



日本生物工学会第61回大会トピックス

大会実行委員会

第61回日本生物工学会大会（名古屋大会）は平成21年9月23日（水）から25日（金）の3日間、名古屋大学東山キャンパス（名古屋市千種区不老町）において開催されます。今大会はすべての講演をPCプロジェクターで発表していただきます。

今大会は、秋の連休の最終日から始まります。連休も活用してご来名ください。名古屋市内はたくさんのお見どころがあります。まずは駅前のミッドランドスクエアやJRセントラルタワーズなどの人気の高層ビル街を散策ください。名店が多く入っていてにぎわっています。名古屋城、名城公園、東山動植物公園、名古屋港水族館は有名ですが、市内には他にも名古屋能楽堂（名城公園）、徳川美術館（東区）、徳川園（東区）、美術館では名古屋市美術館（白川公園）、名古屋ポストン美術館（金山）が、科学館では電気の科学館（伏見）、名古屋市科学館（白川公園）、長久手には長久手古戦場跡もあり、戦国時代の歴史も探訪できます。トヨタグループの見学施設としては、織機中心の産業技術記念館、トヨタ博物館があり、車の歴史を堪能できます。秋の行楽シーズンですので、少し足を伸ばしていただければ、名古屋周辺には瀬戸、常滑、美濃などの焼き物の産地もたくさんあり、常滑のINAX文化スクエアには、窯のある広場資料館、世界のタイル博物館やINAX陶楽工房があります。染め物では有松絞りも有名です。知多半島には、盛田味の館、ミツカン酢の里、国盛酒の文化館、新美南吉記念館があり、一日楽しめると思います。犬山のモンキーパーク、リトルワールドや明治村は知られた観光地ですが、司葉子さんが村長の日本大正村や中村玉緒さんが村長の日本昭和村もあります。長島温泉とナガシマスパーランドは行楽地として有名ですが、これ以外にも、安城にはデンパーク、蒲郡にはテーマパークを備えたラグーナ蒲郡があります（名古屋観光コンベンションビューロー、<http://www.ncvb.or.jp/>参照）。前泊され、名古屋の地酒を片手に、みそかつ、エビフライ、天むす、名古屋コーチン、手羽先、きしめん、あんかけスパ、ういろうなど名古屋独特の食文化もお楽しみいただき、活気のある街、名古屋と、活気のある東海地域を十分にご堪能ください。

今大会のシンポジウムは本誌会告（第87巻第3号）で案内されましたように、19課題が、大会3日目に集中して開催されます。発表件数は109件になりました。また、9月25日午前に特別セミナーとして修士・博士課程在学者をはじめ若手研究者を対象とした「若手理系人のためのキャリアセミナー」が開かれます。

一般講演は、590演題のお申し込みをいただきました。一般講演の科学技術分野別の上位には、1) 環境バイオテクノロジー（112演題）2) 酵素学・酵素工学・タンパク質化学（88演題）、3) 遺伝子工学・核酸工学（85演題）、4) 代謝生理学、発酵生産（71演題）5) 動物バイオテクノロジー（64演題）、6) 生物化学工学（59演題）の順となっています。分野分けを見直しており、昨年までと直接比較はできませんが、時代の流れのためか、環境バイオの件数が多く、動物バイオも多数お申し込みいただいています。

以下に本大会での受賞講演、招待講演、シンポジウムを掲載します。本年の受賞講演はすべて授賞式に続いて行われます。KSBBからの招待講演5題は一般講演の中に組み込んであります。また、一般講演の中からプログラム編集委員会が選定した19演題をトピックスとして紹介します。この19演題は、大会3日目に、「トピックスシーズ発表会」として口頭発表していただく機会をつくりました。

※講演番号は「会期の日」「会場」「午前a・午後p」「通し番号」で表しています。たとえば2Ap03なら「2日目(24日)」「A会場」「午後」「3番目」となり、数字が同じなら同一の時間帯の講演を示しています。

受賞講演

- 1) **1Aa05 生物工学賞**
「生物プロセスシステムの最適化に関する研究」
塩谷捨明(崇城大・生物生命・応生科)
- 2) **1Aa08 生物工学功績賞**
「固体表面設計に基づく細胞制御」
田谷正仁(阪大院・基礎工)
- 3) **1Aa10 生物工学功績賞**
「生物間相互作用(共生・寄生)の分子機構解析とバイオテクノロジーへの利用」
山田 隆(広大院・先端物質科学)
- 4) **生物工学功労賞**
「清酒醸造の進歩発展と学会事業運営に対する貢献」
安部康久(月桂冠)
- 5) **生物工学功労賞**
「バイオ研究支援機器開発による生物工学技術発展および本会事業発展への貢献」
石川陽一(エイブル)
- 6) **1Aa13 生物工学技術賞**
「乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築」
古田吉史・大森俊郎・中村彰宏・丸岡生行・園元謙二(三和酒類・研, 九大)
- 7) **1Ap03 生物工学奨励賞(斎藤賞)**
「出芽酵母におけるゲノム工学技術の開発と応用」
杉山峰崇(阪大院・工)
- 8) **1Ap05 生物工学奨励賞(照井賞)**
「生物由来制御アルゴリズムの工学的応用に関する研究」
滝口 昇(金沢大・理工)
- 9) **1Ap07 生物工学アジア若手賞**
「Biochemical Engineering Approaches toward Bioprocess Development for Biodegradable Polyhydroxyalkanoates Production」Suchada CHANPRATEEP (Dept. Microbiol., Fac. Sci., Chulalongkorn Univ., Thailand)

KSBB 招待講演

- 1) **2Kp01 Anti-obesity agents from regional special natural products based on anti-angiogenesis.**
Jong Deog KIM (Dept. Biotechnol., Chonnam Natl. Univ., Korea, Research center on Anti-Obesity & Health Care, Chonnam Natl. Univ., Korea) *et al.*
- 2) **2Mp05 Some trials for bioprocess design and control for stem cell cultures and production of renewable biochemical platform**
Kee-Bung RHEE (Sch. Life Sci. & Biotechnol., Korea Univ., Korea) *et al.*
- 3) **2Cp12 Overexpression of newcastle disease virus (NDV) V protein specifically enhances NDV production kinetics by disrupting cellular innate immune responses in chicken embryo fibroblasts**
Ik-Hwan KIM (Dept. Biotechnol., Korea Univ., Korea) *et al.*
- 4) **2Jp16 Development of composite scaffold for ligament reconstruction**
Jung-Keug PARK (Dept. Medical Biotechnol., Dongguk Univ., Dongguk Univ. Res. Inst. Biotechnol., Korea) *et al.*
- 5) **2Ip19 Human olfactory receptor-based biosensor**
Tai Hyun PARK (Sch. Chem. Biol. Eng., Seoul Natl. Univ., Korea) *et al.*

シンポジウムとオーガナイザー

- 1) **3S1a バイオマス糖化技術の新展開 (3S1a01-05)**
高橋治雄(豊田中研)
- 2) **3S2a 油糧植物ジャトロファの改良に向けてー日本における遺伝子改変のための基盤整備と方向性ー (3S2a01-05)**(国際環境資源生物学会共催)
柴垣奈佳子(阪大院・工)
- 3) **3S3a 海外微生物資源へのアクセスとその利用 (3S3a01-05)**
安藤勝彦(NITE・バイオ本部)
- 4) **3S4a-p ポストトランスクリプトミクス研究の最前線 (3S4a01-04, p01-02)**
(メタボロミクス研究部会共催)
福崎英一郎(阪大院・工)・馬場健史(阪大院・工)・榎原陽一(宮崎大・農)

- 5) **3S5p 醸造原料植物および醸造微生物の特性とその進化 (3S5p01-06)**
(清酒酵母・麴研究会共催)
下飯 仁 (酒総研)・後藤奈美 (酒総研)
- 6) **3S6p バイオフィルム研究の最前線：制御を目指して (3S6p01-06)**
(化学工学会バイオ部会環境生物分科会, 環境バイオテクノロジー学会共催)
堀 克敏 (名工大院・工)・池田 宰 (宇都宮大院・工)・常田 聡 (早大・先進理工)
- 7) **3S7p 脂質工学の将来像 (2S7p01-06)**
(脂質工学研究会共催)
岩崎雄吾 (名大院・生命農)・小川 順 (京大・微生物科学)
- 8) **3S8a 酵素工学は世界を目指す (3S8a01-05)**
(酵素工学研究会共催)
園元謙二 (九大院・農)・中野秀雄 (名大院・生命農)・吉村 徹 (名大院・生命農)・廣瀬芳彦 (天野エンザイム・岐阜研)・浅野泰久 (富山県大・工)
- 9) **3S8p 独立栄養的代謝の産業応用的基軸 (3S8p01-06)** (JBA新資源生物変換研究会共催)
石井正治 (東大院・農生科)・倉根隆一郎 (中部大・応用生物)・浦尾秀雄 (JBA)
- 10) **3S9a 生物工学の新時代を拓く次世代シーケンスー原理, 応用, 情報解析までー (3S9a01-06)**
原島 俊 (阪大院・工)・黒川 顕 (東工大院・生命理工)・金子嘉信 (阪大院・工)
- 11) **3S9p 地方から目指せ！バイオリファイナリーによる資源循環型社会の構築 (3S9p01-05)** (廃棄物資源循環学会バイオマス系廃棄物研究会共催)
木田建次 (熊大院・自科)・酒井謙二 (九大院・農)
- 12) **3S10p 構造活性相関研究の最新の動向 (3S10p01-08)** (日本薬学会構造活性相関部会後援)
川瀬雅也 (長浜バイオ大・バイオサイエンス)
- 13) **3S11p 生物と機械の融合ーバイオリボティクスー (3S11p01-05)**
(セルプロセッシング計測評価研究会共催)
井藤 彰 (九大院・工)・加藤竜司 (名大院・工)
- 14) **3S12a 非侵襲シングルセル解析ーライフサイエンスーのめざす生物学ー (3S12a01-06)**
(コンビナトリアル・バイオ工学会研究会・ナノバイオテクノロジー研究会共催)
民谷栄一 (阪大院・工)・植田充美 (京大院・農)
- 15) **3S12p 臨床現場での乳酸菌利用のアプローチ (3S12p01-04)** (乳酸菌・腸内細菌工学会研究会共催)

浅田雅宣 (森下仁丹・バイオフィーマ研)・荒 勝俊 (花王・生物科学研)・伊澤直樹 (ヤクルト・中研)

- 16) **3S13a 地球環境と地球環境保全のための光合成微生物 (3S13a01-05)** (光合成微生物研究会共催)
浅田泰男 (日大・理工)・佐々木健 (広島国大院・総合工)
- 17) **3S13p 蚕バイオテクノロジーータンパク質生産工場としてー (3S13p01-06)**
(農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター共催)
朴 龍洙 (静岡大創科技院)・前仲勝実 (九大・生医研)
- 18) **3S14p ポストゲノムネットワーク時代の生物工学研究の最前線 (3S14p01-06)**
田丸 浩 (三重大院・生物資源)・植田充美 (京大院・農)
- 19) **3S15a-p システムバイオテクノロジーが拓く生命工学 (3S15a01-04, p01-04)**
岡本正宏 (九大院・農)・近藤昭彦 (神戸大院・自科)

トピックス19演題

ここでは講演時間順に要旨を紹介するが、発表者による解説を含めた「トピックスシーズ集」を作成しているので参照いただきたい。「トピックスシーズ集」は3日目に予定されている口頭発表会場で配布予定。

1) 1Dp12

「L-プロリン *cis*-4-水酸化酵素遺伝子高発現大腸菌を用いた *cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリンの生産」

岡本直子, 原良太郎, 木野邦器 (早大・理工・応化)

【目的】 *cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン (*cis*-4-Hyp) は抗腫瘍剤として有用である。天然にはほとんど報告例がないが、我々は初めて L-プロリン *cis*-4-水酸化酵素遺伝子を根粒菌のゲノムから見出した。本研究では、当該酵素の基質特異性評価ならびに休止菌体系による *cis*-4-Hyp の生産を試みた。【方法・結果】根粒菌由来 L-プロリン *cis*-4-水酸化酵素遺伝子を高発現させた組換え大腸菌を調製し、L-プロリンと2-オキソグルタル酸を原料として休止菌体反応を行ったところ、*cis*-4-Hyp の生産が可能であった。また、プロリン分解酵素であるプロリンデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊株を宿主とすることで、*cis*-4-Hyp の収率が向上した。反応に必要な2-オキソグルタル酸は、大腸菌の有する解糖系とトリカルボン酸回路を利用して安価なグルコースから供給することが可能であった。¹⁾ R. Hara and K. Kino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 882-886 (2009).

2) 1Mp12

「生もと乳酸菌の摂取によるアトピー性皮膚炎抑制作用」
増田康之, 高橋俊成, 吉田和利, 西谷洋輔, 水野雅史,
溝口晴彦 (菊正宗・総研, 兵庫工技セ, 神戸大・自然
先端, 神戸大院・農)

【目的】生もと酒母から分離した*Lactobacillus sakei*LK-117株は、マウスマクロファージ様細胞株に作用させた際のIL-12p40産生促進作用およびマウスに摂取させた際の受身アナフィラキシー反応抑制作用の高い乳酸菌株として選抜された。本研究では、自然発症皮膚炎モデルNC/NgaマウスにLK-117株乾燥菌体1%含有飼料を摂取させ、アトピー性皮膚炎症状の抑制効果を検討した。【方法】NC/Ngaマウス(雄, 8週齢)を2群に分け(n=10)、標準飼料または標準飼料にLK-117株乾燥菌体を1%含有した飼料を自由摂取させた。4日後、マウス背部にピクリクロライド(PiCl)の連続塗布を開始し、皮膚炎症状スコア、体重、摂餌量を測定した。また、PiCl感作初日から47日目にマウスを屠殺し、血中総IgE濃度を測定し、耳介および背部皮膚を採取した。【結果】血中総IgE濃度は標準飼料群と比較して有意な差は見られなかったが、皮膚炎症状スコアの悪化を有意に抑制していた。特に誘発部位の痂皮形成および乾燥症状において有意な抑制が観察されたため、皮膚バリア機能の保持に関与しているプロスタグランジンD₂の背部組織中の量を測定したところ、LK-117株摂取群において増加傾向が見られた。これらの結果から、LK-117株の摂取によりアトピー性皮膚炎の症状を改善する可能性が示唆された。尚、本研究は平成19-20年度経済産業省地域資源活用型研究開発事業の一環として行われた。

3) 1Fp14

「ヒアルロン酸を産生する*Streptococcus thermophilus*の探索」

伊澤直樹, 花水智子, 曾根俊郎, 水越晴美, 木村一雅,
千葉勝由 (ヤクルト・中研)

【目的】ヒアルロン酸(Hyaluronic acid, 以下HA)は創傷治癒能や水分保持能を有し、医薬品、化粧品、食品分野において広く用いられている。HAは主に鶏冠からの抽出や、*Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*による発酵法によって製造されているが、種を超えた感染性物質などの混入が懸念されている。一方、ヨーグルト製造菌である*Streptococcus thermophilus*は株ごとに多様な種類の多糖を生産することが知られている。食経験が豊富で安全である本菌がHAを生産するとすれば、その有用性は高いと考えられる。そこで我々はHAを生産する*S. thermophilus*の探索を行った。【方法及び結果】*S. thermophilus* 46株を10%スキムミルク中で静置培養し、上清中のHA濃度を、HAを特異的に認識するHA binding proteinを用いて測定した。6株の培養上清にHAを含む多糖が生産されていることが示唆され、そのうち一株(YIT 2084)の培養上清に特に高いHA濃度(8 mg/l)が認められた。YIT 2084株の培養上清を精製して得られた多糖の高分子画分のNMRスペクトルは市販の*S. equi* subsp. *zoepidemicus*由来のHAとよく一致しており、*S. thermophilus* YIT 2084は培養上清中にHAを生産することが確認された。

4) 1Gp20

「次世代シーケンサー SOLiDを用いた泡盛黒麹菌の比較ゲノム解析」

塚原正俊, 照屋盛実, 喜久里育也, 藤森一浩, 今田有美, 鼠尾まい子, 小池英明, 佐藤友紀, 矢野修一, 三輪友希乃, 神野浩二, 堀川博司, 櫛田憲弘, 藤田信之, 町田雅之, 平野 隆 (トロピカルテクノセ, 沖縄先端ゲノム, 沖縄工技セ, 沖縄科技振興セ, 産総, NITE)

【目的】沖縄県の伝統的蒸留酒「泡盛」の醸造には通常複数の黒麹菌株が用いられている。これまでの検討により、これらの黒麹菌株は醸造上異なる特性を示すと共に、最終産物である泡盛風味への影響が異なることを明らかにしてきた。また、これらの泡盛黒麹菌株について、*A. niger*などを含む系統分類も興味深い。そこで、複数の泡盛黒麹菌株について次世代シーケンサー SOLiDを用いたゲノム全体の比較解析を進めている。【方法・結果】複数の*A. awamori*(寄託機関菌株、泡盛醸造に用いられている実用菌株)についてSOLiDでの解析を行った。得られたデータ間および既報の*A. niger*などのデータと比較解析を行うことで、*A. niger*と*A. awamori*間には比較的大きな配列上の違いがあること、各*A. awamori*間では相同性が高いものの一部顕著に異なる領域が存在することがわかった。現在、これらの領域について詳細な比較を行うことで、泡盛黒麹菌全体の特性および個々の泡盛黒麹菌株の特性についての解析を進めている。このような複数菌株間の比較ゲノム解析は、産業に用いられる株間の比較に重要であると考えられる。

5) 1Cp22

「歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*のゲノム再編による高病原化株の検出」

中原 彩, 仲行あゆみ, 恵比須繁之, 加藤昭夫, 阿座上弘行 (山口大・農・生物機能, 阪大院・歯・保存)

*E. corrodens*は歯周病原性細菌の一つで、その病原性には菌体表層のGalNAc特異的レクチンが関与する。近年、プラスミド上のリコンビナーゼがゲノム上のタイプ4線毛遺伝子領域に組換えを起こし、レクチン活性やバイオフィーム形成などが増加することを示した。組換え株からゲノムライブラリーを作成し、タイプ4線毛遺伝子をプローブとして線毛遺伝子領域のクローニングを行った。得られたクローンの塩基配列を解析したところ、タイプ4線毛遺伝子内で組換えが起こり、新たな線毛遺伝子の挿入が見られた。さらに、同様の配列が他の臨床分離株でも報告されていたことから、リコンビナーゼ遺伝子が水平伝播され口腔内で高病原化株が出現している可能性が示唆された。そこで、ヒトの口腔内から実際にゲノム組換え株が検出されるか、その検出頻度と病態との間に相関が見られるかを調べることにした。まず、リアルタイムPCRを用いて、デンタルプラークから*E. corrodens*の検出を行った。本菌に特異的な16S rDNAプライマーを用いることにより、歯周病患者の歯周ポケットからの検出を行うことができた。次に、線毛組換え株を検出するために、臨床分離株からゲノムDNAを抽出し、組換え株の線毛遺伝子領域を特異的に増幅するプライマーを用いてリアル

タイムPCRを行った。その結果、幾つかの臨床分離株で組換え株が検出された。検出された株のサザン解析を行ったところ、実際に組換えが起こっていることが確認された。

6) 1Ep22

「癌細胞標的化を目指した Affibody 提示ナノカプセルの開発」

三枝宏彰, 穴戸卓矢, 田中 勉, 荻野千秋, 近藤昭彦
(神大院・工・応用化学, 神戸大・自・研究環)

【目的】ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは、必要量の薬剤を、必要な時、必要な部位へ到達させることで、薬剤による治療効果の向上、副作用の軽減などが期待できる技術である。本研究室では新規DDSキャリアーとして、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質および脂質二重膜からなる中空のバイオナノカプセル (BNC) を開発した。さらに、表面抗原タンパク質に含まれる肝細胞認識部位周辺を遺伝子工学的に削除し、認識対象の異なる分子を挿入することで、BNCの用途を広げる研究が行われている。本研究では、多くの癌細胞表面に過剰発現している上皮増殖因子受容体 (EGFR) を標的として、表面抗原タンパク質の肝細胞認識部位をEGFR結合AffibodyであるZ_{EGFR-955} (Z_{EGFR}) で置換した粒子を作製し、その機能を調べた。【実験方法及び結果】Z_{EGFR}は二量体化することで結合力が上昇することから、二量体Z_{EGFR}を提示した粒子 ([Z_{EGFR}]₂-BNC) を酵母で作製した。その発現量は従来のBNCの発現量の約80%を達成した。この粒子は従来のBNCと同等の粒径を示し、EGFR過剰発現細胞であるA431細胞への効率的な導入を示した。以上より、EGFRを発現した癌細胞を標的化可能なDDSキャリアーとして[Z_{EGFR}]₂-BNCの開発に成功した。また、他の分子を認識可能なAffibodyを用いることで、この粒子の可能性はさらに広がると言える。

7) 1Lp22

「酵母遺伝子破壊株コレクションを用いたセルラーゼを高生産する遺伝子の同定と解析」

北川孝雄, 幸田勝典, 徳弘健郎, 星田尚司, 赤田倫治, 高橋治雄, 今枝孝夫 (豊田中研, 山口大・産学公連携イノベーション推進機構, 山口大院・医学系研究科)

【背景・目的】セルロースやヘミセルロース成分を糖化するために用いられる酵素製剤費のコスト比率が、セルロースエタノール製造工程の中で、最も高いことが知られている。低コスト化の解決策としては、酵母などのエタノール発酵微生物に直接バイオマス分解酵素を生産させ、糖化させることにより添加酵素製剤費を抑制する考え方 (統合バイオプロセス, CBP化) がある。しかし、酵母はカビなどと比べ、タンパク質の分泌生産能力が劣るため、上記手法開発の大きな障壁となっている。そこで、タンパク質生産能力を高めるための遺伝子の同定と解析を目的とした。【実験方法・結果】酵母のタンパク質の分泌生産の抑制を解除する遺伝子を網羅的に同定するために、酵母遺伝子破壊株コレクションに *C. thermocellum* の endoglucanase cel8A を形質転換した。培養上清の活性をカルボキシメチルセルロース入りの寒天プレートを用いて定量し、活性の向上した

遺伝子破壊株を54種類同定した。また、同定した遺伝子破壊株に *A. aculeatus* の α -glucosidase を染色体へ導入したところ、セロビオースを基質としたエタノール発酵速度が基準株よりも向上することが分かった。更なるセルラーゼ高生産のために、得られた高生産遺伝子の遺伝子多重破壊を行った。多重破壊した遺伝子破壊株は1重破壊株よりも cel8A の活性が更に向上した。

8) 2Ja04

「モリブデンの選別集積回収をめざした酵母の分子育種」

西谷 崇, 島田まり子, 黒田浩一, 植田充美 (京大院・農・応用生命)

【目的】現在のハイテク産業では、レアメタルを中心とした金属元素の活用が不可欠になっており、レアメタルの安定供給は日本の高度な産業システムにおける生命線である。しかし、その供給構造は脆弱で日本のアキレス腱と言われている。そこで、工場廃水経路などに含まれるレアメタル含有溶液の回収・リサイクルに関する研究の重要性が増しているが、まだ十分なものではない。ところで、金属の吸着においては、微生物を吸着剤として利用するバイオアブソルベントの開発に期待が集まりつつある中で、我々はレアメタルであるモリブデンに注目し、モリブデン酸イオン (MoO₄²⁻) と結合アフィニティが高い大腸菌由来のタンパク質 ModE を、酵母分子ディスプレイ法を用いて細胞表面に提示し、モリブデンの選別集積回収を試みてきている。【方法と結果】大腸菌から MoO₄²⁻ 結合ドメインを有するタンパク質 ModE の遺伝子をクローニングした。さらに、酵母分子ディスプレイ法を用いて、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞表面に提示した。ModE 提示酵母を MoO₄²⁻ 溶液に加え、吸着反応を行った後、ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析装置) を用いて吸着量を測定した。また、吸着後の ModE 提示酵母を酵素処理することで MoO₄²⁻ の回収を試みた結果、高効率で MoO₄²⁻ を吸着および回収することができた。この結果とこれまでの酵母分子ディスプレイ法を用いたバイオアブソルベーション、およびその回収についてまとめて報告する。

9) 2Ka06

「逐次遺伝子組込みシステムによって作製した動物細胞を用いた組換え抗体生産」

河邊佳典, 槇坪寛勝, 亀山雄二郎, 井藤 彰, 上平正道 (九大院・工・化工)

【背景・目的】遺伝子組換え動物細胞を用いてバイオ医薬品などの物質生産を行う際、薬剤耐性遺伝子や核酸合成遺伝子などの選択マーカーを用いることで目的遺伝子を細胞のゲノム染色体に挿入して安定形質転換体を樹立している。しかし、この方法は、確実性に欠け、選抜に長期間を要することが問題となっている。我々はこれまでに組換え酵素 Cre により動物細胞染色体上で配列部位特異的に逐次遺伝子組込みできるシステムを開発してきた。本研究では、このシステムを用いて組換え抗体遺伝子の発現ユニットを染色体上に逐次遺伝子組込みすることで組換え抗体の発現増幅を行い、導入遺伝子数と生産性の相関について解析した。【実験方法・結果】独立して機能する3種類のスペーサー変異を含む loxP 配列を選抜し、各 loxP 配列、選択マーカー、組換え抗体遺伝子発現ユニットを有するプ

ラスミドを作製した。次に選抜したloxPサイトが染色体に組込まれたCHO細胞を樹立し、Cre発現ベクターと目的遺伝子を有するプラスミドを遺伝子導入することで、染色体へ組換え抗体遺伝子の逐次遺伝子組込みを行った。染色体上での遺伝子導入を解析したところ、複数の組換え抗体遺伝子発現ユニットが部位特異的に組込まれていることがわかった。また、抗体発現を評価した結果、組込まれている発現ユニット数に伴い抗体生産量の増加が見られた。これらの結果から、本システムは動物細胞における組換えタンパク質の発現増幅に有効であることが示された。

10) 2Dp07

「ホタルルシフェラーゼは基質の不斉をどのように見分けているのか？」

加藤太郎, 宮永佳奈, 番匠亜沙美, 中津 亨, 武尾正弘, 根来誠司 (兵庫県大院・工, 京大院・薬)

発光反応を触媒する酵素として知られるホタルルシフェラーゼは、チオエステル化という全く違った反応をも触媒する。特に2-アリアルプロパン酸を基質とした場合には、分子中の立体を識別し、R体を優先してチオエステル体へと変換することができる。本反応ではまず、アシル-AMP中間体を生成し、そこへ補酵素Aが攻撃するという2段階にてチオエステル結合が形成される。これらの経路中、我々はアシル-AMP中間体に着目した。そして本中間体アナログ-酵素複合体の結晶構造解析を行うことによって、ホタルルシフェラーゼが基質の不斉をどのように見分けているのかに関する情報を得ることを計画した。具体的には、ケトプロフェンより誘導したケトプロフェニル-AMP中間体アナログ存在下、ヘイケボタル由来ルシフェラーゼの結晶を作成した。得られた結晶を用いてX-線回折実験を行ったところ、期待通り複合体像が得られることが分かった。そこで構造の精密化を行い、ケトプロフェン部位の不斉によってアシル-AMP中間体の形成にどのような違いがあるのか確認した。また、ケトプロフェンの光学活性体を用いた速度論解析の結果と合わせ、本酵素の不斉識別に関する考察を行った。

11) 2Ha12

「固体連続併行複発酵によるバイオエタノールの生産」

岸本淳平, Moukamnerd, C., 大道徹太郎, 平尾桂一, 仁宮一章, 塩谷捨明, 紀ノ岡正博, 片倉啓雄 (阪大院・工, 金沢大・工・物質化学, 崇城大・生物生命)

【緒言】バイオマスからのエタノール生産では、コスト低減と、投入エネルギーの最少化が重要である。リグノセルロースからのエタノール生産プロセスは、脱リグニンしたバイオマスの糖化、発酵、エタノール回収を別々に行うものがほとんどであり、得られた発酵液の約9割は水である。これに対して、前処理したバイオマスに糖化酵素と酵母、最小限の水を加えた半固体状態で糖化と発酵を行うと同時に、発酵槽のヘッドスペースからエタノールを連続的に回収する Consolidated Continuous Solid State Fermentation (CCSSF) System を開発した。【方法】円筒形反応槽に試料を入れ、corn starch, 酵母, α -amylase, glucoamylase, YP培地を入れ、アンモニア水でpHを制御しな

がら反応させた。ヘッドスペースガスを -10°C の凝縮塔と加湿槽に循環させ、反応槽は 30°C の恒温チャンバーに入れ、ローラーで8 rpmで回転させた。槽内のエタノール濃度は循環速度によって調整し、水分は加湿槽の温度で調整し、デンプンを適宜追加した。【結果】槽内エタノール濃度を $60\sim 80\text{ g/L}$ に制御した場合、凝縮塔から $35\sim 42\%$ (w/v) のエタノールを回収できたが、30時間後からエタノール生産速度が次第に減少した。 $35\sim 45\text{ g/L}$ に制御した場合、回収エタノール濃度は $25\sim 30\%$ (w/v) であったが70時間以降も生産を維持できた。

12) 2Cp06

「始原生殖細胞を利用したトランスジェニックニワトリの作製」

元野 誠, 中川 亮, 山田裕貴, 服部裕紀, 西島謙一, 飯島信司 (名大院・工・生物機能)

【目的】我々は高力価レトロウイルスベクターを用いることでトランスジェニック鳥類を作製できることを既に見出しているが、導入来遺伝子を持つ後代を効率的に得ることが現在の課題となっている。そこで、本発表では将来生殖細胞になる細胞である始原生殖細胞にレンチウイルスベクターを用いて外来遺伝子を導入後、レシピエント胚に移植することにより、生殖系列キメラ鳥類(G0)を作製した。人工授精により、導入遺伝子を持つ後代の得られる効率を調べた。【方法及び結果】移植する始原生殖細胞として5.5日目胚(stage 27-28)の生殖腺中の始原生殖細胞を利用した。一般的にニワトリの始原生殖細胞のマーカーとして利用されている抗 SSEA (stage-specific embryonic antigen) -1抗体で反応させた後、セルソーターを使うことで、始原生殖細胞を純度よく分離、精製した。この精製した始原生殖細胞にレンチウイルスベクターを感染させた。その後、内在性の始原生殖細胞の一部を取り除いたstage13-16のレシピエント胚にこの細胞を移植し、孵化させた。性成熟したすべてのオスの精子中にはPCR法により導入遺伝子が検出された。作製したG0同士の掛け合わせにより、導入遺伝子を持つ後代を得ることが出来た(1/21)。そこで、作製したG0とレンチウイルスベクター由来の導入遺伝子を持たない親鳥との掛け合わせを行ったところ、後代を取得することができた(1/16)。現在さらに解析を進めている。【謝辞】本研究は生研センター・新技術新分野創出のための基礎研究推進事業の支援を受けて行われた。

13) 2Fp16

「油脂生産酵母に関する研究」

稗田真清, 丹所 豪, 正木和夫, 飯村 譲, 家藤治幸, 長沼孝文 (山梨大院・医工総合・生命, 酒総研)

【目的】我々は、キシロースのような木質糖を酵母に資化させて油脂生産を行わせ、これをバイオディーゼル燃料として利用するための研究を行っている。その場合、木質由来の糖から多量の油脂を生産する酵母の選択は重要な因子である。本研究では、これまで油脂生産をするとされていた酵母および*Lipomyces*の野外分離菌株を木質由来の糖を含む培地で培養し油脂生産能力を調べた。【方法】木質に含まれるD-グルコース、D-キシロース、L-アラビノースおよびセロビオース、キシロオリゴ糖

の5つを対象炭素源とした。油脂が十分に蓄積される定常期まで酵母エキスと無機塩からなる培地で培養した。脂質量は酵素法で測定した。[結果] 油脂生産酵母と言われている6属について検討したところ、*Lipomyces* と *Rhodospiridium* はグルコースやキシロースからの油脂能力が高かった。しかし、*Rhodospiridium* はセロビオース、キシロオリゴ糖の資化性が著しく低かった。それぞれの糖に対する菌株特異性は強く、特定の糖に対してのみ油脂生産能力が高い菌株が多数存在した。実験対象とした5種類の糖に対する総合的な油脂生産能力を比較したところ、対象37菌株中能力の高いものが8菌株あった。本研究はNEDOバイオマスエネルギー先導技術研究開発事業により実施した。

14) 2Lp16

「電気培養による硫酸還元菌の生育活性化およびその機構解明」

平野伸一, 松本伯夫, 大村直也 (電中研)

【背景及び目的】微生物の生育は呼吸などエネルギー獲得過程における電子授受反応に支えられており、電子授受反応は酸化還元電位に影響される。私たちのグループでは電気培養法を用いた電位調整に基づく微生物の生育制御を検討し、これまでに-0.6V (vs Ag/AgCl) 以下の電位に調整することで、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* の生育を活性化できることを明らかにしている。しかし、その詳細な機構に関しては不明である。そこで、本研究では電位環境調整時の細胞に生じた変化を解析することで、電気培養による微生物の生育活性化機構を明らかにすることを目的とした。【方法及び結果】-0.6V以下の電位に培養環境を調整することが *D. vulgaris* に与える影響を、呼吸速度、呼吸に関わる遺伝子の転写、細胞内エネルギー物質のバランスの観点から解析を行った。硫酸呼吸速度は-0.6V以下の電位に培養液を調整することで非通電時と比較し約1.5倍向上した。次に、対数増殖期初期と中期において細胞内のエネルギーバランスを非通電時の細胞と比較したところ、Adenylate energy charge 及び NAD(P)/NAD(P)H 比は電位調整下、対数増殖期初期の細胞において非通電時と比べ、約3倍高い値を示した。さらに、呼吸に関わるヒドロゲナーゼ類・硫酸還元酵素遺伝子などの転写が、対数増殖期初期において電位制御により活性化されていること及び、この転写活性化に寄与する転写因子をレポーターアッセイ・ゲルシフトアッセイにより明らかにすることができた。以上の結果に基づき、電気的な電位環境の制御により微生物の生育を活性化する新規の微生物制御手法の機構について考察する。

15) 2Ip16

「微小電極アレイを組み込んだバイオチップデバイスによる新規多点電気化学検出」

伊野浩介, 堀口佳子, 林 振宇, 珠玖 仁, 末永智一 (東北大院・環境)

近年の分子生物学や分析技術の発展により、生体試料中の微量物質を検出できるさまざまな手法が開発されている。例えば、DNAやタンパク質、細胞を固定化する事で、DNAアレイ、プロテインアレイ、細胞アレイとして用いる事ができる。このようなバイオチップを用いた検出では主に光学的手法が用いら

れている。しかしながら、光学的手法は、周辺装置も含めた小型化が困難、光を吸収、遮光、放出する物質や材料を使えないと言った問題を抱えている。別の手法として、電気化学的手法が以前より提案されているが、これまで培われた半導体技術をそのまま転用でき、感度が高いものの、電気化学検出のためのリード部分が必要なため、一枚のチップ上に多数の測定点を配置させる事が困難であった。そこで、本研究では、一枚のチップ上に多数の測定点を配置させるために、新しい原理に基づいた網羅的検出システムを考案し、全く新しい電気化学イメージングデバイスの開発を行った。このデバイスは、幅が10-100umのバンド電極が上下の挟み込まれており、局所的なレドックスサイクルによる目的の測定点のみの検出が可能になっている。本研究では、スイッチングシステムを組み込む事により多数の測定点における電気化学シグナルを取得する事に成功した。さらに腫瘍マーカータンパク質の検出といった医療用デバイスの開発を行っており、包括的、網羅的検出の可能とするバイオデバイス用の電気化学イメージングプラットフォームとして期待できる。

16) 2Hp17

「プラスミドオーグメンテーションによる連続バッチ式活性汚泥リアクターの2,4-D分解能の増強」

筒井裕文, 松田真佐美, 穴見泰崇, 井上大介, 清 和成, 惣田 訓, 池 道彦 (阪大院・工・環・エネ)

【目的】難分解性化学物質分解遺伝子をコードしたプラスミドを活性汚泥細菌に伝播させ、分解能を増強させるプラスミドオーグメンテーションの有効性を検証する事を目的とし、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 部分分解遺伝子をコードする自己伝達性プラスミド pJP4 を連続バッチ式活性汚泥リアクター (SBR) に導入し、プラスミドの挙動と2,4-D分解能の増強を調査した。【方法・結果】2,4-D資化能を有する *Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4) および、2,4-D資化能をもたない *Escherichia coli* HB101 (pJP4) をSBRに導入し、2,4-D含有廃水を処理した。JMP134導入系の2,4-D除去率は、3日目までは85%以上であったが、導入菌の減少に伴い悪化し7日目には20%まで減少した。HB101導入系の2,4-D除去率は、7日目まで常に20%以下であった。しかし、両SBRの除去率は16日目から100%まで急増した。両SBRとも7日目には2,4-D分解能を示さない *Pseudomonas* 属の transconjugant が分離されたが、20日目には2,4-D資化能を有する *Burkholderia* 属の transconjugant が検出されたことから、これらがSBRの2,4-D分解能の増強に寄与したと考えられた。以上の結果から、導入する宿主によらず、分解能を発揮できる土着菌にpJP4が伝播する事で、2,4-D分解能が増強される事が示唆された。本研究は文科省科研費若手研究 (A) (18681013) の一環として実施した。

17) 2Bp24

「バイオナノ磁性粒子膜上への効率的な膜タンパク質ディスプレイに向けた発現誘導システムの構築」

吉野知子, 下条明子, 前田義昌, 松永 是 (東京農工大院・生命)

【目的】磁性細菌により合成される脂質二重膜で覆われたバイ

オナノ磁性粒子 (Bacterial magnetic particles : BacMPs) は、膜タンパク質の固相担体としての利用が注目されている。しかし、多くの膜タンパク質の発現は磁性細菌の生育阻害を引き起こし、BacMPs 上へのディスプレイが困難であった。本研究では、磁性細菌において膜タンパク質の発現時期や発現量の調整を行うための発現誘導システムを構築し、効率的な BacMPs への膜タンパク質ディスプレイ技術の確立を目指した。【方法及び結果】磁性細菌内で複製可能なベクター pUMG にテトラサイクリンリプレッサー (TetR) 遺伝子、及び標的遺伝子の上流に TetR が結合するオペレーター配列を組み込んだプロモーターを含む発現誘導ベクターを構築した。標的遺伝子として BacMPs 上のタンパク質である Mms13 と GFP の融合遺伝子を用いて発現誘導を行ったところ、Anhydrotetracycline の添加時において BacMPs 上に蛍光が確認された。そこで、膜貫通タンパク質である CXCR4、CCR5 及び CD81 を標的遺伝子として、発現誘導ベクターを用いた磁性細菌の形質転換を行った。その結果、いずれの膜タンパク質においても、発現誘導システムを利用した時のみ形質転換体が得られた。また、CD81 において BacMPs 上への機能発現が確認され、発現誘導システムを用いることで、細胞毒性の高い膜タンパク質の BacMPs 上へのディスプレイが可能となった。

18) 2Mp26

「Streptothricin 生合成遺伝子群のクローニングと機能解析」

丸山千登勢, 豊田順也, 矢野愛佳, 濱野吉十 (福井県大・生物資源)

【目的】放線菌の二次代謝産物として生産される Streptothricin (ST) は、その構造に beta-リジンホモポリマー (1~7 残基) を有しており、その鎖長が長いほど ST の抗菌活性および細胞毒性が強くなることが知られている。また、ポリカチオン性を示す beta-リジンホモポリマーは、ST の膜透過性に関与している事が推測され、ST 生合成における beta-リジンホモポリマー合成酵素は大変興味深い。そこで、ST 生産放線菌より ST 生合成遺伝子群を取得し、これら遺伝子群を解析することにより、beta-リジンホモポリマー合成関連遺伝子の同定を試みた。【方法と結果】ST 自己耐性遺伝子 (*sttR*) をプローブとして用い、ST 生産放線菌 *Streptomyces rochei* ゲノムライブラリーより、*sttR*

遺伝子を含む約 34Kbp のゲノム断片を有するコスミドを取得した。本コスミドの全塩基配列を決定したところ、*sttR* 遺伝子近傍領域に非リボゾームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子を含む遺伝子群が見出され、ST 生合成遺伝子であると推測された。そこで、本コスミドを異種放線菌 *Streptomyces lividans* に導入したところ、その導入株は、beta-リジン3残基以上から成るホモポリマーを有する ST を生産した。従って、本コスミドには ST 生合成に関わる全ての遺伝子群が含まれており、すなわち beta-リジンホモポリマー合成酵素遺伝子も含まれていることを明らかにした。また、クラスター内に見出した4つの NRPS 遺伝子およびその他の関連遺伝子群について破壊実験を行い、各遺伝子の機能について検証した。

19) 2Gp28

「無細胞翻訳系を用いた蛋白質合成活性の最適化戦略」

松浦友亮, 数田恭章, 安達次朗, 相田拓洋, 小野直亮, 森 浩禎, 四方哲也 (阪大院・情報・バイオ情報, 埼玉大院・理工, 奈良先端大・バイオ, ERATO, JST)

蛋白質合成システムの合成活性は、それを構成する因子とその因子間の相互作用ネットワークにより規定される。では、どの程度の因子数で規定されているのだろうか？また、因子間の相互作用の強さはどの程度だろうか？本研究では、これらを明らかにすることで、高い蛋白質合成活性を有する無細胞翻訳系を設計する方法論を確立することを目的とした。蛋白質合成システムは、蛋白質成分としては、最低限 34 種類の蛋白質 (開始、伸長、終結因子など) とリボソームだけで進行することが実験的に示された [Nat. Biotechnol, 2001]。これら基本因子は大腸菌の全遺伝子 4300 種類のわずか 2% 程度である。我々は、大腸菌遺伝子約 4200 種類それぞれが、基本因子のみで構成される無細胞翻訳系 (PURE system) の活性に与える影響を測定した。その結果、新たに約 7% の遺伝子産物が活性向上に寄与することを明らかにした [Mol Cell Proteomics, 2008]。さらに、蛋白質合成システムの構成因子間の相互作用の強さを測定するために、PURE system の構成因子の濃度をさまざまに変化させ合成活性を測定した。これらを解析することで、構成因子濃度の組合せと合成活性の関係性を明らかにした。これらの知見は、高い蛋白質合成活性を有する無細胞翻訳系をデザインするのに有用なものであることを示した。