

第4回 日本生物工学会西日本支部

講 演 会

講 演 要 旨 集

日時：2018年12月1日（土）

場所：鳥取大学 工学部

日本生物工学会西日本支部

第4回 日本生物工学会西日本支部

講 演 会

講 演 要 旨 集

日時：2018年12月1日（土）

場所：鳥取大学 工学部

日本生物工学会西日本支部

第4回 日本生物工学会 西日本支部 講演会

会 場：鳥取大学工学部

開催日：2018年12月1日（土）

13:00 ~ 15:00

シンポジウム <産業に活かされる中四国発祥のバイオ技術>

(工学部21講義室)

・放線菌酵素の基礎研究から応用へ

畠中唯史（岡山県生物科学研究所）

座長 有馬二朗（鳥取大・農）

・蟹取県とつり発の新素材「キチンナノファイバー」のヘルスケア効果と実用化の取り組み

伊福伸介（鳥取大院・工）

座長 岡本賢治（鳥取大院・工）

・ラビリンチュラを用いた脂溶性物質の発酵生産

氏原哲朗（協和発酵バイオ）

座長 原田尚志（鳥取大院・工）

・岡山発！林原の酵素技術を用いたユニークな製品の产业化

安田亜希子（株式会社 林原）

座長 鈴木宏和（鳥取大院・工）

15:15 ~ 17:30

一般講演

(工学部23・24・25講義室)

18:00 ~ 19:30

懇親会

(鳥取大学生協第2食堂)

一般講演 会場一覧表

会場	講演番号
A 23 講義室	A1-A10
B 24 講義室	B1-B10
C 25 講義室	C1-C9

一般講演 座長一覧表

会場	演題番号	座長
A (23 講義室)	1 ~ 3 4 ~ 6 7 ~ 10	西田 郁久(島根大・生物資源・生命科学) 今中 洋行(岡山大院・自然科学) 荒川 賢治(広島大院・先端物質)
B (24 講義室)	1 ~ 3 4 ~ 6 7 ~ 10	広岡 和丈(福山大・生命工・生物工) 鈴木 宏和(鳥取大院・工) 清水 克彦(鳥取大 CoRE)
C (25 講義室)	1 ~ 3 4 ~ 6 7 ~ 9	有馬 二朗(鳥取大・農) 岡本 賢治(鳥取大院・工) 阿座上 弘行(山口大院・創科)

注)

1. 液晶プロジェクターを用います。操作は各発表者でお願いします。
2. 発表時間9分、質疑応答2分、交代1分厳守で進行をお願いします。

講演会 会場図

(鳥取大学工学部:〒680-8552 鳥取市湖山町南 4-101)

受付

工学部 21 講義室前

シンポジウム会場

工学部 21 講義室

一般講演

A会場 工学部 23 講義室

B会場 工学部 24 講義室

C会場 工学部 25 講義室

休憩室・クローケ

工学部 22 講義室



工学部構内図



一般講演プログラム

A 会場(23講義室)

15:15 A-1 抗生物質生産に関するキノン補酵素の機能解析

○原圭佑, 梅代亜紗子, 山内佑介, 荒川賢治
(広島大院・先端研・分子生命)

15:27 A-2 Maniwamycin の生合成起源の解析および生物活性

○達川綾香¹, 岸本拓也¹, 福本敦², 安齊洋次郎², 荒川賢治¹
(¹広島大院・先端研・分子生命, ²東邦大・薬)

15:39 A-3 放線菌の抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子の分子多様性解析

○住吉美保, 手島愛子, 荒川賢治
(広島大院・先端研・分子生命)

15:51 A-4 低グルコース及び cAMP/PKA 経路が分裂酵母のコエンザイム Q₁₀ の生産性に与える影響

○西田郁久, 横見和誠, 細野耕司, 林和弘, 松尾安浩, 戒能智宏, 川向誠
(島根大・生物資源・生命科学)

16:03 A-5 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”のシリカ吸着能を利用した酵素の固定化

○小林大起¹, 西美智佳¹, 美藤友博², 清水克彦³, 有馬二朗²
(¹鳥取大院・農, ²鳥取大・農, ³鳥取大 CoRE)

16:15 A-6 キチン分解菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 によるキチン性廃棄物分解

○東谷洸里¹, 仁木大輔², 美藤友博¹, 清水克彦³, 有馬二朗¹
(¹鳥取大・農, ²鳥取大院・持社創科, ³鳥取大 CoRE)

16:27 A-7 好熱菌転位因子の転位誘発メカニズム

○竹谷達成¹, 田靡実咲², 大城隆², 鈴木宏和²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

16:39 A-8 好熱菌常温発現プロモーターの発現特性解析

○奥村友太¹, 大城隆², 鈴木宏和²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

16:51 A-9 海藻分解性好熱菌に由来する新奇糖加水分解酵素の酵素学的解析

○李原圭¹, 藤井健太¹, 八木寿梓², 大城隆², 鈴木宏和²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

17:03 A-10 超好熱菌由来 CutA1 を足場とした多価化分子認識素子の作出

○今中洋行¹, 東秀隆¹, 笹井友菜², 今村維克¹

(¹岡山大院・自然, ²岡山大・工)

B 会場(24講義室)

- 15:15 B-1 海洋性細菌由来キノン(CTQ)含有型グリシンオキシダーゼの大腸菌発現系の構築及び組換え酵素の精製
○梶山雄輝, 平岩祥太朗, 溝端佐津紀, 根本理子, 田村隆, 稲垣賢二
(岡山大院・環境生命)
- 15:27 B-2 ヒドロゲナーゼのワンステップ精製を可能にするゲノム改変技術の確立
○戸田貴裕, 田嶋智之, 高口豊, 根本理子, 稲垣賢二, 田村隆
(岡山大院・環境生命)
- 15:39 B-3 ペプチド転移酵素を利用した細胞質内送達リガンドの調製法の開発
○田中綾乃¹, 宮田尚也², 宮本愛², 二見淳一郎²
(¹岡山大・工・化学生命, ²岡山大院・自然科学)
- 15:51 B-4 *Serratia marcescens* Lip システムを利用した大腸菌による低分子抗体分泌産生系の構築
○高木大地¹, 浅田知範¹, 辻明彦^{1,2}, 大森謙司³, 湯浅恵造^{1,2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源, ³田辺三菱製薬)
- 16:03 B-5 ユニークな基質特異性をもつアメフラシトリプシン
○辻明彦, 湯浅恵造
(徳島大・生物資源産業)
- 16:15 B-6 分子内SS結合保護試薬によるタンパク質の耐熱性向上
○萩本惇史, 宮本愛, 二見淳一郎
(岡山大院・自然科学)
- 16:27 B-7 枯草菌クオルモン修飾酵素の基質認識を担うアミノ酸残基の探索
塩田紗希¹, ○広岡和丈²
(¹福山大院・工, ²福山大・生命工・生物工)
- 16:39 B-8 西洋わさび由来ペルオキシダーゼ代替触媒としてのヘミンの細胞毒性低減とその応用
○古川翔大, 境慎司, 田谷正仁
(阪大院・基工)
- 16:51 B-9 フコイダン分解細菌 *Luteolibacter algae* H18 のスルファターゼについて
○長尾達彦^{1,2}, 小松史佳¹, 八木寿梓³, 鈴木宏和³, 大城隆³
(¹鳥取大院・工, ²日本ジッコウ(株), ³鳥取大・工)

17:03 B-10 アナモックス細菌のラグラン脂質生合成における推定鍵酵素であるラジカルSAM酵素の結晶化

○末宗周憲¹, 上垣哲心¹, 高井研², 日野智也³, 永野真吾³

(¹鳥取大院・持社創科, ²海洋開発研究機構, ³鳥取大院・工・化学生物)

C 会場(25講義室)

15:15 C-1 *Pseudomonas stutzeri* がアルカリ条件下で生産する多糖の構造及び生理的特徴

○山田浩之^{1,2}, 篠瀬英司¹, 岡本賢治¹

(¹鳥取大院・工, ²富士フィルム和光純薬)

15:27 C-2 海藻多糖フコイダンによるアミロイド線維形成阻害

○矢崎幸拓¹, 木下竣貴², 柏原直樹³, 川本仁志⁴, 三木康成⁴, 大城隆², 八木寿梓²

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工, ³鳥取大・工, ⁴(株)海産物のきむらや)

15:39 C-3 酵素的に脱アセチル化したフコイダンによるアミロイド線維形成抑制の検討

○荒井良仁¹, 長尾達彦^{2,3}, 荊尾美奈子⁴, 八木寿梓², 鈴木宏和², 大城隆²

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工, ³日本ジッコウ(株), ⁴鳥取大・工)

15:51 C-4 腫瘍免疫応答の活性化をモニタリングするマウス自己抗体のプロテオーム解析

○尾崎龍之介¹, 勝河祐希², 二見淳一郎²

(¹岡山大・工・化学生命, ²岡山大院・ヘルスシステム)

16:03 C-5 歯周病原性細菌のオートインデューサーの不活化が病原性に与える影響

○飯田亮平¹, 谷口彰吾², 阿座上弘行³

(¹鳥取大院・連農, ²山口大・農, ³山口大院・創科)

16:15 C-6 スイカ機能性成分の代謝プロファイリングと品種間差異

○井神冬美香¹, 只野翔大², 森本康史³, 明石欣也¹

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥大院・連農, ³鳥取園試)

16:27 C-7 下水処理水中栄養塩濃度変化が土着藻類での脂質蓄積・分解に与える影響

○高部祐剛, 岡崎広典, 増田貴則, 星川淑子

(鳥取大院・工)

16:39 C-8 キトサンを用いた三次元多孔質構造の3Dプリンティングとその応用

○本田尚之, 境慎司, 田谷正仁

(阪大・基工)

16:51 C-9 キトサンを含むバイオインクを用いた3Dプリンティング

○山本翔太, 境慎司, 田谷正仁

(阪大院・基工)

放線菌酵素の基礎研究から応用へ

畠中 唯史（岡山県生物科学研究所・酵素機能研究グループ）

生物科学研究所は、自然に恵まれた岡山県のへそ、吉備中央町に位置し、この10月で満22歳を迎えた岡山県立の研究機関です。当研究所は、植物と微生物とを研究対象として取り上げ、遺伝子組み換え技術を中心に、バイオテクノロジーを活用し、基礎から応用研究へ発展させることを目的した、中・四国地方では唯一といつてもよいバイオ専門の研究所です。私は、研究所設立当初から、一貫して放線菌が产生する酵素を題材とした研究を行ってまいりました。本日は、この22年間行ってきた研究をふりかえりながら、以下の三つのトピックスに絞ってご紹介したいと存じます。



① 活性を指標とした有用酵素の探索

ホスホリパーゼD (PLD) は、グリセロリン脂質のリン酸エステルを加水分解する酵素であるが、反応系に水酸基を有する化合物が存在すると、ホスファチジル基転移反応を触媒する。ホスファチジルセリン (PS) は、牛脳から抽出され、脳機能改善剤としての研究がなされてきたが、狂牛病の発生以来、安全・安心な原料から PLD を用いた酵素合成で PS は生産されるようになってきた。我々は、工業的に優れた PLD を得るために、土壤からスクリーニングを行い、产生量の多い放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株を得ることに成功した。TH-2 株由来 PLD を、工業的スケールで生産する目的で、大型培養設備での生産を試みたところ、大量の金属プロテアーゼ (SCMP) の产生がおこり、PLD の生産は大失敗した。その後、pH をコントロールすることにより、SCMP 产生は抑えられ、TH-2 株由来 PLD の工業生産手法は確立され、TH-2 株は、中国大陸に渡り、PLD を現在でも作り続けている。TH-2 株は、アミノペプチダーゼも分泌し、この酵素について、ホモログとの比較から、詳細に研究を行った。

② 放線菌発現系を利用した有用酵素の探索

TH-2 株が、大量の SCMP を产生することを述べたが、精製酵素の比活性値から逆算すると、0.3g/L の生産量と見積もられた。我々はこの SCMP の高い生産性に着目し、富山県立大学（現：東京大学）の尾仲宏康先生、長瀬産業株式会社と協力して、SCMP プロモーターを利用した発現ベクター (pTONA5a) を作成した。これを使って、放線菌エステラーゼライブリリーから、フェルラ酸エステラーゼを見出すことに成功した。

③ Near the future

SCMP プロモーターは、全長約 420bp であるが、必須領域を検討すると、3'端 68bp で、全長よりも高い発現量を示し、培地成分の制限も解除されることが判明した。この世界最小（かつ最強？）の放線菌プロモーターを二つ搭載した発現ベクターを構築中であり、現在は、このベクターで何が出来そうか？頭の中で、妄想実験している最中です。

蟹取県とつくり発の新素材「キチンナノファイバー」のヘルスケア効果と実用化の取り組み

伊福 伸介（鳥取大学大学院工学研究科）

鳥取県はカニが特産品として知られ、水揚量の全体に占める割合は 46.4%にものぼる。とりわけ境港は国内有数のカニの水揚げ基地として知られている。そこでは、大量のカニ殻が廃棄物として発生する。カニ殻の主成分である「キチン」をナノファイバーという極細の繊維で抽出することに成功し、その実用化を進めている。カニ殻から抽出したキチンを粉碎することにより幅が 10 ナノメートルの極めて細い繊維が取り出せる（図 1）。キチンは昆虫の外皮やキノコにも含まれるバイオマスであるが、水に溶けないため加工が難しかった。一方でキチンナノファイバーは水によく分散してジェル状になるため、加工や試作、評価が出来るようになった。

キチンナノファイバーという特殊な繊維を製造できるのは、カニ殻がもともとキチンナノファイバーの集合体であるためである。鋼鉄並みと言われる強いキチンナノファイバーを殻に蓄えて、外敵から身を守っている。それゆえ、キチンナノファイバーをプラスチックに混ぜると、透明性やしなやかさをそのままに、大幅に強度をアップできる。

鳥取大学には附属の動物病院があるため、獣医師と連携してナノファイバーのいろいろな生理機能を検証している。例えば、キチンナノファイバーを服用すると、腸の炎症が緩和されたり、腸内環境が整えられたり、脂肪やコレステロールを減らせることを明らかにしている。また、肌にナノファイバーのジェルを薄く塗布すると、表皮に保護膜ができて肌の水分の蒸散を抑えたり、肌の弾力に関わる膠原繊維（コラーゲン）を増やすことができる。また、皮膚炎の緩和や最近では育毛や発毛を促す効果があることも明らかにしている。さらには、農作物に撒くと成長を促したり、免疫機能が高められて病気にかかりにくくできる。また、パンなど小麦製品に配合すると良く膨らんだり、食感を改良することもできる。この様にキチンナノファイバーの機能が色々と見つかり、その潜在能力の高さに驚いている。これはまさに共同研究の賜物であろう。今後も多くの研究者にこの新素材に触れてもらい、未知の機能を引き出していきたい。この様な、海の恵みの新素材を普及させるために、大学発のベンチャー企業「マリンナノファイバー」を起業し、製造・販売を行っている。これまでの実績としてはキチンナノファイバーを配合した化粧品が販売されている。今後、より多くの分野で製品化が進んで、「カニ殻が足りなくて困っている」と言われるくらい普及していきたい。

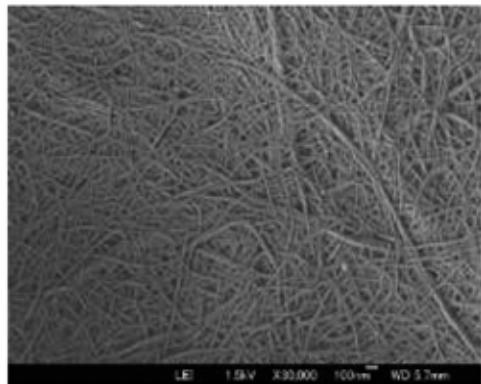


図 1. カニ殻より抽出した極細繊維
キチンナノファイバー

ラビリンチュラを用いた脂溶性物質の発酵生産

氏原 哲朗（協和発酵バイオ）

協和発酵バイオ(株)の前身会社である協和発酵工業は山口県に航空機燃料であるイソオクタンの生産のため、微生物を用いてアセトン・ブタノールを植物原料から発酵生産する工場を構えていた。戦後は燃料需要も変化し、アセトン・ブタノールの生産は終了したが、新たに戦後世界で初めてのグルタミン酸の微生物による発酵生産を成功させてからは、微生物を用いた発酵技術を用いてアミノ酸などの多種多様な製品を生産している。現在では山口県の工場は協和発酵バイオ(株)山口事業所となっており、変わらず微生物発酵の重要な拠点でありつづけている。

さて、グルタミン酸などのアミノ酸発酵ではバクテリアを用いることが一般的であるが、生産する化合物の性質によっては宿主を新たに考えることも重要である。本発表では近年注目を集めてい る油糧微生物ラビリンチュラを用いた協和発酵バイオの脂溶性物質発酵の検討内容について報告する。

ラビリンチュラは多価不飽和脂肪酸の一一種であるドコサヘキサエン酸(DHA)を生産し蓄積する生物として有名である。ラビリンチュラのDHA生産は、多価不飽和脂肪酸合成酵素という巨大なタンパク質複合体で行われていることが知られているが、これまで多価不飽和脂肪酸合成酵素はDHAを生産するものとエイコサペンタエン酸(EPA)を生産するものしか知られていなかった。我々は多価不飽和脂肪酸合成酵素を用いた多様な脂肪酸の生産への展開を目指し、アラキドン酸を生産する多価不飽和脂肪酸合成酵素を海洋性バクテリアより見出すことに成功した。得られたアラキドン酸合成型の多価不飽和脂肪酸合成酵素は初めての $\omega 6$ 生産型の酵素であり、多様な産物への応用が期待される。

脂肪酸以外の検討として、ステロールの生産にも着目している。環境中からのスクリーニングを行い、高いコレステロール生産性を持つラビリンチュラを見出し、その株の7-デヒドロコレステロールレダクターゼ遺伝子を破壊することで、ビタミンD3の前駆体である7-デヒドロコレステロールを生産することに成功した。7-デヒドロコレステロールは光によりビタミンD3に転換できるため、非動物由来のビタミンD3の生産可能性が示された。また、コレステロール以外に含有されるステロールについて解析を進め、その生産に必要なメチル化酵素を同定した。このメチル化酵素を破壊することで純度の高いコレステロールや7-デヒドロコレステロールの生産が可能になった。

岡山発！林原の酵素技術を用いたユニークな製品の产业化

安田 亜希子（株式会社 林原）

林原は1883年に水飴製造業としてスタートし、微生物の作り出す酵素を澱粉に作用させることで、さまざまな糖質製品を開発してきました。酵素を用いた製法は、化学的・物理的手法を用いた製法よりもマイルドであり、着色しにくく、雑味のない良質な品質に繋がります。しかしながら、目的とする酵素が容易に見つかるわけではなく、微生物の持つ可能性を信じて粘り強く土壌から酵素生産菌のスクリーニングを行って初めて、幸運を掴み取ることができます。さらに林原では、ターゲットとする糖質を決め、その生成酵素を狙いうちでスクリーニングするといったアプローチをあまり選択せず、澱粉に作用して特徴的な反応を示す酵素を広くスクリーニングするといったアプローチを好みます。その結果、ユニークな酵素を多く取得し、それらの組合せによって特徴的な糖質製品の開発に繋げてきました。

その代表例はトレハロースです。林原では、トレハロースを最初から作ろうと狙いを定めて開発に着手したのではなく、澱粉に作用するユニークな酵素を探していると、2種類の酵素が組み合わさってトレハロースができる 것을偶然発見したのです。そして、これらの酵素を用いてトレハロースの产业化に成功しました。

酵素を用いたものづくりは、酵素の特性を見極め、どのように澱粉に作用させるかで大きく変わってきます。糖以外の物質に注目すれば、ビタミンやポリフェノールでも配糖化できます。柑橘類に多く含まれるヘスペリジンを配糖化した糖転移ヘスペリジンは、飛躍的に溶解度が向上し、飲料をはじめ配合できる食品が大幅に広がり、ヘスペリジンが持つ多彩な生理機能がトクホや機能性表示食品として活かされています。

イソマルトデキストリンは、新しい難消化性の多糖（食物繊維）を作ろうという開発テーマの中で生まれた糖質です。澱粉をヒトが摂取することの第1の意義はエネルギー源とすることにあります（一次機能）、特定の酵素を作用させることでイソマルトデキストリンという水溶性の食物繊維に変換され、腸内環境の改善や血糖上昇抑制など様々な生理作用（三次機能）を持つ素材へと変化します。

このようにして開発された林原の製品は、「医薬品・食品・健康食品・化粧品・色素」の5フィールドを中心に展開をしており、暮らしのいろいろなところで活躍しています。これからも“独自技術で世界をリードする企業へ”林原は挑戦を続けています。暮らしに役立つ素材を製品化することで、社会に貢献できれば幸甚に存じます。

A-1

抗生素質生産に関するキノン補酵素の機能解析

○原圭佑, 梅代亜紗子, 山内佑介, 荒川賢治

(広島大院・先端研・分子生命)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状プラスミド pSLA2-L 上にはポリケチド抗生物質 lankacidin C (LC) 生合成遺伝子 (*lkc*) クラスターが存在し、その中に補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) 生合成遺伝子 (*lkcK-lkcO*) が見出された。キノン補酵素生合成遺伝子 *lkcL* (*pqqC*) の遺伝子破壊株は LC を生産せず、C23-C25 位が lactamide である lankacidinol 類を蓄積していた。また、本破壊株に対し、系外から PQQ を添加したところ、C23-C25 位が pyruvamide である LC 生産が回復したため、本菌におけるキノン補酵素 (SRO-Q) は LC 生合成に関与することが示唆された。本研究では、(1) SRO-Q 生合成系の解明、(2) SRO-Q 要求性脱水素酵素 (Orf23) の基質特異性解析を行った。

【方法および結果】(1) 本菌におけるキノン補酵素 (SRO-Q) の生合成経路を明らかにするため、SRO-Q の前駆体ペプチド遺伝子 *lkcK* の欠失株を作製し、その代謝産物解析を行なったところ、LC を生産せず、lankacidinol 類の蓄積が認められた。このことから、*lkcK* は SRO-Q 生合成に必須であることが明らかになった。現在、*ΔlkcK* の代謝産物解析を行なっている。

(2) 本菌におけるキノン要求性酵素 Orf23 の基質特異性を調べるため、lankacidinol 類と lankacidin の線状中間体 KA05, KA05-2, 乳酸やグルコースなどを基質として酵素反応を行なったところ、17 員環閉環体の lankacidinol 類でのみ反応が進行していた。これらの結果から、本酵素はグラム陰性菌のそれとは異なり、きわめて厳格な基質特異性を有することが明らかとなった。

A-2

Maniwamycin の生合成起源の解析および生物活性

○達川綾香¹, 岸本拓也¹, 福本敦², 安齊洋次郎², 荒川賢治¹

(¹広島大院・先端研・分子生命, ²東邦大・薬)

【目的】放線菌は抗生物質など多種多様な二次代謝産物を生産し、1 株あたり 30 種類もの生合成クラスターを有するが、通常培養では約 2 割しか生産されていない。そこでゲノムマイニングによる休眠二次代謝の覚醒が注目されている。当研究室では制御遺伝子等に変異を加えた三重破壊株を作製し、培養したところアゾキシアルケン化合物 KA57-A の取得に成功した。KA57-A におけるアゾキシ結合の形成メカニズムは興味深く、さらに本化合物がクロモバクテリウム属細菌の quorum sensing を阻害することも明らかとなっている。そこで、KA57-A の構造類似体である maniwamycin 生産菌の TOHO-M025 株に注目し、生合成遺伝子の比較解析により共通の遺伝子をいくつか見出した。また、TOHO-M025 株の代謝産物解析により新規化合物 maniwamycin G が得られたため、構造解析を行った。そこで本研究では、アゾキシ結合形成機構の解明および生合成遺伝子の人為改変による構造多様化を目指す。

【方法・結果】TOHO-M025 株により生産される maniwamycin G の生合成起源を明らかにするために、[1-¹³C],[2-¹³C] および [1,2-¹³C] 標識酢酸ナトリウムの取り込み実験を行ったところ、Hexylamine ユニットは酢酸由来であることがわかった。また、窒素起源に関して ¹⁵N-L-Serine および ¹⁵N-L-Glutamic Acid を添加したところ、各々 N_α, N_β 位への取り込みが認められた。改良 Mosher 法および円二色性スペクトルの測定により、本化合物の絶対立体配置は (2R,3S) であることがわかった。さらに、maniwamycin G は quorum sensing を IC₅₀=250 μg/ml で阻害することがわかった。

放線菌の抗生物質生産を誘導するブテノライド型シグナル分子の分子多様性解析

A-3

○住吉美保, 手島愛子, 荒川賢治
(広島大院・先端研・分子生命)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産し、その生合成はブテノライド型シグナル分子 SRB (*Streptomyces rochei* butenolide) により厳密に制御されている。SRB は SRB 生合成因子 SrrX によって生合成され、2,3-二置換ブテノライド構造を有しており、LC・LM 生産を 40nM にて誘導した。放線菌のシグナル分子に関して、これまでに約 6 割は γ -ブチロラクトン構造と推測されているが、残り 4 割は、①近年発見されたフラン型や SRB などのブテノライド型、②新規骨格、③シグナル分子非生産、などに大別できる。そこで本研究では、放線菌シグナル分子におけるブテノライド型分子の多様性の検証、さらに休眠二次代謝の誘導生産を目指した。

【方法および結果】まず、SRB の多様性検証のために供試菌として本学の保存菌株からランダムに選択した 86 株を培養し、代謝産物を酢酸エチルで抽出した。その後、抽出物を $\Delta srrX$ 株に添加培養し LC・LM 生産の回復を調べたが、いずれの供試菌抽出物においても回復が認められず、SRB は独特なシグナル分子構造であることが示唆された。また、*srrX* 遺伝子産物の相同性検索を行ったところ、*S. griseofuscus*, *S. cellostaticus* において高い相同性を示した (99%, 86%)。これらの菌のシグナル分子は SRB 型である可能性が高いと考えられたため詳細な解析を行ったところ、MS 解析によってその代謝産物から SRB の存在を確認でき、当該菌株における SRB 生産が強く示唆された。現在、SrrX 相同性が高い他株の解析も行っている。さらに、SRB 添加による供試菌の二次代謝誘導についても報告する。

低グルコース及び cAMP/PKA 経路が分裂酵母のコエンザイム Q₁₀ の生産性に与える影響

A-4

○西田都久, 横見和誠, 細野耕司, 林和弘, 松尾安浩, 戒能智宏, 川向誠
(島根大・生物資源)

【目的】コエンザイム Q (CoQ, ユビキノン) は、真核生物のミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。CoQ は、キノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、ヒトや分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ではその側鎖長が 10 である CoQ₁₀ を生合成する。*S. pombe* では *dps1*, *dpl1*, *ppt1*, *coq3*~*coq9* の少なくとも 10 種の遺伝子が CoQ₁₀ の生合成に関与していることが明らかになっており、機能解析を進めている。CoQ 生合成遺伝子の破壊株は CoQ₁₀ の生合成が欠損あるいは著しく低下しており、呼吸欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上での生育遅延、寿命の低下などの表現型を示す。しかしながら、真核生物における CoQ の生合成経路の全貌やその制御機構に関しては明らかになっていない。そこで、CoQ₁₀ の生産性に影響を及ぼす因子の探索や培養条件の検討を行った。

【方法・結果】分裂酵母は低濃度のグルコースを含む培地では増殖が停止し、それに伴い細胞内の CoQ₁₀ 量が増加する。分裂酵母における CoQ₁₀ の生合成はグルコース応答により制御されていることが示唆されたため、その主要経路である cAMP/PKA 経路に着目した。3% グルコースを含む YES 完全培地で $\Delta cgs1$, $\Delta cyr1$, $\Delta git3$, $\Delta gpa2$, $\Delta pka1$ の各遺伝子単独破壊株の CoQ₁₀ 量を測定したところ、 $\Delta cyr1$, $\Delta git3$, $\Delta gpa2$, $\Delta pka1$ の CoQ₁₀ 量は野生株の約 1.5~2 倍に増加し、 $\Delta cgs1$ では 0.7 倍に減少した。この結果はグルコース濃度依存的に CoQ₁₀ 量が変化する結果と一致する。分裂酵母において CoQ₁₀ の生合成は PKA によって負に制御されている可能性が示唆されたため、その機構解明を目指して解析を進めている。

A-5

シリカ粒子形成促進タンパク質”グラシン”のシリカ吸着能を利用した酵素の固定化

○小林大起¹, 西美智佳¹, 美藤友博², 清水克彦³, 有馬二朗²

(¹鳥取大院・農, ²鳥取大・農, ³鳥取大 CoRE)

【目的】グラシンは、ガラスカイメン類カイロウドウケツのシリカ骨格から見出された水溶性タンパク質であり、室温・中性 pH 条件下でケイ酸から速やかにシリカ粒子を形成する。これまでに、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) とグラシンを融合したタンパク質 (GST-グラシン) を構築し、グラシンのシリカ粒子形成能を利用して GST 活性を保持したシリカ粒子を作成した (2017 年度生物工学会大会)。我々はさらに、グラシンからシリカへの吸着能を見出したため、本研究では、本機能を用いたさらに簡易的な酵素の固定化を検証した。

【方法・結果】性質の異なる 2 種類のシリカ (Wakogel® C-300, フュームドシリカ) に精製 GST-グラシンを添加し、遠心分離をした後に、上清及び回収シリカに存在する GST 活性を評価した。その結果、ほとんどの GST 活性が回収シリカに移行し、回収シリカの GST 全活性は、もとの GST-グラシンと比較して、それぞれ 55 % (Wakogel® C-300) および 75 % (フュームドシリカ) であった。さらに、精製前の GST-グラシンに対してシリカ吸着を行い、遠心上清と回収シリカを SDS-PAGE に供した結果、回収シリカからほぼ純化された GST-グラシンのタンパク質バンドが確認された。以上の結果から、グラシンのシリカ吸着能による簡易的な GST 固定シリカの構築とタンパク質粗精製が可能であることが明らかとなった。

A-6

キチン分解菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 によるキチン性廃棄物分解

○東谷洸里¹, 仁木大輔², 美藤友博¹, 清水克彦³, 有馬二朗¹

(¹鳥取大・農, ²鳥取大院・持社創科, ³鳥取大 CoRE)

【目的】日本一のカニの水揚げ量を誇る鳥取県において、多量のカニ殻が産業廃棄物として廃棄されている。そのため、カニ殻を含めたキチン性廃棄物を有効活用することが求められている。これまでに、カニ殻／廃菌床の完熟堆肥から、キチン分解菌である *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (NTK2 株) が見出された。本研究では、NTK2 株を用いたキチン性廃棄物の分解と有用物質生産をめざし、キチン性廃棄物分解と発現タンパク質について調べた。

【方法・結果】本菌のキチン分解能やそれに関わるタンパク質について調べるために、キチン無添加 ISP1 培地と 2%キチン添加 ISP1 培地で NTK2 株を培養した。その結果、本菌の生育やタンパク質生産は、2%キチンの添加により、著しく向上した。また、培養上清の SDS-PAGE を行った結果、2%キチン添加により特異的に発現したと思われるタンパク質のバンドが、複数観察された。そこで、キチン性廃棄物としてカニ殻、イカの中骨、シイタケの柄の三種類を選択した後、水道水にそれぞれ単独もしくは混合して添加した培地 8 種類を作成した。それらを使用して NTK2 株を培養したところ、良好な生育が確認されたため、その培養上清の SDS-PAGE やザイモグラフィーに供した。その結果、SDS-PAGE では培養液中に含まれるキチン性廃棄物によって、産生されるタンパク質に差が見られ、それとは別にシイタケを含む培養液では別の特異的なバンドが確認できた。今後は N 末端解析により、各タンパク質を同定していく予定である。

A-7

好熱菌転位因子の転位誘発メカニズム

○竹谷達成¹, 田麻実咲², 大城隆², 鈴木宏和²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

【目的】 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 のゲノム中には多数の転位因子が存在する。以前の研究では、HTA426 株の転位因子が生育阻害ストレスによって転位誘導されることが見出された。転位因子は、遺伝子破壊や遺伝子挿入などの遺伝学的ツールとして利用できるが、好熱菌内で実際に機能する転位因子はほとんど報告されていない。本会では、これら転位因子の転位誘導機構に関する最新の知見を報告する。

【実験と結果】 MK536 株は本来の *pyrF* 遺伝子を欠失しており、その一方で非機能的プロモーターと連結した *pyrF* 遺伝子全長を染色体上にもつ。MK536 株はウラシル要求性であるが、転位因子が *pyrF* 全長の上流に挿入されると極性効果により *pyrF* 遺伝子が発現するため、ウラシル原栄養性となる。この原理を利用しながら MK536 株中の転位因子の転位率を分析した。MK536 株はウラシル飢餓によって転位因子を誘導した。IS0302/IS0390 の転位が高頻度だった。サザンプロット解析から、本転位因子は Copy & Paste 型転位機構で無作為に転位することが示された。他生育阻害ストレスによる IS0302/IS0390 転位をサザンプロット解析で調べたところ、炭素源飢餓、窒素源飢餓、抗生物質による生育阻害ストレスで転位誘導された。本誘導がストレス応答性シグマ因子の制御下にあると考え、推定シグマ因子 (SigX, SigW, SigB, および SigB アンタゴニスト) の遺伝子を高発現用プラスミドにクローニングし、MK536 株に導入した。得られた好熱菌株をウラシル欠乏下で培養したところ、*sigW* 高発現株で培養早期から転位が起こった。本結果は、転位因子の転位誘発に *sigW* が関与していることを示唆する。

A-8

好熱菌常温発現プロモーターの発現特性解析

○奥村友太¹, 大城隆², 鈴木宏和²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

【目的】 本研究では、培養温度で代謝経路をスイッチングできる好熱菌代謝工学システムの確立を目的とする。本システムでは、常温培養下で高発現する好熱菌プロモータ一下流に常温菌酵素の遺伝子をクローニングし、その発現カセットを好熱菌細胞に導入する。高温培養中の好熱菌では、產生された常温菌酵素は熱変性により機能しない。ところが増殖した好熱菌を常温下で培養すると、常温菌酵素が高活性の状態で維持され、その機能を發揮する。その一方で、好熱菌由来の火薬酵素群は活性が弱まるため、導入した常温菌酵素から構成される代謝経路が優位に機能する。本システムの実現を目指し、好熱菌 (*Geobacillus kaustophilus* HTA426) の常温高発現プロモーターを探査した。本会では、それにより見出された GK0647 プロモーター (P_{gk0647}) を用いた異種遺伝子発現を検証した。

【方法と結果】 以前に構築した大腸菌-*Geobacillus* シャトルプラスミド pGKE101 に、T7 ターミネーター配列、 P_{gk0647} 配列ならびに耐熱性 β-ガラクトシダーゼの遺伝子 (*bgaB*) を導入することで、pGKE115- P_{gk0647} -*bgaB* を構築した。本プラスミドを有する好熱菌を 60°C で菌体濁度が 1 になるまで培養し、ついで 40°C で 24 h ほど培養したところ、BgaB が顕著に產生された。以前の研究で行った転写変動解析では、GK0647 転写は常温培養で誘導されたが、60°C で 24 h ほど培養しても BgaB バンドが見られた。これは 40°C よりも 60°C において効率的な翻訳が原因と考えられる。常温誘導性は低いものの、 P_{gk0647} は 40°C 培養で異種タンパク質を高生産させられることが示された。

A-9

海藻分解性好熱菌に由来する新奇糖加水分解酵素の酵素学的解析

○李原圭¹, 藤井健太¹, 八木寿梓², 大城隆², 鈴木宏和²

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工)

【目的】海藻バイオマスの高度利用を目的とし, 当研究室では海藻分解好熱菌 (*Geobacillus thermodenitrificans* OS27) を鳥取県沿岸から単離した。本菌は海藻を分解することができ、海藻多糖類を含む様々な糖類を資化できる。ドラフトゲノム配列も解析済みで、その配列中には 28 個の糖加水分解酵素遺伝子が見出された。そのうち 2 個 (GT3485 と GT3489) は珍しい遺伝子で、その発現産物の活性に興味がもたらされた。本研究では、GT3489 異種発現産物を調製し、その酵素学的諸性質を詳細に調べた。

【方法と結果】大腸菌 pET システムを用いて GT3489 組換え体を調製し、IMAC 法で均一に精製した。本酵素はホモ二量体を形成し、pNP-β-D-xylopyranoside を良好な基質とした。天然基質としては、キシロオリゴ糖を分解した。GT3489 は既知 GH1 と N 末端領域において相同性を示したが、C 末端領域では示さず、二次構造予測からは新規なドメインであることが示唆された。C 末端領域で保存されている触媒酸性残基も見出されなかった。アラニンスキャニングで触媒酸性残基を探したところ、Glu188 と Glu318 が触媒残基であることが示唆された。C 末端領域を削った変異酵素を調製したところ、いずれの酵素も不溶性画分に產生された。微量に生産された変異酵素は野生型と同じく二量体を形成し、pNP-β-D-xylopyranoside を分解したが、キシロオリゴ糖に対する活性は大きく減少していた。本結果は、GT3489 の C 末端領域が二量体形成や触媒機能に関与しない一方で、酵素の可溶化やキシロオリゴ糖認識に重要であることを示唆している。

超好熱菌由来 CutA1 を足場とした多価化分子認識素子の作出

A-10

○今中洋行¹, 東秀隆¹, 笹井友菜²・今村維克¹

(¹岡山大院・自然, ²岡山大・工)

生体分子間相互作用を細胞内外で検出あるいは制御する技術は、医療診断、薬剤（スクリーニング）、環境・食品分析やバイオイメージングなどにおいて広く応用されている。本研究では三量体タンパク質で極めて安定なコア構造を有する超好熱菌由来 CutA1 を足場とした標的分子に精密かつ強く相互作用する分子認識素子の開発を目的とした。そして、多価化分子認識素子の作出を狙い、アミノ酸配列挿入部位の探索を進め、分子デザインに対する許容性を評価した。

二次構造形成配列あるいはサブユニット間相互作用への寄与が少ないと考えられる部位を 4 カ所設定し、リガンドペプチドとしてそれぞれ StrepTagII (STII) を挿入した。発現タンパク質の可溶性ならびに熱安定性を評価したところ、STII の単独挿入による不溶化は生じず、CutA1 がペプチドリガンドの足場として有用で、異なる部位へのペプチド挿入が可能であることが示された。一方、挿入部位が三量体形成の際に近接する場合、熱安定性の顕著な低下がみられた。統いて、分子内の 2 カ所にそれぞれ STII (スペーサー配列を含め 16 残基), あるいは 8 残基からなるスペーサー配列を挿入したところ、挿入配列の長さによって発現タンパク質の可溶化率ならびに熱安定性が大きく影響を受けた。これらの検討を通じ、タンパク質の折疊における立体障害を緩和することで、サブユニットあたり 2 カ所、三量体あたり計 6 カ所にペプチドを挿入し得ることがわかった。そして、CutA1 が、標的分子の高度特異的認識を可能とする分子認識素子の創出に資するプラットフォームとなり得ると考えられた。

海洋性細菌由来キノン(CTQ)含有型グリシンオキシダーゼの大腸菌発現系の構築 及び組換え酵素の精製

B-1

○梶山雄輝, 平岩祥太朗, 溝端佐津紀, 根本理子, 田村隆, 稲垣賢二
(岡山大院, 環境生命)

【目的】海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来グリシンオキシダーゼ(以下 GlyOX)はグリシンに厳格な基質特異性を示し、バイオセンサー等への応用が期待される。また本酵素は分子内の結合により生じるシステイントリプトフィルキノン(CTQ)という特徴的な構造を有するが、その生成機構はまだ明らかにされていない。立体構造解析や CTQ 形成機構の解明には大量の酵素が必要であるが、本菌は GlyOX 生産量が少ないため、大腸菌での GlyOX 発現系の構築と精製系の確立を目的として実験を行った。

【方法】GlyOX 遺伝子は本体となる *goxA* と CTQ 形成に関与するとされる *goxB* の両遺伝子から構成されている。そのため 2 つの遺伝子を 2 つの MCS を持つ pRSFDuet-1 に組み込んだ pRSFD *goxA-goxB* を構築し、*E. coli* Rosetta (DE3) pLysS へ導入し、GlyOX 発現を試みた。GlyOX 活性はグリシンの酸化により生じる過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法で定量することで測定した。精製は無細胞抽出液を 80% 硫安沈殿で回収後、メタルアフィニティカラム TALON を用いて行った。精製の確認は SDS-PAGE で行った。

【結果および考察】TALON カラムにより 1 段階で精製純度を効率的に上昇させることができた。精製酵素の比活性は 56.8 U/mg であった。基質特異性を検討した結果、ネイティブ酵素と同様にグリシンに厳格な特異性を示し、構造類似体ではエチルグリシンに若干反応したが、それ以外は反応しなかった。本研究により精製法をほぼ確立できたので、今後は詳細な性質検討を行うとともに X 線結晶構造解析により立体構造を決定し、GlyOX, GoxB 両蛋白質の相互作用による CTQ 形成機構を解明する予定である。

ヒドロゲナーゼのワンステップ精製を可能にするゲノム改変技術の確立

B-2

○戸田貴裕, 田嶋智之, 高口豊, 根本理子, 稲垣賢二, 田村隆
(岡山大院・環境生命)

【目的】水素の酸化、還元反応を可逆的に触媒するヒドロゲナーゼ(Hase)は、水素燃料電池の酵素電極としての利用が期待されている。硫酸還元菌が保有する[NiFeSe]Hase は酸素耐性が高く、失活状態からの回復力が高い。微生物のゲノム情報を検索すると未同定セレン含有型 Hase の存在が示唆されたので生化学的同定を検討した。また、水素燃料電池に応用するため、炭素電極に Hase を付着させ、還元力の発生を確認した。

【方法・結果】*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, *D. alaskensis* G20 の粗酵素液から超遠心分離で膜画分を濃縮して、Native-PAGE 上で水素を基質とする活性染色を行い、セレンを検出するために ICP-MS 分析を行った。その結果、これら二株の硫酸還元菌の Hase 活性バンドにセレンが検出された。次にセレン含有 Hase の簡便精製を目的として *D. alaskensis* の[NiFeSe]Hase 遺伝子にアフィニティタグ配列を導入する方法を検討した。アフィニティタグ導入用の接合伝達-相同組換えベクターを作製し、大腸菌 *E. coli* S17-1 を介した接合伝達により *D. alaskensis* を形質転換した。薬剤耐性を指標とする 1 回目の相同組換え株を選抜して、2 回目の相同組み換えによるプラスミドの切り出しを行い、ゲノム DNA 上の[NiFeSe]Hase 遺伝子にアフニティタグ配列が導入されたことを PCR と DNA シーケンスによって確認した。この菌体を用いて、スピンドルカラムによるワンステップ精製を行い、活性染色を行った。その結果、組換え型[NiFeSe]Hase の活性を確認した。また、光励起特性を持つ炭素電極に Hase を付着させて光照射を行なったところ、光誘起された電子が Hase に受け渡されて還元力（水素）の発生が認められた。

B-3

ペプチド転移酵素を利用した細胞質内送達リガンドの調製法の開発

○田中綾乃¹, 宮田尚也², 宮本愛², 二見淳一郎²

(¹岡山大・工・化学生命, ²岡山大院・自然科学)

【背景と目的】タンパク質や核酸等の高分子の生体物質を生理的な条件下で細胞内に高効率に導入する方法として受容体を介したエンドサイトーシス経路がある。この場合、細胞に対するダメージは少ないが、エンドソーム内の物質は酸性化を経てリソソームと融合して分解経路に入ってしまう。当研究グループでは Leu/His からなる 26 アミノ酸の両親媒性ペプチド(Endoporter:E.P)が酸性条件下でエンドソームを不安定化して高効率に細胞質内へ放出される経路に注目し、細胞内に内在化されるリガンドと E.P の連結を考えた。ところが E.P 融合タンパク質は大腸菌には極めて毒性が高く、動物細胞で発現させても発現細胞内に取り込まれるため調製が困難であった。本研究では Hek293 細胞で分泌生産させた Transferrin(Tfn)の C 末端に、ペプチド転移酵素である SortaseA5 を用いて E.P ペプチドを連結する手法で細胞質内送達リガンドを調製することとした。

【方法】SortaseA5, GGG-GFPuv5, G-EGFP-LPETG は C 末端に HisTag を付加させて大腸菌 BL21(DE3)で発現・精製した。Tfn-LPETG-HisTag は Freestyle293 細胞で分泌生産・精製した。GGG-E.P.は化学合成されたペプチドを用いた。SortaseA5 のペプチド転移反応は G-EGFP-LPETG が分子内環化することで評価・確認した。Tfn-LPETG-HisTag と GGG-E.P.の連結反応は、反応後に HisTag が除去されることで確認した。

【結果と考察】SortaseA5 により EGFP の分子内環化反応と Tfn-GFPuv5 と Tfn-E.P の合成が可能なことが確認された。現在、リガンドの大量調製と細胞内導入実験を行っている。

B-4

Serratia marcescens Lip システムを利用した大腸菌による低分子抗体分泌産生系の構築

○高木大地¹, 浅田知範¹, 遠明彦^{1,2}, 大森謙司³, 湯浅恵造^{1,2}

(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源, ³田辺三菱製薬)

大腸菌を宿主とした組換えタンパク質生産システムはこれまでに数多く構築されており、そのほとんどがペリプラズムを含む菌体内での生産となっている。菌体内生産では菌体破碎等の更なる工程が必要であり、コスト効率改善のため高効率な分泌生産系の構築が望まれている。大腸菌や *Serratia marcescens* などのグラム陰性菌には、3つのタンパク質 (ABC protein, MFP, OMP) によって構成される単純な分泌装置である I 型タンパク質分泌装置 (T1SS) が備わっており、選択的なタンパク質の分泌を行っている。これまでに我々は、*S. marcescens* T1SS の 1 つである Lip system (LipB-LipC-LipD) を利用して、大腸菌によって抗体力値を有する一本鎖抗体 (scFv) が分泌されることを見出した。本研究では、この分泌システムがラクダ科動物抗体フラグメント (nanobody) の分泌生産に応用できるかを検討した。scFv の分泌に関与した推定基質認識部位 (C 末端側 VTV 配列) は scFv の重鎖部分の定常領域にあり、本研究で用いた GFP タンパク質に対する GFP-nanobody の C 末端にも同配列が存在したため、この配列が C 末端から 16-18 番目になるように FLAG タグを付加させた GFP-nanobody-FLAG を作製した。これを Lip system とともに大腸菌 BL21 株に導入し、nanobody の菌体外分泌を調べた。その結果、Lip system により nanobody も分泌されることが明らかとなった。また、得られた分泌 nanobody が抗原結合能を有することを細胞免疫染色法により明らかにした。以上のことから、Lip system を利用した低分子抗体分泌生産システム構築の可能性が考えられた。

ユニークな基質特異性をもつアメフラシリブシン

B-5

○辻明彦, 湯浅恵造

(徳島大・生物資源産業)

トリプシンは、動物界に広く分布し、脊椎動物トリプシンについては、タンパク質の進化モデルとしての詳細な研究が進んでいる。一方、無脊椎動物トリプシンについては、cDNA クローニングは行われているが、酵素精製や切断特異性の解析はほとんど行われていないが、ブラジルの Terra のグループは、2006 年に、ゴキブリと甲虫幼虫のトリプシンについて、サブサイト構造の違いについて報告し、この違いは餌に含まれるトリプシンインヒビターに対応したのではと推測している。

今回、軟体動物門腹足綱に属するアメフラシの消化液よりグリコシダーゼを精製する過程で、トリプシン様プロテアーゼを同定したので、単一に精製した標品を用いて、切断特異性、阻害剤感受性について牛トリプシンと比較した。アメフラシリブシン様酵素は、硫安分画、ベンザミジンーセファロースによって単一に精製した。分子サイズは、約 28 kDa でトリプシンより大きい。活性の至適 pH は pH 8-9 であったが、アメフラシ消化液の pH である 5.5 においても約 50% の活性を保持した。阻害剤感受性は、トリプシンと同様に APMSF, アプロチニンによって阻害されたが、トリプシンと異なり TLCK, ロイペプチドでは阻害されなかった。P1 位に Arg を持ち、長さ、配列の異なる MCA 基質に対する特異性は、トリプシンと全く異なり、サブサイトの構造に違いがあることが示唆された。酵素のアミノ酸配列についても現在解析中であるので、アメフラシゲノムデータとの比較についても報告したい。

分子内 SS 結合保護試薬によるタンパク質の耐熱性向上

B-6

○萩本惇史, 宮本愛, 二見淳一郎

(岡山大院・自然科学)

【背景と目的】ジスルフィド (SS) 結合はタンパク質の熱力学的安定性の向上に大きく貢献している一方で、加熱時には SS 結合の開裂を起因とする SH/SS 交換反応が進行し、不可逆失活の主因となる例が多い。我々は、加熱下のタンパク質中に生じる極微量の perthiol を速やかに保護する能力がある methanethiosulfonate(MTS)系試薬の添加で、効果的に加熱不可逆失活が抑制できることを発見した。

【方法】分子内に SS 結合を有する Lysozyme, RNaseA, α -lactalbumin, Chicken avidin, Tamavidin2-HOT をモデルとした。これらのタンパク質を HEPES buffer(pH6.8)中で MTS 系試薬を添加して加熱し、MTS 試薬による加熱失活抑制効果を評価した。また、タンパク質の熱失活の抑制効果が知られているグリシンアミド (Gly-Ad) と MTS 試薬との熱失活抑制の併用効果についても検証した。

【結果と考察】加熱条件下に MTS 試薬を添加すると单量体の SS 結合含有球状タンパク質は効果的に不可逆失活が抑制された。一方で单量体内に SS 結合があり四量体を形成する Chicken Avidin にはこの抑制効果は見られなかった。これらの結果から、MTS 試薬は各タンパク質の加熱不可逆失活の律速段階の解析・評価に有用なことが示唆された。また、Gly-Ad と MTS 試薬の併用により大幅に安定化効果が高まったことから、タンパク質の安定化剤の構成成分として有用なことが示された。現在、四量体のサブユニット間を SS 結合で架橋をした Streptavidin を用いて添加剤で耐熱性を向上させる実験を行っている。

B-7

枯草菌クオルモン修飾酵素の基質認識を担うアミノ酸残基の探索
塩田紗希¹, ○広岡和丈²
(¹福山大院・工, ²福山大・生命工・生物工)

【目的】細菌はクオルモンと呼ばれる低分子物質を分泌してそれを感知することで同族細胞密度を知り、様々な遺伝子発現誘導（クオラムセンシング応答）を行う。枯草菌の主要なクオルモンは ComX ペプチドであり、細胞内で ComX 前駆体の特定のトリプトファン残基がブレニル化修飾を受けた後に分泌され、ComPA 二成分制御系を介して同族細胞のみに特異的に認識される。ComX への修飾を行うのが ComQ であり C₁₀ と C₁₅ のいずれかのブレニル二リン酸を基質とする。即ち ComQ は ComX 前駆体構造とブレニル二リン酸鎖長の両方を認識していることになる。本研究では ComQ での 2 つの基質の認識に重要なドメイン・アミノ酸残基を決定し、その機構を明らかにすることを目指した。【方法・結果】C₁₀型 ComX を生産する RO-E-2 株由来の ComQX をベースに、様々な領域を C₁₅型 ComX を生産する 168 株由来のものに組み換えたキメラ型 ComQX を作製して認識特異性の改変を試みたが、活性をもつ ComX を生産するものは得られなかった。次に、C₁₀型または C₁₅型 ComX を生産する ComQ のアミノ酸配列を比較し、C₁₀型間と C₁₅型間では共通するが、C₁₀型と C₁₅型では異なるアミノ酸残基を選出し、RO-E-2 株 ComQ 内の対応する各残基を 168 株のものに置換するように遺伝子に点変異導入を行った。これらの変異型 ComQX を生産する大腸菌を、C₁₀型 ComX または C₁₅型 ComX に応答する 2 種の枯草菌テスター株と共に培養することで活性を評価した。その結果、F63S, N186G, G190V 変異体にはいずれのテスター株も応答を示さず、Phe63, Asn186, Gly190 の各残基が RO-E-2 株 ComQ の活性に必須であることがわかった。

B-8

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ代替触媒としてのヘミンの細胞毒性低減とその応用
○古川翔大, 境慎司, 田谷正仁
(阪大院・基工)

【目的】近年、ヒドロゲルを細胞足場材料に用い、細胞を 3 次元組織化する研究に注目が集まっている。これまで、我々は西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の触媒作用によりフェノール性水酸基(Ph 基)導入高分子水溶液をゲル化させ、細胞足場材料を作製してきた。しかし HRP は植物由来であるため、作製した組織を移植治療に使用する際に免疫反応を誘導することが懸念されている。本研究では、HRP と同様の触媒作用を示す動物由来のヘミンに注目した。しかしへミンには、①pH 7.4 の水に難溶②濃度によって細胞毒性を示すという欠点があった。そこで、これらの欠点を改善することを試み、それを用いて 3D バイオプリンティングを行った。

【方法・結果】ヘミンを 274 mM 水酸化ナトリウム水溶液に溶解した後、塩酸で pH を 7 に調製し、ヘミン水溶液を作製した。しかし、この水溶液は高濃度で細胞傷害性を示した。そこで、アルブミンを複合化したところ、細胞毒性を抑制することができた。さらにヘミンを用いて HRP と同様に Ph 基導入ヒアルロン酸(HA-Ph), Ph 基導入ゼラチン(Gela-Ph)水溶液をゲル化させることもできた。また、HA-Ph と Gela-Ph の混合溶液からヘミンを作用させて得られたゲル中で細胞を生存させることができ、押出し式 3D プリンターを用いた造形を行うことも可能であった。

B-9

フコイダン分解細菌 *Luteolibacter algae* H18 のスルファターゼについて

○長尾達彦^{1,2}, 小松史佳¹, 八木寿梓³, 鈴木宏和³, 大城隆³
(¹鳥取大院・工, ²日本ジッコウ(株), ³鳥取大・工)

【目的】オキナワモズク由来フコイダンは、主鎖であるフコースに、硫酸基、グルクロン酸基残基が結合した多糖類であると考えられている。当研究室で単離したフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株では、フコイダンの脱アセチル化の後に低分子化が起こる。しかし、硫酸基、グルクロン酸残基に作用する酵素については調べられておらず、今回、フコイダンの脱硫酸化を触媒するフコイダンスルファターゼ遺伝子の特定を目的とし、H18 株のゲノム DNA 配列からスルファターゼをコードすると推定される遺伝子を大腸菌で発現させ、その特性を評価した。

【方法・結果】H18 株のゲノム中には、スルファターゼとアノテーションされている ORF が 77 個存在している。その中から、フコイダン低分子化酵素遺伝子ならびに、フコイダンデアセチラーゼ遺伝子近傍の遺伝子を含む合計 9 種類をフコイダンスルファターゼの候補遺伝子として選択し、遺伝子のクローニング、大腸菌での発現を行った。そのうち 8 種類について目的タンパク質の生産が確認された。オキナワモズクフコイダンを基質として酵素反応を行ったが、どの酵素を用いても硫酸基の遊離は見られなかった。一方、*p*-nitrophenyl sulfate を基質とした場合は、2 種類の酵素 Sut3, Sut736 で活性が見られた。これらについて酵素精製を行い、金属イオンが活性に及ぼす影響を検討したところ、Sut3 は Ca^{2+} の添加によって活性が上昇し、EDTA によって活性が阻害された。また、Sut736 は Ca^{2+} を添加した場合でしか活性が見られなかった。従って、Sut3 および Sut736 は酵素活性に Ca^{2+} を必要とすることが示唆された。

B-10

アナモックス細菌のラダラン脂質生合成における推定鍵酵素であるラジカル SAM 酵素の結晶化

○末宗周憲¹, 上垣哲心¹, 高井研², 日野智也³, 永野真吾³
(¹鳥取大院・持社創科, ²海洋開発研究機構, ³鳥取大院・工・化学生物)

嫌気的にアンモニアを酸化するアナモックス細菌は、ラダラン脂質と呼ばれる 4 員環が直線状に複数連なった歪みの高い骨格を持つ脂質を多く生産する。この高度に歪んだ炭素骨格の構築は化学的に困難なため、その生合成メカニズムが注目されているが、その大部分が未解明である。Rattray らは、比較ゲノム解析などから 4Fe4S の鉄-硫黄クラスターと S-アデノシルメチオニン (SAM) 及びコバラミン (B_{12}) を補因子とする B_{12} 依存性ラジカル SAM 酵素 (RSE) がラダラン脂質の梯子構造の構築に関与すると提案した。しかし、現在までにこれを直接指示するデータは報告はされていない。そこで、本研究ではラダラン脂質生合成経路の全容解明に向けて、推定鍵酵素である RSE の立体構造に基づいた梯子構造の構築メカニズムの解明を目指す。本研究対象の RSE が持つ鉄-硫黄クラスターは酸素によって崩壊するため、空気中で精製すると補因子を持たないアポ型酵素が得られる。これを用いた結晶化スクリーニングによって最大で 4.5 Å 分解能で回折斑点を確認できる結晶が得られたが、構造決定には至らなかった。そこで、結晶性を向上させるため、補因子の再構成を行なった。鉄-硫黄クラスターの再構成については、電子常磁性共鳴 (EPR) 及び紫外-可視吸収スペクトルから 4Fe4S が再構成できたことが明らかとなった。この試料に SAM を添加した試料で約 500 条件の結晶化スクリーニングを行なったが、結晶が確認できなかった。そこでもう一つの補因子である B_{12} の再構成について検討した。本発表ではこれらの結果について報告する。

C-1 *Pseudomonas stutzeri* がアルカリ条件下で生産する多糖の構造及び生理的特徴
○山田浩之^{1,2}, 篠瀬英司¹, 岡本賢治¹
(¹鳥取大院・工, ²富士フィルム和光純薬)

【目的】微生物が生産する多糖体は、ユニークな物性とその生理学的性質から、食品や工業的用途、また医薬品分野への利用が注目されています。本研究では、土壤から分離したエタノール資化性菌 *Pseudomonas stutzeri* BL58 株が、アルカリ条件下で高いゲル形性能を有する多糖体を生産することを見いだし、その多糖（以下 BL58 ポリマー）の構成成分とその構造、安全性や生理的特徴について検討した。

【方法・結果】BL58 ポリマーの生産条件を検討し、pH10, 0.5%ペプトン, 1%エタノールから成る培地で培養を開始し、24 時間毎に 1%のエタノールを逐次添加、72 時間培養で全糖量約 12.5 g/L の高粘度な BL58 ポリマーを得た。BL58 ポリマーの精製法を最適化し、得られた精製品を用い、HPLC 分析、TFA で酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体を GC-MS 及び NMR にて構造解析したところ、構成糖はグルコース、マンノース及び 3-O-カルボキシエチルラムノース、構造はグルコースとマンノースが 1,4 結合し、グルコース分子内にカルボキシエチルラムノースが結合しているものと推定した。また、化粧品や食品を対象とした BL58 ポリマーの基本的な安定性試験の結果、急性毒性、眼、皮膚への刺激、変異原としての影響は、肉眼的・病理学的に認められず、十分な安定性を示した。更に、BL58 ポリマーの抗菌性・抗ウイルス性試験、皮膚感作性抑制、抗原性試験等、基本的な生理活性試験の結果、腫瘍細胞を用いた BL58 ポリマーの細胞増殖抑制作用についての検討結果から、診断薬や治療薬等の医療分野への適用が期待された。

C-2 海藻多糖フコイダンによるアミロイド線維形成阻害
○矢崎幸拓¹, 木下峻貴², 柏原直樹³, 川本仁志⁴, 三木康成⁴, 大城隆², 八木寿梓²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工, ³鳥取大・工, ⁴(株)海産物のきむらや)

【目的】タンパク質の異常凝集体の一つであるアミロイド線維は、アルツハイマー病、II型糖尿病をはじめ多くの疾患の原因産物である。発症すると根治的な治療が難しく、予防が最重要と考えられている。我々は、これらの疾患の共通機構であるアミロイド線維の形成を阻害することで発症の予防ができると考え、その阻害物質として計 6 種の海藻多糖の効果を調べた。

【方法、結果、考察】モデルタンパク質としてインスリノーマ原因タンパク質であるインスリンを用い、各種多糖の効果を調べた。線維形成の有無はチオフラビン T (ThT) 蛍光測定で調べた。また、インスリンの線維形成に伴う二次構造変化を円二色性分光法 (CD), 反応後の形態は透過型電子顕微鏡 (TEM) で調べた。はじめに、インスリンのアミロイド線維形成に対するデンプンの効果について調べた結果、ThT 蛍光測定において多糖未添加のインスリンと比較すると変化が無く、阻害効果は見られなかった。海藻多糖であるラミナラン、κ-カラギーナン、λ-カラギーナンを添加すると、数時間程度の線維形成時間の遅延が見られたが、最終的には蛍光強度の増加が認められた。他方、フコイダンにおいては大幅に線維形成の阻害効果が見られ、特にアカモクフコイダンの阻害効果が高かった。加水分解により低分子化してもその阻害効果は変わらず、線維形成過程で生じる二次構造変化も抑制されていた。また、TEM 観察において不定形の凝集が見られたが、アミロイド線維は観察されなかった。この結果は、多くの生理活性が報告されているフコイダンに新たな付加価値を見出し、今後の応用展開が期待できることが示唆された。

酵素的に脱アセチル化したフコイダンによるアミロイド線維形成抑制の検討

C-3

○荒井良仁¹, 長尾達彦^{2,3}, 荊尾美奈子⁴, 八木寿梓², 鈴木宏和², 大城隆²

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工, ³日本ジッコウ(株), ⁴鳥取大・工)

【目的】 フコイダンとは硫酸化多糖の一種で、抗ガン作用などの生理活性を持つことが示されているが、生理活性がフコイダン分子中のどの構造に起因するかは不明な点が多く、この解明には酵素的な低分子化が有用と考えている。当研究室で用いているオキナワモズク由来フコイダンは、フコースからなる主鎖にアセチル基、硫酸基等が結合しているが、我々は既にフコイダン資化性細菌 *Luteolibacter algae* H18 からフコイダンを脱アセチル化する酵素を見出し、その遺伝子を大腸菌で異種発現することができた。

アミロイド線維とは、アルツハイマー病等を引き起こすタンパク質の異常凝集体を指すが、最近当研究室ではフコイダンがある種のタンパク質のアミロイド線維形成化を抑制することを見出した。そこで今回、酵素的に脱アセチル化したフコイダンによるアミロイド線維形成抑制について、検討を行った。

【方法・結果】 フコイダンの酵素的脱アセチル化反応は、フコイダン濃度 0.25%, 30°Cで 48 h, 800 mL スケールで行った。酵素反応後の生成物の分子量は反応前とほぼ同じであり、硫酸基の含量も反応前の 19%と比べ、減少は認められなかった。アミロイド線維形成に及ぼす影響を調べるために、モデルタンパク質としてインスリン (0.5 mg/mL)を用い、2 M 塩酸グアニジンを含む溶液に 0~1.25%のフコイダンおよび脱アセチル化フコイダンを添加後、37°Cで振とうし、Thioflavin-T assay 法を用いて、蛍光分光光度計によりアミロイド線維の生成の経時変化を測定した。その結果、オキナワモズクフコイダンによるアミロイド線維形成抑制にはアセチル基の有無は影響しないことがわかった。

腫瘍免疫応答の活性化をモニタリングするマウス自己抗体のプロテオーム解析

C-4

○尾崎龍之介¹, 勝河祐希², 二見淳一郎²

(¹岡山大・工・化学生命, ²岡山大院・ヘルスシステム)

【目的】 免疫チェックポイント阻害剤が効かない cold-tumor では T 細胞の疲弊とがん抗原の発現抑制が認められ、これらを再活性化する薬剤と免疫チェックポイント阻害剤を併用する複合免疫療法に注目が集まっている。この腫瘍免疫応答の変化をモニタリングするため、我々は抗がん抗原抗体を網羅的に定量評価する抗体検査診断薬を開発中である。複合免疫療法の動物実験では野生型マウスで担がんマウスを作成して評価するが、がん抗原の多くがヒトとマウス間で相同性が低く、マウス抗原に特化した創薬研究ツールを開発する必要がある。

【方法】 担がんマウスのがん免疫治療モデルから採取された各種の血清と、マウスに移植されたがん細胞の cell lysate を用いて、western blotting 法でどの様な抗原に対する抗体が誘導されるかを確認・評価した。各陽性バンド由来の抗原の特定は、培養マウスがん細胞から細胞質・膜・核由来成分に分画した後に SDS-PAGE と western blotting 法で比較し、目的バンドを in-gel digestion 法と LC-MS 解析から候補をリストアップした。各候補抗原は全長の cDNA をクローニングして大腸菌で生産した抗原とマウス由来血清との反応性が確認されたものを正しい抗原とした。

【結果と考察】 抗がん抗原抗体は主に配列エピトープを認識することが予測されており、western blotting 法で腫瘍免疫応答に伴う抗体誘導の興味深い変化が観察された。実際に同定された抗原は自己免疫疾患と相關するものが多く、腫瘍免疫と自己免疫が密接な関係にあることが示唆された。

C-5

歯周病原性細菌のオートインデューサーの不活化が病原性に与える影響

○飯田亮平¹, 谷口彰吾², 阿座上弘行³

(¹鳥取大院・連農, ²山口大・農, ³山口大院・創科)

【目的】歯周病原性細菌の一つである *Eikenella corrodens* 1073 株はオートインデューサーとして AI-2 を用いてクオラムセンシングを行う。本菌では、AI-2 濃度は対数増殖期に上昇するが、定常期に入ると AI-2 濃度の急激な低下が観察される。定常期の培養上清中に AI-2 の不活化因子の存在が示唆されたので、培養上清から不活化因子の精製を行った。精製タンパク質の解析により、AI-2 の不活化には外膜ポーリンが関与することがわかった。しかし、ポーリンがどのように AI-2 を不活化するのか、また本菌はなぜ AI-2 を不活化するのかは不明である。本研究では、AI-2 の不活化が本菌の病原性に及ぼす影響を調べるとともに、AI-2 の不活化機構について調べた。

【方法・結果】AI-2 を不活化できない変異株を用いて、バイオフィルム形成能や自己凝集能を調べ、野生株と比較した。バイオフィルム形成は野生株に比べて見かけ上増加していた。また、凝集能は変異株において上昇が見られた。また、部分精製した不活化因子を野生株に添加して培養したところ、バイオフィルム形成の大幅な低下と自己凝集能の増加が観察された。これらのことから、AI-2 の不活化が本菌のバイオフィルム形成能や自己凝集能に影響を及ぼすことが示唆された。

さらに、不活化因子（ポーリン）が細胞外小胞に乗って菌体外に放出され、AI-2 を小胞内に隔離することにより不活化している可能性を考えた。ゲル濾過クロマトグラフィーや限外濾過による解析を行ったが、現在までにその仮説を実証する結果は得られていない。

C-6

スイカ機能性成分の代謝プロファイリングと品種間差異

○井神冬美香¹, 只野翔大², 森本康史³, 明石欣也¹

(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥大院・連農, ³鳥取園試)

鳥取県は、スイカの主要な生産地であり、「大栄スイカ」や「極実スイカ」など市場価値の高いブランドスイカで有名である。スイカの機能性成分であるシトルリンは、スイカから最初に発見された遊離アミノ酸であり、活性酸素除去能など様々な機能性が報告されている。しかし、シトルリンを始めとする主要な栄養素の蓄積量を決定する要因については十分に理解されていない。また、スイカを栽培する際の接ぎ木の組み合わせが、果実の成分や品質へ及ぼす影響についての情報は得られていない。そこで本研究では、異なる品種を接ぎ木して得られたスイカ果実における果肉の代謝産物プロファイリングを行い、スイカ果肉における代謝挙動について知見を得ることを目的とした。

穂木に「祭りばやし 777」と「祭りばやし RG」の 2 品種を、台木に「かちどき 2 号」「どんなもん台」、「101212」の 3 品種を使用し、6 種類の組み合わせで接ぎ木し栽培したスイカ果実を使用した。果肉をメタノール/クロロホルム/水で抽出し、LCMS によりアミノ酸類を網羅的に定量し、主成分分析やクラスター分析により各因子の相関を解析した。その結果、シトルリンを含む 4-5 種のアミノ酸がスイカ果実に顕著に蓄積すること、異なる穂木と台木の組み合わせは、これら主要アミノ酸の含量に顕著な相違を生み出すことが見出された。これらの結果より、穂木と台木の組み合わせの選択が、スイカ果実の栄養特性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

下水処理水中栄養塩濃度変化が土着藻類での脂質蓄積・分解に与える影響

C-7

○高部祐剛, 岡崎広典, 増田貴則, 星川淑子
(鳥取大院・工)

【目的】 与えられた環境で自然に増殖する土着藻類を、実下水処理水を用いて培養する。その上で、下水処理水中の窒素濃度変化に対する土着藻類での脂質の蓄積・分解に関する時間的応答を解明する。また、光照射の有無が、脂質の蓄積・分解に与える影響を把握する。

【方法・結果】 下水処理場から採取した標準活性汚泥法二次処理水を培地として、30 L 容の装置を用いて土着藻類を回分培養した。二次処理水中 pH を指標として、装置に CO₂ を間欠添加した。下水処理水中栄養塩濃度、土着藻類中脂質含有量を継続的に測定した。また、回分培養の途中で、試薬の添加により窒素濃度を上昇させる実験も行った。結果として、窒素濃度の減少に応じて、土着藻類は明条件下で脂質を蓄積した（例：4 時間で窒素が 8.90 mg-N/L から 6.80 mg-N/L へ減少、脂質含有量は 6.63 %から 9.06 %へ増加）。一方で、暗条件下では、脂質含有量がやや低下した。また、窒素が枯渇した条件下に長期間土着藻類を曝しても、脂質含有量の向上は見込めないことが明らかとなった。窒素濃度の上昇に対して、明暗それぞれの条件下で脂質が分解する一方で、窒素濃度上昇から脂質分解が生じるまでの時間は、試薬を添加する前の下水処理水中窒素の残存状況で異なっていた。具体的には、窒素が残存している状況下で試薬を添加した場合、脂質の分解が生じるまでに約 1 日を要した。一方で、窒素が枯渇している状況で試薬を添加した場合、脂質は速やかに分解された（例：試薬添加後 6 時間で脂質含有量は 10.8 %から 9.40 %へ減少）。

キトサンを用いた三次元多孔質構造の 3D プリンティングとその応用

C-8

○本田尚之, 境慎司, 田谷正仁
(阪大・基工)

【目的】 キトサンは、高い生体適合性、生分解性を持つ特徴から、組織工学分野への応用について多くの検討が行われている(1)。また、バイオマテリアルから三次元構造体を作製する 3D バイオプリンティングも、組織工学分野で注目を集めている(2)。本研究では、キトサンをインクとして用いた 3D バイオプリンティングにより、細胞の増殖に適した多孔質な構造体を作製する方法の開発を目指した。

【方法・結果】 多孔質体を作製するために、キトサン溶液と気体で形成した泡を含むインクを用いて、3D プリンティングを行った。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を溶媒として、フェノール性水酸基導入キトサン 2.0 w/v%, 西洋わさび由来ペルオキシダーゼ 5 units/mL, Pluronic F-127 0.1 w/v% となる溶液を調製した。この溶液を、シリジポンプを用いて押し出し、圧力を制御した気体とマイクロ流体デバイス内を流通させることで、泡を含むインクを形成した。このインクを、18 ppm の過酸化水素蒸気を供給しながら吐出することで、キトサンに含まれるフェノール性水酸基の架橋反応を進行させ、ゲル構造物を作製した。共焦点顕微鏡での観察の結果、直径約 0.1 mm の空孔が体積の 66 %を占める、三次元多孔質構造のキトサンゲル構造物の作製に成功した。

【参考文献】

- (1) Croisier F. et al., European Polymer Journal, 49, 780-792 (2013).
- (2) Ibrahim T. et al., Biomaterials, 76, 321-343 (2016).

キトサンを含むバイオインクを用いた3Dプリンティング

○山本翔太, 境慎司, 田谷正仁
(阪大院・基工)

【目的】これまで我々は、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を触媒として用い、フェノール性水酸基 (Ph 基) 間の架橋反応によって形成されるヒドロゲルを、3D バイオプリンティングに応用可能であることを報告してきた [1]。本研究では、生体適合性と生分解性に優れており細胞培養基材としての有用性が報告されているキトサン [2] に Ph 基を導入し、3D プリンティングのバイオインクとして利用可能かどうか検討した。

【方法および結果】キトサンのアミノ基にプロピオン酸とラクトビオン酸を修飾し、中性で高い水溶性をもったキトサン Ph を作製した。当初の検討では、このキトサン Ph と HRP を 2 wt/v%, 5 units/ml で含む水溶液を調製し、インクとして H_2O_2 の蒸気下 (15 ppm) で、27 ゲージの針を装着した押出し式のプリンターを用いて造形を試みた。しかし、高い精度の造形が不可能であった。これは吐出時 (剪断速度が 200 s^{-1}) の粘度が 9 mPa s と低いことに起因すると考えられた。そこで、増粘剤としてキトサンナノファイバーを加えることを試みた。新たにキトサンナノファイバーを 1 wt/v% になるように加えたところ、吐出時の粘度が 100 mPa s となり、造形の精度が改善しバイオインクとしての利用可能性が示された。

【参考文献】

- [1] S Sakai et al., *Biofabrication* 10 (2018) 045007
- [2] F. Croisier et al. *European Polymer Journal* 49 (2013) 780–792

第4回日本生物工学会西日本支部講演会実行委員会

実行委員長：大城 隆（鳥取大院・工）

実行委員

総務：鈴木宏和（鳥取大院・工）

会計：原田尚志（鳥取大院・工）

受付・会場：有馬二朗（鳥取大・農）

岡本賢治（鳥取大院・工）

鈴木宏和（鳥取大院・工）

プログラム・収録：原田尚志（鳥取大院・工）

懇親会：岡本賢治（鳥取大院・工）

日本生物工学会西日本支部事務局

〒680-8552 烏取市湖山町南4-101

鳥取大学工学部内

支部ホームページ：https://www.sbj.or.jp/branch/branch_nishinihon.html