発酵食品製造に使用される重要な微生物であるが、実用的な形質転換系が開発されておらず、この微生物の遺伝子機能解析は困難である。これまでの研究から、*T. halophilus* において内在性のインサクションシーケンス (IS) が活発に転移し、遺伝的多様性を生み出していることが明らかになっている^(1,2)。本研究では、この自発的な IS 転移により構築した変異株ライブラリーと、効率的な PCR スクリーニングを組み合わせたことで、任意の遺伝子に IS が挿入された株を単離する方法である、Targeting spontaneous Insertion Mutations IN Genome (TIMING) 法を確立することを目的とした。

【結果と考察】この方法の実現可能性を把握するため、IS の転移頻度、IS *Teha4* の推定ターゲットサイト数、PCR の検出感度について検討した。その結果、いずれの項目からも問題は認められず、TIMING 法は実現可能と考えられた。そこで、*T. halophilus* NBRC 12172 株を 3-5 回植え継ぎ、1 プール当たり約 500 コロニーからなる変異株ライブラリー (240 プール、約 10 万株相当) を構築した。任意の遺伝子に IS が挿入された変異株が取得できることを示すため、*arcA*, *mtlA*, および *cseA* 遺伝子変異株をスクリーニングした。それぞれの変異株は 1 万、1 万、および 4 万株相当のスクリーニングから取得され、シーケンス解析によって目的の遺伝子座に IS *Teha4* が挿入されていることが確認された。また、これらの株は当該遺伝子の変異から予想される通りの表現型を示した。以上の結果から、TIMING 法は *T. halophilus* の逆遺伝学的解析ツールとしてだけでなく、非遺伝子組換えの育種ツールとしても有効に機能することが示された。

(1) *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. 85:e020208-19.
(2) *Microbiol Spectr.* 2022. 10:e0033622.

Targeted screening for spontaneous insertion mutations in *Tetragenococcus halophilus*

○Yuya Nukagawa¹, Takura Wakinaka², Yoshinobu Mogi², Jun Watanabe^{1,2,3}
(¹Fac. Food and Agric. Sci. Fukushima Univ., ²Yamasa Corp., ³Inst. Ferment. Sci. Fac. Food and Agric. Sci. Fukushima Univ.)

Key words *Tetragenococcus halophilus*, soysauce, lactic acid bacteria, breeding

3D02-03 抗酸化能に優れた乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* の選抜とそれが清酒の劣化に及ぼす影響

○野口 友嗣, 小田木 美保, 河原 航, 石川 卓, 藤井 恵輔, 飛田 啓輔 (茨城産技セ)
tobita@itic.pref.ibaraki.jp

【背景と目的】生もと造りは、環境中に生育する乳酸菌を酒母で繁殖させ、雑菌汚染を防いで酵母を増殖させる清酒製造技術である。生もと造りによる清酒は抗酸化作用が高いことが知られ、酸化による酒質劣化の抑制が期待できるとされる。本研究では劣化しづらい日本酒の開発を目的として、生もとから抗酸化能に優れた乳酸菌 *Leuconostoc (L.) mesenteroides* を選抜し、選抜した菌株を用いて得られた清酒の劣化抑制作用を評価した。

【方法】酵母には明利小川酵母を、酒母には高温糖化乳酸菌添加酒母 (生もと系酒母) および対照に高温糖化酒母 (速醸酒母) を用いた。生もとから乳酸菌を分離後、16S rDNA 塩基配列で *L. mesenteroides* と同定された菌株を用いて醸造試験を行った。成分分析は国税庁所定分析法に従い、抗酸化能は H-ORAC 法により測定した。得られた製成酒は CE-TOFMS でのメタボローム解析を実施後、45°C で 45 日間加速劣化試験に供し、官能評価と FID-GC によりジメチルトリスルフィド (DMTS) 濃度を定量した。

【結果と考察】乳酸菌候補 120 株から、アルコール耐性がなく麹エキス中で増殖可能な 7 株を分離した。分離株により得られた製成酒は、速醸酒母の場合と比較して吟醸香である酢酸イソアミルの濃度が高くなる傾向がみられた。分離株の培養液や製成酒は、既知乳酸菌株や速醸酒母の場合と同等以上の H-ORAC 値を示した。H-ORAC 値が高い 3 株では 3-ヒドロキシアントラニル酸、ヒポタウリン、クマル酸の相対含有濃度が高く、これらが生もと造りでの清酒の抗酸化作用の高さに関与していることが示唆された。一方、実用化を見据えて生体アミノ酸の相対含有濃度が高い菌株を除き、最終的に 3 株を選抜した。選抜した 3 株を用いて得られた製成酒は、速醸酒母の場合と比較して加速劣化試験後の DMTS 濃度が有意に低く、官能評価でも劣化しにくい傾向があることがわかった。

Screening of *Lactobacillus Leuconostoc mesenteroides* with excellent antioxidant capacity and their effect on deterioration of sake

○Tomotsugu Noguchi, Miho Odagi, Wataru Kawahara, Taku Ishikawa, Keisuke Fujii, Keisuke Tobita
(Ind. Technol. Innov. Cent. Ibaraki)

Key words sake, *Leuconostoc mesenteroides*, kimoto

3D02-04 発酵食品由来の *Bacillus* 属の抗菌物質の活性に関する研究

○多賀 直彦, 坂元 佑史
(東海大学 農学部 食生命科学科)
ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

【背景・目的】*Bacillus* 属細菌は、自然界に広く分布しており食品への二次汚染菌となることが多い。また、*Bacillus* 属にはバクテリオシンと呼ばれるタンパク質性抗菌物質を生産するものがある。現在までに市販納豆から分離した *Bacillus* 属のバクテリオシンによる抗菌活性はいくつか検出されたが、増殖阻止円が確認しにくいものがあった。本研究では、最適な実験条件により抗菌活性検出をより確実にすることを目的としている。

【方法】抗菌活性検出には Spot on lawn 法を用いた。抗菌物質生産菌として、市販納豆 35 種、もろみ味噌分離 *Bacillus*. sp SS1 株を使用した。検定菌として *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC13719 を使用した。

【結果・考察】検定菌を接種する重層寒天培地の条件は、重層寒天培地の保温温度を 65°C に設定し、接種量は 20~50 μL が均一に検定菌が増殖し最適であると考えられた。以前まで行っていた保温温度 90°C では接種量 200 μL でもまだらに増殖しており、高温により増殖する菌に限られたためと考えられる。以前まで高い抗菌活性を示していた *Bacillus*. sp SS1 株のポジティブコントロールとしての有用性はないと考えられた。震災による電源消失で保存株が数か月間常温だったため *Bacillus*. sp SS1 株そのものの抗菌活性が低下あるいは失活していると考えられ、再度しよんじよんからの分離、抗菌活性検出を行う必要がある。冷凍保存している市販納豆のうち、-80°C で冷凍保存していた市販納豆分離菌株および、-20°C で冷凍保存していた市販納豆から分離した *Bacillus* 属にのみ滴下位置の輪郭を描くように抗菌活性のよいものが確認された。滴下痕のようにも思えるが、蒸留水や培地のみ等他の物を滴下しても同様にはならなかったことから抗菌活性の可能性が高いと考えられる。今後、より安定して抗菌活性検出が行えるよう検討する。

Study on the activity of antibacterial substances of the genus *Bacillus* derived from fermented foods

○Naohiko Taga, Yuuri Sakamoto
(Tokai University, Faculty of Agriculture, Department of Food and Life Sciences)

Key words *Bacillus subtilis*, antibacterial peptide, bacteriocin, fermented food

3D02-05 発芽誘起物質アナログによる枯草菌芽胞発芽・増殖抑制の可能性の検討

○坂元 仁^{1,2}, 朝田 良子^{2,3}, 古田 雅一^{2,3}, 土戸 哲明²
 (1)関西大・化生工, (2)大阪公立大・微制研セ, (3)大阪大院・工)
 jin.saka@kansai-u.ac.jp

枯草菌はモデル生物として最も研究されている芽胞形成細菌であるが、発芽の活性化機構に関しては多くの謎が残されている。我々は前回、全コレック分解酵素ホモログを多重遺伝子破壊株をベースに GerA および GerB GerK 発芽レセプターアッセイ用の枯草菌芽胞を構築し、新規な発芽誘起物質を多数報告したが、この探索で GerB GerK 発芽レセプター阻害剤候補も検出された。これらの候補物質および対照として既知の GerA 発芽レセプターの阻害剤である D-Ala の存在下で親株、*gerA* 欠損株、*gerB gerK* 欠損株の健全芽胞および加熱損傷芽胞を用いて発芽・増殖抑制物質として機能するかを 37°Cでの L 培地への添加系で調査した。その結果、未加熱処理では親株および *gerA* 欠損株では D-Ala 存在下ではほぼ生育遅延はなかったが、GerA 発芽レセプターしか存在しない *gerB gerK* 欠損株では約 5h の生育遅延が観察された。これより D-Ala による代謝障害の影響ではなく発芽レセプター阻害であることが示唆された。95°C 20 分処理では親株および *gerA* 欠損株では D-Ala 存在下での生育遅延は観察されず、一方、*gerB gerK* 株では D-Ala 存在下では生育遅延が観察されたが 1.5h と未加熱よりも遅延効果は低下した。いわゆる熱活性化とされる加熱損傷による発芽誘発の影響と推察される。一方、GerB GerK 発芽レセプターの阻害が示唆された D-マンニトール添加による生育遅延は未加熱・加熱処理とも全ての株で観察されなかった。GerB GerK 発芽レセプター自体の阻害剤がコレック分解酵素群を含めた系では全く阻害できない不一致は発芽レセプターからコレック分解酵素の活性化機構が吸水→ジピコリン酸漏洩→コレック分解酵素の活性化という 1way ルートではなく、発芽レセプターの吸水が阻害されてもコレック分解酵素は独立して制御できる冗長化された 2way システムの存在を示唆するものであった。

Investigation of the possibility of inhibition of *Bacillus subtilis* germination and growth by germination-inducing substance analogues.

○Jin Sakamoto^{1,2}, Ryoko Asada^{2,3}, Masakazu Furuta^{2,3}, Tetsuaki Tsuchido²
 (1)Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., (2)Res. Ctr. Microorg. Control, Osaka Metro. Univ., (3)Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

Key words spore, injured microbes, germination, *Bacillus subtilis*

3D02-06 酒粕給与による腸管細菌叢の変動および腸管免疫に及ぼす効果

○伊藤 謙¹, 佐藤 友紀², 濱口 裕明¹
 (1)岩手医大・医, (2)秋田総食研)
 kenito@iwate-med.ac.jp

【背景】D-アミノ酸は腸上皮細胞における D-アミノ酸オキシダーゼ(DAO)を介して、片利共生および病原体の防御に関与する。しかし、食品由来の D-アミノ酸が腸内細菌および腸管免疫に及ぼす効果については不明な点が多い。酒粕は、日本酒製造の際の発酵過程で微生物から産生される D-アミノ酸を含むことが知られている。また、清酒粕給与による一部の腸内細菌の変動およびサイトカイン類の発現変動が報告されている。そこで本研究では、酒粕を Wister rat へ給与し、腸内細菌叢および腸管免疫に及ぼす効果を検討した。

【方法】若齢ラットへ飼料中へ凍結乾燥酒粕を添加し、Wister rat へ 30 日間給与した。給与後、回腸および結腸を採取し、組織は RNA 抽出後、RT-qPCR へ供した。消化管内容物は DNA 抽出した後、16S アンプリコンシーケンス解析を行った。

【結果および考察】回腸における DAO 発現量は酒粕給与区で減少したが結腸では変化が認められなかった。また、回腸では TGFβR および defensin の発現量が減少し、結腸では TGFβ および TGFβR の発現量が上昇した。消化管内容物中における腸内細菌叢は、回腸では変化が認められなかったが、結腸では α 多様性および β 多様性に有意な変動が認められ、*Ruminococcus* 属の割合が高まっていた。*Ruminococcus* 属はムチン分解を分解し他の細菌類に糖類およびペプチド・アミノ酸を供給することが知られている(Dai et al., Mol Hum Reprod., 21: 389-409, 2015)。したがって、酒粕は *Ruminococcus* 属を介して α 多様性・β 多様性が增大させることが推察された。ただし、D-アミノ酸と *Ruminococcus* 属の関連性についての報告はなく、現在調査中である。

Changes in the intestinal bacterial flora and intestinal immune response due to lees feeding

○Ken Ito¹, Tomonori Sato², Hiroaki Hamaguchi¹
 (1)Pathol., Iwate Med. Univ., (2)Akita Res. Inst. of Food and Brew.)

Key words sake lees, D-amino acid, intestinal immunity, intestinal microbiota

3D02-07 *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 株による腸管尿酸排泄トランスポーター ABCG2 発現亢進

○根井俊輔¹, 川久保 響², 松崎 竜也⁵, 中野 智木⁵, 竹下 正彦⁵, 新山 拓男⁵, Tsend-Ayush Chuluunbat⁴, 小川 健二郎⁴, 西山 和夫¹, 山崎 正夫¹
 (1)宮崎大・農, (2)宮崎大院・農, (3)宮崎大TT推進機構, (4)蒙科技大, (5)南日本酪農共同(株)
 myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景・目的】

近年、食の欧米化などによるライフスタイルの変化に伴い、尿酸値が 7.0 mg/dL を越える高尿酸血症患者が年々増加傾向にある。高尿酸血症の発症要因として尿酸の排泄低下が知られ、排泄経路の約 3 分の 2 が腎臓から、約 3 分の 1 が腸管を介したものである。近年、腸管上皮細胞に発現する ATP-binding cassette transporter subfamily G member 2 (ABCG2) を介した腸管排泄の低下が、高尿酸血症誘発の主な原因の 1 つとして報告されている。本実験では、モンゴル乳製品由来の乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 株 (LP06CC2) を用いて、尿酸排泄に与える影響を動物実験にて評価した。

【実験方法】

5 週齢雄の Balb/c マウスを Con 群、酵母 RNA およびオキソニン酸カリウム投与により高尿酸血症を誘発した HUA 群、HUA 食に 0.1 および 0.02% の LP06CC2 株を添加した食餌を投与した HUA+LP 群、HUA+Low LP (HUA+L-LP) 群、に分けて 3 週間の飼育を行った。糞中の尿酸は HPLC で測定した。腎機能のマーカーとして、血漿と尿中のクレアチニン値、血漿の尿素窒素を測定した。ABCG2 はウェスタンブロット法、XOD 活性はプテリンからイソキサントプテリンへの変換を指標に蛍光法で測定した。

【結果・考察】

HUA 群と比較して体重、摂食量、臓器重量、糞尿重量、腎機能マーカー、XOD 活性に HUA+LP 群で有意差は認められなかったが、小腸 ABCG2 発現において有意な増加が確認された。また、血漿尿酸値の減少傾向、糞中尿酸値の増加傾向が認められ、LP06CC2 株摂取により尿酸の腎外排泄を促進する可能性が示された。これらの研究結果は、LP06CC2 株が腸管をターゲットとした高尿酸血症予防効果をもつプロバイオティクスとして機能性食品や治療薬の開発につながると思われる。

Lactiplantibacillus plantarum 06CC2 promotes the expression of ABCG2, a transporter of uric acid excretion intestinal.

○Shunsuke Nei¹, Hibiki Kawakubo², Tatsuya Matsusaki³, Tomoki Nakano⁵, Masahiko Takeshita⁴, Takuo Shinyama⁴, Chuluunbat Tsend-Ayush⁴, Kenzou Ogawa⁴, Kazuo Nishiyama⁴, Masao Yamasaki¹
 (1)Fac. Agric., Univ. Miyazaki, (2)Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki, (3)Organization for Promotion of Tenure Track University of Miyazaki Miyazaki Japan., (4)Food and Biotechnology School Mongolian University of Science and Technology Ulaanbaatar Mongolia., (5)Research and Development Division Minami Nihon Rakuno Kyodo Co. Ltd. Miyakonojo Japan.)

Key words ATP-binding cassette transporter G2, *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 株, Hyperuricemia, uric acid

3D02-08 *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 摂取が高脂肪食マウスの脂質代謝に及ぼす影響

○市谷 花帆¹, 松崎 竜也², 中野 智木², 竹下 正彦², 新山 拓男², Chuluunbat Tsend-Ayush³, 小川 健二郎⁴, 西山 和夫⁵, 山崎 正夫⁵
 (1)宮崎大院・農, (2)南日本酪農, (3)蒙科技大, (4)宮崎大・TT推進機構, (5)宮崎大・農)
 myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

肥満は体脂肪が過剰に蓄積した状態のことであり、糖尿病や脂質異常症、高血圧症などの生活習慣病の要因となる。肥満は過剰なカロリー摂取などによって脂肪組織が肥大化、過形成することにより起きる。近年乳酸菌の様々な効果が報告され、抗肥満作用を有する乳酸菌の効果が期待されている。本研究でも、モンゴル乳製品由来の乳酸菌である *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 株 (LP06CC2) が肝臓コレステロール低下作用を持つことを報告している。本研究では、高脂肪食摂取マウスの脂質代謝への影響を評価した。

LP06CC2 株の凍結乾燥菌体を試験に用いた。5 週齢雄の C57BL/6J マウスを通常食 (ND) 群、高脂肪食 (HF) 群に分け、さらにそれぞれの食餌中に 0.1% の LP06CC2 株を添加した ND+LP 群、HF+LP 群の合計 4 群に分け、8 週間飼育した。飼育期間中は体重、摂食量、糞重量を測定した。

体重増加量は群間で有意な差は認められなかった。血糖値は LP 群で減少傾向が認められた。脂肪組織重量は HF 群と比較して HF + LP 群で減少傾向が認められた。血漿中および肝臓中トリグリセリド、血漿中 LDL-コレステロールは LP 群で低値を示す傾向が認められた。また、高脂肪食によって増加した血中総胆汁酸は HF + LP 群で減少傾向が認められた。これらの結果より、LP06CC2 は体脂肪減少や脂質代謝改善効果が期待でき、肥満とそれに伴う代謝異常の予防に対して有効であることが示唆された。

Dietary effect of *Lactiplantibacillus plantarum* 06CC2 on the lipid metabolism in mice fed high fat diet

○Kaho Ichitani¹, Tatsuya Matsusaki², Tomoki Nakano², Masahiko Takeshita², Takuo Shinyama⁴, Tsend-Ayush Chuluunbat³, Kenjiro Ogawa⁴, Kazuo Nishiyama⁴, Masao Yamasaki⁵
 (1)Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki, (2)Minami Nihon Rakuno, (3)Food and Biotechnol. School, Mongolian Univ. of Sci. and Technol., (4)Organization for Promotion of Tenure Track, Univ. Miyazaki, (5)Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words *Lactobacillus plantarum*, lipid degradation, cholesterol

3D02-09 たくあん漬から分離した *Lactococcus lactis* PJR24 が生産するバクテリオシンの精製と性質

○永田 紀奈子¹, 松崎 弘美²
 (¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生)
 matsusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】乳酸菌が生産する抗菌性タンパク質のバクテリオシンは、安全性の高い天然の食品保存料として期待されている。ナイシン A は、我が国で食品添加物として唯一使用が認められているバクテリオシンであるが、酸性領域でのみ安定で、単独ではグラム陰性菌に抗菌作用を示さないことから、使用用途が制限されている。それゆえ、多種多様な新規バクテリオシンの探索が重要である。熊本県阿蘇地方で製造されたたくあん漬より分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* PJR24 は、新規バクテリオシンを生産すると予想している。本研究では、PJR24 株が生産するバクテリオシンを精製し、性質を調べることを目的とした。

【方法および結果】PJR24 株を M17G 培地で、37 °C、18 時間培養した培養液上清について、70%飽和硫酸沈殿を行った。続いて、透析 (MWCO 3,500)、0.1-0.55 M NaCl の直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーによりバクテリオシンを精製し、得られた活性画分の限外ろ過 (MWCO 3,000) を行った。この濃縮サンプルの Tricine-SDS-PAGE および *Lactilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌としたゲルバイオアッセイの結果、約 10 kDa の位置にバンドおよび生育阻害領域が確認された。また、透析サンプルの抗菌スペクトルを調べた結果、ナイシン生産菌を含む近縁種をはじめ、*Enterococcus* 属や *Listeria* 属細菌にも抗菌活性を示した。続いて、pH および熱安定性を調べたところ、pH 3-11 の広い範囲で少なくとも 50%以上の抗菌活性が維持された。また、80 °C、30 分の加熱処理後も 12.5%の残存活性が確認されたが、100 °C以上の加熱では、ほとんど失活した。現在、PJR24 株バクテリオシンの同定に向けて、精製をさらに進めている。

Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* PJR24 isolated from pickled Japanese radish

○Hinako Nagata¹, Hiromi Matsusaki^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Perf. Univ. Kumamoto, ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*

3D02-10 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンに関する研究

○松田 明香里¹, 河原 あい¹, 本田 絢郁², 善藤 威史³, 松崎 弘美²
 (¹熊本県大院・環境共生, ²熊本県大・環境共生, ³九大院・農)
 matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【背景】食経験豊富な乳酸菌が生産する抗菌性タンパク質またはペプチドのバクテリオシンは食品の風味に影響を与えず、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されることから、安全な天然の食品保存料として期待されている。熊本県の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離したバクテリオシン生産乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 は、多成分バクテリオシンを生産する。これまでに、PUK6 株の培養液上清から plantaricins A、F および NC8β を精製し、それらの構造遺伝子を PCR クローニングするとともに生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の全塩基配列 (21.8 kb) を決定した。

【方法および結果】*pln* locus 上の機能不明遺伝子である *orf1* および *orf2* の推定翻訳産物には、バクテリオシン前駆体に特徴的な double-glycine 配列が存在していた。また、2つの *orfs* について RT-PCR を実施したところ、特異的増幅産物が得られ、実際に発現していることがわかった。そこで、Orf1 および Orf2 の推定成熟ペプチド (mOrf1 および mOrf2) を化学合成して抗菌活性試験を行った。その結果、これら 2つの mOrfs は抗菌活性の相乗効果を示したことから、2分子ペプチドバクテリオシンと結論し、plantaricin PUK6 と命名した。これにより、PUK6 株は 4 種類のバクテリオシン (plantaricins A、EF、NC8 および PUK6) を生産することが明らかとなった。また、これら 4 種類のバクテリオシンはそれぞれ異なる抗菌スペクトルを示した。次に、*pln* locus 上の各遺伝子の機能を推定したところ、推定 ABC トランスポーター遺伝子の *plnG* と、そのアクセサリタンパク質遺伝子の *plnH* を見出した。現在、バクテリオシン生産機構を明らかにするため、*plnG/H* 遺伝子破壊株や *plnG/H* 遺伝子とバクテリオシン遺伝子との共発現株の作製を進めている。

Study on the multiple bacteriocins produced by *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6

○Akari Matsuda¹, Ai Kawahara¹, Ayaka Honda², Takeshi Zendo³, Hiromi Matsusaki^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, ³Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words bacteriocin, lactic acid bacteria, *Lactiplantibacillus plantarum*

3D02-11 *In vivo* study of synbiotic formulation for hyperphosphatemia (chronic kidney disorder) prevention

○Ajeeta Anand¹, Peddha Muthukumar Serva², Hideki Aoyagi¹
 (¹Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)
 aoyagi.hideki.ge@utsukuba.ac.jp

Hyperphosphatemia (chronic kidney disorder) can cause vascular calcifications and bone disorders. Phosphate binders are prescribed albeit of adverse effects. We developed new biological approach and formulate tailored synbiotic powder (SP), composed of *Lactobacillus casei* JCM1134 (phosphate-accumulating organism) and *Aloe vera* exclusively to prevent hyperphosphatemia. An *in vivo* study was conducted for hyperphosphatemia management using SP and compared with calcium carbonate (phosphate binder). Induced rats for hyperphosphatemia were randomized into three groups: normal, disease and treatment (calcium carbonate and SP) groups. High plasma phosphate levels were successfully reduced to normal range (5 mg/L or 66.7% reduction) in SP and calcium carbonate groups. In addition to phosphate removal, SP and calcium carbonate treatment reduced creatinine levels by 61.6 % and 28.5 % and, urea levels by 43.5 % and 22.2 %, respectively. Although calcium carbonate is reported for the hypercalcemia development and therefore, limited in use. Histological studies revealed healthier kidneys of SP than disease group while the kidneys in calcium carbonate group were poorly recovered and severely calcified. These results support not only the successful hyperphosphatemia prevention but also the additional health effects by SP application. This is the first report of biological approach to manage hyperphosphatemia using tailored SP. Application of developed SP in the functional food will surely be easy as care is better than cure.

In vivo study of synbiotic formulation for hyperphosphatemia (chronic kidney disorder) prevention

○Ajeeta Anand¹, Peddha Muthukumar Serva², Hideki Aoyagi¹
 (¹Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Dept. Biochem., CSIR Central Food Technol. Res. Inst. India)

Key words probiotics, synbiotics, hyperphosphatemia, kidney disorder

3D04-01 清酒醸造における高温障害米用の消化酵素剤の研究

○山川 達也¹, 朝日 凌大¹, 埴生 智洋¹, 尾関 健二¹, 高山 宗幸², 山城 寛³, 多田 周作³, 三木 翔平³, 山下 秀行³
 (¹金工大・ゲノム研, ²天野エンザイム, ³樋口松之助商店)
 ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【背景・目的】

昨今、温暖化の影響により日照りが続き、イネ登熟期に高温にさらされることでアミロペクチン鎖が長くなる高温障害米が問題となっている。この問題は、全国の清酒醸造現場での吟醸酒、普通酒造りにおける粕歩合の増加に大きく影響を与えている。そこで本試験では小仕込み試験を行い、高温障害米 (山田錦) での粕歩合の減少に効果がある酵素剤の組み合わせ試験を行った。また従来米の溶けが良くない酒米も同様に試験を行った。

【方法・結果】

仕込み試験では、掛米：令和 2 年度産山田錦 (精米歩合 50%)、令和 2 年度産結の香 (精米歩合 40%)、令和 3 年度産美山錦 (精米歩合 60%)、米麴：五百万石 (精米歩合 50%)、協会 9 号 (901 号)、酵素剤：グルク SBG (以下 SBG)、酒造用グルコアミラーゼ「アマノ」SD (以下 GA)、ニューラーゼ F3G (以下 F3G)、グルク吟 (以下吟) (天野エンザイム (株)) を使用した。仕込み試験では、酵素剤添加なしの仕込みに対して、SBG + 吟 (1/5,000 1 : 2)、SBG + F3G (1/5,000 1 : 2)、SBG + GA (1/5,000 1 : 2) の比較試験を行った。その結果、SBG + GA (1/5,000 1 : 2) で最大 17%の粕歩合の減少が見られた。試験結果から次に酵素剤添加なしの仕込みに対して、SBG + GA (添加量 1/10,000、酵素剤割合 SBG:GA = 1:1、1:2)、SBG + GA (添加量 1/5,000、酵素剤割合 SBG:GA = 1:1、1:2、1:3) の比較試験を行った。その結果、SBG + GA (添加量 1/5,000、酵素剤割合 1:2) を添加した仕込みで最大 24%の粕歩合の減少が見られた。よって SBG + GA (添加量 1/5,000、酵素剤割合 1:2) の組み合わせが粕歩合の減少に最も効果がある組み合わせであると考えられた。また米の溶けが良くない酒米では、酵素剤添加なしの仕込みに対して、SBG + GA (添加量 1/5,000、酵素剤割合 1:2) を添加した仕込みで 17%前後の粕歩合の減少が見られた。

Study on digestive enzyme preparations for high temperature damaged rice in sake brewing

○Tatsuya Yamakawa¹, Ryodai Asahi¹, Tomohiro Hanyu¹, Kenji Ozeki¹, Hiroyuki Takayama², Kan Yamashiro³, Shusaku Tada², Shouhei Miki³, Hideyuki Yamashita³
 (¹Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol., ²Amano Enzyme Inc., ³Higuchi Matsunosuke Shoten Co., Ltd.)

Key words High temperature damaged rice, enzyme, Japanese sake

3D04-02 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる「老香」を発生させにくい特長へのSAM低蓄積の関与

○柴田 裕介¹, 池田 優理子², 金井 宗良², 藤井 力³, 赤尾 健³, 五島 徹也², 磯谷 敦子², 山田 翼¹
(¹菊正宗酒造, ²酒総研, ³福島大)
y-shibata@kikumusamune.co.jp

【背景】老香は清酒のオフフレーバーの一種であり、その主要成分であるジメチルトリスルフィド(DMTS)の生成には酵母のメチオニン再生経路の関与が示唆されている¹。協会系酵母と系統の異なる清酒酵母、Km67株を用いた製成酒の貯蔵によるDMTS生成量は協会系酵母を用いたものに比べて低いことが明らかになっている²が、その詳細は不明である。また、Km67株はメチオニン再生経路の中間代謝物であるS-アデノシルメチオニン(SAM)を蓄積しないという特徴を有している。そこで、Km67株のSAM低蓄積に着目しながら、Km67株の清酒において、老香が発生しにくい機構の解明を目指してきた。これまでにSAMを添加した清酒醸造試験を行い、SAMがDMTS生成に関与している可能性が示されていた³ため、今回はSAMとDMTS生成との関連について、より詳細に調べた結果を報告する。

【方法および結果】上槽後の清酒、米麹の酵素抽出液にSAMを添加し、反応後、DMTS生成ポテンシャル(DMTS-pp)を調べた結果、それぞれSAM非添加のものより高かった。一方、火入れ後の清酒を用いた場合、DMTS-ppに差は見られなかった。次に、Km67株を親株として、清酒のDMTS生成に深く関与しているMDE1遺伝子破壊株を作製し、SAMを添加した清酒醸造試験を実施した。酒粕のSAM含量はSAM添加時の方が高かったことから、添加したSAMはある程度酵母に取り込まれていると考えられ、清酒のDMTS-ppを比較した結果、MDE1破壊株では、SAM添加時のDMTS-pp上昇幅が親株より小さかった。以上のことから、SAM添加によるDMTS-pp上昇という現象は化学反応では起こらず、その現象には麹の酵素や酵母のメチオニン再生経路に関与している可能性が考えられた。

- 1) 磯谷敦子, 生物工学学会誌, 89, 720-723 (2011)
- 2) Takao Y., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 126, 617-623 (2018)
- 3) 柴田ら, 日本醸造学会講演要旨集, p7 (2021)

The effect of low SAM accumulation on low hineka odor in sake brewed with a non-Kyokai yeast

○Yusuke Shibata¹, Yuriko Ikeda², Muneyoshi Kanai², Tsutomu Fujii³, Takeshi Akao³, Tetsuya Goshima², Atsuko Isogai², Tasuku Yamada¹
(¹Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd., ²NRIB, ³Fukushima Univ.)

Key words sake yeast, S-adenosylmethionine, Dimethyl trisulfide

3D04-03 酵母のホモ変異型遺伝子を含む染色体領域の異数化が清酒醸造に与える影響

○堀田 夏紀¹, 小高 敦史¹, 戸所 健彦¹, 杉山 峰崇², 石田 博樹¹
(¹月桂冠・総研, ²広工大・生命)
hotta@gekkeikan.co.jp

【背景・目的】清酒酵母では清酒の香味に影響を与える遺伝子変異が多数知られており、それらの変異はヘテロ変異からホモ変異にすることで形質を強化することができる。また、遺伝子の変異だけでなく、染色体の異数性や部分異数性によってそのコピー数が増加することで表現型が変化することも知られている。本研究では、清酒醸造特性に影響を与えることが報告されている遺伝子をホモ変異型で持つ当社保有菌株を用いて、変異遺伝子を含む染色体領域を異数化させることで、その形質をさらに強化できるか検討した。

【方法・結果】清酒の香味に影響を与える遺伝子をホモ変異型で持つ当社保有清酒酵母を親株として、その変異遺伝子のコピー数を1コピー増加させた株を作製した。1コピー増加株は、変異遺伝子のみの重複効果を見るために、プラスミドを用いた変異遺伝子の導入株の作製と、また、異数体を取得した場合の複数遺伝子の重複効果を見るために、任意の染色体領域を重複できるPCR-mediated chromosome duplication (PCDup) 法¹を利用した染色体部分重複株の作製を行った。PCDup法では、変異遺伝子を含む約200 kbの領域を重複させた。作製したプラスミド導入株と染色体部分重複株を、総米50gの清酒醸造試験に供し、上槽酒の各種分析を行った。その結果、変異型ARO4をホモ変異型で持つ株は、プラスミド導入株、部分重複株のどちらの場合でも、変異型ARO4のコピー数を増加させることでバラ様の香気を有する酢酸β-フェネチルやβ-フェネチルアルコールの生産量が増加した。以上の結果より、遺伝子変異により増加した香気成分を、異数性を変化させることでさらに高生産する株を取得できる可能性が示された。現在、ARO4以外の清酒の香味に影響を与える遺伝子について検討を行っている。

1) W. Natesuntorn et al., *Sci. Rep.*, 5, 12510 (2015)

Effect of aneuploidy of chromosomal regions containing homozygous mutant genes in yeast on sake brewing

○Natsuki Hotta¹, Atsushi Kotaka¹, Takehiko Todokoro¹, Minetaka Sugiyama², Hiroki Ishida¹
(¹Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd., ²Fac. Life Sci., Hiroshima Inst. Technol.)

Key words sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, aneuploidy, genome engineering

3D04-04 ゲノム編集技術を用いた有機酸高生産能を有する清酒酵母の育種

○西 智之¹, 西田 郁久², 本間 一郎¹, 田村 博康¹, 赤尾 健³, 大矢 禎一⁴, 平田 大^{1,2,5}
(¹朝日酒造, ²新潟大・日本酒学セ, ³酒総研, ⁴東大・院新領域, ⁵広島大)
nishitomoyuki@asahi-shuzo.co.jp

【背景】一般的に、複数の優良醸造特性を有する清酒酵母の育種には、長い時間と大きな労力が必要とされてきた。近年、我々は、CRISPR-Cas9ゲノム編集技術を清酒酵母に導入し、短期間かつオフターゲット変異をほとんど生じない清酒酵母の育種について報告してきた¹。これまで、清酒酵母の泡なし化、尿素非生産化、老香低減、吟醸香の増加に関する遺伝子がゲノム編集の標的とされてきたが^{1,2}、清酒の味わいに関する遺伝子については未だゲノム編集技術利用の報告はない。清酒の味わいに影響する有機酸には、コハク酸、リンゴ酸、酢酸などがあり、これらは発酵中に酵母によって生成される。そこで、本研究では、有機酸生成に関与する遺伝子を標的として、ゲノム編集技術を用いて、清酒酵母への有機酸高生産能の付与を試みた。

【方法・結果】まず、きょうかい酵母7号および朝日酒造自社酵母を親株として、有機酸生成に関与する既知の2つの遺伝子に着目し、ゲノム編集技術を用いて、単独あるいは二重欠損変異株を取得した。次に、得られたゲノム編集株について、総米100gの小仕込み試験を行い、清酒の一般成分及び有機酸組成を分析した。その結果、二重欠損株では、親株と比べ、酸度が約1.7倍に、特定の有機酸量も約5倍に上昇した。以上より、ゲノム編集技術を用いて標的遺伝子に変異を導入することで清酒酵母に有機酸高生産能を付与し、それにより、清酒の酒質(味わいに関与する有機酸量)を容易に変えられることを示した。

- 1) Chadani et al., *Cells*, 10(6), 1299 (2021)
- 2) Ohnuki et al., *BBB*, 83(8), 1583-1593 (2019)

Development of sake yeast strains with high productivity of organic acids using genome editing

○Tomoyuki Nishi¹, Ikuhisa Nishida², Ichiro Honma¹, Hiroyasu Tamura¹, Takeshi Akao³, Yoshikazu Ohya⁴, Dai Hirata^{1,2,5}
(¹Asahi Sake Brewing Co., Ltd., ²Sakeology Center, Niigata Univ., ³NRIB, ⁴Grad. Sch. Fro. Sci., Tokyo Univ., ⁵Hiroshima Univ.)

Key words sake yeast, genome editing, CRISPR/Cas9, organic acids

3D04-05 自然界から分離した清酒製造用酵母の4-ビニルグアイアコール生成能とその生成遺伝子の一塩基多型

○高橋 空良¹, 数岡 幸孝²
(¹東農大院・応生研, ²東農大・応生科)
t3kazuoka@nodai.ac.jp

4-ビニルグアイアコール(4-VG)は清酒において燻煙臭として忌避される化合物であり、きょうかい清酒酵母など優良酵母は長年の淘汰と選抜によりこの生成能が失われている。そのため、新規の優良酵母を取得する際の選抜指標となると考えられるが、きょうかい酵母以外の清酒製造用酵母については十分に調べられていない。そこで当研究室で自然界から分離し、保存・頒布している清酒製造用酵母について50 mg/L フェルラ酸添加麹汁培地での4-VG生成能を調べたところ、すべての株で培養液中の4-VG含量がきょうかい9号と同等であり、その生成能が失われていることが明らかになった。また、酵母の4-VG生成にはFDC1およびFdc1の脱炭酸反応に必要な補因子をコードするPADIの両遺伝子が必須であり、醸造酵母の4-VG生成能の相違は両遺伝子の一塩基多型と関連がみられることが知られている。本研究で用いた清酒製造用酵母の4-VG生成能遺伝子の一塩基多型についても現在検討中である。

4-Vinylguaiaicol productivity and single nucleotide polymorphism of FDC1 and PADI among the practical yeast strains isolated from natural environment used in sake brewing

○Sora Takahashi¹, Takayuki Kazuoka²
(¹Graduate school of applied bioscience, Tokyo Unit. Agric., ²Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, single nucleotide polymorphism, sake, 4-Vinylguaiaicol

3D04-06 橘の花から分離した野生酵母のビール醸造への適用に向けた育種

○栗原 智也¹, 大橋 正孝¹, 大橋 貴生²
 (¹奈良産振セ,²摂南大・理工)
 kuwahara@pref-nara.jp

【背景・目的】

我々は、地域資源を活用した奈良県オリジナルビールを開発するため、これまで、奈良県と歴史的関連の深い柑橘類である橘の花から出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を1株分離している。しかし、分離株 Kikka はビール醸造に必要なマルトース発酵能を欠失していたことから、本株をビール醸造へ適用させることを目的に、マルトース発酵能を付与、さらには向上させるための育種を試みたので報告する。

【方法】

Kikka を 0.02 % 2-デオキシ-D-グルコース (2-DOG) 含有のマルトースを唯一の炭素源とする最少寒天培地で培養し、自然突然変異により 2-DOG 耐性となった株からマルトース発酵能付与株を選抜した。さらに、取得したマルトース発酵能付与株に対して、EMS による変異原処理を行い、再度 2-DOG 耐性及びマルトース発酵性を指標にマルトース発酵能向上株の選抜を行った。得られたマルトース発酵能付与・向上株と市販ビール酵母を用いてマルトース発酵試験及び麦汁発酵試験を行い、マルトース消費量、エタノール生成量を測定することで発酵能を評価した。

【結果】

Kikka を育種した結果、マルトース発酵試験においてマルトース消費が確認され、かつ、麦汁発酵試験においてエタノール生成量が Kikka の約 3 倍になったマルトース発酵能付与株 K-mal を取得した。しかし、K-mal はマルトース発酵能を獲得したものの、エタノール生成量は市販ビール酵母と比べて約 25 % と低く、ビール醸造への適用は困難であると考えられた。そこで、K-mal に対して EMS 処理によるさらなる突然変異育種を実施した結果、麦汁発酵によるマルトース消費量、エタノール生成量が、いずれも K-mal と比べて約 3 倍に向上したマルトース発酵能向上株 M8-13 を取得した。M8-13 はエタノール生成量が市販ビール酵母の約 80 % にまで向上しており、ビール醸造への適用が可能であることが示された。

Breeding of wild yeasts isolated from *Citrus tachibana* flowers for application to beer brewing

○Tomoya Kuwahara¹, Masataka Ohashi¹, Takao Ohashi²
 (¹Nara Pref. Inst. Ind. Dev., ²Sci. Eng., Setsunan Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol, breeding, beer

3D04-07 オルニチン及びカブロン酸エチル高生産清酒酵母の育種と醸造特性の解析

○大橋 正孝¹, 高木 博史²
 (¹奈良産振セ・バイオ・食品グループ,²奈良先端大・バイオ)
 m-oha-niid@von.jp

【背景と目的】我々は清酒の消費低迷を打破するために、従来の清酒酵母との差別化が可能な奈良県独自の菌株育種を目指している。これまでの研究で、遺伝子組換え技術を用いずに、アルコール性疲労の抑制や肝機能の促進などの機能性を有するオルニチンを細胞内に高生産する変異株（オルニチン高生産酵母）の取得に成功した。そのオルニチン高生産酵母で醸造した清酒及び酒粕には、親株で醸造したそれらと比較して、オルニチンが約 3 倍多く含まれる。しかし、清酒の良い香りとされる吟醸香の主要成分であるカブロン酸エチルの生産性は高くない。そこで、酵母の付加価値を高めるために、オルニチン高生産酵母を親株として、セルレニン耐性株をスクリーニングすることによって、カブロン酸エチル高生産清酒酵母の育種を検討した。

【方法及び結果】オルニチン高生産酵母を培養し、EMS 処理後、セルレニン及びブリンアナログ（アセチル-2-カルボン酸：AZC）を含有する YPG（YPD のグルコースの代わりにグリセロールを含む）寒天培地で生育できる変異株を 32 株分離した。各株を 20% グルコース含有 YPD（YPD20）液体培地で 30°C、72 時間培養後、培養液中のカブロン酸エチル含量を GC/MS ヘッドスペース法で測定した。その結果、培養液中のカブロン酸エチル含量が親株よりも顕著に増加した株を 2 株分離した。この変異株を用いて、総米 46g の小仕込み試験を行い、清酒中の香り成分などを含む醸造特性を解析した。炭酸ガス減量の結果から、変異株の発酵能は親株と同等であった。また、変異株を用いて醸造した清酒中のカブロン酸エチル含有量は親株の 3 倍以上に増加したが、清酒及び酒粕中のオルニチン含量は親株と同程度であった。以上の結果から、オルニチン及びカブロン酸エチルを共に高生産する清酒酵母を 2 株取得することができた。

Isolation of Japanese sake mutants that accumulate ornithine and ethyl caproate and analysis of their fermentation profiles

○Masataka Ohashi¹, Hiroshi Takagi²
 (¹Nara Pref. Inst. Ind. Dev., ²Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)

Key words sake yeast, ornithine, ethyl caproate

3D04-08 高濃度エタノールストレス下における酵母のプロテオスタシスと適応応答

Vo Thi Anh Nguyet, 石川 優, 吉田 雅徳, 堀江 楓子, 古谷 昇,
 ○井沢 真吾
 (京工繊大院・工芸科学)
 thioredoxin@kit.ac.jp

高濃度のエタノールは自らエタノールを産生する酵母にとってもストレスとなり、9%以上のエタノールは翻訳抑制などの障害を引き起こす。本研究では、エタノールがプロテオスタシスにおよぼす影響と酵母の適応応答について解析した。変性・凝集タンパク質が隔離される deposition sites について検討したところ、10%エタノール処理によって細胞質では CytoQ が、ミトコンドリアでは DUMP が形成されることを確認した。また、低濃度のエタノール (6%) で前処理を行うと、10%エタノール下での deposition sites の形成が顕著に抑制された。一方、DUMP 内の脱凝集酵素である Hsp78 は、高濃度エタノールによる翻訳抑制下でも発現量が増加したが、欠損株 *hsp78Δ* ではストレス解除後の DUMP の消失が遅延し、呼吸欠損株の発生頻度が有意に上昇した。そのため、高濃度エタノール下ではミトコンドリアタンパク質がダメージを受け、その対処に Hsp78 の発現誘導が寄与していることが示唆された。さらに、タンパク質の分解についても検討を行った。10%エタノールストレス下ではマクロオートファジーの誘導は認められなかったが、26S プロテアソームによる短寿命タンパク質やオーキシシテグロンシステムでの分解が強く抑制された。一方、6%エタノールでの前処理によってエタノール耐性が向上し、これらのタンパク質分解の阻害は顕著に緩和されたが、プロテアソーム構成因子の主要な転写活性化因子である Rpn4 の欠損株や前処理中の新規タンパク質合成をシクロヘキシミドで阻害した場合には、分解阻害の緩和が認められなかった。以上の結果から、高濃度エタノールストレス下ではタンパク質の新規合成と分解が強く抑制される一方で、変性したタンパク質は deposition sites に隔離され、酵母細胞内タンパク質の急激な減少が防がれている可能性が示唆された。

Adaptive response in proteostasis network of yeast cells under severe ethanol stress

Nguyet Vo Anh, Yu Ishikawa, Masashi Yoshida, Fuko Horie, Noboru Furutani,
 ○Shingo Izawa
 (Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words ethanol stress, proteolysis, protein aggregation, mitochondria

3D04-09 含硫アミノ酸応答に着目したチオール様香気を生成する清酒酵母の育種

○園 彰吾, 窪寺 隆文, 明石 貴裕
 (白鶴酒造)
 shogo-kakoi@hakutsuru.co.jp

清酒に含まれる華やかな香り成分として、カブロン酸エチルや酢酸イソアミルのほか、マスカット様のテルペンアルコールなどがよく知られている。近年では、ソーヴィニヨン・ブランワインの特徴香であり、ライチ様の香りを呈する 4-mercaptopent-4-methylpentan-2-one (4MMP) と呼ばれるチオールが清酒から検出され、注目を集めている。4MMP はグルタチオン抱合体 (glut-4MMP) としてブドウや稲 (米) などの植物中に存在しており、ワイン醸造では、glut-4MMP がトリペプチドトランスポーターである Opt1 を介して酵母に取り込まれ、β-リアーゼの作用で 4MMP が遊離すると考えられている。清酒醸造においては、大吟醸仕込みや、タンパク質含量の少ない低グルテリン米と呼ばれる白米を原料に用いることで 4MMP が生じやすいことは報告されているが、その機構は明らかにされていない。

Opt1 の発現は、メチオニンなどの含硫アミノ酸によって著しく抑制されることから、清酒醸中でもその発現が抑制されていると推察した。そこで、より多くの 4MMP を含む清酒醸造を目的とし、含硫アミノ酸存在下での Opt1 の発現量が多い清酒酵母の取得を試みた。初めにメチオニンおよびシステインアナログ耐性株を取得して、これらをメチオニンと glut-4MMP とを含む液体培地で培養し、香り強度によってスクリーニングした。次に小仕込み試験を行い、4MMP 様の香りを生じた 3 株を選抜した。これらの選抜株を最少培地で培養し、Opt1 発現量解析を行ったところ、メチオニン非添加条件では 3 株、10μM メチオニン条件では 1 株において、それぞれ親株より発現量が高かった。また、小仕込み醪から酵母を回収して同様に Opt1 発現解析を行ったところ、親株の約 1.3 倍に発現量が向上した株が 1 株得られた。

Breeding of sake yeast producing thiol-like aroma focused on sulfur-containing amino acid response

○Shogo Kakoi, Takafumi Kubodera, Takahiro Akashi
 (Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd.)

Key words sake, *Saccharomyces cerevisiae*, amino acid, transporter

3D04-10 高浸透圧条件における酵母 OCM-2 株の脂肪酸組成の変化～GPD1 遺伝子破壊による影響～

○三木 健夫, 佐野 絢子
(山梨大院・医工農)
takemiki@yamanashi.ac.jp

【目的】酵母に含まれる脂肪酸の構成比は生育段階を通じて比較的一定の値を示すが、培養温度を変化させる大きく変化することが知られている。酒類の醸造環境を考えると、酵母は低温環境への適応と果汁に含まれる高濃度糖分による浸透圧ストレスへも同時に適応する必要がある。しかし、物理的な障害を与える浸透圧ストレスによる酵母の脂肪酸構成比について調査した報告は少ない。本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* OCM-2 株および本株の GPD 遺伝子破壊株に対して 1.5M ソルビトール溶液による浸透圧ストレスを与え、両株の脂肪酸構成比の変化について調査した。

【方法】*S. cerevisiae* OC-2 株および本株の GPD1、GPD2 遺伝子破壊株を SD 合成培地に定常期まで培養した。酵母細胞を集菌し洗浄した後、1.5M ソルビトール溶液(50ml)に対して 2.5×10^7 cells/ml になるよう細胞を接種し、28°C で 2 時間、浸透圧ストレスを与えた。ストレス処理後、細胞を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を用いて、酵母細胞より脂肪酸を抽出・精製した。脂肪酸抽出をガスクロマトグラフィーに供し、各種脂肪酸構成比を算出した。

【結果】非ストレス条件下にある OCM-2、GPD1 および GPD2 遺伝子破壊株の脂肪酸構成比 (C16, C16:1, C18, C18:1) は、3 株とも同様であった。一方、浸透圧ストレスを与えた OCM-2 および GPD2 遺伝子破壊株では、C18:0 の比率が増加し、逆に C16:1 が減少する傾向が見られ、低温適応とは異なる脂肪酸構成比の変化が見られた。一方、GPD1 遺伝子破壊株では、浸透圧ストレスにより C18:0 に対する C18:1 の割合が親株と比較して大幅に増加していることがわかり、他株とは異なる変化が観察された。この結果から、GPD1 遺伝子破壊株では、浸透圧ストレスが本株の膜流動性に大きく影響を与えていることが示唆された。

Alteration in fatty acid composition of GPD gene disrupted yeast under hyperosmotic conditions.

○Takeo Miki, Ayako Sano
(Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi)

Key words yeast deletion strains, membrane lipids

3D04-11 酵母細胞の高温ストレスによる活性酸素発生量に関する研究

○佐野 絢子, 田中 伶奈, 天野 真希, 三木 健夫
(山梨大院・医工農)
takemiki@yamanashi.ac.jp

【目的】

Saccharomyces cerevisiae DBY746 株 (MAT:α, trp1-298, his3D-1, leu23-112, ura352) は、熱ストレスを与えると他菌株に比べて、多くの活性酸素が細胞内で発生することが知られている。発表者らは、外環境から加わる熱ストレスが直接、細胞内の活性酸素を誘引する可能性は低いと推定している。本研究では、熱ストレスによる細胞内小器官の損傷により活性酸素が発生する可能性について検証することを目的に、DBY746 株のミトコンドリア欠損株を構築し、本株の熱耐性および DCFH-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)を用いた細胞内活性酸素量について調査した。

【方法】

1. 熱耐性の調査

S. cerevisiae DRY746 株および本株のミトコンドリア欠損株をYPD液体培地に定常期まで培養した。酵母細胞を集菌し洗浄したのち、42.5°C で 60 分間のストレス処理を行った。ストレス未処理培養液のコロニー数を 100% とし、60 分のストレス付加後の生存率を算出した。

2. ROS 発生量の測定

YPD 液体培地に定常期まで培養した両株を集菌し、菌体を洗浄後、DCFH-DA を加え、28°C で 30 分間インキュベートした。その後再び菌体の洗浄を行ったのち、42.5°C の熱ストレスを 60 分間与えた。蛍光分光光度計を用いて蛍光強度を測定し、ストレス未処理の値を 0 とし、活性酸素の増加率を算出した。

【結果】

DBY746 株のミトコンドリア欠損株を DAPI および MitoBriteLT Green で染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、親株に比べて染色されるミトコンドリアはほとんど見られなかった。また、両株の熱耐性に大きな差は見られなかった。一方、熱ストレスを与えたミトコンドリア欠損株における活性酸素発生量は親株に比べ 1/10 以下に減少した。以上の結果から、DBY746 株で見られる熱ストレスによる活性酸素の増大は、ミトコンドリアが発生源であることが示唆された。

Heat stress-induced generation of reactive oxygen species in yeast

○Ayako Sano, Reina Tanaka, Maki Amano, Takeo Miki
(Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi)

Key words yeast, reactive oxygen species, heat shock, mitochondria

3E01-01 微細藻類と動物細胞を利用した循環型食料生産システムの構築

○岡本 裕太^{1,2}, 原口 裕次³, 坂口 勝久¹, 澤村 直哉³, 朝日 透^{1,4}, 清水 達也²
(¹早大院・先進理工, ²女子医・先端研, ³早大・ナノライフ, ⁴早大・理工)
tasahi@waseda.jp

現在、世界的な人口増加などを背景に食肉の需要が増加しているが、既存の食肉生産システムは温室効果ガスの排出要因の 33% を占めるなどして持続可能性に課題がある。そこで、この問題を解決する新たな食肉として培養肉が注目されている。培養肉は家畜の筋細胞や脂肪細胞を大量増幅させることによって得られ、従来の食肉よりも省資源・低環境負荷で生産が可能になる。一方で培養肉の生産にもいくつか課題が指摘されており、そのうちの一つに、大量の培養液を消費する問題が挙げられる。本研究では、将来的な培養肉を含む培養食料の普及に向け、動物細胞と微細藻類を利用した、完全循環型の新規食料生産システムを提案する。微細藻類によって動物細胞培養において蓄積するアンモニアなどの代謝産物を除去し、さらに増殖した微細藻類から基礎栄養素を回収し、再び動物細胞栄養源として利用することで、培養液を廃棄せずに培養肉の生産が可能となる。

食料生産システムの実現に向け、本研究ではまず微細藻類と動物細胞が同一の培養液で培養可能かを調べた。初代鶏細胞を成長因子分泌細胞と低グルコース培地によって調製された順化培地によって培養し、次にその上清を用いて微細藻類の 1 種である *Chlorococcum littorale* を培養した。そして再度同一の培養液を用いて鶏細胞の培養を行った。この過程において、培養液中の栄養や代謝産物のモニタリングを行うと同時に、鶏細胞と微細藻類の増殖を評価した。その結果、鶏細胞と微細藻類のいずれも同一の培養液によって増殖可能であることや、鶏細胞から分泌されたアンモニアが微細藻類によって利用されることが確認された。本研究によって示された動物細胞と微細藻類の共利用による培養系は、循環型食料生産システムの実現可能性を高めると同時に、培養液を大量に消費する抗体医薬品の生産などにも応用が期待される。

Establishment of the Circular Cell Culture System with microalgae and mammalian cell

○Yuta Okamoto^{1,2}, Yuji Haraguchi², Katsuhisa Sakaguchi¹, Naoya Sawamura³, Toru Asahi^{1,4}, Tatsuya Shimizu²
(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²Inst. Adv. Biomed. Eng. Sci., Tokyo Womens Medical Univ., ³Res. Org. Nano & Life Innov., Waseda Univ., ⁴Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words cultured meat, wastewater treatment, microalgae, sustainability

3E01-02 モデルウイルスを用いた室内環境中のウイルス暴露評価に関する研究

○小田 慎太郎¹, 岩橋 均^{1,2,3}, 高橋 淳子⁴
(¹岐阜大院・自然科, ²岐阜大・応生科, ³岐阜大院・連農, ⁴早大院・情報生産システム)
h1884@gifu-u.ac.jp

【目的】昨今の COVID-19 の流行により空気中ウイルス検出技術が注目されている。本研究では室内空気中のウイルス検出を目的としてフィルターと吸引ろ過ポンプ (Rocker Lafil-400 LF-30) を用いた簡易型のウイルス捕集器を作成し、パーティクルカウンター及び定量 PCR による性能評価を行った。次に室内環境中のヒトのウイルス曝露量モデル実験系構築を試みた。

【方法・結果】吸引ろ過ポンプに適合する六種類の材質のフィルター (不織布マスク、親水性 PTFE、セルロース、セルロースアセテート、セルロースエステル、ガラス繊維) を選出し、フィルターの最適化を行った。初めにパーティクルカウンターによる空気中の通過粒子計測 (空気動力学径 0.3 μm) を行ったところ、親水性 PTFE が最も捕集効率が高く約 95% であった。次にモデルウイルス (*Pseudomonas phage phi6*, 1.0×10^6 copy/ml) 培養液 5.0 ml をネブライザーにて噴霧し RNA 抽出及び逆転写反応後、定量 PCR にて捕集率の測定を行った。その結果、親水性 PTFE が最も高い約 19% の捕集率であった。以上の結果から親水性 PTFE が適していることが示唆された。エアサンプラーの吸引流量をヒトの呼吸量 (7 L/min) まで下げ、ウイルスの捕集率を測定したところ、親水性 PTFE フィルターで約 20% の捕集率であった。また、ヒトの衣服に付着するウイルス量を評価するために、捕集器にて直接衣服から捕集したのち、ブランクアッセイにてブランクが確認された。これにより、本補修器を用いると衣服に付着したウイルスについても計測が可能であることが示唆された。

Study on virus exposure assessment in indoor environment using model virus

○Oda Shintaro¹, Iwahashi Hitoshi^{1,2,3}, Takahashi Junko⁴
(¹Grad. Sch. Nat. Sci., Gifu Univ., ²Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., ³United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., ⁴Grad. Sch. Info. Prod. Sys., Waseda Univ.)

Key words virus detection, real time PCR, plaque assay, phage

3E01-03 不凍タンパク質を用いたアスベスト結合タンパク質の分子デザイン

○市川京香, 石田 丈典, 池田 丈, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫
(広島大院・統合生命科学)
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

<目的>アスベストは、肺ガンや悪性中皮腫などを引き起こす。現在、アスベストの使用は禁止されているが、過去に使用された建物の解体現場ではアスベストの飛散のリスクが高く、迅速にアスベストを検出する方法が求められている。当研究室では、アスベスト結合タンパク質を用いたアスベストの迅速検出法を開発している。この検出法では蛍光で標識したアスベスト結合タンパク質をアスベストに結合させ、蛍光により簡便にアスベストを検出することができる。本研究では、検査の精度を向上させるため、より特異性と結合強度の高いタンパク質の創製を目指し、不凍タンパク質に着目した。不凍タンパク質(AFP)は、スレオニンが規則的に繰り返され、平面性の高い構造を持つ。氷も高い平面性と繰り返し構造を持つので、AFPのスレオニンと氷表面の酸素原子は強い結合をする。アスベストも氷と同様、無機結晶であるため分子骨格としてAFPを利用できると考えた。これまでにAFPの繰り返しユニットの変異ライブラリーからアスベストに結合する配列(アスベスト結合ユニット)を取得している。本研究では、アスベスト結合ユニットを繰り返すことで、高度にアスベストを認識するタンパク質の創製を目指した。

<方法・結果>昆虫由来の不凍タンパク質(TmAFP)を緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識した融合タンパク質を作製した。具体的には、TmAFPの分子骨格に、アスベスト結合ユニットを1つ、タンデムに2つ、3つ提示させたものをそれぞれ作製した。そして、アスベストへの結合評価を行ったところ、アスベスト結合ユニットが増えるごとにアスベストへの結合量が増加することが分かった。特異性評価を行ったところ、これまでのアスベスト結合タンパク質と比べてより特異性が高いことが分かった。また、TmAFPの平面構造を崩すとアスベストの結合量が減少することが分かった。

Molecular design of asbestos-binding proteins using antifreeze proteins

○Kyoka Ichikawa, Takenori Ishida, Takeshi Ikeda, Hisakage Funabashi,
Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words antifreeze protein, asbestos, phage display

3E01-04 硫酸還元細菌 *Cupidesulfobrio* sp. HK-II 株における細胞外電子伝達に關与する導電性膜タンパク質

○窪野 一郎¹, 大前 貴裕¹, 川島 京介², 田代 陽介¹, 二又 裕之^{1,3}
(¹静大院・総合科技, ²静大・工, ³静大・グリーン科技园)
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

硫酸還元細菌 (Sulfate reducing bacteria: SRB) は嫌気環境下の代表的な微生物であり、地球化学的炭素・硫黄循環に寄与する一方、金属腐食の原因微生物でもある。そのため、SRB代謝の理解および制御は工学的・生態学的に重要である。これまでに我々は、汽水湖底泥より硫酸還元細菌 *Cupidesulfobrio* sp. HK-II 株を分離し、当微生物が細胞外電子伝達 (Extracellular electron transfer: EET) 能を有することを見出した。EET研究のモデル微生物である *Shewanella* や *Geobacter* では、外膜シトクロムや導電性 pili による EET 機構が報告されているものの、SRBにおける EET 機構の詳細は不明である。そこで本研究では、HK-II 株を SRB のモデル微生物と捉え、本株の EET 機構解明を目的とし、EET 適性電位および EET に關与するシトクロムタンパク質の解析を行った。HK-II 株を硫酸呼吸条件下で前培養後、集菌・洗浄し乳酸を電子供与体とする電気化学セルで培養した。ポテンシostatを用いて電極電位をそれぞれ -0.3 から +0.6 (V vs. SHE) に設定し、経時的に有機酸濃度および電流密度を測定した。その結果、0 から +0.6 V においてのみ電流生産が確認され、+0.6 V にて最大の 235 mA m⁻² が観察された。また、ヘム結合モチーフ CH₂CH (n=2~5) を基に HK-II 株のゲノム情報からシトクロム遺伝子を検索したところ、23 種の遺伝子が推定された。EET に關与するシトクロム特定のため菌体を回収後、細胞質・ペリプラズム、内膜および外膜に分画し SDS-PAGE を行った。ヘムタンパク質に特異的な TMB 染色を行ったところ、硫酸呼吸条件下では外膜画分にヘムタンパク質発現は確認されなかった。一方で、EET 条件下では全ての画分においてヘムタンパク質の発現が確認された。以上の結果から、HK-II 株は硫酸呼吸時では発現しない特異的外膜シトクロムを発現し、EET を可能にしていると示唆された。

Conductive proteins related to extracellular electron transfer in the sulfate reducing bacteria *Cupidesulfobrio* sp. HK-II

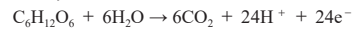
○Ichio Kubono¹, Takahiro Omae¹, Kyosuke Kawashima², Yosuke Tashiro¹,
Hiroyuki Futamata^{1,3}
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Fac. Eng. Shizuoka Univ., ³Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words microbial fuel cells, extracellular electron transfer, sulfate reducing bacteria, cytochrome

3E01-05 α-アミラーゼ遺伝子導入大腸菌を用いたデンプンを燃料とする微生物燃料電池の開発

○風間 伊織, 廣瀬 尚仁, 麻生 祐司, 田中 知成, 小原 仁実
(京工織大院・工芸科学)
ohara@kit.ac.jp

当研究室では *Escherichia coli* JM109 に、*Streptococcus bovis* NRIC1535 由来の α-アミラーゼを細胞表面に発現させることにより、デンプン質化を有する SO-14 株について既に報告している(1)。この SO-14 株を用いることにより、デンプン燃料の微生物燃料電池 (MFC) を 120 時間連続して発電させることに成功したので報告する。メディエーターである AQDS の添加量によりクーロン効率は異なった。この結果を代謝物の濃度から考察した。一般にクーロン効率は、MFC の運転中に減少した燃料から理論的に発生する電子量に対して、実際に発生した電子量の比である。デンプンとした場合には α-アミラーゼによりグルコースにまで加水分解され代謝されるので、理論的に発生する電子量は次の式から求めることができる。



すなわち 1 モルのグルコースから 24 ファラデーの電子が発生する。本研究は、遺伝子組換えにより発電可能微生物を多様なバイオマス燃料に対応可能であることの一例を示した。

1) S. Okamoto, T. Chin, K. Nagata, T. Takahashi, H. Ohara, Y. Aso, Production of itaconic acid in *Escherichia coli* expressing recombinant α-amylase using starch as substrate, *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 548–553, 2015

Microbial fuel cells using alpha-amylase-displaying *Escherichia coli* with starch as fuel

○Iori Kazama, Naoto Hirose, Yuji Aso, Tomonari Tanaka, Hitomi Ohara
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words alpha-amylase-displaying, recombinant *Escherichia coli*, microbial fuel cell, starch

3E01-06 高い酸素耐性を示す水素酸化細菌 *Cupriavidus* sp. FM-47 株の分離とその特性解析

○永井 翔梧¹, 堀 真紀², 上谷 はる², 遠藤 遼平², 西原 宏史¹
(¹茨城大院・農, ²茨城大・農・資生科)
hirofumi.nishihara.agr@vc.ibaraki.ac.jp

好気性水素酸化細菌は炭酸固定能と水素酸化能に優れ、環境技術開発への応用が期待されるが、一般的に好気性で酸素分圧が高くなるほど増殖が阻害される。ヒドロゲナーゼの酸素感受性が主な要因とされるが、酸素耐性と量産性に優れた実用的な菌株が求められる。本研究では自然界から高い酸素耐性を示す新規分離株を取得し、増殖特性や各種培養条件下における独立栄養代謝系酵素活性等の特性解析を行った。採取した試料は H₂-O₂-CO₂ 気相下で集積培養に供した後、高い酸素分圧にてコロニー形成を試みることで分離を行った。炭酸固定系共役活性として、カルビン回路の初期反応酵素である RuBP カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO)、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の共役による RuBP と CO₂ に依存した NADH 酸化活性を測定した。RuBisCO 活性は市販の PGK と GAPDH を反応系に十分量加え、同様に測定した。水素酸化系は膜結合型ヒドロゲナーゼ (MBH) と可溶性の NAD 還元型ヒドロゲナーゼ (SH) について、水素に依存した電子受容体の還元により活性を測定した。その結果、pO₂ 60% でコロニーを形成する FM-47 株を取得し、16SrDNA 配列による系統解析から *Cupriavidus necator* に最も近縁な *Cupriavidus* 属細菌であると位置付けられた。本菌はジャーによる通気攪拌培養で良好に増殖し、pO₂ 20% と 10% で同等の増殖速度を示した。また、有機物質化性のある通気独立栄養細菌であり、従属栄養条件下では RuBisCO 活性は著しく低下していたが、SH と MBH は高い活性を示した。窒素欠乏条件下でポリヒドロキシ酪酸蓄積性が確認された。なお、本研究の一部は養殖業成長産業化技術開発事業 (水産庁) の研究課題「水素細菌を原料とする純国産養魚飼料開発」の一環として実施された。

Isolation and characterization of a highly oxygen-tolerant hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus* sp. FM-47

○Shogo Nagai¹, Maki Hori², Haru Kamitani², Ryohei Endo², Hirofumi Nishihara¹
(¹Grad. Sch. Agric., Ibaraki Univ., ²Dept. Bioresour. Sci., Coll. Agric., Ibaraki Univ.)

Key words hydrogen-oxidizing bacteria, carbon dioxide, isolation, hydrogen

3E01-07 グリコール酸トランスポーターを利用した、組換え大腸菌におけるエチレングリコールからのグリコール酸ポリマーの合成

○太田 陽介¹, 西向 めぐみ², 山田 美和²
(¹岩手大・院, ²岩大・農)
myamada@iwate-u.ac.jp

[背景・目的]

グリコール酸(GL)ポリマーは優れた生体吸収性を有し、手術用縫糸などで応用される有用な材料である。我々は、これまでにGLポリマー合成遺伝子群(*fucO*, *aldA*, *pct*, *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaD*)を導入した組換え大腸菌において、産業廃棄物の主成分であるエチレングリコール(EG)からのGL共重合ポリマーpoly(glycolate-co-3-hydroxybutyrate)[P(GL-co-3HB)]合成経路を構築した。しかし、本合成系において、培養液上清には最大で200 mM程度のGLが産生されていたが、合成されたP(GL-co-3HB)中のGL分率は0.1 mol%に留まっていた。そこで、本研究では、細胞内へのGL輸送に関与することが報告されている大腸菌由来GLトランスポーター遺伝子(*glaA*)[1]とGLポリマー合成遺伝子群を組換え大腸菌で共発現し、培養液に排出された細胞外GLを再び細胞内へ輸送させることで、P(GL-co-3HB)中のGL分率向上を目指した。

[方法・結果]

EGおよびGLポリマー合成遺伝子群が導入された組換え大腸菌を、800 mM EGを含有したLB培地にて48時間培養し、ポリマー合成を行った。ポリマー生産量およびポリマー中のモノマー分率はGas chromatographyにより測定し、細胞外GL濃度はHigh Performance Liquid Chromatographyにより測定した。その結果、*glaA*導入株では、培養液中のGLはほとんど検出されず、細胞内へのGL輸送が示唆された。さらに、*glaA*導入により、ポリマー生産量は非常に低いものの、3-6 mol%のGLユニットを含むP(GL-co-3HB)が合成された。GL分率の向上は、期待通りGLトランスポーターを介して細胞外から細胞内へのGL輸送が行われ、細胞内のGLモノマー供給量が増加したためと考えられる。よって、GLトランスポーターの利用がP(GL-co-3HB)中のGL分率増加に有効であることが示唆された。

[参考文献]

[1] M. Felisa. Nunez. et al., Microbiology, 147, 1069-1077 (2001)

Biosynthesis of glycolate-based polymers from ethylene glycol in recombinant *Escherichia coli* using glycolate transporter

○Yusuke Ota¹, Megumi Nishimukai², Miwa Yamada²
(¹Iwate Univ., ²Fac. Agric., Iwate Univ.)

Key words polyhydroxyalkanoate, ethylene glycol, biodegradable plastic, waste

3E01-08 リグニンからの芳香族ポリマー原料の選択的生産：サルファイトリグニンからのバニリン酸生産への *Pseudomonas* sp. NGC7 株の適用

○鎌田 真未¹, 安田 智恵子¹, 樋口 雄大¹, 吉田 暁弘², 坂本 千穂¹, 大関 さおり¹, 上村 直史³, 政井 英司³, 園田 和典¹
(¹弘前大・農生, ²弘前大・地域戦略, ³長岡技科大・物質生物)
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

木質バイオマスの主成分であるリグニンの利用技術創出に向けて、針葉樹サルファイトリグニンのアルカリ酸化分解物から、耐熱性ポリマー原料として利用可能なバニリン酸(VA)を生産するために、本研究では、リグニン由来の多様な芳香族化合物を質化する *Pseudomonas* sp. NGC7 株の分子育種を行った。銅発泡体上に水酸化銅を析出させた固定化触媒を充填した固定床流通式反応によるサルファイトリグニンのアルカリ酸化分解を行い、精密ろ過、限外ろ過(5,000, 1,000 MWCO)により高分子画分を除去した分解物を得た。分解物には主要な芳香族モノマーとして、VA, バニリン(VN), アセトバニロン(AV)が25.3 : 58.4 : 16.3のモル濃度比で含まれていた。そこでまずNGC7株が有する4つの推定VA O-demethylase 遺伝子セット(*vanA1B1~vanA4B4*)のうち、VA変換に主要に関わる *vanA4B4* を破壊した(NGC711株)。次に *Sphingobium* sp. SYK-6 株由来のAV変換酵素遺伝子群(*acvABCDEF*, *vceA*, *vceB*)の発現プラスミドを組み込み、AVからVAへの変換能を付与した(NGC711/*acv/vce*株)。NGC711/*acv/vce*株はサルファイトリグニン分解物から91 mol%、AV, VN, VAからなる分解物モデルから89 mol%の収率でVAを生産する能力を獲得した。しかし fed-batch 培養では79 mol%に低下した。そこで *vanA1B1~vanA4B4* を全て破壊したNGC720/*acv/vce*株を作製して同様に fed-batch 培養を行ったところ、VA収率は84 mol%に上昇した。NGC7株のゲノムには *P. putida* KT2440 株由来のVN reductase と97%のアミノ酸配列同一性を示す遺伝子(*PSN_2384*)が存在したため、さらに *PSN_2384* を欠損させたNGC729/*acv/vce*株を作製して fed-batch 培養を行った。その結果、分解物モデルから96 mol%の収率で3.1 g/LのVAが得られた。

本研究はJST未来社会創造事業(JPMJMI19E2)、弘前大学若手研究者支援事業の支援を受けて実施した。

Selective aromatic monomer production from lignin: Application of *Pseudomonas* sp. NGC7 to vanillate production from sulfite lignin.

○Mami Kamada¹, Chieko Yasuta¹, Yudai Higuchi¹, Akihiro Yoshida², Chiho Sakamoto¹, Saori Ozeki¹, Naofumi Kamimura³, Eiji Masai³, Tomonori Sonoki¹
(¹Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., ²Inst. Regional Innovation, Hirosaki Univ., ³Dept. Mater. Sci. Bioeng, Nagaoka Univ. Technol.)

Key words lignin, *Pseudomonas* sp., vanillic acid

3E01-09 組換え大腸菌を用いたテレフタル酸からの有用物質生産

○駒井 理乃¹, 内堀 孝博², 中島 敏明¹
(¹筑波大院・生命環境, ²パナック)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

[背景・目的]

PET製品の処理等において、モノマーを含む廃液が生じる。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はテレフタル酸が残存し、その処理が特に問題となっていた。当研究室ではテレフタル酸分解菌の取得のため、活性汚泥から *Pseudomonas* sp. TB-97 株を単離し、30 g/Lテレフタル酸の完全分解に成功した。本研究では、TB-97株のテレフタル酸分解遺伝子群を利用して、テレフタル酸から有用物質への転換を目指す。

[方法および結果]

初めに没食子酸やカテコールなどの原料となる有用な物質、プロトカテク酸に注目した。TB-97株よりも高いプロトカテク酸耐性を持つ大腸菌にテレフタル酸分解遺伝子群をクローニングし、テレフタル酸からのプロトカテク酸生産を確認した。

次に、作製した菌株を用いた、2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)の生産に注目した。PDCは機能性プラスチックや化成品の原料となりうる。プロトカテク酸からPDCまでの生産経路(PDC生産経路)は当研究室保有菌株のポリウレタン分解菌の遺伝子を用いることとした。テレフタル酸分解遺伝子群、PDC生産遺伝子群をそれぞれプラスミドに挿入し、2つのプラスミドをクローニングした組換え大腸菌を作製した。0.5%テレフタル酸含有培地を37°C、600 rpmの条件下で72時間培養した結果、2.2 g/Lのテレフタル酸を分解し、PDC生産を確認した。

しかし、中間物質であるプロトカテク酸が約0.6 g/L蓄積したことから、PDC生産遺伝子群の発現を強める必要があると考えた。そこで、高発現用ベクターであるpETプラスミドにPDC生産遺伝子群を挿入した大腸菌を作製したところ、プロトカテク酸からのPDC生産量はこれまでの約6倍となった。現在は、テレフタル酸からのPDC生産量の向上を目的とし、テレフタル酸分解遺伝子群との組み合わせを検討している。

Production of Useful Compounds from Waste Terephthalic Acid by Recombinant *E. coli*

○Rino Komai¹, Takahiro Uchibori², Toshiaki Nakajima¹
(¹Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²PANAC)

Key words terephthalic acid, PET, 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid, *Escherichia coli*

3E01-10 Light boosted bioenergy recovery from ammonia-rich anaerobic digestion: Long-term effectiveness and underlying mechanisms

○Yunxin Zhu, Zhiyuan Liu, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

During anaerobic digestion (AD), ammonia inhibition caused by protein degradation often poses a great threat on efficient bioenergy recovery from organic waste. Light stimulation is a promising strategy to tackle this challenge, however, limited research focuses on optimizing a light-assisted process for practical application and mechanisms investigation. Herein, an optimal lighted bioprocess was investigated for boosting biomethane production from ammonia-stressed AD. The proposed optimal light condition (225 W/m² with 63 min/day) under incandescent lighting promoted CH₄ yield up to 2-fold of the dark reactor under ammonia stress of 2500 mg/L. Moreover, this light-induced enhancement was found to be reliable under increasing ammonia stress (2500-5000 mg/L) during the 2-month semi-continuous operation, suggesting its long-term effectiveness of proposed lighted process. The mechanism insights revealed that light could upregulate the critical enzyme activities in methanogenesis and promote the sludge properties (hydrophobicity and electroactivity) for the alleviation of the ammonia stress on anaerobes. Moreover, the optimal light stimulation diversified the structure of ammonia-tolerant fermentative taxa (hydrolytic and acetogenic genera), which jointly collaborated with the enriched *Methanosarcina* for efficient CH₄ conversion. Therefore, the proposed bioreactor would be a promising technique to address ammonia-rich AD, and achieve the sustainable waste-to-energy bioconversion in future application.

Light boosted bioenergy recovery from ammonia-rich anaerobic digestion: Long-term effectiveness and underlying mechanisms

○Yunxin Zhu, Zhiyuan Liu, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words ammonia-rich anaerobic digestion, light stimulation, microbial flora, syntrophic metabolism

3E01-11 木質バイオマスの200倍のCO₂削減効果をもたらす甘藷・メタンの持続的的大量生産システムの開発

○鈴木 高広¹, 坂本 勝¹, 川上 高男², 久保 裕志², 宮部 由彩², 横田 祐介², 若山 泰介², 廣島 大祐³
(¹近畿大院・生物理工,²日本下水道事業団,³ウォーターエージェンシー)
tkusuzuki@waka.kindai.ac.jp

甘藷の周年生産のため、冬でも水温15°Cを維持する下水処理水を暖房熱として越冬栽培方法を検討した。また、収穫した芋と茎葉を下水汚泥と共に嫌気消化し、全量メタンに変換する方法を検討した。

【方法と結果】実験は日本下水道事業団が管理受託し、運転操作業務をウォーターエージェンシーが行っている磐南浄化センター（静岡県磐田市）で行った。6月初旬に蔓苗を定植し、11月に収穫したところ芋が19.7 kg/m²、茎葉も含めた乾燥バイオマスは8.3 kg/m²に達した。次に、収穫した蔓から苗を調製し12月に再植し、ビニルフードで覆った三層栽培設備に25鉢（上段1列5鉢、中段2列10鉢、下段2列10鉢）設置し下水処理水を根圏通水した。その結果、越冬栽培に成功し、7月初旬に収穫したところ芋が10.5 kg/m²に達し、年間27 kg/m²、光合成収率4%が可能となった。また、下水汚泥と混合し消化条件を検討したところ、収穫した芋と茎葉のほぼ全量をメタンに変換できることが分かった。

【考察】芋・メタンを燃料電池エネファーム（熱効効率90%）に供給すれば日射エネルギーの総合利用効率は3.6%に達すると見込まれる。一方、森林・林業統計に基づく山林の年間増殖量8000万m³（含水率50%）の光合成収率は0.06%、木質火力発電効率は約30%、総合効率は0.018%未満と見積もられる。したがって、木質燃料を生産するよりも同じ面積で甘藷を生産しメタンに変換した方がCO₂削減量は200倍に達する事が分かる。また、国土面積の1%にあたる耕作放棄地40万haで甘藷を生産しメタンに変換すると、メタン供給量は1440万tと見積もられ、ロシア産LNG輸入量641万t（2020年度）の全量代替が可能であることが明らかとなった。

【謝辞】本研究に協力頂いた磐田市、日本学術振興会科学研究費20K12247「国産可食・燃料バイオマスによる地球温暖化対策に関する新たな知の創出」に感謝致します。

Development of a sustainable mass production system for sweet potatoes and methane that has a CO₂ reduction effect 200 times that of woody biomass

○Takahiro Suzuki¹, Masaru Sakamoto¹, Takao Kawakami², Hiroshi Kubo², Yui Miyabe², Yusuke Makita², Taisuke Wakayama², Daisuke Hiroshima³
(¹Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., ²Japan Sewage Works Agency, ³Water Agency INC)

Key words biomass, photobioreactor, carbon dioxide, methane fermentation

3E01-12 草食性陸ガニのリグニン分解活性について

○三宅 克英, 永倉 佑真
(名城大・理工)
miyake@meijo-u.ac.jp

天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。これらの陸ガニ類は落ち葉や木片を食料として利用することが報告されている。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い切り株なども食料にしている可能性があり、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性リグニン類の分解能力を持っているものと期待している。本研究の目標は、これまで有用生物資源として省みられることのなかった陸ガニ類のバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることである。今回はリグニン類分解活性の指標としてグアヤコール酸化活性および2,6-ジメトキシフェノール(2,6-DMP)酸化活性に着目し、全RNA-seq解析を行うことにより、遺伝子の単離、解析を試みた。

リグニン分解活性としてはパーオキシダーゼ活性（グアヤコール酸化活性）とラッカーゼ活性（2,6-DMP酸化活性）に着目している。グアヤコール酸化活性はアカテガニにおいてはオスよりも植食性の強いメスで高頻度に検出され、植食性の強いクロベンケイガニではほぼ全ての個体から強い活性が検出される。2,6-DMP酸化活性は、餌に植物を与えたときのみ活性を示す。陸ガニ類の植食性の強さと強い関連性を持つこれらの活性をもたらす酵素をアカテガニ及びクロベンケイガニのRNA-seqの解析から推定し、単離してその活性を解析した。その結果、ラッカーゼとグアヤコールパーオキシダーゼ活性を示す酵素をそれぞれ同定できた。大腸菌での生産は封入体等のため、不十分であり、今後、昆虫細胞や酵母での生産が必要である。

1) K. Miyake, Y. Baba, J. Comp. Physiol. B, 192, pp. 247-261 (2022)

Lignin degradation activity of herbivorous land crabs

○Katsuhide Miyake, Yuma Nagakura
(Fac. Sci. Eng., Meijo Univ.)

Key words lignin

3E03-01 遺伝子組換えシアノバクテリアを用いたグリセロールの高効率連続生産プロセスの開発

○叶 静遠¹, 堀内 淳一¹, 熊田 陽一¹, 小倉 慎也¹, 橋 暉太¹, 広川 安孝², 花井 泰三², 村上 明男³, 武田 真由子¹
(¹京工織大院・工学科学,²九大院・農,³神戸大院・工)
horiuchi@kit.ac.jp

遺伝子組換えシアノバクテリアを用いたグリセロールの高効率連続生産プロセスの開発

○(学)叶静遠¹・小倉慎也¹・武田真由子¹・端暉太¹・(正)堀内淳一¹・(正)熊田陽一¹・(正)広川安孝²・(正)花井泰三²・(正)村上明男³
(¹京工織大院,²九大院,³神戸大院)

【背景・目的】地球環境問題や資源枯渇を背景として、微細藻類による光合成反応を利用して太陽エネルギーと二酸化炭素から直接有用物質生産を行う第三世代型バイオリアクターが注目されている。本研究では、グリセロール合成代謝経路を導入したシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* を用い、炭酸ガスによるpH制御を適用したエアリフト型バイオリアクターを用い、連続培養によるグリセロール生産性の向上を目指した。

【方法】菌株には *Synechococcus elongatus* PCC7942 にグリセロール合成代謝経路を導入したTA3800株を使用した。培地にはBG-11にSpectinomycin (25 µg/mL)、IPTG (1 mM)を添加した。炭酸ガスを供給しpHを制御するpH-statシステムを導入したエアリフト型バイオリアクターを用い回分及び連続培養を行なった。

【結果・考察】pH-statシステムを用いてグリセロール生産に最適なpH条件の検討を行なったところ、pH=8.0において最も良好なグリセロール生産が得られた。次に光強度がグリセロール生産に及ぼす影響を検討したところ、500µE/m²/sの光条件において高濃度のグリセロール生産が可能になったことが明らかになった。この結果に基づきエアリフト型バイオリアクターを用いてpH=8.0、光強度300µE/m²/sの光条件で連続培養を行なったところ、約50日間の安定した運転とグリセロール生産を行うことができ、グリセロール濃度5.35mM、最大グリセロール生産性0.94mM/dayを得ることができた。

1) Hirokawa, Y. et al., *Metsb. Eng.* 34, 97-103(2016)

Process development for effective continuous production of glycerol using genetically engineered cyanobacteria

○Jingyuan Ye¹, Jun-ichi Horiuchi¹, Yoichi Kumada¹, Sinya Ogura¹, Ryouta Hasi¹, Yasutaka Hirokawa², Taizo Hana², Akio Murakami³, Mayuko Takeda¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., ²Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., ³Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words airlift bioreactor, glycerol, continuous culture, cyanobacteria

3E03-02 代謝改変乳酸菌を用いたコーンコブの同時糖化発酵による低コストD-乳酸生産

○久保 早友理¹, 熊田 陽一¹, 堀内 淳一¹, 岡野 憲司², 近藤 昭彦³, 田中 勉³
(¹京工織大院・工学科学,²阪大院・工,³神戸大院・工)
horiuchi@kit.ac.jp

【背景・目的】本研究室では未利用バイオマスを原料とした同時糖化発酵(SSF)によるD-乳酸の高濃度生産を進めてきた。これまでの検討では、乳酸生産コストの約76%をMRS培地成分、約15%を糖化酵素が占めており、これらの添加量を削減できれば乳酸生産の低コスト化が期待できる。そこで本研究では、コーンコブ加水分解物を用いたSSFによるD-乳酸生産における培地成分及び糖化酵素の添加量の検討を行い、乳酸生産の低コスト化を試みた。

【方法】乳酸発酵には、神戸大学から提供を受けた代謝改変乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 *Aldh11::PxylAB-xpk1::tkl-DxpK2::PxylAB* を用いた。本菌株は、元株にキシロース代謝経路を導入しており、グルコースに加えキシロースからもD-乳酸を生産できる。コーンコブを1.5% H₂SO₄により121°C、60分の条件で加水分解し、コーンコブ加水分解物を得た。2.0 L容ジャーファーマンターにMRS培地成分を添加したコーンコブ加水分解物1.0 L及び糖化酵素を加え、pH 6.0、37°C、400 rpmの条件でSSFによるD-乳酸生産を行った。

【結果】まず、MRS培地コストの約96%を占めるPeptone、Beef Extract及びYeast Extractに焦点を当て、その添加量を検討した。コーンコブ加水分解物を用いてこれらの成分を削減した種々の条件でSSFを行った結果、Yeast Extractのみを0.5 g/L添加した条件でも最終的な乳酸濃度は同等であり、培地コストを約94%削減できることが明らかとなった。次に、酵素添加量を検討したところ、0.02 g/g-CCの条件でも、従来の0.05 g/g-CCと同等の乳酸濃度が得られた。コーンコブを原料とした場合、これらの検討により全体の乳酸生産コストは約81%低減できることとなり、大幅な低コスト化が可能であった。

[参考文献]1) Kenji Okano et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2017) 101:1869-1875

Cost-effective production of D-lactic acid from corncobs by simultaneous saccharification and fermentation using genetically engineered lactic acid bacteria

○Sayuri Kubo¹, Yoichi Kumada¹, Jun-ichi Horiuchi¹, Kenji Okano², Akihiko Kondo³, Tsutomu Tanaka³
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., ²Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words D-lactic acid, corn cob, simultaneous saccharification and fermentation, *Lactobacillus plantarum*

3E03-03 耐熱性乳酸菌 *Bacillus smithii* を用いたコーンコブの高温同時糖化発酵による L-乳酸生産の効率化

○野村 果音, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

【背景と目的】農産廃棄物であるトウモロコシの芯（コーンコブ）から同時糖化発酵（simultaneous saccharification and fermentation, SSF）により乳酸を効率的に生産するプロセスを検討している。SSF では、酵素糖化と乳酸発酵の最適温度の違いにより酵素糖化が反応の律速段階となり、生産性が制限されることが大きな課題となっている。本研究では耐熱性乳酸菌 *Bacillus smithii* を利用し、高温条件下で SSF を行うことによりバイオマスの酵素糖化速度を向上させ、この課題の克服を目指す。

【方法】中国産コーンコブを 1.5 % 硫酸により酸加水分解処理したコーンコブ加水分解残渣 CCR を実験材料とした。菌株として通性嫌気性乳酸菌 *Bacillus smithii* (JCM9076) を用いた。本菌は 50~55℃ において良好な増殖特性を示す。CCR の糖化酵素には最適温度 45~55℃、比活性 518 FPU/g であるメイセラゼを用い、50℃、pH 6.0、攪拌回転数 200 rpm の条件下で高温 SSF を行なった。

【結果と考察】メイセラゼによる CCR 糖化速度の温度依存性を検討した結果、30℃と比較して 50℃の初期糖化速度は約 2.3 倍向上した。この結果に基づき、50℃の温度条件下で CCR 50 g/L を用いた SSF を行った結果、L-乳酸濃度 24.3 g/L（光学純度 97.5%）となり、CCR のセルロース成分の約 9 割を L-乳酸に変換できることが明らかになった。次に乳酸の高濃度化を目指し、逐次的に CCR を添加する Fed-batch 型 SSF を検討したところ、200 g/L の CCR から 96.7 g/L の乳酸生産に成功し、本菌を用いる高温 SSF の可能性が示された。次に生産性を向上させるため、培養開始から 4.5 時間目まで通気したところ、15 時間程度であった誘導期が約 3 時間に短縮され、嫌気性条件下で行う SSF と比較して乳酸生産性を 1.5 倍向上できた。

Efficient production of L-lactic acid from corncobs using thermotolerant *Bacillus smithii* by high-temperature simultaneous saccharification and fermentation

○Kanari Nomura, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words L-lactic acid, biomass, corn cob, *Bacillus smithii*

3E03-04 コーンコブを用いた赤色酵母によるアスタキサンチン生産の向上

○平井 優輝, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

【背景・目的】リグノセルロース系バイオマスの生物学的利用においては、バイオマスを化学的処理により得られるグルコース及びキシロースをとともに利用し、高付加価値物質を生産することが重要である。赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* はグルコース及びキシロースを共に資化し、菌体内にアスタキサンチンを蓄積する。本研究では、この *X. dendrorhous* を用い、コーンコブを原料としたアスタキサンチン生産の効率化を試みた。

【方法】菌株は *Xanthophyllomyces dendrorhous* (JCM 9681・9683・9684) を使用した。乾燥したコーンコブを酸加水分解及び酵素糖化後、活性炭処理(白鷺 M)を行い、培地とした。この培地はグルコース及びキシロースをそれぞれ 40 g/L、25 g/L 含有する。有効容量 5 L のジャーファーマンターを用い、pH 5.0、通気量 1 vvm、温度 22℃、攪拌速度を 500 rpm に制御し、回分培養を行った。

【結果・考察】コーンコブ加水分解糖化液を培地として回分培養を行ったところ、アスタキサンチン 0.8 mg/L の生産が認められたが、誘導期に約 100 時間を要した。誘導期の長期化は糖化液中の酢酸(2.5 g/L)によると考えられたため、アルカリ前処理を導入し酢酸濃度を低減したところ、誘導期は約 24 時間と短縮され、アスタキサンチン生産も 1.71 mg/L に増加した。更に、コーンコブ 200 g/L を用いて調製した高濃度糖化液を用いて培養を行うことにより、アスタキサンチンは最大 2.85 mg/L まで増加した。本研究は増屋記念基礎研究振興財団の支援を得た。

Enhanced astaxanthin production using *Xanthophyllomyces dendrorhous* from corn cobs

○Yuuki Hirai, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words astaxanthin, corn cob, *Xanthophyllomyces dendrorhous*

3E03-05 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* を用いた酵素分泌生産システムの開発

○屋良みなみ¹, 小林友哉¹, 坂本大輔¹, 荻野千秋¹, 近藤昭彦²
(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* は、45℃で生育可能である事に加え、生育速度が早いこと、物質生産宿主として利用が期待できる。本研究では、*S. thermoviolaceus* を宿主とした酵素の分泌生産系の開発を目指した。目的酵素として複数のセルロース分解酵素を選択し、単一の微生物によってセルロースの糖化・発酵を一貫する Consolidated BioProcessing (CBP) への展開を目指している。本実験では、CBP におけるセルロース分解系の基盤技術開発を目的とし、セルロース分解酵素より β-glucosidase(BGL)と Endoglucanase(EG)の共発現株の作製を目指した。異なるインテグラーゼ(*φC31*, *φK38-1*)を有する 2 種類のプラスミドにゲノム導入技術を用いることで、BGL と EG の遺伝子をそれぞれ、同一宿主に組み込む戦略を立案した。放線菌胞子に BGL 発現プラスミドを導入し、順次、EG 発現プラスミドを導入した。構築した株を培養し、BGL、EG それぞれの酵素活性測定より評価した。培養結果より、BGL、EG ともに活性が見られ、*S. thermoviolaceus* において複数組み込みによる初の形質転換例となる、1 つの宿主株における異種タンパク質の共発現の成功が確認された。しかし、BGL 生産株、EG 生産株それぞれを単独で培養した場合と比べて、BGL は変わらないものの、EG の最大酵素活性が 1/4 程度に低下してしまっただけでなく、複数組み込みにおける *φK38-1 attB* サイトへのプラスミド導入による遺伝子破壊が考えられ、さらなる検討が必要である。

Development of secretory enzyme production system using the thermophilic actinomycetes, *Streptomyces thermoviolaceus*

○Yara Minami¹, Kobayashi Tomoya¹, Sakamoto Daisuke¹, Ogino Chiaki¹, Kondo Akihiko²
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Streptomyces*, actinomycetes, cellulase

3E03-06 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与

○松崎 浩明, 石田 健登, 亀川 颯人, 今久保 友則, 藤田 雄大, 秦野 琢之
(福山大・生命工)
matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp

近年、エネルギー消費の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。また、化石燃料の消費は大気中の CO₂ 濃度を増加させ、地球温暖化を招く。一方、セルロース系バイオマスは地球上に豊富に存在し、カーボンニュートラルにより脱炭素社会の実現に有効な資源であると考えられる。そこで、我々は、化石燃料の代替燃料として、遺伝子工学的手法によりアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼ生産能を付与し、セルロース系バイオマスからバイオ燃料（現在の研究では、バイオエタノール）を生産することを目指している。古紙などの廃棄物を利用し、前処理を省き、手間やコストをできる限り削減しようとしている。本研究では、まず細菌 *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*) および酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の β-グルコシダーゼ (BGL1) の 3 種類の酵素の生産能を付与することを検討した。*cenA* と *cex* の分泌発現プラスミド pHM1061 は、*cenA* と *cex* を GAP プロモーターと *MEL1* 分泌シグナル配列の下流に連結して作製した。また、BGL1 分泌発現プラスミド pHM1062 は、BGL1 を GAP プロモーターに連結して作製した。これらのプラスミドを導入した *S. cerevisiae* 二重形質転換体は、コンゴレッド染色、MUC 染色法、および p-NPG 活性から 3 種類の酵素の分泌生産が確認できた。しかし、エンド型セルラーゼ活性 (*cenA* の活性) は低いと考えられた。次に、酵母 *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチルセルラーゼ遺伝子 *CMC1* (cDNA) の分泌発現プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体は、エンド型セルラーゼ活性を強化でき、紙をある程度分解できた。さらに、紙の分解を向上させるため細菌由来セルラーゼの生産能の強化を検討している。また、形質転換体による紙からのエタノールの生産を検討している。

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Matsuzaki, Kento Ishida, Hayato Kamegawa, Tomonori Imakubo, Yudai Fujita, Takushi Hatano
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

3E03-07 有機酸資化酵母の開発とバイオリファインリーへの展開

○荻野 千秋¹, Prihardi Kahar¹, 壺井 ひかり¹, Risanto Lucki¹,
近藤 昭彦²
(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科 技イノベ)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 マレイン酸によるバイオマス前処理後、使用済マレイン酸を炭素源として資化可能な遺伝子組換え酵母株を作製することで、中和工程を必要とせず処理酸を資源化することができ、今までの廃棄処理の問題などを克服することが期待でき、新たなバイオプロセスの構築が可能となる。本研究では、F118株に対して代謝工学を行いマレイン酸資化能を付与し、使用済マレイン酸を代謝できる酵母株の確立を行った。

【実験方法】 マレイン酸資化経路を確立するため、*maeP*、*hbzII*、*dmlA* の3種の遺伝子を選択し、この3つの遺伝子を導入したF118/MacP-JIA株を構築した。前培養では0.1%のマレイン酸を含むYPD培地中で培養を行い、本培養はマレイン酸濃度が1%となるように調製したYPD培地中で発酵試験を行った。

【結果】 マレイン酸を資化できない野生型F118株に対しF118/MacP-JIA株はマレイン酸の資化が確認された。しかし、本株ではエタノールの生産量が低く、野生型F118株が82%の収率が得られるのに対し、F118/MacP-JIA株の収率は23%に留まった。この原因として、マレイン酸資化経路の導入により酸化還元バランスの崩れが発生したことが考えられる。次に、嫌気および好気条件下での培養を行った。その結果、嫌気条件下ではマレイン酸の資化が抑えられるがエタノールの生産量は改善され、好気条件下ではマレイン酸の資化は促進されるが、エタノール発酵の抑制が確認された。また、マレイン酸の完全資化にはグルコースの流加が不可欠であることが確認された。そこで、好気条件下で流加培養を行ってマレイン酸の完全資化後、菌体を新たな培地に移して嫌気条件下でエタノールを生産させる二段階培養を行った。その結果、マレイン酸資化後の菌体のエタノール収率は改善された。

Development of organic acid assimilating yeast and their application to bio-refineries from lignocellulosic biomass

○Ogino Chiaki¹, Prihardi Kahar¹, Tsuboi Hikari¹, Risanto Lucki¹, Kondo Akihiko²
(¹Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, organic acid, lignocellulosic materials, pretreatment

3E03-08 油糧生産酵母によるグリセロールを用いた脂質生産

○吉本 真¹, 梶浦 裕之^{2,3}, 三崎 亮^{2,3}, 藤山 和仁^{2,3}
(¹阪大院・工, ²阪大・生工国際セ, ³阪大・先導的学際研機構)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】 近年、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。油糧生産酵母が合成する脂質は、エステル交換反応を経ることでBDFとして利用できる。油糧生産酵母による脂質生産は、植物油や動物脂肪由来の生産方法と比較して、食糧との競合がなく生産効率が高いといったメリットがある。一方で、生産コストが高いといった課題があるが、培養の際に安価な炭素源を用いることでコストダウンが見込める。そこで、通常の培養に用いるグルコースの代替として、多量かつ安価に入手できるグリセロールに着目した。本研究においては、市販の「純グリセロール (PG)」、BDF生産の副産物である「廃グリセロール (CG)」の2種類の炭素源を用いて条件検討を行い、BDF生産に適した培養条件の構築を行うことを目的とした。

【方法】 *Rhodotorula toruloides* NBRC 0880株を7-11% (w/v)の異なる濃度のPGを含む培地において培養した後、菌体から脂質を抽出し、脂質生産量と脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。これにより培地中のグリセロール濃度の条件検討を行った。その後、不純物を処理したCGの利用に最適条件を応用し、脂質生産を行った。

【結果・考察】 *R. toruloides*により合成される脂質量は、培地中に含まれるPG濃度が高いほど大きくなった。11% (w/v) PG含有培地においては、5日間の培養で14.2 g/Lの脂質が得られ、これは通常のグルコースを用いた場合と比較して約1.5倍の生産量であった。また脂肪酸組成においてはグルコースを用いた際と同等の割合のオレイン酸を含んでいた。次に、酸処理を行い酵母に阻害作用を与える不純物を除去したCGを用いて、培養条件を応用したところ13.1 g/Lの脂質が得られた。以上より、本研究では脂質生産における各種グリセロールの利用可能性が示された。

Lipid production utilizing glycerol by oleaginous yeast

○Shin Yoshimoto¹, Hiroyuki Kajiu^{2,3}, Ryo Misaki^{2,3}, Kazuhito Fujiyama^{2,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²ICBiotech, Osaka Univ., ³OTRI, Osaka Univ.)

Key words yeast, lipid, glycerol, biomass

3E03-09 脂質生産機構の解明に向けた油脂酵母の RNA-seq 解析

○前田 紗香¹, 梶浦 裕之^{2,4}, 元岡 大祐^{3,4}, Wu Chih-Chan²,
三崎 亮^{2,4}, 藤山 和仁^{2,4}
(¹阪大院・工, ²阪大・生工国際セ, ³阪大院・医, ⁴阪大・先導的学際研機構)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

バイオディーゼル燃料は化石燃料の代替エネルギー資源として注目されている。近年、より安価なバイオディーゼル燃料の油脂源として、乾燥菌体重量あたり20%以上の油脂を生産し、蓄積できる油脂酵母の利用が試みられている。我々は油脂酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* TK16 の高温耐性変異体 L1-1 の取得に成功した。産業化に必須な高温耐性を持つこの変異体は、高温耐性のみならず油脂生産性の大幅な向上も示したが、これらの機能獲得に至った要因は解明されていない。そこで本研究ではTK16と高温耐性変異体L1-1の全ゲノム解析とRNA-seq解析を行い、全塩基配列の比較から、高温耐性と油脂生産性向上に寄与した因子の同定を目指した。

次世代シーケンズを用いたハイブリッドアセンブリによりTK16からは19のcontigを、L1-1からは18のcontigを得た。その後、TK16の全contigに対して遺伝子情報のアノテーションを行い、タンパク質をコードする6854種類の遺伝子を同定した。TK16のゲノム配列をリファレンス配列としたL1-1との類似性比較により、ストレス耐性や油脂生産経路に関連する遺伝子の変異が確認できた。さらに、高温ストレス下で生育させた菌体のRNA-seq解析を行った結果、TK16とL1-1でストレス耐性や油脂生産経路に関連する遺伝子に発現量の変化が確認できた。また発現量が変化した遺伝子の中には、L1-1のゲノム配列に変異が確認できたものも存在した。今後は、L1-1の高温耐性能や高油脂生産能の獲得に至った推定因子を野生株に網羅的に導入し、高温耐性能と高油脂生産能を持つ油脂酵母の分子育種を目指す。

RNA-seq analysis for the elucidation of lipid production mechanism in oleaginous yeast

○Sayaka Maeda¹, Hiroyuki Kajiu^{2,4}, Daisuke Motooka^{3,4}, Chih-Chan Wu²,
Ryo Misaki^{2,4}, Kazuhito Fujiyama^{2,4}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²ICBiotech, Osaka Univ., ³Grad. Sch. Med., Osaka Univ., ⁴OTRI, Osaka Univ.)

Key words yeast, lipid, biomass, genome

3E03-10 *Lipomyces starkeyi*の油脂蓄積プロセスのリアルタイムモニタリング

○高橋 優花¹, 志田 洋介¹, 鈴木 義之¹, 高久 洋暁², 小笠原 渉¹
(¹長岡技科大, ²新潟薬大・応生命)
owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景】 油脂需要が高まっている世界において、油脂酵母は新たな油脂供給源としての期待が高まっている。*Lipomyces starkeyi*は、乾燥菌体重量の85%以上の油脂を蓄積する油脂酵母である。近年、*L. starkeyi*のゲノム配列が公開され、代謝経路の推定やそれに基づいた油脂生産に関する遺伝子の改変における高油脂蓄積株の取得、培養法の検討など様々なアプローチにより*L. starkeyi*の産業利用に向けた研究が進められている。脂肪球形成モデルはいくつか提唱されている一方で、実際の脂肪球の形成機構や形態学的特徴、油脂蓄積過程における肥大化する際のメカニズムについては明らかにされていない。そこで、本研究は*L. starkeyi*の脂肪球の形成機構および脂肪球の肥大化メカニズムの解明に繋がる新たな知見を形態学的に明らかにすることを目的とした。

【方法】 *L. starkeyi*の油脂蓄積を誘導する合成培地を用いて*L. starkeyi*(野生株であるCBS1807)の培養を行った。増殖期、油脂合成期、油脂分解期、の各フェーズの培養液をサンプリングし、生化学的情報(乾燥菌体重量、残糖量、油脂量)を取得した。並行して得られた菌体を、寒天培地で固定し、倒立顕微鏡で1分おきに23時間タイムラプス撮影を行い、生細胞の油脂蓄積および生育過程をリアルタイムで観察した。

【結果】 *L. starkeyi*の長時間タイムラプス撮影により、脂肪球の肥大化や蓄積過程をリアルタイムで捉えることができた。その結果、菌体内の脂肪球が出芽初期において母細胞と娘細胞間を移動することが明らかになった。さらに、複数の脂肪球の肥大化過程を捉えることに成功した。また、生化学的情報や、細胞および脂肪球の形態について相関があることが示された。

Real-time monitoring of the lipid accumulation process in *Lipomyces starkeyi*

○Yuka Takahashi¹, Yosuke Shida¹, Yoshiyuki Suzuki¹, Hiroaki Takaku²,
Wataru Ogasawara¹
(¹Nagaoka Univ. Technol., ²Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words *Lipomyces starkeyi*, lipid, Morphology analysis, Real time monitoring

3E03-11 難資化性ミズ堆肥土壌からの油脂生産微生物の単離と同定

○橋 駿介¹, 若月 良子¹, 鈴木 義之², 志田 洋介³, 小笠原 渉², 森 一樹⁴, 田代 康介⁴, 赤澤 真一¹
(¹長岡高専・物質工, ²長岡技大・技学イノベ, ³長岡技大・物生, ⁴九州大・農)
s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】世界人口は2050年に97億人にも達し(国連報告書, 2019), 食糧・エネルギー問題が世界的に懸念されているため, 限りある石油資源からの脱却及び持続可能性のある資源を活用しこれらの問題を解決する試みが広く行われている。例えば化石燃料に代わる持続可能性エネルギー資源として油糧作物より生産されるバイオディーゼルがあるが, 広い作地面積を要するなどの点で日本では不向きとされる。そのため, 日本においては油糧微生物からの油脂生産法が注目されており効率的に油脂を生産する菌株が探索されている。本研究ではこれまでほとんどスクリーニングサンプルとして用いられておらず, 窒素源が少なく微生物の多様性が期待される難資化性ミズ堆肥土壌から油脂を生産する菌株の取得を目指した。

【方法】単離源として, 樹木チップを飼育床, キャベツを餌として, 2020年6月29日から2021年3月17日の間ミズを飼育した飼育容器より定期的に採取した飼育床を使用した。寒天平板培地への画線によって単離株を取得し同定した。取得した株について油脂量を測定した。

【結果】酵母4株が単離され, 3株はX属, 1株はYと同定された。Yと同定された株は, 乾燥菌体1mg当りの油脂含有率が, 基準株 *Lipomyces starkeyi* NBRC10381の85%程度に迫り, 難資化性ミズ堆肥土壌から油脂生産微生物を単離できることが明らかとなった。現在油脂組成についても解析中である。本研究の一部は, NEDO カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発の支援を受けて行われた。

Isolation and characterization of lipid-producing microorganisms from vermicompost using wood chips

○Shunsuke Tachibana¹, Yoshiko Wakatsuki¹, Yoshiyuki Suzuki², Yosuke Shida³, Wataru Ogasawara², Kazuki Mori⁴, Kosuke Tashiro⁴, Shin-ichi Akazawa¹
(¹Dept. Material Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll., ²Dept. Sci. Tech. Innov., Nagaoka Univ. Tech., ³Dept. Mat. Sci. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., ⁴Dept. Biosci. Biotechnol. Faculty Agri., Kyushu Univ.)

Key words Lipomyces, earthworm, compost, oleaginous yeasts

3E03-12 サトウキビバガスを利用したオーランチオキトリウム属による脂質生産

○渡邊 研志¹, 西嶋 美保¹, 黛 新造², 秋庸 裕¹
(¹広島大院・統合生命科学, ²出光興産株式会社)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【背景】海洋性の真核微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属は従属栄養条件下で高度に増殖し, 高度不飽和脂肪酸や抗酸化カロテノイドなどを細胞内に高度に蓄積する。産業微生物として高付加価値物質だけでなく, 化成品やバイオ燃料など低価格バルク品製造にも利用するためには, 安価かつ豊富に存在する原料を用いる必要がある。本研究では, リグノセルロース系バイオマスであるサトウキビ搾汁残渣(バガス)をオーランチオキトリウム属の培養基質として利用することを試みた。

【結果・考察】サトウキビバガスを水蒸気爆砕した後に市販酵素で加水分解した糖化液を含む培地で *Aurantiocytrium limacinum* SR21 株を培養したところ, 同濃度の標準グルコースを含む対照培地と比較して細胞収量は25~97%、脂肪酸収量は41~99%の顕著な抑制が認められた。リグノセルロース系バイオマスの熱処理により生成することが報告されているフラン類, フェノール類および有機酸類に対するSR21株の感受性を調べたところ, フルフラールが特に顕著な増殖阻害を示し, 糖化液中に増殖を阻害し得る濃度で含まれていることがわかった。フルフラールの除去法を検討した結果, 水蒸気爆砕後のサトウキビバガスの水洗および糖化液の活性炭処理が有効であることがわかった。そこで, これらの処理を施した糖化液を含む培地でSR21株を培養したところ, 対照培地と同等かそれ以上の増殖および脂肪酸生産性を示した。

Utilization of sugarcane bagasse as a substrate for lipid production by *Aurantiocytrium* sp.

○Kenshi Watanabe¹, Miho Nishijima¹, Shinzo Mayuzumi², Tsunehiro Aki¹
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Idemitsu Kosan, Co., Ltd)

Key words *Aurantiocytrium* sp., biomass conversion, lignocellulosic materials

3F02-01 複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御: 炭素源がメタ回分発酵における細菌叢変遷と有機酸の生産に及ぼす影響の解明

○水野 優¹, 古閑 友紀¹, 大城 麦人¹, 宮本 浩邦^{2,3,4,5}, 酒井 謙二¹, 田代 幸寛¹
(¹九大院・生資環, ²千葉大・園芸, ³(株)サーマス, ⁴日環科学(株), ⁵理研・生命医科学)
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】

従来の単一微生物系による発酵と異なり, 制御された複合微生物系により有機物を生産するメタ発酵法をメタ発酵と定義提唱している。先行研究では, 体系的に温度などの諸因子のメタ発酵における影響を報告した。様々な基質特異性をもつ複合微生物系によるメタ発酵には複合基質の利用などの利点があるが, 様々な成分で構成されるバイオマスをメタ発酵に利用するには, 各基質への発酵挙動を理解する必要がある。そこで本研究では, バイオマスを構成する様々な炭素源を用いたメタ発酵を行い, 炭素源が生産物や細菌叢などの発酵挙動におよぼす影響を調べることを目的とした。

【方法】

発酵には種菌に未分離のコンポストを使用し, 50°C, 嫌気条件下で7日間, 回分発酵を行った。pH調整は24時間毎に振動制御を行った。炭素源は未利用バイオマスを構成する基質12種(単糖, オリゴ糖, 糖アルコールなど)を用いた。採取した発酵サンプルを, 有機酸分析, 乳酸の光学純度測定, 炭素源の消費量測定および菌叢解析に供した。

【結果・考察】

デンプン他7種の炭素源では, 炭素源が減少して乳酸が増加し, 最優占菌は *Weizmannia coagulans* であった。このことから, *W. coagulans* が炭素源を消費して乳酸を生産する主要菌と決定した。キシランでは酢酸が生産され, 菌叢は発酵前半と後半で最優占菌が異なった。さらに, 藻類系バイオマスの構成成分であるマンニトールから, 複合微生物プロセスでL-乳酸生産を初めて確認した。炭素源が枯渇した終盤では乳酸を消費して酪酸を生産していた。菌叢も序盤は *W. coagulans* が最優占菌だったが, 終盤は *Garcicella nitratireducens* の割合が増加した。

【結論】

炭素源の種類によって, 生産される有機酸の種類や割合, 細菌叢が変化することを明らかにした。すなわち, 未利用バイオマスからメタ発酵による有機物生産が期待される。

Control of bioprocess with complex microbial engineering: effect of carbon sources on microbial community structure and their organic acid productivity in meta-batch fermentation

○Yuu Mizuno¹, Tomonori Koga¹, Mugihito Oshiro¹, Hirokuni Miyamoto^{2,3,4,5}, Kenji Sakai¹, Yukihiko Tashiro¹
(¹Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Horticult., Chiba Univ., ³Sermas co., Ltd., ⁴Nikkan science., ⁵IMS,RIKEN)

Key words Mixed culture system, biomass, Carbon sources, microbiome

3F02-02 複合微生物工学アプローチによるバイオプロセス制御: メタ連続発酵における希釈率が細菌叢と有機酸生産性に及ぼす影響の解明

○古閑 友紀¹, 宮本 浩邦^{2,3,4}, 酒井 謙二¹, 大城 麦人¹, 田代 幸寛¹
(¹九大院・農, ²千葉大・園芸, ³理研・生命医科学, ⁴サーマス)
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

近年, 複合微生物プロセスを工業, 農業, 環境, 医薬等への応用を目指す学問である『複合微生物工学』(Complex Microbial Engineering)が注目されている¹。特に, 複合微生物を用いた有機物生産プロセスをメタ発酵と定義提唱しており, 複数の基質利用や雑菌汚染への耐性, 減菌不要などのメリットが存在する一方, 生産物のヘテロ化や制御理論や技術の未構築が課題である。連続発酵は高い物質生産性と長期操作安定性の点で優れているが, メタ連続発酵では, 連続発酵特有の因子である希釈率と優占種, 生産物の関連は明らかにされていない。そこで, 本研究では, メタ連続発酵において希釈率(D)の変遷パターン²の影響を詳細に調査した。

複合種菌として堆肥を用い, グルコースを唯一の炭素源として嫌気的条件下, pH 7.0に一定制御し, 50°Cで発酵を行った。Up mode (Up)ではDを0.05 h⁻¹から0.05 h⁻¹ずつ段階的に0.4 h⁻¹に上昇させ, Down mode (Do)ではDを0.4 h⁻¹から0.05 h⁻¹ずつ段階的に0.05 h⁻¹に下降させ, 細菌叢と有機酸生産を解析した。回分発酵では, *Caldicoccus hisashii* 及び *Weizmannia coagulans* が優占種となった。連続発酵開始後, Upでは0.05 h⁻¹において *Anaerostipes bizerterensis* (30.1%) が優占種となった。0.1 h⁻¹以上で, *C. hisashii* および *Xylanivirga thermophila* が優占種となり, 辛酸, 酢酸, 乳酸が生産された。Doでは, 0.4 h⁻¹にて, *C. hisashii*, *W. coagulans* が優占種となり, 0.25 h⁻¹まで同様の細菌叢を維持した。0.20 h⁻¹以下では, *Clostridium cochlearium* の占有率が増加した。0.4から0.2 h⁻¹まで乳酸が主生産物であったが, 0.2 h⁻¹以下, 酪酸の濃度が増加し, 0.05 h⁻¹で最大6.94 g/Lとなった。希釈率とmodeの違いにより, 細菌叢と生産物が大きく変化する事が明らかとなった。

¹ 田代, 酒井, 生物工学, 99, 627-630, 2021

Control of bioprocess with Complex Microbial Engineering: Elucidation of effect of dilution rate on microbial community structure and their organic acid productivity in continuous meta-fermentation.

○Tomonori Koga¹, Hirokuni Miyamoto^{2,3,4}, Kenji Sakai¹, Mugihito Oshiro¹, Yukihiko Tashiro¹
(¹Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., ²Fac. Horticult., Chiba Univ., ³IMS,RIKEN, ⁴Sermas co., Ltd)

Key words mixed culture, continuous culture, dilution rate, microbial community

3F02-03 ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用(第3報)

石本 弥子¹, ○齋藤 愛弥², 相馬 悠希³, 馬場 健史⁴, 青柳 秀紀^{1,2,5}
 (1)筑波大院・生物資源科学学位P, 2)筑波大・生物資源, 3)九大院・農, 4)九大・生医研, 5)筑波大・生命環境系)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】

ウグイス (*Horornis diphone*) 糞は洗顔料やシミ抜きとして平安時代から近年まで利用されてきた。しかし、鳥獣保護管理法の施行により糞の入手が困難となり、現在は製品の製造ができない。ウグイス糞が化粧品の効能を示す機構は、これまで学術的検討が十分になされておらず、糞の主な要素である細菌叢(腸内由来)も未解明な部分が多い。この現状を踏まえ、我々はウグイス糞の諸特性や細菌叢構造の解析をおこなってきた(1,2)。今回は、ウグイス糞が化粧品の効能を持つ機構の解明とその利用を目指し、これまで未解明であったウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析を試みた。

【方法と結果】

ウグイス糞に加え、比較としてウグイスと同じ餌を食べ、体のサイズも類似しているルリビタキ (*Tarsiger cyanurus*) などの糞を実験に使用した。次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて糞の細菌叢構造を解析すると共に、PICRUSt2 による予測メタゲノム解析を行った。種々検討した結果、ウグイス糞とルリビタキなどの他の鳥の糞の細菌叢の違いを把握することができた。また、予測メタゲノム解析の結果からプリン代謝物に関係する酵素に着目したところ、ウグイス糞の Uricase (尿酸分解酵素) の存在比が他の鳥の糞よりも高い値を示した(糞試料から複数種の Uricase 生産菌を単離培養することもできた)。糞のメタボローム解析を行った結果、ウグイス糞と他の鳥の糞のメタボロームの違いを把握できた。また、他の鳥の糞と比較して、ウグイス糞は化粧品の効能を有する Spermidine や Citrulline などの含有量が高いことが明らかになった。

(1) R1 日本生物工学会要旨集 p. 257. (2) R3 日本生物工学会要旨集 p. 198.

Analysis of characteristics and bacterial flora of *Horornis diphone* feces and its utilization (part 3)

Yako Ishimoto¹, ○Manami Saito², Yuki Soma³, Takeshi Bamba⁴, Hideki Aoyagi^{1,2,5}
 (1)Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, 2)Coll. Agro-Bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba, 3)Fac., Agr., Kyushu Univ., 4)Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., 5)Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bacterial community, cosmetics, fecal sample, *Horornis diphone*

3F02-04 細菌・ウイルスのシングルセルゲノム解析技術を用いた河川水中における遺伝子の伝播解析

○西川 洋平^{1,2}, 塚田 祐子³, 我妻 竜太^{2,3}, Lin Chia-Ling³, 小川 雅人³, 細川 正人^{1,2,3,4}, 竹山 春子^{1,2,3,4}

(1)早大・ナノライフ創新研, 2)産総研・早大 CBBB-OIL, 3)早大・先進理工, 4)早大・生命動態研
 haruko-takeyama@waseda.jp

【背景と目的】河川水中には多様な細菌叢・ウイルス叢が形成されており、これらの相互作用によって薬剤耐性遺伝子などの重要な遺伝子が環境中に拡散している。本研究では、これらの遺伝子の分布・伝播を詳細に解析することを目的として、細菌およびウイルスのゲノム情報を1細胞・1粒子レベルの解像度で解析できる技術を開発した。また、河川水中の細菌・ウイルスを対象とした大規模ゲノム解析を実施し、遺伝子の伝播の可能性を評価した。

【方法】ピコリットル容量の微小液滴作製技術を活用し、細菌・ウイルス粒子を1細胞・1粒子レベルで液滴内に封入した後、個々の液滴内において溶解および全ゲノム増幅を可能とするシステムを開発した。実環境への応用として、多摩川および神田川から河水を採取し、吸引濾過によって細菌・ウイルス画分を調製した。それぞれの懸濁液を用いて全ゲノム増幅を行った後、個々の DNA 増幅産物を対象として次世代シーケンサーによる配列解析を行った。

【結果と考察】地点および季節の異なる複数箇所から河川水を採取し、26門 329 属にわたる合計 3345 個の細菌 1 細胞ゲノム情報を獲得した。個々の配列に対してデータベースを参照することにより、1 細胞レベルでの薬剤耐性遺伝子の探索が可能となり、全体の 9%にあたる 306 個の 1 細胞ゲノム情報から薬剤耐性遺伝子が検出された。また、薬剤耐性遺伝子の種類とその保有細菌の系統を紐付けることによって、環境中における薬剤耐性遺伝子の分布を詳細に解析可能であることが明らかとなった。また、同ゲノム解析手法をウイルス粒子に適用することにより、1300 個を超える未知ウイルスのゲノム配列をこれまでに獲得した。今後、ウイルスゲノム上にコードされた細菌様遺伝子を検出することによって、ウイルスが関与する遺伝子の伝播について、詳細な解析が可能になると考えられる。

Single-cell genomics of bacteria and viruses to analyze gene transfer in river water

○Nishikawa Yohei^{1,2}, Tsukada Yoko³, Ryota Wagatsuma^{2,3}, Lin Chia-Ling³, Kogawa Masato³, Hosokawa Masahito^{1,2,3,4}, Takeyama Haruko^{1,2,3,4}
 (1)Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., 2)CBBB-OIL, AIST-Waseda Univ., 3)Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 4)Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words single-cell analysis, environmental bacteria, phage, microfluidic device

3F02-05 ウイルス 1 粒子ゲノムに対する効率的なデータ解析手法の開発と環境ウイルスの多様性解析

○我妻 竜太^{1,2}, 西川 洋平^{2,3}, 塚田 祐子¹, 千々岩 樹佳³, 細川 正人^{1,2,3,4}, 竹山 春子^{1,2,3,4}

(1)早大院・先進理工, 2)産総研・早大 CBBB-OIL, 3)早大・ナノライフ創新研, 4)早大・生命動態研
 haruko-takeyama@waseda.jp

【背景と目的】環境ウイルスは非常に多様であり、環境に様々な影響を与える。しかし、従来のメタゲノム解析では、多様なゲノム配列を生りコードから再構築することが技術的に困難であり、同種ウイルス間での詳細な配列比較が難しいなどの課題が存在した。本研究ではこれらの課題の解決に向け、ウイルス 1 粒子のゲノム解析技術(single-virus genomics; SVGs)を活用し、ウイルス 1 粒子から取得された配列データを効率的かつ高精度に解析する情報解析手法の確立を目指した。さらに、環境ウイルスを対象とした配列の系統解析を行い、その多様性を評価した。

【方法】ウイルス 1 粒子由来の配列データを対象に、de novo アセンブリ、混入配列の除去、遺伝子と系統情報の付与までを並列的に一貫処理できる解析手法を開発した。混入配列除去の正確性は、公共のウイルス配列から作成したモックデータを用いて評価した。さらに、神田川から取得した 1536 個の配列データに対して本解析手法を応用し、ウイルス配列の多様性を調べた。

【結果と考察】開発した手法をモックデータに応用した結果、99.5%以上の混入配列が除去された。環境データに本手法を応用した結果、99%以上が新規の種から構成される 1431 個のウイルス配列が構築された。同時に実施したメタゲノム法との比較によって、約 90.3%の属~亜科レベルの系統は、従来法では取得されない配列であることが確認された。また、メタゲノム解析では 1 配列のみが検出されたウイルス種に対し、SVGs では複数個の配列が獲得された。それらの配列を比較した結果、宿主細菌の免疫への抵抗に関連する遺伝子が頻繁に伝播していることが確認された。以上の結果により、SVGs によって多様なウイルス配列が取得可能であり、同一配列間の詳細な比較ゲノム解析によってウイルスの宿主適応に関する解析が可能となることが示唆された。

Development of a data-analysis tool for efficient single-particle genomics of environmental viruses and its application for diversity analysis

○Ryota Wagatsuma^{1,2}, Yohei Nishikawa^{2,3}, Yuko Tsukada¹, Rieka Chijiwa³, Masahito Hosokawa^{1,2,3,4}, Haruko Takeyama^{1,2,3,4}
 (1)Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., 2)CBBB-OIL, AIST-Waseda Univ., 3)Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., 4)Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words single-cell analysis, phage, virus, bioinformatics

3F02-06 土壌環境と根内細菌叢の関係解析

○佐々木 匠, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
 (立命館大院・生命科学)
 kubo@sk.ritsumeikai.ac.jp

【背景・目的】

植物の根内には多様な微生物が生息している。これらの微生物は種子に由来する種と宿主植物の生育土壌に由来する種に分かれるが、土壌環境の違いによって土壌から根内に移行する微生物の種類や数がどのように変化するかは明らかになっていない。本研究では細菌に注目し、有機肥料を施肥した土壌および化学肥料を施肥した土壌でコマツナを栽培し、その根内の細菌数と細菌叢を解析することによって、土壌環境が根内細菌叢に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

パーミキュライトおよび真砂土、黒土、ピートモスを 5:3:1:1 (w/w) で混合し、コマツナ栽培用土壌を調製した。この土壌に有機肥料または化学肥料を施肥し、それぞれを有機土壌および化学土壌とした。有機土壌および化学土壌に播種後 1 週間のコマツナの苗を定植し、その後 4 週間栽培した。栽培後、各条件の土壌およびコマツナ根内から細菌 DNA を抽出し、細菌数を算出した。また、抽出した DNA を元に根内細菌叢の解析を行った。算出された細菌数は有機土壌で 6.6×10^8 cells/g-sample、化学土壌で 3.5×10^8 cells/g-sample、有機土壌で栽培したコマツナ根で 4.9×10^8 cells/g-sample、化学土壌で栽培したコマツナ根で 4.7×10^8 cells/g-sample であった。どちらの土壌で栽培したコマツナ根内でも *Flavobacterium* 属が優占して分布していたが、*Pseudomonas* 属は有機土壌で栽培したコマツナ根内でも、*Stenotrophomonas* 属は化学土壌で栽培したコマツナ根内でもより高い分布割合であった。これらの結果から、土壌細菌数は根内細菌数にあまり影響を与えないが、土壌細菌の種組成は根内細菌の種組成に大きな影響を与えることが示唆された。

Analysis of the relation between soil properties and bacterial communities in roots

○Takumi Sasaki, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
 (Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil, root, bacteria, metagenomic libraries

3F02-07 ダイズ栽培用微生物資材開発に向けたリン溶解菌の分離及び特性評価

○岩元 真菜, 村田 智志, 新垣 篤史, 田中 剛
(農工大院・工)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【目的】

大豆は近年、代替肉の原料として需要が増加している。ダイズ栽培におけるリン供給は化学肥料が用いられているが、原料となるリン鉱石枯渇の懸念から、日本においては2050年までの化学肥料使用量の30%削減目標を掲げている。そこで、土壌中に蓄積した不溶性リン酸塩の有効利用に向けて、リン溶解菌を担持した微生物資材の開発が期待されている。本研究では、ダイズ栽培用微生物資材の開発を最終目的とし、ダイズ栽培土壌からリン溶解菌の分離とその特性評価を行った。

【方法】

ダイズ栽培土壌から、寒天培地を用いてリン溶解菌の分離を行った。分離株のリン溶解能は、Phosphate Solubilizing Index (PSI)を算出することで評価した。その後、リン溶解菌を用いたダイズポット栽培試験を実施し、28日間の栽培後における植物体乾燥重量及びリン含量を測定した。

【結果と考察】

ダイズ栽培土壌から74株のリン溶解菌を分離した結果、PSI2.0以上の高いリン溶解能を有する2株のリン溶解菌 (*Burkholderia contaminance*)を得た。上記2株を用いて28日間のダイズポット栽培試験を行った結果、乾燥重量における有意差は認められなかった。一方、ダイズの根におけるリン含量はリン溶解菌を接種した方が非接種と比べ有意に低いことが確認された。よって、本研究において分離したリン溶解菌を用いることにより、菌体非接種と比較して少ないリンの取り込み量で同等の乾燥重量を得られたと考えられた。このことから、これらのリン溶解菌は、リンの溶解能以外に植物の成長を促進する特性を有していることが示唆された。今後、これら2株のリン溶解菌及び他の分離株について、ダイズの生育における詳細な影響評価、微生物資材の開発を行う。

【謝辞】

本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施されました。

Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria toward development of biofertilizers for soybean cultivation

○Mana Iwamoto, Satoshi Murata, Atsushi Arakaki, Tsuyoshi Tanaka
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words soybean, biofertilizer, phosphate solubilizing bacteria, *Burkholderia*

3F02-08 ダイズ栽培用微生物資材開発に適した有用窒素固定細菌の探索

○小林 真理香, 村田 智志, 新垣 篤史, 田中 剛
(農工大院・工)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【目的】

ダイズは、高栄養作物として増産が求められている作物である。近年、環境負荷の低い作物増産方法として窒素固定細菌を利用した微生物資材が注目されている。窒素固定細菌の利用により、肥料の3大要素の一つである窒素源の作物への供給が期待される。そこで本研究では、ダイズ高収量圃場の土壌から熱・乾燥耐性を有する窒素固定細菌の分離を行い、生育、窒素固定活性の評価を行った。

【方法】

ダイズポット栽培土壌、ダイズ高収量圃場の4つの生育段階(栽培前、三葉期、開花期、最大繁茂期)の土壌から、窒素源を含まない培地により細菌を分離し、16S rDNA 配列のシーケンス解析により菌種同定を行った。高収量圃場の土壌には熱・乾燥処理(50°C、24h)を行い、同様に菌の分離・種同定を行った。その後同定された窒素固定細菌について、アセチレン還元法により窒素固定活性を評価した。

【結果と考察】

ダイズ栽培土壌からの分離培養の結果得られた窒素固定細菌47株の内、共生窒素固定細菌NKNB3株と、ダイズの窒素需要が高い三葉期・開花期の土壌から分離され、かつ良好な生育を示した単生窒素固定細菌4株(NKNB60, 64, 90, 91株)の計5株を有用窒素固定細菌として選定し、窒素固定活性の評価を行った。その結果、これら5株は、ダイズの増収効果が報告されている既存の根粒菌株と比較して、同等以上の窒素固定活性を有することが示唆された。また、単生窒素固定細菌4株においては熱・乾燥処理を施した土壌から分離されたことから、微生物資材に必要な熱・乾燥耐性を有することが考えられた。そこで、このうちNKNB60株を用いて微生物資材の作製を行った。

【謝辞】

本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施されました。

Isolation of nitrogen-fixing bacteria feasible for biofertilizer enhancing soybean growth

○Marika Kobayashi, Satoshi Murata, Atsushi Arakaki, Tsuyoshi Tanaka
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words soybean, biofertilizer, nitrogen-fixing bacteria

3F02-09 AIを用いた大腸菌異種タンパク質生産の培地最適化

○渡辺 一樹¹, 邱 泰瑛², 小西 正明²
(¹北見工大院・工, ²北見工大)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

[背景]微生物培養による物質生産において、経済性向上のため各工程の最適化が必要であり、特に培地はコストの大部分を占めることから組成最適化が必須である。当研究グループでは、AIと最適化アルゴリズムによる先進的な培地最適化手法に関して研究しており、本報告では組換え大腸菌による異種タンパク質生産に用いる半合成培地の最適化について報告する。

[実験方法] *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysSによるGFP生産系を対象とした。培地成分には酵母エキス等の培養基材を含む19成分を選定した。それぞれの成分に対し、4段階の濃度水準を設定し、実験計画法等を適用し86種の培地を設計した。これらを96穴のディープウェルプレートへ自動分注ロボットにて全量1mLで作成し、培養データを取得した。得られたデータセットを用いて、pythonのtensorflowライブラリにより、本培養8時間目のGFP蛍光強度及び比増殖速度を予測する深層学習モデルを作成した。その後、ベイズ最適化により最適培地組成を探索し、得られた培地を設計して培養実験による検証を実施した。

[結果]学習用の培養データセットは、GFP蛍光強度で最大-最小間で16.0倍の差が確認された。GFP蛍光強度と比増殖速度を予測する深層学習モデルのR²_{test}はそれぞれ0.94, 0.91となり、高精度のモデル作成に成功した。これらモデルから得られた最適化培地にて培養した結果、GFP蛍光強度予測モデルから算出した最適化培地では、各種成分を高濃度に含んだため生育阻害が発生した。一方で、比増殖速度予測モデルから算出した最適化培地では比増殖速度の値が学習データの最高値を上回り、更にGFP蛍光強度の値も最高値を示した。この培地は大腸菌用の一般的な富栄養培地であるSOC培地と比較して6.61倍の蛍光強度を示し、比速度を対象とした最適化が有効であることが示唆された。

AI-based media optimization for *Escherichia coli* heterologous protein production

○Kazuki Watanabe¹, Tai-Ying Chiou², Masaaki Konishi²
(¹Kitami Inst. Tech., Grad. Sch. Eng., ²Kitami Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, artificial neural network, medium optimization, recombinant protein production

3F02-10 酵母エキスおよびペプトンの定量データを用いた成分プロファイリング

○中島 拓都¹, 邱 泰瑛², 小西 正明²
(¹北見工大院・工, ²北見工大)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

微生物による物質生産では、培養基材として酵母エキス (YE) やペプトン (PP) が利用される。しかし、メーカー、ロット間で培養基材の製造方法や原料が異なるため、組成が異なり、微生物の増殖や目的産物の収率に影響する。そのため、安定的に培養するためには、培養基材の組成を正確に把握することが重要である。先行研究では、培養基材の半定量データよりプロファイリングしたが、組成の違いを十分に捉えることができず、ロット違いを含む複数の培養基材の判別が困難だった。そこで、本研究では、定量データを用いてプロファイリングすることで、メーカー、ロットが異なる培養基材の判別が可能となるか検証した。

YE15種、PP22種中の81成分を対象に、5種類の分析手法を用いて定量し、クラスタリングによって判別が可能か評価した。また、ロット違いの培養基材を主成分分析 (PCA) し、特徴的な成分を抽出した。全てのメーカー、ロット違いのYEはそれぞれ異なるクラスターを形成し、判別可能だった。ロット違いのYEのPCAより、PC1の寄与率は40.0%であり、YEはそれぞれPC1の正と負の方向にプロットした。ローディングプロットより、正の方向では、糖類、核酸類、フマル酸、アミノ酸類が寄与していることが示された。負の方向のクラスタリングにはイオン類、有機酸類、Pheが寄与していることが示された。PPの分析では、遊離アミノ酸量データを用いるとメーカー、ロットの異なるPPの判別は可能だったが、総アミノ酸量データを用いるとロットの異なるPPの判別は困難だった。遊離アミノ酸量データのPCAより、PC1の寄与率は69.2%であり、ロットの異なるPPはそれぞれPC1の正と負の方向にプロットした。ローディングプロットより、正と負の方向にそれぞれアミノ酸がプロットしたから、遊離アミノ酸組成の違いがロット間差として影響していることが示唆された。

Component profiling of yeast extract and peptone using quantitative data for microbial media

○Takuto Nakajima¹, Tai-Ying Chiou², Masaaki Konishi²
(¹Grad. Sch. Eng., Kitami Inst. Technol., ²Kitami Inst. Technol.)

Key words profiling, quantitative analysis, yeast extract, peptone

3F02-11 DO-stat 流加培養に基づく組換え大腸菌を用いたラクダ科 VHH 抗体の効率的生産

○鈴木 貴博, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

[背景・目的]

VHH(Variable heavy domain of the heavy chain antibody)はラクダ科動物が持つ重鎖抗体の変異領域で、治療薬や検査薬としての利用が期待されている抗体フラグメントである。VHHは熱安定性やpH安定性が高く、大腸菌を用いて生産できる。本研究では溶存酸素濃度を指標としてグルコースを流加するDO-stat流加培養(1, 2)を適用し、VHHの効率的生産を目指した培養工学的検討を行った。

[方法]

Anti-HEL (Hen egg lysozyme) VHHをモデルタンパク質とし、ベクターと宿主はそれぞれpET-22b(+), Rosetta2 (DE3)を使用した。VHHはN末端にpelB leader, C末端にHis-tagが融合したタンパク質として発現する。PID制御を導入したDO-stat流加培養装置を用いて種々のDO設定値(DO=10.20,40,60%)に設定し、グルコース溶液を流加するDO-stat流加培養を96時間行った。通気速度は1vvm、攪拌速度は800rpm、温度は25°C、pHは7.0に設定した。

[結果と考察]

回分培養開始後、10-12時間目に流加培養に移行し、 $OD_{600}=60$ においてIPTGによる誘導生産を開始した。DO=20%の条件では82時間目に最大0.72 g/L、DO=40.60%の条件では96時間目にそれぞれ最大0.63,0.55 g/Lの菌体内可溶性VHHが生産された。DO=10%の条件ではVHHは良好に生産されなかった。またVHHは菌体外にも生産され、DO=20%の条件では59時間目に最大0.18 g/L、DO=40.60%の条件では96時間目にそれぞれ最大0.15,0.18 g/L菌体外に分泌された。菌体内不溶性VHH濃度は全てのDO条件で0.05 g/L以下に抑制でき、DO=20, 40.60%の条件において可溶化率は95%以上となった。今後は通気・攪拌速度を変化させDO-stat流加培養を行い、通気、攪拌やグルコース供給速度の影響を検討する。

- 1) N. H. Nghia et al. *J. Biosci. Bioeng.* 132,1,56-63(2021)
- 2) N. H. Nghia et al. *Biochem. Eng. J.* 176, 108184.(2021)

Efficient production of camelid VHH antibody fragment using recombinant *Escherichia coli* by DO-stat fed-batch culture

○Takahiro Suzuki, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, DO-stat fed-batch, VHH, Soluble expression

3F02-12 DO-stat 流加培養による組換え大腸菌を用いた単鎖抗体生産のための基質供給制御

○湯川 忠二, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

[背景・目的] これまでにペリプラズム分泌シグナル(PelB leader)を導入した組換え大腸菌を用いてDO-stat流加培養¹⁾²⁾を行うことにより、単鎖抗体(scFv)を菌体外に高濃度に分泌生産できることを報告した³⁾。DO-stat流加培養では、培養後期において比基質消費速度(v)が低下し、scFvの生産性が低下する。一方、DO-stat流加培養では攪拌速度を増加させることで k_{1a} を増加させ、 v を制御することが可能である。本研究では攪拌速度を制御し、 v を最適に維持することでscFv生産の向上を目指した。

[方法] Anti-CRP scFvをモデルタンパクとしpET-22b発現ベクターを用いてRosetta 2 (DE3)株に導入した組換え大腸菌を用いた。2L容Jar-fermenterにより、DO-statに基づく流加培養を行った。菌体濃度が $OD_{600}=60$ に達した時点でIPTGを添加し、誘導生産を行い、流加培養を継続した。培養の進行に伴い攪拌速度を段階的に増加させ、 v を制御した。

[結果と考察] 攪拌速度を一定にしたDO-stat流加培養では酸素供給速度が培養中は一定に維持されるため、基質供給速度もほぼ一定になる。このため培養後期に菌体が高濃度化すると、 v が低下し、scFv生産性が低下していると考えられた。そこで、培養中期の v を0.04 g-substrate g-cell⁻¹ h⁻¹に維持するように攪拌速度を増加させ、基質供給速度を制御した流加培養を行ったところ、scFv 5.4 g/Lが菌体外にリフォールディング不要な活性型として生産され、培養上清scFv濃度は約2.2倍、Total scFv濃度も約1.5倍に増加した。

- 1) N.H. Nghia, et al. *J. Biosci. Bioeng.* 132.1 (2021): 56-63.
- 2) N.H. Nghia, et al. *Biochem. Eng. J.* 176 (2021): 108184.
- 3) 坂本祐一朗他、第69回日本生物工学会、NO.4P-G044 (2017)

Feeding control for efficient production of single-chain variable fragments (scFvs) using recombinant *E.coli* by DO-stat fed-batch culture

○Chuji Yukawa, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, DO-stat fed-batch culture, scFv, extracellular production

3F02-13 組換え大腸菌を用いた DO-stat 流加培養による効率的単鎖抗体生産

○山口 大介, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

[背景及び目的]

当研究室では、DO-stat流加培養(1, 2)を用いペリプラズム分泌シグナル(pelB leader)を導入した組換え大腸菌により、単鎖抗体(anti-CRP scFv)を上清中へ効率的分泌生産できることを報告している³⁾。本研究では、本培養手法の汎用性を高めるため、scFvのアミノ酸配列やプラスミド安定性が菌体外分泌生産性にどのように影響を及ぼすかを検討した。

[方法]

菌体外分泌生産の確認されているanti-CRP scFvの不要なアミノ酸配列を一部削除し、scFv遺伝子をpET22-b(+)⁴⁾発現ベクターに導入し、Rosetta2(DE3)株に形質転換した。これらの生産株を用いて、2L容Jar-fermenterによるDO-stat流加培養によりscFv生産を行った。抗生物質含有/非含有培地を用いたコロニーカウント法により、プラスミドpET22-b(+)⁴⁾の保持率を評価した。

[結果と考察]

アミノ酸配列を変更したscFv生産株を用いて、DO=40%及びDO=60%の条件下でDO-stat流加培養を行ったところ、従来に比べ菌体外分泌生産量が低下したことから、scFvのアミノ酸配列が菌体外分泌特性に強い影響を持つことが示唆された。pET22-b(+)⁴⁾プラスミドの保持率は流加培養開始時では100%であったが、培養50時間目には71%、96時間目には60%まで低下し、培養後期における生産性低下の一因と考えられた。本研究のような長時間の流加培養を行う場合、安定的なscFv生産を行うためには、培養後期においてもプラスミド保持率を高く維持する必要がある。

- 1) N. H. Nghia et al. *J. Biosci. Bioeng.* 132.1:56-63 (2021)
- 2) N. H. Nghia et al. *Biochem. Eng. J.* 176:108184 (2021)
- 3) 坂本祐一朗他、組換え大腸菌を用いた流加培養による単鎖抗体の高濃度菌体外生産、第69回日本生物工学会、NO.4P-G044 (2017)

Effective production of shingle chain variable fragment using recombinant *Escherichia coli* by fed-batch culture

○Daisuke Yamaguchi, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, do-stat, antibody, extracellular production

3F04-01 可聴音による加振条件下での酵母のアルコール発酵

○寄兼 兼摘, 徳田 宏晴
(東農大・醸造)
tokuda@nodai.ac.jp

(目的)

古くからクラシック音楽などの演奏下での醸造製品の製造の試みが行われているが、発酵への可聴音暴露の効果については、これまであまり詳細に検討されていない。本報告では、酵母のアルコール発酵系を対象として、可聴音による加振が酵母のアルコールや有機酸生成などにおよぼす影響について基礎的検討を行った。

(方法)

グルコース10%、L-アスパラギン0.25%、リン酸2水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物0.3%からなる培地に、YM培地を用いて調製した種菌酵母を添加し、培養器底面に設置した加振機(ONKYO社製・Vibtone)により可聴音(31.5、63、125、250、500、1,000、2,000、4,000、8,000および16,000HzのBand noise)での加振をしながら30°Cでアルコール発酵を行った。なお、アルコール、糖および有機酸の定量はHPLC、音響解析はDSSF3(吉正電子(株))によった。

(結果)

培養器としてはTPX(ポリメチルペンテン)製のフラスコを用いることにより、200~9,000Hzという広い周波数帯域での培養系の加振が可能であった。1,000Hzの可聴音による加振条件下においては、酵母のグルコース消費速度やアルコール生成速度が、対照系(加振なし)と比較して約3割程度増大した。一方、4,000Hzの可聴音による加振条件下では、若干の発酵遅延現象が認められた。また、いずれの加振条件下においても、有機酸の生成量が対照系の場合と比較して若干異なっていることも明らかになった。

付記:本研究は、オンキヨー株式会社(大阪市)との共同研究である。

Ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* under the conditions excited of exposing audible sound

○Natsumi Yorikane, Hiroharu Tokuda
(Tokyo University of Agric. Dept. of Ferment. Sci.)

Key words yeast, ethanol fermentation, audible sound

3F04-02 マイクロ波前処理を行ったシアノバクテリアをバイオマス原料とした糖化・発酵

○端谷 智子¹, 仁宮 一章²
 (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】現在のバイオマス資源は、可食性バイオマスや木質バイオマスがある。しかし、これらのバイオマス原料は、それぞれ、食糧と競合する点、糖化前処理が困難である点が課題である。そこで、本研究では、食糧との競合がなく、糖化前処理も安易なバイオマスとして、グリコーゲンを蓄積したシアノバクテリアを原料に用い、酵素糖化および微生物発酵により、燃料や化成品の原料となるエタノール生産を行うことを目的とした。

【方法および結果】本研究ではシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* UTEX2973 株を使用した。BG11 培地に OD730 = 0.05 になるように植菌し、42°C、3%CO₂ 条件下で 4 日間光独立培養培養した。菌体増殖とともにグリコーゲン蓄積がみられた。グリコーゲン含量は約 50%であった。培養終了後、100 g-dry cell/L になるように菌体を回収した。このスラリーに対して 200 W マイクロ波による糖化前処理を 0-150 sec 行った。十分量のアミラーゼを用いた糖化試験の結果、前処理 0 sec では糖化率 18%であったのに対し、前処理 100 sec 以上で糖化率 100%へと向上した。また、前処理により菌体は膨張・破裂していた。以上、マイクロ波によるシアノバクテリアの糖化前処理は有効であった。グリコーゲン含量 50%の菌体 100 g-dry cell/L に対してマイクロ波前処理したものを用意し、アミラーゼによる糖化を 50°C で 72 h、酵母 *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777 株による発酵を 40°C で 24 h 行った。その結果、前処理 150 sec の場合で、糖化率は 86%、糖化・発酵の総括のエタノール収率は理論値の 60%であった。得られたエタノール濃度は 15 g/L であった。

Saccharification and ethanol fermentation from microwave-pretreated cyanobacteria as biomass feedstock

○Tomoko Hashitani¹, Kazuaki Ninomiya²
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words cyanobacteria, glycogen, ethanol fermentation

3F04-03 細胞サイズリボソームの相分離構造における酒の吟醸香成分の影響

○依田 毅
 (青森産技セ)
 tsuyoshi_yoda@aomori-itc.or.jp

清酒に含まれるカブロン酸エチル (EC) は清酒の商品価値を高めるため、酵母の違いや製造試験条件の違いがどう EC 濃度に影響するかなどを調べるため、測定が行われてきた。

EC 濃度測定試験では GC (ガスクロマトグラフィー) が使用されてきた。この装置は、購入時に非常に高価であるだけでなく、測定毎に分析用の高純度ガスをを用いるため、ランニングコストが高いという欠点があった。

極力低コストで行うことのできる、GC での精密分析を行うサンプルを選ぶための予備分析、つまり、いわゆるスクリーニングのような形の簡易な分析手法があれば便利であると考えた。

さて、脂質から人工的に作製されたリボソーム上では相分離ドメイン構造が観察されることが分かっていた。

そこで、EC と膜との相互作用により観察で特徴づけられる明かな差異を利用した簡易な測定方法を構築しようと考えた。具体的には、細胞サイズリボソームを用いた EC 濃度を簡単に判別するための方法を提供しようと考えて研究を行うことにした。

結果、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) / 1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC) / コレステロール三成分からなる相分離構造(固体秩序相/液体無秩序相, So/Ld 等)をする細胞サイズリボソームの割合は、EC を添加した時、大幅に減少し均一な構造(Homogenous)が増えた。この方法を、市販の清酒を使用して行うことで、EC 含有量測定に適用できる可能性を評価した。

The effect of *Sake* flavors for phase separation of cell-sized liposomes

○Tsuyoshi Yoda
 (AITC)

Key words membrane lipids, lipid, lipid vesicle, alcohol

3F04-04 Effect of electromagnetic field on plant growth and microbial rhizosphere

○Jeong Wook Jo, Ju Yeon Lee, Sung Woo Yang, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi, Hyung Joo Kim
 (Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)
 hyungkim@konkuk.ac.kr

This study presents the effect of electromagnetic field on plant growth and rhizosphere microorganisms. *Raphanus sativus* was used as an experimental plant. Experiments were conducted in a system, consisted with frame for conical tube, coil wound plastic bobbin, conical tube, soil, seeds, and power supply. The experiment was carried out with different electromagnetic field stimulation time (0h, 24h, 48h and 72h). During the experiment with the stimulation, plant growth hormone (IAA) and length of the stem and roots were measured. For microbial rhizosphere, DGGE analysis was performed. Results showed that the length of stem and roots showed the maximum growth at 48h electromagnetic field stimulation group (113.36±0.16 mm and 93.53±1.97 mm, respectively). IAA concentrations were observed as the minimum concentration at 48h electromagnetic field stimulation group (3.24±0.47 mg/L). DGGE results indicated that the application of magnetic field stimulation induced different bacterial rhizosphere. Our study demonstrated that the application of electromagnetic field for plant germination could be used as a convenient, inexpensive plant growth promoting system.

Effect of electromagnetic field on plant growth and microbial rhizosphere

○Jeong Wook Jo, Ju Yeon Lee, Sung Woo Yang, Seung Jun Kim, Hak Jin Song, Yong Keun Choi, Hyung Joo Kim
 (Dept. of Biological Engineering, Konkuk Univ.)

Key words Plant, Plant Hormone, Microbial Rhizosphere, Magnetic Fields

3F04-05 ソホロスリビッドを用いたウルトラファインバブル発生技術の開発

○謝花 喜史, 小守 啓友, 脇坂 都, 尾田 友香, 平田 善彦
 (サラヤ)
 jahana@saraya.com

直径が 1 μ m 未満の気泡であるウルトラファインバブルは、洗浄、農業、水産業および美容などの幅広い分野で活用されている。通常、ウルトラファインバブルは発生装置を用いて圧力の制御や機械的せん断を行うことで生成される。これまで発生装置を用いずに製剤でウルトラファインバブルを発生させる技術はなかった。そこで、発生装置を使用することなく、製剤を水に溶解するだけでウルトラファインバブルを生成させる技術の開発を試みた。ウルトラファインバブル発生製剤に求められる条件として、安定な(一定時間粒子径が保たれ、溶液中に保持される)ウルトラファインバブルを生成できること、安全性の高い成分から成ることがあげられる。炭酸塩と酸を組合せ水に溶解すると気泡が発生するが、それはマイクロバブル、ミリバブルと言われるものであり、浮力により水面上昇して破裂する。このことから、発生した気泡が合一化する前に界面活性剤で安定化させることが有効であると考へ、バイオサーファクタントの一種で高い安全性を有するソホロスリビッドを含む各種界面活性剤を用いてウルトラファインバブル発生技術の検討を行った。

炭酸塩に各種界面活性剤を添加し、混合することでウルトラファインバブル発生剤を調製した。これを水に溶解させ、動的光散乱法により、溶液中の気泡の粒子径とその分布を測定した。その結果、評価した界面活性剤の中でソホロスリビッドのみがウルトラファインバブルを生成することが明らかになった。

Development of ultra fine bubble generating technology using sophorose lipid

○Yoshifumi Jahana, Hiroto Komori, Miyako Wakizaka, Yuka Oda, Yoshihiko Hirata
 (Saraya Co., Ltd.)

Key words biosurfactant

3F04-06 ウルトラファインバブルと超音波を組み合わせた水中のウイルス不活性化

○中野 一成¹, 仁宮 一章²
 (¹金沢大院・自科,²金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】超音波を液中に照射すると、液中の気泡が数 μm ~100 μm 程度に圧縮・膨張を繰り返すなかで、気泡がはじけ、「衝撃波」や「局所的な高温高圧場」が生じる。これを超音波キャビテーションという。この際「衝撃波による物理的作用」、「局所的な高温高圧場における水の熱分解で生じるOHラジカルによる化学的作用」が生じる。一方、近年、10~100 nmサイズの微細な気泡であるウルトラファインバブルが注目を集めている。我々はこれまで、ウルトラファインバブルと超音波の組み合わせにより、上述の物理的作用や化学的作用が相乗的に増大することを示してきた。そこで本研究では、ウルトラファインバブルと超音波の組み合わせにより、水中のウイルスの不活性化を効果的にできるか検討した。

【方法および結果】モデルウイルスとして、大腸菌に感染するバクテリオファージ (*Bacteriophage MS2*) を用いた。ウルトラファインバブル水の調整は、旋回流流出式ウルトラファインバブル製造装置を用い、ウルトラファインバブルの粒径分布および濃度は、Nano Tracking Analysis 法により測定した。超音波照射はソニリアクターを用い、照射強度については、カロリメトリ法を用いて評価・設定した。ファージ粒子をウルトラファインバブル水に懸濁し、超音波照射を30分間行った。ウイルスの残存率の評価には、大腸菌を用いたブラックカウントを行った。その結果、処理開始時に対するウイルスの残存率は、ウルトラファインバブルのみの場合、超音波処理のみの場合、ウルトラファインバブルと超音波を組み合わせた場合について、それぞれ、100%、48%、1.6%であった。以上、ウルトラファインバブルと超音波を組み合わせることで、水中のウイルスを相乗的に不活性化できることが分かった。

Inactivation of phage virus in water by combined use of ultrafinebubble and ultrasound

○Nakano Issei¹, Ninomiya Kazuaki²
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words phage virus, nanobubble, ultrasound

3F04-07 ITO 電極システムを活用した微生物培養法の機構解析とその利用

○小鷹 健太¹, 小山 純弘², 青柳 秀紀^{1,3}
 (¹筑波大院・生物資源科学学位P,²エイブル株式会社,³筑波大・生命環境系)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】近年、従来の微生物培養法では、自然界に存在する全微生物のうち1%程度しか培養できないことが示唆され、残された99%の未培養微生物の培養に繋がる新たな方法論が求められている。我々は酸化インジウムスズ (ITO) 電極システムを活用した微生物培養法 (分離・選抜・培養) システムを開発することで、環境中から複数の未培養微生物を獲得してきた¹⁾。しかしながら、本システムによる未培養微生物の培養機構は十分に明らかにされていない。そこで、本研究では、本システムにより環境試料から単離培養した細菌を用いて電位印加に対する感受性などを評価し、未培養微生物の培養機構の解析を行うと共に、本システムの活用を試みた。

【方法と結果】ITO 電極システムにより単離培養した *Herbiconiux* 属と推定される細菌 PA-3 株を、R2A 液体培地で培養後、培地成分を PBS に置換し ITO 電極 (作用電極)、白金電極 (対電極)、銀塩化銀電極 (参照電極) から構成されるシャレ型3電極システムに充填した。作用極に定電位 (-0.4 V) を印加し、PA-3 株を ITO 電極上に付着後、新たに滅菌 PBS を加え高周波電位 (± 20 mV, 12 MHz) を印加して電極上から PA-3 株を剥離し、回収した。電極上から回収した菌体懸濁液を R2A 寒天平板培地に播種し、PA-3 株の生菌数を調べた結果、定電位を印加していない電極上と比較して生菌数が有意に増加した。一方、系全体 (懸濁液中の浮遊菌と電極に付着した菌の合計) の生菌数に有意差はなく、PA-3 株では定電位印加によるコロニー形成の促進、菌体の死滅等は認められなかった。以上の結果は、本システムにより PA-3 株を懸濁液から電極上に集め、回収できる可能性を示唆している。現在、菌種による定電位印加に対する感受性の違いと本システムの活用について検討中である。(1) R3 日本生物工学会要旨 p. 199.

Analysis of the mechanism for the cultivation of microbes using the ITO electrode system and its application

○Kenta Odaka¹, Sumihiro Koyama², Hideki Aoyagi^{1,3}
 (¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²ABLE Co., Ltd., ³Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words electrical pretreatment, ITO electrode, microbial dark matter, screening

3F04-08 ゲルマイクロドロプレット (GMD) 凝集培養法を用いた難培養性細菌の新規分離培養法

○下村 有美, 鈴木 陸太, Martinez Joval, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 謙輝
 (広島大院・統合生命科学)
 yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

環境細菌の多くは未培養・難培養であるため、それらを可培養化する新しい培養手法の開発が求められている。本研究では微小ゲル粒子 (GMD: Gel Micro-Droplet) 凝集培養法という、高密度でありながら純粋培養の維持ができ、かつ微生物間相互作用の保持も期待できる培養系を用いて、未培養・難培養微生物の可培養化と、Cell Sorter による GMD の分取を組み合わせた分離取得法の確立を行った。本手法は、微生物間相互作用を促進することが多くの難培養性微生物の培養の鍵になるという考えに基づいて開発された新規培養手法である。森林土壌より抽出した微生物細胞を含む GMD を作成し、ミネラルオイル中で GMD を凝集させた状態で攪拌培養した (凝集培養)。GMD は経時的にサンプリングし、細菌の可培養化率の計測と菌叢解析を行った。また、培養 14 日目のコロニーが形成された GMD を Cell Sorter で分取して二次培養を行った後、分離培養を試みた。対象試験として標準寒天平板法 (SDP: Standard Direct Plating) を行ったところ、SDP のコロニー形成率は 0.5%~5%であるのに対し、GMD 培養では 45%~50%に達した。GMD の菌叢は、すべての期間において易培養性の *Proteobacteria* が優占していたが、培養日数が進むにつれて難培養性細菌の *Verrucomicrobia* や *Planctomycetes*、難培養性寄生性細菌の *Bdellovibrionota*、そして捕食性細菌の *Myxococcata* などの相対存在率の増加が見られた。SDP と GMD の分離株は、殆どが *Proteobacteria* であったが、GMD 培養では難培養性の *Verrucomicrobia*, *Bdellovibrionota*, *Gemmatimonadetes* に属する細菌が単離された。GMD 凝集培養では難培養性、寄生性、捕食性細菌の増殖が見られたことから、本培養系は微生物間相互作用による難培養性細菌の増殖促進効果を示すことが示唆された。本研究の成果は、NEDO 助成事業の結果得られた。

Construction of a method for isolating uncultured bacteria using gel-micro droplet (GMD) aggregate culture method.

○Yumi Shimomura, Rikuta Suzuki, Joval Martinez, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Yoshiteru Aoi
 (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words gel-micro droplet, uncultured bacteria, isolation

3F04-09 振盪フラスコ培養の換気能を増大させる新規デバイスの開発

○高橋 将人, 青柳 秀紀
 (筑波大・生命環境系)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】我々は、ラボスケールで幅広く使用されている振盪フラスコ培養中のサンプリング操作や微生物呼吸によって、初発のフラスコ気相環境を維持できないことを明らかにした。また、振盪を中断することなくサンプリングできるシステムや二酸化炭素 (CO₂) および酸素 (O₂) 濃度をモニタリングできる技術を開発し、O₂ に限らず CO₂ を含めたフラスコ気相部のガス環境は培地と同様に重要な培養因子であることを明らかにしてきた。非意図的なフラスコ気相部のガス濃度の変動が微生物に及ぼす影響を最小限にするためには、振盪フラスコ培養中の培養器の換気能を増大させ、ガス濃度の変動を抑制する必要がある。そこで、従来の振盪フラスコ条件下で機能する新規デバイスの開発を試みた。

【方法と結果】独自のモニタリングデバイス (Circulation Direct Monitoring and Sampling System: CDMSS) を用いて、通気性のある培養栓付きフラスコの換気能を評価した。フラスコ内に CO₂ を充填させた後、培養栓を介して CO₂ がフラスコ外へ自然換気され、充填していた濃度 (新鮮空気 CO₂ 濃度を考慮) が半減するまでに要する時間を CO₂ 半減期と定義し、換気能の指標とした。また、開発した Nonelectric bellows pump for shake-flask (NeBP-sf) は振盪フラスコへ外付けするデバイスであり、原動力は振盪基盤の運動エネルギーに由来するため、従来の水平方向の振盪条件に適用できた。プラグ型の通気性のある培養栓付き三角フラスコ (NeBP-sf 未付与) の CO₂ 半減期が約 45 分であったのに対して、NeBP-sf を付与すると約 10 分に短縮でき、微生物培養中に生じるフラスコ気相部の非意図的なガス変動を抑制できた。従って、独自に開発したデバイスは、追加電力を要さず利便性が高く、培養器の換気能を増大できるため、これまで困難であった振盪フラスコ培養の気相制御が可能となった。

Development of novel enhancer of ventilation capacity for shake-flask culture

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi
 (Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words carbon dioxide, headspace, shake-flask culture, ventilation capacity

3F04-10 微生物培養におけるフラスコスケールの液滴型流加システムの開発

○加藤 拓也¹, 高橋 将人², 青柳 秀紀^{1,2}
 (¹筑波大院・生物資源科学学位P, ²筑波大・生命環境系)
 aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】一般的に、バイオプロセス開発の下流では流加培養により高効率な物質生産が行われるが、上流ではフラスコスケールの回分培養が使用されることが多い。そのため、培養様式の違いにより、円滑なプロセス開発が妨げられる要素が潜在する。実際に、回分培養では、流加培養で高いポテンシャルを示す菌体が排除される可能性が報告されており、フラスコスケールの流加培養が求められている。従来のフラスコスケールでの液滴型流加システムは、1) 培養栓が制限される、2) サンプリングが困難で培養経過が把握できない、という課題があった。本研究では、これらの課題を克服でき、簡便に導入できる液滴型流加システムを構築し、*Saccharomyces cerevisiae*の振盪培養に実装した。

【方法・結果】構築した流加システムの性能評価を目的として、グルコース無添加のYPD培地(50 mL)を含む300 mL容三角フラスコに、流加システムでグルコース溶液(500 g/L)を、比増殖速度 $\mu = 0.2$ (h⁻¹)、菌体収率 $Y_{XS} = 0.5$ (g-dry cell/g-glucose)を維持するように、指数流加培養の式に基き添加し、流加培養を行った。また、コントロールとして同量のグルコース(40 g/L)を含むYPD培地を用いて回分培養を行った。独自のサンプリングユニットを用いて振盪を中断せずに培養液を採取し²⁾、オフラインで種々の培養因子を測定し、 μ と Y_{XS} を算出した。構築したシステムで流加培養を行った結果、培養期間全体を通じた概算値は $\mu = 0.22$ (h⁻¹)、 $Y_{XS} = 0.52$ (g-dry cell/g-glucose)を示し、設計通りの流加培養が実現でき、本システムの有用性が示された。現在、本システムの使用範囲を明らかにするために、他の培地や菌株について検討中である。

1) Scheidle *et al.*, *FEMS Yeast Res.*, 10, 83-92 (2009).

2) Takahashi *et al.*, *Sci. Rep.*, 10, 10385 (2020).

Development of a droplet based fed-batch system for microbial cultivation at flask scale

○Takuya Kato¹, Masato Takahashi², Hideki Aoyagi^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bioprocess development, fed-batch culture, *Saccharomyces cerevisiae*, shake-flask

3F04-11 エマルジョン化固定化技術を用いたハロカテコールの生産

○高橋 風, 汲田 幹夫, 滝口 昇
 (金沢大院・自科)
 tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

バイオプロセスにおける疎水性物質生産では、基質および生産物の疎水性から来る生物毒性の軽減が必要となる。二相培養システムおよび固定化菌体はいずれも生物毒性軽減に有効である。また、この二つを組合せることでさらなる効果の向上が期待されるが、固定化操作の煩雑さが問題となる。本研究では、有機溶媒耐性菌 *Pseudomonas putida* T-57Δ^{tdE} ex 株 (ex 株) による3-フルオロカテコール (3FC) の二相培養生産系にエマルジョン固定化技術 (エマルジョン法) を適用することで、短時間での固定化後、そのまま二相培養へ移行するプロセスの開発を試みた。

エマルジョン法では、菌体を懸濁したゲル化剤が有機溶媒に分散するまで比較的高温状態で保持する必要がある。そこでまず、固定化に用いる ex 株の固定化時のダメージについて評価を行った。続いて固定化および3FC生産に適する有機溶媒の選択と、固定化条件の検討を行った。菌体増殖、3FC生産とともに、固定化時の高温曝露による負の影響は見られず、エマルジョン固定化技術での固定化菌体作製時の初期温度は45°Cに設定することが可能であることが示唆された。用いる有機溶媒については、1-ドデカノールで3FC生産量が最も多く、続いてBES、フタル酸ジメチルの順で多かった。また、生菌数あたりの最大3FC生産量は1-ドデカノールとBESで同等であった。1-ドデカノールは凝固点が高く、エマルジョン法による固定化の際に扱いが難しいため、BESを適切な有機溶媒として選定した。一方、固定化時にゲル中に基質を含有させることで3FC生産量が増加したことから、固定化菌体内への基質の供給が生産量に影響を及ぼすことが示唆された。

Production of halo catechol by emulsion immobilized cell

○Nagi Takahashi, Mikio Kumita, Noboru Takiguchi
 (Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

Key words immobilized cell, emulsion

3F04-12 低温菌シンプル酵素触媒の熱処理による細胞構造への影響

○穴田 康太, 田島 晋久, 緋田 安希子, 加藤 純一
 (広島大院・統合生命科学)
 ttajima@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】

微生物による化学品生産は、反応条件や反応の特異性から化学合成より環境負荷を低減した物質変換に期待がもたれている。我々の研究室では低温菌を活用したシンプル酵素触媒という新たな手法で酵素変換を簡便に行うプロセス構築を進めている。低温菌シンプル酵素触媒は、中温性酵素を発現させた低温菌を中温で熱処理することで低温菌代謝を失活し、副産物フリーで効率的な物質生産を可能にする。熱処理で基質の膜透過性も向上するが、変換酵素の細胞外漏出が懸念される。

そこで本研究では低温菌シンプル酵素触媒を持続的に利用するため、熱処理による低温菌細胞構造への影響やタンパク質サイズと漏出の関係を解析し、変換酵素の細胞外漏出を抑制するための知見を得ることを目的とした。

【方法と結果】

熱処理による発現タンパク質の挙動を追跡するため、低温性 *Shewanella* 属細菌2株を用い、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現株と分子量の異なるタンパク質(CAD, LacZ)とGFPを融合したタンパク質発現株を構築した。それら発現株の細胞懸濁液を熱処理し、遠心分離によって細胞と上清を分離した。細胞構造を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、上清の蛍光強度とともにタンパク質漏出を評価した。

熱処理の有無による上清の蛍光強度の測定から、熱処理によるGFPの漏出が確認された。TEM観察において熱処理サンプルでのみ細胞膜に約30 nmの突出部分が観察されたため、その部分で細胞内容物が漏出したと考えられる。また、上清の超遠心分離により低温菌から分離した膜小胞を回収したが、膜小胞でのGFP蛍光は観察されなかった。分子量の異なる融合タンパク質発現株においてタンパク質漏出を比較したところ、分子量が大きいほど漏出は低下した。以上より、低温菌は熱処理により細胞膜に間隙が生じ、そのサイズによりタンパク質漏出が起きたと考えられる。

Effects of heat treatment on cell structure of psychrophile-based simple biocatalyst

○Anada Kota, Tajima Takahisa, Hida Akiko, Kato Junichi
 (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words psychrophile, heat treatment, membrane permeability

3G01-01 魚血液由来する栓球の溶解物を用いたCHO細胞の接着培養

○藤原 政司^{1,2}, 猪股 亮佑¹, 森島 輝³, 塩谷 格³, 山原 研一⁴, 高木 睦^{1,2}
 (¹北大院・総合化学,²北大院・工,³日本水産,⁴兵庫医大)
 fujiwara@eng.hokudai.ac.jp

【目的】ヒト血液やウシ血液の血小板を融解処理した血小板溶解物に動物細胞の高い増殖促進効果が確認されている。一方、魚類の血液には血小板ではなく、血小板と同様な止血作用をもつ栓球が含まれている。そこで、ブリ血液からFicoll-Hypaque遠心(FH遠心)と全血遠心で栓球溶解物(TL: Thrombocyte lysate)を調製し、10%ウシ新生仔血清(NBS)培地で接着してから両TLを用いてCHO細胞の接着培養をした結果、全血遠心の方が細胞増殖を促進した。そこで、全血遠心で得た栓球の溶解物によるCHO接着培養の増殖促進効果について検討することを本研究の目的とした。

【方法】抗凝固処理したブリ血液から全血遠心(184 g, 15 min)により栓球を含む画分を取得した。この画分を凍結融解(-80°C, 37°C)を繰り返しTLを調製した。一方、全血遠心画分をさらに遠心(1660 g, 10 min)し、栓球が含まれる沈殿と血漿成分からなる上清に分離し、凍結融解処理した(TL(栓球)と血漿凍結融解物)。次に、Ham's F-12培地(無血清培地)に各種TLを添加した培地を用いてCHO細胞DP-12 clone#1934(ATCC CRL-12445)を接着培養した。コントロール培養は無血清培地および10%NBS培地を用いた。細胞数を脱核染色法で計数した。

【結果と考察】これまでTL(全血遠心)培地は細胞接着後に用いると細胞密度が高かった。そこで、播種時からTL(全血遠心)培地で培養したところ、CHO細胞が接着しなかった。そのため、全血遠心で取得した画分を栓球と血漿に分離し、凍結融解処理した後、播種時から培地に添加してCHO細胞接着培養を行った。その結果、血漿凍結融解物では細胞密度が最大でも10%NBS培地の26%だったのに対し、TL(栓球)では最大で10%NBS培地の59%の細胞密度に達した。この要因としては増殖を阻害すると推測される魚脂質が、TL(栓球)には含まれていないことが考えられた。

Adhesive culture of CHO cells with thrombocyte lysate derived from fish blood

○Fujiwara Masashi^{1,2}, Inomata Ryosuke¹, Morishima Kagayaki³, Shioya Itaru³, Yamahara Ken-ichi⁴, Takagi Mutsumi^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ³Nippon Suisan Kaisha, Ltd., ⁴Hyogo Coll. Med. Univ.)

Key words fish blood, Chinese hamster ovary cell, thrombocyte

3G01-02 間葉系前駆細胞を含む in vitro 骨格筋組織モデルの構築と特性評価

○高瀬 智也¹, 秋山 裕和¹, 深田 宗一郎², 上住 聡芳³, 本多 裕之¹, 清水 一憲¹

(¹名大院・工, ²阪大院・薬, ³徳大院・医歯薬)

shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】 骨格筋は人体最大の臓器であり、全身の恒常性の維持に不可欠である。筋繊維や筋サテライト細胞などの筋細胞のほか、骨格筋には様々な非筋細胞が含まれる。間葉系前駆細胞は筋間質に存在する非筋細胞である。最近の研究により、間葉系前駆細胞は、筋の脂肪化や線維化を引き起こしたりする一方で、筋維持機構や筋力発揮に重要な役割を持つことが明らかになった。我々はこれまで、収縮力測定可能な三次元筋組織モデルを開発してきた[1-4]。しかし、筋細胞のみで構築される従来の筋組織モデルは、非筋細胞である間葉系前駆細胞が関与する筋機能や疾患のモデルとして用いることができない。そこで本研究では、生体内における間葉系前駆細胞の機能の再現を目指し、間葉系前駆細胞を含む三次元筋組織モデルの構築を行った。

【方法と結果】 マウスから採取した筋サテライト細胞と筋間質由来間葉系前駆細胞 (PDGFR α 陽性) を用いた。それぞれの細胞を 1:1 と 1:2 の割合で混合した筋組織と、筋サテライト細胞のみからなる筋組織を、マイクロデバイス上に構築した。収縮力を測定した結果、筋サテライト細胞のみの組織に比べ、間葉系前駆細胞を混合した組織は大きな収縮力を示した (分化培養 4 日目に 1:1 の組織は 2.4 倍、1:2 の組織は 2.3 倍)。また、免疫染色の結果、間葉系前駆細胞を混合した組織では、明瞭なサルコメア構造を持つ長い筋管細胞が多数観察された。これらの結果から、間葉系前駆細胞を混合することで、筋組織内の筋細胞の分化や成熟が促進することが示唆された。

[1] Shimizu, K., *et al.*, *Bioengineering*, 4, 56 (2017), [2] Nagashima, T., *et al.*, *Adv. Biosyst.*, 4, 2000121 (2020), [3] Shimizu, K., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 129, 632-637 (2020), [4] Yamamoto, K., *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 119, 2196-2205 (2022)

Development and characterization of an in vitro skeletal muscle tissue model containing mesenchymal progenitor cells

○Tomoya Takase¹, Hirokazu Akiyama¹, Souichirou Fukuda², Akiyoshi Uezumi³, Hiroyuki Honda¹, Kazunori Shimizu¹

(¹Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ.)

Key words tissue engineering, coculture, mesenchymal stem cell

3G01-03 高品質セルバンク構築のための細胞画像を用いた超早期細胞品質評価

○竹本 悠人¹, 陶山 隆史², 今井 祐太¹, 蟹江 慧¹, 松崎 有未^{2,3}, 加藤 竜司^{1,4}

(¹名大院・創薬, ²PuREC, ³島根大・医, ⁴名大・ナノライフシステム研究所)

kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) は、その分化能や免疫制御能などから再生医療における治療用細胞源として期待されている。さらに近年、MSC は他家細胞治療への応用も承認され、安定かつ安価な治療用細胞として大量製造と品質管理のための技術確立が急務となっている。Rapidly expanding clones (RECs) は骨髄由来 MSC のシングルセルから取得される超高純度 MSC であり、10 継代以上も高い増殖能を維持可能な培養性能、骨などへの高い分化能など、他家治療用細胞として極めて有望である。しかし、他家の治療用細胞を製造するためには、十分な細胞数・バイアル数を提供可能なセルバンクを効率的に構築することが必須である。さらに、セルバンクの構築には極めて大きなコストがかかるため、ドナーセレクトの段階から高品質なロット、かつ、セルバンクを確実に構築できる将来的な培養維持性能の理解が必要とされる。ところが、現在、このようなセルバンク構築の超初期段階 (ドナーセレクト後の拡大培養の初期) に、将来的な継続培養性能の可能性や、その後培養した細胞の品質の予測を定量的に行える技術は存在していない。この結果、マスターセルバンク構築のためのロットやクローンの「品質予測に基づいた選抜」は現状不可能であり、保険的に大量の候補ロット・クローンの培養・維持がセルバンク構築における大きなコスト問題として現場を圧迫している。本研究では、REC を用いたセルバンク品質管理の効率化技術として、細胞形態情報解析技術を用いて、培養中の細胞の初期段階の画像情報のみから、将来的な継続培養性能を超早期に定量予測する技術を開発したのでこれを報告する。

Super early cell quality evaluation image analysis for establishing high quality cell bank

○Yuto Takemoto¹, Takashi Suyama², Yuta Imai¹, Kei Kanie¹, Yumi Matsuzaki^{2,3}, Ryuji Kato^{1,4}

(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²PuREC Co., Ltd., ³Fac. of Med., Shimane Univ., ⁴Inst. Nano-life Science, Nagoya Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, Image analysis, Machine learning

3G01-04 近赤外光イメージング解析によるフェロイド品質モニタリングの可能性

○加藤 竜司^{1,2}, 林 咲希¹, 永井 美希¹, 蟹江 慧¹, 五十嵐 陽子³, 本村 麻子³, 菅沼 寛³

(¹名大院・創薬, ²名大・ナノライフシステム研究所, ³住友電工)

kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

スフェロイドとは、細胞同士が集合して出来る凝集塊であり、3 次元培養されたスフェロイドでは、細胞間や細胞と細胞外マトリックス間の相互作用や、組織内での酸素・栄養素の濃度勾配などが表現され、従来の 2 次元培養法と比較して生体組織に近い生体機能の模倣が実現されることが知られる。このため、スフェロイドは、創薬分野における in vitro ヒト細胞モデルや、再生医療分野における治療用組織医薬品など、様々な分野で応用が期待されている。しかし、従来の 2 次元培養に比べて 3 次元培養は現状の培養テクノロジーでは制御が難しく、スフェロイドの品質には大きな実験的バラツキが含まれ、再現性・同等性の獲得がスフェロイド応用における最大のボトルネックとなっている。このため、スフェロイドを用いた創薬・医療共に、より高度に品質管理されたスフェロイド製造が今後必須となるが、従来の侵襲的評価技術は品質管理に用いることができない。我々はこれまで画像解析を用いた細胞品質管理技術を多数報告してきたが、一般的な顕微鏡撮影画像では 3 次元的に構築されたスフェロイドからは多くの特徴量を抽出することが難しいことがわかってきた。このため、従来の可視光画像では評価できなかったスフェロイド内部の変化特徴量の抽出に向け、我々は近赤外光イメージング解析を用いたスフェロイドの非破壊評価技術の開発を行っている。本研究では、開発した近赤外光を用いたイメージング解析技術の特徴や安定かつロバストな解析技術を用いて、培養中のスフェロイド品質モニタリングの有効性について報告する。

In process monitoring of spheroid quality using near-infrared imaging analysis

○Ryuji Kato^{1,2}, Saki Hayashi¹, Miki Nagai¹, Kei Kanie¹, Yoko Igarashi³, Asako Motomura³, Hiroshi Suganuma³

(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²Nano-life System, ³Sumitomo Electric)

Key words 3D culture, cell, production

3G01-05 CHO-K1 細胞株を用いた SARS-CoV-2 ウイルス様粒子の生産

○保木本 達也, Nguyen Bich Thao, 金井 貴蓉, 山野-足立 範子, 大政 健史

(阪大院・工)

omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

COVID-19 は現在、世界中で猛威を振るっており、終息を目指して様々なワクチン開発が行われている。本研究では、組換えタンパク質ワクチンの一種である VLP (virus-like particle) ワクチンに注目した。VLP はウイルスの外部構造を模倣しているため、効果的な免疫応答が期待されており、さらにウイルスの遺伝情報を欠いているため感染力を保持しない。本研究では、VLP の生産宿主としてチャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) 細胞を用いた SARS-CoV-2-VLP の生産系構築を試みた。

まず、対象ウイルスを構成しているタンパク質 Spike (S), Nucleocapsid (N), Membrane (M), Envelope (E) を発現させるため、二種のプラスミドからなる発現ベクター系 (pBudCE4.1-S-N ならびに pE2-M-E) を構築した。次に、構築した二種のベクターのうち pBudCE4.1-S-N を無血清馴化 CHO-K1 株にトランスフェクションすることで S, N を恒常的に発現する細胞株 (CHO-S-N) を構築した後に、この細胞株に pE2-M-E をトランスフェクションすることによって、VLP 生産細胞株 (CHO-SARS-CoV-2-VLP) を構築した。

構築した細胞株である CHO-SARS-CoV-2-VLP について、144 時間の回分培養を行い、培養終了時の細胞培養上清を、ウェスタンブロッティングを用いて発現解析を行った結果、推定分子量付近において、全ての構造タンパク質 (S, N, M, E) の発現をそれぞれ確認することができた。したがって、SARS-CoV-2 の VLP を恒常的に発現する CHO 細胞株が構築されたと推定された。一方、CHO-S-N と比較して CHO-SARS-CoV-2-VLP における Spike 蛋白質の発現量が著しく低下しており、今後、走査型電子顕微鏡による粒子形成の確認とともに発現系の改良が必要であると考えられる。

SARS-CoV-2 virus-like particle production in CHO-K1 cell line

○Tatsuya Hokimoto, Bich Thao Nguyen, Guirong Kanai, Noriko Yamano-Adachi, Takeshi Omasa

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

Key words Chinese hamster ovary cell, Virus-like-particle, SARS-CoV-2, Vaccine

3G01-06 保存培地の pH がヒト iPS 細胞の新規非凍結保存安定性に及ぼす影響

○佐藤 佑菜, 徐 卓然, 大貫 喜嗣, 田中 佑治, 黒澤 尋
(山梨大院・医工農)
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【背景】 ヒト iPS 細胞の保存方法として凍結保存が主に用いられている。しかし、凍結および解凍作業は細胞を損失するリスクを抱えている。加えて、解凍後の細胞は実験に使用できるよう馴化期間を設ける必要があり、一般的に 2, 3 継代の培養期間を設ける。これでは数日間の学会や週末などの休暇で細胞培養を中断した後すぐに実験を再開できない。そこで我々は凍結を必要としない新規非凍結保存法を提案する。先行研究ではポリオレフィン製プレートシールで well を密閉し、4°C で 3 日間冷蔵保存したヒト iPS 細胞が再培養後に増殖することが明らかとなっている。我々は、well をプレートシールで密閉することによって培地の pH が維持されたため、ヒト iPS 細胞の生存したと考えた。本研究では、プレートシールの pH 維持に対する有用性と、4°C 保存に適切な pH を検討した。【方法】 NutriStem hPSC XF にて無フィーダー培養したヒト iPS 細胞 (201B7, RIKEN BRC) を Vitronectin コートした 12-well plate に播種し、コンフルエントになるまで培養した。0, 1, 2, 3, 4, 5, 10% CO₂ インキュベーターで 24 時間程度ガス平衡した NutriStem で培地交換し、ポリオレフィン製プレートシールにて直ちに密閉した。4°C で 3 日間保管した後、プレートシールを剥がし、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて再培養した。【結果】 プレートシールで well を密閉することによって、培地の pH が維持されることが確認できた。また、0-5%および 10%炭酸ガス濃度環境下で培地を平衡化させることによって異なる pH の培地を作製し、4°C 保管した。その結果、CO₂ 濃度が 3, 4, 5, 10% (pH 7.4~7.7 付近) で細胞の生存が可能で、10% (pH 7.4) で最も多くの細胞が生存できることが示された。

Effect of pH of medium during non-freeze preservation on viability of human pluripotent stem cells

○Yuna Sato, Zhuoran Xu, Yushitsu Ohnuki, Yuji Tanaka, Hiroshi Kurosawa
(Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi)

Key words ヒト iPS 細胞, 非凍結保存, pH

3G01-07 ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲルの調製方法

森 英樹, 竹綱 椰々, 下釜 香枝, 原 正之
(大阪大院・理)
hara@omu.ac.jp

蛋白質のゼラチンは分子間の非共有結合架橋により熱可塑性のハイドロゲルを形成し、酸性多糖のアルギン酸は Ca²⁺ イオンを介して架橋したハイドロゲルを形成する。これらの天然高分子は、どちらも安全性が確認され、優れた生体適合性を持ち、食品素材や生体材料に多く使われている。ゲル化原理の異なるこれら天然高分子を組み合わせて、成型加工が容易で、ある程度の耐熱性を有する細胞培養用ゲルの作製を試みた。1-16%(w/v)の各濃度の Type A ゼラチン(G)、及び 1%(w/v)アルギン酸ナトリウム(A)を含む混合水溶液を 121°C 15 分の autoclave (AC) 処理で溶解し、円板形の穴 (直径 25 mm x 深さ 10 mm) を持つアルミ製の型枠に流し込んだ。18°C 24 時間、10°C 2 時間、4°C 24 時間と段階的に冷却した後、ゲルを取り出して 0.5 M CaCl₂ に 4°C にて 24h 浸漬し、Ca²⁺ 含む G/AC 混合ゲルを調製した。この G/AC 混合ゲルに再び 121°C 15 分の AC 処理を行うと、少し収縮してゼラチンの一部は溶出した。溶出ゼラチン量を定量し、0.5 M CaCl₂ 水溶液中で AC 処理前後のゲル体積の変化を求めた。またゲルの圧縮試験を行って得た応力ひずみ曲線より、弾性指標のヤング率を求めた。さらに、動的粘弾性測定を行い、各ゲルの貯蔵弾性率(G')と損失弾性率(G'')を求めた。また AC 処理後に G 濃度 1%~4% のゲルではヤング率は増加し、G 濃度 8%~16% のゲルでは逆に減少した。G 濃度 8%~16% のゲルは AC 処理時の物性や形状変化が比較的少なく、培養基材に適していると考えた。AC 処理後には G' の数値が上昇し、この数値は G/AC 混合ゲル内の架橋点密度と比例するので、AC 処理後にゲルの分子網目構造がひき締まった硬い状態になったと考えた。以上より、適切な混合比で作製した G/AC 混合ゲルは細胞培養基材に利用可能であると考えられる。

Gelatin/calcium alginate mixed hydrogel

Hideki Mori, Yaya Taketsuna, Kae Shimogama, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words alginate, gelation, collagen, scaffold

3G01-08 血管内皮細胞の接着・剥離挙動を利用した細胞転写培養ゲルの設計

○下釜 香枝, 森 英樹, 原 正之
(大阪大院・理)
hara@omu.ac.jp

【背景と目的】 コラーゲン分子の熱変性物であるゼラチンとアルギン酸を混合して作製されたゼラチン/アルギン酸カルシウム (G/AC) 混合ゲルは、鑄型を用いて成型できる加工特性和、高圧蒸気滅菌処理を加えても変形が少ない材料調製法が可能である。細胞培養基材として用いるには、G/AC 混合ゲルに対する細胞接着特性について不明な点が多く、細胞種に応じたゼラチン濃度やゲルの粘弾性を調整する必要がある。本研究では血管内皮細胞の G/AC 混合ゲルに対する接着・剥離特性を調べた。【方法】 ゼラチン濃度を変えた G/AC 混合ゲルを作製し、動的粘弾性の測定を行った。次に G/AC 混合ゲル上でマウス脳毛細血管内皮細胞 (bEnd.3) を 7 日間培養し、接着細胞数を測定した。剥離した原因を確かめるために MMP-2/MMP-9 阻害剤を添加した条件でも細胞培養を行い、接着細胞数を測定した。また、混合ゲルから他基材への細胞の転写実験を行った。さらに、凸部が多数並んだ凸型 G/AC 混合ゲルを作製し、bEnd.3 の培養を行った。【結果と考察】 培地浸漬後の G/AC 混合ゲルでは、ゼラチン濃度に関わらず類似した動的粘弾性を示した。G/AC 混合ゲル上で培養した bEnd.3 は、培養 3 日目までは接着・増殖が確認されたが、培養 3 日目以降に接着した細胞がゲルから剥離する様子が見られた。MMP-2/MMP-9 阻害剤を添加して培養すると、無添加の場合よりも剥離細胞数が抑えられた為、細胞の剥離はゼラチナーゼ活性を持つ MMP-2 或いは MMP-9 の作用と考えた。次に G/AC 混合ゲル細胞の剥離特性を活かした転写実験においては、2 週間の培養で約 90% の細胞が混合ゲルから他基材へ転写され、細胞転写基材として利用できる事を示した。凸型 G/AC 混合ゲル上に播種した細胞の多くは凹部に接着することが確認できたが、細胞接着パターン形成には至らなかった。今後は、G/AC 混合ゲルの形状を改良する必要がある。

Design of cell culture gels for cell transfer using adhesion and detachment behavior of brain capillary endothelial cells.

○Kae Shimogama, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words alginate, gelation, collagen, scaffold

3G01-09 光増感色素修飾ガラス基板を用いたラット間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導

○森 英樹, 柴田 了哉, 原 正之
(大阪大院・理)
morihide@omu.ac.jp

間葉系幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への多分化能を有した細胞であり、骨疾患の治療などに用いられている。培養によって生体外で間葉系幹細胞から骨分化を促すには、幾つかのデキサメタゾンなどの幾つかの添加剤を用いる必要がある。本研究では、光増感色素から発生する活性酸素による刺激によって、このような添加剤なしに骨分化が誘導されるかどうかを検討した。ラット骨髄に由来する間葉系幹細胞を、光増感色素であるヘマトポルフィリン (HP) を修飾したガラス基板上に播種し、10% ウシ胎仔血清と抗生物質を含む MEM 培地で培養した。一晚培養した後、電子制御により LED 光を 1 分間、5 回照射した。細胞膜過酸化脂質検出薬 Liperfluo を使用した蛍光顕微鏡観察により、照射後に細胞膜過酸化脂質の増加が確認された。また、細胞内活性酸素検出試薬 CM-H2DCFDA を使用した蛍光顕微鏡観察によって、照射後 1 時間後から細胞内の活性酸素種の発生が確認された。2 週間の培養後、未修飾の基板上で培養した細胞は骨分化は確認されなかったが、HP 修飾ガラス基板上で培養した細胞は照射の有無に関わらず骨芽細胞への分化、骨基質の形成を示すアリザリンレッドによる染色が確認できた。さらに、過酸化水素消去能がある PEG-カタラーゼを事前に添加することによって、骨芽細胞への分化は抑制された。このことから、HP 修飾ガラス基板による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、光増感色素から発生した活性酸素による刺激を受けて細胞内で発生した過酸化水素シグナルを介して生じたと考えられる。今後、照射のタイミングなどの改善により効率の良い骨分化誘導条件を検討する必要がある。

Osteoblastic differentiation of rat mesenchymal stem cells using photosensitizer-modified glass substrates

○Mori Hideki, Shibata Ryoya, Hara Masayuki
(Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, differentiation, reactive oxygen species, oxidative stress

3G01-10 Generation of recombinant CHO cells towards bio-engineered heparin and heparan sulfate production

○Razia Sultana^{1,2}, Yoshinori Kawabe¹, Kyosuke Akiyama³, Kosuke Sagawa¹, Masamichi Kamihira^{1,3}
(¹Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ., ²Dept. Biotechnol. Genet. Eng., Fac. Sci., Noakhali Sci. Technol. Univ., ³Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

Heparin, a highly sulfated glycosaminoglycan (sGAG), is considered as an indispensable anticoagulant drug used in medical settings. However, heparin source derived from pigs has provided the risk of world supply due to impurities of products and instability of supply. Here, we aimed to generate engineered Chinese hamster ovary (CHO) cell lines that produce heparin-like polysaccharides with elevated anticoagulant activities. Previously, bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2 (NDST2) and heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 1 (Hs3st1) genes were reported to be required for heparin-like polysaccharide production in CHO cells (CHO/NH). However, the products were produced on the cell surface as proteoglycans. Thus, we focused on a syndecan (SDC) as a secretory carrier. We constructed an expression vector encoding an extracellular domain of SDC. The vector was introduced into CHO/NH cells harboring NDST2 and Hs3st1 genes to generate CHO/NHS cells additionally expressing the extracellular domain of SDC. Heparin-like polysaccharides with anticoagulant activity were detected in culture supernatant of CHO/NHS cells. Next, we transfected each expression vector encoding 17 enzymes related to heparin synthesis into CHO/NHS cells to enhance the specific activity of heparin-like polysaccharides. By overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3 (Hs6st3) in CHO/NHS cells, the specific anticoagulant activity of heparin-like polysaccharides secreted into medium reached around 100 units/mg-sGAG.

Generation of recombinant CHO cells towards bio-engineered heparin and heparan sulfate production

○Razia Sultana^{1,2}, Yoshinori Kawabe¹, Kyosuke Akiyama³, Kosuke Sagawa¹, Masamichi Kamihira^{1,3}
(¹Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ., ²Dept. Biotechnol. Genet. Eng., Fac. Sci., Noakhali Sci. Technol. Univ., ³Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words Heparin, Heparan sulfate, CHO cells, Anticoagulant activity

3G01-11 Engineered functional and expandable hepatocytes derived from HepG2 cells

○Silas Habimana, Hiroyuki Kitano, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

Generating large numbers of functional hepatocytes is an important and unmet goal for cell-based approaches to liver disease and acute liver failure. Primary human hepatocytes (PHHs) are preferred for these approaches. However, the supply of PHHs is constrained by their compromised capacity to maintain functionality *in vitro* and the limited number of acceptable donors. Human hepatoma cells are easy to prepare in large quantities and can be maintained over a long period under standard culture conditions, but they possess a small fraction of essential hepatic functions and thus have finite usability. Previously, we established a human hepatoma cell line with inducible liver functions using HepG2 cells, in which eight liver-enriched transcription factor (*LETF*) genes were introduced as inducible expression units under control of the artificial transactivator. Here, we engineered heat-inducible hepatocytes (hiHeps) by forced expression of BRCA1 associated protein-1 (BAP1) and the human LETFs. Upon heat-shock at 43 °C for 30 minutes, hiHeps display characteristic morphology of cultured PHHs and enhanced liver functions such as ammonia removal, urea synthesis, albumin secretion and cytochrome P450 enzyme activity. Serum-free spheroid culture system and the addition of thyroid hormone T₃ significantly increase the liver functions and improve cellular survival after heat-shock. This work implicates the large-scale production of functional human hepatocytes for use in bioartificial liver devices and pharmacological studies.

Engineered functional and expandable hepatocytes derived from HepG2 cells

○Silas Habimana, Hiroyuki Kitano, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words liver functions, human hepatocytes, heat inducible, transcription factors

3G01-12 Evaluation of the effectiveness of an integrin stimulating molecule for cell inoculation inside a liver template

○Mario K. Uehara, Satoshi Doko, Lucija Stefan, Yusuke Sakai, Hiroyuki Ijima
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)
ijima@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

Tissue engineered recellularized liver (RCL) holds great promise for use as liver grafts and as drug testing systems. In a previous study, we developed a method to optimize the inoculation of hepatocytes into a decellularized liver (DCL) scaffold. However, we found that an efficient inoculation is not enough to achieve highly functional hepatocytes inside the RCL. During recellularization, hepatocytes face many challenges that might result in severe damage; one of such challenges is the loss of the cytoskeleton in the suspended state, which ultimately results in anoikis. For this reason, we hypothesized that the use of an integrin stimulating molecule could improve the outcomes of recellularization by promoting cytoskeleton reorganization in the hepatocytes. The proposed molecule was named PEG-GRGDS and consists of a polyethylene glycol chain (PEG) functionalized with the RGD cell adhesion sequence (GRGDS). Hepatocytes treated with PEG-GRGDS show higher F-actin levels than their untreated or simply RGD blocked counterparts, confirming that this molecule can promote the reorganization of the cytoskeleton. This in turn resulted in a maintenance of hepatocyte viability over extended periods of time. When inoculated into the DCL scaffold, the PEG-GRGDS treated hepatocytes also showed improved gene expression levels over their untreated counterparts. This unique approach offers a simple method to improve cell conditions during recellularization and can help close the gap between RCL technology and its implementation.

Evaluation of the effectiveness of an integrin stimulating molecule for cell inoculation inside a liver template

○Mario K. Uehara, Satoshi Doko, Lucija Stefan, Yusuke Sakai, Hiroyuki Ijima
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

Key words tissue engineering, liver, RGD Peptide, Recellularization

3G03-01 改変型受容体チロシンキナーゼによるシグナル伝達のリプログラミング

○河原 正浩¹, コンクローントーン タットポーン²
(¹医薬健康研, ²東大院・工)
m-kawahara@nibiohn.go.jp

【背景・目的】

細胞運命は特異的リガンドによる受容体の活性化、および引き続き生じる細胞内シグナル伝達により緻密に制御されている。この細胞内シグナル伝達特性を意のままに設計し制御できれば、細胞運命を緻密に制御するという観点での細胞治療プラットフォーム技術になりうる。そこで本研究では、キナーゼ活性を保持しつつ天然型のシグナル伝達能を欠損させた改変型受容体チロシンキナーゼを構築し、これに目的のシグナル伝達分子をリクルートするチロシンモチーフを組み込むことによってシグナル伝達特性を設計可能な人工受容体を構築した。

【実験方法・結果】

幹細胞因子受容体 (c-KIT) をエンジニアリングして、キナーゼ活性を保持したままシグナル伝達分子を結合する足場機能を欠損した改変型キナーゼドメインをデザインした。この改変型キナーゼドメインを小分子リガンド AP20187 応答性ドメインである FK506 結合タンパク質の変異体に連結し、さらに目的シグナル伝達分子を特異的にリクルートするチロシンモチーフに連結した人工受容体 (デザイナー c-KIT) を作製した。このデザイナー c-KIT を細胞で発現させた結果、小分子 AP20187 に応答して、連結した単独または複数のチロシンモチーフ特異的に目的シグナル伝達分子を単独または複数活性化することに成功した。この系を利用して、STAT1、STAT3、STAT5 を単独または 2 種類の組み合わせで活性化することのできる一連のデザイナー c-KIT を構築し、血球細胞株で増殖フェノタイプを解析した結果、STAT3、STAT5 は増殖促進効果があり相加的に作用するが、STAT1 は増殖促進効果を示さず、STAT3、STAT5 の増殖促進活性を阻害することを見出した。

Reprogramming signal transduction by a modified receptor tyrosine kinase

○Masahiro Kawahara¹, Tatphon Kongkrongtong²
(¹NIBIOHN, ²Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words receptor, tyrosine motif, signal transduction, chimeric protein

3G03-02 CHO 細胞における Sar1A 過剰発現の抗体生産性および分泌プロセスへ与える影響

○角田 悠¹, 山野・足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
(¹阪大院・工, ²阪大OTRI)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

CHO 細胞は抗体医薬品生産に汎用されている宿主細胞である。IgG 抗体生産 CHO 細胞内の分泌過程を解析した先行研究で、フォールディングやアセンブリが完了した抗体が小胞体内に蓄積していることが明らかにされ、抗体の小胞体からゴルジ体への輸送が律速段階と推定された¹⁾。抗体輸送は COPII 小胞によって行われ、COPII 小胞の形成は Sar1A の小胞体膜への結合により始まり、Sar1A に結合する GTP の加水分解によって COPII 小胞は小胞体膜から脱離する。そこで、Sar1A の発現量増加により COPII 小胞の形成が促進され、抗体輸送が促進されると仮定した。Sar1A 過剰発現ベクターを構築し、抗体生産 CHO 細胞にトランスフェクションし、安定発現株の選択を行った。Sar1A 過剰発現株と空ベクターを導入した Mock 細胞、それぞれのセルプールを用いて抗体生産性を解析した結果、過剰発現株において、抗体の比生産速度は約 1.5 倍上昇していた。一方、2 種類の細胞間で抗体の重鎖と軽鎖の mRNA 発現量に有意差はなく、比生産速度の上昇は小胞体での抗体輸送の律速解消によるものであると推定された。次に、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを用いてチェイスアッセイを行い、細胞内抗体の蓄積を解析した結果、シクロヘキシミド添加時の Sar1A 過剰発現株の細胞内抗体の量は Mock 細胞の約 40% であり、細胞内抗体の蓄積が解消したことが示唆された。さらに蛍光染色画像に基づき、抗体とゴルジ体の蛍光強度の相関係数を ImageJ により算出し、抗体の細胞内局在を定量的に解析した。過剰発現株は Mock 細胞と比較してゴルジ体に抗体が蓄積していると推定され、小胞体に蓄積した抗体が一部ゴルジ体へ移ったと考えられる。分泌された抗体の糖鎖修飾を解析した結果、Sar1A の過剰発現による影響は確認されなかった。

1) Kaneyoshi et al., J. Biosci. Bioeng., 127(1), 107-113 (2019).

Effects on antibody productivity and secretion process by overexpression of Sar1A in CHO cells

○Yu Tsunoda¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Takeshi Omasa^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words antibody, Chinese hamster ovary cell, COPII vesicle, endoplasmic reticulum

3G03-03 CHO 細胞を用いた組換え抗体生産に有効な高機能化因子の探索

○塚根 正義¹, 平田 結風², 天羽 宏枝¹
(¹徳島大院・社会産理工,²徳島大院・創成科学研究)
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景と目的】抗体医薬品の多くは CHO 細胞を用いて製造されている。生産対象の抗体分子や製造プロセスの特性に応じて、生産細胞の高度化や改変を目的としたセルエンジニアリング手法の開発が必要である。しかしながら高度化や改変に有用な遺伝子、即ち高機能化因子 (Production enhancer gene: PEG) を発掘、同定するには従来の手法では 6 ヶ月程度の時間と多大な実験量が必要である。そこで我々は CHO 細胞を対象とした PEG の迅速同定システムを開発し、その妥当性を検証した。

【方法】本システムでは IgG1 抗体生産 CHO 細胞にエピソード発現システムを導入した。即ち EBNA1 発現遺伝子を CHO 細胞染色体に組み込み、評価対象となる遺伝子発現用のプラスミドには oriP 配列を組み込むことで、導入プラスミドが細胞内で複製されながら細胞が増殖することが可能になる。評価対象の遺伝子配列を含む oriP 含有プラスミドを PEI で遺伝子導入し、バイオレジャー干渉法により抗体濃度測定を行った。抗体品質評価は HPLC 測定により実施した。

【結果と考察】PEG として機能することが既に報告されている 12 種類の遺伝子を評価した結果、必ずしも抗体生産能力が向上しない結果となり、PEG 探索における従来法の問題点が推察された。同時に過剰発現により抗体生産量が 20% 以上向上した遺伝子を 4 種類見出した。以上の結果より PEG 迅速同定システムを用いることで、少ない実験操作で 2 週間以内に PEG の評価、同定が可能であることが示された。さらに遺伝子の 1 つである MDH2 発現遺伝子を染色体に導入した安定発現細胞を構築した。プラスミド培養試験にて IgG1 生産量が 40% 程度向上し、同時に末端ガラクトシル化抗体成分が増加していた。以上より本システムで迅速同定した遺伝子は実際に PEG として作用することが示されたため、迅速同定システムは生産細胞の合理的な高度化に貢献すると期待される。

Exploring production enhancer genes (PEGs) for recombinant antibody production in CHO cells

○Onitsuka Masayoshi¹, Hirata Yuika², Amou Hiroe¹
(¹Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Tokushima Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, monoclonal antibody, production enhancer genes (PEGs)

3G03-04 高機能化因子を利用した組換え CHO 細胞の高度化

○福岡 奈々子¹, 山内 清司², 田地野 浩司², 塚根 正義³
(¹徳島大院・創成科学研究,²株式会社 chromocenter,³徳島大院・社会産理工)
onitsuka@tokushima-u.ac.jp

【背景・目的】CHO 細胞を宿主としたタンパク質医薬品生産において、組換え IgG1 抗体の生産能力向上を可能にする遺伝子である高機能化因子 (PEG) を導入する細胞育種法の有用性は既に示されている。しかし、従来技術では導入した PEG 発現配列が染色体上にランダムに組込まれるため発現量を制御できない、複数の PEG を組込むことが難しいという課題がある。本研究では、PEG を部位特異的に導入でき、搭載できる遺伝子サイズや個数に上限がないという特徴を持つ人工染色体を利用することで、タンパク質医薬品生産の高度化が可能な宿主細胞の開発を試みた。

【実験方法】本研究では、高機能化因子として PEG-X、PEG-Y の二種類を用いた。既に PEG-X が導入されている人工染色体を有した CHO 細胞 (IgG1 抗体生産) に PEG-X と加算的な効果を示す PEG-Y 発現遺伝子と組換え酵素 Cre リコンビナーゼ発現遺伝子を遺伝子導入し、人工染色体上への部位特異的かつ累積的な導入を試みた。遺伝子導入後、PEG-Y に対する薬剤選択マーカー G418 による細胞選別を行い、コロニーピッキングによりクローン細胞を樹立した。その後、ゲノム PCR とキャピラリー電気泳動により部位特異的導入と PEG-Y 発現を検証した。

【結果および考察】PEG-Y の遺伝子導入後、25 日後に G418 への耐性を持つ細胞がセレクションされた。このブール細胞からクローン細胞を 2 株樹立できた。複数のゲノム PCR 解析では適切な部位特異的導入を示す増幅バンドが確認でき、キャピラリー電気泳動では PEG-Y 導入後の細胞でのみ PEG-Y のタンパク質発現を示す分子量 190kDa のバンドが検出された。すなわち、人工染色体上に PEG-Y を部位特異的に導入することで、PEG-X と PEG-Y を同時に発現可能な人工染色体の作製に成功したと考えられる。人工染色体は PEG を集積できるため、本手法は有望な細胞開発法になると期待される。

Developing recombinant CHO cells with enhanced productivity using production enhancer genes (PEGs)

○Fukuma Nanako¹, Yamauchi Seiji², Tajino Koji², Onitsuka Masayoshi³
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Tokushima Univ., ²chromocenter Inc., ³Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, artificial chromosome vector, monoclonal antibody, production enhancer genes

3G03-05 阻害剤が作用した機械刺激応答がん浸潤関連チャネルに外力印加が与える影響

○長田 あかね¹, 山岸 彩奈^{1,2}, 中村 史^{1,2}
(¹農工大院・工,²産総研)
chikashi@cc.tuat.ac.jp

塩化物イオン (Cl⁻) チャネルの一種である Clc1 は、低浸透圧刺激による細胞の膨張時に Cl⁻ を排出し、それに伴い水分子の排出が誘導されることで細胞容積が減少する細胞容積調節機能に関与する。また、高浸透性のがん細胞株で高発現であることから Clc1 はがん浸透性に寄与すると考えられている。がん細胞の浸透過程では細胞や組織の隙間を通過する際にがん細胞が圧縮されると考えられるが、この時細胞膜が伸展し Cl⁻ を排出することで容積を減少させ、浸透を促進する機構があると推測した。実際に当研究室では、がん細胞に対して原子間力顕微鏡で外力を印加することで Cl⁻ が排出されることを見出した。さらに、高浸透性マウス乳がん細胞を用いて作成した Clc1 ノックアウト株において、外力印加時の Cl⁻ 排出能が低下し、浸透性・遊走性が低下したことから、Clc1 が細胞膜伸展により開口した時の Cl⁻ 排出を阻害することでがん浸透・遊走を抑制できると考えた。そこで本研究では Cl⁻ チャネルの阻害剤 IAA-94 を用いて外力印加時の膜伸展による同イオンの排出を阻害可能かどうか、またその際の浸透・遊走性に与える影響について調査した。

高浸透性マウス乳がん細胞に Cl⁻ と相互作用することで蛍光強度が減少する蛍光色素 (MQAE) を導入し、同時に IAA-94 を添加した。原子間力顕微鏡とフラットチップカンチレバーを用いて外力を印加し、MQAE 蛍光強度の経時変化から Cl⁻ 排出能を評価した結果、IAA-94 添加細胞の Cl⁻ 排出能は低下した。一方、印加外力を上昇させることで IAA-94 によるイオン排出の阻害効果が減少した。このことから過剰な細胞膜伸展が IAA-94 のチャネル阻害効果に影響を及ぼすと考えられる。現在、Clc1 の抗体を添加した際の Cl⁻ 排出能も評価しており、その結果についても報告する。

Effects of external force application on mechanical stimulus responsive cancer invasion-related channels acted with inhibitor

○Akane Nagata¹, Ayana Yamagishi^{1,2}, Chikashi Nakamura^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²AIST)

Key words chloride ion, chloride channel, cancer cell, mechanosensing

3G03-06 ケモインフォマティクスによる TRPA1 アゴニストにおける多様性の理解

○田中 健二郎¹, 寺田 祐子², 松山 南², 藤谷 将也¹, 澁谷 正俊¹, 山本 芳彦¹, 伊藤 圭祐², 加藤 竜司¹
(¹名大院・創薬, ²静県大院・薬食生命)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)は、化学物質や温度、酸などの刺激を受容する陽イオンチャネルであり、痛みや辛味の知覚、エネルギー代謝、ホルモン分泌、血管拡張などの様々な生理学的機能への関与が報告されている。TRPA1 アゴニストの探索は、鎮痛剤の開発や、肥満、糖尿病、アテローム性動脈硬化症などの治療に有用な知見を与えると考えられ精力的な探索が行われてきた。

しかし一方で、TRPA1 における作用機序の複雑性により、TRPA1 アゴニストの多くには副作用につながる未知の影響が懸念されてしまうという課題点がある。より安全かつ効果的な TRPA1 アゴニストの設計には、様々な構造的多様性に対する構造活性相関研究からの知見の集約が今後重要となる。本研究では、TRPA1 と化合物の相互作用データの多様性を分析・評価することで、TRPA1 アゴニストにおける作用機構の理解の向上を目指した。

我々の研究チームは、分子生物学的手法により画像ベースのハイスループット TRPA1 アッセイシステムを用いた機能性評価をより効率的に実施するため、ケモインフォマティクスな分析方法に基づき、対象とするケミカルライブラリに含まれる化合物の構造的多様性を定量化する事で、高効率で広範囲に TRPA1 アゴニストの探索方法の確立を行った。その結果、短行程で合成可能なケミカルライブラリの効率的アゴニスト活性評価を実現し、構造的多様性に富む TRPA1 アゴニストの発見に成功した。また、TRPA1 アゴニストとして未だ報告例のない化学構造を持つ分子の特定に至ったのでこれを報告する。

Investigation of TRPA1 agonist variation using chemo-informatics approach

○Kenjiro Tanaka¹, Yuko Terada², Minami Matsuyami², Masaya Fujitani¹, Masatoshi Shibuya¹, Yoshihiko Yamamoto¹, Keisuke Ito², Ryuji Kato¹
(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words TRPA1, agonist, chemical screening

3G03-07 骨再生を促進する短鎖ペプチド界面設計の網羅検証

○杉山 亜矢斗¹, 蟹江 慧¹, 加藤 竜司^{1,2}
(¹名大院・創薬, ²名大・ナノライフシステム研)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

組織工学・再生医療において、細胞培養足場材料における表面機能化は、標的とする細胞の制御を実現するための重要な技術である。近年メカノバイオロジー研究の発展によって、細胞は材料表面の物理化学的特性を感じ取ってその接着・増殖・遊走能を変化させる現象が理解されつつある。しかし、従来細胞接着機構として理解されてきたインテグリンを介した細胞接着機構に比べ、表面の物理化学的特性による細胞制御のメカニズムは、検証パラメータが多すぎるため未だ解明には至っていない。我々は物理化学的パラメータの複雑性を理解し材料表面改質へと応用するため、単純な短鎖ペプチドによる表面被覆技術を応用し、表面の物理化学的パラメータが細胞培養に及ぼす効果を網羅的に理解することを旨とした。

本研究では、実験自動化、画像処理、DOPA を用いたペプチド表面修飾技術を組み合わせて、細胞接着プロファイルを画像解析によるハイコンテンツアナリシスを導入することで効率的にコンビナトリアルな特性設計表面における細胞応答現象の定量化評価を行った。

ペプチド配列組み合わせによる 210 条件の特徴的な培養表面を検証した結果、細胞の接着を有意に促進するペプチド被覆条件を複数発見した。さらに、ペプチド被覆表面の物性値と細胞応答の関係性を解析した結果、表面の物理化学的制御によって効率的な細胞培養足場表面を設計できる可能性を示した。

Exhaustive investigation for understanding design of peptide-ambience for osteogenesis

○Ayato Sugiyama¹, Kei Kanie¹, Ryuji Kato^{1,2}
(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²Inst. Nano-life Sci., Nagoya Univ.)

Key words peptide, cell morphology, automation

3G03-08 線維芽細胞における継代ストレス応答の非破壊評価

○木村 和恵¹, 坂口 混基¹, 田中 健二郎¹, 蟹江 慧¹, 加藤 竜司^{1,2}
(¹名大院・創薬, ²名大・ナノライフシステム研究所)
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

線維芽細胞は、細胞外マトリクスの生産を担う間質細胞であり、生体組織に強度を与える効果を有する。このため、物理的強度が求められる組織の再生・構築に必須の細胞であり、再生医療等製品だけでなく、化粧品的人工皮膚モデル形成など、幅広く応用される可能性を秘めている。しかし、細胞を大量に培養する過程においては、継代に伴った老化現象などの品質変化が生じることが報告されている。こうした品質変化は、増殖能の低下など、製品としての機能が低下する恐れもある。しかし、線維芽細胞には、明確なマーカー分子がなく、品質を定量化することは難しい。そのため、製造過程における品質管理の技術開発が必要とされている。

我々の研究グループでは、近年急速に発展している機械学習や AI と、位相差画像から算出される細胞の形態情報を組み合わせた「非侵襲的な細胞品質評価技術」の研究開発を報告してきた。そこで、本研究では、線維芽細胞の継代に伴った発現プロファイルの解析と共に、本技術への応用についても検討を行った。本研究では、線維芽細胞の過継代に伴う品質変化の現象理解をするため、遺伝子解析と形態解析 2 つのアプローチにて、研究を行った。まず、3 ロットの線維芽細胞を 24 継代まで培養を行い、過継代線維芽細胞ライブラリを作製した。次に各継代の細胞画像を取得し、経時的な細胞形態変化・増殖能変化について解析を行い、品質の数値化を行った。また、5 つの継代について、発現プロファイル解析し、老化マーカーの変化について理解を深めることで、線維芽細胞における継代数に伴う老化マーカーと品質の変化を定量化した。さらに、細胞形態情報解析を用いた早期品質予測モデルの構築に成功した。

Non-invasive evaluation method for serial-passage stress response in fibroblasts

○Kazue Kimura¹, Koki Sakaguchi¹, Kenjiro Tanaka¹, Kei Kanie¹, Ryuji Kato^{1,2}
(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., ²Inst. Nano-life Science, Nagoya Univ.)

Key words cell, gene expression analysis, morphological change, tissue engineering

3G03-09 Cre 組換え酵素を用いたニワトリ始原生殖細胞への抗体遺伝子のノックイン

○金子 悠哉, 河邊 佳典, 上平 正道
(九大院・工)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

我々はこれまでにトランスジェニックニワトリ作製技術の開発を行い、組換え抗体などを卵中で生産するニワトリの作出を行ってきた。本研究では、精子や卵子といった生殖細胞に分化可能なニワトリ始原生殖細胞 (Primordial germ cells, PGCs) をゲノム操作で改変し、改変 PGC からのトランスジェニックニワトリ作製を目指す。まずは CRISPR/Cas9 と Cre-LoxP システムを組み合わせた方法で、PGC に対して抗体遺伝子のノックインを行った。

CRISPR/Cas9 によって PGC へ *loxP* 配列のノックインを行うため、RNA-seq データ等を用いて目的遺伝子の組込みに適したゲノム領域を決定した。標的ゲノム領域に対して gRNA を設計後、*loxP* 配列とマーカー遺伝子を有するドナーベクターを構築し、遺伝子導入試薬を用いて PGC に導入した。導入後、ビューロマイシンによる薬剤選抜により GFP を発現する PGC を作製した。ジョイント領域に対する PCR ならびにシークエンス解析を行ったところ、標的部位への遺伝子ノックインが確認できた。続いてモデル抗体とした一本鎖抗体の遺伝子 (*scFv-Fc*) とプラストサイジン耐性遺伝子を有する Cre 組込み用のドナーベクターを構築後、Cre 発現ベクターとともに PGC に導入した。抗生物質選抜および緑色蛍光の消光を指標にすることで、組換え PGC を得た。ゲノム DNA を抽出後、Cre-LoxP 反応による遺伝子組込みが起こったときにはのみ増幅可能なプライマーペアで PCR 解析したところ、増幅産物を確認できた。SSEA-1 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、組換え PGC で未分化の維持が認められた。組換え PGC の培養上清を ELISA 法で解析した結果、1.0 µg/mL 以上の濃度で scFv-Fc を生産していることがわかった。

Targeted recombinant antibody gene knock-in into chicken primordial germ cells using Cre-LoxP system

○Yuya Kaneko, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira
(Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words transgenic chicken, primordial germ cells, Cre/LoxP system, CRISPR/Cas9

3G03-10 ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子によるがん温熱療法

○山崎 裕永, 金子 真大, 井藤 彰
(名工大院・工)
ito.akira@material.nagoya-u.ac.jp

交流磁場照射により発熱する磁性ナノ粒子を用いたがん温熱療法は、腫瘍組織を局所的に加温しがん細胞を選択的に死滅させるがん治療法として期待されている。しかし、磁性ナノ粒子を直接注射できる固形腫瘍は少なく、また従来の腫瘍標的型ナノ粒子の血中投与では腫瘍組織への送達量が限られているため、治療効果の不足が懸念されている。こうした背景のもと、本研究では細胞小器官の1つであるミトコンドリアに注目した。ミトコンドリアは細胞のエネルギー生産や、細胞死シグナル伝達において中心的役割を担っている。我々は、ミトコンドリアを局所加温することで、温熱治療効果が向上するのではないかと考えた。本研究では、高い親水性と生体親和性を有する 2-(methacryloyloxy) ethyl phosphorylcholine (MPC) ユニットと、ミトコンドリア指向性が知られる triphenylphosphonium (TPP) 基を有したユニットを含む共重合体を重合し、マグネタイトナノ粒子の表面へ修飾することで、生体親和性とミトコンドリア指向性を兼ね備えた機能的磁性ナノ粒子を合成した。マウス結腸がん CT26 細胞の培地にポリマー修飾磁性ナノ粒子を添加したところ、磁性ナノ粒子が細胞内に取りこまれた一方で、明白な細胞毒性は認められなかった。磁性ナノ粒子を取り込んだ CT26 細胞に対して交流磁場の印加により *in vitro* 温熱治療を行ったところ、ミトコンドリア指向性 TPP ユニットを含有したポリマーを修飾した磁性ナノ粒子では、殺細胞効果が向上する傾向が認められた。さらに、CT26 腫瘍担がんマウスの腫瘍部位に磁性ナノ粒子を直接注射し、*in vivo* での温熱治療効果を検討したところ、TPP ユニット含有ポリマー修飾による治療群でより強力な腫瘍退縮効果がみられた。以上の結果は、がん温熱治療におけるミトコンドリア標的の有効性を示している。

Hyperthermia for cancer therapy by mitochondria targeting magnetic nanoparticles

○Hiroto Yamazaki, Masahiro Kaneko, Akira Ito
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Technol.)

Key words magnetic nanoparticle, cancer hyperthermia, mitochondria

3G03-11 高機能性ビニルアルコール系重合体を用いたバイオ人工膵臓の開発

○森口 浩聡, 金子 真大, 井藤 彰
(名大院・工)
ito.akira@material.nagoya-u.ac.jp

膵島移植は1型糖尿病の有力な治療法であるが、ドナー不足が課題となっている。動物由来の細胞や膵島などを利用した異種移植はドナー不足を解決するが、免疫拒絶反応が問題となる。こうした問題を解決するため、新たな治療法としてバイオ人工膵臓が開発されてきた。バイオ人工膵臓はグルコース応答性インスリン分泌細胞や膵島を半透膜で内包したもので、免疫細胞や抗体は透過せず免疫隔離により拒絶反応を防ぐ一方、細胞の生存に必要なグルコースや酸素およびインスリンを透過させる機能を有している。これにより、免疫拒絶反応を起こすことなく血糖値を制御することが可能である。

本研究では生体適合性に優れるエチレン-ビニルアルコール共重合体 (EVOH) 製の多孔質膜を免疫隔離膜として利用した。細胞外マトリクスを豊富に含む Matrigel にインスリン分泌能を有する MIN6 細胞を包埋し、EVOH 膜内に封入することでバイオ人工膵臓を作製した。バイオ人工膵臓は、外部のグルコース濃度に応じてインスリンを放出したことから、内部の MIN6 細胞の機能が保たれていることが確認された。次いで、自家移植モデルとして C57BL/6Ncr マウス、他家移植モデルとして Balb/c マウスを対象として、バイオ人工膵臓の *in vivo* での機能を検討した。膵β細胞を破壊するストレプトゾシンの注射により糖尿病化したマウスに、バイオ人工膵臓を移植し、血糖値の推移を測定した。その結果、自家移植モデル、他家移植モデルともに、移植翌日に随時血糖の正常値である 300 mg/dL 以下まで血糖値が低下し、30 日間にわたって正常血糖が維持されていた。移植 30 日後に摘出したバイオ人工膵臓表面には癒着がほとんどみられず、包埋した細胞の生存も確認された。これらの結果から本研究で開発したバイオ人工膵臓は1型糖尿病治療に有用であると考えられ、今後、長期移植実験を行っていく予定である。

Development of bio-artificial pancreas using functional polyvinyl alcohols

○Hiroaki Moriguchi, Masahiro Kaneko, Akira Ito
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words Bioartificial pancreas, Type1 diabetes, Transplantation, Immunoisolation

3G03-12 Investigating the synthesis bottleneck of shark IgNAR antibodies produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells and its application

○Xiaofang Lyu¹, Masayoshi Onitsuka², Noriko Yamano-Adachi^{1,3}, Yuichi Koga⁴, Takeshi Omasa^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Technol. Ind. and Soc. Sci., Tokushima Univ., ³OTRI, Osaka Univ., ⁴Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Antibodies are widely used as therapeutic drugs and research tools. Recently, the structural different heavy chain-only antibody (HCAb) draws people's attention. HCAb derived from cartilaginous fish is called immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR). IgNAR has the smallest known variable domain (~12 kDa) and can keep its structure and function in harsh environments (1). Thus, IgNAR has potential in therapeutic and biotechnological field. Previously, full-length IgNAR fused with human IgG Fc-region (IgNAR-Fc) was expressed by Chinese hamster ovary (CHO) cells (2). However, the recombinant IgNAR-Fc has difficulty in synthesis. The low cellular productivity (0.19 pg/cell/day) hinders its further analysis. This study is trying to figure out the synthesis bottleneck of full-length IgNAR in CHO cells. A high IgG synthesis CHO TU1 cells are analyzed as comparison. The gene copy number of IgNAR-Fc was half of IgG heavy chain, but there was no significant difference in mRNA level. It suggests that the low IgNAR-Fc productivity didn't result from gene expression level. IgNAR-Fc almost existed as dimer in cells and had slightly higher intracellular numbers than dimeric IgG. And it seems that no obvious degradation of IgNAR-Fc through ER-associated degradation was observed. Further studies will be necessary to find the synthesis bottleneck of IgNAR for its productivity improvement.

References

1. Dooley, H. & Flajnik, M. F., *Dev. Comp. Immunol.*, 30, 43-56, (2006).
2. Enatsu, H. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 132, 302-309 (2021).

Investigating the synthesis bottleneck of shark IgNAR antibodies produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells and its application

○Xiaofang Lyu¹, Masayoshi Onitsuka², Noriko Yamano-Adachi^{1,3}, Yuichi Koga⁴, Takeshi Omasa^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Technol. Ind. and Soc. Sci., Tokushima Univ., ³OTRI, Osaka Univ., ⁴Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words Antibody, Immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR), Chinese hamster ovary cells, Difficult-to-express antibodies

3A06-01 腸内代謝物と宿主の健康

○木村 郁夫
(京大院・生命)
kimura.ikuo.7x@kyoto-u.ac.jp

古くから“医食同源”の概念として知られる様に、食生活は生体内の恒常性を調節し、その調節機構の破綻は生活習慣病に繋がる。近年の食科学の進歩に伴い、食と健康の関係が単なる現象論だけではなく、その分子作用機序の解明という科学的根拠に基づいた証明が為され始めた。特に、各種栄養認識受容体群の同定により、食由来の腸内代謝産物が、エネルギー源として以外にも、生体生理機能に影響を及ぼすシグナル分子として作用することが明らかとなり、肥満・糖尿病等の代謝性疾患の標的分子として、これらの腸内代謝産物を認識する受容体群は注目されている。また、腸内細菌叢がその宿主のエネルギー調節や栄養の摂取、免疫機能等に関与し、その結果、肥満や糖尿病などの病態に直接的に影響するという多数の報告から、医学的側面からも食と腸内細菌、健康への関心は益々高まり、その結果、腸内細菌と宿主恒常性維持の分子機序の解明が早急の課題となった。ここにおいて、我々は独自にこれら宿主受容体と腸内細菌叢の関連に着目した。食品由来の腸内細菌代謝物による生体生理機能への影響について、宿主受容体を介したエネルギー代謝制御の観点から、腸内細菌が作る代謝物と肥満の関係を証明する知見について概説する。

Gut microbial metabolites and host health

○Ikuro Kimura
(Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words microbe, diabetes

3A06-02 腸内細菌脂肪酸代謝物 HYA の機能と応用

○米島 靖記
(Noster)
y.yonejima@noster.inc

脂質の構造多様性を評価できるリピドーム解析が開発され、臨床検体中に含まれる脂質代謝物の種類と量の網羅的解析が可能となり、便や血液などの解析結果より、腸内細菌が食事脂質に由来する多価不飽和脂肪酸を代謝変換して様々な脂肪酸誘導体を生成し、それらの脂肪酸が宿主へ移行していることが明らかとなった。これらの脂肪酸誘導体の内、リノール酸の腸内細菌初期代謝物が 10-Hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) である。HYA には代謝改善作用、腸管バリア機能を回復させる作用、ピロリ菌に対する特異的な抗菌作用、損傷を受けた口腔内バリア機能を回復させる作用などが報告されている。このように、これまで栄養素として考えられてきた脂肪酸が宿主及び腸内細菌によって代謝されることで様々な生理活性を発揮する可能性が示唆されており、これら脂肪酸を利用した医薬品及び機能性食品の開発や腸管内で機能性脂肪酸を産生するプロバイオティクスの開発が期待されている。

HYA に関して、臨床試験にて安全性、有効性の確認が既に進められている。食後血糖値が上昇しやすい方 60 名を対象とした臨床試験が実施され、純度 50% の HYA を 600mg 含有する食品 (HYA として 300mg 含有) の単回摂取が、食後の血糖値の急上昇を有意に抑制することが報告されている。

本講演では、我々が研究開発を進めている腸内細菌の脂質代謝を活用して合成する機能性脂肪酸 HYA の機能と実用化に向けた取り組みについて紹介する。

Functions and applications of gut microbial fatty acid metabolite HYA

○Yasunori Yonejima
(Noster Inc)

Key words microbial catalysis, polyunsaturated fatty acid, lactic acid bacteria

3A06-03 ポリフェノールパラドックスの鍵は 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) であるか

○栢木 宏之¹, 阿波 里佳¹, 三井 亮司², 吉野 進¹, 西谷 洋輔¹, 栗原 浩誠¹
 (¹丸善製薬 総合研究所, ²岡山理大・理)
 h-kayaki@maruzenpcy.co.jp

ポリフェノールは生体での有効性に関するデータが豊富に報告されており、植物由来の機能性成分としても認知度は高い。一方で、その生体利用性の低さや作用機序に未解明な部分が多いことはポリフェノールパラドックスと呼ばれている。近年では腸内細菌に関する研究が盛んに進められており、短鎖脂肪酸や酪酸などの腸内細菌代謝物にも機能性が見出されてきた。そこで、我々はポリフェノールの腸内細菌代謝物の機能性に着目した。

ポリフェノールが豊富な食品やγ-オリザノールやクルクミン、ヘスペリジンといった有効性が知られているポリフェノールの代謝物から興味深いことに共通して C6-C3 化合物である 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) が検出される。我々は「HMPA」がポリフェノールの機能発現に重要な活性本体 (コアポリフェノール) の一つの形であると考え、微生物発酵を用いた HMPA 生産機構や有効性、作用メカニズムについて研究を行ってきた。

これまで HMPA について *in vitro* での評価系では抗肥満、抗老化、抗酸化、抗炎症、肝機能向上、美白、育毛、アイケア、脳機能向上に寄与する可能性が示唆されている。またラットに 10 mg/kg BW で HMPA を経口投与すると最高血中濃度到達時間 (T_{max}) は 15 分で、インタクト体並びに各種抱合体として臓器に移行することが報告されており、生体内での多様な機能性が期待されている。今回、我々は HMPA のヒトでの有効性を実証するため 3 度のヒト試験を実施した。(1) BMI 25-30 kg/m² の健康な日本人男性を対象に、HMPA 配合食品 (HMPA として 23 mg 配合) を 12 週間継続摂取したランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。主要アウトカムは腹部総脂肪面積とし、HMPA 配合食品を摂取する群 14 名と HMPA を含まないプラセボ品を摂取する群 15 名の 2 群で解析を行った。(2) BMI 23-30 kg/m² の健康な日本人男女を対象に、HMPA 配合食品 (HMPA として 23 mg 配合) を 12 週間継続摂取したランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。主要アウトカムは腹部内臓脂肪面積とし、HMPA 配合食品を摂取する群 37 名と HMPA を含まないプラセボ品を摂取する群 37 名の 2 群で解析を行った。(3) 食後血糖値が高い健康な日本人男女を対象に、HMPA 配合食品 (HMPA として 23 mg 配合) を 4 週間継続摂取したランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。主要アウトカムは糖負荷検査 (75 g OGTT) における血糖値とし、HMPA 配合食品を摂取する群 15 名と HMPA を含まないプラセボ品を摂取する群 15 名の 2 群で解析を行った。その結果、(1) 12 週間経口摂取により、HMPA 配合食品群はプラセボ群と比較して、腹部総脂肪面積が有意に減少し、体重および BMI は低下傾向にあった。(2) 12 週間経口摂取により、HMPA 配合食品群はプラセボ群と比較して、腹部内臓脂肪面積、ウェスト周囲径の有意に低下が確認された。(3) 4 週間継続経口摂取により HMPA 配合食品群はプラセボ群と比較して、糖負荷検査 (75 g OGTT) における血糖値 2 時間値の有意な低下が認められた。また、 T_{max} およびグルコアルブミンの有意な低下も認められた。本試験は検査当日の試験食品摂取を行わずに食後血糖値への影響を評価したことから、食後血糖値の改善効果は糖の吸収阻害によるものではなく糖代謝能改善によるものであると考えられた。以上の結果からポリフェノールの代謝物である HMPA が抗肥満や抗高血糖素材として人々の健康に寄与すると思われる。

また、HMPA 産生機構について腸内細菌のモデルとして *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3 を用いた試験を行った。培地に HMPA の前駆体である 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid (HMCA) を添加すると HMPA 変換酵素 (Hydroxycinnamate reductase; *hcrA* 及び FAD/FMN reductase; *hcrB*) が強く誘導されること、またこれらの酵素が NAD⁺ の再生系では乳酸発酵と拮抗して HMCA のプロベン酸部分を還元することで HMPA を生成することが明らかになった。HMPA の生成による pH の極端な低下はなく、乳酸菌に対する生育阻害も認められなかった。解糖により生じた NADH は *HcrA* により FAD を受容体として NAD⁺ を再生しており、*HcrB* はこの FADH₂ を用いて HMCA を HMPA へと還元する FADH 依存型 HMCA レダクターゼであることが明らかになり、*L. plantarum* 22A-3 は HMCA の還元により菌体内のレドックスバランス調整を行っている可能性が示唆された。Pasquale F. et al. (2014) は乳酸菌がヒドロキシ桂皮酸を電子受容体として利用することは競争上の優位性をもたらす可能性があると提唱しているが今回の結果とも矛盾しない。ポリフェノールの摂取が特定の腸内細菌においても宿主であるヒトにおいても有用であり、代謝活性をスイッチする可能性が考えられた。

Is 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid (HMPA) the key to the polyphenol paradox?

○Hiroyuki Kayaki¹, Riyo Awa¹, Ryoji Mitsui², Susumu Yoshino¹, Yosuke Nishitani¹, Hiroshige Kuwahara¹

(¹Research Center, Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd., ²Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)

Key words intestinal bacteria metabolite, polyphenol, lactic acid bacteria, clinical study

3A06-04 腸内細菌の共生系によって生産される機能性腸内代謝物 ウロリチン A

○中島 賢則
 (ダイセル)
 tk_nakajima@jp.daicel.com

ヒトの腸内には多種多様な微生物が存在する。この微生物群、すなわち腸内細菌叢は年齢や食習慣、生活環境など個人のライフスタイルによって大きく変化する。これらの腸内細菌は宿主であるヒトに様々な影響を与えており、腸内環境に有益な作用を及ぼしているものもいれば有害な作用をもつものもいることは古くから知られている。近年では腸内細菌叢または特定の腸内細菌と炎症性腸疾患や動脈硬化、肥満、自己免疫疾患などの様々な疾病との関わりが明らかになってきており、腸内細菌叢のバランスがヒトの健康と密接に関係していると考えられている。このように、腸内細菌は様々な役割をもってヒトとの共生関係を築いていると予想されるが、我々はその多種多様な腸内細菌の中でも一部の微生物によってもたらされる代謝産物に着目し、機能性食品素材の開発へ応用している。

ポリフェノールはフラボノイド、アントシアニン、タンニンなど分子内に複数のフェノール性水酸基をもつ化合物の総称であり、多くの植物に存在する成分である。また、食品の機能性として抗酸化作用を有することが知られている。ポリフェノールは腸内細菌叢の作用によって腸内で代謝されることが報告されているが、我々はそれらの腸内代謝物の一つであるウロリチン類に着目した。ウロリチンは、様々な健康機能をもつスーパーフルーツとして知られるザクロに含まれるエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が、生体内、即ちヒトの腸内細菌によって代謝されて生成する機能性ポリフェノールである。ウロリチンは水酸基の数および位置の違いによる類縁体が存在し、これまでに、エラジタンニンを経口投与したラットの尿中に 7 種類のウロリチン類縁体が検出されたことが報告されている。我々は健康人 30 名を対象としたウロリチン生産者確認試験を実施した結果、約 50% の人が腸内でウロリチンを生産することができ、更にその類縁体の一つであるウロリチン A (UA; 3,8-dihydroxy-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one) がその主要な代謝物であることがわかった。UA は高い抗酸化活性、抗炎症作用が報告されていたが、我々は UA が脂肪滴蓄積抑制効果、破骨細胞分化抑制効果、肌に対する抗老化効果などを有することを明らかにし、ヒトの健康に有益な機能性を発揮する可能性を示してきた。更に、UA が機能不全のミトコンドリアに作用するマイトファジー誘導効果、腸管バリア機能の向上、アルツハイマー病による認知障害の回復効果等も有することが報告され、新規な機能性食品素材として有用なポリフェノールである。

UA はエラグ酸を基質とし、ラクトン環の開環反応、脱炭酸反応、脱水酸化反応を経て水酸基の位置や数が異なる様々な類縁体を經由して生成される。この代謝に関わる腸内細菌として、エラグ酸を基質として UA の前駆体であるウロリチン C (UC) を生産する *Gordonibacter urolithinifaciens* は報告されていたが、UA 生産能を有する単一の微生物はこれまでに分離されていなかった。そこで、我々は UA 生産者の糞便をもとにスクリーニングした結果、UA 生産能を有するヒト腸内細菌を初めて分離することに成功した。16S rRNA 遺伝子を用いた同定の結果、本菌は *Clostridium* 属に属する微生物であった。本菌は脱水酸化反応において高い基質特異性を有しており、ウロリチン骨格における 9 位の水酸基を特異的に脱離する、つまり UC を基質とした場合のみ UA を生産することがわかった。更にこの UA 生産菌と前出の UC 生産菌 *Gordonibacter* 属細菌の共培養システムにより、エラグ酸を出発物質として UA を 1 ポットで生産することに成功した。これらの技術をベースに共培養によって安定的に UA を発酵生産できるプロセスを開発して工業レベルでの製造プロセスを確立し、新規な機能性食品素材として UA 含有食品素材を実用化するに至った。

上述のように、我々は機能性食品素材としてヒト腸内代謝物に着目し、その研究開発を通じて腸内細菌がヒト腸内の特殊な環境において独自の進化を遂げてきたようにユニークな反応を有することがわかってきた。本講演ではヒトにとっても有益な健康効果を有する機能性腸内代謝物として UA の生産に関与する腸内細菌およびそれらが担うユニークな代謝反応、更にその生成機構の解析結果の一部を紹介する。このような腸内細菌によるユニークな反応を酵素学的な観点から掘り下げることによって更なる発展が期待されると考える。また、UA は複数の腸内細菌の協働によって生産されることがわかった。今後、物質生産に必要となる微生物機能を発揮する手段として、複合微生物系によるモノづくりも選択肢の一つとなりうると考えている。我々は、次世代の発酵生産方法として、ヒト腸内で腸内細菌叢の働きによって起こっている代謝反応全体を 1 つの代謝経路 (global metabolic pathway map) として捉え、必要な微生物機能を選択してデザインした共培養システムの確立を目指していきたいと考えている。

Urolithin A is functional gut microbial metabolite which is produced by co-culture of gut bacteria.

○Takanori Nakajima
 (Daicel Corp.)

Key words urolithin A, gut microbial metabolite, co-culture

3A06-05 疾患予防と健康維持のための腸内環境モジュレーション

○金 倫基
(慶大)
ykim@keio.jp

腸内に生息する細菌集団（腸内細菌叢）は、我々の健康維持や疾患予防に重要な役割を果たしていることが次第に明らかになってきた。腸内細菌叢は、ヒトが摂取した食物の一部を栄養源にすることで、集団としての恒常性を維持するとともに、自身の作り出す菌体成分や代謝物を介して宿主の免疫系・代謝系・神経系などに作用し、生理機能の向上に寄与している。ヒトの腸内には数百種類の腸内細菌が存在するが、各腸内細菌は異なる菌体成分・代謝能を有する。そのため、腸内細菌叢の組成変化は、腸内の菌体成分や代謝物の組成を変動させ、その結果、宿主生理機能にも影響を及ぼす。近年、食事や生活スタイルの変化、抗菌薬などの薬剤使用の増加により、腸内細菌叢の構成異常（ディスバイオーシス）が生じやすくなっている。この腸内ディスバイオーシスは、腸内の菌体成分や代謝物を含む腸内環境（マイクロバイオーム）を変化させることにより、多様な疾患の病態に影響を与えていると考えられている。腸内環境変動因子（マイクロバイオームモジュレーター）は、腸内細菌叢の組成や代謝を変化させるもので、下部消化管まで到達する糖・タンパク質・脂質などの栄養素、抗菌剤などの薬剤、生菌、腸内細菌代謝物などが挙げられる。各マイクロバイオームモジュレーターは異なる腸内環境変化を引き起こすため、結果として宿主に異なる影響を及ぼす。そのため、マイクロバイオームモジュレーターは、腸内ディスバイオーシスを改善し、宿主の健康状態に応じた腸内環境を構築できる可能性を持つといえる。我々は、マウスの生理機能や疾患病態を変化させる多様なマイクロバイオームモジュレーターを用いることにより、疾患や健康状態に応じた腸内環境の構築や、腸内細菌やその代謝物の新たな機能の同定を試みている。そこで本講演では、マイクロバイオームモジュレーターを用いて、腸内細菌の持つ新たな機能の探索や、腸内細菌が宿主生理機能に与える影響の作用メカニズムについての最近の知見を紹介する。

Gut microbiome modulation for disease prevention and health promotion

○Yun-Gi Kim
(Keio Univ.)

Key words microbial flora

3A07-01 醸造食品中の D-アミノ酸：生成機構、機能性と新たな醸造技術の開発

○老川 典夫
(関西大・化生工)
oikawa@kansai-u.ac.jp

自然界には L-アミノ酸と D-アミノ酸が存在する。醸造食品中にはさまざまな L-アミノ酸が存在し、醸造食品の風味や機能性に影響を及ぼすことが知られている。一方、醸造食品中の D-アミノ酸の存在や機能については、長らく不明な状態であった。このような背景において、演者は、まず日本の伝統的醸造食品である日本酒を対象に、日本酒中の D-アミノ酸の系統的な分析を行うとともに、その生成機構や日本酒の風味に及ぼす影響について、微生物、酵素レベルで明らかにした。また、これらの知見に基づき、製品中の D-アミノ酸の濃度を高めた福山黒酢や D-アミノ酸を醸造中に産生させた味噌の醸造技術を開発した。本講演では、醸造食品中の D-アミノ酸について、演者の基礎研究の成果と商品開発に関する背景や成果を紹介する。醸造食品中の D-アミノ酸の分析を実施するにあたり、研究着手当時、未解明であった D-アミノ酸の食品の二次機能、特に「食品中の D-アミノ酸と味」との関連性に着目した。したがって、研究対象とする食品は、味の官能評価系が確立していることが重要であった。また、演者は元々微生物や植物の D-アミノ酸代謝関連酵素の研究に従事していたことからその知見を活用できるように、製造に微生物が関与する食品を選定することを考えた。さらに、製品中の D-アミノ酸濃度と製造方法の関連性を明らかにするため、多様な製造方法がある食品であることを選定条件に加えた。これらの条件を満たす食品として日本酒を選定した。全国から無作為に購入した 141 本の日本酒について D-アミノ酸の分析を行ったところ、日本酒中に、さまざまな D-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。特に、D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸の含有量が他の D-アミノ酸より多いことが明らかとなった。また、これらの D-アミノ酸は生配造りの日本酒中に多いことが明らかとなった。そこで、生配造りの醸造時に配中に発生する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* (*Lactobacillus sakei*)、*Leuconostoc mesenteroides* に着目し、これらの乳酸菌が D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸を菌体外に生産し、生配造りの日本酒中の D-アミノ酸の生成を主に担っていることを明らかにした。さらに、141 本の日本酒の D-アミノ酸濃度と官能評価の結果を主成分分析で解析し、日本酒中の D-アミノ酸濃度と味との関係性を評価したところ、D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸を高濃度で含有する日本酒は、味や総合評価が高いことが明らかとなった。したがって、生配造りの日本酒の味には D-アミノ酸が関与することが明らかとなった。以上の結果から、D-アミノ酸生産能を有する乳酸菌をうまく活用した醸造方法を開発すれば、製品中の D-アミノ酸濃度を高めた醸造食品の製造が可能になると考えた。ちょうどそのような時に、鹿児島県の福山黒酢株式会社から同社の黒酢中の D-アミノ酸の分析依頼があった。分析の結果、同社の黒酢は D-アラニン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-セリンを含有していることが明らかとなった。そこでその成因は日本酒中の D-アミノ酸の研究経験から、黒酢醗中の乳酸菌であると推定し、黒酢醗から D-アミノ酸生産能を有する乳酸菌の分離を試みた。その結果、黒酢醗中には、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus brevis* 等の乳酸菌が存在し、これらの乳酸菌が D-アミノ酸を生産することを明らかにした。そこでこれらの乳酸菌を黒酢醗調製時に添加すれば、黒酢製品中の D-アミノ酸の含有量を増やす新たな黒酢醸造技術を開発できると考えた。使用する乳酸菌種や使用する乳酸菌の濃度等をさまざまな組み合わせで検討した結果、製品中の D-アミノ酸濃度が約 2 倍高かつ Brix 値には大きな変化のない福山黒酢 (D-アミノ酸強化福山黒酢) の製造方法の開発に成功した。この黒酢の官能評価試験を実施したところ、糖度を高めず通常仕込みの黒酢より甘味と旨味が優れていることが明らかとなり、この D-アミノ酸強化福山黒酢を用いたフルーツ黒酢を上市することに成功した (2016 年)。

福山黒酢には酢酸が含まれており、D-アミノ酸生産乳酸菌を醸造時に使用しても、この乳酸菌が菌体外に生産する乳酸による酸味の影響はほとんど出ないと考えられる。したがって、D-アミノ酸生産乳酸菌を醸造時に使用し、D-アミノ酸濃度を高めた新たな醸造食品の製造方法の開発拡大には、比較的酸味の穏やかな醸造食品を対象に研究を実施する必要があると考えた。そこで、味噌を研究対象に選定し、大阪の株式会社大源味噌と共同研究を実施した。使用する D-アミノ酸生産乳酸菌の量や使用する時期を検討し、同社の通常仕込みの味噌中には存在しない D-アミノ酸を醸造中に有意に産生させ、かつ味のバランスも整った味噌の醸造方法の開発に成功し、2021 年 11 月に「アミノみそ (商品名)」として上市することに成功した。

食品中の D-アミノ酸には、演者の発見した呈味性の向上以外に、肌のアンチエイジング効果等の機能性があることも知られている。今後、D-アミノ酸が醸造食品の機能性や付加価値を高める新たな機能性成分となることが期待される。

D-Amino acids in brewed foods: production mechanism, function, and development of new technology for brewing

○Tadao Oikawa
(Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words D-amino acid, sake, black vinegar, miso

3A07-02 発酵の力ー酒粕による老化抑制や脳機能活性化の可能性一

○藤井力
(福島大・食農)
tsfujii@agri.fukushima-u.ac.jp

我々は、清酒酵母のS-アデノシルメチオニン (SAM) 蓄積能が高いことから、酒粕にも高含有されているのではないかと考え、全国の清酒製造場から酒粕を収集し、酒粕中のSAM含量や関連する代謝産物で機能が報告されている成分含量を測定した。その結果、酒粕はSAM等を、常識的な摂取量で効果を示してもおかしくないくらい高含有していることを見出した。本発表では、微生物により生産された酒粕の機能性成分が示唆する健康効果の潜在力や、ヒト試験の結果が示す発酵食品「酒粕」の老化抑制や脳機能活性化の可能性について紹介したい。

<発酵の力と酒粕>

発酵は微生物による食品加工法の一つで、麹菌や酵母、乳酸菌等の微生物がビタミン類等の代謝産物を副次的に生産する。酒粕は清酒醸造で得られる副産物で、発酵により平均的には重量が原料米の約25%程度まで減少する一方、麹菌や酵母等が生産する機能性成分が増加し、重量当たりの機能性成分含量は高くなる。酒粕は発酵食品といっただけの食品であるが、米麹や味噌、ヨーグルトほどの発酵食品イメージはなく、製造に酒類製造免許が必要という事情もあり、潜在力に見合う広範な研究は行われてこなかった。

<酒粕中の機能性成分含量の調査・研究>

我々は全国の製造場の協力のもと、製造方法の異なる酒粕109点を収集し、SAMや、SAMと代謝の近い葉酸、ポリアミン、グリセロホスホコリン (GPC)、アグマチン、ビタミンB₆の含量を測定した。これらの成分はいずれも老化抑制や脳機能に関与することが報告されている成分である。

(1) SAM

SAMは処方薬や補助食品として実績のある成分で、気分改善効果や抗肝機能障害効果、抗関節炎効果等が知られている。清酒酵母を含む酒粕は、多くの酒粕で常識的な摂取量で健康機能を示してもおかしくない大量のSAMを含んでいる。

(2) 葉酸

葉酸は世界86カ国以上で穀類等に強制添加されているビタミンである。葉酸摂取は血中のホモシステイン濃度を抑制し、脳梗塞や心筋梗塞のリスクを軽減する。穀類等に葉酸を強制添加している国々では脳卒中死亡率等が減少し、医療費削減効果が見られた。日本でも葉酸摂取を推進する「さかど葉酸プロジェクト」において約10万人の市で約10億円の医療費・介護費の削減効果が見られた。酒粕中の葉酸含量はいずれも高かったが、菊正宗酒造のKm67株を用いた酒粕で特に高かった。

(3) ポリアミン

ポリアミンは正常マウスの寿命伸長を示したはじめての成分で、抗炎症作用等が知られ、脳機能に関する報告も多い。ポリアミンは大豆や納豆に高含有されている成分であるが、酒粕にも高含有されていた。

(4) GPC

GPCは海外では知的機能障害等に対応する医薬品やコリンの補給剤として流通している成分であるが、酒粕中に高含有されていた。なお、コリン不足は肝機能の低下や免疫低下等をもたらすことが知られている。

(5) アグマチン

アグマチンはポリアミン中間体で、近年脳機能関係の論文が多く報告されている。清酒に高含有されていることが知られている成分であるが、酒粕にも高含有されていた。

(6) ビタミンB₆

ビタミンB₆はタンパク質代謝に不可欠で、欠乏によるホモシステインの増大が知られており、脳梗塞や心筋梗塞リスク、脳萎縮とも関係が深い成分である。ビタミンB₆を最も高含有していた酒粕は食品で最もビタミンB₆を含有するとうがらしと同等の含量であった。

<酒粕投与のヒト試験>

酒粕研究伊豆主任研究員とともに、兵庫県立大永井先生、京都医療センター坂根先生、広島大松原先生と共同で、健康高齢者を対象とした無作為化二重ブラインドプラセボ比較試験を行った。本試験は酒粕甘酒摂取の運動への上乗せ効果を検証する試験で、加工工程でSAM含量が大幅に減少していたにもかかわらず、認知やうつスコア、ロコモスコアなど、老化や脳機能に関係する項目で有意差が見られた。

<おわりに>

酒粕は潜在力の高い食材であるが、ヒト試験での証明が足りない。酒粕の選択や加工による機能性成分損失を防いでヒト試験を行えば必ず効果を証明でき、成分を維持できる調理法やレシピの開発によりヒトにも財政にもやさしい長寿社会創造に貢献可能な食材であると信じている。

最後に、本発表は酒粕時代に行なった研究が中心で、多くの同僚や学生、共同研究者の皆様、貴重な酒粕試料や清酒製造条件をご提供いただきました全国の清酒製造場の皆様にご心より御礼申し上げます。なお、本発表で紹介した我々の研究の一部は、内閣府戦略的イノベーション創造プログラム (SIP)「次世代農林水産業創造技術」及びJSPS科研費21H02139の助成を受け実施いたしました。また、一部は日本酒造組合中央会との共同研究により実施しました。心より御礼申し上げます。

Potential Abilities of Fermented Food, such as Pressed Sake Cake, to Anti-aging and Brain Function Improvement.

○Tutomu Fujii
(Fac. Food Agric. Sci. Fukushima Univ.)

Key words fermentation, S-adenosylmethionine, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*

3A07-03 麹菌を活用した機能性食品の開発事例

○仲原文晴
(キッコーマン)
tnakahara@mail.kikkoman.co.jp

日本食 (和食) は日本人の伝統的な食文化としてユネスコ無形文化遺産にも登録されており、そのおいしさと健康的なイメージから、世界の様々な国で日本食がポピュラーになりつつある。伝統的な日本食の特徴として、醤油、味噌、清酒、みりんなどの発酵食品が多用されることが挙げられる。元来は食材の保存性を向上させたり、好ましい味や香りを付与しておいしさを高めるための先人の知恵であったが、発酵工程で生じた酵素分解産物や、微生物の二次代謝産物によって、元の食材にはなかった健康機能が新たに付与されることが明らかになってきている。様々な発酵食品が持つ健康機能が盛んに研究されており、生物工学会でもスローフード微生物工学会がデータベースの整備や講演会の活動をしているほか、生物工学会誌でもこれまで度々特集が組まれている。麹菌はアジアの発酵食品に特徴的に用いられ、とりわけ、日本の発酵食品製造において中心的な役割を担うことから、日本では国菌とも呼ばれている。醤油の醸造においても、大豆と小麦を原料として麹菌を生育させる製麹工程が醤油の品質を左右する。このため、当社では100年以上にわたって麹菌を重要な研究対象としてきた。例えば、原料に含まれる成分の分解に関わる酵素およびその遺伝子に関する研究や、発酵で生じた成分の分析技術などが挙げられ、さらに、これらの研究で培った技術を基礎として、工業的に発酵生産した有用物質や酵素を活用したバイオケミカル事業にも展開してきた。

日本では食生活の変化に伴い、伝統的な日本食を摂る機会が減り、高齢化も相まって生活習慣病が増加傾向となっている。医療費の増大という保健政策上の課題があるだけでなく、患者の高齢期のウェルネスの低下にもつながっており、産学官で連携した課題解決の取り組みが求められている。この社会課題に対し、当社では、発酵技術を活用して機能性成分を豊富に含む食品の開発に取り組んできた。本講演ではその事例を紹介し、本シンポジウムテーマ「健康長寿に貢献するこれからの発酵技術」について議論を深める一助としたい。

(1) 血圧降下ペプチドを高含有した醤油

1990年代以降、アンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害作用を有する食品由来のペプチドが血圧降下作用を発揮することが報告され、これを活用した機能性食品も販売されていた。一方、醤油にもペプチドが含まれることが1970年代に報告されていたが、その含有量やACE阻害活性については明らかにされていなかった。そこで本研究では、調味中のペプチダーゼ活性を低下させることによってACE阻害ペプチドが遊離アミノ酸に分解されることを抑制し、ACE阻害ペプチドが豊富に含まれる醤油調味料を開発した。これを減塩醤油に配合したACE阻害ペプチド高含有醤油を用いて、血圧が高めのヒトを被験者として連続摂取試験を実施したところ、対照 (通常の減塩醤油) 群との比較して収縮期血圧が有意に低下した。これらの知見を基に特定保健用食品 (トクホ) の表示許可申請を行い、2013年に醤油類で初の血圧が気になる方向けのトクホ表示許可を取得し、商品が発売した。さらに2017年に機能性表示食品の届出を行い、新容器での商品を追加発売した。

(2) 抗酸化作用を有するアミノ酸エルゴチオネインの発酵生産

エルゴチオネインは100年以上前に発見された親水性含硫アミノ酸である。エルゴチオネインは、高い抗酸化活性をもつことが知られているが、近年、脳の記憶学習能力の改善、うつ病や認知症に対する機能改善等、その生理機能も注目されている。エルゴチオネインは、キノコなどの菌類や一部の細菌は生合成できる一方、ヒトは生合成できず食事から摂取している。機能性食品素材としてはキノコから抽出したものが主流であったが、新たな供給源として、大量生産が可能な微生物による発酵生産が注目されている。当社では、麹菌 *Aspergillus sojae* および *A. oryzae* の保有菌株からスクリーニングを行い、高生産条件を確立した。

Development of fermented foods with health-promoting function using *Aspergillus* fungi

○Takeharu Nakahara
(Kikkoman Corp.)

Key words *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, peptide, soy sauce

3A07-04 健康な人の免疫を維持するプラズマ乳酸菌：日本初の免疫機能性表示素材の研究開発

○藤原 大介
(キリンホールディングス)
d-fujiwara@kirin.co.jp

ヒトとモノの移動が急速に広がる現在、世界各地で発生、本来地域単位で収束していたウイルス病は今や瞬時に世界規模に広がるようになった。にも関わらず、ヒトのウイルスに対する対抗手段はワクチンや抗ウイルス剤など限定的である。ワクチンや抗ウイルス剤は著効を示す反面、1. 対象スペクトルが極めて狭く汎用性を欠き、2. 医療インフラを必要とするため活用ハードルが高いという問題がある。この背景を踏まえて、我々は本来ヒトが持つウイルスに対する免疫機能を、食素材で高く維持するというアプローチは有用ではないかと考えた。

上記コンセプトのもと、我々は菌体成分に豊富な自然免疫の刺激物質を含む食素材である乳酸菌を用いて、ヒトのウイルスに対する免疫の司令塔であるプラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) を活性化する乳酸菌の探索に着手した。

その結果広範な pDC 活性化スクリーニングによってひとつの乳酸菌が選抜され、プラズマ乳酸菌と命名した。その後の様々なエビデンス取得により、プラズマ乳酸菌は経口摂取することによりヒト pDC の活性を高く維持し、冬季の様々な体調変化のリスクを低減することが証明された。そしてこれらのデータを持って 20 年 8 月に消費者庁に免疫機能表示を届出し、受理された。これは日本で初めて食品に免疫という機能が製品に表示できることが可能となった瞬間でもあった。当日はこれら一連の研究開発について共有させて頂きたい。

Development of LC-Plasma which became the first ingredient with immune health claim in Japanese history

○Daisuke Fujiwara
(Kirin Holdings Co., Ltd.)

Key words lactic acid bacteria

3C06-01 〈招待講演 (台湾生物工学会)〉

PET hydrolysis by a recyclable supramolecular enzyme complex

○Shen-Long Tsai
(National Taiwan University of Science and Technology)
stsai@mail.ntust.edu.tw

Due to its high plasticity, polyethylene terephthalate (PET) has been widely used in our daily life. Unfortunately, its accumulation has become an enormous threat to the ecosystem. The enzymatic hydrolysis of PET recently attracted increasing attention due to its green properties. PET hydrolase (PETase) and MHET hydrolase (MHEase) are two of the most attractive enzymes as they can synergistically catalyze PET degradation. This study aims to imitate the structure of cellulosomes by co-immobilizing two enzymes (PETase and MHEase) and an affinity protein (hydrophobin) for PET degradation. The developed two-enzyme cascade system forms a supramolecular enzyme complex via the interaction between SpyTag/SpyCatcher. The affinity protein increases the accessibility of the enzymes toward the PET substrate, whereas the macromolecular structure facilitates the two-enzyme cascade reaction, allowing it to degrade PET more efficiently. Overall, the created macromolecular enzyme structure can enhance the degradation of PET, which is an important issue to realize a circular economy.

PET hydrolysis by a recyclable supramolecular enzyme complex

○Shen-Long Tsai
(National Taiwan University of Science and Technology)

Key words PET, enzyme reaction, synergistic effect, cloning

3C06-02 〈招待講演 (韓国生物工学会)〉

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the sustainable production of value-added chemicals

○Hyun Uk Kim

(Dept. Chem. Biomol. Eng., KAIST)

chukim@kaist.ac.kr

Metabolic engineering attempts to overproduce value-added chemicals in a sustainable manner. In such grand challenges, an increasing number of microorganisms have been explored as an efficient microbial cell factory. *Corynebacterium glutamicum* has also been recognized as a robust production host for a wide range of chemicals. Here, we further explore the potential of *C. glutamicum* for the production of value-added chemicals by taking examples of indigoidine, a natural blue pigment for a sustainable fabric dye, and β -alanine for fine chemical and pharmaceutical applications. In case of β -alanine, a genome-scale metabolic model of *C. glutamicum* was subjected to gene targeting methods, which were able to identify effective gene manipulation targets that could significantly enhance the production of β -alanine. Finally, future prospects of *C. glutamicum* and the increasing role of computational approaches in metabolic engineering will be discussed.

Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the sustainable production of value-added chemicals

○Hyun Uk Kim

(Dept. Chem. Biomol. Eng., KAIST)

Key words metabolic engineering, *Corynebacterium glutamicum*, indigoidine, β -alanine

3C06-03 Complex microbial engineering of meta-fermentation process for bioresource-recycling and sustainability

○Yukihiro Tashiro

(Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

We have proposed a new concept of 'meta-fermentation', for productions of value-added substances with controlled mixed culture systems using complex microorganisms¹⁾. Compared with a pure culture system, there are several advantages in meta-fermentation such as the utilization of more substrates consisting of various renewable biomasses, no requirement for media sterilization, etc. Furthermore, we have also proposed a newly multidisciplinary field, 'Complex Microbial Engineering', which is the study on processes by complex microorganisms related to industry, agriculture, environment, and medicine²⁾. In addition, processes by complex microorganisms in this field have been considered sustainable biotechnology. One of the goals of Complex Microbial Engineering is to establish a controlled-targeted process consisting of only necessary microorganisms.

To develop the Complex Microbial Engineering, we should initially summarize agendas and drawbacks for processes by complex microorganisms as follows: (1) To know microbiome accurately, (2) To obtain an excellent and suitable seed consortia for the targeted process, (3) To know a function including metabolic activity of each microorganism, (4) To proliferate a targeted microorganisms, (5) to know a control factor in the targeted process, (6) to establish highly efficient targeted process, etc. Until the 2000s, because analytic methods such as clone library method and DGGE method could give only part of microbiome, a scientist proceeded the research on processes by complex microorganisms with little information on microorganisms. However, since the 2010s, a high-throughput sequencing technique has contributed to achieve the above (1), and a scientist can analyze a process by complex microorganisms based on microbiome at genus or species level, which has resulted in acceleration of the researches in the field of Complex Microbial Engineering. In this presentation, I would like to introduce the results of meta-fermentation for organic acid productions from food waste, and to discuss a strategy and a perspective to develop Complex Microbial Engineering.

1. Optical pure L-lactic acid (L-LA) production using unisolated bacterial seed by controlling fermentation temperature¹⁾

Meta-fermentations were performed at 30°C-65°C by pH swing control at 7.0 every 24 h in model kitchen refuse (MKR) medium using a compost as the inoculum. Butyric acid was main product at 30°C and 37°C, while L-LA was predominantly produced at 45°C-55°C. Bacterial community structure analysis suggested that *Bacillus coagulans* would contribute to L-LA production. This is the first report on 100% optical purity of L-LA in meta-fermentation.

2. High L-LA production using unisolated bacterial seed by a novel pH control strategy³⁾

Meta-fermentations were performed at 50°C by several pH control strategy using the same medium and inoculum above⁴⁾. Although the pH constant control at 7.0 shortened fermentation time, accumulation, selectivity, and optical purity of LA drastically decreased due to the growth stimulation of heterofermentative *B. thermoamylovorans*. Deliberately switching from pH swing control to constant control exhibited the best performance for L-LA production. These results present a novel pH control strategy for efficient L-LA production in meta-fermentation based on a concept different from that of pure culture systems.

3. Reconstruction of meta-fermentation for L-LA production using isolated bacteria⁴⁾

We could reconstruct of meta-fermentation for L-LA production using only 3 selected strains *B. coagulans* MN-07, *B. thermoamylovorans* OM55-6, and *B. hisashii* N-11 isolated by systematic feedback isolation method⁵⁾. A simplified constant pH control strategy, which was not suitable method in meta-fermentation using unisolated bacteria, was the most efficient method to decrease fermentation time and to increase L-LA production. These results indicated that technology established in a pure culture system can be applied for a process by minimum microorganisms.

References: ¹⁾Bioresour Technol, 146, 672-681, 2013; ²⁾Seibutsu-Kogaku, 99, 627-630, 2021; ³⁾Bioresour Technol, 216, 52-59, 2016; ⁴⁾J Biosci Bieng, 123, 63-70, 2017; ⁵⁾Biotechnol J, 162, 100277, 2021

Complex microbial engineering of meta-fermentation process for bioresource-recycling and sustainability

○Yukihiro Tashiro

(Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words complex microbial engineering, mixed culture, green chemicals, control strategy

3C06-04 <招待講演 (韓国生物工学会)>

Model-driven elucidation of transcriptional regulation by Nac highlights its complementary role between nitrogen and carbon metabolism in *Escherichia coli*

○Donghyuk Kim

(School of Energy and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology)
dkim@unist.ac.kr

A genome-scale model-driven approach for experimental design was applied to elucidate the transcriptional regulation under nitrogen limitation by two major transcription factors (TFs), NtrC and Nac, in *Escherichia coli*. Unlike NtrC, the genome-wide regulatory role of Nac under nitrogen limitation has been elusive. Here, we performed genome-wide measurements with ChIP-exo and RNA-seq using alternative nitrogen sources predicted by genome-scale models to trigger differential activation of Nac. A total of 43 regulon genes for NtrC associated with RpoN-dependent promoters and 97 for Nac with RpoD-dependent promoters were comprehensively reconstructed. Functional analysis of Nac regulons provided more insight into regulatory mechanisms of Nac under unfavorable nitrogen sources. We demonstrate that Nac directly down-regulates amino acid biosynthesis to alleviate nitrogen-limiting stress and enables maintenance of intracellular glutamine concentration. Moreover, Nac re-balances metabolic flux through carbon metabolism to accommodate the change in the nitrogen source. In addition, both TFs modulate α -ketoglutarate accumulation stress due to nitrogen limitation by co-activating amino acid degradation pathways. A systems-biology computational approach provided a detailed and quantitative understanding of the metabolic roles of Nac and NtrC and how the nitrogen and carbon metabolic network responds complementarily to nitrogen-limiting stress.

Model-driven elucidation of transcriptional regulation by Nac highlights its complementary role between nitrogen and carbon metabolism in *Escherichia coli*

○Donghyuk Kim

(School of Energy and Chemical Engineering, Ulsan National Institute of Science and Technology)

Key words systematic analysis, transcriptional regulation, *Escherichia coli*3C06-05 **Dynamic model-guided engineering of cyanobacteria metabolism**○Fumio Matsuda^{1,2}¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp**Introduction**

A model cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC 6803), is a promising host for direct biochemical production from CO₂; however, its metabolic control mechanism remains unclear due to the lack of a kinetic metabolic model required for the metabolic control analysis. Moreover, further investigation of allosteric regulation is required for rational metabolic engineering to produce target compounds. One of the biggest bottlenecks for the construction of kinetic metabolic models is a shortage of enzyme parameter information. Thus, a data-driven approach was required. In this talk, two topics will be introduced 1) Ensemble modeling of cyanobacteria metabolism using multi-omics data, and 2) Ensemble kinetic modeling identifies novel allosteric inhibition of phosphoribulokinase in PCC 6803

1. Ensemble modeling of cyanobacteria metabolism using multi-omics data

In this study, the ensemble-modeling approach was integrated with the transomics data to construct kinetic models. Kinetic metabolic models of PCC 6803 were constructed to identify engineering targets for improving ethanol production based on an understanding of metabolic regulatory systems.

An ensemble including 100,000 models of PCC 6803 metabolism with randomly sampled parameters were produced using the proteome, metabolome and fluxome data at the autotrophic condition as a reference. Following a modulation of the enzyme expression levels to that of heterotrophic condition according to the proteome data, the metabolic flux and metabolite concentration levels were predicted and compared with that of measured data of the heterotrophic condition. A subset of 100 metabolic models with better predictability were selected from the 100,000 models. Metabolic control analysis using the model ensemble identified that phosphoglycerate kinase (PGK) is a promising engineering target to improve ethanol production. Overexpression of PGK in the metabolically engineered PCC 6803 strain showed that the ethanol titers at 48 h was 1.37-fold greater than that of the control strain [1].

2. Ensemble kinetic modeling identifies novel allosteric inhibition of phosphoribulokinase in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Ensemble modeling of microbial metabolism was applied to build accurate predictive models by synthesizing the results of multiple models with different parameter sets into a single score to identify plausible allosteric inhibitions. Trans-omics data-driven ensemble modeling was performed using three datasets obtained from the PCC 6803 GT strain under photoautotrophic conditions (auto), a metabolically engineered strain (Et-g) under photoautotrophic conditions (EtOH), and the GT strain under mixotrophic conditions (mixo). The data driven-computer simulation using enzyme abundance, metabolite concentration and INST-¹³C-MFA data successfully identified that phosphoribulokinase (PRK) a candidate for novel allosteric inhibition of PCC6803. The enzyme assay experiment using the recombinant protein confirmed isocitrate was a non-competitive inhibitor of PRK as a novel allosteric regulation of cyanobacteria metabolism [2].

[1] Nishiguchi H et al (2019) *Metab Eng* 52:273-283[2] Nishiguchi H et al (2020) *Metab Eng Commun* 11: e00153**Dynamic model-guided engineering of cyanobacteria metabolism**○Fumio Matsuda^{1,2}¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)**Key words** metabolic engineering, cyanobacteria, metabolic analysis

3C07-A1 <受賞講演 (生物学アジア若手研究奨励賞 (DaSilva賞))>

Development of genome engineering technologies for *de novo* design and construction of microbial cell factories

○Yu Wang

(Tianjin Inst. Ind. Biotechnol., Chin. Acad. Sci.)

wang_y@tib.cas.cn

Biomufacturing is important for addressing the global resource and environment concerns. Microbial cell factories capable of converting renewable feedstocks to useful bio-based products such as chemicals, fuels, materials, and foods are considered as the kernel of biomufacturing. Genome engineering is the key enabling technology to manipulate the microbial metabolism and regulation for developing microbial cell factories. In this study, CRISPR-based genome engineering technologies (i.e. gene editing and gene regulation) were developed for *Corynebacterium glutamicum*, a major workhorse for industrial biotechnology, and applied to *de novo* construct microbial strains for efficiently utilizing non-food feedstocks and producing valuable chemicals. First, a Base Editor-Targeted and Template-free Expression Regulation (BETTER) method for simultaneously diversifying multigene expression was developed. BETTER repurposed CRISPR-guided base editors to create complex libraries of multiple translation or transcription elements *in situ*, which was used to simultaneously regulate expression of up to 10 genes in *C. glutamicum* and *Bacillus subtilis*. Strains with improved xylose and glycerol utilization and lycopene biosynthesis were obtained. Second, the CRISPR/Cas9 system was optimized for *C. glutamicum*, facilitating efficient gene deletion, integration, mutation, and genome-scale screening. This system was then used for rational flux-tuning and discovering the first L-proline exporter to *de novo* design and construct an L-proline hyperproducer. The best strain produced L-proline at the highest level to data of 142.4 g/L, 2.90 g/L/h, and 0.31 g/g. The CRISPR-assisted strain development strategy can be used for engineering industrial-strength strains for efficient biomufacturing.

Development of genome engineering technologies for *de novo* design and construction of microbial cell factories

○Yu Wang

(Tianjin Inst. Ind. Biotechnol., Chin. Acad. Sci.)

Key words genome engineering, metabolic engineering, *Corynebacterium glutamicum*, amino acid

3C07-01 Conversion of corn stover into lipids

○Zongbao Zhao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences)

zhaozb@dicp.ac.cn

Lipids especially vegetable oils are important primary commodity for production of foods, oleochemicals and biofuels. While lipids are traditionally produced by plants and animals, the capacity of the traditional approach is limited in terms of quality and quantity to match the ever-growing market demands. Over the past two decades, much attention from academia and industry has been paid to lipids from heterotrophic microorganisms, partially because the production of lipids under controlled conditions offer several advantages. These include utilization of cheap raw materials like lignocellulosic biomass for large-volume production, requirement on much less arable land, accessibility to diverse lipid molecules with engineered hosts, and better compatibility with continuous industrial processes.

However, it remains challenging to produce lipids from lignocellulosic biomass at low costs. We have been working on many aspects of yeast lipid technology to advance this area and reduce the production costs. Specifically, efforts have been devoted to converting corn stover into lipids, for which process optimization has been performed in terms of pretreatment, enzymatic hydrolysis, solid-liquid separation, fermentation, lipid extraction and waste water treatment. Starting from raw corn stover, the process was scaled up and the lipid production step was run in a 1000-L bioreactor to evaluate key parameters. Meanwhile, we developed genetic tools for the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and obtained strains with improved phenotypic profiles to meet the real world applications. Together, we believe that yeast lipid technology will be further developed for sustainable production of biofuels and valuable bio-based products.

Conversion of corn stover into lipids

○Zongbao Zhao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences)

Key words biomass, bioconversion, lipid, pretreatment

3C07-02 Development of high-lipid-producing strain in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Hiroaki Takaku
(Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)
htakaku@nupals.ac.jp

With the exponential increase in human population and economic development, global energy demand is also growing. The primary source of energy worldwide is currently fossil fuels, but the production of these fuels is expensive, and their use produces greenhouse gasses (GHG), which contribute to global warming. An increasingly attractive alternative is the use of biofuels. Biodiesel, one of biofuels, is a renewable fuel comprising of fatty acid methyl esters, helping to reduce the consumption of fossil fuels and the emission of GHG. It is produced by alkali-catalyzed transesterification reaction of vegetable oils and animal fats. Currently, most of biodiesel is produced from edible vegetable oils.

Microbial oils are an attractive resource for biodiesel production, since they do not compete with the global market for food plants. Furthermore, microbial oil production has shown various advantages due to their faster growth rates, high lipid contents, the availability of low cost renewable materials and easy scale-up.

Oleaginous yeasts, one of oleaginous microorganisms, are attractive feedstock for biodiesel production, which can store predominantly triglycerides (TAGs) with fatty acid compositional profiles similar to those of the vegetable oils. The oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is an attractive yeast with great potential in industrial application, since it can accumulate a large amount of TAG to more than 65 % of its dry cell weight, which is produced from several sugars. However, the amount of lipids produced by *L. starkeyi* must be increased for suitable industrial-scale production. Hence, we tried to isolate the mutant cells that produce large amounts of TAG by mutagenizing wild-type *L. starkeyi* cells using ethyl methanesulfonate and then using Percoll density gradient centrifugation (PDGC) to enrich the low-density cells, which were expected to accumulate large amounts of TAG. We obtained five mutant strains (A42, E15, E47, K13, K14) that accumulated higher amount of TAG than the wild-type. Five mutants achieved about 1.5-2.0 times TAG productivity as compared to the wild-type. Among these mutants, only E15 showed significantly higher TAG productivity as well as significantly higher degree of YL/S (lipid to substrate yield) and YX/S (biomass to substrate yield) than the wild-type. Furthermore, we tried to obtain the mutants with higher TAG productivity than the parent strain E15. Three mutants, named E15-11, E15-15, and E15-25, exhibited substantially TAG production than E15 following UV exposure, and they were separated using PDGC. They exhibited approximately 4.5-fold higher TAG productivity than the wild-type. These results indicate that this efficient mutant isolation method using PDGC can produce *L. starkeyi* mutants suitable for industrial use by further breeding the obtained mutants.

We also investigated the poorly known regulatory mechanisms involved in lipogenesis in *L. starkeyi* through the analysis of the obtained mutants with greatly increased TAG productivity. We identified a regulatory protein, LsSpt23p, which contributes to the regulation of TAG synthesis in *L. starkeyi*, using the genome sequence comparison between wild-type yeast and mutants with increased TAG productivity. When *LsSPT23* is overexpressed in *L. starkeyi* they show enhanced TAG productivity compared with the control strain. LsSpt23p upregulated the expression of *GPD1*, which encodes glycerol 3-phosphate dehydrogenase; the Kennedy pathway genes; and citrate-mediated acyl-CoA synthesis pathway-related genes; and *OLE1* encoding $\Delta 9$ fatty acid desaturase. LsSpt23p acted as direct regulator of *SLC1* and *PAH1* in the Kennedy pathway genes, all the citrate-mediated acyl-CoA synthesis pathway-related genes, and *OLE1*. These results imply that LsSpt23p regulates TAG synthesis. We further constructed the *L. starkeyi* mutant overexpressing mutated *LsSPT23* gene (*LsSPT23_mOE*) and assessed its TAG productivity. The TAG productivity of The *LsSPT23_mOE* was increased more than 5-fold, compared with the wild-type. The identification of the regulatory factors involved in metabolism is a promising approach to improve metabolic pathways such as those for lipid production, in which multiple genes are involved.

Development of high-lipid-producing strain in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Hiroaki Takaku
(Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

Key words lipid, oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, transcriptional regulation

3C07-03 Enhanced PET biodegradation by a synthetic consortium

○Shen-Long Tsai
(National Taiwan University of Science and Technology)
stsai@mail.ntust.edu.tw

Due to the low cost and convenience, the extensive utilization of polyethylene terephthalate (PET)- based products has led to unexpected levels of plastic pollution around the world. Several microbes and enzymes have been proven to have the potential to degrade PET. However, the biodegradation of PET by a single enzyme or microorganism is inherently slow. In fact, microorganisms in nature usually work together with other microbial species forming microbial communities to defeat challenging tasks. Here in, a synthetic consortium containing *Bacillus subtilis* and *Ideonella sakaiensis* was developed to efficiently degrade PET. The surfactin produced by *B. subtilis* could enhance the hydrophilicity of PET through its surfactant-like functionality and therefore facilitate the PETase accessibility toward the substrate. These results present an exciting opportunity for the bio-recycling of used plastic waste with upcycling potential.

Enhanced PET biodegradation by a synthetic consortium

○Shen-Long Tsai
(National Taiwan University of Science and Technology)

Key words PET, consortium, hydrolysis, surfactin

3C07-04 Metabolic engineering for bioethanol production from oil palm biomass

○Prayoga Suryadarma
(Dept. Agroind. Technol., Fac. Agric. Technol., Bogor Agric. Univ.)
prayoga@apps.ipb.ac.id

Oil palm cultivation and crude palm oil (CPO) production generate large quantity of biomass that is often categorized as oil palm biomass. Oil palm biomass includes empty fruit bunches (EFB), mesocarps fibers, kernel shells, oil palm frond, oil palm trunks, as well as palm oil mill effluent (POME). Oil palm fronds accounts for 70% of the total oil palm biomass produced, while the EFB accounts for 10% and oil palm trunks accounts for only about 5% of the total biomass produced. Oil palm biomass can be converted into useful bio-products including bioethanol. The development of bioethanol production from oil palm biomass faces many problems including need hydrolyzing the biomass, xylose content in hydrolysate of oil palm biomass, pyruvate as intermediate metabolite, bioethanol as group of metabolite through redox reactions, low ethanol tolerance of bacteria, and need co-enzyme in the bioconversion. The strategies used to solve the problems are the using *Escherichia coli* as host organism, application of bacteria consortia for direct bioconversion of palm oil mill effluent (POME), enhancing ethanol tolerance of *E. coli* by glutamate addition, inducing thiamin (pyruvate decarboxylation co-enzyme) accumulation. The effect formate feeding in the baffled flask shaking culture of BW25113Δ*pta*/p*Hfdh*/p*TadhB-pdc* *E. coli* recombinant could accumulate 8.0 ± 0.3 bioethanol for 24 h. The high cellulolytic indexes were indicated by microbial consortia from Anaerobic 2 and Facultative 1 of Rejosari Palm Oil Mill, Subang District, Indonesia. The high direct bioconversion of lignin and hemicellulose in POME was also shown by the mix culture of these consortias. Meanwhile, the addition of 2 g/l glutamate could induce the ethanol tolerance of *E. coli* recombinant culture from ethanol concentration 20 g/l into 40 g/l. The inducing oxygenation from *kLa* 1.5 to 4.9 minute^{-1} and *rpoS* deletion could enhance twofold thiamin accumulation.

Metabolic engineering for bioethanol production from oil palm biomass

○Prayoga Suryadarma
(Dept. Agroind. Technol., Fac. Agric. Technol., Bogor Agric. Univ.)

Key words oil palm biomass, bioethanol production, metabolic engineering, *Escherichia coli*

3C07-05 What do we need for microbial synthetic biology for fine and speciality chemical production

○Eriko Takano
(University of Manchester, UK)
eriko.takano@manchester.ac.uk

We aim to design and construct micro-organisms with new functionalities by exploiting synthetic biology for metabolic engineering in the context of chemical production. The target chemicals can be exploited as pharmaceuticals, e.g., antibiotics (Breitling et al., FEMS Microbiol Lett. 2021), or as signalling molecules in an engineered microbiome (Connolly et al., Nat. Prod. Rep. 2022). As a first step towards re-engineering the biochemical pathways for enhanced productivity and diversity, we are developing tools for the various steps of the “Design/ Build/ Test/ Learn” cycle of microbial synthetic biology.

1. We are expanding our collection of “Design” tools: computational tools for the detection and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters, and to enrich our library of parts and building blocks for pathway engineering (Del Carratore et al., Commun Biol 2019). We also use computational constraint-based modelling to pinpoint biosynthetic bottlenecks to target for further cellular engineering in a synthetic biology strategy (Amara et al., BMC Genomics 2018).
2. We “Build” enzyme libraries with the aim to understand the interchangeability of biosynthetic parts and have designed and assembled pathways using these parts (Cummings et al., PLOS Biol, 2019). Parts libraries are also the foundation of our attempts for example to engineer orthogonal circuits based on signalling molecule circuits (Biarnes-Carrera et al., ACS Synth Biol 2018).
3. We “Test” and debug our engineered microbes using high-resolution MS analysis, (Nitta et al., Front Bioeng Biotechnol 2020).
4. In the final step, we close the design cycle and “Learn” the rules for efficient design (Jervis et al., ACS Synth Biol 2018).

By exploiting these new tools in an integrated Design/Build/Test/Learn cycle, the Manchester Synthetic Biology Research Centre, SYNBIOCHEM, provides a platform for the high-throughput engineering of fine and speciality chemicals production in microbial systems (Carbonell et al., Communications Biology 2018; Robinson et al., Metab Eng 2020; Dunstan MS et al., Synthetic Biology 2020). This DBTL cycle is further exploited for developing antibiotic high-producer strains of actinomycetes (Del Carratore et al., mSystems 2021) and signalling molecules in engineered *Streptomyces* microbiomes (Connolly et al., Nat. Prod. Rep. 2022).

What do we need for microbial synthetic biology for fine and speciality chemical production

○Eriko Takano
(University of Manchester, UK)

Key words synthetic biology, metabolic engineering, metabolomics, small molecule production

3E06-01 ゲノム編集の研究動向と産業開発

○山本 卓
 (広島大院・統合生命科学)
 tybig@hiroshima-u.ac.jp

ゲノム編集(Genome Editing)は、ゲノム DNA 中の標的遺伝子を塩基配列特異的に切断し、修復過程において自在に遺伝子を改変するバイオテクノロジーである。DNA の二本鎖切断(DSB)には、タンパク質型ゲノム編集ツールである ZFN や TALEN、RNA 誘導型ツールの CRISPR システムが利用されている。中でも 2012 年に発表された CRISPR-Cas9 は簡便で高効率であり、2013 年以降世界中の研究者へ爆発的に利用が広がった。2020 年には CRISPR-Cas9 を開発した 2 人の研究者がノーベル化学賞を受賞している。原理的に全ての生物でこの技術を利用することが可能なことから、微生物での機能性物質の生産、農水畜産物の品種改良から創薬・疾患治療まで多くの分野でゲノム編集を利用した産業開発も進められている。

最近では、DSB を介したゲノム編集に留まらず、DSB を回避した発展技術(転写調節、エピゲノム編集、塩基編集)が開発され、これらの技術の産業利用も視野に入ってきた。特にプライム編集はドナー DNA を必要としない次世代のゲノム編集発展技術として期待されている。本講演では、ゲノム編集の基本原則と最近の技術開発動向について解説する。さらに我々が開発した産業利用可能な新規のゲノム編集ツール(FirmCutヌクレアーゼ)についても紹介する。

Cutting edge and industrial development of genome editing

○Takashi Yamamoto
 (Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words Genome editing

3E06-02 ゲノム編集基本特許の最近の動向

○橋本 一憲
 (弁理士法人セントクレスト国際特許事務所)
 hashimoto@centcrest.com

真核細胞で使用される CRISPR-Cas9 系の基本特許に関するカリフォルニア大学とブロード研究所の発明日の争いが、米国特許商標庁において遂に決着した。ノーベル賞の受賞ではカリフォルニア大学側が勝利を取っていたが、特許の世界では、より早い発明日が認定されたブロード研究所に軍配が上がった。とはいえ、この両者に対しては、シグマアルドリッチ社およびツールジェン社がそれぞれ発明日の争いを開始しており、いまだ最終的な決着が見えていない。一方、日本では、真核細胞で使用される CRISPR-Cas9 系につき、現段階では、カリフォルニア大学が他者よりも広範な基本特許を獲得しており、米国とは状況が異なっている。国によって、なぜ、このような違いが生じているのであろうか。本講演では、CRISPR-Cas9 系の基本特許を中心に最近のゲノム編集特許の動向を説明するとともに、日米における状況の相違とその原因を分析し、今後への影響と見通しに言及する。

Recent trends in genome-editing basic patents

○Kazunori Hashimoto
 (CENTCREST IP ATTORNEYS)

Key words CRISPR-Cas, basic patent

3E06-03 ゲノム編集技術を用いた水産物の品種改良

○梅川 忠典

(リージョナルフィッシュ株式会社)

umekawa@regional.fish

リージョナルフィッシュ株式会社では、昨年9月、世界で初めて国の手続を経たゲノム編集動物性食品として可食部増量マダイ(22世紀鯛)、それに引き続き高成長トラフグ(22世紀ふぐ)について販売を開始している。さらに、グラントの提供や共同研究でアカデミア連携、企業などとの業務提携を通じて、70団体以上と連携して、オープンイノベーションの取組を進めている。

22世紀鯛は、近畿大学が開発した成長の良いマダイをベースに品種改良した。従来の一般的に流通しているマダイに比べて、骨格筋が大きくなり平均1.2倍可食部が増えているのが特徴である。「体が大きくなるのだから必要となる飼料の量も多くなるのではないか」と思われる方もおられると思うが、22世紀鯛が飼料を食べる量が増えるわけではなく、結果として、飼料利用効率が平均して2割改善されている。食感、繊維量が増える結果、個人的な感想だが「もちもち」した食感になっており、食べていただいた方からは、「肉厚の割にソフトな食感でおいしい」といった感想をいただいている。

22世紀ふぐの主な特徴は高成長と飼料利用効率の改善で、通常のトラフグ(従来品種)に比べると、成長速度が1.9倍になっている。また、成長速度の増加に伴い、飼料利用効率が約4割改善されており、飼料コストの節減のみならず、よりサステナブル(持続可能)な養殖が可能になる。

品種改良の歴史を振り返ると、1万年以上と長く、実は現在普段口にされている農産物や畜産物のほとんどが、その長い歴史の中で品種改良されたものであると言われている。

一方で、水産物に関しては、ほとんどが天然種という状況である。まず品種改良の土台となる完全養殖の歴史が50年ほどであることから品種改良が進まず、品種改良したものとしては、近畿大学が30年以上かけて作り出した、成長性を向上させた「近大マダイ」くらいで、品種改良が進んできたとは言いがたい状況であった。

このような状況の中、CRISPR-Cas9の登場を契機に、ゲノム編集技術は水産物にも応用がなされ、2014年、京都大学と近畿大学の共同研究の成果としてゲノム編集技術を利用した可食部増量マダイが誕生した。この「欠失型ゲノム編集」がより多くの皆様にとって分かりやすくイメージしていただけるよう、弊社では「ナノジーン育種」と名付けている。「ナノ」は「10億分の1」を表す言葉で、ごく僅かな遺伝子("ジーン")にのみ働きかけることによって品種改良("育種")を行うことができるという意味を込めている。

弊社は、改良した魚の遺伝的能力を十分に発揮するためには、その魚に合った飼育環境を整えることが重要であると考えている。弊社の社名である「リージョナルフィッシュ」は「地域の魚」という意味で、その地域ならではの品種を作出するとともに、地域の環境に合った生産体系を構築し、地域の養殖業、ひいては日本の水産業の活性化に貢献したいとの想いを込めている。幸いなことに多くの研究機関や高い技術力を持つ企業が弊社の理念に賛同していただき、オープンイノベーション、すなわち、研究機関や企業など70団体以上の知識や技術を積極的に取り込んだ形で技術開発を進めている。

ゲノム編集技術を利用して開発した品種の能力を十分に発揮させるためには、魚にとって快適な水環境を整えることができる効率的な生産体系が大切である。そのため、弊社では、各種センサー、AI(人工知能)、自動化機器などを組み合わせたスマート養殖の技術開発を進めている。

ゲノム編集技術を利用して開発した水産物は、弊社のインターネット通販やふるさと納税サイトから、加工したものを提供している。提供に当たっては、消費者の皆様が購入前にゲノム編集技術や食品としての特徴などをご覧いただいた上で購入いただけるようにしている。また、個々の商品について「ゲノム編集技術を利用して品種改良した」旨表示を徹底するとともに、スマートフォンなどを使えば、その生産・加工履歴や商品の特徴がすぐわかるようにしている。これまで、弊社では可食部が増えたマダイ、成長速度の速いトラフグの提供を始めたが、弊社は「各地の水産業に合った品種改良」を目指しており、他の魚種はもちろんのこと、無脊椎動物も含めて、品種改良を進めてきている。どのような水産物が地域の皆様から求められているかを真摯に考えながら、ナノジーン育種による品種改良をさらに進めていきたい。社名「リージョナルフィッシュ=地域の魚」に込めた想い、すなわち、その地域ならではの水産物がサステイナブルな形で生産できることを通じて、日本の水産業の振興に少しでも貢献させていただければと考えている。

Genome editing breed improvement in aquaculture

○Tadanori Umekawa

(Regional Fish Institute., Ltd)

Key words gene knockout, genome engineering, aquaculture

3E06-04 ゲノム編集技術による機能性トマトの開発と上市

○江面 浩

(筑波大院・生命環境)

ezura.hiroshi.fa@u.tsukuba.ac.jp

ゲノム編集技術は、農作物の迅速改良技術として期待され、利便性や効率の点からCRISPR/Cas9技術が注目されている。2020年12月11日、本技術で開発されたGABA(γ-アミノ酪酸)を高蓄積した機能性トマトの国への届出が完了した。大学発ベンチャー企業により、2021年5月12日に家庭菜園用苗として栽培モニターへの無償提供、同年9月15日には青果販売が始まった。CRISPR/Cas9技術を利用して開発した農作物としては、世界初の上市となった。本講演では、GABA高蓄積トマトの開発、GABA高蓄積トマトの国への届出、上市に向けての取り組みの概要を紹介する。

GABAは、ヒトや動物に対する血圧の抑制作用やリラックス効果が知られていることから、食品の機能性成分として近年利用が進んでいる。我々は、トマトのGABA蓄積の分子機構を詳細に研究し、トマト果実へのGABA蓄積の鍵遺伝子がSIGAD3であることを明らかにし、この遺伝子の自己抑制ドメイン(AID)をコードする領域を削除したSIGAD3遺伝子を果実特異的プロモーターを使って過剰発現することでトマト果実にGABAを高蓄積する技術を開発した。更に、CRISPR/Cas9技術を利用し実験用トマト品種において、内生のSIGAD3遺伝子のAIDドメインをコードする塩基配列の直前に終始コドン変異を導入することでGABA高蓄積化できることも検証した。

さらに当該技術の社会実装を進めるため、大学発ベンチャーを2018年に設立し、同社のCTOとして社会実装の最前線に携わっている。実際の開発では同社が有するトマト品種シリアンルージュの親系統のGABA高蓄積化を行った。続いて、国への届出に必要な実験データや情報収集を行い、厚生労働省、農水省に事前相談を1年間に渡って行い、2020年12月11日に両省への届出を完了した。これにより国内でのゲノム編集食品としての上市が可能になった。

我国では、ゲノム編集農作物の産業利用にあたり、任意ではあるが、開発者は国が定めたルールに従って、関係省庁への事前相談を行った上で、一般栽培を行うために農林水産省への情報提供、食品利用のために厚生労働省への届出、飼料利用のために農林水産省への届出を行うこととなる。事前相談の段階では、各省の依頼を受けた専門家が開発者から提供された情報に基づいて、当該ゲノム編集作物が遺伝子組換え植物に当たらないことや生物多様性への影響がないこと、食品として安全であることが確認される。これらの確認が得られたゲノム編集農作物は各省に正式に届出され、商品化が可能となる。GABA高蓄積トマトも、これらの事前相談を行った上で、届出を行った。

社会実装の手始めとして、GABA高蓄積トマトの第1号の厚生労働省、農林水産省への届出を2020年12月11日に完了し、日本国内での実用化が可能になった。実用化に当たり、この届出系統を親にF1品種としてシリアンルージュハイギャバを開発した。始めに家庭菜園向けにモニターへの苗の無償提供を行った。約2ヶ月で5,000件を超える多数の申し込みがあった。実際の苗の提供は2021年5月12日に開始し、日本全国の4,200件の家庭菜園モニターに苗を提供した。現在、当該ベンチャー企業ではGABA高蓄積トマト品種の拡大に取り組むと共に、トマトの他の重要育種形質のゲノム編集技術によるピラミディングにも取り組んでいる。

開発企業は家庭菜園の栽培モニター用にSNSグループを設置し、モニターと開発者との間で双方向の意見交換できる場を設置した。開発企業はSNSを介して栽培技術の指導や相談を受けるとともに、ゲノム編集作物に関する消費者の意見交換の場とした。開発企業は、家庭菜園モニターに後押しされる形で契約農家での栽培も始め、同年9月にはGABA高蓄積トマトの青果販売を開始し、家庭菜園向け苗の予約販売、さらにはGABA高蓄積トマトの加工品の開発・販売を開始した。この仕組みにより、開発企業は必要とする消費者にGABA高蓄積トマトを直接届けることが可能となった。

ゲノム編集技術は、ライフサイエンスに革新をもたらす技術として注目され、農作物の品種改良分野での先導的利用に期待がかかっている。CRISPR-Cas9技術は、発表後8年という異例の速さでノーベル化学賞に輝いた。この技術に対する世界的な期待の表れである。GABA高蓄積トマトの上市は、世界におけるゲノム編集作物の開発に大きなインパクトを与えている。ゲノム編集技術は、世界の食料の持続的生産システムの構築や食を通じたQOL向上に資する未来技術であり、品種改良技術の一つとして定着していくことを期待する。

Development of functional tomatoes using genome editing technology and its commercialization

○Hiroshi Ezura

(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words GABA, tomato, genome editing, CRISPR/Cas9

3E07-01 植物甘味成分の酵母生産

○關光^{1,2}(¹阪大院・工、²阪大・先導的学際研機構)

hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

植物界がつくる代謝産物は100万種類以上が存在すると推測されており、その一部は、医薬、食品、香料、工業原料などとして利用されている。近年、特殊な植物がつくる様々な有用代謝産物の生合成経路を微生物細胞内で再構築し、植物の採取に依存せずに目的化合物を生産しようとする合成生物学研究が精力的に進められている。

日本をはじめ先進国では高齢化に伴う生活習慣病、なかでも糖尿病患者数の増加が大きな社会問題となっている。糖尿病の大きな要因の一つである肥満は糖尿病だけでなく高血圧など多くの生活習慣病のリスクを高める要因の一つであるため血糖値を上昇させにくい砂糖代替甘味料として、近年特に非糖質系甘味料（一般的に低カロリーやゼロカロリー甘味料などと呼ばれる）への注目が高まっている。非糖質系甘味料は、人工甘味料と天然甘味料に大別されるが天然由来の代表的な非糖質系甘味料として、甘草（カンゾウ）抽出物、ステビア抽出物、羅漢果（ラカンカ）抽出物などが知られている。

甘草は中国東北部から中央アジアおよび南ヨーロッパの乾燥地帯に自生するマメ科の薬用植物で、その根を乾燥させた甘草根は日本国内で販売されている漢方薬の約7割に配合される重要な生薬である。しかしながら、国内使用量の100%を輸入に頼っている。また、主要輸出国の中国では甘草の採取による自生地の砂漠化が問題となっており採取制限をはじめしている。甘草根の主な有効成分であるグリチルリチンはトリテルペン配糖体（サポニン）の一種であり、抗炎症作用、肝機能改善作用、抗アレルギー作用など様々な薬効があるため医薬品や化粧品原料に用いられるだけでなく、砂糖の150倍以上の甘さを持つことから味噌、醤油、菓子類などの食品添加物（天然甘味料）として用いられている。グリチルリチンの生合成には、多くの植物が共通して産生するトリテルペン骨格であるβ-アミリンを酸化する2種のシトクロム P450 酸化酵素（CYP）と二段階の糖転移反応（グルクロン酸転移）を触媒する2種の糖転移酵素が必要となる。最近私達は、グリチルリチン生合成経路において唯一未同定となっていた一段階目の糖転移反応を触媒する糖転移酵素を同定した。これまでの数多くの研究から、トリテルペンを含む多様な植物低分子化合物の配糖体化は、UDP糖依存型配糖体化酵素（UGT）と呼ばれる一群の酵素ファミリーが触媒することが定説となっていたが、トリテルペン骨格にグルクロン酸を転移する配糖化酵素については未解明だった。今回私達は、UGTとは全く異なるセルロース合成酵素スーパーファミリーに属する機能未知タンパク質が多くのサポニンの生合成において鍵となるトリテルペン骨格にグルクロン酸を転移する配糖化酵素であることを突き止めCSyGT（Cellulose Synthase derived-Glycosyltransferase）と命名した。さらに、本酵素遺伝子を含む7個の植物遺伝子を出芽酵母に導入することで、グリチルリチンの *de novo* 合成に成功した。しかしながら、酵母によるグリチルリチン製造の実用化には生成量の劇的な向上が求められる。本講演では、酵母を用いたグリチルリチン関連物質製造を実現するためにクリアすべき課題、および、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成を受けて現在進めているプロジェクト「微生物によるグリチルリチン酸および類縁体の生産システム実証」における演者らの取り組みについて紹介するとともに、ステビオシド、モグロシドといったグリチルリチン以外の天然甘味成分の微生物生産に関する海外の研究動向についても紹介する。

Microbial production of plant-derived natural sweeteners

○Hikaru Seki^{1,2}(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words synthetic biology, terpenoid, plant, yeast

3E07-02 植物酵素を利用した有用物質の生物変換

○田口 悟朗

(信州大・繊維)

gtagtag@shinshu-u.ac.jp

植物は、生理活性の高い特化代謝産物など、多種多様な化合物を種特異的に生産する。これらの化合物は、さらに水酸化、配糖化、アシル化、メチル化などの修飾反応を受けて蓄積される。近年のゲノム解析の進展により、植物には哺乳類や酵母などの他の真核生物に比べてこれらの修飾酵素遺伝子がはるかに多く存在することが明らかとなった。さらに、それら酵素の解析により、植物の様々な代謝産物の生合成機構が明らかにされている。一般に特化代謝に関与する酵素は基質に対して比較的厳密な位置特異性と立体特異性を有していることから、特定の化合物の生産に有利である。しかし、これら酵素の利用では、抽出後に不安定であることや、高価な補酵素等が必要であることが課題となっている。

配糖化は植物で最も主要な修飾反応であり、その反応を担う UGT は各植物のゲノム中に100以上存在する。UGTはUDP-糖を糖供与体として化合物に糖を転移する酵素であり、O-配糖体のほか、N-、S-、カルボキシまたはC-配糖体を生成する。その結果として化合物の物性が変化し、特に水溶性が大きく向上するほか、安定性の向上や生物活性の変化が起こる。そのため、UGTを用いた配糖体合成は医薬品、化粧品、機能性食品などへの応用が期待されている。

これらの酵素活性を活かした物質変換として、植物細胞や毛状根に化合物を投与して変換させる生物変換が行われてきており、一定の成果が得られている。しかし、得られる生成物が限られることや、目的化合物への変換率が低い、細胞壁への重合などの副反応によるロスがある、など課題も多い。

そこで最近では、植物由来の酵素を発現する大腸菌や酵母などの微生物をそのまま触媒として利用する「Whole-Cell Biocatalyst」が種々検討されている。このシステムでは目的の酵素活性が得られるほか、酵素が安定化される、高価な補酵素等が細胞から供給されるなど、種々の利点がある。その一方で、しばしば投与化合物の細胞内への取り込みや分解が課題となるため、その対策も必要である。

本発表では、植物酵素を発現させた Whole-Cell Biocatalyst による種々の有用物質の生物変換について、我々が報告したフラボノイド C-配糖体の効率的な合成^{1,2}など、配糖化酵素を利用した配糖体の合成を中心にいくつか事例を紹介するとともに、植物酵素の応用の可能性について議論したい。

¹Ito et al. (2014) Plant Biotechnol 31:519-524, ²Dorjjugder et al. (2021) Biotechnol Lett 43:1913-1919.

Bioconversion of valuable compounds by microorganism expressing plant enzymes

○Goro Taguchi

(Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

Key words bioconversion, plant enzyme, glycosylation, whole cell biocatalyst

3E07-03 植物を用いたタンパク質生産の過去と現在

○梶浦 裕之, 藤山 和仁
(阪大・生工国際セ)
kajiura@icb.osaka-u.ac.jp

一般的に異種タンパク質生産を行う際、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞が広く利用されてきた。ところが、そこに植物(細胞)という選択肢はこれまでなかった。遺伝子組換え植物が初めて作製されてから約40年が経つ。この初めての遺伝子組換え植物は、酵母由来のADHをタバコに導入するというものであった[1]。その後、1989年に植物での医療用タンパク質として抗体がタバコで発現され[2]、植物を用いた医薬品(plant-made pharmaceutical, PMP)生産に向けた研究が幕開けを迎えた。しかし、医療用タンパク質生産において植物(細胞)が従来利用されてきた宿主に取って代わることはなかった。植物(細胞)での物質生産における最大の弱点は、遺伝子導入から安定株を得るまでにかかる時間と、その生産量の低さである。また、医療用タンパク質生産に注目した場合、植物は動物とは異なる翻訳後修飾を持つため、植物で生産したタンパク質が本来の機能とは異なる生理活性を示す可能性が示唆されてきた。これら欠点を克服しない限り、植物を用いたPMP生産、特に実用的な医療用タンパク質の著量生産は難しいと言えた。

このような状況下で、1997年にアグロバクテリウムを減圧条件下で植物の葉に導入し、植物でタンパク質を一過的に発現する手法、いわゆる“vacuum infiltration”が報告された[3]。この手法が植物でのタンパク質生産のエコックメイキングとなった。その後、2005年にvacuum infiltrationとウイルスベクターの併用による、“magnification”という方法が報告され、生産したタンパク質(GFP)が発現後7日程度で全可溶性タンパク質の40%にも達した[4]。2014年にアフリカで流行したエボラ出血熱の治療薬として開発が進められていた抗体が、実際に本手法により植物で迅速に製造され、臨床試験前であったものの患者に対し効果を発揮したことも記憶に新しい。この技術が広まり、それまで主流であった医療用タンパク質生産に向けた形質転換植物を作製するという取り組みは少なくなりつつある。現在、欧米での植物による医療用タンパク質生産はこの一過的発現が主流であると言っても過言でない。

植物による医療用タンパク質生産の追い風となった例が、2012年にイスラエルのProtalix Biotherapeutics社がニンジン培養細胞で製造したヒト用のゴージェ病治療薬である。このゴージェ病治療薬は植物で製造された医療用タンパク質として初めてアメリカ食品医薬品局から承認を受け、上市された[5]。これら技術開発と医薬品としての認可が植物での医療用タンパク質生産に関する研究を加速させた要因となっていることは間違いない。

このような植物での物質生産における技術革新が進む中で、我々は次に求められるであろうタンパク質の“品質”への寄与が大きい翻訳後修飾、中でも糖鎖修飾に注目してきた。糖鎖がタンパク質の特定のアミノ酸に結合する糖鎖修飾は、タンパク質の生理活性、機能調整等に影響を及ぼすことが知られている。このタンパク質の糖鎖修飾では、動物と植物で異なる構造の糖鎖を持ち、特に植物型糖鎖に特有の糖残基がアレルゲンとなることも示唆されている。そこで我々はアレルゲンとなる糖を含まず、さらにその糖鎖の構造が均一化された植物を生み出した[6]。また、植物体、培養根、一過的発現による糖鎖構造の変化、植物の糖鎖修飾変異体の利用、また異なる医療用タンパク質生産をとおし、植物の糖鎖修飾制御と、よりよい植物での医療用タンパク質生産のプラットフォーム構築、PMPの高付加価値化に向けた取り組みを進めてきた。

タンパク質を分子と見なし、医療用タンパク質などを植物で生産するための育種、“Molecular farming”に向けた更なる取り組みの多様化が求められている。植物での医療用タンパク質を含むPMP生産は今後さらに注目される研究分野となることは間違いない。

References

- [1] Barton et al., *Cell*, 32, 1033-1043, (1983).
- [2] Hiatt et al., *Nature*, 342, 76-78, (1989).
- [3] Kapila et al., *Plant Sci.*, 122, 101-108, (1997).
- [4] Marillonnet et al., *Nat Biotechnol.*, 23, 718-723, (2005).
- [5] Fox, *Nat Biotechnol.*, 30, 472-473, (2012).
- [6] Limkul et al., *Plant Biotechnol J.*, 14, 1682-1694, (2016).

Trends of protein production in plants

○Hiroyuki Kajiura, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words protein production in plant, transient expression, plant made pharmaceutical

3E07-04 UV-LEDによる植物代謝産物の増産

○岡澤 敦司¹, 鶴本 智大², 藤川 康夫²
(¹大阪大院・農,²日亜化学工業)
okazawa.atsushi@omu.ac.jp

植物は、光を光合成のエネルギーとして用いると同時に、環境からのシグナルとして感知し、その変化に種々の生理反応を介して対応している。波長毎に異なる光受容体が働いており、中心的に機能している光受容体として、赤/遠赤色光を感知するフィトクロム、青色光を感知するクリプトクロムおよびフォトトロピン、ならびに紫外線を感じするUVR8が知られている。植物による物質生産において効率よく光合成を行わせることはもちろんのこと、これら光受容体からのシグナル伝達を活用することで、生産能を最適化できると考えられる。特に、閉鎖型の植物工場において、光の制御によるバイオマスおよび機能性代謝物生産向上が試みられている。植物工場においても居住空間と同様に、発光ダイオード(LED)が省電力型の光源として普及している。植物工場におけるLED利用のさらなる利点として、光源の波長域が比較的狭く、光源の組合せによって任意の光環境を作り出せる点が挙げられる。これまでの種々の試みにより、青色光によって芳香族化合物、イソプレノイドおよびアルカロイドといった植物二次代謝産物の作物中もしくは薬用植物中の含量が高まることが報告されている。また、赤色光は、アルカロイドの他にアミノ酸や糖質などの一次代謝産物に大きな影響を与えることが報告されている。演者らは、研究開始当初、実施例の少なかった紫外線に着目し、ナローバンドUV-LEDが植物の代謝に及ぼす影響を検討した。

予備実験として、270、280、300、310 nmにピークを有するUV-LEDをシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に照射したところ、280 nmの照射による顕著なアントシアニン含量の増加が確認された。そこで、280および310 nmを照射したシロイヌナズナについて、トランスクリプトーム解析およびメタボローム解析を実施した。その結果、予備実験の結果と同様に、310 nmを照射したシロイヌナズナと比較して、280 nmを照射した植物において、顕著な遺伝子発現の変動が確認された。変動が確認された遺伝子群についてオントロジーエンリッチメント解析を行ったところ、280 nmを照射したシロイヌナズナでは、ストレス応答と二次代謝に関わる遺伝子群の発現が変化していることが明らかになった。メタボローム解析においても、280 nmを照射したシロイヌナズナで代謝物含量の変化が顕著であった。一次代謝では、TCA回路、脂質代謝およびポリアミン代謝関連化合物の含量に大きな変化が見られた。また、シキム酸経路の下流の芳香族化合物についても変化が確認された。含量に変化が見られた代謝経路について、トランスクリプトームデータを精査すると、特に一次代謝関連遺伝子では280 nmを15 min照射し、その後2日間暗所においたシロイヌナズナで顕著な発現量の増加が確認された。この変化に対するUVR8光受容体の関与を調べるために、UVR8過剰発現ラインならびにゲノム編集によるノックアウトラインを作成し、280 nm照射の影響を解析した。その結果、少なくともポリアミン代謝における遺伝子発現の変化はUVR8非依存的に誘導されていることが明らかになった。芳香族化合物の生合成に関して、同様にトランスクリプトームデータを精査したところ、興味深いことに280 nmの照射は、フェニルプロパノイド経路の上流で働くフェニルアラニンアンモニリアーゼ(PAL)や桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ(C4H)の遺伝子発現を誘導していたものの、下流のカルコシナーゼ(CHS)やカルコニイソメラーゼ(CHI)の遺伝子発現を誘導していなかった。また、UVR8シグナル伝達経路で中心的な役割を担うことが知られている転写因子HY5の遺伝子発現は280および310 nmの照射で同様に誘導されることも明らかになった。以上より、280 nmで特異的に誘導される遺伝子の発現には、これまでに知られているUVR8シグナル伝達経路以外のシグナルが関与していることが示唆された。

演者らは、並行して作物に対してもUV-LED照射の効果を調べており、大阪の特産品の一つであるブドウについて、その代謝物の変動を解析した。過去の研究事例などから、290 nm UV-LEDを光源として選択し、その照射が代謝に与える影響を解析した。その結果、高照度の290 nm照射は、芳香族化合物の中でも特異的にスチルベノイドの含量を増加させることが明らかになった。マスカットベリーAに225,000 μmol/m²の290 nmを照射したところスチルベノイドであるレスベトロール含量が0.1 mg/g DWから1 mg/g DWにまで増加した。同様の効果はシャインマスカットやデラウェアでも確認されたことから、高照度290 nmの照射は、ブドウの品種を問わずレスベトロール含量を特異的に増加させることが明らかになった。なお、その照射はブドウの糖度や酸度には影響を与えないことも確認できた。

以上、演者らは植物のUV-B応答を詳細に解析するための光源としてのUV-LEDの有用性を示し、実際にその照射が作物の機能性成分含量を増加させることを確認した。今後は、今までに知られていない植物のUV-B応答に迫るとともに、作物の高付加価値化や有効利用を目指した実用化研究を展開したい。

Boost in production of plant metabolites by UV-LED

○Atsushi Okazawa¹, Tomohiro Tsurumoto², Yasuo Fujikawa²
(¹Grad. Sch. Agric., Osaka Metro. Univ., ²Nichia Corp.)

Key words LED, *Arabidopsis thaliana*, metabolism, transcriptome

Key words protein production in plant, transient expression, plant made pharmaceutical

3G06-01 第一三共のマルチモダリティ戦略における次世代抗体とその製造プロセス

○野中 浩一
(第一三共株式会社)
nonaka.koichi.k2@daiichisankyo.co.jp

バイオ医薬品の歴史は、1980年代に内在性の生理活性物質を遺伝子組み換え技術を用いて生産したヒトインスリン製剤の上市に始まり、ブロックバスターとなったヒトインターフェロン α 製剤・ β 製剤、ヒトエリスロポエチン製剤などの開発へとつながった。これら初期のバイオ医薬品は、不足した生体成分を補うことによって治療を目指すものであった。その後、がんや自己免疫疾患等を対象として、疾患関連分子に特異的に結合する抗体医薬品の開発が、マウス抗体 muromonab-CD3(Orthoclone OKT3)を契機に始まり、1990年代に rituximab (Rituxan/MabThera)や infliximab (Remicade)などのキメラ抗体が開発され、さらに trastuzumab (Herceptin)や bevacizumab (Avastin)などのヒト化抗体の承認へと続いた。2000年以降、adalimumab (Humira)や nivolumab (Opdivo)などのヒト抗体が承認され、現在、日米欧で承認された抗体医薬品は110以上となった。特に、2000年以降の開発は目覚ましく、世界の売上げトップ10にランクされる医薬品の約半数を抗体医薬品が占めている。2021年の上位10製品には、ヒュミラ(1)、キイトルーダ(2)、ステララー(7)、オプジーボ(9)の4品目がランクされており、抗体医薬品は非常に重要なモダリティとなっている。

第一三共は、2013年の旧バイオ統括部の発足の下、抗体をはじめとしたバイオロジクスの開発、治験原薬の供給体制が確立され、第一段階として naked 抗体の開発を本格的に開始した。さらに第二段階として高機能化した抗体である次世代抗体の開発にも着手し、現在、第三段階として多くの新規モダリティの開発を推進できる体制(マルチモダリティ戦略)が構築されている。このような状況の中で、本発表では特に次世代抗体医薬品の開発とその製造プロセスについて焦点を当てる。次世代抗体医薬品は、分子構造的には天然の抗体分子を活用し、そこに低分子化合物を付加する、複数種類のパーツを合わせるなど、天然型の抗体には存在しない機能を実現しようとしたものであり、抗体薬物複合体(ADC: Antibody Drug Conjugate)、二重特異性抗体(bsAb: Bispecific Antibody)、改変抗体、低分子化抗体等、がある。2020年1月に米国で上市された Trastuzumab Deruxtecan は自社独自のペイロードを持つ ADC (DXd-ADC)であり、特定のがん細胞に発現している抗原タンパク質に特異的に結合する抗体と抗がん作用のある低分子化合物、そしてその低分子化合物を抗体に結合するリンカー技術からなる。本 DXd-ADC 技術では、化合物とリンカー技術はプラットフォーム技術として利用できるため、抗体を変えることによって様々ながんに対する ADC を開発することが可能となり、複数のプロジェクトが進行している。また、bsAb に関しては、海外企業との共同研究およびクロスライセンス契約によって開発を促進している。さらに、高機能化を目指す次世代抗体では、プロセッシングによって抗体を改変している。

抗体医薬品/バイオロジクス、次世代抗体医薬品の開発において重要な点は、原薬もしくは原薬中間体となる抗体部を早く効率良く製造・供給することである。生産系としては、遺伝子組換え技術等を応用して、実績のある CHO (チャイニーズハムスター卵巣)細胞を宿主として使用することがほとんどである。高い治療効果への期待とともに次世代抗体医薬品の開発はさらに激化の一途をたどっており、より効率的に開発を進めて臨床試験を開始するためには、確実かつ短期間で抗体製造プロセスを開発し、抗体部を製造・供給することが極めて重要となる。それを達成するための重要な技術要素は、迅速な細胞基材の開発であり、加えてこれまでとは異なる思想で製造プロセスを考えることである。抗体製造プロセスの高速化に向けた技術要素としての新規 CHO 細胞発現系の開発、及び次世代抗体医薬品のプロセッシングに重要な酵素の発現系としての酵母発現系の開発、以上2つの発現系について当社が開発した製造技術を紹介する。

Next-generation antibody drugs in Daiichi-Sankyo's multi-modality strategy and applied manufacturing process

○Koichi Nonaka
(Daiichi Sankyo Co., Ltd.)

Key words next-generation antibody drug, antibody drug conjugate, manufacturing process, expression system

3G06-02 タンパク質工学を駆使した多重特異性抗体の開発

○浅野 竜太郎
(農工大院・工)
ryutaroo@cc.tuat.ac.jp

抗体医薬品開発が進む一方で、特にがん治療領域においては、必ずしも満足のいく治療効果は得られていない。このため近年より強い薬効を得るために、次世代抗体のモダリティ開発が活発化しており、主だったものとしては、二重特異性抗体、抗体薬物複合体(ADC)、さらにはキメラ抗原受容体発現 T 細胞(CAR-T)療法が挙げられる。二重特異性抗体は開発の歴史は長いものの、CAR-T 療法に比べると治療効果は劣るとされる。一方で、CAR-T 療法の薬価の高さは、改変した細胞のオーダーメイド調製が必要な点で、容易には改善し難い。このため、二重特異性抗体やそのスクリーニング技術などの関連技術の開発も再燃しており、また薬効を高めるための更なる特異性を付与した多重特異性抗体の開発もトレンドとなっている。次世代抗体のモダリティ開発において、高めた治療効果故の副作用の低減を目指した“プロドラッグ化”も開発トレンドのひとつである。例えば、がん組織に送達する前はオフターゲット効果を低減させるために抗体をマスクしておき、がん組織送達に呼応して、マスクを外すというデザインが考えられる。この際、がんで亢進しているプロテアーゼの認識サイトがしばしば利用されている。

我々は、長年二重特異性抗体の開発に従事してきたが、多重特異性化、プロドラッグ化にも近年着手している。二重特異性抗体の中で IgG 抗体様のモダリティを有する分子は、抗体医薬製造におけるゴールドスタンダードである CHO 細胞を用いた発現とプロテイン A を用いた初期精製をそのまま適用可能である。一方で、次世代抗体のモダリティの中には低分子抗体も多く含まれ、近年少しずつ認可例も増えている。必ずしも微生物を用いた調製を指向しているわけではなく、低分子抗体であっても CHO 細胞が用いられている例もあり、実際開発期間等を考慮しなければ製造コスト自体はあまり宿主間で違いはない。そこで、我々はプロテイン A を用いた低分子抗体の精製に着目した。プロテイン A 自体の改変もひとつのストラテジーではあるが、既存の製造プロセスをそのまま使う、という観点から低分子抗体側の改変を進めた。本発表では、次世代抗体のモダリティ開発を概説した後、タンパク質工学を駆使した二重特異性抗体の開発、およびその多重特異性化とプロドラッグ化、さらには低分子抗体のプロテイン A 精製を用いた改変に関する我々の最近の取り組みを紹介する。

Development of multispecific antibodies using protein engineering

○Ryutaroo Asano
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words antibody, recombinant protein, protein engineering, antitumor

3G06-03 抗体医薬精製プラットフォームプロセス：その進化と今後の展望

○山本 修一
(山口大・工)
shuichi@yamaguchi-u.ac.jp

抗体医薬は複数の液体クロマトグラフィー(LC)、膜分離、ウイルス不活化・除去操作を含む複雑な精製プロセス(DSP: Downstream process)で精製される。しかしながら、他のバイオ医薬品とは異なり、対象が標準の抗体であれば基本となる DSP を構築しておけば、各操作の多少の条件変更により新しい抗体に対する DSP を比較的容易に開発できる。

このような DSP はプラットフォームプロセスと呼ばれ、各バイオ医薬品メーカーが開発し保有している。プラットフォーム DSP P 設計に必要なデータの取得方法もハイスループット方法を含めて進化してきており、実験回数と実験時間の大幅な削減が可能になっている。このような迅速 DSP 開発については、メカニスティックモデルの利用によりさらに実験回数の削減が可能となり、究極的には数回の実験による開発・設計が期待されている。

DSP は多数の回分式操作を逐次遂行するので効率が低く、また最終製品が得られるまでに長時間(2-3 日)を必要とする。各操作を連続化し、連結することによりプロセス効率化とともに品質向上を達成することができる。ただし、連続操作条件の設定や連結方法の確立は容易ではなく、上述したメカニスティックモデルの活用が必要である。

DSP は培養プロセスと比較するとメカニスティックモデルによるモデル化・シミュレーション手法の研究が進んでおり、PC の高性能化にともない、実験をせずに多くの条件での分離挙動を検討することができる。しかしながら、モデルシミュレーションに必要なパラメーター数は多く、それらの妥当な値の推算方法については迅速実験方法や推算式を含めて、さらに開発していく必要がある。

References

Simplified methods based on mechanistic models for understanding and designing chromatography processes for proteins and other biological products -Yamamoto Models and Yamamoto Approach- in "Preparative chromatography for separation of proteins", Chapter 4, pp, 111- 157, Wiley, 2017

簡単化したモデルによる食品プロセスの解析に関する研究－乾燥とクロマトグラフィー
日本食品工学会誌, 20, 81-97(2019) DOI:10.11301/jfsf.19557C

Prediction of the performance of capture chromatography processes of proteins and Its application to the repeated cyclic operation optimization.
J.Chem.Eng. Jpn., 53, 689-697(2020) DOI:10.1252/jcej.20we116

A regressive approach to the design of continuous capture process with multi-column chromatography for monoclonal antibodies.
J.Chromatogr. A., 1658, 462604(2021) DOI:10.1016/j.chroma.2021.462604

Linear flow-velocity gradient chromatography-An efficient method for increasing the process efficiency of batch and continuous capture chromatography of proteins. Biotechnol. Bioeng., (2020) DOI: 10.1002/bit.27649

Accelerated method for designing flow-through chromatography of proteins
J.Chem.Eng. Jpn., 53, 206-213(2020) DOI:10.1252/jcej.20we002

Optimization of flow-through chromatography of proteins
J.Chem.Eng. Jpn., 53, 214-221(2020) DOI:10.1252/jcej.20we003

Platform downstream process of antibodies: Its evolution and future direction

○Shuichi Yamamoto
(Fac. Eng., Yamaguchi Univ.)

Key words protein, monoclonal antibody, downstream process, chromatography

3G06-04 次世代抗体医薬品の効率的実用化推進のための品質管理手法研究

○石井 明子
(国立医薬食衛研)
watabe@nihs.go.jp

新規な作用機序、構造、製法を特徴とする次世代抗体医薬品の開発が進展している。未知未経験の要素が多い次世代抗体の効率的な開発には、リスク低減策を適切に講じるため、技術開発と規制の連携が重要となる。演者らは、AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業(国際競争力のある次世代抗体医薬品製造技術開発)において、次世代抗体の開発推進と品質確保のため、MAB 組合を含む国内の多機関と連携して、連続生産に関する留意点文書の作成や先端技術を用いた品質評価法の確立を行っている。

連続生産に関しては、バッチ生産と異なる連続生産の特徴をもとに、製品品質の確保の上で留意すべき事項をまとめ、「バイオ医薬品の連続生産に関する Points to Consider」として 2021 年 6 月に公表した(奥平真一ら PDA Journal of GMP and Validation in Japan 23, 13-22, 2021)。本文書には、バイオ医薬品の連続生産において特に留意すべき事項、バイオ医薬品の連続生産における管理戦略、バイオ医薬品の連続生産におけるプロセスバリデーション、安定性試験に関する留意事項が含まれる。バイオ医薬品の連続生産において特に留意すべき事項としては、製造工程における製品の品質特性及び工程特性のモニタリング、連続生産に特有の製造工程中の要素、稼働時間の長期間化に伴うリスク管理、培養工程における State of Control を達成するための方法論、Process Dynamics を検討する必要がある工程/設備設計、スタートアップ/シャットダウン、逸脱時の取扱い、ロットの定義を取り上げ、連続生産の実用化に向けて課題となる項目について、推奨される事項を述べた。

その後、次世代抗体の品質評価に有用と考えられる各種分析技術の開発に関する検討を進めると共に、バイオ医薬品製造に用いられる細胞基材の構築・評価・管理に関する要件に関して、ICH Q5B「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析」ガイドラインおよび Q5D「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」ガイドライン以降に蓄積された知見や最新の技術開発動向を踏まえた議論を行っている。本講演では、AMED 研究班におけるこれらの取り組みについて紹介する。

Studies on characterization and quality control strategies of next-generation therapeutic antibodies toward accelerating the product development

○Akiko Ishii-Watabe
(Natl. Inst. Health. Sci.)

Key words antibody

3G07-A1 <受賞講演 (生物学アジア若手賞)>

Nanoscale liposomes encapsulating oxygen saturated buffers for the reverse of hypoxia and drug delivery○Jonghoon Choi^{1,2,3}¹Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ²Dept. Chem. Bio. Eng., Univ. of Pennsylvania, ³Nanomedicine Corp.)
nanomed@cau.ac.kr

Hypoxic microenvironments emerge as tumor grow, leading to the over-expression and stabilization of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1a). HIF-1a lowers the sensitization against chemotherapy, radiation therapy and photodynamic therapy in cancer. In this study, nano-sized oxygen carrier, namely oxygen dissolved nanoliposome (ODL) was synthesized, and oxygen was efficiently delivered to different types of mammalian cells to help relieve hypoxia. ODL confirmed that oxygen was released without inducing toxicity to cells. After artificially creating hypoxia in cancer cells, normal cells, and immune cells; various parameters such as cell morphology, HIF-1a expression, and degree of hypoxia were examined. The cellular environment was found to be altered by treatment with the ODL. Under hypoxia, the shape of the cells changed, and the cells began to die. After treatment with the ODL, the degree of hypoxia was reduced, indicating that HIF-1a expression and the rate of cell death decreased. Furthermore, bacteria proliferation was observed with the ODL. Therefore, ODL can be used for oxygen delivery platform in cancer therapy. ODL has a potential application in other microorganisms which needs future research.

Nanoscale liposomes encapsulating oxygen saturated buffers for the reverse of hypoxia and drug delivery○Jonghoon Choi^{1,2,3}¹Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ²Dept. Chem. Bio. Eng., Univ. of Pennsylvania, ³Nanomedicine Corp.)**Key words** oxygen nanoliposome, hypoxia, cancer, drug-delivery

3G07-01 <招待講演 (韓国生物工学会)>

Novel nanomaterials for the detection and elimination of antibiotics resistant pathogenic microbes and biofilms○Jonghoon Choi^{1,2,3}¹Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ²Dept. Chem. Biomol. Eng., Univ. of Pennsylvania, ³Nanomedicine corp.)
nanomed@cau.ac.kr

There are numerous issues associated with bacteria, particularly biofilms, which exhibit a strong resistance to antibiotics.

This is currently considered an urgent global issue owing to the lack of effective treatments. Graphene oxide (GO) nanosheets are two dimensional carbon materials that are available as a substrate for metal nanoparticles and have a lower release rate of metal ions than free metal nanoparticles by regulating the oxidation of metal nanoparticles, which is known to reduce the cytotoxicity caused by the free metal nanoparticles. Over centuries, metal particles, including Ag and Cu, have been considered as antibacterial agents. In this study, Ag and Cu bimetallic nanoparticles on a GO surface (Ag/Cu/GO) were synthesized using a chemical reduction method, and their antimicrobial effects against several bacterial species were demonstrated. Ag/Cu/GO nanocomposites were characterized by transmission electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. The in vitro cytotoxicity of an Ag/Cu/GO nanocomposite was evaluated in human dermal fibroblasts, and its antibacterial activity against *Methylobacterium spp.*, *Sphingomonas spp.*, and *Pseudomonas aeruginosa* was also tested. The synthesized Ag/Cu/GO nanocomposite was able to eradicate all three bacterial species at a concentration that was harmless to human cells. In addition, Ag/Cu/GO successfully removed a biofilm originated from the culturing of *P. aeruginosa* in a microchannel with a dynamic flow. In a small-animal model, a biofilm-infected skin wound was healed quickly and efficiently by the topical application of Ag/Cu/GO. The Ag/Cu/GO nanocomposites reported in this study could be used to effectively remove antibiotic-resistant bacteria and treat diseases in the skin or wound due to bacterial infections and biofilm formation.

Novel nanomaterials for the detection and elimination of antibiotics resistant pathogenic microbes and biofilms○Jonghoon Choi^{1,2,3}¹Dept. Biomed. Eng., Chung-Ang Univ., ²Dept. Chem. Biomol. Eng., Univ. of Pennsylvania, ³Nanomedicine corp.)**Key words** antibacterial, biofilm, Ag/Cu nanomaterials, carbon nanomaterials

3G07-02 Applications of cell-free protein synthesis for generation and characterization of monoclonal antibody: versatile tool of nanomedicine

○Hideo Nakano, Teruyo Ojima-Kato
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

Monoclonal antibody(mAb) is used in a variety of fields, including research, diagnostics, pharmaceuticals, and is especially important in the area of nanomedicine, because cell- or organ-specific targeting is often implemented by mAb. Hybridoma and phage display technologies have been used for the acquisition mAb for several decades, however, single B cell technology, which contains PCR amplification of antibody cDNA from single B cells, has been developed in a past decade and now used for the generation of human anti-COVID-19 antibody. As a variety of single B cell technology, we have developed the "Ecobody technology," a novel mAb acquisition system that can rapidly obtain a single B cell-derived antibody gene including an antigen-binding fragment (Fab).^{1,2)} First, B cells are obtained from animal or human blood or lymph nodes, and the B cells that bind to the antigen of interest are concentrated using a cell sorter or magnetic beads coated with antigen. Then, the Fab regions of the L and H chains of the antibody in each cell is amplified by RT-PCR and PCR. The amplified DNA fragment is modified to include the DNA sequences necessary for expression in the *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system, followed by synthesizing Fab with *E.coli* cell-free protein synthesis system. Thus synthesized Fab is used for multiple assays like ELISA, immunostaining etc. Since all process in Ecobody technology can be easily automated through a simple process of adding and mixing reagents, it can dramatically increase the throughput of monoclonal antibody acquisition. Here we would like to introduce examples for mAb acquisition to anti-GPCR mAb using DNA immunization, and anti-spike protein of COVID-19 from human patient. In addition, ribosome display (RD), a tertial complex of mRNA-ribosome-protein is superior than any other display technologies in its library size. Combination of bioinformatic analysis of NGS results of RD will enable cost effective epitope mapping and affinity maturation of mAbs. These technologies will contribute the creation of mAb suitable for nanomedicine area.

- 1) Ojima-Kato, T., Nagai, S., and Nakano, H. (2017) Sci. Rep. 7, 13979
- 2) Ojima-Kato, T., Morishita, S., Uchida, Y., Nagai, S., Kojima, T., and Nakano, H. (2018) Antibodies 7, 38

Applications of cell-free protein synthesis for generation and characterization of monoclonal antibody: versatile tool of nanomedicine

○Hideo Nakano, Teruyo Ojima-Kato
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words monoclonal antibody, single-cell PCR, cell-free protein synthesis

3G07-03 <招待講演 (韓国生物工学会)>

Controlling diffusion for *in vitro* human intestinal model systems

○Raehyun Kim¹, Yuli Wang², Nancy Allbritton²
(¹Hongik Univ., Korea, ²Univ. Washington, USA)
raehyunkim@hongik.ac.kr

Controlling diffusions of bioactive substances is one of the critical factors for recapitulating the complexity and physiological features of the *in vivo* tissues. The intestinal epithelium is one of the complex tissues that consist of multiple cell types with distinct functions, including proliferative cells (stem cells, transit amplifying cells) and differentiated cells with absorptive or secreting functions (enterocytes or colonocytes, goblet cells, enteroendocrine cells). The spatial distributions and homeostasis of the *in vivo* intestinal epithelium are regulated by local concentrations of various biochemical cues such as host cell-derived growth-promoting factors (e.g., Wnt, R-spondin, Noggin) and differentiation-promoting factors (e.g., BMPs), gut bacterial metabolites, other biochemicals such as oxygen, water, and ions. To recapitulate the complexity of the *in vivo* intestinal tissue, spatial concentrations of these biochemical cues should be appropriately manipulated. Conventional *in vitro* culture models have limited ability to control concentrations of biochemicals leading to mostly simple models lacking the complexity of the *in vivo* tissue.

Here we present intestinal epithelial model systems that recapitulate the key physiological features and complexity of the *in vivo* tissue by manipulating the concentrations of the biochemical cues. Particularly, we fabricated a 2-D model system that recapitulates the spatial segregation of the proliferative and differentiated cells of the intestinal epithelium. Collagen-overlaid microhole array was developed to generate the gradients of growth-promoting factors. Culturing the primary intestinal epithelial cells on this collagen overlaid microhole array formed the "flat crypt" model that possesses the "proliferative regions" over the microholes and "differentiated regions" outside the microholes. Importantly, this flat crypt model system mimicked the *in vivo*-like cell migration from the proliferative regions to the differentiated areas and associated differentiation during the migration.

Moreover, cells in the flat crypt responded to short chain fatty acids, the well-known gut bacterial metabolites reported *in vivo*, demonstrating the potential for a new screening platform. The controlled distributions of multiple cell types, as well as simplicity, easy fabrication, and low maintenance of this flat crypt model, make this flat crypt model attractive for *in vitro* screening and testing. It also provides a new way of recreating concentration gradients of biochemicals that can be applied to other tissues.

Controlling diffusion for *in vitro* human intestinal model systems

○Raehyun Kim¹, Yuli Wang², Nancy Allbritton²
(¹Hongik Univ., Korea, ²Univ. Washington, USA)

Key words epithelial cells, diffusion, *in vitro* model system

3G07-04 <招待講演 (台湾生物工学会)>

Bio-inspired zwitterionic polymeric chelating assembly for treatment of copper-induced cytotoxicity and triggered-release drug delivery

○Chun-Jen Huang
(Dept. Chem. & Mater. Eng., Nat'l Central Univ., Taiwan)
carsoz@gmail.com

In this presentation, a novel nanoscale coordination polymer using the diblock copolymer poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-poly(serinyl acrylate) (PMPC-b-PserA) will be presented. Its uses for trigger/release of a hydrophobic drug to induce breast cancer cell apoptosis in vitro and for elimination of toxic free copper ions by chelation. The zwitterionic PMPC block was inspired by the antifouling structure of cell membranes, and the PserA block was inspired by the amphoteric amino acids of proteins. Functional PMPC-b-PserA was synthesized via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. A mixture of the polymer and Fe³⁺/Cu²⁺ self-assembled into nanoparticles via complexation of metal ions with PserA, with the hydrophilic PMPC block at the particle surface. For the drug delivery, Curcumin, a natural water-insoluble polyphenol used to enhance the effects of chemotherapeutics, was encapsulated in the particles as an oil-in-water emulsion. Triggered release of curcumin was achieved by adding deferoxamine, an FDA-approved Fe³⁺ chelating agent; curcumin release efficiency increased at higher deferoxamine concentrations and lower pH. Triggered release of curcumin induced apoptosis in human triple-negative breast cancer cells. In addition, for detoxification of PMPC-b-PserA, a PserA core with multiple coordination "bridges" between polymers and Cu²⁺ was formed, leading to self-assembly of core-shell polymer-metal nanoparticles in order to remove free Cu²⁺. The formation of self-assembled polymer-Cu²⁺ nanoparticles enables high cell viability and low hemolysis in the presence of Cu²⁺. Consequently, the hemocompatible, bio-inspired, multivalent, polymeric-chelating agent of PMPC-b-PserA offers its excellent potential in medical uses.

Bio-inspired zwitterionic polymeric chelating assembly for treatment of copper-induced cytotoxicity and triggered-release drug delivery

○Chun-Jen Huang
(Dept. Chem. & Mater. Eng., Nat'l Central Univ., Taiwan)

Key words Zwitterionic polymer, amphoteric polymer, drug delivery, detoxification

3G07-05 <招待講演 (韓国生物工学会)>

Stabilization and immobilization of carbonic anhydrase via nanobiocatalytic approaches for CO₂ conversion and utilization

○Jungbae Kim
(Korea Univ.)
jbkim3@korea.ac.kr

Carbonic anhydrase (CA), catalyzing the conversion of CO₂ to bicarbonate at a rate of ~10⁶ per second, can be employed for various processes of CO₂ conversion and utilization. Nanobiocatalysis (NBC), using nanostructured materials for effective immobilization of various enzymes, has been successful in stabilizing the activity of CA enzymes. The stabilization of CA enzyme in various forms of NBCs, together with their successful employment for CO₂ conversion/utilization, will be presented in details. NBC of CA was also combined with 3D-printed floating device, and their successful application for interfacial CO₂ hydration and follow-up mineralization will be also introduced. It is worthy of noting that the successful applications of CA enzyme in this presentation are based on the combination of highly-active CA enzyme with nanobiocatalytic approaches, stabilizing the enzyme activity as well as improving the enzyme loading.

Stabilization and immobilization of carbonic anhydrase via nanobiocatalytic approaches for CO₂ conversion and utilization

○Jungbae Kim
(Korea Univ.)

Key words CO₂ conversion and utilization, Carbonic anhydrase, Nanobiocatalysis

3G07-06 How to design nano carriers of amphiphiles: vesicle, cataniosome, cubosome, and nanostructured lipid carrier

○Hiroshi Umakoshi, Nozomi Watanabe
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
umakoshi.hiroshi.es@osaka-u.ac.jp

Amphiphiles-based nanoparticles (ANPs) are a colloidal system that has been widely used as carriers in drug delivery system. Their characteristics and ability to improve bioavailability and stability of drugs has gained attention in many studies. The applications of ANPs have also been developed in other application fields, such as cosmetics, functional food, nutrition, agriculture, and medical imaging. It has also been reported that ANPs can improve administrative routes and biodistribution of drugs with minimum side effects. A variety of drug carriers are employed for drug delivery systems (DDSs), and they consist of different lipid components with different advantages and disadvantages. In general, LNPs have spherical shape comprising of a lipid bilayer that surrounding aqueous/ liquid/ amorphous phase and they include various self-assemblies, such as vesicle (liposome, cataniosome), cubosome, nanostructured lipid carrier (NLC), and emulsions. The ANPs have different structure which can determine their function. Liposomes, composed of one or more phospholipid bilayers, can be categorized as the most-common ANP. Based on its function as nanocarrier, this type of LNPs is extremely versatile because it can cargo both of hydrophilic and hydrophobic targeted molecules, including small drug molecules, protein, and nucleic acids. A few liposomal drug formulations have been successfully proceeded from concept to clinical application and applied to medical practitioners. Our final goal is to establish the method to comprehensively characterize the “physicochemical properties” and molecular/internal structure of ALCs. The information obtained above can be applied in designing and formulating a nanocarrier system with specific properties that could be useful for certain drug and administration. The main concept of the ALC design will be introduced together with some case studies on selected ALCs (vesicle, cubosome, and NLC).

How to design nano carriers of amphiphiles: vesicle, cataniosome, cubosome, and nanostructured lipid carrier

○Hiroshi Umakoshi, Nozomi Watanabe
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words lipid vesicle, NLC, cubosome, cataniosome

10月20日(木)

受賞講演 (8:45 ~ 9:00)

〈生物工学若手賞〉

受賞者 羽城 周平 (味の素・バイオファイン研)

次世代農業資材に向けた二本鎖 RNA の高効率バイオ生産技術の開発

4A01-A1 p. 213

〈生物工学若手賞〉

受賞者 松沢 智彦 (香川大・農)

植物の多糖類を分解する微生物の緻密な酵素システム

4C01-A1 p. 213

一般講演 (9:00 ~ 12:00)

タンパク質工学／酵素学, 酵素工学

4A01 p. 214

タンパク質工学

4A03 p. 216

生合成, 天然物化学／有機化学, 高分子化学

4B02 p. 219

タンパク質工学／抗体工学

4B04 p. 222

代謝工学

4C01 p. 225

オミクス解析／代謝工学／発酵生理学, 発酵工学

4C03 p. 228

センサー, 計測工学／バイオセンシング, 分析化学

4D02 p. 231

代謝工学／オミクス解析／発酵生理学, 発酵工学／システムバイオロジー
／生体情報工学, バイオインフォマティクス

4D04 p. 234

バイオマス, 資源, エネルギー工学

4E01 p. 237

バイオマス, 資源, エネルギー工学／植物細胞工学, 組織培養, 育種工学

4E03 p. 240

生物化学工学／培養工学／バイオプロセス

4F02 p. 243

バイオプロセス／培養工学／生物化学工学

4F04 p. 246

ペプチド工学

4G01 p. 249

ペプチド工学／脂質工学／糖鎖工学

4G03 p. 251

シンポジウム (13:30 ~ 15:30 / 16:00 ~ 18:00)

生物工学会英文誌 JBB のあゆみとこれから

【本部企画・国際シンポジウム】

4A06 p. 254

産学連携シンポジウム (培養・計測) 【本部企画】

4C06 p. 257

生物工学が拓く未培養微生物 (微生物ダークマター) の未来

4C07 p. 259

バイオエコノミーに資するバイオ×デジタル融合型の次世代研究プラットフォームの創出

4E06 p. 261

科学者の Well-being のための志向倫理 【本部企画】

4E07 p. 264

最先端の代謝研究が解き明かす解糖系の深淵

—Otto Meyerhof ノーベル賞受賞 100 周年によせて—

4G06 p. 266

グローバルバイオで達成するカーボンニュートラル

4G07 p. 269

4A01-A1 〈受賞講演（生物工学若手賞）〉

次世代農業資材に向けた二本鎖 RNA の高効率バイオ生産技術の開発

○羽城 周平

(味の素・バイオファイン研)

shuhei.hashiro.yg9@asv.ajinomoto.com

二本鎖 RNA (dsRNA) は RNA 干渉作用による、農作物の高品質化や害虫駆除といった効果をもたらす環境低負荷な新規農業資材としての活用が見込まれている。しかしながら、設計配列をもつ数百塩基対 (bp) 程度の dsRNA の大量かつ安価な製造は化学合成法や酵素法では達成困難であった。そこで、コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を宿主とした物質生産系において、目的の設計配列をもつ組換え RNA の生産基盤技術を確立し、RNA 農業の主原料となる dsRNA の大量発現系を構築する事を目的に研究を進めてきた。基本戦略として、1. dsRNA 特異的なヌクレアーゼの遺伝子欠損株を生産宿主とする目的 RNA の分解抑制、2. 従来のプラスミドのコピー数を大きく上回る高コピー数プラスミドベクターの採用、3. 高活性な RNA 転写ユニットの整備、の3点の要素技術を組み合わせ、従来の微生物による組換え RNA 発現系での生産成績を大きく凌駕する dsRNA 生産系の構築を実現した。本研究の概要を下記の4点に分けて説明する。

1. RNA の微生物生産の有望な宿主菌株としてコリネ型細菌 *C. glutamicum* を選定
組換え RNA の生産宿主菌株の選定にあたり、*C. glutamicum* 菌体の粗抽出液中での RNA 分解が、既報の組換え RNA 生産菌として知られる *E. coli* での分解に比べて顕著に低いことを見出した。そこで、本特徴により、目的の塩基配列を有する dsRNA の生産菌として *C. glutamicum* を選定し、最初に、dsRNA 特異的な分解酵素 RNase III をコードする *rnc* 遺伝子を欠損させ、RNA 生産菌のための基本的な宿主株 (*Arnc* 株) を作成した。
2. コリネ型細菌で機能する新奇な高コピー数変異プラスミドの取得
コリネ型細菌内で和合性である pHM1519 と pAM330N のプラスミドと *E. coli* で機能するプラスミドとの各シタルベクターにて、*C. glutamicum* 菌体内でコピー数が、染色体あたり約 300 コピーとなった pVC7H2 プラスミド¹⁾および約 800 コピーとなった pPK4H1 プラスミド²⁾を取得した。具体的には、pHM1519 型シタルベクターの pPK4 に対しては、抗生物質耐性を選択圧としたスクリーニングにより、高コピー数変異プラスミド pPK4H1 を取得し、このコピー数変異は、複製開始タンパク質 RepA のアミノ酸置換を伴う変化に因ることが解析により示唆された。
3. 作物害虫に対する dsRNA の高生産系の構築
ナス科作物の農業害虫ニジュウヤホシテントウを対象に、そのアポトシス阻害因子 (Diap1) をコードする遺伝子 *diap1* を RNAi 作用の標的遺伝子とした。*Diap1* の活性発現が dsRNA により阻害されると無秩序なアポトシスが細胞に生じて致死となる。こうして、*diap1* の部分領域 (360 bp) に対応する dsRNA (*diap1**-dsRNA) を設計し、その生産を目指した。T7 RNA ポリメラーゼと T7 プロモーターの組み合わせによる誘導型発現系 RNA 転写ユニットを高コピー数プラスミドである pPK4H1 に導入し、さらに、T7 ターミネーター配列を dsRNA 転写ユニットの両側に配置することで転写終結の効率向上を図った *diap1**-dsRNA 生産株を構築した。その菌株のジャーファーマンターによる培養を行った結果、*diap1**-dsRNA の生産量は 1.0 g/L に達し、この値は既知の微生物を宿主とした dsRNA 発現系よりも 5 倍~10 倍以上高い値であり、高効率な dsRNA 生産系の構築に至った^{3,4)}。
4. dsRNA 含有コリネ型細菌の殺菌体の作物害虫への摂食試験による RNA 農業としての機能実証
生産 dsRNA の構造を保持した状態で生産菌の殺菌処理法として、エタノール処理法を検討した⁵⁾。エタノール溶液に dsRNA 生産菌体を湿潤させることで迅速な殺菌と同時に菌体内の潜在的な分解酵素の不活化を図り、このプロセスは目的 dsRNA を菌体の細胞膜成分等で覆った状態で安定保持可能な“カプセル化”につながることを考えた。50%濃度以上のエタノール溶液で処理することで、dsRNA 生産菌の殺菌と菌体内 RNases の不活化が達成できることを確認し、エタノール処理した *diap1**-dsRNA 含有殺菌体を標的害虫の幼虫に経口投与した結果、害虫の *diap1* 遺伝子の発現量低下と共に、幼虫の体重増加の抑制および餌であるイモ葉の摂食量低下といった生育抑制効果が示された。このことから *diap1**-dsRNA による標的害虫の生育抑制が狙い通り *diap1* 遺伝子発現の低下に起因することが示唆され、本生産 dsRNA が RNA 農業として機能を発揮することが実証された。

[参考文献]

- 1) Hashiro, S., Mitsuhashi, M., Yasueda, H. *J. Biosci. Bioeng.*, 127, 529-538 (2019).
- 2) Hashiro, S., Yasueda, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 82, 2212-2224 (2018).
- 3) Hashiro, S., Chikami, Y., Kawaguchi, H., Krylov, A. A., Niimi, T., Yasueda, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 4987-5000 (2021).
- 4) Hashiro, S., Yasueda, H. *Appl. Sci.*, 12, 2954 (2022).
- 5) Hashiro, S., Chikami, Y., Kawaguchi, H., Niimi, T., Yasueda, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 8485-8496 (2019).

Efficient bioproduction of double-stranded RNA applicable to next-generation agricultural pest control

○Shuhei Hashiro

(Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, dsRNA production, high copy number plasmid, agricultural pest control

4C01-A1 〈受賞講演（生物工学若手賞）〉

植物の多糖類を分解する微生物の緻密な酵素システム

○松沢 智彦

(香川大・農)

matsuzawa.tomohiko@kagawa-u.ac.jp

植物が生産する多糖類は地球上に最も豊富に存在する生物資源であり、微生物はこの多糖類を分解し、炭素源・エネルギー源にしている。植物由来多糖類は構造的多様性に富んでおり、その分解には様々な酵素が必要である。微生物は複雑な植物由来多糖類を分解・利用するために、その進化の過程において様々な作用機序の酵素を獲得してきた。

醸造産業において重要な麹菌 *Aspergillus oryzae* も、植物由来多糖類を分解するために様々な酵素を生産している。本発表では、これまでの研究によって明らかにした麹菌が生産するキシログルカン (植物の細胞壁や種子に含まれている複雑な側鎖構造を有する多糖類) の分解酵素について発表する。麹菌は作用機序の異なる様々な酵素を駆使することによって、複雑な側鎖構造を有するキシログルカンを巧みに分解している。

キシログルカンはβ-1,4-グルカン主鎖と規則的に枝分かれしたキシロース側鎖を基本構造としており、キシロース側鎖にはさらにガラクトースやフコースなどが結合することで複雑な側鎖構造を形成している。まず、麹菌は作用機序の異なる2つのキシログルカン特異的β-グルカナゼ (Xeg5A 及び Xeg12A) によってキシログルカン主鎖を切断し、オリゴ糖化する。Xeg5A と Xeg12A は切断部位が異なっており、Xeg12A は側鎖構造の無い部位に特異的に切断するのに対し、Xeg5A は側鎖構造のある部位も切断する。

次に、キシログルカンオリゴ糖はイソプリメベロース生成酵素 (IpeA) とβ-ガラクトシダーゼ (LacA) の協同的作用によってイソプリメベロース (グルコースとキシロースから成る2糖) と単糖に分解される。IpeA 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を遊離するユニークな酵素であり、結晶構造解析によって本酵素が側鎖構造に富んだキシログルカンオリゴ糖を巧みに認識する分子機構を明らかにした。

IpeA と LacA は相互依存的にキシログルカンオリゴ糖を分解しており、IpeA には LacA が、LacA には IpeA が必要不可欠である。これらの酵素をコードする遺伝子はキシロースやキシログルカンオリゴ糖存在下において発現が誘導され、両酵素は同調的に生産される。

IpeA によって生成されたイソプリメベロースは細胞内α-キシロシダーゼ (AxyA) によってグルコースとキシロースに分解され、麹菌に資化される。麹菌は AxyA に加えて、細胞外α-キシロシダーゼ (AxyB) も生産している。AxyA と AxyB は基質特異性 (基質として好むオリゴ糖の種類) に違いがあり、AxyB は細胞外においてβ-グルコシダーゼと協同的に働くことによってキシログルカンオリゴ糖の分解を担っている。キシログルカンの分解に関与する酵素群は *Aspergillus* 属糸状菌の種間でも違いが見られ、例えば、*A. oryzae* と *A. nidulans* では異なる進化起源の酵素セットによってキシログルカンを分解している。

Enzymatic machinery for degradation of plant polysaccharides in microbes

○Tomohiko Matsuzawa

(Fac. Agric., Kagawa Univ.)

Key words polysaccharide-degrading enzyme, *Aspergillus oryzae*, glycoside hydrolase

4A01-01 テーラーメイド・バイオ生産に向けた α -ケト酸脱炭酸酵素の開発

○伏見 圭司¹, 秀瀬 涼太^{1,2}, Vavricka Christopher J.¹, 工藤 恒¹, 蓮沼 誠久^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2}
(¹神戸大院・科技イノベ,²神戸大・先端バイオ工研セ)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】

利用価値の高い化合物を高効率・高収率で得ることは、産業分野において重要な課題である。バイオ生産技術によって目的の化合物を取得するためには、その分子構造に合わせた酵素反応の設計、スクリーニング、発現、精製、活性評価を行う必要があるが、それぞれの過程に膨大な時間が費やされているのが現状である。

本研究室では、生物がもつ代謝経路とそれを司る酵素反応を掌握することで、あらゆる化合物を合成することができる「テーラーメイド・バイオ生産」を目指している。その技術開発の1つとして、広い基質特異性をもつ酵素（テンプレート酵素）を探索し、これを分子基盤にして高い触媒効率と基質特異性をもつ酵素（人工酵素）を創出することによって、目的の化合物を自在・迅速に合成するための情報基盤を構築している。本研究では、有用物質生産において汎用性の高い酵素の1つである α -ケト酸脱炭酸酵素に焦点を当てた探索・改変について報告する。

α -ケト酸脱炭酸酵素は脱炭酸反応によって α -ケト酸からアルデヒドを合成する。N/M/C ドメインで構成されるサブユニット間で活性を示すことが知られており、酵素の機能によって 10 種類の酵素番号に分類されている。

【結果・考察】

各酵素番号の α -ケト酸脱炭酸酵素と数種類の α -ケト酸を選定し、分子シミュレーション (in silico) と酵素活性試験 (in vitro) を行うことで、テンプレート酵素としての能力を評価した。その結果、数種類の α -ケト酸脱炭酸酵素が候補として挙げられた。特に、酵素番号 EC4.1.1.72 の KdcA は、多彩な骨格をもつ基質に対して幅広く親和性または活性を示すことが確認された。現在、KdcA の各基質周辺のアミノ酸残基を抽出し、分子シミュレーションによる人工酵素の設計と評価を進めている。

Development of alpha-keto acid decarboxylase for tailor-made bio-production

○Keiji Fushimi¹, Ryota Hidese^{1,2}, Christopher J. Vavricka¹, Hisashi Kudo¹, Tomohisa Hasunuma^{1,2}, Akihiko Kondo^{1,2}
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBRC, Kobe Univ.,)

Key words protein engineering, enzyme activity, substrate specificity, bio-production

4A01-02 高基質特異性酵素 L-グルタミン酸オキシダーゼの基質認識に関わる残基の機能解析

○中山 夏女¹, 矢野 佳果¹, 上田 悠加², 今田 勝己², 田村 隆¹, 金尾 忠芳¹, 稲垣 賢二¹
(¹岡山大院・環境生命,²阪大院・理)
kinagaki@okayama-u.ac.jp

Streptomyces sp.由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)は、L-Glu の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼである。LGOX は厳格な基質特異性を有し、高活性で熱や pH に対する安定性も高いことから、食品、医療用バイオセンサーに利用されている。これまでに Arg305 が基質側鎖認識の鍵であること、同残基の変異により基質特異性改変可能であることが示されている。さらに L-Arg オキシダーゼとなった R305E 変異 LGOX の基質複合体構造から、基質認識に関与すると考えられる Glu617 を置換したところ、基質特異性が変化した。今回は、基質側鎖認識に関与すると考えられる Glu617 や Asp433 等に更に変異を導入した。また LGOX-L-Glu 複合体の結晶構造解析に成功したことから、活性中心残基の機能を解析した。【方法】LGOX 発現用ベクター pGOX_mall を鋳型として部位特異的変異導入により変異酵素を作製し、*E. coli* JM109 で発現し、精製・性質検討した。活性は過酸化水素で評価した。【結果】Glu617 に飽和変異導入を行ったところ、Lys, Phe に置換すると L-Glu への活性を失い、新たに L-Tyr への活性を獲得した。また、Asp433 を Ala, Lys に置換すると、基質特異性は維持したが活性が大きく低下したことから、Asp433 は基質認識部位の安定化に寄与すると考えられた。また、LGOX 基質複合体の構造から Arg305 と His312 が L-Glu の側鎖カルボキシ基を認識し、Glu617 と Asp433 は Arg305 の位置を固定していた。この構造が、本酵素の L-Glu に対する厳格な基質特異性と高い反応性をもたらすと考えられる。

Functional analysis of residues involved in substrate recognition of L-glutamate oxidase with high substrate specificity

○Natsume Nakayama¹, Yoshika Yano¹, Yuka Ueda², Katsumi Imada², Takashi Tamura¹, Tadayoshi Kanao¹, Kenji Inagaki¹
(¹Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., ²Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words L-glutamate oxidase, active site residue, biosensor, substrate specificity

4A01-04 麹菌由来 Hydrophobin RoLA の N 末端領域内正電荷残基が自己組織化に与える影響の解析

○高橋 尚史¹, 寺内 裕貴², 田中 拓末³, 吉見 啓⁴, 藪 浩^{5,6}, 阿部 敬悦¹
(¹東北大院・農,²京大院・地球環境学,³阪大院・工,⁴京大院・農,⁵東北大・WPI-AIMR,⁶東北大・多元研)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

【背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生するハイドロフォビン RoLA は、ポリエステラーゼ CutL1 の基質表面に吸着後、CutL1 を基質表面にリクルートして基質分解を促進する⁽¹⁾。リクルートには RoLA N 末端領域内の正電荷残基 (H32, K34) と CutL1 分子表面の負電荷残基間の静電的相互作用が重要である⁽²⁾。また RoLA は気液界面で自己組織化して強固な棒状構造 (rodlet) が密集した薄膜を形成する⁽³⁾。我々は以前、静電的相互作用が RoLA の自己組織化に関与する可能性を見出した。そこで本研究では、荷電残基が集中する RoLA N 末端領域が、CutL1 のリクルートだけでなく RoLA の自己組織化にも関与するのではないかと考え、N 末端領域内の正電荷残基の rodlet 伸長に与える影響を解析した。

【方法・結果】まず精製 RoLA 溶液で液滴を作製し、液滴表面で自然に自己組織化させた。その後 SiO₂ 基板に自己組織化膜を転写して原子間力顕微鏡で観察し、観察画像から rodlet の長さを計測した。N 末端領域変異体 (H32S/K34S) は rodlet を形成し、その長さは野生型 RoLA の rodlet よりも長かった。以上の結果より、RoLA の自己組織化は静電的相互作用による制御を受け、N 末端領域内正電荷残基は CutL1 との相互作用、RoLA の自己組織化の両方に影響を与える二機能性を有する可能性が示唆された。(1)Takahashi T. et al., Mol.Microbiol. 57:780-96 (2005); (2) Takahashi T. et al., Mol.Microbiol. 96:14-27 (2015); (3) Terauchi Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 84:678-685(2020)

Positive amino acid residues located in the N-terminal region of fungal hydrophobin RoLA is involved in rod-like structure formation

○Nao Takahashi¹, Yuki Terauchi², Takumi Tanaka³, Akira Yoshimi⁴, Hiroshi Yabu^{5,6}, Keietsu Abe¹
(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Glob. Environ. Stud., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁵WPI-AIMR, Tohoku Univ., ⁶IMRAM, Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, protein interaction, self-assembly, protein aggregation

4A01-05 麹菌由来界面活性タンパク質 RoLA の自己組織化メカニズム及び界面活性に関する解析

○井田 大輝¹, 寺内 裕貴², 田中 拓末³, 吉見 啓⁴, 三ツ石 方也⁵, 藪 浩^{6,7}, 阿部 敬悦¹
(¹東北大院・農,²京大院・地球環境学,³阪大院・工,⁴京大院・農,⁵東北大院・工,⁶東北大・多元研,⁷東北大・WPI-AIMR)
keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp

Hydrophobin は糸状菌特有の界面活性タンパク質であり、分子内に保存された 8 つの Cys 残基がジスルフィド結合によって 4 つの Cys-Cys loop を形成する。*Aspergillus oryzae* が産生する Hydrophobin RoLA は界面に集合して両親媒性単分子膜を形成後、rodlet と呼ばれる amyloid- β 様の棒状構造へと自己組織化する。本研究では、RoLA の自己組織化機構の解明並びに、自己組織化と界面化学的性質との関係を明らかにすることを目指した。我々は RoLA の Cys7-Cys8 loop 内の 2 つの疎水性残基 Leu を親水性残基 Ser に置換した RoLA 二重変異体 L137S/L142S に着目した。この変異体は疎水性固体表面への吸着親和性が低いことが既に分かっている。まず、精製 RoLA を用いて水面上単分子膜 (Langmuir 膜) を作製し、その表面構造を AFM で観察した。WT は密集した rodlet 層を形成した一方、L137S/L142S では rodlet 層が見られず、球状構造が密集していた。ここから、RoLA の自己組織化には L137 と L142 の両残基が協奏的に寄与し、RoLA 分子間の疎水性相互作用が重要な駆動力であることが示唆された。次に、RoLA の界面化学的物性を解析した。静的表面張力値は L137S/L142S が 45 mN/m であったのに対して、WT は 30 mN/m であり、WT の方が 15 mN/m 低い値を示した。また、L137S/L142S の最大表面過剰濃度は WT の約 1/2 の値を示した。すなわち、rodlet 形成能が阻害された L137S/L142S の界面活性は、WT に比べて著しく劣ることが定量的に示された。さらに、L137, L142 の置換が *A. oryzae* 分生子表面での rodlet 形成に与える影響を検証するため、RoLA 相補株を造成し、その分生子表面を SEM で観察した。結果は予想に反しており、L137S/L142S 相補株の分生子表面は WT 相補株と同様に密な rodlet 層が被覆されていた。これより、分生子形成過程 (in vivo) では RoLA の自己組織化を促進する何らかの要因が存在する可能性が示唆された。

Analysis of Self-Assembly Mechanism and Interface Activity of Surface-Active Protein RoLA from *Aspergillus oryzae*

○Ida Daiki¹, Terauchi Yuki², Tanaka Takumi³, Yoshimi Akira⁴, Mitsuishi Masaya⁵, Yabu Hiroshi^{6,7}, Abe Keietsu¹
(¹Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Glob. Environ. Stud., Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ⁵Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ⁶IMRAM, Tohoku Univ., ⁷WPI-AIMR, Tohoku Univ.)

Key words Hydrophobin, Langmuir-Blodgett Film, Self-Assembly, Interface Science

4A01-06 機械学習を用いた耐熱性リパーゼの創製

○吉田 和典¹, 亀田 倫史², 齋藤 裕², 小池田 聡¹
(¹天野エンザイム, ²産総研・人工知能)
kazunori_yoshida@amano-enzyme.com

【背景と目的】 酵素を用いたバイオプロセスは、触媒性能・環境調和性・持続可能性の観点で優れているため、工業的に広く採用されている。酵素の中でもリパーゼは、基質適用範囲が広いこと、非常に有用な生体触媒である。しかし、反応条件（温度、pH、有機溶媒など）によっては安定性の問題から、適用範囲が限定される場合がある。本研究では、酵素の適用範囲の拡張を目的として、リパーゼ PS (LPS, *Burkholderia cepacia* 由来, 天野エンザイム) を対象に耐熱性リパーゼの創製を試みた。

【方法】 耐熱性向上に寄与する変異点の探索は、新たに開発した変異手法 (Loop walking method, LWM) を用いて探索した。各変異酵素は、大腸菌発現系 (*E. coli* BL21(DE3)pET-LPS) にてタンパク発現させ、温度安定性 (60°C, 30 分) にて評価した。LWM により探索された耐熱化変異点について、置換アミノ酸の組合せ最適化を目的として、機械学習による組合せ変異酵素を予測した。実験値を学習データとして機械学習にて変異酵素のランキングを予測し、上位 20 個について変異酵素を作製・評価した。

【結果と考察】 LWM にて、候補変異点: 12ヶ所 (L1~L12) を選定した。耐熱性評価より、候補変異点: L7_P233/L234/V235 において耐熱性向上が確認された。L7 の置換アミノ酸の組合せは、8,000 通り (=20³) 存在するため、機械学習を用いて組合せ変異酵素のランキングを予測した。組合せ変異酵素の評価より、更に耐熱性の向上した耐熱性リパーゼが取得された。本耐熱性リパーゼは安定性の課題を解決するものであり、工業用途における適用範囲の拡大が期待される。

Creation of thermostable lipase by using machine learning

○Kazunori Yoshida¹, Tomoshi Kameda², Yutaka Saito², Satoshi Koikeda¹
(¹Amano Enzyme Inc., ²AIRC, AIST)

Key words lipase, thermostability, protein engineering, machine learning

4A01-08 新規耐熱性 DNA メチル基転移酵素 M.ApeKI の配列認識ドメインの特性評価

○林 真央, 飯田 泰広
(神奈川工科大学・工)
iida@bio.kanagawa-it.ac.jp

近年、DNA のメチル化異常が疾患に関連することが明らかとなりつつあるが、メチル化部位を配列レベルで正確に解析する方法は確立されていない。そこで我々は、PCR 法にメチル基転移反応を組み込んだ新規メチル化解析法の確立を目指している。本解析法には、1. 耐熱性であること、2. ヒトの DNA メチル基転移酵素 (DNA MTase) と同様に CG 配列を認識し、5-methylcytosine (m5C) を形成すること、3. 維持型であること、の 3 つの条件を満たす DNA MTase が必要である。これまでの研究で、m5C を形成する DNA MTase では初の耐熱性の性質を有する M.ApeKI を見出したが、認識配列が GC(A/T)GC 配列であり、解析法へ適応させるには認識配列を改変する必要がある。しかし、意図した配列を認識するように DNA MTase を改変した成功例はない。本研究では、配列認識ドメインのアミノ酸配列を別の DNA MTase のアミノ酸配列へ改変することで、どのように認識配列が変化するかを調査することを目的とした。はじめに配列認識ドメインを改変した組換え型 M.ApeKI の発現系を構築した。得られた形質転換体を発現誘導後、元の配列 (GC(A/T)GC) と目的配列 (CG) を含むプラスミド上の配列 (180 bp) について、Bisulfite sequencing (BS-seq) を行った。その結果、元の配列にも目的配列にも、m5C は認められなかった。次に、 λ HindIII digest (TOYOBO) に対するメチル化活性を市販キットを用いて評価した。その結果、すべての組換え型 M.ApeKI において活性が認められ、特に活性中心を含むドメインを改変したサンプルについて高い活性が認められた。以上の結果より、組換え型 M.ApeKI は認識配列が改変されていると考えられる。また、組換え型 M.ApeKI 間において活性量が差が確認された為、それぞれ認識する配列が異なる可能性が示唆される。今後、活性が確認されたフラグメントについて BS-seq を行う予定である。

Evaluation of the properties of recombinant M.ApeKI: changing target DNA sequence recognition-related region

○Mao Hayashi, Yasuhiro Iida
(Grad.Sch.Eng., Kanagawa Inst. Technol.)

Key words epigenetic, archaea, DNA methyltransferase

4A01-09 TNF- α 親和性フィブロネクチンドメイン変異体の親和性成熟

○牧野 祥嗣, 石坂 滯来, 金井 保
(富山県大・工)
makino@pu-toyama.ac.jp

近年、抗体等でないタンパク質骨格をもとに、疾病ターゲット分子等のリガンドへの親和性を持つ変異体の創出研究が多く進められている。このような分子は抗体医薬の機能を代替可能なため、次世代型医薬品等としての応用が期待される。我々はこれまで、ヒト 10th fibronectin type III (10FnIII) ドメインを改変し、ヒト TNF- α に特異的に結合する変異体を創出してきた。このような変異体の特性および機能を改良することにより、関節リウマチの治療等に使用される抗体医薬品が代替される可能性がある。そこで我々は、これまでに創出した TNF- α 親和性変異体をもとにして、さらに親和性および特異性の改良を試みた。この親和性変異体は、10FnIII の 2 つのループ領域をランダムなアミノ酸配列に置換したライブラリから、親和性選択により取得したものであった。そこで今回は、これらループ領域の置換アミノ酸を再度部分的にランダム化し、再度選択を行った。具体的には、まず、それぞれのループ領域ごとに最大 3 カ所のアミノ酸残基を選んでランダムアミノ酸置換を行う変異を、様々な残基の組み合わせについて導入するようライブラリを構築した。次に、リボソームディスプレイ法で親和性選択を行い、続いて ELISA 法によるモノクローナルアッセイを行って、親和性、特異性の改良されたクローンを選択した。その結果、親和性および特異性が向上したと考えられるクローンが複数得られた。また、これらのクローンの遺伝子配列解析により、特定のアミノ酸配列を持つクローンが濃縮されていることがわかった。

Affinity maturation of TNF-alpha-binding fibronectin domain mutants

○Yoshihide Makino, Reira Ishisaka, Tamotsu Kanai
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words protein engineering, affinity selection, ELISA, affinity maturation

4A01-10 Split intein を用いた超好熱菌由来プロテアーゼ Tk-SP 高発現系の構築

○白須 尊大¹, 巽 祐介¹, 山野-足立 範子¹, 古賀 雄一^{1,2}, 大政 健史¹
(¹阪大院・工, ²岡山理大・工)
y-koga@ous.ac.jp

Tk-SP は超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 のゲノム上にコードされた、耐熱性に優れた subtilisin-like serine protease であり、通常の酵素が変性、失活してしまう条件下で安定性を維持できる。さらに、伝播性海綿状脳症の原因として考えられている異常型プリオンタンパク質 PrP^{Sc} を分解する能力を有し、医療用酵素洗剤としての応用が期待されている。

しかし、Tk-SP を大腸菌で発現させると、そのタンパク質分解活性により増殖阻害が引き起こされ、大量生産が困難である。そこで、protein trans-splicing (PTS) を起こす split intein に着目した。Intein は宿主タンパク質から自己切除し、その近傍配列 (extein) をペプチド結合で付加させる反応を触媒するタンパク質内部要素である。その中でも split intein は N、C 二つの断片が別の成分として合成され、自己会合し反応が起きる。これらそれぞれを切断した Tk-SP 断片に付すことで、活性を持たない状態で大腸菌における発現が可能となり、*in vitro* で断片同士の PTS を起こすことで再構成 Tk-SP を得ることができた。そこで、本研究では PTS を用いた発現系の構築を目的とし、split intein として、これまで報告されている中で最も早い PTS 速度をもつ海洋メタゲノム由来の gp41-1 の使用を検討した。

まず、断片化した組換えタンパク質の可溶性を向上させるために、2 つのシミュレーションツール (AlphaFold2, SOLart) を用いて、Tk-SP の分割位置ごとのタンパク質の溶解度予測を行い、可溶性を維持できる位置の検討を行った。この結果、2 つの分割位置において、先行研究よりも溶解度を上昇させられるという結果が得られた。また、PTS を起こすために必要となる追加残基が最少になる分割位置 1 つを決定した。本発表では、これらのシミュレーション結果及び、決定された 3 つの分割位置について報告する。

Construction of a high expression system for a hyperthermophile protease, Tk-SP, with split intein

○So Shirasu¹, Yusuke Tatsumi¹, Noriko Yamano-Adachi¹, Yuichi Koga^{1,2}, Takeshi Omasa¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words protein engineering, split intein, enzyme production, hyperthermophilic archaeon

4A01-11 超好熱菌由来 β -sandwich domain1 を基にした新規 binding scaffold の開発

○月元 漱介¹, 長尾 征秀¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 古賀 雄一^{1,3}, 大政 健史^{1,2}
(¹阪大院・工, ²阪大・OTRI, ³岡山理大・工)
y-koga@ous.ac.jp

治療薬や分子イメージング及びアフィニティリガンドなどの研究ツールとして、高い親和性と特異性で標的蛋白質に結合する非抗体タンパク質 (binding scaffold) の研究が進んでいる。これまでに治療薬で課題となる免疫原性を避けるためにヒト由来のタンパク質を利用した binding scaffold が開発されているが、それらの構造安定性は Tm37~65°C 程度であった。高い構造安定性を持つ binding scaffold は、分子ツールとして有利であることから、高い構造安定性を有する超好熱菌 *Fervidobacterium islandicum* 由来サチライシン様セリンプロテアーゼ Islandisin の β -sandwich domain1 (SD1) に着目した。Islandisin は極めて高い安定性を示し、そのドメインである SD1 は Tm77.5°C の安定性を示し、また、抗体の変動ドメインと類似した構造であることから、標的分子に対する結合表面の構築が可能であると考えられる。先行研究において、SD1 を大腸菌で大量発現させた際の可溶性が、binding scaffold としての課題であることが示されたため、SD1 へのランダム変異の導入により大腸菌で発現させた際の SD1 の構造形成能向上を行った。

タンパク質の可溶性発現を再構成された GFP 由来の蛍光強度で検出する、split-GFP システムを、error-prone PCR 法によりランダム変異を導入した SD1 ライブラリーと融合して、可溶性変異 SD1 のスクリーニングを行った。Flow cytometry によって、蛍光強度が野生型 SD1 よりも高いクローンを取得し、約 5.0×10^7 個のクローンから約 12,000 個の陽性クローンを取得した。本発表では、このスクリーニングシステムによって得られた陽性クローンについて報告する。

Development of a novel binding scaffold based on beta-sandwich domain1 derived from hyperthermophile

○Sosuke Tsukimoto¹, Masahide Nagao¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Yuichi Koga^{1,3}, Takeshi Omasa^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words protein engineering, binding scaffold, hyperthermophilic archaeon

4A01-12 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来リゾホスホリパーゼの生体内機能解明に向けた特性解析

○熊野 祐香¹, 古賀 雄一², 山野-足立 範子^{1,3}, 大政 健史^{1,3}
(¹阪大院・工, ²岡山理大・工, ³阪大・先導的学際研機構)
y-koga@ous.ac.jp

T.kodakarensis KOD1 は原始地球環境に近い 80 °C 以上の嫌気環境に生育する古細菌 (始原菌) の一種で、進化系統樹の根の近縁に位置していることから、ユニークな生化学的特性を持っている。例えば、細胞膜がリン酸エーテル脂質で構成されていることが大きな特徴の一つである。近年、本菌から真核生物や細菌由来の脂質分解酵素リゾホスホリパーゼのホモログが見出された。リゾホスホリパーゼはリン脂質の sn-1 位と sn-2 位のエステル結合を加水分解する性質を有しており、脂質の恒常性とリモデリングに重要な役割を果たす酵素である。しかし、細胞膜をエーテル脂質で構成している古細菌ではリゾホスホリパーゼの生体内機能が不明である。そこで本研究では KOD1 由来リゾホスホリパーゼの生理学的意義を明らかにする目的で、基質特異性の解析を行うこととした。リゾホスホリパーゼをコードすると推定される Tk0999 を発現用ベクターに導入し、*E.coli* BL21(DE3) を形質転換することで発現系の構築を行なった。その際 His タグを付与したもの (TkLysoPL-His)、His タグを付与していないもの (TkLysoPL) を調製し、比較を行うこととした。これらの組換えタンパク質を精製し、精製された酵素を用いて酵素活性を測定した。TkLysoPL-His と TkLysoPL の組換え発現体が確認され、どちらも可溶性画分に発現することも確認された。この酵素は 80 °C で熱処理することで精製できたことから、大腸菌を用いて発現させた組換え体においてもこれまでのリゾホスホリパーゼに比べ非常に高い熱安定性を有していると予想された。基質にパラニトロフェニル酪酸を用い、85 °C で行なった活性測定ではどちらの組換えタンパク質においても活性が確認されことから本酵素は高温環境下でも活性を示すことが確認された。本発表では KOD1 由来リゾホスホリパーゼの基質特異性について報告する。

Characterization of lysophospholipase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1 to elucidate the biological function

○Yuka Kumano¹, Yuichi Koga², Noriko Yamano-Adachi^{1,3}, Takeshi Omasa^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci., ³OTRI, Osaka Univ.)

Key words thermostable enzyme, hyperthermophilic archaeon

4A01-13 Engineering the sandwich domain 1 (SD1) of a thermostable protease for improved soluble expression for novel binding

○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo¹, Masahide Nagao¹, Hidekazu Kishi¹, Noriko Yamano-Adachi¹, Yuichi Koga², Takeshi Omasa¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)
y-koga@ous.ac.jp

The β -sandwich domain 1 of a thermostable protease islandisin (SD1), is a subunit of a multimeric protein, fervidolysin and has a molecular weight of 11.7 kDa. It's a small, single-domain protein, with surface loops to generate binding to several targets. A promising non-antibody binding scaffold with less complex structure and expressible in *E. coli*. This study focuses on engineering SD1 for improved soluble expression in *E. coli*. Here, we engineer SD1 by rational design. We re-engineered SD1 surfaces to augment its net-charge, reversibility of unfolding and generally reduce its aggregation. We also explored mutations within the core residues to further improve its stability. We applied the change in free energy calculations on foldx to analyze the effect of mutations on the surface and core residues. Tango was also used to analyze the aggregation-prone regions (APRs), and the stability change on the introduction of gatekeeper residues was determined by foldx. *In silico* mutations were confirmed for soluble expression by SDS-PAGE. Both basic (Y15K/W18R/S106R) and acidic (S2D/N73D/S107E) surface supercharging resulted in soluble expression. A single amino-acid change to the most stabilizing mutation (S26I) on *in silico* polar to hydrophobic amino-acid change within the core residues, did not contribute to soluble expression. The introduction of aggregation gatekeepers within the APRs (S26K Q91P), led to the soluble expression. These mutations, improved SD1 soluble expression and usage for binding applications.

Engineering the sandwich domain 1 (SD1) of a thermostable protease for improved soluble expression for novel binding

○Chukwuebuka Maxwell Ononugbo¹, Masahide Nagao¹, Hidekazu Kishi¹, Noriko Yamano-Adachi¹, Yuichi Koga², Takeshi Omasa¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words protein aggregation, protein folding, protein engineering, protein expression

4A03-01 オーバーラップオペロン構造を用いた複数タンパク質の同時高発現

○西岡 優佑¹, Wolf Ruslana², 星田 尚司¹, 赤田 倫治¹
(¹山口大院・創成科学, ²Berlin University of Applied Sciences and Technology)
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

有用タンパク質の多くは大腸菌を用いて生産されている。通常、大腸菌にクローニングして発現させる組換えタンパク質は 1 種類である。もし、複数のタンパク質を 1 つのプラスミドから同時に高発現できれば、タンパク質生産が効率的になる。2 つ以上のタンパク質を同時に高発現させる手段として大腸菌のオペロン構造を用いることが考えられるが、その報告例は少ない。これまでに、オペロン構造には上流遺伝子の終止コドンから下流に開始コドンがある場合に加えて、上流遺伝子の終止コドンの上流に開始コドンが存在することが知られている。このような遺伝子と遺伝子が重なっている構造をオーバーラップオペロン構造と名付け、上流遺伝子の終止コドンの 3 塩基目を起点として、下流遺伝子の開始コドンの A までの距離を数字で表すこととした。例えば大腸菌 MG1655 のゲノムには、0 である -TGATG- は 163 個、-3 である -ATGA- は 258 個と多く存在している。しかし、-4, -5, -6 はほとんどなく、-7 は 60 個、-8, -9 もほとんどないが、-10 は 34 個と、3 塩基毎に多くなるオーバーラップパターンが見られた。さらに他の細菌や古細菌でも同様のパターンが存在した。このオーバーラップオペロン構造のパターンとタンパク質発現には関係があると考え、srIA プロモーターを用いて上流遺伝子として eEmRFP、下流遺伝子として *leuB* を用いて、オーバーラップオペロン構造を設計し、タンパク質を発現させた。結果は、0, -3 のオーバーラップオペロン構造では上流の eEmRFP は高発現し、下流の *leuB* は低発現となったが、-7, -10, -13, -16, -19 のオペロン構造においては、eEmRFP と *leuB* の 2 つが同時に高発現した。このことから、-7 以上の 3 塩基毎のオーバーラップオペロン構造は 2 つのタンパク質の同時高発現が可能となり、オーバーラップの距離によって下流側のタンパク質の発現量が変化することが示された。

Simultaneous high expression of multiple proteins using overlapped operon structures

○Nishioka Yusuke¹, Ruslana Wolf², Hoshida Hisashi¹, Akada Rinji¹
(¹Grad. Sch. Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., ²Berlin University of Applied Sciences and Technology)

Key words *Escherichia coli*, protein expression, operon, translation

4A03-02 組換え漏れの無い化合物遺伝学的 Cre-loxP 遺伝子組換え制御技術の開発

○河野 風雲, 佐藤 守俊
(東大院・総文)

c-fuun.kawano@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

部位特異的遺伝子組換え系はその高い誘導効率と組換えの忠実度から、真核生物の染色体上にある遺伝子を組換えするためのゲノム工学を実現する強力な技術である。これまでに化合物や光で遺伝子組換えを誘導できる条件付きの誘導型遺伝子組換え系が多く開発されてきた。そうした誘導型の遺伝子組換え系は、誘導効率の高さや特異性などの技術的頑強性を実現してきた一方で、化合物や光で遺伝子組換えを誘導する前に組換え反応が起きてしまう、いわゆる「反応漏れ」を起こす共通の問題点を抱えている。そこで本研究では当該問題を克服するために、トリメトプリム依存的にタンパク質分解が抑制される大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素由来のエピキチン化タンパク質構造不安定化ドメイン系を利用した化合物誘導型の Cre 遺伝子組換え技術 (Sando III, R. et al., Nat. Methods 2013) に着目した。そして本研究では、当該既存技術と分割体タンパク質近接相補化再構成法を組み合わせた SPEED (split-protein-based efficient and enhanced degradation) 法を開発し、当該法を基盤とすることで「反応漏れ」問題を克服した Cre-loxP 遺伝子組換えの化合物遺伝学的誘導制御に成功した。本 SPEED 法は、哺乳類細胞において強力に頑強な化合物誘導型遺伝子組換え制御を実現するのみならず、タンパク質分解誘導が困難であった分子サイズの大きいタンパク質に対しても厳密な機能制御を実現する強力な化合物遺伝学として、生命科学における幅広い基盤技術になり得ることが期待される。

Development of a leakless chemogenetic Cre-loxP recombination system

○Fuun Kawano, Moritoshi Sato
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words Cre/LoxP system, chemogenetics, trimethoprim

4A03-03 *Geobacillus* 属好熱菌を用いた異種タンパク質生産の実用性に関する検証

○鈴木 宏和^{1,2}, 小山 幸祐³, 倉敷 凌太³, 渡辺 俊介⁴, 大城 隆^{1,2}
(¹鳥取大・工, ²鳥取大・GSCセンター, ³鳥取大院・持続創生, ⁴(株) プロテイン・エクスプレス)
hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp

【目的】我々は *Geobacillus* 属好熱菌の応用研究を行っているが、その過程で本菌群が異種タンパク質の生産能に優れていることを見出した。これまでに宿主の検討やプロモーター改変などにも取り組み、*Geobacillus thermodenitrificans* K1041 株を宿主としたタンパク質生産系を確立した。本研究では、K1041 株のタンパク質生産能を既存の産業宿主 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31) と比較することで、K1041 株によるタンパク質生産が実用的かどうかを調べた。
【結果と考察】K1041 生産系による黄色蛍光タンパク質 (Venus) の生産を検討したところ、LB 培地において 420 mg/L の規模で生産された。ガラクトシダーゼ (BgaB) は、安価な CSL 培地中で 98 mg/L 規模で生産された。他様々な異種タンパク質の生産も CSL 培地を用いて検討した。いずれも 30 mg/L 以上の規模で生産され、それには古細菌や常温菌に由来するタンパク質も含まれた。分泌性のキシラナーゼ (XynA) は、細胞外に 550 mg/L で生産された。興味深いことに、BgaB など非分泌性のタンパク質も細胞外に蓄積された。例えば BgaB は、培養液中に 67 mg/L で蓄積された。核酸の溶出も見られたことから、この現象は溶菌に起因すると考えられる。ヒスチジンタグと融合させた Venus を CSL 培地で生産させ、培養液を超音波処理した。その上清を金属アフィニティークラムに直接アプライしたところ、細胞内と細胞外に蓄積された Venus が総じて効率よく精製できた (収率 66%)。B. choshinensis HPD31 を用いて Venus と BgaB を生産させたところ、Venus は 200 mg/L 以上の規模で生産されたが、BgaB の生産は見られなかった。XynA は、細胞外に 400 mg/L 程度の規模で生産された。本結果は、対象タンパク質によっては K1041 生産系が HPD31 生産系を上回る可能性を示唆する。当日は、HPD31 生産系にはない K1041 生産系の長所についても議論したい。

Evaluation of the usefulness of a protein production system using the thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* K1041

○Hirokazu Suzuki^{1,2}, Kosuke Koyama³, Ryota Kurashiki³, Shunsuke Watanabe⁴, Takashi Ohshiro^{1,2}
(¹Fac. Eng., Tottori Univ., ²GSC center, Tottori Univ., ³Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., ⁴Protein Express Co., Ltd.)

Key words enzyme, *Brevibacillus*, secretion

4A03-04 微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発

○伊藤 良浩^{1,2}, 佐々木 隆一¹, 朝里 さやか¹, 北口 哲也³, 上田 宏³
(¹味の素・バイオファイン研, ²東工大・生命理工, ³東工大・化学生命研)
ueda@res.titech.ac.jp

【背景と目的】近年、ゲノム編集による多数遺伝子改変株ライブラリ、長鎖 DNA 合成による複数遺伝子連結コンビナトリアルライブラリなど、技術革新による大規模ゲノム改変微生物株ライブラリの作成が可能となっている。これら技術を活用することで、バイオ医薬品素材などの有用タンパク質を高分泌生産する微生物株の迅速な樹立が期待されるが、膨大なライブラリの培養評価、解析工程がボトルネックであり、スループット性に優れたスクリーニング系の開発が望まれる。この課題を解決すべく、微小ドロップレットを用いたシングルセル培養と、タンパク質を蛍光シグナルとして測定可能な蛍光免疫測定素子 Q-body を組み合わせたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発を目指した。

【方法と結果】タンパク質の分泌発現宿主として、グラム陽性菌 *C. glutamicum* を用い、オステオカルシン (BGP) の C 末端 7 残基をタグとして分泌タンパク質に付与することで、濃度依存的に BGP 認識 Q-body にて検出可能であること、培養液中で分泌タンパク質を検出可能であることを確認した。次にドロップレット種として Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) エマルションを用い、エマルション内部で BGP 認識 Q-body によるタンパク質検出が可能であることを確認した。*C. glutamicum* タンパク質分泌発現株及び BGP 認識 Q-body、培地をエマルションに封入して培養を実施し、対照株と比べて高い蛍光強度を示したことから、スクリーニング系の原理検証が出来たと考えられた。現在、更なるスクリーニング精度向上を目指し、ドロップレット種として微生物培養により適したマイクロゲルカプセルの応用を検討している。

Development of screening method for protein producing strain using a combination of microdroplet culture and biosensor technology

○Yoshihiro Ito^{1,2}, Ryuichi Sasaki¹, Sayaka Asari¹, Tetsuya Kitaguchi³, Hiroshi Ueda³
(¹Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc., ²Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, ³CLS, Tokyo Tech)

Key words protein overproduction, screening, biosensor, microorganisms

4A03-05 分割蛍光タンパク質プローブによる DNA 損傷応答の細胞内イメージング

○金岡 英徳, 渡邊 愛梨, 深田 梨沙子, 田代 有輝, 清中 茂樹
(名大院・工)
kaneoka@chembio.nagoya-u.ac.jp

真核生物の細胞核内にある核内構造体は、タンパク質や核酸など多くの生体高分子の相互作用により構成され、転写・複製・DNA 修復など様々な生体反応を制御している。近年、これらの核内構造体は相分離により形成されることが明らかとなり注目されているが、この構造は一過的で弱い相互作用により形成されているため、その動的特性により解析法は限られている。我々はその特性の解析モデルとして DNA 損傷により生じる DNA 修復 foci に着目し、この foci を可視化する新たなタンパク質プローブの開発を目指した。

DNA 修復 foci の形成には修復因子の翻訳後修飾とそれに伴うタンパク質間相互作用が重要である。そこで DNA 損傷の検出には BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) 法を基とし、修復因子 RAP80 と翻訳後修飾因子 SUMO の相互作用を利用した。BiFC 法は蛍光タンパク質断片の再構築によってタンパク質の相互作用が起きている場所特異的に蛍光を発する手法であり、蛍光タンパク質 Venus の断片に RAP80 と SUMO をそれぞれ融合させプローブとした。このプローブは薬剤処理による DNA 損傷に反応性を示し、その局在は損傷マーカーである γ H2AX とよく一致した。また、プローブタンパク質に変異を導入すると、 γ H2AX との一致率の低下などの変化を示したことから、今回開発したプローブは融合した修復因子の機能を反映していると考えられる。

Cellular imaging of DNA damage response using split fluorescent protein-based probes

○Hidenori Kaneoka, Airi Watanabe, Risako Fukata, Yuki Tashiro, Shigeki Kiyonaka
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words protein interaction, DNA damage, fluorescent protein

4A03-06 新規ナノ材料開発を志向したタンパク質超分子カルボキシソーム外殻形成の鍵タンパク質 CcmO の生化学的特性解析

○大久保 詠一郎¹, 杉山 由花¹, 大島 昌也¹, 中村 隆太郎¹,
松村 洋寿¹, 野口 恵一², 養王田 正文², 尾高 雅文¹
(¹秋田大院・理工, ²農工大院・工)
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【背景と目的】シアノバクテリアは光合成を行うが、反応中心の炭素固定酵素リプソーム 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)は代謝回転速度が低く、酸素の競争的阻害も受けることが知られている。シアノバクテリアは、低 CO₂ 濃度下で直径 150 nm の正二十面体の超分子構造内に炭酸脱水素酵素と RuBisCO を内包することで、炭素固定反応を隔離、増強している。当該構造体はカルボキシソームと呼ばれ、5 または 6 角形のタイル状構造を単位構造とした最大 7 種類のタンパク質サブユニットが自己集合して形成され、約 1 万分子もの RuBisCO を内包可能な内部スペースをもつことから、新規ナノ材料開発への応用が期待されている。しかし、組換え体として発現させた外殻タンパク質間に明確な相互作用が確認できないため、本分子の生物工学的応用は半ば停滞している。我々はこれまでに、外殻タンパク質 CcmO が外殻成分の中で唯一、単位構造以上の集合体形成能を示すことを明らかにした。本発表では、外殻自己集合機構に重要であると考えられる外殻成分 CcmO の生化学的特性の解析結果について報告する。

【方法】CcmO の分子間相互作用に関与していると推測される、85 番目と 190 番目の Arg および C 末端 10 残基に含まれる 4 つの Pro をそれぞれ Ala に置換した変異体 CcmOR85A, CcmOR190A, CcmOala を作製し、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量を、円偏光二色性スペクトルにより二次構造状態を評価した。

【結果と考察】各種変異導入により野生型 CcmO で見られた集合体形成能が失われ、CcmOR85A, R190A 変異体はいずれも同様の多量体状態をとる可能性が示唆された。CcmO はいずれの変異体においても α ヘリックスを多く含む構造を保持している可能性が示唆された。このことから、CcmO の自己集合能には 85 番目と 190 番目の Arg および C 末端 10 残基の Pro が関与していると考えられる。

Analysis of biochemical properties of carboxysome shell protein CcmO for the development of new biomaterials

○Eiichiro Okubo¹, Yuka Sugiyama¹, Masaya Ohata¹, Ryutarō Nakamura¹,
Hirotoshi Matsumura¹, Keiichi Noguchi², Masafumi Yohda², Masafumi Odaka¹
(¹Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., ²Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words aggregation, bioreactor, drug delivery system

4A03-07 タンパク質の人工パルミトイル化技術の拡張と生細胞を用いた評価

○内田 和希¹, 大林 洋貴¹, 南畑 孝介¹, 若林 里衣¹, 後藤 雅宏^{1,2},
下川 直史³, 高木 昌宏³, 神谷 典穂^{1,2}
(¹九大院・工, ²九大・未来化セ, ³北陸先端大・マテリアル)
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

【目的】

タンパク質にパルミトイル基が修飾するパルミトイル化は、がんやウイルス感染などに深く関与している脂質修飾機構である。パルミトイル化したタンパク質は、主に飽和脂質やコレステロールで構成される細胞膜上のラフトドメインに親和性を持つことが示唆されている。本研究では、目的タンパク質の人工的なパルミトイル化を介したラフトへの局在化を目標とした。

【方法】

微生物由来トランスグルタミナーゼが触媒する架橋反応を利用し、部位特異的にパルミトイル基が修飾された緑色蛍光タンパク質 (EGFP-Pal) を得た。EGFP-Pal の脂質二分子膜へのアンカリング挙動を、細胞サイズの Giant Unilamellar Vesicle (GUV) と、ヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat を用いて比較検討した。さらに、Concanavalin A による Jurkat 細胞の活性化に伴うラフトの局在と内在化を利用して、EGFP-Pal の細胞質内への小胞輸送経路について評価した。

【結果と考察】

生体模倣膜である GUV を用いた検討から、EGFP-Pal は脂質間相互作用により GUV 上のラフトを模した相に局在化した。次に、Jurkat 細胞を用いた検討から、EGFP-Pal は濃度依存的に細胞質内へ移行し、ラフトのクラスターとの共局在が確認された。何れの場合においても、脂質二分子膜中の Cholesterol の存在が重要な役割を担うことが明らかとなった。以上の結果から、EGFP-Pal は細胞膜上のラフトに局在化し、カベオラ依存性エンドサイトーシスにより内在化することが示唆された。当日の発表では、任意のタンパク質の細胞質内への送達を志向した新たな手法の開発と、人工脂質修飾タンパク質の適用範囲の拡大に向けた試みについても報告する。

Expansion of technology for artificial palmitoylation of proteins and evaluation using living cells

○Kazuki Uchida¹, Hiroki Obayashi¹, Kosuke Minamihata¹, Rie Wakabayashi¹,
Masahiro Goto^{1,2}, Naofumi Shimokawa³, Masahiro Takagi³, Norihiro Kamiya^{1,2}
(¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²CF, Kyushu Univ., ³Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words protein, lipid, Enzymatic conjugation, Lipid domain

4A03-08 タンパク質性分子認識素子の合理的設計と静電的相互作用モデルの検証

○光成 麻弥, 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を細胞内外で検出・利用する場合、標的分子を特異的に捕捉する分子認識素子が必要である。本研究では極めて高い構造安定性を有する超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来ホモ三量体タンパク質 CutA1 を足場とした汎用性の高い新規タンパク質性分子認識素子の創製を目的とした。

【方法・結果】CutA1 構成アミノ酸残基間相互作用エネルギーの網羅的解析によって選抜したリガンドペプチド挿入候補領域内の 2, 3 か所に、配列あるいは長さが異なるリガンドペプチド (6-16 aa) をそれぞれ挿入した各種変異型 CutA1 を設計し、発現特性を調べた。その結果、リガンドペプチド挿入位置に若干の相違がある場合においても、いずれのタンパク質も可溶性発現し、それらは十分な耐熱性を示したことから、同一サブユニット内に複数のペプチド挿入が可能であることが分かった。そこで、CutA1 を足場とした分子認識素子の機能拡張性を評価するために、シンプルな静電的相互作用をモデルとした分子間相互作用検出系の評価を進めた。中性、酸性あるいは塩基性のアミノ酸からなるペプチドをリガンドとしてそれぞれ複数挿入した変異型 CutA1 を設計・調製後に固定化し、6 残基からなる中性、酸性あるいは塩基性のアナライトペプチドとの相互作用を、アナライトペプチドを連結した超好熱菌 *Archaeoglobus fulgidus* 由来 Esterase の活性を指標に評価した。その結果、特に酸性ペプチド挿入 CutA1 と塩基性ペプチドとの相互作用を感度良く検出できた。この塩基性ペプチドに関して、残基数を変化させ、同様に相互作用検出を試みたところ、3 残基以上の長さであれば相互作用の検出が可能であることが分かった。これらの結果より、リガンドペプチドを挿入した変異型 CutA1 による低分子から高分子にわたる標的分子の特異的な捕捉の可能性が示唆された。

Rational design of proteinaceous molecular recognition elements and validation of electrostatic interaction models

○Maya Mitsunari, Naoyuki Ishida, Koreyoshi Imamura, Hiroyuki Imanaka
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, biosensor, immobilization, CutA1

4A03-09 CutA1 を足場とした分子認識素子積層型ナノバイオ界面の作製とその特性評価

○中山 友梨香, 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検出系において効率的な標的分子捕捉を可能とするナノバイオ界面の作製は、検出感度の向上や、分子認識表面設計の拡張性を高めるメリットがある。本研究では、超好熱菌由来のタンパク質 CutA1 (ホモ三量体) を一本鎖化し、異種の生体分子を複数提示し得る scCutA1 (single-chained CutA1) を足場分子として用いた分子認識素子積層型ナノバイオ界面の作製とその特性評価を目的とした。

【方法・結果】分子認識素子の積層時に利用するタンパク質性分子糊ペアとして、非常に高い親和性で相互作用する *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の Barnase (Bn) / Barstar (Bs) ならびに非酵素的に共有結合を形成する *Streptococcus pyogenes* 由来の SpyCatcher (SC) / SpyTag (ST) を用いた。まず scCutA1 が分子内に有する複数の挿入・連結サイトのうち 2 箇所にも多様な組み合わせで Bn/Bs および SC/ST を挿入・連結した各種変異型 scCutA1 の調製を試みた。SDS-PAGE による発現特性評価を指標に積層ユニットとなる候補を選抜後、精製した。表面親和性ペプチドを介して土台となる scCutA1 を固定化後、1, 3, 7 層のみ、あるいは混合型として積層させたナノバイオ界面をそれぞれ作製し、あらかじめ scCutA1 内に挿入したリガンドペプチドと、アナライト分子との相互作用を Enzyme-Linked Assay (ELA) によって検出した。その結果、単層界面と比較して凹凸構造を有する多層化界面において感度の向上が確認できた。現在さらなる感度向上に向け、積層比率条件や足場構造の変更が相互作用検出感度に及ぼす影響等について検証を進めている。

Fabrication and characterization of molecular recognition element stacked nano-biointerfaces using CutA1 as a proteinaceous scaffold

○Yurika Nakayama, Naoyuki Ishida, Koreyoshi Imamura, Hiroyuki Imanaka
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, biosensor, immobilization, CutA1

4A03-10 炎症性腸疾患治療薬 5-アミノサリチル酸の作用機序解明に向けた新規標的タンパク質の同定と機能解析

○伊藤 和哉, 浦井 秀樹, 尾高 雅文, 松村 洋寿
(秋田大院・理工)
matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

炎症性腸疾患は主に、消化管粘膜に発症する慢性的な炎症疾患の総称であり、潰瘍性大腸炎とクローン病からなる。潰瘍性大腸炎やクローン病の治療には、5-アミノサリチル酸(5-ASA)が第一選択薬として広く用いられている。炎症性腸疾患に対する 5-ASA の治療効果は、臨床的に高いことが明らかになっているが、約半数の症例においては、5-ASA の効果がみられないことも知られている。また、5-ASA を用いた治療は、重い副作用を伴うこともあり、安全で効果的な治療を行うために、その作用機序の解明が望まれる。5-ASA の抗炎症作用は、活性酸素やアラキドン酸代謝物の産生抑制などによるものと考えられているが、5-ASA の標的分子は明らかになっておらず、作用機序には未だ不明点が多い。そこで、本研究では 5-ASA の作用機序解明を目的として、5-ASA に高い親和性を示すタンパク質の探索を行った。その結果、5-ASA の新規標的タンパク質候補として、抗菌や抗腫瘍活性による生体の防御に関与するタンパク質 X を同定することに成功した。メタノール資化性酵母を用いた異種発現系により、タンパク質 X の発現及び精製を行った。精製したタンパク質 X を用いて、Pull-down アッセイにより 5-ASA との相互作用解析を行った結果、タンパク質 X と 5-ASA の相互作用が確認できた。現在、X 線結晶構造解析を用いて、5-ASA とタンパク質 X 間の相互作用様式を分子レベルで明らかにするために、5-ASA-タンパク質 X 複合体の結晶化条件の検討を進めている。

Identification and characterization of a novel target protein to elucidate the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid in the treatment of inflammatory bowel disease

○Kazuya Ito, Hideki Wakui, Masafumi Odaka, Hirotohi Matsumura
(Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ.)

Key words anti-inflammatory drug, protein expression, interaction analysis

4A03-11 PD-SELEX 法で得られた人工 RNA-RBP ペアの特性解析

○福永 圭佑
(沖縄科技大)
keisuke.fukunaga@oist.jp

発表者らは RNA ライブラリーとファージウィルスに提示させた RNA 結合タンパク質 (L7Ae) 変異体ライブラリーの中から複合体形成能を持つ RNA-RBP ペアを選択・増幅する新たな進化分子工学的手法: PD-SELEX 法を開発した (PMID: 34219162)。試験管内の共進化実験により、非常に強い結合親和性 (K_D 値 = 約 7 pM)、及び高い結合選択性 (S/N 比 = 4000 以上) を持つ人工 RNA-RBP ペア (LS4 protein - CS1 RNA、及び LS12 protein - CS2 RNA) を取得することに成功した。LS4 は細胞内 RNA に普遍的に存在するキクタン構造に対する結合能が减弱しており、生体直交性が向上していると考えられる。今後、LS4-CS1 ペアが合成生物学・ケミカルバイオロジー研究において分子パーツとして活用されることが期待される。LS4/LS12/L7Ae 遺伝子をコードしたプラスミド DNA は分与可能なのでお問い合わせ下さい。

Characteristic analysis of lab-evolved RNA-RBP pair

○Keisuke Fukunaga
(OIST)

Key words Protein, RNA aptamer, Directed Evolution, PD-SELEX

4A03-12 転写因子 ArsR-LuxR 融合タンパク質のヒ素添加に伴う OFF スイッチ原理の解明

○阿由葉 里奈¹, 田中 佑樹⁴, 小椋 康光⁴, 梅野 太輔³, 河合 繁子²
(¹千葉大院・融合理工, ²千葉大院・工, ³早大院・先進理工, ⁴千葉大院・薬)
kawai-noma@chiba-u.jp

ヒ素は普遍的に地球上に存在する元素であるが、毒性が高いため、環境中におけるヒ素のモニタリングや検出は非常に重要である。我々は、As(III) 結合型転写因子 ArsR と、ホモセリンラクトン (AHL) 応答型転写因子 LuxR を融合し、ArsR のヒ素結合を LuxR で読み出す高感度な大腸菌発現型ヒ素センサー (ArsR-LuxR) を開発した。このセンサーはヒ素に反応して OFF 型のセンサー挙動を示す。本研究では、ArsR-LuxR の OFF 型になる動作原理を明らかにし、ヒ素応答感度を自在に変化可能なセンサーデバイスの構築を目指す。まずセンサー挙動の動作原理を解明するために、western blotting で分子状態を検出したところ、ヒ素濃度依存的に ArsR-LuxR の可溶性画分が減少し、センサー出力が最小 (OFF) となるヒ素濃度 10^4 ppb で凝集を形成していることが分かった。つまり ArsR-LuxR のヒ素による実効濃度の減少が OFF 型センサー挙動の原因であることが示された。この凝集化メカニズムを明らかにするために、As(III) と結合する ArsR-LuxR の全ての Cys を Ser に置換し、凝集架橋点の検討を行った。すると、ArsR-LuxR の 91 番または 313 番を Ser に置換した変異体で、センサー出力の OFF 型挙動が解消された。このことから、ArsR-LuxR は上述した 2 カ所の Cys とヒ素の結合を介した分子間凝集を形成していることが示唆された。

次に、細胞内のヒ素濃度がどのようにセンサー感度に影響を及ぼすのか調査するため、ICP-MS を用いて細胞内のヒ素取り込み量を測定した。その結果、細胞内のヒ素濃度がある閾値を超えたときに ArsR-LuxR のセンサー出力が完全に OFF になることが明らかになった。つまり、細胞内ヒ素濃度を変化させれば、ヒ素応答を自在に変化させることができるといえる。そこで実際にヒ素排出に関わる膜タンパク質 ArsB を共発現させたところ、ArsR-LuxR の感度をより低感度化させることに成功した。

Mechanism of ArsR-LuxR fusion protein OFF switching by binding of Cys and As(III)

○Rina Ayuba¹, Yu-ki Tanaka², Yasumitsu Ogra⁴, Daisuke Umeno³, Shigeo Kawai²
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Chiba Univ., ²Grad. Sch. Eng., Chiba Univ., ³Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ⁴Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

Key words Arsenic biosensor, cysteine, protein aggregation

4B02-01 微生物分離装置を用いた抗生物質生産菌のスクリーニング法の開発

○小川 昌規, 平瀬 辰朗, 多田 孝清
(株) KRI
m-ogawa@kri-inc.jp

放線菌をはじめ微生物を用いた抗生物質生産は、単一の菌種を純粋培養することにより行われる。一方、放線菌を含む複数の微生物を同時に培養することにより、これまでに知られていない新規抗生物質が生産されるケースが報告されている。しかしながら、新たに環境サンプル中の多様な微生物種から「適切な菌種の組合せ」を見つけ、新規な抗生物質を見出すことは非常に困難であると想定される。

弊社では、これまでに、微生物分離装置を用いた単一細胞分離・培養技術を開発してきた。本装置は 30 分間で環境サンプル中の 1 万細胞を個々に分離することができる。さらには、装置に導入する微生物濃度を調整することで、ハイスループットに複数菌体に分離することも可能である。本研究では、最大の課題である「適切な菌種の組み合わせの探索」において微生物分離装置を活用し、抗生物質生産菌のスクリーニング系の構築を行った。具体的には複数の土壌サンプルを対象に本装置により、多種多様な微生物群を分配し共培養を実施した。培養液中の抗菌活性を調べた結果、複数の抗生物質生産菌候補が見出された。

Development of screening method for antibiotic-producing bacteria using a microbial separator

○Masanori Ogawa, Tatsuaki Hirase, Takakiyo Tada
(KRI, Inc.)

Key words antibiotics, screening, coculture

4B02-02 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の制御遺伝子変異株に見いだされたガンマブチロラクトン化合物の解析

○見崎 裕也^{1,2}, 高橋 謙², 原主佑², 立野 智資², 荒川 賢治^{1,2}
 (1)広島大院・統合生命科学,²広島大院・先端研
 karakawa@hiroshima-u.ac.jp

Streptomyces 属放線菌は、抗生物質や免疫抑制剤、抗腫瘍剤など、多種多様な二次代謝産物を生産することで知られている。ゲノム解析技術の進歩により、*Streptomyces* 属ゲノム上には、30 種類以上の二次代謝産物生成遺伝子クラスターが存在することが判明している。しかし、その多くは通常の培養条件下では発現していない。このような休眠二次代謝を活性化させるために、様々なアプローチが提案されている。本研究では、多重制御因子破壊株の代謝産物を詳細に比較することで、新規代謝産物の発見を試みた。

Streptomyces 属放線菌における二次代謝産物の生産は、種々の制御因子により調節されている。よく研究されている例として、シグナル分子を鍵物質とした二次代謝制御システムがある。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、抗生物質 lankacidin および lankamycin を生産し、それらの生合成遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされている。両抗生物質の生産は、同様に pSLA2-L 上にコードされたブテナイド型シグナル分子 SRB 合成酵素 SrrX、シグナル分子受容体 SrrA、偽シグナル分子受容体 SrrB、SARP 型活性化因子 SrrY、SrrZ により厳密に調節されている。本システムの分子基盤解明に際して、我々は様々な組み合わせの制御遺伝子欠失株を構築している。そのうち、*Streptomyces rochei* の二重遺伝子欠失株 (TetR 遺伝子 *srrC* と SARP 遺伝子 *srrY*) の代謝産物から、親株には見られない 3 種類の化合物を見いだした。これらの化合物の構造を決定したところ、4,10-dihydroxy-10-methyldecan-4-olide、4,10-dihydroxy-10-methylundecan-4-olide および 4-hydroxy-11-oxo-10-methyldecan-4-olide であることが判明した。本発表では、構造決定に至るまでの軌跡および機能解析について詳述する。

Analysis of gamma-butyrolactone compounds discovered from a regulatory gene mutant of *Streptomyces rochei* 7434AN4

○Yuya Misaki^{1,2}, Yuzuru Takahashi², Keisuke Hara², Satoshi Tatsuno², Kenji Arakawa^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.,²Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

Key words actinomycetes

4B02-03 *Streptomyces* sp. TSP2-12 株の生産する抗菌活性物質に関する研究

○鶴貝 龍聖, 秦田 勇二
 (埼玉工業大院・工)
 hatada@sit.ac.jp

[目的] 抗生物質は、細菌による感染症などの治療に必要不可欠なものである。しかし現在、既存の抗生物質に対する薬剤耐性菌の出現が問題となっている。そこで、新しい抗生物質の探索が求められている。新しい抗生物質の発見のための有望な供給源としては、放線菌が知られている。発表者らは、抗菌活性を有する放線菌を土壌サンプルから数多く分離している。その中の一つ *Streptomyces* sp. TSP2-12 株 (以下、TSP2-12 株) の抗菌活性物質の高生産条件の検討及び同抗菌活性物質の精製条件の検討を実施した。

[方法] スクリーニングの結果、土壌から、抗菌活性を示す微生物を数多く取得し、16SrRNA 解析結果も加味して、TSP2-12 株を選抜した。本株の抗菌活性物質高生産条件を検討した。YEME 液体培地の pH、炭素源や窒素源、培養温度や培養時間の最適化を行った。培養上清を酢酸エチルと 1:1 で混和した後、酢酸エチル抽出物の TLC 解析を実施した。さらにシリカゲルカラムによる精製を試みた。

[結果と考察] TSP2-12 株は、pH が 7 付近、炭素源としてデンプン 2% またはマルトース 1%、そして窒素源濃度の極端に低い YEME 改変培地を用いて、25°C で振盪 (140rpm) 培養を行うことで最も高い抗菌活性物質生産性を示した。また、固体培地の炭素源にマルトースを添加することで胞子形成能、並びに抗菌活性物質の高生産が誘導されることが判明し、一方、グルコースを添加することで抗菌活性物質の生産が抑制されることが示された。TLC にて解析した結果、TSP2-12 株は少なくとも 2 種類の抗菌活性物質を生産していることが示された。シリカゲルカラムを用いて 2 種類の抗菌活性物質の分離が行えた。16SrRNA 遺伝子のシーケンス解析の結果、本株は *Streptomyces nashvillensis* の近縁種であることが示された。

Study on antibacterial substances produced by *Streptomyces* sp. TSP2-12 strain

○Ryusei Tsurugai, Yuji Hatada
 (Grad. Sch. Eng., Saitama Inst. Technol.)

Key words *Streptomyces* sp., antibiotics, purification

4B02-04 *Bacillus amyloliquefaciens* に分布する新規 surfactinC 生合成オペロン

○伊藤 光次朗¹, 安達 真菜¹, 松谷 峰之助², 梶川 揚申³, 五十君 静信³, 横田 健治³
 (1)東農大院・応生科,²東農大・ゲノム解析セ,³東農大・応生科
 yokota@nodai.ac.jp

Surfactin は *Bacillus* 属細菌が産生する環状リポペプチドの一種である。ヒドロキシ脂肪酸とヘプタペプチドからなる有用な二次代謝産物であり、ペプチドの一次構造から A、B、C の 3 種類の類縁体が存在する。Surfactin 生産性 *Bacillus* 属 10 菌株を同一条件で培養し、surfactin を LC-MS により解析したところ、溶出時間が異なる 2 つパターンに大別された。この結果は surfactin 類縁体の生産比を決定する内因性の因子の存在を予想させた。本報では、溶出時間の異なる 2 種類の surfactin 類縁体の構造解析と類縁体生産比に影響を及ぼす因子の特定を目的とした。

2 種類 surfactin 類縁体について LC-ESI-MS/MS、並びに酸加水分解により生じた遊離アミノ酸のモル比を解析したところ、一方は、ELLVDLL のヘプタペプチドからなる surfactinA、他方は surfactinA の Leu の 1 つが Ile で置換された surfactin 類縁体であった。Surfactin のペプチド部位は非リボソーム依存型ペプチド合成系(NRPS)で生合成され、NRPS 遺伝子は *urfAA*、*B*、*C*、*D* 4 つの ORF からなる *urfA* オペロンとして報告されている。各菌株の *urfA* オペロンの相同性を ORF 毎に比較したところ、7 番目のアミノ酸伸長反応に関与する *urfAC* の A7 ドメインで大きく異なった。そこで、当該ドメインの置換株を作成し、surfactin 類縁体生産比を評価したところ、作出した遺伝子置換株が産生する surfactin の溶出パターンが未同定の surfactin と一致した。以上の結果から、未同定の surfactin は ELLVDLI からなる surfactinC であることを強く示唆し、LC-MS 解析における溶出パターンの相違に影響することを明らかにした。なお、本報で特定した surfactinC を生合成する *urf* オペロンは新規の *urfC* オペロンであった。そして、ゲノム配列から種レベルで同定を行う ANI 解析の結果から、*urfC* オペロンは *B. amyloliquefaciens* に保存されていた。

Characterization of a novel operon for surfactinC-biosynthesis

○Kojuro Ito¹, Mana Adachi¹, Minenosuke Matsutani², Akinobu Kajikawa³, Shizunobu Igimi³, Kenji Yokota³
 (1)Grad. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.,²NODAI Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.,³Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Bacillus* sp., surfactin, lipopeptide, antibacterial

4B02-05 M13 ファージのライフサイクルを活用した S-Allyl-L-cysteine 生合成経路の最適化

○松本 拓也, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩
 (阪大院・情報)
 shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

大腸菌や酵母等の産業微生物に自然界の生物が持つ様々な代謝経路を追加することで環境低負荷かつ産業レベルで生産可能な化合物の種類を増やすことが可能である。しかし、産業微生物に追加した全ての代謝経路が必ず新たな環境で動作するとは限らず、多くの場合目的化合物に至る生合成経路の複数酵素に対し、発現量・活性・フィードバック阻害を適切に調節することが求められる。従来、代謝酵素を個別に改変する進化分子工学技術やゲノム全体の酵素を対象にした実験室進化実験が適用されてきたが、複数の酵素を同時にかつ選択的に変異を蓄積させることができず、多くの時間と労力が必要であった。そこで本研究では、大腸菌に感染・増殖する M13 phage を活用した進化法を応用し、代謝経路を構成する複数酵素のみを対象に、目的物質の生産量に連動する中規模の酵素群改変技術の開発を目指した。本手法の有用性を示すために、化成品・医薬品の原料である S-Allyl-L-cysteine (Sac) の生合成経路をモデルとして選択し、Sac の生産量に応じて M13 phage が産生する進化プロセス設計に取り組んだ。まずアンバー終止コドン選択的に Sac を導入可能な aminoacyl-tRNA 合成酵素 (aaRS) tRNA ベアと 204 番目の Gln をアンバーコドンに置換した sfGFP を発現するプラスミドをそれぞれ構築し、Sac 濃度依存的に sfGFP を発現させるかを大腸菌発現系で評価した。その結果、aaRS を発現かつ Sac を添加したサンプルのみで sfGFP に由来する蛍光が見られ、さらに Sac 濃度依存的に蛍光強度が増大することが分かった。現在、M13 phage の遺伝子を 3 つのプラスミドに分割し、Sac 濃度依存的に M13 phage 生産が可能かについて検討中である。

Simultaneously tuning of S-Allyl-L-cysteine biosynthesis pathway using M13 phage life cycle

○Takuya Matsumoto, Teppei Niide, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
 (Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words non canonical amino acid, Phage Assisted Continuous Evolution

4B02-06 フルコナゾール耐性病原性真菌 *Candida albicans* に対するアネトールの相乗的抗真菌作用

○土田 泰暉¹, 村田 和加恵^{1,2}, 山口 良弘¹, 荻田 亮^{1,3}, 藤田 憲一¹
(¹大阪大院・理, ²米子高専, ³大阪公大健康研セ)
fujita@omu.ac.jp

近年、真菌症の化学療法の発展においても、頻出する薬剤耐性菌の耐性機構を解明することが重要となってきた。アネトールの主成分トランス・アネトール（アネトール）は、他の薬剤と併用した場合、モデル生物である出芽酵母に対して薬剤排出ポンプの発現を抑制することで、相乗的な抗真菌作用を発揮する。一方、フルコナゾール耐性病原性真菌 *Candida albicans* に対しても、アネトールとフルコナゾールの併用処理が相乗的な抗真菌作用を示すことが明らかとなった。本研究では、その作用機構を探索した。先行研究より相乗的な抗真菌作用に薬剤排出ポンプが関与している可能性があるため、まず、アネトール処理による薬剤排出ポンプの活性への影響を、薬剤排出ポンプによって細胞外への排出される蛍光試薬ローダミン 6G を用いて薬剤排出量を測定することによって調べた。その結果、アネトールは単独および併用した際に薬剤排出を有意に抑制した。次いで、この薬剤排出の抑制の原因を探索した。すなわち、薬剤排出ポンプ遺伝子発現に与えるアネトールの影響をリアルタイム PCR 法により測定した。その結果、アネトールによる遺伝子発現への有意な影響は確認できなかった。そこで、薬剤排出ポンプのエネルギー源となる ATP の細胞内濃度を調べた。その結果、少なくとも耐性株においてはアネトール単独および併用時に細胞内 ATP 濃度の低下が確認された。以上の結果から、アネトールは主に耐性株において、細胞内 ATP 濃度を低下させることで薬剤排出ポンプの活性を低下させ、それにより相乗的な抗真菌作用を示すと考えられた。一方、本実験で用いた耐性株において、感受性株と比較すると恒常的に薬剤排出ポンプの活性が高く、加えて、薬剤排出ポンプ遺伝子も高発現していたことから、薬剤排出活性の高さが薬剤耐性の原因の一つである可能性が示唆された。

Synergistic antifungal activity of fluconazole combined with anethole against fluconazole-resistant *Candida albicans*

○Taiki Tsuchida¹, Wakae Murata^{1,2}, Yoshihiro Yamaguchi¹, Akira Ogita^{1,3}, Ken-ichi Fujita¹
(¹Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ., ²Yonago Natl. Coll. Technol., ³Res. Center. Urban Health Sports, Osaka Metro. Univ.)

Key words ABC transporter, antifungal antibiotics, resistance, *Candida albicans*

4B02-07 出芽酵母における微小管重合阻害とミトコンドリアの融合・分裂異常の関係

○村田 和加恵^{1,2}, 荻田 亮^{2,3}, 山口 良弘², 藤田 憲一²
(¹米子高専, ²大阪大院・理, ³大阪公大健康研セ)
murata@yonago.kosen-ac.jp

真核生物の主要な細胞骨格の一つである微小管は、細胞の形態維持や細胞分裂などの多様な細胞機能において重要な役割を担っている。微小管は α -tubulin と β -tubulin が結合した二量体を構成単位とし、微小管の両端では二量体による重合と脱重合が絶えず繰り返されている動的な構造をもつことで知られている。一方、ミトコンドリアは細胞分裂に必要なエネルギー供給、アポトーシスの制御や細胞老化などにおいて重要な働きを担い、融合および分裂を繰り返すことで自身の形態を維持している多機能な細胞小器官である。ミトコンドリアの融合および分裂に関わるタンパク質はいくつか同定されている。しかし、微小管との関係についての研究報告はほとんどなされていない。本研究では、出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* を用い、微小管重合阻害剤である Benomyl, Thiabendazole, また微小管安定化剤である Nordihydroguaiarenic acid を *S. cerevisiae* に添加し、ミトコンドリアの融合および分裂異常がどのような割合で生じるのかを GFP を用いて細胞内での局在を観察することによって検証を行った。その結果、Benomyl 添加細胞ではミトコンドリアの分裂異常によって生じるモヤ状の構造が、Thiabendazol 添加細胞においては融合異常によって生じる分裂したミトコンドリアが観察された。また単離したミトコンドリアを電子顕微鏡で観察した結果、GFP 観察と同様の結果が得られた。このことから、微小管はミトコンドリアの融合および分裂と関係性があると考えられる。

Microtubule polymerization inhibitors induce abnormal mitochondrial fusion and fission

○Wakae Murata^{1,2}, Akira Ogita^{2,3}, Yoshihiro Yamaguchi², Ken-ichi Fujita²
(¹Yonago Natl. Coll. Technol., ²Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ., ³Res. Center. Urban Health Sports, Osaka Metro. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria, tubulin

4B02-08 担子菌 *Trametes versicolor* 抽出物による PC12 細胞におけるグルタミン酸誘発酸化ストレス抑制機構の解明

○友尻 創太¹, 森脇 真希²
(¹富山大・工, ²富山大院・理工)
mtakano@eng.u-toyama.ac.jp

生体内において活性酸素種 (ROS) はミトコンドリアの電子伝達系により産出され、細胞の抗酸化機能により制御されている。しかしストレスなどの外的要因から ROS の過剰生産や抗酸化機能低下が起こると、細胞内に ROS が蓄積し酸化ストレス状態となる。蓄積した ROS は高い反応性によりタンパク質や DNA を変性させるため、アルツハイマー病などの神経変性疾患の一因となる。一方、担子菌は薬用キノコとして知られており、菌体抽出物から得られる多糖類などは抗がん剤の補助剤として使用される。そこで本研究では担子菌 *Trametes versicolor* 菌糸の熱水抽出物による酸化ストレス抑制効果を評価した。*T. versicolor* NRBC4937 を YM 液体培地で 28°C、10 日間の静置培養を行った。回収した菌体を凍結乾燥により粉末状にし、90°C の水で 1 時間抽出を行った。得られた菌体熱水抽出物はヘキサソ、酢酸エチル、エタノールを用いた液液分離法による分画を行った。それぞれの分画を用いて、DPPH ラジカルや、ヒドロキシラジカルおよびスーパーオキシドラジカルなどの ROS について捕捉アッセイを行った結果、エタノール分画の ROS 捕捉活性が最も高いことがわかった。一方、PC12 細胞をグルタミン酸存在下で培養すると、細胞内シスチン取り込み阻害によるグルタチオンの生成阻害や、グルタミン酸受容体を介した細胞内 Ca イオン濃度の上昇により細胞は酸化ストレス状態となる。そこでこのモデルを用いてエタノール分画による PC12 細胞の酸化ストレス抑制機能を評価した。その結果、エタノール分画は酸化ストレス状態の PC12 細胞を細胞死から保護することがわかった。また、このとき PC12 細胞の ROS レベルは減少していた。さらに、エタノール分画は細胞内 Ca イオン濃度上昇や抗酸化酵素活性阻害の抑制効果により、PC12 細胞の ROS レベル減少に寄与していることがわかった。

Mechanism on inhibition of glutamate-induced oxidative stress in PC12 by extracts from the Basidiomycete *Trametes versicolor*

○Sota Tomojiri¹, Maki Moriwaki²
(¹Fac. Eng., Univ. Toyama, ²Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

Key words oxidative stress, reactive oxygen species, PC12, basidiomycetes

4B02-09 *Talaromyces trachyspermus* が産生するスピクリスボール酸およびその誘導体に関する抗菌活性

○望月 誉志幸¹, 平 敏彰², 関口 喜則¹
(¹磐田化学工業, ²産総研・化プロ)
ysekiguchi@i-kagaku.co.jp

〔目的〕スピクリスボール酸 (S 酸: (4S,5S)-4,5-ジカルボキシ-4-ベンタデカノリド) は *Talaromyces trachyspermus* によって糖から発酵生産される天然の界面活性剤・バリオサールファクタントである。S 酸は、ラクトン環、C10 で固定の分布なしのアルキル鎖、2 つのカルボキシ基からなり、分子内に 2 つのキラル炭素を有するユニークな構造をしている。この構造に起因して 3-ヒドロキシ-1,3,4-テトラデカントリカルボン酸 (O 酸) や 2-(2-カルボキシエチル)-3-デシルマレイン酸 (D 酸) などの誘導体を容易に作成することができる。今回我々は、S 酸と各誘導体の機能性評価を行い、特に D 酸の抗菌特性に関しては実用的な結果が得られたので報告する。

〔方法〕*T. trachyspermus* を通気攪拌培養し、菌体外に蓄積された S 酸を培養液から精製、結晶化して S 酸を入手した。さらにこの S 酸を用いて、ラクトン環の構造およびカルボキシル基の数が異なる誘導体 (O 酸、D 酸など) を合成した。抗菌活性は、基本的に液体培養を用いて MIC (最小発育阻害濃度) を求めることで評価した。細菌 14 種・14 株、酵母 6 種・6 株、糸状菌 15 種・20 株、計 40 種を用いて評価した。

〔結果〕S 酸・O 酸・D 酸いずれにおいても抗菌活性が確認できた。また 3 化合物とも細菌・酵母・糸状菌に効果を示し、幅広い菌種に効果があることが確認できた。細菌に対する効果は O 酸 \geq S 酸 \geq D 酸であったが大きな差は見られなかった。一方酵母・糸状菌に対する効果は顕著な差が見られた (D 酸 $>>$ S 酸 \geq O 酸)。D 酸の *Aspergillus niger* に対する MIC は 0.4 g/L、*Penicillium citrium* は 0.5 g/L、*Cladosporium sphaerospermum* は 0.3 g/L、*Rhodotorula mucilaginosa* は 0.4 g/L、*Candida albicans* は 0.3 g/L、*Malassezia furfur* は 0.4 g/L、であった。この D 酸の糸状菌・酵母に対する抗菌活性は非常に高く実用性が高い値であると考えている。

An antimicrobial activity of Spiculisporic acid produced by *Talaromyces trachyspermus*, and its derivatives.

○Yoshiyuki Mochiduki¹, Toshiaki Taira², Yoshinori Sekiguchi¹
(¹Iwata Chemical Co., Ltd., ²RICPT, AIST)

Key words Spiculisporic acid, biosurfactant, antifungal, antibacterial

4B02-10 超広域感染阻止能を具備するバイオ超分子コーティング：新型コロナウイルスから白癬症まで

○大成 冬真¹, 小野寺 正孝², 白米 優一¹, 芦内 誠¹
 (¹高知大院・総人間自科, ²東洋濾紙株式会社)
 ashiuchi@kochi-u.ac.jp

【背景】新型コロナウイルス感染症は社会を大きく混乱させた。経済活動は停滞し、先進7ヶ国(G7)や欧州の大半で2020年のGDP成長率はマイナスを記録した。医療従事者の肉体的・精神的負担も極大化している。パンデミック取戻の道筋さえ見いだせない今日、持続的な感染防止に資する「新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)不活化プラスチック」がウィズコロナ期の社会基盤を支える産業部材として注目されている。今回、納豆ネバの「ポリ-γ-グルタミン酸(PGA)」と歯磨き粉に含まれる「セチルピリミジウムカチオン(CPC)」から新製された超分子素材「PGA イオンコンプレックス(PGAIC)」の抗菌特性について調査したので報告する。

【方法・結果】ブラーク法(ISO 21702)に準拠した「SARS-CoV-2」不活化試験を実施したところ、「PGAIC コーティング」による事実上の完全感染阻止 (>99.9%の不活化率) という画期的な成果を得た。さらに、抗カビ性試験(JIS L 1921: 吸収法)では、難治性真菌症の「白癬菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 症」への高い殺菌効果が示唆された。以上の結果は、PGAIC がヒトに重篤な感染症を引き起こすエンベロープ型ウイルスから真菌に至るまでの「超広域感染阻止能」を備えた(稀有の)衛生強化目的部材として有望であることを示している。PGAIC による材質不問の持続的コーティング能を明らかにした先行事例を鑑みれば、本件「PGAIC コーティング」にはウィズコロナ期に入った現代社会の健康と産業を支える標準的な生活用材としての利用拡大に加え、その本格的な社会実装化に向けた新展開にも期待が持てる。

Poly-gamma-glutamate ion-complex-based coatings for fighting COVID-19 to Trichophytosis

○Toma Onari¹, Masataka Onodera², Yuichi Hakumai¹, Makoto Ashiuchi¹
 (¹Grad. Sch. Integr. Arts Sci., Kochi Univ., ²TOYO ROSHI KAISHA, LTD.)

Key words Poly-γ-glutamate ion-complex, Coating, antifungal, antiviral

4B04-01 アンモニア応答 G タンパク質共役型受容体の阻害による効果的なアンモニア知覚抑制

○福谷 洋介¹, 齋藤 芽生¹, 江口 諒², 田澤 寿明², 養玉田 正文¹
 (¹農工大院・工, ²エステー株式会社)
 fukutani@cc.tuat.ac.jp

哺乳動物のニオイの知覚は、鼻腔の嗅覚神経細胞に発現する細胞膜受容体が特定の揮発性分子と結合することで生じるシグナル伝達に起因する。特有の刺激臭を示すアンモニアは、分子量17の最小の匂い分子である。ヒトのアンモニア臭の知覚閾値は約2ppmと低濃度であるが、これまでにアンモニア応答受容体は同定されていなかった。そこで、哺乳類の嗅神経細胞に発現するアンモニア受容体の同定と応答阻害剤によるアンモニア臭抑制法の開発を目的とした。まず、319種のヒトOR、6種のヒトTAAR、12種のマウスTAARをHana3A細胞に発現させ、気相刺激アッセイ法を用いて約25ppmのアンモニアに対する応答を評価した。その結果、ヒトおよびマウスのTAAR5のアンモニア応答を確認した。TAAR5はアンモニウム塩溶液に対しては応答を示さなかったため、TAAR5はアンモニウムイオンでなくアンモニア分子と結合していると示唆された。次にTAAR間でアミン結合部位として保存されているマウスTAAR5のD114変異体を構築した。いずれの変異体も細胞膜局在は減少しなかったが、アンモニア応答が消失したことからTAAR5のD114がアンモニア認識部位であると示唆された。最後に、TAAR5のアンモニア応答を阻害する香料の探索を行ったところ、アントラゴニストとして作用する数種の香料分子を同定した。そこで、ヒト官能評価により、同定した香料のアンモニア臭抑制作用を評価したところ、TAAR5の応答阻害を示さなかった分子と比較し、アンモニア臭抑制作用が強いことが分かった。以上の結果から、TAAR5がアンモニア受容体であり、114番目のアスパラギン酸残基がアンモニア認識部位であると示唆された。TAAR5の応答を抑制することで、アンモニア臭知覚を効果的に抑制できることを明らかにした。

Effective suppression of ammonia perception by inhibitors of the ammonia responding G-protein coupled receptors.

○Yosuke Fukutani¹, Mei Saito¹, Ryo Eguchi², Toshiaki Tazawa², Masafumi Yohda¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²S.T. Corporation.)

Key words odorant response, ammonia, trace amine associated receptors, vapor stimulation

4B04-02 中性子結晶構造に基づく小分子阻害剤によるマクロファージ遊走阻止因子の阻害機構の解明

○江澤 理徳¹, 刈屋 佑美², 平野 優³, 日下 勝弘⁴, 玉田 太郎³, 涌井 秀樹¹, 尾高 雅文¹, 松村 洋寿¹
 (¹秋田大院・理工, ²秋田大・産連, ³量研機構・量子生命, ⁴茨城大・フロンティア応用原子科学研セ)
 matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、免疫及び炎症において重要な役割を担うサイトカインであり、関節リウマチや乾癬等の多くの自己免疫疾患に関与することから、潜在的な治療標的となっている。MIFによる炎症反応は、MIFが受容体CD74に結合することによって、下流シグナルの活性化が起こり、IL-1β等の炎症性サイトカインの産生が促進されることで惹起される。これまでに様々な低分子MIF阻害剤が開発され、X線結晶構造解析を含む相互作用解析が行われてきた。しかし、MIFによるCD74活性化の分子機構及びその阻害機構は未だ不明であるため、合理的なMIF阻害剤の設計法の確立には至っていない。最近、MIF構造表面のCD74結合部位と構造内部のN末端を繋ぐ水素結合を介した構造ネットワークの存在が提唱され、このネットワークを含むMIF内部のダイナミクスがCD74の活性化に重要であると報告された。この構造ネットワークの存在は、実験的な照明がなされていないことから、本研究では、MIF阻害剤による阻害機構を明らかにすることを目的とし、中性子結晶構造解析によりMIFの水素原子を含む精密構造を決定し、MIF内の構造ネットワークを検証することとした。MIFの大型結晶を作成し、iBIX BL-03 (J-PARC)とPF BL-5A (KEK)にて、中性子及びX線回折データをそれぞれ取得した。得られた中性子及びX線回折データを複合解析し、MIFの水素原子を含む構造を決定した。本発表では、得られたMIFの水素原子を含む原子レベルの精密構造をもとに、MIF阻害剤によるMIF活性阻害の分子機構について議論する。

Inhibition mechanism of macrophage migration inhibitory factor by its small molecule inhibitors based on the neutron crystal structure

○Toshinori Ezawa¹, Yumi Kariya², Yu Hirano³, Katsuhiko Kusaka⁴, Taro Tamada³, Hideki Wakui¹, Masafumi Odaka¹, Hirotochi Matsumura¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Sci., Akita Univ., ²Coop. Res. Cent., Akita Univ., ³Inst. Quant. Life Sci., QST, ⁴Frontier Res. Center for Appl. Atomic Sci., Ibaraki Univ.)

Key words neutron crystallography, cytokine, macrophage migration inhibitory factor, inhibitor

4B04-03 Immunostimulation of shrimp through oral administration of silkworm pupae expressing VP15 against WSSV

○Jirayu Boonyakida¹, Takafumi Nakanishi², Jun Satoh³, Yoshiko Shimahara³, Tohru Mekata⁴, Enoch Y. Park^{1,2,5}
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Japan Fish. Res. Educ. Agcy., ⁴Fac. Vet. Med., Okayama Univ. Sci., ⁵Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
 park.enoch@shizuoka.ac.jp

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most concerning pathogens in penaeid shrimp and can cause severe loss in shrimp aquaculture worldwide. VP15, one of the major WSSV structural proteins, was a candidate antiviral protein to protect kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) from WSSV infection. We identified that the truncated VP15, VP15₍₂₆₋₅₇₎, is responsible for the protective effect against the WSSV. This study attempted to develop an immunizing agent against WSSV using a silkworm pupa as a delivery vector through oral administration. The VP15, VP15₍₂₆₋₅₇₎, and SR11 peptide derived from VP15₍₂₆₋₅₇₎ were expressed in silkworm pupa. Oral administration of feed mixed with the powdered pupae that expressed VP15-derived constructs enhanced the survivability of kuruma shrimp with an overall relative percent survival (RPS) higher than 70%; the RPS was 100% or no death in a group receiving pupa/VP15₍₂₆₋₅₇₎. In addition to that, we also asserted the relative mRNA expression levels of immune-related genes by qPCR at different time points. Our results indicated that the oral administration of pupa/VP15-derived products could provide a high protective effect against WSSV and could be a practical approach for controlling WSSV in aquaculture.

Immunostimulation of shrimp through oral administration of silkworm pupae expressing VP15 against WSSV

○Jirayu Boonyakida¹, Takafumi Nakanishi², Jun Satoh³, Yoshiko Shimahara³, Tohru Mekata⁴, Enoch Y. Park^{1,2,5}
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Japan Fish. Res. Educ. Agcy., ⁴Fac. Vet. Med., Okayama Univ. Sci., ⁵Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Silkworm, White Spot Syndrome Virus, VP15

4B04-04 イヌバルボウイルス様粒子の作製と EGFP の提示

○朴 龍洙^{1,2}, 関口 智史², プーニャキダ ジラユ¹, 徐 劍¹,
加藤 竜也^{1,2}
(¹静大・グリーン科技研, ²静大院・総合科技)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

ウイルス様粒子 (VLP) は、ウイルゲノムを内包しないまま、構造タンパク質の自己集合によって形成された空のウイルス粒子である。さらに、免疫細胞に効率的に捕捉されるため自然免疫が活性化され、特異的な獲得免疫応答を誘導するため、ワクチンの候補として注目されている。そこで、本研究では、ワクチン候補のプラットフォームとして 60 個のカプシド (VP2) で構成される Canine parvovirus (CPV) に焦点を当て、抗原提示に向けたイヌバルボウイルス様粒子 (CPV-LP) の開発を試みた。SpyTag (SpT) /SpyCatcher (SpC) (Spy システム) を駆使し CPV-LP 上への抗原提示を行った。抗原タンパク質には、蛍光タンパク質である EGFP をモデルタンパク質と使用し、SpC を EGFP の N 末端部に挿入した SpC-EGFP を作製した。抗原提示率の向上を目指し VP2 の表面ループ 1 (S226-G227) 及び 2 (T391-G392) に SpT を挿入した L1-SpT、L2-SpT を作製し、EGFP を提示した CPV-LP を精製したところ、L1-SpT が 80.3% と 16 倍提示効率が向上した。また、免疫電子顕微鏡により CPV-LP 表面上の EGFP の表面提示が確認された。この結果から、CPV-LP の表面上の提示場所によって抗原提示量の劇的な変化があり得ることが明らかになった。

Preparation of Canine parvovirus-like particle (CPV-LP) and display of EGFP

○Enoch Y. Park^{1,2}, Tomofumi Sekiguchi², Jirayu Boonyakida¹, Jian Xu¹,
Tatsuya Kato^{1,2}
(¹Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol.,
Shizuoka Univ.)

Key words virus, Virus-like particle, Silkworm, antigen display

4B04-05 がん免疫サイクルのレベルを末梢血で評価する自己抗体バイオマーカー群網羅的測定法の確立

○宮本 愛¹, 本莊 知子¹, 益井 実鈴¹, 木下 理恵², 公文 裕己³,
垣見 和宏⁴, 二見 淳一郎¹
(¹岡山大院・統合科学, ²岡山大院・医歯薬, ³新見公大, ⁴東大病院)
futamij@okayama-u.ac.jp

現在、がん免疫サイクルを活性化させるがん免疫治療は延命効果が期待できるがん治療オプションの 1 つとなってきた。一方で、腫瘍に対する免疫応答は個々人で大きく異なり、奏効率には個人差がある。このため、がん免疫サイクルの活性化レベルを評価し、治療効果を予測・評価する技術が求められている。この課題に対して我々は、がん細胞内で異常に発現している cancer/testis(CT)抗原などのがん抗原に対する自己抗体が「腫瘍と免疫系の戦いの履歴やがん免疫サイクルの活性化レベルを反映するバイオマーカー」となると考え、測定系の実用化研究を行っている。がん抗原の発現パターンは個々人で大きく異なるため、自己抗体バイオマーカーの評価には、多様な自己抗体を測定する「網羅性」と、微小な変動も正確に評価できる「定量性」を兼ね備えたシステムが必要である。不安定で凝集しやすい物性が大半を占める CT 抗原の網羅的調製には、タンパク質可溶化技術である S-カチオン化法を活用し、これらのがん抗原を固定化した Multi-plex 磁気ビーズを用いて微量の血清から抗体価を同時に多項目で定量評価できる新技術: MUSCAT-assay (Multiple S-cationized antigen beads array assay) を完成させた。また、陽性コントロールとなるウサギポリクローナル抗体の網羅的な準備も進めており、各測定データの信頼性を保証するシステムを構築した。本システムは自己抗体の出現パターンから個々人の免疫状態を「プロファイリング」して治療法を選択したり、治療開始後の免疫応答の変動レベルを「モニタリング」して治療効果をリアルタイムに予測・評価したりできるものと想定している。現在、正確かつ網羅的に自己抗体測定が可能な体制が整った本システムで臨床検体を測定し、その活用方法の検討を進めている。本発表では本システムの技術概要と臨床検体の解析状況を報告したい。

Establishment of a comprehensive assay of autoantibody biomarkers to evaluate the cancer immune cycle from peripheral blood

○Ai Miyamoto¹, Tomoko Honjo¹, Mirei Masui¹, Rie Kinoshita², Hiromi Kumon³,
Kazuhiro Kakimi⁴, Junichiro Futami¹
(¹Grad. Sch. ISEHS, Okayama Univ., ²Grad. Sch. Med. Dent. Pharm. Sci., Okayama Univ., ³Niimi Univ., ⁴Hosp., Tokyo Univ.)

Key words autoantibody, biomarker, cancer-immunity cycle, protein engineering

4B04-06 代替 2 次元分離法の開発による自己抗体バイオマーカー探索の効率化

○益井 実鈴¹, 塩川 つぐみ², 多田 宏子², 宮本 愛¹, 二見 淳一郎¹
(¹岡山大院・統合科学, ²岡山大・自然生命支援セ)
futamij@okayama-u.ac.jp

従来の 3 大がん治療法 (化学療法・外科療法・放射線療法) に加え、現在、がん免疫療法が新しい柱として注目されている。特に免疫チェックポイント阻害剤は、一部の進行がんに対して従来の治療成績を大幅に上回る著効例を示す一方で、個人差も大きく、奏効率の予測と、この治療が効かない患者群への対応が大きな課題となっている。この課題突破には、がん免疫応答をプロファイリングし、がん免疫サイクルの活性化レベルをモニタリングする技術で現場をサポートしなければならない。当研究室ではがん免疫サイクルの活性化に伴って上昇する各種の「がん抗原に対する自己抗体群」をバイオマーカーとして定量評価する抗体検査診断技術を開発中である。本研究では、疾患と相関する自己抗原パネルの強化を目的に、各種の臨床検体の血漿中に含まれる自己抗体バイオマーカーをプロテオミクスで同定・拡張する作業を進めている。この過程で、プロテオミクスの効率化をはかるため、従来法よりも簡便に行うことのできる 2 次元分離技術の開発を試みた。ヒト培養細胞内の総タンパク質は核酸を完全に除去すると、変性状態でも高い溶解性を示す知見¹を活用して lysate を調製し、逆相 HPLC で分画することで疎水性度に応じた総タンパク質を分画できた。さらに、逆相 HPLC 分画サンプルを SDS-PAGE で分子量別に分画することで、hydrophobicity/molecular-mass (HYD/MM) で分離される 2 次元分離法を開発した。HYD/MM 2 次元分離技術では、総タンパク質を逆相 HPLC で疎水性度別に大量に分画した後、品質が一定の市販ゲルを用いて SDS-PAGE を行えば、低コストに多数のレプリカを再現性良く調製することが可能であり、自己抗体の血清学的プロテオミクス・同定が加速できることが確認された。現在、この手法で同定されている自己抗原の特徴についてもご紹介したい。
1) *PLoS One* (2014) e113295

Optimization of autoantibody biomarker search by developing an alternative two-dimensional separation method

○Mirei Masui¹, Tsugumi Shiokawa², Hiroko Tada², Ai Miyamoto¹,
Junichiro Futami¹
(¹Grad. Sch. ISEHS, Okayama Univ., ²Dept. Inst. Anal., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, screening, 2D electrophoresis, proteomics

4B04-07 PURE リボソームディスプレイを用いたエピトープマッピング技術の開発

○Jia Beixi¹, 兒島 孝明², 加藤 晃代¹, 中野 秀雄¹
(¹名大院・生命農学, ²名城大院・農)
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

再構成無細胞タンパク質合成系 (PURE システム) を利用したリボソームディスプレイ (PURE-RD) は、標的分子に結合するペプチドまたはタンパク質をハイスループットに選択する強力なツールである。また、次世代シーケンシング (NGS) を活用することで、PURE-RD 各選択ステップで濃縮された DNA 配列をモニターすることができる。ここでは、PURE-RD、NGS 解析、バイオインフォマティクスを組み合わせたスキームを構築し、抗 HA タグ抗体をモデル抗体としてエピトープ探索システムの確立を試みた。まず、SecM のリボソームアレストペプチド配列の N 末端側に、10 個の NNK トリプレットオリゴヌクレオチドを含むランダムライブラリーを作成し、*in vitro* で転写して PURE システムで翻訳した。リボソームはランダムペプチドを翻訳後にリボソームアレストペプチド配列で停止するため、mRNA-リボソーム-ペプチド三元複合体が合成される。得られた複合体を anti-HA タグモノクローナル抗体と混合し、洗浄-濃縮 (パイオバニング) した。EDTA を加えてリボソーム壊し、遊離した mRNA を逆転写反応—PCR で増幅して、NGS により解析した。得られた NGS の膨大な DNA 配列情報から、連続する 2 アミノ酸、および 3 アミノ酸の、すべての組み合わせ配列の濃縮度を解析するプログラムを開発し、実際の解析に供した。その結果、2 回のパイオバニング操作により得られた配列の濃縮度のデータを利用することで、使用した anti-HA モノクローナル抗体が、「DVP」をエピトープとして認識している可能性が非常に高いことを明らかにし、本システムがエピトープマッピングに有効であることを示した。

The development of epitope mapping using PURE Ribosome Display

○Jia Beixi¹, Kojima Takaaki², Kato Teruyo¹, Nakano Hideo¹
(¹Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ²Grad. Sch. Agric., Meijo Univ.)

Key words ribosome display, antibody, cell-free protein synthesis system

4B04-08 パラトープ改変抗体の作製とその応用

○安西 高廣, 安永 正浩
(国がん・先端医療開発センター)
taanzaai@east.ncc.go.jp

我々はがん治療に向けた抗体医薬開発の基盤整備および開発研究を行ってきたが、抗腫瘍効果の実験を行う際のネガティブコントロールとなる抗体として何を用いるかに常に頭を悩ませてきた。問題の一つはコスト面であり、動物への投与実験に必要な数 10 mg のモノクローナル抗体型アイソタイプコントロール抗体を購入しようとすると数十から数百万円必要となる (例: マウス IgG 100 ug 25,000 円)。そもそも、アイソタイプがヒトの抗体は市販のものはほとんど存在しない。抗体樹立の際に得られた抗原を認識しないクローンを使用する場合もあるが、ホストであるマウスやラットでの使用に限られ、ヒト化抗体のコントロールとしての利用は困難である。そこで固形がんを狙うヒト化抗体医薬開発の場合は、ターゲットとなる腫瘍組織に発現していない CD20 に対する抗体 (Rituximab) を購入し、コントロール抗体として用いることがある。しかし、Rituximab は非常に血中滞留性がよく、EPR (enhanced permeability and retention) 効果を発揮して、非特異的な抗腫瘍効果が見られる例があり、正確な評価は難しい。

そこで我々は新たに、抗体側の抗原認識部位であるパラトープに変異を導入し、抗原への結合能を喪失させたパラトープ改変抗体の利用を着想した。パラトープ改変抗体は改変前の抗体と比較して、アミノ酸の差異がわずか 1% 未満であり、抗原への結合能以外は物性が等しいという特徴を有している。実際、複数の抗体に対し、ホモロジーモデル構築による変異導入部位決定と、ELISA またはフローサイトメトリーを用いた結合能評価法を組み合わせることで、パラトープ改変抗体作製法を確立した。本発表では、パラトープ改変抗体の作製法とパラトープ改変抗体の応用について報告する。

Development of paratope-engineered antibodies and their applications

○Takahiro Anzai, Masahiro Yasunaga
(Natl. Canc. Ctr. EPOC)

Key words antibody, IgG, drug delivery system, purification

4B04-09 H 鎖 L 鎖の特異的ペアリングによる二重特異性抗体の構築

○吉田 純菜¹, 中西 猛², 真壁 幸樹^{1,3}
(¹山形大院・理工, ²大阪公大院・工, ³JST・さきがけ)
t221567m@st.yamagata-u.ac.jp

二重特異性抗体は二つの異なる抗原を標的とするため、例えば免疫細胞とがん細胞を架橋すれば効果的な抗腫瘍作用が期待できる。IgG 型二重特異性抗体は二種類の H 鎖と二種類の L 鎖からなり、これらが正しく会合して分子が完成する。しかしこれらポリペプチド鎖間を正しく会合させないと目的産物が得られないため、収率が低くなる問題があった。これまで様々な手法が研究されてきたが、安定性・精製面において課題があった。本研究では重鎖-軽鎖間の誤対合を防ぐためヘテロな会合を誘導する分子を導入した。抗体の H 鎖と L 鎖を融合し、特異的なペアリングを実現する。ヘテロ会合が出来上がったあとで、これらは除去される。この方法を用いて抗 CD3 抗体と抗 Her2 抗体からなる IgG 型二重特異性抗体の作製を報告する。さらに、作製した二重特異性抗体の物性評価についても報告する。

Construction of bispecific antibodies by specific pairing of H and L chains.

○Yoshida Junna¹, Nakanishi Takeshi², Makabe Koki^{1,3}
(¹Grad. Sch. Sci Eng., Yamagata Univ., ²Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ., ³PRESTO, JST)

Key words IgG

4B04-10 タンデム scFv を環状に連結した二重特異性抗体 (Cyclobody BiTE) の作製と評価

○山田 梨沙¹, 中原 維新², 中西 猛³, 浅野 竜太郎², 真壁 幸樹^{1,4}
(¹山形大院・理工, ²農工大院・工, ³大阪公大院・工, ⁴JST・さきがけ)
makabe@yz.yamagata-u.ac.jp

二重特異性抗体は、2 種類の異なる抗原に同時に結合することが可能な抗体である。さまざまな形が研究・開発されているが、それらの中で抗体の抗原結合部位だけからなる小型二重特異性抗体は組織浸透性が高いという特徴がある。我々の研究室ではこれまで、二種類の VHH からなるタンデム VHH の両端をインテインによって環状に連結させた環状型小型二重特異性抗体 (Cyclobody) を作製し報告した (Biochem Biophys Res Commun., 2020)。このように環状に連結することで、分子配向の制御と安定性向上が期待できる。本研究では、この手法を拡張し、より汎用性の高い scFv からなるタンデム scFv を環状化させた Cyclobody BiTE の構築を行った。抗 CD3 scFv-抗 EGFR scFv からなる BiTE、Ex3 をもとに、リンカー長の異なる 2 種類の Cyclobody BiTE の構築を行った。環状化反応には高濃度の塩によって連結反応が起こる、MCM2 スプリットインテインを用いて主鎖の環状化反応を誘導した (SICLOPPS 反応 (Split Intein Circular Ligation Of Peptides and Proteins))。条件依存的インテインを用いることで、発現時に融合してある精製のためのポリヒスチジンタグを環状化反応によって除去することが可能となる。構築した Cyclobody Ex3 は、BiTE 型 Ex3 と同程度の熱安定性を示した。さらに、細胞傷害活性試験を行ったところ、構築した Cyclobody Ex3 は BiTE 型 Ex3 と比べて、より低い濃度で EGFR 陽性細胞に対して細胞傷害活性を示した。より低い濃度で細胞傷害活性が見られたのは、がん細胞、免疫細胞上の抗原との同時結合においてより適した配向となったためかもしれない。現在さらに物性調査を進めており、合わせて報告する。

Construction of Cyclobody-BiTE, a backbone cyclized tandem scFv, via ligation technique

○Risa Yamada¹, Ishin Nakahara², Takeshi Nakanishi³, Ryutaro Asano², Koki Makabe^{1,4}
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., ²Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ³Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ., ⁴PRESTO, JST)

Key words intein, scFv

4B04-11 分離インテインを用いた蛋白質連結反応による二重特異性抗体の構築と評価

○菅野 菜津奈¹, 森井 勇翔¹, 浅野 竜太郎², 中西 猛³, 真壁 幸樹^{1,4}
(¹山形大院・理工, ²農工大院・工, ³大阪公大院・工, ⁴JST・さきがけ)
makabe@yz.yamagata-u.ac.jp

抗体とは特定の異物にある抗原に特異的に結合して、その異物を生体内から除去する分子である。二種類の異なる抗原と同時に結合できる二重特異性抗体が医薬品抗体として注目されており研究が進められている。IgG 型抗体は 2 本の軽鎖と 2 本の重鎖が Y 字型に配置されているため、製造時、鎖間のミスペアリングが起こり目的の二重特異性抗体の収率が 12.5% と低くなる。二重特異性抗体には重鎖間と重鎖-軽鎖間の適切なペアリングが必要である。このため、これまでに「knobs-into-holes」や「CrossMab」などの抗体改変技術が開発されてきた。しかし、これらの改変技術は人工的なものであり天然抗体とは異なった変異やドメイン構成を持つため不安定化するなどの問題があった。天然配列を持った二重特異性抗体の作製方法としてインテインを介した蛋白質連結反応を用いた方法が報告されている (Han et al., Sci. Rep., 2017)。これは一方の Fab 領域と残りの部位を別々に分離インテイン融合蛋白質として作製し、精製後に連結させるものである。別々に作製することで、精製後の二重特異性抗体における鎖間のミスペアリングの問題を回避できる。本発表ではこの方法を拡張し、2 種類の分離インテインを使用して 2 種類の Fab 領域と Fc 領域の各融合蛋白質を別々に作製しておき、one-pot で連結を実現する方法を報告する。この方法を用いて作製した、抗 HER2 抗体と抗 CD3 抗体からなる二重特異性抗体および抗 EGFR 抗体と抗 CD3 抗体からなる二重特異性抗体の抗原結合能 および細胞傷害活性について現在、測定を進めており、それらの結果について発表する。

Construction and evaluation of a bispecific antibody via protein trans-splicing using split intein

○Nazuna Kanno¹, Hayato Morii¹, Ryutaro Asano², Takeshi Nakanishi³, Koki Makabe^{1,4}
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., ²Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ³Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ., ⁴PRESTO, JST)

Key words IgG, intein

4B04-12 A型インフルエンザウイルスの高度保存領域を標的にした抗体酵素の作製と性質

○鶴田 貴幸¹, 野中 玲美², 宇田 泰三³, 一ノ三 恵美^{2,4}
 (¹大分大・工, ²大分大・研究マネジメント機構, ³九州先端科学技術研究所, ⁴大分大・グローバル感染症研究センター)
 e-hifumi@oita-u.ac.jp

(緒言) インフルエンザウイルスは宿主細胞の受容体と結合するウイルス側の配列が頻繁に変異を起こすことが原因でパンデミックを起こし易い。これに対抗するにはウイルスが変異を起こさない保存領域を標的にすることが肝要である。即ち、この保存領域を狙って構造を壊しウイルスの感染を阻止すれば良い。本研究では A 型インフルエンザウイルス(Flu virus) hemagglutinin (HA: 感染に必須)に存在する高度保存領域を標的として抗体酵素の作製を試みたので報告する。

(方法) 高度保存領域として HA に存在する融合ペプチド部分を選び、この配列を含む 19 mer のペプチドに KLH を conjugate して免疫抗原とし、mAb を得た。抗体遺伝子は mAb 産生細胞から抽出し、重鎖、軽鎖遺伝子をそれぞれ pET20b (+) に組み込み大腸菌で発現させた。精製は Ni-NTA クロマトグラフィー、酵素活性は Arg-pNA や FRET-InfA peptide を用い、感染抑制効果は Plaque assay により評価した。

(結果と考察) mAb(IHK)は標的抗原と特異的に反応し、それ以外の SARS 関連ペプチドや HIV 関連ペプチド等とは全く交差反応しなかった。発現させた重鎖(IHK-H)の免疫学的性質を ELISA により検討したところ、H1 型および H3 型の recombinant HA 両者に反応し、予想通り広い反応スペクトルを示した。また、Arg-pNA および FRET-InfA を用いて IHK-H による分解実験を実施したところ、両基質は加水分解され IHK-H は peptidase 活性を持つ抗体酵素である事が確認された。In vitro 試験では IHK-H による Flu virus の感染抑制効果が見られた。現在、遺伝子工学的手法で IHK-H の酵素活性サイトを究明中である。

Preparation and properties of catalytic antibody targeting highly conserved region of influenza virus A type

○Tsuruda Takayuki¹, Nonaka Tamami², Uda Taizo³, Hifumi Emi^{2,4}
 (¹Fac. Eng., Oita Univ., ²Oita Univ. Inst. for Res. Management, ³ISIT, ⁴Oita Univ. Res. Center for GLOBAL and GLOCAL Infections Diseases)

Key words catalytic antibody, virus, conserved region, hemagglutinin

4C01-01 大腸菌におけるロドプシンの光駆動プロトンポンプが弱酸耐性に及ぼす影響

○小林 祐摩¹, 佐野 海瑚人¹, 弘塾 陽子², 松田 史生¹, 石井 純³, 原 清敬², 戸谷 吉博¹, 清水 浩¹
 (¹阪大院・情報, ²静県大・食栄, ³神戸大院・科技イノベ)
 shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】

大腸菌を利用した物質生産では、酢酸などの有機酸が副産物として生産される。これらの有機酸は細胞内に再取り込みされる際にプロトンを放出し、細胞内酸性化を引き起こす。大腸菌は ATP 合成酵素によりプロトンを細胞外に排出し、細胞内酸性化を緩和する仕組みを持つが、代謝の駆動力として重要な ATP を浪費するために生育速度の低下を引き起こす。そこで、高度好塩菌由来のプロトンポンプ型のロドプシンを大腸菌に発現させて、光エネルギーを利用してプロトンを細胞外に排出する能力を付与することで、ATP を使用せずに細胞内酸性化を緩和し、酸耐性が向上すると考えた。本研究では、低 pH 環境下でのロドプシンのプロトンポンプ能力を測定し、弱酸存在下における細胞生存率を測定することで、ロドプシン発現株の弱酸耐性への影響を評価した。

【方法・結果】

大腸菌 MG1655(DE3)株を宿主として、デルタロドプシン遺伝子を導入した dR 株を得た。プロトンポンプ能力は、培養後の菌体を非緩衝溶液に懸濁し、光の点灯・消灯を繰り返した際の細胞外 pH の変化を測定することで評価した。結果として、低 pH 環境下においてより強力にプロトンを排出できることが確認された。細胞生存率の測定では、LB 培地で培養した菌体を PBS buffer で洗浄・懸濁した後、弱酸を添加した。サンプルを明条件 (100 μmol/m² の白色光) もしくは暗条件で 37°C、3.5 時間振盪した。弱酸添加前と 3.5 時間振盪した後サンプルを LB 寒天培地に播種し、形成されたコロニー数を計測することで細胞生存率を算出した。その結果、明条件における dR 株では、暗条件や dR を発現していないコントロール株と比較して、高い細胞生存率を示すことが確認された。これは、光照射によりロドプシンのプロトンポンプが働き、細胞内の酸性化を緩和できたためと考えられる。

Effect of light-induced proton pump activity by rhodopsin on weak acid resistance in *Escherichia coli*.

○Yuma Kobayashi¹, Mikoto Sano¹, Yoko Hirono², Fumio Matsuda¹, Jun Ishii³, Kiyotaka Hara², Yoshihiro Toya¹, Hiroshi Shimizu¹
 (¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *Escherichia coli*, acid tolerance, rhodopsin, light energy

4C01-02 異なる炭素源を消費する 2 種類の大腸菌株を用いた共培養によるイソプレノール生産

○村上 茉奈美¹, 川井 隆太郎¹, 三吉 健太¹, 芝井 厚², 前田 智也³, 堀之内 貴明⁴, 古澤 力^{2,5}, 戸谷 吉博¹, 清水 浩¹
 (阪大院・情報, ²理化学研究所, ³北大院・農, ⁴産総研, ⁵東大院・理)
 shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

イソプレノールは新たなバイオ燃料やゴムの原料となる有用物質であり、微生物を用いた生産の実用化が望まれている。大腸菌でのイソプレノール生産において、代謝経路を上流と下流に分け、それぞれの経路を分担する株を共培養することで生産性の向上を目指している。この共培養では、下流株において中間体であるメバロン酸の取り込み能力強化が課題であった。これまでの研究で、長期間連続培養することで指向性進化を促し、メバロン酸取り込み能力が強化された進化株を獲得した。また、上流株のメバロン酸生産速度が下流株の取り込み速度に対して大きくメバロン酸が培養液中に蓄積すること、下流株が多く酢酸を副産物として生産することが課題として挙げられた。メバロン酸の蓄積を緩和するためには、下流株の菌体比を高く維持することが必要である。そこで本研究では、上流株と下流株が消費する炭素源をグルコースとキシロースに分けることで基質の競合に対処し、下流株のより高い菌体比維持に取り組んだ。また、下流株に炭素源としてキシロースを利用させることで副産物である酢酸の生産を抑えることができ、更なる収率向上につながると考えられる。これまでに上流株のキシロース取り込み経路を破壊することで、混合炭素源培地でグルコース枯渇後もキシロースを取り込まない株を構築した。また、下流株のグルコース PTS 輸送体を破壊することで、グルコース存在下でもキシロースのみを取り込む株を構築した。両株を混合炭素源培地でそれぞれ単一培養することで、上流株はグルコースのみを下流株はキシロースのみを消費することを確認し、上流株でのメバロン酸収率、下流株でのイソプレノール収率を算出した。これらの値を参考に共培養において炭素源添加量により両株の菌体比を制御し最適化することでイソプレノール生産収率の向上を目指す。

Isoprenol production by co-culture with two *Escherichia coli* strains with consuming different carbon sources

○Manami Murakami¹, Ryutarō Kawai¹, Kenta Miyoshi¹, Atsushi Shibai², Tomoya Maeda³, Takaaki Horinouchi⁴, Chikara Furusawa^{2,5}, Yoshihiro Toya¹, Hiroshi Shimizu¹
 (¹Grad. Sch. IST, Osaka Univ., ²RIKEN, ³Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ., ⁴AIST, ⁵Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words coculture, evolution

4C01-03 多様な大腸菌株を利用した芳香族化合物生産技術の開発

○戸村 正稔¹, 番場 崇弘^{1,2}, 蓮沼 誠久^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2,3}
 (¹神戸大院・科技イノベ, ²神戸大・先端バイオ工研セ, ³理研・環境資源)
 hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

バイオプロセスに広く利用されている大腸菌には様々な菌株が存在し、一般的には K 株や B 株系統から派生した毒性がなく安全な株がよく用いられている。各菌株それぞれに代謝の特徴に違いがあり、例えば、イソプレノール生産では株によって生産量が 2~3 倍程度変化することが報告されてきた。しかしながら、株毎に生産量が異なる理由は明らかにされていない。本研究では複数の大腸菌を宿主に、芳香族化合物生産株の開発に取り組んだ。そして、質量分析計を用いた細胞内外の代謝物の分析により、芳香族化合物生産に用いられるシキミ酸生産経路への代謝フラックスの違いを明らかとする。

本研究ではターゲットとして、液晶材料として利用される 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HBA) を選定した。4-HBA はシキミ酸経路中間体のコリスミ酸からコリスミ酸リアーゼにより 1 段階の反応で生産することができる。生産株として、大腸菌 K 株系統の DH 5 αTM, BW25113, NEB® Turbo, B 株系統の BL21(DE3) および BL21、そして W 株およびその派生株である MachiTM T1[®] 株の計 7 株を選定した。本研究では、これら 7 株に *Providencia rustigianii* 由来であるコリスミ酸リアーゼ遺伝子 (*ubiC*) を導入し、各株の 4-HBA 生産量、シキミ酸経路代謝物の蓄積量、炭素源であるグリセロール消費量の比較を行った。

培養の結果、最も 4-HBA 生産量の多かった株 (BL21(DE3)株; 1980 mg/L) は、最も少ない株 (W 株; 120 mg/L) に比べ、約 16 倍の生産量を示した。さらに、前駆体であるシキミ酸生産量は、BL21(DE3)株 (880 mg/L) は W 株 (60 mg/L) に比べ約 15 倍多かった。一方で炭素源であるグリセロール消費量に関しては、株毎に大きな違いはなく、BL21(DE3)株は他の大腸菌株に比べ、シキミ酸経路の代謝フラックスが強いことが示唆された。

Development of aromatic compound production technology using various *Escherichia coli* strains

○Masatoshi Tomura¹, Takahiro Bamba^{1,2}, Tomohisa Hasunuma^{1,2}, Akihiko Kondo^{1,2,3}
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBCR, Kobe Univ., ³CSRS, RIKENS)

Key words *Escherichia coli*, 4-hydroxybenzoic acid

4C01-04 4-ヒドロキシフェニル酢酸-3-モノオキシゲナーゼ遺伝子を高発現した大腸菌によるチロソールのヒドロキシチロソールへの変換

○藤澤 誠¹, 駒 大輔², 大橋 博之², 山中 勇人², 森芳 邦彦², 長森 英二³, 大本 貴士²
(¹大阪工大・院, ²大阪技術研, ³大阪工大・工)
koma@orist.jp

ヒドロキシチロソール (HT) は高い抗酸化作用を持ち、化粧品やサプリメント等に利用されている。しかし、天然のオリーブ由来 HT は非常に高価であり、また化石資源を原料とする化学合成 HT は環境負荷の観点から好ましくない。そこで我々は、低環境負荷で安価な HT 製造方法として、大腸菌を用いた発酵生産方法の開発に取り組んできた。これまでに作製した HT 生産大腸菌は、ジャーファメンターを用いたグルコースの流加培養により、7.8 g/L の濃度で HT を発酵生産することが可能であった (第 73 回日本生物工学会大会, 2021 年)。しかし、生産物である HT の毒性に起因すると考えられる発酵阻害が見られた。そこで本研究では、大腸菌の潜在的な HT 発酵生産能の解明を目指し、HT 合成経路中の最終反応であるチロソールの酸化反応によって得られる HT の最大濃度を決定することを試みた。

大腸菌 BL21 株由来の 4-ヒドロキシフェニル酢酸-3-モノオキシゲナーゼ遺伝子 (hpaBC) を T7 プロモーターに連結し、大腸菌 MG1655(DE3)株の染色体に導入することで、チロソールを酸化して HT を生成する菌株を作製した。効率的な酸化反応を達成するために、遺伝子の発現温度、反応の至適温度と pH、チロソールと HT の最小発育阻止濃度を調べ、培養条件等を最適化した。ジャーファメンターを用いたグルコースの流加培養を行い、途中でチロソールを添加して反応を開始し、培養液中のチロソールと HT の濃度を HPLC で適時測定した。最終的に、17 g/L のチロソールを添加して、18 g/L の HT を得ることが可能であった。それ以上の濃度でチロソールを添加した場合には大腸菌の酸素消費が停止し、未反応のチロソールが蓄積した。これらの結果から、大腸菌は潜在的に 18 g/L の濃度で HT を生産することが可能であり、この値が発酵生産で目指すべき濃度であることが示唆された。

Efficient bioconversion of tyrosol to 3-hydroxytyrosol by *Escherichia coli* overexpressing the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase gene

○Makoto Fujisawa¹, Daisuke Koma², Hiroyuki Ohashi², Hayato Yamanaka², Kunihiko Moriyoshi², Eiji Nagamori², Takashi Ohmoto²
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Inst. Technol., ²ORIST, ³Fac. Eng., Osaka Inst. Technol.)

Key words hydroxytyrosol, *Escherichia coli*, fermentation

4C01-05 マイクロドロプレットを用いた大腸菌指向進化実験のとりくみ

佐藤 玲子¹, 大竹 理寛¹, 高イカイイ¹, 戸谷 吉博², 清水 浩²,
○鈴木 宏明¹
(¹中央大・理工, ²阪大院・情報)
suzuki@mech.chuo-u.ac.jp

環境に優しい循環型社会の実現に向けて、微生物を用いた有用物質生産が期待されている。清水らは、フラックスバランス解析 (FBA) に基づいた遺伝子破壊と、それに続く指向性進化により、増殖速度と連動させた化合物生産性の向上が可能であることを示した(1)。本研究では、近年細胞機能のスクリーニングで広く利用が進んだマイクログロプレット系を上記の指向性進化実験に適用し、従来法との比較検討を行った。

マイクログロプレットを用いて直径 120μm 程度の均一な油中水滴を作製した。連続相としてフッ素系オイルにフッ素系界面活性剤を溶解させたものを、分散相には 0.5%の低融点アガロース、合成培地(1)、および大腸菌を含む溶液を用いた。大腸菌は、コハク酸生産増加を設計した 5 遺伝子破壊株(P 株)を用い、均一油中水滴の濃度が約 0.3(細胞/水滴)程度になるように希釈して封入した。マイクログロプレットで生成した油中水滴中のアガロースを冷却によりゲル化させ、約 1 週間インキュベートした後、大腸菌コロニーを含むアガロースゲルボールを水中から抽出した。その後、ゲルボール中のシングルセル由来コロニーを、その大きさを指標として選別回収した。さらに、選別したコロニーの大腸菌を培養して油中水滴にシングルセル封入し、以降の作業を繰り返した。10 回以上のマイクログロプレット内継代培養を繰り返したところ、P 株に比べて増殖速度が増加した株が得られた。

本研究では、マイクログロプレットを用い、シングルセル由来コロニーの指向性進化培養系を構築した。従来のバクでの継代培養とは違った選択圧がかかっていることも予想され、今後は得られた株の遺伝型・表現型の解析を急に進めたい。

(1) K. Tokuyama et al., Biotech. Bioeng., 2018; 115:1542-1551.

An attempt of adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* using microdroplets

Reiko Sato¹, Masahiro Ohtake¹, Ikusai Kou¹, Yoshihiro Toya², Hiroshi Shimizu²,
○Hiroaki Suzuki¹
(¹Fac. Sci. Eng., Chuo Univ., ²Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words microfluidic device

4C01-06 マロニル-CoA 生合成を強化した大腸菌での遊離脂肪酸生産

○濱田 美志, 中平 洋一, 西澤 智康, 長南 茂
(茨城大院・農)
shigeru.chohnan.agr@vc.ibaraki.ac.jp

【目的】当研究室では、CoA 生合成経路の鍵酵素であるパントテン酸キナーゼ (CoaA) 遺伝子およびアセチル-CoA からマロニル-CoA の生成を触媒するアセチル-CoA カルボキシラーゼ (Acc) 遺伝子を形質転換した大腸菌において、細胞膜にリン脂質として脂肪酸を蓄積させることに成功している。今回、マロニル-CoA 増産株にシグナルペプチドを欠失したアシル-ACP チオエステラーゼ (TesA) を共発現させ、遊離脂肪酸生産におけるマロニル-CoA 増産の有効性を解析した。さらに、菌体外への脂肪酸排出における多剤排出トランスポーターの効果も併せて評価した。

【方法】グルコースを炭素源とした最少培地で各形質転換体を 30°C で 72 時間振とう培養した。脂肪酸生産量は、菌体から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出し、メタノール処理後、生成した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで測定した。脂質の組成は薄層クロマトグラフィーで解析した。

【結果・考察】TesA 発現により遊離脂肪酸が菌体の内外で確認された。TesA の Acc および CoaA との共発現株では、単独発現株と比較して脂肪酸生産量が 24% 増加しており、炭素数 16 のパルミチン酸が主であった脂肪酸組成が炭素数 14 のミリスチン酸が主となり、ほとんど観察されなかった炭素数 12 のラウリン酸も総脂肪酸量のおよそ 10% を占めた。TesA 共発現株では前培養における生育不良が観察されたが、多剤排出トランスポーターを導入することで生育が回復し、MdtC 導入株では脂肪酸量が 1.9 g/L に達し、TesA 単独発現株と比較すると 1.5 倍高い値を示した。このように、遊離脂肪酸生産においてもマロニル-CoA 増産は有効であり、脂肪酸排出系を組み合わせることで脂肪酸のさらなる増産の可能性も示唆された。

Free fatty acid production in engineered *Escherichia coli* with enhancement of malonyl-CoA biosynthesis

○Yoshiyuki Hamada, Yoichi Nakahira, Tomoyasu Nishizawa, Shigeru Chohnan
(Grad. Sch. Agric., Ibaraki Univ.)

Key words malonyl-CoA, free fatty acid, transporter, *Escherichia coli*

4C01-07 大腸菌染色体上のリボソーム結合配列改変を利用した最適メバロン酸生産

澤田 将吾, 松田 史生, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】目的物質生産を効率化するための代謝改変には、遺伝子破壊や遺伝子発現増強が用いられるが、中枢代謝の代謝フラックスの変化は増殖や栄養取り込みの活性に直結するため、過度な遺伝子発現量変化を人為的に起こすと細胞全体にとって悪影響を起こし、結果として目的物質生産が実現できないことも多い。そこで、大腸菌の中心炭素代謝経路の主要分岐点のフラックスを制御するため、菌染色体上のリボソーム結合配列 (RBS) を種々改変した株を構築し、望みの代謝フラックス分布を与える方法の開発を試みた。

【方法及び結果】大腸菌の *gltA* はクエン酸シターゼ (CS) をコードする必須遺伝子であり、その発現を抑制すると比増殖速度が低下することが予想された。そこで、Mage Oligo Design Tool (MODEST) を用いて段階的に *gltA* の RBS 強度を低下させるためのオリゴ DNA を生成し、変異の共通部位をランダムな塩基にしてゲノム編集による変異導入を実行した。得られたシングルコロニーを 96 穴プレートで培養し比増殖速度が低下した株を L 型試験管による振とう培養で再度評価したところ、段階的に比増殖速度が低下したライブラリーを得ることができた。同様の方法で構築したグルコース 6 リン酸イソメラーゼ (PGI) をコードする *pgi* の抑制配列 3 種類と *gltA* の抑制配列 3 種類を組み合わせた 2 遺伝子抑制株をゲノム編集により構築した。

得られた *gltA* および *pgi* 段階的抑制株の ¹³C-代謝フラックス解析を行ったところ、PGI および CS のフラックス比における段階的な変化と粗酵素活性、比増殖速度の相関関係が確認された。また、PGI の抑制および CS の抑制と組み合わせることでメバロン酸の生産性が向上することが予想されたため、CS と PGI の発現抑制を組み合わせたライブラリーを構築し、メバロン酸生産性を評価し、最適生産に適した株を得ることに成功した。

Optimal production of mevalonate by modification of ribosome-binding sequences of *Escherichia coli* chromosome

Shogo Sawada, Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic flux, ribosome-binding sequences, metabolic engineering

4C01-08 アンチセンス RNA を利用した光照射による代謝フラックス制御技術の開発

○櫻井 翔太, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】

微生物を用いた物質生産において、生産性を向上させるために代謝の流れ（フラックス）を最適化する技術が求められている。代謝フラックスを変化させるには鍵となる酵素の発現量の調節が有効であるため、酵素の遺伝子破壊や過剰発現が行われてきた。しかし、これらは静的な制御方法であるため培養途中で制御を切り換えることができず、代謝を常に最適な状態に維持することが困難であった。そこで本研究では光を誘導シグナルに用いた新たな代謝フラックス制御システムの開発を目的とする。本システムでは代謝の可逆的な制御が可能になり、自由度の高い代謝制御を行うことができる。

【方法・結果】

CcaS/R という光感受性タンパク質とアンチセンス RNA (asRNA) を組み合わせて代謝制御システムを構築した。CcaS/R は *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の光感受性タンパク質で、緑色光条件下では特定の promoter からの転写を誘導、赤色光条件下では転写を抑制する。一方、asRNA は標的 mRNA と相補的な配列をもつ RNA であり、mRNA と二本鎖を形成することで翻訳を阻害する。この asRNA の転写を CcaS/R で制御することで標的酵素の発現量を光で調整して代謝を制御できると考えた。中枢代謝経路の遺伝子 *pgi* を制御対象とする代謝光制御システムを構築し、大腸菌 MG1655(DE3) に導入した。大腸菌解糖系には Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 経路、Pentose phosphate 経路、Entner-Doudoroff 経路の 3 つの分岐した経路があり、*pgi* の発現を抑制すると EMP 経路のフラックス比が減少することが知られている。本システムを導入し、緑色光、赤色光条件下で培養した株の解糖系代謝フラックスを測定した結果、緑色光条件下で EMP 経路のフラックス比が約 22% 減少した。以上より、本システムにより光を誘導シグナルに用いて解糖系のフラックス比を制御できることを実証した。

Development of metabolic flux control technology by light irradiation using antisense RNA

○Shota Sakurai, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words optogenetics, *Escherichia coli*, metabolic flux analysis, metabolic engineering

4C01-09 非酸化分解糖経路の有望な目的化合物の検討と *in silico* 代謝デザイン

○三吉 健太, 一色 衣香, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

非酸化分解糖 (NOG) 経路は、大腸菌の解糖系での炭素ロスを回避することで、物質生産において重要な代謝中間体の一つであるアセチル CoA の収率を向上させることができる。しかし、NOG 経路では菌体合成や物質生産等に必要 ATP や NADH といった補酵素が生成されないため、NOG 経路により高生産可能な目的物質は限られる。また、微生物による物質生産において炭素収率を向上させるには、目的物質生産に向けた代謝の最適化が必要となる。増殖と目的物質生産をカップリングする増殖連動型の代謝設計は、増殖速度に優れた変異株を育種する実験室進化により、目的物質の生産性が向上した進化株を獲得することが期待される。

そこで本研究では、NOG 経路の導入が生産性を向上させる目的物質を探索するため、大腸菌の代謝経路の量論モデルを用いたフラックスバランス解析 (FBA) により目的物質の理論炭素収率を評価した。また、FBA を用いた多重遺伝子破壊シミュレーションにより、これらの化合物を生産する NOG 経路導入大腸菌の増殖連動型の代謝設計を行った。

大腸菌中枢代謝の化学量論モデルに、NOG 経路の 2 反応と大腸菌での物質生産が報告されている有用物質の生合成反応を追加した。バイオマス合成や呼吸による炭素ロスの影響を排除した条件下で、目的有用物質の生産最大化を目的関数として FBA を実行し、理論炭素収率を算出した。結果として、これまでに物質生産性の改善が報告されているアセチル CoA を前駆体とするイソプロパノールやメバロン酸だけでなく、アセチル CoA と α ケトグルタル酸から合成されるラクタム類やイソアミルアルコールについても NOG 経路による収率の向上が予測された。また、2 から 7 個の遺伝子破壊により、これらの化合物を増殖連動型で生産する大腸菌の代謝設計が可能であることが予測された。

Investigation of promising target compounds in the non-oxidative glycolysis and its *in silico* metabolic design

○Kenta Miyoshi, Kinuka Isshiki, Teppei Niide, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, metabolic flux analysis, non-oxidative glycolysis

4C01-10 青色光応答タンパク質を利用した中枢代謝フラックスの制御技術の開発

○赤木 駿斗, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】

バイオプロセスを用いた物質生産性の向上のためには、代謝の流れ（フラックス分布）を目的物質の生産に対して適した状態になるように調節する必要がある。これまで薬剤添加を用いた遺伝子発現制御によってフラックス分布の調節がなされてきたが、静的な代謝改変では細胞増殖と物質生産のバランスが保てないという問題点がある。本研究では、海洋細菌由来の青色光依存性 DNA 結合タンパク質 EL222 を用いて大腸菌の中枢代謝経路の酵素遺伝子の発現量を光条件によって変化させることで、Pentose phosphate (PP) 経路と Entner-Doudoroff (ED) 経路のフラックス比を制御することを目的とした。さらに、フラックス制御の高度化のため EL222 発現量増加に対するシステムの応答を調査した。

【方法・結果】

大腸菌 MG1655 (DE3) の解糖系の遺伝子 *pgi*、ED 経路のリプレッサー遺伝子 *gntR* を破壊した株を宿主に用いた。PP 経路と ED 経路のフラックスを調節するため、ゲノム上のそれぞれの経路の反応を触媒する酵素遺伝子 *gnd* と *edd* のプロモーター配列に対して、ゲノム編集技術を用いて EL222 と特異的に結合する DNA 配列を挿入した。構築した株を暗条件下、青色光下で [1-13C] グルコースを炭素源とする合成培地で回分培養した。GC/MS を用いて得られたアラニン中の 13C 濃縮度から PP 経路と ED 経路のフラックス比を決定した。PP 経路抑制型変異と ED 経路誘導型変異を 1 つの菌株に同時に導入することで、暗状態の PP:ED = 61%:39% から青色光下で 31%:69% に変化したことを確認した。また制御範囲拡大のため、EL222 発現を強化した制御システムの性能を蛍光タンパク質のレポーター系で調査した。また EL222 の発現量を増加させることによって、光制御のダイナミックレンジが 4.2 倍から 11.5 倍に拡大することを確認した。このことから EL222 発現の強化によるフラックス比制御の性能向上が期待できる。

Development of a method to regulate central metabolic fluxes using blue light responsive proteins

○Hayato Akagi, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic flux, gene expression, regulation, genome engineering

4C01-11 Development of ATP regeneration based on Non-Oxidative Glycolysis (ArNOG) module for cofactor recycling in *in vitro* biosynthetic pathways

Gladwin Suryatin Alim¹, Jonathan Ekaputra¹, Kenji Okano^{1,3}, Kohsuke Honda^{1,2}
(¹ICBiotech, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Dept. Life Sci. Biotechnol., Kansai Univ.)
honda@icb.osaka-u.ac.jp

Adenosine triphosphate (ATP) is an essential cofactor for biocatalytic conversion in which energy-dependent reactions are present. Although many research on cell-free ATP recycling have been conducted in past few decades, most encountered operational difficulties for example formation of insoluble salts between divalent metal ions and polyphosphate, pH decrease due to acetate accumulation, etc. In this research, ATP regeneration designed based on Non-Oxidative Glycolysis (ArNOG) (Bogorad et al., Nature 2013), utilizing starch as energy source and orthophosphate as main phosphate donor, was developed with twelve thermotolerant enzymes. In addition, co-expression vectors encoding all twelve enzymes were constructed for ArNOG module single-expression strain.

The ATP regeneration activity was assayed by a coupling reaction with glycerol kinase which catalyzes the phosphorylation of glycerol to glycerol 3-phosphate (GI3P). A mixture of individually expressed ArNOG enzymes resulted in a maximum titer of 41.6 mM GI3P from 50 mM glycerol (83.2% mol/mol) in the presence of only 0.1 mM ADP and 1% maltodextrin. Thus, ATP were successfully regenerated 416-times from ADP without any optimization. Under the same reaction condition, enzyme cocktail from ArNOG co-expression single strain achieved final titer of 42.8 mM GI3P, showing similar result with the former, thus validating the activity of the co-expression vectors.

Lastly, using this ArNOG module, UDP-glucose recycling pathway was designed as future work.

Development of ATP regeneration based on Non-Oxidative Glycolysis (ArNOG) module for cofactor recycling in *in vitro* biosynthetic pathways

Gladwin Suryatin Alim¹, Jonathan Ekaputra¹, Kenji Okano^{1,3}, Kohsuke Honda^{1,2}
(¹ICBiotech, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Dept. Life Sci. Biotechnol., Kansai Univ.)

Key words ATP, thermostable enzyme, *in vitro*, metabolic engineering

4C01-12 アンチセンスペプチド核酸を用いた減算的な菌叢改変手法の開発

○岡野 憲司¹, 日誌 達哉², 佐藤 悠³, 岩木 宏明¹, 本田 孝祐^{2,4}
 (1)関西大・化生工, (2)阪大・生工国際セ, (3)山口大院・創成・農, (4)阪大・先導的学際研機構)
 okano.k@kansai-u.ac.jp

微生物の集合体である菌叢は、宿主の健康改善や土壌の元素循環などに重要である。菌叢の働きを自在に改変・制御できれば、健康寿命の延伸や持続的耕地利用といった社会課題の解決に貢献できるが、そのような技術は存在しない。そこで、われわれは細胞膜透過作用のあるペプチド(CPP)を用いて、標的微生物の必須遺伝子から転写される mRNA に結合するアンチセンスペプチド核酸(PNA)を菌叢微生物に導入し、菌種特異的に増殖を抑制する手法の開発に着手した。

KFFKFFKFFK のアミノ酸配列からなる CPP に対して、*Escherichia coli* の脂肪酸合成関連遺伝子である *acpP*、または *Pseudomonas putida* の細胞分裂関連遺伝子である *ftsZ* に対するアンチセンス PNA を結合させた融合材料である CPP-PNA を合成した。各々の CPP-PNA を *E. coli*, *P. putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactiplantibacillus plantarum* の単培養系に添加したところ、CPP-PNA が標的とする微生物に対してのみ増殖抑制効果を発揮することがわかった。続いて、4 菌の混合培養系に対して各々の CPP-PNA を導入した結果、両菌の増殖を選択的に抑制することに成功した。興味深いことに *P. putida* の増殖抑制に伴い *L. plantarum* の増殖能が低下することや、*P. fluorescens* の増殖能が向上することがわかった。従って、アンチセンス PNA は、菌叢改変ツールとしてのみならず、微生物間の増殖連関を解析するためのツールとしても有用であることが示唆され、菌叢機能の理解と応用のための強力なツールになると期待できる。

Subtractive modification of microbiota by using anti-peptide nucleic acid

○Kenji Okano¹, Tatsuya Hizume², Yu Sato³, Hiroaki Iwaki¹, Kohsuke Honda^{2,4}
 (1)Fac. Chem. Mater. Eng., Kansai Univ., (2)ICBiotech, Osaka Univ., (3)Grad. Sch. Sci. Tech. Innov. Agric., Yamaguchi Univ., (4)OTRI, Osaka Univ.)

Key words Peptide nucleic acid, Cell penetrating peptide, Microbiota

4C03-01 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 脂質代謝経路の ¹³C トレーサー解析

○山田 侑季¹, 村上 慶多¹, 岡橋 伸幸^{1,2,3}, 遠山 敦彦⁴, 飯田 順子^{2,4}, 松田 史生^{1,2,3}
 (1)阪大院・情報, (2)阪大島津協働研, (3)阪大先導研, (4)島津製作所)
 fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】

酵母の油脂生産性向上に資する知見を得るには、脂質代謝経路中の代謝流束(フラックス)を解析する技術が必要である。そこで本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂質代謝経路に注目し、脂質の ¹³C 標識割合を質量分析装置で計測する手法の構築を目指した。

【方法】

S. cerevisiae 実験室株 (BY4947) を 50 mL の非標識および [U-¹³C] グルコース含有 SD 培地でフラスコ培養した (30°C, 120 rpm)。対数増殖期 (0, 3, 4, 5, 6 h) と定常期 (24 h) で回収した菌体を Folch 法を用いて脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー-四重極飛行時間型質量分析装置 (Shimadzu) で分析した。脂質の同定には MS-DIAL ver. 4.70 を使用し、Isotope Calculate Gadgets を用いて天然同位体を除く補正と ¹³C 平均標識割合の算出を行った。

【結果】

S. cerevisiae BY4947 株を非標識グルコース含有 SD 培地で培養した。抽出した脂質のノンターゲットリビドミクスを行った結果、37 クラス 442 分子種の脂質同定に成功した。得られた ¹³C 標識割合と理論上の天然同位体比を比較し、よく一致していたことから分析の妥当性を確認できた。次に、[U-¹³C] グルコース含有 SD 培地で菌体を培養し、抽出した脂質の ¹³C 標識割合を分析した。9 クラスの脂質 (PA, PG, PC, PE, PI, PS, PL, CL, TAG, DAG) で同位体計測チャネルを作成し、得られたピーク面積値から天然同位体の影響を除去した。各脂質の ¹³C 平均標識割合を求めた結果、極性頭部の構造の違いに応じて ¹³C 標識挙動が異なることがわかった。特に、24 h における PC の ¹³C 平均標識割合は TAG に比べて 1.2 倍大きい値を示し、DAG から PC に流れるフラックスが TAG に流れるフラックスよりも大きいことが示唆された。以上の結果から酵母の油脂生産性向上のためには、リン脂質合成の代謝を制御し、炭素の流れを TAG 合成に向ける必要があると推定された。

Development of ¹³C-tracer analysis of lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

○Yamada Yuki¹, Murakami Keita¹, Okahashi Nobuyuki^{1,2,3}, Toyama Atsuhiko⁴, Iida Jun^{2,4}, Matsuda Fumio^{1,2,3}
 (1)Grad. Sch. IST, Osaka Univ., (2)Omic. Innov. Res. Lab, Osaka Univ. Shimadzu Corp., (3)OTRI, Osaka Univ., (4)Shimadzu Corp.)

Key words labeling experiment, lipid, ¹³C-tracer analysis, *Saccharomyces cerevisiae*

4C03-02 Data-independent acquisition (DIA) 法による脂質構造異性体の分離法の構築

○原 大樹¹, 小森 柁花¹, 岡橋 伸幸^{1,2,3}, 遠山 敦彦⁴, 飯田 順子^{2,4}, 松田 史生^{1,2,3}
 (1)阪大院・情報, (2)阪大島津協働研, (3)阪大先導研, (4)島津製作所)
 fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】

脂質のアシル鎖長や不飽和度が物性や機能性に影響するため、アシル鎖の組み合わせが異なる脂質構造異性体を分離可能な分析法の開発が求められる。そこで本研究では、質量分析装置の動作モードの一つである Data-independent acquisition (DIA) 法を用いてアシル鎖由来シグナルを捉えることで、グリセロ脂質に存在し得る構造異性体を網羅的に探索し、分離定量できる解析法の構築を目指した。

【方法】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の実験室株 (BY4947) を回分培養し、定常期の菌体を回収した。この細胞懸濁液と、ヒト血漿 (SRM1950, NIST) のそれぞれから Folch 法によって脂質を抽出し、LC-QTOF/MS (島津製作所, LCMS-9030) を用いて、DIA モードにより分析した。データ解析には、MS-DIAL (ver. 4.70) と Skyline (ver. 21.2) を用いた。

【結果】

酵母とヒト血漿の脂質抽出液を DIA モードにより分析した結果、酵母で 24 クラス 297 分子種、ヒト血漿で 35 クラス、568 分子種を同定した。次に、グリセロ脂質で、アシル鎖に特異的なプロダクトイオンを検出できるリストを全分子種パターンで作成し、DIA データに適用した。炭素数が 34、不飽和度が 1 (以下 34:1 と表記) のリン脂質を探索すると、16:1 18:0、16:0 18:1 のリン脂質の分離定量に成功し、いずれの脂質クラスでも前者が有意に多いことがわかった。この解析法により、計 27597 パターンの脂質分子種の網羅的な探索が可能となった。本手法によって、酵母で 7 クラス、98 種、ヒト血漿で 5 クラス、101 種の構造異性体の分離定量に新たに成功した。特に、トリアシルグリセロールがその 8 割以上を占め、多様なアシル鎖をもつ構造異性体が存在していることを見出した。本解析法による全アシル鎖パターンの可視化は、様々な生物種の脂質分布の把握に有用であることが示唆された。

Data-independent acquisition (DIA)-based method for separation of structural isomers of lipids

○Daiki Hara¹, Shuka Komori¹, Nobuyuki Okahashi^{1,2,3}, Atsuhiko Tohyama⁴, Junko Iida^{2,4}, Fumio Matsuda^{1,2,3}
 (1)Grad. Sch. IST, Osaka Univ., (2)Omic. Innov. Res. Lab, Osaka Univ. Shimadzu Corp., (3)OTRI, Osaka Univ., (4)Shimadzu Corp.)

Key words data-independent acquisition, glycerolipid, structural isomers

4C03-03 様々な酵母種間に見られる代謝戦略の比較解析

○清家 泰介¹, Prihardi Kahar², 荻野 千秋², 松田 史生¹
 (1)阪大院・情報, (2)神戸大院・工)
 taisuke_seike@ist.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】

酵母は現在約 1500 種が知られており、多種多様な表現型を示す。特に酒造りには欠かせない出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や他の一部の酵母は、酸素存在下でも呼吸よりも好気的発酵を行うクラフトリー効果を示すが、なぜエネルギー効率の低いアルコール発酵をするのかはよく分かっていない。そこで本研究では、様々な酵母種間での代謝戦略の違いを比較することを目的とした。

【方法】

実験室酵母 *S. cerevisiae* (BY4947) を含む、遺伝的に大きく異なる 12 属 15 種の酵母株を実験に使用した。50 mL の合成培地で回分培養を行い、48 hr まで経時的に培地サンプルを回収した。また対数増殖期、定常期初期、定常期後期の菌体を回収し、メタノール・クロロホルム・水法で細胞内代謝物を抽出した。培地成分は HPLC (島津 Prominence)、細胞内代謝物は GC-MS (島津 GCMS-QP2020) および LC-MS/MS (島津 LCMS-8060MX) で分析した。

【結果・考察】

まず SD 培地での 15 株の比増殖速度を比較すると、*Kluyveromyces marxianus* が 0.50 [h⁻¹] で最も速く、調べた酵母種の半分以上が *S. cerevisiae* より速く増殖した。一方、グルコース消費速度を比較すると、*S. cerevisiae* は 16.2 [mM/DCW・h] と高くなっており、他の株はこれより低かった。そこで酵母種間での炭素利用率を調べた結果、グルコースの消費が速い種は主にアルコール発酵を行い、消費の遅い種は発酵を行わずにその分をバイオマスに使用していることが分かった。さらに細胞内メタボロームの結果から、グルコース消費が速い種ほど、ピルビン酸や NADH の蓄積量が多い傾向にあった。以上から、グルコースの消費速度が呼吸と発酵の代謝の切替えに重要であり、酵母種間で代謝戦略が大きく異なることが示唆された。本研究の一部は、NEDO「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」で行われた。

Comparative analysis of metabolic strategies among various yeast species

○Taisuke Seike¹, Prihardi Kahar², Chiaki Ogino², Fumio Matsuda¹
 (1)Grad. Sch. IST, Osaka Univ., (2)Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words yeast, metabolic analysis, ethanol fermentation, Crabtree effect

4C03-04 ピキア酵母による芳香族化合物大量生産に向けたチロシンシャーシ株の開発

○雲北 涼太¹, 番場 崇弘¹, 猪熊 健太郎¹, 伊藤 洋一郎^{1,2}, 近藤 昭彦^{1,2,3}, 進沼 誠久^{1,2}
(¹神戸大院・科技術イノベ,²神戸大・先端バイオ工研セ,³理研・環境資源)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

フラボノイド、ステルベノイドなどの植物由来の生理活性物質は芳香族アミノ酸「チロシン」から変換され、化成品業界や食品業界、製薬業界などの多方面で応用されている。現行の製造法では植物からの直接抽出に依存しているが、植物中の含量が少なく、また、天候・気温により植物の収穫量は大きく変動するため、安定供給が困難である。近年、合成生物学の進展により、微生物に植物由来の代謝経路を実装し、微生物の物質生産能力を活用して物質生産する技術開発が進められている。中でも酵母は植物由来物質の生合成に優れ、物質生産の宿主として期待されているが、チロシン由来の芳香族化合物生産については未だ実績が乏しい。

本研究では、*Pichia pastoris* (ピキア酵母) に着目した。ピキア酵母は好気条件下で増殖が速く、発酵産物 (エタノール) を生産しないため、チロシンを短時間で高生産できる可能性がある。しかしながら、これまでピキア酵母でチロシンやチロシン由来の芳香族化合物を生産した報告はなく、高生産に有効な遺伝子もわかっていなかった。そこで、(1) チロシン生産量の簡便な評価系の立ち上げ、(2) チロシン生産性向上遺伝子の探索およびチロシン高生産株の作出、(3) 芳香族化合物生合成経路の導入を施すことで、ピキア酵母による芳香族化合物の発酵生産に初めて成功した。また、開発した新規ピキア酵母の細胞内代謝物を網羅的に解析したところ、代謝改変株では、チロシンやチロシン合成に関与するシキミ酸経路の代謝物が多数蓄積していることが明らかとなった。この結果は、代謝改変によりチロシンへの代謝フラックス増強に成功したことを示唆している。

本発表では、軽油代替燃料として利用可能なバイオディーゼルの製造する際に生じる副産物「グリセリン残渣」を原料とした芳香族化合物群の発酵生産についても紹介する。

Construction of tyrosine chassis for aromatic secondary metabolite production in *Pichia pastoris*

○Ryota Kumokita¹, Takahiro Bamba¹, Kentaro Inokuma¹, Ito Yoichiro^{1,2}, Kondo Akihiko^{1,2,3}, Hasunuma Tomohisa^{1,2}
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²EGBRC, Kobe Univ., ³CSRS, RIKENS)

Key words metabolic engineering, *Pichia pastoris*, aromatic secondary metabolite, crude glycerol

4C03-05 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* が産生する揮発性成分と油脂蓄積量の相関調査

○中井 慶治¹, 古野 正浩¹, 本田 孝祐¹, 福崎 英一郎^{1,2,3}
(¹阪大院・工,²阪大・先導的学際研機構,³大阪大学島津分析イノベーション協働研究所)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

微生物培養による有用物質生産の最適化のためには、発酵槽内の微生物培養状態を正確に把握することが重要である。近年、代謝物プロファイル (メタボローム) を説明変数として生物試料の表現型を定量的に説明するメタボリックフィンガープリンティングが注目されている。従来は、微生物の培養状態を把握する際、培養液中のメタボロームを説明変数としてきた。しかし、培養液の中の代謝物分析は、サンプル採取による破壊的分析、微生物汚染の危険が課題である。そこで本研究では、これらの課題を解決するため、培養液ではなく培養排気ガスに含まれる微生物が生産した揮発性代謝物に注目した。概念立証のために培養排気ガス中に存在する揮発性成分と微生物が生産する有用物質の相関を調査することで、有用物質を非破壊予測することを目的とした。また本研究で扱った微生物は、有用物質である油脂を細胞内に蓄積する油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* である。

培養排気ガスと培養液は、それぞれタイムコースサンプリングを行った。培養排気ガス中の揮発性成分は、大気中の微量有機化合物の捕集・濃縮に用いられる Tenax TA を用いて捕集し、GC/MS 分析を行った。そして、得られた揮発性成分の情報を説明変数、*Lipomyces starkeyi* が細胞内に蓄積する油脂量の情報を応答変数として OPLS (Orthogonal Partial Least Square) により回帰モデルを作成した。結果として、強い相関を有する予測モデルが作成された。また、この予測モデルに対して正に寄与する成分としてアルコール類が挙げられ、これらの揮発性成分の情報から油脂蓄積量の非破壊予測の実現が示唆された。

Investigation of the correlation between volatile components and lipid accumulation produced by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Yoshiharu Nakai¹, Masahiro Furuno¹, Kohsuke Honda¹, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ., ³Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words volatile organic compound, metabolomics, oleaginous yeast, GC/MS

4C03-06 未知の親水性代謝物の包括的構造推定に向けた in silico エピメタボライトデータベース (IEMDB) の開発

○和泉 自泰^{1,2}, 鳥越 大平², 中尾 素直¹, 相馬 悠希³, 池田 和輝², 中谷 航太¹, 高橋 政友^{1,2}, 馬場 健史^{1,2}
(¹九大・生医研,²九大院・シス生科,³九大院・農)
izumi@bioreg.kyushu-u.ac.jp

近年の液体クロマトグラフィー高分解能タンデム質量分析 (LC/HRMS/MS) 技術の発展によって、様々な生物試料から数千種類の代謝物由来の分子量関連イオンを観測できるようになった。しかし、検出されたピークに対して同定できる代謝物の割合は未だ~20%程度に過ぎない。一方、これら未知代謝物の中には既知代謝物の部分構造が異なる類縁体、すなわちエピメタボライト (epimetabolite) の存在が明らかとなっている。本研究では、未知の親水性代謝物の包括的構造推定を行うために、(1) 安定同位体ラベリング、(2) 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー四重極オービトラップ型高分解能質量分析 (unified-HILIC/AEX/HRMS/MS)、(3) 各種データマイニング技術、(4) in silico エピメタボライトデータベース (in silico epimetabolite database, IEMDB) による代謝物構造推定を併用した方法論を開発したので報告する。

はじめに、大腸菌、酵母、ヒトに含まれることが知られている 2,244 種類の代謝物に対して、56 種類の代謝反応様式 (酸化反応、加水分解反応、脱離反応、付加反応など) に基づく in silico 代謝反応を最大で 2 段階行うことで約 60 万種のエピメタボライト候補を算出した。続いて、得られたエピメタボライト候補に対して in silico MS/MS prediction を行い、これらの情報を IEMDB に格納した。¹²C₆ または ¹³C₆-グルコースを用いて培養した大腸菌サンプルを用いて検証した結果、2,046 種類の親水性代謝物候補の中から標準品を指標に 106 種の代謝物を同定し、IEMDB によるプリカーサーイオンの一致度およびプロダクトイオンのアノテーションスコアを基に 90 種類のエピメタボライトの帰属に成功した。以上の結果から、IEMDB を基盤とした我々の新たな方法論は、様々な生体試料に含まれる未知の親水性代謝物の構造推定に有効である。

In silico epimetabolite database (IEMDB) for comprehensive structure estimation of unknown hydrophilic metabolites

○Yoshihiro Izumi^{1,2}, Taihei Torigoe², Motonao Nakao¹, Yuki Soma³, Kazuki Ikeda², Kohta Nakatani¹, Masatomo Takahashi^{1,2}, Takeshi Bamba^{1,2}
(¹Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., ²Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., ³Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words metabolic pathway modification, metabolic analysis, enzyme reaction, bioinformatics

4C03-07 自然発酵パン種の in vitro 菌叢変遷の数理モデル化

○大城 凌人¹, 善藤 威史², 中山 二郎²
(¹山崎製パン・中央研 (現 九大院・農), ²九大院・農)
oshiro@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】自然発酵パン種 (sourdough) は乳酸菌と酵母が複合して発酵するが、継代の過程で菌叢が変遷する。sourdough の菌叢が変遷する原理を解明すれば、菌叢を制御するための理論が確立でき、パンの複合発酵技術が進展する。一方、菌叢が著しい腸内研究では、細菌叢の変遷を数式化して解析することで変遷の理解を深めており、このような数理工学的手法は sourdough にも有効と考えられる。本研究は sourdough 菌叢の変遷を数理工学の見点で理解することを目的として、sourdough 分離菌を in vitro で継代した実測値を用いて、変遷の数理モデル化を試みた。

【方法】sourdough から分離した乳酸菌 3 菌 (*Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*, *Limosilactobacillus fermentum*) と酵母 2 菌 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania unispora*) を用いた。これら 5 菌の単独種菌、もしくは 2~5 菌を組み合わせた 26 の混合種菌を調製 (全 31 の種菌) し、それぞれを sourdough 模倣液体培地で 14 回以上継代した。5 菌それぞれを選択的に培養する希釈平板法で菌数を測定した。一般化 Lotka-Volterra 方程式で記述した数理モデルのパラメータを変動させ、特定の微生物が菌叢から淘汰される原因を推定した。

【結果と考察】種菌の組み合わせは変遷パターンに影響した。2 種間に働く相互作用を組み込んだ数理モデルは、実測した全 31 の菌叢変遷パターンと定性的に一致した。5 菌混合種菌の継代において *W. confusa* と *K. unispora* が菌叢から淘汰され、その原因は *P. pentosaceus* からの負の相互作用によるものと予測した。さらに、毎度の継代で *W. confusa* を大量接種 (10⁹ cfu/ml) しても、菌叢中 1% 未満まで淘汰されると予測した。本研究より、sourdough 菌叢リレーの第 2 走者である *P. pentosaceus* との相互作用が、菌叢変遷の鍵を握ると考えられた。

1) Suzuki, K. et al.: *Ecol. Monogr.*, 91, e01469 (2021).

Mathematical modeling of in vitro population dynamics of sourdough microbiota

○Mugihito Oshiro¹, Takeshi Zendo², Jiro Nakayama²
(¹Yamazaki Baking CO., Ltd. (currently Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.), ²Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words microbial community, population dynamics, mathematical model, Lotka-Volterra equation

4C03-08 Metabolomics-based characterization of commercial coconuts from different origins

○Raffaello Riley C. Voluntad¹, Sastia Prama Putri^{1,2}, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}

(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., ³Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Coconuts are staple tropical fruits widely distributed across regions like Southeast Asia. Coconuts are often classified by origin, but the exact metabolite differences between coconuts from different origins have yet to be examined. Through gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of Indonesian, Thai, and Vietnamese-sourced coconut flesh and water, the relationship between the origins of coconuts and their metabolite profiles are studied. Principal component analysis revealed significant metabolite profile differences between Indonesian, Thai, and Vietnamese-sourced coconuts, with large separations between each cluster. For coconut flesh, Indonesian coconuts accumulated a majority of amino acids and sucrose, while Thai and Vietnamese coconuts accumulated a majority of sugars like glucose, fructose, and galactose. For coconut water, Vietnamese and Thai coconuts accumulated the vast majority of all metabolites. These differences may account for different flavor profiles of each regional coconut such as the sweetness of Vietnamese and Thai coconut water. The findings suggest the importance of origin in determining coconut metabolite profile, of which distinct key metabolites might be accumulated in different clusters of samples. This study would be valuable for understanding each coconut's characteristics. Moreover, the study could be included as a basis for efforts to guide future coconut breeding strategies and to optimize the use of certain types of coconuts for agricultural and industrial use.

Metabolomics-based characterization of commercial coconuts from different origins

○Raffaello Riley C. Voluntad¹, Sastia Prama Putri^{1,2}, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., ³Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words coconut, origin, metabolomics, GC/MS

4C03-09 Metabolite profile of cocoa beans and its correlation to environmental temperature

○Abu Hanifah¹, Hendy Firmanto², Sastia Prama Putri^{1,3}, Eiichiro Fukusaki^{1,3,4}

(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst., ³OTRI, Osaka Univ., ⁴Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The development of cocoa beans flavor precursors are influenced by different factors such as soil, microorganisms, and environmental factors (altitude, rainfall, and temperature). The temperature has been reported to influence the metabolites concentrations of the cocoa bean during fermentation. However, the correlation between environmental temperature and the metabolite profiles of cocoa beans is still not entirely understood. Therefore, a gas chromatography/mass spectrometry-based analysis followed by orthogonal projection to latent structure regression (OPLS-R) was used to investigate this correlation. Results emphasize seven metabolites (isocitric acid + citric acid, ethanolamine, γ -aminobutyric acid (GABA), succinic acid, glycerol, saccharic acid, and malic acid) that are associated with the environmental temperature. Additionally, the variation in the maximum and minimum temperature in the place of origin may be associated with the GABA intensity. This study may help the chocolate industry to identify the place of origin that yields cocoa beans with particular qualities.

Metabolite profile of cocoa beans and its correlation to environmental temperature

○Abu Hanifah¹, Hendy Firmanto², Sastia Prama Putri^{1,3}, Eiichiro Fukusaki^{1,3,4}
(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Indonesian Coffee and Cocoa Res. Inst., ³OTRI, Osaka Univ., ⁴Osaka Univ.-Shimadzu Omics Innov. Res. Laboratories, Osaka Univ.)

Key words cocoa, metabolomics, environmental temperature, correlation

4C03-10 Chitosan coating and low temperature treatment metabolomic analysis reveals different mechanism in delaying banana ripening

○Muhammad Maulana Malikul Ikram¹, Anjaritha Aa Parijadi¹, Kana Yamamoto¹, Fenny M. Dwivany², Ketut Wikantika³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}

(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Sch. of Life Sci. and Tech., ITB., ³Cent. of Remote Sensing, ITB., ⁴Ind. Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka Univ., ⁵Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka Univ.)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

To maintain banana fruit quality, several postharvest technologies have been developed. Storage at low temperatures is a common method to prolong the shelf life of food products, especially during transportation. Another well-known approach is the use of chitosan as an edible coating, which can extend the shelf life of fruit by preventing moisture and aroma loss, and inhibiting oxygen penetration into the plant tissue. Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of the banana ripening process was performed to clarify the global metabolism changes in bananas after chitosan coating or storage at low temperature. Both postharvest treatments were effective in delaying banana ripening. Interestingly, principal component analysis and orthogonal projection to latent structure regression analysis revealed significant differences in both treatments in the metabolite changes, indicating that the mechanism of prolonging the banana shelf life may be different. Chitosan (1.25% w/v) treatment stored for 11 days resulted in a distinct accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolite, an important precursor of ethylene that is responsible for the climacteric fruit ripening process. Low temperature (LT, 14 C) treatment stored for 9 days resulted in higher levels of putrescine, a polyamine that responds to plant stress, at the end of ripening days. The findings clarify how chitosan delays fruit ripening and provides a deeper understanding of how storage at low temperature affects banana metabolism.

Chitosan coating and low temperature treatment metabolomic analysis reveals different mechanism in delaying banana ripening

○Muhammad Maulana Malikul Ikram¹, Anjaritha Aa Parijadi¹, Kana Yamamoto¹, Fenny M. Dwivany², Ketut Wikantika³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Sch. of Life Sci. and Tech., ITB., ³Cent. of Remote Sensing, ITB., ⁴Ind. Biotech. Div., Inst. for Open and Transdisciplinary Res. Init., Osaka Univ., ⁵Osaka University-Shimadzu Omics Innov. Res. Lab., Osaka Univ.)

Key words Banana ripening, chitosan, metabolomics, low-temperature

4C03-11 Metabolites profile of soybean and red kidney bean tempe powder in different drying treatments

○Della Rahmawati^{1,2}, Made Astawan³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}

(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, Japan, ²Dept. Food Sci. Tech., Swiss German Univ, Indonesia, ³Dept. Food Sci. Tech., IPB Univ, Indonesia, ⁴OTRI, Osaka Univ, Japan, ⁵Osaka Univ., Shimadzu Omics Innov. Res. Lab, Osaka Univ, Japan)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Tempe has been known as one of the Indonesian traditional fermented foods commonly produced from soybean. The word tempe originally comes from a process of fermentation, not from the particular material. Therefore, tempe can be made from other legumes, such as red kidney beans. The food drying process usually affects the nutritional content of foods, leading to nutritional heat loss. This study applied different drying processes of legume tempe, namely oven-dry at 45, 50 and 60 0C for 6 hours, freeze-dry overnight, and freeze-crush using dry ice for about 10-20 seconds. And resulted samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) metabolomics based to investigate metabolites differences in each process, especially those related to nutritional content such as amino acids. The result showed that different drying processes yielded different amino acid profiles. Moreover, the oven-dry at 60 0C in soybean and red kidney bean tempe accumulated more amino acids, especially essential amino acids such as lysine, Isoleucine, threonine, and valine, compared with other drying treatments. This finding may help to select the most suitable drying treatment to develop secondary derivative products from tempe that could preserve nutritional compounds such as amino acids.

Metabolites profile of soybean and red kidney bean tempe powder in different drying treatments

○Della Rahmawati^{1,2}, Made Astawan³, Sastia Prama Putri^{1,4}, Eiichiro Fukusaki^{1,4,5}
(¹Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ, Japan, ²Dept. Food Sci. Tech., Swiss German Univ, Indonesia, ³Dept. Food Sci. Tech., IPB Univ, Indonesia, ⁴OTRI, Osaka Univ, Japan, ⁵Osaka Univ., Shimadzu Omics Innov. Res. Lab, Osaka Univ, Japan)

Key words Tempe, Legumes, Metabolomics, Drying process

4C03-12 メタボロミクスに基づいた、テnderココナッツウォーターの異なる保存状態の評価

○渡邊 拓海¹, Putri Sastia Prama^{1,2}, 福崎 英一郎^{1,2,3}
 (1)阪大院・工, (2)大阪大学先端の学際研究機構, (3)大阪大学高津分析イノベーション協働研究所)
 fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

テnderココナッツとは、ココヤシの果実であるココナッツの中で、成熟期間が6-9か月ものを指し、その液状胚乳であるテnderココナッツウォーターは豊富な栄養素を含み、健康飲料として注目されている。しかし、テnderココナッツウォーターは一般的に室温で約1日、冷蔵で約1週間と保存期間が極端に短く、その流通や産業的發展が制限されてきた。テnderココナッツウォーターの保存に関する先行研究では、明度や色度といった色やpH、可溶性固形成分(Brix)、紫外・可視領域における吸光度などの物理化学的特徴が保存中の品質を評価する指標になることがわかっている。しかし、テnderココナッツウォーターの異なる保存温度での品質の変化やそれに起因する代謝物についての研究はほとんどない。食品の味や香りに関わる多くの低分子化合物の網羅的分析に基づく科学であるフードメタボロミクスは、食品の保存状態の評価に用いられている。そこで、本研究ではメタボロミクスと物理化学的特徴の分析を用いることを考えた。本研究の目的は、テnderココナッツウォーターの異なる保存状態の評価の初段階として保存温度と期間に着目し、テnderココナッツウォーターの物理化学的指標ならびにGC/MS分析に基づく代謝物のプロファイルリングを調査し、得られた情報に基づく保存状態の評価を行うこととした。物理化学的指標の測定の結果、室温のサンプルのみ2日目の時点で有意な変化が見られた。また、GC/MS分析及び主成分分析に基づいた代謝物プロファイルリングの結果、室温のサンプルは保存日数の違いにより分離し、4°C、-18°C、-30°Cのサンプルは個体間の違いによって分離した。さらに、室温のサンプルでは糖類やアミノ酸の減少及び多価アルコールや有機酸の増加が確認でき、これらの化合物が品質劣化に大きく影響を及ぼす代謝物であることが示唆された。

Metabolomics-based evaluation of different storage condition on tender coconut water

○Takumi Watanabe¹, Sastia Prama Putri^{1,2}, Eiichiro Fukusaki^{1,2,3}
 (1)Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., (2)Industrial Biotechnology Initiative Division, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka Univ., (3)Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories)

Key words Metabolomics, Coconut, Storage, GC/MS

4D02-01 Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing.

○Tharatorn Rungreunthanapoi¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹, Mina Okochi¹
 (1)Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech, (2)Toshiba Corporation)
 okochi.m.aa@m.titech.ac.jp

[Background and purpose] Graphene field effect transistor (gFET) is an emerging sensor for volatile organic compounds (VOCs) sensing. However, gFET generally suffers from low selectivity and surface modification is required. Peptide mimicking olfactory receptor (OR) is promising probe due to its small size and simplicity. It could enhance sensor selectivity by precise VOC detection. Here, peptide-gFET biosensor for the detection of citrus volatile, limonene, was developed. The peptide probe was isolated from the OR of a fruit fly by employing a peptide array and gas chromatography technique then functionalized on gFET to achieve sensitive and selective detection of limonene.

[Methods] A peptide library was constructed from the OR and synthesized on cellulose membrane. Binding assay with limonene was performed, and the limonene binding strength was quantified. The selected peptide was modified on gFET for limonene detection.

[Results and discussion]

From the binding assay, limonene binding peptide was selected. The peptide was conjugated to graphene binding peptide to enable a one-step immobilization. Different concentration of limonene was added to the sensor while changes in drain current was monitored. The sensor exhibited high affinity with sensitivity and detection limit in pico molar level as well as high selectivity for limonene. The peptide functionalized gFET approach in this study represents a simple, rapid, sensitive and selective limonene detection and could be utilized for diverse sensing applications.

Investigation of olfactory mimetic peptide functionalized graphene field effect transistor for sensitive and selective limonene sensing.

○Tharatorn Rungreunthanapoi¹, Chishu Homma¹, Masayoshi Tanaka¹, Yoshiaki Sugizaki², Hideyuki Tomizawa², Atsunobu Isobayashi², Yuhei Hayamizu¹, Mina Okochi¹
 (1)Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech, (2)Toshiba Corporation)

Key words peptide, sensor, volatile organic compound

4D02-02 3D-HLD法を用いたバイオ医薬品の凝集体計測

○大澤 賢太郎^{1,2}, 安齋 由美子², 梅田 麻理子², 峯邑 浩行², 横山 雅美³, 福原 彩乃³, 内山 進^{3,4}
 (1)日立ハイテク, (2)日立製作所, (3)ユー・メディコ, (4)阪大院・工)
 kentaro.osawa.www@hitachi-hightech.com

バイオ医薬品に含まれる凝集体は、薬の有効性・安全性に悪影響を与える可能性が指摘されており、適切な評価が求められているが、サブミクロンの凝集体の分析技術は十分に確立されていない。今回我々は、サブミクロンの凝集体の定量測定が可能な新たな分析技術、3次元ホモダイナミック光検出(3D homodyne light detection; 3D-HLD)法を開発した。

3D-HLD法では、レーザー光を検体に対して3次元的にスキャンすることで個々の粒子からの反射光を検出し、反射光量の大きさに基づいて粒子サイズを算出する。粒子からの反射光は1つ1つ個別に検出されるため、異なる大きさの粒子が混合していても粒子サイズを正確に測定することができる。また、3D-HLDは96ウェルプレートに対応しており、1度に多数の検体を自動で測定することができ、セルの洗浄等の測定前後の手作業も不要である。測定時間は1検体あたり3分程度で、5時間以内に96検体の測定が可能である。さらに、測定に必要な検体量は20μLと微量であり、測定後に回収して他の分析装置に再利用することもできる。

本手法の妥当性検証のため、抗破傷風ヒト免疫グロブリン(human tetanus immune globulin; TIG)を攪拌して生成された凝集体を、3D-HLDと共振質量測定法(resonant mass measurement; RMM)を用いて測定を行い、両者で同等の結果が得られることを確認した。さらに、製剤における処方検討のデモンストレーションとして、30種類の異なる溶媒条件のTIGの凝集体測定を行い、3D-HLDを用いて条件による粒子濃度の差異を評価可能であることを示した。

Analysis of aggregates in biopharmaceuticals using the 3D-HLD

○Kentaro Osawa^{1,2}, Yumiko Anzai², Umeda Mariko², Hiroyuki Minemura², Masami Yokoyama³, Ayano Fukuhara³, Susumu Uchiyama^{3,4}
 (1)Hitachi High-Tech, (2)Hitachi, (3)U-Medico, (4)Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words aggregation

4D02-03 N,S-グラフェン量子ドット(N,S-GQD)の合成反応の最適化による電気化学的シグナル安定性の向上

○敦賀 健太¹, シャイクリザル エル ムツキン², 朴 龍洙^{1,2}
 (1)静大院・総合科技, (2)静大・グリーン科技研)
 park.enoch@shizuoka.ac.jp

ノロウイルス(NoV)は、下痢や嘔吐などの症状を伴う散発性及び流行性の胃腸疾患を引き起こす可能性のあるウイルスである。迅速で高感度なNoV検出法の開発は、NoV感染症による食中毒の発生や拡大を防ぐ上で極めて重要である。現在、NoVの検出においては、リアルタイムRT-PCR法やEnzyme Immunoassayキットを用いた方法が用いられているが、操作の煩雑さや感度の問題がある。そこで本研究では、この問題を解決するために、抗体修飾N,S-グラフェン量子ドット@金ナノ粒子ポリアニリン複合体(Ab-N,S-GQD@AuNP-PAni)を堆積させたウイルス検出用電極を作製し、迅速で高感度、簡便なNoVの電気化学的検出を実現することを目的とした。本検出系においてAb-N,S-GQD上のSは、AuNP-PAni上のAuNPとの結合のアンカーサイトとして重要な元素であり、電極上の抗体修飾量に大きく関与する。そこで、N,S-GQDの合成反応における温度やpHなどの反応条件を最適化し、検出シグナル安定性への影響について調べた結果、190°C、pH=2.0条件下での合成において最もS量の多いN,S-GQDの合成が確認された。このN,S-GQDのS量は、既存の合成法と比較し、1.3倍程度であった。また、このN,S-GQDを用いて検出用電極を作製し、NoVの検出を行ったところ、電極の安定性は、CV値(変動係数)10%程度という良好な値が得られた。既存の材料を用いた電極のCV値が20%程度であったことから、N,S-GQD合成の最適化によって電極の安定性を大きく改善することに成功した。以上の結果は、この検出法の臨床検査への応用の可能性を示唆するものである。

Optimization of the synthesis reaction of N,S-graphene quantum dots (N,S-GQDs) to improve electrochemical signal stability

○Kenta Tsuruga¹, El Muttageen Sjaikhurri^{1,2}, Enoch Y. Park^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., (2)Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words virus, biosensor

4D02-04 Pt-embodiment ZIF-67-derived nanocage as enhanced nanozyme for infectious virus detection

○Indra M. Khoris¹, Kenta Tsuruga², Akhilesh B. Ganganboina³, Enoch Y. Park^{1,2,4}
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Nat. Inst. Mater. Sci., ⁴Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

A facile and general strategy has been employed to develop highly-active nanozyme for immunoassay purposes. The hollow nanostructure of the Co₃O₄ nanocages (NCs) was anchoring the platinum nanoparticles (PtNPs) enclosed by the exposed oxides framework and formed PtNPs@Co₃O₄ NCs. The embodiment of PtNPs was considered an ideal hybrid nanozyme that efficiently catalyzed the oxidation of the substrate molecules with enhanced activity. The PtNPs@Co₃O₄ NCs were revisited and repurposed on showing its nanozyme's activity with optimization done for the immunoassay platform. The embodiment of 32.44% Pt in the hollow nanostructures demonstrated the highest signal-to-noise responses in the immunoassay. In addition, the stepwise analysis highlighted the enhancement factor of the nanocages' catalytic mechanism. Based on their catalytic activity, these nanocages have been demonstrated to enable sub-femtogram level biosensing of norovirus-like particles (NoV-LPs) with highly selective signals in the capture-detect immunoassay format. The detection limit of the prepared immunoassay achieved 33.52 viral NoV copies/mL of the detection limit, which is 321-folds lower magnitude of the commercial ELISA. This nanocage's enhanced synergic catalytic properties could have great potential applications, including catalysis, biological labeling, and bioassays.

Pt-embodiment ZIF-67-derived nanocage as enhanced nanozyme for infectious virus detection

○Indra M. Khoris¹, Kenta Tsuruga², Akhilesh B. Ganganboina³, Enoch Y. Park^{1,2,4}
(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Nat. Inst. Mater. Sci., ⁴Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words norovirus, immunoassay, nanozyme nanomaterial, peroxidase-like activity

4D02-05 The development a simple polyaniline gold nanoparticle-based biosensor for norovirus detection

○Sjaikhurrazal El Muttaqien^{1,2}, Indra M. Khoris¹, Enoch Y. Park¹
(¹Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Research Center for Vaccine and Drug, National Research and Innovation Agency (BRIN), Indonesia)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Polyaniline (PANI) is well-studied conducting polymer in electrochemical biosensor due to its eminent conductivity. Gold nanoparticles (AuNPs) with its significant electron transport abilities have been widely used as an additive to synergistically enhanced the PANI-based material conductivity. In this study, the effect of the particle size of AuNPs on sensors performance to detect Norovirus-like particles (NoVLPs) was evaluated. The nanocomposite was prepared by ultrasonication assisted mixing of PANI and AuNP (5; 20; 40 nm). To fabricate the electrochemical sensors, PANI was firstly electropolymerized onto the surface of gold electrode (GE), followed by deposition of nanocomposite onto the polyaniline-coated GE. The free amine group of PANI was used as anchor for covalent immobilization of anti-NoV antibody by EDC/NHS. The TEM image of PANI-AuNPs nanocomposites shows that the AuNPs homogeneously distributed on the surface of PANI nanowires. From electrochemical impedance spectroscopy (EIS) analysis, all prepared sensors having various AuNP particle sizes showed good relationship between ΔR_{ct} and logarithmic values of NoVLP concentration. Such linear trend could not be observed on sensor without AuNPs, indicating the importance of improved conductivity rendered by AuNPs. Importantly, the LoD of the sensor with 5, 20, and 40 nm AuNPs are 96.61, 146.05, and 3097.62 fg/mL, respectively, highlighting the benefit of the smallest AuNPs to amplify the biosensor signal.

The development a simple polyaniline gold nanoparticle-based biosensor for norovirus detection

○Sjaikhurrazal El Muttaqien^{1,2}, Indra M. Khoris¹, Enoch Y. Park¹
(¹Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Research Center for Vaccine and Drug, National Research and Innovation Agency (BRIN), Indonesia)

Key words biosensor, polyaniline, gold nanoparticle

4D02-06 ナノマテリアルによる SERS を利用したウイルス検出装置の開発

○前畑 秀樹¹, Ojodomo Achadu², Memdi Indra³, 朴 龍洙^{1,2,3}
(¹静大院・総合科技, ²静大・グリーン科技研, ³静大・創科技院)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

ノロウイルス (NoV) は直径約 35 nm の粒子で一本鎖プラス直鎖 RNA を遺伝子として持つ、非常に感染力の強いウイルスである。感染すると、感染性胃腸炎を発症し、下痢や嘔吐、腹痛を引き起こす。感染力の強いウイルスを防ぐには感染の早期検出が重要である。そこで、ナノマテリアルによる表面増強ラマン散乱 (SERS) を利用したウイルス検出法の開発を目指し、三酸化モリブデン量子ドット (MoO₃ QD) や金ナノ粒子による近接効果を調査した。金ナノ粒子に 4-メルカプト安息香酸 (4-MBA) を修飾し、その後銀のコーティングを行い、Au@4-MBA@Ag NPs を作製し、ラマン基板に滴下し 4-MBA のラマン散乱強度を測定した。また、4-MBA を MoO₃ QD に修飾し、それを pH 応答性ナノゲルでカプセル化を行った。磁気ナノ粒子 (MNP) にマレイミドを修飾し、マレイミド磁気ナノ粒子を作製した。この 2 つの組み合わせによる MoO₃ QD の近接から生じる SERS を利用し、4-MBA のラマン散乱強度を測定し、評価した。Au@4-MBA@Ag NPs では高い 4-MBA のラマン散乱強度が測定され、4-MBA のみ、Au@4-MBA と比較しても有意な差があることを確認でき、ウイルス検出に利用可能であることが示された。4-MBA 修飾 MoO₃ QD をカプセル化したナノゲルと MNP の組み合わせでは、4-MBA 修飾 MoO₃ QD のみ、4-MBA 修飾 MoO₃ QD と MNP の組み合わせよりも高いラマン散乱強度を確認した。今後は以上のナノマテリアルを用いてウイルス濃度依存的にラマン散乱強度を測定できる系を構築し、ウイルス検出を行っていく。

Development of virus detection using SERS by nanomaterials

○Shuei Maehata¹, Achadu Ojodomo², Indra Memdi³, Enoch Park^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ²Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words Surface-enhanced Raman Scattering

4D02-07 ラマン分光を用いた赤潮終息予測のためのシングルセル分子解析

○安藤 正浩¹, 久保 昂也², 堀井 俊平², 外丸 裕司³, 羽野 健志³, 竹山 春子^{1,2,4}
(¹早大・ナノライフ創研研, ²早大院・先進理工, ³水産機構水技研, ⁴早大・生命動態研)
haruko-takeyama@waseda.jp

【背景と目的】ラマン分光法は、非標識・低侵襲的に、シングルセルレベルで細胞の分子解析ができる手法として、近年細胞識別などに応用が進んでいる。本研究では、赤潮終息時期を迅速に予測するため、ラマン分光法による赤潮原因プラントクトンのシングルセル分子イメージング解析を行った。成長段階を特徴付ける分子マーカーを探索し、減衰期を特徴付ける指標を構築することを目的とした。

【方法】珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* をモデルとして培養し、対数増殖期、定常期、減衰期を含む期間において、経日的に細胞をサンプリング、顕微ラマン分光計でラマンマッピング計測を行った。多変量スペクトル分解 (Multivariate Curve Resolution; MCR) 解析によりスペクトル分解し、各種生体分子由来の分子分布画像を構築した。各分子の強度寄与をともに、増殖期、減衰期の細胞を分類するモデルを構築、機械学習を行った。

【結果と考察】MCR 解析の結果、減衰期において多価不飽和脂肪酸の増加、及びマンノースやバルミトレイン酸の減少が観察された。また分子分布画像解析により、バルミトレイン酸と多糖類において、増殖期と減衰期の細胞で異なる局在を示した。さらに、各種分子成分の寄与を統合的に解析するため、主成分分析とサポートベクターマシンによる機械学習を行ったところ、増殖期と減衰期の細胞を明瞭に分類する特徴量を抽出することができた。この指標をもとに、増殖・減衰の状態にある細胞数をそれぞれカウントすることが可能となり、細胞培養の各段階において両状態の細胞数比を算出することができるようになった。これにより、バルクとしての細胞の減衰期の予測が可能であることが示唆された。

Single-cell Raman spectroscopic analysis for predicting the end of red tide

○Masahiro Ando¹, Kouya Kubo², Shumpei Hori², Yuji Tomaru³, Takeshi Hano³, Haruko Takeyama^{1,2,4}
(¹Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., ²Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ³FRA, Fish. Tech. Inst., ⁴Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words single-cell analysis, Raman microspectroscopy, chemical imaging, data mining

4D02-08 シグナリング方式 DNA マイクロアレイを用いた飲料/製菓分野向け微生物迅速検査システムの開発

○平川 祐子^{1,2}, 青木 秀年¹, 三森 裕示¹, 田口 朋之¹
 (1)横河電機,²農工大院・工)
 T.Taguchi@yokogawa.com

食品・医薬品の製造分野においては様々な工程で微生物検査が行われている。一般的な培養法では判定結果を得るまでに長時間を要するため、メーカーは製品を出荷できず在庫の管理や機会損失のリスクを抱えることになる。一方製品に微生物が混入していた場合、その種類によって適切な対策をとる必要があるが、微生物の同定には専門的な知識を要することから、専門スタッフの配置や外部への検査委託が必要になるなど、微生物検査をさらに煩雑なものにしている。このような背景から、迅速かつ簡便に微生物の性状を見極められる検査法が求められている。我々はこうしたニーズに応えるため、微生物検査システムを開発してきた。本報告では、DNA アレイを用いた微生物の多項目検出について報告する。

ヒト常在菌として *Staphylococcus aureus*、グラム陰性菌として *Escherichia coli*、水などの貧栄養環境下で生息する菌として *Methylobacterium aquaticum* を培養後、それぞれ菌体数を調製した。菌体数調製サンプルを高温加圧処理したものをテンプレートとして非対称マルチプレックス PCR を行った。反応液にハイブリダイズバッファーとして終濃度 5×SSC、1% Triton X となるよう調製し DNA アレイに 60°C で 30 分間反応させ、蛍光読取装置 (Yokogawa Electric Corp.) を用いてスポットの蛍光量を算定した。なお菌体数調製後の菌液は寒天培地に播種しコロニーカウントを行った。

結果より、本検査システムを用いて対象菌をそれぞれ検出し多項目検出が可能であることが確認できた。なお感度としては $10^4 \sim 10^6$ であった。非対称 PCR および非洗浄の DNA アレイを用いることで検査を簡便に行える他、一度の培養で性状を確認できるため、従来法に比べ短時間で検査を完了し適切な対応策を選択できるようになると考えられる。以上の結果から、本システムは微生物検査に有用であることが示された。

Development of rapid microorganism testing system for food / pharmaceutical field with the signaling probe-based DNA microarray

○Yuko Hirakawa^{1,2}, Hidetoshi Aoki¹, Yuji Mitsumori¹, Tomoyuki Taguchi¹
 (1)Yokogawa Electric Corp.,²Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words microbial detection, microarray, DNA probe

4D02-09 スタフィロコッカス属細菌の同定方法の開発

○石川 文啓, 多田 孝清
 (株式会社KRI)
 h-ishikawa@kri-inc.jp

スタフィロコッカス属の細菌はヒトを含む動物の皮膚や腸内に存在する常在性の細菌である。検体に混在して存在するスタフィロコッカス属の細菌を種レベルで検出・同定することによって、黄色ブドウ球菌などの有害菌、表皮ブドウ球菌などの有用菌、その他多数の無害菌を識別する事が必要とされている。標的細菌を簡易的に分類、同定する方法として、微生物の 16S リボソーム RNA 遺伝子をコードする DNA を PCR 法によって増幅しシークエンス解析する方法が用いられている。しかしながら、スタフィロコッカス属の細菌は近縁種と 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の類似性が高い事が原因で種を識別する事が困難となる問題があった。

我々は、スタフィロコッカス属では、リシン tRNA リガーゼ遺伝子 (LysS 遺伝子)、5S rRNA 遺伝子、8 種類の tRNA 遺伝子、16S rRNA 遺伝子がゲノム DNA に順に並んで存在しており、ゲノム DNA 上で一か所のみであることを見出した。その中でも、LysS 遺伝子から 5S rRNA 遺伝子の遺伝子間の DNA 配列の相違が著しい事に注目し、LysS 遺伝子から 5S rRNA 遺伝子の遺伝子間の DNA 配列を既知のスタフィロコッカス属細菌の DNA 配列と比較することにより、スタフィロコッカス属細菌を種レベルに簡易的に検出・同定する方法を開発した。ヒトの皮膚検体について、スタフィロコッカス属の細菌の LysS 遺伝子から 16S rRNA 遺伝子までの DNA 塩基配列を決定し BLAST 検索によって解析した。その結果、LysS 遺伝子から 5S rRNA 遺伝子間の塩基配列は、スタフィロコッカス属の細菌の株と 94%~99% の類似性で最上位にヒットした。次に類似性の高い株の DNA 配列は 82% から 89% であった。1 番目と 2 番目にヒットした株の DNA 配列の類似性の差は 7% から 14% であった事から、検索にかけた DNA 配列はすべて 1 番目にヒットした株の種であることが確認された。

Development of molecular identification methods for *Staphylococcus* species.

○Hisayoshi Ishikawa, Takakiyo Tada
 (KRI, Inc.)

Key words microbial detection, *Staphylococcus*

4D02-10 微生物熱測定法を用いたポリフェノール存在下での大腸菌増殖抑制効果の定量解析

○千原 菜緒¹, 柴田 敏行^{1,2}, 田中 礼士^{1,2}, 三宅 英雄^{1,2}
 (1)三重大院・生資,²三重大・海藻バイオリアファイナリー)
 miyake@bio.mie-u.ac.jp

微生物増殖抑制効果を調べる手法として、寒天平板希釈法と微量液体希釈法がある。これらの手法は、一定時間過ぎた後の評価や溶解度が低い阻害剤を含む培養液は評価が難しい。また、得られた阻害剤に関するパラメーターは、段階希釈による幅を持った値であるため定量性に欠ける。微生物増殖を定量的に評価する手法として微生物熱測定法がある。この手法は非破壊かつリアルタイムで微生物増殖を測定することができる。茶に含まれる茶カテキン類は抗菌・抗ウイルス作用がある。大型海藻である褐藻類にもフロロタンニン類が含まれており、茶カテキン類とよく似た生理機能を有する。そこで本研究では、微生物熱測定法を用いてポリフェノール存在下での大腸菌増殖抑制効果の定量的解析を検証した。

微生物として大腸菌を用いた。0.176-4.78×10⁻⁶ mol/L のフロロタンニン類、フロログリンノール、茶カテキン、没食子酸を含む培地を調製し、植菌後、微生物熱測定装置で増殖の際に生じる熱を経時的に測定した。得られたサーモグラムの各ポリフェノール濃度 (i) と発熱開始時間 (t₀) の遅れによる比増殖活性 [t₀(i)/t₀(0)]、もしくは増殖速度定数に相当する μ の減少による比増殖活性 [μ(i)/μ(0)] をプロットし、薬剤作用曲線から最小発育阻止濃度 (MIC) を定量的に解析し、これらの薬剤作用曲線のプロファイルから殺菌的、静菌的効果の評価を行った。解析の結果、フロログリンノールと没食子酸の MIC の値は 14.3 mmol/L と 25.4 mmol/L であり、これらは静菌的効果を持つことが分かった。フロロタンニン類と茶カテキン類の MIC の値は、1.04 mmol/L と 0.494 mmol/L であったが、フロロタンニン類がより強い殺菌的効果を持つことが分かった。微生物熱測定法は、一度の培養で殺菌的効果の静的効果の評価ができ、微生物増殖抑制効果を調べるのに有効な手段である。

Quantitative analysis of growth inhibition of *Escherichia coli* in the presence of polyphenols using microbial calorimetry

○Nao Chihara¹, Toshiyuki Shibata^{1,2}, Reiji Tanaka^{1,2}, Hideo Miyake^{1,2}
 (1)Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.,²Seaweed Biorefinery Res. Center, Mie Univ.)

Key words calorimetry, polyphenol, growth inhibition, phlorotannins

4D02-11 血小板が結合した血中循環腫瘍細胞の 3 D イメージング解析

○後藤 紗也香¹, 桶川 隆嗣², 出来 真弓², 中村 雄², 田中 剛¹, 吉野 知子¹
 (1)農工大院・工,²杏林大・医)
 y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【目的】血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells : CTC) はがん転移に関与するがん患者血液中を循環する腫瘍細胞である。当研究室において、胃がん、肺臓がん、尿路上皮がん等の固形がん患者由来 CTC の単一細胞トランスクリプトーム解析により、血小板が結合した CTC の存在が示唆されている。また、血小板とがん細胞の相互作用はがんの血行性転移に重要な役割をもつと考えられている。しかし、CTC と血小板の相互作用についてほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、血小板が結合した CTC の解析を目指して、当研究室が開発した細胞捕捉デバイス Microcavity array (MCA) を用いて末梢血から CTC を回収し、2D および 3D イメージング解析を試みた。

【方法・結果】はじめに、血小板が結合した CTC のモデル細胞として血小板を結合させたがん細胞株を MCA で捕捉後、血小板の染色を行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、血小板が結合したがん細胞を MCA 上で検出可能であることが確認された。次に、血小板を結合させた細胞株 NCI-N87、SNU-1 (悪性度: NCI-N87<SNU-1) を MCA で捕捉し、捕捉されたがん細胞のうち血小板が結合したがん細胞の割合を算出することで血小板の結合性を評価した。その結果、SNU-1 の方が血小板の結合性が高いことが確認された。したがって、悪性度が高いほど血小板の結合性が高い可能性が示唆された。最後に、尿路上皮がん患者血液を MCA に導入し、がん細胞、白血球、血小板の染色を行った。その後、蛍光顕微鏡及び共焦点顕微鏡によって CTC 候補細胞の観察を行った。その結果、血小板が結合した CTC 候補細胞の 3 D イメージングにより血小板との結合の詳細解析が可能であった。今後はさらなる臨床データを蓄積し、病態との関連解析を行う予定である。

3D imaging analysis of platelet-adherent circulating tumor cells

○Sayaka Goto¹, Takatsugu Okegawa², Mayumi Deki², Yu Nakamura², Tsuyoshi Tanaka¹, Tomoko Yoshino¹
 (1)Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Kyorin Univ. Med.)

Key words circulating tumor cells, platelet

4D04-01 好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* の代謝モデル構築とその検証

○小林 友哉¹, 渡邊 直暉¹, 屋良 みなみ¹, 坂本 大輔³, 近藤 昭彦², 荻野 千秋¹

(¹神戸大院・工, ²神戸大院・科技イノベ, ³神戸大・工)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【目的】好熱性放線菌 *Streptomyces thermoviolaceus* は増殖速度が高く、比較的高温での培養が可能なることから、冷却コスト低減や雑菌混入防止の観点から工業的な応用が期待されている。本研究では *S. thermoviolaceus* の遺伝子組み換えにより、化学物質やたんぱく質の生産を初めて成功させたが、これらの物質生産に適した代謝経路は未設計である。そこで本研究では、流速均衡解析 (Flux Balance Analysis; FBA) によるシミュレーションを行うことで最も効率的に物質生産を行う経路モデルの構築を試みた。

【実験方法】シミュレーションには対象生物の代謝反応を束ねた代謝モデルが必要である。本研究ではまず、*S. thermoviolaceus* の生育に必要な最低限の経路のみを加えたコアモデルを作成し、このモデルの評価を行った。先行研究において解析した *S. thermoviolaceus* のゲノムデータを Blast KOALA, KEGG mapper に入力し、好熱性放線菌の代謝経路をマッピングした。その結果を大腸菌の代謝経路と比較することにより、両種の中心代謝経路に大きな違いがないことがわかった。そこで、既存の大腸菌のモデルをテンプレートとし、マッピングした好熱性放線菌の代謝経路を参考に、コアモデルを構築した。

【結果】構築したコアモデルに対して FBA を行ったところ、必須アミノ酸 20 種類の合成と菌体増殖が行われていることが確認でき、モデルが正常に機能していることがわかった。今後は、好熱性放線菌の菌体構成成分を分析し、菌体増殖式を決定する。また、作成したモデルと実際の培養結果を比較することで、モデルの妥当性の評価を行う。

Construction and validation of a metabolic model of a thermophilic actinomycete, *Streptomyces thermoviolaceus*

○Kobayashi Tomoya¹, Watanabe Naoki¹, Yara Minami¹, Sakamoto Daisuke³, Kondo Akihiko², Ogino Chiaki¹
(¹Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ³Fac. Eng., Kobe Univ.)

Key words *Streptomyces*, secretory production, thermophilic

4D04-02 菌周病菌が産生する揮発性化合物のプロファイリング

○森 あすか¹, 谷口 百優², 久保延 雅恵³, 天野 敦雄³, 福崎 英一郎^{1,2,4}

(¹阪大院・工, ²大阪大学島津分析イノベーション協働研究所, ³阪大院・歯, ⁴阪大・先端の学際研機構)
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

口臭は、主に菌周病菌が産生する揮発性化合物によって形成される。中でも、硫化水素、メタンチオール、ジメチルサルファイドの3つの揮発性硫黄化合物 (VSC) は、主要な口臭原因成分として注目されてきた。しかし、3つの VSC のみでは全てのおいさを定性的に説明できない。正確な診断のためには、マーカーとなりうる新たなおい成分の探索が必要とされている。ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) は、揮発性化合物をノンターゲットで分析するための有用な方法である。一般的に口臭原因成分は、呼気中で低濃度に存在するため、GC/MS 分析の前に濃縮工程が必要とされる。モノリス型多孔質シリカゲル吸着剤である MonoTrap は、ローディングキャパシティが大きいことから揮発性化合物の濃縮に有用である。また、におい嗅ぎ GC/MS 分析は、機器分析による化合物の同定と、ヒトの嗅覚によるにおいの評価を組み合わせた分析技術であり、においの閾値が低い成分の検出に有効である。そこで本研究では、MonoTrap による揮発性化合物の濃縮捕集と、におい嗅ぎ GC/MS 分析を組み合わせることで、菌周病菌培養上清からの揮発性化合物プロファイリングを行い、新たなおい成分を探索することを目的とした。

2種の菌周病菌 *Fusobacterium nucleatum* 及び *Porphyromonas gingivalis* を対象とした。結果として、菌周病菌は VSC に加えて、アルコールや芳香族化合物など、様々なクラスに属する揮発性化合物を産生することが明らかとなった。また、重要な口臭原因成分とされている硫化水素やメタンチオール以外の VSC も口臭に寄与している可能性が示された。さらに、チオ酪酸 S-メチルなどのチオエステルは、より堅牢な菌周病菌バイオマーカーとなる可能性がある。

Profiling volatile compounds produced by periodontal bacteria

○Asuka Mori¹, Moyu Taniguchi², Masae Kubonwa³, Atsuo Amano³, Eiichiro Fukusaki^{1,2,4}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Osaka University Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, ³Grad. Sch. Dent., Osaka Univ., ⁴OTRI, Osaka Univ.)

Key words halitosis, volatile organic compound, periodontopathogenic bacteria, metabolomics

4D04-03 Lrp/AsnC 型転写制御因子による L-アスパラギン代謝制御機構の解明

丸山 凌¹, 谷本 充¹, 吉田 晃¹, 山本 康之¹, Liu Rengwei¹, 道盛 裕太¹, ○金井 保^{1,2,3}, 跡見 晴幸¹

(¹京大院・工, ²富山県大・生医工研セ, ³富山県大・工)
atomi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* がもつ AsnR 遺伝子は、Lrp/AsnC family に属する機能未知転写制御因子をコードする。AsnR がコードする転写制御因子の生理的機能の解明を目的として、まず、*T. kodakarensis* の *asnR* 破壊株を作製した。トランスクリプトーム解析の結果、本破壊株では宿主株 (KU216 株) と比べてアミノ酸異化代謝関連酵素遺伝子群の転写産物量が上昇していた。中でも L-asparaginase 遺伝子は最も増加率が大きく、AsnR の標的遺伝子の有力候補と考えられた。L-Asparaginase は L-Asn のアミド基を加水分解して、L-Asp とアンモニアを生成する反応を触媒する。そこで L-asparaginase 遺伝子のプロモーター配列を含む DNA 断片と組換え型 AsnR との *in vitro* における結合実験を行った結果、AsnR タンパク質が L-asparaginase 遺伝子のプロモーター上に結合することを確認した。この反応溶液中に L-Asn を加えると、AsnR と DNA との複合体がさらに高分子量化することが判明した。次に L-Asn により引き起こされる高分子量化と、細胞内における AsnR タンパク質を介した転写制御との関係性について検討を行った。天然培地を用いて *T. kodakarensis* KU216 株を培養し、その際に L-Asn, L-Asp, L-Gln, L-Glu (終濃度 10 mM) をそれぞれ添加した。得られた細胞抽出液を用いて、抗 L-asparaginase 抗体によるウエスタンブロット解析を行った結果、L-Asn 添加条件でのみ L-asparaginase の発現量の増加が確認された。以上のことから、*T. kodakarensis* 細胞内において AsnR はアミノ酸異化代謝関連遺伝子群の転写を制御する転写抑制因子であり、培地内の L-Asn 濃度の上昇によって DNA 上で構造変化を引き起こし、その転写抑制活性が解除されることが示唆された。

Elucidation of the L-Asn metabolic pathway controlled by a Lrp/AsnC-type transcriptional regulator

Ryo Maruyama¹, Mitsuru Tanimoto¹, Ko Yoshida¹, Yasuyuki Yamamoto¹, Rengwei Liu¹, Yuta Michimori¹, ○Tamotsu Kanai^{1,2,3}, Haruyuki Atomi¹
(¹Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., ²Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., ³Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words archaea, hyperthermophile, amino acid, transcriptional regulation

4D04-04 C₆ カルボン酸代謝酵素遺伝子群を導入した超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の解析

○浅井 祐亨¹, 村松 彩香¹, 折田 和泉¹, 今中 忠行², 福居 俊昭¹
(¹東工大・生命理工, ²立命館大・総合科学技術研究機構)
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】超好熱アーキア *Thermococcus kodakarensis* はピルビン酸やデンプンの存在下では H⁺ を最終電子受容体として水素発生を伴って生育する。本菌は C₆ カルボン酸代謝を担うクエン酸シンターゼ (CS)、アコニターゼ (ACN)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) の遺伝子を有さないため、TCA 回路は機能していない。一方で近縁種の *Pyrococcus furiosus* にはこれらの遺伝子クラスター (以下 Pf-TCA と略記) が存在するが、生理的意義は明らかでない。Pf-TCA が *T. kodakarensis* で機能すると還元型 Fd 生成量が増加し、水素発生量に影響を与えられられる。これまでに Pf-TCA 導入株を作製したが、ACN および IDH の活性が低かった。本研究では Pf-TCA 導入株における *acn* および *idh* の発現強化とその代謝への影響を解析した。

【方法・結果】強力かつ構成的な S-レイヤー糖タンパク質プロモーター (Pcsg) に Pf-TCA を連結して染色体上に挿入した *T. kodakarensis* KUW1Δ*hyh*-TCA (以下 TCA 株) を親株とし、*acn* および *idh* の上流それぞれに Pcsg を配した KUW1Δ*hyh*-TCA-3Pcsg (以下 TCA-3Pcsg 株) を相同性組換えで作製した。作製株の無細胞抽出液における ACN および IDH の酵素活性は、TCA 株と比較して TCA-3Pcsg 株ではそれぞれ約 2 倍、1.5 倍に増加した。次に各種 ¹³C 標識化合物 (ピルビン酸、Asp, Glu) を添加して培養し、代謝物への ¹³C 取り込みを LC-MS/MS で解析した。TCA 株および TCA-3Pcsg 株では培養上清にクエン酸の各種 ¹³C アイソトポマーが生成し、¹³C₅ や ¹³C₆ のクエン酸も検出されたため Pf-TCA 導入によって TCA 回路が機能し、酸化方向に 1 回転以上機能していることが示された。一方で添加 ¹³C 標識化合物由来の CoA 酸アイソトポマーが蓄積しており、以降の代謝が滞っていることが示唆された。現在、生育に伴う水素発生量を定量と代謝物の生成および消費を分析し、Pf-TCA 導入の影響を確認している。

Introduction of C₆-tricarboxylic acids-converting enzymes into hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○Ukyo Asai¹, Ayaka Muramatsu¹, Izumi Orita¹, Tadayuki Imanaka², Toshiaki Fukui¹
(¹Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, ²Sch. Res. Organization Sci. Technol., Ritsumeikan)

Key words hyperthermophile, *Thermococcus kodakarensis*, TCA cycle, hydrogen production

4D04-05 ゲノムデータとメタボロームデータを用いた酵素遺伝子と代謝産物の推定法の開発

○岡橋 伸幸, 松田 史
(阪大院・情報)
n-okahashi@ist.osaka-u.ac.jp

[背景]
特殊な構造の代謝物を産生する微生物の生合成酵素遺伝子は、新たな化学反応を触媒できる遺伝子資源である。しかし、酵素遺伝子の機能や基質・産物の同定には労力を要する。本研究では、代謝物とその生合成酵素遺伝子の関係性を推定する *in silico* 酵素反応プラットフォームを開発し、既知の代謝物の産生酵素を推定できるか検証した。

[方法]
ヒト腸内細菌 17 株を嫌気培養し、一層抽出した代謝物を LC-QTOF/MS で分析した。各菌株のゲノムデータは NCBI から入手し、BPGA を用いて Pan-genome を作成した。In silico 酵素反応は EC 番号の第 2-3 階層レベルで集約して記述した。

[結果・考察]
本法は、特定の菌株群にのみ検出された物質は、該当する菌株群のみが持つ酵素遺伝子によって産生されるという仮定に基づく。腸内細菌株 17 株のノンターゲットメタボローム解析を実施したところ、代謝物の産生傾向はおおよそ門レベルの分類と一致し、既報通り Bacteroidetes 門細菌にのみ Sphingolipid が検出された。続いて、各菌株のゲノムデータを用いて 41053 遺伝子からなる Pan-genome を作成し、Sphingolipid 産生菌にのみ存在する遺伝子を探索したところ、248 個が該当した。これらの遺伝子の触媒機能を配列相同性から推定し、DNA やタンパク質の修飾に関わるタンパク質を除外した結果、109 個が絞り込まれた。これらの酵素反応の産物を In silico 酵素反応プラットフォーム上で予測した結果、Sphingolipid 合成経路の最初の中間体 3-ketosphinganine の精密質量数に合致する基質と反応の組み合わせを見出した。これらのうちの一つは、正解であるセリンと Palmitoyl-CoA から 3-ketosphinganine を産生する serine palmitoyltransferase であり、本解析法が正しい基質-酵素遺伝子-産物の関係を推定できることを確認できた。

Development of a method for estimating enzyme genes and metabolites using genomic and metabolomic data.

○Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words untargeted metabolomics, enzyme identification, cheminformatics

4D04-06 微生物共培養のための精製タグ付きタンパク質を利用した ¹³C 代謝フラックス解析技術の開発

○川本 優一, 二井手 哲平, 戸谷 吉博, 清水 浩
(阪大院・情報)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

[背景・目的]

微生物を利用した物質生産の生産性を向上する手段として共培養がある。原料から目的物質への変換を複数種類の細胞に分担させることで、各細胞にかかる代謝負担を軽減することができる。細胞内の代謝状態を最適化するためには、¹³C 代謝フラックス解析によって代謝の流れを明らかにし、遺伝子操作を行うことで理想的な代謝状態に近づける必要がある。従来の ¹³C 代謝フラックス解析手法は単一培養にしか適用できず、複数種類の細胞が混在する共培養の解析を行うことは出来ない。本研究では共培養を行う片方の株に His タグ付き蛍光タンパク質 (GFP) を発現させることで、各株のフラックス解析が可能になると考えた。

[方法・結果]

大腸菌 MG1655(DE3) を宿主とし、中枢代謝経路のうち解糖系 (EMPP) とペントースリン酸経路 (PPP) の分岐反応を触媒する酵素の *pgi*, *zwf* 遺伝子を破壊した Δ*pgi* 株と Δ*zwf* 株を構築した。Δ*pgi* 株は EMPP の入り口が遮断されているため、EMPP のフラックス比が非常に小さくなり、逆に Δ*zwf* 破壊株は PPP の入り口が遮断されているため、EMPP のフラックス比が非常に大きくなることが知られている。この Δ*pgi* 株と Δ*zwf* 株を共培養することで、フラックス比の答え合わせが可能な実験系を構築した。それぞれの株に His タグ付き GFP を発現させるためのプラスミドを導入し、Δ*pgi*-GFP 株と Δ*zwf*-GFP 株を構築した。Δ*pgi* 株と Δ*zwf*-GFP 株、Δ*pgi*-GFP 株と Δ*zwf* 株の組み合わせで共培養を行い、細胞破砕液から精製した GFP と細胞ペレットに含まれるタンパク質混合物を加水分解し、アミノ酸の ¹³C 濃縮度を測定した。分析結果をもとに各株のフラックス比解析を行ったところ、予想した通りのフラックス比が得られ、本手法の有効性が確認された。

¹³C-metabolic flux ratio analysis using His-tagged GFP for microbial coculture

○Yuichi Kawamoto, Teppei Niide, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic flux analysis, coculture, purification, GFP

4D04-07 ヒト定量メタボロミクスに資する安定同位体標識内部標準群 (SILIS) のバイオプロダクション

○相馬 悠希¹, 高橋 政友², 今戸 優理², 松田 貴意³, 池田 明夏里⁴, 田邊 芽衣⁴, 寺内 勉⁴, 花井 泰三¹, 馬場 健史²
(¹九大院・農, ²九大・生医研, ³SAIL テクノロジーズ, ⁴太陽日酸)
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

メタボロミクスでは、高選択性・高感度・測定対象範囲の広さから各種クロマトグラフィー質量分析計が利用される。同手法の発展により様々な代謝プロファイルリング法が普及した一方で、質量分析では生体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリックス効果」が生じることで定量性が損なわれるため、各代謝物の絶対定量は殆ど実施されていない。

この問題の解決策として安定同位体希釈法 (Stable Isotope Dilution Method; SIDM) が考案されている。同法は定量対象代謝物の安定同位体標識化合物を濃度既知の内部標準物質として添加する内部標準法であるが、市販の安定同位体標準物質は非常に高価であり、代謝物の包括的解析を旨とするメタボロミクスにとって SIDM は非現実的な手法に留まっている。そこで、比較的安価な ¹³C₆-Glucose を単一炭素源にして大腸菌などを培養して ¹³C 標識し、代謝物群を一挙に取得する SILIS のバイオプロダクション法が考案されている。しかし、代謝物の網羅性と各代謝物の含有量は生物種ごとに大きく異なるため、野生型の微生物から得た SILIS を用いてヒト検体等を網羅的に定量することはできない。今後、急速な発展が予想される大規模コホート研究、国際協力研究、ビッグデータに基づく人工知能研究などに向けて、ヒト検体分析を含む定量メタボロミクスのための技術基盤の構築が急務となっている。

本研究ではヒト検体の定量メタボロミクスの実現に向けて、ヒト検体に適応可能な SILIS のバイオプロダクションに取り組んだ。人工代謝経路を用いて大腸菌の代謝を改変し、複数のヒト血漿由来の疾患バイオマーカーを含む SILIS を合成した。また合成した SILIS を用いた SIDM によってヒト血漿サンプル中のバイオマーカーを定量することに成功した。今後は合成可能な代謝物を拡張し網羅性の拡大に取り組む。

Bio-production of stable isotope-labeled internal standards (SILIS) for quantitative metabolomics of human samples

○Yuki Soma¹, Masatomo Takahashi², Yuri Imado², Takayoshi Matsuda³, Akari Ikeda⁴, Mei Tanabe⁴, Tsutomu Terauchi⁴, Taizo Hanai¹, Takeshi Bamba²
(¹Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., ²Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., ³SAIL Technologies Inc., ⁴TAIYO NIPPON SANSO)

Key words metabolomics, biosynthesis, *Escherichia coli*

4D04-08 アルツハイマーモデルマウス海馬の空間位置特異的な遺伝子発現解析

○山崎 美輝^{1,2}, 依田 卓也¹, 松永 浩子³, 細川 正人^{1,2,3,4}, 大島 登志男^{1,4}, 竹山 春子^{1,2,3,4}
(¹早大院・先進理工, ²産総研・早大 CBBB-OIL, ³早大・ナノライフ創新研, ⁴早大・生命動態研)
haruko-takeyama@waseda.jp

生体組織は、様々な種類の細胞が規則的に配置することで、1 細胞では得られない多様な機能を実現している。そのため、生体組織の生命現象を理解するには、組織内の空間情報を用いて細胞の種類や機能を解析することが重要である。当研究室では、空間情報を用いた生体組織の解析手法として、直径 100 μm の微小組織を高速で採取・回収する装置及びアプリケーションの開発を進めてきた (Yoda et al. Sci.Rep. 2017, Yamazaki et al. Sci.Rep. 2020)。本研究では、アルツハイマーモデルマウス (3xTg-AD マウス) と野生型マウスの脳組織切片から海馬領域に沿って微小組織 (各切片約 45 箇所) を採取し解析対象とした。微小組織から cDNA の全長ライブラリを取得し、領域特異的な遺伝子や病態に関与する遺伝子の抽出を目指した。

微小組織からは、平均 11,000 遺伝子が検出された。これは、空間的遺伝子発現解析を各遺伝子の 3'末端のみから解析する市販化スライドベースの手法と比較して約 2 倍多かった。3xTg-AD マウスにおいて、海馬内でも CA1 領域から CA3 領域に向かって領域特異的な発現パターンを示す遺伝子が複数見つかった。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患では、選択的スプライシングが神経変性の進行に関与するとされている。そのため、野生型マウスと 3xTg-AD マウス間の空間的遺伝子発現に加え、転写物の比較を行い、アルツハイマー病との関連について調べている。

本研究では、生体組織切片の微小組織から mRNA 全長の情報を取得することで、空間情報と紐付けた遺伝子発現、及び選択的スプライシングの解析が可能となることを示す。

Site-specific transcriptome analysis in the hippocampus of Alzheimer's disease mouse model

○Miki Yamazaki^{1,2}, Takuya Yoda¹, Hiroko Matsunaga³, Masahito Hosokawa^{1,2,3,4}, Toshio Ohshima^{1,4}, Haruko Takeyama^{1,2,3,4}
(¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²CBBB-OIL, AIST-Waseda Univ., ³Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., ⁴Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words transcriptome, microdissection, Alzheimer's disease, hippocampus

4D04-09 LC-MS/MS を用いた培養上清/細胞内抽出成分の一次分析による抗体高産生クローンの代謝解析

○黒田 博隆^{1,2,3}, 空田 和也¹, 山野 範子¹, 飯田 順子^{2,3}, 鈴木 崇², 本山 賢人², 大政 健史¹
(¹阪大院・工, ²島津製作所, ³大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所)
omasasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO 細胞) は、糖鎖修飾などの翻訳後修飾が可能、無血清培養が可能といった理由から、抗体医薬品生産の宿主細胞として広く使用されているが、微生物に比較して増殖が遅いという課題がある。その課題に対して当研究室では、CHO-K1 細胞より約 2 倍の増殖能を有し、抗体を短期間で生産可能なチャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL-YN 細胞) を樹立した。しかしながら、CHL-YN 細胞の代謝に関する情報は不足しており、抗体生産能に関連する代謝成分の同定やそれに基づく培養プロセス開発により、さらなる細胞増殖能や抗体生産能の向上が期待できる。そこで、本研究では細胞内外の多成分を一次分析し、抗体高産生株に特徴的な代謝成分の同定を試みた。

IgG 生産 CHL-YN 細胞のヘテロセルブールと IgG 高産生株を 7 日間回分培養した。24 時間ごとに細胞培養上清と細胞ペレットを回収し、前処理後、LC/MS/MS メソッドパッケージ細胞培養プロファイリング Ver.3 (島津製作所) を用いて 144 成分 (アミノ酸類: 72 成分, 核酸類: 32 成分, ビタミン類: 18 成分, 糖 4 成分, その他: 18 成分) を測定した。

その結果、培養上清において 72 成分、細胞ペレットより 93 成分が検出された。Volcano Plot により、ヘテロセルブールと高産生株の細胞内抽出成分プロファイルと比較したところ、最大生細胞濃度を示す Day3, 4 においてアスパラギン酸代謝に関わる代謝物が高産生クローンで有意に多いことが示された。細胞培養上清においては、この代謝物が高産生クローンでのみ培養後期に分泌される傾向が観察され、細胞内で余剰となった本代謝物が細胞外へ分泌される可能性が示唆された。以上より、細胞内外の成分の経時的変化を一次分析することにより、CHL-YN 高産生株に特徴的な成分を新規に同定することができた。

Metabolic analysis of antibody-high producing clone by simultaneous analysis of culture supernatant/intracellular extracted components using LC-MS/MS

○Hirota Kuroda^{1,2,3}, Kazuya Sorada¹, Noriko Yamano¹, Junko Iida^{2,3}, Takashi Suzuki², Kento Motoyama², Takeshi Omasa¹
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Shimadzu Corp., ³Osaka Univ. Shimadzu Omics Innovation Research Laboratories, Osaka Univ.)

Key words antibody, metabolic analysis, cell

4D04-10 メタボロームデータとフラックスデータを組み合わせた代謝制御点の探索法の開発

○丸山 正晴, 荒木 千絵, 岡橋 伸幸, 松田 史生
(阪大院・情報)
fmatsumada@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】

細胞は一部の代謝反応の調節を通じて代謝経路全体の流量を制御していると考えられている。この代謝制御点の理解は代謝の工学応用に欠かせないため、同定手法は未確立である。代謝フラックスは基質濃度に依存するため、両者の変化量比較から代謝律速点を抽出しうることに着目した。本研究では培養細胞のフラックスデータとメタボロームデータを用いて、分裂阻害剤を処理した時の代謝変動に寄与した代謝制御点を探索した。

【方法】

ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 に 10 nM の分裂阻害剤 paclitaxel (PTX) を処理し、24 時間培養した。GC-MS と LC-MS/MS で中心炭素代謝の中間体含量を計測した。フラックスデータは同一条件の先行研究 (Araki et al., 2018) より取得した。

【結果と考察】

PTX 処理細胞は比増殖速度が減少し、分裂阻害が確認された。メタボローム解析は 60 種の代謝物を検出できた。薬剤処理による基質の蓄積を評価するため、不可逆反応の基質濃度積の比を算出した。例えば、Fructose 6-phosphate (F6P) と Adenosine diphosphate (ADP) が基質である phosphofructokinase (PFK) では、濃度積の比は $[F6P][ADP] / [F6P][c][ADP]_c$ で算出される (t は薬剤処理群, c は非処理群での濃度)。この値は PFK で 1.54 倍、lactate dehydrogenase (LDH) で 1.41 倍、glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) で 1.32 倍、isocitrate dehydrogenase (IDH) で 1.29 倍、pyruvate kinase (PYK) で 1.17 倍と増加していた。これらの反応のフラックス変化量 (単位 $\text{nmol} \cdot 10^6 \text{cells}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) は、PFK、LDH、PYK でそれぞれ -187、-562、-450 と大きく減少していたのに対し、G6PDH と IDH では、11.2、43.9 とわずかに増加していた。PFK と PYK、LDH は基質が蓄積したにも関わらず、フラックスが減少したことから、PTX 処理により酵素活性が減少し、代謝制御点の役割を果たしたと考えられた。

Development of exploring method for metabolic control point combining metabolome data and flux data

○Maruyama Masaharu, Araki Chie, Okahashi Nobuyuki, Matsuda Fumio
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic analysis, cancer metabolism, central metabolism, metabolic response

4D04-11 好中球の活性酸素種産生能の制御に向けた中心炭素代謝経路の定量解析法の構築

○谷口 越夫, 岡橋 伸幸, 松田 史生
(阪大院・情報)
fmatsumada@ist.osaka-u.ac.jp

【背景】

免疫細胞が外敵駆除のために産生する活性酸素種 (ROS) は NADPH を基質とするため、その制御には代謝の流れを定量的に計測できる技術が必要である。そこで本研究では、血中の免疫細胞の約半数を占める好中球に適用可能な ¹³C 代謝フラックス解析法を開発し、中心炭素代謝のフラックス分布を指標として、ROS 産生に寄与する代謝経路の探索と制御に取り組んだ。

【方法】

骨髄系前駆細胞株 HL-60 を $[1, 2-^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[U-^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[U-^{13}\text{C}]$ 非必須アミノ酸のいずれかを含む培地で培養した。レチノイン酸の添加により好中球様細胞に分化させ、大腸菌由来リポ多糖 (LPS) の添加により免疫応答させた。細胞数・培地成分の経時変化と細胞内代謝物の ¹³C 標識割合を計測し、専用ソフトウェア "mfapy" を用いて ¹³C 代謝フラックス解析を行った。

【結果】

好中球が取り込む炭素源を探索するために、 $[U-^{13}\text{C}]$ グルコース、 $[U-^{13}\text{C}]$ 非必須アミノ酸 1 種ずつを含む培地で培養し、中心炭素代謝中間体の平均 ¹³C 標識割合を計測した。その結果、グルコース、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸が中心炭素代謝経路に流入することがわかった。先行研究の代謝モデル (Araki et al., 2018) に上記の炭素源の取り込みを追加し、代謝フラックス解析に必要な代謝モデルを最適化した。 $[1, 2-^{13}\text{C}]$ グルコース含有培地で細胞を培養し、LPS 処理前後における好中球様細胞の代謝フラックス分布を算出することに成功した。LPS を添加することで、グルコースの取り込み速度が 1.9 倍に増加し、LPS 未処理時は完全に不活性化していたペントースリン酸経路が活性化した。免疫応答中はリンゴ酸酵素が触媒する反応の代謝フラックスが NADPH 再生経路の中で最も大きかった。阻害剤を用いてこの経路に介入すると ROS 産生能が減少したことから、好中球機能を制御する代謝反応を見出すことができた。

Development of quantitative analysis of central carbon metabolic pathway for the regulation of reactive oxygen species production capacity of neutrophils

○Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic flux analysis, metabolic shift

4D04-12 カチオン条件の違いによる酸性環境下の大腸菌細胞内 pH 調節遺伝子群の探索

○福田 紘子¹, 住田 和弥¹, 森 浩禎², 中嶋 幹男³, 片岡 正和¹
(¹信州大院・総理工研, ²広東省農業科学院, ³MSL)
mars@shinshu-u.ac.jp

大腸菌は代表的な好中性細菌である。大腸菌の細胞内 pH は外部環境 pH が変化した際でも中性に維持されている。細胞内 pH が中性付近に維持されていない場合、ATP 合成などの酵素反応を含む様々な生化学反応が正常に進行しない。そのため、細胞内 pH の維持は、生命活動に必要な不可欠な要素の一つである。先行研究より、アルカリ条件下における大腸菌の細胞内 pH の調節にはカチオン/プロトンアンチポーター (NhaA, NhaB, ChaA) の関与が示唆されている (Krulwich et al., 2011)。しかし、酸性条件下の pH 調節に NhaA, NhaB, ChaA の関与は報告されていない。そのため、当研究室で、酸性条件下における NhaA, NhaB, ChaA に着目した細胞内 pH に関する先行研究を実施した。その結果、酸性条件下の細胞内 pH 調節に Na^+ , K^+ を介した pH 調節機構に加え、着目した機構とは異なる機構の存在が示唆された。以上より、酸性条件下における大腸菌細胞内 pH 調節機構に関わる遺伝子の探索を本研究の目的とした。本研究では、必須遺伝子を除く大腸菌の全 3,985 遺伝子を単一欠させた大腸菌株ライブラリ (Keio collection) を用いることで、大腸菌細胞内 pH 調節に関わる遺伝子を網羅的に探索した。測定には、約 4,000 株に及ぶサンプルの増殖動態の定量化を可能とする高スループットコロニー増殖測定システム (Colony-live system) を用いた。更に本研究では、細胞内 pH が酸性化した際の細胞挙動を観測するために、細胞内外の pH を等しくする効果をもつ膜透過性有機酸の安息香酸ナトリウムを用いた。 Na^+ 又は K^+ 条件の異なる酸性固体培地で Keio collection を生育させ、増殖動態を Colony-live system によって定量化した。結果、酸性条件下における胞内 pH 調節候補遺伝子を選定することができた。

Investigation of intracellular pH regulation genes of *E. coli* under acidic circumstances by using various cationic conditions

○Fukuda Hiroko¹, Sumida Kazuya¹, Mori Hirota², Nakajima Mikio³, Kataoka Masakazu¹
(¹Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., ²Guangdong. Acad. Agri. Sci. China, ³MSL Corp.)

Key words intracellular pH, Keio collection, homeostasis

4D04-13 広範な酵素反応予測のための機械学習モデルの開発

○渡邊 直輝¹, 山本 昌輝^{2,3}, 村田 昌浩^{2,3}, Vavricka Christopher J.³, 萩野 千秋¹, 近藤 昭彦^{1,3}, 荒木 通啓^{1,2,3,4,5}
(¹神戸大院・工, ²京都大院・医, ³神戸大院・科イノベ, ⁴国立医薬基盤・健康・栄養研, ⁵国立循環研セ)
araki@nibiohn.go.jp

【研究背景】酵素は生化学反応を触媒するタンパク質で、さまざまな化学物質・医薬品・食品添加物などを生成するために用いられている。近年、アノテーションが付与されていないタンパク質配列が増加する中で、新たな機能を持つ酵素が存在する可能性がある。代謝工学によって有用物質の生成に利用できる経路を拡大するためには、新たな酵素の発見が必要である。そのため、酵素反応を予測するための様々な機械学習モデルが開発されてきた。しかし、学習データに含まれない未知の反応を予測できるかは検証されていない。不確実な未知反応を予測するためには、より幅広い種類の反応をモデルで評価する必要がある。【研究内容】ここでは、Deep Neural Networkを含む様々な機械学習アルゴリズムを用いて、16種類の酵素反応予測モデルを構築した。学習データと酵素と化合物の特徴抽出の改良により、前回の私たちの研究よりも予測精度が大きく向上した。酵素と化合物を組み合わせたモデルは反応内の酵素と化合物の組で反応しなそうな反応を排除することが可能であり、機械学習の種類によらず、厳密な最適化なしで高い精度を維持していた。その中で、基質・酵素・生成物の情報を組み合わせて学習させた Deep Neural Network モデルは、Macro F₁ score が 0.966 で最も高い予測精度を示し、学習データに含まれない酵素反応も頑健に予測することができた。さらにこのモデルは、これまで報告されているモデルと比較して、より広範な酵素反応を予測することができる。本研究により、有用物質生産に向けた新規酵素の選択や代謝経路内の新規な酵素反応の発見が促進されることが期待される。

Development of machine learning models for prediction of extensive enzymatic reactions

○Watanabe Naoki¹, Yamamoto Masaki^{2,4}, Murata Masahiro^{2,3}, Vavricka Christopher J.³, Ogino Chiaki¹, Kondo Akihiko^{1,3}, Araki Michihiro^{1,2,3,4,5}
(¹Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., ²Grad. Sch. Med, Kyoto Univ., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ⁴Natl Inst. Biomed. Inoov., ⁵NCVC)

Key words enzyme reaction, machine learning

4E01-01 微生物で構成される系の細胞密度を推定する AI プログラムの開発

○松本 李梨¹, 江口 文仁², 福西 広見^{2,3}, 中西 昭仁^{1,4}
(¹東京工大・応生, ²東京工大・コンピューターサイエンス, ³東京工大大院・コンピューターサイエンス, ⁴東京工大大院・バイオノクス)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

【背景と目的】人工知能(AI)は複数の情報を網羅的に解析できるため、AIを用いた解析が微生物分野において用いられて久しい。複数の微生物が共存する培養系から得られる情報が多く、AIを用いた解析技術の構築には産業的な意義があると考えられるが、叢に対する AI 解析技術の開発は十分ではない。そこで複数の微生物で構成される培養系の細胞密度について、叢の吸光スペクトラムを情報源に評価できるかの可能性を模索した。

【方法】微生物を芽生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* で構成した。はじめに、*S. cerevisiae* と *C. reinhardtii* のみで構成される微生物とこれら微生物を含む微生物叢について、細胞密度に差をつけて調整後、400-750 nm で 1 mm 刻みの吸光度スペクトラムの情報を得た。次に、細胞密度と吸光度スペクトラムの情報を AI に機械学習させた。最後に、微生物叢の吸光スペクトラムから両株の細胞密度を予想できるか検討するために、吸光波長ごとに細胞密度との相関関係の強度について Shapley Additive exPlanations (SHAP) 解析をした。

【結果と考察】吸光スペクトラムを解析した結果、*S. cerevisiae* と *C. reinhardtii* とともに細胞の密度上昇に起因すると考えられる光の減衰が確認され、*C. reinhardtii* ではソーレー帯や Q 帯に起因すると考えられる光の減衰も確認された。また SHAP 解析の結果、*C. reinhardtii* に見られた特徴的な光の減衰を基に、*S. cerevisiae* と *C. reinhardtii* で構成された微生物叢の吸光スペクトラムの情報のみで、各々の細胞密度を各々評価できる可能性を示した。本系は叢から獲得する情報が単純に吸光スペクトラムだけなので、系を構築できれば微生物叢の細胞密度評価を簡便化でき、叢の状態を評価する上で産業上インパクトがあると考えた。

Development of an AI program estimating cell-density in a system of microorganisms

○Riri Matsumoto¹, Fumihito Eguchi², Hiroaki Fukunishi^{2,3}, Akihito Nakanishi^{1,4}
(¹Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., ²Sch. Comput. Sci., Tokyo Univ. Technol., ³Grad. Sch. Comput. Sci., Tokyo Univ. Technol., ⁴Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words biomass, machine learning, AI, cell density

4E01-02 組換え大腸菌細胞を用いる水素生成バイオカソードの作製

○結城 里沙, 藤井 浩, 本田 裕樹
(奈良女子大・化学生物環境)
honda@cc.nara-wu.ac.jp

【背景と目的】水素社会の実現に向け、光によるクリーンな水素生産への転換に期待が寄せられており、主に無機半導体光触媒を用いた研究が展開されてきた。演者らは、無機光触媒による光—化学エネルギー変換に、高選択的で高効率な酵素による酸化還元反応を組み合わせた無機—生体ハイブリッド系を構築し、光を利用するクリーンな物質生産系を提案してきた。本講演では、ヒドロゲナーゼ遺伝子群を発見する組換え大腸菌を用いた水素生成バイオカソードの作製と、これを酸化チタン光アノードと組み合わせた光電気化学的水素生産について報告する。

【方法】*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群を導入した組換え大腸菌を供試菌とした。電気化学測定はナフィオン膜で隔てた 2 槽セルで実施し、作用電極 (WE) にカーボンペーパー (CP)、基準電極 (RE) に Ag/AgCl 電極、補助電極に Pt、電解液には 50 mM リン酸緩衝液を用いた。WE 側に電子メディエータ (メチルピロロゲン, MV) と大腸菌の懸濁液を添加して CV 測定と定電圧印加時の水素生成を測定した。また、アルギン酸カルシウムゲル包括によって大腸菌を固定化した CP を用いてバイオ電極を作製し、評価した。さらに、酸化チタン光アノードと、バイオ電極をカソードとして、光水素生産を評価した。

【結果と考察】CV 測定により、CP から MV を介して大腸菌内のヒドロゲナーゼへ電子伝達されうる結果を得た。この電流値は大腸菌懸濁液よりも、CP 上に大腸菌膜を形成した場合に顕著に増加し、大腸菌固定化電極が優れた水素生成カソードになりうると示唆された。酸化チタン光アノードと大腸菌固定化電極を組み合わせた光水素生産では、外部からの電圧の補助なしで光水素生産が可能であった。

1) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 8045-8048 (2016); *Appl. Catal. B*, 210, 400-406 (2017).

Biocathode using a whole cell of recombinant *Escherichia coli* for photoelectrochemical hydrogen production

○Risa Yuki, Hiroshi Fujii, Yuki Honda
(Dept. Chem. Biol. Environ. Sci., Nara Women's Univ.)

Key words biocathode, hydrogen production, hydrogen production, photocatalyst

4E01-03 新規メタン資化性菌のスクリーニングと遺伝子導入法の検討

○木村 裕花, 田島 大輝, 出川 貴彬, 中島 敏明
(筑波大院・生命環境)
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

メタンは地球上に豊富に存在する天然資源であり、かつメタン発酵で得ることができる再生可能な資源でもある。しかし現在メタンはほとんどがエネルギー源として燃やされ、二酸化炭素となっているのが現状である。そこで、メタンを他の物質に変換できるメタン資化性菌を用いた発酵生産によってメタンに新たな価値を付与できないかと考えた。しかしながらメタン資化性菌の産業利用は進んでいない。その理由として、メタン資化性菌のスクリーニングが困難であり、現在使用されているメタン資化性菌の多くが 1970 年代に分離されたもので、生育が遅く、一部は 40°C 以上での培養が必要なため専用設備を必要とする。また、効率の良い遺伝子導入技術が発展途上段階にあり、遺伝子操作が比較的困難であることも挙げられる。

そこで、本研究ではメタン資化性菌を用いた有用物質生産の実現に向け、生育が早く扱いやすいメタン資化性菌のスクリーニング、及び簡便な遺伝子導入法の確立を目指した。

まず環境中より生育の早いメタン資化性菌のスクリーニングを行った。水田土壌をスクリーニング源とし集積培養を行った結果、大腸菌と同じ 37°C で生育し、液体培養で 24 時間以内に定常期に達することができるとする菌株 *Methylocystis* sp. TMB-1 株を取得した。

続いて TMB-1 株に対し、効率の良い遺伝子導入法の検討を行った。接合伝達法、エレクトロポレーション法、ハイドロゲル曝露法の 3 つの手法を検討し、このうち接合伝達法とハイドロゲル曝露法による形質転換に成功した。ハイドロゲル曝露法は接合伝達法及びエレクトロポレーション法と異なり、供与体やコンピテンセルを必要としないため操作手順が少ない簡便な形質転換法である。そのため、メタン資化性菌の遺伝子導入法として有効な手法となることが期待される。

Screening of a novel methanotroph and its transformation

○Yuka Kimura, Taiki Tajima, Takaaki Degawa, Toshiaki Nakajima
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words screening, *Methylocystis* sp., methanotroph

4E01-04 *Methyloburum extorquens* 高濃度メタノール耐性株の取得と解析

○千葉 恒慶, 鶴田 爽, 折田 和泉, 福居 俊昭
(東工大・生命理工)
tfkui@bio.titech.ac.jp

【目的】メタノールは食料と競合せず持続供給が可能な微生物培養基質として注目されている。メタノールを資化できる微生物はメチロトロフと呼ばれ、そのモデル生物である *Methyloburum extorquens* AM1 は生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の生合成経路を有する。しかし、高濃度メタノール存在下では生育が抑制されるため、PHA 生産培養時には培地中のメタノール濃度を低濃度に維持する必要がある。本研究では *M. extorquens* によるメタノールを原料とした有用物質の効率的生産を目指し、高濃度メタノール存在下においても生育が良好な変異株の取得と解析を行った。

【方法と結果】通常濃度の10倍となる5%、さらに高濃度の8%のメタノールを添加した最少培地において、試験管培養での継代を繰り返す実験室進化を行った。本菌はレアアースに依存するメタノール代謝が見出されており、レアアース依存型代謝への変異誘発も期待して、培地に 30 μM LaCl₃ を添加した。親株は5%メタノール添加条件では生育できないが、6-10回継代することで、誘導期なく OD₆₀₀ の増加を認める高濃度メタノール耐性系統を得た。特に良好な生育を示す4系統に絞ってフラスコ培養を行ったところ、いずれの系統も5%メタノール添加培地で顕著な生育能を示した。各系統から単離した株について5%メタノール添加条件でのPHA生合成を行ったところ、親株の0.5%メタノール添加条件と比較して培地当たりのPHA生産量は約2倍に増加していた。各単離株ゲノムのリシークエンス解析の結果、3系統に共通する、アミノ酸変異を伴う1塩基変異が存在した。残り1系統には、それとは別の遺伝子に1塩基挿入が認められた。現在、これらの変異を親株に導入し、高濃度メタノール耐性への関与を解析している。

Isolation and analyses of *Methyloburum extorquens* mutant strains with high methanol tolerance

○Tsuneyoshi Chiba, Tsuturu, Izumi Orita, Toshiaki Fukui
(Sch. Life Sci. Technol, Tokyo Tech)

Key words methylotheroph, PHA, methanol, laboratory evolution

4E01-05 Improved GABA production from waste biomass by engineered *Halomonas elongata* GOP-Gad

○Ziyan Zou¹, Hideki Nakayama^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Fish. Environ. Sci., Nagasaki Univ., ²Inst. Sci. Technol., Nagasaki Univ., ³Org. Marine Sci. Technol., Nagasaki Univ.)
nakayamah@nagasaki-u.ac.jp

Halomonas elongata can assimilate various carbon (C) and nitrogen (N) sources and efficiently produce ectoine under high-salty condition as a practical cell factory. We have generated the recombinant *H. elongata* GOP-Gad strain, which can produce GABA as major compatible osmolyte under high-salinity condition. In this study, we found that the GOP-Gad strain can assimilate GABA as sole C and N sources through a GABA utilization pathway containing both a GABA transaminase (GabT) and a succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD) encoded by the genome as a GabTD-like operon. To further increase productivity of GABA, we have generated GOP-GadΔGabT and GOP-GadΔGabTD strains by deleting a GabT-like gene and a whole GabTD operon, respectively. Under high-salinity conditions, the GOP-GadΔGabT strain showed enhanced growth and higher GABA production than the original GOP-Gad strain, while growth of the GOP-GadΔGabTD strain was inhibited. The results suggested that the GOP-GadΔGabT strain is superior to the original GOP-Gad strain possibly due to reduced GABA decomposition. As *H. elongata* can assimilate various biomass-derivative C and N sources, we currently investigate whether the GOP-GadΔGabT strain can produce GABA from salty waste biomass feedstocks such as alkali-hydrolysates of chicken manure. In future, the GOP-GadΔGabT strain could be a practical cell factory for GABA-production and contribute to upcycling of salty waste biomass to valued feed additives for the sustainable development of livestock industry.

Improved GABA production from waste biomass by engineered *Halomonas elongata* GOP-Gad

○Ziyan Zou¹, Hideki Nakayama^{1,2,3}
(¹Grad. Sch. Fish. Environ. Sci., Nagasaki Univ., ²Inst. Sci. Technol., Nagasaki Univ., ³Org. Marine Sci. Technol., Nagasaki Univ.)

Key words *Halomonas elongata*, GABA, eutrophication

4E01-06 植物病害防除における *Bacillus* 属細菌 IA 株が生産する揮発性と非揮発性の抗菌活性物質の複合効果

○松瀬 一平¹, 江邊 正平², 大池 達矢², 岡南 政宏^{1,2}, 阿野 貴司^{1,2}
(¹近畿大院・生物理工,²近畿大・生物理工)
223710009u@waka.kindai.ac.jp

環境保全型農業を推進する技術の一つとして拮抗菌を用いた土壌病害の抑制が注目されている。我々は先行研究において、燻炭により増殖および抗菌物質生産が促進される *Bacillus* sp. IA の単離に成功した (Ebe et al., 2019)。このことから、IA と燻炭を組合せることで植物病原菌を防除可能ではないかと考えた。そこで培養担体として燻炭を、培養基質として米糠を用いて IA の培養を行った。この培養方法で IA は生菌数と胞子数が乾燥燻炭 1g あたり 10⁸ cfu を上回り、通気攪拌等のエネルギーを消費しない省エネルギータイプの培養が可能であることが示された。さらに、この培養物を用いて植物病原性真菌 *Rhizoctonia solani* K1 のコマツナに対する感染防除試験を行った結果、IA 培養物添加ポットでは IA 培養物非添加に比べ倒伏、枯死率が顕著に減少し防除効果が示された。この IA による病害防除効果と考えた際に、IA が生産していることが知られている抗菌物質 iturin A だけでなく、他の要因もあるのではないかと考えた。そこで本研究では、抗菌物質に比べ拡散性が高いことが予想され、病害防除において重要であると考えられる揮発性有機化合物 (volatile organic compounds: VOC) に着目して研究を行った。最初に IA の抗真菌活性 VOC について調べるため double petri dish assay を行ったところ *R. solani* K1 における増殖阻害が認められた。さらに同様の方法で *R. solani* K1 植菌培地に低濃度の iturin A を添加することで、VOC による抑制効果が増強することを見出した。このことから VOC および iturin A の複合効果によって植物病原菌がより効果的に抑制されていると考えられた。本研究では IA 培養物による *R. solani* K1 の感染防除に成功したことから、病原菌防除における揮発性および非揮発性抗菌物質の役割が示唆された。

参考論文: J. Pestic. Sci. 44(1), 33-40 (2019)

Combined effect of volatile and non-volatile antibiotics produced by *Bacillus* sp. strain IA on plant disease control

○Ippei Matsuse¹, Shohei Ebe², Tatsuya Ohike², Masahiro Okanami^{1,2}, Takashi Ano^{1,2}
(¹Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., ²Fac. BOST, Kinki Univ.)

Key words *Bacillus* sp., rice husk biochar, biocontrol agent, volatile organic compound

4E01-07 ファイトレメディエーション後のフィトマスから細菌・酵母の共培養による第2世代バイオエタノール生産

○簡 梅芳¹, 張 瑞仁², Tusher Tanmoy Roy¹, Saunivalu Maria Ita¹, 若狭 颯介¹, 李文雄², 黃 辰介², 井上 千弘¹
(¹東北大院・環境,²Department of Medical Research, China Medical University Hospital, China Medical University, Taiwan, ³Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taiwan, ⁴Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taiwan)
meifangchien@tohoku.ac.jp

有害金属を高濃度で体内に蓄積する植物を利用したファイトレメディエーションでは、刈り取った廃棄ファイトマスの管理が課題となっている。一方、これらのファイトマスをバイオエタノール生産の原料とするポテンシャルはありうるが、ファイトマスからの有害金属の除去による安全性の確保や効率的なエタノール変換システムの確立が必要である。

本研究では、上記のような廃棄ファイトマスから安全なバイオエタノールの生産に適した効率的なバイオペロッシングシステム (Consolidated bio-processing, CBP) の提案を目的とした。ヒ素超蓄積植物である *Peris vittata* のファイトマスを対象に、六つのセルラーゼ遺伝子をゲノムに組み込んだ酵母 *Kluyveromyces marxianus* KR7 株とセルロソーム遺伝子を異なる順番で導入された *Bacillus subtilis* Type1 株、Type2 株を用いて、ワンステップ法 (KR7 株のみ) および共培養法 (B. subtilis + KR7 株) による *P. vittata* のファイトマスの糖化および発酵を検討した。

まず、*P. vittata* を 1% の硝酸または 1% の NaOH にて振とうする、シンプルな前処理を行うことにより、80% 以上のヒ素をファイトマスから除去することができた。次に、糖化反応では、還元糖の測定結果から、KR7 株は両 *Bacillus* 菌株よりも高い糖化能を有したことが示唆された。一方、*B. subtilis* Type 2 株と KR7 株の共培養では、最も高いエタノール収率を示し、*P. vittata* のファイトマスを 3 日間培養した条件では、48.5% のエタノール収率を得ることができた。これらの結果から、ヒ素のファイトレメディエーションに利用した後の *P. vittata* ファイトマスを原料として、第二世代エタノール生産の適用可能性を確認し、「環境修復とエネルギー生産を両方達成する」ことは実現可能であることを証明した。

Production of second-generation bioethanol from phytomass after phytoremediation using recombinant bacteria-yeast co-culture

○Mei-Fang Chien¹, Jui-Jen Chang², Tanmoy Roy Tusher¹, Maria Ita Saunivalu¹, Soussuke Wakasa¹, Wen-Hsing Li³, Chieh-Chen Huang⁴, Chihiro Inoue¹
(¹Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., ²Department of Medical Research, China Medical University Hospital, China Medical University, Taiwan, ³Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taiwan, ⁴Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taiwan)

Key words yeast, *Bacillus subtilis*, ethanol fermentation, biowaste

4E01-08 遺伝子発現から見た植物共生細菌の種間相互作用と代謝スイッチング

○石澤 秀紘^{1,4}, 田代 陽介², 井上 大介³, 池 道彦³, 二又 裕之^{2,4,5}
¹兵庫県大院・工, ²静大院・総合科技, ³阪大院・工, ⁴静大・グリーン科技研, ⁵静大・創科技院
 ishizawa@eng.u-hyogo.ac.jp

【背景・目的】植物と共生する微生物群集は宿主の生育・健康と密接に関わるため、作物やバイオマス資源の持続的な生産に向け、一層の理解が求められている。共生微生物群集の形成には、微生物の種間相互作用が大きな役割を果たすと考えられているが、複雑な生態系でその実態を把握することは非常に困難である。そこで本研究では、無菌化した水生植物ウキクサに6種の代表的な共生細菌が安定共存する「モデル共生系」を研究対象とし、そのシンプルさと再現性を活かすことで、群集形成に関わる種間相互作用の分子メカニズムを解析した。【方法】モデル共生系の各構成種をそれぞれ単独でウキクサに接種した系、全ての2種類の組み合わせをウキクサに接種した系、および全6種を接種した系を作成し、植物表面から抽出した細菌RNAを試料とするmRNA-seqを行った。また、選択培地を用いたコロニーカウント法により、各構成種の植物への定着量を評価した。【結果】2種類の相互作用（15通り）には植物への定着量を有意に増加、減少させるものがそれぞれ5通り、8通り存在した。このうち、定着量を減少させる種間相互作用は多くの場合で大規模な遺伝子発現の変化を伴っていた。例えば、アルコール・アルデヒド代謝遺伝子の発現量を大幅に低下させ、芳香族化合物の分解遺伝子を活性化させるという反応が一貫して観察され、こうした代謝スイッチングが共生微生物群集の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。【謝辞】本研究はJSPS科研費（20J00210）、先進ゲノム支援（16H06279; PAGES）およびJST-JICA SATREPS（JPMJSA2004）の支援を受けて行った。

Interspecies interactions and metabolic switching of plant-associated bacteria as seen by mRNA-seq analysis

○Hidehiro Ishizawa^{1,4}, Yosuke Tashiro², Daisuke Inoue³, Michihiko Ike³, Hiroyuki Futamata^{2,4,5}
¹Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, ²Grad. Sch. Integr. Sci. Technol., Shizuoka Univ., ³Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., ⁵Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words transcriptome, rhizoplane, metabolic shift, symbiosis

4E01-09 牛尿発酵液由来分離菌を用いた微細藻類増殖促進能の評価

○Tan Pei Yu¹, 石田 奨², 加藤 勇太³, 邱 泰瑛², 小西 正朗²
¹北見工大院・工, ²北見工大, ³環境大善株式会社)
 konishim@mail.kitami-it.ac.jp

微細藻類は、大気中の二酸化炭素を固定し、バイオマス生産などの能力を有するものの、従属栄養生物より増殖が遅いため、生産コストが高いことが課題である。そこで、藻類バイオマスの収量と代謝産物の生産を改善するため、他の微生物との共培養が着目されている。研究では、微細藻類の *Synechococcus elongatus* PCC7942 と *Chlorella sorokiniana* NIES-2173 を用いて、牛の尿から長期の好気性微生物処理によって作られた牛尿発酵液(FCU)由来の分離菌との共培養により、共通に増殖促進する細菌を選択することを目的とする。FCU から計 144 株を好氣的に分離した。微細藻類との共培養においては、マイクログルプレートを用い、分離した 144 株を PCC7942 と NIES-2173 とそれぞれ共培養した。PCC7942 と NIES-2173 に対する増殖促進効果の評価では、蛍光プレートリーダーを用い、クロフィル蛍光強度をそれぞれ特異的に測定した。次に、共通に増殖促進効果のある分離株を選定し、震盪プラスチック培養にて、クロフィル抽出法を用い、その効果を検証した。その結果、144 分離株の内の AF2108 株は、PCC7942 と NIES-2173 に対し、それぞれの純培養と比べて、7.5 倍と 4.3 倍のクロフィル蛍光強度の増加が見られた。さらに、プラスチック培養におけるクロフィル抽出の定量結果より、AF2108 株は、それぞれの純培養と比べ、15.7 倍と 1.4 倍の増殖促進効果が得られた。既往研究の知見から、増殖促進は微生物間の溶解性有機物や無機物などの主要養源の交換で PCC7942 と NIES-2173 の代謝が活性化されたことにより引き起こされた可能性、分離株菌によるシデロフォアやビタミン B などの補因子が分泌されることで PCC7942 と NIES-2173 のミネラル吸収能やストレス耐性などが高まる可能性が考えられた。

Evaluation of ability to promote microalgae growth using isolates derived from fermented cattle urine

○Pei Yu Tan¹, Masashi Ishida², Yuta Kato³, Tai-Ying Chiou², Masaaki Konishi²
¹Grad. Sch. Eng., Kitami Inst. Technol., ²Kitami Inst. Technol., ³Kankyo Daizen Co. Ltd.)

Key words microalgae, coculture

4E01-10 木質バイオマスの新規利用に関する研究

○桂木 遼太郎, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
 (立命館大院・生命科学)
 kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

【背景・目的】

現在日本では森林整備により年間約 800 万トンもの間伐材が発生し、その 9 割は利用されずに森林内に放置されている。そのため過剰な有機物が蓄積し森林の物質循環が阻害されている。しかし、木材は強固な構造のため、分解が難しい。常温常圧の自然条件下で木材を分解することができる木材腐朽菌は、化学的あるいは物理的に木材を分解する手法と比べて環境に負荷が少なくコストが低い。このような木材腐朽菌の利用が、木材を利用する解決策として期待できる。本研究では、糸状菌を用いた木材分解を目指し、土壌から木材のみで生育できる糸状菌を単離し、木材のみで培養することによる木材分解能の評価をすることを目的とした。

【方法・結果】

アカマツとヤマザクラの木質チップ 2% を含有した寒天培地に土壌懸濁液を塗布し培養することにより単離を行った。その結果 5 種類の糸状菌が得られた。ヤマザクラとアカマツを 1:1 で混合した木質チップ 3g をシャーレに用意し、そこにボテト・デキストロース液体培地で 48 時間培養した糸状菌をそれぞれ植菌し 9 日間及び 30 日間 30°C で培養を行った。5 種類の菌株を培養すると木質チップ上全てで生育が見られ、質量減少も見られた。30 日間培養した木材の最大の質量減少率は、1 種類の菌株では 7.2%、2 種類や 3 種類で 13.3%、4 種類や 5 種類の菌株で 9.3% であった。RB23 株と RB25 株の組み合わせが質量減少の最も高い傾向が見られた。以上の実験により 2 種類や 3 種類で質量減少率が大きく菌の種数によって木材分解速度に変化がある可能性が示唆された。5 種類の菌株の中で特に生育の良かった菌株 3 種類を rDNA の ITS 領域および 28S rDNA の D1/D2 領域塩基配列解析を行い、RB21 株は *Aspergillus* sp., RB24 株は *Purpureocillium lilacinum*、RB25 株は *Talaromyces* sp. と同定した。

Research on new utilization of woody biomass

○Ryotaro Katsuragi, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
 (Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words biomass, fungus

4E01-11 農作物のミネラル含有量を増加させる資材の探索

○前野 友美, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
 (立命館大院・生命科学)
 kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

【背景・目的】

ミネラルは健康維持や生命活動にとって必要不可欠とされているが、体内で合成されないため、食物として外部から摂取する必要がある。しかし、近年、農作物のミネラル含有量は大幅に減少している。かつては有機肥料を用いる有機農法が主流であったが、現在は化学肥料を用いる慣行農法が主流となり、土壌中の有機物量や微生物数が減少したことが原因の一つとして考えられている。そのため、農作物のミネラル不足を改善するためには有機農法が適していると考えられている。本研究ではバイオマス資材や廃棄有機資材を加えた土壌で作物を栽培し、生育が良く、かつミネラル含有量を増加させる資材を探索することを目的とした。

【方法・結果】

市販のコマツナのミネラル含有量を解析するため、有機および慣行農法で栽培されたコマツナを購入し、ミネラル含有量 (P, K, Ca, Fe, Mg, Mn) を測定した。次に、土壌に施肥する資材の種類によるコマツナのミネラル含有量の違いを調査するため、トウモロコシの灰、鶏糞の灰、2 種類の骨粉をそれぞれ 1 種類ずつ加えた土壌、化学肥料を加えた土壌、無添加の土壌を複製し、計 6 条件でコマツナの栽培を行った。生育では、トウモロコシの灰を加えたコマツナの湿重量が化学肥料を加えた場合よりも重かった。次に、栽培 6 条件と市販の 2 条件におけるコマツナのミネラル含有量を比較すると、Ca と Mn は栽培 6 条件の方が高く、Ca は骨粉で、Mn は化学肥料で最も高くなった。また、資材間で比較すると、P, K, Mg, Fe についてはトウモロコシの灰を施肥したコマツナで他の資材よりも高くなった。これらの結果から、本研究で用いた資材の中ではトウモロコシの灰がミネラル含有量を増加させる資材として最も適していると結論づけた。その他の資材としてクロレラ残渣、鉄鋼スラッグの解析についても報告する予定である。

Searching for materials that increase the mineral content of crops

○Tomomi Maeno, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
 (Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words mineral, material, crop

4E01-12 ガラスを用いた新規有機標準土壌の開発

○水野 淳太, Tran Quoc Thinh, 久保 幹
(立命館大院・生命科学)
kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

【背景・目的】

土壌鉱物の26%はシリカを中心としたケイ酸鉱物で構成されている。このケイ酸鉱物を用いて作られているのがガラスである。ガラスはケイ酸鉱物と石灰石、ソーダ灰を混ぜ、高温で溶解させることで作られるが、ケイ酸鉱物という主成分は変わらない。また、現在の産業過程では、一部のガラスビンから出る廃ガラスが再利用されない課題がある。本研究では、その廃棄ガラスの再利用を目指し、土壌の一部に廃ガラスを用いた有機土壌の開発を目的とした。

【方法・結果】

本研究では、真砂土の代替として、ガラスを用いることとした。まず、土壌中に加えるガラスの割合を確立させるため、ガラス割合を20、30、40、50、60%で5つの土壌を作製し、植物収量を比較した。その結果、30%の土壌で最も高い値を示した。次にガラスの粒径を確立させるため、粒径サイズを4種類用意し、土壌を作製して、植物収量を比較した。その結果、0.6 mm以下の粒径サイズを用いた土壌で最も高い値を示した。得られた結果を基に、パーミキュライト、真砂土、黒土を6:3:1(V/V)で混合し、有機肥料を混合した土壌を作製し、このうち、真砂土のみをガラス(粒径サイズ0.6 mm以下)に置き換えた。測定項目は土壌の最大保水容量、植物収量、SPAD値、土壌総細菌数を測定した。結果はガラスを加えた土壌では、土壌の最大保水容量は1,200~1,300 mL/kg、植物収量は13~15 g、SPAD値は30~37の値を示し、真砂土を加えた土壌と変わらなかった。土壌総細菌数は 3.0×10^8 cells/g-soilから 6.2×10^8 cells/g-soilへ約2倍増加した。

これにより、ガラスが真砂土にとって変わる土壌資材の一部として利用できる可能性が示唆された。

Development of organic soil using glass

○Junta Mizuno, Quoc Thinh Tran, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words soil, organic matter decomposition

4E03-01 群体性藻類 *Botryococcus braunii* の機能解析や分子育種に資する単細胞培養条件の確立

○村山 拳午, 大槻 隆司
(山梨大院・医工農)
tohtsuki@yamanashi.ac.jp

微細藻類 *Botryococcus braunii* (以下ボトリオコッカス) は30から40の炭素が結合したテルペン骨格を持つ、重油に相当する炭化水素(ボトリオコクセン)を生産することから化石資源の代替原料供給源として期待されている。ボトリオコッカスはボトリオコクセンを重合させて形成する外殻に収まった形で群体を形成し生育するが、外殻形成が律速となり生育が著しく遅いため炭化水素生産工業化の障壁になっている。そこで、ボトリオコクセンの生合成や外殻形成に関与する遺伝子を改変することで、外殻を形成せずボトリオコクセンを大量生産するような細胞株の創製技術の確立が期待される。形質転換による遺伝子組換えはすでに報告があるが、群体状態のヘテロな(遺伝子改変内容が異なる可能性がある細胞が混在する)形質転換体となることから機能解析や産業への利用には不適切である。また、群体状態のボトリオコッカスを単細胞にする技術は検討されてきたが、有機溶媒等を用いるため、より環境負荷の少ない方法で分離することが求められている。さらに形質転換を含め、ボトリオコッカスの単細胞からの群体再生についても成功していない。

本研究では、培養後期にボトリオコッカスの単細胞が培養液中に放出されることを見出した。また、この培養液を遠心し、沈殿した単細胞を群体状態の細胞が通過できないフィルターを用いて分離することで、細胞への負荷が少ない状態で単細胞を取得することに成功した。この一連の方法によって得られた単細胞を96ウェルプレートに単一になるように播種し培養を行ったところ、単細胞から群体を形成することに成功した。本手法により、従来の単細胞分離・再生のすべての課題を克服し、単細胞から群体を再生させることで、ヘテロな形質転換体ではなく同一クローン由来の形質転換体群体を得ることが可能である。

Establishment of single-cell culture method for functional analysis and molecular breeding of the colonial green alga *Botryococcus braunii*.

○Kengo Murayama, Takashi Ohtsuki
(Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi)

Key words biofuel, microalgae, single cell, *Botryococcus braunii*

4E03-02 緑藻細胞のみで作製された細胞プラスチックにおける細胞間接合因子の評価

○根本 進太郎¹, 中西 昭仁^{1,2}
(¹東京工科大・応生, ²東京工科大大院・バイオニクス)
nakanishiah@stf.teu.ac.jp

緑藻細胞のみで作製された細胞プラスチックにおける細胞間接合因子の評価
【背景と目的】

現在までに、本研究では単細胞緑藻細胞を素材に用いた細胞プラスチックを提案している。本研究では、固い細胞壁を有し、アスペクト比1.2~1.3程度で長径7.2~8.4 μm程度の *Chlamydomonas* sp. を素材として用いた。単細胞ゆえに細胞間を接合することで細胞プラスチックを成型するので、細胞間を充填するマトリックス成分が必要である。現在のところ、供給の簡便さを考え、細胞内容物を用いることで緑藻のみを原料とした細胞プラスチックを作製してきた。この細胞内容物を用いた細胞プラスチックを引張強度試験に供したところ、ヤング率764 MPa、最大応力8.6 MPa、破断伸び1.2%の力学特性を示したが、この特性を示す根拠を明らかにする必要があった。

【方法】

細胞には *Chlamydomonas reinhardtii* C-9; NIES-2235 を用いた。細胞内容物の獲得のため、乾燥細胞200 mgを20 mLのDWに加え、氷上にて超音波破砕(SMURT:NR-50M(ニチオン), on: 30 sec; off 30 sec, 40 cycles)を試みた。力学特性の根拠を明らかにするため、遠心分離(5,000 rpm, 3 min, RT)し上清を回収後、回収分全量を20 mLのヘキササンと混和することでマトリックス成分となる細胞内容物を分画した。分画した細胞内容物を用いて細胞プラスチックを作製した後、引張強度試験によって力学特性(ヤング率、最大応力、破断伸び)を求めた。

【結果と考察】

分画後に得られた成分をマトリックス成分として細胞と混合、細胞プラスチックを作製した。特定の画分をマトリックス成分として用いた場合、その細胞プラスチックは細胞内容物を全量マトリックス成分として用いた場合と同程度の力学特性を示した。従って、特定の画分の構成成分が細胞同士を接合する因子として機能していることを示唆した。

Evaluation of cell-attachment factor of cell-plastics derived only from green algal cell

○Shintaro Nemoto¹, Akihito Nakanishi^{1,2}
(¹Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol., ²Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words green alga, cell wall, intracellular contents, carbon dioxide

4E03-03 *Euglena gracilis* 細胞の沈降に培地中へのエタノール添加がもたらす影響

○高橋 優, 島本 航輔, 小山内 崇
(明治大院・農)
tosanai@meiji.ac.jp

【目的】 *Euglena gracilis* (以下 *E. gracilis*) は、真核微細藻類の一種であり、貯蔵多糖であるパラミロンやワックスエステル、有機酸、アミノ酸など様々な物質を合成・蓄積することが知られている。この有用性から、産業化が行われているが、更なる推進には、細胞や細胞内物質の生産量増加や低コストで効率的な回収方法が求められる。また、*E. gracilis* はエタノール(EtOH)を含む様々な物質を炭素源として利用できるが、特にEtOHを添加して *E. gracilis* を培養すると、増殖速度の向上やパラミロン生産量の向上が見込まれている。本研究では、*E. gracilis* 細胞の沈降速度を上げて、細胞回収の効率化に貢献することを目的とした。

【方法・結果】 使用菌株は *E. gracilis* NIES-48 で、培地は合成培地であるCM培地を使用し、8日間の培養を行った。培養条件は、1LのCM培地のみを用いたコントロール条件と、終濃度がそれぞれ0.5、1、2%となるように調整した3つのエタノール条件の合計4条件である。この細胞を用いて、沈降の様子を観察した結果、細胞の沈降速度は、0.5%、1% EtOH条件、2% EtOH条件、Control条件の順に速くなった。細胞内パラミロン量と沈降速度の傾向が類似していたことから、このような結果が得られた理由の一つとして、細胞内パラミロン量と細胞沈降に関する関係性があるという仮説を立てた。今後は、様々な生育段階の *E. gracilis* における細胞内パラミロン量と細胞の沈降速度を調べることで、これらの関係性を明らかにする予定である。

Effect of ethanol addition to the medium on sedimentation of *Euglena gracilis* cells

○Yu Takahashi, Kosuke Shimamoto, Takashi Osanai
(Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words ethanol, *Euglena gracilis*, storage polysaccharide

4E03-04 ユーグレナワックスエステル合成系における NADPH→NADH 変換の重要性

○中澤 昌美¹, 大石 陸人¹, 高橋 夢月¹, 柏山 祐一郎², 乾 博¹,
上田 光宏¹, 阪本 龍司¹
(¹大阪公大院・農, ²福井工大)
mami@omu.ac.jp

真核微細藻類ユーグレナは、嫌気・低酸素下でバイオ燃料「ワックスエステル (WE)」を合成する。我々はこれまで、WE 合成は、ミトコンドリア脂肪酸β酸化の完全逆行と嫌氣的呼吸鎖が共役する「脂肪酸呼吸」として機能し、嫌気下での還元力消費と ATP 獲得を行うことを見出してきた。呼吸鎖複合体 I で利用される還元型補酵素は NADH だが、従来ユーグレナ WE 合成系で生成する還元型補酵素は、pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase (ピルビン酸からアセチル-CoA を生成し、WE に炭素鎖を供給する) による NADPH のみが知られてきた。本研究では、この補酵素要求性の矛盾を解消する分子を探索した。

RNAi による発現抑制実験の結果、補酵素変換酵素トランスヒドロゲナーゼ (NNT) がその役割を担うことを見出した。NNT 発現抑制細胞では、低酸素処理後の WE 生産量が約 30% まで低下するとともに、細胞内 ATP 量が大幅に減少した。NNT は、ミトコンドリア内膜に局在し、NADPH から NAD⁺ へのヒドリド転移に伴ってプロトン膜間腔へと輸送する。これにより、複合体 I と協調してプロトン濃度勾配形成に寄与し、嫌気下で効果的に ATP が生産できることが示唆された。さらに、我々は、嫌気下ミトコンドリア内では NADP⁺ 型リンゴ酸酵素が機能し、リンゴ酸からピルビン酸への変換に伴って NADPH を生成していること、嫌気下ではミトコンドリアに、ピルビン酸ではなくリンゴ酸の形で解糖系由来炭素が輸送されていることを見出した。これらを総合し、ユーグレナは嫌気下で生じる還元力をミトコンドリアに徹底的に運び、嫌氣的呼吸鎖で消費するとともに、効果的に物質生産に活用していることが明らかとなった。

NADPH-to-NADH conversion by mitochondrial transhydrogenase is indispensable for sustaining anaerobic metabolism in *Englena gracilis*

○Masami Nakazawa¹, Rikuto Oishi¹, Mutsuki Takahashi¹, Yuichiro Kashiya²,
Hirosi Inui¹, Mitsuhiro Ueda¹, Tatsuji Sakamoto¹
(¹Grad. Sch. Agric., Osaka Metro. Univ., ²Fukui Univ. Technol.)

Key words transhydrogenase, biofuel, *Englena gracilis*, anaerobic metabolism

4E03-05 褐藻類を原料とした 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) の生産

○野田 祐亮¹, 柴田 敏行^{1,2}, 田中 礼士^{1,2}, 三宅 英雄^{1,2}
(¹三重大院・生資, ²三重大・海藻バイオリアファイナリー)
miyake@bio.mie-u.ac.jp

日本における大陸棚の総面積は 25 万 km² であり、約 1,500 種の大型藻類 (ブルーカーボン) が自生する。大型藻類の一つである褐藻類の養殖技術は進んでおり、国土の狭い日本においては、自国で生産できるバイオマスの一つである。褐藻類はリグニンを持たず、ポリフェノールであるフロロタンニン類を有している。褐藻類の構成多糖で最も多いのはアルギン酸であり、全体の 30~40% 含まれている。我々は海洋細菌である *Falsirhodobacter* が持つエンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼを獲得し、これらの精製酵素を用いることで基質であるアルギン酸ナトリウムを分解して 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) を 97% の収率で得ることに成功した。DEH はグルコースのような基幹物質であり、代謝改変した酵母を用いるとエタノール生産が可能である。そこで本研究では、褐藻類からポリフェノールを抽出した残渣を用いて DEH の生産を試みた。

褐藻類からポリフェノール抽出した残渣を“前処理したサンプル”とした。この残渣はアルギン酸やセルロースなどの不溶性多糖が多く含まれる。1% (w/v) の前処理したサンプルと、エンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼの粗酵素溶液が 1.5~2.0 mg/mL になるように混合し、DEH の直接生産を行った。その結果、前処理したサンプルに含まれるアルギン酸重量当たりの DEH の収率は 55.7% (w/w) であった。本手法を用いればアルギン酸からアルギン酸塩にするための酸およびアルカリを使用する必要もなく、直接 DEH を生産することが可能である。本手法は、大型藻類を活用したバイオリアファイナリーのコア技術となるであろう。

Production of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) from brown algae

○Yusuke Noda¹, Toshiyuki Shibata^{1,2}, Reiji Tanaka^{1,2}, Hideo Miyake^{1,2}
(¹Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., ²Seaweed Biorefinery Res. Center, Mie Univ.)

Key words alginate, 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, brown algae, alginate lyase

4E03-06 外部循環型フォトバイオリアクターを用いた耐塩性微細藻類 *Dunaliella tertiolecta* によるグリセロール生産

○立林 尚門, 熊田 陽一, 堀内 淳一
(京工織大院・工芸科学)
horiuchi@kit.ac.jp

【背景・目的】 持続可能な新しい物質エネルギー生産技術として、微細藻類による光合成反応を利用した第三世代型バイオリファイナリーが注目されている。耐塩性微細藻類 *Dunaliella tertiolecta* は高塩濃度環境下において浸透圧調節を行うため細胞内にグリセロールを蓄積する。この性質を活用し、炭酸ガスから光合成により直接グリセロールを生産することができると期待される。本研究では *Dunaliella tertiolecta* によるグリセロール生産に関する基礎的培養条件を検討するとともに、高菌体濃度時の光供給律速の改善のため、外部循環型ループにより照射面積を増大させたフォトバイオリアクターを新たに考案し、グリセロール生産の向上を試みた。

【方法】 *Dunaliella tertiolecta* NIES-2258 を使用した。培地には無機合成培地 (R) を使用し、NaCl 濃度を種々変化させた。培養はフラスコおよび炭酸ガスを供給し pH を制御する pH-stat システムを導入したエアリフト型バイオリアクターを用いた。また PVC チューブおよびポンプを導入した外部循環型フォトバイオリアクターを作製し、種々の条件で回分培養を行った。

【結果と考察】 グリセロール生産に及ぼす最適 pH 条件および最適光強度はそれぞれ pH7.0, 600 μE/m²/s であった。またグリセロール生産に最適な NaCl 濃度は、海水の約 3 倍の 87.6 g/L であった。これらの結果に基づき培養条件を最適化させるとグリセロールは最大 832 mg/L まで増加し、従来の約 10 倍に増加した。一方、この条件において培養後期に高菌体濃度のため光供給律速となりグリセロール生産が抑制されたことから、培養液を外部に引き抜き透明チューブ中で光照射を行う外部循環型フォトバイオリアクターを用いて更に検討を進めている。

1) J. Horiuchi, et al. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 412-415 (2003)

Glycerol production using halotolerant microalgae *Dunaliella tertiolecta* employing photobioreactor with external circulation loop

○Naoto Tatebayashi, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Dunaliella tertiolecta*, glycerol, carbon dioxide, external circulation loop

4E03-07 *Torulaspora quercuum* を用いた紅藻糖化液を原料とした効率的なエタノール生産

○小西 正朗, 森本 一輝, 邱 泰瑛
(北見工大)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

バイオ燃料生産において、原料の多様化や非食用原料の活用が必要とされている。大型海藻は、物質生産性が高く、炭水化物の含量が多い。特に紅藻類は糖含量が高く、バイオエタノール原料として有望であるが、*Saccharomyces cerevisiae* が効率的にエタノール発酵できないガラクトースの含量が高い。そこで本研究では、紅藻由来の糖化液を効率的にエタノールに変換できるガラクトース (Gal) 発酵性酵母を環境中から分離し、紅藻からのエタノール生産への応用可能性を評価した。北見工業大学周辺の環境 (植物等) から真菌を選択的に分離した後に、資化性、発酵性試験および形態観察を行い、EtOH 発酵性が認められた菌株について系統分類を実施した。これらの結果に基づき、グルコース (Glc) または Gal 含む半合成培地ならびに寒天もしくはテングサの糖化液を用いて分離株のアルコール発酵能力を評価した。凝集性が認められた株を用いて、テングサ糖化液を用いた繰り返し回分培養による EtOH 生産について評価した。Gal 発酵性酵母として *Torulaspora quercuum* KRT82 株および KRT85 株が選別された。両株は 200 g/L Gal を含む半合成培地でそれぞれ 54.77 ± 2.18 g/L, 59.92 ± 2.18 g/L の EtOH を生産した。さらにテングサ糖化液 (20 g/L Gal および 10-13 g/L Glc を含む) で培養したところ、8-10 g/L の EtOH を生産し、その生産収率は 54-57% であった。糖化液中での高い凝集性も認められたため、繰り返し回分培養を適用したところ、39 時間の培養で 38 g/L-working vol./h の高い生産性を示した。体積あたり生産性は 0.98 g/L-working vol./h に達し、組換え *S. cerevisiae* で達成された 0.10 g/L-working vol./L を大きく上回る生産性が達成できた¹⁾。

【参考文献】

1) Motimitho K, et al., 2022. *Bioresour. Technol. Rep.* 17: 100952.

Efficient ethanol fermentation from red alga hydrolysate by *Torulaspora quercuum*

○Konishi Masaaki, Morimoto Kazuki, Chiou Tai-Ying
(Kitami Inst. Technol.)

Key words yeast, ethanol, alga

4E03-08 ゲノム編集による微細藻類ナンノクロロプシスへの高濃度炭酸ガス耐性の付与

乔 俏¹, 張 吉¹, 渡部 寛大², 藤江 誠¹
 (¹広島大院・統合生命科学, ²広島大・工)
 mfujie@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 ナンノクロロプシス類はバイオ燃料の生産手段として有望な藻類であるが、実用化には光合成効率の向上が必要であり、我々はゲノム編集技術を用いてナンノクロロプシスの増殖速度の向上を目指している。陸上植物では高濃度のCO₂の供給は光合成効率を向上させる。一方、ナンノクロロプシスを含む多くの微細藻類では、高濃度のCO₂を通気すると培地の酸性化等の理由により増殖能力は低下してしまう。本研究は、微細藻類の増殖能力を向上させる基盤技術として、酸性化に関与するcarbonic anhydrase(CA)をゲノム編集で改変し、高濃度のCO₂通気に耐性を持つ株を作成することを目的とした。

【方法・結果】 材料としている *Nannochloropsis oceanica* NIES-2145 は5種類のCA 遺伝子を持つと考えられるが、今回はCA3について検討した。*N. oceanica* NIES-2145 よりPCRでCA3 遺伝子を取得し、CRISPR-directによりゲノム編集の標的配列を決定した。標的配列に対するゲノム編集用プラスミド(pNAN1014)を構築し、野生株にエレクトロポレーションで導入、Zeocin耐性で選択して形質転換株を得た。形質転換株からPCRで回収したゲノム編集の標的配列を制限酵素で消化し、配列の変化を調べた。スクリーニングの結果、標的配列がゲノム編集された変異株の取得に成功した。塩基配列を確認した結果、この変異株はノックアウト変異ではなく、1アミノ酸置換であると考えられた。取得した変異株を、光強度80μmol/m²/s、0~2%のCO₂添加の条件で通気培養し、増殖を野生株と比較した結果、野生株では増殖が阻害される濃度のCO₂を通気した条件下でも良好に増殖することが確認された。また、空気(0%CO₂添加)を通気した条件下では、野生株と同程度の増殖速度であった。これらの結果より、ゲノム編集により高濃度のCO₂通気に耐性を持つ株の取得に成功したことが示された。

Creation of *Nannochloropsis* strains tolerant to high concentrations of carbon dioxide by genome editing

Qiao Qiao¹, Ji Zhang¹, Kandai Watanabe², Makoto Fujie¹
 (¹Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., ²Fac. Eng., Hiroshima Univ.)

Key words microalgae, genome editing, carbon dioxide, *Nannochloropsis*

4E03-09 植物の気孔開閉を制御する化合物の探索

○竹田 遥¹, 鈴木 喬太¹, 三俣 好令¹, 有澤 美枝子², 石丸 泰寛¹, 魚住 信之¹
 (¹東北大院・工, ²九大院・農)
 uozumi@tohoku.ac.jp

【背景・目的】

植物の気孔は気体の交換口であることから、気孔の開閉状態が成長に重要な生命現象である光合成の速度を制御している。野外環境では、変動する外部刺激に対して瞬時に応答できないため、光合成は最大限行われていない。そのため、気孔開閉を人為的に制御することができれば、光合成効率の向上や生産性の増大が期待できる。光や乾燥によって孔辺細胞の浸透圧が変化することで気孔は開閉する。気孔の浸透圧の変化はK⁺チャネルによるK⁺の流入と関係する。本研究では、孔辺細胞で機能するK⁺チャネルの活性を調節する化合物の探索を行った。これまでに、内向き整流性K⁺チャネルの阻害剤を報告した(Sato *et al.*, Adv. Sci. 2022)。外向き整流性K⁺チャネル Guard cell Outward Rectifying K⁺ channel (GORK)の阻害剤は見つかっていない。今回、GORKの阻害剤を同定し、植物への生理的な効果やこのK⁺チャネルの情報伝達応答の機能について解析をおこなった。

【方法・結果】

GORKの阻害剤を見つけるために、アフリカツメガエル卵母細胞にGORKを異種発現させた後、外液に化合物を添加した際のチャネル活性を、電気生理学的手法を用いて測定した。化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、GORKを阻害する化合物を同定した。本阻害剤の植物における効果を調べるために、気孔に化合物を与えると、光・乾燥で誘導される気孔閉鎖が阻害された。GUS植物を用いてGORKの局在性を観察すると、孔辺細胞の他に根にも発現していることがわかった。本阻害剤を含む培地で植物を生育させたと、根の様子を観察すると主根が短くなったことから根の伸長の阻害効果をもつことが示された。以上の結果から、本阻害剤は光・乾燥誘導性の気孔閉鎖と根の伸長を抑制する効果があることが示された。

Search for compounds that control stomatal aperture in plants

○Haruka Taketa¹, Kyota Suzuki¹, Yoshiharu Mimata¹, Mieko Arisawa², Yasuhiro Ishimaru¹, Nobuyuki Uozumi¹
 (¹Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

Key words electrical recording, inhibitor, transporter, *Arabidopsis thaliana*

4E03-10 土壌に対する植物地下部の環境応答性の解析

○大西 智也¹, Tran Quoc Think¹, 荒木 希和子², 久保 幹¹
 (¹立命館大院・生命科学, ²滋賀県大・環境科学)
 kubo@sk.ritsumeiji.ac.jp

【背景・目的】

アブラナ科植物では、グルコシノレート加水分解して忌避物質を生成するという特異的な生物防御機構が知られている。その一つに忌避物質の生成に関わるβ-glucosidaseを貯蓄する細胞小器官であるER body 防御機構がある。植物体の根や胚軸表皮では恒常的にER bodyが存在し、葉では食害や障害で誘導されることから、地下部ではER bodyが迅速な防御応答に機能することが示唆されている。先行研究より、地下器官として根と地下茎を持つアブラナ科のコンロンソウでは、地下茎でもER bodyが存在することが確認された。本研究では、異なる土壌における地下茎と根の伸長とこの防御応答性を解析することを目的とした。

【方法・結果】

土壌中での地下部の挙動を調べるため、物理性と生物性の異なる自生土壌、有機土壌、化学土壌で、2021年3月から11月までコンロンソウを栽培した。地下茎と根をサンプリングし、地下茎の長さ、健全性、展葉株数を計測した。ER bodyに関連する遺伝子(PYK10, NAI2, GLL23)と地下の栄養器官で発現が高い遺伝子(LSH10)の発現量を定量した。PYK10の発現量は、地下茎では化学土壌より有機土壌で高く、根では化学土壌より有機土壌と自生土壌で高かった。その他のER body関連遺伝子では条件間で発現量に明瞭な違いは見られなかったが、根は条件間での違いが大きかった。新たに展葉した株数とPYK10の発現量の関係について調べると、有機土壌の地下茎では、株数が少ないと発現量が高くなる傾向が見られた。有機土壌と自生土壌の根では、根株数が多いと発現量が高くなる傾向が見られた。以上のことから、ER bodyに関わる遺伝子発現量で見た場合、植物地下部の防御応答性は、土壌環境や株の生育や器官によって異なり、根は土壌環境によって変化しやすく、地下茎はより安定的であることが示唆された。

Responses of plant underground organs to soil environment

○Tomoya Onishi¹, Quoc Think Tran¹, Kiwako S. Araki², Motoki Kubo¹
 (¹Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., ²Res. Inst. Env. Sci., Univ. of Shiga Pref.)

Key words environmental response, rhizome

4E03-11 新規なシグナルペプチドを利用した、植物における組換えタンパク質の分泌生産

○山本 佳奈¹, 梶浦 裕之^{2,3}, 三崎 亮^{2,3}, 藤山 和仁^{2,3}
 (¹阪大院・工, ²阪大・生工国際セ, ³阪大・先端学際連携機構)
 fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

近年、組換えタンパク質生産の宿主の一つとして、植物が注目されている。中でも培養細胞は、目的タンパク質を培地中に分泌できるため、精製の簡便化が期待できる。この培地への分泌効率を上げることで、より理想的なタンパク質生産システムとなり得る。これまでも分泌効率促進を目的に、Extensinに代表されるいくつかの植物由来の分泌SPが利用されてきた。しかし、使用するシグナル配列や宿主によって分泌量が大きく変化するため、宿主に適したより有効的な分泌SPを見出す必要がある。そこで本研究では、*Nicotiana benthamiana*由来の新規な分泌SPを同定し利用することで、植物培養細胞における組換えタンパク質の分泌生産系を構築することを目的とした。まず、植物体での一過性発現時に、細胞間隙であるアポプラストに顕著に分泌されたタンパク質に注目し、2種類の感染特異的タンパク質(CDE1, CDE2)を同定した。このCDE1, CDE2が持つ分泌SP(CDE1_{sp}, CDE2_{sp})を付加したモデルタンパク質GFPを、まずは*N. benthamiana*植物体で一過的に発現し、使用したシグナル配列のタンパク質生産および分泌への寄与を評価した。その結果、特にCDE2_{sp}を付加することで、ヒト由来SPを付加した場合と比べて、GFPの分泌量が増加した。従来植物での分泌生産に汎用されているExtensinのSPと比べても、分泌量の向上が確認できた。シグナル配列の付加によりGFPの発現量に変化はなかった。さらに、培養細胞での安定発現系においてもこれらの分泌SPを付加したGFPの発現を確認した。今後、培養細胞系における分泌性も調べ、医療用タンパク質生産にも応用していく。

Fusion of a novel signal peptide enhances protein secretion into the plant apoplast

○Kana Yamamoto¹, Hirayuki Kajiuira^{2,3}, Ryo Misaki^{2,3}, Kazuhito Fujiyama^{2,3}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²ICBiotech, Osaka Univ., ³OTRI, Osaka Univ.)

Key words plant cell culture, recombinant protein production, secretory production

4F02-01 無血清で作成した肝臓様三次元組織との共培養による筋芽細胞の無血清培養

○新井 世望¹, 仁宮 一章²
 (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】地球上の人口増加により、将来、タンパク質供給が逼迫し、畜産に必要な土地や水のため森林破壊や水不足という問題が生じる。そこで近年、食用を前提とした動物細胞からなる三次元組織（培養肉）の生産が注目されている。現在、動物細胞の培養に用いる培地は、無機塩・糖・アミノ酸・ビタミンからなる基礎培地に、増殖因子タンパク質を含むウシ胎児血清(FBS)を添加したものである。しかしFBSの調達には牛の飼育が前提であり、上記の問題の解決に至らない。そこで本研究では、安価な無血清培養法として、FBSに含まれる細胞増殖因子タンパク質を分泌する肝臓細胞を無血清で培養して三次元組織を作成し、この三次元組織を筋芽細胞の培養中に共存させるという方法を検討した。

【方法および結果】アルブミン・トランスフェリン等生産性のヒト肝臓がん細胞株(HuH-7)を無血清基礎培地（微量金属成分を補充した RPMI-1640 培地）で拡大培養した。無血清培養で得られた HuH-7 細胞で、U 底 96 well プレートを用いて直径約 550 μm のスフェロイドを作製した。作成したスフェロイド 162 個を、スフェロイド積層型のバイオ 3D プリンターを用いて、(9×18×1)となるよう剣山上に積層した。剣山上のスフェロイド積層物は、無血清基礎培地で 5 日間振とう培養することで、肝臓様三次元組織となった。剣山上に作製した肝臓様三次元組織と共存させた状態で、マウス筋芽細胞株(C2C12)の単槽培養を、無血清基礎培地を用いて 6 well プレート内で行った。C2C12 細胞播種後、3 日間培養し、顕微鏡観察および培養終了時のセルカウントにより C2C12 の増殖を評価した。その結果、C2C12 細胞は、無血清培養では死滅したが、肝臓様三次元組織との共存下ではコンフルエントまでの増殖が確認できた。

Serum-free monolayer culture of myoblast cells by co-culture with 3D hepatic tissue

○Tsugumi Arai¹, Kazuaki Ninomiya²
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words serum-free culture, myoblast, 3D hepatic tissue

4F02-02 動物細胞培養のための可食性マイクロキャリアの作成

○坂本 竜朗¹, 仁宮 一章²
 (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】地球上の人口は増加の一途であり、今後、タンパク質供給に問題が発生するといわれている。また、畜産では、食肉の数倍量の穀物が必要であり、森林破壊や水資源枯渇といった環境問題につながる。そこで近年、食用を前提とした細胞からなる三次元組織（培養肉）の生産が注目されている。食用の三次元組織の生産には、大量の細胞が必要である。足場依存性の動物細胞の大量培養にはマイクロキャリアが用いられる。そこで、本研究では、最終の三次元組織に取り込まれることも想定し、可食性のマイクロキャリアの作成を検討した。すなわち、アルギン酸ゲルビーズにゼラチンをコートしたうえで架橋を行うことでマイクロキャリアを作成し、そして、このマイクロキャリア上に筋芽細胞が接着・増殖可能かを検討した。

【方法および結果】2%アルギン酸ナトリウム溶液をマイクロシリンジに取り付けたノズルから吐出し、100 mM CaCl₂ 溶液に対し入水させることで、アルギン酸ゲルビーズを作成した。アルギン酸ビーズは、1%魚鱗由来ゼラチン溶液中で 37°C、1 h 攪拌し、ゼラチンをコーティングした。このビーズを純水で洗浄し、4°C、1 h 静置した。次に、このビーズを終濃度 0.5%の微生物由来トランスグルタミナーゼ製剤溶液中で 37°C、20 h 架橋反応を行い、マイクロキャリアを作成した。マイクロキャリアは直径約 600 μm であった。増殖培地（10%FBS および 5 ng/mL bFGF を含む DMEM 培地）にマイクロキャリアを懸濁し、5.0×10⁴ cells/mL となるよう筋芽細胞を播種した。その結果、細胞播種 2 h 後にはマイクロキャリアに細胞が接着したことが確認できた。その後、培養時間とともにマイクロキャリア表面に接着している細胞数が増加することが確認できた。

Edible microcarrier for animal cell culture

○Tatsuro Sakamoto¹, Kazuaki Ninomiya²
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words gelatin, alginate, myoblast

4F02-03 線維化コラーゲン微粒子を用いる間葉系幹細胞の軟骨分化促進

○佐野 文香, 山田 真澄, 関 実, 鶴頭 理恵
 (千葉大院・融合理工)
 m-yamada@faculty.chiba-u.jp

軟骨は無血管組織であり、自己再生能力が低い。一度損傷すると簡単には修復できない。一方で、間葉系幹細胞(MSC)は骨髄や脂肪組織等から単離することができ、軟骨、骨、脂肪細胞を含む様々な細胞に分化する優れた能力を有するため、MSCを用いた軟骨再生治療は、再生医療分野において期待されている。通常、MSCを軟骨に分化させる際には、MSCの集塊を形成させ、長期間培養を行って軟骨へと分化させる。しかしながら従来の方法には、細胞集塊の中心に均一に栄養分を送達させにくい、アポトーシスが生じやすく、不均一な分化領域を生じるといった課題があった。一方でコラーゲンは細胞外基質成分の一種であり、適切な足場を提供することによって細胞の接着・増殖・分化を制御する。特にI型コラーゲンは、MSCの軟骨への分化を効率的に促進することが報告されている。本研究では、MSCの集塊形成において線維化I型コラーゲン微粒子を混合することで、MSCの軟骨への分化能が向上するか検証した。

中性I型コラーゲン水溶液からなる油中水滴を形成し、37°Cにおいてコラーゲン分子の自発的な組織化を誘導することで、直径数百nmのコラーゲン繊維からなる直径20-30μmの微粒子を形成させた。得られた微粒子をMSCと混合して96ウェルプレートに播種して集塊を形成させ、軟骨形成分化条件下で3週間培養したところ、集塊の内部に軟骨細胞に特有の楕円形の細胞形態が観察された。トルイジンブルー染色によって、微粒子を混合した場合に軟骨分化の指標であるグリコサミノグリカンが増加することを確認した。更に、別の分化指標であるII型コラーゲンの免疫染色により、微粒子の存在下で分化効率が向上したことが確認された。これらの結果は、本研究で提案した線維化コラーゲン微粒子を用いた培養法が、MSCの効率的かつ均一な分化において有用であることを示唆している。

Improved chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells using fibrillized collagen microparticles

○Fumika Sano, Masumi Yamada, Minoru Seki, Rie Utoh
 (Grad. Sch. Sci. Eng., Chiba Univ.)

Key words collagen, chondrocytes, mesenchymal stem cell, differentiation

4F02-04 Human umbilical vein endothelial cell behavior on Gelatin-Ph/HA-Ph composite hydrogel obtained via hydrogen peroxide mediated crosslinking and degradation

○Kelum Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, Wildan Mubarak, Ikki Horiguchi, Masaru Kojima, Shinji Sakai
 (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)
 sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

The study of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) behavior in-vitro is crucial to understanding the mechanism of formation of the new blood vessels. The physicochemical properties of the extracellular matrix are known to govern the various behavior of the HUVECs. In this study, we prepared the composite hydrogels from derivatives of gelatin and hyaluronic acid (HA) through horseradish (HRP)-catalyzed hydrogelation. In the hydrogelation, hydrogen peroxide necessary for the progress of the enzymatic reaction was supplied through continuous exposure to air containing hydrogen peroxide. It caused not only the hydrogelation but also polymer degradation. Using this contradictory effect of hydrogen peroxide, hydrogel stiffness could be controlled by simply tuning the air containing 16 ppm hydrogen peroxide exposure time from 15-120 min. HUVECs showed good adhesion, high migration speed, and network formation on stiff hydrogel (2.4 kPa) obtained through 60 min of the exposure compared to the soft hydrogel obtained through 15 min (0.4 kPa) and 120 min (1.2 kPa) of the exposure. In addition, HUVECs showed high viability (> 80 %) on the composite hydrogel indicating the cytocompatibility of the hydrogelation system. In conclusion, the contradictory effect of hydrogen peroxide on the composite hydrogel could control the behavior of HUVECs.

Human umbilical vein endothelial cell behavior on Gelatin-Ph/HA-Ph composite hydrogel obtained via hydrogen peroxide mediated crosslinking and degradation

○Kelum Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, Wildan Mubarak, Ikki Horiguchi, Masaru Kojima, Shinji Sakai
 (Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words 2D cell culture, Composite hydrogel, degradation, Hydrogen Peroxide

4F02-05 新規生産宿主細胞 CHL-YN 細胞を用いたグルタミンフリー培養におけるアンモニア濃度への影響

○古藤 隆衣¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 有島 凜太郎¹, 古賀 雄一^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (¹大阪大・工, ²阪大・先導的学際研機構)
 omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

チャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) 細胞は、バイオ医薬品生産に最も汎用される宿主細胞である。一方、大腸菌や酵母等に比べて増殖が遅いという課題がある。そこで新たな宿主細胞として、チャイニーズハムスター肺由来 (CHL)-YN 細胞が樹立された。CHL-YN 細胞は、無血清培地に馴化した不死化細胞であり、CHO 細胞に比べてほぼ 2 倍の増殖能を有し、バイオ医薬品生産のプロセス開発時間や製造工程の短縮が期待できる。他に注目される特徴として、CHL-YN 細胞はグルタミン合成能を有している。グルタミンは、グルコースと同様に細胞のエネルギー源として、細胞培養に広く使用されている。しかし、細胞のグルタミン消費に伴って、増殖を阻害物質であるアンモニアが生成する。CHL-YN 細胞のグルタミン無添加培養を行うと、グルタミン酸と培養中に蓄積したアンモニアからグルタミンが合成され、アンモニア生成の軽減が期待できる。本研究では、グルタミン無添加培地での CHL-YN 細胞培養系の構築と解明を目的とした。

CHL-YN 細胞をグルタミン無添加培地での 42 日間培養にて馴化させた結果、比増殖速度 (0.066 h⁻¹)、最高到達生細胞密度 (1.69×10⁷ cells/mL) を示し、グルタミン添加培養の CHL-YN 細胞 (0.067 h⁻¹, 1.67×10⁷ cells/mL) とほぼ同等まで馴化できた。回分培養中の最大アンモニア濃度はグルタミン添加培養 (13.1 mM) と比較して、5.3 mM に低下し、アンモニア生成の軽減が達成された。また、抗体比生産速度は、グルタミン添加培養と比較して同等であり、抗体比生産速度への影響はないことが示された。以上より、CHL-YN 細胞におけるグルタミン無添加培地での培養の可能性と有用性が示唆された。

Effect of glutamine-free cell culture condition of CHL-YN cells on ammonia production

○Takae Koto¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Rintaro Arishima¹, Yuichi Koga^{1,2}, Takeshi Omasa^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster lung-YN cell, ammonia metabolism, L-glutamine, Chinese hamster ovary cell

4F02-06 光独立栄養微生物を原料とした動物細胞培養用の基礎培地の作製

○若林 壮吾¹, 仁宮 一章²
 (¹金沢大院・自科, ²金沢大・新学術)
 ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】 将来、人口増加による食糧問題が発生し、農耕・畜産の規模の拡大に伴う森林破壊や水資源枯渇が生じるといわれている。そこで近年、動物細胞の培養による食用三次元組織 (培養肉) の生産が注目されている。現在、動物細胞の培養に用いる基礎培地には、可食性植物由来の糖やその発酵変換により得られるグルコースやアミノ酸等が用いられている。しかし、先に述べた食糧問題を解決するための食用三次元組織の作製のために可食性の植物資源を使用することは、人類が利用する食糧と競合してしまうため、実質的な問題の解決にはならないと言える。そこで本研究では、非可食性の光独立栄養細菌の細胞内グリコーゲンおよびタンパク質を加水分解することで得られる糖・アミノ酸混合物を用いた動物細胞培養用培地の作製を行った。

【方法および結果】 光独立栄養細菌であるシアノバクテリア UTEX2973 株を BG 11 培地を用いて培養し、回収した。その後、99%エタノールを用いて色素抽出を行い、得られた色素抽出残渣に対して酸加水分解または酵素加水分解のいずれかの方法で細胞内グリコーゲンおよびタンパク質の加水分解を行った。作製した 2 種の加水分解物に対して限外濾過と Triton X-114 処理により加水分解物の精製 (エンドトキシン除去) を行い、さらに浸透圧を調整した。以上の工程により得られた加水分解物を LC/MSMS 分析した結果、細胞培養における必須アミノ酸の一部とグルコースが不足していることが判明した。そこで、調整した加水分解物に対して不足成分 (グルタミン、システインおよびグルコース) を補填したものを既存の培地の糖・アミノ酸の代替として使用した血清含有培地を作成した。マウス筋芽細胞 C2C12 株を 3 日間培養し細胞増殖評価を行ったところ、既存の血清含有培地と同等の増殖を確認できた。

Basal medium for animal cell culture that is made from photoautotrophic microorganism

○Sohgo Wakabayashi¹, Kazuaki Ninomiya²
 (¹Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words cyanobacteria, basal medium, myoblast

4F02-07 抗体生産宿主として有用性の示された高染色体数を持つ CHO 細胞株の特徴解析とその高生産性を示す要因の解明

○山崎 雅大¹, 中西 悠人¹, 山野-足立 範子^{1,2}, 大政 健史^{1,2}
 (¹大阪大・工, ²阪大・OTRI)
 yamanori@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞は染色体異数性という特徴を持つ。単一細胞クローンから樹立された細胞株であっても、培養中に染色体数が変化する。これまでの研究において、高染色体数を持つ CHO 細胞が通常の染色体数の CHO 細胞と比べて高い生産性を示した。この結果から、先行研究では、中心体の過剰形成を誘導する PARP-1 阻害剤 3-Aminobenzamide (3-AB) を CHO-K1 細胞 (K1 株) に添加して、染色体異数性の誘導を行い、複数の細胞株を単離した。これらの細胞株の抗体生産宿主としての有用性を評価したところ、特に 5E8 細胞 (5E8) の抗体生産宿主としての有用性が確認された。そこで本研究では、5E8 が高生産性を示す要因を解明するため、5E8 の特徴を解析した。

まず、抗体生産細胞プールの抗体遺伝子のコピー数及び mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。次に、K1 株と単離した高染色体数の細胞株 (親株) の 6 日間の回分培養を行い、培養 3 日目の細胞を用いて RNA-seq 解析をした。また、核型分析は Metaphase 期染色体標本の作製及びマルチカラー FISH (MetaSystems) 染色により行った。リアルタイム PCR を用いて 5E8 を K1 及び異数性誘発により単離された別の高染色体数の 3A11 細胞 (3A11) と比較した結果、5E8 で HC,LC のゲノム中のコピー数は K1 に対して 24 倍、27 倍に、3A11 に対して 9 倍、7 倍の値を示した。また、HC,LC の mRNA 発現量は K1 に対して 19 倍、28 倍に、3A11 に対して 3 倍、5 倍の値を示した。この結果から、導入遺伝子のコピー数、mRNA 発現量の増加が生産性向上の要因であることが示唆された。次に RNA-seq 解析の結果、8 番染色体のテロメア領域にコードされている遺伝子の発現量が、5E8 で K1 と 3A11 と比較して減少していた。さらに、核型分析の結果、5E8 で 8 番染色体の染色体異常が多く確認された。以上より、5E8 の特徴として 8 番染色体のテロメア領域の欠損が示唆された。

Characterization of CHO cell line with high chromosome number that is a useful host for antibody production and elucidation of the factors that contribute to its high productivity

○Masahiro Yamazaki¹, Yuto Nakanishi¹, Noriko Yamano-Adachi^{1,2}, Takeshi Omasa^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words Chinese hamster ovary cell, chromosome, antibody

4F02-08 トレハロース添加がもたらす抗体機能への影響と宿主 CHO 細胞の応答

○中野 美貴子, 三崎 亮, 新 勇介, 梶浦 裕之, 藤山 和仁
 (阪大・生工国際セ)
 fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

<背景と目的>

近年、抗体医薬品は疾患の原因物質に高い特異性で結合することから、副作用が少ない画期的な治療薬として需要を獲得し続けている。しかし、細胞培養等に製造プロセスを要し、抗体生産プロセスにおけるコストの削減が求められている。本研究は、抗体生産の主流な宿主のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用い、高品質な抗体生産による低コスト化を目指した。近年、CHO 細胞培養培地へ高濃度のトレハロースを添加することで分泌された抗体の凝集が抑制されることが明らかになった^[1]。一方、我々がトレハロース添加培地で抗体生産 CHO 細胞を培養したところ、比抗体生産速度の向上に加え、抗体の糖鎖構造分布、及び抗体の Fc 受容体との結合力に変化が見られた。我々はこの原因がトレハロース添加による浸透圧の増加にあると考え、トレハロース存在下で影響を受ける細胞の遺伝子発現量を網羅的に解析した。

[1] Onitsuka et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.117 No.5, 632-638 (2014)

<方法と結果>

100 mM のトレハロースを含む培地に馴化したヒト IgG 抗体安定発現 CHO 細胞を、培地中のトレハロース濃度を段階的に増加することで樹立した。本細胞を RNA-seq 解析により網羅的に遺伝子発現量を調査し、トレハロース非存在下で培養した細胞と比較して発現量が変化している遺伝子を複数見出した。中でもある種の熱ショックタンパク質の発現量が劇的に上昇しており、当該タンパク質の発現量はトレハロースを一時的に添加した細胞よりもトレハロースに馴化した細胞で約 10 倍高いことも分かった。以上のことから、今回発見した熱ショックタンパク質はトレハロース存在下のような浸透圧がもたらされる状況で細胞が生存するために必要であり、高浸透圧培地へと細胞が馴化するにあたり本遺伝子の発現が恒常的に過剰になったと考えられる。

Trehalose addition affects antibody function and transcriptomic responses in Chinese hamster ovary cells

○Mikiko Nakano, Ryo Misaki, Yusuke Atarashi, Hiroyuki Kajiuira, Kazuhito Fujiyama
 (ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words antibody, Chinese hamster ovary cell, osmotic response, RNA-Seq

4F02-09 画像解析に基づいたポリビニルアルコールゲル上における神経幹/前駆細胞の移動能の評価

○前田 結衣, 森 英樹, 原 正之
(大阪公大院・理)
morihide@omu.ac.jp

【緒言】 ポリビニルアルコール (PVA) は生物学的に不活性で生体適合性の高い親水性ポリマーで、水溶液にガンマ線を照射することでゲルを作製できる。PVA ゲル上で、神経細胞やグリア細胞への多分化能と自己複製能をもった神経幹/前駆細胞 (NSPC) を培養すると、ゲル上に接着して細胞集塊を形成して増殖する。この集塊形成機構の解明を目指し、PVA ゲル上における NSPC の移動能の変化について定量的に評価するために、タイムラプス画像をもとに細胞と細胞集塊の移動速度や方向などを解析した。

【実験方法】 加熱溶解させて 5.5 %PVA 水溶液を調製し、脱気後にその PVA 溶液を 3 cm Dish に加え、20 kGy の 60Co ガンマ線 (線量率 4.5 kGy/h) を照射して PVA を架橋し、PVA ゲルを作製した。細胞は PVA ゲルおよび Dish 上に 1×10^6 cells/mL の細胞密度で播種し、5 % CO₂ 37°C で培養した。培養中の細胞を 20 分間おきにタイムラプス撮影し、細胞の経時変化画像から得られた各画像上の細胞の位置座標より、細胞や細胞集塊の移動速度、距離の経時変化などを解析した。

【結果と考察】 PVA ゲル上で培養された NSPC の移動速度の中央値は、培養 2 日目では 4.9 μ m/h に対し、Dish 上では 9.1 μ m/h を示し、PVA ゲル上の方が細胞の移動速度は遅くなった。移動速度の差が顕著に見られたのは培養 2 日目以降であった。細胞と細胞集塊間の距離については、Dish 上と PVA ゲル上のどちらでも、培養日数の経過とともに細胞集塊に近づく細胞の割合が増えた。また、PVA ゲル上の細胞集塊の方が近づいた細胞の割合が多かった。PVA ゲル上における NSPC の移動速度はゲルに細胞が接着することによって Dish 上に比べて遅くなるが、細胞集塊形成は Dish 上と同様に細胞増殖だけでなく細胞の移動と結合を伴って進み、細胞集塊は大きくなると考えられる。

Evaluation of the migratory potential of neural stem/progenitor cells on polyvinylalcohol gels based on analysis of time-lapse images

○Maeda Yui, Mori Hideki, Hara Masayuki
(Grad. Sch. Sci., Osaka Metro. Univ.)

Key words neural stem cell, hydrogel, cell migration

4F02-10 ヒアルロン酸誘導体を活用した間葉系幹細胞の免疫機能制御

○小高 雄也, 龜山 太一, 濱崎 奈津香, 田村 彰彦, 村松 和明
(電機大院・理工)
k-muramatsu@mail.dendai.ac.jp

【背景と目的】 間葉系幹細胞 (MSC) には免疫調節作用を有することが知られており、ステロイド抵抗性の移植片対宿主病 (GVHD) では同種 MSC を活用した細胞療法が適用されている。これまで我々は、炎症性サイトカインと高分子量ヒアルロン酸 (HA) が共存する際、MSC の免疫調節機能が最も高まることを発見した。そこで本研究では、細胞療法のための MSC の *ex vivo* における培養プロセスにおいて、サイトカインと HA による共刺激を試みた。

【方法】 ラット大腿骨より骨髓細胞を回収し、コロニー形成能を有する接着性細胞を MSC として単離した。この細胞の多分化能は骨分化および脂肪分化で検証した。MSC を腫瘍壊死因子 TNF- α の存在/非存在下で培養する過程で、共刺激するヒアルロン酸の分子量および濃度を変化させた。また当研究室で開発した、分子量 200 万の HA (HA200) を低分子量ポリグルタミン酸 (PGA) で化学修飾した分解抵抗性ヒアルロン酸誘導体 (PGA-g-HA) も評価対象群の一つとした。所定時間の培養後、MSC が産生する炎症性サイトカイン遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。

【結果と考察】 抗炎症性サイトカインの遺伝子発現に及ぼす HA の分子量の影響を評価したところ、分子量 80 万以上の HA で亢進が見られ、HA200 および PGA-g-HA ではその傾向はより顕著となった。また、作用濃度の影響を評価したところ、HA200 では 1 mg/ml 以上で効果を示したのに対し、PGA-g-HA では 0.5 mg/ml 以上で同様の効果が示された。

これら結果より、MSC 療法において移植前の MSC をサイトカインと PGA-g-HA で共刺激することにより、HA の免疫調節機能はより向上することが期待される。

Enhancement of immunoregulatory activity of mesenchymal stem cells using a high-molecularweight hyaluronan derivative

○Yuya Kotaka, Taichi Akiyama, Natsuka Hamazaki, Akihiko Tamura, Kazuaki Muramatsu
(Grad. Sch. Sci. Eng. Tokyo Denki Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, hyaluronan, immune suppressor

4F02-11 CHL-YN 細胞の重力沈降型小型灌流培養

○國田 紘夢¹, Sukwattananipa Puriwat¹, 古賀 雄一^{1,2}, 山野-足立 範子^{1,3}, 大政 健史^{1,3}
(¹阪大院・工, ²岡山理大・工, ³阪大・OTRI)
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】

抗体医薬品の市場は年々拡大しており、生産プロセスの開発は急務である。近年、生産効率向上を目的とした連続生産プロセスの開発が進んでいる。このプロセスの培養段階は灌流培養を使用しており、従来の回分培養や流加培養と比較して、高い細胞濃度と長期培養が実現できる。CHL-YN 細胞は、抗体医薬品製造における主な宿主細胞である CHO 細胞と比較して、高い増殖能を持ち、新たな宿主細胞として期待されている。本研究では、CHL-YN 細胞を連続生産プロセスに適用するため、灌流培養条件として細胞生存率 95%、2 週間の長期培養を目指した検討を行った。培養条件の検討にあたり、ABLE の小型灌流培養装置 BWB-05NA2-C を使用した。本装置は、30 mL からの小容量で灌流培養が実現可能である。細胞保持には重力沈降槽を使用し、培養液中の細胞を沈降させることで細胞分離を可能にする。また bleeding では、沈降させる細胞の割合を変化させ、harvest として細胞を排出する。しかし、細胞沈降過程では、重力沈降槽内の溶存酸素 (DO) 濃度の低下が懸念される。そこで、重力沈降槽の DO 不足を補うため、培養槽内の DO 濃度の影響を検討した。

【実験手法】

上記の小型装置を使用して、培養 4 日目から灌流速度 2 Reactor volume/day、細胞濃度を 2×10^6 cells/mL に維持した灌流操作を行った。さらに、初期値 40% (100%飽和) の下限 DO 濃度を 4 日目から 3 日毎に 50, 60, 70% と上昇させた。

【結果・考察】

グルコース濃度は 8 日目まで 2 g/L で維持されたが、細胞生存率は 4 日目 (DO: 50%) から緩やかに減少し始め、14 日目 (DO: 70%) には 91.4% まで減少した。今後は、膜分離法 (ATF) を用いた異なる灌流培養系と比較し、CHL-YN 細胞の灌流培養条件の検討とともに、重力沈降法と膜分離法が灌流培養に与える影響についても考察を進める。

Small-scale perfusion CHL-YN cell culture by gravity separation

○Hiromu Kunita¹, Puriwat Sukwattananipa¹, Yuichi Koga^{1,2}, Noriko Yamano-Adachi^{1,3}, Takeshi Omasa^{1,3}
(¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²Fac. Eng., Okayama Univ. Sci., ³OTRI., Osaka Univ.)

Key words mammalian cell, continuous culture, antibody, recombinant protein production

4F02-12 糖鎖成分群毎の抗体分取を可能とするアルカリ安定化 Fc 受容体固定化分離剤の開発

○谷口 直優, 早川 勇太, 寺尾 陽介
(東ソー)
yousuke-terao-uc@tosoh.co.jp

【背景】

動物細胞で培養生産される抗体医薬品は、多様な糖鎖修飾を受けた混合物として生産される。この糖鎖構造が抗体の細胞障害活性に大きく寄与するため、糖鎖構造を制御した、高機能な抗体医薬品の開発が進展している。その開発を支援する技術、例えば糖鎖成分毎 (活性の大きさ毎) に抗体を成分分離でき、開発抗体の性能や品質を分析可能な技術の構築が求められていた。そこで当社では、抗体の Fc 領域に特異的に結合する Fc 受容体 (FcR) をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー用分離剤を開発した (TSKgel®FcR-III A-NPR, TSKgel®FcR-III A-5PW として販売中)。FcR は抗体に対して糖鎖成分毎に異なる結合力を示すため、本分離剤の開発により、糖鎖成分毎の分離、つまり活性の大きさ毎の抗体成分分離が可能となった。この分離した糖鎖成分比を算出し評価することで、抗体の性能や品質を迅速に分析できるという技術の構築に成功した。

本報告では分析用途だけではなく、分取用途としての本分離剤の利用を見据え、アルカリ洗浄を可能とする耐アルカリ性能、ならびに大容量処理を可能とする高吸着性能を有する、新規分離剤の開発をおこなったので報告する。

【結果】

耐アルカリ性能の向上を目指し、FcR 遺伝子に対して変異を複数導入したリガンドを創製した。本リガンド固定化分離剤の耐アルカリ性能、抗体精製を模した連続クロマト試験 (平衡化、抗体吸着、洗浄、溶出、アルカリ CIP、再平衡化の各ステップを繰り返し実施) により評価し、連続 100 回使用後も抗体吸着量が 90% 以上保持されることを確認した。さらに当社独自の配向制御を施したりガンド固定化法により、抗体の動的吸着量を 45 g/L まで向上させた。また分取抗体の糖鎖構造を LC-MS 分析により解析し、本分離剤の特長である糖鎖成分毎の抗体分離が可能であることを実証した。

New preparative alkali-stable Fc receptor immobilized resin for separation of antibodies depending on the different glycoforms

○Naomasa Taniguchi, Yuta Hayakawa, Yosuke Terao
(Tosoh Corp.)

Key words antibody, affinity chromatography, Fc receptor, Glycoforms

4F02-13 微細孔を有する金属製メッシュと沈降分離を併用した浮遊懸濁細胞の分離技術の開発

○嘉悦 勇太¹, 谷原 健吾¹, 今井 健太², 近藤 孝志², 長森 英二¹
 (¹大阪工大・生命工, 村田製作所)
 eiji.nagamori@oit.ac.jp

CHO(Chinese Hamster ovary)細胞などを浮遊状態で大量培養する場合、培地交換操作時の細胞-培地分離は課題である。クロスフロー型中空糸限外ろ過モジュール(ATF システム等)が組み込まれた灌流培養プロセスが実装されているが、非常に高価でラボレベルの検討には適用し難い。一方、実験室操作のレベルでは、遠心分離法の他に、編込み式フィルター(穴径の均一性が低い、開口度 15%程度)を用いた分離法などが選択肢となるが、分離の精度が低い等の問題がある。我々は以前に、半導体加工技術によって作製された金属製多孔膜を、細胞-培地分離に活用する方法を検討した。開口度が約 50%と高く、貫通孔式で穴の形状が均一であり、精度が高い分離を、多くの液量に対して可能であった(編込み式フィルター比)。今回、金属製多孔膜を細胞浮遊培養(細胞懸濁液)の培地分離に用いることを検討した。

実験には CHO 細胞を 1.0×10^6 cells/mL に懸濁した模擬培養液 300 mL を用いた。金属製多孔膜(村田製作所、格子径 4 μ m、膜直径 29 mm)を保持可能な汲み上げ式(デッドエンド型)のモジュールを試作し、細胞濃縮操作を検討した。次に細胞沈降速度(27.3 mm/h)を計測し、これを考慮した細胞沈降ゾーン(長さ 30 mm)を有する汲み上げモジュールを試作した。結果、目詰まりを起こすことなく 1.57 倍濃縮操作(最終液量 200 mL)が約 6 時間で可能であった。現在は殺菌操作に耐える素材のモジュールを試作し、灌流培養への適用を検討しており報告する。

Medium-cell separation in CHO suspension culture using a fine "zaru" produced by semiconductor processing technology

○Yuta Kaetsu¹, Kengo Tanihara¹, Kenta Imai², Takashi Kondo², Eiji Nagamori¹
 (¹Biotechnol., Osaka Inst. Technol., ²Murata Manufacturing Co., Ltd.)

Key words Chinese hamster ovary cell

4F04-01 細胞培養プロセスにおける光計測によるリアルタイムモニタリング技術の検証

○小林 航, 山中 洋昭, 末綱 彩花, 木村 一雅, 下田 聡一郎
 (横河電機)
 souichirou.shimoda@yokogawa.com

細胞培養プロセスにおいて、リアルタイムでデータを収集するために、様々な光計測が用いられているが、一般的に光計測によって取得される光スペクトルは検量モデルを介して各種成分濃度(測定値)に変換される。検量モデルを作成する際には、通常培養中のスペクトルデータを使用する。ロバストな検量モデルを構築するためには、膨大な学習データが必要であり、何度も培養を繰り返さなければならず、膨大なコストがかかる。このため、低コストで作成でき、高精度に検量可能な検量モデルが求められている。本研究では、光計測の中でも、水溶液中の測定において水の影響を受けにくいことが知られているラマン分光法を選択し、実際の培養のデータを使用せず、様々な培養に適用可能な検量モデルの構築を目指した。オフラインでいくつかのサンプルを調整し、それらのスペクトルデータから検量モデルを作成した。この検量モデルの評価のため、複数条件の CHO 細胞培養において精度検証を実施した。

その結果、検量モデル作成の諸条件に近い条件の培養では、かなり精度の高い検量結果を得ることができた。予測標準誤差(RMSEP)で評価した場合、グルコース濃度では RMSEP=0.30g/L、乳酸濃度では RMSEP=0.18g/L、抗体濃度では RMSEP=0.10g/L という結果を得ることができた。また、培養トレンドが変化する pH 等の基本的な培養パラメータの変更は、検量精度に影響しないことが確認できた。しかし、培地、細胞や使用する分光器の変更のような条件が大きく変わる培養では、検量精度に課題がある。

今後は、条件の異なる培養においても迅速に高精度な検量を実現するために、数バッチの実培養のデータを学習データとして使用して、検量モデルをアップデートする方法を開発する。

Validation of real-time monitoring technology using optical measurement in cell culture process

○Wataru Kobayashi, Hiroaki Yamanaka, Ayaka Suetsuna, Kazumasa Kimura, Souichiro Shimoda
 (Yokogawa Electric Corp.)

Key words Calibration model, Bioprocess, Raman spectroscopy, Real-time monitoring

4F04-02 ノイズフリーな光子検出器で実現する微弱光の共焦点ライブセルイメージング

○岡野 千草¹, 佐野 千佳歩², 熊谷 彩純³, 堀江 千紘², 衛藤 雄二郎^{4,5}, 丹羽 一樹⁶, 福田 大治^{5,6}, 野村 暢彦^{1,7}, 八幡 隼^{1,7}
 (¹筑波大・生命環境系, ²筑波大院・生命地球科学研究群, ³筑波大・生命環境学群, ⁴京大院・工, ⁵産総研・東大オペランド計測OIL, ⁶産総研, ⁷筑波大・微生物サステイナビリティ研究セ)
 yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp

共焦点蛍光顕微鏡法(CFM)は、3 次元的なスキャンが可能であることから、生きた細胞の動態を 3 次元的に捉えるために広く用いられている。しかし、従来の CFM では、比較的大きな光強度(μ W オーダー以上)で励起光をサンプルに照射する必要があり、繊細な試料の観察には問題があった。既存の検出器にはダークカウント(ノイズの一種)があり、ダークカウントよりも十分に大きなシグナルを得るために、大きな励起光出力が要求されるためである。そこで本研究では、ダークカウントフリーな超伝導転移端移センサーを搭載した CFM を開発し、ごく弱い励起光強度での微弱光のライブセルイメージングを検証した。その結果、わずか 5 nW の励起光強度(焦点位置での放射強度: 約 17 kW/m², 真夏の太陽光の 17 倍程度に相当)で、Hela/GFP 細胞(Cell Biolabs inc.)の GFP 蛍光をイメージングすることに成功した。ステーションキュベータで細胞を培養しながら 41 時間観察したところ(17 分間隔)、長時間観察にも関わらず、GFP の蛍光量は減少しなかった。

CFM は、これまで主に細胞の研究用に使われてきたが、自家蛍光分析による性質評価など応用への展開が期待されている。本研究の成果は、これまでより 3 桁以上低く自然光により近い照射強度での細胞評価への道を拓くものであり、光に対して特にセンシティブな生きた細胞(再生医療に使用する細胞など)の生理状態や品質を評価するための強力なツールとなり得る。

Confocal live-cell imaging of faint light by noise-free photon detector

○Chigusa Okano¹, Chikaho Sano², Azumi Kumagai³, Chihiro Horie², Yujiro Eto^{4,5}, Kazuki Niwa⁶, Daiji Fukuda^{5,6}, Nobuhiko Nomura^{1,7}, Yutaka Yawata^{1,7}
 (¹Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ²Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ³Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, ⁴Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ., ⁵OPERANDO-OIL, ⁶AIST, ⁷MiCS)

Key words Confocal imaging, autofluorescence, Hela cell, yeast

4F04-03 栄養源の投入制御による培養の高い再現性と品質安定化の実現

○末綱 彩花, 山中 洋昭, 小林 航, 木村 一雅, 下田 聡一郎
 (横河電機)
 Souichirou.Shimoda@yokogawa.com

細胞培養プロセスにおいて、安定した品質の産物を得ることは重要であり、品質の安定化には再現性のある培養を行うことが必要と考えられる。しかし、同条件で培養を行ったときに同じ培養トレンドを示す条件を探すのではなく、迅速な培養条件開発をするために、各培養パラメータの制御自由度を高めることが必須と考える。

本研究では、弊社のアドバンスコントロールバイオリクターシステム BR1000 を用いて CHO 細胞を培養し、pH や温度、DO などの基本的な培養環境パラメータに加えて、栄養源の投入制御をすることで培養の高い再現性と品質の安定化を実現した。制御する栄養源はグルコース、グルタミン、フィード剤を選択し、5 条件の培養をそれぞれ 3 回実施し、培養の再現性と品質安定化について検証した。

従来の方法では、栄養源はオフラインサンプリングによって得られた値から、制御したい濃度になるよう投与量を計算し、間欠的に投与する。このグルコースを間欠投与した培養を培養 A とした。次に BR1000 の制御機能を用いてグルコース濃度を一定に制御した培養を行った(培養 B)。同じくグルコース濃度とグルタミン濃度を一定に制御した(培養 C)。培養 C ではグルタミン濃度を培養開始時点から一定値に制御していたが、これに対してグルタミンをいったん枯渇させたあと一定の濃度になるように制御する培養を行った(培養 D)。さらに、フィード剤を短時間で投入すると培養槽内の環境変化が大きいため、24 時間かけてフィード剤の投入を行い、同時にグルコース濃度制御を行った(培養 E)。この 5 条件の培養より、抗体収量、細胞到達密度、アミノ酸代謝、糖代謝、品質解析をそれぞれ比較した。

栄養源の制御をすることで培養の再現性と品質安定化に繋がることを示すために、各培養トレンドと品質解析の評価を進めているのでその結果を報告する。

High reproducibility and quality stabilization of culture by controlling nutrient source input

○Ayaka Suetsuna, Hiroaki Yamanaka, Wataru Kobayashi, Kazumasa Kimura, Souichiro Shimoda
 (Yokogawa Electric Corp.)

Key words antibody, bioreactor

4F04-04 濾過分離における細胞の圧縮性の変化に関する研究

○田中 孝明, 渋谷 裕紀, 民部 裕洋, 落合 秋人
(新潟大)
tctanaka@eng.niigata-u.ac.jp

【背景と目的】 バイオ生産におけるダウンストリームプロセスにおいて粒子の分離（除去または回収）は、高速化・省エネルギー化が求められる。濾過分離は遠心分離と比較してスケールアップが容易である利点を有するが、濾過の進行とともに濾材に蓄積する粒子層が濾過抵抗を増加させ、濾過速度の低下と消費エネルギーの増加の原因となる。本研究では細胞の圧縮性の経時変化に着目して細胞培養液の濾過特性を解析した。

【方法】 濾過対象の細胞としては懸濁培養可能な CHO-K1(SC)細胞を、培地としては S-MEM + 2 mM L-glutamine + 5% HamF12 + 5% FBS 培地（ペニシリン、ストレプトマイシン、およびアムホテリシン B を添加）を用い、（非接着性の）細菌培養用シャーレ内に於て 37°C、5% CO₂ の条件で培養を行った。濾過装置には濾過面積 4.1 cm² のデッドエンド型濾過装置を、濾過膜には主として酢酸セルロース製精密濾過膜（公称孔径 0.2 μm）を用いた。窒素ガスで圧力を印加し、膜間圧力差 10-80 kPa の範囲で定圧濾過を行った。

【結果と考察】 濾過の進行とともに濾過速度（透過流速）は急速に低下した。単位濾過面積当たりの濾液量を v [m]、透過流速を J [m/s] とすると通常の濾過においては透過流速の逆数 $1/J$ と v の間には直線関係がみられるが、本細胞培養液の濾過の場合、下に凸の曲線となった。そこで、濾過ケーキ（濾過膜上に生じた細胞の層）の比抵抗が経時的に指数関数的に増加するモデル式を立てて、実験値と計算値の誤差の二乗和が最小となるように圧縮性に関するパラメータを最適化したところ、実験結果に近い変化を示すモデル式が得られた。（本研究の一部は内田エネルギー科学振興財団の研究助成を受けて実施した。）

Study on change in compressibility of cells in filtration

○Takaaki Tanaka, Yuki Shibuya, Hiromi Minbu, Akihito Ochiai
(Niigata Univ.)

Key words filtration, cell, compressibility

4F04-05 ラボスケール高度制御培養トレンドをスケールアップ培養で再現する手法の開発

○木村 一雅, 小林 航, 山中 洋昭, 末綱 彩花, 下田 聡一郎
(横河電機)
Souichirou.Shimoda@yokogawa.com

動物細胞培養プロセスにおける栄養源の制御は、細胞増殖、産生物の収量と品質の安定化、プロセス再現性確保において非常に重要である。一方、栄養源はオフラインサンプリング値に基づいた必要量を、間欠的に投入する方法が一般的である。特にスケールアップ時ではそれらの投入量の増大に伴い、作業者の負担となり、スケールアップ前後の培養トレンドの再現も容易ではない。横河電機のアドバンスドコントロールバイオリアクターシステム BR1000 はラボスケール（培養槽容量 5 L）でグルコース、乳酸濃度、生細胞密度のリアルタイムインライン測定とモデル予測制御機能により培養液中のグルコース濃度の一定制御が可能である。今回、BR1000 で得られたグルコース濃度トレンドをスケールアップ培養で再現する手法を 3 つ開発した。

1 つ目はグルコース流加速度プログラム制御である。5 L 培養で得られたグルコース流加トレンドを 50 L 培養に拡大し、5 L 培養で得られたグルコース濃度トレンドが再現可能なポンプ駆動アルゴリズムを、弊社運転支援プログラムにて構築した。この結果、50 L 培養において 5 L 培養で得られたグルコース濃度トレンドが再現され、抗体産生、生細胞数密度トレンドも再現された。2 つ目はグルコースのラマン分光法インライン測定値に基づく予測制御培養である。本手法では 5 L 培養においてグルコース、乳酸濃度、抗体濃度のいずれも予測標準誤差 0.3 g/L 以下という高精度な検量と、グルコース濃度一定制御培養を実現し、50 L 培養への拡張性が示唆された。3 つ目は自動オフラインサンプリング値に基づく培養液中グルコース濃度の予測制御培養である。1 日数回のグルコース、生細胞密度の自動オフラインサンプリング値からグルコース消費を予測し、培養液中のグルコース濃度一定制御培養を実施したところ、スケールアップ培養への有用性が示唆された。

Development of methods for reproducing the lab-scale culture trends to the scale-up culture

○Kazumasa Kimura, Wataru Kobayashi, Hiroaki Yamanaoka, Ayaka Suetsuna,
Souichirou Shimoda
(Yokogawa Electric Corp.)

Key words bioreactor, antibody, metabolic engineering

4F04-06 簡便な好気-嫌気共培養法の開発

○梅原 嘉宏¹, 青柳 秀紀^{1,2}
(¹筑波大院・生物資源科学学位P,²筑波大・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 近年、宿主の様々な疾患への腸内細菌の関与が示唆され、*in vitro* で腸管腔環境を再現できる有効な腸上皮細胞と腸内細菌の共培養モデルの開発が求められている。これまで、種々の共培養モデルが提案されているが、実験系や使用する培養装置が複雑で汎用性が乏しいと共に、腸管腔環境を十分に再現できているとは言い難い。我々が知る限り、好気的環境と嫌気的環境を同一空間に *in vitro* で再現し、好気性の細胞と嫌気性菌を簡便に共培養できる系は皆無である。この現状を踏まえ、本研究では、好気性の上皮細胞と嫌気性菌を簡便に共培養できる新規培養法を開発した。

【方法・結果】 好気性の細胞として腸上皮細胞のモデルである MDCK (RCB0995) を、嫌気性菌のモデルとして *Bifidobacterium bifidum* を使用した。好気性の細胞と嫌気性菌との生育空間を分離すると共に、嫌気性菌を培養する空間の上部にミネラルオイルを投入し、気相とのガス交換を抑える「シーリング」を施す共培養系を考案・構築した。開発した培養系を用いて *B. bifidum* を単独培養した結果、培養 24 h 目の O.D.₆₆₀ は非シーリング条件の約 1.5 倍を示し、その有効性が示された。本培養法を用いて *B. bifidum* と MDCK を共培養 (24 h) した結果、経上皮電気抵抗により測定した MDCK のバリア機能と、MDCK の生存率が、MDCK 単独培養と同等の値を示した。共培養系における *B. bifidum* の経時的な増殖経過は、*B. bifidum* 単独培養と同様であった。シーリング条件下の共培養 24 h 目の培養液中のグルコース消費量は、非シーリング条件と比べて 10~15% 高い値を示した。好気的環境と嫌気的環境を同一空間に簡便に作成できる本培養法により、共培養中の *B. bifidum* と MDCK の培養特性の定量的把握が可能となった。本培養法は汎用性が高く、様々な好気性の培養細胞や微生物と嫌気性菌の共培養への適用が可能である。

Development of a facile method for aerobic-anaerobic co-culture

○Yoshihiro Umehara¹, Hideki Aoyagi^{1,2}
(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words aerobic culture, anaerobes, coculture, epithelium

4F04-07 模擬微小重力が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響の解析と利用（第 3 報）

○高津 あゆみ¹, 青柳 秀紀^{1,2}
(¹筑波大院・生物資源科学学位P,²筑波大院・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】 近年、従来の培養法で培養化できる微生物は、自然界に存在する全微生物の 1% 程度であることが示唆され、新たな培養法が求められている。我々は新たな培養法として、模擬微小重力 (LSMMG) 培養に着目し、LSMMG 環境が腸内有用細菌の諸特性に及ぼす影響を解析した結果、LSMMG 環境により複数の腸内有用細菌の胃酸耐性が向上する現象を独自に見出した⁽¹⁾。さらに、この現象を胃酸や胆汁酸に対して優れた耐性を有するエリートプロバイオティクス (*Bifidobacterium breve* JCM1192) の取得に活用できる可能性を示してきた⁽²⁾。本研究では、LSMMG 環境を活用して取得したエリートプロバイオティクス (*B. breve*) の通常重力 (NG) 環境での利用性を明らかにするために、凍結保存性と NG 条件下における胃酸と胆汁酸に対する耐性評価を行った。また、LSMMG 環境を活用する本法の他の腸内有用細菌への適用について検討を行った。

【方法と結果】 LSMMG 培養や LSMMG 条件下でのインキュベーションは、High Aspect-ratio Rotating wall bioreactor Vessel (Synthecon 社) を用いて実施した。LSMMG 環境を活用して取得し、-80°C で凍結保存した *B. breve* を NG 条件下で *Bifidobacterium* 培地を用いて培養後、NG 条件下で連続的な胃酸・胆汁酸耐性試験を行った。種々検討した結果、胃酸や胆汁酸に対して高い耐性が認められた（凍結保存が可能で、NG 環境でも利用可能）。また、本法の他の腸内有用細菌への適用について検討した結果、今回、実験に使用した菌株の中では、本法により *Lactobacillus casei* JCM1134 と *L. gasseri* JCM1130 の胆汁酸耐性の向上が認められた。現在、LSMMG 環境を活用した多様なエリートプロバイオティクスの取得について検討中である。

(1) R1 日本生物工学会要旨集 p. 258.
(2) R3 日本生物工学会要旨集 p. 197.

Effect of low shear and modeled-microgravity condition on the physiological activities of enteric useful bacteria and its application (part 3)

○Ayumi Kozu¹, Hideki Aoyagi^{1,2}
(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words acid tolerance, bile tolerance, low shear and modeled-microgravity, probiotics

4F04-08 ヒト消化管ストレスに耐性を有するプロバイオティクスの新規な評価・選抜・取得法の開発

○小澤 拓真¹, 青柳 秀紀^{1,2}

(¹筑波大院・生物資源科学学位P, ²筑波大・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】健康長寿社会の実現が謳われ、プロバイオティクス (PB) の活用が注目されている。PB が健康効果を示すためには、ヒト消化管を通過する際に胃酸や胆汁酸から受ける連続的ストレスへの耐性が重要である。しかしながら、ストレスの耐性評価は、個々の研究者により異なる条件でなされていると共に、PB を摂取する際の体内環境 (空腹時) を模倣した評価は乏しく、PB の探索にも時間と労力を用いている。本研究では、我々が開発した SCF 法を改良、活用し、従来法の問題点を解消した PB の新規な評価・選抜・取得法の開発と利用を試みた。

【方法と結果】

SCF 法は Specialized Cellulose Film と液体培地を含んだ不織布製の足場で構成されており、両者は分離可能である。そのため、フィルムの移動により細菌叢を保持した状態で培養環境の変更が可能である。しかしながら、培養化されたコロニーが白色の場合、視認が困難であるという欠点があった。そこで、コロニーの視認性を向上させるために、足場の検討を行った。モデル微生物 (大腸菌、酵母、乳酸菌) を用いて種々検討した結果、培養中のコロニーの視認性を向上できる足場を選定し、フィルムから目的とするコロニーを容易に単離培養することが可能となった。さらに空腹時の体内環境に近づけるため、低濃度の胆汁酸やリン脂質を加えた人工胃液 (pH 1.6) と人工腸液 (pH 6.5) を作製し、改良した SCF 法を用いて複数のプロバイオティクスの胃酸・胆汁酸耐性試験を実施した。その結果、細菌種により生存率に違いが生じ、空腹時環境に近づけたストレスを反映した評価と選抜が実現できた。さらに、本法を用いて発酵食品試料からプロバイオティクスの選択的取得を試みた結果、新規なプロバイオティクスの候補株を単離培養することができ、本法の有用性が示唆された。

Development of evaluation, selection, and acquisition methods for probiotics resistant to human gastrointestinal stress

○Takuma Kozawa¹, Hideki Aoyagi^{1,2}

(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words gastrointestinal stress, probiotics, screening, specialized cellulose film

4F04-09 食品添加物が腸内細菌やモデル複合系に及ぼす影響の解析 (第2報)

○芦沢 紇希¹, 青柳 秀紀^{1,2}

(¹筑波大院・生物資源科学学位P, ²筑波大・生命環境系)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】近年、腸内細菌叢と宿主の健康との関連に注目が高まっている。一方、あらゆる食品に含まれている食品添加物は抗菌性や乳化性など多様な機能を有するが、腸内細菌叢に与える影響は未解明な点が多い。我々は、種々の腸内細菌に食品添加物が及ぼす影響を解析し、単一系 (純粋培養) と複合系 (共培養) では生育への影響に違いがあることを見出した⁽¹⁾。本研究では、新規な評価法として、腸内を模した培養環境を簡易的に実現するモデル複合系を独自に考案し、種々の食品添加物が腸内細菌の増殖や細菌表面の特性などに与える影響について多面的に比較解析した。

【方法・結果】善玉菌、日和見菌、悪玉菌のモデルとしてそれぞれ *Lactobacillus gasseri*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* を用い、これらを任意の割合で混合した細菌カクテルを作成した。その後、種々の食品添加物を適宜、添加した培地に細菌カクテルを植菌し、増殖経過 (濁度法) と、各細菌の増殖能 (定量 PCR 法)・細胞表面の特性 (自己凝集アッセイ) の変化を評価した。その結果、食品添加物の種類や作用する細菌種の違いにより、腸内細菌の増殖能に及ぼす影響は大きく異なることが明らかとなった。特にソルビン酸 (保存料) などの抗菌性が強い食品添加物は腸内細菌の組成を変化させる可能性があることが示唆された。また、一部の食品添加物は腸内細菌の凝集能を変化させることも示唆され、食品添加物が腸内細菌叢に与える影響の評価において、増殖能と細菌の特性など多面的な解析が必要であることが示された。現在、2種類以上の食品添加物が複合的に作用した系について検討中である。

(1) R3 日本生物工学会要旨 p. 195

Effect of food additives on the model microbiota system of intestinal bacteria (part 2)

○Tsumugi Ashizawa¹, Hideki Aoyagi^{1,2}

(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words intestinal bacteria, food additives, mixed culture, monoculture

4F04-10 マンナンが乳酸菌の食物繊維への接着に及ぼす影響

○鄭 清¹, 赤川 夏月¹, 清水 咲弥², 山崎 恩乃^{1,2}, 片倉 啓雄^{1,2}

(¹関西大院・理工,²関西大・化生工)
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】宿主が乳酸菌による有益な作用を享受するためには、乳酸菌が腸管上皮を覆うムチン層に定着することが重要である。しかし、乳酸菌は腸管に存在するマンナンなどの食物繊維にも接着できる。乳酸菌は多くの場合、酵母エキスを含む複合培地で培養するが、これには酵母由来の可溶性マンナンが含まれ、乳酸菌の接着が阻害される可能性がある。本研究では、合成培地と複合培地で培養した菌体の食物繊維への接着率とマンナンが接着に与える影響を調べた。

【方法】乳酸菌は、MRS 培地で前培養し、合成培地または MRS 培地で 24 時間本培養した。0.15 M NaCl を含むリン酸クエン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した菌体とセルロースまたはキチン懸濁液を 37°C で 10 分間混合した。500×g で 10 秒遠心分離して食物繊維を沈殿させ、上清の OD₆₀₀ を測定することで、食物繊維に接着した菌体の割合を接着率として算出した。

【結果・考察】合成培地で良好に生育する乳酸菌 14 菌株を MRS 培地あるいは合成培地で培養し、セルロースおよびキチンへの接着率を調べた。一部の菌株では、合成培地で培養すると、MRS 培地で培養した菌体より食物繊維への接着率が高くなったことから、MRS 培地に含まれる成分が菌体の食物繊維への接着を阻害することが示唆された。一方、乳酸菌は酵母エキスに含まれるマンナンに親和性を持つ。合成培地を用いると食物繊維への接着率が顕著に増加する *Lactiplantibacillus plantarum* NCIMB 8826 について、合成培地で培養する際に酵母由来マンナンを添加し、食物繊維への接着率を調べた。その結果、キチンへの接着は阻害されなかったが、セルロースへの接着は培養時のマンナン濃度依存的に阻害された。以上より、酵母エキスを含む培地で培養した菌株は、菌体表面に付着したマンナンによりセルロースへの接着が阻害される可能性が示された。

Effects of mannan on the adhesion of lactic acid bacteria to dietary fiber

○Qing Zheng¹, Natsuki Akagawa¹, Saya Shimizu², Shino Yamasaki-Yashiki^{1,2},

Yoshio Katakura^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., ²Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words lactic acid bacteria, adhesion, mannan, dietary fiber

4F04-11 焼成多孔性シリカゲルによる 可食性タンパク質加水分解物からの 生理活性ペプチドの探索と分離

清水 翔太, 松永 裕太, 羽川 瞳, 秋山 裕和, 清水 一憲, ○本多 裕之 (名大院・工)

honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

食品や化粧品分野で、身体機能向上や恒常性維持に影響を与える生理活性ペプチド (BPs) が注目されている。しかし従来の製造法は、酵素とタンパク質の選定、酵素加水分解物の精密分離、活性画分を同定後、活性のあるペプチドを精製特定し、製造においては改めて加水分解、分離精製などの工程を、経済性を考慮して最適化する。多数の工程があり、製造されるペプチドも微量であるため容易ではない。我々は、ペプチドの物理化学的性質と生理活性との間の関係に着目している。食品タンパク質加水分解物の中から特定の物理化学的性質をもつ BP s を容易に分離可能な焼成多孔性シリカゲルを開発した。この担体を活用して、塩基性疎水性を示す苦味ペプチドの選択的除去や、塩基性疎水性を示す抗菌ペプチドの選択的分離に成功してきた。本発表では、我々の方法を概説したうえで、このシリカゲルを用いたカゼイン加水分解物からのコレステロール吸収抑制ペプチドの探索と濃縮を検討したので報告する。

既知のコレステロール吸収抑制ペプチドは pH 7.4 で焼成多孔性シリカゲルに選択的に吸着することがわかった。実際にミルク由来カゼインを、ペプシンを用いて pH2 の条件で加水分解し、ミセル崩壊活性を評価したところ、未処理のカゼイン加水分解物は活性を示さず、処理後に回収した加水分解物は有意な活性を示した。ペプチド混合物を LC-MS/MS で解析し 388 種類のシリカゲル濃縮ペプチドを同定した。シリカゲルでの濃縮率が高く、20 残基以下のペプチド 12 種類を選択し合成して評価した結果、11 種類でミセル崩壊活性が確認できた。いずれも未知で、その中には DC50 が 1mg/ml 以下の高活性の新規ペプチド 3 種類も含まれていた。開発した焼成多孔性シリカゲルは、生理活性ペプチド濃縮物の製造と新規ペプチド同定を同時に達成できる材料として有用であることがわかった。

Screening and separation of bioactive peptides from edible protein hydrolysate by heat treated porous silica gel

Shota Shimizu, Yuta Matsunaga, Hitomi Hagawa, Hirokazu Akiyama,

Kazunori Shimiau, ○Hiroyuki Honda

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

Key words peptide, hydrolysates, screening

4F04-12 Low Endotoxin Recovery を解消したエンドトキシン測定法の開発と利用

川崎 芳美¹, ○今村 百花², 青柳 秀紀^{1,2,3}

(¹筑波大院・生物資源科学学位P, ²筑波大・生物資源, ³筑波大・生命環境系)

aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】

近年、医薬品の品質管理や医療の現場で、エンドトキシン (Endotoxin : ET) が実際よりも低い値で測定される、Low Endotoxin Recovery (LER) 現象が問題になっており、LER 現象を解消できる ET 測定法の開発が求められている。この現状を踏まえ、本研究では、我々が独自に開発した ET の高感度・迅速測定法 (LAL 固定化ビーズ法) を用い、LER 現象を解消できる ET 測定法を開発すると共に、ET 不活性化の評価や ET 不活化剤の探索への利用を試みた。

【方法と結果】

実験には *Escherichia coli* UKT-B 由来の ET 標準品 (CSE) と *E. coli* Seattle 1946 由来の ET (増殖に伴い菌体外に遊離する Extracellular ET と菌体内に安定に保持されている Intracellular ET) を使用した。LER が生じるモデル溶液 (ポリソルベート 20 とクエン酸ナトリウムの混合液) を用い、LER 現象を解消するための測定試料の処理方法を種々検討した。その結果、ET の構成要素である二価カチオンの適切な添加条件を設定することで、今回、検討したいずれの ET でも LER を解消し、ET 濃度を良好に測定することが可能となった。従来法を用いてポリミキシン B とウシ由来の胆汁酸が ET 活性に及ぼす影響を評価したところ、いずれも ET 活性の大幅な低下が認められた。しかしながら、開発した本法を用いた結果、ET 活性が低下した要因として、ポリミキシン B は ET の不活性化であるのに対して、胆汁酸は LER 現象による見かけ上の不活性化であることが示唆された (ET の不活性化を適切に評価できた)。現在、得られた知見を活用した ET 不活化剤の探索法の開発について検討中である。

Development of an endotoxin assay method for the elimination of low endotoxin recovery and its utilization

Yoshimi Kawasaki¹, ○Momoka Imamura², Hideki Aoyagi^{1,2,3}

(¹Grad. Sch. Deg. P. Agro-Bioresour. Sci. Technol., Univ. Tsukuba, ²Coll. Agro-Bio. Resour. Sci., Univ. Tsukuba, ³Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Escherichia coli*, Extracellular endotoxin, Intracellular endotoxin, Low Endotoxin Recovery

4G01-01 がん免疫療法への応用を目指した新規 PD-1/PD-L1 間相互作用阻害ペプチドの SELEX 法による開発

○安東 丈洋¹, Vedi Santhana¹, 佐藤 将¹, 高守 幸男¹, 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}

(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)

tkawakami@yamanashi.ac.jp

がん免疫療法は、自己免疫応答を防ぐための免疫系の調節機構である免疫チェックポイントを阻害し、T 細胞などの免疫細胞の抗がん反応を回復させる治療法である。T 細胞が T cell receptor (TCR) を介してがん抗原を認識すると、CD4⁺T 細胞は T helper 1 (Th1) 細胞へ、CD8⁺T 細胞は cytotoxic T lymphocyte (CTL) 細胞へ分化し活性化される。Th1 細胞は TCR 下流の NFAT 経路を介して IL-2 や IFN γ などのサイトカインを産生し、CTL の活性化を増強する。活性化 CTL は Perforin や Granzyme B などのプロテアーゼを産生し、がん細胞のアポトーシスを誘導することでがん細胞を攻撃する。一方、一部のがん細胞は IFN γ を受容すると、JAK/STAT 経路の活性化を介して免疫チェックポイントタンパク質の PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1) を過剰発現する。PD-L1 は活性化 T 細胞上の PD-1 (Programmed cell Death 1) と相互作用し、T 細胞の活性化シグナルを阻害する。これにより T 細胞のサイトカイン産生の抑制、アポトーシスが誘導され、がん細胞は T 細胞からの攻撃から逃れていると考えられている。従って、PD-1/PD-L1 間相互作用を阻害すると T 細胞は再び活性化し、がん細胞を攻撃できるようになるため、PD-1/PD-L1 間相互作用阻害が、がん免疫療法において非常に重要であると言える。

本発表では、化学合成可能な抗体より安価で、高い組織浸透性を有する治療薬の開発を目指し、PURE システムと遺伝暗号拡張技術、mRNA ディスプレイを組み合わせた SELEX 法により新規の PD-1/PD-L1 間相互作用ペプチドを同定したので報告する。

Development of novel peptide inhibitors of PD-1/PD-L1 interaction by SELEX for cancer immunotherapy

○Takehiro Ando¹, Santhana Vedi¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹,

Takumi Yokoyama¹, Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}

(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-02 ヒト iPS 細胞の未分化増殖を可能にする新規人工ペプチド化合物の開発

○佐藤 将¹, 大貫 喜嗣¹, 升井 伸治¹, 川上 隆史^{1,2}, 黒澤 尋¹

(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)

tkawakami@yamanashi.ac.jp

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は iPS 細胞の未分化性維持と増殖促進に非常に重要なタンパク質因子である。bFGF は細胞膜上糖鎖のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) に結合し二量体化され、bFGF 二量体が、細胞膜上に発現している複数種類の線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) に結合することで、FGFR をホモ・ヘテロ二量体化し、FGFR の自己リン酸化・下流のシグナル伝達が促進される。しかし、bFGF は熱安定性が非常に低く、37°C では短時間で失活してしまうため、毎日新鮮な bFGF 添加培地に交換する必要があり、手間とコストがかかる。また、bFGF の調製には異種生物のタンパク質発現システムを利用するため、医療へ応用するときにその生物に由来する感染症のリスクが懸念され、安全性に問題がある。従って、これらの問題を解決するためには、bFGF の機能を模倣し、熱安定性の高い、異種生物を用いず化学合成で調製できる新規化合物を開発する必要がある。

そこで本研究では、遺伝暗号拡張技術と PURE システム、mRNA ディスプレイを組み合わせた SELEX スクリーニング法を用いて、FGFR に結合する新規人工ペプチド化合物を同定した。そして、同定したペプチドのホモ二量体とヘテロ二量体を調製し、CRISPR/Cas9 により構築したレポーターヒト iPS 細胞を用いて CID 法に基づくアゴニスト活性評価を行い、ペプチド二量体の最適リンカー長を決定した。更に、RT-qPCR、FCM、ELISA 解析などを用いて未分化増殖評価および熱安定性評価を行ったので、その詳細について発表する。

Development of novel peptide compounds for growth of undifferentiated human iPS cells

○Masashi Sato¹, Yoshitugu Ohonuki¹, Shinji Masui¹, Takashi Kawakami^{1,2},

Hiroshi Kurosawa¹

(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-03 新規小分子結合ペプチドタグの開発と生細胞内タンパク質イメージングおよびノックダウンへの応用

○山本 美月¹, 安東 丈洋¹, 高守 幸男¹, Vedi Santhana¹, 佐藤 将¹, 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 川上 隆史^{1,2}

(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)

tkawakami@yamanashi.ac.jp

生細胞内の特定のタンパク質の蛍光イメージングまたはノックダウンはタンパク質の動態や機能解析において有用である。蛍光イメージングでは非侵襲的にリアルタイムで行うために蛍光タンパク質タグが広く利用されている。しかし蛍光タンパク質タグは、不十分な蛍光特性や巨大なタグサイズ (分子量 20-30kDa) による標的タンパク質の機能阻害の問題が存在する。またプロテインノックダウンの方法の一つとしてユビキチン・プロテアソーム系等を利用する PROTAC (proteolysis targeting chimera) がある。PROTAC は標的タンパク質にそのリガンドと E3 リガーゼリガンドのヘテロ二機能性分子 (PROTAC 化合物) を結合させることで標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導する。しかし PROTAC は標的タンパク質のリガンドが判明しているものに限定される問題点がある。そこで HaloTag などのタンパク質タグとタグ結合小分子を介して光学特性の高い低分子蛍光プローブや PROTAC 化合物を標的タンパク質にラベリングする方法が開発された。これにより蛍光イメージングは前者の問題が解決され、PROTAC は様々なタンパク質に適用可能となった。しかし依然としてサイズが大きいため、タンパク質の立体障害の問題は存在したままである。そのため代替手段として小分子と結合する低分子量のペプチドタグの開発が求められている。

本発表では、低分子量の小分子結合ペプチドタグの開発のために、再構成型無細胞翻訳システム (PURE システム) と cDNA ディスプレイ法を組み合わせた SELEX 法を使用して、小分子結合ペプチドタグを同定し、生細胞内タンパク質の蛍光イメージングとプロテインノックダウンへの応用を行なったので、その結果について報告する。

Development of novel small-molecule-binding peptide tag and its application to intracellular protein imaging and knockdown

○Mizuki Yamamoto¹, Takehiro Ando¹, Yukio Takamori¹, Santhana Vedi¹,

Masashi Sato¹, Takumi Yokoyama¹, Daisuke Fuji¹, Takashi Kawakami^{1,2}

(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-04 血管新生阻害への応用を目指した新規 VEGF/VEGFR2 間相互作用阻害ペプチドの SELEX 法による開発

○横山 匠¹, 安東 丈洋¹, VEDI Santhana¹, 佐藤 将¹, 高守 幸男¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)
tkawakami@yamanashi.ac.jp

血管新生とは既存の血管網から新しい血管を形成することであり、成長および発達、または損傷にตอบสนองして組織の血液供給を回復し創傷治癒を促進する自然な現象である。正常な組織では、血管新生は刺激信号と抑制信号の正確なバランスによって厳密に制御されているが、このバランスが崩れると異常な血管新生が起こり、多くの疾患の原因となる。

固形腫瘍や滲出型加齢黄斑変性で活性化される低酸素誘導因子により、二量体タンパク質である血管内皮増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)の発現が誘導される。VEGF が血管内皮増殖因子受容体(Vascular endothelial growth factor receptor 2: VEGFR2)に結合すると、VEGFR2 同士で二量体を形成し、自己リン酸化により血管内皮細胞が増殖する。これにより血管新生が起き、血管が固形腫瘍や網膜まで伸長することで血液が誘導され、固形腫瘍の増殖・転移や網膜の障害につながる。したがって、VEGF/VEGFR2 間相互作用を阻害する医薬品化合物の開発は、がん分子標的治療や滲出型加齢黄斑変性治療において重要である。しかし、現在使用されている抗体医薬品は動物細胞で生産するため高価であるなどの欠点がある。

本研究では、化学合成可能なため抗体より安価で、高い組織浸透性を有する治療薬の開発を目指し、*in vitro* 翻訳系 (PURE システム) と mRNA ディスプレイ法 (*in vitro* virus 法)、遺伝暗号拡張技術を組み合わせた分子進化学的スクリーニング (SELEX) 法を用いて VEGF/VEGFR2 間相互作用を阻害する非天然型環状ペプチド化合物の探索を行ない、新規の非天然型環状ペプチド化合物を同定したので報告する。

Development for novel peptide inhibitors of VEGF/VEGFR2 interaction by SELEX for angiogenesis inhibition

○Takumi Yokoyama¹, Takehiro Ando¹, Santhana VEDI¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹, Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-05 がん治療への応用を目指した新規ペプチド阻害剤の SELEX 法による開発

○高守 幸男¹, 佐藤 将¹, 安東 丈洋¹, VEDI Santhana¹, 横山 匠¹, 富士 大輔¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)
tkawakami@yamanashi.ac.jp

がんとは無秩序な無限増殖能を獲得した細胞が、組織に浸潤し転移する悪性腫瘍であり、成長したがんによる臓器傷害によって生命維持機能の損失を招き死に至る。がんは正常な細胞の遺伝子異常が発生原因であると考えられ、そのような発がんの直接原因となる遺伝子変異をドライバー遺伝子変異と呼ぶ。線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptors: FGFR) は FGFR1 から 4 までのファミリーで構成される膜貫通型受容体型チロシンキナーゼであり、線維芽細胞成長因子 (Fibroblast growth factor: FGF) と相互作用する受容体である。FGFR は乳がんや卵巣がん等において異常な発現が認められ、FGFR 遺伝子はがん発生に関与するドライバー遺伝子の一つであると考えられている。FGFR は FGF との相互作用により近接し FGFR 二量体化が起こると、FGFR キナーゼが活性化され、細胞内ドメインが自己リン酸化される。FGFR キナーゼは下流の ERK や AKT 等のシグナル経路を活性化し、増殖に関連する遺伝子の発現上昇に関与する。従って、FGFR/FGF 間相互作用阻害はがん分子標的治療における重要な戦略であり、現在までに相互作用又は下流のシグナル経路を標的とする低分子化合物及び抗体医薬品が開発されている。しかし、現在使用されている低分子化合物は、低特異性による無秩序なシグナル伝達阻害による副作用が欠点であり、抗体医薬品では生産コストの高額化などの欠点がある。本発表では、化学合成可能なため安価かつ、高い特異性を有する治療薬の開発を目指し、PURE システムと遺伝暗号拡張技術、mRNA ディスプレイを組み合わせた SELEX 法により新規の FGFR/FGF 間相互作用阻害ペプチドを同定したので報告する。

Development for novel peptide inhibitors by SELEX for cancer treatment

○Yukio Takamori¹, Masashi Sato¹, Takehiro Ando¹, Santhana VEDI¹, Takumi Yokoyama¹, Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-06 自己免疫疾患治療への応用を目指した新規ペプチド阻害剤の SELEX 法による開発

○富士 大輔¹, 安東 丈洋¹, VEDI Santhana¹, 佐藤 将¹, 高守 幸男¹, 横山 匠¹, 山本 美月¹, 川上 隆史^{1,2}
(¹山梨大院・医工農, ²JST・さきがけ)
tkawakami@yamanashi.ac.jp

自己免疫疾患とは自己反応性免疫細胞が正常な細胞や組織を標的として攻撃し、自己に対する免疫応答が抑制されている状態である免疫寛容の破綻を生じる疾患の総称である。自己免疫疾患に関わるサイトカインである B 細胞活性化因子 (B-cell activating factor: BAFF) は骨髄系細胞やリンパ系細胞などから分泌され、B 細胞の広範な分化段階で発現している B 細胞活性化因子受容体 (B-cell activating factor receptor: BAFF-R) に結合する。この BAFF/BAFF-R シグナルは B 細胞の生存や分化を誘導する。本来、自己抗原を認識した自己反応性 B 細胞はアポトーシスやアナジー (不応答性) が誘導され免疫寛容は保たれる。しかし、過剰な BAFF が存在する場合、BAFF/BAFF-R シグナルにより自己反応性 B 細胞が生存し、関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患を引き起こす。従って、BAFF/BAFF-R 間相互作用阻害は自己免疫疾患治療において非常に重要である。実際に、BAFF を標的としたモノクローナル抗体であるベリムマブが抗体医薬品として SLE の治療に使用されている。しかし、抗体医薬品は動物細胞で生産するため高価であり、高分子量であるため注射投与が必要などの欠点がある。

本発表では、化学合成可能なため抗体よりも安価で、経口投与性も有する治療薬の開発を目指し、PURE システムと遺伝暗号拡張技術、mRNA ディスプレイを組み合わせた SELEX 法により新規の BAFF/BAFF-R 間相互作用ペプチドを同定したので報告する。

Development of novel peptide inhibitors by SELEX for autoimmune disease treatment

○Daisuke Fuji¹, Takehiro Ando¹, Santhana VEDI¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹, Takumi Yokoyama¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-07 Development of functional unnatural cyclic peptides by PURE system, genetic code expansion and mRNA display

○Santhana VEDI¹, Takehiro Ando¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹, Takumi Yokoyama¹, Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)
tkawakami@yamanashi.ac.jp

Here we report discovery of novel unnatural cyclic peptides from mRNA-displayed libraries prepared by using PURE system under expanded genetic code and their functional analysis.

Development of functional unnatural cyclic peptides by PURE system, genetic code expansion and mRNA display

○Santhana VEDI¹, Takehiro Ando¹, Masashi Sato¹, Yukio Takamori¹, Takumi Yokoyama¹, Daisuke Fuji¹, Mizuki Yamamoto¹, Takashi Kawakami^{1,2}
(¹Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agric. Sci, Univ. Yamanashi, ²PRESTO, JST)

Key words peptide

4G01-08 アフィニティーペプチドカラムを用いたエクソソームの大量精製技術の開発

○眞崎 加奈子, 石田 丈典, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 池田 文, 黒田 章夫
(広島大院・統合生命科学)
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

【背景】

エクソソームとは細胞が放出する直径 100 nm 前後の細胞外小胞で、体液中や細胞培養上清中に存在している。表面はリン脂質二重層に覆われており、内部には細胞由来のタンパク質や miRNA が含まれている。間葉系幹細胞から放出されるエクソソームは、損傷した組織に対する再生効果を示すので注目されている。既にエクソソームを用いた臨床研究が行われており、エクソソームを薬として利用する未来が想定されている。課題は、エクソソームの医療応用に適した大量精製法が確立していないことである。現在、超遠心機を用いた分離法(超遠心法)が最も一般的に利用されているが、数千リットルの培養上清からエクソソームを精製するには向いていない。そのため、エクソソームの医用利用には、大量の培養上清からエクソソームを精製できる技術の開発が必須である。そこで我々は、医療応用を志向したエクソソームの大量精製技術の開発を目指した。

【方法及び結果】

当研究室では、複数のリジンを含むペプチド(リジンペプチド)がエクソソームのリン脂質に結合し、さらにこの結合が NaCl 溶液で解離できることを明らかにした。そこで本研究では、リジンペプチドを固定化したカラムと液体クロマトグラフィーシステムと組み合わせることで、エクソソームの大量精製技術の開発を試みた。培養上清をカラムに供した後、不純物を洗い流し、NaCl の濃度勾配によってエクソソームを溶出させた。NaCl 濃度 0.4 M 付近の溶出画分に 1 つのエクソソームピークが存在した。エクソソームの回収率は約 60% であった。このエクソソーム画分には、エクソソームマーカーである CD9、CD63 及び TSG101 が確認された。

Development of a scalable purification method for exosome using an affinity-peptide column

○Kanakko Masaki, Takenori Ishida, Hisakage Funabashi, Ryuichi Hirota, Takeshi Ikeda, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ.)

Key words affinity selection, exosome, extracellular vesicle, purification

4G01-09 ペプチドによる金粒子のバイオナノミネラリゼーションと触媒活性評価

○桐木 友花, 田中 祐圭, 大河内 美奈
(東工大・物質理工)
okochi.m.aa@m.titech.ac.jp

【目的】

金ナノ粒子(AuNPs)は、形態や表面分子などの違いにより様々な特性を示し、触媒などへの応用が注目されている。また生物は、骨や歯に代表されるように、形態制御された無機鉱物を温和な条件下で生成する。このバイオミネラリゼーションプロセスを理解し模倣することで、機能性 AuNPs を環境負荷のかららないグリーンな条件下で合成制御可能となると期待されている。当研究グループは、アミノ酸配列に応じて様々なサイズや形状の AuNPs を合成できるペプチドライブラリーを取得してきた。本研究では、その中の 3 種類のペプチド(G1, G2, G3)を用いて合成される、特にサイズが小さく高い比表面積をもつ AuNPs に着目し、メチルオレンジ(MO)分解反応、ペルオキシダーゼ様の酵素反応の 2 つの反応における触媒活性を評価した。

【方法】

G1, G2, G3 を用いて粒径 2 nm 程度の AuNPs 溶液を合成した。MO 分解反応では、NaBH₄ 溶液に MO 溶液、AuNPs 溶液を順次添加し、反応開始から 10 分間の MO に由来する 465 nm における吸光度の変化を測定した。ペルオキシダーゼ様の酵素反応では、AuNPs 溶液(酢酸バッファー:pH3.6, 0.2 M)に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)溶液、H₂O₂ 溶液を順次添加し、TMB 酸化物に由来する 652 nm における吸光度の変化を測定した。

【結果】

2 つの反応において、AuNPs を触媒として添加すると、添加しない場合に比べ反応が著しく速く進み、AuNPs が触媒作用を有することが観察された。MO 分解反応において、触媒定数 K_1 を算出すると、既報の化学合成による AuNPs と同等の値を示した($G1: K_1 = 2.11 \times 10^3 / s \cdot mg$)。ペルオキシダーゼ様の酵素反応において、反応温度の制御を行うと、57°C で最も高い活性を示し、他の生体分子で合成された AuNPs と比較し高温領域での安定性が示された。以上より、ペプチドを用いて合成制御された AuNPs の触媒としての可能性が示された。

Bionanomineralization and evaluation of catalytic activity of gold particles using peptides

○Kiriki Yuka, Tanaka Masayoshi, Okochi Mina
(Sch. Mater. Chem. Technol., Tokyo Tech)

Key words biomineralization, nanoparticle

4G03-01 MSKIK ペプチドタグによる翻訳停止の解除・阻止

○加藤 晃代, 西河 佑馬, 古川 裕貴, 中野 秀雄
(名大院・生命農学)
teruyo@agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】我々は、大腸菌における難発現タンパク質の N 末端に Ser-Lys-Ile-Lys の 4 つのアミノ酸からなる SKIK ペプチドタグを付加すると、タンパク質生産量を顕著に増大可能であり、本タグ付加により転写ではなく翻訳反応が促進されることや(Ojima-Kato, JBB, 2017)、コドン依存性がないことを明らかにしてきた。本研究では、本タグの翻訳促進メカニズム解明を目指し、翻訳を停止させる新生ペプチドとして知られる SecM やクロラムフェニコール(Cm)による翻訳停止を解除あるいは阻止しうるか否か検証した。

【方法】SecM のアレスト配列(FSTPVVWISQAQGRAGP)と SKIK タグを様々な位置関係で配置した 8 種類の発現プラスミドを構築し、大腸菌再構成無細胞タンパク質合成系(PURE system)にて発現させ、ウェスタンブロットング等により翻訳産物量を評価した。Cm により翻訳停止を起こす CmlA leader 配列についても、SKIK タグの有無における影響を比較した。

【結果および考察】SKIK タグをアレスト配列の直前に配置すると、ウェスタンブロットングの検出限界以下から明瞭バンドとして検出される程度に合成量が増大した。また、M を含む「MSKIK」が ORF の途中にある場合でも直後のアレスト効果を打ち消し、遺伝子全長の翻訳産物量を増加させた。CmlA leader 配列を用いた実験では、Cm 濃度に依存し翻訳産物量が減少したが、SKIK タグを付加したものはタグ無しよりも 2~5 倍タンパク質生産量が増大した。以上より、MSKIK という配列は SecM の翻訳停止や Cm・CmlA leader による翻訳停止を解除または阻止しうる可能性が示唆された。

MSKIK peptide tag can release/inhibit ribosomal arrest

○Teruyo Ojima-Kato, Yuma Nishikawa, Yuki Furukawa, Hideo Nakano
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words translation, peptide

4G03-02 大腸菌の外膜タンパク質 OmpW を利用した表層ディスプレイ法の開発

○西田 行希, 尾島 由紘, 東 雅之
(大阪公大院・工)
ojima@omu.ac.jp

表層ディスプレイは、機能を持ったタンパク質やペプチドを細胞表層に露出させて細胞に機能を与える技術である。表層ディスプレイ系としてはファージディスプレイ法が汎用的であるが、大腸菌や酵母といった微生物における表層ディスプレイも行われている。本研究では、大腸菌に着目した表層ディスプレイ法の検討を行った。具体的には、大腸菌外膜を構成するタンパク質の 1 つである OmpW を利用したディスプレイを行った。OmpW は外膜を貫通した β パレル構造をとり、細胞表面に露出した 4 つのループ構造を形成している。ループ構造は挿入や置換といった修正にある程度寛容であり、比較的小さなタンパク質やペプチドであれば挿入することが可能である。そこで、OmpW のループ構造に機能性ペプチドを挿入し、ディスプレイを試みた。今回はチタン結合性ペプチド(以下 TBP)を選択し、ディスプレイさせた大腸菌のチタン結合能の有無を評価した。まず、OmpW のループ構造に TBP を挿入した OmpW-TBP 発現ベクターを作製し、*Escherichia coli* BW25113 株に導入した。TBP の挿入ループはループ 1 (以下 L1)、ループ 3 (以下 L3) を選択し、また、L1 と L3 の両方に TBP を挿入した発現ベクター(以下 L1L3)も用意した。これら大腸菌の培養液に 10 mm \times 10 mm に加工したチタン板を 1 時間浸漬した。取り出したチタン板上の大腸菌を Live/Dead 染色した後、蛍光顕微鏡で観察することでチタン結合能を評価した。その結果、TBP を導入した大腸菌ではチタン板への付着が確認され、菌数評価により有意な差が得られたため、TBP が機能を保持したまま細胞表層にディスプレイされたと考えた。また、挿入したループ位置の違い(L1、L3、L1L3)によるチタン板上の付着大腸菌数に有意な差は無かった。

Development of *Escherichia coli* surface display using outer membrane protein OmpW

○Koki Nishida, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka Metro. Univ.)

Key words OmpW, peptide, *Escherichia coli*, surface display

4G03-03 黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌に対する選択的抗菌活性に及ぼす脂肪酸の炭素数と二重結合数の影響

○永尾 寿浩¹, 吉井 未貴¹, 田中 重光¹, 菊川 寛史², 鈴木 徹³
 (¹大阪技術研,²静岡県・食栄,³岐阜大院・自然科技)
 nagao@orist.jp

【目的】アトピー性皮膚炎や肌荒れは複数要因で発症するが、その因子の1つが炎症悪化などに関与する *Staphylococcus aureus* の増加である。一方、この菌があまり検出されない健康者では善玉菌とされている *Staphylococcus epidermidis* が多い。皮脂中に多い炭素数 16(C16)のサビエン酸(6-*cis*-hexadecenoic acid, SA)は *S. aureus* の生育を抑制し *S. epidermidis* の生育を抑制しない選択的抗菌活性を保持し、皮膚細菌叢の制御に寄与すると推定される。そこで、炭素数と二重結合数の異なる多数の脂肪酸の2種の菌に対する抗菌活性を調べ、SAによる皮膚細菌叢の制御の推論を検証した。

【方法・結果】C6~18の13種の飽和脂肪酸(二重結合なし)、C12~22の9種のモノエン酸(*cis* 二重結合1個, SAはここに属する)、C16~22の5種のジエン酸(同2個)、C18, 20の2種のトリエン酸(同3個)、いずれも遊離型脂肪酸の、*S. aureus* (4株)と *S. epidermidis* (3株)に対する最小生育阻止濃度を調べた。その結果、複数の脂肪酸に弱い選択的抗菌活性が認められたが、強い選択的抗菌活性を示す脂肪酸はC16モノエン酸だけであった。また、二重結合の位置が異なる4種の *cis*-C16モノエン酸(SAを含む)のいずれも同等の選択的抗菌活性を示したが、*trans*-C16モノエン酸は活性が低下した。最後に、2種の菌を塗布した寒天培地に、任意量のSAを懸濁した液体培地を塗布したところ、*S. aureus* が生育せず *S. epidermidis* だけになるのはSAが1.3 μ g/cm²以上塗布された時であり、健康者の皮脂中のSA含量と同レベルであった。アトピー性皮膚炎の炎症部ではSA含量が約1/10に低下すると報告されており、この量では寒天培地を用いた実験で *S. aureus* があまり抑制されなかった。従って、SAが皮膚細菌叢を制御する主体であると示唆された。

Effect of carbon and double bond numbers of fatty acids on selective antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

○Toshihiro Nagao¹, Miki Yoshii¹, Shigemitsu Tanaka¹, Hiroshi Kikukawa², Tohru Suzuki³
 (¹ORIST, ²Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., ³Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Gifu Univ.)

Key words *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, skin microbiome, antibacterial

4G03-04 リポソームの膜ダイナミクスによる界面活性剤刺激性評価

○中谷 祐将¹, 伊藤 太一¹, 下川 直史¹, 萬代 由莉恵², 安 鋼², 高瀬 修一², 辻野 義雄^{1,3}, 高木 昌宏^{1,3}
 (¹北陸先端大・マテリアル,²コタ,³神戸大院・科技イノベ)
 takagi@jaist.ac.jp

【背景】洗剤やシャンプー等の身近な製品に含まれる界面活性剤の刺激性を評価するために、ウサギに点眼し炎症状態を観察する方法(ドレイズ法)や、その代替法としての角膜細胞(ウサギ・ヒト)生存率評価法があるが、動物愛護や定量性の観点で問題がある。皮膚一次刺激性試験代替法として、再構築ヒト表皮を用いる試験法があるが、軽度の刺激性を評価することができない。我々は、痛み刺激が細胞膜損傷を起点とする点に着目し、細胞膜微膜の変形を観察する新規刺激評価法を開発し、ヒト皮膚試験との比較を行った。

【実験方法】不飽和脂質(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)を用いて細胞サイズのリポソームを作成し、界面活性剤の添加後の膜変形をレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。また、生体模倣膜内層-外層間のリン脂質の移動(Flip-Flop)速度を調べるため、内層のみ蛍光を発する層-サイズリポソームを調整し、Flip-Flopが平衡に達するまでの時間を測定した。同時に、ヒト皮膚試験を行い、リポソーム膜変形と刺激性との相関関係を調べた。

【結果】先行研究では、刺激強度に応じた細胞膜微膜の膜変形が存在し、高刺激性界面活性剤では余剰膜表面の増加、低刺激性界面活性剤では収縮を引き起こすことを明らかにした。そこで低刺激性のヤシ油由来アミノ酸系界面活性剤(コイルグルタミン酸Na)について、主成分であるラウロイルグルタミン酸Na(C12)と比較した結果、ラウロイルグルタミン酸Naの方が高刺激であることがリポソーム試験、ヒト試験の両面から明らかになった。また、両性界面活性を混合させた場合でも、ヒト試験による刺激軽減効果に応じた膜変形を確認することができた。膜変形の要因としてFlip-Flopに着目し、界面活性剤刺激性の膜変形について議論し、ヒト皮膚試験の結果と併せて、新規刺激評価法の実用性について報告する。

Surfactant Irritancy Evaluation by Membrane Dynamics of Liposomes

○Yusuke Nakatani¹, Taichi Ito¹, Naofumi Shimokawa¹, Yuriye Mandai², Gang An², Shuichi Takase², Yoshio Tsujino^{1,3}, Masahiro Takagi^{1,3}
 (¹Sch. Mater. Sci., JAIST, ²COTA Co., Ltd., ³Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words surfactant, lipid vesicle

4G03-05 *Weizmannia coagulans* SANK70258 由来メンブランベシクルの機能解析

○和田 佳湖¹, 久保 宏実², 山田 良一³, 片倉 啓雄^{1,2}, 山崎 思乃^{1,2}
 (関西大院・理工,²関西大・化生工,³三菱ケミカル)
 shino.ya@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】細菌が産生する直径10⁻⁷m前後の膜小胞であるメンブランベシクル(MV)は、宿主に免疫調節作用などの生理作用をもたらす。芽胞形成菌である *Weizmannia (Bacillus) coagulans* はプロバイオティクスとして広く利用されているが、MV産生の有無やその機能については理解されていない。本研究では、*W. coagulans* SANK70258を好気あるいは嫌氣的に培養し、MVの産生とその免疫賦活活性について調べた。

【方法】*W. coagulans* SANK70258の好気培養ではYPD培地で200rpmで振盪し、嫌気培養ではGAM培地で酸素除去剤を用いて静置し、96時間培養した。遠心分離(8500×g, 10min, 4°C)後、フィルターを通過した培養上清を超遠心分離(100,000×g, 2h, 4°C)してMV画分を得た。MVは脂質特異的色素FM4-64による蛍光染色(励起波長515nm, 蛍光波長640nm)で定量し、免疫賦活活性はマクロファージ様J774.A1細胞からのInterleukin-6(IL-6)あるいはマウス小腸パイエル板細胞からの免疫グロブリンA(IgA)産生量で評価した。

【結果と考察】好気培養の到達菌体濃度は、嫌気培養より約5.8倍高くなった。いずれの培養条件で得たMV画分にも球状のMVが観察されたが、菌体当たりのMV産生量は好気培養の方が約18倍高かった。好気および嫌気培養で得たMV画分をゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S-500)で精製し、J774.A1細胞に添加したところ、いずれのMVもIL-6産生を誘導した。また、IL-6は腸管におけるIgA産生を促進することから、好気培養で得たMVをパイエル板細胞に添加して培養したところ、IgA産生を有意に促進した。一方、その作用はグラム陽性菌の細胞壁成分を認識するToll like receptor 2の中和抗体の添加により消失したことから、細胞壁成分がMVに含まれることで免疫賦活活性をもたらすことが示唆された。

Characteristic analysis of membrane vesicle produced by *Weizmannia coagulans* SANK70258

○Kako Wada¹, Hiromi Kubo², Ryouichi Yamada³, Yoshio Katakura^{1,2}, Shino Yamasaki-Yashiki^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., ²Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., ³Mitsubishi Chemical Corp.)

Key words membrane vesicles, *Weizmannia coagulans*, Immunostimulatory effect

4G03-06 次世代油脂製造技術の開発～微細藻類によるEPA高生産検討～

○石塚 匠, 尾崎 達郎, 和田 真由美, 齋藤 猛, 小山 伸吾
 (花王)
 saitou.takeshi2@kao.com

EPA(Eicosapentaenoic acid, C20:5n-3)は有用な生理機能が多数報告されており、人口増加に伴い世界的な需要は高まりつつある。しかし、その供給源は天然の魚油に依存しており、将来的な供給不足や水産環境への負の影響が懸念されている。我々はEPAのサステナブルな新規供給源として微細藻類ナンノクロプシに着目した技術開発を行っており、野生株の3~4倍のEPA生産性を示す改変株の開発に成功した。

ナンノクロプシを油脂供給源として産業利用する上で、油脂抽出効率の低さが課題とされている。ナンノクロプシは厚い細胞壁を有しており、堅固な細胞構造をとるため抽出効率が低いと考えられている。本発表では、ナンノクロプシにおけるEPA生産の効率化を目指し、EPA高生産性と易抽出性を併せ持った「EPA高生産×細胞壁欠損株」を分子育種により開発した内容について報告する。

まず、本開発株の乾燥藻体からヘキササンにて油脂の抽出を試みた。EPA高生産×細胞壁欠損株における抽出効率は約80%であり、対象株であるEPA高生産株の抽出効率(約60%)と比較して抽出効率の向上が確認され、抽出工程における細胞壁欠損の有効性が示された。

藻油の製造プロセスにおいて、藻体の乾燥工程には多量のエネルギーを必要とすることから、コストやCO₂排出量の高さが問題となっている。この点を鑑み、近年米国エネルギー省では、乾燥工程を経ない湿潤藻体からの油脂抽出が推奨されている。そこで、本開発株についても湿潤条件下での油脂抽出検討を行った。その結果、細胞壁欠損株における抽出効率は約60%という高い値を示し、対照株の抽出効率(約20%)と比較して大幅な抽出効率の向上が確認された。本改変株の開発により、EPAの新規サステナブル供給源としてナンノクロプシの応用展開が期待される。

Development of sustainable oil production technology: production Eicosapentaenoic acid-rich oil from microalgae

○Ishizuka Takumi, Ozaki Tatsuro, Wada Mayumi, Saitou Takeshi, Koyama Shingo
 (Kao Corp.)

Key words microalgae, lipid, cell, eicosapentaenoic acid

4G03-07 Encapsulation of *Xenopus* egg extract into giant liposomes by phase-transfer of inverted emulsions

○Sho Takamori¹, Hisatoshi Mimura¹, Toshihisa Osaki¹, Tomo Kondo², Miyuki Shintomi³, Keishi Shintomi⁴, Miho Ohsugi², Shoji Takeuchi^{1,5,6}
 (¹Artificial Cell Membrane Systems Group, KISTEC, ²Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, ³Life Sci. Network, Univ. Tokyo, ⁴Chromosome Dynamics Lab., RIKEN, ⁵Grad. Info. Sci. and Technol., Univ. Tokyo, ⁶IIS, Univ. Tokyo)
 shoji.takeuchi@hybrid.t.u-tokyo.ac.jp

Phase-transfer of inverted emulsions is one of the most popular methods for the production of unilamellar giant liposomes and frequently used for the encapsulation of arbitrary water-soluble substances into the liposomes. The encapsulation of functional constituents and structures into liposomes is a popular approach for the development of liposome-based functional devices in synthetic biology, aiming ultimately for applications in drug-targeting in vivo and the assembly of artificial cells.

Meanwhile, the extract of unfertilised eggs from African clawed frogs (*Xenopus laevis*) is known capable of assembling nucleosomes and chromatins from 'properly' pre-compacted DNA in vitro and even inducing the formation of nucleus around the chromatin. Intuitively, the encapsulation of such extract-DNA mix could result in the observation of chromatin/nucleus assembly in the giant liposomes, which could be recognised as a major milestone for bottom-up synthetic biology aspiring after the (re)construction of well-defined cellular organelles from molecules. However, the temperature-sensitive characteristics of the extract essentially requires the encapsulation at a low temperature and tends to hinder reproducible experiments.

In this study we experimentally investigate the efficiency of encapsulation of *Xenopus* egg extract into giant liposomes by the phase-transfer method, focusing on the formation of lipid monolayer at water/oil interfaces and aiming at the demonstration of nucleus assembly inside giant liposomes.

Encapsulation of *Xenopus* egg extract into giant liposomes by phase-transfer of inverted emulsions

○Sho Takamori¹, Hisatoshi Mimura¹, Toshihisa Osaki¹, Tomo Kondo², Miyuki Shintomi³, Keishi Shintomi⁴, Miho Ohsugi², Shoji Takeuchi^{1,5,6}
 (¹Artificial Cell Membrane Systems Group, KISTEC, ²Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, ³Life Sci. Network, Univ. Tokyo, ⁴Chromosome Dynamics Lab., RIKEN, ⁵Grad. Info. Sci. and Technol., Univ. Tokyo, ⁶IIS, Univ. Tokyo)

Key words *Xenopus* egg extract, Giant lipid vesicles / giant liposomes, Synthetic Biology

4G03-09 アカテガニ由来脱皮関連キチナーゼの解析

○永倉 佑真, 三宅 克英
 (名城大・理工)
 miyake@meijo-u.ac.jp

カニをはじめエビ、昆虫などの節足動物の外骨格はキチンが主要成分である。キチンはN-アセチルグルコサミンがb-1,4結合で直鎖状に数百から数千もつながった難分解性、不溶性の多糖であり、これらの動物ではカルシウムなどと結合し、強度成分として機能している。地球上で合成される量は年間で約1,000億トンともいわれており、セルロースに次ぐ資源量となっているが、毎年大量に廃棄されている。このキチンからは、構成糖であるN-アセチルグルコサミンに変形性膝関節症の改善効果や美肌効果などが確認され、分解オリゴ糖には動植物の自然免疫系を活性化して生体防御反応を惹起するエリクター活性も報告されている。本研究では、分解産物を得るための酵素としてカニ本体のキチナーゼに着目した。日本の海岸林に多く生息するアカテガニのRNA-seqを行い、キチナーゼを単離し、解析した。

アカテガニの臓器及び、体液の活性測定を行ったところ、中腸線、胃、体液で強い活性を示した。また脱皮中のカニの方が強い活性を示した。そこで肝臓と膵臓の機能を持ち、多くの酵素の生産を担っているアカテガニの中腸腺から全RNAを精製し、RNA-seqに供した。この際、通常と脱皮直後のカニの2つのサンプルを用意した。このRNA-seqの解析から、キチナーゼ遺伝子を複数見出した。ほとんどのキチナーゼは脱皮直後のカニで発現が昂進していた。そのうち最も発現量の多い酵素(29294)は、GH18ファミリーに属するエキソ型のキチナーゼであり、全キチナーゼ発現量の大半(通常カニ87%、脱皮カニ98%)を占めていた。29294キチナーゼを大腸菌に生産させて活性を解析したが、強い活性は得られなかった。今後昆虫細胞や酵母での発現を行う予定である。

Chitinases of Land crabs

○Yuma Nagakura, Katsuhide Miyake
 (Fac. Sci. Eng., Meijo Univ.)

Key words chitinase, chitin, land crab

4G03-08 大腸菌におけるアピゲニン-7-O-グルコシド生産向上を目指したグルコース転移酵素発現条件の検討

○小林 美稀¹, 石水 毅², 大橋 貴生¹
 (1)摂南大院・理工, (2)立命館大・生命科学)
 takao.ohashi@lif.setsunan.ac.jp

【背景】植物特化代謝産物の一種であるフラボノイドは、糖鎖が付加することで配糖体化し、多種多様な構造と機能を持つことが知られている。アピゲンはアグリコンにアピゲニン、糖鎖にアピオースβ1,2-グルコース構造を持ち、パセリやセロリ等のハーブ類に多く含まれている。アピゲンは抗不安や精神安定に資する機能を持つことから健康食品や処方薬の有効成分としての応用が期待される。一方で、アピゲンのオリゴ糖部分が機能性に重要であると考えられるが、分子レベルでの作用機構は分かっていない。そこで、アピゲンの機能性調査のために、大腸菌を用いたアピゲニン大量生産系を構築することを最終目的とし、本研究ではアピゲニンにグルコースが結合したアピゲニン-7-O-グルコシド(A7G)の醗酵生産条件の検討を行った。

【方法と結果】グルコース転移酵素遺伝子としてシロイソナズナまたはセロリ由来のものを使用した。大腸菌用グルコース転移酵素発現ベクターを構築し、大腸菌に導入し形質転換体を得た。形質転換体を生体触媒として、アピゲニンを受容体基質としA7Gの醗酵生産を行った。グルコース転移酵素の発現時のプロモーターとしてI7プロモーターまたは*cspA*プロモーター、タンパク質可溶性促進タグとして、N末端にNusタグまたはProS2タグを付加し、これらのA7G生産量に与える影響を調査した。現在、逆相HPLCによりA7G生産量を比較し、プロモーター及び可溶性タグの最適条件を検討中であり、本研究で発表予定である。今後の展開としては、本研究で構築したA7G生産系に、さらにUDP-アピオース合成酵素及びアピオース転移酵素遺伝子を導入することで、アピゲニンの大量生産系の構築を目指す。

Heterologous expression of glucosyltransferase in *Escherichia coli* for apigenin-7-O-glucoside production

○Miki Kobayashi¹, Takeshi Ishimizu², Takao Ohashi¹
 (¹Grad. Sch. Sci. Technol., Setsunan Univ., ²Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Flavonoid, UGT, *Escherichia coli*, Apigenin

4A06-01 Introduction of JBB and its historical records
○Noriho Kamiya^{1,2}¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²CFC, Kyushu Univ.)

⟨Editor-in-chief of JBB⟩

kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

The Society for Biotechnology, Japan (SBJ), originally established as the Osaka Brewing Society in 1923, has evolved with the aim of contributing to the development of science by dissemination of research findings on the theory and practical application of biotechnology to all those who are interested in this field. As a part of its major academic activities, SBJ has focused on publishing academic achievements in related fields. In 1977, the predecessor 'Hakko kogaku kaishi' was divided into the Japanese journal and the English journal, 'Journal of Fermentation Technology'. Further, in connection of the change of name of the society, the Journal of Bioscience and Bioengineering (JBB) was launched in 1999. Since then, JBB has become more widely recognized by researchers as a forum for the presentation of the latest academic research in related fields. As its name suggests, JBB is characterized by its ability to deal with both science (Bioscience) and engineering (Bioengineering) in a balanced manner, covering the interdisciplinary areas related to biotechnology, from the field of brewing, fermentation, and food, which is the root of the society, to the latest cutting-edge bio-related science and technologies.

Its long history and tradition of publishing high quality papers have been supported by dedicated young editorial board members of SBJ, international editors and the editorial office staff, and all the authors from all over the world. As a result, JBB has achieved the highest impact factor in its history in 2022. We would like to express our sincere gratitude to all who have supported our publication activities through submission and review of valuable manuscripts. As SBJ celebrates its 100th anniversary, I'd like to take this opportunity to share its history and record, and to discuss issues in the editorial field and policies for the future.

Introduction of JBB and its historical records○Noriho Kamiya^{1,2}¹Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., ²CFC, Kyushu Univ.)

Key words Hakko kogaku kaishi, Journal of Fermentation Technology, Journal of Bioscience and Bioengineering

4A06-02 JBB, a treasured scientific journal for me
○Eiichiro Fukusaki^{1,2}¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

⟨President of SBJ, the highest number of publications with high citations⟩

fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

When I was a student, the name of SBJ's Journal was 'JFT'. Later, 'JFT' was renamed 'JFB', then 'JBB', and so on up to now. Nowadays, many papers related to my specialty, bioorganic chemistry and analytical chemistry, are published in 'JBB', but 30 years ago, the situation was completely different. I would like to talk about some of the changes, focusing on my own history of submissions to JBB.

JBB, a treasured scientific journal for me○Eiichiro Fukusaki^{1,2}¹Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words metabolomics, metabolome analysis, food function, foodloss

4A06-03 JBB, A bridge for academic development and long-term friendship between BEST and SBJ

○Jo-Shu Chang^{1,2}

(¹Tunghai University, ²National Cheng Kung University)

(President of BEST, Editorial board member (long-term contribution to JBB))

changjs@mail.ncku.edu.tw

I have served as an Editor for JBB for more than 10 years. Thanks to Professor Masahiro Takagi (former Editor in Chief of JBB) who appointed me as the editorial board member when we first met in 2011 at the 1st ACB meeting in Shanghai, China. This JBB appointment creates opportunities for me to serve the Asian researchers by evaluating their great academic works for publication in JBB. In particular, by taking this position, I have been able to promote academic exchanges and collaborations between researchers from Taiwan and Japan. It was indeed a dream come true when my good friend Prof. Takagi and myself both served as the President of SBJ and BEST, respectively, in 2019. With this, the relationship between SBJ and BEST had reached its highest level ever with frequent and close interactions between the two associations. I appreciate the opportunity to serve as the Editor for JBB and to coordinate the academic collaboration between SBJ and BEST. I am also so happy to make so many good friends from Japan, especially, Prof. Akihiko Kondo, Prof. Nori Kamiya, and Prof. Masahiro Takagi. I believe that this friendship is truly the key to inspiring and spurring the close academic and cultural exchanges between SBJ and BEST. It is a sincere hope that researchers from Japan and Taiwan will meet physically soon after the COVID-19 pandemic is fading away. I also congratulate JBB for its big success and its tremendous impact on the global academic society.

JBB, A bridge for academic development and long-term friendship between BEST and SBJ

○Jo-Shu Chang^{1,2}

(¹Tunghai University, ²National Cheng Kung University)

Key words BEST, JBB, carbon neutrality, international collaboration

4A06-04 New trend and development in Bioscience and Bioengineering

○Jingchun Tang

(Nankai University)

(Recipient of the Young Asian Biotechnologist Prize in 2012, the author of the highly cited review in the last decade)

tangjch@nankai.edu.cn

Among the 10 breakthroughs of 2021 by Science journal, 7 of them are related with bioscience and bioengineering. With the emphasis on the carbon neutral strategy, bioscience and bioengineering is more and more applied in different area. It is related to both the development of science and technology. Application of bioscience and bioengineering in environmental science and engineering is developed rapidly. This can be reflected from the rapid increase of IF values of journals related to environmental science and technology. Relevant hot topics in environmental science and engineering include: biochar, microplastics, bioremediation, greenhouse gas emission. Biochar has been increasingly researched in recent 10 years. It can be used as carrier of bacteria, and used to enhance biological process in agriculture and soil remediation process. Microplastic is a hot topic in recent years and will be an interesting area for a period of time. It can be related to bioscience and bioengineering as it can form biofilm and affects many environmental processes. Bioremediation is an old topic which can be renewed under the new concept of carbon neutral. Greenhouse gas emission of nature environmental is mainly regulated by microbial process in different media in nature.

New trend and development in Bioscience and Bioengineering

○Jingchun Tang

(Nankai University)

Key words biochar, ARGs, nano materials, microplastics

4A06-05 Latest development of Microalgae Biorefinery

○Pau-Loke Show
(University of Nottingham Malaysia)
(Recipient of the DaSilva Award in 2018, the author of the highly cited research papers)
ShowPauLoke@gmail.com

Liquid Biphasic System (LBS) has become a proven tool used in microalgae biorefinery for circular bioeconomy. This presentation aims to share on the recent literature works in the development of different type of LBSs and their applications in novel separations and purifications of biomaterials. Hopefully this presentation will able to build solid research collaborations among researchers

4A06-06 My memory of JBB

○Akira Ito
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)
(Former Deputy Editor-in-chief, the author of the highly cited review)
ito.akira@material.nagoya-u.ac.jp

Congratulations on the 100th anniversary of the Society for Biotechnology, Japan. In this symposium, I will talk about my memories of JBB by describing the relationship between me and JBB so far and in the future. My first JBB paper was published in 2000 when I was a graduate student at Nagoya University. Since then, 37 papers have been published in JBB, which is 27.6% of my total papers. In 2005, our group (Ito Akira, Shinkai Masashige, Honda Hiroyuki and Kobayashi Takeshi) was invited to submit a review paper to JBB at the 100th anniversary issue, and the paper entitled "Medical application of functional magnetic nanoparticles" has been cited 1264 times and now ranks third in JBB's highly cited papers. JBB has been thus playing an important role in my academic career. I hope that JBB will continue to develop as a beloved journal in the future.

Latest development of Microalgae Biorefinery

○Pau-Loke Show
(University of Nottingham Malaysia)

Key words biomass, bioresources, macroalgae, microalgae

My memory of JBB

○Akira Ito
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words JBB

4C06-01 PUFA synthase を用いた多様な多価不飽和脂肪酸 (PUFA)発酵生産法の開発

○氏原 哲朗
(協和発酵バイオ)
tetsuro.ujihara@kyowa-kirin.co.jp

ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などに代表される多価不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)は脳・認知機能や血液・血管の健康維持に重要な役割を果たすことが知られており近年注目を集めている。DHA や EPA といった PUFA は人間の生体内で合成することができないため必須脂肪酸となっているが、その摂取は魚など限られた資源に依存しており今後の世界的な需要増加を考えると持続的な供給が課題である。人間による消費の他に、養殖漁業でも DHA や EPA などの PUFA が必要であり水産資源の確保のためにも従来の海産物に頼らない PUFA 生産が求められている。

微生物を用いた発酵技術による工業的な PUFA 生産はこの課題に対する有効な方策であるが、現在までに既存の PUFA 生産を凌駕する効率的な PUFA 生産には至っていない。そこで我々は微生物による効率的な PUFA 生産を目指して検討を行った。まず初めに優良なホストを獲得するために自然界からのスクリーニングを行い高い DHA 生産性を持つラビリンチュラ類の真核微生物を単離した。この株にさらに変異育種を施すことにより高効率な DHA の発酵プロセスを確立した。

さらなる改良を目的にこの株を解析してみると本菌株は同属の株と同様 DHA を PUFA synthase と呼ばれる Polyketide synthase 様の巨大タンパク質複合体で生産していることが明らかとなった。PUFA synthase は中間体を遊離することなくマロニル CoA から DHA まで一気に生産する活性を保有しており、通常の不飽和化酵素や鎖伸長酵素を複数利用した PUFA 生産に比して副生成物の低減や還元力の消費が少ないなどの特徴がある。このような特徴を持つ PUFA synthase を活用し DHA 以外の有用な PUFA 生産に展開することを目指したが、PUFA synthase の生産物を変更することは容易ではなかった。その要因の一つとして PUFA synthase の生産物を決めるメカニズムが不明であり、多くの PUFA synthase の機能ドメインの役割がわかっていないことが挙げられる。

そこで我々は北海道大学大利徹教授のグループと共同して PUFA synthase の PUFA 生産メカニズムを解明することに取り組むこととした。これまでに ω3 脂肪酸である DHA を生産する PUFA synthase, EPA を生産する PUFA synthase は知られていたものの、ω6 脂肪酸を生産する PUFA synthase は知られていなかった。そこで我々は ω6 脂肪酸であるアラキドン酸(ARA)を生産する PUFA synthase を探索し、海洋性バクテリアから見出すことに成功した。このようにして多様な PUFA synthase を見出すことに成功したため、これらを活用し、各 PUFA synthase の機能ドメインを入れ替えるなどの検証を行い、PUFA synthase の PUFA 生産メカニズムに関して仮説を立て、in vitro の酵素反応で検証を進めることで PUFA synthase の鎖伸長と不飽和度決定に関わるドメインを特定することに成功した。得られた結果を基にラビリンチュラの PUFA synthase に変異を導入したところ DHA ではなく EPA を生産する PUFA synthase を取得することにも成功した。

PUFA synthase の高い生産物特異性と PUFA 生産性を活用し、今回明らかになった生産メカニズムに従い適切な変異を導入することで多様な PUFA 生産が可能になり、持続的な有用 PUFA の生産に貢献できるものと考えられる。

Development of various Polyunsaturated fatty acid (PUFA) production process using PUFA synthase.

○Tetsuro Ujihara
(Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.)

Key words polyunsaturated fatty acid

4C06-02 オリゴ糖が有するプレバイオティクス効果の分子基盤と応用展開

○片山 高嶺
(京大院・生命)
takane@lif.kyoto-u.ac.jp

最近、組換え大腸菌を使用して生産された一部のヒトミルクオリゴ糖が欧米を中心に育児用調製乳に添加されるようになり、プロバイオティクスやプレバイオティクス研究が再び脚光を浴びている。ヒトミルクオリゴ糖とは人乳中に含まれる重合度3以上のオリゴ糖を指し、乳糖および脂質に次いで3番目に多い成分であるが、ヒトの消化酵素には耐性を示すために乳児の直接的な栄養源とはならず、大腸に生息する腸内細菌によって資化される。我々は15年程前に、乳児糞便中から単離されるビフィズス菌にはヒトミルクオリゴ糖を資化するための特異的な代謝経路が存在していることを見出し、その経路上の遺伝子や酵素について解析を行ってきた。また、ヒトサンプルを解析することで、実際にヒトミルクオリゴ糖が乳児における天然のプレバイオティクスとして機能していることを世界に先駆けて証明してきた。その過程で、ヒトミルクオリゴ糖資化遺伝子のビフィズス菌における保有率が菌種レベルのみならず菌株レベルで大きく異なることに気付き、これをきっかけにプレバイオティクスに対する応答性(レスポンダー・ノンレスポンダー)について考えるようになった。プロバイオティクスにおけるプレバイオティクス資化遺伝子は、いわば病原性細菌の pathogenicity island と対義する概念として捉えても良いのかも知れない。本講演では、我々のこれまでの研究を振り返りながら最新の成果を紹介するとともに、レスポンダー・ノンレスポンダーのメカニズムについて考察を加える。

Molecular insight into responder/non-responder status to prebiotics

○Takane Katayama
(Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words Prebiotics, Responder/Non-responder

4C06-03 発酵生産におけるトランスポーターの重要性

○福井 啓太

(味の素・バイオフィン研)

keita.fukui.3xa@asv.ajinomoto.com

微生物を用いた物質生産では、グルコースなどの安価な糖から目的有用物質を安定的、且つ低コストで生産することが重要である。その際、目的物質の生合成経路のフラックスを大きくするだけでなく、菌体で生産された目的物質を菌体外へ輸送する排出輸送体が重要な役割を果たす。これまでアミノ酸等の様々な物質生産において排出輸送体が同定されているが、膜タンパク質であるが故に精製や機能の解析は難しく、特殊な技術が必要となる。

本シンポジウムでは、植物プラズマックの原料であるコハク酸と、芳香族アミノ酸発酵について、排出輸送体の培養に与えるインパクトと計測（解析）に関する産学連携の結果について紹介する。

Corynebacterium glutamicum を用いたコハク酸発酵は、生産能力を最大にするために、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る。本菌が嫌気条件に適応し、コハク酸生成能を付与するためには、好気から嫌気に移行する前に微好気条件下でのコハク酸生成誘導を必要とする。嫌気条件下でのコハク酸生成能力は、この微好気誘導に依存する。この誘導プロセスは工業生産の観点からは管理指標を定めるのが難しく、スケールアップ時の不安定化を引き起こす原因となっている。そこで、この誘導プロセスを不要とする菌株開発を目的として、コハク酸生成誘導の解析を行った。

トランスクリプトーム解析を用いて、微好気条件下で特異的に発現量が上昇するコハク酸排出輸送体候補遺伝子 *sucE1* を発見した。本遺伝子は増幅することによってコハク酸生産能力が向上し、欠損するとコハク酸を生産しなくなる。本遺伝子にコードされるタンパク質は、Aspartate : Alanine Exchanger (AAE) ファミリーに属しており、欠損株の培養解析からコハク酸の排出遺伝子であることが示唆された。そこで、東北大学阿部先生、七谷先生らとの共同研究により、この膜タンパク質の輸送活性測定を試みた。his-tag を付加した *SucE1*-(his)₆ のアフィニティ精製を行い、46kDa タンパク質の部分精製に成功し、LC-MS/MS 分析により本バンドが *SucE1* であることを確認した。*E. coli* lipid と部分精製 *SucE1*-(his)₆ を用いて再構成膜を作成後、ラベルコハク酸を用いて輸送実験を実施した。その結果、本タンパク質を含む再構成膜においてのみコハク酸の輸送活性が確認され、*SucE1* がコハク酸輸送体であることが証明された。しかしながら、本遺伝子を構成的に発現させても、誘導プロセスが不要にならなかった。そこで、更に解析を行ったところ、コハク酸生成誘導時にコハク酸生成遺伝子の一つであるリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (*mdh*) 遺伝子の発現量が増加していることがわかった。そこで、*sucE1* と組み合わせた構成発現株を構築したところ、コハク酸生成誘導なしで嫌気条件下でのコハク酸生成能を付与させることができ、発酵プロセスの最大化及びプロセスの安定化に成功した。

フェニルアラニンやトリプトファンといった芳香族アミノ酸は必須アミノ酸として知られ、医薬や食品、飼料など様々な用途のために発酵生産されている。*E. coli* 由来 *YddG* はアミノ酸排出輸送体的一种として発見された膜タンパク質で、Aromatic Amino Acid/Paraquat Exporter (ArAA/P-E) ファミリーに属する。*yddG* 遺伝子を増幅することにより芳香族アミノ酸の生産量が大きく向上し、欠損することにより菌体内芳香族アミノ酸濃度が上昇することから、*YddG* は芳香族アミノ酸を排出する輸送体であることが示唆されていた。そこで、東京大学瀧木先生、石谷先生らとの共同研究により、*YddG* によるアミノ酸排出機構を解明することを目的として *YddG* の X 線結晶構造解析を試みた。大型放射光施設 Spring-8 にて、*Starkeya novella* 由来 *YddG* の結晶から X 線回折データを取集した結果、2.4 Å という高分解能で立体構造を解明することに成功した。生化学的解析と構造情報より、基質に関しては芳香族アミノ酸のみならず他の種類のアミノ酸も輸送でき、*YddG* はポケット内部の環境と大きさによって基質を選択していることを明らかとした。

Importance of transporters in microbial production

○Keita Fukui

(Res. Inst. Biosci. Prod. Fine Chem., Ajinomoto Co., Inc.)

Key words fermentation, transporter, production

4C06-04 バイオコントロールとバイオインターフェイスをベースとした革新的微生物技術による起業

○堀 克敏

(名大院・工)

khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

演者は、2017年6月に名古屋大学発ベンチャー（株）フレンドマイクロブ（FM社）を起業した。根幹のシーズは、圧倒的な油脂分解能力を誇る共生微生物製剤と、これを利用した排水処理技術である。後者は微生物製剤を排水処理に適用するための方法論であり、自ら構築したバイオコントロールの理論に基づく。微生物製剤が排水中でその効果を発揮するには、使用法が適切であることが重要だ。連続的に大流量の排水が排出される排水処理現場に微生物を適用するには、大量の微生物製剤が必要になり、非現実的なランニングコストになってしまう。そこで、現場で種菌を自動で数百倍に増幅し、それを処理槽に自動投入するための装置を設置する。この自動増幅投入装置と種菌が、FM社の油性排水処理ビジネスの売物である。

微生物製剤については、共生関係にある複数の微生物を利用するということが、重要なポイントである。また、本微生物は、既報の油脂分解微生物と比べて、分解速度は圧倒的に速く、一桁高い高濃度油脂にも適用可能であり、pHや温度の適用範囲も広い。さらに、トランス脂肪酸を分解可能であることが示された唯一の微生物である。そのため、全ての動植物性油脂と加工油脂を分解できる。現状、様々な食品工場の加圧浮上分離装置を生物分解で代替可能にする唯一の微生物製剤である。数千 mg/L 以上の高濃度油脂も分解できるので、油性汚泥や生ごみ処理ビジネスにも適用できる。

油脂の主成分であるトリアシルグリセロールは、微生物が分泌する酵素リパーゼによって加水分解され、遊離脂肪酸とグリセロールになる。微生物製剤はリパーゼを分泌するとともに、生じた遊離脂肪酸とグリセロールを炭素源として消費する。微生物の分解能力が高いことの要因の一つは、リパーゼの活性が高いことにある。リパーゼは培養上清中に分泌されるので、培養後に微生物細胞と培養上清を分ければ、前者からは微生物製剤を、後者からは酵素製剤を得ることができる。現在、本リパーゼに優れた強力な酵素洗剤を開発中である。また、本リパーゼはエステル交換反応に優れ、油脂をメチルエステルに変換可能である。これを利用し、排水中の油脂をバイオディーゼルの原料とする技術も開発中である。さらに、動植物油脂の分解で培った知見を活かし、難度が高い鉱物油の分解技術の開発にも目途がついた。動植物油脂以上の市場規模が想定される鉱物油分解の事業化も、数年以内に実現させる計画である。油分解と言えばフレンドマイクロブと言われるようになることを目指している。

微生物による排水処理は競争の激しい事業分野である。起業時、他社の追従を許さない強固な特許網を構築することが急務であった。事業については、まずは事業形態を明確にし、販売体制を構築し、顧客開拓を進める必要がある。FM社は、食品工場と直接契約するエンジニアリング会社と取引をするというビジネスモデルを構築した。一からの構築であったこと、コロナ禍により現場視察が必要な排水処理事業の商談を長く中断せざるを得ない状況が続いたことなどの要因により、起業後5年間を要したが、複数のエンジニアリング会社との契約および大手食品メーカーへの納品に至り、いよいよ事業が本格化する段階に入った。この間、会社を支えたのは受託研究ビジネスであった。演者はこれを実現するため、大学・ベンチャー・大手企業の三者による共同研究体制による新しい産学連携モデルの構築を図った。新技術・製品の開発や技術的な課題解決といった大手企業のニーズを、大学の研究力を活用しながら、ベンチャーが実用化や課題解決を目指す。ベンチャーは大手企業から受託研究として受注し、ベンチャー及び大手企業は大学に共同研究費を出す。規模は、研究員の人件費を含み、実質的な研究開発を進めることができる規模である。研究課題は、バイオコントロールと並び演者の研究テーマであるバイオインターフェイスに関係したものが多く、特に、将来の社会実装が期待される気相微生物反応については、産学連携で国家プロジェクトに取り組むことも計画している。ベンチャーは受託研究費で売上を上げつつ、成果をさらなる知財の取得と商品化に繋げ、将来の事業拡大と企業価値向上を図る。ところで、このような産学連携では、企業の言いなりの応用研究ばかりになると敬遠される大学人もおられるかもしれない。しかし、多くの場合、新技術や商品の背景にある作用メカニズムの解明や理論構築は、広く市場に受け入れられるためには必須であり、基礎研究も重要になってくる。故に田良二先生はこれを『応用基礎研究』と呼ばれた。FM社はこのような新しい産学連携体制による受託研究を複数受注することにより、本業である油脂分解が軌道に乗るまでの間、所謂『死の谷』を乗り越え、かつ将来の新規事業の芽も育てることで会社の価値の向上を図ってきたのである。

演者は、微生物と酵素で、またはバイオコントロールとバイオインターフェイスでSDGsを達成することを掲げながら、FM社を、10年後には1000億円企業に、その先には1兆円企業に育てるという大胆で大ばら吹きのような夢を語りながら、実現に向けたビジネス戦略を立てている。

Business start-ups with innovative microbial technology based on biocontrol and biointerfaces

○Katsutoshi Hori

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

Key words biocontrol, biointerface, microorganisms, enzyme

4C07-01 複合的極限環境に生きる微生物の生存戦略から紐解く極限微生物の遺伝資源の潜在性

○鈴木 志野
(宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所)
suzuki.shino2@jaxa.jp

地球には生命にとって一見苛酷とも思える極限環境が存在するが、そこにも微生物は存在し、生命活動を営んでいる。これは約40億年前に地球に生命が誕生した後、環境の劇的変遷に曝されてもおお生命が柔軟に環境適応し多様性を創り出してきた結果である。一方、地球には、複合的な物理化学的要因により生命が存在・生息できない領域も存在する。それらは生命の生息する領域「生命圏」に対し「非生命圏」と呼ばれている。そしてこの生命圏と非生命圏の境界領域には限られた微生物のみが辛うじて生きる事が可能となる極限環境が存在する。極限環境は、微生物に特定の強い物理的・化学的選択圧がかかり続ける環境であり、微生物は生存のための適応を余儀なくされた環境である。

蛇紋岩化反応とは、上部マントルを構成するかんらん岩と水が反応し、蛇紋岩を作り出す反応のことである。この反応は同時に、生命のエネルギーとなる多量の水素ガスを比較的低温域で生成し、かんらん岩に混入するカルシウム、マグネシウムイオンと平衡する形で水酸化イオンを生成する。その結果、蛇紋岩湧水は「低温で、エネルギー物質の豊富な強アルカリ超還元環境」となる。カリフォルニア州 The Cedars カンラン岩体の深部でもこの反応が起きており、ここに湧出する泉水は強アルカリ性（ \sim pH12）超還元性（ $E_h = \sim -700$ mV）を示す。一方、この泉水はリン、炭酸水素塩が乏しいため、生体分子の合成が困難であり、強アルカリ性であるため水素イオンの濃度勾配を用いた ATP の産生が困難となる。また主要な電子受容体をほとんど含まず、蛇紋岩化反応により生成される水素の呼吸利用も難しい環境であるため、生命にとって挑戦的な環境と類推された。事実、The Cedars 深部流体には検出限界（102 cell/mL）以下の細胞数しか検出されなかった。

地球表層とは大きくかけ離れた地下岩石生命圏に存在する微生物の培養はおおむね困難である。よって、これまでその多くが、ダークマター生命として処理されてきたが、私はこの環境に生息する微生物に関し、多様性解析、分離培養、メタゲノミクス、メタトランスクリプトミクス、合成生物学的解析を行い、The Cedars における微生物の生存戦略、適応進化の全体像の解明を行ってきた。ここでは、The Cedars でみられる地下生命圏にかかる本質的な「選択圧」を明らかにし、その選択圧に適応・進化した生命機能を地上技術に利用するという観点で議論していく。

Microbial life strategies in polyextreme environments: potential as genetic resources

○Shino Suzuki
(JAXA-ISAS)

Key words Extremophile, metagenomic libraries, calcium carbonate, Serpentinization

4C07-02 生物種間ネットワークと微生物叢動態分析で難培養生物に挑む

○東樹 宏和
(京大・生態研)
toju.hirokazu.4c@kyoto-u.ac.jp

難培養生物はなぜ難培養なのか？極限環境下に生息する生物を培養するためには、その極限環境における物理化学的な状況を再現することが、培養の成功にとって第一の関門となるであろう。しかし、ごくありふれた環境に生息する生物たちでさえ、その多様性の大部分は培養が困難なもので占められる。この謎を解く鍵は、生物間の関係性にあるのではないだろうか？生態系において生物種は「生物的環境」に取り巻かれている。土壌や淡水・海水中において、微生物たちは、他種と資源を争ったり、他種が排出した代謝産物を利用したりしながら、生存している。そのため、種やゲノムを単位とした競争や相互依存のネットワークを読み解くことが、難培養生物に挑む上での重要な戦略になると考えられる。

本講演では、アーキア、細菌、真菌に関するさまざまな解析の実例を紹介しながら、微生物叢をいかに俯瞰し、相互作用のネットワークを読み解いていくことができるか、議論する。微生物同士の共起パターンを読み解く統計分析でも、群集や生態系といったレベルにおける現象やパターンを大まかに把握することはできる。一方で、微生物間相互作用の背景にある力学を解明し、難培養生物の難培養たる所以を探るためには、理論生態学や非線形力学、統計物理学等を融合させた研究アプローチが必要となる。

システムとして微生物叢を捉える視点から、群集構造の代替安定状態 (alternative stable states) や群集動態の非線形性と予測性、微生物構造の制御に関する研究の展開を解説したい。ショットガン・メタゲノムに由来する情報から、各微生物種の生態的地位 (ニッチ) を推定する統計的手法や、相互に相性のよい微生物種の組み合わせを設計する手法について、現状と将来像を語りたい。本講演で議論する分析技術群は、土壌・水圏微生物叢やヒト腸内細菌叢、植物共生微生物叢、実験微生物叢等を対象としながら横断的に最適化してきたものであり、広範な分野における推定展開が潜在的に可能である。

Analyses of species interaction networks and microbiome dynamics for disentangling uncultured microbes

○Hirokazu Toju
(CER, Kyoto University)

Key words microbial community, uncultured bacteria, microbiomes, microbiome dynamics

4C07-03 未知の微生物を"培養"して新たな生物機能を探る-未利用微生物遺伝子資源開拓と利活用に向けて-

○玉木 秀幸
(産総研・生物プロセス)
tamaki-hideyuki@aist.go.jp

コッホ・パスツールの時代から、環境中の微生物を"培養"してその機能を探る、というアプローチはいわば微生物学の王道であり、応用微生物学・医学細菌学・環境微生物学・微生物生態学・微生物系統分類学はもちろんのこと、健康医療・衛生管理、ヘルスケアをはじめ食品産業、農業、水産業など多岐にわたる産業分野に貢献してきた。しかしながら、1990年代以降の分子生態学的アプローチの誕生により、環境中の微生物の多くが未だ培養されたことのない未知の生物であることが詳らかとなるとともに、今世紀以降、超高速シーケンサーを活用した環境ゲノム情報解析研究が隆盛を極め、今日に至っては、数々の未知微生物のゲノムを高い完成度で再構築し、その未知機能に迫ることができつつある。実際に大規模な環境ゲノム情報解析が世界中で盛んに行われ、地球微生物ゲノムアトラスの構築が進められており、系統学的な側面からすれば、環境中の微生物のほとんどは「未知」の微生物ではなく、ゲノム情報だけは存在する「未培養」の微生物になりつつあると言っても過言ではない。一方で、こうした大規模環境ゲノム情報解析研究により明らかになったもう一つの事実は、機能面で見ると、環境中の微生物の多くは、以前として「未知」のままである、ということである。どんなにゲノム情報を獲得したとしても、系統的に新しい微生物であればあるほど、機能の不明な遺伝子が多く存在しており、それ故に未培養微生物が本来もつ深淵な未知機能に迫ることが難しいという側面がある。今、微生物を「培養」して調べることの重要性が世界的にも広まってきた。我々は20年以上にわたり、「未知の微生物を"培養"して新たな生命機能を探る」という取組みを継続して実施してきており、未知・未培養・難培養微生物の可培養化技術の開発を進めるとともに、特に深部地下圏環境、植物・微生物共生系、腸内環境に生息する未知微生物の培養と新生物機能を明らかにしてきている。本講演では、我々の一連の取組みを紹介しながら、環境ゲノム情報と培養物の両方を得て未知微生物を探究することの意義とともに、未知微生物遺伝子資源の学術・産業の両面における可能性について議論したい。

Cultivation Renaissance in the post metagenomic era

○Hideyuki Tamaki
(BPRI, AIST)

Key words 未知微生物, 環境ゲノム情報解析, 培養アプローチ, 未知微生物遺伝子資源

4C07-04 有用抗生物質探索源としての線虫マイクロバイオームの利用

○今井 優^{1,2}
(¹信州大・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研,²ノースイースタン大・抗生物質発見セ)
y.imai@shinshu-u.ac.jp

1928年にAlexander Flemingによって青カビ*Penicillium notatum*からペニシリンが発見されたことを契機に“微生物から抗生物質を見つけ出す”いう概念が生まれた。1943年にSelman Waksmanらにより放線菌*Streptomyces griseus*からストレプトマイシンが発見されると、放線菌の有用性の認知とワックスマン・プラットフォームの普及(抗菌活性試験の迅速化)により抗生物質探索研究は大きな発展を遂げた。特に1940年代から1960年代までのおよそ20年間は“抗生物質の黄金時代”と呼ばれ、この短い期間にマクロライド、テトラサイクリンおよびグロラムフェニコールなど新しいクラスの抗生物質が次々と単離された。一方1960年代以降は、既知物質の再発見に終わるなど、微生物から新しい抗生物質を見つけ出すことが困難となり、抗生物質の黄金時代は終焉を迎えた。

地球上に生息する微生物の内、99%が研究室レベルでは培養できない難培養微生物と言われており、これまで我々はたった1%の微生物資源を対象に抗生物質探索研究を行ってきたに過ぎない。加えてその中でも、放線菌や糸状菌など、環境中に遍在し、比較的分離が容易な微生物群のみが優先的に利用されてきた。これを背景に近年では、これまで未利用であった微生物資源に着目した抗生物質探索研究がバイオベンチャーや大学を中心に展開されている。Kim LewisとSlava Epsteinらの研究グループは、iChipと呼ばれる*in situ*培養器を開発し、これを抗生物質探索研究に応用することで、難培養性微生物*Eleftheria terrae*から新しい抗生物質テイクソバクチンを発見することに成功した。また、Andreas Peschelらは、これまで抗生物質の探索源として見落とされていたヒト共生細菌に着目し、ヒトの鼻に定着する細菌*Staphylococcus lugdunensis*から黄色ブドウ球菌に活性を示すルグドゥニンを単離している。興味深い点として、これら微生物から発見された抗生物質がユニークな作用機序を有している点が挙げられる。テイクソバクチンはグラム陽性細菌細胞壁の前駆体であるペプチドグリカンとテイコ酸のそれぞれの前駆物質を標的とすることで耐性変異株を生じることなく病原菌を殺すことができる。またルグドゥニンは、黄色ブドウ球菌の膜電位を散逸することで生育を阻害すると考えられている。これらの発見は、これまで抗生物質探索源として未利用であった微生物からは新規かつユニークな作用機序を示す抗生物質が見つかる可能性が高いことを示すものであった。これを背景に講演者らは、有用抗生物質の探索源として比較的手付かずの状態にあった昆虫病原性細菌に着目した抗生物質探索研究を展開してきた。

昆虫病原性細菌*Photorhabdus*属および*Xenorhabdus*属は昆虫病原性線虫に共生するというユニークな生活環を有しており、線虫が昆虫幼生に感染すると幼生体内へと放出される。その後これら細菌は、神経毒を生産することで昆虫幼生を死に至らしめ、その死骸を酵素的に分解し、栄養源としている。またこの際、抗生物質を生産することで周囲の微生物、主に幼生体内に存在する他のグラム陰性細菌から栄養源を守っていると考えられている。またゲノム解析により、*Photorhabdus*属および*Xenorhabdus*属細菌がゲノム中に20程度の二次代謝産物合成遺伝子クラスターを有することもわかっている。これはこれまで抗生物質の探索源として長らく利用されてきた放線菌にも匹敵するものである。このことから講演者らは、*Photorhabdus*属および*Xenorhabdus*属細菌が多様かつ細胞毒性の低い(少なくとも宿主である線虫に対しては無毒であるため)抗生物質を生産している可能性が高いと考えた。そしてこれら線虫共生細菌を探索源としたスクリーニングから、これまで二つの新しい抗生物質を発見している。2019年に講演者らは、*Photorhabdus kharii*からグラム陰性細菌に特異的な活性を示す抗生物質グロバクチンを発見し、この抗生物質がグラム陰性細菌の必須外膜タンパク質BamAに結合し、外膜タンパク質の合成を阻害することでグラム陰性細菌を殺すことを明らかにした。また2022年には、*Photorhabdus noenieputensis*から結核菌*Mycobacterium tuberculosis*に選択的に働くDNAジャイレース阻害剤イヴィバクチンを見出し、イヴィバクチンが各種細菌における物質の取り込み・排出能の違いを利用することで、結核菌にのみ選択的な活性を示すことを突き止めた。これらの成果は、線虫共生細菌が次なる有用抗生物質の探索源として魅力的なソースであることを示している。本シンポジウムではこれら抗生物質の発見の過程およびその特性について紹介したい。

Nematode symbionts as a new source of antibiotics

○Yu Imai^{1,2}
(¹Inst. Biomed. Sci., Shinshu Univ., ²ADC., Northeastern Univ.)

Key words antibiotics, symbionts, nematode, drug discovery

4E06-01 バイオとデジタルの融合によるバイオエコノミーの形成

○近藤 昭彦^{1,2}

(¹神戸大院・科技イノベ,²バッカス・バイオイノベーション)
akondo@kobe-u.ac.jp

バイオテクノロジーを利用した経済「バイオエコノミー」が、ものづくり、健康医療、農業等の幅広い分野で急拡大し、バイオ産業革命の様相を呈しています。ものづくり分野においては、代謝設計された微生物を用いて、多様な化学物質が、バイオマスから生産されつつあります。現在さらに進んで、CO₂からの直接バイオ生産も大きな期待が寄せられています。また健康医療の分野では、抗体医薬から、遺伝子治療・細胞治療そしてマイクロバイオーム等の微生物医薬バイオテクノロジーを活用したモダリティは拡大を続けています。また、食料分野でも、植物育種のみならず、代替タンパク質等の新しい流れが勃興しています。

こうしたバイオ産業革命の流れを加速しているのが、ゲノム解読技術やゲノム合成・編集技術等の先端バイオ技術とIT、AI技術やロボット技術を融合（「バイオ×デジタル」融合）して誕生した、革新的なバイオファウンドリ技術です。このバイオファウンドリ技術は様々な要素技術の集積技術ですが、合成性生物学の根幹となる技術です。バイオファウンドリは、DBTLシステムとして構成されていくが、細胞の代謝設計システム（Design）、長鎖DNA合成とそれを活用した迅速な微生物構築技術（Build）、迅速・高精度代謝評価技術（Test）、さらなる改良と新規代謝経路設計のための機械学習や数理モデリング（Learn）等の先端技術を統合したものです。

次に、バイオファウンドリ構築のために開発した要素技術について説明します。Designでは、様々なデジタル技術が必要となります。一例として、(1)ゲノムスケールでの細胞シミュレーションを可能とするゲノムスケール代謝モデル、(2)代謝設計システムとして、非天然化合物の生合成のための代謝設計を可能にする新しいシミュレーション、(3)最適酵素の選択システムや、それをテンプレートとする人工酵素の設計システム、(4)人工代謝経路を含むゲノムスケールでの代謝最適化ツール等々です。Buildでは、様々な遺伝子回路を合成するために、誘導性人工プロモーターやターミネーターなどの遺伝子コンポーネントを集積する必要があります。また、ゲノムを設計通りに書き換えて細胞工場を効率的に構築するために、新たなゲノム編集技術や大規模遺伝子クラスター合成システムなどの基盤技術を開発し、自動化システムの構築に向けた統合を行います。Testでは、細胞工場の性能をより正確かつハイスループットに解析するため、自動メタボローム解析システム等を開発します。最後に、実験により集積されたデータを用いた学習（Learn）から様々なルールを抽出していくことで、Design精度が上がっていきましてバイオファウンドリが高速化されます。これらの多様な要素技術群をアセンブルすることで、先端的なバイオファウンドリを構築することが可能となります。

世界的に見ますと、多くの国で、政府の支援を受けたバイオファウンドリが構築されています。特に、最近、中国科学院（天津のTenjin Institute of Industrial Biotechnologyおよび深圳のShenzhen Institute of Advanced Technology）において大規模なバイオファウンドリが整備されつつあります。さらに、韓国におきましても、KAISTやKRIBBを中心にK-biofoundryを大規模に整備する構想があります。この様に、バイオファウンドリ構築の世界的な競争は激化しています。一方で、これらのバイオファウンドリの世界的なネットワークを構築して連携を図るために、2019年5月に神戸大学において、Global Biofoundry Allianceが正式にスタートしましたが、現在メンバーとなるバイオファウンドリが世界で増加しています。世界的な連携の重要性も強く認識されています。

一方、民間セクターにおいては、バイオファウンドリ企業が米国を中心に存在感を増しています。ボストン地区にある、Gingko Bioworks社、Conagen社、サンフランシスコ地区にある、Amyris社、Zymergen社など代表的な存在です。いずれの企業も巨額の資金調達を行い、多くのパートナー企業と多くのプロジェクトを推進し、バイオ産業革命を牽引しています。特に、Gingko Bioworks社は、昨春秋に約2兆円の時価総額で上場を果たし、大きな話題となりました。日本においてこうした流れを作るために、私たちは、2020年に、神戸大学における、バイオファウンドリ技術を包括的に移転し、統合バイオファウンドリ企業バッカスバイオイノベーション社を起業しました。バッカスバイオイノベーション社は、神戸市のポートアイランドのクリエイティブラボ神戸（CLIK）にバイオファウンドリを整備して、日本におけるバイオエコノミー拡大に貢献することを目指して、多くの企業とプロジェクトを推進しつつあります。本発表では、バイオファウンドリの技術概要、そして世界の研究開発や事業化の現状と将来展望に関して報告いたします。

Forming a bioeconomy through the fusion of bio and digital technologies

○Akihiko Kondo^{1,2}

(¹Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ²Bacchus Bio innovation)

Key words biofoundry, bio-digital fusion, bioproduction, bioeconomy

4E06-02 人工代謝経路設計技術を利用した有用化合物の微生物による生産

○白井 智量

(理研・環境資源)

tomokazu.shirai@riken.jp

近年、微生物の「醗酵」を利用した有用化合物の生産技術が非化石原料の活用技術の1つとして利用されている。植物や光合成微生物などにより炭酸固定されてきた糖などを炭素源として利用し、遺伝子改変された微生物に目的の有用化合物を生産させるといったものである。この「合成生物学」を利用した微生物生産技術については欧米が先行しており、多くの汎用化学品については既に発酵生産による製造技術のコマーシャル化が進んでいる。コマーシャル化に向けて先行している化学品の具体的な例として、自動車用燃料を代替するバイオエタノール、ポリ乳酸の原料である乳酸をはじめ、1,3-プロパンジオール、 γ -アミノ酪酸、4-アミノ桂皮酸などの汎用ポリマー原料が挙げられる。さらに製造産業へ適用された例として、米国のバイオベンチャーであるGenomatic社と独BASF社が共同で、基幹汎用化合物である1,4-ブタンジオール（BDO）を年間5万トン以上生産することに成功している。

有用化合物を微生物に生産させるとき、細胞内の炭素の流れだけでなく、エネルギーの生産・消費や酸化還元バランスをも含めた『代謝』を最適に設計する技術は必須である。なぜなら細胞内の表現型を理解し、その情報を目的の細胞の代謝設計およびその後の育種に応用できるからである。しかし、1つの細胞内で1,000以上存在する代謝反応のバランスや最適化を人間の頭だけで考えるのは限界があり、コンピュータによる計算力が必須となる。特に近年においては、ゲノムシーケンシング技術と情報処理技術の革新によるアノテーションの迅速化により、ゲノムスケールレベルで全代謝反応をコンピュータ上に記述出来るようになった。つまり、ある環境での微生物細胞の代謝の振る舞いを予測する技術が確立された（ゲノムスケールモデル：GSM）。現在はGSMを用いた細胞の代謝設計から、実際の実験による検証までをシステマティックに行い、ハイスループットに目的化合物の生産性を向上させる研究が盛んである。しかし、既存のGSMでは宿主細胞以外が持つ代謝反応を利用した効率的な代謝設計に困難である。そこで、我々は宿主細胞以外の生物が持つ代謝反応を網羅的に付加し、目的の化合物を効率良く生産するためのハイブリッドな代謝設計ができるツール：HyMePを開発した。このツールの概要は以下の通りである。まずKEGGデータベース（<http://www.genome.jp/kegg/>）にある全生物種の代謝反応から、利用する宿主細胞が持つ代謝反応を除いたものをデータベースとして格納する。次に、作成したデータベースから宿主細胞のGSMに接続する反応経路を選び出し、ハイブリッドな代謝経路を構築する。構築した代謝モデルを使って目的化合物を最大生産することのできる効率の良い代謝経路を設計する。HyMePによる理想的な代謝設計図を描いた後は、増殖および目的化合物への代謝を共に考慮することにより合理的な代謝設計が可能になる。このツールを用いて、大腸菌を含む様々な微生物に実用展開し、理論収率を向上させる代謝設計を提案した。このツールを用いて様々な有用化合物を高生産する微生物の代謝設計を行い、合理的に細胞構築を行うことに成功した。

さらに我々は、未知の生合成経路を予測・設計するツール：BioProVを開発した。KEGGやBRENDAなどの代謝反応および酵素反応が格納されているデータベースから、個々の酵素という概念を外し、化学反応パターンだけを記述した。そして、同様の化学反応パターンをひとつの化学反応として再分類化し、コンピュータに学習させた。学習の方法として、各反応において前駆体と生成物をSMILESという表記方法で記述し、その反応メカニズムをSMIRKSにより全て記述した。実際のシミュレーションにおいては、目的化合物をSMILESで記述し、インプットデータとする。そして、それをもとにランダムにかつ網羅的に前駆体を逆合成していく。その逆合成された前駆体の中に、生体内での存在が既知の化合物が出てくるとシミュレーションが成功となる。つまり、その既知の生体化合物を出発物質として、設計された人工代謝反応を実現することができれば、目的の化合物が生合成できる。このツールを用いて様々な有用化合物のバイオ生産に実用展開することが可能になっており、ここでは、自動車タイヤに用いられる1,3-ブタジエンを生合成する経路を設計することに成功した。現在、ブタジエンは、ナフサ分解の副産物であるC4留分から合成されており、直接のバイオ合成は例がない。我々は生体内化合物であるcis,cis-マコン酸（ccMA）からブタジエンを生産する人工代謝経路を構築した。また、新たに開発した高速で効率的な代謝最適化アルゴリズム：AERITHを用いて、グルコースからプロトカケ酸に至るまでの代謝経路を最適化した。以上の結果を組み合わせ、大腸菌を用いて非天然化合物であるブタジエンをグルコースからバイオ生産することに世界で初めて成功した。これらの成果は、非天然/非生物学的化合物をバイオ生産する目的において、申請者が開発した人工代謝経路の設計技術が有効であることを示している。

Microbial production of useful compounds using artificial metabolic pathway design technology

○Tomokazu Shirai

(CSRS, RIKENS)

Key words metabolic engineering, bioinformatics, metabolic flux, synthetic biology

4E06-03 代謝知識のデジタル化技術の進展

○荒木 通啓^{1,2,3,4}

(1)医薬基盤研究所, (2)神戸大院・科技イノベ, (3)京大院・医, (4)循環器病研究セ)

michihiroaraki@gmail.com

デジタル化が進んでいる。代謝知識ドメインも例外ではなく、関連情報・データの集積、整理、検索、再利用といった単なる情報処理的なデジタル化の側面に加えて、推論、仮説提案といった知的なデジタル化の方向へと質的にも変化してきている。ここでは、代謝関連データベース、代謝経路推定、酵素機能アノテーション、文献知識抽出といったテーマを中心に、知識拡張の観点から代謝知識のデジタル化技術について概観したい。

代謝知識のデジタル化には、対象となる代謝物と化学反応に加えて、酵素情報や属性情報といったメタ情報の知識表現が重要である。古くから、代謝反応は化学反応式として形式化されているが、これらのデジタル化に際しては、名称、化学構造、化学反応等々の知識表現、構造化、体系化が不可欠である。現在の代謝・酵素関連データベースをながめてみると、データベース毎にその表現方法にも個性があることがうかがえる。また、個々の代謝反応を統合した代謝ネットワーク表現も代謝知識の重要な一面である。元々紙上で描かれていた代謝マップがデジタル化されることで、関連情報の付加やリンクを含めた知識拡張が容易となり、計算機性能や情報解析技術の向上と相俟って、新たな知識を生み出す源泉となっている。

こうした代謝知識ベースを利用して、未知代謝経路の推定も進められている。ここで重要となるのは、化学構造、化学反応の知識表現といったケモインフォマティクス領域の技術であり、MOL, SMILES といった一般的な化学構造表記を利用するものから、物性やグラフ構造などを特徴量とするケースもある。代謝経路推定についても、代謝ネットワークを逐次的に拡張する類のものから、最適化経路を探索するものまで多様なアルゴリズムが提案されている。また、代謝ネットワーク・ゲノムスケールモデルを利用したフラックスバランス計算のように、化学構造変換ではなく、化学量論に着目した最適化計算技術は、既知代謝経路のフラックス分布推定や最適経路推定に利用されている。

一方、推定された代謝経路を実装していくためには、目的の代謝反応に関わる酵素配列の探索が重要である。酵素反応は、各反応の特徴をもとに、Enzyme Commission numbers (EC 番号) により分類されており、例えばゲノム配列情報を利用した酵素機能アノテーションといった場合、EC 番号が付与されるケースが多い。ただし、同じ EC 番号に属する酵素配列も多様な配列が存在しており、一意に酵素配列の提案していくことは困難である。また、従来のバイオインフォマティクス解析ではアノテーションが付与されない遺伝子配列も一定数存在している。これらは、配列の特徴を十分に捉えきれていないことに起因しているが、こうした潜在的な配列特徴を捉える取組みとして、深層学習技術が注目されている。

また、代謝・酵素関連データベースに集積されている情報は、基本的に文献等のエビデンスをもとに人手による作業により抽出されている。文献等の情報量が増加している現在、言語処理技術が作業効率化の一助になると目される。特定の代謝経路推定や酵素探索といったコンテキストにおいても同様で、人手による文献検索からの知識抽出といったプロセスを補完するだけではなく、知識探索の網羅性を担保できるという側面もある。こうした技術により、特定のドメイン外の知識へのアプローチも容易になることから、ドメイン知識の拡張といった方向性も期待できる。

代謝知識のデジタル化技術の進展に伴う知識拡張により、今後さらに代謝・ゲノム空間に対する理解と未知・未利用資源の探索が加速していくことが期待される。

Advances in Metabolic Knowledge Digitization Technology

○Michihiro Araki^{1,2,3,4}

(1)NIBIO, (2)Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., (3)Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., (4)NCVC)

Key words metabolism, bioinformatics

4E06-04 機械学習を道先案内とした進化分子工学によるプロテインマイニング

○梅津 光央^{1,2}

(1)東北大院・工, (2)理研・革新知能)

mitsuo@tohoku.ac.jp

タンパク質の構造と機能の情報化は、合理的な変異導入によるタンパク質の機能改変へ大きな一歩を与え、変異を導入する残基をある程度合理的に限定することを可能とし、ライブラリー作製技術も 10¹⁰ 程度まで調製できるようになっている。しかし、スクリーニング技術は、規模の拡大は進んでいるものの未だ作製できるライブラリーに見合った規模を簡便・迅速に行うことは難しく、規模の増加とともにそれなりの設備と資金を必要することが多い。その中で私たちは、変異体ライブラリーの作製に人工知能技術のひとつである機械学習を利用して、機能陽性な変異体を高密度に含む小規模なライブラリー(スマートホットライブラリー)を設計することで、汎用性が高く効率のかつ確実に目的タンパク質へと進化できる進化分子工学の構築を行っている。

緑色蛍光タンパク質(GFP)を黄色蛍光タンパク質(YFP)へ機能改変した研究では、配列の類似性が高い GFP および YFP 間で配列が異なっていた 4 残基についてランダム変異を行い、配列空間の 0.1% にあたる変異体から配列と機能が紐づけされた教師データセットを作成した。そして、この教師データを用いて機械学習が作成した予測モデルを用いて配列空間中の全変異体について黄色率を予測して順位化し、上位変異体について実際に調製し機能評価を行った。その結果、教師データでは黄色性を示した陽性変体は目標の YFP を含め 4 種のみであり、全体のわずか 3% であったのに対して、機械学習が予測した変異体の多くは黄色くかつ強い輝度を示し、機械学習によって機能陽性な変異体を高密度に含むスマートホットライブラリーを構築することができた。この手法は酵素にも応用しており、有意義な活性向上が見られている。

また、特定の分子認識能をもつ抗体や抗体様分子では、ファージ提示法などの遺伝子型—表現型—体システムを用いた生体外での選択操作により目的標的へ結合する分子を取得する技術がある。近年では、選択操作後のライブラリーから、世代シークエンサーを用いて高い存在率を示す変異体を探索することで、スクリーニング規模を拡大させる方法が使われ始めている。しかし、生体外選択法では、選択操作で特定変異体が適切な濃縮を示さないことも多く、必ずしも目的機能をもった分子を取得できるとは限らない。本講演では、実験的操作では有望な分子を取得できなかった生体外選択操作の結果に機械学習を利用することで有望な分子を探索できる可能性も紹介する。

Machine-learning-assisted molecular evolution for mining functional protein in sequence space

○Mitsuo Umetsu^{1,2}

(1)Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., (2)AIP, RIKEN)

Key words molecular evolution, protein engineering, machine learning

4E06-05 圧縮と分類のデジタル生物学

○緒方法^{1,2,3}

(¹株式会社日本バイオデータ, ²次世代バイオ医薬品製造技術研究組合, ³農工大)
norichik@nbiodata.com

デジタル技術は今日の生物学の基礎であり、特にあらゆる生物学の領域で存在感を増し続けているゲノム技術に深く関連する。ヒトゲノムは30億塩基対であり、最近のT2Tゲノムではデータストレージ上ではファスタ形式で3,156,259,703バイト、Deflate圧縮すると959,988,815バイトになる。これをわずかな時間で物質としての生き物のDNAから読み取ることのできるNGSがこれほどに強力であるのも、これが紙面上の記録ではなく送受信でき、マッピングやその他バイオインフォマティクスのな処理に利用できるデジタルデータであるからだ。そして、情報をデジタルデータとして送受信できるようになったのは丁度100年ほど前の1916年に生まれたクロード・シャノンが通信路容量というアイデアの意味を示したことに依拠する。ラジオのノイズに明らかのように通信には必ずノイズが乗ってしまうが、シャノンの通信路符号化定理によれば通信路容量を超えない限り我々は完璧に正確な情報を送受信することができる。シャノンについて長々と扱うのは、彼に生きかえってもらうためである。実はシャノンは、ブル代数をつかっただけの回路を方程式で表現する修士論文を書いた後に、少しの間CSHで遺伝学の研究をしていた。ヒトゲノム解説の2年前に亡くなってしまったシャノンには彼の作った情報理論の産物が生き物の秘密を次々に解き明かす世界で活躍することはできなかったが、彼がAT&T社のベル研究所の技報に載せた論文「A Mathematical Theory of Communication (通信の情報学理論)」を我々が読んで彼の代わりに実行すればよい。

デジタルの方はシャノンと呼ぶとして、バイオの方は誰を呼ばばいいだろうか。NGSをもっとも素晴らしい使った「Who we are and how we got here(交雑する人類)」のデイヴィッド・ライクによればNGSは17世紀における顕微鏡のような存在であるそうなので、フックはどうだろうか。科学哲学者カンギレムによれば顕微鏡は手段に過ぎず、これを用いて細胞理論、つまり、どんな生き物も細胞で出来ていて、細胞は細胞からのみ生じるという認識こそが細胞の発見であるそうなので、細胞の認識あたりの人がよいかもしれない。生物工学に関連の深いところとしては、なによりも培養が重要であろう。培養された細胞は個体の細胞とは違う。培養環境の細胞は増えつづけることができる。カンギレムによれば、培養環境(milieu)が個体の中で受けていた支配から細胞を解き放つ(libère)ことが重要であるらしい。フォーカスが絞られてきた。こういったことを最初のころに見つけたのはチャンピーであろう。彼の1913年の論文によれば「培養する前の組織の特徴を維持したまま培養し続けることはできなかった。脱分化(dédifférenciaient)することで細胞は増殖する」そうなので、今日我々が生物工学の恩恵に預かることができるのもこの作用のおかげかもしれない。

ここまでデジタルの偉人とバイオの偉人と呼びだすことができたので、あとはこの100年前に生まれた偉人と100年前に培養して論文を書いていた偉人を交尾させて卵を取れば良い。なんでも良いから細菌なり哺乳類のセルラインなりをフラスコやジャーで培養すると、細胞は培養環境で活発に増殖し、やがて培養器にいっぱいになって増殖を止める。どこでも必ず再現するプロセスを100年前の偉人はどうしてくれるか。チャンピーがいうには、分裂が脱分化に関連する表裏の事態として、増殖しなくなった細胞は分化していくだろう。細菌の形態はよくわからないし、哺乳類細胞は細胞径こそ大きくなったものの浮遊細胞の丸い形のままであるし、正直なところデブリが邪魔でよく見えない。17世紀の顕微鏡そのものではその程度で仕方ないので、17世紀における顕微鏡に相当する21世紀のNGSを使ってトランスクリプトームをとることにした。デジタルデータになったのでシャノンにバトンタッチすると、彼の情報量の定義式によれば個々の頻度と対数変換した頻度の総和が情報エントロピーであるので、トランスクリプトームを遺伝子ごとの頻度の値のデータセットとみなして情報エントロピーを求める。すべての培養において、細胞が培養器でいっぱいになるにつれて情報エントロピーの値は小さくなっていった。細胞のステータスとして、増殖速度や細胞の大きさ、生細胞率に加えて分化程度を取り込むことができそう。これを使えばいつ細胞を収穫すればよいかが一目瞭然だし、細胞増殖のはやがが異なった培養でも分化程度を揃えて比較することができる。このアイデアは発表されてから10年ほどの間に多数の研究者によって再現されてきた。細胞の分化/脱分化とはトランスクリプトームの情報エントロピーとして定量化することではじめて一般化できるものと考えられる。シンボジウムでは事例を紹介するとともにより近代的な情報理論をつかって分化/脱分化をさらに一般化させる。

Digital Biology of Compression and Classification

○Norichika Ogata^{1,2,3}

(¹Nihon BioData Corporation, ²MAB, ³Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words bioinformatics, transcriptome, Chinese hamster ovary cell, virus

4E06-06 バイオ DX によるスマートセル開発

○蓮沼 誠久^{1,2,3}

(¹神戸大・先端バイオ工研セ, ²神戸大院・科技イノベ, ³理研・環境資源)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

生物資源とバイオテクノロジーを用いて地球規模の課題解決と経済発展の共存を目指す概念は「バイオエコノミー」と言われ、欧米諸国をはじめ、多くの国が戦略的な取り組みを進めている。経済協力開発機構はThe Bioeconomy to 2030の中で、加盟国のバイオ産業規模が2030年に1.6兆ドルに成長すると予測している。分野別みると39%が工業(モノづくり)分野で占められている。バイオエコノミーの形成が国際的潮流にある背景には、バイオ技術と情報解析技術の革新がある。例えば、次世代シーケンサーの登場、質量分析装置の高感度化、バイオインフォマティクスの進展により、バイオデータ(ゲノム配列情報、遺伝子発現情報、タンパク質情報、代謝物情報等)が爆発的に増加し、開発した細胞株の設計が可能になってきた。また、DNA合成が安価となり、CRISPR/Cas9をはじめとする遺伝子工学ツールの充実により、細胞株の設計図を具現化する手段が整備されつつある。さらに、細胞の培養やアッセイを自動で行うロボティクスの開発も行われ、短期間に大規模なデータを取得することが可能になってきた。さて、バイオものづくり分野では、持続可能な物質製造プロセスの構築に向け、微生物による低分子化合物生産が求められている。その中で演者らは、計算科学的手法による代謝経路や酵素の設計、ロボティクスによる組換え微生物株の大量生成とハイスループット評価、メタボロミクスによる代謝メカニズム解析、機械学習による有効遺伝子の絞り込み等を可能にする技術開発を進めてきた。こうした要素技術の開発と統合は「スマートセル(計算科学により機能がデザインされ、その機能が先端バイオ工学により具現化された細胞)」の創出を可能とし、スマートセルは有用化合物の生産に活かされている。近年、バイオ工学とデジタル技術の融合により、産業展開可能な微生物株や酵素が続々と開発されてきている。一方で、こうした革新の源泉はデータであり、それを生み出す分析評価技術である。演者らは超臨界流体を用いたハイスループットな微生物スクリーニング技術や、前処理工程の自動化により再現性を飛躍的に向上させたメタボロミクス技術等を開発してきた。本講演では、これらを組込んだ世界初の「スマートセル創出プラットフォーム(バイオファウンドリ)」を紹介したい。

Development of smart cells using Bio DX

○Tomohisa Hasunuma^{1,2,3}

(¹EGBRC, Kobe Univ., ²Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., ³CSRS, RIKENS)

Key words metabolic engineering, enzyme, microbe

4E07-01 Well-being を志向したエンジニア教育の試み

○小林 幸人
(国立高等専門学校機構)
kobayashi@kosen-k.go.jp

1. VUCA の時代と Well-being

近年 Well-being に関する科学的な研究が活発になり、様々な政策にも導入されている。例えば「第6期科学技術・イノベーション基本計画」や教育未来創造会議第一次提言「我が国の未来をけん引する大学等と社会の在り方について」では、一人一人の多様な幸せと社会全体の豊かさの実現を今後目指すべき社会と表現している。またデジタル田園都市国家構想では Well-being が目指すべき社会を構成するひとつの価値であるとともに構想実現の取り組みの成果指標として Well-being を採用している。

このように、VUCA と表現される予測困難な時代において、我々が目指すべき社会の在り方は、個人の多様な Well-being と社会全体の Well-being が矛盾なく成立することにあると考えられる。それゆえ高等教育の目的のひとつが社会に貢献できる人材育成にあるとすれば、Well-being の実現、向上が教育の目的と考えるのは当然のことだともいえる。一方で学びは学習者自身が自らの Well-being を考え、実現するために必要である。つまり他人や社会の Well-being の実現に貢献するために必要な資質・能力の育成、及び自分自身の Well-being の実現が教育において重要な目的である。こうした視点から検討しているのが「Well-being を志向したエンジニア教育」である。

2. エンジニア教育と Well-being

エンジニアの活動が人々や社会の Well-being の実現、維持、向上に資するものであることはいまさら言うまでもない。しかし安全性や効率性、機能性あるいは経済性などの価値に比して、Well-being そのものについてエンジニア教育の中で具体的に扱われることはなかったように思われる。

たとえば我が国で本格的に技術者倫理教育が広く導入されて以来、主として扱われていたのは予防倫理的観点であった。人々や社会に対して害悪を与えることのないように、エンジニアには専門職としての責任、義務があるという考え方である。これ自体は決して間違っていないが、一方でエンジニアの活動は害悪の発生を防止に留まるものではない。答えが与えられていない問題を解決する方法を新たに実現し、あるいは新たな価値を創造することにより、人々や社会の幸福実現に貢献することもまたエンジニアの活動によってもたらされる効果である。それゆえ、技術者の倫理教育においては予防倫理的観点だけでなく、志向倫理的観点が重要である。志向倫理は、その人の意欲や願望に基づき、自らが同意する責任を果たそうとする態度から捉えられるものである。

志向倫理的観点から技術者教育を考えると、学習者がエンジニアとして何を實現しようとしているのか、エンジニアとしてどのような価値にコミットし、その責務を果たそうとするのかという問題を考える必要がある。つまり、学習者自身の価値観を問い直し、自己理解の再構成を促進する教育的介入が求められることとなる。

この志向倫理的観点が Well-being に志向したエンジニア教育にとっては重要である。学生がエンジニアとしての自分自身の理想を反省的に捉え、かつ自分自身の Well-being について改めて考えていく過程を通して、人々や社会の Well-being の実現、向上に貢献し、そのような活動が自分自身の Well-being とつながることが可能となると考えている。

3. Well-being を志向するエンジニア教育プログラム試案

さて Well-being を志向するエンジニア教育を実現するためには、まず Well-being について改めて考えることが不可欠である。近年活性化している Well-being に関する科学的・実証的研究は、Well-being あるいは幸福が多様な要素から構成される概念であると示唆している。特に近年の研究では、Well-being を単に経済的、あるいは快楽主義的 (hedonic) な観点から捉えるのではなく、多様な観点から捉えられる十全な (eudemonic) 概念として理解されることが重要であるとされる。こうした研究成果を知識として習得することが、Well-being について理解を深めていくために必要となる。

また Well-being は個人の価値観に関わる問題である。したがって、特定の生き方や考え方を正しいものとして強制する (あるいは否定する) ことは許されないが、学生の考え方のメタ認知や変容を促す教育的介入は極めて重要となる。また、こうした教育的介入は、様々な学習過程を通じた学生のメタ認知スキルの習得を目指すものである。Well-being に関する知識・情報の習得、メタ認知スキルの習得・活用、それを通じた学生自身の価値観の変容・再構成、この3つの観点が Well-being を志向するエンジニア教育プログラムの基盤となる Well-being Literacy 教育を構成する。

Well-being を志向するエンジニア教育は、従来おこなわれてきたエンジニア教育に Well-being の視点を導入することにより、エンジニアリング、エンジニアとしての自分自身、その意味や役割を改めて考えるきっかけを提供する。学生が Well-being についてどのような考えを持つかは、各人の自律に委ねられる問題である。しかし、VUCA と言われる時代において、人々や社会、そして自分自身の Well-being を反省的に考察し、変容を促す教育的介入は極めて重要であると考えている。

A trial to develop well-being-oriented engineer education

○Yukito Kobayashi
(National Institute of Technology)

Key words well-being, aspirational ethics

4E07-02 科学者の well-being のための志向倫理

○片倉 啓雄
(関西大・化生工)
katakura@kansai-u.ac.jp

してはいけないこと、遵守すべきことを学ぶ予防倫理に対して、為すべきことを考えるのが志向倫理である。未知・未開に挑む科学者は、得られた知や利便を社会実装するために必要な様々な問題を解決し、必要なルールを整える役割を担う。このため科学者には志向倫理的素養が求められ、それをもつことは科学者自身の well-being につながる (本講では well-being を「幸せ」と訳す)。

1. 予防倫理と志向倫理

これまでの倫理教育や研修では、してはいけないこと、遵守すべきことが強調される傾向にあった。既存のルールや規範を説明し、その尊重を説く予防倫理が重要であることに議論の余地はないが、科学者にとっては十分ではない。なぜなら、ルールや規範は同じ問題を繰り返さないための申し合わせであり、後追いであるのに対して、科学者は新規性を重視するからだ。

科学者 (研究者・技術者) は、まだ誰も知らないこと・まだ誰もできないことを解明・解決し、社会に新しい技術やサービスを提供することを目指している。しかし、科学によって得られた知や利便が社会実装される過程で様々な問題が生じる。例えば、医薬品による副作用、内燃機関による大気汚染や地球温暖化、インターネットによって生じるプライバシーや著作権の問題などである。これらの科学によって生じる問題を予測し、対応するのが工学 (engineering) であり、その実務に携わるのが技術者 (engineer) と言えるだろう。そして、これらの問題を予測できる可能性が最も高いのも、最も効果的な対応 (法律・ルール) を提案できるのも科学者であるはずだ。ゆえに、科学者は研究・開発をするだけでなく、自らの活動が社会にどのような影響を与え、自分たちは社会の安全・安心にどのような関わるべきかを考える必要があり、そのために志向倫理的な素養を身に付ける必要がある。

2. 脱慣習レベルの倫理意識

Kohlberg は人の倫理意識の形成過程を3つの段階に分けて考察している。褒められるか罰せられるかで善悪を判断し、得損で行動を選択する前慣習レベル、他人に良いと認められる行為を善とする慣習レベル、自己の良心に沿った行為を善とする脱慣習レベルの3つである。罪せられるからしない、ルールより利益を優先する、という考え方は、幼児と同じ前慣習レベルの倫理意識でしかなく、ルールや規範は、実はこのレベルに対応するものである。人は成長に伴って周囲や組織に配慮するようになり、ルールや多数決に従い、公序良俗の概念を理解する慣習レベルの倫理意識をもつようになるが、科学者にとってはまだ十分ではない。科学者は知や利便の創造にともなう問題を予測し、それを防ぐ新たなルールを提案できなければならないからだ。そのために、既存のルールや権威者のことばの背景を理解した上で、自己の良心に照らして自律的に判断できる脱慣習レベルの倫理意識が求められる。

3. Well-being とは

1998年に米国の心理学会の会長に就任した M. Seligman は、well-being の科学としての研究を提案した。その成果によれば、Well-being は測定可能であり、Positive emotion (楽しく過ごせる幸せ)、Engagement (没頭できる幸せ)、Relationship (友好関係を保てる幸せ)、Meaning (価値を認めるものに貢献する幸せ)、Achievement (達成する幸せ) の5つの要素で構成される幸福としている。このうち最も重要なものが Meaning であり、これを得られれば幸福度が高まるとされている。ところが、「あなたが『幸せだ』と感じた状況のベストシーリー」と問うと、Meaning に該当するものをあげる者は、大学1年生では2~4%、社会人でも5~7%しかいない。その内容としては、学生の場合、チームに貢献できた、ボランティアや文化祭の企画を評価された、などが、社会人の場合は、家族に感謝された、製品化された、などがあがり、共通するものとして、誰かの役に立てた (必要とされた)、があげられる。

4. 科学者の Well-being

科学によって得られた新たな知や利便に派生する問題の多くは、人々の安全・安心や地球環境に関わる問題であるが、これを解決しようとするれば、利便の制限やコストの問題が生じる。つまり、安全性・経済性・利便性は互いにトレードオフの関係にあり、この問題に対して科学者は、二者択一や単純な妥協ではなく、価値対立そのものを解消する創造的第三案を目指さなければならない。安全とは受け入れられないリスクがないことを言い、ゼロリスクはあり得ないので、実践的には、安全性・経済性・利便性の「よりよい」バランスの実現を目指すことになる。その際には、安全に対する価値 (どこまでのリスクを受け入れるか) が極めて多様であり、動的であることを理解したうえで、何を為すべきかを考える志向倫理に基づいた行動が必要になる。これは容易なことではないが、その実現を目指すことは、社会の安全・安心という誰もが価値を認めるものに貢献する活動であり、科学者・技術者にとって Meaning に他ならない。教員や組織のリーダーは、学生や構成員が思い描く自分の将来を「新たな知や利便を提供する姿」から「社会に安全・安心を提供する姿」にレベルアップするよう導くことが大切であり、それは私たち科学者の well-being にもつながるはずだ。

Aspirational ethics for well-being of scientists

○Yoshio Katakura
(Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words well-being, aspirational ethics

4E07-03 学生の主体性を育む仕掛けづくり

○岡野 憲司
(関西大・化生工)
okano.k@kansai-u.ac.jp

大学における教育研究の目的の一つは「主体的に」物事を探求できる人材を育成することである。無論、主体性は「主体的に動きなさい」と言われて身に着くものではなく、学生個々人の意識改革が必要である。演者は研究室運営において、学生が主導する「ラボミーティング、サイエンティフィックコミュニケーション、ノウハウトランスファー」の仕組みを導入することで意識改革を促しており、この取組みの利点や問題点を共有したい。

【ラボミーティング】企業の生産現場では、経営陣に指示されるのではなく、現場の作業者が知恵を出し合い、作業効率の向上や、安全性の確保といった職場改善を行う風土がある。この「カイゼン」活動に習い、日々の研究活動を通じて得た気づきや問題点を学生間で共有し、その改善方法を考えて実践に移すためのミーティングを定期的に開催してもらっている。ポイントは、毎回進行役を変えること、提案された改善方法に効果があったかを確認すること、即断・即決で会を進めることであり、学生全員に当事者意識やトライ＆エラーの考え方が身につくように工夫をしている。流し台に配置した洗瓶を実験台に持ち出したまま行方不明になるという問題に対して、実験台という実験台に洗瓶を配置するといった珍アイデアが飛び出すことなども多々あるが、多少の珍行動や出費には目をつぶることが主体性育成に肝要だと感じている。

【サイエンティフィックコミュニケーション】こういった活動をしていると、研究室マネージメントばかりに目が行き、本業である研究や勉学がおろそかになる学生もいる。また、そもそもの問題として、受動的な学習形態が体に染みつき、研究活動において自ら何かに興味をもって学ぶことができないという学生もいる。そこで、日常生活に科学との接点をつくるという目的のもと、分野を問わず科学の話をするという朝会を行っている。いわゆる雑誌会とは異なり、英語の文献や専門分野の文献を紹介する必要はなく、気になった科学のトピックを紹介するだけの会である。無論、初めのうちは何の話しようかとネタ探しに悩むこともあるが、日常生活において科学に触れることが当たり前になればよいものである。

【ノウハウトランスファー】組織の運営には知識や技術の継承が重要であり、その観点から、先輩が主体的に後輩の育成を行う仕組みづくりが重要であると考えている。そこで、演者は学生の助力を得ながらラボ運営に最低限必要なノウハウを全てマニュアル化し、それをもとに新たに研究室に配属された学生に対して一か月程度の研修を実施した。初年度以降は本マニュアルをもとに、先輩から後輩に対して研修を行うというシステムを導入している。年度ごとのマニュアル更新や研修のスケジューリングなども学生が行うことで、後輩育成への責任感が芽生えるように工夫をしている。

以上が学生の主体性を育むための演者の取り組みであるが、もちろん全てが上手く機能しているわけではない。ただ、少子化の一途を辿るわが国において、全ての学生の能力のボトムアップを図るという考えを捨ててしまつては、深刻な人材不足に陥ることは目に見えている。したがって、われわれ教員は、教育研究のためのアイデアを考え、共有し、これらをブラッシュアップしていくことが重要となるであろう。

Trials to foster student independence

○Kenji Okano
(Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words know-how transfer, scientific communication, lab meeting

4E07-04 リベラルアーツ教育を通した実践事例

○池田 翼
(熊本高専)
t-ikeda@kumamoto-nct.ac.jp

熊本高等専門学校では、令和元年度より導入を開始した新カリキュラムにおいて、分野横断的能力（あらゆる領域で基盤となる諸能力や態度）の育成を企図したリベラルアーツ教育を展開している。ここでは、本校八代キャンパスにおけるリベラルアーツ教育の概要および成果と課題を報告する。

【リベラルアーツ教育の概要と実施状況】

本校のリベラルアーツ教育は、各学年に設置されたコアとなる科目を中心としながら、各授業やプログラムに展開する設計としている。コア科目については、1年次より開始し、4年次（大学1年生相当）までの各学年において全学科（機械系・生物系・建築系）共通の必修科目として開講中である。各学年の大まかな内容と特徴を次に挙げる。

・第1学年対象の「リベラルアーツ入門」は、コア科目の導入として位置づけ、講義および演習を中心として設計している。リベラルアーツ教育の目的をはじめとし、主体的な学び方等のアカデミック・スキル、あるいは Well-being やキャリアプランニングに関してレクチャーしたのちに、共通教育科目の担当者によるオムニバス形式でのコンテンツを展開する。担当者は社会系・数学系・体育系・情報系など多岐にわたる分野の教員であり、それぞれの正課科目では取り上げない、かつ、分野横断的能力育成への働きかけに資するテーマを設定している。なお、前述のとおり座学が中心ではあるものの、グループワークやプレゼンテーション等のアクティブラーニングも多く取り入れている。

・第2学年対象の「リベラルアーツ実践 I」では、1年次での学びを踏まえた PBL 型学習を展開している。活動を開始するにあたって、分析的思考や統一的思考に関するレクチャーを実施したうえで、SDGs の任意のテーマを足掛かりにして各自で解決すべき問題を設定する。このとき、学科混成によるグループングをおこなうことで、多様性・他分野理解やリーダーシップ・メンバーシップの育成もはかっている。各グループにて議論と検討を重ね、最終的には課題解決のための「コンセプト」を提案するプレゼンテーションをおこなう。検討の過程では、行政や地元企業・地域団体などの外部協力者による助言も参考にする。また、外部協力者による講演によってプロジェクトの進行にヒントを与える取り組みも企画している。

・第3学年対象の「リベラルアーツ実践 II」では、「実践 I」の内容をさらに発展させ、「コンセプト」の提案にとどまらない、ソリューションの「実装」を目的とした PBL を実施している。各学生が「取り組みたいテーマ」をもとにグループを結成し、課題解決に向けた検討を進める。「実践 I」に引き続いて民間・行政問わず外部協力者との連携もはかりつつ、何らかの成果物を提示するプレゼンテーションを目指す。なお、「実践 I」までの評価は合否判定によるが、本科目では、成果物やグループ活動・個人活動の点検結果をエビデンスとして成績評価を施している。また、「実装」を目指したコンセプトの検討には、きめ細やかな助言や専門的なアドバイスが求められるため、上級生（第4学年～専攻科学生）に協力を依頼し、メンターとして授業に参画してもらっている。

・第4学年の「リベラルアーツ実践 III」では、実社会における様々な問題について、専門的な知見も踏まえたうえで解決方法を探る PBL をおこなう。地域の企業等に協力を依頼し、課題を提供いただくことで、クライアント志向・ユーザ志向の視点も導入する。本科目においても成果物を含む多様な観点からの成績評価を施す。

以上の4科目をコアとして、各教科や学科での展開をはかっているところである。

【これまでの成果と今後の課題】

これまで確認できている成果について述べる。継続的に収集している分野横断的能力に関する自己点検結果において、入学直後に比較して学年進行時に伸長が見られている。令和3年度の第2学年対象の分析では、特に「課題発見」や「論理的思考」といった項目で大きな上昇が確認された。また、同学年の年度別比較においても、リベラルアーツ教育導入後に値の上昇が確認できている。平成30年度の第2学年と令和2年度の第2学年の比較では、全体的に値が上昇しており、特に「キャリアデザイン」の項目で顕著な違いが見られた。さらに、eポートフォリオ等で収集した、学生による授業評価や学びの振り返りにおいても比較的肯定的なものも多く、「大変だったが達成感があった」など、困難さを伴うものの学習効果も実感できているという声も少なくなかった。以上のことから、学生の分野横断的能力伸長に際して、本校のリベラルアーツ教育が一定の効果をもたらしているものと考えられる。

今後検討すべき課題は種々あるが、第一には学内外の人的リソースの継続的な確保及び拡充である。先述のとおり、外部協力者や上級生メンターの助力によって PBL 活動を充実したものにしていくが、これを継続的に確保するのみならず、拡充する必要がある。それによって、例えば意欲の高いアクティブな学生やグループが追加的な活動や報告に取り組もうとした際に、より効果的な後押しやサポートが可能になる。

Practical examples through liberal arts education

○Tsubasa Ikeda
(NIT, Kumamoto College)

Key words liberal arts, Project-Based Learning, well-being

4G06-01 はじめに～解糖系：代謝研究の原点にして頂点

○渡辺 大輔

(奈良先端大・バイオ)

watanabe.daisuke@bs.naist.jp

本年は、解糖系の主要経路として知られるエムデン-マイヤー-ホフ経路の発見者の一人である Otto Meyerhof のノーベル賞受賞から 100 周年にあたる。100 周年記念大会は、解糖系研究の偉大な歴史を俯瞰すると共に、新たな代謝研究への展望を考えるのに相応しい舞台となると考え、このシンポジウムを企画した。

解糖系は、ほぼ全ての生命がもつエネルギー代謝経路であり長年にわたる研究の歴史を有する。がんや糖尿病をはじめとする疾患との関わりや、アルコール発酵、乳酸発酵などの微生物生産の観点からも重要性は高い。ところが、遺伝子、タンパク質、代謝産物レベルで厳密かつ精緻に働く解糖系調節メカニズムの全体像の理解は程遠い。本シンポジウムでは、代謝酵素ダイナミクス（メタボロン、環境応答シグナル伝達）、代謝フラックス制御、代謝シミュレーションインフォマティクスなど最先端の知見に基づく解析事例を取り上げ、解糖系研究の面白さと奥深さを聴衆と共有し、他の代謝経路の研究者にとってのロールモデルとして新たな気付きを生み出すことを目指す。

Introduction - Glycolysis: The origin and summit of metabolic studies

○Daisuke Watanabe

(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words glycolysis, alcoholic fermentation, metabolic pathway, metabolic control

4G06-02 質量分析インフォマティクスの研究開拓による代謝多様性の理解

○津川 裕司^{1,2,3}

(¹農工大, ²理研・環境資源, ³理研・生命医科学)

htsugawa@go.tuat.ac.jp

生物工学における代謝と言えば、少なくとも発表者は解糖系を最初に思い浮かべる。解糖系はグルコースからピルビン酸に至るまで十数種の代謝物によって構成される。しかしながら、生物は解糖系以外にも糖質、タンパク質、脂質、そして核酸といった生命活動に必須の様々な代謝物を産生する。たとえば、ヒトの多種多様な細胞は脂質の二重膜で構成されているが、昨今の研究によりその多様性は 10 万種を超えと言われている。また自然界に目を向ければ、植物が創成する天然物の総数は 100 万以上と推定されている。このような多様性を理解することは生命の基本原則の理解に貢献するだけでなく、未利用生物資源の迅速開拓および健康長寿社会設立に向けた新たな予防・治療法を確立するための重要な知見を与える。

このような代謝多様性を捉えるための技術として、液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) があり、メタボロミクス研究で頻用されている。また、生体分子の溶出時間 (保持時間)、m/z、同位体パターン、そしてマスフラグメンテーションのパターン (MS/MS) を標準品ライブラリーと比較することで、代謝物のアノテーションが可能となる。しかしながら、LC-MS/MS には数万種を超える生体分子情報が含まれることから、このようなピーク検出、アノテーション、そして多検体データの比較解析作業は、人間が目視手作業で行えるレベルではなく、質量分析インフォマティクスの研究開発が必須となる。

我々はこれまで、質量分析に基づくオミクス科学を円滑に進めるためのデータ解析プログラムである MS-DIAL の開発に取り組んできた。このプログラムは、質量分析計測データを入力、そして統計解析に資する代謝物データ (データ行列) を出力する。現在、主要質量分析メーカーのデータに関しては直接読み込みが可能であることに加え、GC-MS や LC-MS といった幅広い分析モードに対応しており、世界レベルで人気の高いプログラムとなっている。一方、代謝物アノテーションには課題が多く残されており、質量分析より得られる代謝物イオンのうち 80% 以上が未知ピークとして残されているのが現状である。

そこで本発表では、新しいマスフラグメンテーション法を利用し、そのマスペクトルを解釈するためのアルゴリズムを構築することで、これまでよりも高深度な脂質構造解析を可能とするプラットフォームについて紹介する。本研究により、従来法では識別することが困難であった複合脂質中の二重結合位置やアシル基の位置異性体を迅速に決定し、高解像度のリビドミクス研究が可能となり、基礎研究だけでなく疾患の背後に潜む分子メカニズムの理解に貢献できると期待される。

Understanding the metabolisms of living organisms by the advance in computational mass spectrometry

○Hiroshi Tsugawa^{1,2,3}

(¹Tokyo Univ. Agric. Technol., ²CSRS, RIKENS, ³IMS,RIKEN)

Key words metabolic analysis, membrane lipids, metabolism

4G06-03 細胞の代謝振動と共生動態

○雨宮 隆
(横国大)
amemiya-takashi-jk@ynu.ac.jp

はじめに
細胞のエネルギー代謝において代謝産物濃度の振動が観察されている。特に、解糖系で見られるこの振動は解糖系振動と呼ばれ、細胞レベルの生物学振動として理論・実験の両面からさかんに研究が行われてきた。
解糖系振動は、酵母細胞をはじめ膵臓のβ細胞や心筋細胞、白血球の一種である好中球やがん細胞などで観察されている。β細胞の解糖系振動は、インスリンのパルスの分泌を引き起こし、それによって少量のインスリンで効率的に血糖値を下げているとの研究がある (Benninger and Piston, 2014)。しかし、ほかの細胞がなぜエネルギー代謝でこのような非線形振動を起こすのか、生命にとってその役割や機能はよくわかっていない。
もともと解糖系には、「エネルギー (ATP) 獲得の収率より時間効率を上げる」という機能がある (Pfeiffer et al., 2001)。また、「振動的なエネルギー代謝は定常的なエネルギー代謝よりも単位時間当たりのエネルギー貯蓄率 (ATP/ADP 比) が高い」との数理モデル研究がある (Termonia and Ross, 1981)。これらを考え合わせると、解糖系振動には細胞にとって時間的に効率的な何らかの生命機能があるように思われる。

がん細胞の解糖系振動

講演者らの最近の研究により、がん細胞はグルコース飢餓を経ると代謝産物濃度を時間的に振動させながら糖代謝 (解糖系振動) を行うことが分かってきた (Amemiya et al., 2017; 2019; 2021(a); 2021(b))。がん細胞は通常の細胞とは違い、好気的環境でも嫌気呼吸である解糖系を亢進させる。がん細胞で見られるこのような糖代謝は古くから知られていて Warburg 効果と呼ばれている (Warburg, 1926)。がん細胞はこれにより ATP と増殖に必要な生体高分子を高い時間効率で獲得していると考えられている (Heiden et al., 2009)。解糖系の亢進は増殖細胞にとって有利な選択なのである。
がん細胞がなぜ解糖系振動を起こすのかはよく分かっていない。しかし、がん細胞の生命機能が「増殖と転移」であるならば、悪性度が高く解糖系を強く亢進するがん細胞ほど高い周波数で解糖系振動を起こすものと筆者らは推論している (Amemiya et al., 2021(a), 2021(b))。なぜならば、解糖系酵素群の活性が高いほど解糖系振動の周波数は高くなると考えられるからである。この推論については、細胞実験と数理モデル研究の両面から検証を進めている。

脳細胞のエネルギー代謝

脳細胞は神経細胞とグリア細胞から構成される。グリア細胞の1種であるアストロサイトはがん細胞とは生物学的には全く異なるものであるにもかかわらず、特殊な代謝的類似性がある。すなわち、アストロサイトもがん細胞のように、好気的環境においても嫌気呼吸である解糖系を亢進させるのである。
脳の活動が活発であるとき、ニューロンのエネルギー源はアストロサイトから供給される乳酸であるとの仮説 (ANLSH : Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Hypothesis : Pellerin and Magistretti, 1994) がある。このように脳内で密接な細胞間相互作用をもつアストロサイトは「増殖と転移」が目的のがん細胞とは異なる理由で解糖系を亢進していることは明らかである。講演者らは、アストロサイトにおいても解糖系振動が観察されるものと考えている。また、解糖系振動を利用した ANLSH の検証を現在研究中である。

細胞共生動態

がん細胞と正常な脳細胞は生物学的には全く異なるものである。しかし、細胞のエネルギー代謝に着目すると、両細胞には好気的環境においても解糖系を亢進させてグルコースから乳酸を産生するという類似性があるのは興味深い。さらに、アストロサイトとニューロンが代謝共生を行っていると考えられているように、がん細胞も近隣の細胞との間で代謝共生を行うとされる。
近年、腫瘍内で解糖系を亢進させて乳酸を産生する線維芽細胞と、その細胞から滲出した乳酸を受け取りミトコンドリアで代謝するがん細胞とのエネルギー共生が提唱された (Nakajima and Van Houten, 2013)。これは従来のがん細胞の Warburg 効果に修正を迫るもので大きな注目を集めているが、その真偽を含めまだ十分には解明されていない。
がん細胞と線維芽細胞との間で代謝共生が行われれば、乳酸輸送に関わるこれらの細胞間には必然的に donor-acceptor の因果関係が成り立つはずである。そしてこの因果関係は、解糖系振動から乳酸代謝で発生するミトコンドリアの膜電位振動 (Olsen et al., 2009) へと伝播する代謝情報の中に記録されている公算が高い。従って、線維芽細胞の解糖系振動と乳酸輸送を介して誘導されるがん細胞のミトコンドリアの膜電位振動との時間・空間的因果性を統計学的に解析することにより、がん細胞の共生的エネルギー代謝を直接証明できると推論している。

Metabolic Oscillations and Dynamic Symbiosis in Cells

○Takashi Amemiya
(Yokohama Natl. Univ.)

Key words metabolic oscillations, cancer cells, brain cells, symbiosis

4G06-04 NMR 解析を用いた解糖系酵素 PGK による解糖流量調節機構の解明

○八木 宏昌¹, 葛西 卓磨¹, Rioual Elisa¹, 池谷 鉄兵², 木川 隆則¹
(¹理研・生命機能,²都立大・理)
hiromasa.yagi@riken.jp

解糖系は生体が持つエネルギー獲得のための中心代謝経路であり、その流量 (解糖流量) は細胞環境によって厳密に制御されている。また多くの癌細胞では解糖系が亢進し解糖流量の増大が見られる。そのため、細胞の環境変化に呼応した解糖流量の調整機構を正確に理解するには、解糖系を構成する各酵素の活性制御機構を細胞内あるいは細胞環境に近い状態で解析する必要がある。解糖系酵素の一つであるホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) は、ADP にリン酸を付加することで ATP を合成し、同時に 3-ホスホグリセリン酸 (3PG) を産出する。また糖新生ではその逆反応を担い、両方向へのリン酸転移反応を触媒する酵素である。今回我々は、核磁気共鳴法 (NMR) の手法を用い、生理塩濃度の水溶液中と実際の細胞中におけるヒト由来 PGK (hPGK) の基質結合状態を原子レベルで解析した。その結果、ADP と 3PG の結合には負の協同性が、また ATP と 3PG には正の結合協同性がみられ、hPGK はこれらを巧みに利用することで、細胞内の ATP/ADP 濃度比に応じて触媒反応を制御していることを明らかにした。このことは、hPGK は細胞内 ATP 濃度を感じながら自身の活性をコントロールし、それによって解糖流量を調節していることを示唆している。さらに、この基質結合協同性は生理塩濃度下で最適に発揮できるよう精巧にチューニングされており、その自由エネルギー差は非常に小さいことが明らかになった。これらのことから、今回明らかになった制御機構は、細胞の環境変化に迅速に対応できるように両方向への反応を触媒する酵素に備わった、タンパク質レベルでの環境適応的な制御機構だと考えられる。

Molecular mechanism of glycolytic flux control by PGK using NMR analysis

○Hiromasa Yagi¹, Takuma Kasai¹, Elisa Rioual¹, Tepei Ikeya², Takanori Kigawa¹
(¹BDR, RIKEN, ²Grad. Sch. Sci., Tokyo Metro. Univ.)

Key words glycolysis, enzyme regulation, ligand-binding cooperativity, NMR

4G06-05 細胞質に蓄積したミトコンドリア代謝酵素によって引き起こされる異所性代謝ストレス

○中務 邦雄
(名市大院・理)
nakatsukasa@nsc.nagoya-cu.ac.jp

ミトコンドリアのタンパク質の大部分は、細胞質で標的化シグナルを含んだ前駆体として合成され、膜透過装置を介してミトコンドリア内へ取り込まれる。しかし、細胞の老化や神経変性疾患に関わるタンパク質の蓄積によって、ミトコンドリアへのタンパク質取り込み反応は阻害されることがある。取り込み反応の阻害によって細胞質に蓄積したミトコンドリア前駆体タンパク質は、ユビキチン・プロテアソーム分解系を介して除去されることが明らかにされつつある。過去5-6年の間に、ミトコンドリア関連分解 (MAD, mitoTAD)、ミトコンドリア関連リボソーム品質管理 (mitoRQC)、ユビキリン依存性分解、ER-SURF、核関連分解経路など、誤局在した前駆体タンパク質の様々な分解経路が報告されてきた。また、前駆体タンパク質の蓄積によって、プロテアソームおよび分子シャペロンの発現が誘導され、前駆体タンパク質の分解が促進されることも示された。

このように、ミトコンドリア前駆体タンパク質の品質管理に関わる因子は明らかにされつつあるが、品質管理機構の破綻によって細胞質に蓄積した前駆体タンパク質がどのように細胞障害を引き起こすのか、その機序はほとんど明らかにされていない。これまでに、前駆体タンパク質が毒性のある凝集体を形成することで、細胞障害を引き起こす可能性 (proteotoxic stress) が提案されている。すなわち、前駆体タンパク質はミトコンドリアへ取り込まれる前に細胞質でアンフォールドした状態にあると考えられているので、細胞質に留められた前駆体の凝集を阻止するために分子シャペロンが動員され、他のタンパク質の立体構造形成に影響を及ぼし、結果としてグローバルなタンパク質恒常性の障害を引き起こすという可能性である。

我々はミトコンドリアのクエン酸合成酵素をモデルに、前駆体タンパク質の蓄積に対する細胞応答を調べた。細胞質に蓄積したクエン酸合成酵素前駆体は、申請者が以前同定した新規ユビキチンリガーゼ SCF^{Ucc1} (Nakatsukasa et al., 2015) を介してプロテアソームによって分解された。また、Ucc1-基質複合体の構造解析から、クエン酸合成酵素前駆体は細胞質において活性を発現する可能性が強く示唆された。細胞質で異所的に合成されたクエン酸は、アミノ酸量の変動や核酸の枯渇など、グローバルな代謝不均衡を引き起こすことも見出した。しかしこの時、翻訳抑制が誘導され、より深刻な細胞障害を防いでいることも明らかになった。以上の結果から、ミトコンドリアの膜透過能の低下は、前駆体タンパク質の凝集によるタンパク質性のストレス (proteotoxic stress) だけでなく、活性をもつ代謝酵素前駆体による「異所性代謝ストレス (ectopic metabolic stress)」も引き起こすことが示唆された。

Accumulation of mitochondrial metabolic enzyme in the cytosol elicits ectopic metabolic stress

○Kunio Nakatsukasa
(Grad. Sch. Sci., Nagoya City Univ.)

Key words mitochondria, TCA cycle, ubiquitin ligase, degradation

4G06-06 解糖系酵素が形成する細胞内集合体とその制御

○三浦 夏子
(大阪公立大院・農)
miuran@omu.ac.jp

解糖系酵素群はマイコプラズマからヒトに至るまで、幅広い生物種に広く保存される、生物の中心代謝経路を担う代謝酵素群の一つである。従来、解糖系酵素群は細胞質内に一様に分布して機能すると認識されてきたが、各酵素を生体から精製すると、ある臓器や細胞では解糖系酵素のうちいくつかが複合体を形成しているという報告が以前より相次いでいた。しかしながら、蛍光タンパク質でラベル化するなどして細胞質内で酵素の局在をみても、多くの場合、解糖系酵素はやはり一様に細胞質内に存在しているように見える。複数の酵素が担う連続的な代謝反応においては、酵素群が細胞質内に散在しているよりも一か所に集まり、局所的に高濃度に存在していた方が、基質の受け渡しが効率化でき、代謝回転が上昇するという説は30年以上前から知られてきたが、それが生体内で起きているという確証はなかなか得られなかった。我々は2013年に、出芽酵母の細胞質において、解糖系酵素を含む20以上の代謝酵素群が低酸素条件下で可逆的な集合体を形成することを初めて報告した。また、代謝酵素群は集合体形成によって糖代謝を調節していることを示唆する結果を得た⁽¹⁾。集合体形成による代謝の調節は、以前から知られてきた転写制御に加えた新たな制御機構として注目を集めており、この集合体は2017年に出芽酵母とヒトがん細胞株で追試に成功したアメリカのグループによって"Glycolytic body"または"G-body"と名付けられた⁽²⁾。同様の解糖系酵素集合体は、センチュウの神経細胞でも見出されており⁽³⁾、この機構が少なくとも真核生物において広く保存されていることが示唆される。最近になって、ヒトがん細胞では、*de novo* プリン合成系酵素群が形成する代謝酵素集合体"purinosome"も、低酸素条件下で形成されることが報告されており⁽⁴⁾、細胞内には従来考えられていたよりも大規模な代謝酵素集合体群が存在することが明らかになりつつある。我々はこうした、一過的に形成される代謝酵素集合体を Metabolic Enzymes Transiently Assembling (META) body と名付け^(5,6)、その形成原理の解明と応用について研究を進めている。興味深いことに、META body 形成の過程ではいくつかの代謝酵素の集合順序が規定されており^(5,6)、各代謝酵素はそれぞれ集合体形成に関与するドメインを保有しているようである^(1,7)。本発表では各酵素群のアミノ酸配列を解析した結果から、代謝酵素集合体の形成を駆動する仕組みについてディスカッションしたい。

参考文献：(1) Miura et al. 2013 Eukaryot. Cell; (2) Jin et al. 2017 Cell Rep.; (3) Jang et al. 2016 Neuron; (4) Doigneaux et al. 2020 J. Biol. Chem.; (5) Yoshimura and Hirayama et al. 2021 Cell Biol. Int. (6) Miura (2022) Microorganisms; (7) Utsumi et al. submitted.

Intracellular protein condensates formed by glycolytic enzymes

○Natsuko Miura
(Grad. Sch. Agric., Osaka Metropolitan Univ.)

Key words glycolysis, liquid-liquid phase separation, META body, hypoxia

4G07-01 徳島バイオコミュニティ構想 香酸系柑橘を用いた地域活性

○中澤 慶久
(徳島大院・社会産理工)
nakazawa@tokushima-u.ac.jp

徳島バイオコミュニティ構想とは、バイオ戦略 2020 にて制定されている地域バイオコミュニティ戦略の推進を行うものであり、徳島県に存在する有用バイオマスを用いて循環型および低炭素化社会の構築を目指すものである。グローバルバイオ産業の創生を目指して社会実装させて行くことを事業目標としている。更に徳島大学では、内閣府の地域バイオコミュニティの認定を受けるため、同大バイオイノベーションセンターに準備組織を創生し、自治体や地域法人との地域認定を受けるための活動を始めた。

1. 具体的な活動

農業団体(全農徳島県本部)と自治体、徳島大学との間で「産官学連携による地域バイオマスを有効活用した持続可能な農業の実現と関連産業の振興に関する協定」を 2022 年 8 月 1 日に締結し、産官学連携による農業振興による地域経済の活性化する事業を目指している。

2. 実施内容

スタチは徳島県内で 98% を独占生産する香酸系柑橘であり、「徳島県=スタチ」というイメージを持つほど国内では浸透している。スタチの生産量は 2001 年がピークであり約 8 千トン (400ha) が生産されていたが、現在では 4 千トン程度と約半量に激減している。

その理由の多くは担い手不足や少子高齢化という地域課題が主因のひとつとされている。しかし、本質的な課題はスタチの価格が安価であり生産者の多くが魅力を感じなくなり始めたことが原因とみられている。柑橘としてのスタチは小果であり、その果実をひとつひとつ収穫した後、選果などの手間を加えて出荷することに加えて、生果や加工用の収穫期は夏期から初秋の短期間に集中するため重労働と言える。同期に収穫したものを冷蔵保存し生果として通年出荷も実施して農業生産者も多いが、個人で冷蔵設備を有しており電力費などのコスト増が農業経営の足かせとなっている。また、加工用に用いられるスタチの価格は 100 円/kg が JA での買取価格となっている。

スタチの 1 反 (約 10 アール) の収益は約 25 万円が通常の相場とされている。一方で、徳島県下で収益性の高い(農家の生産意欲の高い)とされる春ニンジンでは約 65 万円/反となり、果樹と耕種作物による収益差があるとは言え、栽培作物による収益格差は両者を比較すると倍の価格差となっているため、生産農家はスタチの栽培に経営的な魅力を感じられないと言える。加工用スタチについては、小規模の搾汁工場が県下 4 箇所に分散している状態にあり、生産能力も期間限定的に大量にスタチが出荷されるため処理能力に限られている。それらの設備は昭和後期に導入されたものが多く、現在の食品衛生基準や大手流通における生産量に対応する規模の生産能力もない状況にある。香酸系柑橘の市場動向から推察すると、ユズにおいては加工用のみが増加する傾向にあり、生果の流通は停滞若しくは縮小と言える。スタチにおいても、コロナ禍とは言え生果の流通は停滞しており、2021 年 10 月には 1 日 1 トンのスタチが余剰していると報道される状況にある。

すなわち、消費動向から推察した場合、生活スタイルの簡易化や食文化の変化などから、生果での流通は減少し、加工品を用いる市場へと変遷して行くと考えられる。従って、スタチにおいても加工用を充実させる生産構造への変化が強く求められている。

3. 具体的な解決策

具体的な解決策としては、スタチ搾汁工程で発生する残渣を有効利用した低炭素化かつ高付加価値を生むバイオコミュニティを創成するところを特徴としている。廃棄する残渣は、果実重量の 70% にあたり、スタチの残渣廃棄物で 850 トン(2020 年実績)あり、徳島県下の香酸系柑橘を全体では 1,700 トンに達している。

このスタチ残渣には、芳香に優れた精油(構成成分は複数のモノテルペン類)が 0.4% 以上含有しており、2019 年に県が実施した減圧蒸溜抽出法による先行研究の成果では、付加価値が高いとみなされる精油の抽出(0.3%)が立証されている。

香酸系柑橘の精油の価値は、ユズの実績からも高価格と想定され、香料メーカーにおける評価も一定量の生産を達成することにより事業化が見込まれるとされている。更に、市場性を精査する必要性はあるものの、現在のスタチ残渣廃棄物量から換算しても精油販売事業となる公算は大と言える。すなわち、これまで搾汁廃棄物処理に 1 億円が必要であった抽出残渣であったが、この廃棄バイオマスを有効利用してスタチの生産振興を目的とした地域バイオコミュニティ産業の創成を目指している。

この精油により得られた利益をスタチ生産者に還元するシステムを構築することにより、生産農家の栽培意欲が高まる農産物(もうける農作物)へと変換し、地域課題である担い手不足や少子高齢化、継続者問題などの農業課題を徐々に解決し、魅力のある農村地帯へと転換させる行くことが、徳島バイオコミュニティを創成するひとつの目標である。

Tokushima bio community concept, Regional activity using perfume-based citrus fruit of Sudachi

○Yoshihisa Nakazawa
(Grad. Sch. Biosci. Bioind, Tokushima Univ.)

Key words Local resources, Resource recycling, Perfume-based citrus

4G07-02 バイオマイニング: ~金属代謝微生物を活用したグローバル技術~

○沖部 奈緒子
(九大院・工)
okibe@mine.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

紀元前よりローマ人やフェニキア人は鉱山から流れ出る廃水が金属価値を有することを経験上知っており廃水を集めて銅を回収していたとされる。しかし実際に鉱物からの金属イオン溶出が微生物反応であることが分かったのは 1950 年近くになってからである。それ以来、世界各国で、天然鉱石や精鉱、より近年では都市鉱山などの金属含有廃棄物等からの金属浸出に微生物反応を利用する新しい「グローバル」技術の開発に注目が集まっている。非資源国・日本は金属供給を海外依存するが、各国の鉱山/製錬現場ではこのような金属代謝微生物が利用され、「生物製錬」された金属の一部は知らずして日本でも利用されているだろう。一方、かつて日本も金属採掘は盛んであったが、現在それは重金属汚染された「鉱山廃水」という形で爪痕を残している。製錬も微生物、鉱山廃水発生を引き金になるのも微生物、そして汚染水浄化も微生物、海外や日本で「グローバル」に活躍する金属代謝微生物とその技術について、著者が取り組んでいる研究テーマをいくつか紹介する。

2. 課題

2.1 難処理性/ヒ素含有一次硫化銅鉱の処理

商業規模のバイオリッチング・バイオオキシデーションは、銅、金、ウラン、ニッケル、コバルト、亜鉛を対象に行われている。最も重要なベースメタル、銅を例にとると、概して低品位で難溶解性ではあるが埋蔵量の多い一次硫化銅鉱が注目されている。黄銅鉱(CuFeS₂)を例にとると、その溶解が最大となる酸化還元電位(Eh)帯が存在するため、バイオリッチング反応もその電位帯に制御することが望ましい。これは、鉄酸化菌による Fe²⁺酸化反応によって上昇する電位を逆に抑制する必要があることを意味する。また、一次硫化銅鉱の利用におけるもう一つの難題がヒ素(As)である。硫砒銅鉱(Cu₃AsS₄)等由来するヒ素は不純物として増加傾向にあり製錬所で様々な支障をきたす。バイオリッチング反応中では、Cu は溶かすが As は溶かさないう一見矛盾した反応を起こすことが望まれる。このような課題に対し、著者らはこれまで、微生物学的鉄酸化能の強弱を利用することで黄銅鉱のバイオリッチング反応の電位制御を図る方法、銀触媒存在下で硫砒銅鉱バイオリッチングが促進され、かつヒ素が不動化するメカニズム、活性炭触媒を利用した硫砒銅鉱の電位制御バイオリッチングのメカニズム、黄銅鉱/硫砒銅鉱共存精鉱の活性炭触媒バイオリッチングにおける電位と銅溶解挙動の関係などについて報告してきた。

2.2 各種重金属汚染水のバイオ処理

2.1 で述べたように、微生物学的な鉱物溶解反応は有用なバイオ技術として利用される一方、野外の尾鉱・廃石に対して無秩序に起こると、「望まないバイオリッチング反応」として重金属を含有する酸性鉱山廃水の発生を起こす。特にヒ素は高毒性であり、その汚染水は世界的に重要な課題である。これに対し、著者らは、ヒ素含有製錬廃液を対象として、極限微生物である好熱好酸性鉄酸化アーキアを利用することで、廃液中のヒ素と鉄を同時酸化し、70°C で安定性の結晶性スコロダイトとして沈殿除去することに成功し、その生成メカニズムを明らかにした。

2.3 都市鉱山廃棄物への応用

使用済みの電子機器などの都市鉱山廃棄物は、適切に処理されなければ深刻な重金属汚染を及ぼし得る一方、金属品位は天然資源のそれより高く地上資源(二次資源)として貴重である。従来、天然資源を対象に発展してきたバイオリッチング技術であるが、各種都市鉱山廃棄物を対象とした研究報告例は近年増加している。

著者らは、廃基板から金を浸出するために、化学的「チオ尿素法」に微生物学的鉄酸化反応を相互作用させることで、溶液電位をコントロールし必要試薬量を抑制した「バイオチオ尿素法」を提案した。また、廃石油精製触媒に対して、糸状菌で発酵したバイオ有機酸を用い、有価金属を有機酸との錯形成反応を介して効果的に浸出できることも報告している。

2.4 付加価値の創出

産業基盤となる金属資源の供給を巡って問題が生じた際、大きな社会不安を招くことを「資源リスク」というが、この二大要因の 1 つは、皮肉にも環境/エネルギー問題解決策として提案された各種新技術であると言われている(多量の希少金属触媒を要するため)。金属をナノ粒子化すれば、比表面積が増大し少量でも触媒活性が著しく向上するため、希少金属の減量が叶えられ得ることから、金属ナノ粒子技術は、資源枯渇問題と新技術開発の推進を両立可能とする先端技術として期待されている。著者らは、これまでに超好酸性金属還元バクテリア・アーキアを利用することにより、プラチナ、パラジウム、金をバイオナノ粒子化できること、またこれらが高触媒活性を示すことを報告している。

3. まとめ

脱炭素社会に向けて、鉱業においてもサーキュラーエコノミー型プロセスへの技術変革が求められている。各種トピックについて、「グローバル」な事例をばさみつつ、著者の研究例と合わせて紹介する。

Biomining: ~"Global" technology using metal-metabolizing microorganisms~

○Naoko Okibe
(Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.)

Key words biomining, bioremediation, bioleaching, metal metabolism

4G07-03 カーボンニュートラル循環型酪農システム

○大久保 敬^{1,2}

(¹阪大・高等共創研究院, ²阪大・先導的学際研機構)
ohkubo@irdd.osaka-u.ac.jp

カーボンニュートラル、ゼロカーボン、SDGs、循環型社会などのキーワードが新聞やテレビなどのメディアを毎日のように賑わせている。これまで二酸化炭素削減が主題であったが、昨年2021年11月13日、英国グラスゴーにて開催された国連気候変動枠組条約第26回締約国会議(COP26)では大きな変化があった。ここでは、世界平均気温の上昇を産業革命前に比べて1.5度以内に抑える努力を追求することが盛り込まれた。いわゆる「グラスゴー気候同意」であり、103カ国が誓約書に署名した。この内容は、2020年のメタン排出量を2030年までに30%削減するという驚くべきものである。日本におけるメタン排出量は年間約3万トンとなっているが、その80%以上が農業系メタンとなっており、この削減技術あるいは有効活用技術の研究開発は喫緊に完成させなければならない。これら農業由来のメタンを削減する方法ではなく、炭素資源として逆に積極的に作り出し有効活用をしたいと考えた。

北海道では酪農牛のふん尿を発酵させることによってバイオガスを生産する施設「バイオガスプラント」が数多くある。ここで得られるバイオガスにはメタンガスが多く含まれていることから、カーボンニュートラルなエネルギーとして注目を集めている。現在はこれを発電機で燃やし売電事業を実施しているが、電力会社の固定価格買取(FIT)制度という国の補助金に依存している。このFIT制度が今後使用しにくくなることから、バイオガスを発電以外の利用法、すなわち有用な化学物質に変換する方法が求められている。

本講演では、最近我々が開発したメタンガスから液体燃料であるメタノール・ギ酸を常温・常圧で製造する技術を説明し、カーボンニュートラル循環型酪農システムとして産学官一体となって社会実装を目指す取り組みについて紹介したい。

4G07-04 PHA系バイオプラスチックのライフサイクル実証

○長田 守弘

(公益財団法人京都高度技術研究所)
m-osada@astem.or.jp

本講演では、環境省「脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業」の採択を受け、令和元～3年度に株式会社カネカ及び日立造船株式会社とともに、京都をフィールドとして実施した実証事業の成果を報告する。

本事業では、脱炭素社会・循環型社会の構築や海洋プラスチック対策の推進に向け、廃食用油等の国産の循環資源を原料に生分解性バイオマスプラスチックであるPHBH(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシヘキサノエート重合体)の製造を行うとともに、中長期的な原料確保に向けてジャトロファ等の油脂作物の国内での栽培可能性を検討した。加えて、PHBHを生ごみ袋に利用し、収集した生ごみとともにバイオガス化(メタン発酵)してエネルギーを回収する新たな循環型ごみ処理システムを、ライフサイクルでの環境影響やコスト解析も踏まえて構築することを目指した。

廃食用油を原料としたPHBH製造技術の開発

現在バーム油を原料としているPHBHについて、国産の循環資源である廃食用油を原料として使用していくための調査や技術開発を行った。まず、廃食用油の賦存量の推計や、排出源ごとの性状の分析を行った。その結果、廃食用油はバーム油に比べてヨウ素価が高く、脂肪酸の不飽和度が高いことが分かった。また排出源の業態によっては酸価が高く劣化が進んでいることも分かった。このような特性を持つ廃食用油を原料として、バーム油を使用した場合と同等の生産性でPHBHの培養生産を行うことを目指した。生産菌株について、不飽和脂肪酸を還元し飽和脂肪酸を生成する酵素遺伝子(*FadH*)を強化することで、高ヨウ素価の廃食用油を工業的に効率的、かつ安定的にPHBH原料として使用することが可能となった。また劣化が進んだ廃食用油については、ブレンドにより劣化度を調整することにより、原料として使用できる可能性を示した。加えて、PHBH製造実機を用いた試験により量産時の生産性・品質を確認し、スケールアップ技術を確立した。製造したPHBHの品質については、着色度や熱安定性等の指標が管理基準を満たすように精製技術の改良を行った。

油脂作物の国内栽培の検討

廃食用油以外の国産油脂源の利用可能性に関する検討として、ジャトロファと菜種の栽培検討を行った。ジャトロファについては、京都地域に実証用の温室と圃場を整備し、肥料としてバイオガス化消化液のみを使用して栽培し生産性の評価を行った。その結果、冬季の低温が課題であったが、灌水方法の工夫により越冬方法を見出すことができ、2年生ながら日本の気候を考慮した目標収穫量の20%を達成した。菜種については、米作の裏作として栽培し、バイオガス化消化液のみを肥料として用いて生産性を評価した。その結果、消化液の増施により収量増加が示唆され、本栽培システムが期待できることが分かった。

PHBH製生ごみ袋の製造技術の開発

生ごみ袋メーカーの量産機で2L、5L、10Lの三種類の生ごみ袋の試作を行った。試作袋の実用性を評価するために、京都市内の地域住民の協力のもと生ごみの分別排出・回収試験を実施した結果、当初はヒートシール部の強度不足により液漏れや持ち手接着部のちぎれ等の指摘がみられたが、インフレーション製膜条件を調整することでこれらの不具合は解消された。

PHBH製生ごみ袋を用いた生ごみ分別排出・回収試験

上記のように生ごみ分別排出・回収試験を実施した結果、PHBH製生ごみ袋の実用面での問題はほとんどなく、生ごみ専用バケツに比べて使いやすさという評価を得た。ただし、今回の試験では従来から生ごみ堆肥化事業に参加している世帯を対象としており分別精度に問題はなかったが、今後幅広い市民を対象に実装していくには、不適物を混入させないために事前に細かな分別ルールの周知・徹底を図る必要がある。その他、実用化した際の生ごみ袋の価格や回収拠点の設置場所が課題として抽出された。

ベンチスケールのバイオガス化試験

上記の分別排出・回収試験によって得られた生ごみを原料にベンチスケール(発酵槽実容量:200L)でのバイオガス化試験を実施した。その結果、定常期間中、安定してバイオガスが発生したことを確認した。また、連続運転による引き抜きの効果を考慮すると、発酵槽内でPHBHは十分に分解していることが確認できた。引き抜いた消化液を肥料として利用することを想定し、ろ過した消化液を用いてコマツナの栽培試験を行ったところ、生育阻害は認められなかった。

システム全体のライフサイクル解析

本事業で提案する循環システムについて、京都市のケーススタディとして、ライフサイクルでのCO₂削減効果及びコスト変化の解析を行った。その結果、PHBH製生ごみ袋を用いて生ごみを分別回収しバイオガス化する本システムは、混合収集して全焼却するベースラインシナリオと比較して、ライフサイクル全体でエネルギー起源GHGが削減されることを明らかにした。また、コストについては、ごみ袋調達費用及び回収費用が増加するものの、処理コストが低減できることで、トータルではベースラインシナリオと同等になることが分かった。以上より、本事業で提案する循環システムの有効性を示すことができた。

Life cycle demonstration project for PHA-polymers

○Morihiro Osada

(Adv. Sci., Technol. & Management Res. Inst. KYOTO (ASTEM RI))

Carbon Neutral Circular-type Daily System

○Kei Ohkubo^{1,2}

(¹IACS, Osaka Univ., ²OTRI, Osaka Univ.)

Key words methane fermentation, methanol, oxidation, photochemistry

Key words biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, aerobic digestion, life cycle assessment

人名索引

A		Hanifah Abu	4C03-09	M	
Akiyama Kyosuke	3G01-10	Haslam Danielle E.	2D02-11	Ma Qingmiao	2C03-11
Allbritton Nancy	3G07-03	Hayamizu Yuhei	4D02-01	Malikul Ikram Muhammad Maulana	4C03-10
Anand Ajeeta	3D02-11	Hitomi Kiyotaka	2A03-04	Maninder Singh	2G07-01
Ando Takehiro	4G01-07	Homma Chishu	4D02-01	Martinez Joval	3F04-08
Andrew S. Utada	3B02-10	Honda Kohsuke	4C01-11	Matsubara Kotaro	2F02-13
Ang Kai Torng	2G01-06, 2G01-07	Horiguchi Ikki	4F02-04	Matsuda Fumio	3C06-05
Aoyagi Hideki	2F02-11, 3D02-11	Huang Chun-Jen	3G07-04	Matsui Daisuke	2G01-05
Asano Yasuhisa	3A01-03	I		Mekata Tohru	4B04-03
Asih Devi	2E01-12	Ijima Hiroyuki	3G01-12	Memdi Indra	4D02-06
Aso Yuji	2F02-13	Iman Marvin Nathanael	2D02-11	Miki Shinsuke	3A01-03
Astawan Made	4C03-11	Ip Chi Hei	2C03-02	Mimura Hisatoshi	4G03-07
B		Isobayashi Atsunobu	4D02-01	Mohammad Asif Ali	2G07-01
Bhatnagar Sharad	2F02-11	Ito Akira	4A06-06	Mubarok Wildan	4F02-04, 2G01-03
Bhupathiraju Shilpa N.	2D02-11	Iwaki Misako	3A01-03	Munaweera T.I.K.	2A03-04
Boonyakida Jirayu	4B04-03	J		Muthukumar Serva Peddha	3D02-11
Bui Hoang Dang Long	2F02-13	Jia Beixi	4B04-07	N	
Byamba Tsogjargal	2E01-10	Jo Jeong Wook	2E03-08, 3F04-04	Nagao Masahide	4A01-13
C		K		Nakanishi Takafumi	4B04-03
Camagna Maurizio	2A03-04	Kahar Prihardi	2B04-01, 4C03-03, 3E03-07	Nakano Hideo	2A03-04, 3G07-02
Chang Jo-Shu	4A06-03	Kamihira Masamichi	3G01-10, 3G01-11	Nakayama Hideki	4E01-05
Choi Jonghoon	3G07-A1, 3G07-01	Kamiya Noriho	4A06-01	Nam Seoyeon	2G03-07
Choi Yong Keun	2E03-08, 3F04-04	Kawabe Yoshinori	3G01-10, 3G01-11	Nemoto Naoto	2A03-04
Christopher J. Vavricka	3A03-08	Kawakami Takashi	4G01-07	Nezu Moeri	2A03-04
Chuluunbat Tsend-Ayush	3D02-08	Khoris Indra M.	4D02-04, 4D02-05	Nguyen Bich Thao	3G01-05, 2G03-07
D		Kim Donghyuk	3C06-04	Ninomiya Kazuaki	2F02-06
Damjanovic Jasmina	2A03-04, 3A03-06	Kim Hyun Uk	3C06-02	Nishii Maki	3A01-02
Danshiitsoodol Narandalai	2C03-11	Kim Hyung Joo	2E03-08, 3F04-04	Noda Masafumi	2C03-11
Doko Satoshi	3G01-12	Kim Jungbae	3G07-05	Nolasco-Hipolito Cirilo	2C03-06
Dwivany Fenny M.	4C03-10	Kim Raehyun	3G07-03	Nuylert Aem	3A01-03
E		Kim Seung Jun	2E03-08, 3F04-04	O	
Eaton-Rye Julian	2E01-12	Kishi Hidekazu	4A01-13	Ohsugi Miho	4G03-07
Ekaputra Jonathan	4C01-11	Kitano Hiroyuki	3G01-11	Ojima-Kato Teruyo	3G07-02
El Muttaqien Sjaikhurrizal	4D02-05	Koga Yuichi	3G03-12, 4A01-13	Ojodomo Achadu	4D02-06
Elvitigala Kelum Chamara Manoj Lakmal	4F02-04	Kojima Masaru	4F02-04	Okano Kenji	4C01-11
F		Kojima Takaaki	2A03-04	Okochi Mina	4D02-01
Firmanto Hendy	4C03-09	Kondo Tomo	4G03-07	Omasa Takeshi	3G03-12, 4A01-13
Fuji Daisuke	4G01-07	Kunwadee Palasin	3A03-10	Onitsuka Masayoshi	3G03-12
Fukasaki Eiichiro	2D02-11, 4C03-08, 4C03-09, 4C03-10, 4C03-11, 4A06-02	Kusumoto Ken-ichi	2D04-06	Ononugbo Chukwuebuka Maxwell	4A01-13
G		L		Osaki Toshihisa	4G03-07
Ganganboina Akhilesh B.	4D02-04	Lasky-Su Jessica	2D02-11	Osanai Takashi	3A01-02
H		Lee Ju Yeon	2E03-08, 3F04-04	P	
Habimana Silas	3G01-11	Li Xiaojie	2E03-03	Parijadi Anjaritha Aa	4C03-10
		Lin Chia-Ling	3F02-04	Park Enoch Y.	4B04-03, 4D02-04, 4D02-05
		Liu Liyun	2D04-06	Prasad Manoj	2E03-03
		Liu Rengwei	4D04-03	Putri Sastia Prama	1S03-A1, 2D02-11, 4C03-08, 4C03-09, 4C03-10, 4C03-11,
		Liu Zhiyuan	3E01-10		
		Lyu Xiaofang	3G03-12		

	4C03-12	Utada Andrew	2E03-03				3E03-12
R		V				秋本 凌輔	2B02-02
Rahmawati Della	4C03-11	Vavricka Christopher J.			秋山 清隆		2D02-09
Ren Huan	2F02-06		4D04-13, 4A01-01		穠山 太一		4F02-10
Rioual Elisa	4G06-04	Vedi Santhana	4G01-01, 4G01-03,		秋山 立幹		2F04-08
Risanto Lucki	3E03-07		4G01-04, 4G01-05,		秋山 裕和	3G01-02, 4F04-11	
Rungreungthanapol Tharatorn	4D02-01		4G01-06, 4G01-07,		秋山 実里		2C03-01
S		Vo Thi Anh Nguyet	3D04-08		浅井 祐亨		4D04-04
Sagawa Kosuke	3G01-10	Voluntad Raffaello Riley C.	4C03-08		浅井 潔		2B04-05
Sakai Kanae	2D04-06	W			朝田 良子		3D02-05
Sakai Shinji	4F02-04	Wakayama Mamoru	2G01-05		浅野 泰久	3A03-09, 3A03-10	
Sakai Yusuke	3G01-12	Wang Yu	3C07-A1		浅野 竜太郎	3G06-02, 4B04-10,	4B04-11
Sato Masashi	4G01-07	Wang Yuli	3G07-03		朝日 透		3E01-01
Satoh Jun	4B04-03	Watanabe Nozomi	3G07-06		朝日 凌大		3D04-01
Saunivalu Maria Ita	4E01-07	Wikantika Ketut	4C03-10		朝里 さやか		4A03-04
Shimahara Yoshiko	4B04-03	Wolf Ruslana	4A03-01		芦内 誠		4B02-10
Shintomi Keishi	4G03-07	Wu Changyu	2C03-02		芦沢 紘希		4F04-09
Shintomi Miyuki	4G03-07	Wu Chih-Chan	3E03-09		蘆田 弘樹		2B02-11
Show Pau-Loke	4A06-05	Wu Jingfei	3A01-03		東 春奈		2D04-01
Song Hak Jin	2E03-08, 3F04-04	Y			東 雅之	2F04-04, 3C01-05,	3C01-07, 4G03-02
Stefan Lucija	3G01-12	Yamamoto Kana	4C03-10		麻生 祐司		3E01-05
Su Zhengyu	2G01-05	Yamamoto Mizuki	4G01-07		安達 真菜		4B02-04
Sugiyama Masanori	2C03-11	Yamano-Adachi Noriko			新 勇介		4F02-08
Sugizaki Yoshiaki	4D02-01		3G03-12, 4A01-13		アディタマ ニッコ	3B02-04, 3B02-05	
Sukwattananiapat Puriwat	4F02-11	Yang Seung Woo	2E03-08		跡見 晴幸	2A01-01, 3A01-13,	4D04-03
Sultana Razia	3G01-10	Yang Sung Woo	3F04-04		穴田 康太		3F04-12
Summerfield Tina	2E01-12	Yang Yingnan	3E01-10		阿野 貴司		4E01-06
Suryadarma Prayoga	3C07-04	Yin Hongrong	2G07-01		油谷 幸代	2F02-02, 3B02-03,	3C01-02, 3C01-03,
Suryatin Alim Gladwin	4C01-11	Yokoyama Takumi	4G01-07				3C01-04
T		Z			油屋 駿介		3C03-11
Takaku Hiroaki	3C07-02	Zhang Nan	3E01-10		安部 綾		2D02-08
Takamori Sho	4G03-07	Zhao Zongbao	3C07-01		阿部 敬悦	2F02-02, 4A01-04,	4A01-05
Takamori Yukio	4G01-07	Zhu Yunxin	3E01-10		阿部 多恵		2B04-08
Takano Eriko	3C07-05	Zou Ziyang	4E01-05		阿部 文快		3B04-02
Takeda Yoichi	2G01-05	あ			天野 敦雄		4D04-02
Takeuchi Shoji	4G03-07	青井 議輝	2C01-01, 2C01-08,		天野 光喜		2E01-03
Tan Pei Yu	4E01-09		3C03-09, 3F04-08		天野 真希		3D04-11
Tan Shao Ying	2G01-11	青木 孝祐	2E01-11		雨宮 隆		4G06-03
Tanaka Masayoshi	4D02-01	青木 秀年	4D02-08		天羽 宏枝		3G03-03
Tanaka Takumi	2D04-06	青木 航	2A03-09, 3B02-08		阿由葉 里奈		4A03-12
Tang Jingchun	4A06-04	青柳 秀紀	2E01-09, 2F04-05,		荒 学志	3B02-03, 3C01-02,	3C01-03, 3C01-04
Tashiro Yukihiko	3C06-03		2F04-10, 3F02-03,		新井 世望		4F02-01
Tomizawa Hideyuki	4D02-01		3F04-07, 3F04-09,		荒井 雅吉		3A01-07
Toyotake Yosuke	2G01-05		3F04-10, 4F04-06,		新垣 篤史	2C07-02, 3F02-07,	3F02-08
Tran Quoc Thinh	2E03-04, 2E03-05,		4F04-07, 4F04-08,		荒川 賢治		4B02-02
	3F02-06, 4E01-10,		4F04-09, 4F04-12		荒木 希和子		4E03-10
	4E01-11, 4E01-12,		3D04-02, 3D04-04		荒木 聡馬		2F02-02
	4E03-10	赤尾 健			荒木 千絵		4D04-10
Tsai Shen-Long	3C06-01, 3C07-03	赤川 夏月	4F04-10		荒木 秀雄	3B02-03, 3C01-02,	3C01-03, 3C01-04
Tsend-Ayush Chuluunbat	3D02-07	赤木 駿斗	4C01-10		荒木 通啓		4D04-13, 4E06-03
Tsuruga Kenta	4D02-04	赤坂 直紀	3C03-01		荒木 勇登		3C03-09
Tusher Tanmoy Roy	4E01-07	赤澤 真一	3E03-11				
U		明石 貴裕	3D04-09				
Uehara Mario K.	3G01-12	赤田 倫治	4A03-01				
Umakoshi Hiroshi	3G07-06	秋 庸裕	2B02-09, 2C01-01,				

荒閑 隼人	3A03-13	石田 直己	2A03-03	今井 祐太	3G01-03
有澤 美枝子	4E03-09	石田 尚之	4A03-08, 4A03-09	今久保 友則	3E03-06
有島 凜太郎	4F02-05	石田 博樹	2B04-04, 2D04-07, 3D04-03	今田 勝己	4A01-02
阿波 里佳	2C03-12, 3A06-03			今田 辰海	2C03-05
安 鋼	4G03-04	石田 奨	4E01-09	今戸 優理	4D04-07
安西 高廣	4B04-08	石塚 匠	4G03-06	今中 忠行	4D04-04
安齋 由美子	4D02-02	石塚 寛子	2A01-11	今中 洋行	4A03-08, 4A03-09
安藤 晃規	2C03-02	石原 静流	2B04-02	今村 維克	4A03-08, 4A03-09
安東 剛	2E03-01	石丸 泰寛	2A03-06, 4E03-09	今村 百花	4F04-12
安東 文洋	4G01-01, 4G01-03, 4G01-04, 4G01-05, 4G01-06	石水 毅	4G03-08	井本 誠志	2C01-06
		石本 弥子	3F02-03	入江 健太	2F02-07
安藤 正浩	4D02-07	石谷 孔司	3B02-03, 3C01-02, 3C01-03, 3C01-04	入交 伶	2B04-10
い		和泉 絢子	3B04-03	岩井 直哉	3B02-07
		和泉 自泰	3C03-11, 4C03-06	岩井 良輔	2G03-04
飯島 信司	2C03-07, 2E03-10	磯谷 敦子	3D04-02	岩木 宏明	2E01-02, 4C01-12
飯田 順子	4C03-01, 4C03-02, 4D04-09	井田 大輝	4A01-05	岩倉 崇文	3C03-07
飯田 泰広	4A01-08	板倉 豊和	1S04-04	岩崎 清隆	2G03-10
五十嵐 陽子	3G01-04	板倉 真優	2F02-03	岩崎 祐樹	2C01-08
五十君 静信	4B02-04	板谷 かえで	3A01-11	岩崎 雄吾	3A03-06
生田 宗一郎	2A03-10, 2A03-11	市川 京香	3E01-03	岩下 和裕	2D02-01
井口 博之	2C01-12	市川 暉	2F02-02	岩橋 均	3B04-03, 3E01-02
池 道彦	4E01-08	市川 めぐみ	2D02-07	岩原 信之	2D02-01
池谷 真里奈	2A01-08	市谷 花帆	3D02-08	岩間 蒼平	2E01-09
池田 明夏里	4D04-07	一瀬 拓海	3B04-10	岩元 真菜	3F02-07
池田 和輝	3C03-11, 4C03-06	一色 衣香	4C01-09	う	
池田 佳代	2B02-05	伊出 健太郎	2B04-04	上垣 浩一	2A01-07, 2F02-07
池田 宇宙	3A03-10	井藤 彰	2G01-04, 3G03-10, 3G03-11	上住 聡芳	3G01-02
池田 丈	2B02-10, 2E03-09, 2F04-01, 3A01-08, 3A03-12, 3E01-03, 4G01-08	伊藤 和哉	4A03-10	上田 太郎	2G03-12
池田 翼	4E07-04	伊藤 圭祐	3G03-06	上田 宏	2F04-12, 2E06-05, 4A03-04
池田 奈菜子	3B04-10	伊藤 謙	3D02-01, 3D02-06	上田 誠	3A01-04
池田 裕布里	3B04-04	伊藤 光次朗	4B02-04	上田 光宏	4E03-04
池田 優理子	3D04-02	伊藤 創平	3A03-13	植田 充美	2A03-09, 3B02-08
池田 麗	2E01-03	伊藤 太一	4G03-04	上田 悠加	4A01-02
池松 充基	2C03-07	伊藤 栄紘	3B04-08	上地 敬子	2A01-06, 2B04-08, 3B04-05
池谷 鉄兵	4G06-04	伊藤 洋一郎	2B04-05, 4C03-04	上野 拓夢	3C03-06
井崎 力久	2A01-01	伊藤 良浩	4A03-04	上村 真理子	2D04-11
井沢 真吾	3D04-08	稲垣 賢二	4A01-02	魚住 信之	2A03-06, 4E03-09
石井 明子	3G06-04	稲葉 繁樹	2D04-02	氏原 哲朗	4C06-01
石井 純	2B04-05	稲福 隆之	2A01-06	右城 夕海哉	3C01-08
石井 純	3C01-01, 4C01-01	稲辺 宏輔	2B02-08	碓井 茉依	2D02-06
石井 俊一	2G06-03	居波 渉	3C03-10	宇田 泰三	4B04-12
石井 義孝	3A01-05	乾 博	4E03-04	宇田 竜成	2B02-04
石上 美佐	2B04-05	乾 将行	2C01-02, 2C01-03, 2C01-09	内田 和希	4A03-07
石川 卓	3D02-03			内田 幸希	2G03-12
石川 文啓	4D02-09	井上 暁人	2E06-05	内堀 孝博	3E01-09
石川 優	3D04-08	井上 謙吾	2C01-05	内山 進	4D02-02
石黒 早紀	2A01-05	井上 浄	2C06-01	内海 俊彦	2A03-06
石坂 滯来	4A01-09	井上 大介	4E01-08	鷓頭 理恵	4F02-03
石澤 秀紘	2E01-08, 4E01-08	井上 千弘	4E01-07	梅川 忠典	3E06-03
石田 健登	3E03-06	井上 元希	2F02-10	梅川 麻理子	4D02-02
石田 丈典	2B02-10, 2E03-09, 2F04-01, 3A01-08, 3A03-12, 3E01-03, 4G01-08	井上 善晴	2B02-04, 2B02-05	梅田 光央	2B04-05, 4E06-04
		猪熊 健太郎	2D02-07, 4C03-04	梅津 太輔	2E06-03, 4A03-12
		猪股 亮佑	3G01-01	梅野 嘉宏	4F04-06
		今井 綾	2G01-12	梅原 浩	3A01-07
		今井 健太	4F02-13		
		今井 友也	2F02-07		
		今井 優	4C07-04		

え		大本 貴士	2A01-07, 2A01-13, 4C01-04	長田 守弘	4G07-04
永樂 元次	2E07-04	大谷 亨	2G01-01	小山内 崇	2C03-01, 4E03-03
江口 文仁	4E01-01	大矢 禎一	3D04-04	尾島 由紘	2F04-04, 3C01-05, 3C01-07, 4G03-02
江口 諒	4B04-01	大山 浩之	2E06-05	尾関 健二	2D04-10, 3D04-01
江澤 理徳	4B04-02	岡 希望	2A01-08	小関 誠	2D02-08
江面 浩	3E06-04	岡崎 飛鳥	2E03-05	小田 忍	3C03-06
衛藤 雄二郎	4F04-02	岡崎 文美	2A01-05	小田 慎太郎	3E01-02
榎本 利彦	2D02-03, 2D02-04	岡澤 敦司	2A03-12, 3E07-04	尾田 友香	2B02-01, 3F04-05
江邊 正平	4E01-06	小笠原 渉	3E03-10, 3E03-11	小鷹 健太	3F04-07
遠藤 遼平	3E01-06	岡島 麻衣子	2G07-01	尾高 雅文	4A03-06, 4A03-10, 4B04-02
お		岡田 海斗	2F02-05	小田木 美保	3D02-03
老川 典夫	3A07-01	岡田 理志	1S04-04	落合 秋人	4F04-04
笈木 宏和	2F04-06, 2F04-07	緒方 法親	4E06-05	鬼塚 正義	2G03-11, 3G03-03, 3G03-04
大池 達矢	4E01-06	岡田 美玖	2F02-07	小野 絵里香	2E03-03, 3B02-10
大石 陸人	4E03-04	岡南 政宏	4E01-06	小野 太暉	2F02-01, 3C03-02
大勝 信秀	1S04-04	岡野 憲司	2E01-02, 3B04-07, 3E03-02, 4C01-12, 4E07-03	小野寺 正孝	4B02-10
大上 高洋	2E01-04	岡野 ジェイムス洋尚	2G03-04	尾花 望	2E03-03, 3B02-10
大川 優生	2A03-08	岡野 千草	4F04-02	小原 仁実	3E01-05
大久保 詠一郎	4A03-06	岡橋 伸幸	3C01-01, 3C03-07, 3C03-08, 4C03-01, 4C03-02, 4D04-05, 4D04-10, 4D04-11	折田 和泉	2B04-02, 4D04-04, 4E01-04
大久保 敬	4G07-03	岡村 隼杜	3C03-03	折田 兼成	2A03-08
大河内 美奈	4G01-09	岡村 好子	2F02-12	か	
大政 健史	2G03-07	岡本 沙樹	2F02-03	甲斐 達己	2C03-07
大澤 賢太郎	4D02-02	岡本 棟悦	2G03-11	甲斐 久博	2D04-09
大澤 亮	3C03-05	岡本 裕太	3E01-01	嘉悦 勇太	4F02-13
大城 麦人	3F02-01	小川 健二郎	2D04-09, 3D02-07, 3D02-08	垣見 和宏	4B04-05
大島 登志男	4D04-08	小川 順	2C03-02, 3A01-04	角田 達紀	2F02-08
大城 隆	3B02-09, 4A03-03	小川 岳紘	2F02-12	景山 達斗	2G03-03
大城 麦人	2A01-A1, 3F02-02, 4C03-07	小川 誠	2G07-02	園 彰吾	3D04-09
大関 さおり	3E01-08	小川 昌規	4B02-01	笠井 敬一郎	2G03-03
大田 悠里	3B04-09	小川 真弘	2E01-01	笠井 大輔	2G06-01
太田 陽介	3E01-07	荻田 亮	4B02-06, 4B02-07	葛西 卓磨	4G06-04
大滝 世和	2E01-08	荻野 千秋	2B04-01, 2F02-01, 2G01-01, 2G01-02, 3C03-02, 3E03-05, 3E03-07, 4C03-03, 4D04-01, 4D04-13	風間 伊織	3E01-05
大竹 理寛	4C01-05	荻野 博康	3C01-13	梶 直人	2C03-10
大塚 祐也	2D02-07	沖部 奈緒子	4G07-02	梶浦 裕之	3E03-08, 3E03-09, 3E07-03, 4E03-11, 4F02-08
大塚 遼	2B02-07	奥迫 拓也	2A03-07	梶川 揚申	4B02-04
大槻 隆司	2E03-07	奥田 知生	2C03-02	梶谷 賢吾	2C03-09
大槻 隆司	4E03-01	奥田 裕暁	2E03-02	柏山 祐一郎	4E03-04
大成 冬真	4B02-10	奥谷 聡志	2G03-11	数岡 孝幸	3D04-05
大西 智也	4E03-10	奥津 果優	2D04-03	粕谷 健一	2G06-03
大西 諒	2A03-07	奥野 凌	2E03-07	片井 順也	3C03-10
大貫 喜嗣	3G01-06, 4G01-02	小倉 慎也	3E03-01	片岡 尚也	2C01-04
大野 萌華	3A01-07	小椋 康光	4A03-12	片岡 正和	4D04-12
大野 莉歩	2G03-05	小椋 義俊	3B04-06	片倉 啓雄	4F04-10, 4G03-05, 4E07-02
大橋 貴生	3D04-06, 4G03-08	小黒 芳史	2D02-04	片平 正人	2A01-04
大橋 博之	2A01-13, 4C01-04	桶川 隆嗣	4D02-11	片山 高嶺	4C06-02
大橋 正孝	3D04-06, 3D04-07	刑部 敬史	3B02-01	加地 楓	3A01-13
大島 昌也	4A03-06	刑部 祐里子	3B02-01	勝又 健一	2G07-02
大林 洋貴	4A03-07	尾崎 達郎	4G03-06	勝又 忠与次	2C03-10
大前 貴裕	3E01-04			勝矢 祥平	2C03-02
大政 健史	2G03-08, 2G03-09, 3G01-05, 3G03-02, 4A01-10, 4A01-11, 4A01-12, 4D04-09, 4F02-05, 4F02-07, 4F02-11			勝山 (高橋) めぐみ	2A07-03
大室 (松山) 有紀	2F04-12			桂木 遼太郎	4E01-10

加戸 悠	2F02-01		4G01-03, 4G01-04,	清 啓自	2C01-05, 2E03-01
加藤 純一	3F04-12		4G01-05, 4G01-06	清中 茂樹	4A03-05
加藤 淳也	2C01-01, 2C01-08,	川北 鈴香	3B04-09	桐木 友花	4G01-09
	2E03-09	川口 秀夫	2G07-04	桐村 光太郎	3A01-05, 3C03-03,
加藤 節	2C01-01, 2C01-08,	川久保 響	3D02-07		3C03-04
	3C03-09, 3F04-08	川崎 了	2E01-09, 2E01-11,	金原 和秀	3B04-09, 3B04-10
加藤 太一郎	2G07-03		2F04-05		
加藤 拓	3B04-02	川崎 真由	3A03-13		
加藤 拓也	3F04-10	川崎 芳美	4F04-12		
加藤 竜也	2F02-08, 4B04-04	川島 京介	3E01-04	久貝 樹幹	2D04-01
加藤 晃代	4B04-07, 4G03-01	川田 善正	3C03-10	日下 勝弘	4B04-02
加藤 大志	2B04-07	河野 惠美	2B04-04	楠本 憲一	2D04-05
加藤 雅士	2A01-03, 2B04-07,	河野 風雲	4A03-02	工藤 恒	3A03-08, 4A01-01
	2D04-08	川畑 龍司	3C03-09	工藤 悠希	2B02-11
加藤 泰彦	3B02-04, 3B02-05	河原 あい	3D02-10	國枝 尚弘	2C03-07
加藤 悠一	2B02-08, 2C03-04	河原 正浩	3G03-01	国岡 正雄	2G06-04
加藤 勇太	4E01-09	河原 航	3D02-03	國田 紘夢	4F02-11
加藤 好一	2F02-02	河邊 佳典	2F04-08, 3G03-09	國光 真生	2B02-01
加藤 頼子	2B02-01	川村 和佳菜	3C01-09	久能 樹	2E03-03, 3B02-10
加藤 竜司	3G01-03, 3G01-04,	川本 純	2F02-07	久保 昂也	4D02-07
	3G03-06, 3G03-07,	川本 翔希	2C03-07	久保 早友理	3E03-02
	3G03-08	川本 優一	4D04-06	久保 裕志	3E01-11
門岡 千尋	2D04-03	河原崎 泰昌	2F04-03	久保 宏実	4G03-05
金井 貴蓉	2G03-07, 2G03-08,	簡 梅芳	4E01-07	久保 幹	2E03-04, 2E03-05,
	2G03-09, 3G01-05	菅野 菜津奈	4B04-11		3F02-06, 4E01-10,
金井 保	2A01-01, 2C01-11,	神戸 彬光	3A03-13		4E01-11, 4E01-12,
	4A01-09, 4D04-03				4E03-10
叶井 正樹	2F04-12			窪寺 隆文	3D04-09
金井 宗良	3D04-02			久保庭 雅恵	4D04-02
金尾 忠芳	4A01-02	木川 隆則	4G06-04	窪野 一郎	3E01-04
金本 昭彦	2C03-04, 2D02-09	菊川 寛史	3C01-12, 4G03-03	熊谷 彩純	4F04-02
蟹江 慧	3G01-03, 3G01-04,	岸本 真奈	3B04-04	熊谷 孝則	2B04-09
	3G03-07, 3G03-08	喜多 幸	2B02-11	熊谷 俊高	2F02-02
金岡 英徳	4A03-05	北垣 浩志	2D04-02	熊田 陽一	3E03-01, 3E03-02,
金子 達雄	2G07-01	北口 哲也	2E06-05, 4A03-04		3E03-03, 3E03-04,
金子 真大	2G01-04, 3G03-10,	木谷 茂	2B02-07		3F02-11, 3F02-12,
	3G03-11	木野 邦器	3A01-06, 3A03-05		3F02-13, 4E03-06
金子 悠哉	3G03-09	紀ノ岡 正博	2G01-06, 2G01-07,	熊野 祐香	4A01-12
釜井 彩花	3A03-09		2G01-08, 2G01-09,	汲田 幹夫	3F04-11
鎌田 真未	3E01-08		2G01-10, 2G01-11,	雲北 涼太	3C01-08, 4C03-04
蒲池 利章	3B04-08		2G01-12, 2G03-01	公文 裕巳	4B04-05
上岡 惇也	2G01-07, 2G01-12	木下 理恵	4B04-05	倉田 淳志	2F02-07
上谷 はる	3E01-06	木原 章雄	2A03-06	倉場 静子	2D02-09
上平 正道	1S02-A1, 2F04-08,	木保 有紀	2B04-11	倉橋 敦	2D02-03, 2D02-04
	3G03-09	木保 行雄	2B04-11	倉持 碧海	3B04-06
上村 直史	3E01-08	金 美海	2G01-06, 2G01-10,	藏本 吾郎	2G03-10
神谷 典穂	1S02-A2, 2A03-08,		2G01-09, 2G01-11	栗栖 太	2E01-03
	3A01-09, 4A03-07	金 倫基	3A06-05	栗田 涼子	2F04-03
亀井 謙一郎	2E07-03	木村 郁夫	3A06-01	栗原 達夫	2F02-07
亀川 颯人	3E03-06	木村 和恵	3G03-08	栗原 優紀	2B02-05
亀田 倫史	4A01-06	木村 一雅	4F04-01, 4F04-03,	黒江 真由	2E01-08
栢木 宏之	2C03-12, 3A06-03		4F04-05	黒澤 尋	3G01-06, 4G01-02
唐鎌 翔大	3A01-06	木村 元彦	2E01-03	黒田 章夫	2B02-10, 2E03-09,
刈屋 佑美	4B04-02	木村 裕花	4E01-03		2F04-01, 3A01-08,
河合 繁子	4A03-12	木村 友紀	2E06-03		3A03-12, 3E01-03,
川井 隆太郎	4C01-02	木村 行宏	2D04-11, 3A01-10		4G01-08
河内 伸浩	2D02-06	木山 実優	2G01-10	黒田 浩一	3C01-11
川上 高男	3E01-11	邱 泰瑛	3F02-09, 3F02-10,	黒田 照夫	2B04-09
川上 隆史	4G01-01, 4G01-02,	乔 俏	4E01-09, 4E03-07	黒田 博隆	4D04-09
			4E03-08	桑野 光明	2F04-06

栗原 智也	3D04-06	小守 啓友	3F04-05	坂元 佑吏	3D02-04
栗原 浩誠	2C03-12, 3A06-03	小山 幸祐	3B02-09, 4A03-03	崎濱 由梨	3B04-02
桑原 芽美	2B04-10	小山 伸吾	4G03-06	櫻井 明彦	2F02-09, 2F02-10
こ		小山 純弘	3F04-07	櫻井 翔太	4C01-08
小池田 聡	4A01-06	倉敷 凌太	4A03-03	櫻井 康雄	2G03-02
高 イクサイ	4C01-05	コンクローン トーン タットポーン		櫻庭 春彦	3A03-01, 3A03-11
黄 辰介	4E01-07		3G03-01	座古 保	2E06-04
高坂 智之	2A03-01	近藤 昭彦	1S01-A2, 2B02-08,	佐々木 啓	2G01-12
幸田 明夫	2F02-01		2B04-01, 2B04-05,	佐々木 建吾	2C01-03, 2D02-07,
高津 あゆみ	4F04-07		2C01-03, 2C03-03,		2D02-08
河野 翔吾	3C01-02		2C03-04, 2D02-07,	佐々木 大介	2C01-03, 2D02-07,
高屋 朋彰	2C03-09		2D02-08, 2F02-01,		2D02-08
古閑 友紀	3F02-01, 3F02-02		2F02-04, 2F02-05,	佐々木 匠	3F02-06
古賀 雄一	2G03-09, 4A01-10,		2F04-02, 2G01-01,	佐々木 寛人	2A07-02
	4A01-11, 4A01-12,		2G01-02, 3A03-08,	佐々木 隆一	4A03-04
	4F02-05, 4F02-11		3C01-08, 3C01-09,	佐々木 良平	2G01-02
小川 雅人	3F02-04		3C01-10, 3C03-02,	佐々浪 由梨香	2E01-06
小坂 唯心	2A03-09		3E03-02, 3E03-05,	佐々本 康平	2A01-07, 2A01-12
小境 敏揮	2D04-09		3E03-07, 4A01-01,	佐塚 隆志	2G07-04
小酒井 智也	3B04-03		4C01-03, 4C03-04,	佐々 洋	3C03-10
小澤 拓真	4F04-08		4D04-01, 4D04-13,	佐藤 治	2G07-05
小柴 歩実	3C01-10		4E06-01	佐藤 源気	3C01-11
小島 幸治	2D04-04	近藤 敬子	2A01-04	佐藤 駿光	2E01-06
兒島 孝明	4B04-07	近藤 孝志	4F02-13	佐藤 俊輔	2A07-01, 2G06-05
五島 徹也	3D04-02	さ		佐藤 喬章	2A01-01, 3A01-13
小嶋 勝	2G01-03, 2G03-06	三枝 敬明	2D04-04	佐藤 友紀	3D02-01, 3D02-06
小関 卓也	2A03-03	財津 奏太	2A01-10	佐藤 将	4G01-01, 4G01-02,
小平 一也	2D02-03, 2D02-04	齊藤 彩	3A03-06		4G01-03, 4G01-04,
小高 敦史	2B04-04, 2D04-07,	齋藤 樹里	2B02-11		4G01-05, 4G01-06
	3D04-03	齋藤 俊也	2A03-06	佐藤 実紗	2D04-10
小高 雄也	4F02-10	齋藤 猛	4G03-06	佐藤 守俊	4A03-02
児玉 千聡	2D02-01	齋藤 昌典	2C06-02	佐藤 悠	2B02-07, 3B04-07,
児玉 浩明	2D02-06, 3A01-11	齋藤 愛弥	3F02-03		4C01-12
後藤 紗也香	4D02-11	齋藤 芽生	4B04-01	佐藤 佑菜	3G01-06
古藤 隆衣	4F02-05	齋藤 祐介	2E01-07	佐藤 里佳子	3B02-03, 3C01-02,
後藤 翼	3A03-01	齋藤 悠希	2C03-10		3C01-03, 3C01-04,
後藤 雅宏	3A01-09, 4A03-07	齋藤 裕	4A01-06		3C03-07
後藤 恭宏	3B04-06	酒井 香奈江	2D04-05	佐藤 峻	3A01-09
小西 正朗	3F02-09, 3F02-10,	酒井 謙二	3F02-01, 3F02-02	佐藤 玲子	4C01-05
	4E01-09, 4E03-07	境 慎司	2G01-03, 2G03-06	里村 武範	3A03-01, 3A03-11
小西 良子	2E06-05	酒井 保藏	3B04-01	真田 弘美	2B02-01
小西 莉子	2F02-07	榊原 誠也	2D04-08	佐貫 理佳子	2B04-04
小林 駿介	2C01-08	坂口 勝久	2G03-10, 3E01-01	佐野 絢子	3D04-10, 3D04-11
小林 拓嗣	2D02-01	坂口 滉基	3G03-08	佐野 千佳歩	4F04-02
小林 智宏	2C03-09	阪口 利文	2F02-12	佐野 文香	4F02-03
小林 友哉	3E03-05, 4D04-01	坂谷 優奈	2G01-09	佐野 海瑚人	4C01-01
小林 典裕	2E06-05	坂野 正季	3A01-05	佐野 元昭	2E03-11
小林 史尚	2E03-06	坂本 篤彦	2D04-10	佐野 夕貴	2E01-04
小林 真理香	3F02-08	坂本 紗津記	3A03-05	澤田 将吾	4C01-07
小林 美稀	4G03-08	坂元 仁	3D02-05	沢田 健	2C01-01
小林 祐摩	4C01-01	坂本 大輔	3E03-05, 4D04-01	澤村 直哉	3E01-01
小林 幸人	4E07-01	阪本 龍司	4E03-04	山敷 拓人	2C01-03
小林 吉生	2B04-07, 2D04-08	坂本 竜朗	4F02-02	し	
小林 航	4F04-01, 4F04-03,	坂元 知里	3A03-01	椎名 渉	3B04-08
	4F04-05	坂本 千穂	3E01-08	塩川 つぐみ	4B04-06
駒 大輔	2A01-13, 4C01-04	坂本 響	2D04-04	塩田 悠介	2A03-01
駒井 理乃	3E01-09	坂元 博昭	3A03-01, 3A03-11	塩野 義人	2A03-03
小森 柊花	4C03-02	坂本 勝	3E01-11	塩谷 格	3G01-01

執行 崇志	3C03-12	進藤 昌	3D02-01		
重政 友貴	2E01-11	新聞 秀一	2A03-10, 2A03-11,	そ	
志田 洋介	3E03-10, 3E03-11		2A03-12		
篠原 菜穂	2A03-10	新山 拓男	3D02-07, 3D02-08		曾 聲儀
芝井 厚	4C01-02				曹 偉
柴垣 和広	1S04-04	す			相馬 悠希
柴田 朗	3C03-04			蘇 九龍	2E06-05
柴田 公彦	2C03-09	末 信一朗	3A03-01, 3A03-11	3F02-03, 4C03-06,	4D04-07
柴田 敏行	4D02-10, 4E03-05	末次 正幸	3B04-10	4D04-09	園木 和典
柴田 直樹	2G07-03	末綱 彩花	4F04-01, 4F04-03,	2A06-06	曾宮 正晴
柴田 成樹	3B02-05		4F04-05	4D04-09	空田 和也
柴田 裕介	3D04-02	末松 和真	3B04-03	1S04-04	成 承炫
柴田 了哉	3G01-09	菅沼 寛	3G01-04	た	
澁谷 駿太	3C03-06	杉木 創	3A03-02, 3A03-04		
澁谷 正俊	3G03-06	杉本 真也	2E03-03, 3B02-10	戴 鳳凰	2D04-02
澁谷 裕紀	4F04-04	杉森 康一	2F02-09	臺 美佐子	2B02-01
島 帆花	3A03-07	杉山 亜矢斗	3G03-07	大長 薫	3C01-12
島田 昌也	2C01-06, 2C01-12	杉山 峰崇	3D04-03	平良 東紀	2A01-06, 3B04-05
島本 航輔	4E03-03	杉山 由花	4A03-06	平 敏彰	4B02-09
島本 真奈	2C01-06	鈴木 章弘	2F02-10	多賀 直彦	3D02-04
清水 一憲	2E07-06, 3G01-02,	鈴木 快	2C01-09	高木 妙子	3B04-09
	4F04-11	鈴木 喬太	4E03-09	高木 博史	1S02-A3, 3D04-07
清水 咲弥	4F04-10	鈴木 研志	2E01-03, 3C03-10	高木 昌宏	1S01-A3, 2C07-05,
清水 翔太	4F04-11	鈴木 沙和	3B02-02		4A03-07, 4G03-04
清水 達也	2B02-08, 2G03-10,	鈴木 志野	4C07-01	高木 睦	3G01-01
	3E01-01	鈴木 伸	3A01-06	高久 洋暁	3B02-03, 3C01-02,
清水 哲	2C01-09	鈴木 崇	4D04-09		3C01-03, 3C01-04,
清水 博史	2E03-10	鈴木 高広	3E01-11		3C03-07, 3E03-10
清水 浩	2C03-05, 3A03-02,	鈴木 貴博	3F02-11	高里 良将	3C01-06
	3A03-03, 3A03-04,	鈴木 貴之	2B04-07	高瀬 修一	4G03-04
	4B02-05, 4C01-01,	鈴木 達也	3A01-06	高瀬 智也	3G01-02
	4C01-02, 4C01-05,	鈴木 亨	2F02-08	高田 健司	2G07-01
	4C01-07, 4C01-08,	鈴木 徹	4G03-03	高田 真穂	3C01-07
	4C01-09, 4C01-10,	鈴木 智大	2F02-01, 3C03-02	高遠 昌樹	2A01-04
	4D04-06	鈴木 宏明	4C01-05	高野 力	2E01-09, 2E01-11,
清水 将文	2C01-12	鈴木 宏和	3B02-09, 4A03-03		2F04-05
志水 元亨	2A01-03, 2B04-07,	鈴木 裕満	2A01-03, 2B04-07	高橋 海	2E03-04
	2D04-08	鈴木 真史	2G03-11	高橋 恒一	1S04-03
下釜 香枝	3G01-07, 3G01-08	鈴木 美和	2G06-03	高橋 淳子	3E01-02
下川 直史	4A03-07, 4G03-04	鈴木 義之	3E03-10, 3E03-11	高橋 祥司	2A01-09, 2A01-10,
下坂 天洋	2A01-01	鈴木 陸太	3F04-08		2C03-09
下澤 勇弥	2A01-12	薄田 隼弥	2F02-02	高橋 空良	3D04-05
下田 聡一郎	4F04-01, 4F04-03,	スボジニー マドゥカ	3C01-06	高橋 尚央	4A01-04
	4F04-05	住田 和弥	4D04-12	高橋 風	3F04-11
下総 葉子	3B04-03	陶山 隆史	3G01-03	高橋 宣博	2E01-03
下村 有美	3F04-08	陶山 哲志	3B04-09	高橋 弘喜	3C03-04
シャイクリザル エル ムッタキン	4D02-03	せ		高橋 将人	3A01-A1, 3F04-09,
	3F04-05			清家 泰介	3C01-01, 3C03-07,
謝花 喜史	2E06-05		4C03-03	高橋 政友	3C03-11, 4C03-06,
朱 博	2F02-08, 4B04-04	関 貴洋	2E06-03		4D04-07
徐 剣	3G01-06	關 光	3E07-01	高橋 夢月	4E03-04
徐 卓然	2F04-11	関 実	4F02-03	高橋 優	4E03-03
庄野 陸太	2C03-03, 4E06-02	関口 智史	2F02-08, 4B04-04	高橋 優花	3E03-10
白井 智量	2C06-02	関口 喜則	4B02-09	高橋 譲	4B02-02
白井 宏樹	4A01-10	善藤 威史	2F04-11, 3D02-10,	高峯 和則	2D04-03
白須 尊大	3C03-09		4C03-07	高村 映一郎	3A03-01, 3A03-11
新里 海咲	3B04-04, 3B04-09,	仙波 弘雅	2D04-11	高守 幸男	4G01-01, 4G01-03,
新谷 政己	3B04-10, 3C03-10				4G01-04, 4G01-05,
					4G01-06
				高山 宗幸	3D04-01

多喜 俊介	3A03-11	田中 瑞己	2F04-03	敦賀 健太	4D02-03
滝口 昇	3F04-11	田中 佑樹	4A03-12	釣賀 雅子	2A01-11
田口 悟朗	3E07-02	田中 佑治	3G01-06	鶴貝 龍聖	4B02-03
田口 精一	2F02-03	田中 礼士	4D02-10, 4E03-05	鶴田 爽	4E01-04
田口 朋之	4D02-08	田中 伶奈	3D04-11	鶴田 貴幸	4B04-12
竹内 愛子	2F04-11	棚倉 有哉	2B04-06	鶴本 智大	3E07-04
竹内 道樹	3A01-04	田邊 芽衣	4D04-07	て	
武尾 正弘	2E01-08	谷 明生	2C01-12	鄭 清	4F04-10
竹口 徹	2D04-09	谷口 和彌	2C01-04	鄭 美嘉	2B02-06
竹下 正彦	3D02-07, 3D02-08	谷口 越夫	4D04-11	出川 貴彬	4E01-03
竹下 美愛	2D04-09	谷口 直優	4F02-12	出来 真弓	4D02-11
竹田 遥	4E03-09	谷口 百優	4D04-02	寺井 悟朗	2B04-05
武田 真由子	3E03-01	谷原 健吾	4F02-13	寺内 勉	4D04-07
武田 穰	2A01-04, 2B02-02	谷本 充	4D04-03	寺内 裕貴	4A01-04, 4A01-05
武田 悠杜	2A01-07	田原 悠平	3C01-05	寺尾 陽介	4F02-12
竹綱 椰々	3G01-07	玉置 尚徳	2D04-03	寺田 祐子	3G03-06
竹中 慎治	2D04-11, 3A01-10	玉木 秀幸	4C07-03	寺本 寛	2B04-11
竹野 領	2A01-01	玉田 太郎	4B04-02	寺本 祐司	2D04-04
竹原 宗範	2B02-05	田丸 浩	3B02-11	寺山 拓臣	2E01-05
竹村 海生	2C01-08	田村 彰彦	4F02-10	天牛 英清	2E01-02
竹本 悠人	3G01-03	田村 謙太郎	3C01-12	と	
竹山 春子	2A06-03, 3B02-06, 3B02-07, 3F02-04, 3F02-05, 4D02-07, 4D04-08	田村 隆	4A01-02	土居 克実	2B04-10
田澤 寿明	4B04-01	田村 博康	3D04-04	土居 幹治	2D04-11, 3A01-10
田地野 浩司	3G03-04	丹原 慎司	2G03-01	董 金華	2E06-05
田島 大輝	4E01-03	ち		滕 魯鵬	2G03-04
田島 誉久	2E03-09, 3F04-12	千田 舜	2A01-04	道家 美紗	2F02-04
田代 康介	2D04-03, 3E03-11	千々岩 樹佳	3F02-05	東樹 宏和	4C07-02
田代 有輝	4A03-05	千葉 恒慶	4E01-04	藤間 千尋	2G03-10
田代 幸寛	3F02-01, 3F02-02	千葉 洋子	2A07-06	遠山 敦彦	4C03-01, 4C03-02
田代 陽介	2E01-03, 3C03-10, 3E01-04, 4E01-08	千原 菜緒	4D02-10	常盤 豊	2E03-12
多田 周作	3D04-01	張 俗喆	2E01-04, 2E01-05	徳王 亮太	2A03-08
多田 孝清	4B02-01, 4D02-09	張 羽嘉	2D02-10	徳田 宏晴	3F04-01
多田 宏子	4B04-06	張 宇琪	2A01-12	徳山 健斗	3C01-A1
只見 秀代	3B04-02	張 易千	2D02-10	都倉 知浩	2G01-08
橘 駿介	3E03-11	張 吉	4E03-08	戸田 弘	2C01-11
立野 智資	4B02-02	張 瑞仁	4E01-07	戸所 健彦	2B04-04, 2D04-07, 3D04-03
巽 謙太	2A03-07	長南 茂	4C01-06	鳥羽 修平	2G03-02
巽 祐介	4A01-10	つ		飛田 啓輔	3D02-03
立林 尚門	4E03-06	塚田 祐子	3F02-04, 3F02-05	戸部 友輔	2G03-10
田中 朝陽	3C03-10	塚原 正俊	1S02-A3, 2D04-01	外丸 裕司	4D02-07
田中 賢二	2F02-03	塚原 正義	2G03-02	富田 峻介	2E06-02
田中 健二郎	3G03-06, 3G03-08	津川 裕司	4G06-02	富田 宏矢	2B02-11
田中 謙也	2C03-03	月元 漱介	4A01-11	富田 因則	2B02-03
田中 重光	4G03-03	柘植 陽太	2C01-02, 2C01-03, 2C01-07	富高 美佐	2C03-10
田中 孝明	4F04-04	辻 彩花	2B02-08	富永 依里子	2F02-12
田中 拓未	2D04-05, 4A01-04, 4A01-05	辻 典子	2D02-03	富安 範行	3C03-11
田中 勉	2F02-04, 2F02-05, 2F04-02, 3C01-09, 3C01-10, 3E03-02	辻 雅晴	3C03-12	戸村 正稔	4C01-03
田中 剛	2C01-10, 3B02-02, 3F02-07, 3F02-08, 4D02-11	辻井 雅	2A03-06	巴 瞭斗	2C01-10
田中 知成	3E01-05	辻野 義雄	2F02-01, 4G03-04	友尻 創太	4B02-08
田中 祐圭	4G01-09	津島 玲奈	2D04-08	戸谷 吉博	1S03-A2, 2C03-05, 3A03-02, 3A03-03, 3A03-04, 4B02-05, 4C01-01, 4C01-02, 4C01-05, 4C01-07, 4C01-08, 4C01-09, 4C01-10, 4D04-06
		津田 栄	2C07-03		
		土田 泰暉	4B02-06		
		土戸 哲明	3D02-05		
		角田 悠	3G03-02		
		壺井 ひかり	2B04-01, 3E03-07		
		坪井 宏和	2F02-01		

外山 博英	1S02-A3, 2B04-08, 2D04-01, 3C01-06	中野 祥吾	3A03-13	仁宮 一章	2G03-05, 3F04-02, 3F04-06, 4F02-01, 4F02-02, 4F02-06
外山 二卯佳	2A03-05	中野 智木	3D02-07, 3D02-08	丹羽 一樹	4F04-02
豊里 恵	2D02-09	中野 秀雄	3A03-06, 4B04-07, 4G03-01		
豊嶋 瞭太	2D04-11	中野 美貴子	4F02-08		
豊田 晃一	2C01-02, 2C01-03	長野 祐太	3C03-10	ぬ	
豊田 達哉	2F02-12	中畑 雅樹	2G03-06	額川 裕矢	3D02-02
鳥越 大平	4C03-06	中原 維新	4B04-10		
	な	中原 尚太	2B04-11	ね	
内藤 温貴	2F04-11	仲原 丈晴	3A07-03	根井 俊輔	3D02-07
直井 喬平	2F04-04	中平 洋一	4C01-06	根来 誠司	2G07-03
永井 敦也	3B04-01	中村 和音	2B04-09	根来 宏明	2D04-07
永井 翔悟	3E01-06	中村 史	2G03-12, 3G03-05	根本 進太郎	4E03-02
永井 拓也	3A01-07	中村 努	2A01-07, 2A01-12	根本 侑知	2C01-06, 2C01-12
永井 美希	3G01-04	中村 啓哉	3D02-01		
中井 慶治	4C03-05	中村 泰之	2B04-05	の	
永尾 寿浩	4G03-03	中村 雄	4D02-11	野口 恵一	4A03-06
長尾 征秀	4A01-11	中村 優里	2B04-01	野口 友嗣	3D02-03
中尾 素直	4C03-06	中村 隆太郎	4A03-06	野崎 功一	3A03-07
仲上 豪二朗	2B02-01	長森 英二	4C01-04, 4F02-13	野澤 大樹	3A01-12
中川 翔太	3B02-09	中山 二郎	2F04-11, 4C03-07	野田 尚宏	2A01-11, 3B04-09
中川 智行	2C01-06, 2C01-12	中山 夏女	4A01-02	野田 祐亮	4E03-05
永倉 佑真	3E01-12, 4G03-09	中山 友梨香	4A03-09	野中 浩一	3G06-01
長崎 晃	2G03-12	奈良 聖亜	3B04-10	野中 玲実	4B04-12
中澤 光	2B04-05	成原 葉	2B02-02	野見山 泰成	2F04-11
中澤 昌美	4E03-04	鳴海 哲夫	3C03-10	野村 果音	3E03-03
中澤 慶久	4G07-01			野村 暢彦	2E03-03, 3B02-10, 4F04-02
中島 一紀	1S03-A3, 2E01-09, 2E01-11, 2F04-05, 2A06-05	に		野村 颯人	2C01-12
中島 賢則	3A06-04	二井手 哲平	3A03-02, 3A03-03, 3A03-04, 4B02-05, 4C01-09, 4D04-06	野村 亘	2B02-04, 2B02-05
中島 拓都	3F02-10	新本 佳子	2B02-09		
仲嶋 翼	2A07-05	荷方 稔之	3B04-01	は	
中島 敏明	3E01-09, 4E01-03	西 輝之	2B04-05	羽川 瞳	4F04-11
中嶋 幹男	4D04-12	西 智之	3D04-04	萩尾 葵	2B02-02
中嶋 唯人	2D04-10	西岡 優佑	4A03-01	朴 龍洙	2A01-08, 2F02-08, 4B04-04, 4D02-03
中島 由莉奈	3C01-02	西河 佑馬	4G03-01	朴 龍洙	4D02-06
中島田 豊	2C01-01, 2C01-08, 2E03-09, 3C03-09, 3F04-08	西川 洋平	3B02-06, 3F02-04, 3F02-05	白米 優一	4B02-10
中杉 行秀	3A01-08, 3A03-12	西澤 智康	4C01-06	橋 瞭太	3E03-01
長田 あかね	3G03-05	西嶋 美保	3E03-12	端谷 智子	3F04-02
永田 暁洋	2B02-11	西田 郁久	3D04-04	橋場 倫子	2B04-05
中田 一弥	2G07-02	西田 行希	4G03-02	橋本 一憲	3E06-02
中田 健太	2A01-02	西谷 洋輔	2C03-12, 3A06-03	橋本 萌加	2D04-04
永田 妃奈子	3D02-09	西原 宏史	3E01-06	橋本 稜知	2E03-02
中谷 航太	3C03-11, 4C03-06	西向 めぐみ	3E01-07	羽城 周平	4A01-A1
中谷 祐将	4G03-04	西村 聡子	2C03-07, 2E03-10	蓮沼 誠久	2B02-08, 2B04-05, 2C03-03, 2C03-04,
中務 邦雄	4G06-05	西村 洗樹	3B04-02		3A03-08, 3C01-08,
永富 康司	3B04-02	西村 祥	2B04-09		4A01-01, 4C01-03,
長縄 真以	2A01-05	西村 美郁	3B02-06		4C03-04, 4E06-06
中西 昭仁	4E01-01, 4E03-02	西村 勇哉	2G01-01, 2G01-02	秦 康祐	3C03-11
中西 貴士	2B04-11	西本 健太郎	3A03-12	幡多 徳彦	2G01-07
中西 猛	4B04-09, 4B04-10, 4B04-11	西矢 芳昭	2A01-07, 2A01-12, 2A03-05, 2A03-07	秦 洋二	2D04-07, 2A06-02
中西 悠人	4F02-07	西山 和夫	2D04-09, 3D02-07, 3D02-08	畑岡 堯也	2G03-08
中野 一成	3F04-06	西山 千遥	2A01-05	畑下 昌範	2F02-09
長野 一也	3A01-07	西脇 寿	2A03-12	秦田 勇二	4B02-03
		二塚 美紀	3C01-07	秦野 琢之	3E03-06
				服部 真帆	2D02-05
				花井 泰三	3E03-01, 4D04-07

殖生 智洋	3D04-01	廣田 隆一	2B02-10, 2E03-09,	伏見 圭司	3A03-08, 4A01-01	
羽野 健志	4D02-07		2F04-01, 3A01-08,	藤山 和仁	3E03-08, 3E03-09,	
浜岸 麻衣	2C01-02		3A03-12, 3E01-03,		3E07-03, 4E03-11,	
濱北 宗太郎	2A01-01		4G01-08		4F02-08	
濱口 裕明	3D02-01, 3D02-06	廣田 瑠花	2A03-03	藤原 伸介	3C03-01	
濱崎 奈津香	4F02-10	弘埜 陽子	2C01-07, 3C01-12,	藤原 大介	3A07-04	
濱田 美志	4C01-06		4C01-01	藤原 卓巳	3A01-10	
早川 紗和子	2A03-02	ふ			藤原 健史	2D02-09
早川 勇太	4F02-12			藤原 逸人	3C03-08	
早坂 実夏	2A01-03	ブーニャキダ ジラユ	4B04-04	藤原 悠暉	2B02-11	
林 咲希	3G01-04	深田 宗一朗	3G01-02	藤原 政司	3G01-01	
林 哲也	3B04-06	深田 梨沙子	4A03-05	二神 泰基	2D04-03	
林 大暉	2A03-12	深津 奈々	2D04-08	二田 昂志郎	2C03-10	
林 真央	4A01-08	深野 和紘	2C03-10	二又 裕之	2E01-03, 3C03-10,	
林 稜也	3C03-10	吹谷 智	3B04-06		3E01-04, 4E01-08	
原 あや乃	3B02-04	福井 啓太	4C06-03	二見 淳一郎	2C07-04, 4B04-05,	
原 清敬	2C01-07, 3C01-12,	福井 健人	2B02-05		4B04-06	
	4C01-01	福居 俊昭	2B04-02, 4D04-04,	舟橋 久景	2B02-10, 2E03-09,	
原 圭佑	4B02-02		4E01-04		2F04-01, 3A01-08,	
原 大樹	4C03-02	福崎 英一郎	1S04-01, 1S04-02,		3A03-12, 3E01-03,	
原 正之	3G01-07, 3G01-08,		2A03-10, 2A03-11,		4G01-08	
	3G01-09, 4F02-09		2A03-12, 2A06-01,	古川 裕貴	4G03-01	
原 良太郎	3A01-04		3D02-01, 4C03-05,	古澤 省吾	2D04-02	
原口 裕次	2B02-08, 3E01-01		4C03-12, 4D04-02	古澤 力	4C01-02	
張本 乾一	2G01-07	福沢 周平	1S04-04	古澤 晃史	2B04-07	
半田 敦也	2B04-07	福島 宗一郎	2G03-04	古田 忠臣	2F04-12	
番場 崇弘	4C01-03, 4C03-04	福田 淳二	2G03-03, 2E07-05	古田 雅一	3D02-05	
馬場 健史	3C03-11, 3F02-03,	福田 大治	4F04-02	古谷 昇	3D04-08	
	4C03-06, 4D04-07	福田 大介	2C03-06	古野 正浩	4C03-05	
ひ		福田 隆志	2F02-07	古屋 俊樹	3A01-12, 3A03-05	
		福田 紘子	4D04-12	へ		
樋口 拓哉	2G03-11	福田 青郎	3C03-01			
樋口 響	2C03-02	福谷 洋介	4B04-01	別宮 浩之	2E01-02	
樋口 雄大	3E01-08	福永 圭佑	4A03-11	別府 春樹	2A01-01	
久田 健司	2C01-12	福西 広晃	4E01-01	ほ		
日詰 達哉	4C01-12	福原 彩乃	4D02-02			
緋田 安希子	3F04-12	福岡 奈々子	3G03-04	坊垣 隆之	2F02-01	
秀瀬 涼太	4A01-01	福守 一浩	2G03-01	外村 彩夏	2E01-06	
日野 資弘	1S01-A1	藤 あかね	2F02-09	保木本 達也	2G03-07, 3G01-05	
日比 慎	3A01-04, 3A03-09	富士 大輔	4G01-01, 4G01-03,	星田 尚司	4A03-01	
一二三 恵美	4B04-12		4G01-04, 4G01-05,	保科 涼	3A01-11	
氷見山 幹基	2A01-07, 2A01-12		4G01-06	星野 里帆	2E03-11	
平 大輔	2B02-01	藤井 恵輔	3D02-03	細川 正人	3B02-06, 3B02-07,	
平井 優輝	3E03-04	藤井 大河	3B02-02		3F02-04, 3F02-05,	
平川 祐子	4D02-08	藤井 隆夫	2B02-01		4D04-08	
平瀬 辰朗	4B02-01	藤井 達也	2C01-08	細田 景太	3C01-05	
平田 收正	3A01-07	藤井 力	3D04-02, 3A07-02	堀田 夏紀	3D04-03	
平田 大	3D04-04	藤井 直紀	2C03-07	堀 克敏	2C07-01, 4C06-04	
平田 風子	2A01-06	藤井 浩	2A03-02, 3A01-01,	堀 真紀	3E01-06	
平田 結風	3G03-03		4E01-02	堀 政博	2C06-03	
平田 悠大	2E01-02	藤江 誠	4E03-08	堀井 俊平	4D02-07	
平田 善彦	2B02-01, 3A01-07,	藤岡 晴生	2G03-09	堀内 淳一	3E03-01, 3E03-02,	
	3F04-05	藤川 康夫	3E07-04		3E03-03, 3E03-04,	
平中 佑磨	3A03-11	藤澤 誠	4C01-04		3F02-11, 3F02-12,	
平野 優	4B04-02	藤田 憲一	4B02-06, 4B02-07		3F02-13, 4E03-06	
平松 健太郎	2D04-03	藤田 雄大	3E03-06	堀江 千紘	4F04-02	
広川 安孝	3E03-01	藤谷 将也	3G03-06	堀江 楓子	3D04-08	
廣島 大祐	3E01-11	藤野 武彦	2B04-10	堀口 一樹	2G03-06	
廣瀬 尚仁	3E01-05	藤野 泰寛	2B04-10	堀田 真代	2F02-04	

堀之内 貴明	4C01-02	松田 幸大	2G03-06	南 はつね	2B04-04
本莊 知子	4B04-05	松谷 峰之助	4B02-04	南畑 孝介	2A03-08, 3A01-09, 4A03-07
本庄 雅則	2B04-10	松永 民秀	2E07-01	峰松 健夫	2B02-01
本莊 雅宏	2E01-03	松永 浩子	4D04-08	峯邑 浩行	4D02-02
本田 絢郁	3D02-10	松永 裕太	4F04-11	三俣 好令	4E03-09
本田 孝祐	2B02-07, 3B04-07, 4C01-12, 4C03-05	松永 行子	2E07-02	三宅 克英	2C03-07, 2E03-10, 3E01-12, 4G03-09
本多 裕之	3G01-02, 4F04-11	松永 陽平	2A01-09	三宅 司郎	2E06-05
本田 裕樹	2A03-02, 3A01-01, 4E01-02	松原 未佳	2C03-07	三宅 英雄	4D02-10, 4E03-05
本間 一郎	3D04-04	松村 洋寿	4B04-02, 4A03-06, 4A03-10	宮古 圭	2D02-09
本間 順	2G03-10	松村 吉信	2E03-02	宮崎 健太郎	2B02-07
ま		松本 謙一郎	2B02-11, 2B04-02, 2G06-02	宮崎 剛亜	2A01-08
前川 佳花	3D02-01	松本 琴音	2F02-01	宮澤 拳	2F02-02
前田 勇	2E01-10	松本 拓	2D04-04	宮副 真子	2F04-08
前田 紗香	3E03-09	松本 拓也	3C01-13, 4B02-05	宮田 ころも	3C01-05
前田 智也	3B04-06, 4C01-02	松本 知歩	3C01-09	宮原 しろ沙	2F02-03
前田 誠	2F02-12	松本 直己	2B02-11	宮部 由彩	3E01-11
前田 瑞歩	2F02-07	松本 李梨	4E01-01	宮本 愛	4B04-05, 4B04-06
前田 結衣	4F02-09	松山 彰収	3A01-12	宮本 浩邦	2D02-06, 3A01-11, 3F02-01, 3F02-02
前田 義昌	3B02-02	松山 南	3G03-06	宮本 風俊	2G01-07
前野 友美	4E01-11	黛 新造	3E03-12	宮脇 佳汰	3A03-02, 3A03-03
前畑 秀叡	4D02-06	丸井 和也	3B02-01	宮脇 佑実	2A03-09
真壁 幸樹	2A03-03, 4B04-09, 4B04-10, 4B04-11	丸子 ひかる	2C03-12	三吉 健太	4C01-02, 4C01-09
横田 祐介	3E01-11	丸山 魁斗	3B02-03	三輪 有哉	2A01-01
牧野 勇樹	2A01-01	丸山 季穂	3A01-01	民部 裕洋	4F04-04
牧野 祥嗣	4A01-09	丸山 正晴	4D04-10	む	
政井 英司	3E01-08	丸山 凌	4D04-03	向田 志保	2A07-04
眞崎 加奈子	4G01-08	馬渡 志郎	2B04-10	武藤 清明	2F02-02
升井 伸治	4G01-02	満生 萌水	2D04-02	棟方 涼介	3C01-08
益井 実鈴	4B04-05, 4B04-06	萬代 由莉恵	4G03-04	村岡 未彩	3A01-07
増田 賢人	2A03-06	満保 拓実	2E03-11	村上 明男	3E03-01
町田 慎悟	2G07-02	み		村上 愛美	3B02-01
町田 佑樹	2F02-08	三浦 綾夏	2D04-08	村上 克治	2C01-08
松井 勇人	2F04-12	三浦 夏子	4G06-06	村上 慶多	4C03-01
松浦 将介	3C03-06	三浦 真帆	2D04-09	村上 周一郎	2D02-05, 3C03-05
松浦 秀幸	3A01-07	三岡 哲生	3B04-02	村上 博紀	2B02-10
松浦 将吏	2C01-01	三木 健夫	3D04-11	村上 茉奈美	4C01-02
松岡 宥汰	2F04-02, 3C01-10	三木 翔平	2D04-05, 3D04-01	村上 優衣	3C03-01
松崎 竜也	3D02-07, 3D02-08	三木 慎介	3A03-09, 3A03-10	村田 智志	3F02-07, 3F02-08
松崎 浩明	3E03-06	三木 健夫	3D04-10	村田 昌浩	4D04-13
松崎 弘美	2F02-03, 3D02-09, 3D02-10	見崎 裕也	4B02-02	村田 和加恵	4B02-06, 4B02-07
松崎 有未	3G01-03	三崎 亮	3E03-08, 3E03-09, 4E03-11, 4F02-08	村松 彩香	4D04-04
松沢 智彦	4C01-A1	水崎 圭	2E03-10	村松 和明	4F02-10
松鹿 昭則	2C01-08	水谷 治	2B04-08, 2D04-01, 3B04-05, 3C01-06	村山 拳午	4E03-01
松下 一信	2C01-04	水谷 拓	3A01-04	村山 芳香	2D02-03
松瀬 一平	4E01-06	水野 洗介	2C01-12	も	
松田 明香里	3D02-10	水野 淳太	4E01-12	茂木 喜信	3D02-02
松田 貴意	4D04-07	水野 優	3F02-01	望月 貴博	3B04-02
松田 史生	2C01-02, 3C01-01, 3C03-07, 3C03-08, 4C01-01, 4C01-07, 4C03-01, 4C03-02, 4C03-03, 4D04-05, 4D04-10, 4D04-11	道盛 裕太	2A01-01, 4D04-03	望月 誉志幸	4B02-09
松田 真実	2C03-03	三井 亮司	2C01-12, 2C03-08, 2C03-12, 3A06-03	元岡 大祐	3E03-09
		三ツ石 方也	4A01-05	本村 麻子	3G01-04
		光成 麻弥	4A03-08	本山 賢人	4D04-09
		三森 裕示	4D02-08	森 あすか	3D02-01, 4D04-02
		南 豪	2E06-01	森 一樹	2D04-03, 3E03-11
				森 壮太	2A01-08

森 英樹	3G01-07, 3G01-08, 3G01-09, 4F02-09	山下 哲郎	2E01-06, 2E01-07	横山 匠	4G01-01, 4G01-03, 4G01-04, 4G01-05, 4G01-06
森 浩禎	4D04-12	山下 秀行	2D04-05, 3D04-01	横山 雅美	4D02-02
森 光矢	3B04-10	山城 寛	3D04-01	吉井 未貴	4G03-03
森 めぐみ	2A03-09	山田 修	1S02-A3	吉岡 育哲	3C03-03, 3C03-04
森 玲香	2A01-03	山田 賢治	2C06-02	吉岡 美紗	3C03-01
森井 勇翔	4B04-11	山田 紗里奈	3B02-11	吉崎 由美子	2D04-03
森口 浩聡	3G03-11	山田 翼	3D04-02	吉澤 莉奈	2F04-10
森下 琢麻	2G01-01, 2G01-02	山田 真澄	4F02-03	吉田 曉弘	3E01-08
森下 風香	2C01-02	山田 美和	2E01-06, 2E01-07, 3E01-07	吉田 江里菜	2C03-04
森島 輝	3G01-01	山田 侑季	4C03-01	吉田 和典	4A01-06
森田 いずみ	2E06-05	山田 梨沙	4B04-10	吉田 晃	4D04-03
森田 健太	2G01-01, 2G01-02	山田 良一	4G03-05	吉田 滋樹	2D02-10
森田 大地	2B04-09	山田 亮祐	3C01-13	吉田 純菜	4B04-09
森田 友岳	2C01-08	山手 康輝	2G01-01, 2G01-02	吉田 昭介	2B04-04
森田 大貴	2A01-04	山中 享史	2E03-09	吉田 貴美	2G03-09
森本 一輝	4E03-07	山中 勇人	2A01-13, 4C01-04	吉田 ナオト	2C01-05, 2E03-01
森本 啓太	2C01-10	山中 洋昭	4F04-01, 4F04-03, 4F04-05	吉田 信行	3B04-04
森芳 邦彦	2A01-07, 2A01-13, 4C01-04	山根 周弥	2F04-07	吉田 遥海	2F04-11
森脇 真希	4B02-08	山野 範子	4D04-09	吉田 雅偲	3D04-08
や		山野-足立 範子	4F02-05, 2G03-08, 2G03-09, 3G01-05, 3G03-02, 4A01-10, 4A01-11, 4A01-12, 4F02-11, 2G03-07, 4F02-07	吉田 亮介	2F04-01
八木 敬祐	2E01-02			吉野 進	3A06-03
八木 宏昌	4G06-04			吉野 知子	2C01-10, 2A06-04, 4D02-11
薬師 寿治	2C01-04			吉見 啓	2F02-02, 4A01-04, 4A01-05
矢口 貴志	3C03-04			吉本 真	3E03-08
矢倉 一樹	2A03-07	山内 万貴	2G03-03	依田 卓也	4D04-08
矢崎 一史	3C01-08	山原 研一	3G01-01	依田 毅	3F04-03
安池 一貴	3C03-10	山本 佳奈	4E03-11	米子 響	3A01-10
安田 智恵子	3E01-08	山本 修一	3G06-03	米島 靖記	3A06-02
安永 正浩	4B04-08	山本 卓	3E06-01	米塚 亜美	2F02-08
谷田部 楓太	3C01-01	山本 達也	2E03-03, 3B02-10	米光 裕	2C01-06
柳田 晃良	2D04-02	山本 昌輝	4D04-13	寄兼 菜摘	3F04-01
柳瀬 卓馬	2C01-05	山本 万結	2C03-08	り	
矢野 高典	2C03-08, 2C03-12	山本 美月	4G01-06, 4G01-01, 4G01-03, 4G01-04, 4G01-05	李 文雄	4E01-07
矢野 佳果	4A01-02			リー デイビッド	3B02-05
藪 浩	4A01-04, 4A01-05			劉 利雲	2D04-05
山内 清司	3G03-04	山本 美也子	2B04-09	わ	
山内 悠至	3B02-08	山本 康之	4D04-03	若井 暁	2E01-01, 2F02-01, 3C03-02
山内 夢乃	2A01-06	山本 陽治	2G03-02	若狭 颯介	4E01-07
山形 洋平	2B04-07	山本 祥輝	3C01-13	若槻 壮哉	2C03-12
山川 達也	3D04-01	山本 芳彦	3G03-06	若月 良子	3E03-11
山岸 彩奈	2G03-12, 3G03-05	山本 陸	2G01-08	我妻 竜太	3F02-04, 3F02-05
山口 明生	2G01-04	屋良 みなみ	3E03-05, 4D04-01	若林 憲信	2G03-10
山口 陽	2C01-03	八幡 穰	4F04-02	若林 壮吾	4F02-06
山口 慎一郎	2C01-07	ゆ		若林 里衣	3A01-09, 4A03-07
山口 大介	3F02-13	結城 里沙	4E01-02	若山 泰介	3E01-11
山口 颯人	3B04-06	湯川 忠二	3F02-12	脇 駿也	2C01-10
山口 良弘	2A01-02, 4B02-06, 4B02-07	よ		脇坂 都	3F04-05
山崎 思乃	4F04-10, 4G03-05	叶 静遠	3E03-01	脇田 克也	2E03-02
山崎 晴丈	3B02-03, 3C01-02, 3C01-03, 3C01-04	養王田 正文	4A03-06, 4B04-01	脇中 琢良	3D02-02
山崎 裕永	3G03-10	横田 亜紀子	2A01-11	涌井 秀樹	4A03-10, 4B04-02
山崎 正夫	2D04-09, 3D02-07, 3D02-08	横田 篤	2C01-02, 2C01-03, 3B04-06	鷺尾 周	2G01-01, 2G01-02
山崎 雅大	4F02-07	與古田 佳世	2B04-08	和田 佳湖	4G03-05
山崎 美輝	4D04-08	横田 健治	4B02-04		

和田	圭介	2C01-08
和田	直樹	3B02-01
和田	大	2C01-02, 2C01-03
和田	真由美	4G03-06
渡邊	愛梨	4A03-05
渡辺	一樹	3F02-09
渡部	寛大	4E03-08
渡邊	研志	2B02-09, 3E03-12
渡辺	智	2F04-01
渡邊	秀平	2B02-11
渡部	潤	3D02-02
渡辺	俊介	4A03-03
渡辺	大輔	4G06-01
渡邊	崇史	2D02-09
渡邊	拓海	4C03-12
渡辺	直己	2C01-01
渡邊	直暉	4D04-01, 4D04-13
渡邊	肇	3B02-04, 3B02-05
渡邊	幸夫	3A03-09
渡部	凌	3C01-03

ランチタイムセミナー

各日の昼休憩を利用して開催を予定しています。事前登録不要・参加費無料です。参加される場合は直接会場へアクセスください。

.....

《大会2日目》10月18日（火）12：00～13：00

2A05-01（A会場） P&G イノベーション合同会社

酵母の代謝物質網羅解析と化粧品素材への可能性～ガラクトミセス属近縁酵母の特性解析～

Comprehensive Analysis of Metabolites in Yeast and Their Potential Application for Cosmetic Materials:
Characterization of a Yeast Related to the Genus Galactomyces

.....

《大会3日目》10月19日（水）12：00～13：00

3G05-01（G会場） ノバ・バイオメディカル株式会社

新モダリティへの応用をふまえたバイオ医薬品製造技術の最新動向

.....

《大会4日目》10月20日（木）12：00～13：00

4C05-01（C会場） ベックマン・コールター株式会社

マイクロウェルプレート+オンラインモニタリングで最大48培養の条件検討を同時にできるマイクロバイオリアクター BioLector XT

4E05-01（E会場） バイオテック株式会社

微生物ものづくりのための合成生物学と実験自動化バイオエコノミーの実現に向けて

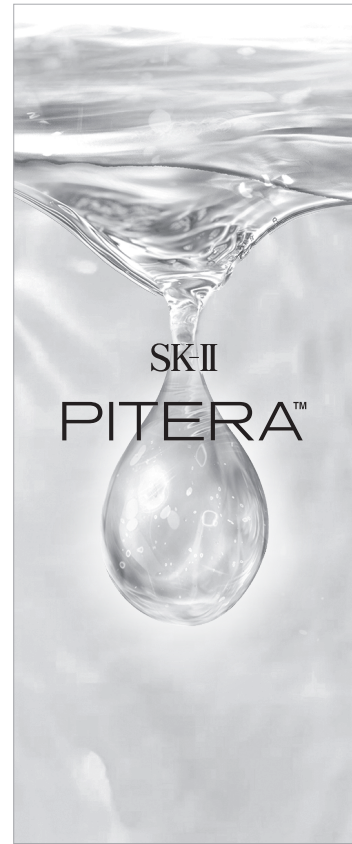
SK-II lunch time seminar / SK-II ランチタイムセミナー

2022年10月18日(火) 12:00-13:00 A会場 講演番号:2A05-01

酵母の代謝物質網羅解析と化粧品素材への可能性
～ガラクトミセス属近縁酵母の特性解析～Comprehensive Analysis of Metabolites in Yeast and
Their Potential Application for Cosmetic Materials:
Characterization of a Yeast Related to the Genus *Galactomyces*演者
Presenters神戸大学 先端バイオ工学研究センター バイオ生産工学研究室
BioProduction Engineering Lab, Engineering Biology Research Center, Kobe University特命准教授 (Associate professor)
梅林 恭平 Kyohei Umebayashi特命助教 (Assistant professor)
番場 崇弘 Takahiro Bamba

酵母をはじめとする微生物は、古くからアルコール、アミノ酸、抗生物質など様々な有用代謝産物の生産に利用されてきた。近年、サステナブルな社会の発展を目指し、グリーン素材として微生物由来成分の産業への応用がますます注目されている。化粧品業界では、1970年代にバイオテクノロジーの興隆によって微生物を利用した素材開発が始まり、SK-IIブランドはいち早くその流れを受け、ガラクトミセス酵母の発酵産物を利用した独自素材を開発し、その皮膚外用剤としての効果を検証してきた。近年、バイオテクノロジーの技術革新により、「スマートセル」による代謝工学は、最新のメタボロミクス解析と相まって、様々な産業分野で新しい素材を生み出すことを期待されている。本研究では、最新メタボロミクス技術を用い、ガラクトミセス属近縁酵母に特徴的な代謝物質を解析し、その特性を理解することで物質生産菌株としての可能性を探索した。産業上よく利用されている *Saccharomyces cerevisiae* と比較し、細胞内外の代謝物質の蓄積を経時的に分析した。本酵母株はペントースリン酸経路の化合物や種々のアミノ酸産生の特徴的な代謝プロファイルを示し、*S. cerevisiae* とは異なる様々な有用化合物を細胞内外に蓄積することを明らかにした。また、培養条件に依存して、皮膚バリア機能を保護し肌荒れを予防することで知られるパントテン酸を高生産することも明らかになった。ガラクトミセス属やその近縁酵母は酵母型・カビ型の二形性をとる特徴的な微生物であり、培養条件・環境による形態と代謝特性への影響についての研究も始めている。

Yeast and other microorganisms have long been used to produce a variety of useful metabolites such as alcohols, amino acids, and antibiotics. In recent years, the application of microorganism-derived ingredients as green materials to industry has been attracting more and more attention with the aim of developing a sustainable society. In the cosmetics industry, the development of materials utilizing microorganisms began in the 1970s with the rise of biotechnology, and the SK-II brand was one of the first to follow this trend, developing its own materials using the fermentation products of *Galactomyces* yeast and testing their efficacy as topical skin care products. With recent innovations in biotechnology, metabolic engineering with "smart cells" coupled with the latest metabolomics analysis is expected to create new materials for various industrial fields. In this study, we used the latest metabolomics technology to analyze metabolites characteristics of a *Galactomyces* sp. -related yeast and explored their potential as hosts for material production. Compared to *Saccharomyces cerevisiae*, which is commonly used in industry, the accumulation of intracellular and extracellular metabolites in the *Galactomyces* sp. -related yeast was analyzed overtime. This yeast strain showed characteristic metabolic profiles of compounds of the pentose phosphate pathway and various amino acids, indicating that they accumulate various useful compounds inside and outside the cells differently from *S. cerevisiae*. It was also revealed that, depending on culture conditions, the *Galactomyces* sp. -related yeast produces high levels of pantothenic acid, which is known to protect the skin barrier function and prevent skin roughness. *Galactomyces* spp. and their related yeasts are unique microorganisms with yeast-type and mold-type dimorphism, and further studies on the effects of culture conditions and environment on its morphology and metabolic characteristics have been initiated.



ピテラ™: 特別な酵母の株から、独自のプロセスで発酵させ生み出した、SK-IIだけの天然由来成分 (SK-II独自のガラクトミセス培養液 → 整肌保湿成分)

PITERA™-SK-II's exclusive and naturally derived ingredient crafted from a proprietary fermentation process of a unique yeast strain. (SK-II's owned *Galactomyces* Ferment Filtrate - skin conditioning agent).



お問い合わせ: P&G イノベーション合同会社 P&G Innovation Godo Kaisha
SK-IIグローバル学術広報 SK-II Global Scientific Communications
宗 千栄子 Chieko Soh Tel 078-336-6265 / E-mail soh.c@pg.com

第74回日本生物工学会 ランチタイムセミナー

日時

2022年 10月19日(水)12:00~13:00

講演番号・会場

3G05-01 G会場

タイトル

新モダリティへの応用をふまえた
バイオ医薬品製造技術の最新動向

演者

岡村 元義 氏 株式会社ファーマトリエ 代表取締役

要旨

新モダリティとは新しい医薬品の治療法のことですが、今回の新型コロナワクチンにおける mRNA や、治療効果を高めるために従来のモノクローナル抗体 (IgG) を改良した Fc フュージョンタンパク質、VHH 抗体、バイスペシフィック抗体あるいはがん治療の特異性を高めた ADC などの新しいモダリティが実用化されてきています。いずれもバイオ医薬品製造の基本技術である培養および精製が用いられますが、これら未知の医薬品の製造には創意工夫と技術革新が求められています。本セミナーでは新モダリティの製造に用いられる技術を最新動向をご紹介します。課題と将来への展望についてお話しいたします。

バイオテクノロジー関連
ウェビナー配信中



ノバ・バイオメディカル株式会社

〒104-6007 東京都中央区晴海 1-8-10 晴海アイランドトリトンスクエアオフィスタワー X7 階

TEL:03-5144-4144 FAX:03-5144-4177

E-mail:jp-marketing@novabio.com <https://www.novabiomedical.com/jp>

nova
biomedical

第74回日本生物工学会 ランチタイムセミナー

日時 2022年 10月20日 [木] 12:00 ~ 13:00

会場 C会場 講演番号 4C05-01

タイトル **マイクロウェルプレート + オンラインモニタリングで
最大48培養の条件検討を同時にできる
マイクロバイオリアクター BioLector XT**

- ① 各種有用微生物の培養条件検討の実例
- ② 新機能 光合成微生物の培養が可能な
「Light Array モジュール」の紹介



BioLector XT

概要

マイクロバイオリアクター BioLector XTは、培養プロセスの最適化、詳細な培養データが必要な菌株の評価などの、ハイスループット化が可能です。

本セミナーでは、BioLector XTによる**大腸菌** (*E. coli*)、**酵母** (*Hansenula polymorpha*)、**植物細胞** (*Nicotiana tabacum*)、**乳酸菌** (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*)、**ビフィズス菌** (*Bifidobacterium bifidum*)、**海洋細菌** (*Vibrio natriegens*) を、異なる基質、pH、流加条件、あるいは高酸素条件などで培養、モニタリングした様々なアプリケーション例を交えながら、BioLector XTのパワフルな機能をご紹介します。

さらにマイクロバイオリアクター BioLector XTの新機能「**光合成微生物の培養**」が可能な16種の波長のLEDを搭載した「Light Array モジュール」を**微細藻類** (*Chlorella vulgaris*) の培養例とともにご紹介いたします。*

マイクロバイオリアクター BioLector XT

- ✓ 最大48ウェルの専用マイクロプレートで複数の微生物株をパラレルに培養、評価
- ✓ 培養パラメータ (pH、菌数、酸素飽和度、振とう速度、蛍光強度など) のオンラインモニタリング
- ✓ ガスコントロールモジュールで嫌気、好気性微生物に対応
- ✓ pH制御、基質などの流加培養をプログラム、あるいはシグナルトリガーにより制御

*Light Array モジュールは開発中のため、開発状況により発表内容が変更になる場合があります。また本記事はその機能や性能を保証するものではありません。

Beckman CoulterおよびBeckman Coulterロゴは、Beckman Coulter, Inc.の登録商標です。

ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704

✉ bckk_ls_web@beckman.com URL <https://www.beckman.jp>



第74回日本生物工学会 ランチタイムセミナー

微生物ものづくりのための合成生物学と実験自動化
バイオエコノミーの実現に向けて

日時：令和4年 10月20日(木) 12:00~13:00

会場：E会場

講演番号：4E05-01

演者：石井純 先生

神戸大学 先端バイオ工学研究センター／大学院科学技術イノベーション研究科 准教授

要旨

2030年のバイオ市場はGDPの2.7%（約180兆円）と飛躍的な市場拡大が予想されている。この背景には、バイオテクノロジーとデジタルテクノロジーの融合が可能になってきたことから合成生物学（生物学と工学の学際的分野）が進展し、地球環境問題を解決しつつ経済成長を伴う持続可能社会の構築を目指したバイオエコノミーという概念が世界的に浸透してきたことがある。合成生物学の分野では、米国を筆頭にバイオ実験の自動化が進められており、膨大な数の改変細胞を作出してデータを取得するとともにデジタル技術を活用することで、効率的なものづくり微生物の創出が試みられている。また、我が国の国益に直結する科学技術分野として「バイオものづくり」が新たに指定されたことから、国内においても微生物を用いた物質生産に改めて注目が集まっている。本講演では、酵母や大腸菌によるものづくりを目指して我々独自に開発してきたバイオ化学品やバイオ医薬品など物質生産のための合成生物学の技術や、バイオテック社のEDR-384SX等の自動分注装置を活用したバイオ実験の自動化に関する取り組みを紹介する。


バイオテック株式会社®
URL <http://www.biotec.co.jp> E-mail: info@biotec.co.jp本社/〒113-0034 東京都文京区湯島2-29-4 古澤ビル
TEL. (03)3816-6931 FAX. (03)3818-4554大阪営業所/〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原4-3-12
新大阪明幸ビル901
TEL. (06)6151-9690 FAX. (06)6151-9689

第74回 日本生物工学会大会ご参加の皆様へ 試験管ミキサー(卓上ミキサー)寄贈のお伺い

● タイテックでは社会貢献活動の一貫として、研究・教育・検査に関わる皆様に、実験現場で汎用される卓上試験管ミキサーの**応募者全員プレゼント企画**を過去複数回行って参りました。2005年からこれまで総計1万7千台以上を寄贈しております。

● 本ミキサーは過去ユーザー様から頂いた「使用中に動き回らないミキサーが欲しい」というご意見を元に、バランスを追求した独自形状の製品を開発したものです。ユーザー様の声を製品に活かしフィードバックする。弊社のモットー「ユーザー直結」の象徴とも言える製品であり、折に触れ寄贈を行って参りました。



● 2020年からは「学会ミキサー企画」と称し、日本の各地で行われる大小多数の学会大会への支援企画として各リアル・オンライン大会参加の皆様へ、試験管ミキサーをプレゼントする企画を開始致しました。大好評につき今年も継続いたします。

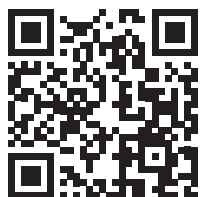
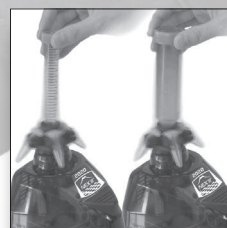
● 弊社「学会ミキサー」を学会を盛り上げる支援企画として、困難な状況下で研究を続ける皆様へのご助力として**寄贈を行いたく**考えております。(本体、送料全て弊社負担)。

一度に複数台のお申し込みも可能ですので、どうぞ遠慮なく。皆様のご応募をお待ちしております。



「学会ミキサー」仕様 (弊社試験管ミキサー Se-04 同等品)

- 攪拌方式
水平偏心震動式、約 2800r/min (固定)、連続運転
- 適用容器/架数
手持ち攪拌：マイクロチューブ各種～50mL 遠沈管
固定攪拌：0.5 mL マイクロチューブ×4 本+ 1.5/2mL マイクロチューブ×4 本



【応募フォーム】 <https://taitec.net/g-mixer-sbj2022/>
もしくは左の二次元バーコードからご応募ください。
受付：2022/10/11～10/27 まで。

後日、弊社より宅配便にて直送いたします。

※ご記入頂いた個人情報は、個人情報保護法に従い、細心の注意を払って厳重に管理いたします。個人情報は製品のご送付とアフターサービス以外の目的には使用いたしません。
※ご記入頂いた個人情報は、お客様の承諾を得た上で、前項の目的の範囲内で、弊社の関係会社および業務委託先に提供させていただきます。

タイテック株式会社 <http://TAITEC.net/>

〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1 TEL：048-988-8359 FAX：048-988-8362 Email：senden@taitec.org



情報で、科学をひらく

情報は、新しい扉を開けるための鍵だ。
 世界を変えるための資源だ。
 人を幸福へ導くための燃料だ。
 私たちは半世紀以上も前から、科学に携わるすべての人を、
 情報を通じて支えてきました。

必要な科学情報が、いつでも最適な形で手に入る。
 その環境を整えることは、これまで世の中に
 存在しなかった技術を生み出す助けとなり、
 新たな未来への近道を示すことにほかなりません。

探究心を減速させない。研究開発を加速させる。
 それが JAICI の存在意義であり、
 より豊かな社会の実現を願う、私たちの使命です。
 そのために、自らも変革に挑み続け、
 これからも人々に感動と幸せをお届けしていきます。
 情報が、科学の未来を切り拓くと信じて。



- エンドユーザー向け科学情報検索ツール CAS SciFinder®
- 情報専門家向け科学技術分野の検索ツール CAS STNext
- 特許検索・解析ツール CAS Scientific Patent Explorer
- 世界最大の製剤・配合コレクション CAS Formulus
- 科学的分析手法の検索ツール CAS Analytical Methods
- 物質規制情報検索ツール CAS Chemical Compliance Index
- 特許モニタリングサービス FIZ PatMon
- 分子性結晶関連ツール CSD-Core, CSD-Materials
- 創薬支援ツール CSD-Discovery, CSD-Enterprise
- 無機マテリアル系データベース ICSD、相図データベース
- 質量スペクトルデータベース NIST20、Wiley Registry
- 化合物辞典シリーズ CHEMnetBASE
- CAS登録番号(CAS RN®)の取得代行サービス CAS Registry Services
- 製品カタログ情報提供サービス CAS Chemical Supplier Insights
- 用途に合わせて選択できる機械翻訳サービス JAICI AutoTrans、JAICI ProTranslator
- 専門用語豊富なシソーラス付き辞書 JAICI Science Dictionary Pro、JSD Web API
- 文献複写サービス FIZ AutoDoc
- 医薬、化学、バイオ分野に特化した特許調査サービス SHIPS

JAICI

一般社団法人化学情報協会 www.jaici.or.jp
 〒113-0021 東京都文京区本駒込 6-25-4 中居ビル TEL.03-5978-3608 FAX.03-5978-3600



やわらかく、筋を通す。

飲酒は20歳になってから。お酒はおいしく適量を。飲酒運転は法律で禁止されています。
妊娠中や授乳期の飲酒は、胎児・乳児の発育に悪影響を与えるおそれがあります。

 **大関株式会社**
 高崎市今津出在家町4番9号
www.ohtani.co.jp



霧島ブランド
 サイトはこちら



 **霧島酒造株式会社**

◎飲酒は20歳から。◎飲酒運転は、法律で禁じられています。
 ◎飲酒は適量を。◎妊娠中や授乳期の飲酒はお控えください。



うすくち
淡口ほんのり
四季のいろ

城下町の面影を今も残す
淡口のふるさと、播州龍野。
風の詩を子守唄に
ゆつくりと歳月に磨かれた
ヒガシマルの淡口しょうゆは
やさしい自然のおいしさ。
春夏秋冬それぞれの味わいを
色美しく引き立てます。

特選丸大豆うすくちしょうゆ 5000 ml
超特選丸大豆うすくち 吟旬芳醇 4000 ml

おいしさをずっと、400年。
東ヒガシマル醤油 <https://www.higashimaru.co.jp/>

麴文化の名作です。

澄んだ香り。ゆたかなコクと深み。
「いいちこフラスコポトル」は「いいちこ」の頂点に立つ
高級むぎ焼酎です。
高精白、低温発酵。そして一次仕込みも二次仕込みも
大麦麴だけを使って、じっくり仕込んだ全麴造り。
麴でつくる酒の、技のすべてを傾けました。
全麴造りのコクのあるりまさを、バランスよく表現するために、
度数はあえて30度。
その極められた深いりまさを、お楽しみください。

iiichiko
FRASCO
[いいちこ・フラスコ]

飲酒は20歳を過ぎてから。お酒はおいしく適量を。飲酒運転は、絶対にやめましょう。
妊娠中や授乳期の飲酒は、胎児・乳児の発育に影響するおそれがありますので、気をつけましょう。

三和酒類株式会社 〒879-0495 大分県宇佐市山本・虚空蔵寺丁 TEL.0978(32)1431(代) FAX.0978(33)3030 <https://www.sanwa-shurui.co.jp>

SFWSC 金賞 受賞
DOUBLE GOLD
米国最大級の出品数を誇る酒類コンペティション「San Francisco World Spirits Competition」2021、2022において、2年連続「DOUBLE GOLD」を受賞しました。

LAISC 金賞 受賞
GOLD
米国でトップクラスの酒類鑑評会「Los Angeles International Spirits Competition」2022において、「GOLD」を受賞しました。

1637年創業。京都、伏見



月桂冠株式会社
www.gekkeikan.co.jp



オンラインショップはこちら

水と生きる SUNTORY

The
PREMIUM
MALT'S

プレモル史上
最高プレモル



ストップ! 20歳未満飲酒・飲酒運転。妊娠中や授乳期の飲酒はやめましょう。
お酒はなによりも適量です。のんだあとはリサイクル。 © サントリービール株式会社



健康と科学に奉仕する

宮野医療器株式会社



本社 〒650-8677 神戸市中央区楠町5丁目4-8
☎(078)371-2121 (大代表)

大倉山別館 〒650-8677 神戸市中央区楠町2丁目3-11
☎(078)371-2121 (大代表)

M S C 〒650-0047 神戸市中央区港島南町4丁目6-1
ポートアイランド60 ☎(078)302-7001 (代表)

MSCイースト70 〒596-0817 岸和田市岸の丘町2丁目2番10号
☎(072)447-6208 (代表)

MSCウエスト 〒654-0161 神戸市須磨区弥栄台2丁目12-1
☎(078)797-2072 (代表)

神戸中央営業所・神戸西営業所・明石営業所・阪神営業所
中兵庫営業所・姫路営業所・北兵庫営業所
大阪支社・大阪北営業所・大阪中央営業所・大阪東営業所
大阪南第一営業所・大阪南第二営業所
奈良営業所・和歌山営業所・京都営業所・舞鶴出張所
広島営業所・福山営業所・岡山営業所・鳥取営業所・米子営業所
高松営業所
名古屋営業所・三重出張所・東京営業所・神奈川営業所
埼玉営業所
福岡営業所・北九州営業所・熊本営業所
モイヤン神戸店・モイヤン姫路店・モイヤン阪神店
モイヤン大阪店・モイヤン鳥取店

あなたの研究をお手伝いします!

「研究機器オンライン」

「受託オンライン」

製品情報の充実
随時、追加・更新を
行っております。

気になる
ワードで検索!

研究機器オンライン
トップへ!

受託オンライン
トップへ!

HPトップから
一目でラクラク
検索ダウン!



ワケン

研究機器オンラインの特徴

- ▶ 研究用途に合わせた検索もラクラク!
- ▶ 予算申請の金額に合わせた検索もラクラク!
- ▶ 予算申請に便利
 - 指定範囲の金額で検索が可能!
- ▶ あの商品の製品を
 - フリーワード検索や
 - メーカーの絞り込み検索も可能!

受託オンラインの特徴

- ▶ 遺伝子発現解析や抗体作製から
病理標本作製まで幅広い受託サービスを掲載
- ▶ 研究用途から受託サービス検索
 - 遺伝子工学、シーケンス解析、タンパク質工学などの
カテゴリー検索!
- ▶ キャンペーン情報の確認も可能
- ▶ あの商品の受託サービスを
 - フリーワード検索やメーカーの絞り込み検索も可能!

和研薬株式会社
WAKENYAKU CO., LTD.

和研薬の研究機器オンライン・受託オンラインは、
PC、スマートフォンやタブレット端末からアクセス!

WEBサイト 随時更新中 <https://www.wakenyaku.co.jp>

和研薬 検索



和研薬ホームページ

微生物培養関連受託サービス

主な受託サービス

- ・微生物の培養条件検討、スケールアップ、大量培養 (GMP対応可、GILSP申請実績多数あり)
- ・培養液から目的物の単離精製 (少量危険物取扱可)
- ・組換えタンパク質の精製 (条件検討～大量精製)
- ・代謝物調製 (P450代謝物、グルクロン酸抱合体)
- ・キラルスクリーン®など酵素を用いたプロセス開発 (キラルスクリーン® は株式会社ダイセルの登録商標です)



5,000 L 培養槽
(GMP対応)



取り扱い菌株

大腸菌、酵母、放線菌など (組換え体(BSL1) 対応可)

培養設備

汎用 : 2 L、5 L、10 L、50 L、200 L、500 L、2,000 L
GMP対応 : 200 L、5,000 L

精製設備

大型イオン交換カラム、ホモジナイザー (GMP対応可)
膜分離(中空糸膜、平膜、セラミック膜)など

お客様の研究・事業推進のお役に立てればと存じます。お気軽にお問合せ下さい。



神戸天然物化学株式会社

KNC Laboratories Co., Ltd.



<https://www.kncweb.co.jp/>

(ホームページ)

神戸営業所 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町7-1-19
東京営業所 〒101-0035 東京都千代田区神田紺屋町6 大矢ビル5F

TEL 078(955)9898 FAX 078(955)9899
TEL 03(3251)1861 FAX 03(3251)1862



日本初の 統合型バイオファウンドリ

INTEGRATED BIO-FOUNDRY

私たちは微生物等による有用物質生産に関する育種・解析サービスや自社プロダクトの開発等を行う統合型バイオファウンドリです



研究員募集中

バイオ×ITを活用した技術の開発・運用や、高生産株の育種開発を担っていただける方を募集しています

【歓迎】

- ・微生物発酵生産、合成生物学の知識・経験
- ・機械学習、統計解析アルゴリズム開発の経験
- ・機器分析 (HPLC/GC/MSなど) の経験

ご興味のある方は下記メールアドレスまでご連絡下さい

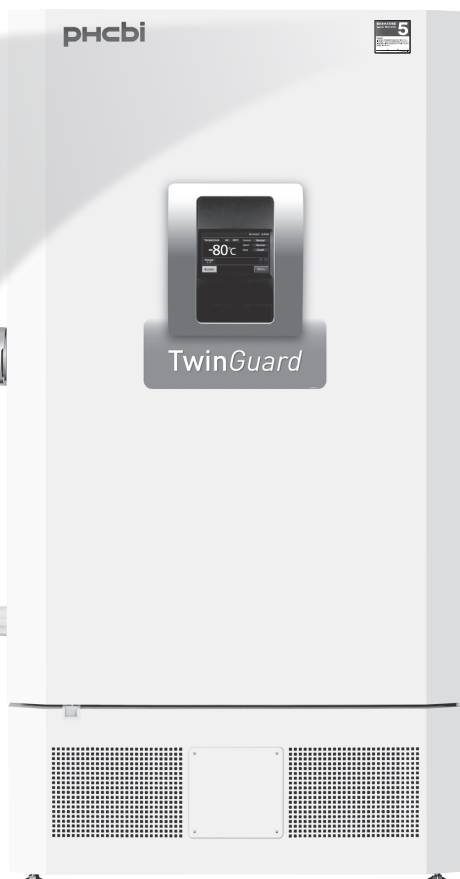
株式会社バックス・バイオイノベーション
加藤 t_kato@b2i.co.jp



バイオメディカ機器の
製品本体 保証期間が

5年 になりました

■ 5年保証ラベル



■ 注意)

- ▶ 2022年4月1日以降納品された製品本体が対象となります
- ▶ 5年保証ラベルに記入された日(納品設置日)より5年間が保証期間となります
- ▶ 製品本体が対象です。オプション品・消耗品・定期交換部品などは対象外です
- ▶ 製品の内容物の保証はできませんので予めご了承ください
- ▶ 薬局関連機器は対象外です
- ▶ フードソリューション機器は3年保証となります
- ▶ 5年保証の詳細内容は、各営業所へお問合せください

5年保証の詳しい情報は web もご覧ください

- お得な情報をお届け！ お客様情報(機器情報)の登録もこちらから！
- 5年保証サイト <https://www.phchd.com/jp/biomedical/about-phcbi/warranty>

バイオメディカ5年保証

Q 検索



お問い合わせは

PHC株式会社
バイオメディカ事業部
〒105-8433
東京都港区西新橋2丁目38番5号

北海道営業所 TEL 011-817-7151 FAX 011-817-7167
東北営業所 TEL 022-266-2131 FAX 022-215-5582
東京営業所 TEL 03-5408-7277 FAX 03-5408-0873
南関東営業所 TEL 045-978-5134 FAX 045-978-5150

中部営業所 TEL 052-211-8880 FAX 052-211-8882
近畿営業所 TEL 06-6136-1415 FAX 06-6136-1449
中国営業所 TEL 082-247-7532 FAX 082-240-2701
九州営業所 TEL 092-292-7719 FAX 092-291-5353

