第69回
日本生物工学会大会

講演要旨集

会　期　2017年9月11日（月）～14日（木）

会　場　早稲田大学　大隈記念講堂（9月11日）
西早稲田キャンパス（9月12日～14日）

公益社団法人 日本生物工学会

第69回
日本生物工学会大会プログラム
（2017）

一般講演（特別口頭発表A・B，ポスター発表）・シンポジウム

会　期　2017年9月12日（火）～14日（木）
会　場　早稲田大学　西早稲田キャンパス（新宿区大久保3-4-1）

授賞式典・受賞講演

日　時　2017年9月11日（月）13：00～15：25
会　場　早稲田大学大隈記念講堂（新宿区戸塚町1-104）　大講堂（W会場）
（生物工学奨励賞・アジア若手賞・学生優秀賞の講演日程については大会日程表をご覧下さい）

公開シンポジウム

日　時　2017年9月11日（月）16：00～17：30
会　場　早稲田大学大隈記念講堂　大講堂（W会場）

懇 親 会

日　時　2017年9月11日（月）18：00～20：00
会　場　リーガロイヤルホテル東京（新宿区戸塚町1-104-19）ロイヤルホール

ランチョンセミナー

期　間　2017年9月12日（火）～14日（木）
会　場　早稲田大学　西早稲田キャンパス　52号館（E, G, H, I, J会場）

展 示 会

期　間　2017年9月12日（火）～14日（木）
会　場　早稲田大学　西早稲田キャンパス　63号館1階　情報ギャラリー，
ロームスクエア

生物工学若手研究者の集い（若手会）総会・交流会

日　時　2017年9月12日（火）18:00～20:00
会　場　早稲田大学　西早稲田キャンパス　56号館地下1階　理工カフェテリア

イブニングセッション

日　時　2017年9月13日（水）18:00～20:00
会　場　早稲田大学　西早稲田キャンパス　56号館地下1階　理工カフェテリア

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)

会場案内図…… (5)

実行委員会担当者表…… (8)

受賞者一覧…… (9)

一般講演（特別口頭発表A・B，ポスター発表）日程・講演番号表，講演番号の見方 … (10)

プログラム

第1日目　授賞式・受賞講演，公開シンポジウム …… (13)

第2日目　受賞講演，シンポジウム・招待講演，一般講演（特別口頭発表A，特別口頭発表B，ポスター発表），ランチョンセミナー　…… (14)

第3日目　受賞講演，シンポジウム，一般講演（特別口頭発表A，特別口頭発表B，ポスター発表），ランチョンセミナー，イブニングセッション　…… (39)

第4日目　シンポジウム，一般講演（特別口頭発表A，特別口頭発表B，ポスター発表），ランチョンセミナー …… (63)

要旨

第1日目　受賞講演 …… (87)

第2日目　受賞講演 …… (91)

シンポジウム・招待講演…… (93)

一般講演…… (114)

第3日目　受賞講演 …… (175)

シンポジウム…… (176)

一般講演…… (200)

第4日目　シンポジウム …… (263)

一般講演…… (272)

人名索引…… (331)

キーワード索引…… (347)

ランチョンセミナープログラム…… (361)

ランチョンセミナー要旨…… (362)

2017年8月30日（水）～11月7日（火）まで大会HP（http://www.sbj.or.jp/2017/abstract/）で講演要旨集E-PUB版のダウンロードが可能になります。

大会日程表

会場	9月11日（月）			
	午　前	昼	午　後	
	9:00-11:00	11:45-12:45	13:00-15:25	16:00-17:30	18:00-20:00
W会場（大隈記念講堂）			授賞式・受賞講演（生物工学賞，功績賞，技術賞）	公開シンポジウム	懇親会（リーガロイヤルホテル東京）

会場	9月12日（火）					
	午　前	昼	午　後			
	9:00-11:00	11:45-12:45	13:00-15:00	15:10-15:30	15:30-17:30/18:00	18:00-20:00
A会場（57号館2階）	[S] 集え！バイオインフォマティクスを利活用する生物工学若手研究者				[S] 生物工学若手研究者の集いシンポジウム－博士後期課程学生口頭発表コンペティション－	
B会場（57号館2階）	[S] 微生物は電気を作る，使う，盗む. その能力, 上手に使いませんか？			受賞講演（生物工学アジア若手賞）	[IS] Next Generation Enzyme Engineering -Tools for *in silico* Enzyme Discovery, Correct Folding and Their Fabrication- (～18:00)	
C会場（56号館1階）	[S] 健康とモノづくりへの腸内細菌活用の最前線 共催：バイオインダストリー協会新資源生物変換研究会，発酵と代謝研究会，アルコール・バイオマス研究会，グリーンバイオイノベーションフォーラム（GIF）				[S] 生命システムビッグデータと情報解析技術の融合による生物工学の新展開	
D会場（56号館1階）	[S] 合成生物の時代におけるロバストな物質生産と生物学的封じ込め			受賞講演（生物工学アジア若手賞）	[IS]Japan-Korea Joint Symposium "Development of Bio-device Based on Cell Engineering and Nano- and Micro-biotechnology for Medical Application" (～18:00)	
E会場（52号館1階）	特別口頭発表B1					
F会場（52号館1階）	特別口頭発表B2 *受賞者講演（飛翔賞）					
G会場（52号館2階）	特別口頭発表A1-1～4	[L] 東ソー株式会社		受賞講演（照井賞）	[S] 培養・計測技術の最前線【本部企画】	
H会場（52号館2階）	特別口頭発表A2-1～4	[L] アジレント・テクノロジー株式会社			[S] 微生物の「声」が聴きたくて…単細胞生物のコミュニケーションスキル	
I会場（52号館3階）	特別口頭発表A3-1～4	[L] タカラバイオ株式会社				
J会場（52号館3階）	特別口頭発表A4-1～4	[L] パラミロン研究会				
ポスター会場（63号館2階）	ポスター貼付け（9:00-11:45）	ポスター展示	ポスター発表	ポスター展示（～18:00）		
カフェテリア（56号館地下1階）						若手会総会・交流会

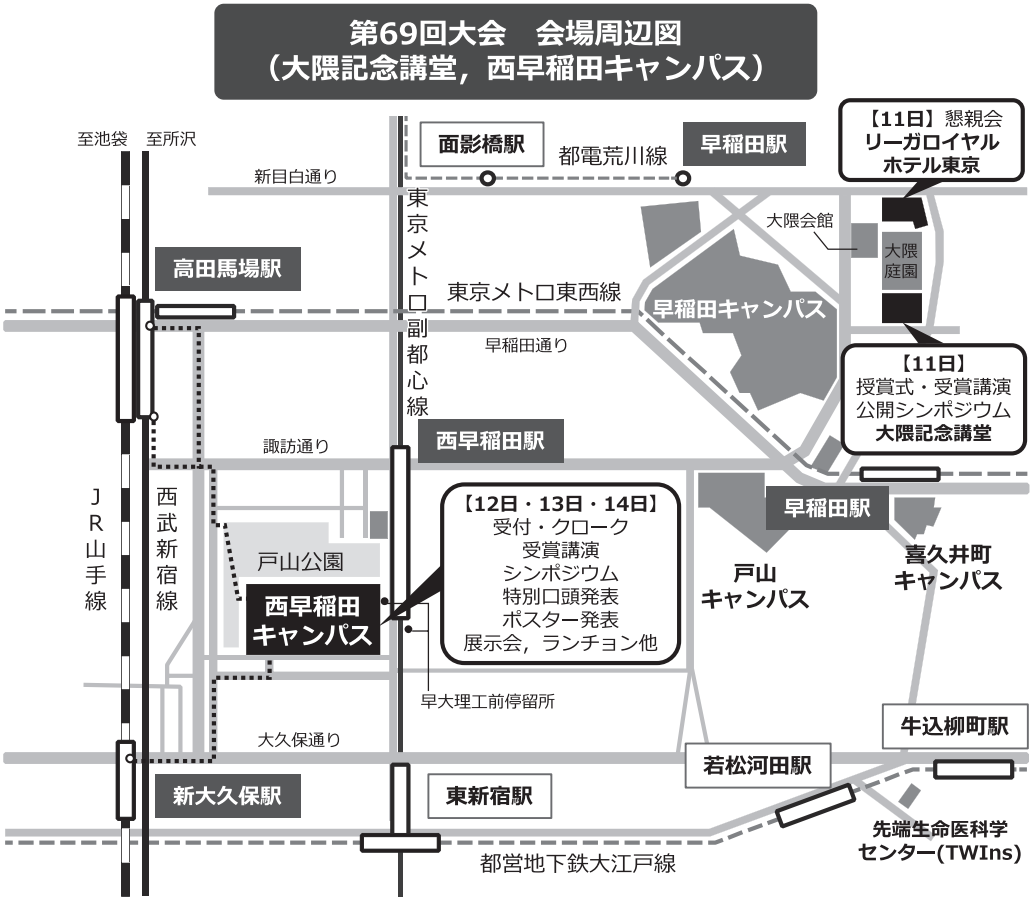
会場	9月13日（水）				
	午　前	昼	午　後		
	9:00-11:00	11:45-12:45	13:00-15:00	15:10-15:30	15:30-17:30	18:00-20:00
A会場（57号館2階）	[S] 設計生物学による組み合わせ：人工細胞から組織デバイスまで	代議員会 (11:40-12:45)		受賞講演（斎藤賞）	[IS] "Smart Cell Industry" A New Trend in Bioeconomy	
B会場（57号館2階）	[S] 発酵醸造微生物育種の新発想アプローチ				[S] 細菌からヒトにおける多彩な抗菌ペプチド：その作用機序，生体防御機能などを探る	
C会場（56号館1階）	[S] 国際展開する日本の生物工学～海外事業化研究の実例から～			受賞講演（江田賞）	[S] 醸造技術～もの造りの原点と将来【本部企画】	

会場	9月13日（水）					
	午　前	昼	午　後			
	9:00-11:00	11:45-12:45	13:00-15:00	15:10-15:30	15:30-17:30	18:00-20:00
D会場（56号館1階）	[S] 生合成再設計の深化で挑む複雑骨格機能分子の創出 共催：科研費新学術領域研究・生合成リデザイン				[S] 脳機能活性化や健康長寿の鍵となる機能性食品素材・農産物 共催：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」「次世代機能性農林水産物・食品の開発」，バイオインダストリー協会機能性食品研究会	
E会場（52号館1階）	特別口頭発表B3 *受賞者講演(飛翔賞)	[L]エッペンドルフ株式会社				
F会場（52号館1階）	特別口頭発表B4					
G会場（52号館2階）	特別口頭発表A5-1～4	[L]ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社			[S] 医薬品・化成品開発のためのインビトロ細胞培養技術開発の新展開	
H会場（52号館2階）	特別口頭発表A6-1～4	[L]日本ウォーターズ株式会社			[S]未培養微生物（微生物ダークマター）の培養，解析，利用に関する研究開発の最前線と展望	
I会場（52号館3階）	特別口頭発表A7-1～4	[L]株式会社島津製作所				
J会場（52号館3階）	特別口頭発表A8-1～4	[L]サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社				
ポスター会場（63号館2階）	ポスター貼付け（9:00-11:45）	ポスター展示	ポスター発表	ポスター展示（～18:00）		
カフェテリア（56号館地下1階）						イブニングセッション

会場	9月14日（木）		
	午　前	昼	午　後
	9:00-11:00	11:45-12:45	13:00-15:00
A会場（57号館2階）	[S] 醗酵生産技術の温故知新～その歩みと新展開		
B会場（57号館2階）	[S] 地球の未来資源に貢献する生物工学【本部企画】		
C会場（56号館1階）	[S] 動物・臨床現場から学ぶ成育医療研究 ～検査から診断・治療への応用～		
D会場（56号館1階）	[S] 若手研究者が切り拓く，1細胞解析技術の最先端		
E会場（52号館1階）	特別口頭発表B5 *受賞者講演(飛翔賞)		
F会場（52号館1階）	特別口頭発表B6 *受賞者講演(飛翔賞)		
G会場（52号館2階）	特別口頭発表A9-1～4		
H会場（52号館2階）	特別口頭発表A10-1～4	[L]三洋貿易株式会社	
I会場（52号館3階）	特別口頭発表A11-1～4	[L]公益財団法人かずさDNA研究所	
J会場（52号館3階）	特別口頭発表A12-1～3	[L]高機能遺伝子デザイン技術研究組合	
ポスター会場（63号館2階）	ポスター貼付け（9:00-11:45）	ポスター展示	ポスター発表

S：シンポジウム　IS：国際シンポジウム　L：ランチョンセミナー　*「飛翔賞」受賞者による講演は特別口頭発表Bの中で行います．

会場への交通案内



早稲田大学　大隈記念講堂，リーガロイヤルホテル東京へのアクセス

【JR・西武新宿線】　高田馬場駅から徒歩…20分

【地下鉄東京メトロ】東西線　早稲田駅から徒歩…5分

副都心線　西早稲田駅から徒歩…17分

【都バス】学02（学バス）高田馬場駅～早大正門バス停，（都バス）早稲田バス停

【都電】荒川線　早稲田駅から徒歩…5分

早稲田大学　西早稲田キャンパスへのアクセス

【JR・西武新宿線】　高田馬場駅から徒歩…15分

【地下鉄東京メトロ】副都心線　西早稲田駅　直結

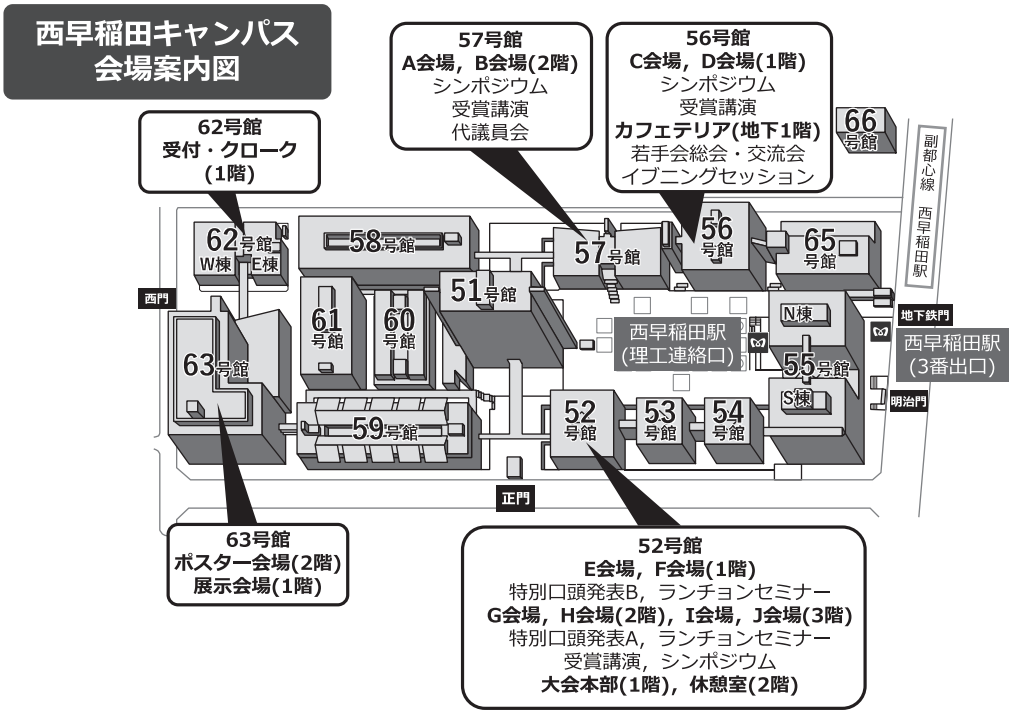
東西線　早稲田駅から徒歩…22分

【都バス】新宿駅西口～早稲田，早大理工前バス停

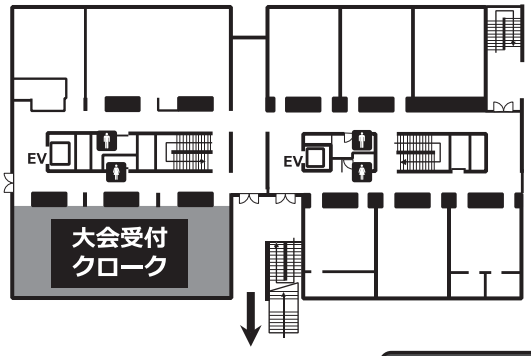
高田馬場駅～九段下，早大理工前バス停

会場案内

西早稲田キャンパス 会場案内図

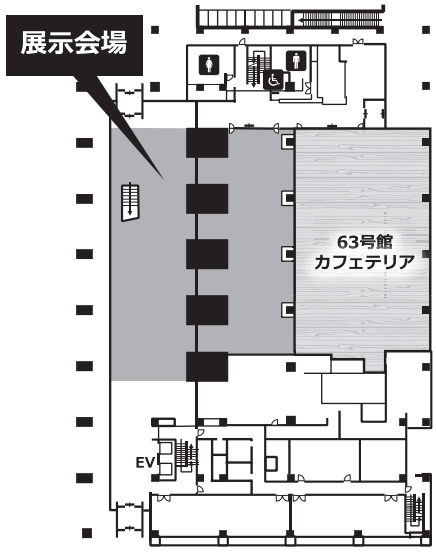


62号館-1F

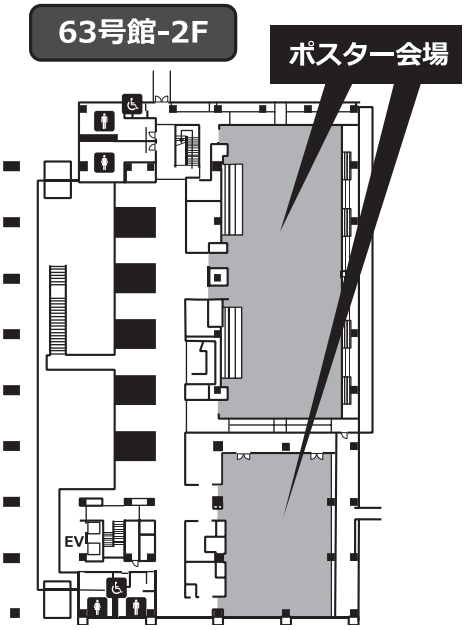


63号館へ

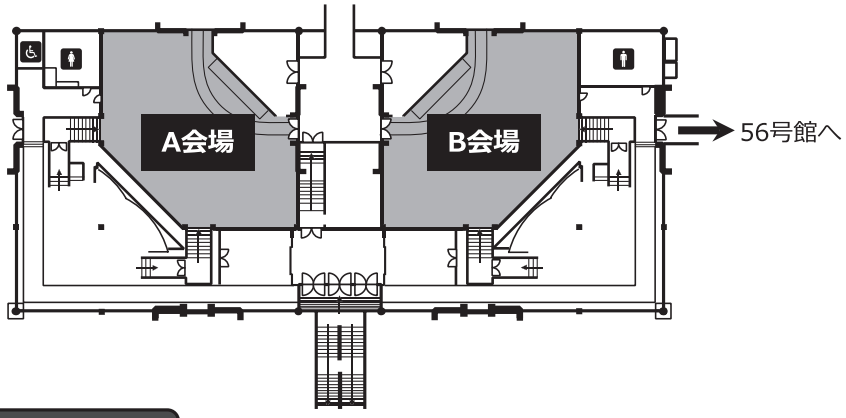
63号館-1F



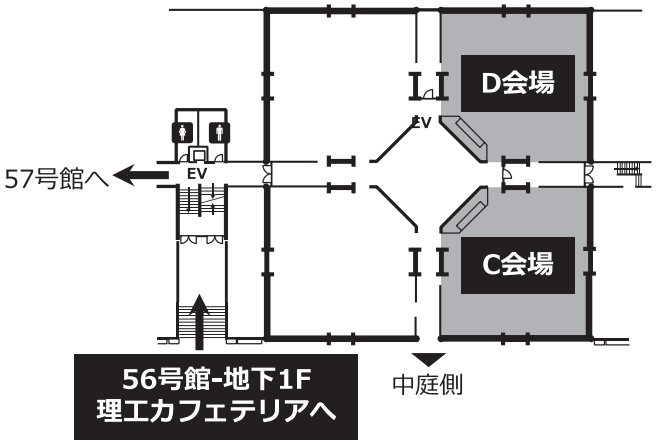
63号館-2F



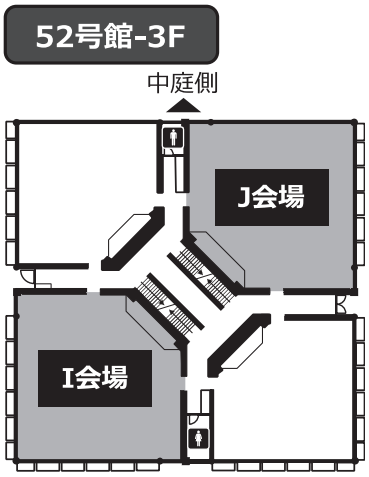
57号館-2F



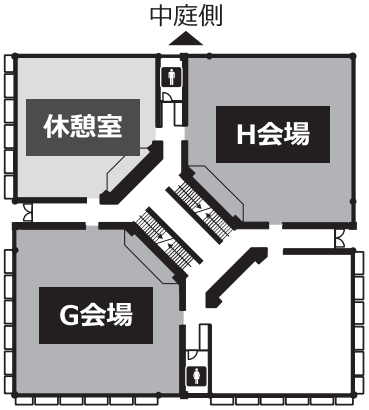
56号館-1F



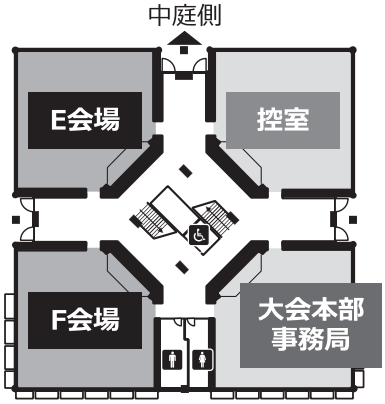
52号館-3F



52号館-2F



52号館-1F



第69回日本生物工学会大会（2017）

実行委員会・業務分担（○：責任者）

実行委員長	竹山 春子
副実行委員長	池田 宰
総務	○石井 正治・常田 聡・細川 正人
会計	○新井 博之・桐村 光太郎
広報	○鈴木 市郎・森田 友岳
会場・会議室・展示・ポスター	○上田 宏・北本 宏子・寺田 昭彦・石井 正治・常田 聡・細川 正人
受付・クローク	○大河内 美奈・黒澤 尋・桐村 光太郎・木賀 大介
プログラム・特別口頭発表A	○諸星 知広・浜本 牧子・前田 理久・上野 嘉之・中島 春紫・川崎 信治・川崎 寿・片山 葉子・西原 宏史・橋本 義輝・杉浦 慎治
シンポジウム	○青柳 秀紀・池田 宰・伊藤 久生・荒 勝俊・貝沼 章子
トピックス集・特別口頭発表B	○田中 剛・大槻 隆司・鈴木 市郎・渡辺 文昭・堀 知行・春田 伸・宮崎 健太郎・伊藤 隆・今井 泰彦・河原 正浩
イブニングセッション	○大槻 隆司・鈴木 市郎
授賞式	○平沢 敬・木賀 大介・竹山 春子
懇親会	○中川 洋史・桐村 光太郎・石井 正治
若手交流会	○柘植 丈治・細川 正人・竹山 春子
ランチョンセミナー	○徳田 宏晴・中村 聡・瀧川 義澄・木賀 大介・細川 正人・竹山 春子
顧問	養王田 正文

日本生物工学会　2017年度　受賞者

去る5月25日，理事会が開催され，本年度の受賞者が決定しましたのでお知らせ申し上げます．

■第36回　生物工学賞　田谷　正仁（大阪大学大学院基礎工学研究科・教授）
「構造体形成を伴う動植物細胞の培養と利用に関する生物工学研究」

■第11回　生物工学功績賞　髙木　博史（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授）
「微生物におけるアミノ酸の代謝制御機構・生理機能の解析とその応用」

■第11回　生物工学功労賞
該当者なし

■第50回　生物工学奨励賞（江田賞）　渡部　　潤（ヤマサ醤油（株）醤油研究室・室長代理）
「醤油酵母における香気成分の生成機構に関する研究」

■第53回　生物工学奨励賞（斎藤賞）　古賀　雄一（大阪大学大学院工学研究科・准教授）
「超好熱菌由来酵素の構造機能相関研究とその応用」

■第40回　生物工学奨励賞（照井賞）　加藤　竜司（名古屋大学大学院創薬科学研究科・准教授）
「画像情報処理を用いた再生医療用製品製造工程における非破壊的品質管理技術の開発」

■第26回　生物工学技術賞　宮本　浩邦[1,2,3,4]**・児玉　浩明**[1,3]**・宮本　　久**[1,5]**・酒井　謙二**[6]**・田代　幸寛**[6]
（[1]（株）サーマス，[2]日環科学（株），[3]千葉大学，[4]理化学研究所，[5]（株）三六九，[6]九州大学）
「好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの高機能発酵製品の製造と学術的解明」

■第14回　生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）　John Chi-Wei Lan
（Associate Professor, Yuan Ze University, Taiwan）
「Aerobic utilization of crude glycerol by recombinant *Escherichia coli* for simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate and bioethanol」

■第14回　生物工学アジア若手賞（Young Asian Biotechnologist Prize）　Tau Chuan Ling
（Professor, University of Malaya, Malaysia）
「Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems」

■第6回　生物工学アジア若手研究奨励賞（The DaSilva Award）　Fithriyah Sjatha
（Assistant Professor, Universitas Indonesia, Indonesia）
「Production of resuscitation-promoting factor B of *Mycobacterium tuberculosis* using various expression systems and their immunogenetical study for vaccine platform」

■第25回　生物工学論文賞

1）**松本　大亮**[1]*・**山岸　彩奈**[2]・**齋藤　　恵**[1]**・**Ramachandra Rao Sathuluri**[2]***・**Yaron R. Silberberg**[2]****・**岩田　　太**[3]・**小林　　健**[4]・**中村　　史**[1,2]
（[1]東京農工大学，[2]産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門，[3]静岡大学，[4]産業技術総合研究所集積マイクロシステム研究センター，*現，東京医科歯科大学，**現，埼玉医科大学病院，***現，National Institute of Health and Family Welfare, India，****現，東京大学）
Mechanoporation of living cells for delivery of macromolecules using nanoneedle array

2）**Mohamed A. A. Abdelhamid**[1,2]*・**池田　　丈**[1]・**本村　　圭**[1]・**田中　達也**[1]・**石田　丈典**[1]・**廣田　隆一**[1]・**黒田　章夫**[1]
（[1]広島大学，[2]Minia University, Egypt，*現，Korea University, Korea）
Application of volcanic ash particles for protein affinity purification with a minimized silica-binding tag

3）**菊川　寛史**[1]*・**櫻谷　英治**[1,2]・**安藤　晃規**[1]・**奥田　知生**[1]・**清水　　昌**[1,3]・**小川　　順**[1]
（[1]京都大学，[2]徳島大学，[3]京都学園大学，*現，岐阜大学）
Microbial production of dihomo-γ-linolenic acid by *Δ5-desaturase* gene-disruptants of *Mortierella alpina* 1S-4

4）**谷口　正之**[1]・**落合　秋人**[1]・**福田　　駿**[1]・**佐藤　哲平**[1]・**斎藤　英一**[2]・**加藤　哲男**[3]・**田中　孝明**[1]
（[1]新潟大学，[2]新潟工科大学，[3]東京歯科大学）
AmyI-1–18, a cationic α-helical antimicrobial octadecapeptide derived from α-amylase in rice, inhibits the translation and folding processes in a protein synthesis system

5）**Ming Gao**[1,2]**・田代　幸寛**[1]**・Qunhui Wang**[2]**・酒井　謙二**[1]**・園元　謙二**[1]
（[1]九州大学，[2]University of Science and Technology Beijing, China）
High acetone–butanol–ethanol production in pH-stat co-feeding of acetate and glucose

6）**董　　金華***・**鄭　　熙陳****・**上田　　宏**（東京工業大学，*現，Weifang Medical University，**現，Dana-Farber Cancer Institute）
Preparation of Quenchbodies by protein transamination reaction

7）**山野　範子**[1]*・**髙橋　　舞**[1]**・**Seyed Mohammad Ali Haghparast**[2]***・**鬼塚　正義**[1]・**隈元　信貴**[1]****・**Jana Frank**[1]*****・**大政　健史**[1,2]
（[1]徳島大学，[2]大阪大学，*現，次世代バイオ医薬品製造技術研究組合/大阪大学，**現，大塚製薬株式会社，***現，京都大学，****現，沢井製薬株式会社，*****現，大阪大学）
Increased recombinant protein production owing to expanded opportunities for vector integration in high chromosome number Chinese hamster ovary cells

■第6回　生物工学学生優秀賞（飛翔賞）

1）**林　　祥平**（北海道大学大学院総合化学院総合化学専攻）
「多価不飽和脂肪酸合成酵素の生産性及び生産物制御機構の解明」

2）**袴田　一晃**（東京農工大学大学院工学府生命工学専攻）
「熱帯熱マラリア原虫*Plasmodium falciparum*由来EXP2の獲得と特性解析」

3）**小崎　一功**（名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻）
「ペプチドアレイを利用した細胞内機能性ペプチドの高活性化」

4）**中野　洋介**（大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻）
「D-アミノ酸の定量分析に資する高感度ハイスループット分析法の開発」

5）**李　　秋実**（崇城大学大学院工学研究科応用微生物工学専攻）
「*Aspergillus*属糸状菌のガラクトマンナン生合成に関与するガラクトフラノース転移酵素の同定および機能解析」

一般講演（特別口頭発表A・B，ポスター発表）日程・講演番号表

一般講演発表日　：9月12日（火）～14日（木）
一般講演発表形式　：特別口頭発表A（ショートプレゼンテーション）または
特別口頭発表B（大会トピックス講演＋飛翔賞受賞者講演）
＋ポスター発表のハイブリッド形式
特別口頭発表A会場　：G・H会場（西早稲田キャンパス　52号館2階）
I・J会場（西早稲田キャンパス　52号館3階）
発表時間，発表様式　：9：00～11：00（各演題発表時間は登壇時間含めて2分30秒），
書画カメラ使用によるショートプレゼンテーション
特別口頭発表B会場　：E・F会場（西早稲田キャンパス　52号館1階）
発表時間，発表様式　：9：00～11：00（各演題発表時間15分・討論5分），
PC＋プロジェクター使用によるプレゼンテーション
ポスター掲示時間　：各演題掲示時間は9月12日（火）・13日（水）は9：00～18：00，
14日（木）は9：00～15：00まで
ポスター発表会場　：ポスター会場 (西早稲田キャンパス　63号館2階)
ポスター発表・討論時間　：奇数番号　13：00～14：00
偶数番号　14：00～15：00

特別口頭発表A（一般講演　ショートプレゼンテーション）スケジュール一覧

講演番号は同日の13:00～15:00に実施するポスター発表での講演番号と共通です.
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨をご覧ください.

9月12日(火)			
G会場 (52号館2階)	H会場 (52号館2階)	I会場 (52号館3階)	J会場 (52号館3階)
座長:浜本 牧子, 川崎 信治	座長:田中 剛, 大槻 隆司	座長:今井 泰彦, 春田 伸	座長:渡辺 文昭, 宮崎 健太郎
セッション A1-1 (9:00～9:30)	セッション A2-1 (9:00～9:30)	セッション A3-1 (9:00～9:30)	セッション A4-1 (9:00～9:30)
【遺伝子工学】	【タンパク質工学】	【醸造学, 醸造工学】 【食品科学, 食品工学】	【生物化学工学】
2P-G002, 2P-G003, 2P-G006, 2P-G008, 2P-G009, 2P-G010, 2P-G011, 2P-G012, 2P-G013, 2P-G014, 2P-G015, 2P-G016	2P-H058, 2P-H060, 2P-H061, 2P-H062, 2P-H063, 2P-H064, 2P-H066, 2P-H067, 2P-H070, 2P-H071, 2P-H073, 2P-H075	2P-I115, 2P-I116, 2P-I117, 2P-I118, 2P-I119, 2P-I122, 2P-I123, 2P-I124, 2P-I125, 2P-I130, 2P-I132, 2P-I133	2P-J168, 2P-J169, 2P-J170, 2P-J171, 2P-J172, 2P-J173, 2P-J175, 2P-J176, 2P-J177, 2P-J178, 2P-J179, 2P-J180
セッション A1-2 (9:30～10:00)	セッション A2-2 (9:30～10:00)	セッション A3-2 (9:30～10:00)	セッション A4-2 (9:30～10:00)
【遺伝子工学】	【発酵生理学, 発酵工学】	【食品科学, 食品工学】 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】	【生物化学工学】 【バイオプロセス】
2P-G017, 2P-G018, 2P-G019, 2P-G020, 2P-G022, 2P-G023, 2P-G024, 2P-G025, 2P-G027, 2P-G028, 2P-G030, 2P-G031	2P-H076, 2P-H077, 2P-H078, 2P-H079, 2P-H080, 2P-H081, 2P-H083, 2P-H086, 2P-H087, 2P-H089, 2P-H090, 2P-H091	2P-I134, 2P-I135, 2P-I136, 2P-I138, 2P-I139, 2P-I140, 2P-I143, 2P-I144, 2P-I145, 2P-I146, 2P-I147, 2P-I148	2P-J181, 2P-J183, 2P-J186, 2P-J189, 2P-J190, 2P-J191, 2P-J193, 2P-J194, 2P-J195, 2P-J196, 2P-J197, 2P-J198
セッション A1-3 (10:00～10:30)	セッション A2-3 (10:00～10:30)	セッション A3-3 (10:00～10:30)	セッション A4-3 (10:00～10:30)
【遺伝子工学】 【酵素学, 酵素工学】	【発酵生理学, 発酵工学】 【代謝工学】	【バイオマス, 資源, エネルギー工学】	【バイオプロセス】 【生体医用工学】 【バイオセンシング, 分析化学】
2P-G034, 2P-G036, 2P-G037, 2P-G038, 2P-G039, 2P-G040, 2P-G041, 2P-G043, 2P-G044, 2P-G045, 2P-G046, 2P-G049	2P-H092, 2P-H093, 2P-H094, 2P-H096, 2P-H097, 2P-H098, 2P-H099, 2P-H100, 2P-H102, 2P-H103, 2P-H104, 2P-H105	2P-I149, 2P-I150, 2P-I151, 2P-I152, 2P-I153, 2P-I154, 2P-I155, 2P-I158, 2P-I159, 2P-I160, 2P-I162, 2P-I163	2P-J199, 2P-J200, 2P-J201, 2P-J203, 2P-J205, 2P-J206, 2P-J207, 2P-J208, 2P-J209, 2P-J219, 2P-J221, 2P-J222
セッション A1-4 (10:30～10:48)	セッション A2-4 (10:30～10:50)	セッション A3-4 (10:30～10:35)	セッション A4-4 (10:30～10:45)
【酵素学, 酵素工学】	【代謝工学】	【バイオマス, 資源, エネルギー工学】	【バイオセンシング, 分析化学】
2P-G050, 2P-G051, 2P-G052, 2P-G053, 2P-G055, 2P-G056, 2P-G057	2P-H106, 2P-H107, 2P-H108, 2P-H109, 2P-H110, 2P-H111, 2P-H112, 2P-H113	2P-I165, 2P-I166	2P-J224, 2P-J226, 2P-J227, 2P-J229, 2P-J230, 2P-J231

9月13日(水)			
G会場 (52号館2階)	H会場 (52号館2階)	I会場 (52号館3階)	J会場 (52号館3階)
座長:伊藤 隆, 川崎 寿	座長:尾高 雅文, 中川 洋史	座長:上野 嘉之, 鈴木 市郎	座長:杉浦 慎治, 片山 葉子
セッション A5-1 (9:00～9:30)	セッション A6-1 (9:00～9:30)	セッション A7-1 (9:00～9:30)	セッション A8-1 (9:00～9:30)
【遺伝子工学】	【タンパク質工学】 【発酵生理学, 発酵工学】	【環境浄化, 修復, 保全技術】 【環境工学, 廃水処理技術】	【培養工学】 【セル＆ティッシュエンジニアリング】
3P-G002, 3P-G003, 3P-G004, 3P-G006, 3P-G007, 3P-G008, 3P-G009, 3P-G010, 3P-G012, 3P-G015, 3P-G016, 3P-G017	3P-H060, 3P-H061, 3P-H062, 3P-H063, 3P-H064, 3P-H066, 3P-H067, 3P-H068, 3P-H070, 3P-H071, 3P-H073, 3P-H074	3P-I118, 3P-I119, 3P-I120, 3P-I121, 3P-I122, 3P-I123, 3P-I125, 3P-I126, 3P-I128, 3P-I129, 3P-I130, 3P-I132	3P-J185, 3P-J186, 3P-J188, 3P-J189, 3P-J190, 3P-J193, 3P-J194, 3P-J195, 3P-J196, 3P-J197, 3P-J199, 3P-J200

セッション A5-2 (9:30～10:00)	セッション A6-2 (9:30～10:00)	セッション A7-2 (9:30～10:00)	セッション A8-2 (9:30～10:00)
【遺伝子工学】 【酵素学, 酵素工学】	【発酵生理学, 発酵工学】 【代謝工学】	【環境工学, 廃水処理技術】 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】	【セル＆ティッシュエンジニアリング】 【システムバイオロジー】
3P-G018, 3P-G020, 3P-G021, 3P-G023, 3P-G024, 3P-G025, 3P-G026, 3P-G027, 3P-G028, 3P-G030, 3P-G031, 3P-G032	3P-H077, 3P-H078, 3P-H079, 3P-H080, 3P-H081, 3P-H082, 3P-H083, 3P-H084, 3P-H085, 3P-H086, 3P-H087, 3P-H088	3P-I133, 3P-I136, 3P-I137, 3P-I138, 3P-I139, 3P-I141, 3P-I143, 3P-I145, 3P-I146, 3P-I148, 3P-I149, 3P-I150	3P-J201, 3P-J202, 3P-J204, 3P-J205, 3P-J206, 3P-J207, 3P-J208, 3P-J209, 3P-J210, 3P-J211, 3P-J212, 3P-J213
セッション A5-3 (10:00～10:30)	セッション A6-3 (10:00～10:30)	セッション A7-3 (10:00～10:30)	セッション A8-3 (10:00～10:30)
【酵素学, 酵素工学】 【タンパク質工学】	【代謝工学】【醸造学, 醸造工学】 【食品科学, 食品工学】	【バイオマス, 資源, エネルギー工学】 【生物化学工学】	【システムバイオロジー】 【バイオセンシング, 分析化学】
3P-G035, 3P-G036, 3P-G037, 3P-G038, 3P-G039, 3P-G040, 3P-G041, 3P-G042, 3P-G043, 3P-G044, 3P-G047, 3P-G049	3P-H089, 3P-H091, 3P-H094, 3P-H095, 3P-H096, 3P-H097, 3P-H098, 3P-H099, 3P-H102, 3P-H104, 3P-H107, 3P-H108	3P-I151, 3P-I152, 3P-I154, 3P-I156, 3P-I157, 3P-I158, 3P-I159, 3P-I161, 3P-I164, 3P-I165, 3P-I171, 3P-I172	3P-J214, 3P-J215, 3P-J216, 3P-J217, 3P-J220, 3P-J221, 3P-J222, 3P-J223, 3P-J224, 3P-J225, 3P-J226, 3P-J227
セッション A5-4 (10:30～10:53)	セッション A6-4 (10:30～10:48)	セッション A7-4 (10:30～10:55)	セッション A8-4 (10:30～10:53)
【タンパク質工学】	【食品科学, 食品工学】	【生物化学工学】 【培養工学】	【バイオセンシング, 分析化学】 【生合成, 天然物化学】
3P-G050, 3P-G051, 3P-G052, 3P-G053, 3P-G054, 3P-G055, 3P-G056, 3P-G058, 3P-G059	3P-H111, 3P-H112, 3P-H113, 3P-H114, 3P-H115, 3P-H116, 3P-H117	3P-I173, 3P-I174, 3P-I175, 3P-I176, 3P-I177, 3P-I178, 3P-I179, 3P-I182, 3P-I183, 3P-I184	3P-J228, 3P-J229, 3P-J230, 3P-J231, 3P-J232, 3P-J233, 3P-J234, 3P-J235, 3P-J236

9月14日(木)			
G会場 (52号館2階)	H会場 (52号館2階)	I会場 (52号館3階)	J会場 (52号館3階)
座長:中島 春紫, 加藤 太一郎	座長:前田 理久, 西原 宏史	座長:堀 知行, 河原 正浩	座長:諸星 知広
セッション A9-1 (9:00～9:30)	セッション A10-1 (9:00～9:30)	セッション A11-1 (9:00～9:30)	セッション A12-1 (9:00～9:30)
【分類, 系統, 遺伝学】 【酵素学, 酵素工学】	【オミクス解析】 【醸造学, 醸造工学】	【環境工学, 廃水処理技術】 【バイオマス, 資源, エネルギー工学】	【生体情報工学, バイオインフォマティクス】 【センサー, 計測工学】 【生合成, 天然物化学】
4P-G001, 4P-G002, 4P-G005, 4P-G006, 4P-G007, 4P-G008, 4P-G009, 4P-G010, 4P-G011, 4P-G012, 4P-G016, 4P-G018	4P-H070, 4P-H072, 4P-H074, 4P-H075, 4P-H076, 4P-H078, 4P-H079, 4P-H080, 4P-H082, 4P-H086, 4P-H087, 4P-H088	4P-I126, 4P-I128, 4P-I129, 4P-I130, 4P-I131, 4P-I132, 4P-I133, 4P-I137, 4P-I139, 4P-I140, 4P-I141, 4P-I144	4P-J184, 4P-J186, 4P-J187, 4P-J188, 4P-J189, 4P-J190, 4P-J191, 4P-J192, 4P-J193, 4P-J194, 4P-J195, 4P-J197
セッション A9-2 (9:30～10:00)	セッション A10-2 (9:30～10:00)	セッション A11-2 (9:30～10:00)	セッション A12-2 (9:30～10:00)
【酵素学, 酵素工学】 【抗体工学】	【醸造学, 醸造工学】 【環境浄化, 修復, 保全技術】	【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】	【生合成, 天然物化学】 【有機化学, 高分子化学】【核酸工学】 【ペプチド工学】【脂質工学】
4P-G021, 4P-G024, 4P-G025, 4P-G026, 4P-G029, 4P-G030, 4P-G032, 4P-G034, 4P-G035, 4P-G036, 4P-G037, 4P-G038	4P-H089, 4P-H090, 4P-H091, 4P-H092, 4P-H093, 4P-H094, 4P-H095, 4P-H096, 4P-H097, 4P-H098, 4P-H100, 4P-H101	4P-I145, 4P-I146, 4P-I147, 4P-I149, 4P-I150, 4P-I151, 4P-I152, 4P-I153, 4P-I154, 4P-I156, 4P-I157, 4P-I159	4P-J199, 4P-J200, 4P-J201, 4P-J203, 4P-J209, 4P-J210, 4P-J211, 4P-J212, 4P-J214, 4P-J215, 4P-J219, 4P-J221
セッション A9-3 (10:00～10:30)	セッション A10-3 (10:00～10:30)	セッション A11-3 (10:00～10:30)	セッション A12-3 (10:00～10:15)
【抗体工学】 【代謝工学】	【環境浄化, 修復, 保全技術】 【環境工学, 廃水処理技術】	【植物細胞工学, 組織培養, 育種工学】 【セル＆ティッシュエンジニアリング】	【糖鎖工学】
4P-G040, 4P-G042, 4P-G044, 4P-G047, 4P-G050, 4P-G051, 4P-G053, 4P-G054, 4P-G056, 4P-G057, 4P-G058, 4P-G060	4P-H102, 4P-H105, 4P-H107, 4P-H109, 4P-H110, 4P-H111, 4P-H112, 4P-H113, 4P-H114, 4P-H115, 4P-H116, 4P-H117	4P-I163, 4P-I164, 4P-I165, 4P-I166, 4P-I167, 4P-I168, 4P-I169, 4P-I171, 4P-I172, 4P-I173, 4P-I174, 4P-I176	4P-J223, 4P-J224, 4P-J225, 4P-J226, 4P-J227, 4P-J229
セッション A9-4 (10:30～10:48)	セッション A10-4 (10:30～10:48)	セッション A11-4 (10:30～10:40)	
【代謝工学】	【環境工学, 廃水処理技術】	【セル＆ティッシュエンジニアリング】	
4P-G061, 4P-G062, 4P-G064, 4P-G065, 4P-G067, 4P-G068, 4P-G069	4P-H118, 4P-H119, 4P-H121, 4P-H122, 4P-H123, 4P-H124, 4P-H125	4P-I177, 4P-I178, 4P-I179, 4P-I180	

特別口頭発表B（大会トピックス講演および飛翔賞受賞者講演）スケジュール一覧

講演番号は同日の13:00～15:00に実施するポスター発表での講演番号と共通です.
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨および別冊の大会トピックス集をご覧ください.
＊2A-Fa01は受賞者講演のみとなります(ポスター発表はありません). 講演要旨については12日の受賞講演要旨をご覧ください.

日	9月12日(火)		9月13日(水)		9月14日(木)	
会場	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)
	特別口頭発表 B1	特別口頭発表 B2	特別口頭発表 B3	特別口頭発表 B4	特別口頭発表 B5	特別口頭発表 B6
座長	中村 史, 寺田 昭彦	鈴木 市郎, 東田 英毅	吉野 知子, 斎木 祐子	大槻 隆司, 阿部 克也	田中 剛, 藤田 聡史	松村 洋寿, 高橋 寿洋
	【1. 遺伝学, 分子生物学および遺伝子工学】	【4. 醸造・食品工学】	【1. 遺伝学, 分子生物学および遺伝子工学】	【4. 醸造・食品工学】	【2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学】	【8. 動物バイオテクノロジー】
9:00	2P-E007	2P-F114	3P-E022	3P-F109	4P-E017	4P-F181
			【2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学】	【5. 環境バイオテクノロジー】		【9. バイオ情報】
9:20	2P-E035	2P-F131	3P-E045	3P-F131	4P-E041	4P-F183

日	9月12日(火)		9月13日(水)		9月14日(木)	
会場	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)	E会場 (52号館1階)	F会場 (52号館1階)
	【2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学】	【5. 環境バイオテクノロジー】	【2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学】	【5. 環境バイオテクノロジー】	【3. 代謝生理学・発酵生産】	【11. 生体関連化学】
9:40	2P-E042	2P-F167	3P-E057	3P-F147	4P-E083	4P-F198
		【6. 生物化学工学】	【3. 代謝生理学・発酵生産】	【6. 生物化学工学】	【5. 環境バイオテクノロジー】	【12. 生体分子工学】
10:00	2P-E065	2P-F174	3P-E069	3P-F170	4P-E143	4P-F216
	【3. 代謝生理学・発酵生産】	【10. 分析計測化学】			【7. 植物バイオテクノロジー】	【飛翔賞】
10:20	2P-E082	2P-F228	3P-E092	3P-F181	4P-E161	4P-F202
		【飛翔賞】	【飛翔賞】	【8. 動物バイオテクノロジー】	【飛翔賞】	【飛翔賞】
10:40	2P-E101	*2A-Fa01	3P-E014	3P-F203	4P-E084	4P-F213

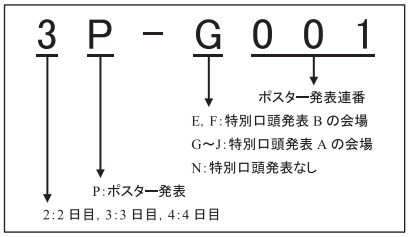
ポスター発表（一般講演）スケジュール一覧

講演要旨については各講演番号の一般講演要旨をご覧ください.

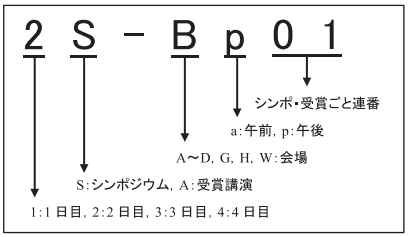
分野	Session	9月12日(火)	9月13日(水)	9月14日(木)
1. 遺伝学, 分子生物学および遺伝子工学	1. Genetics, Molecular, Biology, and Gene engineering			
1a 分類, 系統, 遺伝学	1a Taxonomy, phylogenetics			4P-G001～G007
1b 遺伝子工学	1b Genetic engineering	2P-N001～E035	3P-N001～G026	
2. 酵素学, タンパク質工学および酵素工学	2. Enzymology, Protein engineering, and Enzyme technology			
2a 酵素学, 酵素工学	2a Enzymology, enzyme	2P-G036～G057	3P-G027～G047	4P-G008～N033
2b タンパク質工学	2b Proteins	2P-H058～H075	3P-N048～H063	
2c 抗体工学	2c Antibody engineering			4P-G034～N049
3. 代謝生理学・発酵生産	3. Metabolism and Fermentation production			
3a 発酵生理学, 発酵工学	3a Fermentation physiology, fermentation technology	2P-H076～N095	3P-H064～H081	
3b 代謝工学	3b Metabolic engineering	2P-H096～H113	3P-H082～H097	4P-G050～G069
3c オミクス解析	3c Omics technology			4P-H070～E084
4. 醸造・食品工学	4. Brewing and Food technology			
4a 醸造学, 醸造工学	4a Brewing, brewing technology	2P-F114～I123	3P-H098～H107	4P-N085～H098
4b 食品科学, 食品工学	4b Food science, food technology	2P-I124～I143	3P-H108～H117	
5. 環境バイオテクノロジー	5. Environmental biotechnology			
5a 環境浄化, 修復, 保全技術	5a Bioremediation		3P-I118～I130	4P-N099～H115
5b 環境工学, 廃水処理技術	5b Environmental technology, wastewater treatment		3P-F131～N140	4P-H116～I128
5c バイオマス, 資源, エネルギー工学	5c Biomass, bioresource and energy engineering	2P-I144～F167	3P-I141～I159	4P-I129～I154
6. 生物化学工学	6. Biochemical engineering			
6a 生物化学工学	6a Biochemical engineering	2P-J168～J191	3P-N160～I177	
6b 培養工学	6b Cell culture engineering		3P-I178～J197	
6c バイオプロセス	6c Bioprocess engineering	2P-N192～J203		
7. 植物バイオテクノロジー	7. Plant cell technology			
7a 植物細胞工学, 組織培養, 育種工学	7a Plant cell / tissue engineering			4P-N155～I163
8. 動物バイオテクノロジー	8. Animal cell technology			
8a 生体医用工学	8a Biomedical engineering	2P-N204～N220		
8b セル＆ティッシュエンジニアリング	8b Cell and tissue engineering		3P-N198～J212	4P-I164～N182
9. バイオ情報	9. Bioinformation technology			
9a 生体情報工学, バイオインフォマティクス	9a Bioinformatics			4P-F183～J192
9b システムバイオロジー	9b Systems biology		3P-J213～N218	
10. 分析計測化学	10. Analytical chemistry and Measuring device			
10a バイオセンシング, 分析化学	10a Biosensing and analytical chemistry	2P-J221～J231	3P-N219～J229	
10b センサー, 計測工学	10b Sensors and monitoring devices			4P-J193～J195
11. 生体関連化学	11. Biofunctional chemistry			
11a 生合成, 天然物化学	11a Biosynthesis, natural organic chemistry		3P-J230～J236	4P-N196～N206
11b 有機化学, 高分子化学	11b Organic chemistry, polymer chemistry			4P-N207～J209
12. 生体分子工学	12. Biomolecular engineering			
12a 核酸工学	12a Nucleic acid engineering			4P-J210～J212
12b ペプチド工学	12b Peptide engineering			4P-F213～J219
12c 脂質工学	12c Lipid engineering			4P-N220～J221
12d 糖鎖工学	12d Glycoengineering			4P-N222～J229

各種講演番号の見方

一般講演（特別口頭発表＋ポスター）



受賞講演・シンポジウム



第 1 日（9 月 11 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

授賞式・
受賞講演（生物工学賞，生物工学功績賞，生物工学技術賞）

早稲田キャンパス　大隈記念講堂　W 会場（大講堂）（13:00〜15:25）

授賞式（13:00〜13:50）

13:00　会長挨拶

13:05　KSBB 会長挨拶

13:10　名誉会員，功労会員推戴

13:20　各賞授賞

14:00　1A-Wp01　**〈生物工学賞〉**　座長：**五味 勝也**

構造体形成を伴う動植物細胞の培養と利用に関する生物工学研究

…… ○田谷 正仁（阪大院・基礎工）

14:35　1A-Wp02　**〈生物工学功績賞〉**　座長：**木野 邦器**

微生物におけるアミノ酸の代謝制御機構・生理機能の解析とその応用

…… ○髙木 博史（奈良先端大・バイオ）

15:05　1A-Wp03　**〈生物工学技術賞〉**　座長：**川面 克行**

好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの高機能発酵製品の製造と学術的解明

…… ○宮本 浩邦[1,2,3,4], 宮本 久[3,5], 田代 幸寛[6], 酒井 謙二[6], 児玉 浩明[1,3]

（[1]千葉大・園芸, [2]理研・統合生命, [3]サーマス, [4]日環科学, [5]三六九, [6]九大院・農）

公開シンポジウム

早稲田キャンパス　大隈記念講堂　W 会場（大講堂）（16:00〜17:30）

公開シンポジウムは，大会参加を申し込まれていない方もご聴講いただけます.

座長：**竹山 春子**

16:00　宇宙，人，夢をつなぐ

…… 山崎 直子（宇宙飛行士・女子美術大学客員教授・立命館大学客員教授）

16:45　イノベーションと課題大国日本

…… 濵口 道成（国立研究開発法人　科学技術振興機構　理事長）

第 2 日（9 月 12 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（生物工学奨励賞（照井賞），生物工学アジア若手賞）

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（15:10〜15:30）

15:10 2A-Gp01 **〈生物工学奨励賞（照井賞）〉** 座長：**大政 健史**

画像情報処理を用いた再生医療用製品製造工程における非破壊的品質管理技術の開発

…… ○加藤 竜司（名大院・創薬科学）

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（15:10〜15:30）

15:10 2A-Bp01 **〈生物工学アジア若手賞〉** 座長：**跡見 晴幸**

Sustainable bioprocessing for producing and recovery of polyhydroxyalkanoates

…… ○John Chi-Wei Lan

（Yuan Ze University, Taiwan）

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（15:10〜15:30）

15:10 2A-Dp01 **〈生物工学アジア若手賞〉** 座長：**藤山 和仁**

Applications and recent trends in aqueous two-phase extraction of bioproducts

…… ○Tau Chuan Ling

（Inst. Biol. Sci., Fac. Sci., Univ. Malaya）

シンポジウム（午前の部）

集え！バイオインフォマティクスを利活用する生物工学若手研究者

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（9:00〜11:00）

9:00 はじめに

…… 堀之内 貴明

座長：**兒島 孝明**

9:05 2S-Aa01 超大規模実験室進化とオミックス解析による大腸菌のストレス耐性機構の解析

…… ○堀之内 貴明[1], 前田 智也[1], 古澤 力[1,2]（[1]理研・生命システム, [2]東大院・理）

9:27 2S-Aa02 代謝シミュレーションに基づいた有用発酵微生物の育種

…… ○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

座長：**蟹江 慧**

9:49 2S-Aa03 メタボロミクス研究のための質量分析インフォマティクス

…… ○津川 裕司[1,2]（[1]理化学研究所・環境資源科学研究センター・メタボローム情報研究チーム, [2]理化学研究所・統合生命医科学研究センター・メタボローム研究チーム）

10:11 2S-Aa04 クモ類網羅的シーケンシングによる超高機能構造タンパク探索

…… ○荒川 和晴（慶応大）

10:33 2S-Aa05 創薬研究におけるウェット・ドライ連携によるバイオインフォマティクス
…… ○六嶋 正知（塩野義製薬株式会社）

10:55 おわりに
…… 兒島 孝明

微生物は電気を作る，使う，盗む．その能力，上手に使いませんか？

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（9:00〜11:00）

座長：**石井 正治**

9:00 2S-Ba01 微生物による金属腐食の電子流失速度とガス生産
…… ○若井 暁（神戸大院・イノベ）

9:26 2S-Ba02 金属鉄を腐食する新規硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans*
…… ○飯野 隆夫（理研 BRC-JCM）

座長：**若井 暁**

9:52 2S-Ba03 e-バイオと電子の特異な流れ（エレクトロンバイファーケーション）
…… ○石井 正治（東大院・農生科）

10:08 2S-Ba04 生物電気化学的にみた水素/C1 社会
…… ○加納 健司（京大院・農）

10:34 2S-Ba05 沿岸域生態系を支える REDOX 恒常性の評価
…… ○中村 龍平[1,2]（[1]理研・環境資源, [2]東工大・地球生命）

健康とモノづくりへの腸内細菌活用の最前線
共催：バイオインダストリー協会　新資源生物変換研究会，発酵と代謝研究会，アルコール・バイオマス研究会，グリーンバイオイノベーションフォーラム（GIF）

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（9:00〜11:00）

9:00 はじめに
…… 松山 彰収

座長：**髙木 忍**

9:05 2S-Ca01 腸内細菌の脂質代謝を活用した新規機能性脂肪酸
…… ○米島 靖記[1], 岸野 重信[2], 小川 順[2]（[1]日東薬品・研究開発, [2]京大院・農）

座長：**松山 彰収**

9:30 2S-Ca02 ヒト腸内細菌データベースとその利用
…… ○山田 拓司（東工大）

座長：**安枝 寿**

9:55 2S-Ca03 ビフィズス菌のゲノム操作系の構築
…… ○鈴木 徹, タフオン アミン, 野村 泉（岐阜大・応生科）

座長：**石井 正治**

10:20 2S-Ca04 腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療基盤技術の創出
…… ○福田 真嗣[1,2,3]（[1]慶大・先端生命研, [2]JST さきがけ, [3]メタジェン）

10:45 おわりに
…… 石井 正治

合成生物の時代におけるロバストな物質生産と生物学的封じ込め

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（9:00〜11:00）

9:00 はじめに
…… 廣田 隆一

座長：**廣田 隆一**

9:02 2S-Da01 バクテリアの硫黄代謝とシステイン発酵
…… ○野中 源（味の素株式会社バイオ・ファイン研究所）

9:25 2S-Da02 酵素と代謝デザインによる微生物生産ポリマーの物性制御〜カネカ 生分解性ポリマー PHBH™ 〜
…… ○佐藤 俊輔, 小林 新吾, 有川 尚志, 青木 里奈
（（株）カネカ・Health Care Solutions Research Institute バイオテクノロジー開発研究所）

座長：**松浦 友亮**

9:48 2S-Da03 壊れたら，また作れ 〜耐熱性酵素を用いた *in vitro* サルベージ合成による NAD(H)の安定化〜
…… ○本田 孝祐（阪大院・工）

10:11 2S-Da04 自然界にない物質がないと生きられない生物をつくる―生物学的封じ込め法―
…… ○加藤 祐輔（農研機構・生物機能・新産業・生体物質）

10:34 2S-Da05 リン代謝経路の改変による微生物の選択的培養と生物学的封じ込め
…… ○廣田 隆一[1,2], 黒田 章夫[1,2]（[1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構・先端的低炭素化技術開発）

10:57 おわりに
…… 松浦 友亮

シンポジウム（午後の部）

生物工学若手研究者の集いシンポジウム
―博士後期課程学生口頭発表コンペティション―

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（15:30〜17:30）

若手会が選定した博士後期課程学生による口頭発表です．なお，発表者は大会 3 日目（13 日）13:00〜15:00 に実施するポスター発表も行います．講演番号は，大会 3 日目ポスター発表での講演番号と共通です．講演要旨については各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

座長：**原田 和生**

15:30 3P-G027 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの非触媒 β-プロペラドメイン上に存在する基質特異性に重要な残基
…… ○東海 彰太[1], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[2]
（[1]鳥取大院・連農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・産学）

15:42 3P-I174 High Production of single cell oil from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
…… ○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Hiromi Otsuka[1], Hana Matsumoto[1], Chie Kihira[1], Ahmad Thontowi[2], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[1,4]
（[1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]BSN, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.）

座長：**今中 洋行**

15:54 3P-J202 高生産株の構築を目指した抗体生産 CHO 細胞内の分泌過程解析
…… ○兼吉 航平[1], 内山 圭司[2], 鬼塚 正義[3,4], 山野 範子[1,4], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,4]
（[1]阪大院・工, [2]徳島大・疾患酵素学研セ, [3]徳島大院・社会産業理工, [4]MAB 組合）

16:06 3P-H094 Milking 方式による藻類バイオ燃料生産の実現に向けた技術基盤の構築
……○加藤 明宏[1], 高谷 信之[1,4], 鵜瀬 和秀[1], 池田 和貴[2,4], 愛知 真木子[3,4], 前田 真一[1,4], 小俣 達男[1,4]
（[1]名大院・生命農学, [2]理研・IMS, [3]中部大・応生, [4]JST CREST）
座長：**中島 一紀**

16:18 3P-J231 BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質
…… ○新倉 春香[1], 丸山 千登勢[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2], 濱野 吉十[1]
（[1]福井県大・生物資源, [2]北大院・工）

16:30 3P-J211 遺伝子改変フィーダー細胞を用いた iPS 細胞の運動神経分化誘導
……○吉岡 貫太郎[1], 井藤 彰[1], Paerwen Paerhati[2], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1]
（[1]九大院・工, [2]九大院・シス生科）
座長：**青木 航**

16:42 3P-J216 出芽酵母における解糖系タンパク質の発現限界を決める要因
…… ○江口 優一[1], 蒔苗 浩司[2], 守屋 央朗[2]（[1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大・異分野コア）

16:54 3P-J236 Direct secretory production of D-lactate oligomers by engineered *Escherichia coli*: a shortcut in the process of polylactide production
……○Camila Utsunomia[1], Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Chiaki Hori[1,3], Seiichi Taguchi[2,3]
（[1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]CREST, JST）
座長：**戸井田 力**

17:06 3P-G026 微小組織採取システムを用いた生体組織の空間的 RNA-seq
…… ○依田 卓也[1], 細川 正人[2,3], 高橋 清文[2], 坂梨 千佳子[2], 神原 秀記[2], 竹山 春子[1,2,4]
（[1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]JST・さきがけ, [4]産総研・早大 CBBD-OIL）

17:18 3P-I120 脱窒菌が引き起こす代謝電流による同位体効果の計測
……○山田 哲也[1,2], 松下 伸広[2], 中村 龍平[1]（[1]理研, [2]東工大）

Next Generation Enzyme Engineering -Tools for *in silico* Enzyme Discovery, Correct Folding and Their Fabrication-《国際シンポジウム》

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（15:30〜18:00）

15:30 Next generation enzyme engineering
……Yasuhisa Asano

15:45 2S-Bp01 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉** 座長：**Yasuhisa Asano**
Implementing cell-free synthesis systems for the synthesis and analysis of industrial enzymes
……Kyung-Ho Lee, ○Dong-Myung Kim
（Dept. Chem. Eng. Appl. Chem., Chungnam Nat'l Univ., Korea）

16:10 2S-Bp02 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉**
Designer nanoscale enzyme complexes for application to advanced biotechnology tools
……○Sung Ok Han
（Dept. Biotechnol., Korea Univ.）

16:35 Break

16:45 2S-Bp03 New molecular tools for selective determination of amino acids in biological samples
……○Masafumi Kameya（ELSI, Tokyo Tech.）

17:10 2S-Bp04 Development of INTMSAlign software to design artificial proteins and assign enzymes
…… ○Shogo Nakano[1,3], Sohei Ito[1,3], Yasuhisa Asano[2,3]
（[1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [3]ERATO, JST）

17:35 2S-Bp05 Structural informatics for gene expression of industrial enzymes with correct folding
…… ○Daisuke Matsui[1], Yasuhisa Asano[1,2]
（[1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST）

生命システムビッグデータと情報解析技術の融合による生物工学の新展開

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（15:30〜17:30）

15:30 はじめに
…… 竹山 春子

座長：**竹山 春子**

15:35 2S-Cp01 ビッグデータに基づくヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析
……○西嶋 傑[1,2,3], 須田 亙[2,3,4,5], 大島 健志朗[2], 服部 正平[2,3,4]
（[1]産総研・CBBD-OIL, [2]東大院・新領域, [3]早大・先進理工, [4]理研・IMS, [5]慶応大）

座長：**富永 大介**

16:00 2S-Cp02 Big data analysis on the comparative metagenomics from the Red sea
……○Katsuhiko Mineta
（CBRC/KAUST）

16:25 2S-Cp03 微生物を用いた高機能品生産技術の開発
……○久原 哲（九州大学）

座長：**油谷 幸代**

16:50 2S-Cp04 医療におけるビッグデータ・人工知能の可能性
……○奥野 恭史（京大院・医）

17:15 おわりに
…… 油谷 幸代

Japan-Korea Joint Symposium "Development of Bio-device Based on Cell Engineering and Nano- and Micro-biotechnology for Medical Application"《国際シンポジウム》

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（15:30〜18:00）

座長：**Enoch Y. Park**

15:30 2S-Dp01 Cell Chip to detect and control cellular metabolic state based on spectroelectrochemical method
……○Jeong-Woo Choi[1,2]
（[1]Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., [2]Dept. Biomedical Eng., Sogang Univ.）

15:55 2S-Dp02 Semiconductor-based biosensing technology for *in vitro* diagnostics
……○Toshiya Sakata（Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo）

16:20 2S-Dp03 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉**
Ultrafine separation of biological nano particles
……○Jong Wook Hong[1,2]
（[1]Dept. Bionano Technology, Grad. Sch., Hanyang University, Korea, [2]Dept. of Bionano Engineering, Hanyang University）

16:45 Break

座長：**Eiichi Tamiya**

16:50 2S-Dp04 Plastic antibody-based sensing for biomarker proteins
……○Toshifumi Takeuchi（Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.）

17:15 2S-Dp05 **〈招待講演（韓国生物工学会）〉**
Study on nature-inspired nano structure based cell-surface interactions for antimicrobial activities
……○Donghyun Lee[1], Hyuneui Lim[2]
（[1]Department of Biomedical Engineering, School of Integrative Engineering, Chung-Ang University, Korea, [2]Department of Nature-Inspired Nanoconvergence Systems, Korea Institute of Machinery and Materials, Korea）

17:40 2S-Dp06 BEAMing Droplet Microfluidics for Liquid Biopsy

……○Ayato Tagawa

（Sysmex Corp.）

培養・計測技術の最前線【本部企画】

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（15:30〜17:30）

15:30 はじめに

…… 今井 泰彦

座長：**富田 悟志**

15:35 2S-Gp01 抗体医薬品生産における培養プロセス開発戦略

…… ○槙坪 寛勝, 岡本 浩（中外製薬・製薬研究部（生物技術））

座長：**佐久間 英雄**

16:00 2S-Gp02 再生医療製品の開発事例と将来展望

…… ○井家 益和（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング・研究開発部）

16:25 休憩

座長：**今井 泰彦**

16:30 2S-Gp03 高感度腸内フローラ解析システム"Yakult Intestinal Flora-SCAN (YIF-SCAN)"の開発と応用

…… ○辻 浩和（ヤクルト中央研究所）

座長：**安原 貴臣**

16:55 2S-Gp04 アミノ酸で健康状態を測る―アミノインデックス技術の開発―

…… ○森 妹子[1], 吉田 寛郎[1], 宮野 博[2]（[1]味の素・アミノサイエンス統括部, [2]味の素・イノベーション研）

17:20 おわりに

…… 安原 貴臣

微生物の「声」が聴きたくて…単細胞生物のコミュニケーションスキル

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（15:30〜17:30）

15:30 はじめに

…… 八代田 陽子

座長：**八代田 陽子**

15:33 2S-Hp01 細菌によるデジタルな情報伝達!?

…… ○豊福 雅典[1], 森永 花菜[1], エーベル レオ[2], 野村 暢彦[1]

（[1]筑波大院・生命環境, [2]チューリッヒ大学）

座長：**渡辺 大輔**

15:56 2S-Hp02 窒素代謝を変えるコミュニケーション ―脂肪酸をつかった分裂酵母の種の生存戦略―

……○八代田 陽子（理研 CSRS・ケミカルゲノミクス）

座長：**八代田 陽子**

16:19 2S-Hp03 放線菌の眠れる二次代謝を呼び覚ます！―異属細菌間での競合と協調―

…… ○浅水 俊平（東大院・農生科）

座長：**渡辺 大輔**

16:42 2S-Hp04 ビール酵母細胞壁が植物栽培の歴史を変える

…… ○北川 隆徳（アサヒバイオサイクル）

座長：**八代田 陽子**

17:05 2S-Hp05 清酒醸造における新しい微生物間相互作用 ―乳酸菌の「声」は酵母に届くか―
……○渡辺 大輔[1], 砂田 啓輔[2], 高橋 俊成[2], 山田 翼[2], 高木 博史[1]
([1]奈良先端大・バイオ, [2]菊正宗酒造)

17:28 おわりに
……渡辺 大輔

特別口頭発表 B（大会トピックス講演・生物工学学生優秀賞「飛翔賞」講演）

講演番号は同日の 13:00〜15:00 に実施するポスター発表での講演番号と共通です.
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨および別冊の大会トピックス集をご覧ください.
＊2A-Fa01 は受賞講演のみとなります（ポスター発表はありません）. 講演要旨については 12 日の受賞講演要旨をご覧ください.

特別口頭発表 B1

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　E 会場（9:00〜11:00）

座長：**中村 史, 寺田 昭彦**

【遺伝学，分子生物学および遺伝子工学】

9:00 2P-E007 リボレギュレーターを用いた *cyabrB2* 遺伝子の発現制御によるグリコーゲン高生産シアノバクテリアの構築
……○上野 絹子[1,2], 酒井 雄大[1,2], 生野 千佳[1,2], 坂本 一平[1,2], 塚越 かおり[1], 日原 由香子[2,3], 早出 広司[1,2], 池袋 一典[1,2]
([1]農工大院・工, [2]JST・CREST, [3]埼玉大院理工)

9:20 2P-E035 コシヒカリを大粒化させる遺伝子の SNP マーカー選抜
……○富田 因則[1], 上岡 莉枝子[2] ([1]静大・グリーン科学技術研究所, [2]静大・農)

【酵素学，タンパク質工学および酵素工学】

9:40 2P-E042 改変型ホスホリパーゼ D によるホスファチジルトレオニンの酵素合成
……○松永 望（名大院・生命農学）

10:00 2P-E065 カイコ幼虫からのヒトパピローマウイルス様粒子の効率的精製
……馬場 里奈[1], 黒澤 八重[2], 鈴木 慎一郎[1], ミンカナー ロバート[3], 加藤 竜也[1,3,4], 小林 伸太郎[2], ○朴 龍洙[1,3,4]
([1]静大・農, [2]HOYA 株式会社, [3]静大・創科技院, [4]静大・グリーン科技研)

【代謝生理学・発酵生産】

10:20 2P-E082 創薬研究を目指したベンジルイソキノリンアルカロイドの大腸菌を用いた生産系の構築
……○中川 明[1], 佐藤 文彦[2], 片山 高嶺[2], 南 博道[1]
([1]石川県大・生物資源研, [2]京大院・生命)

10:40 2P-E101 酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の個別生産
……○小林 俊介[1], 柘植 陽太[2], 岩崎 還帰[1], 川口 秀夫[3], 仁宮 一章[2], 荻野 千秋[4], 高橋 憲司[1], 近藤 昭彦[3]
([1]金沢大・理工, [2]金沢大・新学術, [3]神戸大院・イノベ, [4]神戸大院・工)

特別口頭発表 B2

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　F 会場（9:00〜11:00）

座長：**鈴木 市郎, 東田 英毅**

【醸造・食品工学】

9:00 2P-F114 清酒酵母から自然に得られた染色体数の異なる一倍体株の代謝解析によるミトコンド リア活性の推定

…… ○藤丸 裕貴[1], 門脇 真史[1], 田口 誠我[1], 澤田 和敬[2], 赤尾 健[3], 野口 英樹[4], 豊田 敦[4], 藤山 秋佐夫[4,5], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]佐賀県工業技術センター, [3]酒総研, [4]国立遺伝研・DDBJ 研究セ, [5]総合研究大学院大学 遺伝学専攻）

9:20 2P-F131 大気圧低温プラズマによる出芽酵母殺菌過程の解析

…… 糸岡 洸樹, ○井沢 真吾（京工繊大院・工芸科学）

【環境バイオテクノロジー】

9:40 2P-F167 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産

…… ○片岡 尚也[1,2], Vangnai Alisa S.[3], 藥師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大院・創科, [2]山口大・中高温微セ, [3]チュラロンコン大）

【生物化学工学】

10:00 2P-F174 テロメラーゼ活性を高める抽出液がヒト線維芽細胞の若返りに及ぼす影響

…… ○塩見 尚史, 渡邊 桂子（神戸女学院大・人間科学）

【分析計測化学】

10:20 2P-F228 精確な濃度が付与された DNA 認証標準物質の開発

…… ○柴山 祥枝[1], 松倉 智子[2], 佐々木 章[2], 藤井 紳一郎[1], 稲垣 和三[1], 山崎 太一[1], 吉岡 真理子[1], 関口 勇地[2], 野田 尚宏[2], 高津 章子[1]
([1]産総研・物質計測標準, [2]産総研・バイオメディカル）

10:40 2A-Fa01 **〈生物工学学生優秀賞（飛翔賞）〉受賞者講演**

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 EXP2 の獲得と特性解析

…… ○袴田 一晃[1], 渡辺 寛和[1], 川野 竜司[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工・生命工, [2]農工大・機器分析施設）

特別口頭発表 A（一般講演　ショートプレゼンテーション）

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（9:00〜10:48）

セッション A1-1，A1-2，A1-3，A1-4（43 演題）　座長：**浜本 牧子，川崎 信治**

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（9:00〜10:50）

セッション A2-1，A2-2，A2-3，A2-4（44 演題）　座長：**田中 剛，大槻 隆司**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（9:00〜10:35）

セッション A3-1，A3-2，A3-3，A3-4（38 演題）　座長：**今井 泰彦，春田 伸**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（9:00〜10:45）

セッション A4-1，A4-2，A4-3，A4-4（42 演題）　座長：**渡辺 文昭，宮崎 健太郎**

1 演題の登壇時間は 2 分 30 秒（発表 2 分），1 セッションは 30 分，セッション間の休憩時間はありません．詳しくは特別口頭発表 A スケジュール一覧をご参照ください．講演要旨については，スケジュール一覧に記載した各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

一般講演　ポスター発表

西早稲田キャンパス　63 号館 2 階　ポスター会場（13:00〜15:00）

【遺伝子工学】

13:00　2P-N001　歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* における新規溶血因子の同定
……○阿座上 弘行[1,2,3], 島谷 雅文[1], 甲斐 幹世[1]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・創科・農, [3]山口大・微研セ・病微）

14:00　2P-G002　口腔連鎖球菌 *Streptococcus anginosus* の莢膜多糖生合成制御機構の解析
……○小澤 賢人, 松本 裕子, 中西 猛志, 三宅 克英（石川県大・生物資源研）

13:00　2P-G003　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網羅的同定に向けた INSeq 法の確立
……○中島 森[1], 中川路 伸吾[1], 阪中 幹祥[2], 小椋 義俊[3], 林 哲也[3], 横田 篤[1], 吹谷 智[1]
（[1]北大院・農, [2]石川県大・生資環, [3]九大院・医）

14:00　2P-N004　*Stenotrophomonas maltophilia* の高濃度リン酸走性センサーの解析
……○柳沢 優[1], 橋本 麻衣子[2], 酒井 保藏[1], 荷方 稔之[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]宇都宮大・工）

13:00　2P-N005　日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltphilia* のアルコールに対する走性応答
……○古川 卓磨, 渡邉 祐子, 酒井 保藏, 荷方 稔之（宇都宮大院・工）

14:00　2P-G006　光化学系 II 反応中心に耐熱性 D1/D2 タンパク質を組み込んだシアノバクテリア変異株の作成と D1 タンパク質 C 末端配列の最適化
……○塩屋 健一, 鶴田 開生, 原口 典久, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳
（崇城大・生物生命）

13:00　2P-E007　リボレギュレーターを用いた *cyabrB2* 遺伝子の発現制御によるグリコーゲン高生産シアノバクテリアの構築
……○上野 絹子[1,2], 酒井 雄大[1,2], 生野 千佳[1,2], 坂本 一平[1,2], 塚越 かおり[1], 日原 由香子[2,3], 早出 広司[1,2], 池袋 一典[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]JST・CREST, [3]埼玉大院理工）

14:00 2P-G008 新奇糸状性シアノバクテリアの SigB 相同性因子の特徴付けと発現解析
……○菅原 卓也[1], 鎭西 真理子[1], 川又 透[1], 田島 直幸[2], 兼崎 友[3], 中平 洋一[1], 吉川 博文[4], 佐藤 直樹[2], 朝山 宗彦[1]
([1]茨城大農・資生科, [2]東大院・総合文化, [3]東農大・ゲノムセ, [4]東農大・応生科)

13:00 2P-G009 分岐鎖ポリアミンが珪藻のシリカ被殻形成に与える影響
……○片山 翔太, 秀瀬 涼太, 松田 祐介, 藤原 伸介（関西学院大院・理工）

14:00 2P-G010 *Bacillus* 属細菌が形成するシリカ内部に含まれる長鎖ポリアミンの発見
……○中川 美樹, 田中 達也, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫（広島大院・先端物質）

13:00 2P-G011 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の RNA ポリメラーゼの成熟と転写に及ぼす影響
……○家森 優佳[1], 濱川 匡史[1], 秀瀬 涼太[1], 兼崎 友[2], 貝沼(岡本) 章子[3], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工, [2]東京農大・ゲノムセ, [3]東京農大・応生科・醸造)

14:00 2P-G012 極限環境微生物の新奇ホモキラルポリ-γ-グルタミン酸合成システム
……○芦内 誠[1,2], 白米 優一[2], 福永 愛[1]（[1]高知大・農, [2]愛媛大院・連合農）

13:00 2P-G013 トランスポゾン挿入による大腸菌組換えプラスミドの異常
……○相原 惇也, 中村 美紀子, 星田 尚司, 赤田 倫治（山口大院・創成科学・化学系）

14:00 2P-G014 PPR タンパク質の核酸認識機構を利用した新規 DNA/RNA 操作技術の開発
……○八木 祐介[1,2], 中村 崇裕[1,2]（[1]九大院・農・, [2]エディットフォース（株））

13:00 2P-G015 *Rhodococcus-Escherichia coli* シャトルベクターの開発及びそれを用いたアミノケトン不斉還元酵素遺伝子の発現
……○山村 栄虎, 藤本 昇（協和ファーマケミカル）

14:00 2P-G016 大腸菌を宿主とした N^G-ヒドロキシ-L-アルギニン生産系構築の試み
……○折川 明日美, 山本 美也子, 黒田 照夫, 杉山 政則, 熊谷 孝則（広大院・医歯薬保健学）

13:00 2P-G017 coryneazolicin 生合成遺伝子クラスターの異宿主発現
……○田熊 桃子, 黒羽 真以, 小谷 真也（静大・創科技院）

14:00 2P-G018 大腸菌-*Sphingomonas* 属細菌の発現用シャトルベクターの構築
……○三宅 湧登, 小谷 真也（静大・創科技院）

13:00 2P-G019 比較進化工学：組換え蛋白質高発現に影響を与える宿主因子
……○河原崎 泰昌, 田中 翔大, 田中 瑞己, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 伊藤 圭祐（静県大・食栄）

14:00 2P-G020 細菌のビスフェノール A 耐性に関与する遺伝子の単離とその解析
……○加賀 経元[1], 釜井 優花[1], 伊藤 小百合[1], 荷方 稔之[2], 酒井 保藏[2]
([1]宇都宮大・工, [2]宇都宮大院・工)

13:00 2P-N021 エチレン生成酵素遺伝子を組み込んだ *Corynebacterium glutamicum* によるエチレン生産
……○魚住 昇平, 石原 杏里, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳（崇城大・生物生命）

14:00 2P-G022 *Corynebacterium glutamicum* における銅（II）添加によるグルタミン酸生産機構の解明
……○尾形 駿介, 平沢 敬（東工大・生命理工学院）

13:00 2P-G023 コリネ型細菌におけるシステイン排出系の探索
……○岸野 真弓, 近藤 麻梨子, 松久 和歩, 平沢 敬（東工大・生命理工学院）

14:00 2P-G024 ABC トランスポーター EnkT の基質寛容性を利用した効率的な抗菌ペプチド・バクテリオシン分泌生産系の構築
……○酒井 美由季[1], 須志田 浩稔[1], 石橋 直樹[1], 善藤 威史[1], 園元 謙二[1,2]
([1]九大院・農, [2]九大・バイオアーク)

13:00 2P-G025 *Lactococcus* 特異的な抗菌活性を有するラクトコッシン Z の生合成遺伝子群の解析
……Daba Ghoson Mosbah[1], 石橋 直樹[1], ○善藤 威史[1], 園元 謙二[1,2]
([1]九大院・農, [2]九大・バイオアーク)

14:00 2P-N026 *Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの大量発現と精製の試み
……○鳥居 誉[1], 田端 菜央[2], 奥野 圭祐[1], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工)

13:00 2P-G027 *Sphingomonas subterranea* からの新規ラッソペプチドの単離と構造決定
……○黒羽 真以[1], 逸見 光[2], 亀山 眞由美[2], 小谷 真也[1]
([1]静大・創科技院, [2]農研機構)

14:00 2P-G028 大腸菌の酸刺激惹起性 DNA 取込み現象
……渡邊 修平, 宮本 葉子, 清 啓自, ○吉田 ナオト（宮崎大・農）

13:00 2P-N029 *Shewanella* 属細菌における cAMP 加水分解酵素 CpdA の新規機能の解析
……○笠井 拓哉, 高妻 篤史, 渡邉 一哉（東薬大・生科）

14:00 2P-G030 蛍光タンパク質を利用した酢酸菌細胞内 pH の評価
……○繁 宥樹[1], 東久保 遥[1], 石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工, [2]マルカン酢)

13:00 2P-G031 大腸菌の乳酸発酵遺伝子 ldhA 発現による persister 形成とプロトン駆動力との関係
……○山本 尚輝[1], 一色 理乃[1], 河合 祐人[1], 松本 慎也[2], 常田 聡[1]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]名大・医・細菌)

14:00 2P-N032 汽水湖由来の新規極微小細菌のもつ推定プロテオロドプシンの機能解析
……○村口 雄亮[1], 前島 由明[1], 鈴木 智大[2,3], 道羅 英夫[3], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
([1]静大院・総合科技, [2]宇都宮大・バイオサイエンス教育研, [3]静大・グリーン研)

13:00 2P-N033 ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の活性部位近傍への変異導入効果
……○南部 友香, 柘植 丈治（東工大院・物質理工・材料）

14:00 2P-G034 ヒドロゲルを用いた浮遊細胞マイクロアレイ技術の開発
……○藤原 央之[1,2], 戸井田 力[2], 境 慎司[1], 田谷 正仁[1], 藤田 聡史[1,3]
([1]阪大院・基礎工, [2]産総研・バイオメディカル, [3]神戸大院・工)

13:00 2P-E035 コシヒカリを大粒化させる遺伝子の SNP マーカー選抜
……○富田 因則[1], 上岡 莉枝子[2] ([1]静大・グリーン科学技術研究所, [2]静大・農)

【酵素学，酵素工学】

14:00 2P-G036 CYP53A15 発現大腸菌を用いた *p*-ヒドロキシ安息香酸生産性の向上
……○玉木 峻, 今石 浩正（神戸大・バイオシグナル総研セ）

13:00 2P-G037 脂溶性キラルアルコール生産にむけた立体選択的カルボニル還元酵素の親油性細菌内での発現と有機溶媒中での利用
……○小野 智博[1], 岡野 憲司[1], 本田 孝祐[1], 出来島 康方[2], 川端 潤[2]
([1]阪大院・工, [2]三菱ケミカル)

14:00 2P-G038 非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用した D-アミノ酸含有ジペプチド合成
……○賀野 壮一朗[1], 鈴木 伸[1], 鈴木 亮平[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
([1]早大・先進理工, [2]早大・理工研)

13:00 2P-G039 非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインの利用に向けた pyruvate phosphate dikinase による AMP からの ATP 再生系の構築
……○鈴木 伸, 木野 邦器（早大・先進理工）

14:00 2P-G040 シリカ重合酵素の異種発現と活性評価
……○小栗 秀俊, 中島 一紀, 川﨑 了（北大院・工）

13:00 2P-G041 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した新規 L-アルギニンオキシダーゼの性質検討と構造解析
……○松尾 慎作[1], 藤野 志保子[1], 伊藤 菜奈子[2], 今田 勝巳[2], 日下部 均[3], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
([1]岡山大院・環境生命, [2]阪大院・理, [3]バイオセンサ)

14:00 2P-E042 改変型ホスホリパーゼ D によるホスファチジルトレオニンの酵素合成
……○松永 望（名大院・生命農学）

13:00 2P-G043 Acyl chain that matters: Turning a phospholipase D into a lysophospholipase D by protein engineering
……○Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
（Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.）

14:00 2P-G044 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 D-乳酸脱水素酵素の機能改変
……○伊東 昇紀[1], 竹屋 壮浩[2], 小山内 崇[1,2]（[1]明治大・農, [2]明治大院・農）

13:00 2P-G045 *Pseudomonas aerginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼが触媒するアセチル化反応
……○井上 尚[1], 吉田 知博[2], 佐伯 将[2], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[1,2]
（[1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・産学）

14:00 2P-G046 タイの塩蔵発酵食品から分離した Bacillus 属細菌の生産する耐塩性プロテアーゼの特性解析
……○竹中 慎治[1], 吉浪 淳[1], Kuntiya Ampin[2], Seesuriyachan Phisit[2], Chaiyaso Thanongsak[2], 渡辺 昌規[3], 吉田 健一[4]
（[1]神戸大院・農, [2]チェンマイ大・アグロ・バイオ, [3]山形大農, [4]神戸大院・科学技術イノベ）

13:00 2P-N047 ヒドロキシアダマンタン類の微生物合成
……○吉沢 崚[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・化学・生命工）

14:00 2P-N048 新奇スルホンアミド分解酵素の探索と反応特性解析
……○青木 俊[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・化学・生命工）

13:00 2P-G049 デラセミ化とラセミ化-非発光基質 L-ルシフェリンからホタル生物発光を実現する 2 つの方法
……○加藤 太一郎[1], 前田 樹里[1], 奥田 真利[2], 白川 大暉[2], 武尾 正弘[2], 根来 誠司[2], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 丹羽 一樹[3], 太田 博道[4]
（[1]鹿児島大院・理工, [2]兵庫県大院・工, [3]産総研, [4]長崎県大）

14:00 2P-G050 酵素の長期安定性，熱安定性向上に寄与するイオン液体の開発
……○金子 恒太郎, 河合 功治（ミヨシ油脂）

13:00 2P-G051 ギ酸オキシダーゼにおける FAD の 8-formyl-FAD への修飾に対するアミノ酸置換及び pH の影響
……○岩越 亮汰, 田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之（福井大院・工）

14:00 2P-G052 芳香族ヒドロキシカルボン酸生産に有用な脱炭酸酵素の探索
……○原 良太郎[1], 椛沢 遼[2], 広川 安孝[1], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・理工研, [2]早大・先進理工）

13:00 2P-G053 逐次的な多酵素複合体構築
……岩田 史也, ○平川 秀彦, 長棟 輝行（東大院・工）

14:00 2P-N054 Isolation and characterization of collagenase from non-pathogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VN3
……○Bach Thi Mai Hoa[1], Phi Quyet Tien[1], Nguyen Phuong Nhue[1], Pham Thanh Huyen[1], Ho Tuyen[1], Dang Thuy Duong[1], Vu Thi Hanh Nguyen[1], Hiroshi Takagi[2]
（[1]Inst. of Biotech., Vietnam Academy of Sci. and Technol., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST）

13:00 2P-G055 エチレングリコール中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能相関
……○生越 大輔, 岡崎 秀明, 伊東 雅人, 竹原 一起, 武尾 正弘, 根来 誠司
（兵庫県大院・工）

14:00 2P-G056 ナイロン加水分解酵素の構造安定化機構の解析
……○岡崎 秀明[1], 生越 大輔[1], 伊東 雅人[1], 戸田 光[1], 竹原 一起[1], 武尾 正弘[1], 重田 育照[2], 根来 誠司[1]
（[1]兵庫県大院・工, [2]筑波大院・数理物質）

13:00 2P-G057 光学活性フルオロアルコール生産に有用な *Pichia farinosa* NBRC 0462 由来カルボニルレダクターゼの精製と諸性質の解明
……○釜井 彩花[1], 七田 沙耶香[1,2], 三木 慎介[3], 礒部 公安[1,2], 浅野 泰久[1,2]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]JST・ERATO, [3]セントラル硝子(株)）

【タンパク質工学】

14:00 2P-H058 北海道白糠町産植物からのアミロイドβ凝集阻害物質の網羅的探索
……○渡邉 輝[1], 久保 研二[1], 杉村 康司[2], 徳楽 清孝[1], 上井 幸司[1]
([1]室蘭工大院・工・環境創生工, [2]熊大院・薬)

13:00 2P-N059 Genetically engineered monomeric streptavidin for designing a new protein expression tag system based on monovalent biotin interaction
……○Osamu Hiraoka[1], Sayuri Sakamoto[1], Takuya Terai[2], Shigeru Sugiyama[3], Etsuko Suzaki[1]
([1]Grad. Sch. Clin. Pharm., Shujitsu Univ., [2]Grad. Sch. Pharm., Univ. Tokyo, [3]Fac. Sci. Eng., Kochi Univ.)

14:00 2P-H060 N末端融合ペプチドを用いた新規可溶性タンパク質検出法
……○元島 史尋[1,2], 浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大・工, [2]JST, ERATO)

13:00 2P-H061 イネ由来ディフェンシンの抗真菌作用メカニズムの解析
……○福田 美南海[1], 落合 秋人[1], 大堀 正裕[1], 提箸 祥幸[2], 田中 孝明[1], 谷口 正之[1]
([1]新潟大・自然研, [2]農研機構・北農研)

14:00 2P-H062 イネ由来α-アミラーゼの糖結合部位に対する機能解析
……○山田 大貴, 落合 秋人, 荻原 寛和, 田中 孝明, 三ツ井 敏明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)

13:00 2P-H063 カイコ - ＢｍＮＰＶ バクミド発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫抗原提示ウイルス様粒子の作製
……○稲垣 裕[1], 朴 龍洙[1,2], 加藤 竜也[1,2], 宮崎 剛亜[1,2], Deo Vipin Kumar[3]
([1]静大院・総科技・農, [2]静大グリーン科技研, [3]静大 融合グローバル)

14:00 2P-H064 カイコを用いたネオスポラ原虫抗原提示ラウス肉腫ウイルス様粒子の構築
……○平松 利輝人[1], Suhaimi Hamizah[2], 加藤 竜也[1,2,3], 朴 龍洙[1,2,3]
([1]静大・農, [2]静・大創科技院, [3]静大・グリーン科技研)

13:00 2P-E065 カイコ幼虫からのヒトパピローマウイルス様粒子の効率的精製
……馬場 里奈[1], 黒澤 八重[2], 鈴木 慎一郎[1], ミンカナー ロバート[3],
加藤 竜也[1,3,4], 小林 伸太郎[2], ○朴 龍洙[1,3,4]
([1]静大・農, [2]HOYA 株式会社, [3]静大・創科技院, [4]静大・グリーン科技研)

14:00 2P-H066 マウス由来嗅覚受容体の大腸菌による発現および精製条件の検討
……○浅川 賢史[1], 福谷 洋介[1], 池上 健太郎[1], 松波 宏明[2], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]デューク大・メディカルセンター)

13:00 2P-H067 βサンドウィッチドメインを用いた新規標的特異的結合分子骨格の検討
……○来住 秀憲, 杉田 慎之介, 古賀 雄一, 大政 健史 (阪大院・工)

14:00 2P-N068 腫瘍免疫を活性化する REIC/Dkk-3 タンパク質の相互作用分子の解析
……○羽田 彩夏[1], 中川 そらみ[1], 木下 理恵[1,2], 二見 淳一郎[1]
([1]岡山大院・自科, [2]岡山大・医・細胞生物)

13:00 2P-N069 SH 保護試薬によるジスルフィド結合含有タンパク質の加熱不可逆失活の抑制
……○萩本 惇史, 宮本 愛, 二見 淳一郎 (岡山大院・自科)

14:00 2P-H070 基板材料結合タンパク質を用いたナノデバイス指向インターフェイス分子開発
……○宮木 達輝, 中澤 光, 筋野 拓馬, 梅津 光央 (東北大院・工)

13:00 2P-H071 レクチン様分子シャペロン calnexin と ERp29 の相互作用における物理的性質の解析
……○中尾 仁美[1], 瀬古 玲[2], 伊藤 幸成[3], 迫野 昌文[1]
([1]富山大院・理工, [2]JST・ERATO, [3]理研)

14:00 2P-N072 In cell folding 法による可逆的カチオン化転写因子タンパク質の導入効率の検討
……○中野 智貴[1], 二見 淳一郎[2], 槇原 将紘[2], 浅間 孝志[2], 二見 翠[1]
([1]岡山理大院・工・生工, [2]岡山大院・自科)

13:00 2P-H073 マウス嗅覚受容体の膜輸送機構解明に向けた RTP1S の機能構造解析
……○玉木 良平[1], 池上 健太郎[1], 福谷 洋介[1], 松波 宏明[2], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]デューク大・メディカルセンター)

14:00 2P-N074 リポソームディスプレイ法を用いたデザイン膜タンパク質の機能アッセイ
……◯岡村 昂典, 渡邉 肇, 松浦 友亮（阪大院・工）

13:00 2P-H075 超安定化人工蛋白質 SUWA の X 線結晶構造解析および蛋白質ナノブロック超分子複合体動的秩序構造形成への応用
……木村 尚弥[1], 小林 直也[1], ◯新井 亮一[1,2]（[1]信州大・繊維, [2]信州大・菌類微生物セ）

【発酵生理学，発酵工学】

14:00 2P-H076 Effect of carbon-nitrogen ratio on accumulation of valuable compounds in *Yarrowia lipolytica* culture
……◯Sivamoke Dissook, Sastia Putri, Eiichiro Fukusaki
（Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.）

13:00 2P-H077 納豆菌を宿主とした *pyrE* 遺伝子破壊株によるオロト酸の生産性の評価
……◯七尾 圭香[1], 袴田 佳宏[2], 大箸 信一[2]（[1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研）

14:00 2P-H078 高光学活性 L-乳酸の生産のための複合微生物系の再構築
……◯溝口 尊春[1], 古原 俊哉[1], 田代 幸寛[1], 宮本 浩邦[2], 酒井 謙二[1]
（[1]九大院・生資環, [2]日環科学）

13:00 2P-H079 スクリーニングした *Lipomyces* の脂質蓄積能力を高める培地・培養条件
……◯柳場 まな[1], 正木 和夫[2], 南アルプス市[3]*, 長沼 孝文[1]
（[1]山梨大院・医工総, [2]岐阜産技セ・環化, [3]南アルプス市）
*著者からの希望により自治体名を記載しています.

14:00 2P-H080 *Citrobacter braakii* TB-96 株の有機酸生合成経路破壊による 1,3-プロパンジオール生産の向上
……◯清 啓自[1], 野中 大輔[2], 森田 峻秀[2], 松本 瑞葵[3], 吉田 ナオト[1], 中島（神戸） 敏明[2]
（[1]宮崎大・農, [2]筑波大院・生命環境, [3]筑波大）

13:00 2P-H081 *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産における最適培養系の構築
……◯野中 大輔[1], 森田 峻秀[1], 清 啓自[2], 松本 瑞葵[3], 中島 敏明[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]宮崎大院・農, [3]筑波大）

14:00 2P-E082 創薬研究を目指したベンジルイソキノリンアルカロイドの大腸菌を用いた生産系の構築
……◯中川 明[1], 佐藤 文彦[2], 片山 高嶺[2], 南 博道[1]
（[1]石川県大・生物資源研, [2]京大院・生命）

13:00 2P-H083 High butanol production by immobilized extractive fermentation with large extractant volume
……◯Rizki Darmayanti[1], Takuya Noguchi[1], Ming Gao[1], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,2]
（[1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.）

14:00 2P-N084 Study on methane production from CO_2/H_2 gas mixture using acclimated methanogens
……◯Ying Wang, Chenzhu Yin, Ye Liu, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 2P-N085 Bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) from fatty acid by using fed-batch culture of *Escherichia coli*
…… ◯Fakhrul Ikhma Bin Mohd Fadzil, Koki Maezima, Suzuran Watanabe, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge
（Tokyo Tech）

14:00 2P-H086 糸状菌による N-アセチルグルコサミンの生産
……◯森 哲也, 市川 稚子, 手塚 保行, 北 雄一（北興化学工業開発研究所）

13:00 2P-H087 Production of lipids containing C14 fatty acids by a filamentous fungus *Plectospira myriandra*
……◯Brian King Himm Mo, Hirotaka Asai, Akinori Ando, Jun Ogawa
（Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.）

14:00 2P-N088 出芽酵母を利用したD-アミノ酸誘導体生産系の構築
……○中本 侃[1], 梅川 碧里[2], 林 順司[1], 若山 守[1]
([1]立命館大・生命科学, [2]京大院・生命)

13:00 2P-H089 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株によるキシリトールの生産
……○田代 朔也, 田口 久貴（崇城大院・工）

14:00 2P-H090 サツマイモ焼酎粕培地におけるセラミド生産に適した麹菌のスクリーニング
……○小境 敏揮[1], 小玉 誠[2], 宮成 亮太[1], 森谷 亜希[2], 坂口 武則[1], 河野 邦晃[1], 松本 公彦[2], 久木﨑 雅人[2], 岩井 謙一[1], 髙瀬 良和[1]
([1]霧島酒造, [2]宮崎県工業技術セ)

13:00 2P-H091 焼酎粕を培地とする麹菌培養により生産されるセラミドの構造解析とその定量
……○小玉 誠[1], 森谷 亜希[1], 小境 敏揮[2], 宮成 亮太[2], 坂口 武則[2], 河野 邦晃[2], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 松本 公彦[1], 久木﨑 雅人[1]
([1]宮崎県・工技セ, [2]霧島酒造)

14:00 2P-H092 放線菌 *Streptomyces ficellus* による寄生植物種子発芽阻害剤ノジリマイシンの生産
……○中井 拓也[1], 原田 和生[1], 那須 雄大[1], 岡澤 敦司[2], 平田 收正[1]
([1]阪大院・薬, [2]阪府大院・生環科)

13:00 2P-H093 *Lactobacillus plantarum* 22A-3 によるフェルラ酸からのジヒドロフェルラ酸生産
……○向田 潤[1], 西谷 洋輔[2], 川上 秀昭[2], 桑原 浩誠[2], 三井 亮司[1]
([1]岡山理大・理, [2]丸善製薬・研究開発本部)

14:00 2P-H094 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* を宿主とする異種タンパク質生産の試み
……○東久保 遥[1], 繁 宥樹[1], 石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工・生命科学, [2]マルカン酢)

13:00 2P-N095 Characterization of novel plant growth-promoting bacterium, *Citrobacter* sp., isolated from co-compost of palm oil industry waste
…… Clament Fui Seung Chin[1,2], Mohd. Huzairi Zainudi[3], Norhayati Bt. Ramli[3], Hassan Mohd. Ali[3], Yukihiro Tashiro[1], ○Kenji Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Univ. Malaysia Sabah, Malaysia, [3]Univ. Putra Malaysia, Malaysia)

【代謝工学】

14:00 2P-H096 亜リン酸を用いたシアノバクテリアの選択的培養手法の開発
……○神原 亮大[1], 廣田 隆一[1,2], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構 先端的低炭素化技術開発)

13:00 2P-H097 亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法の開発とその有効性評価
……○桂浦 善一朗[1], 廣田 隆一[1,2], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構 先端的低炭素化技術開発)

14:00 2P-H098 遺伝子組換え大腸菌を利用したセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産技術の研究開発
……○寺本 陽彦, 須田 雅子, 乾 将行（RITE）

13:00 2P-H099 遺伝子組換え紅色非硫黄細菌による酢酸からの高効率バイオ水素生産プロセスの研究開発
……○清水 哲, 寺本 陽彦, 乾 将行（RITE）

14:00 2P-H100 乳酸・コハク酸生産時におけるコリネ型細菌の耐熱性
……○水野 光[1], 柘植 陽太[2], 仁宮 一章[2], 乾 将行[3], 近藤 昭彦[4], 高橋 憲司[1]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]RITE, [4]神戸大院・イノベ)

13:00 2P-E101 酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の個別生産
……○小林 俊介[1], 柘植 陽太[2], 岩崎 還帰[1], 川口 秀夫[3], 仁宮 一章[2], 荻野 千秋[4], 高橋 憲司[1], 近藤 昭彦[3]
([1]金沢大・理工, [2]金沢大・新学術, [3]神戸大院・イノベ, [4]神戸大院・工)

14:00 2P-H102 フェニルアラニン高生産大腸菌の染色体に導入した人工オペロンの最適化に関する検討
……○岸田 隆寛[1], 駒 大輔[2], 山中 勇人[2], 森芳 邦彦[2], 長森 英二[1], 大本 貴士[2]
([1]大工大・工・生命, [2]阪技術研)

13:00 2P-H103 大腸菌染色体 DNA のエンジニアリングによるフェニルアラニンおよびチロシン生産菌の育種
……○駒 大輔, 山中 勇人, 森芳 邦彦, 大本 貴士（阪技術研）

14:00 2P-H104 *Clostridium paraputrificum* の水素ガス生産向上をめざした有機酸生産経路の解析
……○関 兵馬, 吉田 稜, 粟冠 真紀子, 國武 絵美, 粟冠 和郎, 木村 哲哉（三重大院・生資）

13:00 2P-H105 生体触媒を利用した 2-フェニルエタノールの位置選択的水酸化によるチロソール及びヒドロキシチロソールの合成
……川村 駿介[1], ○岡本 姫佳[1], 古屋 俊樹[2,3], 木野 邦器[1,2]
([1]早大・先進理工, [2]早大・理工研, [3]東理大・理工)

14:00 2P-H106 *Arthrobacter* sp. KI72 におけるナイロンモノマー代謝系の同定と酵素の特徴
……○竹原 一起[1], 藤井 翼[1], 加藤 太一郎[2], 武尾 正弘[1], 根来 誠司[1]
([1]兵庫県大院・工, [2]鹿児島大院・理工)

13:00 2P-H107 酢酸菌における分岐鎖アミノ酸生産を支配する Lrp 様転写因子の制御機構の解析
……○石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工, [2]マルカン酢)

14:00 2P-H108 Moorella thermoacetica の細胞内 ATP プール量に及ぼす 酢酸合成経路改変の影響
……○竹村 海生[1], 吉田 嵩一郎[1], 岩崎 裕樹[1], 喜多 晃久[1,2], 田島 誉久[1,2], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]JST・CREST)

13:00 2P-H109 γ-アミノ酪酸生産大腸菌における代謝動態制御のメタボローム解析
……○藤原 由梨[1], 相馬 悠希[2], 和泉 自泰[2], 花井 泰三[3], 馬場 健史[2]
([1]九大院・シス生科, [2]九大・生医研, [3]九大院・農)

14:00 2P-H110 異属微生物間の応答機構：*Pseudomonas* sp. C8 株による大腸菌増殖抑制作用
……○本荘 雅宏[1], 鈴木 研志[1], 西村 朋香[2], 田代 陽介[1], 二又 裕之[1,3]
([1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン研)

13:00 2P-H111 低温菌シンプル酵素触媒における補酵素再生系に関する研究
……○森 一将, 津々木 亜美, 田島 誉久, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 中島田 豊, 加藤 純一（広島大院・先端物質）

14:00 2P-H112 *Corynebacterium glutamicum* を用いたセルロース系バイオマスからのカダベリン生産技術の開発
……○松浦 礼奈, 岸田 真裕美, 平田 有希, 田中 勉, 近藤 昭彦（神戸大院・工）

13:00 2P-H113 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の発酵生産収率向上のための大腸菌の代謝工学的改変
……○濵野 雄大[1], 柘植 陽太[2], 梶田 真也[3], 政井 英司[4], 片山 義博[5], 敷中 一洋[6], 大塚 祐一郎[7], 中村 雅哉[7], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]農工大・生物システム応科, [4]長岡技科大, [5]日大・生資科, [6]農工大院・工, [7]森林総合研)

【醸造学，醸造工学】

14:00 2P-F114 清酒酵母から自然に得られた染色体数の異なる一倍体株の代謝解析によるミトコンド リア活性の推定

…… ○藤丸 裕貴[1], 門脇 真史[1], 田口 誠我[1], 澤田 和敬[2], 赤尾 健[3], 野口 英樹[4], 豊田 敦[4], 藤山 秋佐夫[4,5], 北垣 浩志[1]
([1]佐賀大・農, [2]佐賀県工業技術センター, [3]酒総研, [4]国立遺伝研・DDBJ 研究セ, [5]総合研究大学院大学 遺伝学専攻)

13:00 2P-I115 醤油の主発酵酵母における接合型決定機構の解析

…… ○渡部 潤, 上原 健二, 月岡 祐一郎（ヤマサ醤油）

14:00 2P-I116 熱安定性の向上した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 が清酒酵母の発酵力に及ぼす影響

…… ○大橋 正孝[1], 那須野 亮[2], 渡辺 大輔[2], 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)

13:00 2P-I117 嫌気条件が清酒酵母の葉酸含量に与える影響の解析

…… ○村上 葉月[1,2], 原田 春佳[1,2], 上佐古 大貴[1,2], 濱田 涼子[2], 金井 宗良[2], 藤井 力[1,2]
([1]広島大院・生物圏, [2]酒総研)

14:00 2P-I118 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる葉酸高蓄積機構

…… ○柴田 裕介[1], 高橋 俊成[1], 藤井 力[2], 赤尾 健[2], 五島 徹也[2], 山田 翼[1], 末野 和男[1]
([1]菊正宗酒造, [2]酒総研)

13:00 2P-I119 清酒酵母のペルオキシン遺伝子変異によるリンゴ酸生産能の上昇

…… ○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 秦 洋二（月桂冠・総研）

14:00 2P-N120 有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析

…… ○山元 翔太[1], 池下 実咲[2], 清 啓自[1], 久保田 恵理[3], 兼崎 友[3], 鈴木 健一朗[1], 門倉 利守[1], 中山 俊一[1]
([1]東農大院・農, [2]東農大・応生科, [3]東農大・ゲノムセ)

13:00 2P-N121 高リンゴ酸・低酢酸生産性変異株 DNPR38 の網羅的転写解析

…… ○西村 友里[1], 山元 翔太[1], 久保田 恵理[2], 兼崎 友[2], 鈴木 健一朗[1], 門倉 利守[1], 中山 俊一[1]
([1]東農大院・農, [2]東農大・ゲノムセ)

14:00 2P-I122 酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク調節

…… ○渡辺 大輔, 高木 健一, 吉岡 直哉, 杉本 幸子, 高木 博史（奈良先端大・バイオ）

13:00 2P-I123 パン酵母の高発酵力を生み出す遺伝的要因の探索

…… ○梶原 拓真, 渡辺 大輔, 高木 博史（奈良先端大・バイオ）

【食品科学，食品工学】

14:00 2P-I124 乳酸菌と食物繊維およびムチンとの相互作用の解析

…… ○山崎 思乃[1], 倉光 香奈[2], 谷口 茉莉亜[1], 片倉 啓雄[1]
([1]関西大・化生工, [2]関西大院・理工)

13:00 2P-I125 酢酸菌由来外膜小胞の産生と性質

…… ○橋本 雅仁, 松元 太一, 馬場 梨沙子, 大薗 まみ, 橋口 周平（鹿児島大院・理工）

14:00 2P-N126 出芽酵母における梨幼果添加による経時寿命の延長

…… ○村田 和加恵[1], 長谷川 真梨菜[1], 酒瀬川 世瑠[1], 荻田 亮[2,3], 藤田 憲一[2], 田中 俊雄[2]
([1]米子高専, [2]阪市大院・理, [3]阪市大・健康研セ)

13:00 2P-N127 非イオン性界面活性剤ジグリセロールモノラウレートによる不可逆的な真菌液胞膜障害作用

…… 池側 智香子[1], 土井 剛志[2], 熊澤 史貴[2], 村田 和加恵[3], ○荻田 亮[1,4], 藤田 憲一[1], 田中 俊雄[1]
([1]阪市大院・理, [2]太陽化学, [3]米子高専, [4]阪市大・健康研セ)

14:00 2P-N128 ポリグルタミン酸による IL-12 遺伝子発現誘導効果に及ぼす PGA 合成関連遺伝子 *pgsE* の影響
…… 中野 太一[1], 吉田 泉[2], 三嶋 隆[2], 高橋 良輔[3], 北村 進一[3], 山口 良弘[4], 荻田 亮[5], 田中 俊雄[1], ○藤田 憲一[1]
([1]阪市大院・理, [2]日本食品分析セ・彩都研, [3]阪府大院・生環科, [4]阪市大・複合先端, [5]阪市大・健康研セ)

13:00 2P-N129 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得
…… ○三木 健夫, 篠筒 光慶（山梨大院・医工総）

14:00 2P-I130 冷凍パン生地製法に適した冷凍耐性酵母の探索と評価
…… ○森本 一輝[1], 小西 正朗[2]（[1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工業大学・工・地域未来デザイン工学）

13:00 2P-F131 大気圧低温プラズマによる出芽酵母殺菌過程の解析
…… 糸岡 洸樹, ○井沢 真吾（京工繊大院・工芸科学）

14:00 2P-I132 *Saccharomyces cerevisiae* 子嚢胞子の耐熱性に対する炭酸ガスとアルコールの影響
…… ○浅野 静, 伊藤 大和, 佐藤 英明, 飯島 和丸, 舛田 晋, 渡邊 哲也（アサヒビール）

13:00 2P-I133 *Bacillus subtilis* C-3102 株が産生する新規ビフィズス菌増殖因子の同定
…… ○畑中 美咲, 森田 寛人, 青柳 有美, 中村 哲平（アサヒグループホールディングス・コアテク研・フローラ技術部）

14:00 2P-I134 水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響の時間栄養学的解析
……○千々岩 樹佳[1,2], 丸山 徹[1,2], 青木 菜摘[1], 細川 正人[3,4], 柴田 重信[5], 竹山 春子[1,2,3]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ, [5]早大院・先進理工・電生）

13:00 2P-I135 キムチ中 D-アミノ酸の保存期間における経時的プロファイル変動の調査
…… ○谷口 百優, 紺屋 豊, 中野 洋介, 福崎 英一郎（阪大院・工）

14:00 2P-I136 自動プレカラム誘導体化-HPLC 法によるアミノ酸のキラル分離
…… ○熊谷 浩樹（アジレント・テクノロジー（株））

13:00 2P-N137 ペプチド一斉分析と多変量解析による牛乳アレルギー治療乳のプロファイリング
……倉林 篤史[1], 佐藤 大[1], 栗本 昌樹[2], 中田 創[2], 越智 浩[2], 阿部 文明[2], ○鈴木 秀幸[1]
([1]かずさ DNA 研, [2]森永乳業・素材研）

14:00 2P-I138 多孔性担体を用いた機能性ペプチド腸輸送技術の開発
…… ○今井 健人[1], 清水 一憲[1], 上村 光浩[2], 小川 光輝[2], 本多 裕之[1]
([1]名大院・工, [2]富士シリシア化学）

13:00 2P-I139 *Kluyveromyces lactis* 由来 β-ガラクトシダーゼ製剤における陰イオン交換膜を用いたプロテアーゼの一段階除去
…… ○吉川 潤, 塩田 一磨（合同酒精・酵素医薬品研）

14:00 2P-I140 小麦ふすま, コーンと大豆種皮の高度酵素分解
…… ○柴田 晃, 笠井 尚哉（阪府大院・生環科）

13:00 2P-N141 Phytochemical characteristics and pharmaceutical activity of ethanol extract from *Helicteres angustifolia* L. stem
…… ○Junyi Zhu, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

14:00 2P-N142 養液栽培法による非遺伝子組み換えの機能性ホウレンソウの作製
…… ○渡辺 祥[1], 大谷 優太[1], 立上 陽平[1], 青木 航[1,3], 雨宮 崇[2], 助清 泰教[2], 窪川 清一[2], 植田 充美[1,3]
([1]京大院・農, [2]三菱ケミカル (株) (旧 三菱樹脂 (株)), [3]京都バイオ計測センター）

13:00 2P-I143 *Lactobacillus brevis* を用いた GABA 含有デーツ残渣発酵エキスの開発
……○長谷川 桃子[1,2], 越澤 大典[2], 船戸 耕一[2], 吉田 充史[1], 三本木 至宏[2]
([1]オタフクソース・研究室, [2]広島大院・生物圏）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

14:00 2P-I144 微生物の BDF 廃液代謝における夾雑物の影響評価
……○滝口 昇[1,2], 内山 佳祐[2], 川西 琢也[1,2]（[1]金沢大・理工, [2]金沢大院・自科）

13:00 2P-I145 バイオディーゼル燃料生産に適した油脂生産微細藻類の単離と油脂生産能評価
……○樫尾 浩貴[1], 紅谷 貴之[1], 髙 未麗[1], 松村 吉信[1,2]
（[1]関西大・化生工, [2]関西大・ORDIST）

14:00 2P-I146 油脂高蓄積クラミドモナス株の選抜育種によるバイオ燃料生産「明暗周期問題」の克服
……○加藤 悠一[1], 藤原 悠右[1], 小山 智己[1], 張 嘉修[2], 蓮沼 誠久[1], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]国立成功大・化工）

13:00 2P-I147 バイオ燃料生産への利用に向けた水面浮遊性微細藻類におけるオイル生産性向上
……○石塚 裕貴, 野島 大佑, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛（農工大院・工）

14:00 2P-I148 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
……○神藤 定生[1], 中尾 領亜[2], 坂本 拓郎[2], 細田 晃文[2], 田村 廣人[2]
（[1]名城大理工, [2]名城大農）

13:00 2P-I149 微細藻類における油脂生産時の葉緑体分解
……○三宅 誠人, 齊宮 史佳, 阿野 嘉孝（愛媛大院・農）

14:00 2P-I150 *Euglena gracilis* を用いた有用物質生産
……○吉岡 和政[1], 冨田 結芙子[2], 小山内 崇[1,2]（[1]明治大・農, [2]明治大院・農）

13:00 2P-I151 海洋性アルギン酸分解菌叢および *Nitratireductor* sp. OM-1 株を用いた 2 段階培養によるアルギン酸からのバイオディーゼル生産
……○喜多 晃久[1,3], 中井 昇太[1], 三浦 豊和[1,3], 高橋 宏和[1,3], 岡村 好子[1,3], 秋 庸裕[1,3], 松村 幸彦[2,3], 田島 誉久[1,3], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,3]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工・エネ環, [3]JST・CREST）

14:00 2P-I152 食物残渣の短鎖および中鎖脂肪酸生産への利用可能性評価
……○張 傛喆, 林 悟, 矢島 由佳, モタカトラ レッディー（室工大院・工・環境創生）

13:00 2P-I153 高分子ゲル封入培養法による微細藻類の細胞凝集体形成と増殖・脂質蓄積速度の促進
……○吉冨 徹[1], 神永 紗英子[1], 豊島 正和[1,2], 佐藤 直樹[1,2], 真崎 康博[3], 吉本 敬太郎[1,4]
（[1]東大院・総合文化, [2]JST・CREST, [3]北里大・理, [4]JST・さきがけ）

14:00 2P-I154 二相培養による糸状性シアノバクテリアからの有用物質の生産と抽出
……○青木 仁一[1], 川又 透[1], 小高 明日香[1], 皆川 真之[1], 岡田 克彦[2], 今村 信和[2], 都筑 幹夫[2], 朝山 宗彦[1]
（[1]茨城大・農, [2]東薬大・生命科）

13:00 2P-I155 *Cyanidioschyzon merolae* からフィコシアニン抽出を促進する溶液の開発
……○丹羽 杏奈, 澤井 歩, 小山内 崇（明治大・農）

14:00 2P-N156 スギ改質リグニン抽出残渣からの並行複発酵による乳酸製造
……○池 正和[1], Guan Di[1], 山岸 賢治[1], 荒井 隆益[2], 小杉 昭彦[2], 徳安 健[1]
（[1]農研機構・食品研, [2]国際農研セ）

13:00 2P-N157 Utilization of rice straw to L-lactic acid in open fermentation using thermophilic lactic acid bacterium
……○Jiaming Tan[1], Mohamed Ali ABDEL-RAHMAN[1,2], Yukihiro Tashiro[1], Takeshi Zendo[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,3]
（[1]Fac. Agric., Kyushu Univ., Japan, [2]Fac.Sci., Al-Azhar Univ., Egypt, [3]Bio-Arch., Kyushu Univ., Japan）

14:00 2P-I158 白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による乳酸産生に適した lactate dehydrogenase 遺伝子の探索
……○加古 博子[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院）

13:00 2P-I159 組換え大腸菌による新規モノマー組成からなる乳酸ベースポリマーの生合成
……○後藤 早希[1], 外村 彩夏[2], 田口 精一[3], 松本 謙一郎[4], 阿部 英喜[5], 田中 賢二[6], 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]東農大・生命科学, [4]北大院・工, [5]理研-CSRS, [6]近大・産理工)

14:00 2P-I160 組換え微生物による生分解性共重合ポリエステルの生合成
……○森 恵美[1], 倉富 優季[1], 後藤 早希[1], 脇田 和[2], 外村 彩夏[2], 阿部 英喜[3], 田中 賢二[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]理研-CSRS, [4]近畿大・産理工)

13:00 2P-N161 CO_2 からの共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HHx)生合成と PhaJAc 遺伝子の導入効果
……○森 舜也[1], 丸尾 浩希[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
([1]近大院・産理工・生還化, [2]東工大院・生命理工)

14:00 2P-I162 Lactyl-CoA 重合における乳酸重合酵素の反応機構解析
……○飯島 翠[1], 松本 謙一郎[1,2], 堀 千明[1,2], 田口 精一[1,2,3], 大井 俊彦[1,2]
([1]北大院・工, [2]CREST-JST, [3]東農大・生命科)

13:00 2P-I163 *Aeromonas caviae* 由来ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の C 末端改変とポリマー生産性向上
……○廣江 綾香[1], 田口 精一[1], 柘植 丈治[2] ([1]東農大, [2]東工大)

14:00 2P-N164 転写因子欠失株を用いた乳酸ベースポリマー生産大腸菌のリモデリング
……○門屋 亨介[1,2], 児玉 悠[3], 松本 謙一郎[2,3], 大井 俊彦[2,3], 田口 精一[1,2]
([1]東京農業大学・生命科・生化, [2]JST・CREST, [3]北大院・工)

13:00 2P-I165 ポリ（乳酸-*co*-3-ヒドロキシ酪酸）フィルムの柔軟性に及ぼす結晶性と熱物性の影響
……○石井 大輔[1,3,5,6], 滝沢 憲治[2,4], 松本 謙一郎[2,5], 大井 俊彦[2,5], 引間 孝明[6], 高田 昌樹[6], 岩田 忠久[3,5,6], 田口 精一[1,2,6]
([1]東農大・生命科, [2]北大院・工, [3]東大院・農生科, [4]東京家政大, [5]JST-CREST, [6]理研・播磨研)

14:00 2P-I166 異なる焼成温度で作製した $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ 光触媒の太陽光下における水分解活性の比較
……○永井 大地, 祝 キ, 劉 ナ, 楊 英男（筑波大院・生命環境）

13:00 2P-F167 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産
……○片岡 尚也[1,2], Vangnai Alisa S.[3], 藥師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大院・創科, [2]山口大・中高温微セ, [3]チュラロンコン大)

【生物化学工学】

14:00 2P-J168 数理モデルを用いた人工遺伝子回路トグルスイッチの解析
……○出口 真里[1], 岡本 正宏[2], 花井 泰三[2], 濱田 浩幸[2]
([1]九大院・シス生科, [2]九大院・農)

13:00 2P-J169 大腸菌を用いたムコン酸の高効率発酵生産
……○藤原 良介[1], 野田 修平[2], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[1,2]
([1]神戸大院・工, [2]理研・バイオマス)

14:00 2P-J170 高度膜分離技術によるソルガム搾汁液からのスクロース分離および連続的エタノール生産
……○佐々木 建吾[1], 川口 秀夫[1], 荻野 千秋[2], 佐塚 隆志[3], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科学技術イノベーション, [2]神戸大院・工, [3]名大・生物機能セ)

13:00 2P-J171 Exploration of potential indigenous marine *actinomycetes* from indonesia soil producing enzyme lignocellulosic for biorefinery application
……○Apriliana Pamella[2], Nanik Rahmani[2], Fahrurrozi Izzuddin[2], Puspita Lisdiyanti[2], Jaemin Lee[1], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Bambang Prasetya[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Research Center for Biotechnology, LIPI., [3]National Standardization Agency of Indonesia)

14:00 2P-J172 大気圧低温プラズマによる分子シャペロン PFD の Folding 活性向上
……○小豆澤 友希[1], 井川 聡[2], 養王田 正文[3], 北野 勝久[4], 座古 保[1]
（[1]愛媛大学院 理工, [2]大阪産業技術研究所, [3]農工大院・工, [4]阪大院・工）

13:00 2P-J173 Importance of LEA peptide lengths in co-expression system to enhance biologically active recombinant protein expression
……○Nishit Pathak, Kohei Yano, Shinya Ikeno
（Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.）

14:00 2P-F174 テロメラーゼ活性を高める抽出液がヒト線維芽細胞の若返りに及ぼす影響
……○塩見 尚史, 渡邊 桂子（神戸女学院大・人間科学）

13:00 2P-J175 回転浮遊培養装置を用いたヒト iPS 細胞集塊培養
……○橋田 礼博[1], 植村 壽公[2], 紀ノ岡 正博[1]
（[1]阪大院・工・生命先端・生工, [2]阪大院・工・精科応物・精科）

14:00 2P-J176 ヒト iPS 細胞の育て方がエピジェネティクスに与える影響
……○秋山 真一, 紀ノ岡 正博, 金 美海（阪大院・工）

13:00 2P-J177 細胞内レドックス状態の制御に基づく哺乳動物細胞の概日時計操作
……○河合 和紀[1], 石川 聖人[1,2], 金子 真大[3], 中西 周次[2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]阪大・太陽エネ, [3]東大院・工）

14:00 2P-J178 レトロトランスポゾンを用いた遺伝子導入技術の開発
……○村上 舞[1], 河邉 佳典[2], 吉田 宗一郎[2], 井藤 彰[2], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・工）

13:00 2P-J179 光合成細菌投与による植物の成長促進効果
……○林 修平[1], 岩本 康成[2], 馬場 育美[1], 東垂水 健太[1],
平川 夕貴[1], 宮﨑 優[1], 山本 進二郎[1], 宮坂 均[1]
（[1]崇城大・生物生命, [2]崇城大院・工）

14:00 2P-J180 量子ドットナノプローブを用いたアミロイドβと PC12 細胞の相互作用の観察
……○山下 涼太, 板田 鉄平, 上井 幸司, 徳楽 清孝（室工大院・工・環境創生）

13:00 2P-J181 抗体固定化金ナノ粒子凝集の単一クラスター解析による Amylin アミロイド凝集体の高感度検出
……○中西 文香[1], 矢野 湧暉[1], 島崎 洋次[1], 増本 純也[2], 座古 保[1]
（[1]愛媛大学院理工, [2]愛媛大学院医学）

14:00 2P-N182 Decomposition of organic pollutant using archaerhodopsin-sensitized TiO_2 photocatalytic system
……○Xiong Geng[1], luomeng Chao[2], Gang Dai[3], Tatsuo Iwasa[1,4]
（[1]Adv. Production Syst. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan, [2]Anim. Sci. Technol., Inner Mongolia Nationalities Univ., China, [3]Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China, [4]Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan）

13:00 2P-J183 分子シャペロン Hsp90 と Hsp70 の機能に及ぼす天然小分子化合物レスベラトロールの影響
……○仲本 準, 宮本 悠里（埼玉大院・理工・分子）

14:00 2P-N184 Production of novel methylated resveratrol analogs from sequential biotransformation of resveratrol by two recombinant *Escherichia coli*
……○Te-Sheng Chang
（Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan）

13:00 2P-N185 撥液性材料を利用した気中乾燥法による微生物包括カプセルの作製および微生物傷害性の検証
……○武井 孝行, 濵田 周吾, 吉田 昌弘（鹿児島大院・理工）

14:00 2P-J186 生物鉱物化現象を模倣したレアアースイオンの選択的回収
……○畠中 孝彰[1], 松上 明正[2], 林 文晶[2], 石田 亘広[1]
（[1]豊田中研, [2]理研・ライフサイエンス技術基盤研究セ）

13:00 2P-N187 ストロンチウムがツバキ花粉の生理活性に与える影響の解析
……○中村 真由, 望月 玲於, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

14:00 2P-N188 A high throughput screening and isolation method for phosphate accumulating microbes
……○Anand Ajeeta, Hideki Aoyagi
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 2P-J189 SCF 法を用いた強酸性条件下における未培養微生物の培養化
…… ○高野 力[1], 村山 晃一[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]フタムラ化学）

14:00 2P-J190 振盪フラスコ培養中のフラスコ気相部が培養微生物群集に及ぼす影響の解析
…… ○高橋 将人, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

13:00 2P-J191 物理的な前処理法を活用した樹皮試料からの新規微生物の培養化
…… ○小林 和輝[1], 村山 晃一[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]フタムラ化学）

【バイオプロセス】

14:00 2P-N192 ピルビン酸高生産大腸菌を利用した D-乳酸の生産
…… ○秋田 紘長[1], 中島 信孝[2,3], 星野 保[1,3]
（[1]産総研・機能化学, [2]東工大院・生命理工, [3]産総研・生物プロセス）

13:00 2P-J193 顕微ラマン分光法を用いた微生物内における生理活性物質の *in situ* 検出
…… ○宮岡 理美[1], 安藤 正浩[2], 細川 正人[2,3], 中島 琢自[4],
松本 厚子[4], 高橋 洋子[4], 濵口 宏夫[5], 竹山 春子[1,2,6]
（[1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]JST・さきがけ,
[4]北里大, [5]台湾国立交通大, [6]産総研・早大 CBBD-OIL）

14:00 2P-J194 出芽酵母によるフリルアクロレインの変換およびそのメカニズムの検討
…… ○佐藤 守, 大竹 遥, 宮越 俊一（群馬高専 専攻科）

13:00 2P-J195 オーランチオキトリウムを原料とした DHA 強化卵産生鶏飼料の開発
……○多田 清志[1], 伊藤 順子[1], 吉田 昌樹[2], 渡邉 信[1], 赤上 雅子[3], 石川 恭子[3]
（[1]筑波大・ABES, [2]筑波大院・生命環境, [3]茨城畜産セ）

14:00 2P-J196 高光学純度（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸を用いた高分子の開発とその生分解
……○常盤 豊[1], 中山 敦好[1], 川崎 典起[1], 山野 尚子[1], 伊田 小百合[1], 楽 隆生[2], 世嘉良 宏斗[3]
（[1]産総研, [2]甲南化工, [3]沖縄県工技セ）

13:00 2P-J197 *Halomonas* sp. OITC1261 株による高光学純度（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸の好気的発酵生産
…… ○世嘉良 宏斗[1], 照屋 盛実[1], 花城 隆二[1], 合田 雅浩[1], 常盤 豊[2]
（[1]沖縄県工技セ, [2]産総研・バイオメディカル）

14:00 2P-J198 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるマンニトールの効率的変換
…… ○冨田 晃佑[1], 田島 誉久[1], 渡邉 研志[1], 秋 庸裕[1],
岡村 好子[1], 松村 幸彦[2], 中島田 豊[1], 加藤 純一[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工）

13:00 2P-J199 *Citrobacter* 属細菌の生産するキトサン様バイオ凝集剤の中空糸膜による濃縮
…… ○武尾 正弘[1], 長山 尚輝[1], 木村 和幸[2], バランワル プリヤンカ[1],
柏 雅美[1], 加藤 太一郎[3], 根来 誠司[1]
（[1]兵庫県大院・工, [2]（株）兵庫分析センター, [3]鹿児島大院・理工）

14:00 2P-J200 ホモ三量体ファイバータンパク質 AtaA の菌体外分泌生産の検討
……○唐鎌 智也[1], 石川 聖人[1], 石井 慧[1], 吉本 将悟[1,2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）

13:00 2P-J201 低分子化抗体精製用アフィニティークロマト担体の機能評価
…… ○西八條 正克[1,2], 村田 大[1,2], 吉田 慎一[1,2], 水口 和信[1,2]
（[1]（株）カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）

14:00 2P-N202 新規プロテイン L アフィニティ―充填剤の抗体との結合親和性解析と機能評価
…… ○小林 秀峰[1], 松葉 隆雄[1], 円谷 健[2], 藤井 郁雄[2]
（[1]東ソー, [2]阪大院・理）

13:00 2P-J203 ムコン酸生産の律速反応である “Protocatechuate decarboxylase” を活性化する因子の機能解明
……○尾形 拓哉, 栗本 祐樹, 園木 和典（弘前大院・農生）

【生体医用工学】

14:00 2P-N204 タンパク質成分の導入による酸化還元応答性ハイドロゲルの細胞培養基材としての機能化
……○神谷 典穂[1,2], 濱田 祐成[1], 香川 元気[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ）

13:00 2P-J205 神経筋接合部解析のための細胞アッセイデバイスの開発
……○山岡 奈央[1], 清水 一憲[1], 今泉 裕[1], 伊藤 卓治[2], 岡田 洋平[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]愛知医大・神経内科, [3]名大・予防早期医療創生セ）

14:00 2P-J206 B 型肝炎ウイルス由来ペプチドを用いた AFM による肝細胞の受容体検出
……○西田 真一朗[1], 竹中 武蔵[1], 森田 健太[2], 西村 勇哉[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[3]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大研究基盤センター, [3]神戸大院・イノベ）

13:00 2P-J207 B 型肝炎ウイルスの新規細胞接着ドメインの同定及び DDS への応用
……○劉 秋実[1,2], 曽宮 正晴[1], 黒田 俊一[1,2]（[1]阪大・産研, [2]阪大院・生命機能）

14:00 2P-J208 抗体提示型 GL-Virosome によるマクロファージ特異的薬剤送達法の開発
……○李 昊[1,2], 立松 健司[1,2], 曽宮 正晴[1,2], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大・産研, [2]阪大院・生命機能）

13:00 2P-J209 数理システム生物学に基づく黄色ブドウ球菌病原性発現兆候の早期特定と早期治療
……○濱田 浩幸[1,2], 浅村 健太[2], 出口 真里[2], 岡本 諒太[2], 花井 泰三[1,2], 岡本 正宏[1,2]
（[1]九大院・農, [2]九大院・シス生科）

14:00 2P-N210 ポリウレタンナノファイバー表面へのタンパク質吸着挙動の解析とその構造および活性変化の評価
……○森田 祐子[1], 坂元 博昭[1,2], 末 信一朗[1,2]（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大学・生命セ）

13:00 2P-N211 Development of a label-free, sample recoverable detection system for the early diagnosis of pancreatic cancer
……○Dohyun Lee, Jangsun Hwang, Saad Muhammad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
（Sch. Integr. Eng., Chung-Ang Univ.）

14:00 2P-N212 Aptamer grafted hydroxyapatite for promoting angiogenesis and bone regeneration
……○Jaewoo Son, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

13:00 2P-N213 Preparation of Beta glucan particles as an efficient drug delivery system
……○Kyungwoo Lee, Youngmin Seo, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Chanhwi Park, Dohyun Lee, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chugang Univ.）

14:00 2P-N214 Synthesis of oxygen containing microbubbles for reversal of hypoxia in cancer cells
……○Muhammad Saad Khan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

13:00 2P-N215 Production of Apoferritin (AFTN) nanoprobes for the detection of sensitive pathogen
……○Sachin Chavan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

14:00 2P-N216 Study of tumor cell characteristic changes by culturing in different platforms
····· ○Yeonho Jo, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

13:00 2P-N217 Synthesis of silver/copper/graphene oxide composite and its antimicrobial effects
·····○Chanhwi Park, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Jonghoon Choi
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

14:00 2P-N218 Study of anti-biofilm activity and mechanism of copper nanoparticles / multi-walled carbon nanotubes complexes
····· ○Jonghoon Choi, Jangsun Hwang, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Wyungwoo Lee, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Chanhwi Park, Youngmin Seo, Hojeong Jeon
（Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.）

13:00 2P-J219 掻痒感抑制を目的とした新規アトピー性皮膚炎抑制デバイスの創製
····· 藤澤 彩乃[1], 鄭 雄一[1], ○下畑 宣行[2]（[1]東大院・工, [2]立命館大・生命科学）

14:00 2P-N220 B 型肝炎ウイルス感染機構に基づく NF-κB 転写活性抑制ペプチド sMPAID の肝臓特異的送達法の開発
·····○徐 子暢[1,2], 立松 健司[1], 岡本 一起[1], 曽宮 正晴[1], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大院・理, [2]阪大・産研）

【バイオセンシング，分析化学】

13:00 2P-J221 機能性銀ナノ粒子を利用した迅速・高感度芽胞検出技術の開発
····· ○池野 慎也[1,2], 前川 貴宏[1]（[1]九工大院・生体工, [2]九工大・バイオマイクロ技セ）

14:00 2P-J222 ジカウイルスの迅速・高感度検出に向けた量子ドット・金ナノ粒子間局所表面プラズモン共鳴効果の安定化
·····○竹村 謙信[1], Adegoke Oluwasesan[2], 朴 龍洙[1,2], 鈴木 哲朗[3]
（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化, [2]静岡大グリーン科技研, [3]浜医大・医・医学科）

13:00 2P-N223 酸化鉄/金ナノ粒子を修飾したカーボンナノマテリアルを用いた導電性モニタリングシステムによるインフルエンザウイルス DNA 検出法
····· ○森田 真広[1], Lee Jaewook[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻, [2]静大・グリーン科技研）

14:00 2P-J224 Iron oxide/gold nanoparticles decorated graphene for biosensing application
····· ○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[2], Masahiro Morita[2], Enoch Y. Park[1,2]
（[1]Res. Inst. Green Sci. Technol, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.）

13:00 2P-N225 ナノファイバーをガイドとしたカーボンナノチューブ配向電極の開発と そのバイオデバイスへの応用
·····○藤原 郁也[1], 森田 祐子[1], 松崎 祥平[1], 坂元 博昭[1,2], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大学・生命セ）

14:00 2P-J226 Colorimetric detection of Norovirus-like particles using peroxidase-like activity of positively-charged gold nanoparticles
·····○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Tetsurou Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infectious Disease, Hamamatsu Univ. Sch. Med.）

13:00 2P-J227 固定化酵素方式バイオセンサを用いた L-アラニル-L-グルタミン定量法の開発
····· ○奥河内 貴大, 林 隆造（王子計測機器）

14:00 2P-F228 精確な濃度が付与された DNA 認証標準物質の開発

……○柴山 祥枝[1], 松倉 智子[2], 佐々木 章[2], 藤井 紳一郎[1], 稲垣 和三[1], 山崎 太一[1], 吉岡 真理子[1], 関口 勇地[2], 野田 尚宏[2], 高津 章子[1]
([1]産総研・物質計測標準, [2]産総研・バイオメディカル)

13:00 2P-J229 微小液滴の融合・分割機構を利用した 1 細胞レベルでのゲノム増幅と特異的遺伝子配列検出法の開発

……○高橋 海[1], 西川 洋平[1], 細川 正人[2,3], 竹山 春子[1,3,4]
([1]早大・先進理工, [2]JST・さきがけ, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]産総研・早大 CBBD-OIL)

14:00 2P-J230 光切断性ペプチドアレイと質量分析計の組み合わせによる配列網羅的なプロテアーゼ切断部位同定技術の開発

……○栗本 昌樹[1], 清水 一憲[2], 越智 浩[1], 阿部 文明[1], 本多 裕之[2,3]
([1]森永乳業, [2]名大院・工, [3]名大・予防早期医療創生セ)

13:00 2P-J231 MMLV 逆転写酵素，耐熱型 DNA ポリメラーゼおよび DNA/RNA ヘリカーゼの組み合わせによる高感度な one-step RT-PCR

……岡野 啓志[1], 馬場 美聡[1], 山﨑 朋美[1], 秀瀬 涼太[2], 藤原 伸介[2], 柳原 格[3], 宇治家 武史[4], 林 司[4], 兒島 憲二[1], 滝田 禎亮[1], ○保川 清[1]
([1]京大院・農, [2]関西学院大, [3]大阪母子医療センター, [4]カイノス)

ランチョンセミナー

2L-G01 東ソー株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（11:45〜12:45）

2L-H02 アジレント・テクノロジー株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（11:45〜12:45）

2L-I03 タカラバイオ株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（11:45〜12:45）

2L-J04 パラミロン研究会

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（11:45〜12:45）

第 3 日（9 月 13 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（生物工学奨励賞（江田賞・斎藤賞））

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（15:10〜15:30）

15:10 3A-Cp01 **〈生物工学奨励賞（江田賞）〉** 座長：**吉田 聡**

醤油酵母における香気成分の生成機構に関する研究

…… ○渡部 潤（ヤマサ醤油）

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（15:10〜15:30）

15:10 3A-Ap01 **〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉** 座長：**福崎 英一郎**

超好熱菌由来酵素の構造機能相関研究とその応用

…… ○古賀 雄一（阪大院・工）

シンポジウム（午前の部）

設計生物学による組み合わせ：人工細胞から組織デバイスまで

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（9:00〜11:00）

座長：**青木 航**

9:00 3S-Aa01 設計生物学：生物工学を指数関数的に進展させる方策

…… 鮎川 翔太郎[1], ○木賀 大介[2]（[1]早大・理工総研, [2]早大・先進理工）

9:20 3S-Aa02 微生物表現型を制御する人工遺伝子回路設計

…… ○相馬 悠希[1], 花井 泰三[2]（[1]九大・生医研, [2]九大院・農）

9:40 3S-Aa03 機能的な組織培養モデル構築による人工生命システムの試み

…… ○玉井 美保[1,2], 藤山 陽一[3], 田川 陽一[2]

（[1]北大院・歯, [2]東工大・生命理工, [3]島津製作所）

座長：**木賀 大介**

10:00 3S-Aa04 多様な遺伝子の連結組み合わせを実現する OGAB 法による長鎖 DNA 合成

…… ○柘植 謙爾（神戸大院・科学技術イノベーション）

10:20 3S-Aa05 2 次元・3 次元膜ダイナミクスの再構成と細胞信号伝達

…… ○高木 昌宏, 下川 直史（北陸先端大・マテリアル）

10:40 3S-Aa06 人工細胞を用いた，生命科学における還元的方法と構成的方法の統合

…… ○青木 航, 古村 峻, 植田 充美（京大院・農）

発酵醸造微生物育種の新発想アプローチ

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（9:00〜11:00）

座長：**丸山 潤一**

9:00 3S-Ba01 リファンピシン耐性による納豆菌の育種法と応用
……○木村 啓太郎[1], 久保 雄司[2]（[1]農研機構 食品部門, [2]茨城県工技セ）

9:24 3S-Ba02 染色体数の異なる清酒酵母の作出とその醸造特性―遺伝子組換を使わない染色体操作技術―
……藤丸 裕貴[1], 門脇 真史[1], 田口 誠我[1], 阪本 真由子[1], 野口 英樹[2,3], 豊田 敦[3], 藤山 秋佐夫[2,3], 赤尾 健[4], ○北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]情報・システム研究機構, [3]国立遺伝研・DDBJ 研究セ, [4]酒総研）

9:48 3S-Ba03 出芽酵母において染色体の大規模改変を可能にする CRISPR-PCS 法を用いた菌株育種
……○笹野 佑[1], 杉山 峰崇[2], 原島 俊[1]（[1]崇城大・生物生命, [2]阪大院・工）

座長：**北垣 浩志**

10:12 3S-Ba04 麹菌における Cre-*loxP* システムの利用と TALEN を用いたゲノム編集
……○水谷 治[1,2], 山田 修[2], 家藤 治幸[2]（[1]琉球大・農, [2]酒総研）

10:36 3S-Ba05 麹菌実用株の分子育種を可能にする―CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集
……片山 琢也, ○丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）

国際展開する日本の生物工学〜海外事業化研究の実例から〜

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（9:00〜11:00）

座長：**廣岡 青央**

9:00 3S-Ca01 バイオテクノロジー分野におけるグローバル知財戦略
……○秋元 浩（知的財産戦略ネットワーク）

9:30 3S-Ca02 ハラールサイエンスとバイオセンサー
……○民谷 栄一（阪大院・工）

座長：**西川 正洋**

10:00 3S-Ca03 酒米新品種と革新的栽培・醸造技術の活用による日本酒輸出促進への取組
……○杉本 琢真（兵庫県立農林水産技術総合センター）

座長：**本田 孝祐**

10:30 3S-Ca04 酵素技術によるクラスターデキストリンの実用化と国際展開
……○古屋敷 隆[1], 高田 洋樹[2], 栗木 隆[1]（[1]江崎グリコ（株） 健康研, [2]江崎グリコ（株） グループ研企室）

生合成再設計の深化で挑む複雑骨格機能分子の創出
共催：科研費新学術領域研究・生合成リデザイン

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（9:00〜11:00）

9:00 はじめに
……阿部 郁朗

座長：**阿部 郁朗**

9:05 3S-Da01 Cyclopenase, hemocyanin-like enzyme converting 6,7-bicyclo ring of cyclopenin to form 6,6-quinolone core of viridicatin-type fungal alkaloid
……○Kenji Watanabe（Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka）

9:30 3S-Da02 放線菌の持つ二次代謝産物生合成に用いられる亜硝酸生合成経路
……○勝山 陽平（東大院・農生科）

座長：**濱野 吉十**

9:50 3S-Da03 麹菌異種発現系を利用した糸状菌由来二次代謝産物の生合成研究
……○南 篤志, 及川 英秋（北大院・理）

10:10 3S-Da04 テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する
……○梅野 太輔, 小野 航央, 田代 美希, 大谷 悠介, 河合 繁子（千葉大院・工）

10:30 3S-Da05 放線菌由来天然化合物の骨格形成機構の解明
……○葛山 智久（東大・生物工学セ）

10:55 おわりに
……濱野 吉十

シンポジウム（午後の部）

"Smart Cell Industry" A New Trend in Bioeconomy 《国際シンポジウム》

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（15:30〜17:30）

座長：**Jian-Jiang Zhong**

15:30 3S-Ap01 Introduction: "Smart cell industry" a new trend in bioeconomy
……○Toshiya Muranaka（Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.）

座長：**Toshiya Muranaka**

15:50 3S-Ap02 Natural product synthetic biology: From bacteria to plant
……○Yong Wang
（Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences）

16:15 3S-Ap03 Higher fungus as a promising cell factory: A story about Lingzhi (Reishi)
……○Jian-Jiang Zhong, Han Xiao, Wen-Fang Wang
（State Key Lab. Microb. Metab., Dept. Bioeng., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.）

座長：**Atsushi Okazawa**

16:40 3S-Ap04 Production of high functional products using plants by manipulation of gene expression and growth
……○Eiji Goto（Fac. Horticul., Chiba Univ.）

17:05 3S-Ap05 Challenge to development of “smart” microorganisms based on information analysis and its application to production of highly functional compounds
……○Tomohisa Hasunuma（Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ）

細菌からヒトにおける多彩な抗菌ペプチド：その作用機序，生体防御機能などを探る

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（15:30〜17:30）

15:30 はじめに
……園元 謙二

座長：**田口 精一**

15:36 3S-Bp01 ランチビオティック研究のパラダイムシフト：その作用機序，生合成機構など
……○園元 謙二, 中山 二郎, 善藤 威史（九大院・農）

16:03 3S-Bp02 食品タンパク質由来抗菌ペプチドの作用機序と多彩な生理活性の解明
……○谷口 正之, 落合 秋人（新潟大・自然研）

座長：**園元 謙二**

16:30 3S-Bp03 昆虫由来抗菌ペプチドの高活性化と作用機序解明のための新アプローチ
……○松本 謙一郎[1], 山崎 蔵亨[1], 川上 駿[1], 三吉 大地[1], 堀 千明[1], 田口 精一[1,2], 大井 俊彦[1], 橋本 茂樹[3]
([1]北大院・工, [2]東農大・生命科学, [3]東理大・基礎工)

16:57 3S-Bp04 α ディフェンシン：自然免疫，腸内細菌との共生，疾病への関与
……○綾部 時芳, 櫻木 直也, 中村 公則（北大院・生命科学）

17:24 おわりに
……田口 精一

醸造技術～もの造りの原点と将来【本部企画】

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（15:30～17:30）

15:30 はじめに
……山田 修

座長：**山田 修**

15:32 3S-Cp01 清酒醸造の技術革新 これまでとこれから
……○秦 洋二（月桂冠・総研）

16:01 3S-Cp02 醤油醸造技術の伝統を受け継ぎ未来へ活かす
……○仲原 丈晴（キッコーマン）

座長：**髙瀬 良和**

16:30 3S-Cp03 本格焼酎の製造技術の独自性，酒質の多様化および機能性
……○髙峯 和則（鹿児島大・農・焼酎・発酵学教育研究センター）

16:59 3S-Cp04 日本のワイン葡萄の父，川上善兵衛とその作出ブドウ品種
……○棚橋 博史（岩の原葡萄園）

17:28 おわりに
……髙瀬 良和

脳機能活性化や健康長寿の鍵となる機能性食品素材・農産物
共催：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」「次世代機能性農林水産物・食品の開発」，バイオインダストリー協会　機能性食品研究会

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（15:30～17:30）

座長：**水沼 正樹**

15:30 3S-Dp01 発酵食品「酒粕」による老化抑制及び脳機能活性化の検討
……○藤井 力[1,2], 伊豆 英恵[1], 松原 主典[3]
([1]酒総研, [2]広島大院・生物圏, [3]広島大院・教育)

15:54 3S-Dp02 腸内細菌由来ポリアミンを標的とした健康寿命伸長食品の開発
……○松本 光晴（協同乳業・研・技術開発）

座長：**藤井 力**

16:18 3S-Dp03 アミノ酸代謝が鍵となる酵母の長寿メカニズム
……○水沼 正樹（広島大院・先端物質）

16:42 3S-Dp04 玄米機能成分を活用した脳機能の改善
……○益崎 裕章[1], 小塚 智沙代[1,2], 金城 綾乃[1], 與那嶺 正人[1], 岡本 士毅[1], 田仲 秀明[1,3], 島袋 充生[4]
([1]琉大院・医, [2]ハーバード大・ジョスリン糖尿病セ, [3]田仲医院, [4]福島県立医大)

17:06 3S-Dp05 ロスマリン酸による脳機能改善機作の解析
……○小林 彰子[1], 篠原 もえ子[2], 浜口 毅[2], 山田 正仁[2]
（[1]東大院・農生科, [2]金沢大院・医）

医薬品・化成品開発のためのインビトロ細胞培養技術開発の新展開

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（15:30〜17:30）

座長：**杉浦 慎治**

15:30 3S-Gp01 創薬プロセスにおけるインビトロセルベーストアッセイ
……○荒木 徹朗（旭化成ファーマ・医薬研究セ・安全性動態研）

15:50 3S-Gp02 化学物質安全性試験に利用されるインビトロセルベーストアッセイ
……○斎藤 幸一（住友化学）

座長：**藤田 聡史**

16:10 3S-Gp03 創薬に求められる細胞規格と培養技術について：再生医療と比較した考察
……○伊藤 弓弦（産総研・創薬基盤）

16:30 3S-Gp04 創薬応用を目指した肝細胞組織工学
……○酒井 康行[1,2], 篠原 満利恵[2], 小森 喜久夫[1]（[1]東大院・工, [2]東大・生研）

16:50 3S-Gp05 創薬応用を目指した骨格筋細胞培養マイクロデバイスの開発
……○清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

座長：**清水 一憲**

17:00 3S-Gp06 Organs on a chip 研究の世界最新動向
……○藤田 聡史[1,2]（[1]産総研・バイオメディカル, [2]神戸大院・工）

17:10 3S-Gp07 Organs-on-a-chip を用いたインビトロセルベーストアッセイの産業化に向けた取り組み
……○杉浦 慎治, 金森 敏幸（産総研・創薬基盤）

17:20 総合討論

未培養微生物（微生物ダークマター）の培養，解析，利用に関する研究開発の最前線と展望

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（15:30〜17:30）

15:30 はじめに
……青柳 秀紀

座長：**青柳 秀紀**

15:33 3S-Hp01 未知微生物資源探索におけるファンクショナルメタジェノミクス法の可能性
……○木村 信忠[1,2]（[1]産総研・生物プロセス, [2]筑波大院・生命環境）

15:58 3S-Hp02 分離培養手法の革新：難培養性微生物の正体と資源としての可能性
……○青井 議輝（広島大院・先端物質）

座長：**木村 信忠**

16:23 3S-Hp03 従来の微生物培養法の特性：問題点と解決策の提案
……○青柳 秀紀, 高橋 将人, 斉藤 諒, 長谷川 智弘, 小林 和輝, 高野 力
（筑波大院・生命環境）

16:45 3S-Hp04 共生微生物によって生合成される海洋天然化合物
……○中尾 洋一, 町田 光史, 親泊 安基（早大・先進理工）

座長：**青柳 秀紀**

17:10 産官学パネルディスカッション

特別口頭発表 B（大会トピックス講演・生物工学学生優秀賞「飛翔賞」講演）

講演番号は同日の 13:00〜15:00 に実施するポスター発表での講演番号と共通です.
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨および別冊の大会トピックス集をご覧ください.

特別口頭発表 B3

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　E 会場（9:00〜11:00）

座長：**吉野 知子, 斎木 祐子**

【遺伝学，分子生物学および遺伝子工学】

9:00 3P-E022 ミミズにおける最適な異種遺伝子導入法の検討
……○山谷 竜大, 町田 悠, 土田 喜野, 伊佐 猛, 赤澤 真一（長岡高専・物質工）

【酵素学，タンパク質工学および酵素工学】

9:20 3P-E045 *In vitro* 人工代謝経路による L-システイン生産のモデル化と最適化
……○花谷 燿平[1], 谷口 博範[1], 岡野 憲司[1], 本田 孝祐[1], 井村 誠[2], 岩切 亮[2]
（[1]阪大院・工・生命先端工, [2]興人ライフサイエンス株式会社）

9:40 3P-E057 アスベストのバイオイメージングと細胞毒性解析
……○藤原 暢哉, 石田 丈典, 舟橋 久景, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
（広島大院・先端物質）

【代謝生理学・発酵生産】

10:00 3P-E069 蛍光タンパク質を用いた新規レシオメトリック酸化センサーの開発
……○坂元 仁[1,2], 古田 雅一[1,2,3], 土戸 哲明[1]
（[1]阪府大・21 科研セ・微制研セ, [2]阪府大・放研セ, [3]阪府大院・工・量子）

10:20 3P-E092 光合成電子伝達系との電子授受を媒介する細胞親和性レドックスポリマー
……○中西 周次[1,2], 田中 謙也[2], 金子 真大[3], 石川 聖人[1,4]
（[1]阪大・太陽エネセ, [2]阪大院・基礎工, [3]東大院・工, [4]名大院・工）

10:40 3P-E014 **〈生物工学学生優秀賞（飛翔賞）〉受賞者講演**
黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における分泌糖タンパク質に関する解析
……○李 秋実, 竹川 薫, 樋口 裕次郎（九大院・生資環）

特別口頭発表 B4

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　F 会場（9:00〜11:00）

座長：**大槻 隆司, 阿部 克也**

【醸造・食品工学】

9:00 3P-F109 14-デヒドロエルゴステロールを含む白麹 *Aspergillus kawachii* 抽出エキスの経口摂取による肌質改善効果

……○杉原 圭彦[1], 生嶋 茂仁[1], 三宅 美加[1], 矢田 幸博[3], 桐浴 隆嘉[2], 藤原 大介[2]
（[1]キリン（株） 健康技術研究所, [2]キリン（株） 基盤技術研究所, [3]筑波大院 グローバル教育院）

【環境バイオテクノロジー】

9:20 3P-F131 Designing a microbial co-culture for ammonification and nitrification of organic nitrogen

…… ○You-Shan Tsai[1], Sakuntala Saijai[1], Akinori Ando[1,2], Wakako Okada[1], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Jun Ogawa[1,2]
（[1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO）

9:40 3P-F147 白色腐朽菌 *Phanerochaete* sp. K-20 株のブタノール産生特性について

……○笠井 稜子[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院）

【生物化学工学】

10:00 3P-F170 LAL 固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用（第 4 報）

…… ○猪瀬 陽加, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

10:20 3P-F181 リグノセルロース系バイオマスを用いたキシリトールの効率的微生物生産

…… ○姜 林涛, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

【動物バイオテクノロジー】

10:40 3P-F203 高濃度アミノ酸入り培地を用いた未分化ヒト iPS 細胞の選択的細胞死

…… ○長島 拓則[1], 清水 一憲[1], 松本 凌[1], 本多 裕之[1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

特別口頭発表 A（一般講演　ショートプレゼンテーション）

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（9:00〜10:53）

セッション A5-1，A5-2，A5-3，A5-4（45 演題）　座長：**伊藤 隆, 川崎 寿**

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（9:00〜10:48）

セッション A6-1，A6-2，A6-3，A6-4（43 演題）　座長：**尾高 雅文, 中川 洋史**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（9:00〜10:55）

セッション A7-1，A7-2，A7-3，A7-4（46 演題）　座長：**上野 嘉之, 鈴木 市郎**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（9:00〜10:53）

セッション A8-1，A8-2，A8-3，A8-4（45 演題）　座長：**杉浦 慎治, 片山 葉子**

1 演題の登壇時間は 2 分 30 秒（発表 2 分），1 セッションは 30 分，セッション間の休憩時間はありません．詳しくは特別口頭発表 A スケジュール一覧をご参照ください．講演要旨については，スケジュール一覧に記載した各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

一般講演　ポスター発表

西早稲田キャンパス　63 号館 2 階　ポスター会場（13:00〜15:00）

【遺伝子工学】

13:00　3P-N001　白神こだま酵母より分離した酸化ストレス耐性株の解析
……○金田 絵里[1], 中沢 伸重[1], 高橋 慶太郎[2]（[1]秋田県大院・生資, [2]秋田総食研）

14:00　3P-G002　GPCR 拮抗薬のポジティブ検出を可能とする反転型レポーター発現系
……○福田 展雄[1], 石井 純[2], 本田 真也[1]（[1]産総研・バイオメディカル, [2]神戸大院・イノベ）

13:00　3P-G003　担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* の遺伝子操作法の開発
……○鎗水 透[1], 下飯 仁[1], 森田 友岳[2], 小池 英明[3], 山下 結香[1], 田中 拓未[1], 北本 宏子[1]
（[1]農研機構・農業環境セ, [2]産総研・機能科学, [3]産総研・生物プロセス）

14:00　3P-G004　*Pichia pastoris* におけるセントロメア配列を含む自律複製型プラスミドの開発
……○中村 泰之[1], 西 輝之[2], 野口 理紗[3], 伊藤 洋一郎[1], 渡邉 徹[2], 西山 陶三[2],
藍川 晋平[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 八十原 良彦[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ, [3]高機能遺伝子デザイン技術研究組合）

13:00　3P-N005　赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* における遺伝子工学技術の開発
……○八木 周和[1], 山元 啓輔[2], 森田 敏彦[2], 近藤 昭彦[2,3], 原 清敬[1,3,4]
（[1]静県大・食栄, [2]神戸大院・工, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]静県大院・環科）

14:00　3P-G006　メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* における遺伝学的基盤解析系の確立
……小松崎 亜紀子[1], 吉原 瑛梨奈[1,2], 千葉 靖典[1], ○横尾 岳彦[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]東薬大・生科）

13:00　3P-G007　メタノール資化性酵母 Ogataea minuta を用いたウイルス様粒子（VLP）の発現と特性解析
……○中谷 侑紀[1], 馬場 悟史[1], 野中 浩一[1], 吉田 久美[2], 染谷 和彦[2],
小野寺 宜郷[2], 遠藤 淳[1], 星野 一樹[2], 武下 文彦[1], 千葉 靖典[3]
（[1]第一三共, [2]北里第一三共ワクチン, [3]産総研）

14:00 3P-G008 バイオ医薬品製造を目指したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* の分子育種と生産系の開発
……○津田 将志[1], 中谷 侑紀[1], 馬場 悟史[1], 野中 浩一[1], 横尾 岳彦[2], 千葉 靖典[2]
([1]第一三共(株), [2]産総研)

13:00 3P-G009 コンビナトリアル手法を利用した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるタンパク質高分泌生産技術
…… ○梶原 翔太, 山田 亮祐, 荻野 博康（阪府大院・工・化工）

14:00 3P-G010 YHp プラスミド：醸造酵母への 2 μm プラスミド再構成によるタンパク質高生産
…… 美澄 幸恵[1], 西岡 佐都子[1], 上村 毅[2], 星田 尚司[1], ○赤田 倫治[1]
([1]山口大院・創成科学・化学, [2]JXTG エネルギー)

13:00 3P-N011 油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母の育種
…… ○秦野 琢之, 遊佐 一希, 松崎 浩明（福山大・生命工）

14:00 3P-G012 組換え *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株による MEL-D 生産
……○牧野 幹[1], 小西 正朗[2]
([1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工業大学・工・地域未来デザイン工学)

13:00 3P-N013 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する 2 つのアシル CoA 結合タンパク質の細胞生化学的解析
……○樋口 裕次郎[1], クウォン ヒースー[1], 川口 航平[2], 菊間 隆志[2], 北本 勝ひこ[3], 竹川 薫[1]
([1]九大院・農, [2]東大院・農生科, [3]日薬大・薬)

14:00 3P-E014 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における分泌糖タンパク質に関する解析
…… ○李 秋実, 竹川 薫, 樋口 裕次郎（九大院・生資環）

13:00 3P-G015 麹菌の固体培養における転写因子 FlbC のプロテアーゼ遺伝子の発現制御への関与
…… ○荒井 啓, 田中 瑞己, 吉村 緑, 新谷 尚弘, 五味 勝也（東北大院・農）

14:00 3P-G016 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による有機酸生産制御
…… ○一瀬 桜子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也（東北大院・農）

13:00 3P-G017 麹菌における *creB* 破壊と CreD 脱リン酸化変異導入によるアミラーゼ生産量の増加
……○田中 瑞己[1], 平本 哲也[2], 多田 日菜子[2], 河原崎 泰昌[1], 新谷 尚弘[2], 五味 勝也[2]
([1]静県大・食栄, [2]東北大院・農)

14:00 3P-G018 *Aspergillus luchuensis* におけるプロトプラスト形成と α-1,3-glucan 合成遺伝子 *agsE* の影響
…… ○渡嘉敷 直杏[1], 利田 賢次[2], 林 梨咲[2], 西堀 奈穂子[2],
山田 修[2], 渡邉 泰祐[3], 水谷 治[1,2], 外山 博英[1]
([1]琉大院・農, [2]酒総研, [3]日大・生資科)

13:00 3P-N019 糸状菌の鉄恒常性を担う転写因子 HapX の C-末端システインリッチ領域の機能解析
…… ○辻上 誠也, 村田 俊輔, 小森 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士（名城大・農）

14:00 3P-G020 細胞生存を指標としたエピトープ選択的抗体選択法の開発
…… ○江口 晃弘, 長棟 輝行, 河原 正浩（東大院・工）

13:00 3P-G021 効率的な細胞運命制御を指向したチロシンモチーフのスクリーニング
…… ○梅根 輝来人, 長棟 輝行, 河原 正浩（東大院・工）

14:00 3P-E022 ミミズにおける最適な異種遺伝子導入法の検討
…… ○山谷 竜大, 町田 悠, 土田 喜野, 伊佐 猛, 赤澤 真一（長岡高専・物質工）

13:00 3P-G023 Glycoengineering baculovirus host insect cell lines with CRISPR-Cas9 technology
……○Hideaki Mabashi-Asazuma[1], Donald L. Jarvis[1,2]
([1]University of Wyoming, Mol. Biol. Dept., [2]GlycoBac, LLC)

14:00 3P-G024 メラニン形成における白色・黒色細胞のメラニン形成関連遺伝子に関する DNA メチル化解析
……○前田 翔大[1], 栗原 誠[1,2], 飯田 泰広[1,2] ([1]神奈川工大院・工学研究科, [2]神奈川工大・応用バイオ)

13:00 3P-G025 生体制御分子硫酸体の生理機能評価技術開発
…… ○下平 武彦[1], 黒木 勝久[1], Liu Ming-cheh[2], 水光 正仁[1], 榊原 陽一[1]
([1]宮崎大院・農工総合, [2]Dep. Pharmaco. Coll. of Pharmacy and Pharm. Sci., Univ. Toledo.)

14:00 3P-G026 微小組織採取システムを用いた生体組織の空間的 RNA-seq
…… ○依田 卓也[1], 細川 正人[2,3], 高橋 清文[2], 坂梨 千佳子[2], 神原 秀記[2], 竹山 春子[1,2,4]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]JST・さきがけ, [4]産総研・早大 CBBD-OIL)

【酵素学，酵素工学】

13:00 3P-G027 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの非触媒 β-プロペラドメイン上に存在する基質特異性に重要な残基

……○東海 彰太[1], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[2]

([1] 鳥取大院・連農, [2] 鳥取大・農, [3] 鳥取大・産学)

14:00 3P-G028 高電圧バイオ電池構築のための酸化還元電位シフトを目指した超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの遺伝子改変

……○高村 映一郎[1], 坂元 博昭[2,4], 里村 武範[3,4], 櫻庭 春彦[5], 大島 敏久[6], 末 信一朗[2,3,4]

([1] 福井大学院・工・総合, [2] 福井大学院・工・繊維, [3] 福井大学院・工・生物応用化, [4] 福井大学・生命セ, [5] 香川大・農, [6] 大阪工大)

13:00 3P-N029 アミノ酸を燃料とするバイオ電池のための多段階酵素反応系を有するバイオアノードの構築

……○小松 丈紘[1], 山﨑 晃司[1], 坂元 博昭[1,3], 里村 武範[2,3], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[1,2,3]

([1] 福井大院・工・繊維, [2] 福井大院・工・生物応用化, [3] 福井大学・生命セ, [4] 香川大・農, [5] 大阪工大)

14:00 3P-G030 光触媒活性に及ぼす酸化還元酵素内包半導体ナノ粒子の分散性の影響

……○安田 信幸, 油井 信弘, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

13:00 3P-G031 緑膿菌の飢餓状態における生存戦略：クォーラムセンシング物質アルカリプロテアーゼの役割

……○星子 裕貴[1], Garcia-Contreras Rodolfo[2], 前田 憲成[1]

([1] 九工大院・生体工, [2] Dept. Microb. Parasitol., Fac. Med., UNAM, Mexico)

14:00 3P-G032 固定化ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素によるアセチル-CoA 生成

……○竹中 慎[1,2], 尹 基石[1,2,3], 松本 崇弘[1,2,3], 小江 誠司[1,2,3]

([1] 九大院・工・応化, [2] WPI-I2CNER, [3] 九大・小分子エネルギーセ)

13:00 3P-N033 両親媒性を有する有機-無機ハイブリッド多孔体の酵素反応への応用

……○松浦 俊一[1], 池田 卓史[1], 山本 勝俊[2] ([1] 産総研・化学プロセス, [2] 北九大・国際環境工)

14:00 3P-N034 規則性ナノ空孔材料を含んだ多孔質成形体の開発とバイオプロセス応用

……松浦 俊一, 長瀬 多加子, ○角田 達朗（産総研・化学プロセス）

13:00 3P-G035 スチレンモノオキシゲナーゼを用いたインディルビン誘導体生産

……○戸田 弘[1], 黒田 千尋[2], 伊藤 伸哉[1] ([1] 富山県大・生工研セ, [2] 富山県大・工)

14:00 3P-G036 メタゲノムからのアルコール脱水素酵素遺伝子の探索とバルキーケトン不斉還元反応への応用

……○粟谷 晃也, 八箇 裕子, 戸田 弘, 伊藤 伸哉（富山県大・工）

13:00 3P-G037 リウマチ薬メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子の機能及び相互作用解析

……○杉島 小雪[1], 松村 洋寿[1], 面川 歩[2], 尾高 雅文[1], 廣川 誠[2], 涌井 秀樹[1]

([1] 秋大院・理工, [2] 秋大院・医)

14:00 3P-G038 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ(AoTanB)の諸性質

……○市川 響太郎, 佐々木 克仁, 塩野 義人, 小関 卓也（山形大農）

13:00 3P-G039 イネいもち病菌 Maganporthe oryzae 由来新規ヘム含有膜タンパク質の分泌酵母 Pichia pastoris による発現系構築

……○本間 陽名[1], 松村 洋寿[1], 鮫島 正浩[2], 五十嵐 圭日子[2], 小川 信明[1], 伊藤 英晃[1], 尾高 雅文[1]

([1] 秋大院・理工, [2] 東大院・農生科)

14:00 3P-G040 麹菌のクチナーゼ様エステラーゼ CutC が示す特徴的な酵素学的諸性質

……○小幡 公平, 山岸 純也, 竹内 俊輔, 新谷 智子, 渡部 昭, 新谷 尚弘, 阿部 敬悦, 五味 勝也

（東北大院・農）

13:00 3P-G041 好熱性アーキアに存在する色素依存性 L-乳酸脱水素酵素複合体の機能解析

……○里村 武範[1,2], 宇野 紘平[1], 角間 真人[1], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,2]

([1] 福井大・工, [2] 福井大・ライフ, [3] 香川大・農, [4] 大阪工大・工)

14:00 3P-G042 好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に存在する新規な色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の解析
……○角間 真人[1], 里村 武範[1,2], 黒沢 則夫[3], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[1,2]
([1]福井大院・工, [2]福井大ライフ, [3]創価大, [4]香川大・農, [5]大阪工大・工)

13:00 3P-G043 酵素分子密度制御によるバイオ電池用高性能バイオデバイスの構築
……○末 信一朗[1,5], 大西 拓[1], 坂元 博昭[2,5], 里村 武範[1,5], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4]
([1]福井大院・工, [2]福井大テニュアトラック事業本部, [3]香川大農,
[4]大阪工大, [5]福井大学ライフイノベセンター)

14:00 3P-G044 特異的タグ付加によるタンパク質の分子シャペロニンへの優先的捕捉
……○藤原 伸介, 秀瀬 涼太, 高 楽 (関西学院大・理工)

13:00 3P-E045 *In vitro* 人工代謝経路による L-システイン生産のモデル化と最適化
……○花谷 燿平[1], 谷口 博範[1], 岡野 憲司[1], 本田 孝祐[1], 井村 誠[2], 岩切 亮[2]
([1]阪大院・工・生命先端工, [2]興人ライフサイエンス株式会社)

14:00 3P-N046 タンパク質熱変性に応答する好熱菌遺伝子の RNA-Seq 解析
……○鈴木 宏和[1], 奥村 友太[2], 大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工・化生応工, [2]鳥取大院・持社創生・工)

13:00 3P-G047 好熱菌細胞内で発生した耐熱化変異酵素を蛍光レポーターで検出する
……○奥村 友太[1], 大谷 千晶[2], 八木 寿梓[3], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2]
([1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大・工, [3]鳥取大・工・GSC)

【タンパク質工学】

14:00 3P-N048 *Streptococcus pyogenes* 由来ストレプトリジン O の大腸菌組換え生産
……○角田 洋輔, 北澤 宏明, 川井 淳, 岸本 高英 (東洋紡)

13:00 3P-G049 カルボキシソーム外殻タンパク質のリクルートに関与する足場タンパク質 CcmN の発現系構築
……○大畠 昌也[1], 中村 隆太郎[2], 中口 雄貴[3], 三木 智寛[3], 松村 洋寿[2],
福谷 洋介[3], 野口 恵一[3], 養王田 正文[3], 小川 信明[2], 尾高 雅文[2]
([1]秋大・理工, [2]秋大院・理工, [3]農工大院・工)

14:00 3P-G050 *In vitro* membrane protein synthesis inside a contact droplet for fluorescence based functional assay
……○Maie Elfaramawy, Hajime Watanabe, Tomoaki Matsuura
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

13:00 3P-G051 ペプチド転移酵素を用いた機能性アミロイドポリマーの作製
……○迫野 昌文, 大島 立樹 (富山大院・理工)

14:00 3P-G052 Q-body 化に適した抗体選抜のための新規抗体結合プローブの構築
……○塚原 知也[1], 三宅 千絢[2], 董 金華[3], 北口 哲也[3], 上田 宏[3]
([1]東工大院・生命理工, [2]東工大院・総理工, [3]東工大・化生研)

13:00 3P-G053 発光酵素融合クエンチ抗体を用いた生物発光抗原検出系の構築
……○高橋 里帆[1], 大室 有紀[2], 上田 宏[2] ([1]東工大院・生命理工, [2]東工大・化生研)

14:00 3P-G054 細胞内酵素活性の可視化によるアシル-(アシル-ACP)還元酵素の進化分子工学
……○林 勇樹, 新井 宗仁 (東大院・総合文化)

13:00 3P-G055 マレートデヒドロゲナーセの部位特異的変異による比活性向上および構造的解釈
……○下澤 勇弥, 西矢 芳昭 (摂南大院・生命科学)

14:00 3P-G056 乳酸オキシダーゼのタンパク質工学によるマンデル酸オキシダーゼへの改変
……○西矢 芳昭, 比留田 美咲 (摂南大院・生命科学)

13:00 3P-E057 アスベストのバイオイメージングと細胞毒性解析
……○藤原 暢哉, 石田 丈典, 舟橋 久景, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
(広島大院・先端物質)

14:00 3P-G058 CutA1 をリガンド足場として利用した生体分子間相互作用高感度検出のための分子デザイン
……○伊達 弘輝[1], 石田 尚之[1], 今村 維克[1], 清瀬 紀彦[2], 宮崎 誠生[2], 今中 洋行[1]
([1]岡山大院・自科, [2]アーク・リソース (株))

13:00 3P-G059 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の機能による GST 固定シリカ粒子の構築
……○小林 大起[1], 西 美智佳[2], 天野 太郎[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]鳥取大産学）

14:00 3P-H060 微生物触媒の固定化を目指したナノファイバー蛋白質 AtaA の小型化
…… ○青木 壮太[1], 吉本 将悟[1,2], 石川 聖人[1], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）

13:00 3P-H061 配列情報を利用した SUMO2 変異体ライブラリからの HER2 親和性選択
…… ○牧野 祥嗣, 河上 佳奈, 伊藤 伸哉（富山県大・工）

14:00 3P-H062 アミロイドβ（Aβ）凝集体の形態に与える Aβ 凝集阻害物質の効果の 3D 観察
…… ○楊 卓朗, 板田 鉄平, 大柄 俊貴, 上井 幸司, 徳楽 清孝（室工大・応理化）

13:00 3P-H063 腫瘍免疫応答の活性化をモニタリングする抗体検査診断薬の標準化
……○二見 淳一郎[1], 丸山 悠[1], 新土居 奈緒美[1], 大川 裕也[1], Ahmad Hannaneh[1], 勝河 祐希[2], 吉岡 実咲[2], 本荘 知子[1], 木下 理恵[3]
（[1]岡山大院・自科, [2]岡山大・工, [3]岡山大院・医歯薬）

【発酵生理学，発酵工学】

14:00 3P-H064 新規ポリγ－グルタミン酸誘導体の製造方法とその物性評価
…… ○丸山 裕慎, 栗田 修, 佐合 徹, 梅谷 かおり, 苔庵 泰志, 山岡 千鶴
（三重・工業研）

13:00 3P-N065 サツマイモ焼酎に含まれる成分の育毛活性
…… ○章 超, 河野 邦晃, 岩井 謙一, 髙瀬 良和（霧島酒造）

14:00 3P-H066 Subcritical water extraction of polyphenols from fermented soybean curd residue with *Ganoderma lucidum*
…… ○Yuchen Zhao, Hongyi Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 3P-H067 *β*-1,3-グルカン合成阻害剤処理により *Candida albicans* から遊離する乳化物質の解析
…… ○根路銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

14:00 3P-H068 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の乳化およびマクロファージ活性化に関与する物質の解析
…… ○齋藤 大輝, 大西 将也, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工）

13:00 3P-E069 蛍光タンパク質を用いた新規レシオメトリック酸化センサーの開発
……○坂元 仁[1,2], 古田 雅一[1,2,3], 土戸 哲明[1]
（[1]阪府大・21 科研セ・微制研セ, [2]阪府大・放研セ, [3]阪府大院・工・量子）

14:00 3P-H070 味噌漬け豆腐から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する 多成分バクテリオシンの精製と遺伝子クローニング
…… ○河原 あい[1], 山下 奈菜[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）

13:00 3P-H071 熊本県環境中から分離した抗菌性乳酸菌の同定とそれらが生産するバクテリオシンの特性
……○八浪 早季[1], 山下 奈菜[2], 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）

14:00 3P-N072 発酵阻害耐性酵母由来強力な ENO1 プロモーターの発現解析
…… ○Nurlina B. Azmi[1], Prihardi Kahar[1], 糸見 明穂[1], 紀平 知枝[1], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・イノベ）

13:00 3P-H073 オキサロ酢酸蓄積型リジン生産 *Corynebacterium glutamicum* の代謝プロファイル解析
…… ○佐藤 桃梨, 柳瀬 真紀, 愛甲 徹, 和田 大, 横田 篤（北大院・農・微生物生理学）

14:00 3P-H074 耐熱性乳酸生産糸状菌のイオンビーム変異誘導による Xylose 発酵性向上における機能解析
…… ○高野 真希[1], 山下 聖樹[1], 畑下 昌範[2], 星野 一宏[1]
（[1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研）

13:00 3P-N075 発酵阻害物質耐性 *Candida boidinii* K212 のキシロース発酵の解析
……○Kahar Prihardi[1], 紀平 知枝[1], 大塚 裕美[1], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[1,2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大・自科・研究環)

14:00 3P-N076 出芽酵母中心代謝酵素欠損株のトランスオミクス解析
……○松田 史生, 西野 駿佑, 清水 浩（阪大院・情報）

13:00 3P-H077 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 が排出する香気成分と硫黄代謝についての研究
……○中山 宗一郎[1], 白須 未香[1,2], 小倉 一将[1], 新井 博之[1], 東原 和成[1,2], 石井 正治[1]
([1]東大院・農生科, [2]JST, ERATO)

14:00 3P-H078 Functional analysis of bacterial acyl-CoA reductases generating fatty aldehydes for alkane production
……○Yu-An Sui[1], Shigenobu Kishino[1], Yuki Nakatani[1], Kosuke Fujii[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Jun Ogawa[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Toyota Motor Corp.)

13:00 3P-H079 *Acetobacter* 属酢酸菌の TCA サイクル周辺経路を中心とした酢酸過酸化能発現メカニズム
……○佐々木 大樹[1], 石川 森夫[1], 鈴木 敏弘[1], 今井 健太郎[1], 山本 有紀[1], 松原 拓哉[1], 兼崎 友[2], 吉川 博文[2,3], 貝沼(岡本) 章子[1]
([1]東京農大・応生科・醸造, [2]東京農大・ゲノムセ, [3]東京農大・応生科・バイオ)

14:00 3P-H080 大腸菌の NADH 脱水素酵素 I とシトクロム bo_3 オキシダーゼ両欠損株における異常な糖代謝の解析
……○瀬島 祐大, 紀平 千枝, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤（北大院・農・微生物生理学）

13:00 3P-H081 好熱菌発酵産物がブタ腸内の乳酸代謝に与える影響
……○吉川 翔太[1], 梶原 悠[2], 宮本 浩邦[3,4,5], 須田 亙[3], 井藤 俊行[2], 服部 正平[3,6,7], 大野 博司[3], 中西 裕美子[3], 田代 幸寛[8], 酒井 謙二[8], 古原 俊哉[8], 長 雄一郎[9], 児玉 浩明[5]
([1]千葉大院・融合, [2]京葉プラントエンジニアリング, [3]理研・IMS, [4]サーマス, [5]千葉大院・園芸, [6]東京大院・新領域, [7]早稲田大院・先進理工, [8]九大院・農, [9]東京医科歯科大院・保健衛生)

【代謝工学】

14:00 3P-H082 アセト酢酸エステルを基質としたイソプレノイド大量生産大腸菌株の作出
……千田 大樹, ○原田 尚志（鳥取大院・工）

13:00 3P-H083 Construction of a molecular sensor for the detection of intracellular methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1
……○Viviane Carnier Casaroli, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui (Tokyo Tech)

14:00 3P-H084 大腸菌を宿主とした人工経路によるグルコースからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成
……○齊藤 周, Insomphun Chayatip, 折田 和泉, 福居 俊昭（東工大院・生命理工）

13:00 3P-H085 *Methylobacterium extorquens* の代謝改変によるメタノールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成
……○折田 和泉, 海野 源人, 中村 聡, 福居 俊昭（東工大院・生命理工）

14:00 3P-H086 *Lactobacillus reuteri* のグリセリン共流加による乳酸生産の抑制
……○一瀬 涼, 福田 雄一, 山崎 思乃, 片倉 啓雄（関西大・化生工）

13:00 3P-H087 乳酸菌培養における乳酸生産の抑制
……○河合 美桜[1], 原田 里紗[2], 土屋 麻美[3], 依田 伸生[3], 山崎 思乃[4], 福崎 英一郎[2], 片倉 啓雄[4]
([1]関西大院・理工, [2]阪大院・工, [3]明治, [4]関西大・化生工)

14:00 3P-H088 生デンプンを基質とした高光学純度 L-乳酸の発酵生産
……○植松 元太郎[1], 岡野 憲司[2], 濵 真司[3], 野田 秀夫[3], 近藤 昭彦[4], 本田 孝祐[2]
([1]阪大・工, [2]阪大院・工, [3]Bio-energy, [4]神戸大・院・科イノ)

13:00 3P-H089 ^{13}C 代謝フラックス解析およびプロテオーム解析を用いた *n*-ブタノール生産シアノバクテリア株の代謝解析

……○和田 圭介[1], 植林 希代加[1], 戸谷 吉博[1], 傳寶 雄大[2], Putri Sastia[2], 松田 史生[1], 福崎 英一郎[2], Liao James[3], 清水 浩[1]

([1]阪大院・情報, [2]阪大院・工, [3]UCLA・Chem. Eng.)

14:00 3P-N090 LC/MS-based widely targeted metabolomics for the improvement of 1-butanol titer in transgenic *Synechococcus elongatus*

……○Artnice Mega Fathima[1], Walter Lavina[1], Sastia Putri[1], James Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]

([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

13:00 3P-H091 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学反応を精緻化したゲノムスケールモデルを用いた様々な光条件における代謝シミュレーション

……○豊島 正和, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

14:00 3P-E092 光合成電子伝達系との電子授受を媒介する細胞親和性レドックスポリマー

……○中西 周次[1,2], 田中 謙也[2], 金子 真大[3], 石川 聖人[1,4]

([1]阪大・太陽エネセ, [2]阪大院・基礎工, [3]東大院・工, [4]名大院・工)

13:00 3P-N093 *Euglena gracilis* における有機酸生産の強化のための培養条件検討

……○冨田 結芙子[1], 森 若葉[2], 小山内 崇[1,2]（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）

14:00 3P-H094 Milking 方式による藻類バイオ燃料生産の実現に向けた技術基盤の構築

……○加藤 明宏[1], 高谷 信之[1,4], 鵜瀬 和秀[1], 池田 和貴[2,4], 愛知 真木子[3,4], 前田 真一[1,4], 小俣 達男[1,4]

([1]名大院・生命農学, [2]理研・IMS, [3]中部大・応生, [4]JST CREST)

13:00 3P-H095 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の暗・嫌気条件培養での有機酸生産

……○保田 知香, 小山内 崇（明治大・農）

14:00 3P-H096 アスタキサンチン生産能を付与した高増殖性ラン藻のトランスクリプトミクスおよび動的メタボロミクス

……○高木 綾湖, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神大院・イノベ）

13:00 3P-H097 ATP 消費系の導入による *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の代謝改変

……○岡本 諒太[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2]（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・農）

【醸造学，醸造工学】

14:00 3P-H098 醤油乳酸菌のアルギニン分解性に関する研究

……○脇中 琢良, 渡部 潤, 月岡 祐一郎（ヤマサ醤油）

13:00 3P-H099 黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索

……○伊藤 俊彦, 広幡 千紘, 藤田 直子, 橋爪 克己（秋田県立大・生資科）

14:00 3P-N100 紫芋焼酎粕を原料とする機能性飲料および食品開発

……○多賀 直彦, 椛田 聖孝, 村田 達郎, 芝田 猛, 荒木 朋洋, 安田 伸, 松田 靖, 本田 憲昭

（東海大・農）

13:00 3P-N101 α-EG の用途開発

……○尾関 健二, 山本 ゆかり, 佐藤 銀河（金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ）

14:00 3P-H102 α-EG の美容食品・化粧品素材としてのコラーゲンスコアへの影響

……○三井 雅貴[1], 遠藤 佳純[1], 横田 大輝[1], 山本 ゆかり[1], 塩谷 侑子[2], 徳田 耕二[2], 尾関 健二[1]

([1]金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ, [2]車多酒造)

13:00 3P-N103 ホエイを原料とする新規酒類の開発-麹菌の種類および材料の選定並びに醸造条件の検討-

……○石山 真乃介, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学）

14:00 3P-H104 ホエイ由来新規醸造飲料の開発

……○山畑 直樹, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学）

13:00 3P-N105 *Zymomonas mobilis* を用いたホエーを原料とするアルコール発酵および食酢醸造の検討
……○荻山 大輝, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学）

14:00 3P-N106 新規調味液 Lact-sho（酪醤）の醸造法の検討
……○服部 俊, 若山 守, 林 順司（立命館大院・生命科学）

13:00 3P-H107 甘酒に含まれる脂質成分のマクロファージへの作用解析
……○阪本 真由子[1], 藤川 彩美[1], 酒谷 真以[1], 柘植 圭介[2], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]佐賀工技セ）

【食品科学，食品工学】

14:00 3P-H108 麹発酵物より新規に発見された制御性樹状細胞を誘導する 14-デヒドロエルゴステロール
……○阿野 泰久[1], 井門 久美子[2], 新藤 一敏[3], 小泉 英樹[2], 藤原 大介[2]
（[1]キリン(株)・健康研, [2]キリン(株)・基盤研, [3]日本女子大）

13:00 3P-F109 14-デヒドロエルゴステロールを含む白麹 *Aspergillus kawachii* 抽出エキスの経口摂取による肌質改善効果
……○杉原 圭彦[1], 生嶋 茂仁[1], 三宅 美加[1], 矢田 幸博[3], 桐浴 隆嘉[2], 藤原 大介[2]
（[1]キリン（株） 健康技術研究所, [2]キリン（株） 基盤技術研究所, [3]筑波大院 グローバル教育院）

14:00 3P-N110 糠床浸漬による野菜に付着する微生物叢の変化
……○古田 吉史, 田中 貴絵, 甲斐 達男（西南女学院大・保健福祉）

13:00 3P-H111 ベーカリーのパン種から分離された乳酸菌種について
……○伊藤 惠介, 藤本 章人, 成島 典子（MC フードスペシャリティーズ株式会社 製開研）

14:00 3P-H112 Metabolomics-based approach for the study of *Garcinia mangostana* (mangosteen) ripening stages
……○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Sobir Ridwani[2], Fenny Martha Dwivany[3], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Center of Tropical Fruit Stud., Bogor Agricultural Univ., [3]School of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung）

13:00 3P-H113 Non-targeted metabolomics approach for the discrimination of Indonesian specialty coffee based on species and geographical origin
……○Sastia Putri[1,2], Tomoya Irifune[1], Yusianto[3], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, [3]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute）

14:00 3P-H114 Evaluation of the effect of chitosan coating on postharvest quality of *Musa acuminata* (banana) using metabolomics approach
……○Kana Yamamoto[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
（[1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sci. and Technol., Inst.Technol. Bandung）

13:00 3P-H115 イメージング質量顕微鏡で「旨味をみる」！
……○新間 秀一[1], 三好 航平[2], 村田 貴輝[1], 福崎 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]阪大・工）

14:00 3P-H116 大豆ボディ構造体高度可溶化酵素生産麹菌の探索
……○中嶋 優里, 笠井 尚哉（阪府大院・生環科）

13:00 3P-H117 Steam pressure process yields better antibacterial and antioxidant activity in Indonesia traditional fermented soybean
……○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
（[1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.）

【環境浄化，修復，保全技術】

14:00 3P-I118 脱窒作用を促進させる新規水処理装置の開発
……○脇 孝典, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

13:00 3P-I119 Purification of natural static water environment by a new water treatment system
……○Nimatus Salamah Lutfi, Yudha Perwira Ima, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
（Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

14:00 3P-I120 脱窒菌が引き起こす代謝電流による同位体効果の計測
……○山田 哲也[1,2], 松下 伸広[2], 中村 龍平[1]（[1]理研, [2]東工大）

13:00 3P-I121 *Acinetobacter baylyi* GFJ2 株の 3,4-ジクロロアニリン分解遺伝子の機能解析
……○佐藤 里咲[1], 小林 巧[1], 木内 勇貴[1], Vangnai Alisa[2], 笠井 大輔[1], 福田 雅夫[1]
（[1]長岡技科大, [2]Chulalongkorn Univ.）

14:00 3P-I122 微生物のゴム分解における残渣の資源としての有効活用法の探索
……○一木 葉月, 笈木 宏和（久留米高専）

13:00 3P-I123 合成ゴム分解微生物の分解遺伝子解明に関する研究
……○笈木 宏和（久留米高専）

14:00 3P-N124 1,4-ジオキサンを分解する微生物コンソーシアムの解析
……○李 特[1], 崔 舸[1], 井上 千弘[1], 冨士田 浩二[2], Shrihari Chandraghatgi[2]
（[1]東北大院・環境, [2]エコサイクル）

13:00 3P-I125 効率的な PET 分解菌スクリーニング方法の開発
……○小山内 稚尋, 川西 琢也, 滝口 昇（金沢大院・自科）

14:00 3P-I126 熱可塑性コポリエステルの酵素分解を促進する前処理方法の検討
……○山田 裕次郎[1], 川西 琢也[1,2], 滝口 昇[1,2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・理工）

13:00 3P-N127 *Penicillium* sp. CHY-2 株を用いた炭化水素類化合物の低温条件下における分解
……○細貝 俊貴, 藤澤 宗一郎, 矢島 由佳, 張 傛喆（室工大院・工・環境創生）

14:00 3P-I128 *Ralstonia solanacearum* の走化性センサー遺伝子の機能発現に関する研究
……○竹下 正記, 緋田 安希子, Mattana Tunchai, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）

13:00 3P-I129 アゾ染料の微生物分解に関する研究（第３報）
……○鈴木 健太, 中川 克彦, 牛尾 一利, 早瀬 伸樹（新居浜高専）

14:00 3P-I130 ビーチロック周辺から単離したウレアーゼ生産菌 *Pararhodobacter* sp.の全細胞酵素活性評価
……○中島 一紀, 藤田 賢大, 川﨑 了（北大院・工）

【環境工学，廃水処理技術】

13:00 3P-F131 Designing a microbial co-culture for ammonification and nitrification of organic nitrogen
……○You-Shan Tsai[1], Sakuntala Saijai[1], Akinori Ando[1,2], Wakako Okada[1], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Jun Ogawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO)

14:00 3P-I132 自家発酵熱型高温好気消化プロセスによるし尿の液肥化における諸要因の解明
……○田代 幸寛, 朝倉 侑弥, 柴崎 良直, 酒井 謙二（九大院・生資環）

13:00 3P-I133 大腸菌の自発的なフロック形成と有害物分解への利用
……○大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之（阪市大院・工・化生系）

14:00 3P-N134 固定床担体による廃水処理バイオリアクターの反応制御と効率化
……○上野 嘉之[1], 多田羅 昌浩[1], 北島 洋二[2]（[1]鹿島技術研究所, [2]鹿島環境本部）

13:00 3P-N135 酸性鉱山廃水処理に有用な鉄酸化細菌の単離と性質
……○上村 一雄[1], 山本 康次郎[1], 渡邉 里咲[3], 赤堀 文雄[4], 高田 潤[2], 金尾 忠芳[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大院・自科, [3]岡山大・農, [4]卯根倉鉱業）

14:00 3P-I136 *De novo* RNA-seq：活性汚泥微生物群の網羅的遺伝子発現解析で見えた希少種の決定的な役割
……○佐藤 由也[1], 堀 知行[1], 小池 英明[2], Navarro Ronald[1], 尾形 敦[1], 羽部 浩[1]
([1]産総研・環境管理, [2]産総研・生物プロセス)

13:00 3P-I137 固定化光合成細菌ビーズを用いたバイオリアクターによる廃液中のセシウム除去及び放射能除去
……○佐々木 慧[1], 中村 薫[1], 佐々木 健[1], 松尾 健司[2], 中島田 豊[2], 金原 和秀[3], 大塚 祐一郎[4], 中村 雅哉[4], 加藤 純一[2]
([1]広島国際学院大院・工, [2]広島大院・先端物質, [3]静岡大院・工・化学バイオ, [4]森林総合研)

14:00 3P-I138 水中からアンチモンを除去する微生物集積系の構築と特性評価
……○森 健太朗[1], 馬形 さやか[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]立命館大・理工)

13:00 3P-I139 生物ろ過による地下水からの鉄・マンガン除去法に関与する細菌群集構造の比較
……○鈴木 市郎（横国大院・工）

14:00 3P-N140 係留気球を用いた南極上空の大気バイオエアロゾルの採集と生物分析
……○小林 史尚（弘前大院・理工）

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

13:00 3P-I141 主成分分析によるバイオエタノール生産に影響を及ぼす阻害物質探索
……○渡辺 一樹[1], 小西 正朗[2]
([1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工大・工・地域未来デザイン工学)

14:00 3P-N142 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
……○松崎 浩明, 上田 賢一, 山崎 新平, 早田 亮太, 秦野 琢之（福山大・生命工）

13:00 3P-I143 Xylose 資化性出芽酵母における Xylose 消費速度は Xylose 由来 Ribose 5-phosohate に影響される
……○小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一, 藤森 一浩（産総研・生物プロセス）

14:00 3P-N144 希硫酸浸漬爆砕処理バガス SSCF において高いエタノール発酵性能を有する C5C6 酵母変異体の単離
……○藤森 一浩, 小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一（産総研・生物プロセス）

13:00 3P-I145 セルロースエタノールの商業化に向けた酵母菌開発
……○保谷 典子[1], 多田 宣紀[1], 伊藤 順二[1], 平尾 理恵[1], 菊田 弘和[1], 林田 真生[1], 神戸 浩美[1], 池内 暁紀[2], 片平 悟史[2], 徳弘 健郎[2], 中村 里沙[2], 村本 伸彦[2], 大西 徹[2]
([1]トヨタ自動車, [2]豊田中研)

14:00 3P-I146 *Penicillium* 属由来新規キシラナーゼを導入した *Trichoderma reesei* による高効率糖化酵素の開発
……○柴田 望, 末次 真梨, 五十嵐 一暁, 瀧村 靖（花王）

13:00 3P-F147 白色腐朽菌 *Phanerochaete* sp. K-20 株のブタノール産生特性について
……○笠井 稜子[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)

14:00 3P-I148 グルコースによるセルラーゼ生産阻害が抑制された糸状菌 *Trichoderma reesei* 変異株の特性解析
……○新井 俊陽, 掛下 大視, 五十嵐 一暁, 瀧村 靖（花王）

13:00 3P-I149 高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の単糖消費速度増加によるエタノール発酵能強化について
……○近藤 旺次郎[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)

14:00 3P-I150 ハイブリッド酵母 FSC の凍結保存株の活性化と並行複発酵
……○山田 泰地, 酒井 遥行, 田中 修三（明星大・理工）

13:00 3P-I151 エタノール発酵のための木質バイオマスのアルカリ酸化処理による前処理
……○酒井 遥行, 山田 泰地, 田中 修三（明星大・理工）

14:00 3P-I152 イオンビーム照射による直接 Ethanol 生産のための Cellulase 分泌糸状菌の構築
……○山下 聖樹[1], 高野 真希[1], 畑下 昌範[2], 星野 一宏[1]
([1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研)

13:00 3P-N153 超好熱性アーキアの代謝改変～キシラン分解能の付与
……○福田 青郎[1], 林 千広[1], 大垣 裕亮[1], 川村 実央[1], 佐藤 喬章[2], 金井 保[2], 跡見 晴幸[2], 今中 忠行[1]
([1]立命館大・生命科学, [2]京大院・工)

14:00 3P-I154 アメフラシ 21K セルラーゼのセルロース分解における機能解析
……○辻 明彦, 湯浅 恵造, 淺田 元子, 中村 嘉利（徳島大学・生物資源産業学部）

13:00 3P-N155 ベタイン型添加剤によるセルロース糖化効率向上に対するセロビオハイドロラーゼ活性化の評価
……○山本 真史, 甲元 一也（甲南大・FIRST）

14:00 3P-I156 アルカリ加水分解により得られる稲わらリグニン由来芳香族化合物を原料としたムコン酸のバイオ生産
……○菊地 晟弘[1,3], 東 勇太[1,3], 高橋 健司[2,3], 上村 直史[2,3], 政井 英司[2,3], 園木 和典[1,3]
([1]弘前大院・農生, [2]長岡技大・生物, [3]JST-ALCA)

13:00 3P-I157 木質系・草本系バイオマス由来のリグニン分解物を原料としたムコン酸生産
……○東 勇太[1,4], 佐藤 匠[2,4], 高橋 健司[3,4], 上村 直史[3,4], 政井 英司[3,4], 園木 和典[1,2,4]
([1]弘前大院・農生, [2]弘前大・農生, [3]長岡技大・生物, [4]JST-ALCA)

14:00 3P-I158 酵素糖化残渣リグニンからのリグニンナノ粒子の作製およびその特性評価
……○杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術)

13:00 3P-I159 気生微細藻類単離株における低温条件下オレイン酸の高蓄積
……○西田 章弘[1], 油井 信弘[1], 藤原 祥子[2], 都筑 幹夫[2], 阿部 克也[1]
([1]工学院大・先進工・生化, [2]東京薬科大・生命科・応用生命科)

【生物化学工学】

14:00 3P-N160 Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodosporidium toruloides*
……○Dung Pham Khanh[1], Atsushi Miyata[1], Yosuke Shida[1], Harutake Yamazaki[2], Kazuo Masaki[3], Kazuki Mori[4], Kosuke Tashiro[4], Satoru Kuhara[2], Wataru Ogasawara[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]NRIB, [4]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

13:00 3P-I161 微生物分泌性膜小胞の物質送達媒体としての機能向上
……○高木 航太郎[1], 長谷川 雄将[1], 二又 裕之[1,2], 田代 陽介[1]
([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン研)

14:00 3P-N162 GFP 酵母を内包した単分散微細水滴の氷点下保存
……○齋藤 友紀, 山根 克己, 西崎 徹彦, 中川 智行, 稲垣 瑞穂, 今泉 鉄平, 山内 亮, 岩本 悟志
(岐阜大院・自然科学技術)

13:00 3P-N163 フロー式粒子像分析装置を用いた微生物集団のモルフォロジー解析
……○原田 雄斗, 中川 智行, 稲垣 瑞穂, 今泉 鉄平, 岩本 悟志（岐阜大院・自然科学技術）

14:00 3P-I164 *Mucor circinelloides* の二形性変化を応用した D-アミノ酸の生理活性解明
……○岩倉 遼, 高野 真希, 星野 一宏（富山大院・理工）

13:00 3P-I165 スエヒロタケ変異株を用いた糖化発酵同時進行によるリグノセルロースからの直接 L-リンゴ酸生産
……○星野 一宏[1], 高野 真希[1], 畑下 昌範[2]（[1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研）

14:00 3P-N166 可視光・近赤外光応答性光半導体加工フィルムの抗菌特性に関する研究
……○山本 幸次郎[1], 辻塚 誠一郎[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
([1]近畿大院・産理工・生環化, [2]伊都研)

13:00 3P-N167 新規な塗料状光半導体材料の暗所と可視光及び近赤外光照射下での抗菌特性に関する研究
……○辻塚 誠一郎[1], 山本 幸次郎[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
([1]近大・産理工, [2]伊都研究所)

14:00 3P-N168 二価カチオンが誘起する負電荷脂質膜での相分離
……○山本 耀悟, 下川 直史, 高木 昌宏（北陸先端大・マテリアル）

13:00 3P-N169 酸化コレステロール存在下における生体模倣膜での相分離ドメイン形成
……○志水 誠, 下川 直史, 高木 昌宏（北陸先端大・マテリアル）

14:00 3P-F170 LAL 固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用（第 4 報）
……○猪瀬 陽加, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

13:00 3P-I171 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析（第 2 報）
……○大瀧 賀也, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

14:00 3P-I172 固定化培養を活用したシロアリ腸内の未培養微生物の培養化
……○森 峻一[1], 吉村 剛[2], 青柳 秀紀[1]（[1]筑波大院・生命環境, [2]京大・生存研）

13:00 3P-I173 腸内有用細菌のストロンチウム除去特性の解析（第 3 報）
……○遠藤 輪, 青柳 秀紀（筑波大院・生命環境）

14:00 3P-I174 High Production of single cell oil from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*
……○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Hiromi Otsuka[1], Hana Matsumoto[1], Chie Kihira[1], Ahmad Thontowi[2], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[1,4]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]BSN, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

13:00 3P-I175 *Pichia pastoris* のタンパク質分泌生産における新規有用因子の獲得とその蓄積による効果の検証
……○伊藤 洋一郎[1], 中村 泰之[1], 西 輝之[2], 藍川 晋平[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ)

14:00 3P-I176 The establishment high cell density culture of oleaginous *Lipomyces starkeyi* D35 for high cell and lipid production
……○Rezky Lastinov Amza[1], Prihardi Kahar[1], Ario Betha Juanssilfero[1,3], Hiromi Otsuka[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [3]LIPI)

13:00 3P-I177 麹菌による複数遺伝子の同時高発現を可能にするプロモーターセットの開発
……○片山 周平[1], 若井 暁[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・イノベ, [3]月桂冠・総研)

【培養工学】

14:00 3P-I178 非有機溶媒耐性菌による疎水性物質生産への隔壁二相培養システムの適用
……○石川 大将[1], 川西 琢也[1,2], 滝口 昇[1,2]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・理工）

13:00 3P-I179 water-in-oil エマルションを用いた微生物培養技術の開発
……○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 松倉 智子[2], 髙木 妙子[2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
([1]早大・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル)

14:00 3P-N180 エマルジョンドロップレットを用いた微生物培養
……○村井 雄大[1], 森田 直樹[1], 土居 克実[2], 久原 哲[1], 田代 康介[1]
([1]九大院・生資環, [2]九大院・農・遺資研セ)

13:00 3P-F181 リグノセルロース系バイオマスを用いたキシリトールの効率的微生物生産
……○姜 林涛, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

14:00 3P-I182 赤色酵母を用いた未利用バイオマスからのアスタキサンチン・キシリトールの同時発酵生産
……○井上 順允, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

13:00 3P-I183 コーンコブ酸加水分解残渣を原料とした同時糖化発酵による D-乳酸の効率的生産
……○谷口 麻菜美, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

14:00 3P-I184 木材腐朽時における白色腐朽菌と細菌間相互作用解明のためのモデル共培養系の構築
……○松村 真輝[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)

13:00 3P-J185 空気封入下の光合成細菌－枯草菌共培養におけるニトロゲナーゼ活性発現
……○前田 勇[1], 嵐田 遥[1], 渡辺 昌規[2]（[1]宇都宮大・農, [2]山形大農）

14:00 3P-J186 気生微細藻類を用いた壁面緑化法の開発：窒素固定菌が産生する産生粒状多糖の特徴づけ
……○塚越 崇之[1], 油井 信弘[1], 阿部 克也[1]
([1]工学院大・先進工・生化, [2]工学院大・先進工・生化, [3]工学院大・先進工・生化)

13:00 3P-N187 フォトバイオリアクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオール生産
……○端 暸太[1], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2], 村上 明男[3]
([1]京工繊大院・工芸科学, [2]九大院・農, [3]神戸大院・工)

14:00 3P-J188 合成代謝経路経路導入シアノバクテリアを用いた D-乳酸の高効率生産
……○高井 あまね[1], 熊田 陽一[1], 堀内 淳一[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2], 村上 明男[3]
([1]京工繊大院・工芸科学, [2]九大院・農, [3]神戸大院・理)

13:00 3P-J189 焼酎蒸留残液を利用した哺乳類細胞培養のための培地添加剤の効果
……○中村 彰宏, 外薗 英樹（三和酒類）

14:00 3P-J190 トリプシンに依らない付着性培養細胞の解離法の開発
……○市川 航平[1], 池田 丈[1], 重藤 元[2], 廣田 隆一[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1]
([1]広島大院・先端物質, [2]産総研)

13:00 3P-N191 ソホロースリピッドの細胞凍結保存液としての利用可能性
……○野上 明日香[1], 龍見 宗樹[1], 大河原 弘達[2,3], 齋藤 充弘[2,3], 竜 瑞之[1], 平田 善彦[1], 宮川 繁[3], 澤 芳樹[3]
([1]サラヤ, [2]阪大病院・未来医療開発部, [3]阪大院・医)

14:00 3P-N192 概日リズムを考慮した肝毒性試験
……○守矢 恒司[1], 玉井 美保[2,3], 古賀 匠[2], 田川 陽一[1,2]
([1]東工大院・生命理工, [2]東工大・生命理工学院, [3]北大院・歯)

13:00 3P-J193 シングルユースバイオリアクターを用いた巨核球系細胞株の大量培養条件の検討
……Nurhayati Retno[1], ○尾島 由紘[2], 堂田 丈明[1], 紀ノ岡 正博[1]
([1]阪大院・工, [2]阪市大院・工・化生系)

14:00 3P-J194 微粒子状 ECM スキャホールドを用いる肝細胞の 3 次元培養と機能評価
……○矢嶋 祐也, 山田 真澄, 鵜頭 理恵, 関 実（千葉大院・工）

13:00 3P-J195 リアルタイム細胞形態プロファイリングを用いた効率的細胞培養工程管理
……○今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 松本 恵[1], 岡田 真衣[1], 蟹江 慧[1], 清水 一憲[2], 本多 裕之[2], 加藤 竜司[1]
([1]名大院・創薬科学, [2]名大院・工)

14:00 3P-J196 3 次元培養スフェロイド画像から得られる非破壊情報解析の意義
……○加藤 寛人[1], 渋田 真結[1], 長谷部 涼[1], 蟹江 慧[1], 清水 一憲[2], 本多 裕之[2], 清田 泰次郎[3], 加藤 竜司[1]
([1]名大院創薬科学, [2]名大院・工, [3]ニコン)

13:00 3P-J197 iPS 細胞未分化逸脱評価のためのコロニー画像から得られるビッグデータ活用法
……○吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 清田 泰次郎[2], 古江-楠田 美保[3], 清水 一憲[4], 本多 裕之[4], 加藤 竜司[1]
([1]名大院・創薬科学, [2]ニコン, [3]医薬基盤研究所, [4]名大院・工)

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

14:00 3P-N198 ビオチンリガーゼと基質タンパク質間の相互作用を利用した細胞間連結促進技術の開発
…… 杉若 隆一[1], 中道 祐希[1], 田川 澪[1], ○末田 慎二[1,2]
([1]九工大院・情報工・生命情報, [2]九工大・RCBT)

13:00 3P-J199 不飽和カルボニル化合物による細胞傷害機構の解明
…… ○東 恒仁, 眞井 洋輔, 真崎 雄一（北大院・医・細胞薬理）

14:00 3P-J200 毛細血管様構造を有する多細胞スフェロイドをビルディングブロックとして作製した 3 次元組織についての生細胞数の評価
…… ○神並 美華[1], 高橋 憲司[2], 仁宮 一章[1]（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）

13:00 3P-J201 DMSO フリー細胞凍結保存液の開発と凍結融解が細胞に与える影響
……○永井 悠也[1], 大和屋 健二[1], 寺本 直純[2], 中田 一弥[1], 八木 透[3], 宮本 義孝[3]
([1]東理大・理工, [2]千葉工大・工, [3]東工大・工学院）

14:00 3P-J202 高生産株の構築を目指した抗体生産 CHO 細胞内の分泌過程解析
…… ○兼吉 航平[1], 内山 圭司[2], 鬼塚 正義[3,4], 山野 範子[1,4], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,4]
([1]阪大院・工, [2]徳島大・疾患酵素学研セ, [3]徳島大院・社会産業理工, [4]MAB 組合）

13:00 3P-F203 高濃度アミノ酸入り培地を用いた未分化ヒト iPS 細胞の選択的細胞死
…… ○長島 拓則[1], 清水 一憲[1], 松本 凌[1], 本多 裕之[1,2]
([1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）

14:00 3P-J204 ヒト iPS 細胞の未分化維持培養における集塊形成機構の解明
…… ○金 美海, 竹内 一博, 百川 拓実, 紀ノ岡 正博（阪大院・工）

13:00 3P-J205 羊毛ケラチンの透明な薄膜の調製
…… 森 英樹, 酒井 千尋, ○原 正之（阪府大院・理）

14:00 3P-J206 蛋白質修飾ナイロン網目を用いた神経幹細胞／前駆細胞の三次元培養
…… ○藤田 雅徳, 森 英樹, 原 正之（阪府立大院・理・生物科学）

13:00 3P-J207 両イオン性を有する共重合体 CAT の温度応答性培養基材としての有用性検討
…… ○鳴海 勇希[1], 岩井 良輔[2], 高木 睦[1]（[1]北大院・工, [2]岡山理大・技科研）

14:00 3P-J208 不織布を用いた間葉系幹細胞増殖における増殖倍率の増加
…… ○傅 博, 藤原 政司, 高木 睦（北大院・工）

13:00 3P-J209 安定染色体を標的とした抗体遺伝子導入による抗体生産 CHO 細胞株の構築
…… ○田中 航[1], 吉冨 耕太[1], 山野 範子[1,2], 鬼塚 正義[2,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
([1]阪大院・工, [2]MAB 組合, [3]徳大院・社会産業理工）

14:00 3P-J210 Multicolor fluorescent *in situ* hybridization (mFISH)法を用いた Chinese hamster ovary (CHO)細胞における染色体多様性の解析
…… ○北 一真[1], 山野 範子[1,2], 鬼塚 正義[2,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
([1]阪大院・工, [2]MAB 組合, [3]徳島大院・社会産業理工）

13:00 3P-J211 遺伝子改変フィーダー細胞を用いた iPS 細胞の運動神経分化誘導
……○吉岡 貫太郎[1], 井藤 彰[1], Paerwen Paerhati[2], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1]
([1]九大院・工, [2]九大院・シス生科）

14:00 3P-J212 −80℃下における細胞の長期凍結保存: 保存温度が細胞に与える影響
……○宮本 義孝[1,2], 池内 真志[1], 野口 洋文[3], 生田 幸士[1], 林 衆治[2]
([1]東大・先端研, [2]名大院・医, [3]琉大・医）

【システムバイオロジー】

13:00 3P-J213 数理解析に基づく３因子定常振動系人工遺伝子回路の設計
……○浅村 健太[1], 成瀬 裕紀[2], 伊庭 斉志[2], 岡本 正宏[3], 花井 泰三[3], 濱田 浩幸[3]
([1]九大院・シス生科, [2]東大院・工, [3]九大院・農）

14:00 3P-J214 大腸菌による有用物質生産の改善のためのコアモデルの構築
……○厨 祐喜[1], 大山 彰[2], 荒木 通啓[1,3]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]インシリコバイオロジー, [3]京大院・医)

13:00 3P-J215 珊瑚礁海域における環境細菌叢ダイナミクスと環境ネットワーク解析
……○井手 圭吾[1,3], 伊藤 通浩[2], 藤村 弘行[2], 須田 彰一郎[2], 中野 義勝[2], 油谷 幸代[3], 竹山 春子[1,3]
([1]早大・先進理工, [2]琉球大・理, [3]産総研・早大 CBBD-OIL)

14:00 3P-J216 出芽酵母における解糖系タンパク質の発現限界を決める要因
……○江口 優一[1], 蒔苗 浩司[2], 守屋 央朗[2] ([1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大・異分野コア)

13:00 3P-J217 ニューラルネットワークを網羅的かつハイスループットに解析する新規方法論
……○松倉 秀典[1], 横山 治樹[1], 青木 航[1,2], 植田 充美[1]
([1]京大院・農, [2]JST・さきがけ)

14:00 3P-N218 「構成的遺伝学」を用いた大腸菌相同組換え機構の解明
……○古村 崚, 青木 航, 植田 充美（京大院・農）

【バイオセンシング，分析化学】

13:00 3P-N219 イメージング質量分析を用いた炎症モデルマウスにおけるプロスタグランジン可視化法の開発
……○安田 優太郎[1], 杉浦 悠毅[2], 東 達也[3], 福崎 英一郎[1], 新間 秀一[1]
([1]阪大院・工, [2]慶応大, [3]東理大・薬)

14:00 3P-J220 GC-MS を用いた糞便中短鎖脂肪酸の一斉分析法の開発
……○杉立 久仁代[1], 古橋 剛[2], 石原 玄基[2], 軸丸 裕介[1], 中井 隆志[1], 中村 貞夫[1]
([1]アジレント, [2]アニコム先進医療研)

13:00 3P-J221 多様な魚類における腸内細菌叢・有機物組成データの統合解析手法の構築
……○佐藤 有穂[1,2], 朝倉 大河[2], 坂田 研二[2], 伊達 康博[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
([1]横市大院・生命医, [2]理研 CSRS, [3]名大院・生命農学)

14:00 3P-J222 ドロップレットデジタル PCR によるサンゴ共在細菌量の地点間・季節間変動の追跡
……○竹田 裕貴[1], 細川 正人[2,3], 西川 洋平[1], 小川 雅人[1,6], 須田 彰一郎[4], 中野 義勝[5], 伊藤 通浩[5], 竹山 春子[1,3,6]
([1]早大・先進理工, [2]JST・さきがけ, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]琉球大・理, [5]琉球大・熱帯生物圏研究セ, [6]産総研・早大 CBBD-OIL)

13:00 3P-J223 微小液滴を用いた単一細胞からの超並列ゲノム解析技術の開発
……○西川 洋平[1], 細川 正人[2,3], 小川 雅人[1,4], 竹山 春子[1,2,4]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創研, [3]JST・さきがけ, [4]産総研・早大 CBBD-OIL)

14:00 3P-J224 蛍光標識材料への応用を見据えた新規青色蛍光材料の開発
……○矢下 亜紀良[1], 川上 隼人[1], 河合 功治[1], 村井 利昭[2]
([1]ミヨシ油脂株式会社, [2]岐阜大学)

13:00 3P-J225 光合成微生物におけるカロテノイドの蛍光イメージング：金属イオンによる蛍光増幅
……○油井 信弘, 阿部 克也（工学院大・先進工・生化）

14:00 3P-J226 Multi-functional magnetic nanoparticles for tumor cell isolation
……○Liu Chi-Hsien, Soubhagya Laxmi Sahoo
(Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Univ., Taiwan,)

13:00 3P-J227 細胞高集積化デバイスを用いた単一がん細胞からの分泌タンパク質の免疫測定
……○前田 義昌[1], 太田 健人[1], 畠山 慶一[2], 吉野 知子[1], 田中 剛[1]
([1]農工大院・工, [2]静岡県立静岡がんセンター研究所・遺伝子診療研究部)

14:00 3P-J228 Microcavity array 方式に基づく血中循環腫瘍細胞の迅速な遺伝子発現解析
……○根岸 諒[1], 小泉 史明[2], 澤田 武志[2], 下山 達[2], 松永 是[1], 田中 剛[1], 吉野 知子[1]
([1]農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院)

13:00 3P-J229 顕微ラマン分光法と多変量スペクトル分解法を組み合わせたペニシリンの *in situ* 検出

……○吉田 雅駿[1], 宮岡 理美[1], 安藤 正浩[2], 中島 琢自[3], 野中 健一[3], 高橋 洋子[3], 濵口 宏夫[4], 竹山 春子[1,2,5]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]北里大, [4]台湾国立交通大, [5]産総研・早大 CBBD-OIL)

【生合成，天然物化学】

14:00 3P-J230 気生微細藻類から単離された抗菌活性を有する新規クロロフィルの構造

……○三田 一至[1], 福田 裕介[1], 油井 信弘[1], 伊世井 湧太[2], 真弓 智仁[2], 小林 正美[2], 阿部 克也[1]
([1]工学院大・先進工・生化, [2]筑波大・物質工学域)

13:00 3P-J231 BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質

……○新倉 春香[1], 丸山 千登勢[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2], 濱野 吉十[1]
([1]福井県大・生物資源, [2]北大院・工)

14:00 3P-J232 streptothricin 類縁化合物における *O*-acylpeptide 構造生合成遺伝子群の同定 および機能解析

……○坂上 莉奈[1], 丸山 千登勢[1], 橋本 絢子[2], 新家 一男[3], 濱野 吉十[1]
([1]福井県大・生物資源, [2]JBIC, [3]産総研)

13:00 3P-J233 *Jatropha curcas* の産生するホルボールエステル類の生理活性評価

……○柳内 知哉[1], 小田垣 瑞穂[1], 高田 果歩[1], 松川 哲也[1], 西海 史子[2], 名倉 由起子[2], 柳原 格[2], 梶山 慎一郎[1]
([1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]大阪母子医療センター・研究所)

14:00 3P-J234 種々のストレス状況下におけるカンキツ類の二次代謝物質のプロファイリング

……○伊佐木 芳[1], 松川 哲也[1,2], 梶山 慎一郎[1] ([1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]近畿大・附属農場)

13:00 3P-J235 バイオポリエステル生合成における補酵素供給強化の影響評価

……○宮原 佑宜, 太田 美乃, 柘植 丈治（東工大院・総理工）

14:00 3P-J236 Direct secretory production of D-lactate oligomers by engineered *Escherichia coli*: a shortcut in the process of polylactide production

……○Camila Utsunomia[1], Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Chiaki Hori[1,3], Seiichi Taguchi[2,3]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]CREST, JST)

ランチョンセミナー

3L-E01 エッペンドルフ株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　E 会場（11:45〜12:45）

3L-G02 ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（11:45〜12:45）

3L-H03 日本ウォーターズ株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（11:45〜12:45）

3L-I04 株式会社島津製作所

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（11:45〜12:45）

3L-J05 サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（11:45〜12:45）

イブニングセッション

西早稲田キャンパス　56 号館地下 1 階　理工カフェテリア（18:00〜20:00）

本セッションは大会初の試みとして開催される，「企業人から若い世代への産の心と技術の継承」と「従来の枠にとらわれないものづくりの異分野交流」を目的とした，サロン風のポスターセッションです．軽食や飲み物も用意いたします．ふだん触れることの少ない各企業の貴重な話を聞けるまたとない機会ですので，気軽にご参加ください．

出展企業・タイトルなどの情報は大会ホームページ（https://www.sbj.or.jp/2017/）に掲載しますので，ぜひご覧ください．

第 4 日（9 月 14 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

シンポジウム（午前の部）

醗酵生産技術の温故知新〜その歩みと新展開

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　A 会場（9:00〜11:00）

9:00　はじめに
……鈴木 市郎

座長：**鈴木 市郎**

9:05　4S-Aa01　蛍光 DO・蛍光 pH センサーとシングルユースリアクター
……○石川 陽一[1,2]（[1]エイブル, [2]バイオット）

9:30　4S-Aa02　攪拌技術の温故知新
……○仁志 和彦（千葉工大・工・機械）

9:55　4S-Aa03　FK506 発酵培地原料のリスク回避戦略
……○竹下 敏一, 二瀬 彩子, 岡崎 宜恭, 渡辺 国晴, 清水 志保（アステラス ファーマテック 株式会社）

10:20　4S-Aa04　ガスバリア性（DLC）PET ボトルの開発と実用化
……○山崎 照之, 中谷 正樹, 加藤 克哉（キリン パッケージング技術研）

10:40　4S-Aa05　発酵プロセス産業における，IoT テクノロジーの活用事例と今後の可能性
……○天辰 健一, 上塘 広也, 杉本 勇（カマルク特定技術研究所・CTO）

地球の未来資源に貢献する生物工学【本部企画】

西早稲田キャンパス　57 号館 2 階　B 会場（9:00〜11:00）

9:00　はじめに
……安原 貴臣

座長：**今井 泰彦**

9:05　4S-Ba01　サトウキビ産業の農工横断型技術革命による砂糖・エネルギー同時増産の実現
……○小原 聡（アサヒグループホールディングス）

9:30　4S-Ba02　藻類がもたらす資源の有価物化と産業創生
……○鈴木 健吾（ユーグレナ）

9:55　休憩

座長：**田口 精一**

10:05　4S-Ba03　プラチナ社会における植物資源の役割
……○菊池 康紀（東大・総括プロ・プラチナ講座）

10:30　4S-Ba04　二酸化炭素を資源化する生体触媒を基盤とした人工光合成技術
……○天尾 豊（阪市大・複合先端研）

10:55　おわりに
……今井 泰彦

動物・臨床現場から学ぶ成育医療研究　～検査から診断・治療への応用～

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　C 会場（9:00～11:00）

9:00 はじめに
…… 宮本 義孝
座長：**宮本 義孝**

9:05 4S-Ca01 生殖工学と生殖医学の融合～育種から不妊診断・治療への展開～
…… ○宮戸 健二[1], 花井 慎弦[2], 康 宇鎭[1], 中村 彰宏[2], 河野 菜摘子[2]
（[1]国立成育医療研究センター, [2]明治大・農）
座長：**乾 雅史**

9:25 4S-Ca02 タンデムマス(LC-MS/MS)を用いた新生児マススクリーニングの現状と今後ついて
…… ○渡辺 淳
（島津製作所・分析計測事業部・ライフサイエンス事業統括部・MSBU ソリューション開発 G）
座長：**折原 芳波**

9:40 4S-Ca03 ゲノム編集による疾患モデルマウスの作製と解析
…… ○乾 雅史（明治大・農）

10:00 4S-Ca04 ペプチドマイクロアレイ解析技術によるアレルギー症状の経過予測
…… ○大河内 美奈（東工大・物質理工）
座長：**乾 雅史**

10:20 4S-Ca05 非 IgE 依存性消化管アレルギー診断における血便中 EDN 測定の有用性
……○折原 芳波[1,2], 野村 伊知郎[2], 森田 英明[2], 斎藤 博久[2], 松本 健治[2]
（[1]早大・先進理工, [2]国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部）

10:40 休憩
司会：**宮本 義孝**

10:45 パネルディスカッション
…… パネリスト（全発表者）

若手研究者が切り拓く，1 細胞解析技術の最先端

西早稲田キャンパス　56 号館 1 階　D 会場（9:00～11:00）

9:00 はじめに
…… 細川 正人
座長：**山口 哲志**

9:03 4S-Da01 CUBIC による全身全細胞のオミクス的網羅解析
…… ○洲崎 悦生[1,2,3]
（[1]東大院・医・システムズ薬理学, [2]科学技術振興機構さきがけ, [3]理研・QBiC・合成生物学研究 G）

9:28 4S-Da02 微小試料からの機能ゲノミクス解析―組織から１細胞，微生物まで―
…… ○細川 正人[1,2]（[1]早大・ナノライフ創新研, [2]JST・さきがけ）
座長：**青木 航**

9:49 4S-Da03 １細胞メタボロミクスに向けた基盤技術開発
……○和泉 自泰[1], 原 健士[1], 中谷 航太[1], 秦 康祐[1], 山村 昌平[2], 松本 雅記[1], 馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]産総研・健康工学）
座長：**細川 正人**

10:14 4S-Da04 クロマチン高次構造のイメージング
…… ○宮成 悠介（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

10:39 4S-Da05 1 細胞解析を支援する合成分子ツールの開発
…… ○山口 哲志（東大・先端研）

特別口頭発表 B（大会トピックス講演・生物工学学生優秀賞「飛翔賞」講演）

講演番号は同日の 13:00〜15:00 に実施するポスター発表での講演番号と共通です.
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨および別冊の大会トピックス集をご覧ください.

特別口頭発表 B5

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　E 会場（9:00〜11:00）

座長：**田中 剛, 藤田 聡史**

【酵素学，タンパク質工学および酵素工学】

9:00 4P-E017 不斉水酸化反応とアミノ基立体転換反応を組み合わせた酵素法による(2*R*)-ヒドロキシアミノ酸の生産

……○日比 慎[1,2], 角田 洋輔[3], 北澤 宏明[3], 岸本 高英[3], 杉山 明生[3], 小園 祥子[4], 高橋 里美[1], 小川 順[4]
([1]京大院・農, [2]富山県大・生工研セ, [3]東洋紡, [4]京大院・農)

9:20 4P-E041 NanoLuc 由来ペプチドタグを用いた簡便迅速な免疫測定法の開発

……○大室（松山） 有紀, 蘇 九龍, 高橋 里帆, 上田 宏（東工大）

【代謝生理学・発酵生産】

9:40 4P-E083 GC/MS によるメタボローム解析に資する新規 Calibration-Curve-Locking Database の構築

……○相馬 悠希[1], 山下 俊幸[1], 秦 康祐[1], 高橋 政友[1], 杉立 久仁代[2], 芹野 武[2], 宮川 浩美[3], 鈴木 健一[3], 川向 孝知[4], 塩田 晃久[4], 山田 佳代子[4], 和泉 自泰[1], 馬場 健史[1]
([1]九大・生医研, [2]アジレント・テクノロジー, [3]ジーエルサイエンス, [4]エーエムアール)

【環境バイオテクノロジー】

10:00 4P-E143 大腸菌の代謝や細胞表層電子伝達系の改変が微生物燃料電池の性能に与える影響

……○川口 太一[1], 福井 早紀[1], 駒 大輔[2], 大本 貴士[2], 尾島 由紘[1], 東 雅之[1]
([1]阪市大院・工, [2]阪技術研)

【植物バイオテクノロジー】

10:20 4P-E161 シロイヌナズナの Non photochemical quenching に関与する K+/H+ アンチポーター の輸送活性の評価

……○辻井 雅[1], 解良 康太[1], 濱本 晋[1], 黒森 崇[2], 鹿内 利治[3], 魚住 信之[1]
([1]東北大院・工, [2]理研・植物科学研究セ, [3]京大院・理)

10:40 4P-E084 **〈生物工学学生優秀賞（飛翔賞）〉受賞者講演**
ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発

……○中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎（阪大院・工）

特別口頭発表 B6

西早稲田キャンパス　52 号館 1 階　F 会場（9:00〜11:00）

座長：**松村 洋寿, 高橋 寿洋**

【動物バイオテクノロジー】

9:00 4P-F181 Body on a Chip の実現に向けた細胞の自己凝集化誘導剤（CAT）を用いた 2D-3D 連結細胞構造体の作製と固定化

……長島 諒[1,2], ○岩井 良輔[1,2]（[1]岡山理大・技科研, [2]岡山理大・工）

【バイオ情報】

9:20 4P-F183 ヒト毛髪に付着する細菌の存在形態および群集構造の解析

…… ○渡邉 康太[1], 西 英二[2], 田代 幸寛[1], 酒井 謙二[1]

（[1]九大院・生資環, [2]大分科捜研）

【生体関連化学】

9:40 4P-F198 スクアレンーアンブレイン環化酵素の創出：アンブレインはスクアレンから 2 つの経路を通して 1 つの酵素によって合成できる

…… ○上田 大次郎, 奥野 琴音, 星野 力, 佐藤 努（新潟大・自然研）

【生体分子工学】

10:00 4P-F216 “超”高親和性型ペプチド輸送体の発見と輸送体工学への応用

…… ○中山 綾花[1], Vu Thi Tuyet Lan[1], 河合 駿[2], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 河原崎 泰昌[1], 伊藤 圭祐[1]

（[1]静県大・食栄, [2]名大院・創薬科学）

10:20 4P-F202 **〈生物工学学生優秀賞（飛翔賞）〉受賞者講演**

多価不飽和脂肪酸合成酵素における 3-ケトアシルリダクターゼとデヒドラターゼの機能解析

…… ○林 祥平[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 氏原 哲朗[3], 大利 徹[2]

（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]協和発酵バイオ）

10:40 4P-F213 **〈生物工学学生優秀賞（飛翔賞）〉受賞者講演**

ペプチドアレイを用いた配列改変による細胞内機能性ペプチドの高活性化

……○小崎 一功[1], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創生セ）

特別口頭発表 A（一般講演　ショートプレゼンテーション）

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　G 会場（9:00〜10:48）

セッション A9-1，A9-2，A9-3，A9-4（43 演題）　座長：**中島 春紫, 加藤 太一郎**

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（9:00〜10:48）

セッション A10-1，A10-2，A10-3，A10-4（43 演題）　座長：**前田 理久, 西原 宏史**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（9:00〜10:40）

セッション A11-1，A11-2，A11-3，A11-4（40 演題）　座長：**堀 知行, 河原 正浩**

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（9:00〜10:15）

セッション A12-1，A12-2，A12-3（30 演題）　座長：**諸星 知広**

1 演題の登壇時間は 2 分 30 秒（発表 2 分），1 セッションは 30 分，セッション間の休憩時間はありません．詳しくは特別口頭発表 A スケジュール一覧をご参照ください．講演要旨については，スケジュール一覧に記載した各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

一般講演　ポスター発表

西早稲田キャンパス　63 号館 2 階　ポスター会場（13:00〜15:00）

【分類，系統，遺伝学】

13:00 4P-G001 海藻分解性好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 のドラフトゲノム解析
…… ○藤井 健太, 大城 隆, 鈴木 宏和（鳥取大院・工・化生応工）

14:00 4P-G002 *Pseudomonas putida* とその近縁種の MALDI-TOF MS を用いた迅速同定法の確立
…… ○岩崎 卓己, 田頭 彩佳, 則武 ちあき, 上條 知昭, 川﨑 浩子（NITE・NBRC）

13:00 4P-N003 MALDI-TOF MS を用いた *Aspergillus* 属糸状菌の識別ライブラリーの構築
…… ○上條 知昭, 伴 さやか, 川﨑 浩子（NITE・NBRC）

14:00 4P-N004 MALDI-TOF MS を用いたパン用酵母の識別方法の検討
…… ○半谷 朗, 安田（吉野） 庄子, 小野 奈津子（あいち産科技セ）

13:00 4P-G005 麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規制御因子 KpeR の機能解析
……○荒川 弦矢[1], 江口 優一[1], 小川 真弘[2], 小山 泰二[2], 徳岡 昌文[1], 進藤 斉[1], 穂坂 賢[1]
（[1]東農大院・農, [2]野田産研）

14:00 4P-G006 山形県，新潟県及び兵庫県で分離した油脂酵母 Lipomyces 属の解析
…… ○山崎 敦史, 宮崎 由美子（NITE・NBRC）

13:00 4P-G007 Smart utilization of jumbo phages for biological control of zoonotic diseases
…… ○Alaaeldin M. Saad[1], Ahmed M. Soliman[2], Hirofumi Nariya[2], Tadashi Shimamoto[2], Takashi Yamada[1], Takeru Kawasaki[1]
([1]Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【酵素学，酵素工学】

14:00 4P-G008 *Pseudomonas* 属細菌の ABC 輸送体基質結合タンパクと推定されていた新規なアコニット酸イソメラーゼの発見
…… ○平磯 一輝, 滝口 有沙, 丸海老 純也, 桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）

13:00 4P-G009 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来 α-グルコース転移酵素を用いた ethyl α-D-glucopyranoside の選択的な高収量生産
…… ○恩田 裕, 中里 美穂, 桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）

14:00 4P-G010 耐熱性を向上した *Naxibacter* 属由来イソアミラーゼの開発
…… ○馬場 将弘, 佐野 涼子, 伊豫谷 愛, 小川 俊, 堀口 博文, 塩田 一磨, 吉川 潤（合同酒精・酵素医薬品研）

13:00 4P-G011 好熱性アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来耐熱性酵素が有する UDP-GlcNAc 合成活性の人為的向上
…… ○本田 裕樹[1], 河原林 裕[2]（[1]奈良女子大・理・化学, [2]産総研）

14:00 4P-G012 酵素触媒タンパク質架橋法によるキチナーゼ集合体の設計と機能評価
…… ○田中 悠佑[1], 南畑 孝介[1], 平良 東紀[2], 神谷 典穂[1,3]（[1]九大院・工, [2]琉球大・農, [3]九大・未来化セ）

13:00 4P-N013 *Streptomyces thermodiastaticus* 由来耐熱，好酸性キチナーゼの諸性質の検討
…… ○武 慶太郎, 藤木 英寿, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学）

14:00 4P-N014 サルコシンオキシダーゼの合理的な変異による L-チオプロリンオキシダーゼへの改変
…… ○黒部 督惠, 岡島 奨, 吉田 知左, 西矢 芳昭（摂南大・生命科学）

13:00 4P-N015 サルコシンオキシダーゼの基質親和性および基質特異性の改良に関する基礎的検討
…… ○松本 美徳, 竹本 淳一, 山本 眞知, 西矢 芳昭（摂南大・生命科学）

14:00 4P-G016 好熱性真菌 D-アスパラギン酸オキダーゼの機能解析と基質親和性の向上
…… ○高橋 祥司, 大杉 航平, 新保 晃, 阿部 勝正, 解良 芳夫（長岡技科大院・生物機能工）

13:00 4P-E017 不斉水酸化反応とアミノ基立体転換反応を組み合わせた酵素法による(2*R*)-ヒドロキシアミノ酸の生産
…… ○日比 慎[1,2], 角田 洋輔[3], 北澤 宏明[3], 岸本 高英[3], 杉山 明生[3], 小園 祥子[4], 高橋 里美[1], 小川 順[4]（[1]京大院・農, [2]富山県大・生工研セ, [3]東洋紡, [4]京大院・農）

14:00 4P-G018 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上
…… ○林 優花[1], 中村 誠彌[1], 酒瀬川 信一[2], 杉森 大助[1]（[1]福島大・共生システム理工, [2]旭化成ファーマ）

13:00 4P-N019 ジペプチド Trp-His 合成能を有する $_{L}$-アミノ酸エステラーゼのクローニングと諸性質の検討
…… ○牧 慶子[1], 田中 貴大[1], 高木 一好[2], 林 順司[1], 若山 守[1]（[1]立命館大院・生命科学・生工, [2]立命館大院・生命科学・応化）

14:00 4P-N020 *Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究
…… ○佐野 千晴[1], 岡住 脩平[1], 今岡 大士[1], 日笌 隆雄[2], 林 順司[1], 若山 守[1]（[1]立命館大院・生命科学, [2]福井県大・生物資源）

13:00 4P-G021 D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離とその D-アミノ酸オキシダーゼの酵素学的諸特性の解析
…… ○七五三掛 湧也, 高橋 祥司, 阿部 勝正, 解良 芳夫（長岡技科大院・生物機能工）

14:00 4P-N022 食品中アクリルアミド低減に向けた L-アスパラギナーゼ高生産乳酸菌の探索及び諸性質の検討
…… ○古川 慎, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学）

13:00 4P-N023 L-アミノ酸エステラーゼによるイミダゾールペプチドの酵素合成に関する研究
…… ○小塩 茂々子, 林 順司, 若山 守（立命館大院・生命科学・生工）

14:00 4P-G024 プロリン生合成系酵素 GPR の機能解析 ~γ-glutamyl cysteine 合成の観点から~
…… 村田 瑠偉[1], ○松浦 秀幸[1], 蓮池 友香[1], 赤石 健児[1], 川下 理日人[2], 原田 和生[1], 平田 收正[1]（[1]阪大院・薬, [2]近畿大・理工）

13:00 4P-G025 ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素 QhpD における架橋形成配列長および配列特異性の解析
……○小酒井 一輝[1], 中井 忠志[2], 谷澤 克行[1], 岡島 俊英[1]
([1]阪大・産研, [2]広島工大・生命)

14:00 4P-G026 キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素のキノン補酵素含有サブユニットの翻訳後修飾機構
……○大関 俊範[1], 中井 忠志[2], 谷澤 克行[1], 岡島 俊英[1]
([1]阪大・産研, [2]広島工大・生命)

13:00 4P-N027 放線菌由来 M24 アミノペプチダーゼ特異性に関する新たな知見
……○畑中 唯史[1], 万 クン[1], 裏地 美杉[1], 中東 良太[2]
([1]岡山生物研, [2]ナガセケムテックス（株))

14:00 4P-N028 放線菌フェルラ酸エステラーゼにおけるアルコリシス活性と加水分解活性の関わり
……○裏地 美杉, 万 クン, 畑中 唯史（岡山県生科総研）

13:00 4P-G029 *Gluconobacter* 属酢酸菌のデヒドロキナ酸脱水酵素の細胞内局在とその制御
……○中村 謙太郎[1], 松谷 峰之介[1], 片岡 尚也[1,2], 藥師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大学院・創科, [2]山口大・中高温微セ)

14:00 4P-G030 *Gluconacetobacter* 属酢酸菌の膜結合型ソルボソン脱水素酵素の解析
……○高橋 亮太[1], 松谷 峰之介[1], 片岡 尚也[1,2], 藥師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大院・創科, [2]山口大・中高温微セ)

13:00 4P-N031 *Pimelobacter* sp. Z-483 株由来プロテアーゼ前駆体遺伝子のプロセシング機序
……○大橋 大志[1], 浴野 圭輔[2], 尾山 廣[1]（[1]摂南大院・理工, [2]崇城大・生物生命)

14:00 4P-G032 担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* 由来の生分解性プラスチック分解酵素の簡便な濃縮・殺菌および安定化
……○田中 拓未, 鈴木 健, 山下 結香, 鎗水 透, 北本 宏子（農研機構・農業環境センター)

13:00 4P-N033 *Aspergillus oryzae* 由来 Amidase におけるカルバミン酸エチルの分解
……○藤原 可菜子[1], 柿薗 ダララット[2], 奥田 将生[2], 向井 伸彦[2], 正木 和夫[1,2,3]
([1]広島大院・生物圏, [2]酒総研, [3]岐阜産技セ)

【抗体工学】

14:00 4P-G034 抗体遺伝子変異能力を操作できるニワトリＢ細胞を用いた動物細胞ディスプレイ
……○金山 直樹, 太田 愛美, 中谷 元紀, 中谷 耕治, 植月 英智, 西山 由美子, 仲尾 祐輝, 曲 正樹, 徳光 浩
（岡山大院・自科)

13:00 4P-G035 糖鎖改変によるカイコバキュロウイルス発現系由来抗 Her2 抗体の高品質化
……○江頭 由里子[1,2], 長門石 曉[3], 木吉 真人[4], 石井 明子[4], 津本 浩平[2,3]
([1]シスメックス, [2]東大院・工, [3]東大・医科研, [4]国立医薬食衛研)

14:00 4P-G036 単ドメイン抗体に基づくネオバイオ分子免疫センサー mini Q-body の構築
……○上田 宏[1], Banwait Bhagat[2], 董 金華[1], Kristensen Peter[2]
([1]東工大・化生研, [2]オーフス大学・工)

13:00 4P-G037 *Serratia marcescens* type 1 secretion system 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], 浜垣 秀平[1], 辻 明彦[2], 大森 謙司[3], 湯浅 恵造[2]
([1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大院・生物資源産業, [3]名古屋大学院・創薬科学)

14:00 4P-G038 抗体データベースを利用した大規模変異導入による難発現抗体断片の発現量向上プロセスの提案
……○服部 修平, 二井手 哲平, 中澤 光, 本田 亜由美, 梅津 光央（東北大院・工)

13:00 4P-N039 タンパク質の機能改変を効率化するライブラリーデザインサイクルの提案
……○菊池 沙也香, 服部 峰充, 中澤 光, 二井手 哲平, 梅津 光央（東北大院・工)

14:00 4P-G040 Ecobody 法によるヒトシングル B 細胞由来抗インフルエンザモノクローナル抗体の取得
……○内田 由乃, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄（名大院・生命農学)

13:00 4P-E041 NanoLuc 由来ペプチドタグを用いた簡便迅速な免疫測定法の開発
……○大室（松山） 有紀, 蘇 九龍, 高橋 里帆, 上田 宏（東工大）

14:00 4P-G042 検査・診断薬開発に役立つ Flow Cytometer を利用した立体構造を選択的に認識するモノクローナル抗体作製法の開発
……○中嶋 千佳[1], 赤城 幸[2,3], 背戸川 千春[1], 栗原 靖之[2]
（[1]横国大, [2]横国大院・工, [3]アステラス製薬）

13:00 4P-N043 エクソソームの高効率アフィニティ分離が可能な単鎖抗体固定化担体の開発
……○新 裕太[1], 赤井 亮太[1], 熊田 陽一[1], 堀内 淳一[1], 片山 淳子[2], 的場 一孝[2]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]日産化学）

14:00 4P-G044 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
……○坂本 祐一朗, 李 歓, 熊田 陽一, 堀内 淳一（京工繊大院・工芸科学）

13:00 4P-N045 ウサギ単鎖抗体を用いた高感度ラテックス凝集検査法の開発
……○谷端 怜奈[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ, [3]デンカ生研）

14:00 4P-N046 高親和性ウサギ scFv-Fc の開発とインフルエンザ検査への応用
……○神吉 菜摘[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ株式会社, [3]デンカ生研株式会社）

13:00 4P-G047 インフルエンザ高感度診断のための高親和性ウサギ単鎖抗体の開発
……○岡西 崚輔[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ, [3]デンカ生研）

14:00 4P-N048 B 細胞由来培養細胞を利用した抗体分子進化基盤技術の開発
……○橋本 講司, 黒澤 恒平, 村山 晃歩, 瀬尾 秀宗, 太田 邦史（東大院・総合文化）

13:00 4P-N049 イムノクロマトグラフィの高感度化を目指した抗体固定化技術の開発
……○岡林 雪乃[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 犬飼 忠彦[4], 川瀬 三雄[4,5], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ株式会社, [3]デンカ生研株式会社, [4]株式会社 TBA, [5]東北大院・医工）

【代謝工学】

14:00 4P-G050 *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株のシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析
……○山本 泰誠, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛（関西大・化生工）

13:00 4P-G051 DIT1 ターミネーターと２つの RNA 結合タンパク質による目的タンパク質の増産技術
……○松山 崇[1], 伊藤 洋一郎[1], 北川 孝雄[2], 山西 守[1], 片平 悟史[1], 井沢 真吾[3], 入江 賢児[4], 清木 誠[2]
（[1]豊田中研, [2]山口大院・医系, [3]京工繊大院・工芸科学, [4]筑波大）

14:00 4P-N052 出芽酵母のメバロン酸経路強化遺伝子破壊の探索と評価
……○神田 義貴, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

13:00 4P-G053 Improved cellulase production and efficiency of consolidated bioprocessing using recombinant yeast strains engineered with functional genes involved in stress tolerance
……○Xinshui Yu[1], Fengwu Bai[1], Xinqing Zhao[2]
（[1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China）

14:00 4P-G054 Enhanced cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of the fermentation process for efficient xylitol production from kraft pulp
…… ○Gregory Guirimand[1], Kentaro Inokuma[1], Takahiro Bamba[2], Kengo Sasaki[1], Chiaki Ogino[2], Tomohisa Hasunuma[1], Akihiko Kondo[2,3]
([1] Grad. Sch. of Sci., Technol. & Innov., Kobe Univ., [2] Dept. of Chem. Sci. & Eng., Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., [3] RIKEN, Biomass Eng. Program)

13:00 4P-N055 長期間の継代培養を基盤とした出芽酵母へのグリセロール資化能の賦与
…… 河合 一輝[1], 兼崎 友[2], 吉川 博文[3], ○平沢 敬[1]
([1] 東工大・生命理工学院, [2] 東農大・ゲノムセンター, [3] 東農大・応生科)

14:00 4P-G056 長期継代培養によりグリセロール資化能を獲得した出芽酵母の代謝フラックス解析
……○湯澤 太路[1], 河合 一輝[1], 白井 智量[2], 近藤 昭彦[2,3,4], 平沢 敬[1]
([1] 東工大・生命理工学院, [2] 理研・バイオマス, [3] 神戸大・科学技術イノベーション, [4] 神戸大院・工)

13:00 4P-G057 Deletion of endogenous genes on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* improves xylitol yield during aerobic fed-batch fermentation
……○Baixue Yang, Min Gou, Zhaoyong Sun, Yueqin Tang
(Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ.)

14:00 4P-G058 分裂酵母の代謝改変株を用いた 3-ヒドロキシプロピオン酸生産
…… ○高山 征也, 小西 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦（神戸大院・工）

13:00 4P-N059 ピルビン酸代謝フローの転換による出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産性の向上
……○森田 啓介[1], 松田 史生[1], 岡本 浩二[2], 石井 純[3], 近藤 昭彦[3], 清水 浩[1]
([1] 阪大院・情報, [2] 阪大院・生命機能, [3] 神戸大院・イノベ)

14:00 4P-G060 低温ストレスにより誘導される南極産担子菌酵母が持つ二次代謝産物の探索
…… ○辻 雅晴（国立極地研）

13:00 4P-G061 Isolation of thermotolerant mutants and characterization of fatty acid profile in *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16
……○Chih Chan Wu[1], Takao Ohashi[1], Yung Yu Tsai[1], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1] ICBiotech, Osaka Univ., Japan, [2] Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand)

14:00 4P-G062 糸状菌 *Aspergillus niger* における alternative oxidase 遺伝子高発現によるシュウ酸生産速度の向上
…… ○吉岡 育哲, 小林 慶一, 桐村 光太郎（早大・先進理工・応化）

13:00 4P-N063 生きた麹菌摂取が宿主の腸内細菌叢及び腸内代謝物に与える影響
……○都築 翔[1], 山田 和広[1], 高田 真由香[1], 村田 俊輔[1], 丸井 萌子[1], 長澤 麻央[1], 林 利哉[1], 片山 琢也[2], 丸山 潤一[2], 兒島 孝明[3], 中野 秀雄[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
([1] 名城大・農, [2] 東大院・農, [3] 名大院・農)

14:00 4P-G064 *Clostridium perfringens* の毒素産生抑制に関わる内在性クオラムクエンチングの解析
…… ○安達 桂香, Ravindra Pal Singh, 園元 謙二, 中山 二郎（九大院・農）

13:00 4P-G065 Target-AID を利用したゲノム編集による高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種
…… ○向山 正治[1], 市毛 栄太[1], 田中 勉[2], 西田 敬二[2], 近藤 昭彦[2]
([1] 日本触媒, [2] 神戸大学)

14:00 4P-N066 代謝物濃度絶対定量値を用いたエタノール生産シアノバクテリア代謝律速点の解析
…… ○西口 大貴, 永井 暉, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

13:00 4P-G067 任意の栄養要求生変異株構築に向けた代謝シミュレーション法の開発
…… ○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 清水 浩（阪大院・情報）

14:00 4P-G068 相関解析を基盤としたメタボロミクスによる, 1 -ブタノール生産大腸菌改良における遺伝子改変標的の捜索
…… ○新田 克章[1], Putri Sastia[1], Pontreli Sammy[2], Liao James[2], 福崎 英一郎[1]
([1] 阪大院・工, [2] Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

13:00 4P-G069 耐熱性 NAD^+サルベージ合成酵素遺伝子群の大腸菌内での共発現とモジュール化
…… ○谷口 博範, 岡野 憲司, 本田 孝祐（阪大院・工）

【オミクス解析】

14:00 4P-H070 時空間に対して離散的・連続的に採取した環境水のプランクトンと物理化学プロファイルの特徴抽出

…… ○種田 あずさ[1], 大島 嵩裕[2], 坪井 裕理[1], 伊達 康博[1,2], 守屋 繁春[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
([1]理研・CSRS, [2]横市大院・生命医, [3]名大院・生命農学)

13:00 4P-N071 魚類・底泥分析データの AI 重要変数選択法による沿岸生態系の特徴抽出

…… ○朝倉 大河[1], 坂田 研二[1], 伊達 康博[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
([1]理研・CSRS, [2]横市院・生医, [3]名大院・生命農)

14:00 4P-H072 メタボローム解析によるオーランチオキトリウム属のドコサヘキサエン酸及びアスタキサンチン生産性の改善

…… ○渡邉 研志[1,4], Hazel V. Arafiles Kim[1,4], 岡村 好子[1,4], 田島 誉久[1,4], 松村 幸彦[2,4], 中島田 豊[1,4], 松山 恵介[3], 秋 庸裕[1,4]
([1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工, [3]長瀬産業, [4]JST・CREST)

13:00 4P-N073 シグマ因子 SigE によるシアノバクテリア代謝制御の定量プロテオーム解析

…… ○徳丸 雄磨[1], 植林 希代加[1], 小山内 崇[2], 松田 史生[1], 清水 浩[1]
([1]阪大院・情報, [2]明治大・農)

14:00 4P-H074 枯草菌中枢代謝経路における酵素発現レベルとフラックス分布の関係

…… ○戸谷 吉博, 富田 淳美, 松田 史生, 清水 浩（阪大院・情報）

13:00 4P-H075 サンゴと共在細菌叢の構造解明に向けた細菌叢解析及び関連遺伝子群の推定

…… ○伊藤 遼[1,2], 伊藤 通浩[3], 中野 義勝[3], 大久保 悠介[1], 森 一樹[2], 竹山 春子[1,2,4]
([1]早大・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]琉球大・理, [4]早大・ナノライフ創新研)

14:00 4P-H076 生物間相互作用の俯瞰的理解に向けた統合オミクス解析

…… ○丸山 徹[1,2], 伊藤 通浩[3], 若王子 智史[1], 大久保 悠介[1], 新里 宙也[4], 藤村 弘行[5], 中野 義勝[3], 須田 彰一郎[5], 竹山 春子[1,2,6]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]琉大・熱生研, [4]OIST・マリンゲノミクスユニット, [5]琉大・理, [6]早大・ナノライフ創新研)

13:00 4P-N077 Proteomic analysis reveals the underlying mechanisms of improved acetic acid stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by *SET5* overexpression

…… ○Xinqing Zhao[1], Mingming Zhang[2], Fengwu Bai[1]
([1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China)

14:00 4P-H078 *N*-アセチルグルコサミン資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* の基質別代謝特性の解析

…… ○猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・イノベ）

13:00 4P-H079 LC-MS/MS によるマウス糞便中の代謝物測定 −若齢マウスと老齢マウスの測定例−

…… ○國澤 研大[1,2], 服部 考成[1,2], 岡 有香里[1], 川名 修一[1], 河野 慎一[1,2], 早川 禎宏[1], 飯田 順子[1,2], 福崎 英一郎[3], 松本 光晴[4]
([1]島津製作所, [2]阪大・島津分析イノベーション共同研, [3]阪大院・工, [4]協同乳業)

14:00 4P-H080 メタボロミクス解析を用いた山廃日本酒製造に関わる代謝産物の同定

…… ○油屋 駿介[1,2], 立上 陽平[1,2], 森坂 裕信[1,3], 青木 航[1,3], 高阪 千尋[3,4], 谷 雅史[3], 廣岡 青央[3,4], 山本 佳宏[3,4], 北岡 篤士[5], 藤原 久志[5], 若井 芳則[5], 植田 充美[1,3]
([1]京大院・農, [2]日本学術振興会特別研究員（DC1), [3]京都バイオ計測セ, [4]京産技研, [5]黄桜)

13:00 4P-N081 柑橘類の果皮に含まれるセラミド素材の LC-MS/MS による分析

…… 柳川 大樹, ○今井 博之（甲南大院・自然科学・生命・機能科学）

14:00 4P-H082 メタボローム解析に資する次世代型多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理法の開発

…… 相馬 悠希[1], 山下 俊幸[1], 高橋 政友[1], 秦 康祐[1], 川向 孝知[2], 塩田 晃久[2], 山田 佳代子[2], 宮川 浩美[1], 鈴木 健一[3], 杉立 久仁代[4], 芹野 武[4], 和泉 自泰[1], ○馬場 健史[1]
([1]九大・生医研, [2]エーエムアール, [3]ジーエルサイエンス, [4]アジレント・テクノロジー)

13:00 4P-E083 GC/MS によるメタボローム解析に資する新規 Calibration-Curve-Locking Database の構築
……○相馬 悠希[1], 山下 俊幸[1], 秦 康祐[1], 高橋 政友[1], 杉立 久仁代[2], 芹野 武[2], 宮川 浩美[3], 鈴木 健一[3], 川向 孝知[4], 塩田 晃久[4], 山田 佳代子[4], 和泉 自泰[1], 馬場 健史[1]
([1]九大・生医研, [2]アジレント・テクノロジー, [3]ジーエルサイエンス, [4]エーエムアール)

14:00 4P-E084 ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発
…… ○中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎（阪大院・工）

【醸造学，醸造工学】

13:00 4P-N085 味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合育種
…… ○黒木 克明[1], 伊藤 功起[1], 近藤 彬文[1], 中村 建介[2], 尾形 智夫[1]
([1]前橋工科大・工・生工, [2]前橋工科大・工・生命情報)

14:00 4P-H086 老香を発生させにくい清酒酵母の育種
……○若林 興[1], 井上 豊久[1], 池田 優理子[2], 神田 涼子[2], 磯谷 敦子[2], 藤井 力[2], 中江 貴司[1]
([1]日本盛, [2]酒総研)

13:00 4P-H087 釜石「はまゆり酵母」の特性と日本酒醸造への応用
…… ○齊藤 隆行[1], 山田 美和[1], 笠井 宏朗[2], 井上 諭宜[3], 下飯 仁[1]
([1]岩手大学院・農, [2]北里大学・海洋生命科学部, [3]釜石市)

14:00 4P-H088 酢酸ナトリウム資化性を指標として育種した寡酸性酵母の諸性質解析
…… ○中瀬 舞[1], 西本 遼[1], 窪寺 隆文[1], 田代 康介[2], 明石 貴裕[1]
([1]白鶴酒造, [2]九大院・農)

13:00 4P-H089 エタノール耐性清酒酵母きょうかい 11 号における Ras2 活性化の効果
…… ○石田 義大[1], 山田 美和[1], 森中 和也[2], 赤尾 健[2], 下飯 仁[1]
([1]岩手大院・農, [2]酒総研)

14:00 4P-H090 カプロン酸エチルを高生産する尿素非生産性清酒酵母 S9arg の実用化
…… ○栗林 喬[1], 佐藤 圭吾[1], 城 斗志夫[2], 金桶 光起[1]
([1]新潟県醸造試, [2]新潟大・農)

13:00 4P-H091 花から分離した野生酵母の糖資化能と清酒の成分に及ぼす影響
……○大原 礼仁[1], 三井 俊[2], 船越 吾郎[2], 伊藤 彰敏[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
([1]名城大院・農, [2]あいち産科技セ)

14:00 4P-H092 清酒中オリゴ糖の構造解析
…… ○本田 千尋, 山田 真理子, 徳岡 昌文, 進藤 斉, 穂坂 賢（東農大院・農）

13:00 4P-H093 The significance of the solid-state saccharification process in *Xiaoqu-Mijiu* production
…… ○Xuan Yin[1], Yumiko Yoshizaki[2], Kayu Okutsu[2], Taiki Futagami[2], Hisanori Tamaki[2], Kazunori Takamine[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Agric., Kagoshima Univ.)

14:00 4P-H094 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎醸造に与える影響
……○瀬戸口 翔[1,4], 水谷 治[2], 高橋 徹[3], 山田 修[3], 岩井 謙一[4], 髙瀬 良和[4], 外山 博英[2], 二神 泰基[5], 玉置 尚徳[5]
([1]鹿児島大院・連農, [2]琉球大・農, [3]酒総研, [4]霧島酒造, [5]鹿児島大・農)

13:00 4P-H095 泡盛醸造に甕（カメ）を使用する効果の検討
…… ○仲村 佑介, 玉城 康智（沖縄高専・生物資源）

14:00 4P-H096 蛍光指紋による泡盛の簡易・迅速品質評価に向けた基礎的検討
…… 蔦 瑞樹[1], 相山 怜子[1], ○塚原 正俊[2], 塚原 恵子[2], 平良 英三[3]
([1]農研機構・食総研, [2]バイオジェット, [3]琉球大・農)

13:00 4P-H097 栽培条件の異なった京都産酒米における貯蔵タンパク質の解析
…… ○沼本 穂, 下司 友仁香, 森本 陽子, 増村 威宏（京府大院・生命環境）

14:00 4P-H098 メタボローム解析による栽培履歴の異なる酒米の醸造適性評価
……○清野 珠美[1], 和田 潤[1], 高阪 千尋[1], 山本 佳宏[1], 藤原 久志[2], 北岡 篤士[2], 若井 芳則[2], 廣岡 青央[1]
([1]京産技研, [2]黄桜)

【環境浄化，修復，保全技術】

13:00 4P-N099 蓄電性バイオミネラル生成細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の細胞外電子伝達
……○安藤 翔太[1], 由井 嵐士[1], 片桐 美紀[2], 田代 陽介[1], 二又 裕之[1,3]
([1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン研)

14:00 4P-H100 海洋セレン酸還元微生物によるセレンを含む金属アモルファス微粒子の生成
……○阪口 利文[1], 田中 星奈[1], 岡村 好子[2], 富永 依里子[2], 前田 誠[3]
([1]県大広島・生命科学, [2]広島大院・先端物質, [3]広島大・N-BARD)

13:00 4P-H101 *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析
……○黒田 真史[1], 櫻井 紫乃[1], 山下 光雄[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]芝浦工大・応化)

14:00 4P-H102 廃糖蜜に含まれるポリフェノールとその六価クロム還元性に関する解析
……○広瀬 佑紀, 池上 健仁, 杉山 友康（東京工科大院・バイオニクス）

13:00 4P-N103 Adsorption of metal ion in *Saccharomyces cerevisiae*
……Tu Dang[1], Hidehiro Iwata[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Shunji Kiyoda[1], Masakazu Furuta[1]
([1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

14:00 4P-N104 菌叢構造解析に基づく嫌気性菌を利用した重金属除染法の構築
……○岡野 凌一[1], 舟木 裕哉[2], 倉橋 健介[2], 吉原 静恵[3], 徳本 勇人[3]
([1]阪府大院・工, [2]阪府大高専, [3]阪府大院・理)

13:00 4P-H105 セシウム蓄積細菌の探索及びセシウム蓄積変異株の作成
……○吉岡 潤一, 渡辺 剛, 林 秀謙（前工大院・工・生物工）

14:00 4P-N106 生物濃縮を利用した線虫による土壌からの Cs 回収
……○合田 亮[1], 伊藤 みさご[1], 星 英之[2], 倉橋 健介[3], 吉原 静恵[4], 徳本 勇人[4]
([1]阪府大院・工, [2]阪府大院・人社, [3]阪府大高専, [4]阪府大院・理)

13:00 4P-H107 *Dehalococcoides* 属細菌由来還元的脱ハロゲン化酵素の発現と機能解析
……○田中 良拓[1], 小畑 智弘[1], 中村 龍貴[1], Meinhold Sarah[2], 渡辺 文雄[3], Jianzhong He[4], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]ミュンヘン工科大学, [3]鳥取大・農・生資環, [4]シンガポール国立大学)

14:00 4P-N108 バイオ脱硫菌による芳香族複素環化合物の脱硫分解
……○練 子荷[1], 藤井 啓史[2], 古谷 陸[2], 望月 康佑[2], 浦瀬 太郎[1,2], 筒井 裕文[1,2], 松井 徹[1,2]
([1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生)

13:00 4P-H109 Enhancement of microorganisms and material circulation in agrochemical-contaminated soil by using organic materials
……○aziz amin ABD[1], Adhikari Dinesh[2], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agriculture Promotion Center)

14:00 4P-H110 細菌に対する農薬の影響に関する研究
……○森田 涼斗, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

13:00 4P-H111 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のクエン酸走化性と植物感染への重要性
……○緋田 安希子, Tunchai Mattana, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一（広島大院・先端物質）

14:00 4P-H112 植物保護効果を有する *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質生産制御機構の解析
……○久勝 順平[1], 染谷 信孝[2], 竹内 香純[2], 諸星 知広[1]
([1]宇都宮大院・工, [2]農研機構)

13:00 4P-H113 連作土壌の環境変化の分析
……○森谷 政孝, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

14:00 4P-H114 笹侵食湿地土壌中のメタン生成を抑制する嫌気酢酸酸化微生物の同定
……青柳 智[1,2], Ho Cuong[3], 成廣 隆[4], 眞弓 大介[5], 尾形 敦[1], 羽部 浩[1], ○堀 知行[1]
（[1]産総研・環境管理, [2]石巻専修大, [3]ベトナム科学院, [4]産総研・生物プロセス, [5]産総研・地圏資源）

13:00 4P-H115 硝酸還元条件における津波打上げ海底堆積物の嫌気分解機構
……○青柳 智[1,2], Navarro Ronald[1], 眞弓 大介[3], 羽部 浩[1], 片山 葉子[4], 高崎 みつる[2], 堀 知行[1]
（[1]産総研・環境管理, [2]石巻専修大, [3]産総研・地圏資源, [4]農工大）

【環境工学，廃水処理技術】

14:00 4P-H116 Study on water disinfection in actual environment by using $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ photocatalyst
……○Na Liu[1], Qi Zhu[1], Qiansu Ma[1], Xuehu Zhou[1], Ruilin Qi[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst., AIST, Tsukuba)

13:00 4P-H117 メタン発酵におけるアンモニア阻害抑制のための自然素材を加えたゼオライト開発
……○平沼 貴紀, 張 楠, 楊 英男（筑波大院・生命環境）

14:00 4P-H118 微生物を利用した新規汚泥減容化システム
……○柳瀬 亜美[1], 黒住 悟[2], 石田 秀樹[2], 倉根 隆一郎[1]
（[1]中部大院・応生, [2]積水アクアシステム（株））

13:00 4P-H119 Optimization of illumination conditions for methane recovery in ammonium-rich anaerobic digestion
……○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

14:00 4P-N120 異なる pH で運転した微生物燃料電池：アノード電極上の微生物群集に由来する細胞内代謝物の比較
……○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 柘植 陽太[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]金沢大・新学術創成）

13:00 4P-H121 高塩濃度条件下で生育可能な微生物による電力生産
……○雪本 寛, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工）

14:00 4P-H122 抽水植物セキショウの根圏から分離した微生物による貴金属ナノ粒子の合成
……○南川 泰輝[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]立命館大・理工）

13:00 4P-H123 各種金属が 1,4-ジオキサン微生物分解に及ぼす影響
……○井上 大介[1], 角田 翼[2], 澤田 和子[3], 山本 哲史[1,4], 黒田 真史[1], 池 道彦[1], 清 和成[2,3]
（[1]阪大院・工, [2]北里大院・医療系, [3]北里大・医衛, [4]大成建設）

14:00 4P-H124 Use of bio-stimulants to enhance microorganisms in agrochemical contaminated soil
……○Rose Caroline Kirigo Mumbi[1], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1], Adhikari Dinesh[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agric promotion center)

13:00 4P-H125 工場冷却水中に存在する細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析
……○山口 祐太朗[1], 謝 肖男[2], 諸星 知広[1]（[1]宇都宮大院・工, [2]宇都宮大・バイオ）

14:00 4P-I126 水回りのピンク汚れ原因菌 *Methylobacterium populi* における Quorum Sensing 機構の解析
……○茂呂 亮汰, 池田 宰, 諸星 知広（宇都宮大院・工）

13:00 4P-N127 植物成長促進根圏細菌 *Pseudomonas protegens* CHA0 のアミノ酸走化性センサー群の特性化
……○松田 浩希, 緋田 安希子, 田島 誉久, 加藤 純一（広島大院・先端物質）

14:00 4P-I128 Novel method to control *Ralstonia solanacearum* infection by targeting chemotaxis
……○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Yutaka Nakashimada, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

【バイオマス，資源，エネルギー工学】

13:00 4P-I129 針葉樹リグニン分解物を唯一の炭素源とした糖質に依存しないムコン酸のバイオ生産
…… ○園木 和典[1,3], 杉田 晴佳[1,3], 高橋 健司[2,3], 上村 直史[2,3], 政井 英司[2,3]
（[1]弘前大院・農生, [2]長岡技大・生物, [3]JST-ALCA）

14:00 4P-I130 糖質に依存しない広葉樹リグニン分解物からのムコン酸のバイオ生産
…… ○高橋 健司[1,3], 篠田 英里[1], 鈴木 祥央[1], 上村 直史[1,3], 園木 和典[2,3], 政井 英司[1,3]
（[1]長岡技大・生物, [2]弘前大・農生, [3]JST-ALCA）

13:00 4P-I131 管理放棄林における森林バイオマスの解析
…… ○連 綾香, 荒木 希和子, 久保 幹（立命館大院・生命科学）

14:00 4P-I132 耕作放棄地 42 万 ha だけで全国民のカロリー必要量全量を供給可能な甘藷の格安生産法の実証試験
…… ○鈴木 高広[1], 坂本 勝[1], 森岡 航[2]（[1]近畿大・生物理工, [2]森岡産業）

13:00 4P-I133 海岸林に生息する陸ガニ類がもつバイオマス分解活性について
…… 知田 真之介, 上田 佳希, 馬場 保徳, ○三宅 克英（石川県大・生物資源研）

14:00 4P-N134 定量 PCR を用いたシイタケ(*Lentinula edodes*)を植菌した木材中の菌体バイオマスの定量
…… ○菜山 知子[1], 上村 真由子[1], 丸山 温[1], 小松 雅史[2], 山口 宗義[2]
（[1]日大・生資科, [2]森林総研）

13:00 4P-N135 植物生長促進細菌の単離と微生物農薬としての利用
……○中岡 知規[1], 西山 紋加[2], 小林 誠治[2], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
（[1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]近畿大・生物理工・生物工）

14:00 4P-N136 新規の植物生長促進細菌の単離と評価
…… ○澤田 祥子[1], 中岡 知規[1], 西山 紋加[2], 吉水 芳織[2], 黒田 雄亮[2], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
（[1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工）

13:00 4P-I137 好熱菌発酵産物がサツマイモネコブセンチュウによる植物への寄生に与える影響
…… ○柳瀬 裕介[1], 金子 由喜[2], 西川 あずさ[3], 井藤 俊行[4], 小野瀬 暁[4,5], 宮本 浩邦[1,5,6], 児玉 浩明[1]
（[1]千葉大院・園芸, [2]千葉大・園芸, [3]千葉大院・融合,
[4]京葉プラントエンジニアリング, [5]サーマス（株）, [6]理研 IMS）

14:00 4P-N138 Identification of novel syntrophic fatty acid-oxidizing bacteria (SFAOB) in anaerobic chemostats via stable isotope probing (SIP)
…… Huizhong Wang, Yue Yi, Min Gou, Zhaoyong Sun, ○Yueqin Tang
（Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ., PR China）

13:00 4P-I139 ウシルーメン液によるメタン発酵前処理過程の微生物群集構造解析
……○馬場 保徳[1,2,3], 松木 悠[2], 馬場（森） 裕美[1,2], 陶山 佳久[2], 多田 千佳[2],
福田 康弘[2], 三宅 克英[1], 齋藤 雅典[2], 中井 裕[2]
（[1]石川県大・生物資源研, [2]東北大院・農, [3]日本学術振興会特別研究員）

14:00 4P-I140 Enhanced biogas production from *Chlorella vulgaris* using photocatalytic pretreatment
……○Aditya Sharma, Mishma Silvia Stanislaus, Qi Zhu, Chenyu Zhao, Nan Zhang, Yingnan Yang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 4P-I141 各種基質と海洋由来微生物源を使用した海水条件下での流加培養におけるメタン生産の改善と微生物の多様性
……○三浦 豊和[1,3], 喜多 晃久[1,3], 岡村 好子[1,3], 秋 庸裕[1,3],
松村 幸彦[2,3], 田島 誉久[1,3], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,3]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工・エネ環, [3]JST・CREST）

14:00 4P-N142 Application of nano sparger for biological syngas methanation
……○Ye Liu, Ying Wang, Xinlei Wen, Chenzhu Yin, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 4P-E143 大腸菌の代謝や細胞表層電子伝達系の改変が微生物燃料電池の性能に与える影響
……○川口 太一[1], 福井 早紀[1], 駒 大輔[2], 大本 貴士[2], 尾島 由紘[1], 東 雅之[1]
（[1]阪市大院・工, [2]阪技術研）

14:00 4P-I144 実はおもしろい化学合成菌のエネルギー代謝：『昇圧電子伝達経路』をめぐる葛藤！？
……○庄野 暢晃, 中村 龍平（理研 CSRS）

13:00 4P-I145 バイオ電池構築のためのバイオデバイスを目指したカーボンナノチューブ結合ペプチドによる酵素の配向固定化
…… ○殿岡 愛菜[1], 坂元 博昭[2,5], 里村 武範[1,5], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,5]
（[1]福井大院・工, [2]福井大テニュアトラック事業本部, [3]香川大・農, [4]大阪工大, [5]福井大学ライフイノベセ）

14:00 4P-I146 好熱菌由来酸化還元酵素を用いたアミノ酸を燃料とするバイオ電池用アノードの構築
…… ○田中 志乃[1], 里村 武範[1,2], 坂元 博昭[1], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工, [2]福井大・ライフ, [3]香川大・農, [4]大阪工大・工）

13:00 4P-I147 微生物燃料電池を用いて余剰汚泥の分解して直接電力変換する
…… ○高垣 俊宏, 柿薗 俊英（広島大院・先端物質）

14:00 4P-N148 Operation of plant based microbial fuel cells using electrochemical mediators
…… ○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Minju Chang[1], Sok-young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Chang Joong Kim[1], Yung-Hun Yang[1], Sang Hyun Lee[1], Hyung Joo Kim[1]
（[1]Dept. Biological eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration）

13:00 4P-I149 Identify of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production with optimal bedding material and initial substrate concentration
…… ○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

14:00 4P-I150 マリンビブリオを生物触媒とした連続的水素生産システムの開発
…… ○宮坂 信城, 美野 さやか, 澤辺 智雄（北大院・水産）

13:00 4P-I151 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による水素産生能向上に関する研究
…… ○曽我 亜由美[1], 髙橋 沙綾[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院）

14:00 4P-I152 燻炭が *Bacillus* 属細菌 IA 株の生育を促進するメカニズムの解明 2
…… ○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工）

13:00 4P-I153 燻炭抽出液による *Bacillus amyloliquefaciens* IA 株の iturinA 生産促進
…… ○久野 龍之介, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司（近畿大院・生物理工）

14:00 4P-I154 Astaxanthin production using alginate-derived from brown algae by *Aurantiochyrium* sp.
……○Kim Hazel V Arafiles[1,4], Kenshi Watanabe[1,4], Akihisa Kita[1,4], Yoshiko Okamura[1,4], Takahisa Tajima[1,4], Yukihiko Matsumura[2,4], Yutaka Nakashimada[1,4], Keisuke Matsuyama[3], Tsunehiro Aki[1,4]
（[1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]NAGASE & CO., LTD., [4]CREST, JST）

【植物細胞工学，組織培養，育種工学】

13:00 4P-N155 渦鞭毛藻類 Karenia mikimotoi が有する毒性因子の多彩な生物活性に関する研究
……Kim Daekyung[1], 竹下 哲史[2], 山崎 康裕[3], 山口 健一[4], ○小田 達也[4]
（[1]Jeju Center, KBSI, Korea, [2]長崎大 産連戦略本部, [3]水大校, [4]長大水）

14:00 4P-I156 代謝工学による黄色天然色素ルテイン高蓄積クラミドモナス株の創出
…… ○阪口 健太, 加藤 悠一, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦（神戸大院・科学技術イノベーション）

13:00 4P-I157 糖誘導性プロモーターを用いた GUS 遺伝子高発現サツマイモの開発
…… 小高 章宏, ○本間 洋平, 山川 隆（東大院・農生科）

14:00 4P-N158 Effect of electrical ground connection for plant growth
……◯Hyung Joo Kim[1], Chang Joong Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Min ju Chang[1], Hak Jin Song[1], Sok-Young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Yong-Keun Choi[1]
([1] Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2] Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

13:00 4P-I159 根寄生雑草防除のための貯蔵糖プランテオース代謝に関わる酵素の探索
…… 馬場 敦也[1], 徳永 智哉[1], 木場 康介[1], 小川 拓水[1], 杉本 幸裕[2,3], 太田 大策[1], ◯岡澤 敦司[1,3]
([1] 阪府大院・生環科, [2] 神戸大院・農, [3] JST/JICA・SATREPS)

14:00 4P-N160 *In vitro* regeneration of *Helicteres angustifolia* L. for production of bioactive secondary metabolites
……◯Siyu Sun, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

13:00 4P-E161 シロイヌナズナの Non photochemical quenching に関与する K+/H+ アンチポーター の輸送活性の評価
……◯辻井 雅[1], 解良 康太[1], 濱本 晋[1], 黒森 崇[2], 鹿内 利治[3], 魚住 信之[1]
([1] 東北大院・工, [2] 理研・植物科学研究セ, [3] 京大院・理)

14:00 4P-N162 Optimization of cell suspension culture conditions for *Helicteres angustifolia* L. to effectively produce phenolic compounds
……◯Long Xiao, Xi Yang, Shuang Sun, Junyi Zhu, Siyu Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

13:00 4P-I163 グアユール(*Parthenium argentatum* Gray)のゴム生合成機構の解明
……◯梶浦 裕之[1,2], 鈴木 伸昭[1], 内山 俊宏[3], 毛利 浩[3], 渡辺 訓江[3], 中澤 慶久[1]
([1] 阪大院・工, [2] 立命館大院・生命科学, [3] 株式会社ブリヂストン)

【セル＆ティッシュエンジニアリング】

14:00 4P-I164 毛細血管様構造を有する多細胞スフェロイドをビルディングブロックとして作製した 3 次元組織の内部構造の定量的解析
…… ◯井上 優里[1], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2] ([1] 金沢大院・自科, [2] 金沢大・新学術)

13:00 4P-I165 多細胞スフェロイド内部および多細胞スフェロイド間における細胞遊走の観察
…… ◯仁宮 一章[1], 今堀 夏奈美[2], 高橋 憲司[2] ([1] 金沢大・新学術, [2] 金沢大院・自科)

14:00 4P-I166 多細胞スフェロイドの 3 次元的な解析手法の開発
…… ◯稲垣 慶一[1], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2] ([1] 金沢大院・自科, [2] 金沢大・新学術)

13:00 4P-I167 高次元細胞形態情報を用いたリアルタイム細胞培養工程パラメータ評価法の開発
…… ◯藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司 (名大院・創薬科学)

14:00 4P-I168 Oxygen supply and oxidative stress in pancreatic β-cell spheroids
……◯Dina Myasnikova, Junji Fukuda
(Yokohama Natl. Univ.)

13:00 4P-I169 CHO 細胞を宿主としたサメ由来 IgNAR 抗体フラグメント分泌生産の検討
…… ◯有永 幹基[1], 野村 嘉紀[1], 鬼塚 正義[2,3], 山野 範子[1,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,3]
([1] 阪大院・工, [2] 徳島大院・社会産業理工, [3] MAB 組合)

14:00 4P-N170 低酸素応答型遺伝子発現システムを導入した細胞センサーの機能評価
……◯小野 章彦[1], 井藤 彰[2], 佐藤 智詠[2], 山口 雅紀[2], 鈴木 大雅[2], 河邉 佳典[2], 上平 正道[1,2]
([1] 九大院・シス生科, [2] 九大院・工)

13:00 4P-I171 CHO 細胞における導入遺伝子高発現部位の解析
……森 孔明[1], 淺井 聖也[1], 金岡 英徳[1], 石川 晃大[1], 上平 正道[2], ◯西島 謙一[1]
([1] 名大院・工, [2] 九大院・工)

14:00 4P-I172 ニワトリ始原生殖細胞への CRISPR/Cas9 システムの応用
…… ◯金岡 英徳, 奥嵜 雄也, 萩原 遥太, 村上 晴太郎, 西島 謙一, 飯島 信司
(名大院・工)

13:00 4P-I173 生きたスフェロイド内細胞のあるがままの形と分布を計測する
……○田中 正太郎（東女医大・医・生化学）

14:00 4P-I174 一細胞回収を指向した新規光分解性 PEG 脂質共重合体の開発
……○中宿 優太[1], 山平 真也[2], 山口 哲志[3], 金野 智浩[1], 石原 一彦[1], 長棟 輝行[1]
（[1]東大院・工, [2]産総研, [3]東大・先端研）

13:00 4P-N175 胚様体形成段階における GSK3β 阻害剤添加が ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化に及ぼす影響
……○澤登 美空, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋（山梨大院・総研部）

14:00 4P-I176 ECM 微粒子を内包した複合型膵島様組織の作製
……○亀田 真央, 堀 綾香, 矢嶋 祐也, 鵜頭 理恵, 山田 真澄, 関 実
（千葉大院・工）

13:00 4P-I177 三次元培養がん細胞自動選抜システムのための画像情報解析の有効性
……○渋田 真結[1], 加藤 寛人[1], 田村 磨聖[2], 蟹江 慧[1], 松井 裕史[3], 杉浦 慎治[2],
金森 敏幸[2], 柳沢 真澄[4], 佐藤 琢[2], 高木 俊之[2], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬, [2]産総研, [3]筑波大, [4]エンジニアリングシステム）

14:00 4P-I178 コラーゲンゲル上への紫外線照射処理による脳毛細血管内皮細胞と神経幹細胞／前駆細胞のパターン化
……○森 英樹, 白岩 侑馬, 山尾 明日美, 土岐 麻菜, 原 正之（阪府大院・理）

13:00 4P-I179 ラット培養心筋細胞の拍動能及び脂肪酸組成に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果
……○佐藤 大介[1], 小坂 薫[1], 斉藤 丈[1], 楠 正隆[2], 中村 孝夫[1]
（[1]山形大院・医・生命情報工学, [2]名大・総合保体セ）

14:00 4P-I180 疑似反磁性アセンブリにより構築した微小心筋組織の力学的特性の評価
……○末永 寿恵[1], 杉原 惇嗣[1], 堀江 正信[2], 秋山 佳丈[1]
（[1]信州大・繊維, [2]京大・RIRC）

13:00 4P-F181 Body on a Chip の実現に向けた細胞の自己凝集化誘導剤（CAT）を用いた 2D-3D 連結細胞構造体の作製と固定化
……長島 諒[1,2], ○岩井 良輔[1,2]（[1]岡山理大・技科研, [2]岡山理大・工）

14:00 4P-N182 圧力駆動型 Organs-on-a-chip を用いた肝臓とがん細胞の連結培養による 抗がんプロドラッグの影響評価
……佐藤 琢, ○杉浦 慎治, 進 和美, 金森 敏幸（産総研・創薬基盤）

【生体情報工学，バイオインフォマティクス】

13:00 4P-F183 ヒト毛髪に付着する細菌の存在形態および群集構造の解析
……○渡邉 康太[1], 西 英二[2], 田代 幸寛[1], 酒井 謙二[1]
（[1]九大院・生資環, [2]大分科捜研）

14:00 4P-J184 新しい抗菌薬としてのアンチセンス核酸
……○木野 裕太, 中島 信孝（東工大院・生命理工）

13:00 4P-N185 Difference of gene expression between upper and bottom side mycelia in liquid surface culture of *Cordyceps militaris* NBRC103752
……○Suparmin Ahmad[1]
（[1]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ）

14:00 4P-J186 mRNA 切断部位の網羅的解析
……○上野 大心, 山崎 将太郎, 出村 拓, 加藤 晃（奈良先端大・バイオ）

13:00 4P-J187 ゲノム情報に基づく微生物の安全性評価支援システム MiFuP Safety
……○木村 明音, 牧山 葉子, 山本 美佳, 北橋 優子,
宮澤 せいは, 黄地 祥子, 市川 夏子, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）

14:00 4P-J188 タンパク質合成反応を解析する大規模全成分計算機シミュレーターの開発と応用
……○松浦 友亮[1], 清水 義宏[2]（[1]阪大院・工, [2]理研・生命システム）

13:00 4P-J189 微生物叢解析のためのリファレンススタンダード（Mock Community）の作製
……○三浦 隆匡, 平方 里美, 金 達英, 川﨑 浩子（NITE・NBRC）

14:00 4P-J190 微小液滴を用いて並列取得した微生物シングルセルゲノムデータに対する相互参照ゲノム解析法の開発
……○小川 雅人[1,2], 西川 洋平[1], 森 一樹[2], 細川 正人[3,4], 竹山 春子[1,2,3]
（[1]早大・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ）

13:00 4P-J191 細胞画像情報を用いた凍結ストレスに対する幹細胞品質変化の評価
……○松本 恵[1], 河合 駿[2], 岡田 真衣[2], 蟹江 慧[2], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1], 加藤 竜司[2]
（[1]名大院・工, [2]名大院創薬）

14:00 4P-J192 機能性遺伝子解析による自家熱型高温好気発酵プロセスの解明
……○河野 祥尚, 朝倉 侑弥, 神田 昇佑, 田代 幸寛, 酒井 謙二（九大院・生資環）

【センサー，計測工学】

13:00 4P-J193 発熱を指標とした嫌気性微生物の増殖過程の評価
……○青木 奈緒子, 三宅 英雄（三重大院・生資）

14:00 4P-J194 無細胞反応系を用いた抗菌剤検出のための紙基板バイオセンサーの開発
……○氏家 和紀[1], 松浦 秀幸[1], Tran Thi My Duyen[1,2], 原田 和生[1], 平田 收正[1]
（[1]阪大院・薬, [2]カントー大・水産）

13:00 4P-J195 Microsystem for viral disease detection
……○Seri Choi[1], Soojeong Shin[3], Eunwon Lee[1], Kwanhun Lim[2], Sunyoung Lee[2], Hae Joon Park[2], Jong Wook Hong[1,3]
（[1]Dept. Bionano. Technol., Grad. Sch., Hanyang Univ., [2]Dept. MDx., SD Biosensor, Inc., [3]Dept. Bionano. Eng., Hanyang Univ.）

【生合成，天然物化学】

14:00 4P-N196 Biosynthesis of caffeic acid-based melanin polymer from L-Tyrosine in *Escherichia coli*
……Jang Seyoung[1], Yang Yung-Hun[2], Kim Yun-Gon[3], ○Choi Kwon-Young[1]
（[1]Dept. Environ. Eng., Ajou Univ., [2]Dept. Micr. Eng., Konkuk Univ.,, [3]Dept. Chem. Eng., Soongsil Univ.）

13:00 4P-J197 放線菌由来生理活性物質が植物および植物病原菌に与える影響
……○前田 みのり, 大池 達矢, 岡南 政宏, 松川 哲也, 梶山 慎一郎, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工・生物工）

14:00 4P-F198 スクアレンーアンブレイン環化酵素の創出：アンブレインはスクアレンから 2 つの経路を通して 1 つの酵素によって合成できる
……○上田 大次郎, 奥野 琴音, 星野 力, 佐藤 努（新潟大・自然研）

13:00 4P-J199 ポリプレニルアセトン類の生合成：活性酸素によるメナキノンの非酵素的開裂反応
……○松ヶ根 沙織[1], 上田 大次郎[1], 岡本 渉[1], 橋本 昌征[2], 佐藤 努[1]
（[1]新潟大・自然研, [2]成功大・分子医学研）

14:00 4P-J200 放線菌 *Streptomyces rochei* の二次代謝を誘導するシグナル分子 SRB の生合成に関わる P450 モノオキシゲナーゼ SrrO の生理学的・生化学的解析
……○手島 愛子, 波多江 希, 津田 直人, 荒川 賢治（広島大院・先端物質）

13:00 4P-J201 Plasmid-assisted random genome deletion in *Streptomyces rochei* affects secondary metabolites production
……○Yosi Nindita, Amirudin Akhmad Fauzi, Yiwen Zhang, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
（Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.）

14:00 4P-F202 多価不飽和脂肪酸合成酵素における 3-ケトアシルリダクターゼとデヒドラターゼの機能解析
……○林 祥平[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 氏原 哲朗[3], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]協和発酵バイオ）

13:00 4P-J203 大腸菌による Ergothioneine の発酵生産
……大澤 怜[1], ○上出 倫敬[1], 佐藤 康治[2], 河野 祐介[3], 大津 厳生[3], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]筑波大）

14:00 4P-N204 Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Helicteres angustifolia* L. root
……○Shuang Sun, Long Xiao, Xi Yang, Kazuya Shimizu, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang
（Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba）

13:00 4P-N205 *Bacillus cereus* は PHA 合成遺伝子クラスターに *R*-ヒドラターゼ遺伝子を有する
……○木原 崇博[1], 廣江 綾香[2], 水野 康平[3], 柘植 丈治[1]
（[1]東工大院・物質理工, [2]農工大, [3]北九州高専）

14:00 4P-N206 不飽和ユニットを含む中鎖ポリヒドロキシアルカン酸の生合成
……○黄 鵬涛, 大越 鷹哉, 廣江 綾香, 柘植 丈治（東工大物質理工）

【有機化学，高分子化学】

13:00 4P-N207 ゴシポール配糖体の開発とその分光学的特性
……○中村 真基[1], 天野 善継[1], 長谷川 輝明[2,3]
（[1]東洋大院・生命, [2]東洋大・生命, [3]東洋大・バイオナノ）

14:00 4P-N208 シッフ塩基を連結部位として有するゴシポール配糖体の合成とその機能
……○天野 善継[1], 白石 晋也[3], 塩澤 伸哉[2], 矢野 友啓[4], 萩尾 真人[3], 長谷川 輝明[3,5]
（[1]東洋大院・生命, [2]東洋大院・食環, [3]東洋大・生命, [4]東洋大・食環, [5]東洋大・バイオナノ研究セ）

13:00 4P-J209 グリーンオルガノゲルの創製と応用
……○白米 優一[1], 芦内 誠[2]（[1]愛媛大院・連合農, [2]高知大・農）

【核酸工学】

14:00 4P-J210 広範なゲノム領域を正確に編集する新開発 CRISPR Nickase システムの構築
……○黒田 浩一, 里村 淳, 植田 充美（京大院・農）

13:00 4P-J211 G-quadruplex 構造及びタンパク質の相互作用に対する DNA メチル化の影響解析
……○齋藤 史織, 塚越 かおり, 西尾 真初, 李 鎭熙, 池袋 一典（農工大院・工）

14:00 4P-J212 G カルテット構造形成による CpG ODN の免疫活性能の向上
……○山崎 智彦[1], 星 和明[2], 杉山 雄紀[2], 塚越 かおり[2], 津川 若子[2], 早出 広司[2], 池袋 一典[2]
（[1]物材研・機能性材料研究拠点, [2]農工大院・工）

【ペプチド工学】

13:00 4P-F213 ペプチドアレイを用いた配列改変による細胞内機能性ペプチドの高活性化
……○小崎 一功[1], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創生セ）

14:00 4P-J214 金ナノ粒子合成制御に向けた金イオン還元性を示すペプチド触媒ライブラリーの作製
……○田中 祐圭[1,2], 大河内 美奈[1,2]（[1]東工大・物質理工, [2]JST・ImPACT）

13:00 4P-J215 膜結合ペプチドを用いたグラファイト電極への生体膜の固定
……○立松 宗一郎, 田中 祐圭, 大西 知子, 早水 裕平, 大河内 美奈（東工大）

14:00 4P-F216 “超”高親和性型ペプチド輸送体の発見と輸送体工学への応用
……○中山 綾花[1], Vu Thi Tuyet Lan[1], 河合 駿[2], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 河原崎 泰昌[1], 伊藤 圭祐[1]
（[1]静県大・食栄, [2]名大院・創薬科学）

13:00 4P-N217 納豆抽出物中のカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性の解明
……○相田 涼介, 齊藤 健吾, 生江 俊樹, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
（新潟大・自然研）

14:00 4P-N218 培養細胞を用いたコメ糠タンパク質由来抗菌ペプチドの創傷治癒作用とその機構の解明
……○斉藤 寿槻, 生江 俊樹, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之（新潟大・自然研）

13:00 4P-J219 抗菌ペプチド・アピデシンおよび高活性変異体の作用機構解析
……○川上 駿[1], 山崎 蔵亨[1], 三吉 大地[1], 大井 俊彦[1], 橋本 茂樹[2], 堀 千明[1], 田口 精一[1,3], 松本 謙一郎[1]
（[1]北大院・工, [2]東理大・基礎工, [3]東農大・生命科）

【脂質工学】

14:00 4P-N220 Thermal stability of raft-mimetic structure in liposome was decreased due to the interaction of local anesthetics.
……○Ko Sugahara, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi（Sch. Mater. Sci., JAIST）

13:00 4P-J221 オーランチオキトリウム属由来 β-カロテン合成酵素 CrtIBY の発現制御機構の解析
……○野村 夏矢[1,4], 渡邉 研志[1,4], 岡村 好子[1,4], 田島 誉久[1,4], 松村 幸彦[2,4], 中島田 豊[1,4], 松山 恵介[3], 秋 庸裕[1,4]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工, [3]長瀬産業, [4]JST・CREST）

【糖鎖工学】

14:00 4P-N222 Syntheses of tris-bipyrdine ferrous complexes having hexavalent glycolclusters and ion-induced changes in their carbohydrate packings
……○Naoto Chigira[1], Fumiko Dai[1], Yuki Nonaka[1], Koki Sato[2], Masahito Hagio[2], Teruaki Hasegawa[2,3]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ.,
[2]Dept. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [3]Bio-nano Electron. Res. Center., Toyo Univ.)

13:00 4P-J223 硫黄酸化細菌由来の β-1,4-*N*-アセチルグルコサミノグルカンのリゾチーム感受性
……○三田 修平[1], 河﨑 雄太[1], 浜口 悠貴[1], 近藤 敬子[2], 片平 正人[2], 武田 穣[1]
（[1]横国大院・工, [2]京大・エネルギー理工研）

14:00 4P-J224 組換え型ノダフジレクチンの酵母 *Ogataea minuta* での発現と特性解析
……○千葉 靖典[1], 清水 明[1], 佐藤 隆[1], 舘野 浩章[1], 久保田 智巳[1], 宇津井 隆志[2], 松尾 一郎[2], 成松 久[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]群大院・理工）

13:00 4P-J225 ナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの酵母菌体内生産系の構築
……○窪村 有紗, 大橋 貴生, 長谷川 友香, 三崎 亮, 藤山 和仁（阪大・生工国際セ）

14:00 4P-J226 高品質バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター卵巣細胞の糖鎖合成経路改変
……前田 晶子, ○三崎 亮, 大橋 貴生, 藤山 和仁（阪大・生工国際セ）

13:00 4P-J227 カイコ由来 *N*-acetylgalactosaminyltransferase の基質特異性
……○宮下 龍之介[1], 宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大院・総科技・農, [2]静大・グリーン科技研）

14:00 4P-N228 カイコで発現させたヒトエリスロポエチンの糖転移酵素共発現による *N* 型糖鎖構造改変
……○堀場 早紀[1], 加子 夏未[1], 宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2], 近藤 幸子[3,4], 矢木 宏和[3], 加藤 晃一[3,4,5], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静大院・総科技・農, [2]静大グリーン科技研, [3]名市大院・薬, [4]株式会社医学生物学研究所, [5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオ）

13:00 4P-J229 カイコ - BmNPV バクミド発現系を用いた *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II の発現と性質の解析
……○宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]（[1]静大・グリーン科技研, [2]静大・農・応生化）

ランチョンセミナー

4L-H01 三洋貿易株式会社

西早稲田キャンパス　52 号館 2 階　H 会場（11:45〜12:45）

4L-I02 公益財団法人かずさ DNA 研究所

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　I 会場（11:45〜12:45）

4L-J03 高機能遺伝子デザイン技術研究組合

西早稲田キャンパス　52 号館 3 階　J 会場（11:45〜12:45）

9月11日（月）

授賞式・受賞講演（13:00 ～ 15:25）

早稲田大学大隈記念講堂　W 会場（大講堂）

授賞式（会長挨拶，KSBB 会長挨拶，名誉会員・功労会員推戴，各賞授賞）

〈生物工学賞〉

受賞者　田谷 正仁（阪大院・基礎工）

構造体形成を伴う動植物細胞の培養と利用に関する生物工学研究

1A-Wp01　p. 87

〈生物工学功績賞〉

受賞者　髙木 博史（奈良先端大・バイオ）

微生物におけるアミノ酸の代謝制御機構・生理機能の解析とその応用

1A-Wp02　p. 87

〈生物工技術賞〉

受賞者　宮本 浩邦[1,2,3,4], 宮本 久[3,5], 田代 幸寛[6], 酒井 謙二[6], 児玉 浩明[1,3]

([1] 千葉大・園芸，[2] 理研・統合生命，[3] サーマス，[4] 日環科学，[5] 三六九，[6] 九大院・農)

好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの高機能発酵製品の製造と学術的解明

1A-Wp03　p. 88

1A-Wp01 構造体形成を伴う動植物細胞の培養と利用に関する生物工学研究

○田谷 正仁
（阪大院・基礎工）
taya@cheng.es.osaka-u.ac.jp

この度は，はからずも 2017 年度生物工学賞受賞の栄誉に浴しました．これもひとえにご指導いただいた先生方，共同研究者，研究室の教職員諸氏・学生諸君など，多くの皆様のご協力の賜物と心からお礼申し上げます．受賞の対象となった研究内容について，以下にその概要を示します．

（1） 植物細胞に関する研究
土壌細菌 Agrobacterium rhizogenes のもつ Ri プラスミドが植物細胞の染色体に組み込まれると，植物細胞は根に分化した状態で無限の増殖能を獲得するとともに，二次代謝産物などの生産能が高い“毛状根”と呼ばれる根の形態に誘導される．毛状根は条件を整えればカルスに脱分化し植物体にも分化再生できる．このような毛状根の特徴に興味をもち研究を開始した．
まず初めに，毛状根全体の生長速度を支配する因子は，先端部に存在する生長点の伸長速度と分枝により生じる生長点の数とする「分枝増殖モデル」を提案した．このモデルにより，毛状根の生育に及ぼす培養条件，培養操作（栄養源濃度，阻害物質濃度，物理的ストレスなど）の影響を速度論的に議論することができるようになった．また，培養液中で不均質な非懸濁状態を与える毛状根の培養に適したバイオリアクターの開発にも取り組んだ．毛状根をメッシュ状の支持体にアンカリングし，酸素を富化した培養液を循環（内部循環型あるいは外部循環型バイオリアクター）することで良好な培養結果を得ることができた．しかし，このような非懸濁状態の培養系では細胞の試料採取は不可能である．そこで，培地の電気伝導度に着目し，培養経過に伴う電気伝導度の減少値と細胞増殖量に良い相関があることを見出し，培養槽に電気伝導度セルを装着することで，オンラインでの細胞量の推算を可能とした．
一方，培養液の溶存酸素（DO）濃度を制御すると生長点の活性を損なうことなく二次代謝産物が細胞外に漏出することが分かった．これは，分化器官である毛状根の先端から基部に向かって細胞齢が増加して不均質となり，専ら基部の成熟細胞から代謝産物放出が生じることに起因する．この現象に基づき，レッドビート毛状根や西洋アカネ毛状根を対象として，色素の漏出と回収操作を in situ で行う培養システムを構築した．
さらに，毛状根のユニークな利用として，西洋ワサビ毛状根から誘導した細胞集塊をカプセルに包埋することで室温でも保存可能な人工種子胚とし，さらに発芽条件を整えると植物体に再生できることを示した．また，光合成能を付与したパックブン毛状根は光合成阻害剤などの濃度に依存し生長点の伸長速度などが変化することから，農薬などの環境汚染物質の検出ツールとして有望であることを示した．

（2） 動物（ヒト）細胞に関する研究
再生医療分野などで対象となる細胞の多くは足場依存性であり，培養中に分化／脱分化や老化などの生理的変化を伴って不均質な細胞集団を形成することが多い．このような培養プロセスに対して，生物工学的視点に立脚した新たな理論・方法論の導入が必要であると考え研究を開始した．
まず，ヒト角化細胞の平面培養を対象として，セルラー・オートマトンに基づき培養面を格子状に区画化したグリッドで記述し，細胞分裂した娘細胞が隣接するグリッドを順次占有してゆく「細胞配置モデル」を提案した．培養面上での二次元的な細胞増殖をコンピュータ上で精度よく再現することが確認され，細胞播種密度や細胞接触阻害の効果を定量的に評価し，適切な培養計画を策定する有効なツールとなることを実証した．また，本モデルをキューブで区画化された三次元へと拡張し，ゲルマトリクス中での軟骨組織の形成過程に適用した．
医療分野などへの適用を想定した足場依存性細胞の培養においては，培養細胞の一部をサンプリングし，細胞の量や状態を直接分析することは極めて困難である．そこで，培養面上での細胞挙動を追尾するため画像解析手法を開発した．これにより，取得画像を細胞数，細胞面積，円形度や回転速度などの数値データに変換し，有限の分裂回数をもつ正常細胞の寿命や脱分化度など質に関わる特性と相関づけることができた．さらに，培養容器底面に CCD カメラを外部敷設することで非侵襲的に細胞画像を取得し，オンラインで細胞状態を観察しながら，培地交換や継代操作などを自動的に行う閉鎖系培養システムの開発へと展開した．
一方，培養面から培養後の細胞や組織を回収する手法にも取り組み，アミラーゼなどで分解可能な天然高分子由来のヒドロゲルを開発した．このゲルを塗布した培養面上でヒト上皮細胞を培養し，培養終了時に唾液（アミラーゼ）でゲルを加水分解することで細胞間連結構造を損なうことなく回収できることを実証した．これにより，例えば医療現場において患者自身の体液の利用が可能となる．このようなヒドロゲル材料は，中空の球状やチューブ状に成型して細胞に増殖空間を提供する基材としても利用でき，スフェロイドや血管様構造をもった組織体の作製が可能であった．これら 3 次元的な組織体は，目的細胞から形成したスフェロイドの凍結保存技術や生体モデルとしての実験動物代替システムへの展開が期待される．

Bioengineering studies on cultivation and application of plant and animal cells propagating with cellular constructs

○Masahito Taya
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words plant and animal cells, heterogeneity, propagation models, bioreactor design

1A-Wp02 微生物におけるアミノ酸の代謝制御機構・生理機能の解析とその応用

○髙木 博史
（奈良先端大・バイオ）
hiro@bs.naist.jp

演者は微生物におけるアミノ酸の新しい代謝制御機構と生理機能を明らかにしてきた．また，得られた基盤的知見を微生物の高機能開発に資することで，実用株の育種や発酵生産への応用に取り組んできた．以下に研究の概要を述べる．

1. 酵母のプロリン・アルギニン代謝によるストレス耐性機構の解析と製パンへの応用
パン酵母は製パン過程で冷凍，乾燥，高浸透圧などのストレスに曝されており，有用機能の発現にはストレス耐性の強化が重要である．プロリン（Pro）には，浸透圧調節，細胞膜安定化，ヒドロキシラジカル消去などの機能が報告されているが，生理機能には不明な点が多い．演者らは，酵母の Pro アナログ（AZC）耐性変異株から Pro 蓄積株を分離し，解析した．その結果，Pro は冷凍，浸透圧，乾燥，エタノールなどのストレスから酵母を保護すること，γ-グルタミルキナーゼ Pro1 のアミノ酸置換により，Pro によるフィードバック阻害感受性が低下し，Pro が過剰合成されることが判明した．また，Pro の生理機能を解析し，細胞内局在の重要性，活性酸素種レベルの制御，リボファジーへの関与，細胞寿命の延長効果などを見出した．次に，セルフクローニング法や突然変異処理により Pro 蓄積パン酵母を作製し，製パン特性を評価した．その結果，冷凍・高糖生地の発酵力，乾燥酵母としての発酵力が向上し，Pro がパン酵母の育種に有効であることを実証した．また，Pro の研究過程で，AZC などの環状二級アミンを基質とするアセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を発見した．さらに，X 線結晶構造解析により Mpr1 の構造と反応機構を解明するとともに，ランダム変異導入や分子設計に基づき安定化変異体を取得した．興味深いことに，Mpr1 はアルギニン（Arg）合成を亢進し，一酸化窒素（NO）の生成に関与していた．NO は様々な生命現象に関わり，哺乳類では Arg から NO 合成酵素（NOS）により生成するが，酵母には NOS の相同遺伝子が存在せず，研究は進んでいない．演者らは，Arg からフラボタンパク質 Tah18 依存的に NO が合成され，酸化ストレス耐性に寄与することを見出した．Tah18 は Dre2 タンパク質と複合体を形成し，細胞質の鉄硫黄タンパク質生成に必須であるが，NO 合成への関与は初めての知見である．また，Tah18 と Dre2 の相互作用を介した新規 NO 合成制御機構を提唱した．さらに，NO が銅イオントランスポーター Ctr1 の発現を亢進し，スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 活性を上昇させ，酸化ストレス耐性に寄与することを示した．パン酵母においても，Pro と NO の合成系を強化することで，冷凍，乾燥に対する耐性と発酵力が向上した．

2. 酵母のロイシン代謝を介した香気成分の生成能強化と泡盛製造への応用
沖縄の伝統的蒸留酒「泡盛」は香りと味に特徴があり，それらの生成には酵母が関与する．清酒，パンの主要香気成分（吟醸香，バナナ香）である酢酸イソアミルは，前駆物質のイソアミルアルコールがエステル化して生成される．酢酸イソアミルの生成に必須であるロイシン（Leu）の合成は，α-イソプロピルリンゴ酸合成酵素 IPMS の活性が Leu によるフィードバック阻害を受けることで制御されている．演者らは，泡盛の高付加価値化を目指し，泡盛酵母の Leu アナログ（TFL）耐性変異株から Leu 蓄積株を分離した．また，小仕込み試験を行い，親株に比べて Leu，酢酸イソアミルの含量が増加した菌株を取得し，IPMS のアミノ酸置換が TFL 耐性，Leu 高生産，フィードバック阻害解除の原因であることを明らかにした．本研究は泡盛酵母の育種に関する初めての成果であり，本菌株で製造した泡盛は香味性の向上と特徴的な風味が認められ，昨年商品化された．

3. 大腸菌のシステイン代謝調節機構の解析と発酵生産への応用
システイン（Cys）は様々な工業原料として重要であり，グルコースからの直接発酵が望まれていた．演者らは，大腸菌における Cys の代謝調節機構を解析し，発酵生産への応用に取り組んだ．Cys 含量はセリンアセチルトランスフェラーゼ（SAT）の Cys によるフィードバック阻害，Cys デスルフヒドラーゼ（CD）によって制御されている．まず，大腸菌のフィードバック阻害感受性が低下した SAT 変異体や植物のフィードバック阻害非感受性型 SAT を発現させ，合成系の強化により Cys の過剰生産に初めて成功した．次に，CD の同定と機能解析を行い，遺伝子破壊による分解系の弱化が Cys 生産性の向上に有効であることを示した．さらに，排出系の利用を目的に，薬剤排出タンパク質 Bcr や外膜ポリン TolC を Cys 輸送体として同定し，高発現させることで Cys 生産への有用性を確認した．得られた知見の一部は Cys 発酵生産の工業化に貢献した．

微生物のアミノ酸代謝とその制御機構は生存環境や代謝様式などで異なっている．また，複雑なネットワークを形成し，細胞内の様々な代謝産物やシグナル分子の制御系とのクロストークも存在する．基礎研究では，それらの分子機構を解明し，生命現象の理解を深めることが可能である．一方，応用研究では，アミノ酸含量の人為的制御によって，ストレス耐性の付与による発酵食品・バイオエタノール・有用物質の生産性改善，味・風味の差別化や機能性の向上を目指した食品の製造などへの貢献が期待できる．

Analysis of metabolic regulatory mechanisms and physiological functions of amino acids and their applications in microorganisms

○Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words microorganisms, amino acid, metabolism, functional property

1A-Wp03 好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの高機能発酵製品の製造と学術的解明

○宮本 浩邦[1,2,3,4], 宮本 久[3,5], 田代 幸寛[6], 酒井 謙二[6], 児玉 浩明[1,3]
([1]千葉大・園芸, [2]理研・統合生命, [3]サーマス, [4]日環科学, [5]三六九, [6]九大院・農)
h-miyamoto@sermas.co.jp

我々は，好熱性微生物の自家発酵熱を活用することによって，70-80℃の連続発酵が可能な fed-batch 式の閉鎖系の発酵槽の技術開発，並びに製造された発酵産物の用途開発を多面的に進めてきた．特に，未利用の海産資源を原材料として，動植物の成長に寄与する肥・飼料を開発し，実際の現場への普及を実現化している．また，モデル生ゴミを原材料として生分解性プラスチックの原料である L 型乳酸を効率的に生産する発酵技術の開発に成功している．以下，その概要について紹介する．

1)高機能肥料化(抗かび活性と植物の低硝酸化)とその作用機序の解明
未利用海産物を独自の閉鎖系の三槽隔離発酵法によって好気下で高温発酵した発酵産物は，植物の成長に寄与する肥料として活用できることを証明し，発酵産物中の *Bacillus* 属菌の一つが，植物病原性糸状菌である *Fuzarium* 属菌に対する増殖抑制効果を示した．また，その抗菌物質として環状リポペチドを生産していることを明らかにした（J Gen Appl Microbiol, 54: 149-158, 2008）．さらに，発酵産物には作物中の硝酸濃度を低減化する機能があり，その分子機序の一部が，土壌中の菌叢の変化を伴った脱窒作用によることをアセチレンブロック法などによって明らかにした(Appl Microbiol Biotechnol, 97:1349-1359, 2013)．これらのデータから，当該発酵産物の施用によって，化学農薬や化学肥料の使用量を低減しても農場の単離面積あたりの生産量が増産するとともに，作物自体の品質が向上する傾向とも関連する可能性が示唆された．これらの研究成果の一部は，国内特許化を実現し，国際特許として PCT 出願をしている．

2)発酵飼料としての高機能性(死亡率抑制，生育促進効果，脂肪蓄積軽減)とその分子機序の解明
上記発酵産物の経口投与が，養豚・養鶏・養殖魚の生産性に対して好影響を与え，死亡率の抑制や生育促進の効果があることを明らかにした（J Gen Appl Microbiol,56: 61-65, 2010; Res Vet Sci, 93:137-142, 2012; J Biosci Bioeng, 121: 530-535, 2016a; 121: 659-664, 2016b）．その作用機序の評価のために，モデル動物の試験を進め，発酵産物が低濃度の菌密度で腸内免疫や脂質代謝に影響を与え，糞中の IgA の分泌促進効果，並びに筋肉や肝臓における過酸化脂質の蓄積抑制効果があることを示唆した(J Biosci Bioeng, 114: 500-505, 2012; J Biosci Bioeng, 116: 203-208, 2013)．さらに，それらの生理的作用を示す主要好熱菌種の単離・同定をノトバイオートによる動物実験によって成功させた（J Appl Microbiol, 114: 1147-1157, 2013）．これらの IgA 産生に貢献する菌株の一つは，ヤシ酒の発酵微生物 *Bacillus thermoamylovorance* の近縁菌であり，新菌種名として *Bacillus hisashii* と命名し，学術報告した（IJSEM, 65: 3944-3949, 2016）．当該菌株には，内臓脂肪の蓄積軽減効果も見い出され，本研究の成果に基づいて国際寄託するとともに，国際特許として PCT 出願し，現在，日本，中国，EU において特許の権利化を実現させた．

3) 高純度 L 型乳酸の高効率生産への利用
上記発酵物を複合種菌とした嫌気条件・高温下における生ゴミの発酵工程において，複数種の微生物群が混在する条件下においても，L 型乳酸を高純度に生産可能であり(Bioresour Technol, 146: 672-681, 2013)，培地における pH 変化の方法を改変することによって L 型乳酸の生産効率が改善することを明らかにした(Bioresour Technol, 216: 52-59, 2016)．また，それらの菌群の中において，デンプンから直接，L 型乳酸を高純度に高効率的に生産可能な菌株を分離することに成功するとともに (J Ind Microbiol Biotechnol，42: 143-149, 2015)，複合微生物系から主要微生物を分離する方法として，MALDI-TOFMS を活用した体系的フィードバック分離法を考案した(J Biosci Bioeng, 123: 63-70, 2017).

本研究は，好熱菌によるリサイクル技術を活用した発酵産物が，1)過剰な薬剤の使用を避けながら農畜水産業の生産効率を向上させるとともに，2)生分解性プラスチック原料の L 型乳酸を生ゴミから高効率に生産可能であることを示しており，持続可能な循環型社会の構築のために次世代に貢献できる技術シーズと捉えている．国連が 2015 年に提唱した「持続可能な開発目標(Sustainable Development Goals: SDGs)」における目標設定との関係性も踏まえて，本研究の概要について紹介する．

最後に，今回の受賞に際して，循環型農業のモデルの確立のために，御指導，御協力下さいました都路グループの皆様，技術開発の普及に御尽力頂いた京葉プラントエンジニアリング株式会社の皆様，並びにフィールド試験の協力を様々な形で御支援頂いた多くの皆様に深謝致します．

Studies on production of highly functional fermented-products made from unutilized biomass resources by thermophiles.

○Hirokuni Miyamoto[1,2,3,4], Hisashi Miyamoto[3,5], Yukihiro Tashiro[6], Kenji Sakai[6], Hiroaki Kodama[1,3]
([1]Fac. Horticul., Chiba Univ., [2]IMS, RIKEN, [3]Sermas, [4]Japan Eco-science, [5]Miroku, [6]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words compost, thermophile, biomass, bioreactor

9月12日（火）

受賞講演（15:10 ～ 15:30）

G 会場（52 号館 2 階），B 会場（57 号館 2 階），D 会場（56 号館 1 階）

〈生物工学奨励賞（照井賞）〉

受賞者　加藤 竜司（名大院・創薬科学）

画像情報処理を用いた再生医療用製品製造工程における
非破壊的品質管理技術の開発　2A-Gp01　p. 91

〈生物工学アジア若手賞〉

受賞者　John Chi-Wei Lan (Yuan Ze University, Taiwan)

Sustainable bioprocessing for producing and recovery of polyhydroxyalkanoates
2A-Bp01　p. 91

〈生物工学アジア若手賞〉

受賞者　Tau Chuan Ling (University of Malaya, Malaysia)

Applications and recent trends in aqueous two-phase extraction of bioproducts
2A-Dp01　p. 92

※生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者講演 2A-Fa01 は，
特別口頭発表 B2（F 会場，9:00 ～ 11:00）にて行います．　2A-Fa01　p. 92

シンポジウム（午前の部 9:00 ～ 11:00）

A, B 会場（57 号館 2 階）/ C, D 会場（56 号館 1 階）

集え！バイオインフォマティクスを利活用する生物工学若手研究者　2S-Aa01 ～ 05　p. 93

微生物は電気を作る，使う，盗む．その能力，上手に使いませんか？　2S-Ba01 ～ 05　p. 95

健康とモノづくりへの腸内細菌活用の最前線

共催：バイオインダストリー協会　新資源生物変換研究会，発酵と代謝研究会，
アルコール・バイオマス研究会，グリーンバイオイノベーションフォーラム（GIF）　2S-Ca01 ～ 04　p. 98

合成生物の時代におけるロバストな物質生産と生物学的封じ込め　2S-Da01 ～ 05　p. 100

シンポジウム・招待講演（午後の部 15:30 ～ 17:30/18:00）

A, B 会場（57 号館 2 階）/ C, D 会場（56 号館 1 階）/ G, H 会場（52 号館 2 階）

生物工学若手研究者の集いシンポジウム―博士後期課程学生口頭発表コンペティション―
本シンポジウムの講演番号と講演要旨については p.16 ～ 17 のプログラムをご参照の上，
各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

Next Generation Enzyme Engineering ―Tools for *in silico* Enzyme Discovery, Correct Folding and Their Fabrication―《国際シンポジウム》(～ 18:00)
2S-Bp01 ～ 05 p. 102
〈招待講演（韓国生物工学会）〉 (2S-Bp01, 2S-Bp02) p. 102, 103

生命システムビッグデータと情報解析技術の融合による生物工学の新展開
2S-Cp01 ～ 04 p. 105

Japan-Korea Joint Symposium
"Development of Bio-Device Based on Cell Engineering and Nano- and Micro-biotechnology for Medical Application"《国際シンポジウム》(～ 18:00)
2S-Dp01 ～ 06 p. 107
〈招待講演（韓国生物工学会）〉 (2S-Dp03, 2S-Dp05) p. 108, 109

培養・計測技術の最前線【本部企画】 2S-Gp01 ～ 04 p. 110

微生物の「声」が聴きたくて… 単細胞生物のコミュニケーションスキル
2S-Hp01 ～ 05 p. 112

一般講演　特別口頭発表 A･B（9:00 ～ 11:00）E, F, G, H, I, J 会場（52 号館 1 ～ 3 階）
ポスター発表（ポスター掲示時間 9:00 ～ 18:00）　ポスター会場（63 号館 2 階）

遺伝子工学	2P-N001 ～ E035	p. 114
酵素学，酵素工学	2P-G036 ～ G057	p. 123
タンパク質工学	2P-H058 ～ H075	p. 128
発酵生理学，発酵工学	2P-H076 ～ N095	p. 133
代謝工学	2P-H096 ～ H113	p. 138
醸造学，醸造工学	2P-F114 ～ I123	p. 142
食品科学，食品工学	2P-I124 ～ I143	p. 145
バイオマス，資源，エネルギー工学	2P-I144 ～ F167	p. 150
生物化学工学	2P-J168 ～ J191	p. 156
バイオプロセス	2P-N192 ～ J203	p. 162
生体医用工学	2P-N204 ～ N220	p. 165
バイオセンシング，分析化学	2P-J221 ～ J231	p. 169

2A-Gp01 画像情報処理を用いた再生医療用製品製造工程における非破壊的品質管理技術の開発

○加藤 竜司
（名大院・創薬科学）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

再生医療は，患者由来の細胞を用いて従来では治療・修復できなかった疾患や損傷を治療する新しい医療である．近年では iPS 細胞などの幹細胞技術や抗体医薬などの生物製剤生産における細胞培養技術の発展により，再生医療は新しい産業へと発展しつつある．
再生医療において培養する細胞は，「治療に用いる細胞」である．従来の生物学を支えてきた分子生物学的評価法は，破壊的評価が多いため適用が難しい．また，現状では 1 製品あたりの再生医療等製品の製造コストは極めて高く，その一因として人の経験と勘に依存した培養プロセスの不安低性・非効率性が挙げられる．即ち，治療用細胞を工業的に大量製造し，産業化を推進するためには，細胞培養における安全性・効率性を向上させるための品質管理技術の開発が必要である．このように，生物の現象に学び，これを制御することで基礎研究を実用化に繋げるための技術開発は，生物工学における一つの新しい挑戦分野であるとも言える．
現在の再生医療用細胞の培養では，培養の熟練者は「細胞の形」を顕微鏡で観察することによって，培養中の細胞の「活性」や「仕上がり」をモニタリングし，培養を絶妙に最適化している．このような細胞の視覚的な形の情報は，細胞培養の有史以来，最も実用的かつ世界的に広く用いられているが，「顕微鏡画像」から得られる形の情報を，いかに情報として抽出し，モデリング等に興ずるかは，あまり系統的に議論されてきていなかった．また従来，多くの画像解析技術は，染色された情報量の多い画像を対象にすることが多く，非染色画像から得られる形態情報と，実際のバイオロジーとの相関性や関連性は，あまり明らかではなかった．
演者は，培養中の細胞画像から様々な特徴量を抽出し，バイオインフォマティクス的解析手法と融合させることによって，「細胞の形」が「細胞の品質」と密接に相関し，工業的に計測可能な品質管理のための指標となり得ることを検証してきている．本講演では，細胞画像から得られる情報を用いて，細胞の製造工程における「不確定要素」や「感覚的指標」を定量化できる可能性を示しながら，その工業的利用価値と生物学的意義について論じたい．

Development of image-based informatics as non-invasive quality control technology for controlling regenerative medicine products

○Ryuji Kato
(Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words cell morphology, quality control, cell processing, prediction

2A-Bp01 Sustainable bioprocessing for producing and recovery of polyhydroxyalkanoates

○John Chi-Wei Lan
(Yuan Ze University, Taiwan)
lanchiwei@saturn.yzu.edu.tw

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are known as the most fascinating and largest groups of biopolyesters characterized with dissimilar properties and functionalities. Although PHAs have been considered a sustainable alternative to petrochemical-derived plastics, their commercial value is markedly limited by high production and purification costs. Therefore, to develop a sustainable bioprocessing for PHAs product in respect of low cost and high recovery is main challenging. The P(3HB), one of PHAs polymers, can be synthesized by enzymatic method either *in vivo* by accumulation in bacteria or *in vitro* through a polymerization of (R)-3HBCoA molecules by PHA synthases. Crude glycerol, an inevitable byproduct during biodiesel production, is emerging as a potential feedstock for fermentation, due to its availability and a reasonable price. Biological utilization of abundant crude glycerol to several value added products is contemporary research area with beneficial features. Our approaches revealed that the simultaneous production of poly 3-hydroxybutyrate (P3HB) and bioethanol from crude glycerol by recombinant *E. coli* were achieved. The incorporation of aldehyde reductase (Alrd) and aldehyde dehydrogenase (AldH) in recombinant strain showed 2-fold increment in crude glycerol utilization under aerobic condition. Moreover, these two enzymes introduced an alternative pathway leading toward the potential production of bioethanol. The maximum production of bioethanol and P3HB in the recombinant strain was 0.8 g L^{-1} (17.4 mmol L^{-1}) and 30.2% (w/w dry cell weight) respectively, which were higher than the parental strain. In addition, we also developed an effective synthesis system to be effective in monitoring and controlling the molecular weight of P3HB by employing aqueous two phase technology. Thermoseparating aqueous two-phase extractions (ATPEs) have the benefits of environmental friendliness, scalability, and provision of a mild environment for bioseparation. It was conducted and investigated to separate P3HB from fermentation broth. Under the condition of 14% wt/wt of EOPO 3900 concentration, 14% wt/wt of ammonium sulphate concentration, and pH 6, without the need for additional centrifugation steps, a yield and purity of up to 72% and 60%, respectively, can be achieved. In summary, we believe by integrating biotehnology platform could develop/improve the efficiency biorefinery process of biochemicals (PHAs and bioethanol as the examples) in a sustainable production manner.

Sustainable bioprocessing for producing and recovery of polyhydroxyalkanoates

○John Chi-Wei Lan
(Yuan Ze University, Taiwan)

Key words PHA, glycerol, ethanol

2A-Dp01 Applications and recent trends in aqueous two-phase extraction of bioproducts

○Tau Chuan Ling
(Inst. Biol. Sci., Fac. Sci., Univ. Malaya)
tcling@um.edu.my

Over the last two decades, the aqueous two-phase system (ATPS) has regained increasing interest due to its potential in circumventing some of the technical limitations exist in the downstream processing of many bioproducts, e.g., enzymes, Immunoglobulin G (IgG), protein from microalga etc. Research done thus far has demonstrated that ATPS is a versatile and cost-effective technique for the separation and purification of the bioproducts from cell culture fluids and crude extract of plants. In addition, successful applications of ATPS integrated with various recovery strategies and approaches beyond batch-scale also confirms its potential implementation in large-scale operations. In this article, the impact of ATPS and process parameters, recovery strategies, applicability, challenges and recent advances of several types of ATPS in the extraction of various bioproducts are addressed. This article is intended to provide a comprehensive review on the studies related to the extraction of bioproducts using the ATPS since its introduction till date, which will be helpful for the future development of this technique in the downstream processing of bioproducts.

2A-Fa01 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 由来 EXP2 の獲得と特性解析

○袴田 一晃[1], 渡辺 寛和[1], 川野 竜司[1], 野口 恵一[2], 養王田 正文[1]
（[1]農工大院・工・生命工, [2]農工大・機器分析施設）
kazuaki.hakamada@yohda.net

近年，マラリア原虫は PTEX（Plasmodium translocon of exported proteins）と呼ばれるトランスロコンを介して，自身のタンパク質を宿主赤血球の細胞質内に送り込む事が分かってきた．PTEX は HSP101，PTEX150，EXP2 を中心に複数のタンパク質からなる複合体とされている．原虫細胞から寄生胞内に分泌された輸送タンパク質は，PTEX により一度アンフォールドされ，膜透過すると考えられている．我々は他のユニットを膜に繋ぐリンカーであり，タンパク質が通過するポアの形成が予想されるタンパク質 EXP2 について大腸菌組み換え体を用いて *in vitro* 解析を行った．
EXP2 の Pore forming toxin（PFT）への類似性により，PFT に広く用いられる Hemolytic Assay を行った．ヒツジ血液の血球成分を EXP2 と培養した結果，EXP2 の濃度に依存してヘモグロビン特有の吸光度の上昇が見られ，EXP2 は赤血球に対して溶血性をもつことが示唆された．次に人工膜に再構成させた EXP2 について，電流計測を用いて電気的特性を観察した．この結果，PFT に多く見られる電流上昇が見られ，EXP2 はモデル膜に対して活性を持つことが示唆された．また得られた電流から EXP2 のポア直径，オリゴマーの会合数を算出した結果，ポア直径は 3.45 nm，オリゴマーの会合数は 12.3 ± 4.0 と見積もられた．またリポソーム上に再構成した EXP2 を透過型電子顕微鏡で観察した結果，円状のタンパク質粒子がリポソーム上に存在していることが分かった．また，円状のタンパク質粒子の内部のポア直径は 3.35 nm である事が分かった．
これまで先行研究による *in vivo* 解析において，EXP2 のポア形成の可能性が挙げられてきた．本研究では，人工脂質 2 分子膜を利用した EXP2 の再構成と観測，赤血球への溶血特性から，EXP2 は PTEX のユニットのうち，膜上でポアを形成するユニットである事を強く示唆した．また電流計測，TEM によって推測したポア直径から，EXP2 の直径は約 3.4 nm である事が示唆された．

Applications and recent trends in aqueous two-phase extraction of bioproducts

○Tau Chuan Ling
(Inst. Biol. Sci., Fac. Sci., Univ. Malaya)

Key words aqueous two-phase system, bioseparation, purification, protein

Expression and characterization of EXP2 from *Plasmodium falciparum*

○Kazuaki Hakamada[1], Hirokazu Watanabe[1], Ryuji Kawano[1], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[1]
([1]Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Instr. Anal. Center, Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words malaria, membrane protein, translocon

2S-Aa01 超大規模実験室進化とオミックス解析による大腸菌のストレス耐性機構の解析

○堀之内 貴明[1], 前田 智也[1], 古澤 力[1,2]
（[1]理研・生命システム, [2]東大院・理）
takaaki_horinouchi@riken.jp

生物システムは一般に，厳しい環境条件に対しても適応できるという柔軟性を有する．ある環境下で長期間にわたって世代を重ねるという実験室進化は，その環境に対する適応の過程を経時的に追跡可能であり，高速シーケンシングならびにオミックス技術の革新は，この進化過程における遺伝子型や表現型の変化の直接的な解析を可能とした．さらに，実験室進化に用いる淘汰圧として種々の化合物を用いることにより，たとえば抗生物質耐性菌の出現機構の解析や，化成品原料など工業的に重要な物質のバイオ生産における有用微生物の育種なども可能であり，実験室進化は理学分野のみならずこうした応用分野においても強力な手法として注目されている[1].

一方で実験室進化には長い培養期間を要する場合があり，これを多系列，多数条件で系統的に行う際には，多大な人的コストが必要となる．近年は自動分注機をはじめとするラボオートメーションシステムが登場し，そうした実験上での制約を打破することが可能となってきた．我々はこれまでに，多系列・多数条件の植え継ぎ培養を全自動で行う実験室進化システムの開発を行ってきた[2]．このシステムはクリーンブース内に設置された自動分注機と，それに接続したプレートリーダーおよびインキュベータからなり，プログラムによる制御によってマイクロプレート上での培養，増殖の評価および植え継ぎ操作を最大数十枚（384 穴プレート使用時には最大約 20,000 系列）について並列かつ全自動で行うことが可能である．

我々はこのシステムを用い，様々な化合物によるストレス（抗生物質，酸，アルカリ，塩類，界面活性剤，金属イオン，代謝中間体など約 100 種類）を題材として実験室進化を行い，親株よりも高いストレス耐性を有する株を取得した．こうした大規模の実験室進化によって得られた多種多様のストレス耐性株の全ゲノムリシーケンス解析，トランスクリプトーム解析，ならびに表現型網羅的解析を行い，それらのデータ間の関係を解析することにより，ストレス耐性機構の理解や耐性・感受性の変化を予測すること等を試みており，本発表ではそれらの結果について紹介するとともに，こうした大規模解析が生物工学分野にもたらすインパクトについて議論したい．

[1] 堀之内, 鈴木, 古澤., *生物工学*, 93(9), 536-538, 2015.
[2] Horinouchi *et al*., *J. Lab. Autom*., 19(5), pp. 478-482, 2014.

Analysis of *Escherichia coli* stress tolerant mechanism using ultra-high throughput experimental evolution and omics approach.

○Takaaki Horinouchi[1], Tomoya Maeda[1], Chikara Furusawa[1,2]
([1]QBiC, RIKEN, [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

Key words evolutionary engeneering, *Escherichia coli*, genome, transcriptome

2S-Aa02 代謝シミュレーションに基づいた有用発酵微生物の育種

○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
k-tokuyama@ist.osaka-u.ac.jp

微生物によるものづくりを達成するために，目的物質の生産性の高い有用発酵微生物を育種することが求められる．近年では，コンピュータ上で細胞内の代謝状態を予測するシミュレーション法が開発され，その予測に基づいて遺伝子操作を行うことで，目的物質の生産性を向上させるという取り組みが行われてきた．しかし，遺伝子操作前に比べて生産性は向上するものも，予測値に比べると実際の生産性が低い場合がほとんどである．この原因として，本予測に用いたシミュレーション法には酵素のカイネティクスの情報が考慮されていないため，細胞内の代謝挙動を十分に予測・再現できていないと考えられる．そのため，代謝シミュレーションの特性を理解した上で，更なる育種戦略を創出する事が望まれる．本講演では，代謝シミュレーションと実験室進化の統合利用によるコハク酸高生産大腸菌育種と，オミクス解析やタンパク質構造解析などのバイオインフォマティクスを利用した取り組みについて紹介する．

1) 代謝シミュレーションと実験室進化の統合利用による高コハク酸生産大腸菌の育種
大腸菌などの微生物は全ゲノム配列の解読や個々の遺伝子・タンパク質の機能の解明により，細胞内の代謝反応の多くが同定され，得られた知見はデータベースに蓄積されてきた．これらの情報を基に，ゲノムワイドな代謝反応モデルを計算機上で再構築して，代謝状態の予測に利用できる．フラックスバランス解析は，数千以上の代謝反応を含むゲノムスケールの代謝モデルに対し，定常状態において細胞は自身が最も増殖できるように代謝を自己組織化するという制約条件下での代謝フラックス分配を計算する手法である．この方法を用いることで，増殖最大時の目的物質生産性を指標として，目的物質生産に有効な遺伝子破壊戦略を *in silico* で設計できる．実際に，グリセロールを基質としたコハク酸生産大腸菌の育種に本法を応用したところ，野生型の大腸菌と比べて，2.8 倍高い 0.07 g/g のコハク酸生産収率を示す遺伝子破壊株の構築に成功したが，予測された生産収率 (0.44 g/g) と比べて低い値となった．フラックスバランス解析では酵素のカイネティクスの情報が考慮されていないため，遺伝子破壊直後の株においては何らかの代謝反応が律速となり，細胞増殖に最適な状態に移行できないために予測値よりも低い生産性を示したと考えられる．そこで，構築した遺伝子破壊株に対し実験室進化を行い，自然変異を通じて増殖速度の上昇した進化株を構築することで，コハク酸生産性の向上を試みた．継代培養により独立した 5 系列の実験室進化実験を行ったところ，全ての系列の進化株 (100 世代目) は進化前に比べて，コハク酸収率が 3.1 ~ 4.3 倍に向上した．さらに，バイオリアクターを用いて酸素供給条件を調節した結果，進化株はフラックスバランス解析の予測と等しい 0.44 g/g のコハク酸収率を達成した．

2) バイオインフォマティクスを利用したコハク酸高生産機構の解明
実験室進化による有用菌株育種では，変異率が少ないため，適応進化に有効な遺伝子変異を容易に同定できる．進化株において，コハク酸生産が向上した機構を解明するため，次世代シーケンサーによる全ゲノム変異解析を行ったところ，全株が遺伝子変異を 1~3 個持ち，特に共通してホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (Ppc) をコードする *ppc* 遺伝子上にミスセンス変異を引き起こす 1 塩基置換が確認された．そこで，親株のゲノム上に発見された変異を導入したところ，増殖速度とコハク酸生産性が回復した．さらに，タンパク質構造モデルを用いて変異箇所を解析したところ，確認されたミスセンス変異はいずれも共通の α-ヘリックス鎖上に位置し，本鎖にはアロステリック阻害物質であるアスパラギン酸の結合部位が存在する事が確認された．*In vitro* での Ppc 酵素活性測定を行ったところ，アスパラギン酸の存在下で野生型は活性値を 80% ほど低下したのに対し，同定された変異型はアスパラギン酸に非感受性の表現型を示した．これより，進化株は 1 塩基置換により Ppc へのアスパラギン酸による阻害を解除させ，コハク酸の生産性が高い増殖に最適な代謝状態へと適応進化したことが明らかになった．

Strain improvement for valuable chemical production with using genome-scale metabolic simulation

○Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic simulation, evolutionary engeneering, succinate, *Escherichia coli*

2S-Aa03 メタボロミクス研究のための質量分析インフォマティクス

○津川 裕司[1,2]
（[1]理化学研究所・環境資源科学研究センター・メタボローム情報研究チーム, [2]理化学研究所・統合生命医科学研究センター・メタボローム研究チーム）
hiroshi.tsugawa@riken.jp

生体中に含まれる低分子代謝産物を網羅的に解析できるメタボロミクスの技術は現在，生物・食品・医学分野といった幅広い研究において必須のものとなっており，最近では遺伝子・タンパク質・低分子代謝物のオミクス情報を統合的に解析する「マルチオミクス（もしくはトランスオミクス）」研究まで 行われるようになってきた．発表者はその中でも，学生の頃からメタボロミクス研究において頻用される計測装置であるガスクロマトグラフィーおよび液体クロマトグラフィー質量分析（GC/MS・LC/MS）より得られるデータを，（１）どのように解析すれば生物学者は楽になるのか？（２）どのように解析すれば新規化合物が発見できるのか？（３）どのようにすれば新たな生命現象の解明につながるのか？という観点で見つめ，研究に取り組んできた．このように質量分析データを取り扱い，新たな技術の開発・生命現象の発見を目指す研究分野を今では「質量分析インフォマティクス」と言ったりするが，本セッションでは発表者が行ってきた技術開発ならびに，その技術を用いた統合オミクス解析について紹介したい．また，本発表で出てくるすべてのソフトウェア・データベースはすべて，理化学研究所 PRIMe ホームページ（http://prime.psc.riken.jp）中の「Computational MS-based metabolomics」セクションにて無償で公開されている．開発しているソフトウェアはダウンロードするだけで使用することができるため（インストールの必要はない），メタボロミクスにおけるデータ解析の「スタートアップキット」として使用していただければ幸いである．

2S-Aa04 クモ類網羅的シーケンシングによる超高機能構造タンパク探索

○荒川 和晴
（慶応大）
gaou@sfc.keio.ac.jp

クモ糸はその強靭さや再生可能性などから，次世代の高機能構造タンパク素材として注目されている．このクモ糸には幅広い機械特性を持つ７種類のものが存在し，これらを構成する遺伝子は基本的に単系統であることが確認されている．よって，クモ目において網羅的な遺伝子配列及びクモ糸の物性を解析することにより，クモ糸遺伝子配列の進化に伴う物性の変化を定量的に関係づけることが可能であると考えられ，これを元にクモ糸の高機能発現メカニズムを明らかにすることが期待される．このため本研究では，革新的研究開発推進プログラム（ImPACT・鈴木 PM）の一部として，本研究では超並列シーケンサーを用いた de novo トランスクリプトームアセンブリーによって 1,000 サンプルのクモ糸遺伝子配列を決定した．また，牽引糸のプロテオミクス及びメタボロミクス解析によって，既知のクモ糸遺伝子以外の構成成文についても明らかにしている．本発表ではこの網羅的シーケンシング及びオミクス解析プロジェクトの進捗及び，そこから明らかになってきたクモ糸の高機能発現メカニズムについて紹介する．

Informatics for mass spectrometry-based metabolomics

○Hiroshi Tsugawa[1,2]
([1]RIKEN CSRS, Metabolome Informatics Research Team, [2]RIKEN IMS, Laboratory for Metabolomics)

Key words Metabolomics, Mass spectrometry, Chemoinformatics

Sequencing 1000 spiders

○Kazuharu Arakawa
(Keio Univ.)

Key words bioinformatics, genome, transcriptome, spider

2S-Aa05 創薬研究におけるウェット・ドライ連携によるバイオインフォマティクス

○六嶋 正知
（塩野義製薬株式会社）
masatomo.rokushima@shionogi.co.jp

近年の創薬研究では，各種オミクス技術やスクリーニング技術の進歩により，膨大な生物学的データを解釈するバイオインフォマティクスの重要性が益々高まっ てきています．本講演では，製薬企業の研究現場でのバイオインフォマティクスの活用シーンや，創薬研究において求められるバイオインフォマティシャン の人材像について，現場マネージャーの立場から紹介いたします．

Bioinformatics in drug discovery based on the cooperation between wet and dry researchers

○Masatomo Rokushima
(Shionogi & Co., Ltd.)

Key words bioinformatics, drug discovery

2S-Ba01 微生物による金属腐食の電子流失速度とガス生産

○若井 暁
（神戸大院・イノベ）
wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp

微生物が金属腐食反応に関与する現象は，微生物腐食として古くから知られている．金属腐食にかかわるコストは，米国で年間 2760 億ドル，日本でも年間数兆円と試算されており，腐食現象の数十％に微生物が関与していると言われている．金属の腐食反応は，金属鉄から金属イオンが溶出し（アノード反応），余剰な電子がカソード反応によって消費されることで成立する．微生物腐食現象については，微生物がアノード反応とカソード反応のいずれに関与しているかは明らかになっていない．最も古い微生物腐食のモデルによれば，嫌気的な環境で金属腐食のカソード反応は水素イオンの還元による水素発生であり，その生じた水素を消費することでカソード反応を加速すると言われている．一方で，多くの水素資化性菌は，この反応を加速することはできない．

近年，多くの新規腐食性微生物が報告されている．その中でも，演者は，鉄腐食性メタン生成菌に注目している．鉄腐食性メタン生成菌は，日本の石油タンクの底に溜まっている水から分離されたもので，単独で強い腐食反応（加速された鉄溶出）を示す．電子供与体を金属鉄のみとして嫌気的に培養すると，無菌区では化学的なアノード反応により緩やかに鉄を溶出しながら少量の水素を発生するが，鉄腐食性メタン生成菌は，著量の鉄を溶出させて，著量のメタンを生成する．この時，生じた鉄イオンが不溶性の腐食生成物を形成するため，鉄溶出量を正確に測定することは難しい．そこで，メタン生成菌というベースの能力に注目し，メタン生成の電子供与体が金属鉄とそこから生じた少量の水素であることから，ガス生産量から電子流失量を見積もった．その結果，鉄腐食性メタン生成菌は，無菌区よりも約 40 倍も速い速度で金属鉄からの電子流失を引き起こし，メタン生成していることが明らかになった．正に，「電子を盗んで」腐食していた．

次に，この電子流失を加速してメタン生成を行う反応にさらに注目すると，長期培養するとメタン生成が停止して，水素発生に切り替わることが分かった．メタン生成が停止するタイミングは，初期投入してある炭酸塩濃度から算出するとあまりにも早い．原因は，溶出した鉄イオンと培地中の炭酸イオンが反応して不溶性の炭酸鉄を形成することにあった．注目すべきは，この炭酸枯渇後の水素発生速度が，無菌区での水素発生速度よりも明らかに速い点にある．したがって，無機物である金属鉄から本菌を用いることで，炭酸塩存在下ではメタンガス，炭酸塩枯渇下では水素生産が可能である．現在，日本国内には年間 4000 万トンもの鉄くずが発生しているが，これらを原料して水素生産を行った場合，ポテンシャルとして 163 億 Nm^3 の生産に相当する．この量は，政府が水素化社会構築に向けて 2030 年目安で目指している追加の水素供給量（27 億 Nm^3）を遥かに超える．

微生物腐食という現象は，ある視点で見ると「金属から電子を盗む」反応であるが，使い方次第では，水素生産のポテンシャルを持っており，我々の経済活動を助ける可能性がある．上手に使えるかどうかは，人間次第である．

Electron flow rate and gas production in metal corrosion by microorganism

○Satoshi Wakai
(Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ.)

Key words microbiologically influenced corrosion, electron, hydrogen, methanogen

2S-Ba02 金属鉄を腐食する新規硝酸塩還元菌 *Prolixibacter denitrificans*

○飯野 隆夫
（理研BRC-JCM）
iino@riken.jp

1. 目的
金属材料は様々な用途で使用されており，現代の我々の生活に必要不可欠な材料である．しかし，時間経過と共に，金属材料は腐食し，重大な性能低下や機能劣化を引き起こす．こうした金属腐食は一般的に化学的要因によるものと考えられがちであるが，微生物が金属腐食を誘起することが明らかになっており，この現象は微生物腐食と呼ばれる．微生物腐食は，腐食しないはずの環境で理論値よりも著しい速度で発生・進行するため，その予測は困難であり，問題が深刻化している．微生物腐食という現象は古くから観察されており，現在に至るまで，長らく硫酸塩還元菌 (SRB) が主要な微生物腐食の原因菌として捉えられてきた．以降，メタン生成アーキアや鉄酸化細菌などによる微生物腐食事例も報告されたが，これらの微生物が金属鉄を唯一の電子供与体として金属腐食を引き起こすことを証明されたのは，2000 年代とごく最近になってのことである．実体解明が遅々として進まない理由として，微生物腐食が多様な微生物と金属の相互作用による煩雑な現象である上，対象となる微生物が主に嫌気性もしくは難培養性であり，取り扱いの知識および技術の難易度が高いことが挙げられる．特に，金属鉄 (Fe^0) を酸化する鉄腐食菌は報告が少ない上，ほとんど保存されておらず，現存しない．そのため，問題解決に向けた研究の進展に弊害となっている．結果として，過去の微生物腐食研究は比較的培養の容易な菌種に限定した金属腐食能の解析や，金属腐食能とは無縁の分子生態学的解析に留まり，SRB 以外の金属腐食菌についてはほとんど知見が得られていない現状である．金属腐食菌の正確な種の特定や生態の把握なしに，微生物腐食を防止することは不可能である．本背景から，筆者らは，原油試料から新たな金属腐食菌を分離・培養し，生理・生化学特性や金属腐食能の解明を試みた．

2. 新規鉄腐食細菌の純粋分離および生理・生化学性状の解析
秋田県の石油備蓄基地から 2 株 (MIC1-1 株，AT004 株)，鹿児島県の石油備蓄基地から 1 株 (KGS048 株) の計 3 株を純粋分離した．分離株 3 株はグラム陰性，無芽胞，非運動性，従属栄養性の通性好気性桿菌であった．電子受容体として硝酸塩と酸素を利用し，電子供与体として金属鉄 (Fe^0)，第一鉄 (Fe^{2+}) を利用した．興味深いことに，既報の金属腐食菌とは異なり 3 株とも水素を利用できなかった．16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った結果，分離株 3 株は *Bacteroidetes* 門 *Bacteroidales* 目 *Prolixibacteraceae* 科に属し，*Prolixibacter bellariivorans* JCM 13498^T と近縁であった．*P. bellariivorans* JCM 13498^T との 16S rRNA 遺伝子の相同性は 97.0-97.1 %であった．3 株間の相同性は 99.1-99.2 %であった．以上の結果から，分離株 3 株を *Prolixibacter* 属細菌と同定した．MIC1-1 株の生理・性化学性状を詳細に解析した結果，至適生育温度，pH，塩濃度はそれぞれ 37℃，7.0，2 %であった．MIC1-1 株は，細胞の大きさや硝酸還元能，系統位置が *P. bellariivorans* と異なることから，新種として独立させることが妥当であり，新種 *Prolixibacter denitrificans* を提唱した．

3. 新規鉄腐食細菌による鉄腐食能の解析
P. denitrificans の生理性状に基づいて培養条件を設定し，MIC1-1 株の鉄腐食試験を実施した．対象として，*P. bellariivorans* JCM 13498 を用いた．電子受容体および炭素源として 10 mM 硝酸塩と 0.05 % 酵母エキスが存在した時，*P. denitirificans* MIC1-1 株の培養液中では，鉄片に黒い沈着物が付着し，培養液は黄土色に変色した．培養液中に溶出した鉄イオンを定量した結果，無菌区と比べ，6 倍の鉄イオンが溶出していた．Fe^{2+}と Fe^{3+}の比率は，Fe^{2+} : Fe^{3+} = 7 : 3 であった．電子受容体に硫酸塩を使用した時や，炭素源が存在しなかった時，鉄イオンの溶出は観察されなかった．*P. bellariivorans* JCM 13498 の培養液と無菌区では，全ての培養条件下で，鉄片，培養液共に変化はなかった．*P. denitirificans* MIC1-1 株の培養液の成分分析を行った結果，培養液中の硝酸は減少し，亜硝酸とアンモニアが検出された．腐食鉄片の構造解析，元素分布解析を行った結果，鉄片は減肉し，腐食生成物として炭酸鉄 ($FeCO_3$)とリン酸鉄 ($FePO_4$)が付着していた．以上の結果から，*P. denitirificans* MIC1-1 株は，硝酸還元を介して，鉄腐食を引き起こすことが明らかとなった．また，カソード水素を利用できなかったことから，*P. denitrifians* MIC1-1 株は，金属鉄から直接電子を引き抜いている可能性が示唆された．

Novel metallic iron-corroding nitrate-reducing bacterium *Prolixibacter denitrificans*

○Takao Iino
(RIKEN BRC-JCM)

Key words microbiologically influenced corrosion, nitrate-reducing bacterium, *Prolixibacter denitrificans*, crude oil

2S-Ba03 e-バイオと電子の特異な流れ（エレクトロンバイファーケーション）

○石井 正治
（東大院・農生科）
amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

演者らは，２００９年に『e-バイオ研究会』を立ち上げている．
『生物のエネルギー代謝の中枢ともいえる電子(水素) の流れに着目する．電子(水素) の生物 (群) への注入，生物 (群) 中の流れの制御，生物 (群) からの引き抜き，などにより，炭素循環をベースとした有用物質生産に資する全く新たな反応場の創生を目指す』を e-バイオと定義もしていた．
電子の流れを方向性を保った恰好で機能させ続けていることが，代謝が正常に機能している状態であり，それは生きているということにも直接的に繋がってくる．
本シンポジウムでは，e-バイオ（研究会）が立ち上がった時のことを，簡単に紹介する．

エレクトロンバイファーケーションとは，直訳すれば電子の分岐である．
同じエネルギー準位を有した 2 個において，一方が他方のエネルギーを吸い取るような恰好で電子の有するエネルギー準位の不均化が生じているような反応のことを指している(1)．たとえば，シトクロム bc_1 コンプレックスで生じている 還元型キノン依存のシトクロム b の還元と鉄硫黄タンパク質の還元は，エレクトロンバイファーケーションの古典的例として知られており，最近の例では，水素ガス依存のフェレドキシン還元に，フラビン化合物が関与し ながらエレクトロンバイファーケーションが生じている例が報告されている(2).
本シンポジウムでは，エレクトロンバイファーケーションに関しての最近の知見を纏めて紹介する．

最後には，演者の『e-バイオ』現在像をお伝えしたい．

(1) Nitschke, W. and Russell, M. J.: Bioessays, 34, 106 (2012)
(2) Fuchs, G.: Annu. Rev. Microbiol., 65, 631 (2011)

e-Bio and Electron bifurcation

○Masaharu Ishii
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words hydrogenase, electron bifurcation

2S-Ba04 生物電気化学的にみた水素/C1 社会

○加納 健司
（京大院・農）
kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp

温室効果ガス削減に向けて日本が世界的な主導権を取るうえで，CO_2 の固定と資源化の技術開発は極めて重要な課題である．植物等の光合成系は，光エネルギーを利用して CO_2 を還元固定するので，CO_2 の回収・利用(CCU)という観点で，優れた天然の CCU デバイスであると考えられる．しかし，光合成暗反応は CC 結合生成を伴うので反応が非常に遅い．これに対して光合成明反応系(PS II/I)の光エネルギー変換反応は非常に速く，変換効率も極めて高いので，生物機能を利用した現実的な CO_2 固定を考えるならば，PS II/I だけを利用して CC 結合生成を伴わないギ酸への 2 電子還元反応系を構築するのが最も合理的である．一方，エネルギー関連技術開発課題のひとつに，半導体等の光触媒を用いた「人工光合成」の開発が挙げられている．ここで注目される $2H^+/H_2$ 系の酸化還元電位は，CO_2/ギ酸系やニコチンアミドジヌクレオチド系(NAD(P)$^+$/NAD(P)H)のそれらとほぼ同じであるので，H_2 生成とはエネルギー的にはギ酸や NAD(P)H 生成と同等である．このため，相互変換酵素（フルクトース脱水素酵素(FDH)と NAD$^+$還元型ヒドロゲナーゼ(H_2ase)）を用いると上に挙げた３つの酸化還元系は相互変換できる．さらに，ギ酸はエネルギー源としてだけでなく炭素源としても利用できるので，工業化学的観点のみならず，応用微生物学的観点からも極めて魅力的である．
これらの背景を鑑み，生物機能と電気・光エネルギーを利用する CO_2 の資源化を基盤とした C1/水素経済社会を提唱する．光エネルギーによる H_2 あるいはギ酸生成と，それらの有用物資への変換は，生物機能をそのまま利用するだけもある程度実現できる．しかし，生物機能だけを利用する場合には速度制御が困難であり，速度論的観点から実用化が困難である．この系に電気化学系を組み込み，電気エネルギーを利用することにより速度制御が容易になり，応用性・実用性が飛躍的に高まる．演者らはこれまでに，のすべての生物的酸化還元触媒系を電極系と共役すること（酸化還元酵素反応の二基質の一方を電極に置き換え，高機能化すること）に成功している．CO_2 還元は FDH 反応だけでは困難であるが，電極と共役することにより実用的速度で進行できる．電気化学的には困難な NAD$^+$/NADH の可逆変換や(中性での)2H+/H2 の可逆変換も，酵素機能電極で実現した．そこで，図１の中で，本事業では，①CO_2 のギ酸への生物電気化学的還元デバイスの開発，②ギ酸/O_2 バイオ燃料電池の開発，③光エネルギーによる CO_2 のギ酸への還元系（人工光合成系）の開発，④微生物によるギ酸の有用物質変換系（ギ酸資化系）の開発を，実用化を念頭において進める．いずれの系も，常温・常圧で駆動し，無機・有機触媒による化学変換の場合に比べて，エネルギー・物質変換に伴うエネルギー損失が極めて小さいことが大きな特徴である．

Bioelectrochemical Approach to Hydrogen/C1 Society

○Kenji Kano
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words carbon dioxide, hydrogenase, formate dehydrogenase, artificial photosynthesis

2S-Ba05 沿岸域生態系を支える REDOX 恒常性の評価

○中村 龍平[1,2]
（[1]理研・環境資源, [2]東工大・地球生命）
ryuhei.nakamura@riken.jp

エネルギー代謝（呼吸・発酵・光合成）のバランスを保つ能力（恒常性維持能）は，人間を含めた全ての生物の健康度を表す指標であり，疲労，老化，疾患に対する免疫力の向上など，生命の根幹をなす生理現象と密接に結びついている．一方で多種多様な生物の集合体からなる自然生態系においては，エネルギー代謝の恒常性は，気候変動や病害に対する耐久性を付与する重要な因子となる．しかし，人間活動による河川や陸域からの過剰な栄養分の流入は，水圏生態系のエネルギーバランスを大きく乱し，生物多様性により維持される恒常性の破綻を引き起こす．恒常性が一度破綻すると，その修復には多大なコストと時間を有する．故に，水圏生態系を支える「微生物や宿主となる底生動物が，どの様に相互作用しながら，恒常性能を保持しているのか？」，そのメカニズムを理解することは健全な生態系を維持する上で重要である．さらには，恒常性を制御する手法の開発は新たな環境診断や浄化技術の創出にもつながるものである．特に水産養殖漁業が世界的に必要不可欠な食糧供給源となっている現在，沿岸域共生システムが持つ恒常性メカニズムの理解と制御は，次世代型の環境と調和した水産業を創生する上でも不可欠な課題となってきている．
以上の背景を踏まえ我々は，日本の豊かな水産資源の稚仔を育む場（ゆりかご）として重要な沿岸域生態系を研究対象とし，「微生物と宿主パートナーである底生動物」が作り出す恒常性メカニズムの解明と新規制御法の開発に取り組んでいる．具体的には，生態系の健全度を表す新たな指標として「生態系が元来有する酸化還元（エネルギーフロー）バランスを保つ能力（REDOX 恒常性能）」に着目している．多様な生物の複合体である沿岸域生態系においては底生動物と共生パートナーである微生物の双方の代謝（呼吸・発酵・光合成）活動の相互作用により環境中の REDOX 電位（環境電位）が決まる．一方で，養殖魚への飼料の投与などに代表される人間活動によるエネルギーフローのかく乱は，生物の代謝活動に大きな影響を与える．本発表では，微生物と宿主となる底生動物が作り出す微弱電流/電位差の時系列変動の計測，そして時系列データから得られる共生系が元来有するバランスを整える能力を REDOX 恒常性能にて議論する．

Visualizing REDOX Homeostasis in Benthic Ecosystems

○Ryuhei Nakamura[1,2]
([1]RIKEN CSRS, [2]Tokyo Tech. ELSI)

Key words ecosystems, symbiosis

2S-Ca01 腸内細菌の脂質代謝を活用した新規機能性脂肪酸

○米島 靖記[1], 岸野 重信[2], 小川 順[2]
（[1]日東薬品・研究開発, [2]京大院・農）
y.yonejima@nitto-ph.com

10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid（HYA）は，植物油脂の主成分であるリノール酸が腸内細菌による代謝を受けることにより生成する水酸化脂肪酸である．岸野らは，乳酸菌における HYA の生成機構を解明し，HYA 産生に関与する酵素群がリノール酸，α-リノレン酸などの不飽和脂肪酸の二重結合を対象に水和，酸化，還元，脱水反応を触媒し，様々な新規脂肪酸を産生することを見いだしている．さらに，これらの不飽和脂肪酸代謝物の生体内での存在と，その生成が腸内細菌によるものであるかどうかを確認するため，SPF マウスと GF マウスをもちいた解析を行った．それぞれのマウスを通常飼料を用いて飼育し，結腸，小腸，血漿における遊離脂肪酸の分布を解析したところ，リノール酸の初期代謝産物である水酸化脂肪酸 HYA 及び 13-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid，オレイン酸の初期代謝産物である 10-hydroxy-octadecanoic acid が各種組織中に確認された．興味深いことに，GF マウスと比較して，SPF マウスの小腸に HYA，13-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid 及び 10-hydroxy-octadecanoic acid が有意に高い値で検出された．本結果より，摂取した飼料由来の脂肪酸が腸内細菌の存在に依存して水酸化脂肪酸に変換されていることが示唆された．更にこれらの脂肪酸について，様々な評価系にて機能性評価が行われ，興味深い活性が見いだされている．宮本らは，HYA に GPR40 を介した腸上皮バリア損傷の回復作用を報告した．ヒト腸管上皮様細胞株（Caco-2 細胞）に IFN-γ と TNF-α を加えるとタイトジャンクションが損傷を受けるが，HYA を加えることで回復する効果を認めた．さらにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎モデルマウスに HYA を予め摂取させることで，DSS によって生じる腸管上皮の炎症，大腸長の短縮，炎症に伴う下痢・血便，ならびに体重減少が回復する作用を認めた．これらの作用は，HYA が GPR40 を介して腸管上皮細胞中の TNFR2 の発現を抑制することで発揮されると考えられた．また，宮本らは HYA をマウスに経口投与すると，血液中の GLP-1 濃度及びインスリン濃度が向上することを確認した．以上の報告により，乳酸菌などの腸内細菌の代謝によりリノール酸から生成する HYA が，消化管に発現している長鎖脂肪酸受容体に作用し，様々な生理活性を発揮すること，また，その活性の一つとして血糖値を制御しうる可能性があることが示された．
現在我々は，腸内細菌の代謝物であり，様々な生理活性を有する HYA について，食品向けの実用化検討に取り組んでいる．本講演では，その成果について紹介する．

Functional hydroxy fatty acid; 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid produced by gut lactic acid bacteria

○Yasunori Yonejima[1], Shigenobu Kishino[2], Jun Ogawa[2]
([1]Nitto Pharm., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words fatty acid, lactic acid bacteria, gut microbial metabolism, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid

2S-Ca02 ヒト腸内細菌データベースとその利用

○山田 拓司
（東工大）
takuji@bio.titech.ac.jp

ヒト腸管内には 1000 種 100 兆個体を超える細菌が共生している．これらの細菌はヒト腸内細菌と呼ばれ，腸管内に群集構造を形成し，複雑なエコシステムをなしている．微生物由来の遺伝子配列を直接決定するメタゲノム解析などの新たな解析手法の開発により，ヒト腸内環境研究は多くの発展を見せ，肥満，糖尿病，炎症性腸疾患，肝臓がんなどの様々な疾患との関連性が明らかになりつつある．我々は大腸がんに焦点を当て，その発症に関するメカニズムにヒト腸内細菌がどのように関連しているかを明らかにするため，大規模な疫学コホート研究を行っている．その中で収集しているデータとして，ヒト腸内環境のメタゲノムデータに加え，メタボロームデータ，生活習慣，食生活および内視鏡所見も収集しており，検体数はすでに 1800 を超えている．これらの統合解析により，大腸がん発症に関連する微生物，代謝物質，および微生物由来代謝経路を見出す試みを紹介する．

また，メタゲノム解析は大規模な遺伝子配列情報を産出するが，新規遺伝子が数多く存在するため，メタゲノム配列から得られた遺伝子の機能アノテーションをつけることができない場合が多い．そこで，我々はヒト腸内細菌群集に特化した代謝パスウェイデータベース，”EnteroPathway” データベースを構築している．このデータベースにより，これまでは機能を類推することが出来なかった遺伝子に対して，遺伝子機能をアノテーションすることができると期待できる．このパスウェイには反応情報のみが登録されている反応も数多く存在しているため，その酵素遺伝子を予測するパイプラインの構築も行い新規の反応経路の探索も行っている．

Metabolic pathway database for human gut microbiome

○Takuji Yamada
(Tokyo Tech)

Key words bioinformatics, database, microbiome

2S-Ca03 ビフィズス菌のゲノム操作系の構築

○鈴木 徹, タフオン アミン, 野村 泉
（岐阜大・応生科）
suzuki@gifu-u.ac.jp

ビフィズス菌は，ヒトの健康にとってもっとも重要な腸内共生細菌の一つである．我々はこれまで，本菌の分子生物学的解析を可能にするための研究ツールが十分に整っていなかった．我々は，ゲノム情報に基づき高効率形質転換系，遺伝子破壊法，遺伝子発現方などの一連の遺伝子操作技術の開発を行ってきた．
1) PAM 法による高効率形質転換系の構築： PAM 法とは，対象菌の制限修飾系の配列特異的 DNA メチル化酵素遺伝子をクローン化した大腸菌から得たメチル化されたプラスミドを用いることにより，形質転換効率を画期的に高める方法である．本法を用いて *B. adolescentis* ATCC15704 のエレクトロポレーションによる形質転換効率を 10^0 cfu/μg から 10^5 cfu/μg まで 100,000 倍に向上させることが出来る（文献 6,10）(Fig.1) (文献 1).
2) 温度感受性プラスミド： 我々は，42℃で複製が停止するビフズス菌のプラスミド pKO403 を作成した．この温度感受性プラスミドを用いると，10^3 細胞に 1 個程度で相同組換えによる遺伝子破壊株が取得可能である(文献 1).
3) *pyrE* 遺伝子によるマーカーの繰り返し使用： *pyrE* 遺伝子は，培地にウラシルが無い場合には必須であるが，5－フルオロオロチン酸がある場合は致死である．これを用いて，ポジティブネガティブ両方のセレクションが可能なマーカーとして利用可能であることを示した（文献 2）.
4) 高効率プロモーターの構築： 翻訳開始点上流について，ゲノム配列を解析したところ，従来 *E.coli* 等の研究から得られていたリボソーム結合配列(RBS) AGGAGG とは異なる AAGGAG がビフィズス菌における最適配列であることが明らかになった(文献 3). また，RNA-Seq の情報から従来の-35, -10 とは異なる認識配列であることが明らかになった．以上の情報から，遺伝子発現において最適プロモータの構築を行い．元となる *hup* プロモータに対し約 10 倍の発現効率を実現した.
以上の要素技術を組み合わせることにより，マーカーの痕跡を残さない遺伝子破壊が可能になった．これを用いれば，連続的に複数遺伝子の破壊が可能である（Fig.2）．これを用いて，*B. longum* NCC2705 株及び 105-A の約個の健康増進関連遺伝子群の単独の破壊株の作成を試みた.
この中で，以下の３点に関し報告する
1) *B. longum* NCC2705 株における双方向性マーカーを用いたマーカレス遺伝子破壊法
2) *B. longum* NCC2705 株における二成分制御系遺伝子の系統的破壊株コレクション構築
3) *B. longum* 105-A の莢膜多糖合成系遺伝子の破壊による，莢膜欠失株の開発（文献 4）

1. Yasui, K., Kano, Y., Tanaka, K., Watanabe, K., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., and Suzuki, T. (2009) Nucleic Acids Research. 37, e3-e3
2. Sakaguchi, K., He, J., Tani, S., Kano, Y., and Suzuki, T. (2012) Applied Microbiology and Biotechnology. 95, 499-509
3. He, J., Sakaguchi, K., and Suzuki, T. (2012) Applied and Environmental Microbiology. 78, 2988-90
4. Sakaguchi, K., Funaoka, N., Tani, S., Hobo, A., Mitsunaga, T., Kano, Y., and Suzuki, T. (2013) Bioscience of Microbiota, Food and Health. 32, 59-68
5. Tahoun, A., Masutani, H., El‐Sharkawy, H., Gillespie, T., Honda, R. P., Kuwata, K., Inagaki, M., Yabe, T., Nomura, I., and Suzuki, T. (2017) Gut Pathogens. 10.1186/s13099-017-0177-x

Construction of genome enginnering system of *Bifidobacterium*

○Tohru Suzuki, Amin Tahoun, Izumi Nomura
(Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

Key words bifidobacterium, gene knockout, probiotics, genome engineering

2S-Ca04 腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療基盤技術の創出

○福田 真嗣[1,2,3]
（[1]慶大・先端生命研, [2]JST さきがけ, [3]メタジェン）
sfukuda@sfc.keio.ac.jp

ヒトの腸内には数百種類以上でおよそ 100 兆個にもおよぶとされる腸内細菌が生息しており，これらの集団（これを腸内フローラと呼ぶ）は宿主の腸管細胞群と密接に相互作用することで，複雑な腸内生態系，すなわち「腸内エコシステム」を形成している．腸内エコシステムはヒトの健康維持に重要であることが知られているが，そのバランスが崩れると大腸癌や炎症性腸疾患といった腸そのものの疾患に加えて，糖尿病や動脈硬化などの代謝疾患，さらにはアレルギーや自己免疫疾患といった全身性疾患につながることも知られている．したがってその重要性から，腸内フローラは異種生物で構成されるわれわれの体内の「もう一つの臓器」とも捉えられるが，一方で個々の腸内細菌がどのように振る舞うことで腸内エコシステムの恒常性維持に寄与しているのか，すなわち宿主－腸内フローラ間相互作用の分子機構の詳細は不明な点が多い．われわれはこれまでに，腸内フローラの遺伝子地図と代謝動態に着目したメタボロゲノミクスを基盤とする統合オミクス解析技術を構築し，腸内フローラから産生される短鎖脂肪酸である酢酸や酪酸が，それぞれ腸管上皮細胞のバリア機能を高めて腸管感染症を予防することや，免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の分化誘導を促すことで，大腸炎を抑制することを明らかにした．他にも，便秘薬摂取による腸内環境改善が慢性腎臓病の悪化抑制に効果があることや，加齢に伴った腸内フローラの変動が宿主の肥満や耐糖能悪化につながることも明らかにした．このように腸内フローラが生体恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかとなったことから，本研究成果を社会実装する目的で，慶應義塾大学と東京工業大学とのジョイントベンチャーとして株式会社メタジェンを設立した．本発表では，「腸内デザインによる健康長寿社会」をキーワードに，科学的根拠に基づく食習慣の改善，適切なサプリメント開発や創薬など，腸内エコシステムの適切な修飾による新たな健康維持，疾患予防・治療基盤技術の創出に向けたわれわれの取り組みについて紹介する．

Development of a novel prevention and therapeutic approach targeted at intestinal environment

○Shinji Fukuda[1,2,3]
([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]JST PRESTO, [3]Metagen, Inc.)

Key words gut microbiota, omics, metabolite, metabologenomics

2S-Da01 バクテリアの硫黄代謝とシステイン発酵

○野中 源
（味の素株式会社バイオ・ファイン研究所）
gen_nonaka@ajinomoto.com

システインはジスルフィド結合を形成するタンパク質の重要な構成成分として，生体の種々の酸化還元反応を担うチオール基のドナーとして，また生体内の硫黄代謝の中心的な役割を果たす主要なメタボライトとして，様々な生理機能を持つ重要なアミノ酸である．また，食品・飼料添加物，香粧品素材，医薬品などの工業原料に広く用いられており，工業的にも重要なアミノ酸の一つである．その製法としては古くから用いられてきた人毛・羽毛など動物由来タンパク質からの抽出法のほかに，酵素法や発酵法といったバイオを用いた方法が知られている．現在コスト面では抽出法が有利と言われるが，製品の安全性や製造過程での環境への負荷を懸念する消費者の意識は高まってきており，酵素法や発酵法で作られる非動物原料由来のシステインのニーズは高まっている．多くのアミノ酸は 60 年代から 80 年代くらいまでに工業レベルでの発酵技術が確立されてきたが，システインは長年難しい発酵種の代表格として扱われ，近年ようやく本格的な工業生産が可能となった最も新しいアミノ酸発酵種の一つである．システイン発酵を難しくしている最大の要因はシステインによる宿主への毒性である．毒性が強いが故にバクテリアは細胞内のシステイン濃度（システイン合成，分解，細胞外排出）を抑えるための種々の堅牢な制御システムを備えている．これらメカニズムの全貌を解明し，制御を解除してやることがバクテリアでのシステイン発酵を成立させる肝である．まず第一の制御は，生合成経路鍵酵素のフィードバック阻害である．システイン生合成経路上にはシステインで阻害される serine acetyltransferase と中間体セリンで阻害される 3-phosphoglycerate dehydrogenase の二つの鍵酵素が存在する．これらの酵素をフィードバック阻害非感受性の改変型としておく必要がある．第二の制御は，毒性の高いシステインを速やかに細胞外に出す安全弁の働きをする排出ポンプである．こうしたシステイン排出ポンプを見出し，生産菌に導入強化することがシステインの高生産には必須である．演者らはシステイン誘導型の新規システイン排出ポンプ CefA，CefB を発見し，発酵菌への実装を行った．第三の制御は，システインの分解系である．バクテリアは，毒性の高いシステインに対処するため複数の分解系を備えている．演者らは，バクテリアのシステイン耐性において極めて重要な生理機能を有すシステイン分解酵素 CcdA，YhaM 等を見出し，これらの欠損がシステイン発酵菌に必須であることを実証した．そして最後に，硫黄代謝のマスターレギュレーター CysB による転写レベルでの制御がある．これまで知られていた CysB レギュロンの多くがシステイン生合成に関わる遺伝子群であったが，演者らは新たに硫黄代謝に関与する複数の新規レギュロンを発見，機能の解明を経てシステインの発酵菌への応用を試みてきた．見いだされた新規因子の中には硫黄源やシステイン関連物質の取り込みに関与する新規のトランスポーターが含まれた．
本講演では，演者らが近年成功させた商業ベースでのシステイン発酵生産に関わる技術やその過程で明らかとなった生理学的知見に触れながら，バクテリアのシステイン代謝・硫黄代謝機構からシステイン生産菌の育種までを紹介する．

Bacterial sulfur metabolism and fermentative production of cysteine

○Gen Nonaka
(Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals, Ajinomoto Co., Inc.)

Key words cysteine biosynthesis, cysteine fermentation, metabolic engineering, sulfur metabolism

2S-Da02 酵素と代謝デザインによる微生物生産ポリマーの物性制御～カネカ 生分解性ポリマー PHBH™ ～

○佐藤 俊輔, 小林 新吾, 有川 尚志, 青木 里奈
（（株）カネカ・Health Care Solutions Research Institute バイオテクノロジー開発研究所）
Shunsuke.sato@kaneka.co.jp

PHBH は 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸（3HHx）から成る熱可塑性のランダム共重合ポリエステルであり，植物油脂や糖質などの再生可能原料から，微生物発酵により生産される．その物性は 3HHx 組成比によって変化し，例えば 3HHx 比率が 7mol%程度の PHBH は高い結晶性，曲げ弾性率を示し，ポリプロピレン様の物性を示す．一方で 3HHx 組成 11mol%程度の PHBH は，結晶化度が低下することで 300%以上の引っ張り伸び率を示し，ポリエチレン様の軟質性を示す．このように樹脂物性を 3HHx 比率により制御可能であること，また加工性や物性に影響する分子量も制御可能であることから，PHBH は石油由来のプラスチックの代替素材として期待されている．
上述のように，PHBH の工業生産，実用化においては，微生物レベル，培養生産レベルで 3HHx 組成，及び分子量を精密制御することにより，ポリマー品質を安定化させることが極めて重要である．
我々は，ロバストな物質生産を目指し，PHBH 生産微生物である *Cupriavidus necator* における 3HHx 組成，及び分子量制御技術を開発した．以下に技術概要を示す．
１）3HHx 組成制御技術
PHBH 生産経路の中で 3HHx モノマーの供給に関する鍵酵素であるエノイル－CoA ヒドラターゼ遺伝子（*phaJ*）の発現を精密制御することで，所望の 3HHx 組成を有する PHBH の生産技術を開発した．
２）分子量制御技術
分子量制御に関しては，培養後の精製プロセス，並びに成形加工時の分子量低下を加味すると培養段階において，より高分子量の PHBH を生産することが好ましい．そこで，PHBH 分解酵素に着目し，特定の分解酵素を破壊することで，生産性や 3HHx 組成に影響を与えずに分子量を高める技術を開発した．
上記技術開発により，ロバストな工業生産技術を確立し，現在，実用化に向けたアプリケーション開発を進めている．

Regulation of material property of biodegradable polymer by designing of enzyme and metabolic pathway

○Shunsuke Sato, Shingo Kobayashi, Hisashi Arikawa, Rina Aoki
(Biotechnol., Develop., Lab., HCSRI., KANEKA Corp.)

Key words biodegradable plastic, metabolic engineering, molecular breeding, *Cupriavidus necator*

2S-Da03 壊れたら，また作れ ～耐熱性酵素を用いた *in vitro* サルベージ合成による NAD(H)の安定化～

○本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

好熱性酵素は，その優れた頑健性により有用化学品製造などのための工学的ツールとして大きな魅力を有する．演者らのグループでは複数の好熱性酵素を細胞外で組み合わせ，任意の人工代謝経路を *in vitro* で再構成する独自技術（*in vitro* 代謝工学）の開発と本法を用いた種々の有用化学品生産に取り組んでいる．本法では，まず大腸菌などの中温性汎用宿主内で好熱性酵素を発現させる．次にその細胞抽出液を熱処理に供することで宿主由来酵素を不活化・除去し，得られた粗精製酵素を触媒素子として代謝経路を組み上げる．こうして構築される人工経路は，目的物質の生産に必要な最小数の酵素反応のみから構成されるため，副反応を伴わない高収率な変換反応を可能とする．また，様々な好熱性酵素の自在な組み合わせが可能となるため，本法は原理上，あらゆる代謝産物をオンデマンドに製造できるポテンシャルを有する．演者らはこれまでの研究で，グルコースやグリセロール，コロイド化キチンなどから，乳酸，リンゴ酸，1-ブタノール等の生産に本法が利用可能であることを示してきた．
一方，好熱性酵素は，その名が示すとおり熱を好む酵素であり，多くの場合，60～100℃程度の高温域で最大活性を示す．このため好熱性酵素は，熱安定性の低い化学品の変換や生産には適さない．また，触媒に必要な補酵素が熱分解を受ける条件下では，そのパフォーマンスを十分に発揮することができない．演者らの先行研究では，特にニコチンアミド補酵素（NAD^+/NADH および $NADP^+$/NADPH）の熱分解が好熱性酵素による化学品製造技術の高効率化を妨げる主たる課題として顕在化した．この課題に対する解決策を考慮する中で，演者は以下のような着想に至った．

「*In vitro* 代謝工学の魅力のひとつは，好熱性酵素の自由な組み合わせにより，あらゆる代謝産物をオンデマンドに作り出せる点にある．そしてニコチンアミド補酵素もまた，生物により生産される代謝産物のひとつである．ならば，*in vitro* 代謝工学のスキームに則り，ニコチンアミド補酵素をその熱分解物から再合成できるのではないか？」

この着想に基づき，演者らは NAD^+を対象に，その熱分解産物を同定するとともに，得られる分解物から NAD^+を再合成するための好熱性サルベージ合成酵素群を探索した．検討の結果，NAD^+の熱分解パターンは溶液の pH によって変化し，塩基性条件下ではニコチンアミドと ADP-リボースが主たる分解物として生じることが確認された．これらの物質からの NAD^+サルベージ合成には複数とおりの経路が考えられたが，各種好熱菌ゲノムのアノテーション情報に基づく探索試験の結果，最終的に 6 段階の酵素反応による NAD^+サルベージ合成経路をデザインするに至った．サルベージ合成に必要とされる ATP の供給のため，ポリリン酸をリン酸基ドナーとした ATP 再生酵素群を組み合わせるとともに，各酵素の濃度比を実験的に最適化することによって目的のサルベージ合成経路を *in vitro* で構築した．本経路を構成する好熱性酵素群の存在下もしくは非存在下で NAD^+を pH8.0，60℃にてインキュベートしたところ，酵素非存在下における NAD^+濃度は約 6 時間で半減した一方，酵素存在下ではほぼ一定濃度の NAD^+が 15 時間に渡り保たれ続けた．また同条件下において本サルベージ合成酵素群は，還元型補酵素である NADH の見かけ上の安定化にも効果的であることが示された．
講演では，これらの研究成果の詳細とともに，本サルベージ合成酵素遺伝子群の共発現株の作成やこれを用いた有用化学品への取り組みについても紹介したい．

【参考文献】
Honda, K. et al. (2016) *In vitro* metabolic engineering for the salvage synthesis of NAD^+. Metab. Eng., 35, 114-120

If broken it is, fix it you should -Apparent stabilization of NAD(H) with thermophilic enzymes-

○Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words NAD(P)H, thermostable enzyme, *in vitro* metablic engineering

2S-Da04 自然界にない物質がないと生きられない生物をつくる―生物学的封じ込め法―

○加藤 祐輔
（農研機構・生物機能・新産業・生体物質）
kato@affrc.go.jp

生物学的封じ込めは，「人間の管理下では生きられるが，自然環境中では死ぬように，遺伝的にプログラムする技術」である．合成生物学によって作られた自然との異質の度合いが大きい生物は，自然環境中に漏出して，野放図に拡散するリスクは，これまでより大きい．そのため，実用化を迎える段階にいたって，作出された生物を，生物学的封じ込め技術によって，安全に管理しようとする研究が，注目されるようになった．近年，欧米を中心に新しい原理に基づく生物学的封じ込め法の報告が相次いでいる．
私たちは，新しい生物学的封じ込め技術として，天然には存在しないアミノ酸（非天然アミノ酸，UAA）を栄養として与えないと生きられないようにする遺伝的プログラムを開発した．この遺伝的プログラムは，２つのプラスミドの導入により，大腸菌に組み込むことができる．ひとつは，毒素遺伝子 *colE3* および翻訳開始コドン直下にアンバー終止コドン（*amb*）を挿入した抗毒素遺伝子 *1amb-ImmE3* が座乗するプラスミドである．もうひとつは，*amb* に特定の非天然アミノ酸を組み込むための，アミノアシル tRNA シンテターゼおよび tRNA が座乗するプラスミドである．人為的に UAA を与えたときのみ，抗毒素が産生され，宿主は生存・増殖できる．もし自然環境中に漏出しても，UAA はどこにも存在しないので，死滅してしまう仕組みである．以下に，この技術に込めた意図を解説する．
この封じ込め法の特徴は，第一に UAA に対する人工的栄養要求性によって，対象とする生物の生死を制御する点にある．初期の封じ込め法の開発において，さまざまな糖，アミノ酸，またはヌクレオシドなどを与えなければ死滅する微生物が作られた．自然環境中には，それらの物質の存在は限られていると思われていたが，実際には局所的に豊富にあり，組換え微生物は生き残る事例が多数報告された．この教訓から導かれたのは，理想的な封じ込め法とは「自然環境には存在しない物質がないと生きられないようにする技術」ということである．UAA は，まさに自然には存在しない物質であり，そのような思いがけない環境のニッチに組換え微生物が生き残る問題を，原理的に解決できるだろう．
第二の特徴は，プラスミドの導入のみで施せる封じ込め法であり，ゲノムの改変を必要としないことである．そのため，同じ生物種の他系統（たとえば，大腸菌においては，種々の病原性大腸菌など）に移植することが容易になる．私たちは，この封じ込め法の応用として，安全性の高い生ワクチンの作出が有望と考えており，その観点から，この特性は重要である．反面，プラスミドは水平伝播するため，組換え遺伝子の拡散を防ぐのが難しく，生物学的封じ込め回路の構築には適していない，とも考えられている．私たちは，「伝播できないプラスミド」を構築して，この問題の回避を試みている．すなわち，２つのプラスミドのうち，毒素-抗毒素遺伝子が座乗するものは，もう一方の非天然アミノ酸導入装置がなければ，抗毒素が発現せず，活性のある毒素を産生して宿主を殺すため，単独では伝播できない．同様の原理をもって，すべてのプラスミドの伝播を防ぐ仕組みを目指している．
第三の特徴は，死滅するタイミングを制御できることである．UAA に 3-ヨウ化-$_L$-チロシン（0.1 mg/ml 培地）を用いた場合，UAA 遮断した直後の 1 時間程度は増殖を続けるが，それ以降は急激に生菌数が減少する．これは，菌体内に UAA の蓄積があり，それが分解や利用によって枯渇すると死んでゆくため，と考えられる．この性質を利用して，UAA 遮断後から使用までの保留時間や，使用開始後の UAA の追加投与によって，微生物が死滅する時間を数時間単位で制御できる可能性がある．これは，初期の感染過程を再現しながら発病を防ぐ，プログラムされた弱毒性の粘膜ワクチンの開発に，特に有効と考えられる．
本法の欠点のひとつは，非許容条件でもなお生存する「エスケーパー」の発生確率の高さである．ゲノム遺伝子の操作なしに，プラスミドのみで構成される封じ込め法の制限のひとつは「能動的封じ込め」しか採用できないことである．宿主の生存に必須な遺伝子を破壊して許容条件においてその機能を人為的に相補する「受動的封じ込め」に対して，「能動的封じ込め」とは非許容条件において毒素などの宿主を障害する遺伝子が発現させる遺伝的プログラムである．能動的封じ込めの欠点として，受動的封じ込めと比較してエスケーパーの発生率が高いことがあげられる．本法の場合，その発生原因のひとつは，UAA による翻訳スイッチの厳密さの不足にあった．最近，正のフィードバック遺伝回路を付加して，より厳密性を高めた翻訳スイッチを開発して適用したところ，エスケーパーの発生確率を著しく抑制することができた．さらに，複数の毒素-抗毒素遺伝子を用いた封じ込め回路の多重化により，エスケーパーの発生を相乗的に抑えることを試みている．

謝辞：本研究は JSPS 科研費 JP25660281 および JP16K08121 の助成を受けたものです．

Synthetic auxotrophy for unnatural compounds: a novel biological containment system.

○Yusuke Kato
(Molec. Biomimetics Res. Unit, Div. Biotechnol., Inst. Agrobiol. Sci., NARO)

Key words biological containment, synthetic biology, unnatural amino acids, *Escherichia coli*

2S-Da05 リン代謝経路の改変による微生物の選択的培養と生物学的封じ込め

○廣田 隆一[1,2], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構・先端的低炭素化技術開発)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

微生物を用いた物質生産は，常温・常圧の温和な条件で行われる環境調和型のプロセスである．そのなかでも安価なバイオマスを原料とする発酵生産や，有用微細藻類による光エネルギーを用いた二酸化炭素からの物質生産は，サステナブル社会構築という目的に合致したバイオならではのプロセスである．微生物の産業利用では，目的とする微生物をいかに効率良く培養するかが高い生産性を得るための重要な課題となる．しかし実用レベルでの培養では，生産低下を引き起こす雑菌混入の抑止に大変な労力とコストを要する．微生物培養は，分子レベルの学問分野が大きく進展している昨今，古典的な技術と思われがちであるが，効率化のために今なお改良が求められる重要なプロセスである．
一方，遺伝子組換え技術は，目的物質の生成量を増加させたり，新規な物質を作る能力を宿主微生物に付与する事で生産性を飛躍的に高めることを可能にし，いまやバイオテクノロジーを支える根幹技術となっている．ゲノム編集に代表される近年の遺伝子工学技術の発展は，より高度な分子育種株の作出を可能にし，その利用分野はものつくりの現場のみならず，環境，医療，農業分野など様々な局面が想定されている．しかし，遺伝子組換え微生物の産業利用は，生物多様性の保全に対するリスクの点からカルタヘナ法による使用範囲の制限を受ける．ところが高度な組換え体の構築が技術的に可能になっている現在，この規制の枠組みではバイオのポテンシャルを十分に発揮できないという現状が突きつけられ始めている．生物学的封じ込めは，1970 年代に DNA 組み換え技術が開発された時期に作られた概念であり，宿主微生物が環境中では生存できない性質をあらかじめ与えておくことで，組換え体の拡散を防ぐ方策である．この概念が作り出された当初の方法論では，効果が不十分であり安全性の確保という点では現実的ではなかった．しかし近年，従来のものに比べて効果が飛躍的に高められた優れた方法が開発されてきており，組換え体利用の安全性を高める技術として再び注目を集め始めている．
リンは ATP や核酸などの成分として生物の必須元素であり，リンが制限されると生物は増殖できなくなる．演者らはこれまでにバクテリアのリン代謝機能の研究を展開してきた過程で，亜リン酸（HPO_3^{2-}）などの酸化数の小さなリンをもつリン化合物を利用するバクテリアの機能に着目していた．通常の生物にとって，亜リン酸は利用することができない，いわば「不活性な」リン源であるため，亜リン酸をリン酸（PO_4^{3-}）に変換する亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）を導入することで，宿主生物に亜リン酸の利用能力を与えることができる．これにより，亜リン酸をリン源とする培養環境では目的生物が増殖における優位性を獲得し，選択的に増殖できるようになる．さらに，リン酸輸送系の制限を加えれば，亜リン酸のみに生育を依存する表現型を創り出すことも可能である．亜リン酸は環境中では得られないため，この概念は生物学的封じ込めとして利用できる．これを実現するためには，亜リン酸だけを取り込む性質を示す輸送体の存在が必須であったが，様々なリン輸送系の解析によって我々は幸運にも *Pseudomonas* 属細菌由来の HtxBCDE がそのような性質を有することを発見した．すなわち，リンの代謝系の改変により，全く新しい概念に基づいた微生物の選択的培養そして生物学的封じ込めの方法論を作ることが可能であった．いずれも目的微生物の選択的な培養そして高効率生産を可能にする「ロバスト」なプロセス構築に貢献し，前述のような現在のバイオテクノロジーが抱える課題の解決に貢献できる技術になると期待される．本講演ではこれらの技術確立に至った研究，そして課題と今後の展望について議論したい．
本研究は科学技術振興機構先端的低炭素化技術開発（JST-ALCA)支援のもと行われた．

Engineered phosphorous metabolic system for the selective cultivation and biological containment of microorganisms

○Ryuichi Hirota[1,2], Akio Kuroda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

Key words phosphorous, metabolic pathway modification, biological containment, transporter

2S-Bp01 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Implementing cell-free synthesis systems for the synthesis and analysis of industrial enzymes

Kyung-Ho Lee, ○Dong-Myung Kim
(Dept. Chem. Eng. Appl. Chem., Chungnam Nat'l Univ., Korea)
dmkim@cnu.ac.kr

While the expression and screening of genetic libraries have traditionally been performed using transformed bacterial cells, cell-based expression/screening methods bear intrinsic limitations in numerous dimensions. Cell-based screening protocols should be designed within the boundaries of physiological conditions that can maintain cell viability, including that the target enzymes and substrates should not interfere with normal metabolism of the cells. In addition, the substrates for enzyme screening should be chosen from a narrow range of candidates that are transportable across the cell membrane. Difficulties in soluble expression and quantitative interpretation of screening results are also frequently met during cell-based expression/screening procedures. In this work, we discuss a cell-free protein synthesis system as an alternative route to addressing these limitations associated with conventional cell-based methods. Based on our results and experience with a number of enzymes having indusrial implications, we highlight the advantage and perspective of the cell-free approach and also discuss how the cell-free platform should be evolved to be routinely used for the discovery and engineering of enzymes.

Implementing cell-free synthesis systems for the synthesis and analysis of industrial enzymes

Kyung-Ho Lee, ○Dong-Myung Kim
(Dept. Chem. Eng. Appl. Chem., Chungnam Nat'l Univ., Korea)

Key words enzyme, screening, protein engineering, protein expression

2S-Bp02 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Designer nanoscale enzyme complexes for application to advanced biotechnology tools

○Sung Ok Han
(Dept. Biotechnol., Korea Univ.)
samhan@korea.ac.kr

The design of enzyme and microbe is a useful strategy as tools in whole-cell biocatalyst systems for C1, 5 and 6 biorefinery and has drawn considerable attention as an attractive strategy for bioprocess applications. Prior to fermentative production of valuable biochemical product from the C1, 5 and 6 based carbon sources by microbes, the lignocellulosic materials and hydrocarbons should be absorbed and fixed by available state for use. In this study, we were assembled the functional enzyme complexes containing a recombinant scaffolding protein from *Clostridium cellulovorans* and various chimeric enzymes such as endoglucanase CelE, laccase CueO, xylanase XynB in several industrial strains such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* and *Corynebacterium glutamicum* for utilizing of lignocellulosic biomass into valuable products including ethanol and amino acids. Moreover, functional enzyme complexes were displayed on the cell surface of *C. glutamicum* to directly convert natural biomass to derived reducing sugars by synergistic hydrolysis effect. Carbon monoxide (CO) gas was successfully efficiently converted from CO to CO2 by functional enzyme complexes on the cell surface of *Ralstonia eutropha* containing carbon monoxide dehydrogenase (CODH) and carbon monoxide sensing heme protein (CooA) with enhanced CO binding affinity. These results suggest that the complexed system may be a promising strategy for C1, 5 and 6 biorefinery as biological tools for production of high value biochemicals such as biofuel and bioplastics. To facilitate the widespread use of biological degradation and hydrocarbon recycling, it is necessary to develop new enzymes and novel microbes that are both effective and economical.

Designer nanoscale enzyme complexes for application to advanced biotechnology tools
○Sung Ok Han
(Dept. Biotechnol., Korea Univ.)

Key words enzymatic conversion, metabolic engineering, microbe, bioresources

2S-Bp03 New molecular tools for selective determination of amino acids in biological samples

○Masafumi Kameya
(ELSI, Tokyo Tech.)
mkameya@elsi.jp

Amino acids are key metabolites in our body, and the concentration of each amino acid can be a useful biomarker to diagnose various diseases and inborn errors of metabolism. In addition to this medical significance, determination of amino acids is beneficial also in industrial fields such as food manufacturing.
Several enzymatic assays have been developed by employing L-amino acid oxidases and L-amino acid dehydrogenases. However, enzymes in these families often show broad substrate specificity, which is a feature unsuitable for constructing selective assays. One of the reason for the poor selectivity is the catalyzed reaction; these enzymes react with amino acids at the amino group, a common structure shared among all amino acids. Another reason is that these enzymes physiologically serve in H2O2 formation or amino acid degradation as a nutrient source, for which purposes a broad substrate specificity is advantagous.
To overcome these problems, we have developed selective enzymatic assays based on the following strategies (1-3). In addition, a selective and sensitive bioassay has been developed by using microbial whole-cells as a biocatalyst of protein synthesis from amino acids (4).

(1) L-Amino acid oxidases from biosynthetic pathways
It was expected that L-amino acid oxidases involved in a biosynthetic pathway exhibit higher substrate specificity than those in H2O2 formation or amino acid catabolism. Trp-specific oxidases were obtained from biosynthetic pathways for bis-indole antibiotics. The first reaction of these pathways is L-Trp oxidation, and they prevail among a few species of bacteria including *Streptomyces* sp. TP-A0274 and *Chromobacterium violaceum* for staurosporine and violacein biosyntheses, respectively. The obtained oxidases showed unusually high substrate specificity, and a selective assay for L-Trp was developed.

(2) Selective enzymes reacting with the side chain of amino acid
Enzymes reacting with amino acids at their side chain are expected to exhibit high substrate specificity. Novel enzymatic assays for L-Met, citrulline, and Arg were developed by using adenosylmethionine synthetase, argininosuccinate synthetase, and Arg deiminase. To construct robust and selective assays, these enzymes were coupled to a pyrophosphate detection system as a shared platform.

(3) Aminoacyl-tRNA synthetase (AARS)
AARS is an essential enzyme for protein translation in all living cells, transferring aminoacyl-moiety to the cognate tRNA. AARS is known to exhibit accurate and selective recognition mechanisms for their cognate amino acid to ensure high fidelity of protein synthesis from the genetic code. We succeeded to develop selective assays by coupling AARS, the pyrophosphate detection system, and an AARS regeneration system.

(4) Translation-dependent bioassay
A rapid, selective, and sensitive bioassay for amino acids was developed by using not enzymes but whole-cells of auxotrophic microbes, to which a gene of reporter proteins such as luciferase and GFP was introduced. Translation of the reporter protein was observed immediately after mixing assay solutions and analytes in response to the concentration of the target amino acid. The results demonstrated that the whole-cells system serves as an excellent biosensor allowing for a rapid and selective quantification of a wide range of amino acids.

Kameya, M., Onaka, H. & Asano, Y. (2013) Selective tryptophan determination using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis. Anal. Biochem. 438, 124-132.
Kameya, M., Himi, M. & Asano, Y. (2014) Rapid and selective enzymatic assay for L-methionine based on a pyrophosphate detection system. Anal. Biochem. 447, 33-38.
Kameya, M. & Asano, Y. (2014) Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection. Enzyme Microb. Technol. 57, 36-41.
Kameya, M. & Asano, Y. (2017) Translation-dependent bioassay for amino acid quantification using auxotrophic microbes as biocatalysts of protein synthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 2523-2531.

New molecular tools for selective determination of amino acids in biological samples
○Masafumi Kameya
(ELSI, Tokyo Tech.)

Key words amino acid, enzymatic assay, bioassay, protein translation

2S-Bp04 Development of INTMSAlign software to design artificial proteins and assign enzymes

○Shogo Nakano[1,3], Sohei Ito[1,3], Yasuhisa Asano[2,3]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [3]ERATO, JST)
snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp

Many of protein sequences are being registered to database, such as PubMed. Development of new methods is required to mine useful information, such as highly stable and active enzymes, from endlessly expanding database. Here, multiple sequence alignment (MSA) method would be suitable to mine and analyze the large amount of protein sequence data; and we are developing new MSA method, INTMSAlign (1).

In this study, we will introduce the application examples of INTMSAlign toward protein engineering: in silico enzyme screening and protein design. For the screening, nine of L-threonine dehydrogenase which belongs to short-chain dehydrogenase/reductase family (SDR-TDH) and two L-arginine oxidases could be obtained in the total 12 of expressed genes which were screened by the software; the positive rate of the screening was about 92 % (the false positive rate was about 8%). Six of 11 protein sequences (>50%) are hard to assign only applying Blastp search, such as baseline method of which sequences are selected from top to bottom continuously with defined number. For the protein design, we succeeded in designing artificial SDR-TDH, FcTDH, by applying full consensus protein design method to the curated SDR-TDH sequence library. The library was generated by INTMSAlign and consists of total 87 sequences. FcTDH bears > 3-fold higher enzyme efficiency (k_{cat}/K_m) and > 20℃ higher T_m value than native SDR-TDH from *Cupriavidus necator* (2). Design of other proteins is under progress, such as design of single domain antibody and membrane binding enzymes.

Taken together, we can show the usefulness of INTMSAlign to the screening and protein engineering. In addition, the software could also apply to assign aggregation hotspots based on HiSol score which is calculated utilizing INTMSAlign output file. The software only requires protein sequence data as input data; thus, this can apply not only to enzymes but also other proteins, such as membrane proteins of which no crystal structure is available.

[Reference]
(1). Shogo Nakano and Yasuhisa Asano, "Protein evolution analysis of S-hydroxynitrile lyase by complete sequence design utilizing the INTMSAlign software", Scientific reports, 5, 8193, (doi: 10.1038/srep08193)
(2). Yasuhisa Asano, Shogo Nakano, Sohei Ito, Tomoharu Motoyama, Remi Matsunaga, Japanese Patent Application No. 2016-234857

2S-Bp05 Structural informatics for gene expression of industrial enzymes with correct folding

○Daisuke Matsui[1], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)
d-matsui@pu-toyama.ac.jp

Enzymes catalyze various reactions that are difficult to achieve by chemical catalysis. Currently, recombinant proteins can be obtained by utilizing heterologous expression systems. Among these, the prokaryotic expression system with *Escherichia coli* is widely utilized because it is easily handled and can produce high levels of proteins. Despite these advantages of the *E. coli* expression system, it also has several drawbacks. In particular, the formation of inclusion bodies often reduces the yield of target proteins in the soluble fraction.

We discovered a following phenomenon regarding the soluble expression of a plant enzyme, hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* (*Me*HNL), in *E. coli*. When the enzyme was subjected to random mutagenesis, a single point mutation H103L and mutations with alterations at three positions (Lys-Pro mutations at positions 176, 199 and 224) were found to cause their total solubility in *E. coli* even when grown at 37℃[1]. If a relationship between soluble expression and mutation points can be revealed, it will become far easier to generate mutants for correctly folded expression in heterologous hosts, without the current trial and error methods. Therefore, we developed new methods to predict hot-spots to solubilize proteins without crystal structures.

We first investigated the solubilization of the following four insoluble enzymes using the *E. coli* expression in detail: L-arginine decarboxylase from the plant *Arabidopsis thaliana* (*At*ADC), mandelonitrile oxidase (*Ch*MOX) from the millipede *Chamberlinius hualienensis*, L-glutamate dehydrogenase (*Dm*GDH) and L-ornithine decarboxylase (*Dm*ODC) from the insect *Drosophila melanogaster*. Libraries of 12,000 clones from each enzyme were obtained by random mutagenesis. Then, the screening strategy using color development methods[2] was used to obtain their soluble forms associated with the enzyme activities. When the hydrophobic residues Val455 in *Ch*MOX and Val174 in *Dm*GDH were substituted to the hydrophilic amino acids, the variants were expressed as a soluble protein. When the hydrophilic residues Lys441 in *At*ADC and Lys117 in *Dm*ODC were substituted to the hydrophobic amino acids, the variants were also expressed as a soluble protein. Our results indicate that the hydrophobicity of the residues affects the structure formation in heterologous production.

Using the different perspectives of sequence conservation and hydropathy contradiction, we also developed a method to assign the hot-spots using INTMSAlign[3], a software program for assigning consensus residues. The prediction of hot-spots in the target proteins is successfully achieved in regard to the HiSol score, which is calculated using the output file of INTMSAlign and the hydropathy index. We first confirmed whether the score can assign aggregation hot-spots with reference to the study of *Me*HNL. The HiSol score of the 103rd residue had the highest negative value in the 259 total residues of *Me*HNL. The hot-spots in the target proteins are successfully predicted using the HiSol score.

We developed new methods to assign aggregation hot-spots and improve protein solubility based on the hydropathy contradiction. The advantages of this approach were as follows: the hydropathy contradiction can be applied to the assignment of both mutation sites and candidate amino acids for the mutation utilizing only the primary sequence data. Our methods for hot-spot assignment are applicable to solubilizing various proteins.

[1]Y. Asano, et al, *Protein. Eng. Des. Sel.*, 24, 607-16 (2011)., [2]D. Matsui & Y. Asano, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 1473-1480 (2015)., [3]S. Nakano & Y. Asano, *Sci. Rep.*, 5, 8193 (2015)

Development of INTMSAlign software to design artificial proteins and assign enzymes

○Shogo Nakano[1,3], Sohei Ito[1,3], Yasuhisa Asano[2,3]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [3]ERATO, JST)

Key words protein engineering, *in silico* enzyme screening, artificial protein

Structural informatics for gene expression of industrial enzymes with correct folding

○Daisuke Matsui[1], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

Key words amino acid substitution, aggregation hot-spot, hydrophobicity, solubilization

2S-Cp01 ビッグデータに基づくヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析

○西嶋 傑[1,2,3], 須田 亙[2,3,4,5], 大島 健志朗[2], 服部 正平[2,3,4]
([1]産総研・CBBD-OIL, [2]東大院・新領域, [3]早大・先進理工, [4]理研・IMS, [5]慶応大)
nishijima.suguru@aist.go.jp

ヒトの腸内には数 100 種類の細菌が生息しており，それら腸内細菌叢はヒトの健康と密接に関わる．例えば，宿主が消化できない食物繊維の分解による栄養素の供給，病原菌の感染に対する抵抗，Th17 や Treg 細胞を始めとした免疫細胞の分化や成熟化など，ヒト全身の恒常性に関わることが知られている．近年，シークエンス技術の著しい発展により，環境中の微生物 DNA を網羅的に決定するメタゲノム解析が可能となった．この手法により菌種の分離・培養過程を経ずに，腸内細菌叢を構成する菌種やそれらの遺伝子機能・代謝経路の網羅的な評価を行なうことができる．既に世界各国の健常者・疾患患者を対象に，数百～千サンプルの解析を行った研究例が続々と報告され，データベースにそれらのビッグデータが蓄積されている．
しかし，ヒト腸内細菌叢には宿主の食事や生活習慣，加えて遺伝的背景が関わることが知られるものの，日本人の腸内細菌叢の菌種・機能的特徴は明らかでない．そこで我々は 106 人の日本人被験者を対象に腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い，それらを既に公開されている 11 カ国，約 750 被験者のメタゲノムデータと比較した．その結果，特に日本人の腸内細菌叢には *Bifidobacterium* と *Blautia* が豊富である一方， *Methanobrevibacter* が極めて少ないことが明らかとなった．加えて興味深いことに，日本人の腸内細菌叢には腸内の水素ガスを代謝する経路として酢酸生成が豊富な一方，メタン生成が欠乏していることが判明した．
また，上記の比較解析の中で，国間の腸内細菌叢の多様性は予想外なことに，各国の食事データだけでは説明がつかないことが明らかとなった．そこで我々は食事以外にその国の腸内細菌叢の構造と関わる因子を探索した結果，各国の抗菌薬使用量がその国の被験者の腸内細菌叢と統計的有意な関連を示すことを見出した．特に，ヒトに使用している総抗菌薬使用量が多くの *Bacteroides* 属の菌種と正の相関を示した．また，*Bacteroides* 属を始めとする抗菌薬使用量と正の相関を示す菌種の多くは，幅広い種類の抗菌薬耐性に関わる RND（Resistant-Nodulation-Division）排出遺伝子をコードしていることが判明した．
以上のように，年々増加を続けるヒト腸内細菌叢のビッグデータをうまく利用いることで，今までに無い視点から腸内細菌叢の生態や機能，それらと宿主の健康や疾患との関わりを解明することができる．

Metagenomic analysis of the human gut microbiome

○Suguru Nishijima[1,2,3], Wataru Suda[2,3,4,5], Kenshiro Oshima[2], Masahira Hattori[2,3,4]
([1]Comp. Bio Big-Data Open Inno. Lab., AIST, [2]Grad. School of Front. Sci., The Univ. of Tokyo, [3]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [4]Integ. Med. Sci., RIKEN, [5]Keio Univ.)

Key words microbime, metagenome, bioinformatics, antibiotics

2S-Cp02 Big data analysis on the comparative metagenomics from the Red sea

○Katsuhiko Mineta
(CBRC/KAUST)
katsuhiko.mineta@kaust.edu.sa

Metagenomics is an emerging approach to provides a large amount of sequence data from the organisms in the environment, together with various environmental metadata. Thus, a metagenomic approach is one of the resources for the big data in the life science. For the marine environment, metagenomics is a promising and powerful approach to study the microbial community for understanding their ecosystem, environmental/evolutionary adaptation and diversity, comprehensively. In this study, we focus on the Red sea environment as the Red Sea has several unique environmental features such as high salinity, high temperature, and low nutrition. These features are characteristic of harsh environments that could drive the evolution of the extraordinary microbial community and potentially provide genetic resources for the pharmaceutical and bio-industrial applications. However, little is known about the dynamics of the community structure, the functional gene content, and evolutionary and environmental background of the organisms in the Red Sea environment. To better characterize the dynamics and variety of the gene content and its microbial community, we are conducting a time-series comparative metagenomics in the Red Sea. So far, more than 400 metagenome samples were collected from seawater and sediment on a monthly basis. We are conducting the whole-genome shotgun metagenomics so that we can infer the functional diversity as well as the diversity in the microbial community. In this presentation, we will provide an overview of our Red Sea metagenome project and technical details on our analyses to deal with the big data from the metagenomes.

Big data analysis on the comparative metagenomics from the Red sea

○Katsuhiko Mineta
(CBRC/KAUST)

Key words metagenomic libraries, marine environment, microbial diversity

2S-Cp03 微生物を用いた高機能品生産技術の開発

○久原 哲
（九州大学）
kuhara@grt.kyushu-u.ac.jp

近年，バイオテクノロジーの基盤技術の革新が著しく，より低コストで膨大な配列を産生できる次々世代型 DNA シークエンサーの技術，遺伝子操作では，狙った配列を編集できるゲノム編集技術等が利用の可能となってきている．これにより生物の機能を遺伝子レベルで認識・利用することで，新たな材料等を製造できる世界が開かれつつある．
また，蓄積された膨大な塩基配列情報等を解析するための情報解析技術も発展しており，生物情報を対象とした解析ソフトウエアー等も整備されつつある．最近ではディープラーニング等の機械学習技術が生物情報等の解析にも適用されつつある．これらの技術革新を融合することによって，(1)生物の情報を網羅的に取得，(2)取得した情報を解析し，得たい生物機能を最適設計，(3) 設計した生物機能をゲノム改変等により実現する，という一連のアプローチが可能になりつつある．このことは，これまで利用し得なかった“潜在的な生物機能”を効率的に引き出し，生物機能を狙ったとおり最適化できるポテンシャルを持つだけでなく，他の生物が持つ有用機能をより優位な生物に導入し，有用物質等を容易に生産できる可能性を示している．
産業分野においても，バイオテクノロジーの利用は加速してきており，この 10 年余りでバイオ市場規模は約 2 倍に拡大してきており，バイオ経済（Bioeconomy）という概念が国際的に提唱されている．OECD の報告書では，2030 年のバイオ産業市場は全 GDP の 2.7%（約 200 兆円規模）に拡大し，バイオエコノミーとして大きな市場を形成すると予測している．特に，今後世界が直面する人口増加や資源枯渇などの諸問題に対する解決策として，バイオテクノロジーの更なる産業利用，特に工業分野や農業分野での利用が世界経済を大きく牽引すると期待されている．
この状況に対して，NEDO では，平成 28 年度から「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」プロジェクトを開始している．このプロジェクトでは，植物や微生物の細胞が持つ物質生産能力を最大限に引き出した“スマートセル”を作り出し，従来合成法では生産が難しい有用物質の創製，生産プロセスの低コスト化や省エネ化を実現することを目的としている．
まず，NEDO は植物を対象として，CRISPR／Cas 等の既存の海外技術に依存しない国産ゲノム編集技術や，物質生成を決定する遺伝子や栽培・生育環境の制御技術開発を行います．今回開発する技術は，植物に遺伝子レベルでアプローチすることで，短期間かつ高精度で望ましい植物を作り出すための基盤技術です．また，植物に比べて遺伝子解明が進む微生物については，近年，次世代シーケンサーの開発によって，ムーアの法則をはるかに上回るスピードでゲノム解析のコストが下がったことで，生物情報が急速に蓄積されている微生物を対象とした多様な生物情報から，近年進展著しい IT／AI 技術を駆使し，物質生産機能を最大限に引き出した細胞“スマートセル”を高速に設計可能とする新規の情報解析システムを開発する計画です．
本プロジェクトでは，国立大学法人神戸大学と国立研究開発法人産業技術総合研究所を拠点とした全 19 機関による研究チームを中心として，参画する企業や大学が有する微生物から網羅的かつ体系的に取得した DNA，mRNA，タンパク質，代謝物等のデータをビッグデータ化し，機械学習等の計算科学手法を用いて，遺伝子発現の制御ネットワークモデルや代謝経路の最適化モデルを開発します．これら情報解析技術と長鎖 DNA 合成技術，計測・評価技術を統合し，世界的に競争力のある微生物育種技術を確立します．

Development of Production Techniques for Highly Functional Biomaterials Using Smart Cells of Microorganisms

○Satoru Kuhara
(Kyushu University)

Key words Smart cell industry, Bigdata, Bioeconomy, Metabolic pathway design

2S-Cp04 医療におけるビッグデータ・人工知能の可能性

○奥野 恭史
（京大院・医）
okuno.yasushi.4c@kyoto-u.ac.jp

スーパーコンピュータなど最近のコンピュータの演算能力の向上は著しく，実験科学，理論科学に次ぐサイエンスとして「シミュレーション科学」と「ビッグデータ科学」の重要性が急速に高まっている．医療分野では，近年の計測・観測機器，ICT 技術の著しい進展にともない，ビッグデータ時代に突入したと言われ，パーソナルゲノムなどのビッグデータ解析手法の研究開発が急務とされている．特に臨床医学ではビッグデータをリアルワールドデータと呼び，規格化された従来の観察研究とは異なり，実臨床の実態に迫ることが可能な新しい臨床研究のアプローチとしてビッグデータ解析が注目されている．一方，我が国では 2012 年に始動したスーパーコンピュータ「京」に続き，2021 年完成予定の次期スパコン・ポスト「京」の開発もスタートした．さらには，人工知能研究の強化も検討されており，今後，スーパーコンピューティング技術やビッグデータ解析技術，人工知能技術が，我が国の科学と産業の発展を加速するキーテクノロジーとなることは言うまでもない．本講演では，スパコン「京」を用いた創薬計算や京大病院がんセンターにおける実臨床データ解析を例にスパコン・ビッグデータの医療・創薬における可能性について紹介する．

Possibility of big data / artificial intelligence in medicine

○Yasushi Okuno
(Grad. Sch. of Medicine, Kyoto University)

Key words genome

2S-Dp01 Cell Chip to detect and control cellular metabolic state based on spectroelectrochemical method

○Jeong-Woo Choi[1,2]
([1]Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., [2]Dept. Biomedical Eng., Sogang Univ.)
jwchoi@sogang.ac.kr

Nanobioelecronic devices have emerged as a breakthrough with huge potentiality to generate new concepts and technologies for the development of new functional electronic devices. Major challenges in nanobioelectronics include the miniaturization, and various new functions implemented in biomaterial. Various biomemory devices and bioprocessing device based on bio-hybrid materials have been developed. Cell-based nanobiolectronic device has been developed to control intracellular state by electron. Novel cell chip based on nanopatterned array and nanoparticle was proposed to analyze and control cellular metabolic state with spectroelectrochemical detection method using surface enhanced Raman scattering (SERS) and linear sweep voltammetry (LSV). The proposed techniques for cell chip can be applied to fabricate the organ-on-a chip, and control and monitor intracellular metabolic state. By the integration of neural cell chip with bioprocessing device the cell-based nanobiolectronic device and brain-on-a chip with various functions will be realized in future.

Acknowledgement: This research was supported Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2016R1A6A1A03012845).

References

1. J. -W. Choi, et al., Adv. Mater. 27, 6356 (2015), 26, 910 (2014), 22, 510 (2010)
2. J. -W. Choi, et al., ACS Nano 9, 6675 (2015), 9, 3780 (2015)
3. J. -W. Choi, et al., Adv. Funct. Mater. 24, 1781 (2014)
4. J. -W. Choi, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 52, 8337 (2013)
5. J. -W. Choi, et al., Biomaterials 75, 250 (2016), 40, 80 (2015), 34, 8660 (2013)
6. S.J. Park, J.-W. Choi, K.K. Parker, et al., Science, 353, 158 (2016)

2S-Dp02 Semiconductor-based biosensing technology for *in vitro* diagnostics

○Toshiya Sakata
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)
sakata@biofet.t.u-tokyo.ac.jp

In this study, we report a biosensing method to analyze and monitor simply and easily biological phenomena such as DNA recognition events, antigen-antibody reaction and cell functions in vitro by use of a semiconductor device. As the most important point, we focus on a direct detection of ions or ionized molecules with charges, because most biological phenomena are related to ionic behaviors such as sodium or potassium ions through ion channel at cell membrane resulted from cell-cell communications, and biomolecules such as DNA molecules have intrinsic molecular charges. That is, the principle of semiconductor-based biosensing device contributes to directly detect biomolecular charges. Thus, the platform based on a semiconductor-based biosensor is suitable for a label-free and noninvasive biosensing detection device in the field of in vitro diagnosis (IVD).

Cell Chip to detect and control cellular metabolic state based on spectroelectrochemical method

○Jeong-Woo Choi[1,2]
([1]Dept. Chem. Biomol. Eng., Sogang Univ., [2]Dept. Biomedical Eng., Sogang Univ.)

Key words Cell chip, Nanobioelectronic device, Spectroelectrochemical method

Semiconductor-based biosensing technology for *in vitro* diagnostics

○Toshiya Sakata
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words biosensor

2S-Dp03 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Ultrafine separation of biological nano particles

○Jong Wook Hong[1,2]
([1]Dept. Bionano Technology, Grad. Sch., Hanyang University, Korea, [2]Dept. of Bionano Engineering, Hanyang University)
jwh@hanyang.ac.kr

Extracellular vesicles (EVs) are the cell-secreted nano- and micro-sized particles consisted of lipid bilayer containing nucleic acids and proteins for diagnosis and therapeutic applications. The inherent complexity of EVs is a source of heterogeneity in various potential applications of the biological nanometer scale vesicles including analysis. To diminish heterogeneity, EV should be isolated and separated according to their sizes and cargos. However, current technologies do not meet the requirements. Here, we present novel precise separation systems for noninvasive and continuous separation of EVs based on their sizes without any recognizable damages. We separated and observed distinct size and morphological differences of 30 to 100 nm of exosomes and apoptotic bodies through TEM analysis. Indeed, we confirmed the biological moiety variations through immunoblotting with noninvasively separated EVs opening new windows in study and application of the biological nanoparticles. The present systems and methodology have great potential revolutionize molecular bioprocess and future medicine.

2S-Dp04 Plastic antibody-based sensing for biomarker proteins

○Toshifumi Takeuchi
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)
takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

Protein recognition polymeric materials have been recognized as plastic antibodies, which could become to be substitutes for natural antibodies. In order to achieve high binding activity comparable to natural antibody, it is important to design and synthesize well-defined binding cavities with nonspecific adsorption-free for off-target proteins.

We prepared these plastic antibodies by molecular imprinting, where the template-induced specific recognition sites can be formed, in order to achieve molecular recognition in specific binding cavities [1]. Molecularly imprinted polymers (MIPs) are generally prepared by the co-polymerization of a comonomer(s) and a crosslinking agent(s) in the presence of functional monomer-template molecule complexes formed by either covalent or noncovalent interactions, where the template molecule is either the target molecule or its derivative. After polymerization, the template molecule is removed resulting in molecularly imprinted cavities complementary in shape, size, and functional group alignment suitable for the rebinding of the target molecule or its structurally related derivatives.

Recently, we proposed the idea of post-imprinting modifications (PIMs), which was inspired by post-translational modifications (PTMs) of proteins in order to achieve diversity of functionality by attaching functional molecules other than amino acids to the proteins themselves to yield more mature proteins. Similar to PTMs, PIMs enhanced the functionality of MIPs in a variety of ways, specifically by forming cofactor-coupled molecularly imprinted cavities where prosthetic groups are introduced into these cavities either covalently or non-covalently to improve binding activity [2-11]. This modification can help to achieve the transformation of functional groups, site-directed introduction of additional functions such as on/off switching, signaling, catalytic functions, and other such desirable features. In this presentation, recent development of PIM-based MIPs and their applications to sensing materials for biomarker proteins will be discussed.

REFERENCES
[1] Takeuchi, T., et al. Chromatography 2014, 35, 139-145 (open access).
[2] Horikawa, R., et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 13023.
[3] Kuwahara, A, et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 12765.
[4] Sunayama, H., et al. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014, 6, 20003.
[5] Sunayama, H., et al. Chem. Commun. 2014, 50, 1347.
[6] Suga, Y. Chem. Commun. 2013 49, 8450.
[7] Taguchi, Y., et al. Langmuir 2012, 28, 7083.
[8] Sunayama, H., et al. Biosens. Bioelectron. 2010, 26, 458
[9] Takeda, K., et al. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 8833.
[10] Takeuchi, T., et al. Org. Biomol. Chem. 2006, 4, 565.
[11] Yane, T., et al. Org. Biomol. Chem. 2006, 4, 4469.

Ultrafine separation of biological nano particles

○Jong Wook Hong[1,2]
([1]Dept. Bionano Technology, Grad. Sch., Hanyang University, Korea, [2]Dept. of Bionano Engineering, Hanyang University)

Key words nanoparticles, ultra fine separation, continuous separation, extracellular vesicles

Plastic antibody-based sensing for biomarker proteins

○Toshifumi Takeuchi
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words molecular imprinting, molecular recognition, plastic antibody, sensor

2S-Dp05 〈招待講演（韓国生物工学会）〉

Study on nature-inspired nano structure based cell-surface interactions for antimicrobial activities

○Donghyun Lee[1], Hyuneui Lim[2]
([1]Department of Biomedical Engineering, School of Integrative Engineering, Chung-Ang University, Korea, [2]Department of Nature-Inspired Nanoconvergence Systems, Korea Institute of Machinery and Materials, Korea)
dhlee@cau.ac.kr

Bacteria based biofilm formation is known to be causes of many infections including diseases in plants, animals and humans as such is the case in infection of orthopedic implants. These overwhelming bacterial infections and emergence of drug resistant bacterial strains necessitate developing new approaches to kill those bacterial cells with higher efficiency. In lieu of traditional chemical drug coating based methods, we imitated the natural mechanism of using nano-pillar textured surfaces that mechanically disrupt outer cell membrane of bacterial cells, resulting in bacterial cell death. We have fabricated bactericidal nano-pillars using quartz substrate via nanosphere lithography, varying sharpness and height of the pillars. Our results exhibit that nano-pillars with 300nm height and 1nm diameter lead to maximum bactericidal activity, killing ~27000 and ~38000 cells per cm-2min^{-1} of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa respectively. The contact angle measurement and light reflectance patterns confirmed the superhydrophilic and antireflective nature of the developed nano-pillar textured surfaces, which makes the surface suitable for applications related to optical devices. Thus our newly designed nano-pillar textured surfaces can be used to develop antibacterial optical devices such as contact lenses, optical glasses, endoscopic devices, and microscopic slides and lenses.

2S-Dp06 BEAMing Droplet Microfluidics for Liquid Biopsy

○Ayato Tagawa
(Sysmex Corp.)
Tagawa.Ayato@sysmex.co.jp

The importance of companion diagnostics (CDx), in which diagnosis and therapy are conjoined, is growing in concert with the progress of recent years in molecularly targeted antitumor agents. The range of cancer types indicated for testing by these agents is expected to grow and ultimately include all types. At present the approved CDx test targets are tissue specimens derived from the primary lesion obtained by surgery or biopsy. However, repeated highly invasive biopsies are difficult to perform and place a heavy burden on the patient. A method of detecting cancer-originated DNA in the blood is therefore highly desirable.

BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) has been proposed for detection of minute quantities of circulating tumor deoxyribonucleic acid (ctDNA) in the blood. It is a digital polymerase chain reaction (dPCR) technique comprising a sequence of manual processes performed in the order pre-amplification, beads emulsification, emulsion PCR, emulsion break, hybridization and flow cytometry. We are investigating construction of a microfluidic reaction system for automation that will enable its application to large-scale clinical trials.

High-sensitivity molecule measurement technology using droplets has been a subject of widespread study for many years, and the targets have now extended from DNA to cells and proteins. Progress has been rapid with regard to development of instruments for research use, but diagnostic instrument development lies ahead and our goal is to produce world-leading systems for medical use. The automated system will be reported conference.

Study on nature-inspired nano structure based cell-surface interactions for antimicrobial activities

○Donghyun Lee[1], Hyuneui Lim[2]
([1]Department of Biomedical Engineering, School of Integrative Engineering, Chung-Ang University, Korea, [2]Department of Nature-Inspired Nanoconvergence Systems, Korea Institute of Machinery and Materials, Korea)

Key words superhydrophilic, nanopillar, bactericidal, transparent

BEAMing Droplet Microfluidics for Liquid Biopsy

○Ayato Tagawa
(Sysmex Corp.)

Key words liquid biopsy, digital PCR, droplet microfluidics, microfluidic device

2S-Gp01 抗体医薬品生産における培養プロセス開発戦略

○槙坪 寛勝, 岡本 浩
（中外製薬・製薬研究部（生物技術））
makitsubo.hirokatsu78@chugai-pharm.co.jp

近年，抗体医薬品の市場は急速に拡大し，世界中の患者へ新たな治療法を提供しているが，世界的規模の製薬会社からベンチャー企業まで数多くの会社の参入もあり，国際的に熾烈な開発競争が繰り広げられている．中外製薬の研究部門では独自の革新的抗体技術を利用した First in class 戦略及び Best in Class 戦略を狙い，左右の抗原結合部位が異なる抗原と結合できる「バイスペシフィック抗体」や，薬効の持続時間を高めることで薬剤の必要投与量・投与回数を減らすことが出来る「リサイクリング抗体」・「スイーピング抗体」をこれまで開発してきた．一方，製薬部門では，これらの開発された次世代抗体の複数同時開発及び高速上市を実現すべく，より生産性が高く，より質の高い抗体を製造出来るプロセスを開発し，より早く患者へ届けることが必要になっている．
抗体の製造プロセス開発は，抗体産生細胞株構築，培養プロセス開発，精製プロセス開発の大きく 3 つの工程から構成されるが，本シンポジウムでは培養プロセス開発に焦点を当てる．培養プロセス開発では主な目的として培地および培養条件の改良により抗体の生産量を増加させ，製造原価を下げることが挙げられる．また，医薬品の安定供給の視点で見れば，微生物・ウイルスの汚染リスクや原材料の変動リスクを考慮したプロセス設計が必要になってくる．
我々の培養プロセス開発では上述の点を考慮し，Wheat hydrolysate のような Lot 間差のリスクが高い加水分解物を含まず，未知成分を含まない完全合成（CD：Chemically Defined）培地を用いたプラットフォーム製法を開発してきた．複数の抗体産生細胞株をモデル細胞として培地開発を進め，従来の加水分解物を含む培地以上の抗体生産性を得ることに成功した．加えて，微生物・ウイルスの汚染リスク対策として CD 培地の High temperature short time（HTST）対応を並行して実施し，HTST の影響を受けない CD 培地プラットフォーム製法を樹立した．
この新たな製法を次世代抗体であるリサイクリング抗体プロジェクトに適用し，抗体産生株の樹立，樹立した細胞株を用いた Large scale の製造を実施した．Large scale の製造では，Small scale と同等の培養 performance が得られている．
本シンポジウムでは中外製薬における CD 培地プラットフォームの開発方針と開発結果に関して実例を交えてご説明するとともに，弊社の次世代抗体であるリサイクリング抗体への適用事例をご紹介する．

Strategy of upstream process development for antibody production

○Hirokatsu Makitsubo, Hiroshi Okamoto
(API Process Development (Bio technology), Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.)

Key words Antibody production, CD media, HTST system, scale-up

2S-Gp02 再生医療製品の開発事例と将来展望

○井家 益和
（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング・研究開発部）
masukazu_inoie@jpte.co.jp

2013 年 11 月の薬事法から薬機法（医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律）への改正において新区分として設けられた再生医療等製品は，再生医療若しくは遺伝子治療を目的とした細胞加工物と定義された．これまでに製品化された 4 品目は何れも再生医療を目的としたヒト細胞加工物であり，2007 年に自家培養表皮ジェイス，2012 年に自家培養軟骨ジャック，2015 年に自家骨格筋細胞ハートシートおよび同種骨髄由来間葉系幹細胞テムセルが承認された．われわれが開発した自家培養表皮と自家培養軟骨は，旧薬事法下で医療機器として審査・承認され，薬機法への改正の際に再生医療等製品に読み替えられた経緯がある．現在，この 2 品目の製造販売と市販後活動に加えて，自家培養角膜上皮の受託開発を行うとともに，同種細胞や MSC（間葉系幹細胞）や用いた次世代製品の開発を進めている．これらの再生医療製品の開発事例を解説するとともに，多様な細胞を用いた再生医療製品の将来展望を述べる．
自家培養表皮は，患者自身の皮膚から単離した細胞を培養して製造する移植用の表皮細胞シートである．培養工程で細胞足場材料は使用しておらず，マウス由来 3T3 細胞のフィーダーとウシ胎児血清含有培地を用いて表皮細胞を培養することによって細胞間結合が発達し，シート構造が維持される．通常，数 cm^2 の皮膚から，2，3 週間の培養期間で体表の 1，2 割に相当する面積，4 週間の培養で体表全面を覆う面積の細胞シートを作製することができる．製品は，培養フラスコから剥離した細胞シートを保存液と共にパッケージした形状である．自家培養表皮は熱傷創に移植されると，シートに含まれる表皮幹細胞が生着して表皮が再生し，創閉鎖に至る．この有効性が機能するには製品となる表皮細胞シートに体性幹細胞が維持されるような培養法の最適化が必要であり，製品を構成する細胞の特性解析を行うことによって，有効性と安全性が担保できる培養条件と製品規格を設定した．
具体的には，有効性評価として表皮細胞含有率の定量，連続継代試験，増殖コロニー形成試験，生理活性物質産生量の定量，および物性・強度試験を行い，不純物評価として含有細胞種の定量，残存フィーダー細胞の定量，残留培地添加物の定量，残留抗生物質の定量，および残留ウシ胎児血清の定量を行い，工程評価として洗浄効率確認試験，および細胞凍結解凍確認試験を行い，遺伝学的評価として細胞形態確認試験，核型分析，軟寒天コロニー形成試験，および免疫不全動物への移植試験を行い，微生物評価としてマイコプラズマ否定試験，無菌試験，エンドトキシン定量試験，および 3T3 細胞セルバンクとフィーダー細胞のウイルス試験を行い，安定性評価として保存温度設定試験，保存安定性試験，および長期保存試験を行った．これらの解析結果から培養法を標準化するとともに，製品規格として，組織の受け入れ検査，製造の工程検査，製品の出荷検査，微生物の確認検査，および貯蔵温度 10～25℃ で 56 時間の有効期間を設定した．自家培養表皮は，全身の 30%以上を受傷した広範囲の重傷熱傷患者を適応として毎年 100 例を超える受注があり，2016 年から先天性巨大色素性母斑の切除創に対する適応が追加された．
2 番目に製品化した自家培養軟骨は，患者自身の軟骨片を原材料として製造する移植用のコラーゲン包埋軟骨細胞であり，外傷性軟骨欠損症等が適応である．製造工程では，膝関節の非荷重部位から採取した 1g 未満の軟骨組織から分離した軟骨細胞を，ウシ真皮由来アテロコラーゲンに包埋してウシ胎児血清含有培地中で約 4 週間培養する．この 3 次元培養法が最大の特長であり，これによって軟骨細胞は分化することなく基質産生能を維持した状態で増殖が継続できる．自家培養軟骨も，先行した自家培養表皮の開発手法を雛形とした細胞の特性解析を行うことによって培養法を標準化するとともに，適切な製品規格や，貯蔵温度 8～25℃ で 80 時間の有効期間を設定した．
受託開発中の自家培養角膜上皮は，患者自身の角膜輪部片や口腔粘膜片から単離した上皮細胞を培養して製造する移植用の細胞シートであり，現在，角膜上皮幹細胞疲弊症を対象として治験を実施中である．自家培養表皮と同様にマウス由来 3T3 細胞のフィーダーとウシ胎児血清含有培地を用いた培養法を採用したが，温度応答性培養皿上で作製された細胞シートを剥離することなく保存液と共にパッケージした製品形態とした．
また，次世代の再生医療製品として同種細胞や MSC を用いた開発を行っている．まずは同種培養表皮の製品化を目的として，商業利用可能な臨床用の国産セルバンクの構築を進めており，適切なドナースクリーニングとセルバンクのウイルス試験を終了した．MSC の研究では，細胞自体の多様性を明らかにする目的でクローン解析法を用いた特性評価を行っており，将来的に各種組織由来の高性能な MSC の臨床用セルバンクを構築することによって，MSC を必要とする多くの疾患への供給基盤となることを目指している．
再生医療製品の開発では，ヒトに移植する品質と安全性を確保するために，細胞培養の標準化と適切な製品規格の設定が重要である．

Technical overview of current products and next evolution for regenerative medicines

○Masukazu Inoie
(R&D Dept., Japan Tissue Engineering Co.,Ltd)

Key words regenerative medicine, autologous cultured epidermis, autologous cultured cartilage, mesenchymal stem cell

2S-Gp03 高感度腸内フローラ解析システム"Yakult Intestinal Flora-SCAN (YIF-SCAN)"の開発と応用

○辻 浩和
（ヤクルト中央研究所）
hirokazu-tsuji@yakult.co.jp

ヒトの大腸内には約 1000 種にもおよぶ細菌が糞便 1g あたり 10^{11} 個レベルで棲息し，極めて複雑な微生物生態系を形成している．この腸内菌叢は免疫系の発達や感染防御，様々な疾患さらには腸脳相関に関連することが示唆されている．したがって，腸内細菌叢を正確に把握することが，ヒトの生涯にわたる健康を増進する上で非常に重要と考えられ，将来的には腸内細菌叢の構成から，個人の疾病のリスクを予測できるようになることが期待されている．
従来，腸内細菌の解析には主に培養法が用いられてきたが，この方法には，多大な労力と時間を必要とする，培養法ではすべての菌株を分離培養することが困難である，従来の生物・生化学性状を指標とした分類・同定は，現在の 16S rRNA 遺伝子配列を指標とした分類体系とは必ずしも一致しない，といった問題が存在した．この問題を克服するため，様々な分子生物学的方法による腸内細菌叢の解析手法が開発され，特に最近では次世代シークエンサー技術による腸内細菌解析技術の進展が目覚ましい．この手法は 16S rRNA メタ解析とも呼ばれ，未知細菌を含む腸内細菌叢の構成を網羅的に調べる上で，今や重要な技術となっている．しかしながら，腸内において多様な種類の腸内細菌は各々異なった存在レベルで棲息しており，極めて広いダイナミックレンジで存在する腸内細菌を精度よく解析するためには，これらの方法をもってしても検出感度が低い，そのため最優勢菌のみしか測定できない，定量性に乏しいといった点で問題が残されている．そこで我々は，迅速かつ操作がシンプルで多検体の解析に適した方法である定量的 PCR 法の発展形として，RT (Reverse Transcription)-quantitative PCR 法(定量的 RT-PCR)を原理とした Yakult Intestinal Flora-SCAN (YIF-SCAN)開発した．
一般に，rRNA 遺伝子は数～十数コピーがゲノムにコードされる．定量的 PCR では，この遺伝子の特異配列を標的としたプライマーおよび DNA ポリメラーゼを用いて遺伝子増幅を行うが，YIF-SCAN では，まず rRNA 分子を逆転写反応により cDNA を合成する．引き続き，定量的 PCR 法を行うわけだが，rRNA 分子は 1 細胞内に数万分子存在するため，通常の DNA を標的とする定量的 PCR に比較して高い検出感度で標的微生物の定量が可能となる．実際に，細菌に含有される rRNA をコードする DNA とその転写産物である RNA 分子のコピー数の差は，定量的 PCR および YIF-SCAN による定量解析の検出感度の差に反映され，それぞれの測定感度が少なくとも約 100 倍は異なる．さらに，生きた微生物の定量という観点からも，PCR では生菌のみならず死菌をも測定することがあるのに比べて，rRNA 自体がより生菌状態を反映していることも示唆されていることから，YIF-SCAN が腸内の生菌を定量するために好適な手法であるといえる．
YIF-SCAN では，細菌群あるいは種のレベルで，それぞれの特異的な配列に対するプライマー配列が設計され，その特異性および感度の妥当性の検証がなされ，多様な腸内フローラ構成菌群および種を包括的に解析するためのプライマーおよび対応する標準菌株核酸のセットが構築されている．腸内での存在量が少ない，日和見感染を引き起こす細菌や真菌，また腸管病原菌にも対応したプライマーも準備されている．
本発表では，YIF-SCAN を含む分子生物学的な腸内細菌解析方法を概説するとともに，その利点や問題点を議論する．さらには，高感度な YIF-SCAN による応用例を紹介したい．

Development and aplication of high sensitivity intestinal microbiota analysis system —Yakult Intestinal Flora-SCAN (YIF-SCAN)—

○Hirokazu Tsuji
(Yakult Cent. Inst.)

Key words bacteria, rRNA, microbiota, reverse transcriptattion-quantitative PCR

2S-Gp04 アミノ酸で健康状態を測る―アミノインデックス技術の開発―

○森 妹子[1], 吉田 寛郎[1], 宮野 博[2]
（[1]味の素・アミノサイエンス統括部, [2]味の素・イノベーション研）
maiko_mori@ajinomoto.com

背景：高齢化が急速に進む昨今，「健康寿命が延伸する社会」すなわち高齢者が健康で活き活きと生活する社会が求められている．この目的を達成するために，国は予防・健康管理に関する取組の推進（高齢者だけでなく現役世代からの健康づくり対策の推進）やがんを含む生活習慣病（循環器疾患・糖尿病等）の発症および重症化予防を健康増進の方向性として掲げている（健康日本２１（第二次））．特にがんは日本人の死因のトップであり，一生涯で２人に１人はがんにかかる国民病である．またがんは，早期発見がその後の生存率に大きく影響することが報告されている．これらのことから健康状態をタイムリーに把握すること，特に疾病に関しては予防，早期発見することに資する簡便かつ侵襲度の低いツールが求められている．
アミノ酸はからだを構成し，生体に欠かせない代謝上の重要な成分として，古くより多くの生体中のアミノ酸濃度が分析されてきた．また生体中のアミノ酸と疾患との関わりは非常に多く報告されているにも関わらず，実際にバイオマーカーとして実用化されているものは極めて少ない．
内容：ヒトの血液中には遊離アミノ酸が体重の約 0.002%（体重 50kg の人であれば約 1g）存在する．血液中の遊離アミノ酸濃度バランスは厳密にコントロールされており，恒常性が維持されていることが知られている．我々はヒトの健康状態を計測する技術として血液中のアミノ酸濃度に着目し，バイオマーカーとして指標化するためにアミノ酸濃度から複数のアミノ酸濃度のパターンを数値化し，健康状態を測る技術「アミノインデックス技術」を開発してきた．さらに「アミノインデックス技術」を実用化して社会実装することを目的に，アミノ酸分析技術（J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 998-999:88-96(2015)）および機器・試薬の開発さらに製品（採血時にがんに罹患している可能性を評価する検査）の臨床研究（PLoS ONE 6(9): e24143 (2011)）を経て，2011 年 4 月よりアミノインデックス®がんリスクスクリーニング（AminoIndex Cancer Screening; AICS®）検査として全国展開している．AICS®は一度の採血（5ml）で 7 種類のがん（胃・肺・大腸・膵・前立腺・乳・子宮あるいは卵巣）に罹患している可能性を評価する検査として提供されており，迅速かつ安定したアミノ酸分析プラットフォームが本検査の基盤となっている．本講演では「アミノインデックス技術」の開発にまつわる課題とそのブレークスルーに繋がった研究開発（分析時間の短縮化のための LC/MS 高速アミノ酸分析システム UF-Amino Station の共同開発（島津製作所），分析精度の向上と安定化のための試薬開発，生体サンプル取扱い方法（Clin Chim Acta. 455:68-74(2016)）等）さらに「アミノインデックス技術」の最新の話題や今後の展開について紹介する．

AminoIndex Technology - For supporting human's health and wellness

○Maiko Mori[1], Hiroo Yoshida[1], Hiroshi Miyano[2]
([1]Ajinomoto CO.,INC. AminoScience Div., [2]Ajinomoto CO.,INC. Inst. for Innov.)

Key words amino acid analysis, LC-MS, biomarker, cancer screening

2S-Hp01 細菌によるデジタルな情報伝達!?

○豊福 雅典[1], 森永 花菜[1], エーベル レオ[2], 野村 暢彦[1]
([1]筑波大院・生命環境, [2]チューリッヒ大学)
toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

細菌はシグナル物質を介して細胞間で情報伝達を行い, お互いに遺伝子発現を調節することで集団としての性質を発揮する．このような細菌間情報伝達は細菌の病原性やバイオフィルム形成などを制御しており, ヒトの健康や環境保全にも密接に関与している．シグナル物質の中で多くのグラム陰性細菌で用いられているのがアシル化ホモセリンラクトン（AHL）類である．AHL は炭素数が 4 から 18 の長さのアシル鎖を持っており，その鎖長と修飾によって，受容体との特異性が決定される．AHL 類を介した細菌間情報伝達のもう一つの特徴は，シグナル物質濃度が一定の濃度（閾値）に達すると遺伝子発現が同調的に調節される点である．このような，シグナル濃度に依存した同調的な遺伝子発現制御機構は，クォラムセンシング(QS) と呼ばれている．QS において，シグナル濃度に応じて集団全体の遺伝子発現が同調するには，AHL が拡散して集団全体に均等に行き渡る必要がある．一方で，長鎖 AHL のように，細胞から拡散しにくい疎水性のシグナル物質も多く発見されており，それらがどのようにして細胞から放出されて周囲の細胞に伝達されるのかについては，ほとんど明らかにされていない．さらに，物質が希釈されてしまう海洋や河川などの水環境でシグナル物質がどのようにして閾値に達するのかについて，理解されてこなかった．疎水性のシグナル物質は一般的に膜に局在しやすいということが知られていたため，我々は，メンブレンベシクル(MV)に着目した．MV は細胞膜によって形成された数十から数百 nm の球状の構造体で，その中に様々な物質を取り込むことで，輸送体の役割を果たしている．代表的な長鎖 AHL 産生菌である *Paracoccus denitrificans* を用いた結果, *P. denitrificans* が産生する C16-HSL が MV によって放出され，他の細胞に C16-HSL が MV を介して伝達されることが明らかとなった．さらに，MV 1 粒子には閾値濃度以上の C16-HSL が濃縮されており，理論上，MV1 粒子を受け取った細胞は遺伝子発現が制御されることが示された．細胞からの拡散性の高い，短鎖 AHL を用いた細菌間情報伝達では，従来の QS モデル通り，シグナルが濃度勾配を伴って集団全体に連続的（アナログ）に伝達されるのに対して, 疎水性の高い長鎖 AHL を用いた細菌間情報伝達では，AHL が MV にパッケージ化されて，シグナルがとびとび（デジタル）に伝達される可能性がる．このような細菌間シグナル伝達を我々はバイナリーシグナリングと名付けている．本講演では，バイナリーシグナリングについて,MV に関する我々の最新の知見と合わせて発表する．

Binary digital communication in bacteria

○Masanori Toyofuku[1], Kana Morinaga[1], Leo Eberl[2], Nobuhiko Nomura[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Plant Microb. Biol., Univ. of Zurich)

Key words membrane vesicle, quorum sensing, cell-cell interactions, bacteria

2S-Hp02 窒素代謝を変えるコミュニケーション —脂肪酸をつかった分裂酵母の種の生存戦略—

○八代田 陽子
（理研CSRS・ケミカルゲノミクス）
ytyy@riken.jp

微生物は培養環境中の栄養源状況を感知し，効率良く栄養源を確保するための細胞内プロセスを調節する機構を発達させている．たとえば，真核微生物である酵母は，培養環境における窒素源の質を感知して，窒素源の取り込みやその異化・同化プロセスを調節している．酵母は培地中の利用しやすい良質な窒素源（アンモニア，グルタミン酸等）を優先的に取り込むため，利用しやすい窒素源が存在すると，利用しにくい窒素源（分岐鎖アミノ酸，プロリン等）の利用・取り込みに必要な酵素やトランスポーターの発現を抑制する．この機構は「窒素源カタボライト抑制」と呼ばれる．分裂酵母の *eca39*$^{+}$遺伝子は分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素をコードする．この酵素は分岐鎖アミノ酸（ロイシン，イソロイシン，バリン）の生合成を触媒するので，*eca39*$^{+}$遺伝子破壊株（*eca39Δ* 株）は生育に分岐鎖アミノ酸自体が必須である「分岐鎖アミノ酸要求性株」となる．*eca39Δ* 株は利用しやすい窒素源であるグルタミン酸を含む最少培地においては，いくら分岐鎖アミノ酸が十分量含まれていても生育不可能となる．このような培地においては，窒素源カタボライト抑制機構が働き，*eca39Δ* 株の生育に必須の分岐鎖アミノ酸が取り込めないからである．しかしながら，同様の培地にて，*eca39Δ* 株を分裂酵母野生株の近傍に置くと，*eca39Δ* 株の生育が可能となる現象を我々の研究グループは見出し，これを「適応生育」と名付けた．この現象は，野生株から細胞外へ分泌された何らかの物質により，*eca39Δ* 株において窒素源による抑制機構が解除され，アミノ酸の取り込み能が回復することで引き起こされたと考え，この分泌されている物質の分離・同定を行った．その結果，フェロモン様のナノモルレベルの極低濃度で作用する不飽和脂肪酸 2 種 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid および 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid を同定した．これらの不飽和脂肪酸により誘導される適応生育現象は *eca39Δ* 株だけではなく，ロイシン要求性株（*leu1* 株）においても見られた．*leu1* 株は，高濃度アンモニアを含む最少培地においてはロイシンが含まれていても生育が抑制されたが，不飽和脂肪酸を添加すると生育が促進された．さらに，その生育の促進はアミノ酸トランスポーターをコードする *agp3*$^{+}$依存的であることがわかった．このように分裂酵母は自ら分泌する脂肪酸を介して，アミノ酸の取り込みを調節し，窒素代謝を変えるような環境適応戦略，すなわち細胞間コミュニケーション機構を有することが示唆された．本講演では，この脂肪酸を介した分裂酵母のコミュニケーション機構についての最新の知見を紹介したい.〔参考文献〕Sun *et al.*, *Sci. Rep.*, 6, 20856 (2016)

Intra-species communication mediated by fatty acids for nitrogen metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*

○Yoko Yashiroda
(Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS)

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, nitrogen catabolite repression, fatty acid, communication

2S-Hp03 放線菌の眠れる二次代謝を呼び覚ます！―異属細菌間での競合と協調―

○浅水 俊平
（東大院・農生科）
asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

放線菌は菌糸状に生育し，胞子を着生する生活環を有するグラム陽性細菌であり，土壌を始めとする様々な自然環境中に豊富に存在し，抗生物質など医薬・農薬の原料となる有用な化学物質の生産者として知られている．2000 年以降，モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)やエバーメクチン生産菌 *Streptomyces avermitilis* MA-4680 の完全ゲノム配列解読をはじめとして，これまでに数百の放線菌株ドラフトゲノムがデータベースに登録されているが，どの株も 20-40 個に及ぶ未知の「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有することが推定されている．この数字は従来の単独培養中から同定できる二次代謝産物の種類（一般的に多くて 5 種類程度）を大きく超える数字であり，残りの「潜在的」二次代謝をどのように発現させ，利用可能にできるかが重要な課題となっている．放線菌の残りの「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子がいつどのようなタイミングで発現し得るかを考えたとき，本来の自然生育環境に目を向けると，そこには多種多様な生物により構築される複雑な生態系があり，この中には異種・異属細菌同士の多様で複雑な相互作用が存在すると考えられる．このことから微生物間相互作用が鍵となるような二次代謝産物生合成のスイッチがあると予想され，実験室環境下の単独培養では発現が困難な「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの活性化が起こることが期待された．

我々の研究グループでは放線菌と他の細菌との相互作用により活性化する二次代謝産物生産の活性化に注目し，研究を行っている．尾仲らは放線菌 *Streptomyces lividans* は通常の培養条件では色素性抗生物質 undecylprodigiosin（RED）を生産しないが，その性質を利用して *S. lividans* の RED 生産を誘導する微生物を探索した結果，効率的に RED 生産を誘導する土壌分離細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 を発見した [1]．*T. pulmonis* は細胞膜にミコール酸という特異な脂肪酸を含むミコール酸含有細菌とも呼ばれているアクチノバクテリアの一種である．また放線菌とミコール酸含有細菌との共培養を複合培養と我々は呼んでいる．*T. pulmonis* が *S. lividans* に対して RED 生産を誘導するとき，コロニー同士が接触する限られた部位のみで *S. lividans* による RED 生産が観察され，また透析膜などで二細菌を隔てた場合 *S. lividans* による RED 生産は起こらなかった [1]．これらの結果から，物理的接触を介した放線菌による異属細菌の認識，その応答による二次代謝活性化機構の存在が示唆された．異種・異属細菌同士の接触に依存した二次代謝に関連する相互作用が見いだされた現象はこれまでに例がなく，どのような相互作用機構が存在するのか強い興味が持たれた．

S. lividans に対して RED 生産を誘導する現象は *T. pulmonis* だけではなく，他のミコール酸含有細菌（*Mycobacterium* 属，*Rhodococcus* 属など）にも見いだされたことから [1]，細胞膜に局在するミコール酸が誘導因子であることが考えられたが，ホルムアルデヒド固定やγ線滅菌を用いて作製したミコール酸含有細菌の死細胞には *S. lividans* に対する RED 生産誘導活性が消失していた [2]．また複合培養時の細菌同士の相互作用を観察した結果，二種類の細菌同士が接着し，共凝集していることが観察された [2]．この実験室環境下で起こる共凝集現象が，土壌中などの自然環境下でどのような意味を持つかは不明であるが，細菌同士の，敵対するだけではない何らかの協調的な機構が示唆される．

現在，*S. lividans* と同様の性質を示したモデル放線菌 *S. coelicolor* A3(2)を用いて，*S. coelicolor* A3(2)がミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* に対してどのように遺伝子レベルで応答するのか解析を行っている．*S. coelicolor* A3(2)の網羅的転写レベルを，単独培養時，*T. pulmonis* との複合培養時，枯草菌 *Bacillus subtilis* との共培養時で，RNA-seq を利用して比較した結果，*S. coelicolor* A3(2)の遺伝子発現は *T. pulmonis* により強く影響を受けることが観察された．また重イオンビームを変異源とした *S. coelicolor* A3(2)株の変異株ライブラリーを作製し，*T. pulmonis* によって色素生産が誘導されない放線菌変異株を 15 万株からスクリーニングによって選抜し，複数の有用候補株を取得した．現在，色素生産非応答性変異株における遺伝子変異点解析を行っており，その結果も併せて発表する予定である．

参考文献
1) Onaka H, *et al*. *Appl Environ Microbiol*. 77(2):400-6. 2011
2) Asamizu S, *et al*. *PLoS One*. 10(11):e0142372. 2015

Awakening Natural Products Biosynthesis. -Competition and Coordination in Bacterial Interaction-

○Shumpei Asamizu
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words *Streptomyces*, secondary metabolism, bacterial interaction

2S-Hp04 ビール酵母細胞壁が植物栽培の歴史を変える

○北川 隆徳
（アサヒバイオサイクル）
takanori.kitagawa@asahigroup-holdings.com

アサヒグループではビール醸造の副産物として大量の余剰酵母が生じる．医薬部外品の「エビオス錠」，調味料・培地原料の「酵母エキス」などとして有効活用されているが，酵母エキス抽出後の「酵母細胞壁」は十分には有効活用されていなかったため，新規用途開発を目的として２００４年にプラントアクティベーターとしての研究開発を開始した．大豆の病原菌細胞壁由来のグルカンオリゴ糖（ヘプタ β-グルコシド）が大豆の防御反応を誘導することは古くから知られており，ビール酵母細胞壁の構成成分である β-1,3-1,6-グルカンに着目し，植物に与える影響について検討を行った．酵母細胞壁は水に不溶であるため，酵素分解または水熱分解により低分子化したものを供試した．シロイヌナズナにおいては，一般に拮抗すると言われているＩＳＲ，ＳＡＲの両病害応答系を，ＩＳＲ，ＳＡＲの順に活性化することが明らかとなり，広範な病害に対する抵抗性を付与できることが示唆された．イネにおいては，処理１日後に病害抵抗性遺伝子の発現量が増加し，発現量が低下した２日後以降に根のオーキシン量が増加，サイトカイニン量が減少し，発根が促進されることが明らかとなっている．また，水熱分解した酵母細胞壁は還元性を有し，土壌を還元し土壌の微生物叢を変化させるというユニークな特徴がある．これらの知見を基に農業現場やゴルフ場の芝管理に展開おり，各地で様々な問題を解決し驚きの声が上がっている．本講演では，基礎的な知見と現場での知見を交えながら，ビール酵母細胞壁が植物に与える影響について紹介する．

Brewing yeast cell wall changes the history of plant cultivation

○Takanori Kitagawa
(Asahi Biocycle co.,ltd.)

Key words yeast cell wall, glucan, auxin, plant activator

2S-Hp05 清酒醸造における新しい微生物間相互作用 —乳酸菌の「声」は酵母に届くか—

○渡辺 大輔[1], 砂田 啓輔[2], 高橋 俊成[2], 山田 翼[2], 高木 博史[1]
（[1]奈良先端大・バイオ, [2]菊正宗酒造）
d-watanabe@bs.naist.jp

微生物は，実際の生育環境において単独で存在しているのではなく，他の生物と様々な形で関わりあいながら生きている．したがって，微生物の真の姿を理解しその知見を活用するためには，純粋培養をベースとした従来の微生物学を超えるための新しい観点を，バイオテクノロジーおよびバイオインダストリーに積極的に導入していくことが重要であると考えられる[1]．

清酒の伝統的醸造法である「生もと造り」においては，まず乳酸菌を繁殖させた後に酵母が生育し，アルコール発酵を開始させる．この意義として，(1)乳酸菌が生成する乳酸によって酸性の発酵環境が生み出され，酵母以外の雑菌の増殖を防ぐ，(2)乳酸菌が特有の香味成分などを高生産する，といった点を挙げることができる．しかし，もし乳酸菌と酵母の間に何らかの未知なる相互作用が存在しているとすれば，「生もと造り」の新たな意義の解明につながることが期待される．

近年の研究から，乳酸菌などのバクテリアと酵母の共存下において，酵母の[*GAR*$^+$]と呼ばれる推定上のプリオン（タンパク質性の遺伝因子）が誘導され，その結果，酵母の炭素代謝に変化がもたらされる（グルコース抑制が解除される）ことが発見された[2]．したがって[*GAR*$^+$]の誘導は，多様な炭素源を含む環境において，酵母にとってはグルコース以外の炭素源の利用につながり，バクテリアにとっては酵母によるグルコース利用の独占を防ぐことにつながる．あたかも，バクテリアの発する「声」に応じて酵母が態度を変え，双方にとってメリットを生み出すかのような振舞いを示す，興味深い微生物間相互作用-環境応答メカニズムが見出された，ということになるだろう．

それでは，「生もと造り」において，[*GAR*$^+$]はどのような役割を果たしているのだろうか．演者らは，現在までに，(1)清酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae* に属する清酒醸造用菌株）が他の酵母菌株と同様に[*GAR*$^+$]を実験室条件下で誘導する能力を有すること，(2)生もとに用いられる乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* および *Lactobacillus sakei* が酵母の[*GAR*$^+$]誘導を促進させる能力を有すること，(3)特に *L. mesenteroides* による[*GAR*$^+$]誘導促進能力に関しては，標準株より生もと由来株の方が顕著であること，(4)清酒酵母を用いた清酒小仕込試験において，[*GAR*$^+$]誘導が炭素代謝に影響を及ぼすことを明らかにしている．以上の結果から，「生もと造り」において乳酸菌と酵母が実際に選択的な相互作用を行っており，その結果として独自の品質を持った清酒が生成される可能性が示唆された．本研究はまだ発展途上であるが，乳酸菌の発する「声」の正体は何なのか，酵母が「声」を感知するメカニズムはどのようなものであるか，に着目しながら研究を進めていきたい．

私たちは，生命についてどこまで理解したと言えるのだろうか．生物種の中では比較的単純と考えられている単細胞生物についてですら，「プリオンというエピゲノミックなメカニズムを介した異種生物間のコミュニケーションが存在し，それが知らぬ間に清酒醸造技術に応用されている」ことが驚きを持って解明されつつあるといった現状である．改めて考えてみると，ヒト同士のコミュニケーションについても未だに謎だらけ，と言えるのではないか．未知なる生命現象は至る所に転がっており，その一つ一つに，挑戦に値する研究テーマが眠っているかのように感じる．

［参考文献］
1) 渡辺大輔, 生物工学会誌, vol. 93, p. 38 (2015)
2) Jarosz *et al.*, *Cell*, vol. 158, p. 1083-1093 (2014)

Novel microbial interaction in sake brewing: Can yeast hear the "voice" of lactic acid bacteria?

○Daisuke Watanabe[1], Keisuke Sunada[2], Toshinari Takahashi[2], Tasuku Yamada[2], Hiroshi Takagi[1]
([1]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, [2]Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd.)

Key words sake yeast, lactic acid bacteria, kimoto, prion

2P-N001 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* における新規溶血因子の同定

○阿座上 弘行[1,2,3], 島谷 雅文[1], 甲斐 幹世[1]
（[1]山口大・農, [2]山口大院・創科・農, [3]山口大・微研セ・病微）
azakami@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* 1073 株は，羊血液寒天培地上で β 溶血を示す．我々は，細胞外被(CE)画分に溶血活性を確認し，CE 画分から溶血因子の精製を試みた．その結果，約 65kDa のタンパク質が精製され，N 末端アミノ酸配列の解析から，X-プロリルアミノペプチダーゼと相同なタンパク質であることが示唆され，このタンパク質を HlyA と名付けた．本研究では，HlyA タンパク質が溶血因子であるかどうかを確認するため，大腸菌での組換えタンパク質生産と，欠損株の作成を行った．
【方法】*E. corrodens* 1073 のゲノム DNA から *hlyA* 遺伝子を増幅し，大腸菌発現ベクター pET22b につないだ．組換えプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)に導入し，IPTG により誘導発現させた．His タグ付きの発現タンパク質を Ni-カラムで精製後，溶血活性を調べた．また，*hlyA* 遺伝子の中央付近をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えた断片を *E. corrodens* 1073 に導入し，相同的組換えを利用して *hlyA* 欠損株（*ΔhlyA* 株）を作成し，溶血活性を調べた．遺伝子の欠損は PCR により確認した．
【結果】大腸菌内で約 65kDa の可溶性タンパク質の発現が確認された．このタンパク質を精製し，兎赤血球に対する溶血活性を測定した．その結果，精製タンパク質の濃度に依存して溶血活性が見られた．さらに，*hlyA* 遺伝子欠損株（*ΔhlyA* 株）では，溶血活性は見られなかった．これらの結果から，*hlyA* が溶血因子をコードしている可能性が示唆された．現在，溶血活性に X-プロリルアミノペプチダーゼ活性が必要かどうか，また，どのようなメカニズムで溶血を引き起こすのか調べている．

Identification of novel hemolysin in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*

○Hiroyuki Azakami[1,2,3], Masafumi Shimatani[1], Kansei Kai[1]
([1]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [2]Coll. Agr., Dept. Biol. Chem., Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., [3]Div. Pathog. Micro., Res. Center Thermotolerant Microb. Res., Yamaguchi Univ.)

Key words periodontopathogenic bacteria, *Eikenella corrodens*, hemolysin, aminopeptidase

2P-G002 口腔連鎖球菌 *Streptococcus anginosus* の莢膜多糖生合成制御機構の解析

○小澤 賢人, 松本 裕子, 中西 猛志, 三宅 克英
（石川県大・生物資源研）
miyake@ishikawa-pu.ac.jp

菌体外莢膜多糖はバイオフィルムの主成分として細菌を外部環境から保護する働きを有している．我々はこれまで口腔連鎖球菌 *S. anginosus* の莢膜多糖に着目し，莢膜多糖生合成（*cps*）遺伝子群をクローン化し，その解析を行ってきた．連鎖球菌の莢膜多糖生合成遺伝子群は構造や特徴も明らかになっているが，遺伝子群を調節し，莢膜多糖の生産を制御するメカニズムには不明な点が多い．今回は CO_2，炭酸および不飽和脂肪酸が *cps* 遺伝子群の発現と増殖に与える影響について解析した．炭酸と不飽和脂肪酸は莢膜多糖生産量を増強することを ELISA 法で明らかにした．また RT-qPCR 法とプロモーター解析の結果，炭酸と不飽和脂肪酸は *cps* 遺伝子群の発現を正に制御していることが判明した．この現象は CO_2 を炭酸に変換する carbonic anhydrase の強制発現株でも確認された．従って，CO_2 が炭酸に変換されることが重要と考えられる．また炭酸と不飽和脂肪酸は増殖にも同様に働くことも確認した．不飽和脂肪酸がなぜ炭酸の作用を代替できるのかという点を調べるために，不飽和脂肪酸生合成系遺伝子 (*fabK*, *fabM*, *fabZ*)の解析を炭酸による発現制御という観点から行った．炭酸や不飽和脂肪酸を検知する調節遺伝子に関しては，*cps* 遺伝子群近傍下流に存在する二成分制御系因子（OrfO (脱リン酸化酵素)，OrfP (LPXTG 細胞壁表層蛋白質)，OrfQ (転写因子)，OrfR (ヒスチジンキナーゼ)）に注目している．しかし，細胞膜タンパク質である OrfP の配列の相同性を検索したところ，フィブロネクチンと結合する SSURE(Streptococcal surface repeat domain)を持つことが判明した．莢膜多糖生合成との関連を解析するため，OrfP，OrfQ，OrfR をすべて同時に過剰発現および欠損する株を利用し，フィブロネクチンや不飽和脂肪酸による増殖，莢膜多糖生産，*cps* 遺伝子発現への影響を解析している．

Regulatory mechanism of capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus anginosus*

○Kento Ozawa, Yuko Matsumoto, Takeshi Nakanishi, Katsuhide Miyake
(Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

Key words *Streptococcus anginosus*, capsular polysaccharide, unsaturated fatty acid, fibronectin

2P-G003 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網羅的同定に向けた INSeq 法の確立

○中島 森[1], 中川路 伸吾[1], 阪中 幹祥[2], 小椋 義俊[3], 林 哲也[3], 横田 篤[1], 吹谷 智[1]
（[1]北大院・農, [2]石川県大・生資環, [3]九大院・医）
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】ビフィズス菌は宿主に対して整腸作用などの様々な有用効果を発揮する偏性嫌気性細菌であるが，消化管通過時の生存や腸管定着に関する分子機構については不明な点が多い．そこで本研究では，転移因子 *Himar1C*9 を用いる INSeq (insertion-sequencing) 法をビフィズス菌に応用し，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を網羅的に同定する実験系の確立を試みた．INSeq 法では，トランスポゾン変異株ライブラリーをマウスに投与し，次世代シークエンサーを用いて消化管内での各変異株の相対数の増減をモニタリングする．投与を経て相対数が減少した変異株は，消化管における生存と定着に寄与する遺伝子が変異していると考えられる．
【方法・結果】これまでに確立した *Himar1C*9 を用いたトランスポゾン変異導入系により，*Bifidobacterium longum* 105-A（105-A 株）の 11,114 株の変異株ライブラリーを構築した．このライブラリーから DNA を抽出後，変異部位を特異的に増幅・精製し，Illumina MiSeq に供して INSeq 解析を行った．解析の結果，各変異株の変異部位の特定と相対数の計測に成功し，105-A 株の全 ORF の 67% が変異していることが示唆された．次に，INSeq 解析における各遺伝子変異株の定量の再現性を評価した．抽出した DNA から独立に 2 つの INseq 解析用サンプルを調製し，サンプル間の各変異株の相対数を比較した．解析の結果，サンプル間で各変異株の相対数はほぼ一致しており，菌数の定量の再現性を確認できた．以上のことから，105-A 株のトランスポゾン変異株ライブラリーの INSeq 解析手法の確立に成功したと考えられた．現在，さらに網羅的な変異を導入するために 30,000 株の変異株ライブラリーの構築を進めている．ライブラリーの完成後，INSeq 法を用いて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を同定する予定である．

Establishment of insertion-sequencing method for identifying genes that contribute to survival and colonization of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of mice

○Shin Nakajima[1], Shingo Nakakawaji[1], Mikiyasu Sakanaka[2], Yoshitoshi Ogura[3], Tetsuya Hayashi[3], Atsushi Yokota[1], Satoru Fukiya[1]
([1]Res. Fac. Agric., Hokkaido Univ., [2]Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ., [3]Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.)

Key words bifidobacterium, insertion-sequencing

2P-N004 *Stenotrophomonas maltophilia* の高濃度リン酸走性センサーの解析

○柳沢 優[1], 橋本 麻衣子[2], 酒井 保藏[1], 荷方 稔之[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]宇都宮大・工）
nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【緒言】日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* は，ビスフェノール A を含む多種のフェノール類に対して走性を示す細菌であり，リン酸イオンに対しても強い走性を示す．本研究では，*S. maltophilia* のリン酸イオンを感知するセンサーの単離を目的とした．既に緑膿菌においては低濃度(CtpL)および高濃度(CtpH)のリン酸イオンを感知する走性センサーが報告されている．そこで，緑膿菌の CtpH と相同性の高い走化性センサー遺伝子 *mcp3* および *mcp7* に着目し，これらの遺伝子破壊株を作成，リン酸イオンに対する走化性を測定することでリン酸走性センサー遺伝子の単離を試みた．
【方法】相同組換えを起こすことで *mcp7* の破壊株 *S. maltophilia Δmcp7*，*mcp7,10* の二重破壊株 *S. maltophilia Δmcp7,10* を作製した．野生株，破壊株ともに同条件で走化性の測定を行った．前培養は LB 液体培地を用い，本培養ではリンを含まない MOPS-P-MSV 培地を用いて，30°C で 18h 培養した．菌体は 5 mM MgCl2 を含む 40 mM MOPS 緩衝液(pH7.0)で洗浄し，顕微鏡を用いた画像処理により走化性を測定した．
【結果および考察】 リン酸飢餓条件下におけるリン酸イオンに対する *S. maltophilia* の走性応答は，濃度(5~0.0005 mM)に依存していた．野生株の走性応答は 5 mM，1 mM のリン酸イオンに対してそれぞれ 19.7，15.8(cells/sec・OD660)と強い応答であったのに対し，同濃度における Δmcp7 の応答はそれぞれ 0.43，0.45(cells/sec・OD660)と消失していた．このことから *S. maltophilia* において Mcp7 が唯一の高濃度リン酸走性センサーであることが明らかとなった．また二重破壊株 Δmcp7,10 では高濃度及び低濃度のリン酸走性が消失した事から，*S. maltophilia* においてリン酸イオンを感知する走性センサーは Mcp7，Mcp10 の 2 つであることが明らかとなった．

Identification of methyl-accepting chemotaxis genes for phosphate taxis of *Stenotrophomonas maltophilia*

○yu yanagisawa[1], maiko haisimoto[2], yasuzou sakai[1], tosiyuki nikata[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Fac. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*, phosphate, chemotaxis

2P-N005 日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltphilia* のアルコールに対する走性応答

○古川 卓磨, 渡邉 祐子, 酒井 保藏, 荷方 稔之
（宇都宮大院・工）
nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【緒言】細菌の走化性は走化性センサータンパク質によって化学物質を感知し，鞭毛モーターの回転方向を変えることで実現される．日和見感染菌 *S. maltophilia* はフェノール類や芳香族有機塩素化合物などに対して集積応答を示す．これらを感知する走化性センサータンパク質をコードする遺伝子を網羅的に同定することで新規検出システムや効率的なバイオレメディエーションへの応用が期待できる．本研究では，フェノール類に共通して存在する OH 基を有するアルコールに着目し，*S. maltophilia* の走性応答を調査した．さらに走化性センサー遺伝子の破壊株を用いて野生株との比較を行うことでその同定を試みた．
【実験方法】*S. maltophilia* の遺伝子破壊株は相同組換えを用いて作製した．前培養は LB 液体培地を用いて 30℃で一晩培養し，本培養は合成培地である MOPS-glucose-MSV 培地を用いて，30℃で 20 時間振とう培養した．菌体を 40mM MOPS 緩衝液(pH7.0)，5mM $MgCl_2$ 溶液で洗浄し，顕微鏡を用いた画像処理法により走化性を測定した．
【実験結果】*S. maltophilia* のアルコール走性をメタノール，エタノール，2-プロパノール，2-ブタノールの 4 種類を用いて測定したところ，エタノールと 2-プロパノールに対しそれぞれ 6.4，8.9 cells/sec・OD_{660} と強い走性応答が観察され，2-ブタノールとメタノールに対してはそれぞれ 3.2，1.3 cells/sec・OD_{660} と弱い走性応答を示した．走化性センサー遺伝子 *mcp5* を破壊した株を用いて，強い走性応答を示したエタノールと 2-プロパノールの走性応答を測定したところ，4.6 w/w% エタノールと 4.8 w/w% 2-プロパノールで，それぞれ 94%と 66%の応答の減少が見られた．このことから MCP5 が両アルコールに対する主要な走化性センサーであることが示唆された．

Characterization of alcohol taxis of *Stenotrophomonas maltphilia*

○Takuma Furukawa, Yuko Watanabe, Yasuzou Sakai, Toshiyuki Nikata
(Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words chemotaxis, *Stenotrophomonas maltophilia*, alcohol

2P-G006 光化学系 II 反応中心に耐熱性 D1/D2 タンパク質を組み込んだシアノバクテリア変異株の作成と D1 タンパク質 C 末端配列の最適化

○塩屋 健一, 鶴田 開生, 原口 典久, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳
（崇城大・生物生命）
matsuoka@bio.sojo-u.ac.jp

光エネルギーによる水の分解は植物やシアノバクテリア（ラン藻）のチラコイド膜内に存在する光化学系 II（PSII）複合体で行われる．D 1/D 2 ヘテロダイマーは PSII 複合体の中心に位置し，光化学反応において水の分解で得られた電子をプラストキノン還元に用いる反応を触媒する．D1/D2 ヘテロダイマーはこの電子伝達反応のすべての因子を結合しているので，PSII の最小単位とみなせる．私たちは耐熱性の D1*/D2*タンパク質を組み込んだ PSII 複合体から D1/D2 最小単位を精製するために，PSII の反応中心 D1/D2 ヘテロダイマーをコードする最も発現量の高い psbA1, psbD1 遺伝子を耐熱性 D1*, D2*ポリペプチドをコードする psbA1*, psbD1*遺伝子に置換した *Synechococcus elongatus* PCC7942 の組換え体を作成した．D1*，D2*に特異的なウサギ抗体を用いたウェスタン分析の結果，psbA1*/psbD1*遺伝子置換株ではチラコイド膜および精製 PSII 複合体に D2*タンパク質が取り込まれていたが，D1*タンパク質はいずれの試料にも検出されなかった．その原因として D1 と D1*の C 末端 16 アミノ酸配列の相違により C 末端プロセシングが起こっていないことが示唆された．そこで，D1*のプロセシング部位 Ala344 以降の 16 アミノ酸配列を *S. elongatus* PCC 7942 の配列に置換した場合について D1*の発現を検討中である．また，変異株の作成方法について改良を加え，1 点相同組換えを介した遺伝子置換を行う rps12 媒介遺伝子置換法（マーカーフリー組換え法）を導入し，実効性を確かめている．

Preparation of cyanobacterial mutants incorporating thermostable D1/D2 protein in the reaction center of photosystemII and optimization of C-terminal sequence of D1 protein

○Kenichi Shioya, Kaisei Tsuruda, Norihisa Haraguchi, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Masayoshi Matsuoka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words photosystem II, cyanobacteria, protein expression, thermostability

2P-E007 リボレギュレーターを用いた *cyabrB2* 遺伝子の発現制御によるグリコーゲン高生産シアノバクテリアの構築

○上野 絹子[1,2], 酒井 雄大[1,2], 生野 千佳[1,2], 坂本 一平[1,2], 塚越 かおり[1], 日原 由香子[2,3], 早出 広司[1,2], 池袋 一典[1,2]
（[1]農工大院・工, [2]JST・CREST, [3]埼玉大院理工）
ikebu@cc.tuat.ac.jp

近年，シアノバクテリアはバイオ燃料関連化合物生産の宿主として注目され研究が進められている．シアノバクテリアは染色体上に有する代謝関連遺伝子の発現制御によりバイオマス燃料関連化合物の生産能が向上することが明らかとなっており，当研究グループはシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) が有する転写因子である cyAbrB2 を欠損させることで菌体内におけるグリコーゲン蓄積量が増加することを報告している．しかし代謝関連遺伝子の多くは菌体の生育に必須であり，その制御には染色体上の遺伝子を欠損させずに発現制御できるノックダウン法が望ましい．これまでにシアノバクテリアにおいて機能するノックダウン法として，標的遺伝子のリボソーム結合配列 (RBS) に相補的な配列を持つ RNA 断片を用いたアンチセンス RNA 法や CRISPRi 法が報告されているが，染色体上の類似配列に対する RNA 断片の非特異結合によって標的以外の遺伝子発現に影響を与える可能性があり，シアノバクテリアにおいて機能する新規ノックダウン法が求められている．
そこで本研究ではリボレギュレーターを用いたノックダウンを試みた．リボレギュレーターは，RBS に対し結合する cr 配列を含む *cis*-repressed mRNA と，cr 配列と相補鎖形成可能な *trans*-activating RNA (taRNA) を用いて遺伝子発現制御が可能な RNA ツールである．リボレギュレーターを用いた場合，RBS に対し結合する cr 配列を人工的に設計することで標的遺伝子のみを特異的にノックダウンできる．また，taRNA の転写を制御することで任意のタイミングにおけるノックダウンの解除も可能である．本研究では，ゲノム DNA 上にリボレギュレーターに連結した *cyabrB2* 遺伝子を挿入し *Synechocystis* が有する *cyabrB2* 遺伝子の発現制御を行うことで，*cyabrB2* 遺伝子のノックダウンおよびグリコーゲンの高生産に成功した．

Applying riboregulator to expressional regulation of chromosomal gene *cyabrB2* in *Synechocystis* sp. PCC6803 for higher glycogen production

○Kinuko Ueno[1,2], Yuta Sakai[1,2], Chika Shono[1,2], Ippei Sakamoto[1,2], Kaori Tsukakoshi[1], Yukako Hihara[2,3], Koji Sode[1,2], Kazunori Ikebukuro[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]CREST, JST, [3]Grad. Sch. Sci. and Eng. Inst. for Environ. Sci. Technol. Saitama Univ.)

Key words cyanobacteria, biomass, synthetic biology, glycogen

2P-G008 新奇糸状性シアノバクテリアの SigB 相同性因子の特徴付けと発現解析

○菅原 卓也[1], 鎭西 真理子[1], 川又 透[1], 田島 直幸[2], 兼崎 友[3], 中平 洋一[1], 吉川 博文[4], 佐藤 直樹[2], 朝山 宗彦[1]
（[1]茨城大農・資生科, [2]東大院・総合文化, [3]東農大・ゲノムセ, [4]東農大・応生科）
munehiko.asayama.777@vc.ibaraki.ac.jp

【背景と目的】 真性細菌の RNA ポリメラーゼ (RNAP) ホロ酵素は，コア酵素にシグマ因子サブユニットが結合して機能し，シグマ因子は遺伝子プロモーター認識特異性を与える．シグマ因子はその構造や機能に基づき 3 つのグループ (グループ 1, 2, 3) に分類されている．本研究では自己溶菌を特徴とする新奇糸状性シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. ABRG5-3 株におけるグループ 2 相同性シグマ因子 SigB (5-3_SigB) の機能解明の一環として，分子構造の特徴づけ並びにストレス培養条件下での発現量を解析することを目的とした．
【方法】 5-3_SigB のアミノ酸配列に基づき分子進化系統樹解析並びに蛋白質立体構造の予測を行なった．更に，対数増殖期および定常期において環境 (温度・栄養源・暗黒) ストレスを与えた細胞より可溶性蛋白質画分を抽出し，5-3_SigB 抗体を用いたウェスタンブロットによって 5-3_SigB 発現量を解析した．
【結果と考察】 分子進化系統樹解析より 5-3_SigB がグループ 2 シグマ相同性因子であることが明らかとなった．また 5-3_SigB 立体構造の予測を基に，他のシアノバクテリア SigB アミノ酸配列と比較すると，region 4 (-35 プロモーター配列の認識に必要) に特徴的な酸性アミノ酸が含まれていた．一方，5-3_SigB 発現に関しては，対数増殖期特異的に熱および窒素欠乏ストレス下で SigB (39 kDa) 量が増加していたが，暗黒下では変化していなかった．また定常期では SigB シグナルは検出されなかった．以上の結果，5-3_SigB は細胞生育相特異的に多様な環境ストレスに対応する遺伝子の転写誘導に関わっている可能性が推察された．これまで解析が進んでいるシアノバクテリア代表株 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の SigB と比較した 5-3_SigB 発現の共通性ならびに独自性について考察する．

Characterization and expression analysis of sigma-factor homolog SigB in novel filamentous cyanobacteria

○Takuya Sugawara[1], Mariko Chinzei[1], Toru Kawamata[1], Naoyuki Tajima[2], Yu Kanesaki[3], Yoichi Nakahira[1], Hirofumi Yoshikawa[4], Naoki Sato[2], Munehiko Asayama[1]
([1]Dept. Bioresour. Sci., Coll. Agric., Ibaraki Univ., [2]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, [3]Genome Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words filamentous cyanobacteria, RNA polymerase, sigma factor, transcription

2P-G009 分岐鎖ポリアミンが珪藻のシリカ被殻形成に与える影響

○片山 翔太, 秀瀬 涼太, 松田 祐介, 藤原 伸介
（関西学院大院・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

長鎖ポリアミンは珪藻の有するシリカ被殻の構成成分の一つであり，効率的に被殻形成を行う上で重要であることが知られている [(1)]．一方で，N^4-aminopropylspermidine [3(3)4] や N^4-bis(aminopropyl)spermidine [3(3)(3)4] などの分岐鎖ポリアミンは好熱菌にのみ見られる特殊構造を有するポリカチオンである．この分岐鎖ポリアミンは低濃度で DNA を凝集する[(2)]ことができ，超好熱菌においては，高温での生育に必須である[(3)]．本研究では *Thermococcus kodakarensis* 由来の分岐鎖ポリアミン合成酵素 *Tk*-BpsA を低温で機能するように改変し，海洋性珪藻 *Thalassiosira pseudonana* に導入し，分岐鎖ポリアミンがシリカ被殻の形状に及ぼす影響を検証した．
先行研究において *Tk*-BpsA はスペルミジンから 3(3)4 を経て 3(3)(3)4 を合成し，90℃において最大活性を示す．珪藻 *T. pseudonana* の生育温度は約 20℃であることから，より低温で *Tk*-BpsA が分岐鎖ポリアミンを合成できるような低温適応変異体の作出を試みた．その結果，158 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した *Tk*-BpsA-D158A は 20℃で分岐鎖ポリアミンを合成することがわかった．プラスミドを介して *Tk-bpsA*-D158A を *T. pseudonana* に導入し，細胞内のポリアミン組成を HPLC にて解析した．その結果，*Tk-bpsA*-D158A を保持する株では 3(3)(3)4 の合成が確認できた．電子顕微鏡による形態観察を行なったところ，野生型と異なるねじれた形状が観察された．分岐鎖ポリアミンは珪藻のシリカ被殻形成に影響を及ぼすことが示唆された．

(1) Kröger,N. and Poulsen,N., Annu.Rev.Genet., 42, 83-107 (2008)
(2) Muramatsu, A. et al., J. Chem. Phys.145, 235103 (2016)
(3) Okada, K., et al., J.Bacteriol., 196, 1866-1876, (2014)

Branched-chain polyamine induces structural change of diatom bio silica

○Syota Katayama, Ryota Hidese, Yusuke Matsuda, Shinsuke Fujiwara
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words *Thalassiosira pseudonana*, *Thermococcus kodakarensis*, polyamine, silica

2P-G010 *Bacillus* 属細菌が形成するシリカ内部に含まれる長鎖ポリアミンの発見

○中川 美樹, 田中 達也, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
（広島大院・先端物質）
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】 ケイ素（シリコン, Si）は酸素に次いで地殻上に二番目に多く存在する元素であり，産業的にも広く利用されている．珪藻や海綿などの一部の真核生物が，可溶性のケイ酸($Si[OH]_4$)の形でケイ素を積極的に取り込み，その重合体であるシリカ（SiO_2）を骨格や殻などとして利用することは古くから知られていたのに対し，原核生物とケイ素の関わりについてはこれまでほとんど報告がなかった．当研究室では，グラム陽性細菌 *Bacillus cereus* とその近縁種が胞子形成期に多量のケイ素を取り込み，シリカとして蓄積していることを発見した．蓄積されたシリカは胞子殻とその近傍に局在し，胞子の酸耐性を向上させることも明らかにした．現在は，本菌のシリカ蓄積メカニズムの解析を進めている．本研究では，シリカ内部に含まれる有機物がシリカ形成に関与しているのではないかと予想し，シリカ中の有機物の抽出とその同定を試みた．
【方法・結果】 *B. cereus* をケイ酸を添加した培地で培養し，シリカを蓄積した胞子を回収した．胞子を強酸中で強熱することでシリカ外部の有機物を分解し，超遠心によりシリカを回収した．このシリカをフッ化アンモニウム処理にて溶解し，溶出した画分を SDS-PAGE に供した．泳動後のゲルを CBB で染色したところ低分子量の領域にバンドが確認された．質量分析による解析の結果，観察されたバンドはタンパク質ではなく，非常に長い長鎖ポリアミン(long-chain polyamine; LCPA)であることが判明した．珪藻や海綿の形成するシリカ中にも構造のよく似た LCPA が存在することが報告されていることから，シリカ形成において LCPA は真核生物と原核生物に共通する何らかの重要な役割を果たしていることが強く示唆された．現在，本菌のシリカ形成における LCPA の役割の解明と LCPA 生合成系の解析を進めている．

Long-chain polyamines embedded in the biosilica of *Bacillus cereus*

○Miki Nakagawa, Tatsuya Tanaka, Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Bacillus cereus*, silica, long-chain polyamine, spore

2P-G011 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の RNA ポリメラーゼの成熟と転写に及ぼす影響

○家森 優佳[1], 濱川 匡史[1], 秀瀬 涼太[1], 兼崎 友[2],
貝沼(岡本) 章子[3], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工, [2]東京農大・ゲノムセ, [3]東京農大・応生科・醸造)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】ポリアミンとは分子内に複数のアミノ基を持つ脂肪族炭化水素の総称である．超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis（生育至適温度：85℃）はスペルミジン[34]など一般的な直鎖状ポリアミンに加えて，分岐した構造をもつポリアミンである N^4-ビス(アミノプロピル)スペルミジン[3(3)(3)4]を有する．しかし，好熱菌における分岐鎖ポリアミンの生理的な機能は不明である．我々は分岐鎖ポリアミンが特定の遺伝子の発現制御に関与すると考え，*T. kodakarensis* で分岐鎖ポリアミンが発現制御する遺伝子を特定し，特に RNA ポリメラーゼ（RNAP）の高次構造形成と安定性に与える影響を調べた．
【方法と結果】*T. kodakarensis* の分岐鎖ポリアミン合成酵素遺伝子を破壊した BpsA 破壊株は，90℃以上では野生株に比べ比増殖速度が著しく低下する．破壊株を９０℃で培養し，全 RNA を抽出し，破壊株で転写量が顕著に変動した遺伝子を RNA-Seq 法で解析した結果，転写量が増加した遺伝子は 434 種類，減少した遺伝子は 21 種類あった．さらにプロテオミクス解析で発現量が減少した遺伝子を調べると RpoL が含まれていた．トランスクリプトーム解析では RpoL 遺伝子の転写量に変動はなかったため，RpoL の発現量はタンパク質レベルで分岐鎖ポリアミンの制御を受けると考えられる．本菌では分岐鎖ポリアミンにより RNAP の安定性が影響を受けると推察された．そこで BpsA 破壊株を親株とし，RpoL サブユニットの N 末端領域に His-tag を導入した株（DBP1-HisRpoL）を作出した．親株 KUWL 株（HisRpoL 株）及び DBP1-HisRpoL 株を 85℃で培養し，各細胞抽出液を Ni キレートカラムに供し，RpoL-His の溶出画分を SDS-PAGE で解析した結果，KUWL 株と比べて DBP1-HisRpoL 株由来 RNAP のサブユニットの多くが消失した．この結果は RNAP が分岐鎖ポリアミン依存的に安定化されることを強く示唆する．

Effect of branched-chain polyamine on RNA polymerase and gene expression in the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis.

○Yuka Yamori[1], Masafumi Hamakawa[1], Ryota Hidese[1], Yu Kanesaki[2],
Akiko Okamoto-Kainuma[3], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Genome Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. of Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

Key words *Thermococcus kodakarensis*, branched-chain polyamine, transcription, RNA polymerase

2P-G012 極限環境微生物の新奇ホモキラルポリ-γ-グルタミン酸合成システム

○芦内 誠[1,2], 白米 優一[2], 福永 愛[1]
([1]高知大・農, [2]愛媛大院・連合農)
ashiuchi@kochi-u.ac.jp

【背景】ポリ-γ-グルタミン酸（ＰＧＡ）は納豆の糸の主成分として有名だが，納豆菌の他にもＰＧＡを作る微生物は存在し，その多くが極限環境微生物という事実は注目に値する．一方，多種多様な生物種で全ゲノム情報が公開されているにもかかわらず，極限環境微生物のＰＧＡ合成システムの分子情報に関してはその糸口さえ得られずにいた．そのため，極限環境微生物のＰＧＡ合成システムは納豆菌とは異なる全く未知の装置による可能性も指摘されていた．演者らは，極限環境微生物（超好塩アーキアの一種）の *Natrialba aeyptiaca* を対象に，ホモキラルＰＧＡ合成システムをコードする遺伝子群の同定に取り組んできた．今回，その候補となるＤＮＡ配列に焦点をあて中核遺伝子群の解析を試みた．
【方法・結果】ＰＧＡの強力な材料表面接着性と塩基性色素結合能，さらに異種ポリマーの剥離分解を目的とする酸性処理工程を加えることで（遺伝子組み換え体を含む）ＰＧＡ生産菌のハイスループット検出法を確立した．今回発見した最有力候補遺伝子については便宜上 ORFa1/ORFa2 と名付けた．*N. aeyptiaca* にはパラログ遺伝子オペロンも存在することが判明した（ORFb1/ORFb2）．そこで，各候補遺伝子（群）の大腸菌発現ベクターを構築するとともに，同発現クローン株を作製後，ハイスループット検出法を用いてＰＧＡ生産能を解析，評価した．

Novel systems for homo-chiral poly-γ-glutamate synthesis from extremophiles

○Makoto Ashiuchi[1,2], Yuichi Hakumai[2], Ai Fukunaga[1]
([1]Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ., [2]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Ehime Univ.)

Key words poly-gamma-glutamate, extremophiles, biosynthesis, molecular cloning

2P-G013 トランスポゾン挿入による大腸菌組換えプラスミドの異常

○相原 惇也, 中村 美紀子, 星田 尚司, 赤田 倫治
（山口大院・創成科学・化学系）
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

大腸菌での組換え遺伝子構築には高コピー化する pUC 系のプラスミドが広く用いられている．クローニング用の大腸菌株は様々な種類があるが，組換え宿主としていくつかの遺伝子変異が与えられているので，一般的に導入されたプラスミドは安定に維持されていると考えられている．タンパク質生産用プラスミドではタンパク質発現量の増強に加え，クローニングした遺伝子に変異が入らないことも重要であり，もしクローニング後の大腸菌内で目的遺伝子が変化しているようであれば致命的な問題となる．本研究では赤色蛍光タンパク質(eEmRFP)を用いてプラスミド上の遺伝子の安定性について調べた．
大腸菌型のコドンに最適化した eEmRFP を高発現するプラスミドを作製し，大腸菌宿主 DH5α 株に導入した．このコロニーは赤色を示したが，新たにプレート上にコロニーを形成させると赤いコロニーだけでなくしばしば白色コロニーが現れた．この白色コロニーのプラスミド構造を調べたところ eEmRFP 内に何らかの DNA が挿入されていることが分かった．シークエンス解析によりこの配列はトランスポゾン Tn10 であることがわかった．そこで，eEmRFP 内の Tn10 トランスポゾンのターゲティング配列を改変した変異型 eEmRFP を作製した．この変異型 eEmRFP でも赤色コロニーとなったのでさらにコロニーを形成させたところ，このプラスミドでも白色コロニーが現れた．同様に調べてみると，今度は変異型 eEmRFP の別の位置に別のトランスポゾンが入っていることが分かった．DH5α 株ではクローニングした遺伝子がトランスポゾンの挿入にさらされていることがわかった．現在，様々な大腸菌宿主にプラスミドを導入してトランスポゾンが挿入されにくい宿主を探している．

Emergence of aberrant plasmid by transposon insertion in *Escherichia coli*

○Junya Aihara, Mikiko Nakamura, Hisashi Hoshida, Rinji Akada
(Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Thec. Inov. Yamaguchi Univ.)

Key words plasmid, *Escherichia coli*, transposable element

2P-G014 PPR タンパク質の核酸認識機構を利用した新規 DNA/RNA 操作技術の開発

○八木 祐介[1,2], 中村 崇裕[1,2]
([1]九大院・農・, [2]エディットフォース（株））
yyagi@agr.kyushu-u.ac.jp

Pentatricopeptide repeat (PPR)タンパク質は 35 アミノ酸からなる PPR モチーフの連続体(2~26 個のモチーフ)で構成されている．PPR タンパク質は植物に幅広く分布し，葉緑体とミトコンドリア遺伝子の遺伝子発現調節に様々な段階で関与している．先行研究から PPR タンパク質は１つの核酸(DNA/RNA)分子と配列特異的に結合し，RNA の安定性，スプライシング，切断，編集，翻訳，転写に関与すると報告されていたが，その基質認識機構については長く不明であった．我々は，PPR と RNA の結合において，1 つの PPR モチーフが 1 つの塩基に対応することと PPR モチーフ中の特定の位置のアミノ酸の組み合わせが結合する塩基を決定する暗号(PPR コード)として機能することを見出した．この PPR コードに基づき，標的とする RNA 配列に結合する人工 PPR タンパク質を構築したところ，配列特異的な結合が確認された．さらに，PPR と RNA の結合法則が DNA に結合する PPR タンパク質にも適用できる知見が得られてきている．近年，ゲノム編集技術を利用し，数十億塩基対のゲノムから特定の DNA 配列を生体内で狙って操作し，細胞内の核酸を自在に制御することが可能になっている．この技術に TALE とほぼ同様の構築方法で DNA に結合する PPR タンパク質を適用できると考えている．本発表では，PPR モチーフの基質認識機構とそれを利用した細胞内核酸(DNA/RNA)操作技術への応用可能性を議論する．

Development of novel DNA / RNA manipulation technique using PPR protein motif

○Yusuke Yagi[1,2], Takahiro Nakamura[1,2]
([1]Fac. Agr. Kyushu Univ., [2]EditForce.inc.)

Key words genome engineering

2P-G015 *Rhodococcus-Escherichia coli* シャトルベクターの開発及びそれを用いたアミノケトン不斉還元酵素遺伝子の発現

○山村 栄虎, 藤本 昇
（協和ファーマケミカル）
eitora.yamamura@kyowa-kirin.co.jp

【背景と目的】放線菌は，物質の生産や分解など多用途に利用されており，その物質生産に関与する有用な酵素も多く発見されている．放線菌の中でも，*Rhodococcus* 属細菌は大腸菌と比較して，有機溶媒に対して耐性が高く，芳香族や脂肪族などを変換する能力が高いことが多いことから，*Rhodococcus* 属細菌で見出した酵素は，*Rhodococcus* 属細菌を宿主として発現させた方が物質生産に有利であると考えられる．そこで，新規の遺伝子発現系を開発し，*Rhodococcus* 属細菌を宿主とした組換え菌による遺伝子発現を行った．
【方法と結果】(1) *Rhodococcus* 属細菌のプラスミドの探索：*R. erythropolis* のプラスミドをスクリーニングしたところ，5 株の *R. erythropolis* がプラスミドを保持していることが示唆された．(2) *Rhodococcus* 属細菌の発現ベクターの開発：得られたプラスミドの塩基配列を解析した結果，2 種類に分類することができた．取得した 2 つのプラスミド pRET1100 及び pRET1200 は和合性のあるプラスミドと推察され，*Rhodococcus* 属細菌の発現ベクターの開発に有効であると考えられた．大腸菌ベクター pHSG299 に制限酵素消化した pRET1100 または pRET1200 を挿入した pRET1102 または pRET1202 を *R. erythropolis* MAK-34 に遺伝子導入したところプラスミドを保持していることが示唆されたことから *R. erythropolis*-大腸菌シャトルベクターを作製できたことが示唆された．(3) *R. erythropolis* MAK-34 における *R. erythropolis* 由来アミノケトン不斉還元酵素遺伝子の発現：シャトルベクターにプロモーターと *R. erythropolis* 由来アミノケトン不斉還元酵素を挿入し *R. erythropolis* MAK-34 に遺伝子導入した所，高い活性向上を示した．以上，今回開発した *Rhodococcus* 属細菌を宿主とした新規の遺伝子発現系は，他の *Rhodococcus* 属細菌由来の酵素生産に有用と考えられる．

Expression of the aminoketone asymmetric reductase gene using novel *Rhodococcus-Escherichia coli* shuttle vector

○Ei-Tora Yamamura, Noboru Fujimoto
(Kyowa Pharma Chemical Co., Ltd.)

Key words gene expression, shuttle vector, *Rhodococcus*, asymmetric reduction

2P-G016 大腸菌を宿主とした N^G-ヒドロキシ-L-アルギニン生産系構築の試み

○折川 明日美, 山本 美也子, 黒田 照夫, 杉山 政則, 熊谷 孝則
（広大院・医歯薬保健学）
tkuma@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 抗結核薬 D-サイクロセリンの生合成経路において, 生合成原料であるヒドロキシウレア（HU）は, L-アルギニンが DcsA により酸化され N^G-ヒドロキシ-L-アルギニン（NHA）が生成した後, NHA が DcsB により加水分解されることで供給される [1]．本研究では, 大腸菌を宿主とした抗癌剤 HU の生産系の構築を最終目的として, その前駆体である NHA の大腸菌を宿主とした生産系の構築を試みたので, その結果について報告する．

【方法および結果】 DcsA の活性発現には, NADPH, フェレドキシン（FDX）, フェレドキシン還元酵素（FDR）および NADPH 再生酵素が必要である．そこで, まず, 大腸菌を宿主として, ホウレン草由来 FDX および FDR の発現を試みた．コドンを最適化した遺伝子を用いることにより, 両タンパク質は可溶性のタンパク質として良好に発現した．精製した FDX および FDR は, それぞれのタンパク質ファミリーに特徴的な吸収スペクトルを示し, 両タンパク質は活性を保持しているものと考えられた．次に, 大腸菌を宿主として, NADPH 再生酵素である Zwf（glucose 6-phosphate dehydrogenase）の発現を試みた．その結果, Zwf は良好に発現し, 精製したタンパク質は NADPH 再生活性を保有していた．現在, 精製した各タンパク質を用いて, *in vitro* における DcsA の活性検出を試みている．

[1] Kumagai T. *et al.Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3682-3689 (2012).

Heterologous production of N^G-hydroxy-L-arginine by *Escherichia coli*

○Asumi Orikawa, Miyako Yamamoto, Teruo Kuroda, Masanori Sugiyama, Takanori Kumagai
(Grad. Sch. Biomed. & Health Sci., Hiroshima Univ.)

Key words N^G-hydroxy-L-arginine, hydroxyurea, heterologous production

2P-G017 coryneazolicin 生合成遺伝子クラスターの異宿主発現

○田熊 桃子, 黒羽 真以, 小谷 真也
（静大・創科技院）
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

リボゾームによって生産され修飾を受けるペプチドの中でもチアゾール環およびオキサゾール環を含むペプチドは thiazole/oxazole-modified microcin(TOMM)に分類される．TOMM に含まれるペプチドは，抗菌活性など多様な生理活性を有することで注目されている．Deane らは *Corynebacterium urealyticum* のゲノム上に存在している TOMM の coryneazolicin 生合成関連遺伝子の発現実験を行い，*in vitro* で coryneazolicin を生産した(Deane et al. ACS Chem Biol. 2016)．しかしながら，生産量が低く，活性は報告されていない．そこで，大量生産を目指し，本研究では coryneazolicin の大腸菌による *in vivo* 生産を目的とし，大腸菌を用いた異宿主発現を行った．まず，coryneazolicin 生合成遺伝子 *CurABCDEFGH* を PCR で増幅し，pET28a へクローニングした．大腸菌で発現を行ったところ，ごく微量の coryneazolicin の生産が確認された．さらに，アミノ酸置換体の作成を最終目標として，構造遺伝子を含むプラスミド pCDFDuet-CurA および修飾遺伝子群を含むプラスミド pET28a-CurEFGH を構築した．この 2 つのプラスミドを *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入し，発現実験を行ったところ，coryneazolicin のデメチル体の生産が見られた．

Heterologous expression of biosynthetic gene cluster of coryneazolicin

○Momoko Takuma, Mai Kuroha, Shinya Kodani
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words antibacterial peptide, heterologous expression, *Corynebacterium urealyticum*

2P-G018 大腸菌-*Sphingomonas* 属細菌の発現用シャトルベクターの構築

○三宅 湧登, 小谷 真也
（静大・創科技院）
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

Sphingomonas 属細菌は，難分解物質分解細菌として研究が進んでいる土壌細菌である．そのため，大腸菌とのシャトルベクターの開発が行われている(Hayashi et al. Bicsci. Biotech. Biochem. 2014)．その知見に基づき，本研究において，シャトルベクターを構築し，さらに，*Shingomonas* で既に報告されているプロモーター配列(Kaczmarczyk et al. Appl. Environ. Microbiol. 2013)を組み込み発現ベクターの構築を行った．さらにそのベクターにラッソペプチド生合成遺伝子クラスターを組み込み，*S. subterranea* (NBRC 16086)に導入し発現を試みた．*S. yanoikuyae* (NBRC 15102) のプラスミド pYAN-1 から PCR によって repA 及び par 領域を増幅後，pHSG396 へ組み，pHSG396sp を得た．pHSG396sp にラッソペプチド生合成遺伝子クラスターを組み込み，ラッソペプチド発現ベクター pHSG396sp-16086lasso を得た．また，発現させるため遺伝子クラスター上流に，プロモーター配列を組み込んだ．ラッソペプチド発現ベクター pHSG396sp-16086lasso を *S. subterranea* にエレクトロポレーション法で導入した．ベクターを有した *S.subterranea* をおよびベクターの無い *S.subterranea* を培養し，化学分析を行ったところ，ベクターを有した *S.subterranea* にラッソペプチドの生産を確認した．

Construction of expression shuttle vector between *Escherichia coli* and *Sphingomonas*

○Yuto Miyake, Shinya Kodani
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words *Sphingomonas*, expression, shuttle vector, pYAN-1

2P-G019 比較進化工学：組換え蛋白質高発現に影響を与える宿主因子

○河原崎 泰昌, 田中 翔大, 田中 瑞己, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 伊藤 圭祐
（静県大・食栄）
kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景及び目的】活性型組換え蛋白質の収量増大を目的とした進化工学的アプローチにおいて，発現宿主の影響に関する知見は少ない．そこで，同一の祖先分子と同一のクローン選択基準を用いて進化工学的手法による機能改良を行い，最終的に得られたクローン群の配列を比較することにより進化工学における宿主因子の影響を検出可能であると考え，研究を行った．
【方法】野生型 GFP を祖先分子とし，大腸菌または出芽酵母を発現宿主とし，高温（37℃）発現環境においてフォールディング能が高まった GFP 変異体群を進化工学的に作出した．大規模変異導入はエラープローン PCR により行い，有効変異の集積（適応歩行）には DNA シャフリングを用いた．
【結果と考察】上記スクリーニング・有効変異集積を複数回繰り返し，大腸菌および出芽酵母発現系のそれぞれで野生型の数十倍に活性型発現量が改善したクローン群を得た．両者を比較したところ，F64L と V163A（ともに既知）の有効変異を共通して獲得しており，用いた宿主に固有のアミノ酸置換は見られなかった．これより，宿主および宿主因子は，“進化”の結果到達するアミノ酸配列に顕著な影響を与えないことが示された．しかしながら，大腸菌発現系で進化した GFP と酵母発現系で進化した GFP には，それぞれ固有の同義置換（サイレント変異）が集積していた．それらの変異は，それぞれの宿主において通常の使用頻度のコドンから，低使用頻度のコドンへの置換であった．これより，活性型組換え蛋白質の高発現系においては，co-translational folding の効率が影響を及ぼすことが示された．

A comparative study of directed evolution using *E. coli* and yeast as hosts

○Yasuaki Kawarasaki, Shota Tanaka, Mizuki Tanaka, Shogo Nakano, Sohei Ito, Keisuke Ito
(Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka.)

Key words combinatorial protein library, directed evolution, protein folding, recombinant protein production

2P-G020 細菌のビスフェノール A 耐性に関与する遺伝子の単離とその解析

○加賀 経元[1], 釜井 優花[1], 伊藤 小百合[1], 荷方 稔之[2], 酒井 保藏[2]
（[1]宇都宮大・工, [2]宇都宮大院・工）
nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp

【緒言】日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* は，多剤耐性を示し院内感染菌としてしばしば検出される．本細菌は低濃度(0.3 mM)のビスフェノール A（BPA）により増殖が阻害されることから，BPA 感受性メカニズムを解明することで新規微生物制御法の開発が期待できる．そこで本研究では，まず BPA 耐性である大腸菌の遺伝子破壊株ライブラリーを用いて BPA 感受性を示す破壊株のスクリーニングを行い，BPA 耐性に関与する遺伝子を特定することで大腸菌の BPA 耐性メカニズムを考察した．さらに大腸菌の薬剤排出ポンプの構成因子 TolC に着目し本タンパク質の排出活性を測定することで BPA 耐性との関係を検討した．
【使用菌株及び実験方法】大腸菌 BW25113 株の網羅的な単独遺伝子破壊株ライブラリである KEIO collection を用いて，1mM の BPA を含む LB 培地で 37℃，16 時間振盪培養を行い，感受性株をスクリーニングした．また大腸菌の薬剤排出活性はドキソルビシンを用い蛍光強度の経時変化をもとに初期値の蛍光強度に対する割合である相対蛍光強度で評価した．
【実験結果及び考察】KEIO collection を用いた大腸菌の破壊株ライブラリによる網羅的探索の結果，5 株の BPA 感受性株が得られ，これらは *rfaC, rfaF, rfaD, lpcA, tolC* の欠損株であった．TolC は薬剤排出ポンプを構成する外膜チャネルタンパク質であり，それ以外はリポ多糖の合成に関与する遺伝子であった．このことから大腸菌においては細胞外への排出や，細胞外膜の構造が BPA 耐性に関与していることが示唆された．そこで大腸菌において BPA 存在下で TolC の排出活性を測定したところ，BPA 濃度に依存してドキソルビシンの排出活性が減少したことから，BPA は TolC が関与する排出ポンプの基質となり得ることが示唆され，この BPA の排出が大腸菌の BPA 耐性の一因であると考えられた．

Identification and characterization of bacterial bisphenol A resistance genes

○Tsunemoto Kaga[1], Yuka Kamai[1], Sayuri Itou[1], Toshiyuki Nikata[2], Yasuzou Sakai[2]
([1]Fac. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words bisphenol A, bacteria, resistance

2P-N021 エチレン生成酵素遺伝子を組み込んだ *Corynebacterium glutamicum* によるエチレン生産

○魚住 昇平, 石原 杏里, 中山 泰宗, 長濱 一弘, 松岡 正佳
（崇城大・生物生命）
matsuoka@bio.sojo-u.ac.jp

エチレン生成酵素(EFE)は 2-オキソグルタル酸（2OG）依存性ジオキシゲナーゼの一種で 2OG からエチレンをつくる反応を触媒する．EFE の基質である 2OG は TCA 回路で生産されることから，TCA 回路の炭素フラックスが大きい *Corynebacterium glutamicum* 細菌内で EFE を発現させることで高効率のエチレン生産が期待される．
この研究では，*Pseudomonas syringae* pv.*phaseolicola* PK2 株由来の *efe* 遺伝子を 2 種のプラスミド pHT1 ，pECt に挿入し，pHT1-efe ，pECt-efe を作成した．*C.glutamicum* NBRC12168 の形質転換により得られた *C.glutamicum*/ pHT1-efe のエチレン生産能を確認した結果，グルコースを炭素源とする NB 培地，30℃でのエチレン比生産速度は最大で約 50nl ethylene h^{-1} $OD610^{-1}$ 程度と低かった．また，SDS-PAGE では EFE のバンドは確認できなかった．現在，*C.glutamicum*/ pECt-efe 形質転換体を作成中であり，エチレン生産能を確認し，エチレン生産 *C.glutamicum* の有用性を検討している．

Ethylene production by *Corynebacterium glutamicum* recombinants carrying the gene for ethylene-forming enzyme

○Shouhei Uozumi, Anri Ishihara, Yasumune Nakayama, Kazuhiro Nagahama, Masayoshi Matsuoka
(Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words ethylene, TCA cycle, 2-oxoglutarate, ethylene-forming enzyme

2P-G022 *Corynebacterium glutamicum* における銅（II）添加によるグルタミン酸生産機構の解明

○尾形 駿介, 平沢 敬
（東工大・生命理工学院）
thirasawa@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】我々は，グルタミン酸生産菌として知られるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* について，グルタミン酸生産に対する金属添加によるストレスの影響を解析してきた．そして，グルタミン酸の細胞外への排出にかかわるメカノセンシティブチャネルである NCgl1221 の gain-of-function 変異株の培養時に銅（II）添加すると，顕著なグルタミン酸生産が引き起こされることを明らかにした (昨年度の本大会にて報告)．本発表では，銅（II）添加時におけるグルタミン酸生産機構の解明を目指し，NCgl1221 遺伝子やグルタミン酸生産時に起こる 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性低下にかかわる *odhI* 遺伝子について，銅（II）添加時におけるプロモーター活性を解析したので報告する．
【実験方法および結果】グルコースを炭素源とした合成培地で培養した *C. glutamicum* の野生株に対して銅（II)を対数増殖初期に添加し，グルタミン酸生産と *lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイによる *odhI* 遺伝子のプロモーター活性を測定したところ，顕著なグルタミン酸生産は確認されず，*odhI* プロモーター活性は低下していた．一方，NCgl1221 の gain-of-function 変異株では，銅（II）添加により *odhI* のプロモーター活性は上昇した．このことから，NCgl1221 メカノセンシティブチャネルが開いた状態にあることで，銅（II）添加による *odhI* 遺伝子の発現が上昇し，グルタミン酸の生産が引き起こされると推測された．また，NCgl1221 のプロモーター活性は銅（II）添加後どちらの菌株でも上昇しており，銅（II）添加によりグルタミン酸排出系が増強されることが推測された．

Analysis of copper-induced glutamate production mechanism in *Corynebacterium glutamicum*

○Shunsuke Ogata, Takashi Hirasawa
(Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, glutamate fermentation, Cu^{2+}, mechanosensitive channel

2P-G023 コリネ型細菌におけるシステイン排出系の探索

○岸野 真弓, 近藤 麻梨子, 松久 和歩, 平沢 敬
（東工大・生命理工学院）
thirasawa@bio.titech.ac.jp

【背景と目的】 システイン (Cys)は，製薬や化粧品・食品産業等において重要なアミノ酸であり，年間約 5000 トンが生産されている．しかしながら，その大部分が毛髪などからの抽出により生産されており，新たな Cys 製法のニーズが高まっている．我々は多くのアミノ酸の発酵生産に実績のあるコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を用いた Cys 発酵生産法の構築を目指し，研究を行っている．本研究では，Cys の生産性を向上させる手段の 1 つとして排出系の強化に着目し，コリネ型細菌では未知の Cys の排出にかかわるタンパク質をコードする遺伝子の同定を試みた．
【方法と結果】 大腸菌においては，Cys 排出タンパク質として既に EamA (YdeD)，EamB (YfiK)，Bcr，CydDC が同定されている．これらのアミノ酸配列との相同性から，コリネ型細菌における Cys 排出タンパク質のホモログ遺伝子の候補を検索した．高濃度の Cys は細胞に対して毒性を示し，大腸菌では Cys 排出タンパク質の欠損により Cys に対する感受性が増大することが知られている．そこで，各ホモログの欠損株について，増殖に対する Cys 添加の影響を検討したところ，CydDC ホモログの欠損により感受性が顕著に増大した．また，当研究室で構築した Cys 生産株において各ホモログ遺伝子を欠損させたところ，Cys 排出量はいずれの欠損株においても減少し，特に CydDC ホモログの欠損株で最も顕著だった．以上の結果から，CydDC のホモログがコリネ型細菌における Cys 排出に関与している可能性が示唆された．
本研究は，農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の一環として行われたものである．

Identification of cysteine efflux system in *Corynebacterium glutamicum*

○Mayumi Kishino, Mariko Kondoh, Kazuho Matsuhisa, Takashi Hirasawa
(Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, cysteine production, cysteine efflux system, CydDC

2P-G024 ABC トランスポーター EnkT の基質寛容性を利用した効率的な抗菌ペプチド・バクテリオシン分泌生産系の構築

○酒井 美由季 [1], 須志田 浩稔 [1], 石橋 直樹 [1], 善藤 威史 [1], 園元 謙二 [1,2]
（[1]九大院・農, [2]九大・バイオアーク）
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が有する ABC トランスポーター EnkT は，本株が生産する 4 種の抗菌ペプチド・バクテリオシン，enterocin NKR-5-3A，C，D，Z（Ent53A，C，D，Z）に加え，2 つの異種バクテリオシン，enterocin A および lactococcin Q の分泌能を有することが明らかになっている．そこで本研究では，この EnkT の特性を利用し，さらに多様な異種バクテリオシンの分泌生産，及びその効率化を試みた．
【方法】本実験では，基質として異種バクテリオシンである pediocin PA-1（PedA）及び lactococcin A（LcnA）を選択した．まず，各バクテリオシンの構造遺伝子及び自己耐性遺伝子を EnkT 遺伝子（*enkT*）と共発現させ，抗菌活性試験により分泌の有無を検証した．一方，バクテリオシンは N 末端に分泌のシグナルとなる固有のリーダーペプチド配列を伴った前駆体として合成されるが，それらを Ent53C リーダーペプチド（Lc），あるいはさらにアミノ酸点変異を導入した Lc（M-Lc）に置換することで EnkT による分泌量の増加が報告されている．そこで，分泌の効率化に向け，PedA 及び LcnA のリーダーペプチドを Lc，あるいは M-Lc に置換した変異株を構築し，それぞれの分泌量を評価した．
【結果】EnkT による PedA の分泌が確認され，リーダーペプチドを Lc に置換した株では分泌量の増加が確認された．対して，LcnA 発現株ではリーダーペプチドを Lc に置換した場合に菌体外分泌が著しく改善された．以上の結果から，EnkT の基質受容における高い寛容性と，さらにその効率を改善可能な Lc のシグナル配列としての有用性が示された．一方，M-Lc を用いた場合には，いずれの異種バクテリオシンにおいても Lc と比較して分泌量の変化は確認されなかった．今後は，EnkT により分泌可能な基質の探索を行うとともに，領域的変異導入による Lc 配列のシグナルとしての最適化を進める．

Development of an effective bacteriocin secretion system by EnkT, the multiple bacteriocin transporter.

○Miyuki Sakei[1], Hirotoshi Sushida[1], Naoki Ishibashi[1], Takeshi Zendo[1], Kenji Sonomoto[1,2]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words bacteriocin, ABC transporter, leader peptide, lactic acid bacteria

2P-G025 *Lactococcus* 特異的な抗菌活性を有するラクトコッシン Z の生合成遺伝子群の解析

Daba Ghoson Mosbah [1], 石橋 直樹 [1], ○善藤 威史 [1], 園元 謙二 [1,2]
（[1]九大院・農, [2]九大・バイオアーク）
zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】*Lactococcus lactis* QU 7 が生産する抗菌ペプチド・バクテリオシンであるラクトコッシン Z は，*Lactococcus* 属に特異的な抗菌活性を示し，同様に特異的な抗菌活性を示すラクトコッシン A に類似した構造を有する（1）．本研究では，ラクトコッシン Z の分泌や自己耐性などの生合成に関わる遺伝子群の同定とその機能を解明することを目的とした．
【方法・結果】すでに明らかとなっているラクトコッシン Z 構造遺伝子（*lczA*）近傍の塩基配列を解析し，約 5.1 kb の推定生合成遺伝子群が明らかとなった．相同性検索の結果，*lczA* の下流に，自己耐性遺伝子（*lczB*），ABC トランスポーター遺伝子（*lczC*），トランスポーターアクセサリータンパク質遺伝子（*lczD*）と推定される遺伝子が見出された．新たに見出された 3 つの遺伝子は，ラクトコッシン A 生合成遺伝子群の各遺伝子（*lciA*，*lcnC*，*lcnD*）とアミノ酸レベルでそれぞれ 25.5%，93.7%，95.3%の相同性を示した．次に，見出された各遺伝子について，構成発現型プラスミド（pMG36c）を用いた異種発現による機能解析を行った．その結果，*lczA*，*lczB*，*lczC*，*lczD* がラクトコッシン Z の分泌生産に必須であり，*lczB* が単独でラクトコッシン Z に対する自己耐性能を付与することが明らかとなった．さらに，同様にラクトコッシン A 生合成遺伝子群との比較解析を行ったところ，*lcnC* と *lcnD* を *lczC* と *lczD* に置換した場合にもラクトコッシン Z は分泌生産され，これらは同様の機能を持つことが明らかとなった．一方，*lczB* 発現株にはラクトコッシン A 対する交差耐性能がなく，*lciA* 発現株もラクトコッシン Z への交差耐性能を示さなかったことから，ラクトコッシン Z と A は同様の構造と抗菌スペクトルを有しながらも，異なる作用機構をもつことが推察された．
（1） Ishibashi *et al*., Probiotics Antimicrob Proteins (2015)

Functional analysis of the biosynthetic gene cluster of a *Lactococcus*-specific bacteriocin, lactococcin Z

Ghoson Mosbah Daba[1], Naoki Ishibashi[1], ○Takeshi Zendo[1], Kenji Sonomoto[1,2]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words bacteriocin, biosynthesis, *Lactococcus lactis*, lactic acid bacteria

2P-N026 *Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの大量発現と精製の試み

○鳥居 誉 [1], 田端 菜央 [2], 奥野 圭祐 [1], 阿野 貴司 [1,2], 岡南 政宏 [1,2]
（[1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工）
okanami@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】細菌が産生するエステラーゼは，一般的に動植物が産生するものより高い安定性を有することが知られている．また，細菌によって棲息する環境条件が異なるため，産生されるエステラ―ゼの至適反応温度，基質特異性，熱安定性などの特性も多岐に渡ることが予想される．このようなエステラーゼの特性の多様性は，生分解性プラスチックの効率的分解への利用に期待される．我々はこれまでに，高いエステラーゼ活性を示す *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株を環境中より単離している．4A 株が産生するエステラーゼは，熱安定性が高く，至適 pH が中性付近にあり，至適反応温度が中温付近にあることがわかった．また，遺伝子クローニングの結果，エステラーゼ活性をコードする遺伝子は約 1.5kbp であることもわかった．本研究では，組換えエステラーゼを大腸菌内で大量に発現させ，精製することを目的とした．
【方法と結果】*Stenotrophomonas* エステラーゼを組換えタンパク質として大腸菌内で大量発現させたところ，非常に効率よく発現することがわかった．また，組換えタンパク質を発現させた大腸菌の培養上清がエステラーゼ活性を示したことから，組換えタンパク質がエステラーゼ活性を保持することがわかった．しかし，発現させた組換えタンパク質のほぼすべてが inclusion body に取り込まれ，不溶性画分へ移行していた．培養温度，IPTG 濃度，培養培地など，様々な発現条件を試みたが，可溶性画分として回収することができなかった．そこで，尿素によって変性させ精製し，その後にタンパク質を再生することにした．予備的な実験で再生後の組換えタンパク質もエステラーゼ活性をもつことがわかったため，現在，大量精製と保存を試みているところである．本大会ではさらに，エステラーゼ遺伝子の発現調節機構についても報告する．

Overexpression and purification of a *Stenotrophomonas maltophilia* esterase

○Takashi Torii[1], Nao Tabata[2], Keisuke Okuno[1], Takashi Ano[1,2], Masahiro Okanami[1,2]
([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

Key words *Stenotrophomonas maltophilia*, esterase, recombinant protein

2P-G027 *Sphingomonas subterranea* からの新規ラッソペプチドの単離と構造決定

○黒羽 真以[1], 逸見 光[2], 亀山 眞由美[2], 小谷 真也[1]
（[1]静大・創科技院, [2]農研機構）
kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

ラッソペプチドは C 末端側の直鎖部が，N 末端側の環状部を貫通した構造をもつペプチドである．この特殊な構造は高温や酵素による分解に対して高い安定性を与える．発表者らによるゲノムマイニングの結果，新しいラッソペプチド生合成遺伝子遺伝子クラスターが *Sphingomonas subterranea* に存在していることが分かった．そこで本研究において，野生株から新規ラッソペプチドの単離と構造決定を行った．まず，*S. subterranea* NBRC16086 を培養し，メタノールで抽出後，HPLC を用いて分析した．ペプチド性化合物の生産が見られた為，ESI +-TOF-MS を用いて分析を行い，subterisin と命名した新規ラッソペプチドを単離した．構造決定に関して COSY, NOESY, HMBC, HMQC 等の 2 次元 NMR によって構造を決定した．また，MALDI-TOF/MS/MS 分析の結果，C 末端部分のアミノ酸配列が明らかとなった．大腸菌等の検定菌を用いたペーパーディスク法による抗菌活性を行ったが，活性は見られなかった．さらに subterisin の生合成遺伝子クラスター(約 2700bp)を PCR によって増幅後，発現用プラスミド pET41a へ組み込んだ．大腸菌をホストに用いて発現実験を行ったところ，発現していることを確認できたが，生産量が非常に少なかった．今後，さらに，発現条件の検討を行い，最適化を行っていく予定である．

Isolation and structure determination of new lasso peptide from *Sphingomonas subterranea*

○Mai Kuroha[1], Hikaru Hemmi[2], Mayumi Ohnishi-Kameyama[2], Shinya Kodani[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]NARO)

Key words lasso peptide, structure determination, *Sphingomonas subterranea*

2P-G028 大腸菌の酸刺激惹起性 DNA 取込み現象

渡邊 修平, 宮本 葉子, 清 啓自, ○吉田 ナオト
（宮崎大・農）
a04109u@cc.miyazaki-u.ac.jp

酢酸，乳酸，クエン酸などの有機酸には食品の腐敗を防止する作用があることは古くから知られている．これらの分子は非解離状態の時に細菌の細胞膜を透過し，細胞内 pH の恒常性を狂わせ毒性を発揮するといわれている．本発表においては，クエン酸刺激は大腸菌の DNA 取込み，形質転換を誘発するという新現象を紹介し，その機構を考察した．
[方法] DNA 受容菌としては *E. coli* JM109 を用い，LB プレートにて 37℃14-18 時間培養した．2-10 mM のクエン酸溶液に 0.5 μg/ml となるようにプラスミド pUC18DNA を加え，A600 の値が 0.1 になるように DNA 受容菌を懸濁させた．本懸濁液 50 μl を 100γ アンピシリンを含む LB プレートに塗布し，37℃で 18 時間培養した．アンピシリン耐性に形質転換したコロニー数を数え，酸惹起性 DNA の取り込みを評価した．
[結果及び考察]アンピシリン耐性へ形質転換した細胞は 1μg pUC18 あたり 10^3〜10^4 個出現した．酸刺激惹起性 DNA 取込みはクエン酸の他，乳酸，コハク酸，マレイン酸で見られた．クエン酸暴露後速やかに 200mM NaCl にて洗浄しても，形質転換体数に変化がないので，酸刺激惹起性 DNA 取込みはクエン酸暴露直後に起こっていると思われる．クエン酸と受容菌と pUC18 の混合状態に時間を与えると，形質転換対数は減少するので，取込んだプラスミドを吐出すことが考えられる．またクエン酸と受容菌の混合溶液に時間を与えても形質転換対数は減少するので，酸惹起性の DNA 取込み能力は，クエン酸暴露直後が最大であり，以後減衰していくことが予想される．トランスポゾン挿入による外膜タンパク質欠損株について，pUC18 の取込みを調べると，OmpA 欠損株が弱くなっていることがわかった．酸刺激惹起性 DNA 取込みには OmpA が関わっていることが示唆される．

Acid stimulus-triggered acquisition of competency on *Escherichia coli*

Shuhei Watanabe, Yoko Miyamoto, Keiji Kiyoshi, ○Naoto Yoshida
(Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words *Escherichia coli*, citric acid, transformation, OmpA

2P-N029 *Shewanella* 属細菌における cAMP 加水分解酵素 CpdA の新規機能の解析

○笠井 拓哉, 高妻 篤史, 渡邉 一哉
（東薬大・生科）
kazuyaw@toyaku.ac.jp

【背景】Cyclic AMP（cAMP）ホスホジエステラーゼ（CpdA）は多くの細菌に保存されており，グローバルレギュレーターである cAMP receptor protein（CRP）の補因子である cAMP を加水分解する活性を持つ. 一方, *Pseudomonas aeruginosa* では CpdA の欠損が cAMP 濃度非依存的にコロニーサイズの低下を引き起こすことが報告されている．したがって本酵素は cAMP の加水分解以外の活性を持つことが予想されるが，その機能については未解明である．一方，我々は金属還元細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 株における cAMP 濃度の制御機構を解析する過程で，本株の CpdA がこれまで知られていない生理機能を持つことを見出した．本発表では MR-1 株における CpdA の機能解明のため，本株の *cpdA* 遺伝子破壊株の表現型を解析した結果について報告する．
【結果】MR-1 株の *cpdA* 遺伝子破壊株（*ΔcpdA*）を作製し，cAMP 濃度を測定した結果，*ΔcpdA* は野生株（WT）の約 3 倍の cAMP を蓄積したことから，本株の CpdA が cAMP 加水分解酵素として働くことが示された．*ΔcpdA* の生育特性を調べた結果，乳酸を基質とした最少培地（LMM）において本変異株がほとんど増殖しないことが明らかとなった．この増殖阻害は cAMP 合成酵素（CyaABC）を欠損させても回復しなかったが，MR-1 株または大腸菌の *cpdA* の相補により回復した．以上の結果から MR-1 株の最少培地における増殖阻害は CpdA の cAMP 加水分解以外の活性に起因するものであると考えられた．増殖阻害の原因を探索するため *ΔcpdA* のトランスクリプトーム解析を行った結果，本変異株ではメチオニン，S-アデノシルメチオニンおよびヒスチジン合成遺伝子の発現量が著しく低下していた．これらの化合物を LMM へ添加すると *ΔcpdA* の増殖は大幅に改善されたことから，MR-1 株では CpdA がアミノ酸合成系の発現制御に関与することが示された．

Investigation of a novel function of cyclic AMP phophodiesterase in *Shewanella oneidensis* MR-1.

○Takuya Kasai, Atsushi Kouzuma, Kazuya Watanabe
(Sch.Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words *Shewanella*, cAMP phosphodiesterase

2P-G030 蛍光タンパク質を利用した酢酸菌細胞内 pH の評価

○繁 宥樹[1], 東久保 遥[1], 石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大院・理工, [2]マルカン酢）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】酢酸菌は，細胞膜結合型脱水素酵素によりエタノールを酸化し，酢酸を生産するため雑菌の繁殖を抑えることができる．なかでも酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は通気撹拌培養が可能であり，十分な菌体収量を確保することができる．本菌には 3 種の内在性プラスミドが存在し，遺伝子操作を行う実験基盤も整っている．これらの条件は本菌が物質生産系宿主として機能することを示唆する．本研究では細胞外 pH の低下に伴う，細胞内の pH 変動を調べ，異種タンパク質の発現宿主としての適正評価を目的とした．
【方法と結果】先行研究の知見に基づき，オワンクラゲの GFP タンパク質遺伝子を改変し，pH 感受性 GFP（pHluorin2）を構築した．pHluorin2 を大腸菌で発現誘導後，組換えタンパク質として精製した．得られた pHluorin2 を 2 点の励起波長(400 nm 及び 480 nm)に対する蛍光強度を測定し，pH 5-9 の範囲で pH 依存的な蛍光強度の変化を確認した．次に，pHluorin2 発現プラスミドを大腸菌 DH5α 及び *K. europaeus* KGMA0119 に導入し，細胞を培養して継時的に pHluorin2 の蛍光を観察した．大腸菌では，対数期から定常期にかけて細胞内の pH は中性付近で著しい変化は認められなかったのに対し，*K. europaeus* では，対数増殖期では 6 であり，定常期に入ると低下した．生育に伴い増加する酢酸生産量と連動し，細胞外 pH は著しく低下し，細胞内の pH もそれにともない低下していると考えられる．ただし，本菌では定常期に入り細胞外 pH が 3.5 に低下しても，細胞内 pH は 5 に留まっていた．細胞内 pH が著しく低下しない性質は，本菌が異種タンパク質発現用宿主としての可能性を示す．

Evaluation of cytoplasmic pH in acetic acid bacteria by using a fluorescent protein, pHluorin2

○Yuki Shige[1], Haruka Higashikubo[1], Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

Key words *Komagataeibacter europaeus*, fluorescent protein, cytoplasmic pH

2P-G031 大腸菌の乳酸発酵遺伝子 ldhA 発現による persister 形成とプロトン駆動力との関係

○山本 尚輝[1], 一色 理乃[1], 河合 祐人[1], 松本 慎也[2], 常田 聡[1]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]名大・医・細菌)
n-aoki.y@ruri.waseda.jp

近年，同一遺伝子を持つクローナルな細菌集団であっても，個々の細菌を見ると遺伝子発現量や表現型にばらつきがあることが明らかになった．persister は表現型のばらつきによって生じた多様な表現型の 1 つであり，増殖をほとんど行わず，様々な抗生物質に抵抗性を持つことが知られている．
当研究室では，これまでに非分裂細菌を検出する大腸菌マーカー株を独自に開発し，これを用いて persister を分取し，トランスクリプトーム解析を行った．その結果，乳酸発酵遺伝子である *ldhA* が persister で高発現することが明らかとなった．そこで，本研究では *ldhA* 発現による persister 形成メカニズムの解明を目的とした．
まず，*ldhA* の過剰発現株とノックダウン株における抗生物質オフロキサシンの抵抗性を比較したところ，コントロール株と比較して過剰発現株では persister が約 100 倍増加し，ノックダウン株では約 10 分の 1 に減少した．これらの結果から，*ldhA* 発現によって persister 形成が誘導されることが明らかとなった．次に，*ldhA* 発現による persister 形成メカニズムを調べるために，細菌のエネルギー代謝に着目した．特に persister ではエネルギー産生において重要なプロトン駆動力が減少するという報告があるため，染色キットを用いて *ldhA* 過剰発現株のプロトン駆動力を測定した結果，プロトン駆動力の著しい上昇が確認された．この結果は，プロトン駆動力と persister 形成の関係において既往の仮説と異なっている．そこで，*ldhA* 発現による persister 形成とプロトン駆動力の関連を調べるため，CCCP 添加によるプロトン駆動力阻害実験を行った．その結果，*ldhA* ノックダウンによる persister の減少が抑制された．以上の結果から，*ldhA* 発現による persister 形成とプロトン駆動力は関連しており，プロトン駆動力に関する既存の persister 経路とは異なることが示唆された．

The Relationship Between ldhA-Dependent Persister Formation and Proton Motive Force

○Naoki Yamamoto[1], Rino Isshiki[1], Yuto Kawai[1], Shinya Matsumoto[2], Satoshi Tsuneda[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Technol. Waseda Univ., [2]Dept. Bacteriol. Sch. Med. Nagoya Univ.)

Key words *ldhA*, persister, proton motive force, *E. coli*

2P-N032 汽水湖由来の新規極微小細菌のもつ推定プロテオロドプシンの機能解析

○村口 雄亮[1], 前島 由明[1], 鈴木 智大[2,3], 道羅 英夫[3], 金原 和秀[1], 新谷 政己[1]
([1]静大院・総合科技, [2]宇都宮大・バイオサイエンス教育研, [3]静大・グリーン研)
muraguchi.yusuke.16@shizuoka.ac.jp

静岡県浜松市に位置する佐鳴湖は滞留時間が長い汽水湖で，COD 値が高いという特徴がある．先行研究において，本湖から孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過可能な，16S rRNA 遺伝子配列レベルで新規性の高い菌株の分離培養に成功した．我々は以前，このような菌株のゲノム解析を行い，Unidentified bacterium M34 株 = JCM 31449，Unidentified bacterium M15 株 = JCM 31448，*Algoriphagus* sp.M8-2 株 = JCM 31448 から，光駆動型プロトンポンプ proteorhodopsin（PR）をコードすると推定される遺伝子を見出した．そこで本研究では，これらの菌株の光照射下における生残性の違いを調べるとともに，推定 PR がプロトンポンプとしての機能をもつかどうかを検証した．
6W，400~600 lux の LED ライトを用いて光照射の有無による各菌株の生残性の比較を，栄養を加えていない人工海水内，30℃で静置することで行った．培養から 12 日，28 日，35 日後，各条件の菌体懸濁液を Marine Broth (MB, Difco) 平板培地上に塗布し，CFU を計測して生残菌体数を比較した．その結果，M8-2 株について，光照射条件では非照射条件に比べ，培養から 28 日目では約 5 倍，35 日では約 10 倍，菌体が生残していることが認められた．
推定 PR の機能解析としては，各菌株で当該遺伝子が転写されているかどうかを，MB 液体培地で培養後，全 RNA を抽出し，ランダムプライマーを加えて逆転写後，各遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR（RT-PCR）で調べたところ，3 株ともその産物が認められ，転写されていることが示された．また，PR のプロトンポンプとしての機能は，光照射による pH 変化を追跡することで行った．その結果，M8-2 株では，光照射開始後，pH の低下が認められたことから，PR が実際に発現し，プロトンポンプとしての機能をもつことが示唆された．現在，他の 2 株についても調べている．

Genomic analysis of novel filterable bacteria isolated from a brackish lake

○Yusuke Muraguchi[1], Yoshiaki Maejima[1], Tomohiro Suzuki[2,3], Hideo Dora[3], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1]
([1]Grad.Sch.Sci.Technol.Shizuoka Univ., [2]Sch.Educ.Biosci.Utunomiya Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

Key words brackish lake, filterable bacteria, proteorhodopsin

2P-N033 ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の活性部位近傍への変異導入効果

○南部 友香, 柘植 丈治
(東工大院・物質理工・材料)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

[背景]微生物が蓄積するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は，PHA 重合酵素(PhaC)の作用により重合される．PhaC には，活性中心であるシステインを含むアミノ酸配列[GS]-X-C-X-[GA]-G が存在する．この配列は保存性が高く，活性が確認された全ての PhaC に存在するため，我々はこれを PhaC box と呼ぶことを提唱している．本研究では，この PhaC box 内に存在するアミノ酸に対して置換できる許容範囲を調べるために，点変異を導入し重合活性への影響について調べた．
[実験]*Ralstonia eutropha* 由来の PHA 重合酵素である $PhaC_{Re}$ の PhaC box（G-X-C319-X-G-G）内に存在する 319 位のシステイン（活性中心）及びその周辺の 317，321，322 位のグリシンに対して Overlap-PCR 法により点変異を導入し，モノマー供給酵素遺伝子を保持したプラスミドに挿入した．これを *Escherichia coli* XL1-Blue に形質転換した．組換え株は炭素源としてグルコースを含む LB 培地にて，30℃で振とう培養を行った．また，同様の組成の培地に PHA を染色可能な色素 Nile Red を含む寒天培地を作製し，これに組換え株を塗布し，30℃または 37℃で静置培養を行った．ポリマー蓄積の確認は，Nile Red プレートによる目視とガスクロマトグラフィー法にて行った．
[結果・考察]まず，PhaC box 内のアミノ酸をアラニンに置換した結果，活性中心である C319 の変異体のみポリマー合成能が欠失した．次に，セリン置換体を作成した結果，C319 に加えて G322 の変異体においてもポリマー合成能が欠失した．このことから，322 位はアミノ酸置換に対して許容性が低く，317 及び 321 位は許容性が高いことが示唆された．次に，PhaC 変異体を有する組換え株を 37℃で培養すると，30℃でポリマーを蓄積していた株のいくつかがポリマーの蓄積を行わなくなった．このことから，これらの株が有する PhaC 変異体には温度感受性があることが考えられる．

Polymerization activity of polyhydroxyalkanoate synthase having point mutation at its active site

○Yuka Nanbu, Takeharu Tsuge
(Dept. Mat. Sci. Eng, Tokyo Tech.)

Key words PhaC box, amino acid, temperature sensitive, *Ralstonia eutropha*

2P-G034 ヒドロゲルを用いた浮遊細胞マイクロアレイ技術の開発

○藤原 央之[1,2], 戸井田 力[2], 境 慎司[1], 田谷 正仁[1], 藤田 聡史[1,3]
([1]阪大院・基礎工, [2]産総研・バイオメディカル, [3]神戸大院・工)
s-fujita@aist.go.jp

【背景と目的】創薬開発プロセスにおいて，細胞を用いた候補薬剤やその関連遺伝子の評価が必須となる．大規模な候補薬剤スクリーニングを行う上で，ハイスループットな細胞評価技術基盤の開発が重要であり，細胞をサブミリ間隔でアレイ状に配置し機能評価を行う「細胞マイクロアレイ技術」が注目されている．従来のこの技術においては，基板に細胞を接着させる必要がある事から，血球系の浮遊細胞の評価には不適という問題があった．そこで，本研究ではヒドロゲルに注目し，細胞の周りをドーム状ゲルで覆うことで，浮遊性の細胞をアレイ状に固定する手法の開発を試みた．
【方法】ヒドロゲル形成のためのポリマーとしてアルギン酸を用いた．浮遊細胞を覆っているヒドロゲルとガラス基板の接着力向上のため，基板にアルギン酸を修飾させ，ゲルと基板に共有結合を作った．APS コートガラスをアルギン酸，EDC，NHS を溶かした MES 緩衝溶液（pH6.0）に一晩つけて撹拌した．ヒト慢性骨髄性白血病由来の浮遊細胞である K562 細胞とゼラチン，CaCl2 水溶液を含んだ RPMI1640 培地をアルギン酸修飾したガラスに 1 μL ずつスポットした．その溶液を 4 ℃で 10 分間冷やしてゲル化させ，アルギン酸を溶かした PBS 液をかけることで，ドーム状アルギン酸ゲルを作製した．培養のために RPMI1640 培地で満たし，37 ℃インキュベーターで 72 時間培養した．培養後，Calcein-AM で生細胞染色を行うことで，生存確認を行った．
【結果と考察】72 時間培養して，ドーム状のアルギン酸ゲルが基板から剥がれることはなかった．顕微鏡観察結果より，細胞がドーム内に閉じ込められていることが確認できた．また，細胞が Calcein-AM により染色されており，72 時間培養後の細胞の生存と増殖を確認した．今後は，本研究で開発した技術を用いて遺伝子導入が出来ることを示す予定である．

Development of cell microarray technology for non-adherent cells by using hydrogel

○Hiroyuki Fujiwara[1,2], Riki Toita[2], Shinji Sakai[1], Masahito Taya[1], Satoshi Fujita[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST, [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words microarray, non-adherent cells, hydrogel, gene transfection

2P-E035 コシヒカリを大粒化させる遺伝子の SNP マーカー選抜

○富田 因則[1], 上岡 莉枝子[2]
（[1]静大・グリーン科学技術研究所, [2]静大・農）
tomita.motonori@shizuoka.ac.jp

グローバル化の波で国際競争を余儀なくされるコシヒカリの低コスト多収化に有効な遺伝子を探索するため，これまで育種に利用されていない埋もれた遺伝資源である大粒変異種「いのちの壱」の大粒に関する遺伝子解析を行った．まず，DNA 多型が生じる交雑 F_2 の遺伝的分離集団を用いて，大粒の遺伝様式を解明しつつ遺伝学的にマッピングし，さらに，連続戻し交雑でコシヒカリに大粒遺伝子のみを移入して，大粒遺伝子の DNA 領域を解明した．その結果，コシヒカリ×いのちの壱の交雑 F_2，および，F_2 で分離した大粒型個体を 1 回親，コシヒカリを反復親とする戻し交雑 BC_1F_2，BC_2F_2，BC_3F_2 を通して，1 遺伝子遺伝の理論比に従う 1 大粒型個体:2 ヘテロ型個体:1 小粒型個体に分離したことから，大粒が 1 個の対立遺伝子に支配されることが判明し，これを G_g と命名した．次に，遺伝的背景の異なる 2 つの遺伝的分離集団，日本晴×いのちの壱の交雑 F_2 とコシヒカリ×いのちの壱の交雑 F_2 で分離した小粒型 g_g ホモ型個体を用いて，SNP，SSR マーカーによるマッピングを行って G_g との組換え価を求めるとともに，BC_2F_2，BC_3F_2 で分離した G_g ホモ型大粒個体を用いてゲノムの置換率を調べた．その結果，G_g が第 2 染色体末端から 7.7～9.1 Mb の領域に座乗していることが分かった．BC_3F_2 で分離した G_g ホモ型大粒コシヒカリはコシヒカリより千粒重が 34％増大し，食味値も新潟コシヒカリの 81.0 に匹敵する 80.0 を示したので，米国産コシヒカリとの差別化を図るスーパーコシヒカリの開発が期待できる．

SNP marker-assisted selection of gene for enlarging grain of Koshihikari

○Motonori Tomita[1], Rieko Kamioka[2]
([1]Res. Inst. Green Sci. & Technol., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

Key words *Oryza sativa*, large grain, genetic mapping, DNA probe

2P-G036 CYP53A15 発現大腸菌を用いた *p*-ヒドロキシ安息香酸生産性の向上

○玉木 峻, 今石 浩正
（神戸大・バイオシグナル総研セ）
himaish@kobe-u.ac.jp

p-ヒドロキシ安息香酸（*p*-HBA）は，液晶ポリマーの原料などとして多用されている．液晶ポリマーは，IT 機器のキーデバイスなどに採用され，スマートフォンやタブレット PC の市場拡大に伴い，今後より一層の需要拡大が見込まれる素材である．しかし，*p*-HBA の有機合成は大量のエネルギーを必要とするため，本研究では大腸菌を用いた生物変換法に着目した．シトクロム P450（CYP，P450）は，微生物から動植物まで生物界に幅広く分布するヘム含有モノオキシゲナーゼファミリーであり，子嚢菌 *Cochliobolus lunatus* 由来の CYP53A15 は安息香酸の *p*-位特異的水酸化を触媒する．そこで本研究では，大腸菌における CYP53A15 発現系を構築し，その発現・反応条件を最適化することで，*p*-HBA 生産性の向上を試みた．
pCWori(+)ベクターに N 末端領域を改変した CYP53A15 およびヒト P450 還元酵素遺伝子を導入したプラスミドを構築し，大腸菌 JM109 株に導入した．1 mM IPTG およびヘム前駆体（0.5 mM 5-アミノレブリン酸）を添加後，24 h 発現誘導した．大腸菌懸濁液中の P450 量は，還元型 CO 差スペクトルにより算出した．また，大腸菌懸濁液に 2 mM 安息香酸を添加し，16 h 反応後に代謝物をメタノール抽出し，HPLC 分析により *p*-HBA 生成量を評価した．各発現ベクター中の CYP53A15N 末端配列を比較したところ，N 末端領域にラビット CYP2C3 由来の N 末端アミノ酸配列を挿入した pCWRrab2C3N ベクターが最も高い発現量を示した．また，発現誘導温度を比較したところ，20℃が最適であった．CYP53A15 発現プラスミドを導入する大腸菌ホストを比較したところ，BW25113 株が最適であった．現在，発現誘導（培地，誘導時間，IPTG 濃度）および代謝反応（基質濃度，反応時間，共添加剤濃度）の各種条件の最適化を進めている．

Improvement of *p*-hydroxybenzoic acid productivity in *Escherichia coli* expressing CYP53A15

○Shun Tamaki, Hiromasa Imaishi
(Biosig. Res. Ctr., Kobe Univ.)

Key words cytochrome P450, benzoate, bioconversion, *Escherichia coli*

2P-G037 脂溶性キラルアルコール生産にむけた立体選択的カルボニル還元酵素の親油性細菌内での発現と有機溶媒中での利用

○小野 智博[1], 岡野 憲司[1], 本田 孝祐[1], 出来島 康方[2], 川端 潤[2]
（[1]阪大院・工, [2]三菱ケミカル）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景・目的] *Ogataea minuta* 由来カルボニルレダクターゼ (OCR1) は位置・立体選択的なケト基の還元反応を触媒し，医薬品合成前駆体として有用なキラルアルコール類の生産に利用可能な酵素である．一方，OCR1 による有用キラルアルコール生産は難水溶性物質を基質とすることから，有機溶媒中で本酵素の利用を可能とするプロセスの開発が望まれている．このための方策のひとつとして我々のグループでは，進化工学的アプローチにより熱・有機溶媒耐性が向上した変異型 OCR1（V166A）の育種に成功している [1]．本研究では，OCR1 の有機溶媒中での利用可能性を拡大するため，湿潤状態で有機溶媒中に分散可能な親油性細菌 *Rhodococcus opacus* [2]を宿主とした OCR1 の発現と得られた組換え菌を whole-cell catalyst とした非水環境下でのキラルアルコール生産に取り組んだ．
[方法・結果] OCR1 は補酵素として NADPH を要求する．そこで安価な脂溶性化合物を犠牲基質として $NADP^+$から NADPH の再生が可能な補酵素再生酵素のスクリーニングを行った．この結果，*Thermus* 属，*Thermoanerobacter* 属細菌から $NADP^+$を補酵素として，シクロヘキサノール，2-プロパノールを酸化可能なアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)を見出した．OCR1 と *Thermus* 由来 ADH 遺伝子を共発現させた *R. opacus* B4 の湿菌体をトリフルオロアセトフェノン(TFAP)を溶解させたシクロヘキサノール中に直接分散させ，変換反応を実施したところ，1 M TFAP に対し 22 時間で 30% (mol/mol)の収率で生産物（トリフルオロメチルベンジルアルコール）を得ることができた．現在 OCR1 V166A でも同様の検討を行うとともに，さらなる収率向上を目指し反応条件の最適化を進めている．

参考文献
[1] Honda, K. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2017 in press
[2] Yamashita, S. et al. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74, 761-767, 2007

Heterologous expression of an enantio-selective carbonyl reductase in a lipophilic bacterium and its application to a chiral-alcohol production in anhydrous solvent

○Tomohiro Ono[1], Kenji Okano[1], Kohsuke Honda[1], Yasumasa Dekishima[2], Hiroshi Kawabata[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Mitsubishi Chemical)

Key words *Rhodococcus opacus*, whole cell biocatalyst, carbonyl reductase, chiral alcohol

2P-G038 非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインを利用した D-アミノ酸含有ジペプチド合成

○賀野 壮一朗[1], 鈴木 伸[1], 鈴木 亮平[1], 原 良太郎[2], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工研）
kkino@waseda.jp

【目的】D-アミノ酸を含有するペプチドには，L-アミノ酸のみで構成されるペプチドとは異なる生理活性が期待できる．近年，その有用性が注目されているが，効率的な酵素合成法は構築されていない．我々は，非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメイン（A ドメイン）による L-アミノ酸のアデニル化反応に求核剤を作用させることで，ジペプチドを含む多様な L-アミノ酸アミドの合成が可能であることを報告している[1]．本研究では，D-アミノ酸を基質とする A ドメインを利用することで，D-アミノ酸を含有する多様なジペプチドの合成が可能と考えて検証を行った．さらに，生成したジペプチドから，D-アミノ酸を含有するジケトピペラジン（DKP）の合成も試みた．
【方法・結果】*Brevibacillus parabrevis* IAM1032 由来 tyrocidine synthetase A の A ドメイン（TycA-A）は，興味深いことに生理基質である L-Phe だけでなく D-Phe も認識し，さらに数種類の L-及び D-アミノ酸も基質とすることを見出している[2]．そこで，TycA-A を利用した D-アミノ酸含有ジペプチドの合成を試みた．当該酵素の基質となる 6 種類の D-アミノ酸に対し，D-Pro を求核剤として ATP 及び $MgSO_4$ 存在下で反応を行ったところ，D-Trp-D-Pro など予想されるジペプチドの合成を HPLC 及び MS 分析により確認することができた．さらに，反応溶液の加熱により，cyclo(D-Trp-D-Pro)などの DKP も合成可能であった．TycA-A 以外に D-アミノ酸を認識する A ドメインも見出しており，本手法は，D-アミノ酸を含有するジペプチド及び DKP の簡便で汎用性のある合成法を提案するものである．

1) R. Hara, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 477, 89-91 (2015)
2) 鈴木ら, 日本生物工学会 2013 年度大会講演要旨集, 1P-070

Synthesis of dipeptides containing D-amino acids using adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase

○Soichiro Kano[1], Shin Suzuki[1], Ryohei Suzuki[1], Ryotaro Hara[2], Kuniki Kino[1,2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words adenylation domain, nonribosomal peptide synthetase, D-amino acid, dipeptide

2P-G039 非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメインの利用に向けた pyruvate phosphate dikinase による AMP からの ATP 再生系の構築

○鈴木 伸, 木野 邦器
（早大・先進理工）
kkino@waseda.jp

【目的】我々はこれまでに，非リボソーム型ペプチド合成酵素のアデニル化ドメイン(A ドメイン)を用いたアミド化合物合成法を開発している[1]．本反応では ATP が AMP とピロリン酸(PPi)に分解される際のエネルギーによりアミド結合が形成される．A ドメインの利用における ATP の多量添加によるコスト高を解消するためには，反応によって生成する AMP からの効率的な ATP 再生が重要となる．また，PPi はアデニル化の逆反応を助長するため反応速度低下の要因となっている．そこで，これら二つの課題に対して，菌体反応系でのプロセス開発を想定し，糖代謝によって供給可能なホスホエノールピルビン酸(PEP)を利用して AMP と PPi から ATP とリン酸に変換する pyruvate phosphate dikinase(PPDK)に着目した．本研究では，まず PPDK の精製酵素系における有用性の確認と課題の抽出を行った．
【方法・結果】ATP 合成反応を優先的に触媒し，AMP からの ATP 再生に適する PPDK として *Acetobacter aceti* NBRC 14818^T 由来の PPDK(AaPPDK)に着目した．大腸菌で調製した組換え AaPPDK を用いて基質 AMP, PPi および PEP からの ATP 合成試験を行ったところ，AMP 消費に伴う ATP 合成を確認した．そこで AaPPDK による ATP 再生系を *Brevibacillus parabrevis* IAM1032 由来 tyrocidine synthetase A の A ドメインを利用した Trp-Pro 合成反応に共役させた．その結果，本来反応が進行しない AMP を初発基質とした場合にも Trp-Pro が生成し，AMP からの ATP 再生系が有効であることを確認できた．また，ATP を初発基質とした場合には ATP 再生系を共役させない条件と比較して反応速度が向上しており，PPi の蓄積を抑制する効果も確認できた．菌体反応系においても同様の効果が得られ，糖質からの PEP 供給が可能となれば，革新的なアミド化合物生産プロセスになると考えられる．

1) Hara, R., *et al.*, *Anal. Biochem.*, 477, 89-91 (2015)

ATP regeneration system from AMP using pyruvate phosphate dikinase for the application of adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase

○Shin Suzuki, Kuniki Kino
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words pyruvate phosphate dikinase, ATP regeneration, adenylation domain, NRPS

2P-G040 シリカ重合酵素の異種発現と活性評価

○小栗 秀俊, 中島 一紀, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【背景と目的】
シリカテインは海綿動物のガラス骨格に存在するシリカの重合反応を触媒する酵素である．このシリカ重合反応は温和な条件下（常温，中性 pH）で進行するため，様々な工業分野への応用が期待される．シリカテインを工学的分野に応用するためには，シリカテインの機能について解明する必要がある．本研究では，大腸菌を用いた異種発現によりシリカテインを作製し，リフォールディング操作により可溶化後，モリブデンイエロー法によりシリカテインの活性を定量的に評価した．
【方法】
海綿動物 *Suberites domuncula* 由来シリカテイン遺伝子を挿入した pCold 発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し，低温発現誘導により，シリカテインの発現を行った．菌体破砕を行い，沈殿画分の封入体を回収した．透析法（4℃，24h）により，シリカテインをリフォールディングした後に，シリカ前駆体であるテトラエトキシシラン（TEOS）と接触させ，20℃で 18h 振とうすることでシリカの重合を行った．回収したシリカを乾燥凍結した後，1M NaOH を添加し，重合シリカをケイ酸に加水分解した．ケイ酸濃度をモリブデンイエロー法で測定することでシリカテインの活性を定量的に評価した．
【結果と考察】
異種発現の後，SDS-PAGE を行った結果，シリカテインのほとんどは不溶性の封入体として発現していることが分かった．透析法によるリフォールディングを行ったところ，シリカテインの可溶化に成功した．その後，TEOS とシリカテインを反応させることでシリカの重合を確認した．また，シリカ生成量をモリブデンイエロー法により測定したところ，リフォールディング後のシリカテインは，シリカ重合活性を有していることが分かった．

Heterologous expression and activity evaluation of silica-polymerizing enzyme

○Hidetoshi Oguri, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biomineralization, biosilica, self-assembly, molybdenum yellow method

2P-G041 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した新規 L-アルギニンオキシダーゼの性質検討と構造解析

○松尾 慎作[1], 藤野 志保子[1], 伊藤 菜奈子[2], 今田 勝巳[2], 日下部 均[3], 根本 理子[1], 田村 隆[1], 稲垣 賢二[1]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]阪大院・理, [3]バイオセンサ）
kinagaki@okayama-u.ac.jp

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)は，L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である．LGOX の基質特異性は極めて厳格であり，バイオセンサーに活用されている．我々は, LGOX の 305 番目のアルギニン残基(R305)が LGOX の基質認識に最も重要であることを明らかにし，R305 への部位特異的変異導入により，L-Arg, L-His, L-Tyr 等に新たに活性を示すような基質特異性改変酵素の作成に成功している．今回作成した R305E 変異 LGOX は，R305D 変異 LGOX と同様に L-Arg に対して高い活性を示す．R305E 変異 LGOX の L-アルギニンオキシダーゼとしての性質を調べるため，性質検討を行った．また本酵素の基質特異性変換機構に関する知見を得るため，X 線結晶構造解析を行った．【方法】変異酵素は，LGOX 発現用ベクター pGOx_mal1 を有する *E. coli* JM109 を用いて発現させ，精製を行った．酵素活性は，反応生成物である α-ケト酸の定量または，過酸化水素を定量することで測定した．結晶化は 8.7 mg/ml の精製酵素を用いて行い，X 線回折強度測定は Spring-8 BL41XU にて行った．【結果】R305E 変異 LGOX は L-Arg を最も良い基質とし，厳格な基質特異性を示した．また R305E 変異 LGOX の L-Arg に対する *Km* は 0.46 mM であった．また触媒効率 k_{cat}/Km は R305D 変異 LGOX と比べて R305E 変異酵素の方が約 2 倍高かった．そして，X 線結晶構造解析を行った結果，R305E 変異 LGOX 及び基質複合体の構造モデルを分解能 2.65 Å，2.7 Å で決定できた．それによると R305E 変異 LGOX では E305 以外に D433，E617 のアミノ酸残基が基質認識に寄与していると考えられた．今回得られた構造学的な知見を基に, LGOX の基質認識機構を解明し，更に新規な L-アミノ酸オキシダーゼの作製を行う予定である．

Characterization and structural analysis of L-arginine oxidase made from L-glutamate oxidase

○Shinsaku Matsuo[1], Shihoko Hujino[1], Nanako Ito[2], Katsumi Imada[2], Hitoshi Kusakabe[3], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

Key words L-glutamate oxidase, biosensor, substrate specificity, crystal structure

2P-E042 改変型ホスホリパーゼ D によるホスファチジルトレオニンの酵素合成

○松永 望
（名大院・生命農学）
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

[背景と目的]
ホスファチジルトレオニン（PT）は天然リン脂質の一種で，マスト細胞の脱顆粒化促進等に関わる脂質メディエーターとして認められつつある．しかしその詳細な機能解析は進んでいない．その理由は PT やリゾ PT の調製が煩雑なためである．現行の PT の化学合成法は複雑な多段階反応であるため，より簡便な合成法が望まれている．
酵素ホスホリパーゼ D(PLD)によるホスファチジル基転移活性を利用すると，様々なリン脂質が合成できる．本研究では，改変型 PLD を用いたホスファチジルコリン(PC)と無保護トレオニン(Thr)からの PT の酵素合成を検討した．
[方法と結果]
野生型 PLD を用いても PT は合成できない．これは当酵素の基質結合部位が Thr の嵩高い二級水酸基を受け入れないためである．一方，当研究室では野生型 PLD の基質結合部位に変異を導入し，特異性が変化した変異 PLD を多数保有している．そこで，保有する変異型 PLD の PT 合成活性を調べたところ，いくつかの変異型 PLD に PT 合成活性が認められた．中でも 187F/191Y/385L(FYL)型変異 PLD が最も効率よく PT を合成した．
次に，有機溶媒-水二相反応系において反応条件の最適化を行った．その結果，(1)有機溶媒相は芳香族炭化水素(ベンゼン，トルエン，キシレン)が極めて有効であること，ならびに，(2)水相の pH が高いほど PT 合成量が増大し, 最適 pH は 12 であることが判明した．
また,興味深い事に，Thr の光学異性体を用いて PT 合成反応を行ったところ，L-Thr, L-allo-Thr, D-allo-Thr からは PT が生成したが，D-Thr は全く反応しなかった．FYL 型変異 PLD と Thr とのドッキングシミュレーションにより，D-Thr は触媒ポケットに結合するものの，PT 合成に関わらない non-productive な配向で結合することが推定された．
以上のように PC と無保護 Thr からの一段階の PT 合成法を世界で初めて確立した．

Enzymatic synthesis of a bioactive phospholipid, phosphatidylthreonine

○Nozomi Matsunaga
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase D, enzymatic synthesis, phosphatidylthreonine

2P-G043 Acyl chain that matters: Turning a phospholipase D into a lysophospholipase D by protein engineering

○Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)
iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

To establish efficient synthesis of else difficult-to-obtain bioactive phospholipids (PLs) we have designed several synthetic routes that utilize our engineered phospholipase D (PLD) enzymes to introduce bulky or branched polar heads into the PL backbone. The current research tackles the ability of PLD to distinguish between PL substrates with different length of the acyl chains at sn-2 position. Based on the crystal structure of a Streptomyces PLD (2ze9), W166 was selected for saturation mutagenesis since it interacts strongly with sn-2 acyl chain of the PL. The obtained variants were screened using two substrates, dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) and lyso-oleoyl-phosphatidylcholine (lyso-OPC). All variants, except W166K and W166R, either utilized both or none of the substrates. W166K and W166R reacted on lyso-OPC, but not on DOPC. After overexpression and purification, the two variants and the wtPLD were reacted with PCs having increasing length of the sn-2 acyl chain, namely, oleoylacetyl-PC, oleoylhexanoyl-PC, oleoyldecanoyl-PC, oleoylmyristoyl-PC and DOPC. Activity sharply decreased with increase of the sn-2 acyl chain length in W166R and, to a less extent in W166K PLD. While the wt PLD hydrolyzed all of the PCs with efficiency of more than 90% (calculated as yield of the hydrolytic product), W166R and W166K hydrolyzed oleoylacetyl-PC with comparable efficiency, however, DOPC with nearly 0% and 25%, respectively. Kinetic and in silico analyses are used to further explain observed behavior of the enzymes.

Acyl chain that matters: Turning a phospholipase D into a lysophospholipase D by protein engineering

○Jasmina Damnjanovic, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words phospholipase D, substrate specificity, substrate binding, protein engineering

2P-G044 ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来 D-乳酸脱水素酵素の機能改変

○伊東 昇紀[1], 竹屋 壮浩[2], 小山内 崇[1,2]
([1]明治大・農, [2]明治大院・農)
tosanai@meiji.ac.jp

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は嫌気・暗条件下で乳酸やコハク酸といった有機酸を細胞外に放出する．乳酸，コハク酸はそれぞれバイオプラスチックである PLA，PBS の原料となる．光独立栄養生物である *Synechocystis* は光合成により固定した CO_2 を炭素源として有機酸生産を行うことができる．しかしながら，*Synechocystis* の有機酸生成過程における生化学的な知見は乏しく，各反応における制御機構の解明が求められる．そこで，本研究では乳酸発酵の最終段階の反応を触媒する D-乳酸脱水素酵素(*Sy*Ddh)の生化学解析を行い，さらなる有機酸増産に向けた機能改変を行った．
*Sy*Ddh 活性は，分光光度計 Hitachi U-3310 spectrophotometer(Hitachi High-Tech., Tokyo, Japan)を用いて，反応過程で消費される NADH の特異吸収波長(340 nm)の光を照射し，吸光度変化量として測定した．
生化学解析の結果，*Sy*Ddh は Mg^{2+}存在下でピルビン酸に対する親和性が低下するアロステリック酵素で，糖代謝における中間体であるオキサロ酢酸にも活性を示すことが明らかとなった．そこで，点変異導入によるアロステリック効果及び基質特異性の改変を試みた．作製した 2 種類の変異型のうち，*Sy*Ddh_Q14E は Mg^{2+}存在下でピルビン酸に対する親和性が飛躍的に向上し，*Sy*Ddh_S234G はピルビン酸よりもオキサロ酢酸に対してより特異的に活性を示した．*Sy*Ddh において aa14 はアロステリック因子である Mg^{2+}による制御部位であり，aa234 は基質となる 2-ケト酸の認識に比較的柔軟に機能していることが示唆された．

Modifying the function of a D-lactate dehydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Shoki Ito[1], Masahiro Takeya[2], Takashi Osanai[1,2]
([1]Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words D-lactate dehydrogenase, cyanobacteria

2P-G045 *Pseudomonas aerginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼが触媒するアセチル化反応

○井上 尚[1], 吉田 知博[2], 佐伯 将[2], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[1,2]
([1]鳥取大院・農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・産学)
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】Ser 残基を活性中心に持つ加水分解酵素は，エステルやアミド結合形成反応などの副反応が起こりやすい．我々はこれまでに，Ser 残基を活性中心にもつ *Pseudomonas aerginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼの異種発現系を構築し，その利用に向けた性質検討を行ってきた．本酵素はエステル化されたコリン系物質を強く基質として認識して加水分解を触媒し，コリンと有機酸を生成する．また，本酵素は類似化合物についても反応性を示し，酢酸エチルに対しても分解活性を持つことを明らかにした．本研究では，本酵素が示す副反応に焦点を当て，様々な物質に対するアセチル化反応を試みた．
【方法】酢酸エチルを基質として使用したアセチル化反応は，緩衝液，基質，酵素，酢酸エチルの混合液中に 1%となるよう Triton X-100 を添加し，超音波でエマルジョンを形成させて行った．また，生じたエタノールはアルコール酸化酵素で定量し，アセチル化された物質は TLC もしくは LC/MS によって解析した．
【結果】本酵素は，p-ニトロフェニル酢酸も基質として認識して分解活性を示したため，酢酸エチルとのエマルジョン中で酵素反応を行った結果，酵素を添加していない反応液よりも早くエマルジョンが消失し，エタノールの遊離も確認された．また酢酸エチルの存在下でアルキルアミンやアルキルアルコールを添加したところ，10-Amino-1-decanol や 6-Amino-1-hexanol をアシル受容体基質として認識し，アセチル化された生成物が確認された．この結果から，本酵素は酢酸エチルをアシル供与体として，水の代わりにアルコールやアミン類をアシル受容体として認識することが明らかとなった．現在は，アセチル化における最適条件の検討と，アセチル化が可能な化合物の更なる探索を行っている．

Acetylation reaction catalyzed by acetylcholinesterase from *Pseudomonas aerginosa* PAO1

○Hisashi Inoue[1], Tomohiro Yoshida[2], Sho Saiki[2], Tomohiro Bito[2], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric, Tottori Univ., [3]Org. Reg. Ind. Acad. Coop.)

Key words *Pseudomonas aeruginosa*, acetylcholine esterase, ethyl acetate, acetylation

2P-G046 タイの塩蔵発酵食品から分離した Bacillus 属細菌の生産する耐塩性プロテアーゼの特性解析

○竹中 慎治[1], 吉浪 淳[1], Kuntiya Ampin[2], Seesuriyachan Phisit[2], Chaiyaso Thanongsak[2], 渡辺 昌規[3], 吉田 健一[4]
([1]神戸大院・農, [2]チェンマイ大・アグロ・バイオ, [3]山形大農, [4]神戸大院・科学技術イノベ)
stakenaka@people.kobe-u.ac.jp

【目的】 耐塩性酵素とは塩存在下および非存在下両方において安定で同程度の活性を維持できる酵素と定義されている．これは，高塩濃度下で安定かつ高活性を示す好塩性酵素とは性質が異なる．酵素の耐塩性機構が明らかにできれば，タンパク質工学による既存酵素への耐塩性の付与に応用可能と思われるが，好塩性酵素と比較して耐塩性酵素の報告例は少ない．本研究では，新たに耐塩性プロテアーゼ生産菌を検索し，既報の耐塩性プロテアーゼ[1)]および塩耐性の低い類縁酵素と比較し，調製した変異酵素の特性を明らかにすることを目的とした．
【方法および結果】
タイ国・チェンマイ市にて収集した塩蔵発酵調味料（Kapi）の中から目的にかなう *B. subtilis* No. 16 を選抜し，培養上清中からプロテアーゼを精製した．No. 16 株のプロテアーゼは，試験した塩濃度範囲(0～20% (w/v))で安定で，7.5% (w/v)でも相対活性 60%を維持しており，市販の subtilisin Carlsberg よりも耐性を示した．同プロテアーゼの分子質量は SDS-PAGE により 29 kDa であった．また，50～60℃，pH 8.0～9.0 で最大活性を示し，50℃まで安定であった．PMSF に対して顕著に阻害を受けたこと，N 末端および内部アミノ酸配列解析結果から本酵素はセリンプロテアーゼに分類される．同遺伝子をクローニング（1,143 bp）し，既報の *B. subtilis* FP-133 由来耐塩性プロテアーゼ[1)]と比較的塩耐性の低い Carlsberg を含む既報の類縁酵素について一次構造を比較した結果，8 か所において相違が見られ，No. 16 株および FP-133 株の耐塩性プロテアーゼでは主に Asp，Glu，Asn 残基であったものが Ser 残基や Ala 残基に置き換わっていた．現在，これらのアミノ酸残基をすべて Ala 残基に置換した 8 重変異酵素を調製し，耐塩性を含めた酵素特性を調べている．1)Takenaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 75:148-151, 2011.

Characterization of halotolerant protease from Bacillus sp. that was isolated from Thai salted fermentation food

○Shinji Takenaka[1], Jyun Yoshinami[1], Ampin Kuntiya[2], Phisit Seesuriyachan[2], Thanongsak Chaiyaso[2], Masanori Watanabe[3], Ken-Ichi Yoshida[4]
([1]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ., [2]Fac. Agri., Chiang Mai Univ., [3]Fac. Agric., Yamagata Univ., [4]Dep.Sci.Technol.Innov., Kobe Univ.)

Key words *Bacillus* sp., halotolerant protease, serine protease, salted fermentation food

2P-N047 ヒドロキシアダマンタン類の微生物合成

○吉沢 崚[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・化学・生命工）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】 アダマンタンは熱的に安定で潤滑性に優れた脂環式炭化水素であり，その骨格に水酸基を導入したアダマンタン誘導体は，化成品や医薬品中間体としての用途が期待されている．アダマンタンは不活性な炭化水素で構成されている化合物であることから，通常の酸化剤で位置選択的に酸化することは困難である．我々の研究室では，これまでに 1-アダマンタノールや 1,3-アダマンタンジオールを位置選択的に水酸化する高活性菌を，放線菌 *Streptomyces* 属や *Kitasatospora* 属 に見出している．そこで本研究では，２型糖尿病治療薬ビルダグリプチンの骨格となる 3-アセチルアミノ-1-アダマンタノール (3-NHAc-1-adOH) の微生物合成を試みた．1-アセチルアミノアダマンタン(1-NHAcad) を用いて，位置選択的な水酸化反応を触媒する微生物を探索し，菌体による 1-NHAcad の水酸化反応を検討した．

【方法と結果】 我々の研究室では，アダマンタンおよびその誘導体に対する水酸化活性を放線菌に多く見出してきた．そこで土壌から放線菌を優先的に分離した後，1-NHAcad に対する水酸化活性を調査した．土壌分離放線菌を培養し生育後に 5.2mM 1-NHAcad を添加し，５日間培養した．培養液上清を TLC 分析した結果，33 株が 1-NHAcad に対して水酸化活性を示した．高活性菌については休止菌体反応で，3-NHAc-1-adOH の生成量を ＧＣ分析から算出した．それらの中で，SY49 株が高い水酸化活性と位置選択性を示した．16S rDNA 解析から SY49 株を *Streptomyces* sp. と同定した．50 mM グルコース存在下，60 mL 系で休止菌体反応を行ったところ，20 mM 1-NHAcad から 3-NHAc-1-adOH が 6.8 mM，4-NHAc-1-adOH が 0.4 mM 生成した．3-NHAc-1-adOH の変換率が低い理由として，1-NHAcad の水に対する溶解度が低いことが挙げられる．今後，水溶性を向上させるため，アミノ基の保護基を検討する予定である．

Microbial synthesis of hydroxyadamantane derivatives

○Shun Yoshizawa[1], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

Key words adamantane, *Streptomyces* sp., hydroxylation

2P-N048 新奇スルホンアミド分解酵素の探索と反応特性解析

○青木 俊[1], 満倉 浩一[2], 吉田 豊和[2]
（[1]岐阜大院・工, [2]岐阜大・化学・生命工）
toyosida@gifu-u.ac.jp

【背景と目的】 スルホンアミドは抗菌剤であるサルファ剤や利尿剤などの医薬品の骨格に含まれる有用な化合物のひとつであり，水産養殖や畜産などでも利用されている．しかし，化学的に安定であり生体内で分解代謝を受けにくいため，環境へ排出されると蓄積しやすく，環境汚染や抗生物質耐性の伝播に繋がる可能性がある．スルホンアミドの化学的な分解は高熱，長時間の反応を必要とする．一方で，スルホンアミド分解酵素に関する報告例はごくわずかである．そこで本研究では，4-スルファモイル安息香酸を分解して生育する微生物を土壌から探索し，菌体を用いた変換反応と反応生成物の構造解析を行った．

【方法と結果】 4-スルファモイル安息香酸を単一窒素源とした培地を用いて集積培養を行い，土壌から微生物を分離した．分離菌を集積培養培地で培養した後，培養液上清を HPLC 分析した．4-スルファモイル安息香酸の減少量を指標として分解活性を調査した結果，14 株に活性を見出した．それらの中で SA25 株の培養液上清から反応生成物を検出した．培養液上清から反応生成物を精製した後，NMR 分析した結果，その反応生成物を 3,4-ジヒドロキシ安息香酸と同定した．SA25 株の 16S rDNA 解析から，本菌株は *Achromobacter* 属と高い相同性を示した．*Achromobacter* sp. SA25 の菌体懸濁液を調製した後，休止菌体反応を行い，分解活性と基質特異性を調べた．種々の市販スルホンアミドの中で，4-スルファモイル安息香酸のみに対して分解活性を示し，ベンゼンスルホンアミド，4-ヒドロキシベンゼンスルホンアミド等には作用しなかった．この結果から，SA25 株由来スルホンアミド分解酵素は，極めて基質特異性が高いことが示唆された．

Survey and characterization of novel sulfonamide-degrading enzymes

○Shun Aoki[1], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ.)

Key words sulfonamide, *Achromobacter* sp., 3, 4-dihydroxybenzoic acid

2P-G049 デラセミ化とラセミ化-非発光基質 L-ルシフェリンからホタル生物発光を実現する 2 つの方法

○加藤 太一郎[1], 前田 樹里[1], 奥田 真利[2], 白川 大暉[2], 武尾 正弘[2], 根来 誠司[2], 有馬 一成[1], 伊東 祐二[1], 丹羽 一樹[3], 太田 博道[4]
（[1]鹿児島大院・理工, [2]兵庫県大院・工, [3]産総研, [4]長崎県大）
kato@sci.kagoshima-u.ac.jp

【目的】 D-ルシフェリンはホタルルシフェラーゼ生物発光における天然基質であるが，その構造中に不斉点が存在することが問題となっている．ルシフェリン分子は一つの不斉炭素を有し，D-体 L-体という一組の光学異性体が存在するが，これらの内現状の発光反応条件では D-体が発光基質として利用できる一方，L-体は強い発光阻害剤として働き，定量的な発光反応を妨げたり，再現性を低下させたりする原因となっている．特に注意すべきは，ルシフェリン分子が中性付近でも容易にラセミ化する点であり，in vivo イメージングのような長時間測定を行う際には光学純度の維持が困難となる場合があった．我々は，この問題を解決するために L-体からでも効率良く発光する方法を検討し，二種類のシステムを構築するに至った．

【方法と結果】 一つは，ホタル体内での D-ルシフェリン生合成経路を模倣したデラセミ化反応である．ホタルルシフェラーゼのもう一つの触媒活性であるチオエステル化と，チオエステル加水分解反応を組み合わせることによって，L-ルシフェリンから in situ 立体反転を伴って D-ルシフェリンを調製し発光させることを試みた．もう一つはアリールマロン酸脱炭酸酵素変異体ラセマーゼ(AMDase ラセマーゼ)とホタルルシフェラーゼを組み合わせることによって，ルシフェリンのラセミ化を伴いながら発光させる方法である．発光活性はルミノメータを，系中の鏡像異性体の割合はキラルな固定相を有する HPLC カラムを用いて計測した．検討した二系統共に，D-体 L-体いずれからでも効率よく発光できることを確認した．特に AMDase ラセマーゼを利用した系では，補酵素 A のような補因子が必要ないという利点があり，in vivo イメージング測定に適用しやすいシステムであることが期待できた．

Deracemization and racemization - two types of unique bioluminescence system from nonluminous firefly L-luciferin

○Dai-ichiro Kato[1], Juri Maeda[1], Masatoshi Okuda[2], Daiki Shirakawa[2], Masahiro Takeo[2], Seiji Negoro[2], Kazunari Arima[1], Yuji Ito[1], Kazuki Niwa[3], Hiromichi Ohta[4]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [3]AIST, [4]Univ. Nagasaki)

Key words firefly luciferase, bioluminescence, deracemization, biosynthetic pathway

2P-G050 酵素の長期安定性，熱安定性向上に寄与するイオン液体の開発

○金子 恒太郎, 河合 功治
（ミヨシ油脂）
kanekok@so.miyoshi-yushi.co.jp

【緒言】
イオン液体は，不揮発性，高極性，低融点等の特異的な物性を有する常温で液体の有機塩であり，幅広い分野で注目されている．これまでに我々は，特定官能基を導入した４級アンモニウム型イオン液体が，酵素等の生体高分子に対して高い溶解性を示し，長期安定性を付与することを見出した．今回，本イオン液体の酵素安定化剤（添加剤）及び酵素反応溶媒への応用を指向し，数種類の４級アンモニウム型イオン液体を用いて，酵素安定化効果とイオン液体濃度並びに酵素反応率と反応温度との相関について検討した．

【結果と考察】
イオン液体の１～１０％水溶液に酵素を溶解し，各温度で一定期間保存した後，酵素活性を測定した．イオン液体の系は，いずれの水溶液濃度においても，リファレンス（バッファー，各種安定化剤等）より高い酵素活性を示し，特定官能基を導入したイオン液体が，低濃度においても酵素の安定化効果に優れることを確認した．次に，イオン液体水溶液を用いて３０～５０℃の条件下で酵素反応を試みた．イオン液体の系は，各温度において，リファレンスよりも優位な結果が得られた．特に，反応温度を上げた際，リファレンスの系は反応率が低下したのに対して，イオン液体の系は反応率が上昇する傾向を示した．さらに，イオン液体中の特定官能基の有無によって，安定性，耐熱性に差が認められた．
これらの結果は，イオン液体のカチオン，アニオン中の特定の官能基の存在が，酵素の活性保持効果，耐熱性向上に強く影響することを示し，本イオン液体が酵素をはじめとする生体高分子の安定化剤（添加剤），酵素反応溶媒に有用性が高いことが示唆された．

Development of ionic liquids with long-term stability and thermostability for enzyme

○Kotaro Kaneko, Koji Kawai
(Miyoshi Oil & Fat Co., Ltd.)

Key words Ionic liquid, Thermostability, Enzyme stabilizing agent, Enzyme reaction solvent

2P-G051 ギ酸オキシダーゼにおける FAD の 8-formyl-FAD への修飾に対するアミノ酸置換及び pH の影響

○岩越 亮汰, 田邊 直人, 道林 泰樹, 沖 昌也, 内田 博之
（福井大院・工）
uchida@u-fukui.ac.jp

[目的] ギ酸オキシダーゼ（FOD）は，8-formyl-FAD をコファクターとして，酸素存在下でギ酸を酸化する酵素である．FOD 以外で，8-formyl-FAD をコファクターとする酵素は報告されていない．FOD の属する GMC oxidoreductase family の他の酵素は，FAD のイソアロキサジン環近傍に活性発現に重要な His-Asn 対，His-His 対，又は His-Pro 対を持つが，FOD は His-Arg 対を持つ．His-Arg 対は，ギ酸の酸化だけでなく，FAD の修飾にも関与している．また，8-formyl-FAD 近傍には Phe510 が存在しており，これも修飾に関与していると考えられる．本研究では，FOD における FAD 修飾機構の解明を目指して，*Aspergillus oryzae* RIB40 由来 FOD のイソアロキサジン環近傍に存在する His-Arg 対を形成する Arg554，Arg87，そして Phe510 を置換した変異体を作成し，修飾に対する置換の影響，及び pH の影響を調べた．
[方法と結果] 変異体酵素は，部位特異的変異導入法により作成し，Ni-sepharose と Hi-trap Q を用いて精製した．精製酵素を二つに分け，それぞれ pH 4.5 のバッファーと pH 7.0 のバッファーで一晩透析した．4°C で保存中，スペクトル分析と HPLC 分析を経時的に行い，コファクター構造の変化を追った．
R87K と F510A では，精製終了の時点で，酵素内に FAD と 8-formyl-FAD が存在し，時間の経過と共に 8-formyl-FAD の割合が増加し，増加速度は pH 7.0 で保存した方が速かった．R554K でも同様の結果であった．F510Y，F510W では，精製後の時点で修飾が終了しており，R87A では修飾は起こらなかった．
これらの結果より，His511，Arg554 ばかりでなく，Arg87，Pne510 が 8-formyl-FAD への修飾に関与すること，pH が修飾に影響することが分かった．修飾過程で起こるイソアロキサジン環 8 位のメチル基からの H^+引き抜きにおいて，これらの残基が何らかの役割を果たし，それに pH が影響していると考える．

Effects of amino acid replacements and pH on the modification of FAD to 8-formyl-FAD in formate oxidase

○Ryota Iwagoshi, Naoto Tanabe, Taijyu Doubayashi, Masaya Oki, Hiroyuki Uchida
(Grad. Sch. Eng. Fukui Univ.)

Key words Formate oxidase, 8-formyl-FAD, Phe510, FAD modification

2P-G052 芳香族ヒドロキシカルボン酸生産に有用な脱炭酸酵素の探索

○原 良太郎[1], 椛沢 遼[2], 広川 安孝[1], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・理工研, [2]早大・先進理工）
ryo_h@aoni.waseda.jp

【目的】芳香族ヒドロキシカルボン酸は，医薬品，化粧品，食品添加物，液晶ポリマーの原料として有用な化合物であるが，その生産法において現行の化学合成法ではカルボキシ基の導入における位置選択性や収率の低さに課題がある．微生物由来の非酸化的脱炭酸酵素には，脱炭酸反応のみならず，逆反応である炭酸固定反応を触媒するものも知られている．こうした特性を有する当該酵素を用いると，フェノール類からは多様なヒドロキシカルボン酸の合成が期待できる．そこで本研究では，フェノール類縁体への直接的かつ位置選択的な炭酸固定活性を有する微生物酵素の探索，ならびに当該酵素を用いた芳香族ヒドロキシカルボン酸の合成法の開発を目指した．
【方法・結果】各地より採取した土壌サンプルを 2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸（オルセリン酸）を単一炭素源とした最少培地に接種し，生育した微生物株に対してオルセリン酸脱炭酸活性の有無を検討した．その結果，数株の菌体反応において，オルセリン酸のカルボキシ基が脱離した 5-メチルレゾルシノール（オルシノール）の生成を確認することができた．この中で最も高活性であった K8 株は，16S rDNA 解析により *Arthrobacter* 属細菌であることが判明した．当該微生物を用いた菌体反応では，オルセリン酸からオルシノールへの脱炭酸活性のみならず，飽和炭酸水素カリウム存在下ではオルシノールからオルセリン酸への炭酸固定活性も認められ，K8 株に可逆的脱炭酸酵素の存在が示唆された．また，芳香族ヒドロキシカルボン酸を対象に基質特異性を検討したところ，4-メトキシサリチル酸から 3-メトキシフェノールへの脱炭酸反応およびその逆反応の進行も確認された．さらに，ショットガンクローニングと呈色法を併用することで，当該遺伝子の効率的な取得と同定にも成功した．

Screening of microbial decarboxylase for aromatic hydroxy acid synthesis

○Ryotaro Hara[1], Ryo Gawasawa[2], Yasutaka Hirokawa[1], Kuniki Kino[1,2]
([1]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words decarboxylase, carboxylation, orsellinic acid, 4-methoxysalicylic acid

2P-G053 逐次的な多酵素複合体構築

岩田 史也, ○平川 秀彦, 長棟 輝行
（東大院・工）
hirakawa@bio.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】生体内において複合体形成や局在化などにより，酵素の空間配置が制御されることにより，高度かつ高効率な多酵素反応が行われている．したがって，生体外においても酵素の空間配置を制御することできれば，多酵素反応のポテンシャルを大きく引き出せると予想される．相互作用部位を酵素に導入することにより，複数の酵素を一意に集合させることも可能であると考えられる．しかし，このような方法では集合させる酵素の数に応じた独立な相互作用部位が必要であるため，汎用性に乏しい．そこで，本研究ではリング状のヘテロ三量体タンパク質を形成する *Metallosphaera sedula* 由来核内増殖抗原（PCNA）を利用した多酵素複合体の構築法の開発に取り組んだ．
【結果と考察】*M. sedula* 由来 PCNA は三つの異なるサブユニット（PCNA1，PCNA2，PCNA3）から成り，PCNA1 と PCNA2 がヘテロ二量体を形成した後，PCNA3 が結合する．ヘテロ三量体の解離を防ぐために，サブユニット間にジスルフィド結合を形成するようにシステイン残基を導入した．PCNA1 と PCNA3 を遺伝子的に連結した融合タンパク質 PCNA1-PCNA3 と PCNA2 を等モル濃度で混合したところ，超分子を形成した．そこで，固定した PCNA1 に酵素を融合した PCNA2 と PCNA1-PCNA3 を交互に添加することにより，酵素を逐次的に連結させることを試みた．シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ系を形成する P450，フェレドキシン（FdX），フェレドキシン還元酵素（FdR）を PCNA2 に融合し，逐次的に連結させたところ，P450 は FdX を介して FdR から電子を受け取るため，FdX が P450 と FdR の間に配置された場合に，最も高いモノオキシゲナーゼ活性が得られた．以上により，ヘテロ三量化という一つの現象を利用することにより，逐次的な多酵素複合体の構築が可能であることが明らかとなった．

Sequential multienzymetic complex formation

Fumiya Iwata, ○Hidehiko Hirakawa, Teruyuki Nagamune
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words cytochrome P450, immobilization, accumulation, protein interaction

2P-N054 Isolation and characterization of collagenase from non-pathogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VN3

○Bach Thi Mai Hoa[1], Phi Quyet Tien[1], Nguyen Phuong Nhue[1], Pham Thanh Huyen[1], Ho Tuyen[1], Dang Thuy Duong[1], Vu Thi Hanh Nguyen[1], Hiroshi Takagi[2]
([1]Inst. of Biotech., Vietnam Academy of Sci. and Technol., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)
btmhoa@ibt.ac.vn

The high collagenolytic activity of the microorganism has been isolated from pathogenic bacteria as *Clostridium* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.. Collagenases plays an essential role of invasion step on animal and human. In the present of this study, we report the characterization of collagenase detected from non-pathogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VN3. The strain VN3 was isolated from soil of Nam Son landfills at Soc Son, Hanoi, Vietnam. It's phenotypic and genotypic shown that its similar gram positive *Lysinibacillus sphaericus*. It almost reported that could kill insects, especially the larvae of mosquitoes. Base on the similar of 16S rRNA sequence of the strain VN3 has characterized into the fifth group of five DNA-homology *L. sphaericus* groups. The strain VN3 was able to produce clear zone on skim milk, casein, gelatin or collagen M9 agar plate. The *L. sphaericus* VN3 could synthesize the highest collagenase activity in M9 medium containing bovine collagen pH 7.5, at 37°C, for 24 cultivation. The specific activity of purified collagenase is 46.42 U/mg. That enzyme has a relative molecular weight of 95 kDa by SDS-PAGE and gelatin zymography. The collagenase activity was strongly inhibited by Cu^{+2}. However, Zn^{+2} greatly increased its activity.

Isolation and characterization of collagenase from non-pathogenic bacteria *Lysinibacillus sphaericus* VN3

○Bach Thi Mai Hoa[1], Phi Quyet Tien[1], Nguyen Phuong Nhue[1], Pham Thanh Huyen[1], Ho Tuyen[1], Dang Thuy Duong[1], Vu Thi Hanh Nguyen[1], Hiroshi Takagi[2]
([1]Inst. of Biotech., Vietnam Academy of Sci. and Technol., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words bacterial collagenase, *Lysinibacillus sphaericus Bacillus sphaericus*, ColG, colH

2P-G055 エチレングリコール中におけるナイロン加水分解酵素の構造と機能相関

○生越 大輔, 岡崎 秀明, 伊東 雅人, 竹原 一起, 武尾 正弘, 根来 誠司
（兵庫県大院・工）
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

【目的】ナイロン分解の効率化として，i）分解酵素の高機能化，ii）モノマー化が容易なポリマーの探索，iii）固形ポリマーを溶解させる有機溶媒・イオン液体中での反応などのアプローチが考えられる．特に，有機溶媒中での酵素反応は，化学処理と酵素処理の連携を容易にする．本研究では，ナイロンのリサイクル処理で，エチレングリコール(EG)が用いられていることに着目し，EG および，水混合系でのナイロン分解酵素（NylC）の二次構造，安定性および活性について検討した．

【方法及び結果】ナイロン分解酵素として親型 NylC に $G^{122}Y^{130}A^{36}Q^{263}$ 置換が導入された NylC-GYAQ 変異体（Tm=88℃）を，基質として Ahx 環状オリゴマーを用いて，0～99%までの各 EG 濃度（10%間隔）における酵素活性を測定した．また，EG 中のタンパク質の二次構造変化と凝集性の有無を，各々，円二色性（CD），動的光散乱（DLS）から検討した．80%以上の EG 濃度に溶解させた酵素の CD スペクトルは，活性型酵素（水溶液中）とスペクトルの形状は類似していたが，約 10nm 長波長域へシフトしていた．しかし，熱変性タンパク質の CD スペクトルとは異なっていたことから，EG 中でも立体構造は維持されていると推定した．また，DLS 分析から EG 濃度 80%以下では殆ど凝集していないことが分かった．CD スペクトルにより得られた結果を，BeStSel 構造予測プログラム（*Proc.Natl.Acad.Sci.*USA,112, E3095, 2015）に入力し，二次構造を推定した．EG 濃度が高くなるにつれて，α-helix の割合が増加するという傾向が見られた．50%EG 中で，95℃まで加熱後，25℃に戻した状態で CD 測定を行ったところ，加熱を行わなかった場合に近いスペクトルが得られたことから，EG 中で構造がリフォールディングする可能性が示唆された．各 EG 濃度，および，リフォールディング前後の酵素活性と構造との関連性についても報告する．

Correlation between Structure and Function of the Nylon hydrolase in Ethylene glycol

○Daisuke Ogoshi, Hideaki Okazaki, Masato Ito, Ikki Takehara, Masahiro Takeo, Seiji Negoro
(Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo)

Key words nylon oligomer

2P-G056 ナイロン加水分解酵素の構造安定化機構の解析

○岡崎 秀明[1], 生越 大輔[1], 伊東 雅人[1], 戸田 光[1], 竹原 一起[1], 武尾 正弘[1], 重田 育照[2], 根来 誠司[1]
（[1]兵庫県大院・工, [2]筑波大院・数理物質）
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

【目的】ナイロン加水分解酵素 NylC は 6-アミノヘキサン酸オリゴマー，ポリアミド PA6，PA66，PA4 をエンド型で加水分解する酵素であり，前駆体として発現後，Asn266 / Thr267 間で自己分断されて活性型酵素となる．本酵素は同一モノマー 4 分子（モノマー A～D）が会合したテトラマー構造（D2 対称）を有するが，各モノマー界面の置換により，熱変性 Tm 値が 41～88℃まで変化する．また，変異導入により，熱安定性が低下する，細胞内での発現段階でポリペプチドがフラグメント化する，タンパク質が凝集する，自己分断されず前駆体として得られるなど様々な挙動をとる．本研究では，生化学的検討と計算科学の両面から，本酵素の耐熱性，および，有機溶媒存在下の構造安定化機構を解析した．

【方法及び結果】
X 線結晶構造解析から取得された前駆体型構造を基に，欠損領域の構造を補完し，構造安定化計算を行った．活性型構造を再現するため各モノマーの 266 位と 267 位を構造ファイル上で分断後，着目変異（安定化・凝集性等に影響を与える変異）を導入し，分子動力学（MD）シミュレーションに使用した．例えば，122 位の変異（Arg，Lys，Val，Gly）により，Tm 値は，親型 NylC（Asp122）の 52℃から 76℃（Gly122）まで段階的に上昇するが，結晶構造解析から，モノマー A の Lys159 とモノマー D の Glu115 の側鎖間の距離が近接するにつれて耐熱性が上昇することが分かっている．この現象は MD シミュレーションでも再現され，当該距離が安定性に寄与していると推定した．また，A/B 界面と A/D 界面の各々の相対的バランスが重要であると考えられる．さらに，DDM (Difference Distance Map)を作成したところ，30 位，130 位等の特定部位での相互作用が構造安定性に影響すること，フラグメント化（D122P）や凝集化（Q299E）変異体では，DDM のパターンに変動が見られることが分かった．

Analysis of structural stabilization mechanism of nylon hydrolase

○Hideaki Okazaki[1], daisuke Ogoshi[1], Masato Itou[1], Hikaru Toda[1], Ikki Takehara[1], Masahiro Takeo[1], Ikuteru Shigeta[2], Seiji Negoro[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Grad. Sch. Pure Appl. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words nylon oligomer

2P-G057 光学活性フルオロアルコール生産に有用な *Pichia farinosa* NBRC 0462 由来カルボニルレダクターゼの精製と諸性質の解明

○釜井 彩花[1], 七田 沙耶香[1,2], 三木 慎介[3], 礒部 公安[1,2], 浅野 泰久[1,2]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]JST・ERATO, [3]セントラル硝子(株)）
asano@pu-toyama.ac.jp

[目的] 光学活性 1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノール (1,1,1-TFIPL) は，医薬品の合成原料として有用で，微生物菌体を用いて，1,1,1-トリフルオロアセトン (1,1,1-TFAc) を立体選択的に還元する合成法が報告されている．本研究では *Pichia farinosa* NBRC 0462 が，1,1,1-TFAc を(*R*)-1,1,1-TFIPL に還元する酵素を産生することを見出したので，その酵素を精製し，諸性質を解明した．

[方法] 酵素は，菌体を破砕した後，硫安分画及び GigacapQ-Toyopearl と Blue-Sepharose のカラムクロマトグラフィーで精製した．酵素活性は NADH の存在下で 1,1,1-TFAc を基質として pH 5.5 で 30ºC，3 分間反応し，340 nm の吸光度変化を測定する方法で求めた．酵素 1 U は 1 分間に 1 μmol の 1,1,1-TFAc を還元する酵素量と定義した．

[結果] 本酵素は，上記の精製法で約 73 倍精製され，その比活性は 203 U/mg であった．分子量は SDS-PAGE では約 29,100 の単一バンドで，ゲルろ過法では約 76,000 であったので二量体として存在していると考えられた．精製酵素を用いて諸性質を検討した結果，本酵素はフルオロアセトン，1,1-ジフルオロアセトン，1,1,1-TFAc などのフッ素を有するケトンに高い活性を示し，1,1,1-TFAc を 97% ee の光学純度で (*R*)- 1,1,1-TFIPL に変換した．本酵素は NADH に特異的で，NADPH ではほとんど活性を示さなかった．また逆反応では，2-ブタノールや 2-プロパノールなどの 2 級アルコールに対して高い活性を示した．本酵素の還元反応の至適 pH は 5.5 で，至適温度は 35 - 40ºC であった．また本酵素は，pH 4.5 - 8.0 で安定であり，pH 5.5 では，40ºC で 30 分間加熱しても 75%以上の活性が残存していた．本酵素はキレート試薬で阻害され，$CoCl_2$ を添加することにより安定性が著しく向上した．

Purification and characterization of carbonyl reductase from *Pichia farinosa* NBRC 0462

○Sayaka Kamai[1], Sayaka Shichida[1,2], Shinsuke Miki[3], Kimiyasu Isobe[1,2], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST, [3]Central Glass Co., Ltd)

Key words *Pichia farinosa* , Carbonyl reductase, chiral fluoro alcohol, cobalt(II)

2P-H058 北海道白糠町産植物からのアミロイド β 凝集阻害物質の網羅的探索

○渡邉 輝[1], 久保 研二[1], 杉村 康司[2], 徳楽 清孝[1], 上井 幸司[1]
（[1]室蘭工大院・工・環境創生工, [2]熊大院・薬）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景・目的】
アルツハイマー病(AD)は高齢者で多くみられる認知症の中でも最も一般的な病型である．AD の原因として，アミロイドβ(Aβ)ペプチドが脳内で凝集，蓄積することで神経細胞死を引き起こし発症するアミロイド仮説が有力である．最近では，Aβ 凝集体に特異的に結合する抗体 aducanumab が臨床試験で AD の前駆症状を示す患者や軽度 AD 患者の認知機能低下を緩和する研究結果が発表され，アミロイド仮説に基づく AD の治療，予防が注目を集めている．本研究では，高い Aβ 凝集阻害活性を示す新たな植物の発見を目指し，北海道白糠群白糠町に分布しているアイヌ伝承有用植物を含むサンプル抽出液 130 種類のライブラリーを作成し，その Aβ 凝集阻害活性の評価を行った．

【方法】
白糠町産の植物抽出物ライブラリーは次のように作成した．白糠町の海岸，湿地帯，山林等で植物 130 種を採取，洗浄後，重量を測定した．5 倍量のエタノールにより 1 週間抽出，乾燥を行い，乾燥物を DMSO に溶解，分注し，-80 ℃にて冷凍保存した．Aβ 凝集阻害活性は微量ハイスループットスクリーニング法 (MSHTS 法)により評価し，EC_{50}(50 %効果濃度)として数値を算出した．

【結果と考察】
白糠町産アイヌ伝承有用植物を含む植物種 27 目 48 科 130 種の Aβ 凝集阻害活性評価をしたところ，全 27 目中 3 目，全 48 科中 10 科，全 130 種中 33 種が EC_{50} 値 0.1 mg/ml 以下の高い活性を有していることが判明した．33 種中 7 種は，以前，本研究室で報告した 52 種類の香辛料 EtOH 抽出物の中で最も活性の高いスペアミント(EC_{50}=0.018 mg/ml)より高い Aβ 凝集阻害活性を有していることが明らかとなった．

Comprehensive screening of inhibitory substances for Amyloid-β aggregation from plants found in the Shiranuka area of eastern Hokkaido

○Hikaru Watanabe[1], Kenji Kubo[1], Koji Sugimura[2], Kiyotaka Tokuraku[1], Koji Uwai[1]
([1]Div. Sustain. Environ. Eng., Muroran Inst Technol., [2]Fac.Pharm.Sci.,Kumamoto Univ.)

Key words amyloid-beta, aggregation, Qdot, Shiranuka

2P-N059 Genetically engineered monomeric streptavidin for designing a new protein expression tag system based on monovalent biotin interaction

○Osamu Hiraoka[1], Sayuri Sakamoto[1], Takuya Terai[2], Shigeru Sugiyama[3], Etsuko Suzaki[1]
([1]Grad. Sch. Clin. Pharm., Shujitsu Univ., [2]Grad. Sch. Pharm., Univ. Tokyo, [3]Fac. Sci. Eng., Kochi Univ.)
hiraoka@shujitsu.ac.jp

Avidin and streptavidin are proteins widely utilized in a number of applications in life science, ranging from purification and labeling techniques to diagnostics, and from targeted drug delivery to nanotechnology. Although (avidin) streptavidin-biotin interaction is universally used in biology, it is not suitable for every application. For example, the dissociation constant of the order of 10^{-15} M is too strong for affinity purification and very harsh conditions are required to elute the biotin-conjugated molecules, which sometimes leads to alteration of the native function or conformation of the targets. Another potential problem with native (avidin) streptavidin-biotin complex is the multivalency, which might lead to aggregation or functional interference with molecules of interest. To address this issue, monomeric (avidin) streptavidin was developed by site-directed mutation. In this study, we describe functional expression and characterization of the engineered monomeric streptavidin, 10 mutein (T76R, V125R, V55T, L109T, A72K, G74E, A89R, T91E, S93R, and W120A) using *E. coli* system. The 10 mutein was obtained about 2.5 mg from 1 litter culture as soluble form (not as inclusion body), and can selectively bind to biotin (Kd = 3.8 μM), and the thermostability (Tm = 40.5℃) was higher than 37℃ for applying to the mammalian cell culture. These results suggested that our recombinant 10 mutein might be candidate for application to construct the new protein expression tag system of biomolecules.

Genetically engineered monomeric streptavidin for designing a new protein expression tag system based on monovalent biotin interaction

○Osamu Hiraoka[1], Sayuri Sakamoto[1], Takuya Terai[2], Shigeru Sugiyama[3], Etsuko Suzaki[1]
([1]Grad. Sch. Clin. Pharm., Shujitsu Univ., [2]Grad. Sch. Pharm., Univ. Tokyo, [3]Fac. Sci. Eng., Kochi Univ.)

Key words Streptavidin monomer, recombinant protein expression, fusion tag

2P-H060 N 末端融合ペプチドを用いた新規可溶性タンパク質検出法

○元島 史尋[1,2], 浅野 泰久[1,2]
([1]富山県大・工, [2]JST, ERATO)
asano@pu-toyama.ac.jp

【目的】タンパク質を安価で大量に得る手段として大腸菌が用いられるが，異種由来タンパク質は不溶性に発現しやすい．熱安定性およびフォールディング能が向上した変異体のスクリーニングはこの問題を解決する有力な方法である．作業を簡略化するため，標的タンパク質の C 末端にレポータータンパク質を融合させ，その活性を指標にする方法が報告されている．しかし C 末端への融合はタンパク質の不安定化を引き起こす場合がある．一方，N 末端への融合は標的タンパク質が欠失して擬陽性が生じる可能性があり，スクリーニングに適さない．
【方法】N 末端融合で起こる擬陽性の問題を解決するために，バクテリアの Tat 輸送装置と split-GFP (1)を組み合わせた実験系を構築した．Tat 輸送装置は native 状態のタンパク質のみをペリプラズム内に輸送し，変性状態のタンパク質を分解経路に移行させる．標的タンパク質には TorA 由来 Tat シグナルペプチドと split-GFP の GFP 11 ペプチドを付加し，Tat シグナルペプチドを付加した GFP1-10 部分と共発現させた．大腸菌ペリプラズム内で両者が結合して GFP 蛍光を呈すると予想された．
【結果】C 末端への融合により不溶性に発現するキャッサバ(*Manihot esculenta*)由来 hydroxynitrile lyase (MeHNL)を用いて本方法を利用したスクリーニングを行った．野生型 MeHNL を error-prone PCR によりランダム変異した．高い蛍光を呈した 8 クローンのうち，7 クローンは可溶性に発現する H103L 変異体を含んでいた．また擬陽性の数は大幅に減少した．現在，他のタンパク質についても本方法を適用し，有用性を検証している．
【References】(1) Cabantous, S. *et al.*, (2005) *Nat. Biotechnol.* 23, 102-107.

A novel detection system for soluble protein using N-terminal fusion peptide

○Fumihiro Motojima[1,2], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

Key words protein folding, protein engineering, GFP, screening

2P-H061 イネ由来ディフェンシンの抗真菌作用メカニズムの解析

○福田 美南海[1], 落合 秋人[1], 大堀 正裕[1], 提箸 祥幸[2], 田中 孝明[1], 谷口 正之[1]
([1]新潟大・自然研, [2]農研機構・北農研)
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】ディフェンシンは，先天性免疫系において機能する抗菌タンパク質の一種である．当研究室では，長い食経験を持つイネ由来ディフェンシン OsAFP1 に着目した．これまでに，OsAFP1 はヒト病原性真菌 *Candida albicans* に対して強力な抗真菌活性を示し，分解酵素や熱に対して高い耐性を有することを明らかにしている．また，断片ペプチドを用いた解析により，OsAFP1 の C 末端に近い 10 個程度のアミノ酸残基が抗真菌活性に関わることを示している．本研究では，部位特異的変異体を設計して抗真菌活性に関わる活性部位を同定するとともに，蛍光観察法を用いてターゲット細胞に対する作用機構を解析した．
【方法と結果】まず OsAFP1 の C 末端付近の 6 つのアミノ酸残基を選択し，アラニンに置換した変異体 K35A, H37A, L39A, K41A, R42A を設計した．PCR を用いた部位特異的変異導入により各変異体の発現プラスミドを作製し，得られたプラスミドを大腸菌宿主に組み込んで大量発現系を構築した．発現させた OsAFP1 の各変異体は，2 段階の精製ステップにより高純度に精製した．濁度法を用いて *C. albicans* に対する各変異体の抗真菌活性を測定した結果，野生型 OsAFP1 と比べてそれぞれ 1/8 以下に活性が低下したことから，これらの残基が抗真菌活性における活性部位を構成することが明らかになった．また，OsAFP1 を作用させた *C. albicans* 細胞に対してアポトーシス検出マーカーである PE-annexin V を処理した．蛍光顕微鏡を用いてこの細胞を観察した結果，アポトーシスが誘導されたことを示す蛍光の集積が細胞膜において観察された．これらの結果により，OsAFP1 はアポトーシスを誘導することにより抗真菌活性を発揮することを明らかにした．今後は，抗真菌活性の向上を目指して OsAFP1 の機能改良を進める予定である．

Analysis of antifungal action mechanism of defensin from rice

○Minami Fukuda[1], Akihito Ochiai[1], Masahiro Ohori[1], Yoshiyuki Sagehashi[2], Takaaki Tanaka[1], Masayuki Taniguchi[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]NARO/HARC)

Key words defensin, antifungal activity, apoptosis, rice

2P-H062 イネ由来 α-アミラーゼの糖結合部位に対する機能解析

○山田 大貴, 落合 秋人, 荻原 寛和, 田中 孝明, 三ツ井 敏明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
ottie@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】イネ由来の α-アミラーゼ AmyI-1 は，様々な組織や成長段階において重要な役割を担っている．当研究室では，これまでに野生型 AmyI-1 の X 線結晶構造を 2.2 Å 分解能において決定した．また，既報のオオムギ由来 α-アミラーゼ(AMY1)の立体構造との比較から，AmyI-1 はその分子表面に 2 つの糖結合部位を有することが示唆された．今回，デンプンのアナログ基質である Acarbose との複合体の立体構造と，同定した糖結合部位における変異体の立体構造を解析し，糖の結合メカニズムを明らかにした．さらに，糖結合部位と酵素活性との関係について考察した．
【方法と結果】野生型 AmyI-1 の結晶を蒸気拡散法により調製し，Acarbose をソーキングすることにより AmyI-1/Acarbose 複合体結晶を調製した．この結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った結果，D203, E228, D314 などのアミノ酸で構成される活性部位に Acarbose が結合していた．さらに，W301 と W302，または Y403 と H418 などから構成される 2 箇所の分子表面にも Acarbose が結合しており，これらの部位が糖結合に関わることが明らかになった．一方で，W302 におけるアラニン変異体 W302A を作製してその α-アミラーゼ活性を測定したところ，野生型と比較してむしろ 1.2 倍程度高い活性を示した．また，それぞれの可溶性デンプンの完全分解物には大きな違いは見られなかった．さらに，W302A の X 線結晶構造を解析して野生型の立体構造と比較したところ，糖結合部位周辺の K305 や N263 などのアミノ酸において顕著な構造変化が認められ，糖結合部位の破壊が確認された．これらの結果を総合的に判断すると，AmyI-1 の糖結合部位はデンプンの加水分解活性とは無関係であることが明らかとなり，他の役割を担っている可能性を示した．

Functional analysis of saccharide-binding-sites of α-amylase from rice

○Hiroki Yamada, Akihito Ochiai, Hirokazu Ogiwara, Takaaki Tanaka, Toshiaki Mitsui, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words rice, saccharide binding site, alpha-amylase

2P-H063 カイコ‐ＢｍＮＰＶ バクミド発現系を用いた熱帯熱マラリア原虫抗原提示ウイルス様粒子の作製

○稲垣 裕[1], 朴 龍洙[1,2], 加藤 竜也[1,2], 宮崎 剛亜[1,2],
Deo Vipin Kumar[3]
([1]静大院・総科技・農, [2]静大グリーン科技研, [3]静大 融合グローバル)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景】マラリアとは，プラスモジウム属に分類される寄生性原虫によって引き起こされる原虫感染症である．マラリア原虫はヒト体内で肝臓と赤血球内に寄生し，それぞれ形態を変化する．従って，各形態の抗原を同時に免疫することで効果的にマラリアを予防できるワクチンがが期待できる．本研究では，カイコ- Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV)バクミド発現系を用いてスポロゾイトとメロゾイトのそれぞれ異なる形態のマラリア原虫表面に発現しているタンパク質である Circum Sporozoite Protein (CSP)と Merozoite Surface Protein 3 (MSP3)をラウス肉腫ウイルス様粒子（RVS VLP）上へ提示させることを目的とした．
【方法・結果】Plasmodium falciparum 3D7 株の CSP と MSP3 (PfCSP と PfMSP3) 遺伝子をそれぞれ膜の貫通領域を欠損させ，C 末端側にバキュロウイルスのエンベロープを構成する糖タンパク質 GP64 の膜貫通領域を付加させた PfCSP-GP64TM，PfMSP3-GP64TM として発現するように遺伝子を組み換え，カイコで発現可能な BmNPV バクミドに挿入した．これらバクミドを RSV VLP バクミドと共発現させた．共発現させたカイコから体液を回収し，ショ糖密度勾配超遠心法で精製を行った．得られたフラクションをウェスタンブロットに供したところ，VLP と CSP が同じフラクションで確認されウイルス様粒子上への提示が示唆された．今後，電子顕微鏡での VLP 形態観察を進め，MSP3 においては粒子上に提示できるようにシグナルペプチドの改変などを行っていきたい．

Production of Rous sarcoma virus-like particles displaying *Plasmodium falciparum* antigen in silkworm larvae

○Yu Inagaki[1], Enoch Y Park[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Takatsugu Miyazaki[1,2], Vipin Kumar Deo[3]
([1]Dept., Agric., Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]College Global-Interdisciplinary Studies, Shizuoka Univ.)

Key words Silkworm, BmNPV, *Plasmodium falciparum*, Virus-like particle

2P-H064 カイコを用いたネオスポラ原虫抗原提示ラウス肉腫ウイルス様粒子の構築

○平松 利輝人[1], Suhaimi Hamizah[2], 加藤 竜也[1,2,3], 朴 龍洙[1,2,3]
([1]静大・農, [2]静・大創科技院, [3]静大・グリーン科技研)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】ネオスポラ症は，*Neospora caninum* によるウシに対する感染症であり，畜産業に大きな損害を与えている．現在ネオスポラ症に対する有効なワクチンなく，早急な予防策が必要である．本研究ではネオスポラ症に対するワクチン候補として，*N. caninum* の抗原タンパク質である Surface antigen 1 (NcSAG1)，SAG1-related sequence 2 (NcSRS2)，Microneme protein 3 (NcMIC3)，Dense granule antigen 2 (NcGRA2)をラウス肉腫ウイルス（RSV）様粒子(RS-VLP)に提示させた抗原提示 RS-VLP の作製を目指した．
【方法】ネオスポラ抗原タンパク質である NcSAG1，NcSRS2，NcMIC3，NcGRA2 遺伝子に Bombyx mori nucleopolyhedrovirus（BmNPV）の表面糖タンパク質 GP64 の膜貫通領域をコードする遺伝子を融合させた融合遺伝子と，RSV の group antigen protein (gag)遺伝子を持つ組換え BmNPV bacmid を作製した．得られたそれぞれの組換え BmNPV をカイコに共感染させ，4 日後回収したカイコ体液から，発現させた抗原提示 RS-VLP を密度勾配遠心分離によって精製した．ウエスタンブロッティングや ELISA，免疫電顕法により抗原提示確認を行った．
【結果と考察】4 種の抗原タンパク質のうち SAG1 と SRS2 を RS-VLP に提示させることができた．RS-VLP への提示量は，NcSRS2 に比べ NcSAG1 が多く，提示させる抗原として NcSAG1 が効果的であると考えられた．さらに，SAG1 と SRS2 を同時に RS-VLP へ提示させることも可能であった．

Construction of Rous sarcoma virus-like particles diplaying antigens of *Neospora caninum* as a vaccine candidate in silkworm

○Rikito Hiramatsu[1], Hamizah Suhaimi[2], Tatsuya Kato[1,2,3], Park Enoch Y.[1,2,3]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Silkworm, Bacmid, Virus-like particle, *Neospora caninum*

2P-E065 カイコ幼虫からのヒトパピローマウイルス様粒子の効率的精製

馬場 里奈[1], 黒澤 八重[2], 鈴木 慎一郎[1], ミンカナー ロバート[3], 加藤 竜也[1,3,4], 小林 伸太郎[2], ○朴 龍洙[1,3,4]
([1]静大・農, [2]HOYA株式会社, [3]静大・創科技院, [4]静大・グリーン科技研)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】 ウイルス本来の外殻構造を有するが遺伝物質を持たないウイルス様粒子（VLP）は，複製の恐れがないためワクチンとして注目されている．しかし，VLP 精製には一般に超遠心法が用いられるが，ウイルスと VLP の分離，スケールアップが困難である点が指摘されている．そこで，カイコ幼虫で発現した VLP を，超遠心法に代わるカラムクロマトグラフィーを用いた精製法の確立を目指した．
【方法】 エンベロープを持たないヒトパピローマウイルス（HPV）構造タンパク質 L1 遺伝子を組み込んだ組換え *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドをカイコ幼虫に注射し，カイコ体内で HPV VLP を発現させた．DNA とバキュロウイルスの除去を目的として，それぞれイオン交換カラムとセラミックヒドロキシアパタイト（CHT）カラムを，最終精製としてヘパリンカラムを用いた 3 段階精製を行った．精製後，DNA，バキュロウイルスとの分離能や VLP の精製効率を調べた．
【結果と考察】 強陰イオン交換カラム（Giga Cap Q-650M，東ソー）が最も高い DNA 除去効率を示した．バキュロウイルスは，精製前 4.00×10^6 pfu/ml であったが，Giga Cap Q-650M カラムで，9.41×10^3 pfu/ml，CHT カラム精製で検出限界であった．透過型電子顕微鏡を用いて精製した VLP を観察したところ，直径およそ 10－50 nm の VLP が観察された．最終的に HPV VLP 71 μg が得られ，残留 DNA は 0.02 ng であった．本研究では従来の精製法である超遠心法に代わるスケールアップが容易なカラムクロマトグラフィーを組み合わせることで，バキュロウイルスと DNA を完全に分離精製することができた．

Efficient purification of human papillomavirus-like particles expressed in silkworm

Rina Baba[1], Yae Kurosawa[2], Shinichiro Suzuki[1], Robert Minkner[3], Tatsuya Kato[1,3,4], Shintaro Kobayasi[2], ○Enoch Y. Park[1,3,4]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Hoya Technosurgical Co., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words virus-like particle, papillomavirus, chromatography, silkworm

2P-H066 マウス由来嗅覚受容体の大腸菌による発現および精製条件の検討

○浅川 賢史[1], 福谷 洋介[1], 池上 健太郎[1], 松波 宏明[2], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]デューク大・メディカルセンター)
yohda@cc.tuat.ac.jp

嗅覚受容体（Odorant receptor: OR）は嗅覚神経細胞の細胞膜上に発現しており，リガンドとなる匂い分子と結合し構造変化することで，G タンパク質を介したシグナル伝達のトリガーとして機能する．従来の OR 研究では，主に OR を培養細胞に発現させ細胞内シグナル伝達を利用したルシフェラーゼアッセイにより OR のリガンド応答を評価していた．しかし OR と匂い分子の結合を直接評価することができず，培養細胞を利用するため工学的応用に向けた課題も多い．そこで本研究では，マウス由来 OR の精製と生化学的解析を行うことを目的に，mOR223-1 を対象に大腸菌での大量発現系の構築と精製を試みた．まず pColdI ベクターに mOR223-1 遺伝子を導入し，mOR223-1 の大腸菌組換え体による発現を試みた．タンパク質発現を確認したところ，mOR223-1 の発現は示唆されたものの発現量が少なく精製を行うのは困難であった．そこで発現に用いるベクターおよび培養条件の再検討による mOR223-1 の発現量の増加を進めている．また，Strep タグを介したアフィニティークロマトグラフィーによる OR の高純度化も行っている．本発表ではこれらの進捗についても併せて報告する．

Expression and purification of mouse olfactory receptor in *E. coli*

○Masashi Asakawa[1], Yousuke Fukutani[1], Kentaro Ikegami[1], Hiroaki Matsunami[2], Masafumi Yohda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Dept. of Molecular Genetics and Microbiology, Duke Univ. Medical center)

Key words odorant response, *Escherichia coli*, binding

2P-H067 βサンドウィッチドメインを用いた新規標的特異的結合分子骨格の検討

○来住 秀憲, 杉田 慎之介, 古賀 雄一, 大政 健史
（阪大院・工）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景】
近年，医薬品や結晶化シャペロンへの応用を目的とした特異性及び高親和性を有する結合蛋白質の構築が注目されている．この標的特異的結合蛋白質は低分子量であることから急速な組織浸透や血中クリアランスが可能な生物物理学的特性を示しており，細胞内分子を標的とした医薬品への応用が期待されている．また微生物を宿主とするため，結合能を利用した安価な研究ツールとしての利用も注目されている．本研究では高い安定性及び結合力を有する新規結合分子骨格として好熱菌 *F. islandicum* 由来サチライシン様セリンプロテアーゼ Islandisin の Sandwich Domain 1(SD1)に着目した．
【方法】
SD1 は組換え大腸菌により発現させ，Ni^{2+}アフィニティークロマトグラフィーにより精製することで調製した．ケラチンを担体としたプルダウンアッセイを行い，SD1 の結合能を評価した．また SD1 の三次元構造を MUSTANG によりラクダ抗体の VHH と重ね合わせ，構造相同性の評価を行った．さらに CD 測定による SD1 の二次構造及び熱安定性の評価を行った．
【結果及び考察】
ケラチンを担体としたプルダウンアッセイによる結合評価においてケラチンに対する結合を示したことから，SD1 は Islandisin において結合部位に関与するドメインである可能性が示唆された．さらに三次元構造アライメント解析の結果，VHH と SD1 の RMSD 値が 1.542 Å という高い値を示したことから標的分子への標的部位の設計が可能な分子骨格になりうる可能性が示唆された．また CD 測定により SD1 は単ドメインでβシート構造を形成しており，87.5℃という高い変性温度を有していたことから高い熱安定性を有する分子骨格になりうると考えられる．最後にファージディスプレイ法を用いた標的特異的結合蛋白質の構築へ向けた取り組みについて報告する．

Investigation of novel target-specific binding protein scaffold based on β sandwich domain

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

Key words protein engineering, binding protein scaffold, phage display

2P-N068 腫瘍免疫を活性化する REIC/Dkk-3 タンパク質の相互作用分子の解析

○羽田 彩夏[1], 中川 そらみ[1], 木下 理恵[1,2], 二見 淳一郎[1]
（[1]岡山大院・自科, [2]岡山大・医・細胞生物）
futamij@okayama-u.ac.jp

正常細胞で普遍的に発現している一方で，多くのがん細胞で発現が消失している REIC/Dkk3 は分泌タンパク質である．アデノウイルスベクターを用いて REIC を強制発現させる Ad-REIC 治療では，(1)分泌発現の段階でがん細胞に選択的に小胞体ストレスに起因するアポトーシスを誘導，(2)分泌後の REIC タンパク質が樹状細胞の分化を誘導し抗がん免疫活性が誘導される．すなわち Ad-REIC 治療では「選択的アポトーシス誘導」と「抗がん免疫の活性化」を同時に発揮する理想的な抗がん機構が判明している．実際に腫瘍局所に Ad-REIC を局注する前立腺がん・肝がん治療の臨床研究が岡山大学病院で進んでおり，高い臨床効果が確認されている．本研究ではこの後者の抗がん免疫活性化の分子機構の解明を進めている．
これまでの研究で，分泌 REIC タンパクが示す作用濃度は高く，REIC と相互作用する分子とは低親和性で結合していることが予測されていた．我々は組換え REIC タンパク質を用いてプロテオミクス手法で結合候補分子を探索し，TGFβ 受容体の細胞外ドメインを見出し，その結合検証実験を進めている．FreeStyle293 細胞での共発現により REIC タンパク質と TGFβ 受容体の細胞外ドメインの 1:1 の複合体形成が確認された．また，対応するサイトカイン TGFβ に対する細胞内シグナル伝達が REIC タンパク質により競合阻害されることをバイオアッセイとルシフェラーゼアッセイで確認した．TGFβ は腫瘍局所で免疫抑制状態を誘導することが知られており，REIC タンパク質は TGFβ 活性の阻害によって腫瘍免疫応答の活性化に関連している可能性が示唆された．

Analysis of REIC/Dkk-3 binding protein related to enhancing tumor immunity

○Ayaka Hada[1], Sorami Nakagawa[1], Rie Kinoshita[1,2], Junichiro Futami[1]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ., [2]Dept.cell biol. Med. Okayama Univ.)

Key words cancer immunotherapy, TGF-beta, protein engineering

2P-N069 SH 保護試薬によるジスルフィド結合含有タンパク質の加熱不可逆失活の抑制

○萩本 惇史, 宮本 愛, 二見 淳一郎
（岡山大院・自科）
futamij@okayama-u.ac.jp

タンパク質の溶媒・添加剤の工夫で保存安定性が大幅に向上する例があり，安定化剤にはタンパク質分子に対する化学修飾の抑制能が求められる．ジスルフィド（SS）結合含有タンパク質においては，加熱時に SS 結合が開裂して SH/SS 交換反応が不可逆失活の主因となる例が多い．この際，生成された極微量の SH 基を速やかに保護し，かつ，分子内で本来のジスルフィド結合を再生することができれば，SS 結合含有タンパク質の不可逆失活の抑制が期待できる．本研究では SS 結合を有する様々なタンパク質をモデルとして SH 基と特異的かつ速やかに反応する SH 基保護試薬：methanthiosulfonate(MTS)系試薬を用いて，SH/SS 交換反応に起因する加熱不可逆失活の抑制効果を評価した．

分子内に SS 結合を有するタンパク質として Lysozyme，RNaseA，α-lactalbumin，IgG，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 TAPS-Sulfonate や S-Methylmethanethiosulfonate（MMTS）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．さらに MTS 試薬の検討で得られた添加剤の最適化条件でオートクレーブ（121℃・20 分）条件での残存活性の評価を行った．

単量体の SS 結合含有球状タンパク質は，MTS 試薬の添加で不可逆失活が大幅に抑制された．一方で，IgG や Chicken avidin の様に高次の四量体を形成するタンパク質において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判明した．また，グリシンアミドと MTS 試薬の併用により大幅に安定化効果が高まり，オートクレーブ後においても同様の結果が得られた．

Supression of heat-denaturation of disulfide containing protein by SH blocker

○Atsushi Hagimoto, Ai Miyamoto, junichiro Futami
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ.)

Key words protein engineering, stability

2P-H070 基板材料結合タンパク質を用いたナノデバイス指向インターフェイス分子開発

○宮木 達輝, 中澤 光, 筋野 拓馬, 梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

疾患診断の多くは，特定の標的分子を検出することで行われることが多く，その検出では標的分子に対して高い特異性を持つ抗体を検出プローブとして基板や膜，粒子表面へ固定化し，その抗体が捕獲した標的の分子量を計測することで診断する．この検出を高感度化するには，抗体を高密度かつ高配向で固相表面へ固定化する必要があるが，そのためには固相表面を化学修飾しなければいけないという問題点がある．
近年，我々は特定の材料に対して特異的に結合するラクダ抗体の抗原結合ドメイン VHH の取得に成功した．この VHH は固相表面に対して化学修飾せずに高密度に結合できるため，基板と抗体の間に用いることで検出の高感度化が期待できる．
そこで，本研究では様々な抗体断片をこの VHH の C 末端に融合させたインターフェイス分子を開発し，既存の検出方法やバイオセンサーの感度を汎用的に向上させる方法を提案する．

Application of material-binding protein for easy immobolization of antibodies on material chip

○Tatsuki Miyaki, Hikaru Nakazawa, Takuma Sujino, Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words biosensor, antibody, immobilization, protein engineering

2P-H071 レクチン様分子シャペロン calnexin と ERp29 の相互作用における物理的性質の解析

○中尾 仁美[1], 瀬古 玲[2], 伊藤 幸成[3], 迫野 昌文[1]
（[1]富山大院・理工, [2]JST・ERATO, [3]理研）
msakono@eng.u-toyama.ac.jp

【背景と目的】分子シャペロン calnexin(CNX)は小胞体での糖タンパク質フォールディングにおいて中心的な役割を果たす．PDI (protein disulfide isomerase)ファミリータンパク質 ERp57 は CNX と複合体を形成しジスルフィド結合形成を補助すると考えられているが，我々は CNX が ERp57 と同様に ERp29 とも相互作用することを見出した．本研究では，CNX-ERp29 複合体の解離定数の算出ならびに CNX 上の ERp29 認識部位に関する検討を行った．
【方法】HaloTag 融合 CNX を，HaloTag 修飾セファロースビーズ上に固定化した CNX 固定粒子を用いて，様々な濃度(0-100μM)の ERp57, ERp29 に対してプルダウン実験を行った．プルダウン後，溶液から単離した粒子に結合した ERp57 および ERp29 を SDS-PAGE で分離し，染色を行った．タンパク質濃度とバンドの濃さをプロットし，1:1 結合式によるカーブフィッティングにより解離定数を導出した. ERp57 と相互作用しない CNX M346A 変異体を作製し，同様に ERp57, ERp29 に対してプルダウン実験及び SDS-PAGE での分離を行い，相互作用の評価を行った．
【結果と考察】カーブフィッティングより CNX-ERp29, CNX-ERp57 の解離定数は，それぞれ 3.7 μM, 4.4 μM と推定され，おおよそ同程度の相互作用であることが示された．CNX M346A を用いたプルダウン実験では，ERp57 との相互作用は予想通り大きく減少したが，ERp29 との相互作用の減少は限定的であった．したがって，CNX 上の ERp29 相互作用ドメインは ERp57 のそれと近接しているが，結合様式は異なることが予想された．CNX-ERp29 複合体形成における ERp29 の二量体形成の影響についてさらに検討を行う．

Biophysical analysis of interaction between molecular chaperone calnexin and ERp29.

○Hitomi Nakao[1], Akira Seko[2], Yukishige Ito[3], Masafumi Sakono[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, [2]ERATO, JST, [3]RIKEN)

Key words calnexin, ERp29, protein-protein interaction, Protein disulfide isomerase

2P-H073 マウス嗅覚受容体の膜輸送機構解明に向けた RTP1S の機能構造解析

○玉木 良平[1], 池上 健太郎[1], 福谷 洋介[1], 松波 宏明[2], 養王田 正文[1]
（[1]農工大院・工, [2]デューク大・メディカルセンター）
yohda@cc.tuat.ac.jp

嗅覚は多くの生物の生命活動に重要な役割を担う感覚である．環境中の匂い分子の識別は，嗅神経細胞に発現している嗅覚受容体（Odorant Receptor; OR）の働きによる．G タンパク質共役型受容体に属す OR が匂い分子を特異的に受容することで生じるシグナル伝達により，生物は匂いを感じている．OR は生物種ごとに数百種類あるが，多くの OR は単独では細胞膜に局在することができず, Receptor Transporting Protein 1S (RTP1S)の補助を必要としている. この RTP1S は 1 回膜貫通型の膜タンパク質であり，小胞体で OR と相互作用することで，OR と RTP1S は細胞膜に輸送されると考えられている．しかしながら，RTP1S の構造は未解明であり，RTP1S と OR の相互作用部位なども一切同定されてないため，RTP1S による OR の細胞膜輸送機構は未解明である．
我々はかねてから，哺乳類の嗅覚を模倣した匂い検出システムの開発を目指しており，その中で OR の発現方法の最適化が課題の 1 つである．そこで，本研究では OR にとって最も重要なシャペロンである RTP1S の機能構造解析を行い，RTP1S のもつ OR の膜輸送機能の解明を行うことを目的とした．
RTP1S の膜貫通領域欠損体 RTP1SDTM を大腸菌組換え体として獲得した. SEC-MALS 法による絶対分子量測定により，RTP1SDTM がホモ二量体を形成していることが示唆された. また, 最少培地を用いた培養から亜鉛イオンが RTP1SDTM の構造安定化に，また還元剤による試験からジスルフィド結合が RTP1SDTM のホモ二量体形成に一部関与することが示唆された．さらに，分割ルシフェラーゼ融合体 RTP1S を HEK293T 細胞に発現させたところ，RTP1S が細胞内においてもホモ二量体を形成することが示唆された．これらのことから，RTP1S はホモ二量体で安定なタンパク質であると考えられる．現在，RTP1S と OR との相互作用解析を進めており，その進捗についても併せて報告する．

Structural and functional characterization of receptor transporting proteins for elucidating the cell surface trafficking mechanism of olfactory receptors

○Ryohei Tamaki[1], Kentaro Ikegami[1], Yosuke Fukutani[1], Hiroaki Matsunami[2], Masafumi Yohda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Duke Univ. Medical center)

Key words protein, receptor, transmembrane domain, protein interaction

2P-N072 In cell folding 法による可逆的カチオン化転写因子タンパク質の導入効率の検討

○中野 智貴[1], 二見 淳一郎[2], 槇原 将紘[2], 浅間 孝志[2], 二見 翠[1]
（[1]岡山理大院・工・生工, [2]岡山大院・自科）
mfutami@bme.ous.ac.jp

我々は転写因子タンパク質の細胞導入を細胞機能の人工制御技術として応用する研究を行っている．転写因子は構造的に揺らぎが大きく凝集しやすい特性から，活性構造での導入はタンパク質の取り扱い上難しい．In cell folding 法では変性状態のタンパク質のチオール基を可逆的にカチオン化することにより可溶化し，効率的に細胞内に送達し，細胞質の還元環境によって活性構造を形成させ，機能を発揮させる．細胞表面に吸着したカチオン化タンパク質はエンドサイトーシスによって取り込まれるため，エンドソームからの放出が重要な鍵となる．本研究では，In cell folding 法により肝臓特異的転写因子 HNF-4α タンパク質と人工転写因子 GAL4-VP16 タンパク質をモデルとして，カチオン化方法，細胞導入時の添加物の検討を行った．HNF-4α では，平均分子量 1200 以上のポリエチレンイミンの付加により導入効果が確認できた一方で，GAL4-VP16 では一級アミンの付加で十分な導入効果が得られた．このことはタンパク質の導入効率にはカチオン化量だけでなく，タンパク質自身の物性も関わると示唆される．さらに GAL4-VP16 の導入では，両親媒性ペプチドである Endo-PORTER との共導入により導入効率が劇的に改善した．蛍光標識した GAL4-VP16 を用いた実験では，Endo-PORTER の効果で GAL4-VP16 が細胞質に拡散することが分かった．以上の結果から，in-cell folding 法におけるカチオン化・添加物条件をタンパク質毎に最適化することで，最大限の導入効果が得られる可能性がある．
(参考文献：J. Biosci. Bioeng., 123(4):419-424, 2017)

In cell folding efficiency of reversibly cationized transcription factor.

○Tomoki Nakano[1], Junichiro Futami[2], Masahiro Makihara[2], Takashi Asama[2], Midori Futami[1]
([1]Dept. Biomed. Eng., Fac. Eng, Okayama Univ. Sci., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ.)

Key words protein transduction, in cell folding, transcription factor, cell regulation

2P-N074 リポソームディスプレイ法を用いた デザイン膜タンパク質の機能アッセイ

○岡村 昂典, 渡邉 肇, 松浦 友亮
（阪大院・工）
matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

膜タンパク質は，生物工学にとって重要な研究対象だ．しかし，そのほとんどは天然に存在する配列を対象にしており，完全に非天然の新規膜タンパク質を創り出すという試みはあまりなかった．ところが近年，Computational designed の非天然配列を用いて 天然膜タンパク質と同種のトランスポーター機能を発現させた成果(V Vinson *et al.*, *Science*, 2014) が報告され始めている．
我々は，そのような computational designed membrane proteins 研究の出発点としてポア形成機能を持つようにデザインされた配列 7h2L に注目した．7h2L は脂質膜上でヘアピン構造をとり，会合し，ポアを形成するようデザインされており，結晶構造解析に成功している(*unpublished*)．しかし，ポア形成により細胞毒性を示すという制限があり，生体条件においてポア形成が起こるかどうかを解析することが困難だった．そこで我々は無細胞翻訳系 PURE system(Shimizu *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2001)と細胞サイズのリポソーム GUV を組み合わせたリポソームディスプレイ法(Fujii *et al.*, *Nat Protoc*, 2014)を用いて 7h2L のポア形成能のアッセイ系立ち上げを目指した．
まず，7h2L の C 末端に myc タグを付加した遺伝子配列を PURE system により合成し，Anti-myc 蛍光抗体で 7h2L の膜挿入を確かめる事ができた．この際 GUV 内部および外部で合成した結果から デザイン通りの配向性が示唆された．次に，GUV 内部にストレプトアビジンを封入，7h2L を合成し外部に蛍光ラベルされたビオチンを添加したところ，蛍光ビオチンが GUV 内部に集積する様子を観察出来た．また，カルシウムイオンとそのインジケーター Calcium Green1(CG1)dextran conjugate を用いた場合にも低分子基質の GUV 内部への集積を観測することが出来た．これは 7h2L によるポアの形成を検出することが出来たことを意味している．

Functional assay of designed membrane proteins by using liposome display method

○Kosuke Okamura, Hajime Watanabe, Tomoaki Matsuura
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words membrane protein, cell-free protein synthesis, cell-sized liposome, functional assay

2P-H075 超安定化人工蛋白質 SUWA の X 線結晶構造解析および蛋白質ナノブロック超分子複合体動的秩序構造形成への応用

木村 尚弥[1], 小林 直也[1], ○新井 亮一[1,2]
([1]信州大・繊維, [2]信州大・菌類微生物セ)
rarai@shinshu-u.ac.jp

私達は，近年，分子間フォールディング（ドメインスワップ）4 本ヘリックス二量体構造を形成する新規人工蛋白質(*de novo* protein) WA20 を利用して，蛋白質ナノブロック(Protein Nano-building Block: PN-Block)の WA20-foldon を開発し，多様な自己組織化超分子ナノ構造複合体の創出に成功してきた(Kobayashi, N., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 137, 11285-11293, 2015)．また最近，ナノマテリアル等への応用を見据えて，ナノブロックを構成する人工蛋白質の構造安定化を目的として，立体構造を基にした合理的デザインによりアミノ酸変異を導入した改変新規人工蛋白質 SUWA (Super WA20)を開発した．熱変性実験の結果，SUWA の変性温度 T_m は 122℃と極めて高く，WA20 よりも 47℃もの熱安定性の向上に成功した．そこで，SUWA の安定化機構の理解をさらに深めるために X 線結晶構造解析を行って立体構造を解明したところ，WA20 と同様に特徴的な分子間フォールディング 4 本ヘリックスバンドル二量体構造を形成していた．変異導入箇所を詳細に観察すると，新たな疎水性相互作用が形成されており熱安定化への寄与が確認された．さらに，蛋白質ナノブロック SUWA-foldon を構築したところ，複数の自己組織化超分子ナノ構造複合体の形成が示された．また，熱変性実験を行ったところ，これらの蛋白質ナノブロック複合体においても安定性の向上が示され，さらに部分的熱変性・再構成による動的秩序構造の形成も示唆された．これらについて SEC-MALS 解析や SAXS 解析を行ったところ，樽型 6 量体及び正四面体型 12 量体の超分子複合体構造の形成が示唆された．

Crystal structure of a super-stabilized *de novo* protein SUWA, and its application to dynamical ordering supramolecular complexes of protein nanobuilding blocks

Naoya Kimura[1], Naoya Kobayashi[1], ○Ryoichi Arai[1,2]
([1]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]CFMD, Shinshu Univ.)

Key words protein engineering, protein structure design, self-assembling supramolecular nanostructure, protein nanobuilding block

2P-H076 Effect of carbon-nitrogen ratio on accumulation of valuable compounds in *Yarrowia lipolytica* culture

○Sivamoke Dissook, Sastia Putri, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* is an attractive host for converting various carbon source to high-value chemicals in an economical and environmentally friendly way. However, metabolic engineering of *Y. lipolytica* is still in its infancy. Metabolomics has been shown to facilitate metabolic engineering in various organisms. At present, information regarding metabolite changes that occur within *Y. lipolytica* in different environmental conditions is still limited. Among different factors affecting *Y. lipolytica* metabolism, the carbon-nitrogen ratio has been found to give a profound effect in altering the metabolic state of this yeast. The previous study reveals lipid accumulation increased two-fold in limited nitrogen condition due to the increased biosynthesis of acetyl-CoA from additional citrate and decreased capacity for β-oxidation. In this study, *Y. lipolytica* was cultivated in several different carbon-nitrogen ratios, and metabolite changes were monitored in a time-course manner. Relative quantification of 81 metabolites was performed using IP-RP- LC/QqQ-MS system. This study revealed that the carbon-nitrogen ratio significantly affects metabolite accumulation and growth of *Y.lipolytica*. This study could help provide a better understanding of *Y.lipolytica* metabolism and basic information for metabolic engineering of *Y.lipolytica*.

Effect of carbon-nitrogen ratio on accumulation of valuable compounds in *Yarrowia lipolytica* culture

○Sivamoke Dissook, Sastia Putri, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Yarrowia lipolytica*, Metabolomics, LC/MS, Carbon-nitrogen ratio

2P-H077 納豆菌を宿主とした *pyrE* 遺伝子破壊株によるオロト酸の生産性の評価

○七尾 圭香[1], 袴田 佳宏[2], 大箸 信一[2]
([1]金工大院・工, [2]金工大・ゲノム研)
yhakamada@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】
オロト酸は UMP 生合成経路の代謝中間体物質であり，これまでに医薬品に配合されるなどヒトに生理活性を有する物質である．現在多くのオロト酸は，尿素とオキサロ酢酸エステルとの有機合成反応で生産されており，一方で枯草菌 *Bacillus subtilis* による生産が報告されている．本研究では，食品微生物である納豆菌を用いて，UMP 生合成経路の一員である Orotate phosphoribosyltransferase の遺伝子 *pyrE* の破壊株を構築し，オロト酸の生産性を検討した．
【方法】
破壊用プラスミドを構築し，プロトプラスト法を用いて形質転換を行った後，相同組換えによって目的遺伝子が破壊された株を選択した（*B.natto* KIT1205*ΔpyrE*）．得られた破壊株を用いて，ウラシルの発酵生産で用いられる一般的な液体培地により経時的なオロト酸の生産性(1-5 days)を調べた．発酵生産により生じたオロト酸の定性・定量は，HPLC を用いて行った．
【結果】
オロト酸発酵生産では，変異株・破壊株ともに 3 日目における生産が最も高かった(mutant:13.9(±1.48) g/L, disrupt :15.3(±0.53) g/L)．従って納豆菌によるオロト酸の生産では，遺伝子破壊株の有意性は認められなかったが，生産性は変異株と比べ高い傾向を示した．遺伝子破壊株は，変異株で生じる reveresion による生産性の低下を解決できると考えられた．

Estimation of ororic acid production by *Bacillus natto* harboring disrupted *pyrE* gene

○Keika Nanao[1], Yoshihiro Hakamada[2], shinichi Ohashi[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kanazawa Inst. Technol., [2]Genome Biotechnol. Lab., Kanazawa Inst. Technol.)

Key words *Bacillus natto*, orotic acid, gene disruption, production

2P-H078 高光学活性 L-乳酸の生産のための複合微生物系の再構築

○溝口 尊春[1], 古原 俊哉[1], 田代 幸寛[1], 宮本 浩邦[2], 酒井 謙二[1]
([1]九大院・生資環, [2]日環科学)
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】本研究室では複合微生物系による有価物生産のための発酵法を『メタ発酵』と定義提唱している（Tashiro et al.. Bioresour Technol., 2013, 2016）がメタ発酵の制御に関する知見は少ない．これまでに，堆肥を種菌としたメタ発酵にて，糖化処理した標準生ゴミ培地から高光学純度 L-乳酸の生産，さらに主要 L-乳酸生産菌である *Bacillus coagulans* とデンプン分解菌である *B. thermoamylovorans* の分離に成功した．優秀な分離菌を用いてメタ発酵を再構築することができれば，プロセスの改良および制御に関する理論の構築が期待できる．本研究では，上記 2 種の分離菌に加えて，新たに分離された *B. hisashii* を用いて糖化未処理の標準生ゴミ培地から直接 L-乳酸を生産するメタ発酵システムを再構築することを目的とした．
【方法】堆肥または分離菌 3 種 14 株を異なる組み合わせで糖化未処理の標準生ゴミ培地に接種して，50℃，嫌気的にメタ発酵を行った．発酵中，24 h 毎に pH7.0 に振動制御および窒素置換を行った．
【結果・考察】堆肥を種菌としたメタ発酵では，糖化処理した場合と同程度の乳酸生産濃度が得られた．一方，分離菌を用いたメタ発酵では，分離菌の組み合わせによって乳酸生産濃度が大きく異なった．検討した組み合わせの中で，全 14 株を用いたメタ発酵で，最大 L-乳酸生産濃度（光学純度 100%）が得られ，堆肥を用いた場合と同等であった．特に，*B. hisashii* は発酵終盤に *B. coagulans* が分解・利用できない多糖類を分解し，乳酸生産濃度の向上に寄与していることが予測された．以上の結果，分離菌によってメタ発酵を再構築できるとともに，属・株レベルでメタ発酵を制御できる可能性が示唆された．今後，14 株からの優秀な分離菌の選定によるさらなる効率化および各分離菌の機能の解明を行う予定である．

Reconstruction of complex microbial system for producing highly optical pure L-lactic acid

○Takaharu Mizoguchi[1], Toshiya Kohara[1], Yukihiro Tashiro[1], Hirokuni Miyamoto[2], Kenji Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Japan Eco-Science)

Key words L-lactic acid, complex microbial system, meta-fermentation

2P-H079 スクリーニングした *Lipomyces* の脂質蓄積能力を高める培地・培養条件

○柳場 まな[1], 正木 和夫[2], 南アルプス市[3]*, 長沼 孝文[1]
（[1]山梨大院・医工総, [2]岐阜産技セ・環化, [3]南アルプス市）
tnaganuma@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】 地球温暖化の要因となる二酸化炭素の蓄積が抑制できる再生可能バイオディーゼル燃料(BDF)は，油糧作物からの植物脂質が原料であるが，栽培環境の悪化や急激な世界人口の増加により燃料用として潤沢に供給することは難しい．私達が研究対象としている脂質生産酵母 *Lipomyces* は，菌体内脂肪球として中性脂質を蓄積する特長を有し，その脂質は BDF の原料として利用可能である．そこで脂質生産の実用化を目指し，まず脂質蓄積能力の高い *Lipomyces* 菌株のスクリーニングを行った．得られた脂質高蓄積能株は，炭素源を脂質に変換する効率が高く，脂肪球内脂質が漏出し易い傾向にあった．
本報告では，スクリーニングされた脂質蓄積能力が高い菌株の，より高い能力が発揮できる培地・培養条件の決定を試みた．
【結果と考察】 南アルプス市で発生する廃棄モモ果実と学校給食残炊飯米の各低価値再生可能資源から脂質の実用生産に利用できる菌株の決定を行った．脂質変換効率，脂質生産量を指標に菌株の解析を行った結果，廃棄モモ果汁培地で 2 株，残炊飯米培地で 1 株が得られた．続いて，決定した菌株を用いて炭素源濃度，培地成分，通気量，前培養回数，培養時間が脂質蓄積能力やその他の能力に及ぼす影響について振盪フラスコを中心とする小規模ラボレベルで検討した．炊飯米培地における野外菌 No.8 変異株の脂質蓄積能力は炭素源濃度 8% で，高い振盪数が良かったことから溶存酸素濃度の影響が示唆された．モモ果汁培地で選抜された野外菌 No.335 と 347 では最適炭素源濃度が異なった．また，果汁で前培養を行なうと両者とも高い脂質蓄積能力を発揮したが，前培養回数の影響は No.347 の方が受け易かった．これらの結果から，環境要因はスクリーニングされた *Lipomyces* の能力発揮に影響を及ぼし，その影響の受け方は菌株で異なることが分かった．

*著者からの希望により自治体名を記載しています。

Medium component and culture condition for improvement on lipid accumulation ability of screened *Lipomyces*

○Mana Yanagiba[1], Kazuo Masaki[2], Minami alps-shi[3]*, Takafumi Naganuma[1]
([1]Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, [2]Ind. Technol. Center, Gifu Pref. Gov., [3]Minami alps-shi)

Key words *Lipomyces*, lipid accumulation ability, medium component, culture condition

2P-H080 *Citrobacter braakii* TB-96 株の有機酸生合成経路破壊による 1,3-プロパンジオール生産の向上

○清 啓自[1], 野中 大輔[2], 森田 峻秀[2], 松本 瑞葵[3], 吉田 ナオト[1], 中島（神戸） 敏明[2]
（[1]宮崎大・農, [2]筑波大院・生命環境, [3]筑波大）
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【背景・目的】
現在，化石燃料の代替エネルギーとしてバイオディーゼル燃料(BDF)が注目されている．BDF は植物油などを原料とする脂肪酸メチルエステルであり，地球温暖化抑制に効果的であるとされる．しかし，BDF 生産において副生する廃グリセロールは高アルカリ性かつ不純物を含むため，再利用が困難であり，コストをかけて処分されている．従って，廃グリセロールの有効利用及び BDF 生産のコスト削減のため，これを基質とした有用物質の発酵生産が注目されている．我々はこれまでにポリマー原料などに利用される 1,3-プロパンジオール(1,3-PD)をグリセロールから高生産する *Citrobacter braakii* TB-96 株を環境中から単離した．当株はグリセロールを炭素源としたとき，主発酵産物は 1,3-PD であるが，副産物として乳酸とギ酸が多く生産される．そこで，本研究では TB-96 株によるグリセロールからの 1,3-PD 生産量及び収率の向上のため，乳酸とギ酸生成経路の破壊について検討した．
【方法・結果】
TB-96 株を用いて乳酸生成経路の主要酵素である Lactate dehydrogenase (*ldh*)，およびギ酸生成経路の Pryuvate-formate lyase (*pfl*)の破壊により，乳酸とギ酸生産量低減による 1,3-PD 生産量および収率の向上を試みた．野生株にλファージ由来リコンビナーゼ発現プラスミド pKD78 を導入し，相補鎖 500 bp をもつ破壊用断片を更に導入することで相同組換えにより遺伝子破壊を行った．
野生株と取得した破壊株をそれぞれ 2 L ジャーファーメンターでグリセロールを逐次添加する流加培養に供した結果，1,3-PD 生産量は野生株 55 g/L に対して Δ*pfl* では顕著な変化はなかったものの，*Δldh* は 67 g/L に増大した．また，1,3-PD 収率も野生株の 0.33 g/g に対して，Δldh は 0.40 g/g まで向上した．現在，多重破壊株の取得により更なる向上を試みている．本研究は JST-ALCA の一環として行った．

Improvement of 1,3-propanediol production of *Citrobacter braakii* strain TB-96 by disruption of organic acid producing pathway

○Kiyoshi Keiji[1], Nonaka Daisuke[2], Takahide Morita[2], Matsumoto Mizuki[3], Yoshida Naoto[1], Nakajima Toshiaki[2]
([1]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Univ. Tsukuba)

Key words 1, 3-propanediol, glycerol, lactic acid, formic acid

2P-H081 *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-プロパンジオール生産における最適培養系の構築

○野中 大輔[1], 森田 峻秀[1], 清 啓自[2], 松本 瑞葵[3], 中島 敏明[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]宮崎大院・農, [3]筑波大）
nakajima.toshiaki.ga@u.tsukuba.ac.jp

【目的】現在，化石燃料の代替燃料として，バイオディーゼル燃料（以下 BDF）が注目されている．しかし，BDF 生産の副産物である廃グリセロールは，廃棄物としてコストをかけて処分されている．そこで，BDF の利用性向上のために，微生物による廃グリセロールを基質とした 1,3 プロパンジオール（以下 1,3-PD）発酵生産を検討した．1,3-PD は，ポリエステルや化粧品の原料など需要が高い化合物である．これまでに当研究室は，グリセロール資化性 1,3-PD 高生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株を取得している．本研究では，この TB-96 株の 1,3-PD 生産性の向上を目的とし，培養系の構築，及び最適培養条件の検討を行った．
【結果】先行研究から，TB-96 株は最適条件下において，48 時間で 51.1 g/l，最大生産性 2.67 g/l/h と高い 1,3-PD 生産能・生産性を示した．この 1,3-PD 高生産能を維持し，かつ他代謝産物の影響を抑えるために，不織布を用いた固定化培養の検討を行った．培地を全量交換し，繰り返し培養を行った．その結果，5 回目まで 1,3-PD 生産性が高い状態(2.8 g/l/h)で安定して連続的に培養することに成功した．また，その後基質量を増加することで 1,3-PD 生産性は最大 3.9 g/l/h まで向上した．また，基質として廃グリセロールを用いた培養でも純グリセロールを基質とした培養と同程度の 1,3-PD 生産量を達成した．さらに，不織布を使用した連続培養系の構築を検討した．本研究は，JST, ALCA の一環として行われた．

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

○Daisuke Nonaka[1], Takahide Morita[1], Keiji Kiyoshi[2], Mizuki Matsumoto[3], Toshiaki Nakajima-Kambe[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Agric., Univ. Miyazaki., [3]Univ. Tsukuba)

Key words 1, 3-propanediol, *Citrobacter*, immobilization, continuous culture

2P-E082 創薬研究を目指したベンジルイソキノリンアルカロイドの大腸菌を用いた生産系の構築

○中川 明[1], 佐藤 文彦[2], 片山 高嶺[2], 南 博道[1]
（[1]石川県大・生物資源研, [2]京大院・生命）
minami@ishikawa-pu.ac.jp

モルヒネをはじめとするベンジルイソキノリンアルカイド（BIA）は医薬品として利用されている天然物であり，将来的にも様々な薬効成分の発見が期待されている．しかし，実用 BIA 生産は植物からの抽出に頼っているため比較的高価であり，また，新規天然 BIA についても微量にしか存在しないものが多く，その薬効研究も難しい．微生物の培養は植物に比べ，空間的時間的なコストが安くすみ，その制御のしやすさから生産能向上が容易であると考えられている．近年，微生物を用いた BIA 生産系の構築に注目が集まっており，本研究では，安価な BIA 生産系の構築を目的とし，大腸菌を用いた BIA 生産基盤技術の開発を行っている．
BIA の殆どは(*S*)-レチクリンを中間体として生成されるため，我々は，生合成経路が明らかになっていない反応段階や大腸菌で発現が難しいとされる P450 酵素の存在等，幾つかの問題点を代替酵素の利用等の技術を用いて，グルコースから(*S*)-レチクリンを生産する BIA 生産プラットフォーム株を構築した．続いて，本プラットフォーム株を用いて，テバインを始めとする実用 BIA 生産系も構築し，微生物を用いた BIA 世界最高生産量を実現した．更に天然には存在しない新規 BIA の生産も行い，薬理効果の検証も行っている．
本研究では，様々な実用 BIA，新規 BIA，希少 BIA を生産することに成功しており，医薬品製造，創薬研究に役立つ結果を得られている．本技術を用いることにより BIA を中心とした医薬創薬研究の飛躍的発展が望める．

Benzylisoquinoline alkaloids production using *Escherichia coli* for drug discovery

○Akira Nakagawa[1], Fumihiko Sato[2], Takane Katayama[2], Hiromichi Minami[1]
([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words alkaloid, production, *Escherichia coli*

2P-H083 High butanol production by immobilized extractive fermentation with large extractant volume

○Rizki Darmayanti[1], Takuya Noguchi[1], Ming Gao[1], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,2]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

Biobutanol, attracted as biofuel, can be produced via butanol fermentation, where there are several challenges. The toxicity of butanol to the producing strain inhibits butanol production, which results in lower butanol concentration less than 20 g/l. Extractive fermentations have been reported to reduce the butanol toxicity under small extractant volume at extractant/broth ratio (Ve/Vb) of ca. 1. Besides, immobilization technique would be also expected to protect the cells from the toxic environment. The objective of this research was to establish high butanol production using immobilized extractive fermentation with large extractant volume.

Fed-batch fermentation was conducted using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 and oleyl alcohol - tributyrin mixture (1:1 v/v) as extractant. At Ve/Vb of 5, only 24.2 g/l total butanol concentration was obtained using free cells. Subsequently, the following types of immobilized extractive fermentation were investigated at Ve/Vb of 5; two phases (EC) of extractant and carrier beads (immobilized cells and nutrients), and 3 phases (EBC) of extractant, broth (nutrients) and carrier beads (immobilized cells). EBC exhibited higher 29.4 g/l total butanol concentration than EC (27.7 g/l). Furthermore, EBC at Ve/Vb of 10 increased total butanol concentration to 64.6 g/l. We established novel butanol production process with combination of extractive fermentation with large Ve/Vb and immobilization by reducing butanol toxicity effect .

High butanol production by immobilized extractive fermentation with large extractant volume

○Rizki Darmayanti[1], Takuya Noguchi[1], Ming Gao[1], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,2]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

Key words butanol, extractive fermentation, immobilization, extractant per broth ratio

2P-N084 Study on methane production from CO_2/H_2 gas mixture using acclimated methanogens

○Ying Wang, Chenzhu Yin, Ye Liu, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
wangying17543@126.com

Methane can be synthesized from carbon dioxide and hydrogen. Conventional chemical conversion to methane is mainly based on catalytic reaction under high temperature and pressure with high energy consumption and lower security, limiting its economic feasibility. Anaerobic microorganisms are capable of converting CO_2 and H_2 into CH_4 at ambient temperature and pressure, resulting in high yield of methane (a sustainable energy), equipment saving and environmental friendliness. In this study, a semi-continuous reactor was used to cultivate methanogens from sampled lake sediment. Gas composition was analyzed by gas chromatography. Change in dry cell weight was recorded to indicate the cell density variance in the reactor. When 20 L of CO_2 / H_2 (v/v=1:4) gas mixture was loaded into a reactor containing 1 L of cultivation medium, the cycle test results were as follows: 1) In the initial 10 h under high H_2 partial pressure conditions methane content increased gradually from 0% to 15% along with the slow decrease in hydrogen and carbon dioxide contents in the gaseous phase. 2) In the subsequent 12 h under lower H_2 partial pressure conditions methane content increased sharply up to 93%, with hydrogen and carbon dioxide being almost used up by the methanogens. Thus, under lower H_2 partial pressure conditions, higher speed of methane production was achieved. 3) In this test, the daily methane production rate was determined as 0.155 L/h・L.

Study on methane production from CO_2/H_2 gas mixture using acclimated methanogens

○Ying Wang, Chenzhu Yin, Ye Liu, Tian Yuan, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words methane, methanogens, CO_2/H_2 gas mixture, anaerobic fermentation

2P-N085 Bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) from fatty acid by using fed-batch culture of *Escherichia coli*

○Fakhrul Ikhma Bin Mohd Fadzil, Koki Maezima, Suzuran Watanabe, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge
(Tokyo Tech)
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are well known as sustainable materials and attracting global interest due to their biodegradability without producing toxic substances. Amongst PHA classes, medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) are seen as promising materials for wide range of uses, due to their elastic properties and shows high transparency in their film. In this study, *E. coli* was used as a cell factory for producing mcl-PHA that enable to attain high productivity with less risk of contamination. Overexpression of PHA biosynthetic enzyme in recombinant *E. coli* allowed direct conversion of fatty acid towards mcl-PHAs. Fed-batch fermentation process had been designed in such way that enables to produce high dry cell weight (DCW) and PHA production by employing two-stage cultivation. In the growing stage, culture was fed with glucose to allow high cell concentration. Then, followed by PHA accumulation stage, which performed under nitrogen and dissolved oxygen (DO) limitation. Fatty acid in the form of sodium decanoate or decanoic acid was fed simultaneously with addition of chemical inducer at the middle of exponential phase. Early fatty acid supplementation had improved PHA production by two-fold despite the reduction in total dry cell weight acquired due to toxicity of fatty acid. Gas chromatography analyses revealed that 3-hydroxydecanoate (3HD) was a major PHA monomer unit, which up to 99 mol%, thus the produced mcl-PHA can be recognized as a P(3HD) homopolymer.

Bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) from fatty acid by using fed-batch culture of *Escherichia coli*

○Fakhrul Ikhma Bin Mohd Fadzil, Koki Maezima, Suzuran Watanabe, Ayaka Hiroe, Takeharu Tsuge
(Tokyo Tech)

Key words mcl-PHA, fatty acid, fed-batch culture, *Escherichia coli*

2P-H086 糸状菌による N-アセチルグルコサミンの生産

○森 哲也, 市川 稚子, 手塚 保行, 北 雄一
（北興化学工業開発研究所）
mori-t@hokkochem.co.jp

【緒 言】
N-アセチルグルコサミンはグルコサミンと同様の効果（変形性関節症に効果）があるとされ，また，美肌効果があるといわれている．グルコサミンは苦味を呈するのに対し，N-アセチルグルコサミンは蔗糖の１／２の甘味を有し，摂取しやすいという利点があるため，グルコサミンに代替する物質としてN-アセチルグルコサミンが注目されている．現在，N-アセチルグルコサミンはカニやエビなどの甲殻類の殻やイカの甲を原料とし，加水分解・酵素分解によって製造されている．
【結果と考察】
本研究では，N-アセチルグルコサミンのポリマー（キチン）やオリゴマー（キチンオリゴ糖）を原料としない培地を用いて，N-アセチルグルコサミンを生産する微生物の検索を行った．グルコース，酵母エキス，無機塩を成分とした培地にて種々の微生物を培養した所，培養液中にN-アセチルグルコサミンを蓄積する複数の菌株が見いだされた．それら菌株の同定を行った結果，すべてが *Trichoderma* 属糸状菌であった．中でも生産能が高い *Trichoderma hamatum* AB10282 菌株を選抜し，変異，培養検討により生産量は元の 1000 倍向上した．また変異育種した株は，N-アセチルグルコサミン生産量が向上するに伴い，細胞壁中のキチン含量が増加していることがわかった．AB10282 変異株を 5L ジャーファメンターにて培養した結果，7 日間で 8.5 g/L のN-アセチルグルコサミンが蓄積した．

A Production of N-acetylglucosamine by fungi

○Tetsuya Mori, Wakako Ichikawa, Yasuyuki Tetsuka, Yuichi Kita
(Hokko Chemical Industry Co., Ltd.)

Key words N-acetylglucosamine, fermentation, *Trichoderma* sp., chitin

2P-H087 Production of lipids containing C14 fatty acids by a filamentous fungus *Plectospira myriandra*

○Brian King Himm Mo, Hirotaka Asai, Akinori Ando, Jun Ogawa
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

Long-chain fatty acids (LCFA) contain more than twelve carbon atoms, and are present in a wide range of foods such as nuts, fish oil and soybean oil. LCFAs are important biochemical compounds both metabolically and structurally. For example, myristic acid (14:0) functions as energy storage materials and structural components of the lipid membrane, and aids in membrane targeting of receptor-associated kinases. Myristic acid is also used industrially in the production of soaps, cosmetics and for the synthesis of flavour.
Previously, we screened for microorganisms producing beneficial LCFAs and isolated an oomycete *Plectospira myriandra* NBRC 32548. This strain was able to produce C14 fatty acids at significantly high levels.
In this study, we optimized C14 fatty acid production by the strain. *P. myriandra* was cultivated in GY medium containing 2% glucose as C source and 1% yeast extract as N source, then incubated at 28℃ with shaking at 90 rpm for ten days. Total extracted fatty acids were esterified and the resulting fatty acid methyl esters (FAMEs) were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Fractionated FAMEs with more than 95% purity were then analyzed by H-NMR spectroscopy. These fatty acids were identified to be tetradecanoic acid (myristic acid, C14:0) and *cis*-5-tetradecenoic acid (physeteric acid, C14:1n-9), which took up 13% and 31% of the total fatty acid composition.

Production of lipids containing C14 fatty acids by a filamentous fungus *Plectospira myriandra*

○Brian King Himm Mo, Hirotaka Asai, Akinori Ando, Jun Ogawa
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words lipid, production, filamentous fungi

2P-N088 出芽酵母を利用した D-アミノ酸誘導体生産系の構築

○中本 侃[1], 梅川 碧里[2], 林 順司[1], 若山 守[1]
([1]立命館大・生命科学, [2]京大院・生命)
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

≪目的≫
D-アミノ酸は下等生物から高等生物まで幅広い生物に少なからず存在し，生体内の様々な生理機能や代謝調節機構において重要な役割を担っている事が明らかになってきた．また，D-アミノ酸は抗生物質や医薬品，食品添加物の合成中間体などとしても利用されており，幅広い分野での利用が期待される．しかし，多くの場合 D-アミノ酸生産には大きなコストや多くの工程が必要であり，より効率的な D-アミノ酸生産方法の確立が望まれる．
Saccharomyces cerevisiae は体内の *N*-アセチル-D-アミノ酸を体外に排出することが知られている．そこで，酵母内でアミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸-*N*-アセチルトランスフェラーゼを発現させることで，L-アミノ酸を出発物質として，D-アミノ酸誘導体である *N*-アセチル-D-アミノ酸の酵母による発酵生産を試みた．
≪方法・結果≫
アミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸-*N*-アセチルトランスフェラーゼが共役して働くか調べるため，硫安分画後のアミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸-*N*-アセチルトランスフェラーゼを *in vitro* で働かせたところ，90.1 %の収率で *N*-アセチル-D-Met が生産され，L-アミノ酸から *N*-アセチル-D-アミノ酸を生産する目的の反応経路が *in vitro* で進行することが確認できた．次に，アミノ酸ラセマーゼと D-アミノ酸-*N*-アセチルトランスフェラーゼを酵母内で高発現させるため，酵母発現用プラスミド pGAR426 と pGDT425 を製作し，組換え酵母でのアミノ酸ラセマーゼ，D-アミノ酸-*N*-アセチルトランスフェラーゼ発現の確認を行った．SD+Met 培地および SD+Ala 培地で組換え酵母を培養し，*N*-アセチル-D-Met または *N*-アセチル-D-Ala 濃度が培地中で増加しているか酵素法を用いて確認した．

Construction of D-amino acid derivative production system using *Saccharomyces cerevisiae*

○Akira Nakamoto[1], Midori Umekawa[2], Jyunji Hayasi[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.)

Key words D-amino acid, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

2P-H089 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株によるキシリトールの生産

○田代 朔也, 田口 久貴
（崇城大院・工）
taguchi@bio.sojo-u.ac.jp

【目的】高温下希硫酸で処理した植物バイオマスは，セルロースとキシロースを含む．これを原料に，組換え酵母によるキシリトールとエタノールを同時生産するプロセスを開発する．酸処理バイオマスを模倣（市販のセルロースとキシロース）した実験系で，微量のセルラーゼで徐々にセルロースを糖化したところ，効率良くキシリトールを生産することを見いだし，昨年度の日本生物工学会九州支部大会で報告した．本研究では，キシリトール生産に有効な *Saccharomyces cerevisiae* 変異株を育種したので，その結果について報告する．
【方法】グルコース，キシロース，キシリトール，エタノールは HPLC で測定した．
【結果】*Scheffersomyces stipitis* の野生型キシロース還元酵素（XR，NADPH を好む）が，NADH 型変異酵素よりキシリトール生産に有効であった．そこで，NADPH 生産経路である酸化的ペントースリン酸回路の強化を試みた（*ZWF1* の構成化）．野生型 XR 遺伝子を持ち *gpd1-gpd2* 二重欠損の背景（基準）で，*TDH3* プロモーターで *ZWF1* 遺伝子を構成化した株を育種し，キシリトール生産実験（8.8 g/L セルロース，30 g/L キシロース，32.5℃）を行った．*ZWF1* 野生型株では，83％のキシロースを消費し 24.3 g/L のキシリトールを生産した．一方，*ZWF1* 構成化株では，91％のキシロースを消費し 26.7 g/L のキシリトールを生産した．同条件でセルロース量を 2 倍にすると，*ZWF1* 構成化株は，95％のキシロースをキシリトール（27.6 g/L）へと変換した．キシロースからのエタノール生産の研究において，高濃度キシロース資化性を示す *SXM1* 変異株では，キシリトール蓄積量が多くなる傾向があった．そこで，上記の基準遺伝背景に *SXM1* 変異を有する株を育種し，キシリトール生産への効果を調べた．その結果，36℃で 98.8％のキシロースをキシリトール（29.0 g/L）へと変換した．

Xylitol production by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*

○sakuya Tashiro, hisataka Taguchi
(Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

Key words xylitol, *Saccharomyces cerevisiae*, NAD(P)H, biomass

2P-H090 サツマイモ焼酎粕培地におけるセラミド生産に適した麹菌のスクリーニング

○小境 敏揮[1], 小玉 誠[2], 宮成 亮太[1], 森谷 亜希[2], 坂口 武則[1], 河野 邦晃[1], 松本 公彦[2], 久木﨑 雅人[2], 岩井 謙一[1], 髙瀬 良和[1]
([1]霧島酒造, [2]宮崎県工業技術セ)
t-kosakai@kirishima.co.jp

【背景と目的】麹菌にはスフィンゴ脂質の 1 種であるセラミドが含まれていることが知られている．セラミドは機能性食品素材や化粧品原料として利用されている．また焼酎製造時には焼酎粕を副生するが，ロンドン条約により焼酎粕の海洋投棄が原則禁止された．宮崎県では焼酎粕の約 73% がメタン発酵によって処理され，次いで飼料，肥料として処理されている．我々はこれまでに焼酎粕を高付加価値素材であるセラミドに転換するプロセスについて培地及び培養条件を検討し，焼酎粕に含まれる固形部の割合がかわっても麹菌由来のセラミドが得られることを見出している[1]．そこで，セラミド高生産菌株を選抜し，諸性質を解析することを目的とした．
【方法と結果】焼酎製造工場からサンプリングした焼酎粕の濾液を培地として，麹菌を液体培養した．培養後，凍結乾燥した菌体から脂質を抽出し，LC-MS/MS を用いてセラミド生成量を確認した結果，K5 株のセラミド生成能が高いことが明らかとなった．培養液当たりのセラミド生成量について経時変化を調べたところ，培養 3 日間で最大となった．さらに培養時の培地成分について解析を進めたところ有機酸，アミノ酸，糖が減少していた．

1）小境ら （2015） 第 67 回日本生物工学会大会要旨集．2P-101

Screening of koji for ceramide production using sweetpotato shochu distillery by-product

○Toshiki Kosakai[1], Makoto Kodama[2], Ryota Miyanari[1], Aki Moritani[2], Takenori Sakaguchi[1], Kuniaki Kawano[1], Kimihiko Matsumoto[2], Masato Kukizaki[2], Ken-ichi Iwai[1], Yoshikazu Takase[1]
([1]Kirishima Shuzo Co., Ltd.,, [2]Miyazaki Prefecture Industrial Technol. Center)

Key words koji, shochu distillery by-product, ceramide

2P-H091 焼酎粕を培地とする麹菌培養により生産されるセラミドの構造解析とその定量

○小玉 誠[1], 森谷 亜希[1], 小境 敏揮[2], 宮成 亮太[2], 坂口 武則[2], 河野 邦晃[2], 岩井 謙一[2], 髙瀬 良和[2], 松本 公彦[1], 久木﨑 雅人[1]
([1]宮崎県・工技セ, [2]霧島酒造)
kodama-makoto@pref.miyazaki.lg.jp

【背景と目的】宮崎県の本格焼酎出荷量は 135,140 kl／年（2015 酒造年度）と日本一である．一方，焼酎製造時には焼酎粕が発生し，県内の発生量は約 30 万 t／年にも及ぶ．ロンドン条約により焼酎粕の海洋投棄が原則禁止されて以降，各メーカーは飼肥料やメタン発酵によるガス化など，様々な手法により活用を図ってきたが，その処理コストは大きな負担となっている．我々はこれまでに，焼酎粕を培地とする麹菌培養により菌体からセラミドを製造する技術を開発している（特開 2016-42803）．今回は，本技術により生産されるセラミドについて，LC-MS/MS を用いて構造解析を行うと共に，YPD 培地とのセラミド生産量の比較について検討した．
【方法】霧島酒造（株）から入手したサツマイモ焼酎粕のろ液を培地として，白麹から単離した麹菌株を液体培養した．培養後，凍結乾燥した菌体からクロロホルム：メタノール溶液により脂質を抽出し，定容後に API3200QTrap タンデム四重極型質量分析装置（ABSciex 製）を用いて，ポジティブモードの LC-ESI-MS/MS で分析した．
【結果と考察】MS/MS スペクトルを採取することにより，グルコシルセラミド 2 種とセラミド 17 種の構造を推定することができた．これらのセラミドについて定量したところ，麹菌に特徴的なセラミドである脂肪酸基に 2 個の水酸基を持つ構造のグループが総セラミド量の 1 割以上を占めていた．また，YPD 培地による培養時と比較して，菌体回収量は大きく変らないものの，セラミド生産量は約 2 倍であった．このことから焼酎粕による麹菌の培養は，一般的な培養液を用いた場合と比較して，麹菌体中のセラミド濃度を高め，セラミド生産量を向上させることがわかった．

Identification and determination of ceramide produced by culturing *Aspergillus kawachii* with sweetpotato shochu distillery by-products

○Makoto Kodama[1], Aki Moritani[1], Toshiki Kosakai[2], Ryota Miyanari[2], Takenori Sakaguchi[2], Kuniaki Kawano[2], Ken-ichi Iwai[2], Yoshikazu Takase[2], Kimihiko Matsumoto[1], Masato Kukizaki[1]
([1]Miyazaki Pref. Industrial Technol. Center, [2]Kirishima Shuzo Co., Ltd.)

Key words koji, shochu distillery by-products, ceramide

2P-H092 放線菌 *Streptomyces ficellus* による寄生植物種子発芽阻害剤ノジリマイシンの生産

○中井 拓也[1], 原田 和生[1], 那須 雄大[1], 岡澤 敦司[2], 平田 收正[1]
([1]阪大院・薬, [2]阪府大院・生環科)
harada6@phs.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】*Orobanche* 属をはじめとする根寄生植物はヨーロッパ，アフリカを中心とした広い地域で主要穀物に寄生し農業に甚大な被害を与えている．岡澤らは糖加水分解阻害剤である nojirimycin (NJ) 亜硫酸付加物が，根寄生植物の種子発芽を選択的に阻害することを見出した．NJ は放線菌 *Streptomyces ficellus* 培養物の精製により得られるが，その市場での流通量は極めて少ない．当研究室における過去の研究で市販されている bacto peptone (BP) を用いた培地で NJ が高生産されることが判明したことを踏まえ，本研究ではさらに低コスト，高効率の NJ 生産を志向し，NJ 生合成に協調した代謝経路，代謝産物の探索を行うことで，NJ 生産条件の合理的な改善を試みた．
【結果】まず，BP に含まれる無機リン酸が他の窒素源と比較して低濃度であることに着目し，リン酸を添加して発酵培養を行ったところ，NJ 生合成がリン酸濃度依存的に阻害され，NJ 生合成の開始においてリン酸飢餓状態が重要であることが判明した．また，BP を用いた発酵用培地に各種アミノ酸を添加して培養を行ったところ，proline の添加により NJ 生合成量が 1.6 倍に向上することを見出した．培養条件の更なる改善のために，上記の各条件における培地中および細胞内代謝物の濃度変化を GC/MS を用いて測定したところ，糖，糖アルコールおよび glutamate, glutamine 代謝が大きく変動し，NJ 生合成条件においてこれらの化合物が細胞内で飽和していることが推察された．今後，これらの結果をもとに培地に添加する炭素源やアミノ酸組成を改善し，NJ 生産のさらなる高効率化を目指す．

Production of nojirimycin, an inhibitor of root parasitic weed germination, by *Streptomyces ficellus*

○Takuya Nakai[1], Kazuo Harada[1], Yudai Nasu[1], Atsushi Okazawa[2], Kazumasa Hirata[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Streptomyces ficellus*, nojirimycin, parasitic weed

2P-H093 *Lactobacillus plantarum* 22A-3 によるフェルラ酸からのジヒドロフェルラ酸生産

○向田 潤[1], 西谷 洋輔[2], 川上 秀昭[2], 桑原 浩誠[2], 三井 亮司[1]
([1]岡山理大・理, [2]丸善製薬・研究開発本部)
rmitsui@dbc.ous.ac.jp

【目的】ジヒドロフェルラ酸（DFA）は，フェルラ酸（FA）のプロペン酸二重結合が還元された構造で，高い抗酸化作用のほか，抗肥満（cAMP ホスホジエステラーゼ活性阻害）や血糖値改善（DPP-IV 活性阻害）作用を有している．私たちは，この DFA の機能性に着目し，微生物による生産法を検討してきた．これまでに乳酸菌の一種 *Lactobacillus plantarum* が低い収率ながらも FA から DFA を生成することは報告されている．そこで本研究では「スマート乳酸菌®」として上市している *L. plantarum* 22A-3 株を用いて DFA の高効率生産法と関与する酵素について検討を行った．
【方法・結果】MRS 培地に FA を加えて *L. plantarum* 22A-3 株を振とう培養すると，生育に伴い FA は減少した．それに伴い 4-ビニルグアヤコール(4-VG)が生成したが，時間とともに 4-VG は減少していった．一方で，DFA は対数期中期以降に検出されたが，その収率は低く，培養ごとにばらつく傾向が見られた．しかし，生成した DFA は代謝されずに培養液中に残存していた．このことから *L. plantarum* 22A-3 株の FA に対する反応は 4-VG に変換される経路と，FA を還元し DFA を最終産物とする 2 つの経路が推定された．この生育段階での切り替えに着目し，培養液中の溶存酸素を測定したところ，対数増殖期中期の溶存酸素がほぼゼロになる嫌気的環境がスイッチとなり，FA 代謝が切り替わっていることが明らかになった．この結果から溶存酸素を除いて培養した結果，DFA は効率的に培養液中に蓄積され，収率はほぼ 100％となった．また，粗酵素液を調製し，FA と反応させた結果，NADH を過剰にすると反応が進行した．このことから，*L. plantarum* は嫌気的な条件下で細胞内の酸化還元バランスの維持に FA を利用していることが示唆された．現在，FA 存在下での乳酸生成に及ぼす影響を検討中である．

Microbial production of dihydroferulic acid from ferulic acid by *L. plantarum* 22A-3

○Jun Mukaida[1], Yosuke Nishitani[2], Hideaki Kawakami[2], Hiroshige Kuwahara[2], Ryoji Mitsui[1]
([1]Fac. Sci., Okayama Univ. Sci., [2]R&D. Div., Maruzen pharm. Co., Ltd.)

Key words dihydroferulic acid, *Lactobacillus plantarum*, lactic acid bacteria, ferulic acid

2P-H094 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* を宿主とする異種タンパク質生産の試み

○東久保 遥[1], 繁 宥樹[1], 石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
([1]関西学院大院・理工・生命科学, [2]マルカン酢)
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】 酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* は食酢製造に広く用いられている．本菌は発酵槽で撹拌培養でき，菌体収量も高い．更に *K. europaeus* KGMA0119 株(野生株)には 3 種の潜在性プラスミド(pGE1，pGE2，pGE3)が存在し，独立の安定なレプリコンとして機能する．酢酸菌はエタノール酸化により酢酸を産生し，外環境 pH の低下を招き，他の微生物の繁殖を防ぐ．特に本菌は，培地 pH は低下させるが，細胞内の pH は定常期初期まで 5 以上に保たれることが示されている(繁ら 2017 年度生物工学会)．本研究では，内在性プラスミドを用いて外来タンパク質を発現させ，酢酸菌細胞内でのタンパク質の安定性評価を行い，宿主としての可能性を探った．
【結果と考察】 KGMA0119 株は，アンピシリン，テトラサイクリン，ストレプトマイシンに対して感受性を示した．そこで酢酸菌及び大腸菌のシャトルベクター pBE1 を構築した．pBE1 を保持する形質転換体はアンピシリン，テトラサイクリン耐性を示す．β-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)の直下に β-ガラクトシダーゼ(β-Gal) 遺伝子 (*lacZ*) を導入したプラスミド (pBE1-Pbla-*lacZ*) を構築した．KGMA0119 株に pBE1-Pbla-*lacZ* を導入し，テトラサイクリン耐性を指標にプラスミド保持株を単離した．pBE1-Pbla-*lacZ* 保持株は X-Gal を含む寒天培地で青色を示した．次に本菌を液体培養し，継時的に β-Gal 活性を調べた結果，対数期から定常期初期にかけて活性が見られた．更に培養を続けると活性は低下し，これは酢酸合成量と連動していた．細胞内 pH の低下に伴い，β-Gal が不活性化したと考えられる．次に，pBE1 と異なる *ori* を有する pCDFDuet-1 と内在性プラスミド pGE2 を連結した pCE2 を構築した．pCE2 に大腸菌 *lac* プロモーターを移入し，酢酸菌 KGMA0119 株において機能することが確かめられた．今回，このプラスミドを用いた物質生産についても検証した．

Construction of host-vector system toward bio-production platform in *Komagataeibacter europaeus*

○Haruka Higashikubo[1], Yuki Shige[1], Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

Key words acetic acid bacteria, *Komagataeibacter europaeus*, cryptic plasmid, bio-production

2P-N095 Characterization of novel plant growth-promoting bacterium, *Citrobacter* sp., isolated from co-compost of palm oil industry waste

Clament Fui Seung Chin[1,2], Mohd. Huzairi Zainudi[3], Norhayati Bt. Ramli[3], Hassan Mohd. Ali[3], Yukihiro Tashiro[1], ○Kenji Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Univ. Malaysia Sabah, Malaysia, [3]Univ. Putra Malaysia, Malaysia)
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

A unique co-compost produced by composting wastes from palm oil industry has been reported (Zainudin et al, JIMB, 2017). Our previous study succeeded in many multifunctional bacteria with plant growth promoting, biocontrolling, and composting from the co-compost (Chin et al., in revision). Among them, we first discovered plant growth promoting activity from 7 strains of Citrobacter sp., closely related to *C. sedlakii*. The aim of this study was to characterize these *Citrobacter* sp. strains by comparing with type strain.

Seven *Citrobacter* sp. strains (CESi7, CE8, CE9, P9, P10, TSASi9, and TSASi10) and *C. sedlakii* NBRC 105722^T were used in this study. Morphological and biochemical characteristics, plant growth traits were investigated. Plant growth promotion by those strains and recovered strains from co-compost was assessed with *Brassica rapa* (komatsuna) for 5 weeks of cultivation.

All strains were gram-negative staining, non-spore forming, motile, rod bacteria. Most of isolated strains showed the same sugar fermentative patterns and API 20E patterns except for P9 and TSASi9 strains. On the other hands, plant growth traits of nitrogen fixation, phosphorus solubilization, potassium solubilization, silicate solubilization, and siderophore production were confirmed with several isolated strains, while type strain did not show potassium solubilization activity. In addition, some isolated strains significantly promoted growth of komatsuna, which suggested the possibility of application of oil palm plantation.

Characterization of novel plant growth-promoting bacterium, *Citrobacter* sp., isolated from co-compost of palm oil industry waste

Clament Fui Seung Chin[1,2], Mohd. Huzairi Zainudi[3], Norhayati Bt. Ramli[3], Hassan Mohd. Ali[3], Yukihiro Tashiro[1], ○Kenji Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Univ. Malaysia Sabah, Malaysia, [3]Univ. Putra Malaysia, Malaysia)

Key words *Citrobacter* sp., plant growth promoting bacteria, plant cultivation, co-compost

2P-H096 亜リン酸を用いたシアノバクテリアの選択的培養手法の開発

○神原 亮大[1], 廣田 隆一[1,2], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構 先端的低炭素化技術開発)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】微細藻類を用いた有用物質生産は二酸化炭素を直接固定して行われるためサステナブルなバイオ技術として期待されている．現在，様々な有用微細藻類が開発されている．しかし，有用藻類実用化の課題として，大規模培養で生産性を維持することが難しいという問題がある．特にコンタミネーションによる生産性の低下が大きな問題となっている．実験室条件では装置や培地を滅菌することは可能だが，非常に大きな規模の培養で，滅菌操作を行うことは現実的ではない．本研究室では，亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）を利用し，通常の生物が利用する事のできない亜リン酸（HPO_3^{2-}）をリン源として供給することで目的生物を選択的に増殖させることができる技術を開発している．そこで本研究では，原核藻類のモデル生物として用いられている淡水性のシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における本手法の有効性を検討した．
【手法・結果】PCC7942 の発現ベクター pNSHA を用いて *Ralstonia* sp. 4506 株由来の *ptxD* を単独，あるいは亜リン酸輸送体遺伝子 *ptxABC* と共発現させるプラスミドを作製した．これらを用いて PCC7942 を形質転換し，得られた形質転換体をリン源なし，リン酸，亜リン酸の BG－11 培地で培養し，増殖の確認を行った．その結果 *ptxD* を単独で発現させた株では亜リン酸培地では増殖しなかった．一方，*ptxABC* と *ptxD* のみを共発現するプラスミドで形質転換した株は増殖が可能であった．そのため *ptxABC* と *ptxD* を共発現させた場合亜リン酸で選択培養が可能であった．また，*ptxABCD* 発現株の亜リン酸培地での最終到達 OD はリン酸培地の約 70%～80%であった．

Deveolopment of a selective cultivation method of cyanobacteria using phosphite

○Akihiro Kanbara[1], Ryuuiti Hirota[1,2], Takeshi Ikeda[1], Hisakage Hunabashi[1], Akio Kuroda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

Key words cyanobacteria, phosphite, phosphite dehydrogenase

2P-H097 亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法の開発とその有効性評価

○桂浦 善一朗[1], 廣田 隆一[1,2], 池田 丈[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1,2]
([1]広島大院・先端物質, [2]科学技術振興機構 先端的低炭素化技術開発)
hirota@hiroshima-u.ac.jp

【目的】遺伝子組換え生物の利用は医療・農業・環境保全などの分野で急速に拡大しており，その安全な利用を可能にするための方策として，生物学的封じ込めが注目されている．リンは生物の必須元素であり，通常の生物は酸化数が 5 価のリン酸（HPO_4^{2-}）を利用する．しかし一部のバクテリアは，亜リン酸（HPO_3^{2-}）をはじめとする還元型のリン化合物を利用する機能を有している．そこでこの機能を利用して生物のリン代謝経路を改変し，亜リン酸に生育を依存させる性質を創り出すことで，その生物の環境中での増殖を制御する新たな生物学的封じ込め技術の開発を試みた．また大腸菌をモデルとして作製した亜リン酸に依存して生育する株 RN1008 を用いて，本技術の封じ込め効果の評価と，本株から出現する変異株の特性およびその出現メカニズムについて解析を行った．
【方法・結果】亜リン酸に対する要求性は，*Pseudomonas stutzeri* において見出された亜リン酸特異的な輸送体（HtxBCDE）と *Ralstonia* sp. 4506 株由来亜リン酸酸化酵素（PtxD）を発現させ，内在性リン酸輸送体を破壊することで創り出すことが可能であった．RN1008 を用いた封じ込め効果の評価により，本手法はこれまでに報告されている手法のなかで最も高い封じ込め効果を発揮していることが明らかとなった．また RN1008 の増殖試験を行った結果，複合培地では増殖阻害が確認され，培養を続けると，この阻害を解消する変異株（AM）が出現した．さらに AM の解析を進めると，亜リン酸に依存することなく生育する変異株(EM)の出現が確認された．EM の解析を行ったところ，HtxBCDE 輸送体の基質特異性が変化することでリン酸を取り込むことが示唆された．EM の出現は封じ込めの観点からは望ましくないため，現在，*htxBCDE* のコピー数を減らすことで EM の出現頻度を下げることができるかを検討している．

Development and evaluation of a novel biocontainment strategy that makes bacterial growth dependent on phosphite

○Zen-ichiro Katsuura[1], Ryuichi Hirota[1,2], Takeshi Ikeda[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

Key words biocontainment, phosphite, mutation, transporter

2P-H098 遺伝子組換え大腸菌を利用したセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産技術の研究開発

○寺本 陽彦, 須田 雅子, 乾 将行
（RITE）
inui@rite.or.jp

【背景と目的】我々は，大腸菌を高密度菌体触媒として利用した高速バイオ水素生産プロセス[1]を基盤として，セルロース系バイオマスからの経済性ある水素生産技術を確立することを目指し，代謝工学による水素生産微生物の改良に取り組んでいる．本研究では，大腸菌の水素生成プロセスにおける 2 種の水素取り込み系ヒドロゲナーゼ（Hyd1，Hyd2）の役割とバイオマス原料（コーンストーバー）由来の発酵阻害物質の影響について基礎的な検討を行った．
【方法】大腸菌は通性嫌気性菌であり，嫌気条件下で水素生成能が誘導される．各種遺伝子組換え株の水素生成能を評価するため，嫌気雰囲気下に密閉した培養系における気相中の水素濃度を経時的に測定した．炭素源として，セルロース系バイオマス由来の主要な糖類であるグルコースまたはキシロースを添加した．
【結果と考察】Hyd2 の破壊によりグルコースからの水素生成速度と収率が向上したが，Hyd1 の破壊を重ねると水素生産性は野生株と同程度まで低下した．Hyd1 は Hyd2 と共に水素取り込みに働くとされているが，本条件では水素生成能の誘導を促進するのではないかと思われる．一方，乳酸およびコハク酸生成経路の破壊によりキシロースからの水素収率が向上することを確認し，さらにコーンストーバー糖化前処理液およびこれに含まれるフラン類の添加による濃度依存的な阻害効果を確認した．本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである．

1. Yoshida A., et. al., *Appl Environ Microbiol* 71:6762-6768 (2005)

Research and development of technology for highly efficient bio-hydrogen production from cellulosic biomass using genetically engineered *Escherichia coli*

○Haruhiko Teramoto, Masako Suda, Masayuki Inui
(RITE)

Key words *Escherichia coli*, metabolic engineering, hydrogenase, fermentation inhibitor

2P-H099 遺伝子組換え紅色非硫黄細菌による酢酸からの高効率バイオ水素生産プロセスの研究開発

○清水 哲, 寺本 陽彦, 乾 将行
（RITE）
inui@rite.or.jp

【背景と目的】我々は，大腸菌による暗発酵と紅色非硫黄細菌による光発酵を組み合わせたセルロース系バイオマスからの高効率バイオ水素生産プロセスの確立を目的として，代謝工学による水素生産微生物の改良に取り組んでいる．暗発酵では熱力学的な制約によりグルコースは酢酸までしか酸化されないのに対し，*Rhodobacter* 属細菌に代表される紅色非硫黄細菌を用いた光発酵では光エネルギーの利用により熱力学的な制約をうけず，酢酸の完全酸化による水素生産が可能なため，両発酵プロセスの統合により原料バイオマスあたりの水素収率の大幅向上が期待される．本研究では，2 種の *Rhodobacter* 属細菌の酢酸からの水素生産性の比較評価および遺伝子改変による水素生産性の向上について検討した．
【方法】*R. sphaeroides*，*R. capsulatus* それぞれを親株として，二回交差法により水素取込み系ヒドロゲナーゼ遺伝子(*hupSL*)破壊株，ポリヒドロキシ酪酸合成酵素遺伝子(*phaC*)破壊株を作製した．親株および各破壊株について炭素源として酢酸を添加した無機塩培地にて嫌気条件，光照射下で培養し，生成水素をガスクロマトグラフィーにより定量した．
【結果と考察】上記培養条件において *R. capsulatus* は *R. sphaeroides* と比較して酢酸からより多くの水素を生産することが観察された．また *hupSL* の破壊はいずれの種を親株とした場合でも有意な水素生産量の向上が観察された一方で，*phaC* の破壊は *R. sphaeroides* を親株とした場合でのみ顕著な水素生産量の向上が観察された．現在両種について他の遺伝子改変も進めているため，本大会ではそれらの結果についても報告する予定である．本研究は METI の委託研究の一環として行われたものである．

Research and development of highly efficient bio-hydrogen production from acetate by genecially engineered purple non-sulfur bacteria

○Tetsu Shimizu, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui
(RITE)

Key words *Rhodobacter*, metabolic engineering, purple non-sulfur bacteria, hydrogen production

2P-H100 乳酸・コハク酸生産時におけるコリネ型細菌の耐熱性

○水野 光[1], 柘植 陽太[2], 仁宮 一章[2], 乾 将行[3], 近藤 昭彦[4], 高橋 憲司[1]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]RITE, [4]神戸大院・イノベ）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】コリネ型細菌はアミノ酸生産菌として工業的に広く利用されている有用細菌である．本菌を酸素抑制条件下で培養すると，増殖は停止するが代謝活性は維持され，著量の乳酸と少量のコハク酸を生産する．乳酸やコハク酸は生分解性プラスチックやポリエステル樹脂の原料として利用価値が高く，本菌に代謝工学的改変を施すことにより，乳酸やコハク酸を高生産させる研究が報告されている．コリネ型細菌の増殖至適温度は 30°C であり 40°C を超えると増殖は著しく阻害される．酸素抑制条件下における有機酸生産も，慣例的に増殖至適温度で反応が行われてきたが最適温度は不明である．本研究では野生株と代謝改変を施したコハク酸生産株を用いて，乳酸・コハク酸生産における温度の影響について検証した．
【方法と結果】乳酸生産株としてコリネ型細菌の野生株を用いた．コハク酸生産株としては，副生成物である乳酸や酢酸の生合成遺伝子（*ldhA*, *pta*, *ack*, *cat*, *pqo*）を欠損させ，コハク酸への炭素フラックスを増加させるためピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（*pyc*）をプロモーター置換により高発現した株を用いた．酸素抑制条件下における有機酸生産の培養温度は 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 42.5, 45°C でそれぞれ行った．野生株における乳酸の単位菌体量当たりの生産速度は，35°C では 30°C と比較して 46%増加した．この生産速度の向上効果は 42.5°C まで持続した．一方，代謝改変株を用いたコハク酸生産では，42.5°C で 30°C と比較して生産速度が 35%増加し，それ以外の温度では 30°C と同程度の生産速度を示した．検証したいずれの温度においても，乳酸，コハク酸ともに増殖至適温度と同等，もしくはより高い生産速度を示したことから，酸素抑制条件下における化合物生産では，増殖至適温度にとらわれない生産温度の選択が可能なことが示唆された．

Thermotolerance of *Corynebacterium glutamicum* on production of lactate and succinate under oxygen deprivation

○Hikaru Mizuno[1], Yota Tsuge[2], Kazuaki Ninomiya[2], Masayuki Inui[3], Akihiko Kondo[4], Kenji Takahashi[1]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]InFiniti, Kanazawa Univ., [3]RITE, [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov. Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, thermotolerance, lactic acid, succinic acid

2P-E101 酸素をスイッチとした二つの樹脂原料の個別生産

○小林 俊介[1], 柘植 陽太[2], 岩崎 還帰[1], 川口 秀夫[3], 仁宮 一章[2], 荻野 千秋[4], 高橋 憲司[1], 近藤 昭彦[3]
（[1]金沢大・理工, [2]金沢大・新学術, [3]神戸大院・イノベ, [4]神戸大院・工）
ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】コリネ型細菌はアミノ酸のリジンの生産菌として利用されている有用細菌である．本菌は大腸菌由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子（*ldcC*）を導入することにより，ジアミンのカダベリンを好気条件下で高生産することが報告されている［1］．また，酸素抑制条件下では乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*ldhA*）を欠損させることでジカルボン酸のコハク酸を高生産することが報告されている［2］．カダベリンとコハク酸はポリアミドや生分解性ポリエステルなどの樹脂原料として利用価値が高いが，現在は別々の条件，菌株で生産されている．特にコハク酸生産では最初に好気条件下における菌体増殖が必要である点から非効率的であった．そこで本研究では，酸素をスイッチとして用いることで，同一菌株による二つの樹脂原料の個別生産について検証した．
【方法と結果】初めにコハク酸生産の際の副生成物である乳酸と酢酸の生合成遺伝子を欠損させた．リジンのフィードバック阻害解除のため，アスパルトキナーゼ遺伝子（*lysC*）に一塩基置換を導入するとともに，高発現プロモーター（*tuf*）の制御下においた *ldcC* 遺伝子を導入し，カダベリン生産株を作製した．また，カダベリン，コハク酸双方の生産性向上のため，ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（*pyc*）のプロモーターを *tuf* プロモーターに置換することで高発現させた．作製した株は好気条件下のフラスコ培養で 193 mg/L のカダベリンを，酸素抑制条件下で 29 g/L のコハク酸を生産した．最後にカダベリン生産の際に必要な NADPH の効率的な獲得のため，グルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子（*pgi*）のプロモーターを酸素抑制条件下で特異的に働く *ldhA* 遺伝子のプロモーターに置換したところ，カダベリン生産量は約 5.1 倍向上した．
[1] Kind et al, Metab Eng (2014)
[2] Okino et al, Appl Microbiol Biotechnol (2008)

Separate production of 1,5-diaminopentane and succinate in a single *Corynebacterium glutamicum* strain switched by oxygen level

○Shunsuke Kobayashi[1], Yota Tsuge[2], Genki Iwasaki[1], Hideo Kawaguchi[3], Kazuaki Ninomiya[2], Chiaki Ogino[4], Kenji Takahashi[1], Akihiko Kondo[3]
([1]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., [2]InFiniti, Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering, cadaverine, succinic acid

2P-H102 フェニルアラニン高生産大腸菌の染色体に導入した人工オペロンの最適化に関する検討

○岸田 隆寛[1], 駒 大輔[2], 山中 勇人[2], 森芳 邦彦[2], 長森 英二[1], 大本 貴士[2]
（[1]大工大・工・生命, [2]阪技術研）
koma@omtri.or.jp

【背景と目的】
これまでに，芳香族化合物を高生産する大腸菌の育種を目指して中央代謝経路やシキミ酸経路の代謝工学的な改変を行ってきた．その結果，T7 プロモーターに連結した 10 種類の遺伝子を染色体に導入することで，既報の株と比べて優れたフェニルアラニン（Phe）およびチロシン生産株を育種できることが明らかとなった．しかし，染色体に導入した 10 種類の遺伝子のうち，6 種類の遺伝子は 2 つの人工オペロンを形成しており，オペロン中の遺伝子順序に最適化の余地があると考えられた．そこで本研究では，オペロンを構成する各遺伝子の重要度について解析し，より最適なオペロンを構築することを試みた．

【方法と結果】
オペロンを形成する遺伝子のうち，Phe 生産性に大きく寄与している遺伝子を同定するために，一方のオペロンから 1 つの遺伝子を削除した菌株の作製を試みた．はじめに，人工オペロン *aroAL*，*aroAC*，および *aroLC* を構築し，λファージの Red recombinase を用いて染色体上の *aroALC* オペロンと置換した．同様にして，*aroEDB* オペロンを *aroED*，*aroEB*，または *aroDB* オペロンと置換した．得られた 6 株の最少培地での Phe 収率を調べた．*aroL*，*aroD*，または *aroE* を削除した株では親株とほぼ同等のモル対糖収率であった（約 24%）．一方，*aroC*，*aroA*，または *aroB* を削除した株では，生育（OD_{660}）やグルコース消費速度の低下から代謝負荷を受けているものと推測され，収率は 1.5，1.3，または 2.6% と大きく低下した．これらの結果から，*aroC*，*aroA*，および *aroB* の重要度が高いと考えられ，オペロン中でも 5'末端側に配置されるべき遺伝子と考えられた．現在，オペロン中の遺伝子順序を変えて Phe 生産性に与える影響を調べている．得られた結果に基づいて最適と推測されるオペロンを構築し，Phe 生産について報告する予定である．

A study on optimization of the artificial operons located on the chromosome of phenylalanine-producing *Escherichia coli*.

○Takahiro Kishida[1], Daisuke Koma[2], Hayato Yamanaka[2], Kunihiko Moriyoshi[2], Eiji Nagamori[1], Takashi Ohmoto[2]
([1]Dept. Biomed. Eng.,Osaka Inst. Technol., [2]Osaka Res. Inst. Ind. Sci. Tech.)

Key words metabolic engineering, aromatic amino acid, *Escherichia coli*, chromosome

2P-H103 大腸菌染色体 DNA のエンジニアリングによるフェニルアラニンおよびチロシン生産菌の育種

○駒 大輔, 山中 勇人, 森芳 邦彦, 大本 貴士
（阪技術研）
koma@omtri.or.jp

【背景】
フェニルアラニン（Phe）やチロシン（Tyr）は有用な芳香族アミノ酸として商業化されているだけでなく，2-フェニルエタノールやチロソールをはじめとするさまざまな芳香族化合物の前駆体となる．我々は大腸菌の Phe と Tyr の合成経路を合成生物学的手法により拡張することで，さまざまな芳香族化合物を糖質資源から生産する菌株を育種してきた．当研究グループの菌株育種の特徴は，外来および在来の遺伝子を高活性なプロモーター下に配置して染色体に直接導入することである．すなわち，プラスミドフリー，マーカーフリーな菌株を育種することである．この育種戦略に基づいて，Phe と Tyr の生産効率を向上するべく，大腸菌の中央代謝経路とシキミ酸経路のエンジニアリングを行ってきた．しかしながら，プラスミドを用いて行われている一般的な方法（*aroG*^{fbr}，*pheA*^{fbr} または *tyrA*^{fbr}，*tktA*，および *ppsA* 遺伝子の高発現）では，これまでに生産量の向上は見られなかった．

【方法および結果】
tktA 遺伝子を高発現することで，最少培地での菌株の生育が極端に悪くなり，Phe および Tyr の生産量が激減したが，AroG の基質であるエリスロース 4 リン酸の供給のために *tktA* 遺伝子の高発現は必須であると思われた．そこで，*tktA* 遺伝子を含む前述の遺伝子に加えて，他のシキミ酸経路の遺伝子を染色体 DNA に導入した菌株を作製した．しかしながら，シキミ酸経路の律速段階を改善するための *aroL* 遺伝子の高発現を含めて，大きな効果は見られなかった．最終的に，シキミ酸経路中の *aroG* と *pheA*（または *tyrA*）の間にある 6 種類の遺伝子を 2 つの人工オペロンの形で染色体に導入し，高活性プロモーター下で高発現させた．その結果，*tktA* 遺伝子を高発現した状態でも最少培地で良好に生育するようになり，Phe および Tyr 生産量が大幅に向上した．

Engineering of *Escherichia coli* chromosome to generate phenylalanine and tyrosine producers

○Daisuke Koma, Hayato Yamanaka, Kunihiko Moriyoshi, Takashi Ohmoto
(Osaka Res. Inst. Ind. Sci. Tech.)

Key words metabolic pathway modification, bioconversion, aromatic amino acid, genome engineering

2P-H104 *Clostridium paraputrificum* の水素ガス生産向上をめざした有機酸生産経路の解析

○関 兵馬, 吉田 稜, 粟冠 真紀子, 國武 絵美, 粟冠 和郎, 木村 哲哉
（三重大院・生資）
t-kimura@bio.mie-u.ac.jp

我々は植物バイオマスから微生物によって水素を直接生産することを究極の目的として，三重大学キャンパス土壌から単離した嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 を中心とした水素生産システムの構築をめざしている．嫌気性細菌は解糖系でのピルビン酸生産を経て，その後，アセチル CoA から酢酸や酪酸，エタノールを生産する嫌気性細菌特有の代謝経路をもつ．この過程で生じた還元力から水素ガスが生産される．本研究では，ゲノム情報より有機酸と水素生産に働く遺伝子を推定し，これらの機能を解析して代謝工学よる水素生産の効率化のための知見を得ることにした．すでに，乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊によって水素ガス生産が増加することは報告している．そこで，アセチル CoA から酪酸を生産する経路に関わるチオラーゼ遺伝子(*thl* 遺伝子)とアセチル CoA から酢酸を生産する経路に関わるホスホトランスアセチラーゼ遺伝子(*pta* 遺伝子)を破壊した株を作出することを試みた．遺伝子破壊は Nottingham 大学が開発した ClosTron 法を用いて *thl* 遺伝子破壊株 *Δthl* と *pta* 遺伝子破壊株 *Δpta* を作出した．これらを，グルコースを炭素源として嫌気瓶で培養し，発酵ガスと培地中の有機酸・アルコールをガスクロマトグラフィーや HPLC で定量した．*Δthl* 株は酪酸を全く生産しておらず，野生株と比較して乳酸・酢酸・エタノールの生産が増加し，水素の生産は減少した．これは，酪酸生産のための還元力消費を他の経路で消費しようとした結果と予測された．一方，*Δpta* 株は酢酸の生産は減少したが完全には消失せず，野生株と比較して乳酸の生産が増加し，酪酸・水素の生産が減少した．これは，酢酸合成経路が他にも存在することを示唆している．

Analysis of metabolic pathway of organic acids for hydrogen production by *Clostridium paraputrificum*

○Hyoma Seki, Ryo Yoshida, Makiko Sakka, Emi Kunitake, Kazuo Sakka, Tetsuya Kimura
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words hydrogen production, *Clostridium paraputrificum*, ClosTron

2P-H105 生体触媒を利用した 2-フェニルエタノールの位置選択的水酸化によるチロソール及びヒドロキシチロソールの合成

川村 駿介[1], ○岡本 姫佳[1], 古屋 俊樹[2,3], 木野 邦器[1,2]
（[1]早大・先進理工, [2]早大・理工研, [3]東理大・理工）
kkino@waseda.jp

【目的】オリーブに微量含まれるチロソール及びヒドロキシチロソールは強い抗酸化活性を有するポリフェノールの一種で，その生理作用から化粧品の美白原料等として期待されている化合物である．しかし，オリーブオイルからの抽出に依存している現在の製造法では，生産量には限界がある．そこで，バイオプロセスによる効率的な製造法として，安価かつ大量供給が可能な 2-フェニルエタノールを原料とする微生物変換プロセスを考えた．目的活性を有する微生物の自然界からの探索法を新たに考案し，2-フェニルエタノールからチロソールならびにヒドロキシチロソールに変換することができる微生物の取得を検討した．さらに，取得した微生物における活性誘導条件などを検討し，当該微生物の培養菌体を生体触媒とするチロソールおよびヒドロキシチロソールの生産を試みた．
【方法・結果】不活性な側鎖を有する芳香族化合物を分解する微生物の中に芳香環を水酸化する活性の存在を予想し，一次スクリーニングでは *tert*-ブチルベンゼン等を分解する微生物を自然界から探索した．その結果，土壌 418 サンプルから目的候補株 64 株を分離した．活性評価による 2 次スクリーニングの結果，2-フェニルエタノールをチロソールに，かつチロソールをヒドロキシチロソールに変換する微生物を高頻度で取得することに成功した．最も変換活性が高い T773 株は *Cupriavidus* 属であると同定された．誘導培養基質及び誘導培養時間を検討した結果，トルエンを炭素源として 21 時間培養を行うことにより変換活性が効率的に誘導されることを明らかにした．*Cupriavidus* sp. T773 株を用いた 6 時間の菌体反応により 15 mM の 2-フェニルエタノールから 5.2 mM のチロソール合成を，また 15 mM のチロソールから 0.89 mM のヒドロキシチロソール合成を達成した．

Biocatalytic regioselective hydroxylation of 2-phenylethanol to tyrosol and hydroxytyrosol

Shunsuke Kawamura[1], ○Himeka Okamoto[1], Toshiki Furuya[2,3], Kuniki Kino[1,2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Fac. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci.)

Key words tyrosol, hydroxytyrosol, *Cupriavidus*, screening

2P-H106 *Arthrobacter* sp. KI72 におけるナイロンモノマー代謝系の同定と酵素の特徴

○竹原 一起[1], 藤井 翼[1], 加藤 太一郎[2], 武尾 正弘[1], 根来 誠司[1]
（[1]兵庫県大院・工, [2]鹿児島大院・理工）
negoro@eng.u-hyogo.ac.jp

<目的>
Arthrobacter sp. KI72 はナイロンオリゴマー(6-アミノヘキサン環状/直鎖状オリゴマーの総称)を単一炭素源/窒素源として生育する．本微生物が保持する 3 種類の酵素(NylA/NylB/NylC)により，同オリゴマーは 6-アミノヘキサン酸まで分解されるが，これより下流の代謝経路は解明されていない．モノマー以降の代謝系は，不要ナイロンからの有用物質への変換や，バイオマスからのナイロン原料の生産への応用が期待できる．本研究では 6-アミノヘキサン酸代謝経路の同定を目的として検討を行った．

<方法および結果>
4-アミノ酪酸代謝経路との類似性から，6-アミノヘキサン酸はアミノトランスフェラーゼによりアジピン酸セミアルデヒドに変換され，その後デヒドロゲナーゼによりアジピン酸へと変換されると予測した．*Arthrobacter* sp. KI72 ドラフトゲノム配列において機能類似酵素との相同性比較により，アミノトランスフェラーゼ/デヒドロゲナーゼ候補遺伝子(各々，*nylD*，*nylE* と命名)を探索し，*nylD* については 2 種，*nylE* については 21 種の相同性遺伝子を確認した．候補遺伝子数種を PCR で増幅し，発現ベクターに組み込み，大腸菌より高発現したタンパク質を His-tag 融合タンパク質として精製した．6-アミノヘキサン酸からアジピン酸セミアルデヒドへの変換活性を有する NylD と，アジピン酸セミアルデヒドからアジピン酸への変換活性を有する NylE を組み合わせ NylD/NylE 共役系を構築し一連の変換活性を確認した．その結果，6-アミノヘキサン酸は NylD/NylE 共役系によりアジピン酸まで変換されることを確認した．また，その共役系においては NylD の補酵素としてピリドキサルリン酸，NylE の補酵素として $NADP^+$が必要であることを確認した．

Metabolic pathway of nylon-monomer in *Arthrobacter* sp. KI72

○Ikki Takehara[1], Tsubasa Fujii[1], Dai-ichiro Kato[2], Masahiro Takeo[1], Seiji Negoro[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Grad. Sch. Eng., Kagoshima Univ.)

Key words 6-aminohexanoate, *Arthrobacter*, metabolism

2P-H107 酢酸菌における分岐鎖アミノ酸生産を支配する Lrp 様転写因子の制御機構の解析

○石井 友理[1], 赤坂 直紀[2], 佐古田 久雄[2], 秀瀬 涼太[1], 藤原 伸介[1]
（[1]関西学院大院・理工, [2]マルカン酢）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

Lrp(leucine-responsive regulatory protein)は，アミノ酸代謝遺伝子の発現を幅広く制御する転写因子であり，N 末端側に DNA 結合領域，C 末端側にリガンド結合領域を有する．Lrp オルソログはバクテリア及びアーキアに広く分布しているため，これらの制御機構はそれぞれの種が生存する外部環境に応じて異なり，多様性に富む．これまでに，酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* の Lrp オルソログ(*Ke*Lrp)の機能解析を行う過程で，分岐鎖アミノ酸生合成遺伝子(*ilvIH*)に対する制御様式が，大腸菌 Lrp とは異なることを見出した．すなわち，*Ke*Lrp はリプレッサー，大腸菌 Lrp はアクチベーターとして振る舞い，両種における Lrp オルソログの挙動は逆転している．これは，両者の標的遺伝子プロモーター近傍領域における結合位置の違いに起因することが推測される．また，リガンド結合領域を欠損した *Ke*Lrp(*Ke*Lrp2)は，*ilvIH* に対する抑制能を失う．本研究では，*Ke*Lrp の制御機構の解明を目的とし，まず組換え *Ke*Lrp 及び *Ke*Lrp2 の大腸菌による精製を試みた．*Ke*Lrp を用いて，*ilvIH* の推定プロモーター領域近傍への結合性をゲルシフトアッセイにより検証した．*Ke*Lrp の濃度依存的に，特異的な結合が観察され，さらに結合が 2 段階で起こっていることが示された．このことから，*ilvIH* の転写は *Ke*Lrp により直接的に制御され，プロモーター領域近傍には，複数の結合領域が存在すると考えられる．*Ke*Lrp2 は大腸菌において明瞭な発現が確認されなかった．現在，両タンパク質の制御様式の比較を行うため，酢酸菌の宿主ベクター系を用いたタンパク質の取得を試みている．

Regulatory mechanism of leucine-responsive regulatory protein involved in the production of branched-chain amino acids in acetic acid bacteria

○Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Shinsuke Fujiwara[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co., Ltd.)

Key words leucine-responsive regulatory protein, branched-chain amino acids, acetic acid bacteria, *Komagataeibacter europaeus*

2P-H108 Moorella thermoacetica の細胞内 ATP プール量に及ぼす酢酸合成経路改変の影響

○竹村 海生[1], 吉田 嵩一郎[1], 岩崎 裕樹[1], 喜多 晃久[1,2], 田島 誉久[1,2], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,2]
（[1]広島大院・先端物質, [2]JST・CREST）
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【目的】我々は，H_2-CO_2 からの高収率エタノール製造を最終目的として，好熱性ホモ酢酸菌である *Moorella thermoacetica* ATCC39073 に aldehye dehydrogenase を導入とともに，酢酸合成，及び ATP 合成に関与する phosphotransacylase を破壊し，フルクトースからのエタノール高生産株の育種に成功した．しかし，本変異株は H_2-CO_2 培養では生育できなかった．また，フルクトース消費後に H_2-CO_2 を基質とする二段階培養を行った結果，培溶液中にギ酸の蓄積が確認された．ギ酸は H_2-CO_2 代謝経路中の代謝物質であり，次の代謝物質テトラヒドロ葉酸の合成反応を進行させるためには，この代謝系で唯一 ATP を必要とする．そのため，酢酸合成経路破壊による ATP 生産量の低下が，ギ酸の蓄積，及び生育できない原因と考え，基質の違い，及び酢酸合成経路改変による細胞内 ATP プール量への影響を調べた．
【方法】野生株，及びエタノール高生産株をフルクトース培養または H_2-CO_2 培養を行い，対数増殖期にサンプリングを行った．OD_{600} が 0.10~0.15 になるように希釈し，96 ウェルオプティカルボトムプレートにサンプルを 100 µl，BacTiter-GloTM Reagent を 100 µl ずつ加え，発光量の測定を行った．
【結果】フルクトースまたは H_2-CO_2 を基質とした野生株の細胞内 ATP プール量を測定したところ，それぞれ $6.1x10^{-18}$，$1.0x10^{-18}$ mol/cell であった．また，フルクトース培養におけるエタノール高生産株の細胞内 ATP プール量の測定を行ったところ，$0.8 x 10^{-18}$mol/cell であり，同じ条件の野生株より大きく減少し，H_2-CO_2 培養と同程度しかなかった．さらに，フルクトースで培養後，H_2-CO_2 存在下で 12 時間処理した変異株の細胞内 ATP プール量はさらに小さく $0.03x10^{-18}$mol/cell であった．本結果から，基質の違い，及び酢酸合成経路の欠損により ATP 生産量は顕著に低下することが示唆された．

Effect of modification of acetate synthesis pathway on intracellular ATP pool in Moorella thermoacetica

○Kaisei Takemura[1], Kouichiro Yoshida[1], Yuki Iwasaki[1], Akihisa Kita[1,2], Takahisa Tajima[1,2], Junichi Kato[1], Yutaka Nakashimada[1,2]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]CREST, JST)

Key words ethanol fermentation, thermophile, ATP

2P-H109 γ-アミノ酪酸生産大腸菌における代謝動態制御のメタボローム解析

○藤原 由梨[1], 相馬 悠希[2], 和泉 自泰[2], 花井 泰三[3], 馬場 健史[2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大・生医研, [3]九大院・農）
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】再生可能資源の有効利用に向けて，バイオプロセスによる物質生産が注目されている．γ-アミノ酪酸 (GABA) は，機能性食品，医薬品，バイオプラスチックなどの原料として利用可能な代謝物である．これまでに，グルタミン酸やグルタミン酸ナトリウムを基質としたバイオコンバージョンによる GABA 生産系が構築されてきたが，近年，生産コスト低減に向けて，より安価なグルコースを基質として用いた GABA 発酵の研究が進められている．GABA は，菌体増殖に重要な TCA 回路の中間代謝物である α-ケトグルタル酸 (α-KG) からグルタミン酸生成を経由して生産されるため，生産経路と菌体増殖の競合が，総生産性の低下要因となっている．これまでに幾々は，大腸菌による GABA 発酵過程の任意のタイミングにおいて，GABA 生産と競合する代謝流束を遮断し，余剰の代謝流束を GABA 生産経路に転換するための人工遺伝子回路 (Metabolic toggle switch: MTS) を開発し，3.8 g/L の GABA 生産に成功している．本研究では，GABA 生産性向上に向けた MTS 機能拡充に加え，MTS 機能評価と新たな代謝改変候補の探索を目的としたメタボローム解析に取り組んだ．
【方法・結果】MTS は IPTG 添加によって P_tlacO_1 下流の *tetR* が発現すると P_ttetO_1 下流の *sucA*，*aceA* の発現が抑制され，同時に GABA 生産経路遺伝子群 *gdhA*，*gadB*，*pyc* と GABA トランスポーター遺伝子 *gadC* が発現する設計とした．MTS 導入株は GABA 生産系のみを導入したコントロール株と比較して GABA 生産量が 3.1 倍向上した (4.8 g/L)．IPTG 添加前後において両株細胞内の代謝物濃度を定量した結果，MTS 株導入株では IPTG 添加後に α-KG を前駆体とする代謝物の蓄積とピルビン酸を前駆体とする代謝物の減少が見られた．以上の結果から， MTS による細胞内代謝制御の効果を確認することが出来たほか，新たな改変候補が明らかとなった．

Metabolomics on synthetic metabolic regulation in *Escherichia coli* producing gamma-aminobutyric acid.

○Yuri Fujiwara[1], Yuki Soma[2], Yoshihiro Izumi[2], Taizo Hanai[3], Takeshi Bamba[2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words metabolic analysis, synthetic biology, GABA, *Escherichia coli*

2P-H110 異属微生物間の応答機構：*Pseudomonas* sp. C8 株による大腸菌増殖抑制作用

○本荘 雅宏[1], 鈴木 研志[1], 西村 朋香[2], 田代 陽介[1], 二又 裕之[1,3]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

複合微生物系を好適に制御するためには異属微生物間の応答機構の理解は必須である．我々の研究室では，微生物群集の動態解析を通じて，*Pseudomonas* sp. C8 株が複数種の微生物の増殖を抑制する物質を生産していることを見出した．しかし，その詳細な作用機序の解明には未だ至っていない．そこで本研究では，*Escherichia coli* BW25113 株を用い，本物質に対する作用機序の糸口を探ることを目的とした．
まず，BW25113 株を用いて培地条件の検討を実施した．LB 培地，1/10TSB 培地および最小培地にグルコースを添加した培地（BSM+Glc）に C8 株培養上清を添加し，無添加系と増殖曲線を比較した．その結果，複合有機物成分を含有する培地では増殖抑制は見られず，BSM+Glc 培地でのみ増殖抑制が観察された．これまでの研究において数 µM の Fe^{3+}による増殖抑制の解除が示されている為，複合有機物中に極僅かに含まれる鉄イオンが抑制解除に寄与した可能性が考えられた．また，両系においてグルコースは完全消費されたにも関わらず，添加系における増殖量および増殖速度定数は無添加系の約 70%および 50%以下であった．ATP 生産量を時系列で比較した結果，添加の有無に関わらずほぼ同等の傾向を示した．脱共役剤添加系では ATP 生産が完全に抑制されたことから，本物質は脱共役的作用を生じるのでは無く，代謝に直接影響していることが推察された．そこで，BW25113 株一遺伝子欠損株ライブラリー 3285 株を用いて一次スクリーニングを実施した結果，107 株が増殖耐性能を発揮し，その内 24 株は膜輸送タンパクあるいは排出ポンプ欠損株であった．
以上の結果から，C8 株由来増殖抑制物質は，同化と異化の代謝バランスをより異化反応へシフトさせることにより，結果的に増殖抑制を誘発していると推定された．

Interspecies interaction: Mechanism of growth inhibition of *E. coli* by *Pseudomonas* sp. strain C8

○Masahiro Honjo[1], Kenshi Sizuki[1], Tomoka Nishimura[2], Yosuke Tashiro[1], Hiroyuki Futamata[1,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words interspecies interaction, growth, metabolism, *Pseudomonas*

2P-H111 低温菌シンプル酵素触媒における補酵素再生系に関する研究

○森 一将, 津々木 亜美, 田島 誉久, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 中島田 豊, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
m170602@hirishima-u.ac.jp

【背景目的】微生物を利用した物質生産では微生物のもつ複雑な代謝系により目的物質の他に多くの副産物が生成されることが問題点の一つである．副産物生成を防ぐには代謝工学的制御が必要であるが，これには大きな手間とコストがかかる．そこで本研究室では低温菌を用いたシンプル酵素変換触媒技術の開発を行っている．本技術は，酵素精製や代謝制御など複雑な過程を踏まずに目的物質のみを生産することが可能であり，様々な代謝反応で利用される ATP や補酵素を目的反応のみに使用することが期待される．しかし，補酵素を必要とする反応系では，効率的な物質変換のために補酵素の供給が課題となる．本研究では，補酵素再生系を利用した効率的なシンプル酵素触媒の構築を目的としている．
【方法及び結果】NADH の再生系において，安価な亜リン酸を基質とする PtxD は Fdh と比較して平衡定数や Kcat が高いことから，補酵素再生酵素として利用が期待される．そこで補酵素再生系として Fdh，亜リン酸デヒドロゲナーゼ(PtxD)を比較検討した．補酵素再生系を評価するために，アセトフェノンを還元する Rhodococcus erythropolis 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ (Adh)と Fdh もしくは PtxD を組み合わせて低温菌 Shewanella livingstonensis Ac10 株に発現させたシンプル酵素触媒を作製した．45℃で熱処理した触媒ではいずれも約 80 % の収率でアセトフェノン 10 mM を変換した．しかし，再生された補酵素 NADH の一部が宿主の代謝にも利用されるため，熱処理温度の検討を行っているところである．

Efficient conversion system with NADH regeneration by psychrophile-based simple biocatalyst

○Kazumasa Mori, Ami Tsuzuki, Takahisa Tajima, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words NADH regeneration, psychrophile, phosphite dehydrogenase, formate dehydrogenase

2P-H112 *Corynebacterium glutamicum* を用いたセルロース系バイオマスからのカダベリン生産技術の開発

○松浦 礼奈, 岸田 真裕美, 平田 有希, 田中 勉, 近藤 昭彦
（神戸大院・工）
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 カダベリンはジアミンの一種で，ナイロンや医薬品などの原料となる．地球温暖化などの環境問題に配慮したクリーンな生産が求められているため，カダベリンの発酵原料としてバイオマスの利用が理想的である．本研究で用いる *Corynebacterium glutamicum* はカダベリンの前駆体であるリジンの工業的発酵に優れている．しかし，*C. glutamicum* はバイオマスの主成分であるセルロースを分解できず，リジン脱炭酸能を有さない．そこで *C. glutamicum* にセロビオース（セルロースの主成分）をグルコースに分解する b-g l ucosidase(BGL) と lysine decarboxylase (LDC)を共発現させて，セロビオースからのカダベリン生産経路の構築とカダベリン生産量の向上を目指した．
【方法】 *Thermobifida fusca* 由来の BGL と *E. coli* 由来の LDC を共発現したプラスミドを構築した．また，*C. glutamicum* ATCC 13032 株に１０種類の代謝改変を行い *C. glutamicum* MQN-7 を取得した．electropolation 法により *C. glutamicum* MQN-7 に構築したプラスミドを導入した．得られた株を 50 g/L セロビオースを含む CGXII 培地で 48 h まで本培養した．その後，培養液の OD_{600}，培養液上清のセロビオース濃度，グルコース濃度，カダベリン濃度を測定した．
【結果と考察】 BGL・LDC 共発現株において培養 16 h でセロビオースを全て消費し，培養 40 h で OD_{600} は 50.2 まで増大した．同時に，48 h で 9.10 g/L のカダベリンを生産し，収率は 0.173(g-cad/g-glu)となった．これは過去の研究におけるカダベリン生産量の約３０倍となった．また，グルコースを炭素源として用いた時のカダベリン収率は 0.156(g-cad/g-glu)であり，炭素源にセロビオースを用いることはグルコースよりカダベリンの収率を増加させた．この結果から，セロビオースからのカダベリン生産経路の構築とカダベリン生産量の向上に成功した．

Cadaverine production from cellulosic biomass using *Corynebacterium glutamicum*

○Rena Matsuura, Mayumi Kishida, Yuuki Hirata, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Eng., Kobe Univ)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, cadaverine, cellulosic baiomass, metabolic engineering

2P-H113 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の発酵生産収率向上のための大腸菌の代謝工学的改変

○濵野 雄大[1], 柘植 陽太[2], 梶田 真也[3], 政井 英司[4], 片山 義博[5], 敷中 一洋[6], 大塚 祐一郎[7], 中村 雅哉[7], 高橋 憲司[1], 仁宮 一章[2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術, [3]農工大・生物システム応科, [4]長岡技科大, [5]日大・生資科, [6]農工大院・工, [7]森林総合研）
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】近年，木質系バイオマスを原料とした有用物質の生産が活発になっている．我々は，その中でも特に，新規ポリマーの原料としての利用が期待されている 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(PDC)の生産に関する研究に注目した．既往の研究により，バイオマスから取り出すことのできる単糖であるグルコースからの組み換え大腸菌による PDC 発酵生産システムの構築には成功している．しかし，現状の大腸菌株では，PDC の収率が低いという問題点がある．そこで本研究では，さらなる遺伝子組み換えによる大腸菌の代謝工学的改変を行い，PDC の前駆体であるエリスロース-4-リン酸(E4P)とホスホエノールピルビン酸(PEP)への代謝反応の促進を行うことで PDC の効率的な生産を目指した．
【方法および結果】グルコースからの PDC 収率の向上に向けた手段としては以下に示す 3 つの遺伝子組み換えを行った．（1）*tktA*，*ppsA* 遺伝子の過剰発現による E4P，PEP への代謝反応の促進．（2）ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)に関する遺伝子の 1 つである *ptsG* 遺伝子の破壊による PTS における PEP の消費の抑制．（3）乳酸，酢酸，ギ酸生産遺伝子（*ldhA*, *poxB*, *ackA*, *pflB*）の破壊により，PDC 生産における副産物の生産を抑制．以上 3 種の遺伝子組み換えを行った大腸菌株を用い，グルコースを単一炭素源とした最小培地において，PDC 発酵試験を行った．その結果，いずれの株においても PDC 収率が向上し，*tktA*, *ppsA* の過剰発現が最も効果的であったことが確認できた．

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid

○Takehiro Hamano[1], Yota Tsuge[2], Shinya Kajita[3], Eiji Masai[4], Yoshihiro Katayama[5], Kazuhiro Shikinaka[6], Yuichiro Otsuka[7], Masaya Nakamura[7], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Bio-Appl. Syst. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]Nagaoka Univ. Technol., [5]Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., [6]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [7]Forestry Forest Products Res. Inst.)

Key words metabolic engineering, *Escherichia coli*, 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid

2P-F114 清酒酵母から自然に得られた染色体数の異なる一倍体株の代謝解析によるミトコンド リア活性の推定

○藤丸 裕貴[1], 門脇 真史[1], 田口 誠我[1], 澤田 和敬[2], 赤尾 健[3], 野口 英樹[4], 豊田 敦[4], 藤山 秋佐夫[4,5], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]佐賀県工業技術センター, [3]酒総研, [4]国立遺伝研・DDBJ研究セ, [5]総合研究大学院大学 遺伝学専攻）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

［背景と目的］
清酒酵母の育種に遺伝子組み換え技術を利用すれば目的の形質を意図したとおりに改変できるが，この方法で作出した株は消費者へのアクセプタンスに課題がある．
我々は遺伝子組換技術を使わずに醸造酵母の遺伝子の改変を可能にするため，特異な突然変異株の解析を行っている．本研究室では以前に，薬剤耐性を利用してピルビン酸低減性を示す清酒酵母 TCR7 を作出している．TCR7 では 11 番と 14 番の染色体が 2 本から 3 本に増加していたため，染色体の増加がピルビン酸の低減に関与しているのではないかと考えた．染色体数が酵母の醸造特性に及ぼす影響を調べるため，TCR7 から多数の一倍体を取得し，染色体数ごとの醸造特性のランダム化比較試験を行った．特定の染色体の増加とそれによる代謝の変動を関連付けることができれば，遺伝子組換え技術を用いずに意図した染色体セットと醸造形質を持った酵母を作出できるようになると考えている．
［実験方法］
TCR7 から 45 株の一倍体を取得し，qRT-PCR による核型解析を行った．それらを用いて小仕込み試験を行い，清酒を GC/MS を用いた分析に供した．検出された 51 個の代謝物について，それらのピークエリアを内部標準で標準化した値を説明変数として PCA を行った．
［結果と考察］
清酒の小仕込み試験の結果，11 番染色体が増加していた一倍体において，そうでない株と比較して有意にピルビン酸濃度が低減していた($p<0.05$).
PCA の結果より，PC1（寄与率 39.1%）軸上で 2,11,16 番染色体が 1 本から 2 本に増加した一倍体とその他の一倍体が分離した．また，11 番染色体増加株の分離に正に寄与する代謝物としてアミノ酸，有機酸があった．一方でエタノール，ピルビン酸は負に寄与していた．
以上の結果より，11 番染色体が増加することで解糖反応の減少，ミトコンドリア内代謝の活性化が生じたことが示唆された．

Estimating the mitochondrial activity of haploid strain derived from sake yeast based on metabolomics

○Yuki Fujimaru[1], Masahumi Kadowaki[1], Seiga Taguchi[1], Kazutaka Sawada[2], Takeshi Akao[3], Hideki Noguchi[4], Atsushi Toyoda[4], Asao Fujiyama[4,5], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]ITC of Saga, [3]NRIB, [4]DDBJ Center, Natl. Inst. Genet., [5]Sokendai)

Key words aneuploid, sake yeast, randomized controlled trial, metabolic analysis

2P-I115 醤油の主発酵酵母における接合型決定機構の解析

○渡部 潤, 上原 健二, 月岡 祐一郎
（ヤマサ醤油）
j_watanabe@yamasa.com

【背景と目的】酵母における種間交雑はしばしば認められる現象である．種間交雑によるゲノムのサイズと複雑さの増大は選択優位性をもたらすが，Dobzhansky-Muller 不和合成や染色体間の非相同性などにより，種間交雑株は生存率の高い胞子を形成できない．さらに，性決定に関与する Mating-Type（*MAT*）遺伝子座のヘテロ接合性により，交雑株は接合能を失うため，無性生殖により増殖するほかない．醤油の主発酵酵母は，その接合様式からヘテロタリックな 1 倍体と考えられてきたが，今年公開された主発酵酵母 2 株のドラフトゲノムデータは，それらが種間交雑によって生じた異質 2 倍体であることを示唆していた．この事実は主発酵酵母が異質 2 倍体でありながら，接合により異質 4 倍体を形成し，胞子形成により異質 2 倍体に戻るという生活環を有することを示している．今回，主発酵酵母が接合能を回復している理由を明らかにすることを目標に検討を実施した．
【結果】主発酵酵母のゲノムデータから性決定に関与する遺伝子座を探索した結果，6 つの Mating-Type-Like（*MTL*）遺伝子座が見出された．しかし，*MTL* 遺伝子座間の染色体の相互転座により，どの *MTL* 遺伝子座が活性型の *MAT* 遺伝子座なのかを予測することは困難であった．接合実験の結果と，6 つの *MTL* 遺伝子座にコードされる情報とを照合した結果，単一の *MTL* 遺伝子座により性決定されることが示唆された．RT-PCR 解析により，この *MTL* 遺伝子座から遺伝子が発現していることが確認され，さらに，この遺伝子座の接合型変換により，接合性が反転することを確認した．以上の結果より，異質 2 倍体の主発酵酵母が有する 6 つの *MTL* 遺伝子座から，接合型を決定する単一の *MAT* 遺伝子座が明らかになった．本発表では，種間交雑株が接合能を回復する機構について考察すると共に，全ゲノム重複との関連についても述べる．

A mechanism for restoration of fertility after interspecies hybridization

○Jun Watanabe, Kenji Uehara, Yuichiro Tsukioka
(Yamasa Corp.)

Key words interspecies hybridization, mating type, yeast, *Zygosaccharomyces*

2P-I116 熱安定性の向上した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 が清酒酵母の発酵力に及ぼす影響

○大橋 正孝 [1], 那須野 亮 [2], 渡辺 大輔 [2], 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】*S. cerevisiae* Σ1278b 株に見出された *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は，プロリンの毒性アナログである L-アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）をアセチル化によって無毒化する酵素として同定された．これまでの研究により，Mpr1 は冷凍や高濃度エタノール，乾燥などの処理による酸化ストレスから酵母細胞を保護する効果を有すること，Asp203 が Lys に置換した変異型 Mpr1（Mpr1-N203K）は野生型酵素に比べて熱安定性が向上したことが分かっている．我々は，Mpr1 をコードする遺伝子がゲノム上に存在しない清酒酵母で Mpr1 を発現させることで，酸化ストレス耐性及び発酵力の上昇が期待できると考えた．そこで，本研究では，熱安定性の向上した Mpr1-N203K の発現が清酒酵母の発酵力に及ぼす影響について解析を行った．
【方法及び結果】まず，ウラシル要求性の清酒酵母 K701 UT-1T 株において，野生型 Mpr1 または変異型 Mpr1（Mpr1-N203K）を pAG426-GPD ベクター上から恒常的に過剰発現させる菌株を作製した．両株を SC-Ura 液体合成培地（20%グルコース含有）で静置培養し（30℃），炭酸ガスの発生量をモニターしたところ，Mpr1-N203K 発現株は野生型 Mp r 1 発現株と比較して，発酵速度が有意に上昇することを見出した．また，清酒小仕込み試験においても同様に，Mpr1-N203K 発現株の発酵速度は上昇した．以上の結果から，元々優れた発酵力を示す清酒酵母に熱安定性の向上した Mpr1 をコードする遺伝子を導入することで，発酵力がさらに上昇する可能性が示された．今後，Mpr1 を有する菌株との交配育種と AZC 耐性を指標としたスクリーニングによって，発酵力が向上した新規清酒酵母の取得が期待できる．

Effect of thermostable *N*-acetyltranferase Mpr1 on the fermentation ability of Japanese sake yeast.

○Masataka Ohashi[1], Ryo Nasuno[2], Daisuke Watanabe[2], Hiroshi Takagi[2]
([1]Nara Pref. Inst. Ind. Dev., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *N*-Acetyltransferase Mpr1, Thermostabilization, Fermentation ability, Japanese sake yeast

2P-I117 嫌気条件が清酒酵母の葉酸含量に与える影響の解析

○村上 葉月 [1,2], 原田 春佳 [1,2], 上佐古 大貴 [1,2], 濱田 涼子 [2],
金井 宗良 [2], 藤井 力 [1,2]
（[1]広島大院・生物圏, [2]酒総研）
tfujii@hiroshima-u.ac.jp

【目的】葉酸はビタミン B 群に属する水溶性ビタミンで，レバーや緑黄色野菜，酵母などに高含有されている．また，葉酸が不足すると，胎児の神経管閉鎖障害リスクのほか，心筋梗塞や認知症等の発症リスクも高まることが知られている．清酒粕は葉酸を高含有しているが，4℃保存でも葉酸含量が減少するという欠点があった．我々は清酒粕保存における葉酸安定化を検討し，脱酸素処理により保存における葉酸含量の減少が抑制できることを明らかにしたが，その機構については明らかでなかった．そこで，この原因を探るため，清酒酵母に着目し，嫌気的な培養条件が清酒酵母の葉酸含量に与える影響の解析を行った．
【方法】清酒酵母を前培養後，寒天培地に塗布し培養，脱酸素処理を行い培養した試験区と，脱酸素処理をせず培養した対照区を設け，葉酸等の代謝産物含量を比較するとともに，培養酵母から RNA を抽出し，マイクロアレイにより遺伝子発現を解析した．
【結果】対照区の酵母では 9 日目の葉酸含量が 0 日目の 12%にまで減少していたが，脱酸素処理した試験区の酵母では 49%残存しており，清酒粕と同様，清酒酵母でも脱酸素処理が葉酸含量の低減抑制に有効であることが分かった．遺伝子の発現解析の結果，試験区の酵母では，解糖系の遺伝子が高発現していたほか，葉酸合成経路，葉酸サイクル，メチオニン合成経路に関与する遺伝子が高発現していることがわかった．このことは，嫌気的条件で葉酸合成が高いことが葉酸含量の減少抑制に寄与している可能性を示唆している．また，対照区の酵母で減少しているのは 5-メチルテトラヒドロ葉酸であり，*S*-アデノシルメチオニン含量も対照区の酵母の方が少ないことがわかった．
本研究は SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された．

Effects of the anaerobic condition on folates content of sake yeast.

○Hazuki Murakami[1,2], Haruka Harada[1,2], Daiki Uesako[1,2], Ryoko Hamada[2],
Muneyoshi Kanai[2], Tsutomu Fujii[1,2]
([1]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2]NRIB)

Key words sake yeast, folates content, sake cake, methionine synthesis pathway

2P-I118 協会系酵母と系統の異なる清酒酵母に見られる葉酸高蓄積機構

○柴田 裕介 [1], 高橋 俊成 [1], 藤井 力 [2], 赤尾 健 [2], 五島 徹也 [2],
山田 翼 [1], 末野 和男 [1]
（[1]菊正宗酒造, [2]酒総研）
y-shibata@kikumasamune.co.jp

【目的】全国の清酒粕の成分分析の結果，協会系酵母と系統が異なる清酒酵母 Km67 株を使用した清酒粕には葉酸が豊富に含まれていることが明らかとなった．葉酸は水溶性ビタミン(B9)に分類され，核酸の合成やアミノ酸代謝に関与し，貧血，うつ病，大腸がんなどの発症リスクを軽減することが知られている．当社ではこれまでに，Km67 株の *HMT1* 遺伝子が協会 7 号とは異なることが酒粕中の葉酸高含有に何らかの影響を与えていることを明らかにしてきたが [1]，それ以外の要因も考えられた．今回は Km67 株の葉酸高蓄積機構をさらに解明することを目的として，他の実用酵母の *HMT1* 配列や醪後半の葉酸含量の変化などを測定したので報告する．
【方法及び結果】Km67 株の *HMT1* 配列の K7 株との違いは 1 箇所（189 番目の塩基が Km67 は A，K7 株は T，アミノ酸配列では Km67 は Leu，K7 は Phe）だが，この変異により HMT1 の基質（SAM）結合能にも影響があると考えられた [2]．そこで，他の醸造用酵母の *HMT1* 配列と葉酸蓄積性を検討したところ，K7 型の配列は K6，K9，K1001 とワイン酵母の一部のみで，他の清酒酵母やビール酵母は Km67 型であり，この変異型と葉酸蓄積量に相関は見られなかった．Km67 株の葉酸高蓄積能に *HMT1* の違い以外の要因が考えられたので，Km67 株と K701 株で仕込んだ醪中の葉酸含量の経時変化を測定した．その結果，K701 株に関しては，葉酸含量が留 9 日目で最大となり，醗酵がほぼ停止してくると次第に減少していたのに対して，Km67 株の場合，醗酵がほぼ停止してからも葉酸含量が減少せずに維持されているということが明らかとなった．この高蓄積した葉酸を維持できるという性質も Km67 株の清酒粕中の葉酸含量が他の清酒粕と比べて高い原因の一つと考えられる．
1）柴田ら： 日本醸造学会大会講演要旨集 p10 (2016)
2）McBride, A. E. et al., J. Biol. Chem., 275, 3128-3136, 2000

The mechanism of high folate accumulation in sake yeast not belonging to Kyokai yeasts

○Yusuke Shibata[1], Toshinari Takahashi[1], Tsutomu Fujii[2], Takeshi Akao[2],
Tetsuya Goshima[2], Tasuku Yamada[1], Kazuo Sueno[1]
([1]Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd., [2]NRIB)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, folate, sake lees, *HMT1*

2P-I119 清酒酵母のペルオキシン遺伝子変異によるリンゴ酸生産能の上昇

○根来 宏明, 小高 敦史, 松村 憲吾, 秦 洋二
（月桂冠・総研）
negoro@gekkeikan.co.jp

【目的】 リンゴ酸は清酒の呈味に寄与する重要な成分であり，これまでに多くのリンゴ酸高生産清酒酵母の育種法が開発されている．今回，新たに取得したF-701H 株について，そのリンゴ酸高生産に寄与する変異遺伝子の同定を試みた．さらに，変異遺伝子がリンゴ酸生成能を増強させる機構の解析を行った．【方法と結果】 きょうかい 701 号を親株として香気生成に優れた F-701 株を育種した．さらに F-701 からコハク酸ジメチル（DMS）感受性を指標とし，清酒醸造でのリンゴ酸生産量が 3.2 倍高い F-701H 株を取得した．F-701 と F-701H の全ゲノム比較を行うと，F-701 に対して F-701H は 15 個の遺伝子に非同義変異を有していた．これらの変異の影響を検証した結果，*PEX22* 374G>A（p.W125amber）ホモ接合型変異がリンゴ酸高生産能を与えることを見出した．野生型 *PEX22* を F-701H に導入するとリンゴ酸高生産能と DMS 感受性を失ったことから，*PEX22* は F-701H の表現型に寄与する原因遺伝子であると判明した．また，*PEX22* 破壊株との有機酸生成能の比較から，この点変異は機能欠損をもたらすことが示唆された．次に，リンゴ酸高生産能を付与する機構について調べた．Pex22 はペルオキシソームの恒常性に関わるペルオキシン（Pex）群の一つである．酵母の Pex コード遺伝子を各々破壊した 28 株を評価した結果，ペルオキシソーム輸送シグナル 1（PTS1）保有タンパク質の輸送に関わる Pex 群および，Pex 自身の局在に関わる Pex 群の破壊株で，リンゴ酸生成能が上昇した．さらにペルオキシソームで機能しているグリオキシル酸回路の関与を調べると，PTS1 保有タンパク質である Mdh3 の欠損により *PEX22* 変異株のリンゴ酸生成能上昇が抑制された．これらの結果から，*PEX22* 変異株では Mdh3 の局在がペルオキシソームから細胞質へと変化したためにリンゴ酸高生産になったと推察した．

Increase in malate production by the mutation of peroxin-coding gene in sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Negoro, Atsushi Kotaka, Kengo Matsumura, Yoji Hata
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *PEX22*, malic acid, peroxisome, *Saccharomyces cerevisiae*

2P-N120 有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析

○山元 翔太[1], 池下 実咲[2], 清 啓自[1], 久保田 恵理[3], 兼崎 友[3], 鈴木 健一朗[1], 門倉 利守[1], 中山 俊一[1]
（[1]東農大院・農, [2]東農大・応生科, [3]東農大・ゲノムセ）
s3nakaya@nodai.ac.jp

2-オキソグルタル酸をグルタミン酸へと変換するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（*GDH1* ）のリンゴ酸生成初期における DNPR89 の転写量は K901 と比較して 3.3 倍，ミトコンドリアにおける有機酸のトランスポーター（*ODC2* ）の転写量は 1.7 倍に増加した．このことからミトコンドリアでの TCA サイクルにより生じた 2-オキソグルタル酸が細胞質中でグルタミン酸へと速やかに変換することで有機酸生成量が低減する可能性が示唆された．そこでこれらの遺伝子を K901 で高発現させリンゴ酸量を測定したところ，*GDH1* 発現株においてはコントロール株と比較して変化が見られなかったのに対して，*ODC2* 発現株においては 35％低下した．一方，グリオキシル酸をリンゴ酸に変換するリンゴ酸シンターゼ（*MLS1*）のリンゴ酸生成中期における DNPR89 の転写量は K901 と比較して 61％低下した．また，K901 に *MLS1* 高発現プラスミドを導入したところリンゴ酸生成量が増加した．このことからリンゴ酸生成に *MLS1* が寄与していることが確認され，DNPR89 における *MLS1* の低い転写量が低リンゴ酸生産性に関与する可能性が示唆された．以上の様に，DNPR89 における低リンゴ酸生成機構は単一の経路ではなく複数の経路の変化によることが示唆された．

Global expression analysis of low organic acid producing mutant derived from Kyokai 901

○Shota Yamamoto[1], Misaki Ikesita[2], Keiji Kiyosi[1], Eri Kubota[3], Yu Kanesaki[3], Kenichiro Suzuki[1], Tosimori Kadokura[1], Shunichi Nakayama[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Genome Res.Center,Tokyo Univ.Agric)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, organic acid, RNA-seq

2P-N121 高リンゴ酸・低酢酸生産性変異株 DNPR38 の網羅的転写解析

○西村 友里[1], 山元 翔太[1], 久保田 恵理[2], 兼崎 友[2], 鈴木 健一朗[1], 門倉 利守[1], 中山 俊一[1]
（[1]東農大院・農, [2]東農大・ゲノムセ）
s3nakaya@nodai.ac.jp

＜目的＞酒質の多様化を目的として，清酒酵母 K901 を親株とし，呼吸阻害剤である 2,4‐dinitrophenol(DNP)耐性を指標として有機酸生成が異なる変異株が取得された．中でも高リンゴ酸・低酢酸生産性を示す DNPR38 はグルコース 10％を含む YM 培地(YM10)において K901 に比べてリンゴ酸生成量が 3.3 倍に増加し，酢酸生成量が 30％に減少した．本研究では，RNA-seq 法を用いた網羅的転写解析により高リンゴ酸・低酢酸生産性の原因遺伝子を推定した．
＜方法・結果＞ K901 と DNPR38 を YM10 培地にて培養し，12h 毎にサンプリングした．上清から発酵産物を測定し，菌体から RNA を抽出後 RNA-seq 法により網羅的に転写解析した．親株 K901 と DNPR38 の転写量を比較したところ，リンゴ酸・酢酸生成に直接関与する遺伝子群は転写量が増加した遺伝子と減少した遺伝子が混在しており，その生成機構の推定は困難であった．リンゴ酸生成には NADH を必要とし，酢酸生成には NAD^+を必要することから，酸化還元に関する遺伝子に注目したところ，ペルオキシソームでのグルタチオンの輸送に関わりグルタチオン酸化還元バランスを保つ遺伝子 *OPT2* の転写量が顕著に低下していた．さらに，ペントースリン酸経路において NADPH を生成する 6-phosphogluconate dehydrogenase(*GND2*)の転写量が増加していた．一方，酵母のメタボローム解析より，K901 と比較して DNPR38 は還元型グルタチオンが 12 倍，NADPH が 2.7 倍も多かった．*GND2* が高発現したことにより NADPH の生成量が増加し，酸化型グルタチオンから還元型グルタチオンとなる反応が促進されるのと同時に，*OPT2* が低発現しペルオキシソーム内でのグルタチオンの酸化ができず，細胞内に還元型グルタチオンが蓄積することで，DNPR38 の細胞内がより還元状態となり，NADH 要求性のリンゴ酸生成が促進され，NAD^+要求性の酢酸生成が抑制された可能性が示唆された．

Global transcriptional analysis of high malic acid and low acetic acid producing sake yeast

○Yuri Nishimura[1], Shota Yamamoto[1], Eri Kubota[2], Yu Kanesaki[2], Kenichiro Suzuki[1], Toshimori Kadokura[1], Syunichi Nakayama[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric.)

Key words sake yeast, organic acid, RNA-seq, redox balance

2P-I122 酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク調節

○渡辺 大輔, 高木 健一, 吉岡 直哉, 杉本 幸子, 高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
hiro@bs.naist.jp

酵母 *Sacccharomycyces cerevisiae* のアルコール発酵力を人為的に改変することは，未だに容易ではない．我々は以前に，高発酵力を有する清酒酵母の研究を通して，発酵抑制の鍵を握る Rim15p プロテインキナーゼを見出しているが，これが発酵調節を担う唯一の因子であるのかについては不明である．そこで，本研究では，発酵調節メカニズムの全体像を明らかにするために，発酵力に影響を及ぼす遺伝子をゲノムワイドに探索した．
S. cerevisiae 遺伝子ノックアウト株コレクション（4,949 株）を用いて発酵速度の解析を行い，発酵促進遺伝子 220 種および発酵抑制遺伝子 286 種を同定した．本研究では，発酵抑制遺伝子の中から，これまで発酵との関連が未知であった液胞トランスポーターシャペロン（VTC）複合体に着目した．VTC 複合体とは，ポリリン酸合成酵素活性を有する液胞局在型の膜タンパク質複合体であり，構成因子のいずれかの機能欠損により発酵速度が上昇した．さらに，実用的な菌株や発酵条件を用いた場合にも，*VTC1* 遺伝子の破壊がパン生地や糖蜜の発酵速度を上昇させた．以上の結果から，VTC 複合体が発酵抑制に関与する新規因子として同定され，発酵力改変育種のためのターゲットとして有用であることが示された．
過去の報告により，Rim15p と VTC 複合体は共に，リン酸シグナル伝達の鍵因子である Pho80p-Pho85p プロテインキナーゼ複合体によって機能や発現を抑制されることが知られている．したがって酵母細胞は，環境中のリン酸に応答してこれらの発酵抑制因子を阻害し発酵力を高めると推測された．実際に，リン酸が Pho80p-Pho85p 複合体に依存して発酵速度を上昇させる効果を有することを新たに見出した．酵母にとっての発酵の意義の一つが ATP の産生であることから，このようなリン酸-炭素代謝クロストーク調節の存在は理にかなったものであると考えられる．

Crosstalk between phosphate and carbon metabolic pathways revealed by genome-wide exploration for the regulatory genes of alcoholic fermentation

○Daisuke Watanabe, Kenichi Takagi, Naoya Yoshioka, Yukiko Sugimoto, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation, VTC complex, Rim15p

2P-I123 パン酵母の高発酵力を生み出す遺伝的要因の探索

○梶原 拓真, 渡辺 大輔, 高木 博史
（奈良先端大・バイオ）
hiro@bs.naist.jp

【背景と目的】パン酵母による生地の発酵は，食感と香味の形成にとって必要不可欠な工程である．分類学上 *Saccharomyces cerevisiae* に属するパン酵母は，同種の他菌株と比べて，生地における高い発酵力が求められるが，その遺伝的要因はほとんど未知である．そこで本研究では，発酵中の生地におけるパン酵母の遺伝子発現に着目し，パン酵母の高発酵力に関連する遺伝子を明らかにすることを目的とした．
【方法】まず，市販パン酵母と実験室酵母 X2180 株を用いて生地を作製し，ファーモグラフを用いて CO_2 発生量を測定することで，発酵速度に顕著な差が見られる時期を調べた．該当する時期の生地から酵母の全 RNA を抽出し，次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析に供した．
【結果と考察】生地における CO_2 発生量を測定した結果，パン酵母では発酵開始直後から発酵速度が上昇し続けたのに対し，実験室酵母では発酵開始から 30 分間は発酵速度の顕著な上昇が見られず，その後徐々に上昇を開始した．このことから，パン酵母は初期における発酵の立ち上がりが優れていることが示された．次に，発酵開始から 30 分後の生地から調製した酵母の全 RNA を用いて RNA-seq 解析を行った．その結果，実験室酵母と比べてパン酵母では，炭素代謝（糖質同化，ペントースリン酸経路など）の関連遺伝子の発現レベルが低く，エルゴステロール合成を担う遺伝子の発現レベルが高いことが示された．このうち，炭素代謝に関連する遺伝子の多くが，清酒酵母で以前我々が見出した発酵抑制因子 Rim15p の標的遺伝子であり，実際にパン酵母が RIM15 遺伝子上にナンセンス変異 *rim15*^{T384G} 変異を有していることを明らかにした．これは，清酒酵母のフレームシフト変異 *rim15*^{5055insA} とは異なることから，パン酵母と清酒酵母の育種の過程で各々独自に機能欠失変異を生じ，高発酵力を獲得した可能性が示された．

Exploration of the key genetic elements to the high fermentation performance of baker's yeast

○Takuma Kajihara, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words baker's yeast, RNA-seq, dough fermentation, Rim15p

2P-I124 乳酸菌と食物繊維およびムチンとの相互作用の解析

○山崎 思乃[1], 倉光 香奈[2], 谷口 茉莉亜[1], 片倉 啓雄[1]
（[1]関西大・化生工, [2]関西大院・理工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【目的】乳酸菌による健康増進機能は，乳酸菌の腸管内への接着・定着によりもたらされる．腸管上皮は主に糖タンパク質ムチンから成る粘液層に覆われ，乳酸菌は DnaK や GroEL などのタンパク質を細胞表層に提示してムチンに接着する．一方，これらのタンパク質はマンナンやセルロースなどの食物繊維にも親和性を示し，乳酸菌が腸管内の食物繊維に接着して排出される可能性が示唆された．本研究では，この接着を評価しうる実験系を構築し，乳酸菌と食物繊維およびムチンとの相互作用を解析した．
【方法】乳酸菌は MRS 培地で対数後期まで培養した．セルロースパウダー（ナカライテスク）あるいはキチンパウダー（Wako）に菌体懸濁液を加え，37°C, 6 rpm で 30 分間インキュベートした．5 分間静置して食物繊維パウダーを沈降させた後，上清の OD_{660} を測定して接着率を算出した．ブタ胃由来ムチン（Wako）は 6 M 塩酸グアニジンを含む緩衝液に溶解し，ゲルろ過により分子量約 250 万の高分子ムチンを精製した．
【結果】乳酸桿菌 15 種のセルロースへの接着率を調べたところ，ヒト腸管から単離した *Lactobacillus johnsonii* NBRC 13952 が pH 5 および pH 7 でそれぞれ 80%および 60%と高い値を示した．また，キチンへの接着率は pH 5 で 78%，pH 7 で 37%であり，低い pH において高くなった．固定化ムチンと乳酸菌の接着に対する食物繊維による拮抗実験は困難であったため，不溶性食物繊維と乳酸菌の接着に対する可溶性ムチンによる拮抗実験で相互作用を評価した．食物繊維への乳酸菌の接着率はムチン濃度の増加に伴い低下し，pH 7 でセルロースでは 4 μg/ml，キチンでは 0.5 μg/ml のムチン添加により接着が 50%阻害された．本実験系により乳酸菌の食物繊維およびムチンに対する親和性の相対的な評価が可能となり，腸管内での食物繊維への接着を考慮すべきことが明らかとなった．

Analysis of interaction between lactic acid bacteria and dietary fiber or mucin

○Shino Yamasaki-Yashiki[1], Kana Kuramitsu[2], Maria Taniguchi[1], Yoshio Katakura[1]
([1]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ.)

Key words lactic acid bacteria, adhesion, dietary fiber, mucin

2P-I125 酢酸菌由来外膜小胞の産生と性質

○橋本 雅仁, 松元 太一, 馬場 梨沙子, 大薗 まみ, 橋口 周平
（鹿児島大院・理工）
hassy@eng.kagoshima-u.ac.jp

外膜小胞(OMV)は，リポ多糖(LPS)，タンパク質などを含んだ親株由来の膜構造を持つため，哺乳類細胞に対し免疫調節能を示すことが知られており，アジュバントとして用いられている．しかし大腸菌などの一般細菌由来の OMV は LPS の強毒性のため弱毒化などの操作が必要である．酸酸菌 *A. pasteurianus* は黒酢の発酵に関与している細菌であり，長い食経験を持つ安全な細菌である．最近我々は，酢酸菌の LPS がヒトの自然免疫を弱く活性化することを明らかにした．そこで本研究では，酢酸菌由来 OMV を利用するための基礎として，その産生能と免疫学的性質について検討した．酢酸菌を 804 培地を用いて培養後，TEM 観察したところ，培養２日目以降に OMV の産生が観察された．そこで，酢酸菌培養上清を超遠心分離したところ，培養３日目以降に OMV を回収できることが分かった．糖含量を基準に OMV の改修料を比較したところ，培養７日目に最も多くの OMV を回収できることが分かった．ついで OptiPrep を用いた密度勾配遠心法により OMV を精製した．精製 OMV を SDS-PAGE で分離し，糖およびタンパク質を可視化したところ，精製 OMV が酢酸菌 LPS および外膜タンパク質を含むことがわかった．精製 OMV の自然免疫活性化能を測定したところ，TLR2 を強く，TLR4 を僅かに活性化することが明らかとなった．これらの結果は，酢酸菌 *A. pasteurianus* が OMV を産生すること，またヒトの自然免疫系を調節しうることを示している．

Outer membrane vesicles from acetic acid bacteria

○Masahito Hashimoto, Taichi Matsumoto, Risako BAba, Mami Ozono, Shuhei Hashiguchi
(Grad. Sch. Sci. & Eng., Kagoshima Univ.)

Key words acetic acid, lipid vesicle, lipopolysaccharide, TLR

2P-N126 出芽酵母における梨幼果添加による経時寿命の延長

○村田 和加恵[1], 長谷川 真梨菜[1], 酒瀬川 世瑠[1], 荻田 亮[2,3], 藤田 憲一[2], 田中 俊雄[2]
（[1]米子高専, [2]阪市大院・理, [3]阪市大・健康研セ）
murata@yonago-k.ac.jp

細胞寿命の制御に関して，酵母からヒトまで共通性があると考えられており，これは様々なモデル生物を用いた寿命研究から考えられた結果である．本研究では，出芽酵母を用い，経時寿命における梨の効果添加における寿命の延長について研究を進めている．経時寿命とは，出芽酵母における寿命の１つの考え方で，分裂寿命とわけて考えられている．経時寿命は分裂を停止した細胞が生存する期間のことを指し，具体的には，定常期に入った細胞を選択し，コロニー形成率を求めることで生存曲線を作成し，生存率を求めることができる．
本研究では，この経時寿命に着目し，経時寿命の延長が見られるような食品の探索を目的とし，特に鳥取県で栽培が盛んな梨に着目し，研究を行った．その結果，梨の効果を添加した酵母において，添加しない酵母より経時寿命の延長が確認された．しかし，成熟した梨の果実抽出液を添加した酵母と，添加無しの酵母と比較した場合，経時寿命に大きな変化は見られなかった．梨の摘果によって得られる効果はほぼ廃棄されるいという現状がある．この研究結果は，梨の効果の有効利用につながる可能性があると考えられる．

Young asian pear fruit can act as anti-aging on budding yeast cells.

○Wakae Murata[1], Marina Hasegawa[1], Seiru Sakasegawa[1], Akira Ogita[2,3], Ken-ichi Fujita[2], Toshio Tanaka[2]
([1]Yonago Natl. Coll. Thechnol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]Res. Center. UrbanHealth Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, chronological lifespan, pear

2P-N127 非イオン性界面活性剤ジグリセロールモノラウレートによる不可逆的な真菌液胞膜障害作用

池側 智香子[1], 土井 剛志[2], 熊澤 史貴[2], 村田 和加恵[3],
○荻田 亮[1,4], 藤田 憲一[1], 田中 俊雄[1]
([1]阪市大院・理, [2]太陽化学, [3]米子高専, [4]阪市大・健康研セ)
ogita@sports.osaka-cu.ac.jp

【目的】発酵食品の生産に欠かせない *S. cerevisiae* など一部の酵母が，一方では糖や酸を高濃度で含む飲料など食品の腐敗にも関与している．そのため，食品中での酵母の増殖を効果的にかつ安全に阻止するための方法が求められている．食品乳化剤である diglycerol monolaurate (DGL) は，高い両親媒特性などから食品添加物としての応用が期待されている．本研究では *S. cerevisiae* に対する DGL の致死作用に注目し，その機序を明らかにしようとした．
【方法】モデル細胞として *S. cerevisiae* W303 株を用いた．致死作用の検定は麦芽末培地，YPD 培地，水，およびコハク酸緩衝液中，30℃ の条件で行い，生菌数をコロニーカウント法により測定した．細胞膜障害の指標として，細胞内 K^+ の漏出を測定した．液胞膜の観察は蛍光試薬 FM4-64 によって処理した細胞を用いて行った．
【結果と考察】DGL の致死作用はイオン強度や栄養度の異なる条件下でも保持されたことから，食品中の一般的な化学成分による不活化の可能性は低いとみなされた．DGL の作用を同じく非イオン性界面活性剤である Tween 20 および Triton X-100 のそれと比較したところ，DGL は他の界面活性剤より低濃度で強い致死作用を示すが，致死濃度では界面活性剤によく見られる細胞膜リン脂質の可溶化作用を示さなかった．意外にも DGL は酵母の細胞内に取り込まれて液胞膜を著しく断片化させることが判った．この種の液胞膜構造の変化は Tween 20 処理細胞には全く認められず，Triton X-100 処理細胞には弱く認められる程度であった．DGL 処理細胞を洗浄した後，新たな培地に供したところ，液胞膜の断片化が保持されることが判った．以上より，DGL は細胞膜リン脂質を可溶化することなく細胞内へと移行し，液胞の膜構造に不可逆的な障害を与えることで *S. cerevisiae* を殺菌するとみなされた．

Irreversible vacuolar membrane fragmentation in the lethality of diglycerol monolaurate against budding yeast

Chikako Ikegawa[1], Takeshi Doi[2], Fumitaka Kumazawa[2], Wakae Murata[3],
○Akira Ogita[1,4], Ken-ichi Fujita[1], Toshio Tanaka[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Taiyo Kagaku Co.,Ltd., [3]Yonago Natl. Coll. Technol., [4]Res. Center for Urban Health & Sports., Osaka City Univ.)

Key words diglycerol monolaurate, surfactant, vacuole, *Saccharomyces cerevisiae*

2P-N128 ポリグルタミン酸による IL-12 遺伝子発現誘導効果に及ぼす PGA 合成関連遺伝子 *pgsE* の影響

中野 太一[1], 吉田 泉[2], 三嶋 隆[2], 高橋 良輔[3], 北村 進一[3],
山口 良弘[4], 荻田 亮[5], 田中 俊雄[1], ○藤田 憲一[1]
([1]阪市大院・理, [2]日本食品分析セ・彩都研, [3]阪府大院・生環科, [4]阪市大・複合先端, [5]阪市大・健康研セ)
kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp

納豆のネバネバの主成分の 1 つであるポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) は，マクロファージの細胞膜上で Toll-like receptor 4 に認識され，インターロイキン 12 (IL-12)を分泌させる．PGA は，枯草菌において 4 つの遺伝子 *pgsB*, *pgsC*, *pgsA* および *pgsE* で生合成され，*pgsE* は PGA の生産量・見かけの分子量を上昇させると報告されている．本研究では，*pgsE* の有無が IL-12 遺伝子発現に与える影響を，マクロファージ様培養細胞ヒト単球 THP-1 を用いて検討した．3 つの遺伝子 *pgsB*, *pgsC* および *pgsA* あるいは 4 つの遺伝子 *pgsB*, *pgsC*, *pgsA* および *pgsE* 高発現系を 168 株を用いて構築し，それらの株由来の PGA サンプルを得た．THP-1 細胞をそれぞれの PGA サンプルで処理し，IL-12 遺伝子転写量をリアルタイム PCR により調べた結果，*pgsE* の有無による有意な差は認められなかった．SEC-MALS 法により解析したところ，4 つの遺伝子由来 PGA サンプルには，分子量 690 k の PGA だけが含まれており，3 つ遺伝子由来 PGA サンプルには，分子量 950 k，28 k，6 k の成分が含まれることが判明した．3 つ遺伝子由来 PGA サンプル中に含まれる 3 成分を限外ろ過フィルターにより分画し，アミノ酸分析を行ったところ，28 k は PGA であり，6 k は不純物であることがわかった．分画されたサンプルについて IL-12 遺伝子の転写を調べた結果，690 k 及び 950 k が含まれる画分には転写が認められ，28 k および 6 k が含まれる画分には全く認められなかったことから，*pgsE* により発酵生産が促進された PGA には IL-12 遺伝子転写を誘導する活性があると推論した．

Effect of *pgsE* on PGA-induced gene expression of IL-12 in human monocytic THP-1 cells

Taichi Nakano[1], Izumi Yoshida[2], Takashi Mishima[2], Ryosuke Takahashi[3], Shinichi Kitamura[3], Yoshihiro Yamaguchi[4], Akira Ogita[5], Toshio Tanaka[1], ○Ken-ichi Fujita[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Saito Lab., Japan Food Res. Lab., [3]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]OCARINA, Osaka City Univ., [5]Res. Center, Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

Key words *Bacillus* sp., poly-gamma-glutamic acid, IL-12

2P-N129 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得

○三木 健夫, 篠笥 光慶
(山梨大院・医工総)
takemiki@yamanashi.ac.jp

キラー酵母は感受性酵母に対して静菌もしくは細胞破壊を伴う致死作用を示す．このキラー現象は細胞外にキラータンパク質を放出し，これが感受性酵母に作用することにより発現する．我々は，強いキラー活性を示す *Saccharomyces cerevisiae* YM41 株について研究を行っている．これまでに，YM41 株の生産するキラータンパク質（KP41）を精製し，本タンパク質の諸性質について調査を行った結果，pH2.0~5.0 および 20℃ 以下で安定性を示し，分子質量は約 70 k Da であることを明らかにしている．本研究では，酵母 *S. cerevisiae* YM41 株の保持するキラー遺伝子の取得を試みた．KP41 の N 末端アミノ酸配列（A-M-V-E-A）に対応する縮重プライマーを作成し，PCR 法により増幅を試みた結果，4 つの増幅断片（1.2，2.0，3.5 および 5.0kbp）を得た．これらのうち 2 つの断片（1.2，2.0kbp）をクローニングし，塩基配列を決定した．これらの配列を Saccharomyces Genome Database 上で BLAST 検索した結果，一つは *S. cerevisiae* EC1118 の XIII 染色体の一部分と 98％の同一性を示し，他方は IV 染色体の一部分と 97％の同一性を示すことがわかった．

Cloning of killer gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae* YM41

○Takeo Miki, Mitsuyoshi Sasaki
(Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, killer gene, cloning

2P-I130 冷凍パン生地製法に適した冷凍耐性酵母の探索と評価

○森本 一輝[1], 小西 正朗[2]
([1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工業大学・工・地域未来デザイン工学)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

近年，食生活は個性化，多様化しておりパンも同様で新鮮で焼きたてのパンを求めるニーズが高まっている．パン業界では二次発酵前の生地を凍結保存し，必要なときに融解し，二次発酵後に焼成する，冷凍パン生地製法が急増している．しかし，凍結により，パン生地の品質が劣化するという課題がある[1]．そこで，当研究室では，日本でも有数の寒冷地であるオホーツク地域に立地している大学である特色を活かし，環境中から凍結耐性の高い酵母の探索を試みた．まず，84 株の Glucose 発酵能を持つ酵母を分離し，簡易凍結試験で 43 株の凍結耐性に強いと思われる候補株を選別している．
本研究では，凍結融解による生菌数の変化により，既存の凍結耐性酵母 (*Torulaspora delbrueckii* NBRC 1129, *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 103964)より凍結耐性が高い酵母 29 株を選択した．次に，得られた菌株の 26/18s rRNA の D1/D2 領域の DNA 配列に基づく系統解析を行った．系統解析の結果より，分離株の中で 3 番目に凍結耐性が高かった SRT88 株は食経験豊富な醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* と同定され，食用に供することができる菌株であることがわかった．次に，パン生地中で凍結前後の発酵量の減少率を測定したところ，SRT88 株 21.9％となり，ドライイーストの 61.5％と比べて，1/3 程度であることがわかった．SRT88 株はパン生地中でも高い凍結耐性を示した．
現在 SRT88 株で作成したパンの品質について，評価を進めている．

1) 高野博幸 (1989) 日本醸造協会雑誌 vol.84:88-94

Isolation and evalution of new freeze-tolerant yeast for frozen dough method

○Kazuki Morimoto[1], Masaaki Konishi[2]
([1]Dept. Biotechnol. Environ. chem., Grad. School of Eng.Kitami Inst Techol, [2]Dept. Biotechnol. Environ. Chem., Kitami Inst Tech.)

Key words yeast, bread, freeze tolerante

2P-F131 大気圧低温プラズマによる出芽酵母殺菌過程の解析

糸岡 洸樹, ○井沢 真吾
（京工繊大院・工芸科学）
thioredoxin@kit.ac.jp

誘電体バリア放電により発生させる大気圧常温プラズマ(cold atmospheric pressure plasma, CAP)は，常温大気圧下で電離したガスであり，反応性が高くウィルスの不活化や殺菌効果を持つ．CAP 照射は熱変性を引き起こさず残留物質の問題もないことから，生鮮食品などの新しい殺菌法として注目されている．しかし，バクテリアに比べて酵母などの真核微生物に対する作用機構は未だ十分に解明されていない．これまでに我々は，CAP 照射に伴い出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞内で酸化的ストレスや翻訳抑制などが惹起されることを見出している(Itooka *et al*., 2016)．今回，酵母タンパク質に及ぼす CAP 照射の影響を検討した．
小胞体ストレス（ER ストレス）および小胞体ストレス応答（UPR）の誘導を，Ire1-Hac1 pathway の活性化を指標に解析した．CAP 処理によって酵母細胞内の小胞体ストレスセンサーである Ire1 の局在が速やかに変化し，Ire1 の活性化が観察された．しかし，*HAC1* mRNA のスプライシングや Hac1 標的遺伝子の転写活性化は CAP 処理によって誘導されなかった．そのため，本研究の CAP 照射条件下では小胞体ストレスは惹起されるものの，UPR の誘導は不十分なまま細胞死に至っていると考えられた．次に，細胞質側でのタンパク質の変性を Hsp104 および peroxiredoxin Tsa1 の局在を指標に検討した．Hsp104-GFP と Tsa1-GFP が明瞭な foci を形成したことから，CAP 処理によって生じた過酸化水素を介して細胞質タンパク質が変性・凝集したと考えられた．さらに，ユビキチン化されたタンパク質レベルの増加も確認された．これらの結果から，CAP 処理による殺菌過程で酵母細胞の小胞体内や細胞質でタンパク質の変性が引き起こされることが明らかとなった．
【参考文献】Itooka *et al*. (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 100, 9295-9304.

Study on the sterilization process of yeast by cold atmospheric pressure plasma

Koki Itooka, ○Shingo Izawa
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words cold atmospheric pressure plasma, yeast, ER stress, protein denaturation

2P-I132 *Saccharomyces cerevisiae* 子嚢胞子の耐熱性に対する炭酸ガスとアルコールの影響

○浅野 静, 伊藤 大和, 佐藤 英明, 飯島 和丸, 舛田 晋, 渡邊 哲也
（アサヒビール）
shizuka.asano@asahibeer.co.jp

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は生育環境の変化によって耐熱性子嚢胞子を作ることが知られており，この子嚢胞子は栄養細胞の 50-150 倍という高い耐熱性を示すことが知られている．このことから，清涼飲料をはじめとする食品の加熱殺菌において，当該酵母の耐熱性子嚢胞子を指標菌と想定した殺菌条件が設定されていることが多い．さらに，清涼飲料に含まれる酸や糖，果汁などの構成成分が子嚢胞子の耐熱性に与える影響は，これまで多くの知見が報告されており，加熱殺菌を基本とする食品分野において，必要十分な加熱殺菌を行い微生物事故を起こさないための製造工程を設定する重要な要素となっている．
本報告では，食品の構成成分として，アルコール濃度と炭酸ガスに着目し酵母子嚢胞子の耐熱性に与える影響を調査した．まず，*S. cerevisiae* の過去に知見のある株より，安定的かつ高い耐熱性子嚢胞子を形成する株と培養条件を検討した．次に，炭酸ガスとエタノールを含有する標準的な炭酸アルコール飲料を用いて，アルコール濃度及びガスボリュームをパラメーターとして変化させ，各試験区における殺菌効果を検証した．さらに，これらのデータを CAE 技術のひとつである応答曲面法を活用し，*S. cerevisiae* の子嚢胞子を 10^{-5} 以上殺菌できる条件を数式化することに成功した

Effect of carbonation and ethanol concentration on the heat resistance of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores

○Shizuka Asano, Hirokazu Ito, Hideaki Sato, Kazumaru Iijima, Susumu Masuda, Tetsuya Watanabe
(Asahi Breweries, Ltd.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, ascospore

2P-I133 *Bacillus subtilis* C-3102 株が産生する新規ビフィズス菌増殖因子の同定

○畑中 美咲, 森田 寛人, 青柳 有美, 中村 哲平
（アサヒグループホールディングス・コアテク研・フローラ技術部）
misaki.hatanaka@asahigroup-holdings.com

【背景・目的】
腸内フローラは，人々の健康に寄与しているが示唆されているが，有用菌であるビフィズス菌は，加齢とともに菌数が減少していくことが知られている．*Bacillus subtilis*C-3102 株（以下，C-3102 株）はこれまでの検討から，培養上清がビフィズス菌を増やすことが明らかになっており，培養上清中に含まれる物質が直接ビフィズス菌を増殖させていることが示唆された．そこで，C-3102 株培養上清からビフィズス菌増殖因子の単離・同定を試みた．
【方法】
C-3102 株を DSM 改変培地（1％ Glucose, 0.5％ Casamino acid, 0.01％ KCl, 0.00122％ $MgSO_4$, pH7.6）に植菌し，6 時間培養後，得られた培養上清に等量のブタノールを添加した．水層とブタノール層に分離し，そのうちのブタノール層を HPLC に供し，活性画分を回収した．回収した活性画分を濃縮乾固し，得られた乾燥粉末を LC-MS/MS，LC-NMR に供し，物質の同定を行った．
【結果】
ブタノール層活性画分より，cyclo(Leu-Val)，cyclo(Ile-Val)の 2 種類の環状ジペプチドが単離された．また，本物質を酸加水分解後，アミノ酸組成を分析したところ，D-Val, L-Val, D-Ile, L-Ile, L-Leu が検出された．これらの結果から，C-3102 株培養上清のブタノール抽出液中には，cyclo(L-Leu-D-Val), cyclo(L-Leu-L-Val), cyclo(D-Ile-D-Val), cyclo(D-Ile-L-Val), cyclo(L-Ile-D-Val), cyclo(L-Ile-L-Val) の 6 種のキラル化合物が含まれていることが推測された．また，6 種類それぞれの物質のビフィズス菌増殖活性を評価したところ，コントロールと比べて 150-300％の活性があり，環状ジペプチドを構成するアミノ酸の一方に D 体を含む物質の方が，増殖活性が高いことが明らかとなった．尚，これら 6 種類の物質は，腸内の有害菌を増殖させなかったことから，ビフィズス菌を特異的に増殖させる作用があることが示唆された．

Identification of a new bifidogenic growth factor in culture supernatant of *Bacillus subtilis* C-3102

○Misaki Hatanaka, Hiroto Morita, Yumi Aoyagi, Teppei Nakamura
(Dept. Microbiol. Flora Tech., Core Tech. Lab., Asahi Group Holdings, LTD.)

Key words *Bacillus subtilis*, bifidogenic growth factor, cyclodipeptide, diketopiperazine

2P-I134 水溶性食物繊維イヌリンのマウス腸内細菌叢に及ぼす影響の時間栄養学的解析

○千々岩 樹佳[1,2], 丸山 徹[1,2], 青木 菜摘[1], 細川 正人[3,4], 柴田 重信[5], 竹山 春子[1,2,3]
（[1]早大院・先進理工・生医, [2]産総研・早大CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ, [5]早大院・先進理工・電生）
haruko-takeyama@waseda.jp

腸内環境を制御している腸内細菌叢は，宿主の様々な生理機能に影響する．近年では腸内環境を制御する機能性食品成分が注目されており，その生理的な機能性効果の検証が求められている．また，腸内環境は末梢臓器の概日時計にも応答し，腸内細菌叢にも日内変動が認められることが知られる．
本研究では，腸内細菌の発酵基質として利用される食物繊維イヌリンを用いて，イヌリンの摂取頻度と摂取時間がマウス腸内細菌叢へ与える影響を評価した．マウス（ICR，雄，6 週齢）をコントロール摂取群とイヌリン摂取群に分け，普通飼料（AIN93M）に 5%セルロースもしくは 5%イヌリンを混合し，10 日間与えた．また，摂取時間の条件を朝夕食群，朝食群，夕食群の 3 群に分け，各群の腸内細菌叢および盲腸内容物の pH や有機酸などのメタボロームデータを収集し，統合的に解析した．腸内細菌叢データは，Illumina 社の Miseq を用いた 16S rDNA 遺伝子配列 (V3-V4 領域)のシーケンス解析により取得した．腸内細菌叢の変動比較を行なった結果，イヌリン摂取群ではコントロール群に対して，一部の腸内細菌叢が特徴的に変化する事が観察された．また，イヌリンの摂取時間により腸内細菌叢の変化パターンが異なることが明らかとなった．
以上の結果より，イヌリンの摂取に加えて，摂取時間を制御することによって特定の腸内細菌叢の増加や減少が促されることが明らかとなった．このことから，時間栄養学的な観点を考慮して食成分の腸内環境への影響を評価することが重要と考えられた．

Chrono-nutrition analysis of effect of dietary fibre inulin on mice gut microbiota.

○Rieka Chijiiwa[1,2], Toru Maruyama[1,2], Natsumi Aoki[1], Masahito Hosokawa[3,4], Shigenobu Shibata[5], Haruko Takeyama[1,2,3]
([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [4]PRESTO, JST, [5]Dept. Electrical Eng. Biosci., Waseda Univ)

Key words Inulin, mice gut microbiota, chrono-nutrition

2P-I135 キムチ中 D-アミノ酸の保存期間における経時的プロファイル変動の調査

○谷口 百優, 紺屋 豊, 中野 洋介, 福崎 英一郎
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
自然界にはほとんど存在しないと考えられてきた D-アミノ酸が，キラルアミノ酸分析の技術進歩により，発酵食品中に高濃度に存在することが明らかとなっている．食品分析で用いられている従来のアミノ酸分析の多くは光学異性体を区別しておらず，アミノ酸の食品機能への寄与は L-アミノ酸を前提に考察されてきたが，D-アミノ酸の食品機能への関与が重要視され始めている．しかし，簡便性やスループットの問題から実用的なキラルアミノ酸分析法は存在しなかった．そこで，これまでに当該研究チームは簡便かつハイスループットな新規キラルアミノ酸分析法を開発した．本研究では，開発した分析法を用いて発酵食品の一つであるキムチ中の D-アミノ酸の保存期間における経時的なプロファイル変動を調査した．

【方法】
市販の白菜キムチは 4℃ または 25℃ で保存し，0，3，7，14，28 日目に採取した．得られたキムチは前処理後，キラルカラム (CROWNPAK CR-I，ダイセル CPI) と液体クロマトグラフィ - 飛行時間型質量分析計を組み合わせたシステムを用いて，非誘導体化タンパク質構成アミノ酸 18 種を対象として一斉分析を行った．（1 分析あたり 10 分）

【結果と考察】
開発した分析法を用いてキムチの保存期間における D-アミノ酸プロファイルの変動を調査したところ，10 種の D-アミノ酸が増加する様子を捉えることができた．特に，D-アラニン，D-アルギニン，D-グルタミン酸は 28 日間保存後のキムチから高濃度に検出され，全体の 20%以上が D-体であった．今回の結果を考察すると，食品分析においてアミノ酸キラリティを考慮することは重要であると示唆され，さらにはアミノ酸の新規食品機能の発見も期待できる．

Investigation of time dependent alternations of D-amino acids profile in kimchi during storage process

○Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, Yosuke Nakano, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words D-amino acid, enantioseparation, time dependent profiling, food analysis

2P-I136 自動プレカラム誘導体化-HPLC 法によるアミノ酸のキラル分離

○熊谷 浩樹
（アジレント・テクノロジー（株））
hiroki_kumagai@agilent.com

【目的】クロマトグラフィーによるアミノ酸のキラル分離では，キラル固定相による方法とアミノ酸のジアステレオマーを汎用の固定相で分離する方法が主として用いられている．アミノ酸と OPA，システイン誘導体は室温で迅速に反応し蛍光性のジアステレオマーを形成し，このジアステレオマーは，ODS などの一般的な逆相カラムで分離可能である．この誘導体化反応が室温で迅速に反応することを利用し，誘導体化反応を HPCL システムで自動化することによって簡便かつ高精度なアミノ酸のキラル分離ができることを報告した [1]．本研究では，分離カラムの検討により分析速度と分離能の改善を試みたので報告する．
【方法】HPLC システムは Agilent 1290 Infinity II LC System に蛍光検出器を接続して 使用した．アミノ酸と OPA，*N*-isobutyryl-L-cysteine をホウ酸緩衝液中で混合し，オートサンプラ内で自動で反応を行った．分離カラムには，高速・高分離が可能なコアシェル形充填剤 Agilent Poroshell HPH-C18 を使用した．
【結果と考察】粒子径の小さいコアシェル形充填剤により，十分な分離度を維持したまま分析時間を短縮することが可能であった．コアシェル形充填剤のカラムを HPLC システムの耐圧に応じて適切に選択することにより，分離度に優れたキラル分離を容易に実施することができるため，全自動プレカラム誘導体化とジアステレオマー - 逆相分離の組合せは簡便なキラル分離手法として有用であると考えられる．今回検討した分析条件を食品中のアミノ酸分析に適用したところ，良好なキラル分離を行うことができた．
1) 熊谷，第 68 回日本生物工学会大会，1P-2p168，(2016).

Enantioseparation of amino acids using pre-column derivatization-HPLC method

○Hiroki Kumagai
(Agilent Technologies Inc.)

Key words amino acid, enantiomer

2P-N137 ペプチドー斉分析と多変量解析による牛乳アレルギー治療乳のプロファイリング

倉林 篤史 [1], 佐藤 大 [1], 栗本 昌樹 [2], 中田 創 [2], 越智 浩 [2],
阿部 文明 [2], ○鈴木 秀幸 [1]
（[1]かずさDNA研, [2]森永乳業・素材研）
hsuzuki@kazusa.or.jp

【背景と目的】牛乳アレルギー治療乳（以下，アレルギー用ミルク）は，牛乳蛋白質を酵素消化により低アレルゲン化した牛乳アレルギーに罹患した乳児に使われるミルクである．本研究では，国内外で実際に販売されているアレルギー用ミルクを対象とし，それらの最終的な製品特性を決定すると考えられるペプチドをはじめとしたマルチコンポーネントプロファイリングを行い，品質の把握と比較を行った．
【方法】試料にはカゼイン原料 7 種類，ホエイ原料 6 種類，およびカゼイン・ホエイ混合原料 3 種類の合計 16 種類のアレルギー用ミルクを使用した．ペプチド一斉分析にはナノフロー高速液体クロマトグラフ質量分析計（NanoLC-MS）を用い，検出されたピークの MS2 スペクトルよりペプチド配列を推定した．また，ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて非ペプチド成分も分析した．各アレルギー用ミルクの分析結果を，主成分分析を中心とした多変量解析によるプロファイリングに供した．
【結果と考察】NanoLC-MS 分析により検出された各ペプチドの主成分分析では，16 種類のアレルギー用ミルクは 3 つのグループ（Group A，B，C）に分類された．Group A と B はそれぞれ 3 種類のカゼインあるいはホエイを原料としたアレルギー用ミルクから構成されていた．Group 3 は 10 種類の原料の異なるアレルギー用ミルクから構成されていたが，Group C の中では原料別のサブグループを形成していた．これらの結果から，ペプチド一斉分析によって原料のグルーピングが可能であることが明らかとなるとともに，本研究で使用したアレルギー用ミルクには原料の違い以上に含有ペプチド組成に影響を与える要因の存在が示唆された．発表では，ペプチド以外に見出される成分や官能評価との関連性についても考察する．

Peptide and the other multi-component profiling of various extensively hydrolysed formula

Atsushi Kurabayashi[1], Masaru Sato[1], Masaki Kurimoto[2], Hajime Nakada[2],
Hiroshi Ochi[2], Fumiaki Abe[2], ○Hideyuki Suzuki[1]
([1]Kazusa DNA Res. Inst., [2]Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

Key words extensively hydrolysed formula, peptidomics, high-resolution mass spectrometory, multivariate analysis

2P-I138 多孔性担体を用いた機能性ペプチド腸輸送技術の開発

○今井 健人 [1], 清水 一憲 [1], 上村 光浩 [2], 小川 光輝 [2], 本多 裕之 [1]
（[1]名大院・工, [2]富士シリシア化学）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】
ペプチドは機能性食品の有効成分として注目されている．しかし経口摂取されたペプチドの大部分はプロテアーゼによって分解され，その機能を失う．このため，ペプチドをプロテアーゼから保護し生体吸収を担う腸に届ける技術開発が求められている．本研究では食品添加物として使用実績が豊富な多孔性担体に注目し，機能性ペプチドの腸輸送担体としての応用を検討した．
【方法】
平均粒子径 5 μm，細孔径 10 nm の多孔性担体を用いた．等電点と疎水度などの物理化学的性質が異なる 3,5,7 残基のペプチドをそれぞれ 32 種類ずつ（合計 96 種類）合成し pH2 と pH7 における，それらのペプチドと多孔性担体との吸着特性を調べた．
【結果】
多孔性担体にペプチドを吸着させたところ，胃内プロテアーゼであるペプシンによるペプチド分解を抑制できた．このことから多孔性担体を輸送担体とするペプチドの腸輸送が可能であると考えた．そこで腸輸送を想定し，pH2 で多孔性担体に吸着し，pH7 で担体から脱離するペプチドの物理化学的性質を調べた．その結果，ペプチド残基数に関係なく，比較的疎水性で負電荷のペプチドが腸輸送に向いた吸脱着特性を示すことがわかった．さらに，多孔性担体の表面疎水度を向上させることで，pH2 におけるペプチド吸着量が増え，その結果，腸輸送特性が大きく改善することが明らかになった．

Use of porous supports as carriers for intestinal delivery of functional peptides

○Kento Imai[1], Kazunori Shimizu[1], Mitsuhiro Kamimura[2], Kouki Ogawa[2],
Hiroyuki Honda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fuji Silysia Chemical LTD.)

Key words peptide

2P-I139 *Kluyveromyces lactis* 由来 β-ガラクトシダーゼ製剤における陰イオン交換膜を用いたプロテアーゼの一段階除去

○吉川 潤, 塩田 一磨
（合同酒精・酵素医薬品研）
j-yoshikawa@oenon.jp

【目的】 産業用酵素製剤は主たる酵素活性以外に夾雑酵素が含まれることが多く，中でも生産菌由来のプロテアーゼが様々な問題を引き起こすことがある．β-ガラクトシダーゼ製剤の基原として広く用いられている *Kluyveromyces lactis* においては，ゲノム情報を参照する限りで１０種類以上のプロテアーゼが検索できる．その一つ一つに対して欠損株を取得することは現実的な方法ではなく，β-ガラクトシダーゼ製剤中のプロテアーゼを低減できる精製手法の開発が望まれていた．さらに，コストを考慮した時には可能な限り簡便であることが重要である．そこで，陰イオン交換膜を用い，通液するだけでプロテアーゼを低減可能な精製方法を開発することとした．
【方法および結果】 *Kluyveromyces lactis* 由来 β-ガラクトシダーゼ製剤として GODO-YNL（合同酒精社製）を用い，陰イオン交換膜として Qyu SpeedD（旭化成社製）を用いた．Qyu SpeedD に，0～0.4 M KCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5)で 10 倍希釈した GODO-YNL を通液した．KCl 濃度が低い時は，β-ガラクトシダーゼの収率が 30%と低値であった．一方，KCl 濃度が高い時はプロテアーゼ活性が 1/2 以下にも低下しなかった．結果としてその中間の KCl 濃度の時，β-ガラクトシダーゼの収率を 90%以上確保しつつ，プロテアーゼ活性を約 1/5 に低減することができた．次に，プロテアーゼを低減したサンプルを市販の牛乳に添加し，30℃保存で 1 ヶ月と 3 ヶ月後に SDS-PAGE に供した．その結果，過剰量に酵素サンプルを添加した時に差が現れ，精製前の GODO-YNL では乳タンパクの分解が確認されたが，精製後の YNL では乳タンパク成分の分解がきわめて少なかった．以上の結果から，β-ガラクトシダーゼ製剤中のプロテアーゼを除去する簡便な方法を開発できた．なお，本発表内容については WO2014-185364 として特許出願中である．

One-step removal of proteases in a commercial beta-galactosidase preparation from *Kluyveromyces lactis* by an anion-exchange membrane

○Jun Yoshikawa, Kazuma Shiota
(Enzyme Pharm. Laboratory, Godo shusei Co., Ltd.)

Key words *Kluyveromyces lactis*, beta-galactosidase, anion-exchange membrane, protease

2P-I140 小麦ふすま, コーンと大豆種皮の高度酵素分解

○柴田 晃, 笠井 尚哉
（阪府大院・生環科）
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

[背景] 小麦は年間 7 億トン以上生産され，その種皮である小麦ふすまは 15%にも及ぶ．当該種皮は 6 層からなり，小麦粉製粉時に生成されるほか，醤油製造時のように，小麦粒そのままが発酵原料として使用される場合には発酵物残渣の中に 30-40%容量にも及ぶ．昨年度，酵素による長時間糖化にて約 4%糖化できることを明らかにしてきたが実際的には小麦ふすまに膠着しているリグニンが酵素分解の妨害をしていると考えられ，これを簡便に取り除くことが可能であれば高度酵素分解が可能になり，バイオマス・食品素材分野において有用と考えられる．そこで本研究では比較的温和な処理によるリグニン除去と酵素による高度分解を目的として種々諸検討を行い，さらに植物の相同性から分解が可能と考えられるコーンハル(トウモロコシ種皮)や大豆の種皮についても同処理・高度酵素分解検討を行った．
[方法と結果] 小麦ふすまは，供与された小麦粉製造時に生成されるものを洗浄・脱デンプンしたものを使用した．アルカリ濃度，処理条件，温度などの諸検討を行ったところ，一定条件での希アルカリ撹拌処理を行うことで小麦ふすまの難抽出リグニン・フェルラ酸成分もよく抽出されることを見出した．本処理残渣の蛍光顕微鏡観察によりリグニンの自発蛍光は弱まり，カルコ染色によるセルロース蛍光が強まることが観察された．このことから一定条件のアルカリ撹拌処理を行うことでリグニンが簡便によく除去され，充分にセルロースが露出させられたことがわかった．続いて本アルカリ撹拌処理残渣に種々の 1%セルラーゼを加え，45℃インキュベーター内にて反応を行ったところ乾燥重量にて約 80%分解されるものも認められ，簡便な処理により飛躍的に酵素分解率が向上した．また，難分解性とされるコーンハルや大豆種皮についても同処理後 80%以上の酵素分解が確認された．

High enzymatic digestion of wheat bran, corn and soybean hull

○Akira Shibata, Naoya Kasai
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words wheat bran, cellulase, soybean, lignin

2P-N141 Phytochemical characteristics and pharmaceutical activity of ethanol extract from *Helicteres angustifolia* L. stem

○Junyi Zhu, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
Zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Helicteres angustifolia L. (Sterculiaceae) is a traditional medicinal plant in China. It has been used as a folk herbal drug to treat cancer, inflammatory, bacterial infections and diabetes, etc. Up to the present, statistics show that leaves account for the highest percentage (31％) in the plant parts used for medicinal applications, while roots occupy 5％ ranking fifth in the various plant parts. Generally, the amount and variety of bioactive secondary metabolites are different for different parts of the plant. This study aims to demonstrate the phytochemical characteristics and biological activity potential of extracts from the stem of *Helicteres angustifolia*. After being soaked in 80％ ethanol and then hot reflux for 6 hours, ethanolic extract was obtained. Phytochemical screening of the extract indicated that abundant secondary metabolites such as flavonoids, phenols and tannins were detectable. Antioxidant activity was evaluated by measuring DPPH and hydroxyl radical scavenging abilities. Antidiabetic activity was also evaluated by assaying rat intestinal maltase and sucrase inhibitory activities. Furthermore, neuroprotection potential was detected by using H_2O_2-injuried IMR32 cells model. Results show that the ethanolic extract exhibits significant antioxidant and antidiabetic activity. An obvious protection effect on human neuronal cell damage was observed as well. In conclusion, the stem of *Helicteres angustifolia* L. has potentials for development as promising natural agents for disease treatments.

Phytochemical characteristics and pharmaceutical activity of ethanol extract from *Helicteres angustifolia* L. stem

○Junyi Zhu, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Helicteres angustifolia* L, ethanol extract, antidiabetic activity, antioxidant activity

2P-N142 養液栽培法による非遺伝子組み換えの機能性ホウレンソウの作製

○渡辺 祥[1], 大谷 優太[1], 立上 陽平[1], 青木 航[1,3], 雨宮 崇[2], 助清 泰教[2], 窪川 清一[2], 植田 充美[1,3]
（[1]京大院・農, [2]三菱ケミカル (株) (旧 三菱樹脂 (株)), [3]京都バイオ計測センター）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】葉酸はビタミン B 群に属し，赤血球の産出やアミノ酸の代謝あるいは核酸（DNA や RNA）の産生に重要な機能を有している．食物に含まれる葉酸量は少量であり，推奨される葉酸量（一般成人は 400 μg/日，妊婦の場合は正常な胎児の脳の発達のため 600 μg/日が求められる）を摂取することが難しい．これまで，遺伝子工学的アプローチにより，葉酸含有量増加の試みが行われてきた．しかし，遺伝子組み換え作物の流通は厳しく制限されており，その販売は難しい．そこで本研究では，サラダホウレンソウを対象に，栽培条件の最適化によって葉酸含有量の増加を試み，評価した．
【方法】本研究では，代謝工学的研究データベースをもとにして水耕栽培用の液肥に葉酸含有量の増加が期待できる候補化合物を添加し，サラダホウレンソウの栽培を行った．葉酸系化合物の同定・定量には，高速液体クロマトグラフィーと三連四重極型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた．葉酸増加が確認された化合物に関しては異なる添加条件を設定し各種葉酸の含量の違いを調べた．
【結果】フェニルアラニンを含む液肥で栽培したホウレンソウサンプルでは，通常のサンプルと比較して最も葉酸増加が大きかった（2.0 倍）．また，これらの化合物添加が，葉酸全量と共に葉酸化合物のうち最も重要な葉酸化合物の生合成量を増加させたので，その分子機構の考察を含め，結果をまとめて報告する [1]
[1] Watanabe *et al*. submitted.

Preparation of folate - rich spinach by strategic hydroponics

○Sho Watanabe[1], Yuta Ohtani[1], Yohei Tatsukami[1], Wataru Aoki[1,3], Takashi Amemiya[2], Yasunori Sukekiyo[2], Seiichi Kubokawa[2], Mitsuyoshi Ueda[1,3]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Mitsubishi Chemical, Inc., [3]KIST-BIC)

Key words Hydroponics, Biofunctional, Spinach, Folate

2P-I143 *Lactobacillus brevis* を用いた GABA 含有デーツ残渣発酵エキスの開発

○長谷川 桃子[1,2], 越澤 大典[2], 船戸 耕一[2], 吉田 充史[1],
三本木 至宏[2]
（[1]オタフクソース・研究室, [2]広島大院・生物圏）
mhasegawa@otafuku.co.jp

【背景・目的】ナツメヤシの実であるデーツは栄養価が高く，国内においてはソースなどの原料として利用されている．デーツをソースに配合する際，ピューレ状に加工するが，皮などは繊維質で口当たりが悪いためデーツ残渣として廃棄されている．本研究では，デーツ残渣の有効活用のため，乳酸菌によって発酵させ，ＧＡＢＡを増加させた発酵エキスの開発を行った．
【方法・結果・考察】デーツ残渣を用いて GABA を作る際の最適条件を検討した．未加工のデーツ残渣に乳酸菌（*Lactobacillus brevis*）を添加してもほとんど GABA を作らなかった．そこで，デーツ残渣に水を加え，粉砕し，セルラーゼとペクチナーゼを添加して酵素分解を行った．その後，グルタミン酸ナトリウムと酢酸を添加し，乳酸菌を植え，GABA の生産を試みた．その結果，酵素やグルタミン酸の量，発酵温度，植菌量などを最適な条件にした場合，28 mM 程度の GABA の生産が見られた．
次に，発酵時のデーツ残渣中のグルタミン酸，GABA，乳酸，グルコース，pH，菌数の経時変化を測定した．その結果，時間と共にグルタミン酸及びグルコースは減少し，GABA は徐々に増加し，3～4 日目にはグルタミン酸からの変換率が 80％以上となった．また，乳酸も徐々に増加し，それに伴い pH が低下した．6 日間発酵させた後，デーツ残渣の水層部分を回収した．これを約 25% 配合した，独自配合のシロップを作り，85℃以上で 5 分間加熱し，アミノ酸分析と官能評価を行った．その結果，加熱による GABA 量の減少は無く，未発酵のデーツ残渣を配合したものより，酸味，フルーティーさが増したという評価が多かった．また，発酵による不快臭などは無く，食品として十分に使用できる GABA 含有発酵エキスができた．
【結論】デーツ残渣に乳酸菌を植え，最適条件で発酵させることで GABA 含有デーツ残渣発酵エキスを作ることができた．

Development of date residue extract containing GABA by fermentation of *Lactobacillus brevis*.

○Momoko Hasegawa[1,2], Daisuke Koshizawa[2], Kouichi Funato[2], Atsushi Yoshida[1], Yoshihiro Sambongi[2]
([1]Otafuku sauce, [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

Key words lactic acid bacteria, GABA, date, waste

2P-I144 微生物の BDF 廃液代謝における夾雑物の影響評価

○滝口 昇[1,2], 内山 佳祐[2], 川西 琢也[1,2]
（[1]金沢大・理工, [2]金沢大院・自科）
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】代替燃料として注目されているバイオディーゼル燃料(BDF)の製造過程において，15～80％のグリセロールの他，夾雑物として水，メタノール，石鹸・遊離脂肪酸，塩，そして未反応のグリセリドが含まれる廃グリセロール(BDF 廃液)が排出される．BDF 廃液の有効利用法の確立は，BDF 産業にとって急務である．微生物変換は解決法の一つとして期待されているが，問題点として BDF 廃液に含まれる夾雑が微生物に与える影響が解明されていないことがある．本研究では夾雑物中に含まれる脂肪酸に焦点を当て，BDF 廃液処理の効率化を目的として，微生物の BDF 廃液代謝における脂肪酸の影響について評価を行った．
【方法】実験にはグリセロール資化性菌 *Raoultella planticola* RK2-2 および *Serratia* sp. RK2-3 を用いた．MSB 液体培地に炭素源としてグリセロールまたは BDF 廃液を，脂肪酸の影響を評価するために適宜脂肪酸を添加して培養し，菌体，グリセロール，有機酸，脂肪酸濃度を測定した．また，BDF 廃液中の脂肪酸は脂質抽出後に重量測定を行うとともに組成を調べた．
【結果と考察】BDF 廃液において脂肪酸は 17.3 wt%，その脂肪酸中にはオレイン酸が 56.7 wt%含有していることが明らかとなった．BDF 廃液代謝において，BDF 廃液の濃度増加に比例して比増殖速度が低下するという，負の相関を得られ，オレイン酸が培地中に 0.50 wt%を超える量が存在すると増殖が阻害されることが明らかなったとなった．また，比増殖速度の低下を招く因子はオレイン酸塩，つまり石鹸であり，BDF 廃液中の石鹸が培養中に融解することで，石鹸の界面活性効果により微生物の増殖が阻害されると判断した．阻害低減のためには，酸性 pH にすることで石鹸を脂肪酸にし，BDF から除去する前処理を行うことが BDF 廃液代謝の効率化につながる方法であると考えられる．

Effect of contaminants of waste glycerol from BDF production on microbial metabolisms

○Noboru Takiguchi[1,2], Keisuke Uchiyama[2], Takuya Kawanishi[1,2]
([1]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

Key words waste glycerol, fatty acid, waste bioconversion

2P-I145 バイオディーゼル燃料生産に適した油脂生産微細藻類の単離と油脂生産能評価

○樫尾 浩貴[1], 紅谷 貴之[1], 髙 未麗[1], 松村 吉信[1,2]
（[1]関西大・化生工, [2]関西大・ORDIST）
ymatsu@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】近年，化石燃料の枯渇や地球温暖化問題が顕著する中，化石燃料に替わる持続・再生可能エネルギーへの変換が求められている．特に微細藻類を用いたオイル（バイオディーゼル）生産は，単位面積あたりの生産性が高く，食糧と競合しないなどの利点から注目を集めている．しかし，現状では生産性が低く高コストとなるため，高い油脂生産能を有した藻類の育種や高密度培養が必要となっている．そこで，本研究では河川環境から油脂生産能の高い微細藻類の単離を試みた．
【方法】大阪府と和歌山県で採取した河川環境サンプルを改変 BG-11 寒天（またはゲラムガム）培地，400μmol/m^2/s（明条件 12h, 暗条件 12h），25℃で 14 日間培養し，コロニーを単離した．細胞内の油脂の検出には脂肪染色試薬であるナイルレッドで細胞を染色し，蛍光顕微鏡観察し，油脂生産菌株を単離した．詳細な油脂成分の分析には，Bligh & Dyer 法に基づく脂質抽出後，GC 分析で確認した．
【結果】ナイルレッド染色法により油脂生産が確認された微細藻類が 131 株単離された．その中で高油脂生産能（油脂含有率約 30%）を有した株として Y2-1 株，N1-2 株，4-2 株，S242 株が単離され，特に Y2-1 株が安定した生産能を有していた．Y2-1 株細胞の脂肪酸組成を GC 分析した結果，パルミチン酸，オレイン酸，γ-リノレン酸が主成分であり，トリグリセリドとして蓄積する傾向が高いと予想された．今後，ゲノム塩基配列の解読と脂質代謝系の解明，脂質高生産培養条件の最適化を行う予定である．

Isolation of high oil-producing microalgae for biodiesel fuel production and evaluation of their oil productivities

○Hiroki Kashio[1], Takayuki Benitani[1], Miryo Kou[1], Yoshinobu Matsumura[1,2]
([1]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

Key words microalgae, biodiesel fuel, fatty acid, triglyceride

2P-I146 油脂高蓄積クラミドモナス株の選抜育種によるバイオ燃料生産「明暗周期問題」の克服

○加藤 悠一[1], 藤原 悠右[1], 小山 智己[1], 張 嘉修[2], 蓮沼 誠久[1],
近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]国立成功大・化工）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 持続可能なエネルギー政策の実現に向けて，微細藻類を用いて生産するバイオ燃料が期待を集めている．*Chlamydomonas* sp. JSC4 は光独立栄養・海水塩濃度条件において高い増殖性と油脂含有率を両立する株であり，バイオ燃料の生産者として有望である．しかし屋外における JSC4 の試験培養では，その油脂含有率が実験室内の場合と比較して大きく低下した．これまでに我々はその原因の一つが明暗周期であることを解明している．コストパフォーマンスの理由から，バイオ燃料生産のための微細藻培養は屋外で太陽光を利用して実施することが必須条件である．ゆえに，この「明暗周期問題」は微細藻バイオ燃料生産を事業化する上で必ず解決されなければならない問題である．本研究では，明暗周期問題を克服し，明暗周期下での油脂生産性を改善することを目的として，JSC4 を親株とした油脂高蓄積株の選抜育種と，獲得した株の明暗周期下における油脂蓄積メカニズムの解明を行った．
【方法】 重イオンビーム照射あるいは常温常圧プラズマ照射により，JSC4 にランダムな突然変異を導入した．変異集団を明暗周期下で培養し，BODIPY により強く染色された細胞をフローサイトメーターにより分取した．
【結果と考察】明暗周期下において JSC4 株の 2 倍を超える油脂含有率を達成する油脂高蓄積株の選抜育種に成功した．ランダムな変異導入とフローサイトメーターによる高速スクリーニングを組み合わせた選抜育種が明暗周期問題を解決する上でも有用であることが示された．獲得した油脂高蓄積株において油脂含有率が向上した原因の解明を進めており，その結果を本発表において報告する予定である．

Overcoming “the Light/Dark problem” in microalgal biofuel production by selective breeding of oil-rich *Chlamydomonas* sp. strains

○Yuichi Kato[1], Yu Fujihara[1], Tomoki Oyama[1], Jo-Shu Chang[2], Tomohisa Hasunuma[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Deprt. Chem. Eng., Natl. Cheng Kung Univ.)

Key words biodiesel fuel, microalgae, flow cytometry, light/dark cycle

2P-I147 バイオ燃料生産への利用に向けた水面浮遊性微細藻類におけるオイル生産性向上

○石塚 裕貴, 野島 大佑, 前田 義昌, 吉野 知子, 田中 剛
（農工大院・工）
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】微細藻類由来バイオ燃料の普及拡大に向け，様々な試みがなされている．特にバイオマスの回収に要するコストの削減に向けた試みは多く行われているが，未だ有効な手法は確立されていない．本研究グループでは水面浮遊性微細藻類に着目した．本微細藻類は水面上に自発的に浮上し，バイオフィルムを形成する特性を持ち，回収コスト削減に寄与出来る．これまでに 168 株の水面浮遊性微細藻類より，高い脂質生産性を有する AVFF007 株，及び FFG039 株を獲得している．本研究ではこれら二株のキャラクタリゼーション及び変異株の作出を試みた．
【方法】緑藻の培養に一般的に用いられる C 培地を基に最適化した改変 CSi 培地を用いてプラスチックケース内で静置培養を行った．PE フィルムを用いて水面上のバイオフィルムを回収し，底面の藻体は遠心分離により回収した．バイオマス重量を基に含水率を算出し，またオイル抽出を行い，オイル生産性を算出した．加えて 18S rDNA 配列に基づく系統解析を行った．続いて化学変異剤を用いて変異株の作出を試みた．MNNG 及び EMS を暴露後に，クロロフィル含有量の低下した変異株を獲得し，オイル含有量及びバイオマス生産性を算出した．
【結果と考察】分子系統解析の結果，AVFF007 株及び FFG039 株はそれぞれ *Botryosphaerella* 属及び *Chlorococcum* 属に分類された．両株において水面上のバイオマスにおける含水率は，水中のバイオマスと比較して有意に低いことが示され，回収コストだけでなく，乾燥に要するエネルギーも削減できることが示唆された．また，水面上のバイオマスにおけるオイル生産性は AVFF007 株では 1.3±0.1 g/m^2/day，FFG039 株では 1.0±0.3 g/m^2/day を示した．続いて化学変異剤を用いた結果，野生株と比較してバイオマス生産性が約 1.9 倍向上した FFG039 株由来の変異株を獲得し，オイル生産性の向上が達成された．

Improvement of oil productivity of water-surface floating microalgae toward biofuel production

○Yuki Ishizuka, Daisuke Nojima, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words water-surface floating microalgae, biofuel, chemical mutagenesis, oil productivity

2P-I148 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良

○神藤 定生 [1], 中尾 領亜 [2], 坂本 拓郎 [2], 細田 晃文 [2], 田村 廣人 [2]
（[1]名城大理工, [2]名城大農）
sjindou@meijo-u.ac.jp

脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため，我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した．すなわち，植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-l-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を，セルロソームエンジニアリングで複合体化させ，Ethylenome SOC2 とした．これを合成生物学の手法によりシアノバクテリアへ導入した結果，本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した．また，複合体の形成により 3.7 倍高いバイオエチレン合成活性を得た．さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として，われわれは Ethylenome の酵素組成の変更による以下の反応系最適化を行ってきた．具体的には，①バイオエチレン生産株 SOC3B 株を構築し，既存の SOC2 株と比較して 1.7 倍高いバイオエチレン生産量増加を示した．②バイオエチレン生産株 SOC3D2 株を構築し，既存の SOC2 株と比較して 1.9 倍のバイオエチレン生産量増加を観察した．そこで，ACS:ACO:MTAN=1:2:1 の各酵素モル比を持つ酵素複合体の生産効率を検討する事を目的として，本研究では新規の Ethylenome SOC4 を構築し，これを保持するシアノバクテリアのバイオエチレン生産効率定量し，これを報告する．

Engineering a Chimeric Complex of Plant Enzymes to Improve Photosynthetic Production of Bio-ethylene by Cyanobacterium

○Sadanari Jindou[1], Reia Nakao[2], Takuro Sakamoto[2], Hosoda Akifumi[2], Hiroto Tamura[2]
([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ.)

Key words *Synechococcus*, ethylene, cellulosome, cyanobacteria

2P-I149 微細藻類における油脂生産時の葉緑体分解

○三宅 誠人, 齊宮 史佳, 阿野 嘉孝
（愛媛大院・農）
anoy@agr.ehime-u.ac.jp

【目的】微細藻類は，光合成により二酸化炭素（CO_2）を固定してバイオ燃料となる油脂を直接生産できることから，次世代の有望なエネルギー源として期待されている．しかしながら，窒素飢餓（N－）などの高い油脂生産を示す条件では，顕著な葉緑体分解が進行し，CO_2 固定能が大幅に低下してしまう．微細藻類の利点を活かしたままエネルギー源として利用するためには，CO_2 固定能を損なわずに油脂生産能力を高めることが必要である．本研究では，微細藻類における油脂生産時の葉緑体分解機構を理解し制御することを目指して，微細藻類における油脂生産と葉緑体との関係を調査した．
【方法と結果】 *Chlamydomonas* の油脂生産に窒素飢餓センサーであるラパマイシン標的タンパク質（TOR）が関与していると想定し，窒素栄養（N ＋）条件下で Rapamycin を添加した．その結果，薬剤非添加条件に比べ，細胞内に油滴の形成が誘導されたが，その際クロロフィル量の変化は確認されなかった．一方で，N－条件下にリン脂質シグナリングの阻害剤である 3-Methyladenine および Wortmannin を添加したところ，どちらの薬剤においても薬剤非添加条件に比べ，細胞内に油滴の形成が誘導されたが，その際クロロフィル量の変化は確認されなかったことから，油脂生産と葉緑体分解はそれぞれ独立した機構で制御されていることが推測された．これらのことから，油脂生産を進行させたまま，葉緑体分解を阻害することが可能であると考えられた．現在，葉緑体分解に寄与する分子を探索しているところである．

Chloroplast degradation during lipid production in microalgae

○Makoto Miyake, Fumika Itsuki, Yoshitaka Ano
(Grad. Sch. Agric., Ehime Univ.)

Key words microalgae, lipid production, chloroplast degradation

2P-I150 *Euglena gracilis* を用いた有用物質生産

○吉岡 和政 [1], 冨田 結芙子 [2], 小山内 崇 [1,2]
（[1]明治大・農, [2]明治大院・農）
tosanai@meiji.ac.jp

【背景・目的】化石資源の有限性が問題となるなか，持続可能な物質・エネルギー生産システムを構築することが社会的な要請となっている．1 つのアプローチとして微生物を用いたバイオプロダクションが提案され，バイオ燃料，食料，プラスチック，医薬品などへの幅広い応用が期待されている．近年，「光合成の光利用効率」が高い藻類として，*Euglena* という真核微細藻類が注目されている．*Euglena* は，光合成により高濃度の二酸化炭素を吸収する能力がある．*Euglena* は二酸化炭素を取り込むことで有機酸などの様々な物質を合成し，その一次代謝産物にはバイオプラスチックの原料となる乳酸やコハク酸などが含まれる．コハク酸などのプラスチック原料となる有機酸は，主に石油などを用いて化学的に合成されている．微生物を用いた合成システムが確立されれば，化石資源の枯渇などの環境・資源の問題の解決に寄与できる技術となる．
【方法・結果】本研究では，*E. gracilis* NIES-48 株を用いて嫌気培養における代謝産物解析を行った．*E. gracilis* を CM 培地を用いて明・好気条件下で 14 日間培養した．その後，暗・嫌気条件下に移行し，3 日間培養した．効率的な有機酸生産系を確立するために，暗・嫌気条件下で様々な塩や外部炭素源を添加し，培養条件を検討した．嫌気培養後の上清を，HPLC により分析することで，細胞外の有機酸を定量した．これらの培養条件の変化により目的物質である乳酸，コハク酸生産量の向上が見込めた．

Production of useful substances using *Euglena gracilis*

○Kazumasa Yoshioka[1], Yuko Tomita[2], Takashi Osanai[1,2]
([1]Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words biomass, microalgae, anaerobic condition

2P-I151 海洋性アルギン酸分解菌叢および *Nitratireductor* sp. OM-1 株を用いた 2 段階培養によるアルギン酸からのバイオディーゼル生産

○喜多 晃久[1,3], 中井 昇太[1], 三浦 豊和[1,3], 高橋 宏和[1,3], 岡村 好子[1,3], 秋 庸裕[1,3], 松村 幸彦[2,3], 田島 誉久[1,3], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,3]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工・エネ環, [3]JST・CREST）
kita@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】 褐藻類は海洋中に豊富に存在し，第 3 世代バイオマスとして注目されている．褐藻類の主要成分であるアルギン酸は微生物に対する有望な炭素源として期待されているが，アルギン酸を炭素源とした有用物質生産に関する研究開発はまだ途上にある．アルギン酸は難分解性多糖であるため，工業的に利用されている微生物では遺伝子組み換え無しに嫌気分解することができないためである．そのような中で，我々は海洋底泥中の菌叢が，いとも簡単にアルギン酸を嫌気分解し，揮発性脂肪酸（VFAs）を生産し得ることを見出してきた．さらに，我々の研究グループでは低級有機酸資化性海洋性細菌 *Nitratireductor* sp. OM-1 株を取得し，VFAs からバイオディーゼルを生産することに成功している．そこで，本研究ではリアクター培養に適した海洋性アルギン酸分解菌叢を馴養し，その菌叢解析を行うとともに，*Nitratireductor* sp. OM-1 株との 2 段階培養によるアルギン酸からのバイオディーゼル生産を試みた．【方法・結果】有明海および広島湾由来の底泥をアルギン酸培地（3% NaCl）に摂取し，30℃および 37℃で嫌気的に継代培養（10%植菌）を行った．5 世代継代培養後，アルギン酸からの VFAs 生産収率が高い海洋性アルギン酸分解菌叢を取得した．本菌叢は，通性嫌気性を示し，リアクター培養にも適していることが明らかとなった．菌叢解析の結果，本菌叢は主に *Photobacterium* 属，*Mangrovibaterium* 属および *Petrimonas* 属細菌の近縁種で構成されていた．そこで，リアクターを用いて本菌叢を高密度培養し，アルギン酸から VFAs を生産した．次いで，高密度培養した OM-1 株を接種することによる 2 段階培養により，遺伝子組み換えを伴わずに，アルギン酸からバイオディーゼルを生産することに成功した．

Production of biodiesel from alginate by two step cultivation using marine microbial consortium and *Nitratireductor* sp. OM-1

○Akihisa Kita[1,3], Shota Nakai[1], Toyokazu Miura[1,3], Hirokazu Takahashi[1,3], Yoshiko Okamura[1,3], Tsunehiro Aki[1,3], Yukihiko Matsumura[2,3], Takahisa Tajima[1,3], Junichi Kato[1], Yutaka Nakasimada[1,3]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Div. Ener. Environ., Inst. Eng. Hiroshima Univ, [3]CREST, JST)

Key words alginate, biodiesel fuel, volatile fatty acids, microbial consortium

2P-I152 食物残渣の短鎖および中鎖脂肪酸生産への利用可能性評価

○張 脩喆, 林 悟, 矢島 由佳, モタカトラ レッディー
（室工大院・工・環境創生）
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景及び目的】
中鎖脂肪酸生産プロセスにおいて最も重要な鎖伸長は，細菌がエタノールを用い短鎖脂肪酸（SCFA）を中鎖脂肪酸（MCFA）に変換するプロセスである．MCFA は，飽和モノカルボン酸であり，抗菌剤，腐食防止剤，バイオディーゼルの前駆体，およびバイオプラスチック製造に用いられている．一方，バイオマスを原料とした嫌気反応による中鎖脂肪酸の生産が試みられているが，日本では未だ適用例がない．従って本研究では，食物残渣を原料とした中鎖脂肪酸の生産可能性を評価し，さらに生産に用いた嫌気混合培養液中の微生物群叢を明らかにすることを目的とする．
【方法及び結果】本研究で用いた混合培養菌は，岐阜市の終末処理場の活性汚泥を当研究室で短鎖脂肪酸とエタノールを基質とし集積培養を行い，中鎖脂肪酸の生産に適した微生物群集に選択圧をかけたものである．培養は嫌気条件で，対照系（細菌添加無し），純粋培養（*Clostridium kluyveri*）のみ，混合集積培養のみ，混合集積培養液に *Clostridium kluyveri* 株を加えた条件（計 4 種類）で 91 日間行った．その後，経時的にカプロン酸，ヘプタン酸，カプリル酸およびデカン酸を分析した．その結果，*Clostridium kluyveri* 株を添加した集積培養液は，他の条件よりも高い SCFA（8.9 g/L, 酪酸）および MCFA（8.1 g/L, カプロン酸）値を示した．また，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）の結果，混合集積培養液を構成する微生物群叢は，*Anaerobaculum mobile* DSM 13181，*Actinomyces naturae*，*Bacterium* NLAE-zl-P257，*Bacteroides fragilis* NCTC 9343，*Clostridium thiosulfatireducens* strain MCM B 556 など 13 種類の嫌気微生物であることが示唆された．近年，MCFA の中でも炭素鎖を 8 個もつカプリル酸は認知症の予防効果も期待されており，今後その利用可能性について検討していく予定である．

The availability evaluation of food waste for short chain and medium chain fatty acids production

○Young-Cheol Chang, Satoru Hayashi, Yuka Yajima, Venkateswar Reddy M.
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words MCFA, Medium chain fatty acids, Food waste, Anaerobic cultivation

2P-I153 高分子ゲル封入培養法による微細藻類の細胞凝集体形成と増殖・脂質蓄積速度の促進

○吉冨 徹[1], 神永 紗英子[1], 豊島 正和[1,2], 佐藤 直樹[1,2], 真崎 康博[3], 吉本 敬太郎[1,4]
（[1]東大院・総合文化, [2]JST・CREST, [3]北里大・理, [4]JST・さきがけ）
t_yoshitomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】 近年，微細藻類を用いた物質生産技術は，バイオ燃料，医薬品，食料，プラスチック等の幅広い応用が期待されている．これらの応用技術を実用化するうえで，微細藻類の大規模培養や物質の産生効率を高めることが必要不可欠である．近年，微細藻類の野外大規模培養が検討されているものの，細胞の回収に手間とコストがかかるだけでなく，異種微生物の繁殖が起きるなどの問題がある．そこで，本研究では，高分子ゲルに微細藻類細胞を封入する培養法に着目した．微細藻類を高分子ゲルに封入することで，回収が容易になるだけでなく，外部からの微生物の侵入を防ぐことができる．本発表では，アルギン酸ゲル内に封入した微細藻類 Chlamydomonas debaryana (C. debaryana) の増殖能および脂質蓄積能について報告する．
【結果と考察】 アルギン酸ゲルビーズ内に C. debaryana を封入した後，光独立条件下で培養した．細胞増殖速度を通常培養と比較したところ，ゲルに封入することにより増殖速度が促進することを確認した．またゲル内の細胞を顕微鏡を用いて観察したところ，球状の細胞凝集体を形成していることが明らかとなった．さらに中性脂質染色試薬 BODIPY を用いて同凝集体を形成する細胞内脂質を染色したところ，アルギン酸ゲル封入培養法により脂質の蓄積速度が促進することが分かった．以上の結果から，アルギン酸ゲル封入培養法は，C. debaryana の増殖および脂質蓄積速度を促進させ，物質の産生効率を高める培養法であることが示された．

Accelerated cell growth and lipid accumulation of microalgae by forming spherical aggregation in alginate hydrogels

○Toru Yoshitomi[1], Saeko Kaminaga[1], Masakazu Toyoshima[1,2], Naoki Sato[1,2], Yasuhiro Mazaki[3], Keitaro Yoshimoto[1,4]
([1]Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo, [2]CREST, JST, [3]Dept. Chem, Kitasato Univ., [4]PRESTO, JST)

Key words microalgae, alginate, biodiesel fuel, aggregation

2P-I154 二相培養による糸状性シアノバクテリアからの有用物質の生産と抽出

○青木 仁一[1], 川又 透[1], 小高 明日香[1], 皆川 真之[1], 岡田 克彦[2], 今村 信和[2], 都筑 幹夫[2], 朝山 宗彦[1]
（[1]茨城大・農, [2]東薬大・生命科）
munehiko.asayama.777@vc.ibaraki.ac.jp

【背景と目的】 微細藻類の光合成による高い炭酸固定能を利用した有用物質生産は，カーボンニュートラルの観点からも重要である．本研究では，有用物質生産に必要不可欠な藻類高効率培養装置の開発および有用物質の生産と抽出を目的とした．
【方法】 液体培養の液量を減らすため，固相表面と液体中の 2 形態で培養する「二相培養システム」 を試験した．まず未滅菌 BG11 液体培地を沁み込ませた綿布 (固相) 上に，自己溶菌を特徴とする糸状性シアノバクテリア *Pseudanabena* sp. ABRG5-3 株培養液を種付けした．綿布上で生育した 5-3 株細胞の一部を培養液とともに流出させ，その細胞を液相としても培養した．更に，この培養液を再び固相支持体へ循環させることによる連続培養システムを構築した．人工光照射による屋内閉鎖 （IC） 系及び自然光を用いた屋内半開放 (IO) 系において本システムから収穫された藻乾燥重量 (DCW-g) を固相支持体の単位面積当たりに換算し，二相から得られるバイオマスの総和を測定した．一方，IC 系「固相」で藻が付着した支持体を乾燥させ，それを直接燃やす燃焼実験を行った．また IC 系 「液相」で生育した培養液より 5-3 株細胞を回収し，アルカンを抽出した後，これを GC-MS 分析に供した．
【結果と考察】 本システムによるバイオマス生産量は，IC/IO 各々の系で 1.73 並びに 1.46 DCW-g/m^2/day となり，これらは従来知られている屋外池培養の生産量と比較しても良好な値であった．一方，「固相」支持体の燃焼実験では，コントロール (藻未付着布) と比較して長時間燃え続ける傾向にあった．更に，「液相」培養液由来の 5-3 株細胞より抽出したアルカンの主成分は，ヘプタデカン ($C_{17}H_{36}$) であることを確認した．以上，二相培養システムによる糸状性シアノバクテリアからの有用物質生産と抽出の利点並びに課題について考察する．

Production and extraction of useful substances from filamentous cyanobacteria grown in dual-phase cultivation system

○Jinichi Aoki[1], Toru Kawamata[1], Asuka Kodaka[1], Masayuki Minakawa[1], Katsuhiko Okada[2], Nobukazu Imamura[2], Mikio Tsuzuki[2], Munehiko Asayama[1]
([1]Agric. Ibaraki Univ., [2]Life Sci., Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

Key words alkane, biofuel, cyanobacteria, *Pseudanabaena*

2P-I155 *Cyanidioschyzon merolae* からフィコシアニン抽出を促進する溶液の開発

○丹羽 杏奈, 澤井 歩, 小山内 崇
（明治大・農）
tosanai@meiji.ac.jp

Cyanidioschyzon merolae（通称：シゾン）は，イタリアの温泉に生息する単細胞性の紅藻である．シゾンは，高温酸性の環境で生育し，至適温度は 42℃，至適 pH は 2.5 である．フィコシアニンは，フィコシアノビリン（色素）を結合したタンパク質で，吸収波長は 618 nm 付近で青色を呈し，そのタンパク質が変性することで退色する．フィコシアニンは，鮮やかな青色が特徴的で，工業生産されている天然色素である．現在，アイスやチョコレートなど多くの食品に用いられているフィコシアニンは藍藻のスピルリナ由来であるが，酸や熱に弱く，殺菌工程で退色するなどの課題があり，使用できる品目が限られている．これまでの我々の研究により，シゾンのフィコシアニンは耐酸・耐熱性に優れていることが明らかになっている．そこで，シゾンフィコシアニンを効率的に細胞から溶媒中に抽出する溶液の検討を行った．その結果，溶液の陽イオンの種類を変えることで細胞からの抽出効率が変化することが明らかになった．また，抽出のされ方が価数により異なることから，価数による性質の違いが影響していると考えている．

Development of solution promoting phycocyanin extraction from *Cyanidioschyzon merolae*

○Anna Niwa, Ayumi Sawai, Takashi Osanai
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words pigment

2P-N156 スギ改質リグニン抽出残渣からの並行複発酵による乳酸製造

○池 正和[1], Guan Di[1], 山岸 賢治[1], 荒井 隆益[2], 小杉 昭彦[2], 徳安 健[1]
（[1]農研機構・食品研, [2]国際農研セ）
mikegogo@affrc.go.jp

地域資源の有効活用や地域活性化の観点から，農山村におけるバイオマス資源の有効利用技術開発研究が活発化している．森総研を代表機関とする研究コンソーシアムでは，スギなどの木質バイオマス資源からの改質リグニン製造を軸とする，新産業創出を目指した技術開発を行っている[1]．その中で我々は，リグニン抽出過程で副生する固形分残渣（パルプ画分）を用いた乳酸や乳酸オリゴマーの製造技術開発及びこれらの農業資材としての用途開発を進めており，単行複発酵によるパルプ画分からの高濃度乳酸製造技術については既に報告している[2]．本研究では，乳酸製造工程の更なる効率化を目指し，並行複発酵による乳酸製造技術の高度化を目的とした．
スギの改質リグニン抽出後に副生したパルプ画分を原料として用い，水，栄養成分，$CaCO_3$，市販セルラーゼ製剤（*Trichoderma reesei* 由来，12 FPU/g-原料）を添加し，50℃で 6 時間予備糖化を行った．次いで，乳酸発酵菌として *Bacillus coagulans* 169 株を接種（最終的な固形分濃度は 10%(w/w)）し，50℃で 12 日間，並行複発酵による乳酸生産を行った．その結果，5.0%(w/v)の乳酸（理論収率に対して約 65%）が得られ，原料糖化率は 85-90%程度と推察された．現在，並行複発酵工程における問題点の抽出と乳酸生産効率の改善に取り組んでおり，本発表では，これらの検討結果等も併せて報告する．
尚，本研究は，戦略的イノベーション創造プログラム（次世代農林水産業創造技術）「地域のリグニン資源が先導するバイオマス利用システムの技術革新」により実施されたものである．
1) http://lignin.ffpri.affrc.go.jp/project/
2) 荒井ら，第 68 回日本生物工学会大会講演要旨集 p. 249

Production of lactic acid from the pulp fraction of glycol-lignin-extracted Japanese cedar in simultaneous saccharification and fermentation

○Masakazu Ike[1], Di Guan[1], Kenji Yamagishi[1], Takamitsu Arai[2], Akihiko Kosugi[2], Ken Tokuyasu[1]
([1]NFRI, NARO, [2]JIRCAS)

Key words *Bacillus coagulans*, lactic acid, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), lignocellulosic materials

2P-N157 Utilization of rice straw to L-lactic acid in open fermentation using thermophilic lactic acid bacterium

○Jiaming Tan[1], Mohamed Ali ABDEL-RAHMAN[1,2], Yukihiro Tashiro[1], Takeshi Zendo[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,3]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., Japan, [2]Fac.Sci., Al-Azhar Univ., Egypt, [3]Bio-Arch., Kyushu Univ., Japan)
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

Effective utilization of rice straw (RS) is hampered by the carbon catabolite repression (CCR) of mixed sugars and byproducts. We recently reported a thermophilic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium* QU 50, that could use mixed glucose/cellobiose/xylose simultaneously without CCR and byproducts under open condition.(1) Here, we report open separate hydrolysis and fermentations for LA production from RS by strain QU 50. Acid-pretreated RS (90.9 g-dry mass/L) was hydrolyzed by cellulase (incomplete hydrolysis) or mixed cellulase/cellobiose (complete hydrolysis) that resulted in mixed glucose/cellobiose/xylose/arabinose at 5.11/6.29/13.1/1.69 g/L and 22.4/0.0/15.6/2.12 g/L, respectively. Open batch and fed-batch cultures of undetoxified rice straw hydrolysate (RSH) were conducted. Homo $_L$-LA of 25 g/L and 41 g/L were produced from incomplete RSH without CCR and complete RSH with relaxed CCR, respectively with high yield (LA/sugars) of approx.1 g/g. This equivalent to the yield (LA/RS) of approx. 330 g/kg and 570 g/kg using incomplete and complete RSH, respectively. The incomplete RSH showed several advantages over complete RSH, such as low-cost enzyme consumption of only cellulase, avoiding CCR due to contained cellobiose and low titer of glucose, and potentiality of enhancing sugars titers in repeated hydrolysis by immobilized cellulase on RS. Thus, enhancing sugar conversion and open simultaneous saccharification and fermentation with incomplete RSH will be investigated.
(1)RSC Adv., 2017; 7: 24233-24241

Utilization of rice straw to L-lactic acid in open fermentation using thermophilic lactic acid bacterium

○Jiaming Tan[1], Mohamed Ali ABDEL-RAHMAN[1,2], Yukihiro Tashiro[1], Takeshi Zendo[1], Kenji Sakai[1], Kenji Sonomoto[1,3]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., Japan, [2]Fac.Sci., Al-Azhar Univ., Egypt, [3]Bio-Arch., Kyushu Univ., Japan)

Key words *Enterococcus*, homo-lactic acid, rice straw, carbon catabolite repression

2P-I158 白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株による乳酸産生に適した lactate dehydrogenase 遺伝子の探索

○加古 博子[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院）
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【目的】持続可能型社会の実現あるいは地球温暖化対策に向けた取り組みの一つとしてバイオマス由来プラスチックに関する研究が盛んに行われている．バイオマス由来プラスチックの一つとしてポリ乳酸があるが，前処理技術や製造コストなどの問題から木質バイオマスを原料とした実用化には至っていない．一方で，白色腐朽菌は木質バイオマスの低コスト前処理法として期待される微生物である．本実験では白色腐朽菌に種々の微生物由来乳酸デヒドロゲナーゼ（*ldh*）を導入して乳酸産生能を付与した際の，*ldh* の由来やコドン使用頻度の最適化が乳酸産生量に与える影響を調査した．
【方法・結果】ハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカー遺伝子として各菌種由来の L-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子をそれぞれ共形質転換し，白色腐朽菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の乳酸産生株を作出することにした．宿主として *P. sordida* YK-624 株のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子欠損株（Δ*pdc* 株）を用いた．本検討で用いた *ldh* は，*Bifidobacterium longum*，*Lactobacillus plantarum*，*Lactobacillus casei* および *Rhizopus oryzae* から取得した．また，*B. longum* 由来 *ldh* のみ供試菌と同族である *P. chrysosporium* のコドン使用頻度に基づきコドン最適化し（*Blldh*），他の菌種由来 *ldh* は野生型（*Lpldh*，*Lcldh*，*Roldh*）を使用した．これらの全ての *ldh* 導入株で，低収率ながら乳酸を産生可能であった．乳酸産生量は，各野生型 *ldh* 導入株で乳酸産生量は同程度であったが，*Blldh* 導入株では大幅に高い値を示した．この結果から，白色腐朽菌による乳酸産生には，*ldh* 種よりもコドン最適化が重要である事が示唆された．現在，*Lpldh* をコドン最適化し，Δ*pdc* 株に導入して乳酸産生量の変化を検討している．

Selection of suitable lactate dehydrogenase genes for the lactate production by white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○Hiroko Kako[1], Toshio Mori[1], Hirokazu Kawagishi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words *Phanerochaete sordida* YK-624, lactate production, lactate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase

2P-I159 組換え大腸菌による新規モノマー組成からなる乳酸ベースポリマーの生合成

○後藤 早希[1], 外村 彩夏[2], 田口 精一[3], 松本 謙一郎[4], 阿部 英喜[5], 田中 賢二[6], 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]東農大・生命科学, [4]北大院・工, [5]理研-CSRS, [6]近大・産理工)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】環境低負荷な微生物合成系のポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生合成システムを利用したポリ乳酸（PLA）様物質の合成が報告されている[1]．本研究では，さまざまな物性をもつ PLA 様物質を合成するため，モノマー組成比を変化させることにより，新規の乳酸ベースポリマーを生合成することを目的とした．
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1(STQK)*）を始め，乳酸（LA）ユニット，3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニット，さらには，中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを供給する酵素遺伝子を大腸菌 LS5218 株に導入し，グルコースを唯一の炭素源として培養した．その結果，組換え株は P(19.7% LA-*co*-74.9% 3HB-*co*-5.4% 3HA)を 2.9 wt%合成した．このポリエステルの重量平均分子量は 31.7 万，数平均分子量は 5.3 万であった．このようなモノマー組成からなる共重合体はこれまでに報告がなく，今回，新規乳酸ベースポリマーが生合成された．また，LA および 3HA ユニットを供給する酵素遺伝子と *phaC1(STQK)* 遺伝子を大腸菌 CAG18497 に導入すると新規共重合ポリエステル P(58.6% LA-*co*-41.4% 3HA)を 3.2 wt%合成した．このことから，PhaC1(STQK)は(*R*)-3HB-CoA 非共存下であっても(*R*)-3HA-CoA 共存下で D-LA-CoA を重合できることがわかり，PhaC1(STQK) の新たな知見が得られた．今後，このポリエステルを抽出・精製し，性質について評価する．

1)Taguchi, S. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008)

Biosynthesis of biodegradable lactate-based polymers with novel monomer compositions in recombinant strains of *Escherichia coli*

○Saki Goto[1], Ayaka Hokamura[2], Seiichi Taguchi[3], Ken'ichiro Matsumoto[4], Hideki Abe[5], Kenji Tanaka[6], Hiromi Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Tokyo Univ. Agric., [4]Hokkaido Univ., [5]RIKEN, [6]Kindai Univ.)

Key words biodegradable plastic, biodegradable polymer, polyhydroxyalkanoate, PHA

2P-I160 組換え微生物による生分解性共重合ポリエステルの生合成

○森 恵美[1], 倉富 優季[1], 後藤 早希[1], 脇田 和[2], 外村 彩夏[2], 阿部 英喜[3], 田中 賢二[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]理研-CSRS, [4]近畿大・産理工)
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】微生物が合成・蓄積するポリ-3-ヒドロキシブタン酸（P(3HB)）は硬くて脆いが，3HB と炭素数 6～12 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）との共重合体である P(3HB-*co*-3HA)は柔軟性があり丈夫である．そこで，PHA 生合成関連酵素遺伝子を導入したさまざまな組換え株を作製し，実用的な P(3HB-*co*-3HA) を合成することを目的とした．
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*）を有するプラスミド pJASc22 と 脂肪酸合成経路からの 3HA ユニット供給系酵素遺伝子を有するプラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)を *Ralstoniaeutropha* H16 の PHA 重合酵素遺伝子破壊株（H16dC）に導入した組換え株は，フルクトースを唯一の炭素源として P(3HB-*co*-6.2% 3HA)を合成した．さらに，*phaC1* 遺伝子と 3HB ユニット供給系酵素遺伝子 *phbAB* を *Pseudomonas* sp. 61-3 あるいは/および *R. eutropha* のプロモーターで発現させる pJKSc46-*pha*，pJBB49-*phb* および pJKSc54-*phab* を pRTcAA-GMCL(Pa)を保持する *R. eutropha* H16dC にそれぞれ導入した．pJBB49-*phb*（P_{Re}, *phaC1*, *phbAB*）をさらに導入した株は合成された PHA の蓄積率が高くなり（15.2 wt%），pJKSc54-*phab*（P_{Ps}, *phaC1*, P_{Re}, *phbAB*）導入株は合成されたポリエステル鎖中の 3HA 分率が高くなった（9.8 mol%）．現在，物性の優れた P(3HB-*co*-3HA)の合成と蓄積率の向上，さらには，他のモノマーユニットを取り込んだ共重合ポリエステルの合成を目指し，微生物の分子育種を進めている．

Biosynthesis of biodegradable copolymers by recombinant bacteria

○Megumi Mori[1], Yuki Kuradomi[1], Saki Goto[1], Izumi Wakida[2], Ayaka Hokamura[2], Hideki Abe[3], Kenji Tanaka[4], Hiromi Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]RIKEN-CSRS, [4]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ.)

Key words PHA, polyhydroxyalkanoate, biodegradable plastic

2P-N161 CO_2 からの共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HHx)生合成と PhaJAc 遺伝子の導入効果

○森 舜也[1], 丸尾 浩希[1], 折田 和泉[2], 福居 俊昭[2], 田中 賢二[1]
([1]近大院・産理工・生還化, [2]東工大院・生命理工)
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】
3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と炭素数 6－12 の 3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)からなる共重合体のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は，ホモポリエステル PHA に較べ柔軟性に優れている．福居らは，水素酸化細菌 *Ralstonia eutropha* を用いてフルクトースから 3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)を高含有率で含む P(3HB-*co*-3HHx)を生合成する遺伝子組換え株の作製に成功した[1]．本研究では，本菌の独立栄養条件下での CO_2 からの共重合ポリエステルの生合成について検証し，新たに好ましいポリマー物性を与える 3HHx 分率 10-20mol%のポリエステルを生合成する組換え株の取得を目指した．
【実験】
R.eutropha の PHA 生合成系に種々の改変を加えた MF01/pBPP-ccrJ4a-emd (MF01/J4a 株) とその phaB1 欠損株である MF01ΔB1/ pBPP-ccrJ4a-emd (MF01ΔB1/J4a 株)の 2 種類の組換え株を，混合基質ガス $H_2/O_2/CO_2$ = 8：1：1 と無機塩合成培地を用いてフラスコ培養した．
【結果】
MF01ΔB1/J4a 株では，40mol%を超える驚異的に高いモル分率で 3HHx を含む P(3HB-*co*-3HHx)を高含有率で菌体内に蓄積していた．3HHx モル分率が高すぎたため，(*R*)-エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子のうち基質炭素数が増加するほど高い活性を示す *phaJ4a* の代わりに短鎖長(*R*)-3HA-CoA に高い活性を示す *phaJAc* を導入した MF01/JAc 株と MF01ΔB1/JAc 株を作製した．結果として，*phaJAc* 導入により 3HHx のモル分率が減少し，MF01/JAc 株では 3HHx モル分率を 10mol%程度に抑えることができた．

1) C.Insomphun,H.Xie,J.Mifune,Y.Kawashima,I.Orita,S.Nakamura,T.Fukui, *Metabolic Engineering*,27,38-45,2015

Effect of introducing of PhaJAc gene on biosynthesis of P(3HB-*co*-3HHx) from CO_2 in the engineered strain of *R.eutropha*

○Shunya Mori[1], Kouki Maruo[1], Izumi Orita[2], Toshiaki Fukui[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Grad.Sch.Humanity-Oriented Sci.&Eng.,Kindai Univ, [2]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words *Ralstonia eutropha*, P(3HB-*co*-3HHx), hydrogen-oxidizing bacteria, CO_2 fixation

2P-I162 Lactyl-CoA 重合における乳酸重合酵素の反応機構解析

○飯島 翠[1], 松本 謙一郎[1,2], 堀 千明[1,2], 田口 精一[1,2,3], 大井 俊彦[1,2]
([1]北大院・工, [2]CREST-JST, [3]東農大・生命科)
mken@eng.hokudai.ac.jp

【背景と目的】乳酸重合酵素(LPE)は，当研究室で人工進化により創出されたポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素の改変体であり，モノマーとなる Lactyl-CoA(LA-CoA)供給酵素と共に大腸菌などで発現させると，非天然ポリエステルである乳酸ポリマーを細胞内に合成する特殊な性質を有する．乳酸ポリマーは天然型 PHA とは異なり透明性などの有用な物性を示すことから，バイオベースプラスチックの一つとして期待できる．これまでに組換え大腸菌の培養結果等から，LPE が乳酸ポリマーの合成量・モノマー組成を決定する重要な因子であることが示唆されていた．しかし，LPE の LA-CoA 重合活性については，主にポリマー生産量を指標とした間接的な方法で評価され，生化学的な定量解析は行われていなかった．そこで本研究では，LPE の LA-CoA に対する活性と反応生成物について，*in vitro* 系を用いて解析することを目的とした．
【実験方法と結果】組換え大腸菌を用いて LPE の Histag 融合タンパク質を発現させ，アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製タンパク質を調製した．LA-CoA と 3-hydroxybutyryl-CoA(3HB-CoA)は酵素法により合成した．天然の基質モノマーである 3HB-CoA を比較対象とし，LA-CoA に対する LPE の反応速度を測定した．調整した酵素と基質を作用させたところ，基質が経時的に消費され，反応後の溶液から消費された基質量とほぼ同程度の重合物が検出されたため，重合反応が進行したと考えられた．この際，LA-CoA と 3HB-CoA の消費速度に大きな差は見られなかった．このことから，LPE は非天然基質である LA-CoA と，天然基質である 3HB-CoA と同程度の速度で反応することが示された．

Mechanism analysis of enzymatic polymerization of lactyl-CoA

○Midori Iijima[1], Ken'ichiro Matsumoto[1,2], Chiaki Hori[1,2], Seiichi Taguchi[1,2,3], Toshihiko Ooi[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]CREST-JST, [3]Fac. Lifesci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words PHA, PHA synthase, poly(lactide)

2P-I163 *Aeromonas caviae* 由来ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の C 末端改変とポリマー生産性向上

○廣江 綾香[1], 田口 精一[1], 柘植 丈治[2]
（[1]東農大, [2]東工大）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景・目的】*Aeromonas caviae* 由来のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素 $PhaC_{Ac}$ は PHA の工業生産で利用されている重要な酵素である．一方，$PhaC_{Ac}$ を大腸菌に導入した際，そのポリマー蓄積は低い傾向にある．今回，この低生産の理由として，$PhaC_{Ac}$ の C 末端アミノ酸配列に着目した．$PhaC_{Ac}$ の C 末端には AA(アラニン-アラニン)の配列があるが, AA 配列はプロテアーゼ ClpXP の認識に非常に重要であることがわかっている．つまり，$PhaC_{Ac}$ がプロテアーゼによる分解を受けている可能性を考えた．そこで，本研究では，$PhaC_{Ac}$ の C 末端配列 AA を AD に変更することで，プロテアーゼによる認識を弱め，最終的にポリマーの高生産へとつなげることを目的とした．
【実験】PHA の合成には，大腸菌 JM109 株及び DH5α 株を用いた．PHA 合成経路を構築するため，各大腸菌に 3 遺伝子($phaC_{Ac}$ の野生型 or C 末端改変型, $phaA_{Re}$, $phaB_{Re}$)を導入し，LB 培地で 3 日間培養した．このとき，ポリマー炭素源として，グルコースを加えた．ポリマーの生産量及び組成は，ガスクロマトグラフィーにて決定した．
【結果・考察】$PhaC_{Ac}$ の C 末端アミノ酸を A→D に変更することにより，ポリマー生産量が 2～10 倍程度増加する結果を得た．このことは，アミノ酸の置換が，酵素の分解を抑え，ポリマー生産量を増加させた可能性を示唆している．

Enhancement of polymer production by C-terminal alternation of polyhydroxyalkanoate synthase from *Aeromonas caviae*

○Ayaka Hiroe[1], Seiichi Taguchi[1], Takeharu Tsuge[2]
([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, C-terminal alternation, PHA synthase, *Aeromonas caviae*

2P-N164 転写因子欠失株を用いた乳酸ベースポリマー生産大腸菌のリモデリング

○門屋 亨介[1,2], 児玉 悠[3], 松本 謙一郎[2,3], 大井 俊彦[2,3], 田口 精一[1,2]
（[1]東京農業大学・生命科・生化, [2]JST・CREST, [3]北大院・工）
st206172@nodai.ac.jp

当研究室では，再生可能なバイオマスからワンポットで微生物合成可能な乳酸ベースポリマーの創製に取り組んでいる．宿主である大腸菌にポリマー生合成酵素を導入し生合成しており，ポリマー生産量を向上させるために関連酵素の活性増強や代謝フラックスの改変に注力してきた．
大腸菌自身の改良を行った結果，生産経路に直接関与しないにも関わらず生産性を向上させる遺伝子（*mtgA*）を発見した[1]．この結果は，ポリマー合成に正の影響をもたらす変異が複数存在することを示唆し，これらを顕在化して利活用することはポリマー微生物合成の新しい戦略になると考えられる．
大腸菌には約 4000 の遺伝子が存在するので，それらを網羅的に解析していくことは現実的ではない．そこで，転写因子に着目した．一つの転写因子は複数の遺伝子発現制御を行っている．全ての転写因子変異株でポリマー生産量解析を行うことで，ほぼすべての遺伝子のポリマー生産への影響を網羅的に解析できると考えた. 大腸菌遺伝子データベースより転写に関わる遺伝子群の検索を行った結果，312 存在した．一遺伝子欠失株コレクション（KEIO コレクション）から該当株を選抜後，乳酸ポリマー合成経路を付加する．これらの株と野生株を 20g/L グルコース存在下の LB 培地で 30°C，48 時間培養し，ポリマー生産量を HPLC で測定した結果，9 株で生産量が増加していた．これら菌株ではグルコースを完全に消費していた．そこで，グルコース濃度を 30g/L に上げたところ，さらに生産量が増加し，最も生産量が高い株は，野生株と比較し 2 倍増加した[2].
1: Ryosuke Kadoya *et al*. PLoS One 2015
2: Ryosuke Kadoya *et al*. JBB 2017

Rearrangement of polymer production *E. coli* by TF deletion

○Ryosuke Kadoya[1,2], Yu Kodama[3], Ken'ichiro Matsumoto[2,3], Toshihiko Ooi[2,3], Seiichi Taguchi[1,2]
([1]Tokyo Univ. of Agricul., [2]CREST, JST, [3]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words biobased plastic, *Escherichia coli*, transcriptional factor

2P-I165 ポリ（乳酸-*co*-3-ヒドロキシ酪酸）フィルムの柔軟性に及ぼす結晶性と熱物性の影響

○石井 大輔[1,3,5,6], 滝沢 憲治[2,4], 松本 謙一郎[2,5], 大井 俊彦[2,5], 引間 孝明[6], 高田 昌樹[6], 岩田 忠久[3,5,6], 田口 精一[1,2,6]
（[1]東農大・生命科, [2]北大院・工, [3]東大院・農生科, [4]東京家政大, [5]JST-CREST, [6]理研・播磨研）
di206176@nodai.ac.jp

[研究背景] 既存バイオプラスチックであるポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブチレート](P(3HB)) やポリ乳酸は，いずれも高い結晶性に起因する剛性を示す一方，環境中での分解挙動や生体吸収性には大きな違いがある．両者の相溶化によりこれらの挙動を段階的に制御したプラスチック材料の開発が期待されるが，溶剤キャストや熱混練による相溶化は不可能であった．近年，両者の共重合体であるポリ（乳酸-*co*-3-ヒドロキシ酪酸）(P(LA-*co*-3HB)) の糖類を炭素源とする微生物合成が可能となり 1)，新規バイオプラスチックとしての利用の拡大が期待されている．本発表では，ポリ（乳酸-*co*-3-ヒドロキシ酪酸）のフィルム物性において，結晶性と熱物性が及ぼす影響の検討結果を報告する．
[方法・結果及び考察] P(LA-*co*-3HB)はグルコースおよびキシロースを炭素源として組換え大腸菌により微生物合成されたものを用い，クロロホルム溶液からキャスト製膜によりフィルムを作製した．LA 分率 20 mol%以上の P(LA-*co*-3HB) はいずれも 100%を超える高い伸びを示し，32 mol%のもので約 400%という高い伸びを示した．これは最も汎用の石油由来プラスチックであるポリプロピレンに匹敵する値である．大型放射光施設（SPring-8，BL45XU）における広角 X 線回折測定によりキャストフィルムの結晶構造解析および結晶化度算出を行ったところ，3HB ユニットが主に結晶化しており，LA 分率の増大とともに結晶化度が低下したことから，伸び性の増大が 3HB ユニットの結晶性の低下によることが明らかとなった．また P(LA-co-3HB)は室温付近にガラス転移温度を有することで，長期保存後（5 ヶ月経過後）も高い伸び性を保持することが明らかとなった．
1) 松本謙一郎，田口精一，生物工学会誌 90, 411-414 (2012)

Effect of crystallinity and thermal properties on the flexibility of P(LA-*co*-3HB) film

○Daisuke Ishii[1,3,5,6], Kenji Takisawa[2,4], Ken'ichiro Matsumoto[2,5], Toshihiko Ooi[2,5], Takaaki Hikima[6], Masaki Takata[6], Tadahisa Iwata[3,5,6], Seiichi Taguchi[1,2,6]
([1]Tokyo Univ. Agr., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [4]Tokyo Kasei Univ., [5]JST-CREST, [6]RIKEN)

Key words biodegradable plastic, biomass

2P-I166 異なる焼成温度で作製した $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ 光触媒の太陽光下における水分解活性の比較

○永井 大地, 祝 キ, 劉 ナ, 楊 英男
（筑波大院・生命環境）
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

近年の化石燃料の枯渇に伴うエネルギー需要の増加などの問題解決のために，水素が新エネルギーとして注目されており，低コストかつ環境に無害な水素生産法として光触媒を用いた太陽光による水分解が盛んに研究されている．しかし，従来の二酸化チタン光触媒は紫外光以下の波長の光を吸収し反応を起こすため，可視光が大半を占める太陽光下で活性を持たない．こうした欠点を改善するために当研究室で開発された $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ 光触媒は二酸化チタンにリン酸銀や酸化銀をドープさせることで可視光を吸収し，太陽光下で光触媒作用を示すことが明らかとなっている．また，光触媒作製時の焼成温度により異なる有機物分解活性を示すことが確認されているが，この焼成温度と水分解活性の関係については検討されていない．また，先行研究において，アルコール類などの犠牲剤を適切な濃度で添加することで水素生成量が向上したという報告がされている．そこで，本研究では異なる焼成温度で作製した光触媒を用いて太陽光照射下における水素及び酸素生成効果を確認し，また，水素生成量を向上させる犠牲剤とその濃度について検討することを目的とした．
光触媒として使用する $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ は，それぞれ焼成温度 100℃，120℃，140℃で作製し，それらの水素，酸素生成量を測定した．メタノールとグリセリンは水素生成量を高める犠牲剤として使用し，最適な濃度を特定した．水素生成量では，焼成温度 120℃の $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ 光触媒が 100℃，140℃で作製されたものよりも高い数値を示した．メタノールを犠牲剤とした水分解試験において，5%溶液から最も高い水素生成量が確認された．これらの結果から，太陽光による光触媒水分解における $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ の最適な焼成温度及び犠牲剤とその濃度はそれぞれ 120℃，メタノール 5% となった．

Comparing the water splitting efficiency by using different calcination temperature of $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ under solar light

○Daichi Nagai, Qi Zhu, Na Liu, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words photocatalyst, water splitting, solar light

2P-F167 大腸菌による 1,3-ジオール類の生産

○片岡 尚也[1,2], Vangnai Alisa S.[3], 薬師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
（[1]山口大院・創科, [2]山口大・中高温微セ, [3]チュラロンコン大）
nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp

【背景・目的】近年, 低炭素社会実現のため, 化石資源から産出される化成品を再生可能資源から生産するバイオリファイナリー研究が世界中で展開されている. これまでに, 大腸菌や酵母等を育種することで, 有機酸やアルコール, 植物由来の炭化水素の生産が報告されているが, その多くが, “天然化合物” を対象としていた. バイオプロダクションの実用可能性を拡げるには, “非天然化合物” を生産する新たな技術の開発が求められるが, そこでは, 新規代謝経路の設計とその機能的な構築が必要となる. こういった背景のもと我々は, “非天然化合物” 1,3-ブタンジオールの生産を以前報告した(1). 本発表では, 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を拡張することで, 化学構造の異なる 3 種の 1,3-ジオール類の微生物生産に成功したので報告する.
【方法・結果】我々が構築した 1,3 ブタンジオール合成代謝経路は, ポリヒドロキシ酪酸生産菌 *Ralstonia eutropha* 由来 PhaAB, ブタノール発酵菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 由来 Bld 及び内在性アルコール脱水素酵素で構成されていた. 本経路を基盤に, (i) PhaA の幅広いアシル CoA への活性が報告されている *R. eutropha* 由来 BktB への変換, (ii) 有機酸の CoA 誘導体への活性化を触媒するルーメン細菌 *Megasphaera elsdenii* 由来 Pct の付加, により 1,3-ジオール類を標的とする新規合成代謝経路を設計した. *pct*, *bktB*, *phaB*, *bld* を IPTG 誘導型プロモーター支配下に配置した発現用プラスミドを構築し, 大腸菌に付与した. 得られた組換え株をグルコース及びプロピオン酸, イソ酪酸又はグリコール酸混合物を基質に好気的に培養した結果, 各混合物から 1,3-ペンタンジオール, 4-メチル-1,3-ペンタンジオール, 1,2,4-ブタントリオールの生産が確認された.

(1) Kataoka *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 115: 475-480 (2013).

Production of 1,3-diols in *Escherichia coli*

○Naoya Kataoka[1,2], Alisa S. Vangnai[3], Toshiharu Yakushi[1,2], Kazunobu Matsushita[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ., [3]Chulalongkorn Univ.)

Key words 1, 3-pentanediol, 4-methyl-1, 3-pentanediol, 1, 2, 4-butanetriol, 1, 3-butanediol

2P-J168 数理モデルを用いた人工遺伝子回路トグルスイッチの解析

○出口 真里[1], 岡本 正宏[2], 花井 泰三[2], 濱田 浩幸[2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・農）
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】 人工遺伝子回路トグルスイッチは 2 つの安定な遺伝子発現状態をもち, 外部刺激によって発現状態が切り替えられる. 例えば, 微生物による有用物質生産において物質生産と菌体増殖の代謝状態が競合する場合, トグルスイッチを用いて代謝状態を切り替えることで増殖阻害を引き起こすことなく物質を生産させることができる. この発現状態の切り替えにおいて, 目的タンパク質の発現量を定量的に制御できればさらに有用性が高まると期待できる. そこで本研究では, トグルスイッチの数理モデルを構築し, 目的タンパク質発現量の制御に最も寄与する生化学反応過程を明らかにすることを目的とした.
【方法】 プロモーター $P_L lacO_1$ と $P_L tetO_1$, リプレッサー lacI と tetR から構成されるトグルスイッチを対象とした. まず, 各プロモーター下流にレポータータンパク質である GFP を組み込み, 誘導剤濃度を変化させ蛍光値を経時的に測定した. この実験データをもとに, 転写・翻訳・遺伝子発現制御を考慮したトグルスイッチの数理モデルを構築した. 次に, 数理モデルに含まれる反応速度定数を 0.5 倍～1.5 倍の間で変化させ, 目的タンパク質発現量におよぼす影響を調べた (感度解析).
【結果と考察】 感度解析により, 誘導剤濃度やリプレッサーの DNA コピー数など様々な条件を変えた場合も安定して目的タンパク質発現量比率を制御するのに有効な候補として, 目的タンパク質の翻訳効率が挙げられた. また, この因子の制御は目的タンパク質発現量の最大値を約 1.5 倍増大することが示された. Salis らは Ribosome Binding Site (RBS) の配列を変えて RBS の強度を調節しており[1], RBS の強度を変えることで目的タンパク質の発現量を定量的に制御できると考えた. 今後, 解析で得られた結果を実験により検証する.

[1]Salis, H. M. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 27, 946-950 (2009)

Analysis of genetic toggle switch using a mathematical model

○Mari Deguchi[1], Masahiro Okamoto[2], Taizo Hanai[2], Hiroyuki Hamada[2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words toggle switch, synthetic genetic circuit, mathematical model

2P-J169 大腸菌を用いたムコン酸の高効率発酵生産

○藤原 良介[1], 野田 修平[2], 田中 勉[1], 近藤 昭彦[1,2]
（[1]神戸大院・工, [2]理研・バイオマス）
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

アジピン酸は 6,6 - ナイロン等の原料に使用されるバルクケミカルであり, 非常に汎用性の高い基幹化合物である. その合成は石油由来の環状炭化水素を原料として行われているが, 多大なエネルギーを要するうえ, 副産物として窒素酸化物が 5-8 %排出されるため, 環境負荷が大きい. これらの課題の解決に向け, 近年, バイオプロダクションによるアジピン酸の生産に関する研究が盛んにおこなわれている.
現状のバイオベースでのアジピン酸生産では, 生産量が極めて低い点が, 最大の問題となっている. Jia-Le Yu 氏らは, 組み換え *E. coli* を宿主としてアジピン酸の発酵生産に成功している. この報告では, アセチル CoA・サクシニル CoA を出発原料としてアジピン酸を生産しているが, 生産量は 639 micro-g/L に留まっている. 一方, アジピン酸前駆体として期待されるムコン酸は, g/L オーダーでの生産に成功している. また, 最近, ムコン酸内の二重結合を開裂し, アジピン酸へと転化する酵素が発見された. これにより, ムコン酸経るアジピン酸生産経路の構築が可能となった.
これら背景から, 将来的なアジピン酸発酵生産に向け, 前駆体であるムコン酸の効率的な発酵生産を目指した. ムコン酸はシキミ酸経路を経由して, コリスミ酸から 4 段階の反応を経て生合成される. 本研究ではまず初めに, シキミ酸経路のフラックスを強化する代謝改変を行った. 次に, コリスミ酸からムコン酸を生産する経路を大腸菌へ導入した. さらに, ムコン酸合成経路の複数のタンパク質を融合して発現させることで, ムコン酸収率の向上を目指した.

High efficient fermentative production of muconic acid using *Escherichia coli*

○Ryosuke Fujiwara[1], Shuhei Noda[2], Tsutomu Tanaka[1], Akihiko Kondo[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]BMEP, RIKEN)

Key words *Escherichia coli*, metabolic pathway modification, biomass, muconic acid

2P-J170 高度膜分離技術によるソルガム搾汁液からのスクロース分離および連続的エタノール生産

○佐々木 建吾[1], 川口 秀夫[1], 荻野 千秋[2], 佐塚 隆志[3], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科学技術イノベーション, [2]神戸大院・工, [3]名大・生物機能セ）
sikengo@people.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】ソルガムは大型イネ科 C4 作物であり, 茎に糖液を蓄積することから, 高い糖濃度の搾汁液を得ることができる. ソルガム高糖性品種が蓄積する搾汁液は糖濃度が特に高くバイオリファイナリー分野にて利用可能であるが, グルコース/フルクトースに対するスクロース含量が低く製糖には不向きであった. 一方, 高度膜分離技術は従来困難とされていた物質の分離が可能であり, バイオリファイナリー分野において利活用が進んでいる[1]. しかし, 高度膜分離技術をソルガム搾汁液に適用してスクロース分離を行った知見は存在しなかった. そこで, 本研究では高度膜分離技術によりソルガム搾汁液よりスクロースを分離するプロセスを確立するとともに, 残りの糖液より連続的に高濃度のバイオエタノール生産を行うことを目的とした.
【方法・結果】出穂後 45-50 日（糖が十分に蓄積した時期）のソルガム品種 SIL-05 より搾汁液を採取した. ソルガム搾汁液を限外ろ過膜 RS50 でろ過して, スクロース 84.0g/L・グルコース 26.2g/L・フルクトース 18.0g/L の液を得た. 本液をナノフィルトレーション膜 NTR-7450 でろ過して, 濃縮液側にスクロース 143.2g/L・グルコース 8.5g/L・フルクトース 4.5g/L の液を得て, スクロース分離に成功した. また, NTR-7450 での透過液をナノフィルトレーション膜 ESNA3 で濃縮した液に *Saccharomyces cerevisiae* を添加して, バッチ培養を繰り返した. その結果, 5 回目のバッチ培養でも 107.7g/L（エタノール収率:85.4%）のエタノールを生産しており, 1 回目のバッチ培養と同様であった（エタノール：104.4g/L, エタノール収率：85.4%）. 連続的なエタノール生産が可能であった理由として, ESNA3 での濃縮液側には酵母に有益なアミノ酸, アルギニン・アスパラギン・セリン・バリンを含有していたからと考えられた.
[1])2013 年度日本生物工学会

Sucrose purification and repeated ethanol production from sugars remaining in sweet sorghum juice subjected to a membrane separation process.

○Kengo Sasaki[1], Hideo Kawaguchi[1], Chiaki Ogino[2], Takashi Sazuka[3], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [3]Biosci. Biotechnol. Cent., Nagoya Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sucrose, ethanol fermentation, batch culture

2P-J171 Exploration of potential indigenous marine *actinomycetes* from indonesia soil producing enzyme lignocellulosic for biorefinery application

○Apriliana Pamella[2], Nanik Rahmani[2], Fahrurrozi Izzuddin[2], Puspita Lisdiyanti[2], Jaemin Lee[1], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Bambang Prasetya[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Research Center for Biotechnology, LIPI., [3]National Standardization Agency of Indonesia)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

The SATREPS program under cooperation between Kobe university and Indonesian Institute of Sciences (LIPI) which focuses on "Innovative Bio-production in Indonesia (iBiol): Integrated Bio-refinery Strategy to Promote Biomass Utilization using Super-microbes for fuels and Chemicals Production" has been successfully screened actinomycetes from terrestrial and marine resources in Indonesia. The potential marine *actinomycetes* from soil at several locations of marine areas in the Indonesia Island, such as Bali island, Enggano island and Tondano island were used in this study. The purpose of this study was to screen the potential isolates capable of lignocellulosic degrading enzyme production due to their diversity and their proven ability by using sugarcane bagasse as a real source of biomass. The primary screening of cellulose and xylan degrading activities from each isolate were measured on CMC and xylan-containing agars (0.5% W/V) at pH 5 and also at pH 6. Clear zones appeared around growing bacterial colonies indicated cellulose and xylan hydrolysis. To visualize the hydrolysis zone, the plates were flooded with congo red (0.25%), otherwise washed with NaCl and acetic acid to check CMC and xylan degradation more clearly. We found 8 and 11 isolates have activities to produce cellulase and xylanase enzyme, respectively.

Exploration of potential indigenous marine *actinomycetes* from indonesia soil producing enzyme lignocellulosic for biorefinery application

○Apriliana Pamella[2], Nanik Rahmani[2], Fahrurrozi Izzuddin[2], Puspita Lisdiyanti[2], Jaemin Lee[1], Prihardi Kahar[1], Yopi[2], Bambang Prasetya[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Research Center for Biotechnology, LIPI., [3]National Standardization Agency of Indonesia)

Key words satreps, indigenous marine actinomycetes, cellulose degrading enzyme, xylanase

2P-J172 大気圧低温プラズマによる分子シャペロン PFD の Folding 活性向上

○小豆澤 友希[1], 井川 聡[2], 養王田 正文[3], 北野 勝久[4], 座古 保[1]
([1]愛媛大学院 理工, [2]大阪産業技術研究所, [3]農工大院・工, [4]阪大院・工)
zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

【背景と目的】プレフォルディン(PFD)は６量体クラゲ状構造の分子シャペロンであり，基質との親和性により活性が変化する．親和性が強い場合，変性タンパク質の凝集を防ぐ作用(Arrest 活性)を示すが，親和性が弱い場合タンパク質の折れたたみを促進する作用(Folding 活性)を示すことを我々は見出した[1]．大気圧低温プラズマは多種の活性種を生成でき，生体高分子への熱的負荷が少ないことから医療・バイオ分野への応用が行われ始めている．生成された活性種はアミノ酸を修飾することが知られており，酵素活性への影響等が調べられているが，分子シャペロンへ与える影響は明らかでない．そこで本研究では，PFD 溶液にプラズマを照射し，Arrest 活性および Folding 活性の変化を調べた．
【方法および結果】プラズマ処理した PFD の Arrest 活性を Citrate synthase(CS)の熱凝集による光散乱で評価したところ，凝集抑制作用が減少していたことから，Arrest 活性の低下が示された．また，プラズマ処理した PFD の Folding 活性を変性リゾチームにより評価したところ，リフォールディング収率が２倍以上に向上したことから，Folding 活性の上昇が示された．さらに，8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid(ANS)を用いて PFD の表面疎水性を評価したところ, ANS 蛍光強度の相対値が 40%減少することが観察され，PFD 表面疎水性の減少が示された．これらの結果から，プラズマ処理による親水化に伴い分子シャペロンの活性を上昇できることが示唆された．今後，反応機序の詳細や他の基質について検討していく予定である．

[1] Zako, et al. BBRC ,391(1),pp.467-470(2010)

Improvement of folding activity of molecular chaperone prefoldin by low temperature atmospheric pressure plasma

○Tomoki Azukizawa[1], Satoshi Ikawa[2], Masahumi Yohda[3], Katsuhisa Kitano[4], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci and Eng., Ehime Univ., [2]ORIST, [3]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [4]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Molecular chaperon, Prefoldin, Low temperature atmospheric pressure plasma, Folding activity

2P-J173 Importance of LEA peptide lengths in co-expression system to enhance biologically active recombinant protein expression

○Nishit Pathak, Kohei Yano, Shinya Ikeno
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)
ikeno@life.kyutech.ac.jp

In the last two decades, for the production of a variety of therapeutic proteins on industrial-scale, the prokaryotic expression systems have been used. *E.coli* arose as a most preferred choice among the various expression systems employed for the overproduction of proteins. High-throughput techniques are being used nowadays for the efficient production of recombinant biologically active protein. Previously, we developed and analyzed a LEA peptide co-expression system which expresses the GFP as a target protein. This designed and constructed LEA peptide was based on G3LEA protein originated from repetitive units of 11 mer motif amino acid of *P. vanderplanki* larvae. We observed decreased target protein expression on increasing peptide length by repeating the LEA I sequence (AKDGTKEGAKE). At present, we are analyzing the influence of LEA peptide length on over-production of target protein in *E.coli*. For this, we increased and decreased the LEA peptide lengths by adding and deleting amino acids respectively, one by one in LEA K peptide sequence (AKDKLKEKAKE). In future, this procedure can be made amenable to the industrial production of that particular protein with minimum alterations.

Importance of LEA peptide lengths in co-expression system to enhance biologically active recombinant protein expression

○Nishit Pathak, Kohei Yano, Shinya Ikeno
(Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, recombinant protein, co-expression, late embryogenesis abundant protein

2P-F174 テロメラーゼ活性を高める抽出液がヒト線維芽細胞の若返りに及ぼす影響

○塩見 尚史, 渡邊 桂子
（神戸女学院大・人間科学）
n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp

テロメアの長さは，細胞の若さと深く関係しており，テロメアの長さを伸長することにより，細胞が若返ることを，発表者は見い出してきた．そこで，本研究では，テロメラーゼ活性を高める化合物を探索し，その化合物が細胞の若返り（分裂回数の少ない状態）を促すのかについて検討した．
まず，テロメラーゼ（テロメアを延ばす働き）の活性を高める化合物のスクリーニングを行った．様々なサンプル（食品，健康食品，サプリメントなど）の粉末あるいはすり潰したものに蒸留水を添加して，滅菌濾過あるいは 120℃で 1 分間熱処理することにより，抽出液を得た．65 歳の女性由来のヒト線維芽細胞 TIG107（老化させた状態）に，それらの抽出液を 10-20μL 添加した培地で培養し，その増殖速度を調べた．その結果，プラセンタ，魚や鶏の白子，マムシや蜂の子の乾燥物から抽出した溶液に増殖を高める効果が見出だされ，テロメラーゼ活性も増加した．
そこで，効果の優れていた蜂の子の抽出液について，ヒト線維芽細胞 TIG-1-20(分裂回数：30-40)を用いて詳しく調べた．ヒト線維芽細胞 TIG-1-20 に蜂の子エキスを添加することにより，細胞の増殖速度とテロメラーゼ活性が非常に高まり，細胞の分布も均一化した．また，TIG-1-20 に蜂の子エキスを添加して植え継ぐことにより，分裂寿命も増加した．以上のことから，蜂の子エキスを添加することにより，細胞は若がえったと考えられる．しかし，継続的に蜂の子エキスを添加して培養した場合，テロメラーゼ活性の著しい低下が見られた．この理由は不明だが，テロメラーゼ活性の増加により細胞の自己防衛機構が働いて活性が抑制された可能性がある．したがって，テロメラーゼを活性化して細胞を若返らせるには，刺激をパルス的に与える必要があると思われる．

Effects of extracts that induce telomerase activity on rejuvenation of human fibroblasts

○Naofumi Shiomi, Neiko Watanabe
(Dept. Hum. Sci., Kobe Coll.)

Key words telomerase, rejuvenation, aging, fibroblasts

2P-J175 回転浮遊培養装置を用いたヒト iPS 細胞集塊培養

○橋田 礼博[1], 植村 壽公[2], 紀ノ岡 正博[1]
([1]阪大院・工・生命先端・生工, [2]阪大院・工・精科応物・精科)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【緒言】
ヒト iPS 細胞は再生医療や創薬スクリーニングへの応用が期待されており，これらの実現のために細胞の大量培養プロセスの確立が求められている．現在，細胞を平面に接着させて培養する 2 次元培養法と比較して，立体的な細胞集塊を形成させて高密度に培養できる 3 次元培養法が大量培養には有用であると考えられている．しかしその中で代表的な 3 次元懸濁培養法は液流によるシェアストレスが細胞にダメージを与えてしまうことが課題となっている．そこで本研究ではシェアストレスを低減させると考えられる回転浮遊培養装置に着目した．円盤状の容器の軸が水平方向に回転して上向きの液流が生じ，この力と浮力が細胞集塊の重力と拮抗して，細胞集塊が沈降することなく浮遊した状態ができる．現在この環境におけるヒト iPS 細胞の増殖過程の特徴はわかっておらず，この装置を用いた大量培養プロセスの設計が困難となっている．本研究では，シェアストレスがかからない 3 次元静置培養容器で形成させた細胞集塊をこの装置で培養し，細胞集塊の沈降を抑えるシェアストレスが，細胞の増殖過程にどのような影響を与えているのか調べた．
【方法および結果・考察】
Matrigel 上で継代培養したヒト iPS 細胞 (253G1) を 3 次元静置培養容器で 10 uM Y-27632 を含む StemFit(R)AK02N 培地を用いて 24 h 培養を行い，均一な径の細胞集塊を形成させた．この細胞集塊を回転浮遊培養装置に播種して 72 h 培養を行った後，集塊径測定および細胞数計測を行った．得られた結果から，播種した細胞集塊は培養 24 h までに小集塊へと崩壊し，その後崩壊が止まって細胞増殖しつつ，一部細胞集塊同士の合一が生じていることが分かった．以上のことから，この環境におけるシェアストレスが，細胞集塊を脆い細胞集塊から堅いものへと変化させていることが示唆された．

Culture of human induced pluripotent stem cell aggregates in rotating wall vessel bioreactor

○Akihiro Hashida[1], Toshimasa Uemura[2], Masahiro Kino-oka[1]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Prec. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words human induced pluripotent stem cell, rotating wall vessel bioreactor, shear stress

2P-J176 ヒト iPS 細胞の育て方がエピジェネティクスに与える影響

○秋山 真一, 紀ノ岡 正博, 金 美海
(阪大院・工)
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景, 目的】ヒト人工多能性幹細胞(hiPS 細胞)を産業応用するには, 未分化性を維持し, 目的細胞へ分化する品質の良い細胞を安定的に供給することが求められている. しかし，育て方の違いが品質に与える影響は明らかではなく, それを評価する指標も確立されていない. 近年では hiPS 細胞の品質評価・規格化開発の現場で, エピジェネティック修飾解析が有用になってきた. しかし, ヒストンの修飾による DNA のメチル化と相互に作用するクロマチン構造のダイナミックな変化が, 細胞の運命制御に関係している報告はあるが, 細胞培養工程にて, 培養特性と細胞特性の変動が未分化性と分化能に与えている影響は明らかではない. 本研究ではまず, hiPS 細胞の未分化維持培養における播種密度の違いがエピジェネティックスの変化に及ぼす影響を見る.

【方法, 結果】ヒト iPS 細胞を 2 つの播種密度 1.25×10^3 cells/cm^2 と 1.00×10^4 cells/cm^2 で iMatrix 面上に播種し, StemFit AK02N 培地を用いて継代培養した. 継代 1 と 4 回目の細胞の培養 24 と 120 h で, 未分化性の維持に関与するヒストン H3 の 27 番リジンにおけるトリメチル化(H3K27me3)と核マーカーの DAPI の二重蛍光染色を行い, 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した. その結果，継代回数に係らず, 培養 24 h では H3K27me3 が核内部において局在しており, 培養 120 h で H3K27me3 発現が増加していることが確認された. さらに, 播種密度 1.25×10^3 cells/cm^2 で継代培養した条件では継代回数の変化による差が見られなかったことに対し, 播種密度 1.00×10^4 cells/cm^2 で継代培養した条件では継代を 4 回重ねると細胞の核内における H3K27me3 の発現が増加することがわかった. 以上の結果から, 培養がメチル化に影響を与え, 細胞運命が変化する可能性があることが示唆された. 今後は, メチル化と hiPS 細胞の未分化性や分化能の関係を検討する.

Influence of human induced pluripotent stem cell culture methods on epigenetic change

○Shinichi Akiyama, Masahiro Kino-oka, Mee-Hae Kim
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words human induced pluripotent stem cell, cell quality, epigenetic

2P-J177 細胞内レドックス状態の制御に基づく哺乳動物細胞の概日時計操作

○河合 和紀[1], 石川 聖人[1,2], 金子 真大[3], 中西 周次[2], 堀 克敏[1]
([1]名大院・工, [2]阪大・太陽エネ, [3]東大院・工)
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】
代謝は物質の酸化還元（レドックス）に基づく電子移動反応から成り立っている．物質のレドックス状態を制御することに長けた電気化学的手法は，物質生産の効率化に向けた代謝改変法として，微生物工学分野で古くから研究されている．その一方，哺乳動物細胞を用いた研究分野では，センシング目的で利用されることが多く，細胞内のレドックス状態を制御する目的ではあまり使用されていない．本研究では，細胞内レドックス状態が概日時計の発振機構に関与していることに注目し，哺乳動物細胞のレドックス状態を電気化学的に制御することで，概日時計を操作することができるか検討した．
【方法・結果】
時計遺伝子 Bmal1 のレポーター株として *Bmal1-dLuc* U2OS 細胞を用い，電子伝達メディエーターには，ホスホリルコリン基とフェロセンを含有する両親媒性レドックスポリマー（pMFc, E_M = 0.3 V vs. Ag/AgCl）を適用した．電気化学実験は三電極系で行い，作用電極にはグラッシーカーボン，カウンター電極には白金，参照電極には Ag/AgCl 電極を用いた．
酸化型と還元型の pMFc を培地に添加して時計遺伝子の発現を追跡したところ，細胞から電子を受け取ることのできる酸化型 pMFc を添加したときのみ，遺伝子発現の周期変化が確認できた．次に，電子移動の起きない還元型 pMFc を含む条件下で 0.4 V (vs. Ag/AgCl)の電位を印加し，pMFc を in situ 酸化したところ，酸化型 pMFc を添加した条件と同様に周期を変化させることに成功した．これらの結果から，細胞内レドックス状態を電気化学的に変化させることで，概日時計遺伝子を操作できることが示唆された．

Controlling of the mammalian circadian clock by the regulation of intercellular redox states

○Kazuki Kawai[1], Masahito Ishikawa[1,2], Masahiro Kaneko[3], Shuji Nakanishi[2], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]RCSEC, Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words intracellular redox state, electrochemistry, circadian rhythm, redox polymer

2P-J178 レトロトランスポゾンを用いた遺伝子導入技術の開発

○村上 舞[1], 河邉 佳典[2], 吉田 宗一郎[2], 井藤 彰[2], 上平 正道[1,2]
([1]九大院・シス生科, [2]九大院・工)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】動物細胞ゲノムへの外来遺伝子導入は，バイオ医薬品の生産細胞構築やトランスジェニック動物作製などにおいて重要な技術であり，効率的な方法の開発が望まれている．本研究では，レトロトランスポゾン LINE-1 の転位メカニズムに着目し，目的遺伝子の増幅・導入が制御可能なレトロトランスポゾンベクターの開発を目的とした．
【方法】LINE-1 遺伝子を pCEP4 に組込んだ．ネオマイシン耐性遺伝子 (*Neo*) 発現ユニットをレトロトランスポゾンの転写方向と逆方向に配置した．scFv-Fc 遺伝子は，CMV プロモーターで発現制御可能なユニットとした．これらの遺伝子をレトロトランスポゾンの 3'UTR 内に挿入し，pCEP4/mL12-sc を作製した．CHO-K1 細胞にレトロトランスポゾンベクタープラスミドを一過性導入し，G418 で薬剤選抜した．薬剤耐性コロニーよりクローンを樹立後，レトロ転位による組込みをゲノム PCR で評価した．樹立した細胞の抗体生産能を ELISA 法で評価した．
【結果と考察】*Neo* 内部にイントロンをレトロトランスポゾンと同じ転写方向で挿入することで，レトロ転位した細胞を G418 で選抜できるシステムを用いた．選抜クローンをゲノム PCR 解析したところ，レトロ転位が起こったときに増幅される分子量サイズでバンドを検出できた．LINE-1 のうち *ORF2* を欠損させたレトロトランスポゾンベクターを作製し，ORF タンパク質発現ベクターと共導入させたところ，レトロ転位を確認できた．この場合に，レトロトランスポゾンベクターと ORF 発現ベクターの導入比を検討したところ，10:1 とした際，G418 耐性コロニー数が最大となった．樹立した細胞の抗体生産能と導入遺伝子数を解析したところ，導入数が多いクローンで抗体生産量が高かった．

Development of a gene transfer technique using retrotransposon

○Mai Murakami[1], Yoshinori Kawabe[2], Soichiro Yoshida[2], Akira Ito[2], Masamichi Kamihira[1,2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words retrotransposons, LINE-1, gene delivery, CHO cells

2P-J179 光合成細菌投与による植物の成長促進効果

○林 修平[1], 岩本 康成[2], 馬場 育美[1], 東垂水 健太[1], 平川 夕貴[1], 宮﨑 優[1], 山本 進二郎[1], 宮坂 均[1]
（[1]崇城大・生物生命, [2]崇城大院・工）
shayashi@life.sojo-u.ac.jp

【目的】一般的に，光合成細菌とは電子供与体として低級脂肪酸や硫化水素などを必要とする微生物である．光合成細菌の中でも，紅色非硫黄細菌は農業において経験的に利用されていた．ここ 50 年ほどの研究により，農業，畜産業，水産業，環境分野，さらに医薬分野への応用が可能で，現在問題となっている食糧生産，エネルギー生産，環境問題などの解決に大きく貢献できる微生物の 1 つとして期待されている．本研究では，熊本県を中心とした九州各地より有用な光合成細菌を分離し，その植物への成長促進効果の検討を行う．
【方法】九州各地で採取したサンプルを光合成細菌の培養に適した GM 培地で満たした容器に接種し，培養液が赤くなったものを選び出した．培養液を GM 寒天培地に塗布し，嫌気培養を行った．これらを繰り返して光合成細菌を単離した．植物栽培では，ハツカダイコン（*Raphanus sativus* var. *sativus*）やコマツナ（*Brassica rapa* var. *perviridis*）を種から栽培し，出芽した日から光合成細菌懸濁液を定期的に投与した．十分に生育したところで収穫し，植物体の重量や葉の大きさなどを測定した．
【結果と考察】各地から採取したサンプルより，多くの光合成細菌が分離できた．それらは，*Rhodobacter* 属や *Rhodopseudomonas* 属に属する光合成細菌であった．植物の成長促進効果については，農業用に市販されている光合成細菌（*Rhodobacter sphaeroides*）を用いて様々な投与条件を検討したところ，生きたまま投与するより超音波破砕したものを投与する方が，より高い成長促進効果がみられる傾向があった．

Plant growth-promoting effect by photosynthetic bacteria

○Shuhei Hayashi[1], Yasunari Iwamoto[2], Ikumi Baba[1], Kenta Higashitarumizu[1], Yuki Hirakawa[1], Yu Miyazaki[1], Shinjiro Yamamoto[1], Hitosi Miyasaka[1]
([1]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Sojo Univ.)

Key words photosynthetic bacteria, growth stimulation, plant, agriculture

2P-J180 量子ドットナノプローブを用いたアミロイドβと PC12 細胞の相互作用の観察

○山下 涼太, 板田 鉄平, 上井 幸司, 徳楽 清孝
（室工大院・工・環境創生）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景と目的】アルツハイマー病（AD）は，アミロイドβ（Aβ）と呼ばれるペプチドが脳内で凝集・蓄積し，最終的に脳内の神経細胞死が起こることで発症すると考えられている．しかし，Aβ がどのように神経細胞に作用し，脳内の神経細胞死を引き起こすのか，その詳細は不明な点が多い．我々は，最近量子ドットナノプローブを用いて Aβ の凝集過程を溶液中でリアルタイムイメージングすることに成功した．本研究では Aβ による細胞毒性メカニズムの解明を目的として，培養細胞中に Aβ と量子ドットナノプローブを添加し，Aβ と培養細胞の相互作用の可視化を試みた．
【方法】まず，ポリ-D-リジンでコーティングした 96 ウェルプレート上に PC12 細胞を均一に播種し，神経成長因子（NGF）を加え，24 時間インキュベートすることで神経化した．次に，古い培地を取り除いた後，量子ドットナノプローブ（30 nM），$A\beta_{42}$（30 μM），新鮮な培地を混合したものを添加し，24 時間インキュベートした．その後，$A\beta_{42}$ が培養細胞に対してどのように作用しているのか，蛍光顕微鏡を用いて観察した．
【結果と考察】Aβ の添加によって PC12 の細胞死が誘導され，細胞がウェルの底から徐々に解離していく様子が観察された．また，Aβ を添加することで PC12 細胞の周辺部に Aβ の凝集体が付着する様子が蛍光顕微鏡により観察されたが，その量は解離した細胞の周辺部の方が多かった．細胞を含まない場合，Aβ 凝集体はウェルの底に均一に沈殿していったことから，この細胞周辺部への Aβ 凝集体の付着は，細胞膜上で Aβ の凝集体形成が促進されたことを示唆した．また，Aβ 凝集阻害物質共存下で細胞表面の凝集体量が低減することも観察された．

Observation of the interaction between amyloid β and PC12 cells by a quantum dot nanoprobe.

○Ryota Yamashita, Teppei Itada, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku
(Div. Sustain, Environ. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words Amyloid beta, quantum dot nanoprobe, PC12, Alzheimer's disease

2P-J181 抗体固定化金ナノ粒子凝集の単一クラスター解析による Amylin アミロイド凝集体の高感度検出

○中西 文香[1], 矢野 湧暉[1], 島崎 洋次[1], 増本 純也[2], 座古 保[1]
（[1]愛媛大学院理工, [2]愛媛大学院医学）
zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp

【背景と目的】
2 型糖尿病とは高血糖症などの特徴を持つ代謝異常疾患である．様々な合併症を引き起こすため早期治療が重要であるが，早期発見は困難とされている．Amylin は 37 アミノ酸残基で構成されるペプチドホルモンであり，酸化ストレス等の影響により線維構造を持ったアミロイド凝集体(Amylin 凝集体)を形成する．Amylin 凝集体は 2 型糖尿病患者の膵 β 細胞に多く沈着しているため，Amylin 凝集体検出は疾病の早期発見において重要である．
アミロイド凝集体検出には蛍光プローブが用いられてきたが検出感度が低く，イムノアッセイでは凝集体の特異的な検出が困難であるなどの問題点があった．このためアミロイド凝集体の特異的かつ高感度な検出法の開発が求められている．これまでに我々は抗体を固定化した金ナノ粒子(Ab-AuNP)がアミロイドβ(Aβ)凝集体存在下で形成するナノ粒子凝集を暗視野顕微鏡(DFM)により単一クラスター解析することで Aβ 凝集体を特異的かつ高感度に検出することに成功した[1]．そこで本研究では Amylin 抗体を固定化した Ab-AuNP 凝集の単一クラスター解析による Amylin 凝集体の高感度検出を試みた．
【方法・結果】
Amylin モノマーをインキュベートすることで Amylin 凝集体を得た．その後 Ab-AuNP を各 Amylin sample に加え，目視および DFM によるナノ粒子凝集観察を行った．DFM 解析ではナノ粒子凝集に対応する個々の輝点について輝度測定を行った．その結果，目視では 5μM の Amylin 凝集体添加においてナノ粒子凝集が観察され，Ab-AuNP による Amylin 凝集体観察が可能であることが示された．さらに DFM を用いた輝度測定ではより低 Amylin 濃度でもモノマーと凝集体とで DFM 像において差異が観察された．これらの結果から DFM により Amylin 凝集体を特異的かつ高感度に検出できることが示唆された．

【1】Bu, Zako et al. Anal. Sci. 32, 307 (2016)

Sensitive detection of amylin amyloid aggregates by single cluster analysis of gold nanoparticles using dark field microscopy

○Ayaka Nakanishi[1], Yuki Yano[1], Youji Shimazaki[1], Junya Masumoto[2], Tamotsu Zako[1]
([1]Grad. Sch. Sci and Eng., Ehime Univ., [2]PROS, Sch. Med., Ehime Univ.)

Key words Dark field microscopy, Gold nanoparticle, Amylin amyloid, Sensitive detection

2P-N182 Decomposition of organic pollutant using archaerhodopsin-sensitized TiO_2 photocatalytic system

○Xiong Geng[1], luomeng Chao[2], Gang Dai[3], Tatsuo Iwasa[1,4]
([1]Adv. Production Syst. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan, [2]Anim. Sci. Technol., Inner Mongolia Nationalities Univ., China, [3]Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China, [4]Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan)
iwasat@mmm.muroran-it.ac.jp

Photocatalytic degradation of organic pollutants using TiO_2 nanoparticles has showed hopeful prospect in the treatment of water and air pollutants. However, wide bandgap of TiO_2 (3.2 eV) requires UV light irradiation for excitation that limits its application under solar light irradiation since UV light (< 387 nm) in solar light is less than 5 %. The TiO_2 can be responsive to visible light when a dye attached onto the surface of the nanoparticles. It has been found that many dyes can enhance to photocatalytic efficiency of TiO_2 under visible light. However, many dyes are pollutants themselves and some of them even persistent and toxic. Thus, it is important to found a dye that is not only an efficient sensitizer but also environmentally friendly. Biological pigment should be a promising candidate for this purpose. Archaerhodopsin (AR) is a photoactive protein, a biological pigment found in the membrane of *halophilic archaea*. The protein works as the light-driven proton pump in the host cell. In our previous work, we isolated a homolog of AR in the membrane of *Halorubrum* sp. Ejinoor. The protein showed wide absorption band in the visible light region (λmax at 550 nm) and high stability under harsh environments. Moreover, *E. coli* expression system of *He*AR was established in our lab recently. In the present work, we tested the sensitizing effect of *He*AR in comparison with the alizarin red, a commercially available organic dye.

Decomposition of organic pollutant using archaerhodopsin-sensitized TiO_2 photocatalytic system

○Xiong Geng[1], luomeng Chao[2], Gang Dai[3], Tatsuo Iwasa[1,4]
([1]Adv. Production Syst. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan, [2]Anim. Sci. Technol., Inner Mongolia Nationalities Univ., China, [3]Chem. Environ. Sci., Inner Mongolia Normal Univ., China, [4]Div. Eng., Muroran Ins. Technol., Japan)

Key words TiO_2 nanoparticles, photocatalytic degradation, archaerhodopsin, organic dye

2P-J183 分子シャペロン Hsp90 と Hsp70 の機能に及ぼす天然小分子化合物レスベラトロールの影響

○仲本 準, 宮本 悠里
（埼玉大院・理工・分子）
nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp

【背景と目的】分子シャペロンは，非天然タンパク質の凝集抑制や機能的構造への折り畳みの介助，タンパク質凝集塊の可溶化などの働きを通して，細胞のタンパク質恒常性の維持に深く関わる一群のタンパク質である．がん細胞は通常の細胞よりも分子シャペロン Hsp90 への依存度が高いので，Hsp90 の（シャペロン機能に必要とされる）ATPase 活性を阻害する化合物を用いて，がん治療薬の開発が行われている．しかし，まだ薬として市販されるには至っていない．我々は，（亜）熱帯植物由来のゴニオタラミンやゼルンボンが Hsp90 の ATPase 活性を活性化するにもかかわらず，Hsp90 のシャペロン機能を阻害することを明らかにした．これは，阻害剤ではなく活性化剤によって Hsp90 機能を阻害するという，薬剤開発における新規なアプローチを提供するものである．本研究では，ゴニオタラミンと類似した構造をもつレスベラトロールが，Hsp90 ともう一つの代表的分子シャペロンである Hsp70 に及ぼす影響を調べた．
【方法】シアノバクテリア（Synechococcus elongatus）の Hsp90 と Hsp70（及びそのコシャペロン）を高度に精製した．ATPase 活性の測定は，ピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素（LDH）反応を共役させて分光学的に行った．分子シャペロン活性を測定するために，熱変性 LDH の凝集反応と，尿素変性 LDH の天然構造への折りたたみ反応を解析した．
【結果と考察】レスベラトロールは，Hsp90 と Hsp70 の ATPase 活性を阻害し，さらに Hsp90 の凝集阻止活性と Hsp70 の折りたたみ活性も阻害した．レスベラトロールは抗がん活性を示すという報告があるが，この天然小分子化合物による，がん細胞で必須の働きをする Hsp90 と Hsp70 の機能抑制が，抗がん作用発現のために重要かもしれない．

Effect of resveratrol on the functions of the molecular chaperones Hsp90 and Hsp70

○Hitoshi Nakamoto, Yuri Miyamoto
(Dept. of Biochem. Mol. Biol., Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ.)

Key words heat shock protein, molecular chaperone, small molecules, cancer

2P-N184 Production of novel methylated resveratrol analogs from sequential biotransformation of resveratrol by two recombinant *Escherichia coli*

○Te-Sheng Chang
(Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan)
mozyme2001@gmail.com

Two novel methylated resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) analogs were produced from sequential biotransformation of resveratrol by two recombinant *Escherichia coli*. First, resveratrol was *ortho*-hydroxylated by a recombinant *E. coli*, which expressed tyrosinase gene from *Bacillus megaterium*. Then, the produced hydroxyresveratrol was catalysed into two metabolites by another recombinant *E. coli*, which expressed *O*-methyltransferase (OMT) gene from *Streptomyces peucetius*. The two metabolites were isolated by preparative high-performance liquid chromatography and identified as 3'-hydroxy-4'-methoxy-resveratrol (1) and 4'-hydroxy-3'-methoxy-resveratrol (2), on the basis of mass, 1H-NMR, and 13C-NMR spectrophotometric analysis. Both (1) and (2) had not been produced by microorganisms before. Through the two step biotransformation process developed in the present study, many methoxyflavonoids derivatives could be produced in the future.

Production of novel methylated resveratrol analogs from sequential biotransformation of resveratrol by two recombinant *Escherichia coli*

○Te-Sheng Chang
(Dept. Biotechnol., NUTN, Taiwan)

Key words biotransformation, tyrosinase, *O*-methyltransferase, resveratrol

2P-N185 撥液性材料を利用した気中乾燥法による微生物包括カプセルの作製および微生物傷害性の検証

○武井 孝行, 濵田 周吾, 吉田 昌弘
（鹿児島大院・理工）
takei@cen.kagoshima-u.ac.jp

【緒言】有用微生物をカプセル内に包括することで，外環境からの微生物の保護や水中からの微生物の容易な回収，カプセルからの微生物の徐放などが可能になる．合成樹脂からなるカプセル内に微生物を包括する場合，合成樹脂を溶解した有機溶媒中に微生物を懸濁し，それを水中に分散させた後に溶媒の蒸発によって分散液滴を固化させる “水中乾燥法”が広く使用されている．そのような水環境下において有機溶媒を蒸発除去するには時間がかかるため，その間，生物毒性を有する有機溶媒により微生物が大きな障害を受けると考えられる．一方，これまでにわれわれは，撥液性材料を利用して，水中よりも有機溶媒の蒸発が容易な気相中でカプセルを調製する方法（気中乾燥法）を開発している[1]．本研究では，上記手法の新規微生物包括カプセル調製法としての可能性の検証，ならびに微生物に傷害を与えないカプセル調製条件の探索を行ったので報告する[2]．【実験方法および結果】PLGA（乳酸-グリコール酸共重合体）を DCM（ジクロロメタン）に 20 wt％濃度で溶解し，その溶液 10 μL を撥油性平板上に滴下した後，30℃で静置しながら経時的に液滴内の DCM 残量を測定した．この気中乾燥法の DCM 蒸発速度は，水中乾燥法よりも 100 倍以上高かった．次に DCM の生物毒性発現機構を調査したところ，水の存在によりその毒性が顕著に増大することが明らかとなった．最後に，乾燥酵母を分散させた PLGA 溶液を用いて，両方の方法でカプセルを作製し，それらのエタノール生産能を評価したところ，気中乾燥法のカプセルのみにエタノール生産能を確認できた．これは，気中乾燥法が生物毒性を増大させる水を一切使用しないためであると考える．【参考文献】[1] Takei T. et al., Polym Bull., 73, 409 (2016), [2] Takei T. et al., Process Biochem., 54, 28 (2017)

Air drying on superamphiphobic surfaces can reduce damage by organic solvents to microbial cells immobilized in synthetic resin capsules

○Takayuki Takei, Shugo Hamada, Masahiro Yoshida
(Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

Key words microorganism immobilization, microcapsule, organic solvent

2P-J186 生物鉱物化現象を模倣したレアアースイオンの選択的回収

○畠中 孝彰[1], 松上 明正[2], 林 文晶[2], 石田 亘広[1]
（[1]豊田中研, [2]理研・ライフサイエンス技術基盤研究セ）
e1168@mosk.tytlabs.co.jp

【目的】 レアアースは先端材料に必須な金属資源であるが，分離回収に課題がある．一方で生物は，様々な金属イオンが混在している自然環境下から，特定の金属イオンのみを選択的に認識して鉱物化する能力（バイオミネラリゼーション）を有している．本発表では，ハイブリッド自動車の永久磁石等に活用されているレアアースの一種（ジスプロシウム）をターゲットに，生物鉱物化現象を着想とした新しい金属回収コンセプトを提案したい[1)]．
【方法】 レアアースは，中性溶液中でイオンと水酸化物との平衡状態を生じる．我々は，水溶液中の水酸化物を認識し安定化する分子をデザインすれば，複合体を形成して沈殿するのではないかと考えた．そこで，ペプチドライブラリを構築し，表面を水酸化させたレアアースナノ粒子を標的に選抜を試みた．得られたペプチドを合成し，酵素結合免疫吸着（ELISA），核磁気共鳴装置（NMR）で評価した．生成鉱物は，電子顕微鏡（SEM，TEM），X 線吸収微細構造解析（XAFS，SPring-8 豊田ビームライン）で評価した．また，選抜ペプチドとグルタチオン S 転移酵素（GST）との融合タンパク質を設計し，遺伝子組換え大腸菌にて，発現・精製・評価した．
【結果】 選抜ペプチドとレアアースイオン溶液を混合すると，直後に白濁化し粒子が生成した．XAFS 解析より，本粒子は水酸化ジスプロシウムに近い局所構造を有していると推定され，NMR から，ペプチド中の酸性アミノ酸がレアアースを認識していることが分かった．さらに本ペプチドは，レアアース以外のイオン種を多量に含む模擬海水からでも，レアアースの選択的な回収能力を示した．また，GST 融合タンパク質についても，ペプチド単独の場合と同様，レアアースイオンのみを選択的に認識し，鉱物化できることを明らかにした．

1)Hatanaka et.al, Nature Communications, 8:15670, 2017.

A novel concept for selective recovery of the rare earth elements inspired by biomineralization.

○Takaaki Hatanaka[1], Akimasa Matsugami[2], Fumiaki Hayashi[2], Nobuhiro Ishida[1]
([1]Toyota Cent. R&D Labs. Inc., [2]Cent. Life Sci. Technol., RIKEN)

Key words bio-mineralization, phage display, peptide, rare earth

2P-N187 ストロンチウムがツバキ花粉の生理活性に与える影響の解析

○中村 真由, 望月 玲於, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】東日本大震災により福島原発から飛散した放射性ストロンチウム（Sr^{2+}）は，大きな社会問題となっている．汚染された地域の大部分は森林域だが，Sr^{2+}の動態や影響評価は十分になされていない．特に，花粉は植物の繁殖面で非常に重要であるが，その影響評価は未解明な部分が多い．我々は，高純度セルロースシートを用いた新規培養法（UCS 法）を開発し，種々検討した結果，Sr^{2+}は他のアルカリ土類金属と比べて低濃度で花粉の発芽や花粉管伸長を阻害することや，Ca^{2+}が阻害緩和効果を有することを明らかにした[1]．今回は，Sr^{2+}が花粉の生理活性に及ぼす影響の機構，および花粉における Sr^{2+}の動態の解析を試みた．
【方法と結果】UCS 法を用いて種々の条件でツバキ（*Camellia japonica*）花粉を培養し，Sr^{2+}がツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響を解析した．その結果，（A）十分量の Ca^{2+}が Sr^{2+}と同時に存在し競合することで，花粉への Sr^{2+}の付着が抑えられ，花粉の発芽や花粉管の伸長の阻害が緩和される，（B）Sr^{2+}は Ca^{2+}よりも花粉への付着力が強い，ことが明らかとなった．また USC 法を活用することで培養中の花粉を単離することができた．単離した花粉を Particle Induced X-ray Emission（放射線医学総合研究所）で解析した結果，花粉における Sr^{2+}の動態を可視化できた．その結果，Sr^{2+}と Ca^{2+}を同時に添加して培養した花粉では，花粉内の Sr^{2+}の存在量が少ないことや，発芽している花粉では，花粉管の付け根部分に Ca^{2+}が多く存在することが明らかとなった．現在，Sr^{2+}による阻害の緩和物質の探索と，効果的緩和法について検討中である．また，他の評価系への UCS 法の適用についても検討中である．
1) H28 日本生物工学会要旨集 p.316

Effect of strontium on the physiological activities of *Camellia japonica* pollen grains

○Mayu Nakamura, Reo Mochizuki, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words novel culture method, Particle Induced X-ray Emission, pollen grains, strontium

2P-N188 A high throughput screening and isolation method for phosphate accumulating microbes

○Anand Ajeeta, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

The capability of phosphate accumulating microbes (PAMs) to lower the phosphate content of waste streams turned the intensive waste water research to screen them. The reported screening and isolation methods for PAMs are still struggling with challenges like contamination with non PAMs, stability of pure culture, significant parameters influencing screening tests and exploration of the metabolic characteristics etc. We developed a novel high throughput screening and isolation method for *Lactobacillus casei* JCM 1134 (a potential PAM) to rectify the shortcomings in previous methods. Firstly, phosphate enrichment was achieved by incubating *L. casei* in salt selection media. Secondly, for removal of other strains (non PAM strains), *L. casei* were transferred in low pH phosphate free media and then followed by Percoll density gradient centrifugation to separate the PAM strains consortia. Suitably diluted pellets were spread plated and 15 isolates of *L. casei* were examined for phosphate accumulation capabilities. *L. casei* isolate accumulated the highest amount of phosphate (0.81 [mg-phosphate/mg-dry cell]) from salt selection media and the overall phosphate increment was observed to be about 23 fold. The developed method is under trial for other potential microbes.

A high throughput screening and isolation method for phosphate accumulating microbes

○Anand Ajeeta, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words density gradient centrifugation, isolation, phosphate accumulating microbes, salt selection media

2P-J189 SCF 法を用いた強酸性条件下における未培養微生物の培養化

○高野 力[1], 村山 晃一[2], 青柳 秀紀[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]フタムラ化学）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】自然界に存在する微生物の 99%が未培養であり，特に，特殊環境には，未培養微生物が多く存在するといわれている．微生物の単離培養には主に寒天平板培養法が用いられているが，強酸性条件下では寒天が加水分解を起こすため，使用することができない．本研究では，強酸性条件下でも使用可能で，培地の添加や交換により培養中に培養条件を変化させることができる，我々が開発した Specialized Cellulose Film（SCF）法[1] を用いて様々な培養系を構築し，強酸性条件下における未培養微生物の培養化を試みた．

【方法と結果】種々の培地（pH 1）と SCF 法を用いて強酸性（pH 1.7～1.9）の環境で採取した種々の試料を培養（30℃, 2 週間）し，PCR-DGGE 法を用いて培養菌叢を解析した．その結果，培地の種類によって培養菌叢は異なり，シーケンス解析の結果，新規性の高い細菌の存在が示唆された．強酸性条件下で SiO_2 を取り込み，胞子形成により生存する細菌の存在が報告[2] されている点に着目し，種々の環境試料を，SCF 法を用いて，48 h ごとに培地を交換することで培地の pH を 7→1→7 と変化させて培養を行い，培地中の SiO_2 の有無が培養菌叢に及ぼす影響を，PCR-DGGE 法を用いて解析した．その結果，SiO_2 を添加した LB 培地では，pH 1 の条件で 48 h 培養した後，pH 7 で培養すると，培養微生物の多様性が増加したのに対し，コントロールの LB 培地では，培養微生物が検出できなかった．現在，本系を活用した新規微生物の単離培養について検討中である．
1) H28 生物工学会要旨 p. 203
2) Hirota *et al.*: *J. Bacteriol.*, 192, 111-116 (2010).

Cultivation of uncultured microbe under strong acidic condition using SCF method

○Chikara Takano[1], Kouichi Murayama[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Futamura Chemical Co., Ltd.)

Key words acid tolerance, microbial dark matter, specialized cellulose film, uncultured bacteria

2P-J190 振盪フラスコ培養中のフラスコ気相部が培養微生物群集に及ぼす影響の解析

○高橋 将人, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】我々は，土壌試料の振盪フラスコ培養中に新奇な現象[1]を見出した（手作業のサンプリング操作に伴う短時間［30 sec］の無菌的な培養栓の開封により培養微生物群集構造が大きく変化する）．この現象を模倣するために，フラスコ気相部に通気ができる培養システム（AAFS）を開発し集積培養したところ，培養中期から後期に短時間の通気を行うと，培養微生物群集構造が大きく変化することを見出した[2]．さらに，これらの現象を解明するために，振盪培養中に培養栓の開封や振盪の中断を行わずに，フラスコ気相部と培養液の CO_2 と O_2 の連続的なモニタリングと経時的なサンプリングができるシステム（CDMSS）を開発した[3]．今回は，AAFS と CDMSS を併用して新奇な現象が生じるメカニズムの解明を試みた．
【方法および結果】CDMSS と AAFS を併用して土壌試料の振盪培養中にフラスコ気相部に任意の条件で間歇的な通気を行った．その結果，通気直後に一時的な気相部の CO_2 濃度の低下とそれに伴う培養液中の溶存 CO_2 濃度の低下が認められ，その後，溶存 O_2 は枯渇し続け，溶存 CO_2 は高い濃度を維持した（フラスコ気相部への意図的な操作がない control と比べ大きく異なる挙動を示した）．また，通気後に集積される培養微生物群集構造は control とは異なり，培養後期に多様性に富んでいた．種々検討した結果，振盪培養中のフラスコ気相部の CO_2 濃度を間欠的に変化させることは，培養微生物群集構造に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった．
本研究は，新奇な現象が生じるメカニズムの一端を明らかにした初めての報告である．
1）H24 生物工学会要旨 p. 156. 2）H26 生物工学会要旨 p. 248. 3） H28 生物工学会要旨 p. 262.

Analysis of the influence of headspace environment of culture flasks on microbial community in the shake-flask culture

○Masato Takahashi, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words carbon dioxide, DGGE, headspace, shake flask culture

2P-J191 物理的な前処理法を活用した樹皮試料からの新規微生物の培養化

○小林 和輝[1], 村山 晃一[2], 青柳 秀紀[1]
（[1]筑波大院・生命環境, [2]フタムラ化学）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】 従来の寒天平板培養法（AP 法）で培養可能な微生物は，自然界に存在する全微生物の１％前後であり，残された９９％の未培養微生物（microbial dark matter）の培養化による新たな微生物資源開拓が求められている．この現状を踏まえ我々は，特殊セルロースフィルムを用いた培養法（SCF 法）を開発し，新規微生物の分離源として種々の樹皮試料に本法を適用してきた[1)]．本研究では，樹皮試料に前処理を加え，微生物叢を意図的に変化させてから培養することで，未培養微生物の培養化を試みた．
【方法と結果】 植物試料としてヒノキやカエデの樹皮を用いた．試料は（公財）新技術開発財団植物研究園（静岡県熱海市）で採取した．樹皮試料を培養し，獲得した分離株の簡易同定を行ったところ，新規性が高い（16S rDNA の相同性が９０％以下）微生物が複数単離された．樹皮試料をＡＰ法とＳＣＦ法を用いて培養後，得られたコロニーの DNA を抽出し，DGGE 法で培養微生物叢を解析した結果，SCF 法と AP 法で異なる微生物が複数検出された．前処理法として，樹皮試料の懸濁液を孔径 0.8μm と 0.45μm のフィルターで濾過し，サイズの大きな微生物を排除した後，培養した結果，特異的に培養化される微生物が複数存在することが示された．現在，有効な前処理法と改良ＳＣＦ法を組み合わせた新規微生物の取得について検討中である．
１） Ｈ２８ 生物工学会要旨 p. 203

Cultivation of novel microorganisms from tree bark samples utilizing the physical pretreatment.

○Kazuki Kobayashi[1], Koichi Murayama[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Futamura Chemical Co., Ltd.)

Key words microbial dark matter, pretreatment, specialized cellulose film, tree bark

2P-N192 ピルビン酸高生産大腸菌を利用した D-乳酸の生産

○秋田 紘長[1], 中島 信孝[2,3], 星野 保[1,3]
（[1]産総研・機能化学, [2]東工大院・生命理工, [3]産総研・生物プロセス）
h-akita@aist.go.jp

【背景と目的】ピルビン酸は，様々な方法により，多様な化学品原料に変換できる．そのため，ピルビン酸を高生産する大腸菌の作製は，バイオマスを利用した有用物質生産のための基盤技術の構築を可能にする．本研究では，ピルビン酸高生産大腸菌の応用として，ポリマー原料として需要が高まりつつある D-乳酸の生産を行った．
【方法】大腸菌内に存在するピルビン酸代謝関連遺伝子をテトラサイクリン誘導性プロモーター制御下，または破壊することで，それら遺伝子の発現量を著しく低下させて，ピルビン酸を高生産可能な大腸菌を作製した．さらに，ピルビン酸高生産大腸菌体内で D-乳酸脱水酵素を発現させて，D-乳酸生産能を付与した．D-乳酸生産性の高効率化を図るため，培養温度・pH，撹拌速度および空気供給量について検討し，生産条件の最適化を行った．
【結果と考察】D-乳酸生産条件を最適化させることで，生産収率の向上が確認された．また，バイオマスを主成分とする培地を利用して，D-乳酸を生産した．本法で得られる D-乳酸の光学純度は既存の方法に比べて高く，バイオマスの利用技術について産業利用の可能性を示した．

Production of D-lactate using a pyruvate-producing *Escherichia coli* strain

○Hironaga Akita[1], Nobutaka Nakashima[2,3], Tamotsu Hoshino[1,3]
([1]RISC. AIST, [2]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [3]BRI. AIST)

Key words Pyruvate, D-Lactate, D-Lactate dehydrogenase, Corn steep liquor

2P-J193 顕微ラマン分光法を用いた微生物内における生理活性物質の *in situ* 検出

○宮岡 理美[1], 安藤 正浩[2], 細川 正人[2,3], 中島 琢自[4], 松本 厚子[4], 高橋 洋子[4], 濵口 宏夫[5], 竹山 春子[1,2,6]
（[1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]JST・さきがけ, [4]北里大, [5]台湾国立交通大, [6]産総研・早大CBBD-OIL）
haruko-takeyama@waseda.jp

微生物が生産する二次代謝産物は抗生物質や生理活性物質として広く利用されている．しかし，微生物内の二次代謝産物生産を直接的に検出する手法はなく，培養・分離精製などの処理を経て間接的に生産能が評価されてきた．そこで，本研究では，顕微ラマン分光法を用いて，微生物内で生産される生理活性物質の *in situ* 検出を目指した．本手法により生理活性物質の迅速な生産評価が可能になるだけでなく，本手法を新規スクリーニング法として応用することで，難培養性微生物をも対象とした生理活性物質生産菌体に対するスクリーニングが可能となることが期待される．さらに，我々はスペクトル解析手法として多変量スペクトル分解法 (MCR-ALS) を利用した．MCR-ALS により，複雑な生体由来のラマンスペクトルから単一の化合物に由来するスペクトルを抽出することができる．
本研究では，培養株として放線菌，環境微生物として海綿共在微生物を用いた．放線菌では，抗生物質生産誘導培地で培養後の菌体において生体由来のラマンスペクトルから抗生物質由来のラマンバンドが検出された．さらに，ラマンイメージングにより抗生物質が菌糸中で局在していることが明らかとなった．MCR-ALS を用いることで生体成分と重複した位置にバンドが存在する場合でも目的の化合物を検出することが可能となった．この手法を利用して，海綿共在微生物において生理活性物質生産菌体を推定することに成功した．以上の結果から，本手法は抗生物質の生産モニタリングや新規生理活性物質生産菌のスクリーニングなどへの応用に有効であることが示された．

***In situ* detection of bioactive compounds from bacteria by using Raman microspectroscopy**

○Rimi Miyaoka[1], Masahiro Ando[2], Masahito Hosokawa[2,3], Takuji Nakashima[4], Atsuko Matsumoto[4], Yoko Takahashi[4], Hiro-o Hamaguchi[5], Haruko Takeayama[1,2,6]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [3]PRESTO, JST, [4]Kitasato Univ., [5]National Tsing Hua Univ., [6]CBBD-OIL, AIST)

Key words Raman microspectroscopy, bioactive compound, screening

2P-J194 出芽酵母によるフリルアクロレインの変換およびそのメカニズムの検討

○佐藤 守, 大竹 遥, 宮越 俊一
（群馬高専 専攻科）
miyako@nat.gunma-ct.ac.jp

【背景及び目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は cinnamaldehyde から（2*S*, 3*R*）5-phenylpent-4-ene-2,3-diol への立体特異的な還元を触媒することが知られている．我々は，*S. cerevisiae* の pyruvate decarboxylase 遺伝子（*PDC1*）をクローニングし，酵母及び大腸菌で発現させて，この反応が *PDC1* に依存することを明らかにし報告した[1)]．本研究では，cinnamaldehyde 以外の反応基質としてフラン環を有する 3-（2-furyl）acrolein （FA）を用いて，同様の立体特異的な目的代謝物が生じるか確認をし，反応の応用可能性拡大の検討を目的とした．
【方法】 *S. cerevisiae* （こだま酵母）を 1/2YPD 培地中で 28℃，220 rpm で 3 日間培養後，FA を 0.40%，グルコースを 5%の終濃度となるようにそれぞれ添加した．経時的にサンプリングを行い，等量の酢酸エチルを加え抽出，濃縮した．各サンプルを Shim-pack FC-ODS （φ 4.5 mm × 150 mm） カラムを用いた HPLC 条件で分析した．抽出物を分取用シリカゲル TLC およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し，^{1}H-NMR ほか機器分析により構造を確認した．
【結果と考察】 培養経過に伴って基質である FA が減少し，代謝中間体と考えられる 5 種の代謝物が生じた．その後，これらは減少して最終的に 3 種の生成物へと変換された． *S. cerevisiae* は cinnamaldehyde のみならず FA に対しても触媒作用を示すことが確認されたので，これら中間体および変換生成物についてその構造を明らかにしてゆく予定である．さらに， *PDC1* を高発現した大腸菌および酵母を用いて変換特性を比較することにより，その変換メカニズムを解明するとともに，より効率的な変換の実現が可能になると考えている．
1）S. Miyakoshi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 265-267, (2016).

Bioconversion of 3-(2-furyl)acrolein by budding yeast and its mechanism

○Mamoru Sato, Haruka Oodake, Shunichi Miyakoshi
(National Institute of Technology, Gunma College)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, 3-(2-furyl)acrolein, pyruvate decarboxylase, bioconversion

2P-J195 オーランチオキトリウムを原料とした DHA 強化卵産生鶏飼料の開発

○多田 清志[1], 伊藤 順子[1], 吉田 昌樹[2], 渡邉 信[1], 赤上 雅子[3], 石川 恭子[3]
（[1]筑波大・ABES, [2]筑波大院・生命環境, [3]茨城畜産セ）
tada.kiyoshi.gu@u.tsukuba.ac.jp

【目的】従属栄養性藻類オーランチオキトリウムは DHA 生産能を有し藻体内に蓄積可能である．一方，鶏卵産業では配合飼料の価格の高騰及び消費者ニーズの多様化（健康志向・安全性）等から鶏卵の高付加価値化が求められている．本研究では，藻類由来の DHA 強化鶏卵を効率的に生産するために，安価な培地成分を用いた流加培養よるオーランチオキトリウムの大量生産を検討し，また培養で得られた藻体を添加した配合飼料を作製し給餌試験を行い，その移行性について実証試験を行った．
【方法・結果】藻体は *Aurantiochytrium limacinum* 4w-1b 株を用いた．この株は N 源枯渇により藻体内に DHA を蓄積する．GTY 培地 2L を含む 5L ジャーファーメンターを用い検討を行った．N 源枯渇後も Glc を流加した結果，乾燥藻体濃度及び DHA 濃度はそれぞれ 72.2 g/L 及び 15.2 g/L に達し，両者ともに回分培養の値の約 5 倍になった．このことから，4w-1b 株を用いた DHA 生産では N 源枯渇後の C 源の供給により DHA 生産が向上することがわかった．次に，仕込み及び流加用 N 源をそれぞれコーンスティープリカー（CSL）及び味液（醤油の原料）とし，安価な N 源を流加し藻体を増加させ，N 源枯渇後に DHA 生産を行う二段階培養を検討した．その結果，培養 120h で乾燥藻体濃度 147.6 g/L，DHA 濃度 12.1 g/L となり，GTY 培地と同等の培養結果が得られることがわかった．また，本藻体を 5% 配合した飼料を作製し給餌試験を行ったところ，給餌 3 d から卵黄に飼料中の DHA が移行し，13 d で最大移行率 81.7%を示し 299 mg-DHA/100 g-egg の DHA 強化卵が得られた．これは，藻体無添加の場合の約 5.4 倍の DHA 量に相当し，市販の DHA 強化卵と同等の DHA 含有率であった．以上のことから，CSL 及び味液は流加培地の N 源として適しており，オーランチオキトリウムは DHA 強化卵産生の飼料添加剤として効果的であることが明らかとなった．

Development of livestock feed for hen laying DHA component-conteining egg using *Aurantiochytrium* sp.

○Kiyoshi Tada[1], Jyunko Ito[1], Masaki Yoshida[2], Makoto Watanabe[1], Masako Akagami[3], Kyouko Ishikawa[3]
([1]ABES, Tsukuba Univ., [2]Grad. Sch. Life. Environ. Sci., Tsukuba Univ., [3]Ibaraki Pref. Livest. Res. Center)

Key words *Aurantiochytrium*, DHA, livestock feed, egg

2P-J196 高光学純度（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸を用いた高分子の開発とその生分解

○常盤 豊[1], 中山 敦好[1], 川崎 典起[1], 山野 尚子[1], 伊田 小百合[1], 楽 隆生[2], 世嘉良 宏斗[3]
（[1]産総研, [2]甲南化工, [3]沖縄県工技セ）
y.tokiwa@aist.go.jp

【背景と目的】 最近，マイクロプラスチック汚染が，海洋生態系や人の健康への驚異になってきている．マイクロプラスチック汚染を解決する一つの切り札として，海でも分解しやすいポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）が注目される．しかし，PHB やその共重合体は，菌体内に蓄積されるため，微生物由来の不純物を含むなどの問題があり，未だ普及していない．我々は，*Halomonas* sp. OITC1261 株が菌体の外に生産し，精製が容易な(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R-3HB）を用いて，すでに，エチレングリコールを開始剤とした R-3HB 重合体（ポリ R-3HB ジオール）を化学合成してその生分解性について報告した．今回，R-3HB を用いて，グリコール酸との共重合体やポリウレタンを開発し，それらの生分解性について調べた．
【方法】 光学純度 99.0% ee 以上 の R-3HB を用いた．R-3HB とグリコール酸からなる共重合体は，トルエン中で脱水重合により合成した．また，ポリウレタンはポリ R-3 HB ジオール(重量平均分子量 *M*w 4200) とヘキサメチレンジイソシアネートを反応させて合成した．重合体の生分解性は，PHB 分解酵素と，海水を用いて BOD テスター F200 により評価した．
【結果】 R-3HB とグリコール酸をモル仕込み比 95:5，90:10，80:20，50:50，20:80，10:90，0:100 で反応した共重合体の *M*w は，それぞれ 6460，6160，9610，13400，21500，8380，5490 であった．仕込み比が 80:20，50:50 および 20:80 の場合，非晶性の比較的大きい分子量の共重合体が得られた．PHB 分解酵素による分解速度は，グリコール酸の仕込み比が大きくなると著しく減少した．一方，グリコール酸の仕込み比が大きい共重合体は，非酵素的な加水分解速度が増大した．さらに，海水による分解性試験では，合成したポリウレタンの PU-1(*M*w 15400)と PU-2(*M*w 22200)は，PHB と同等の高い生分解性を示すことを見出した．

Development and biodegradation of polymers using (*R*)-3-hydroxybutyric acid of high optical purity

○Yutaka Tokiwa[1], Atsuyoshi Nakayama[1], Norioki Kawasaki[1], Naoko Yamano[1], Sayuri Ida[1], Takao Raku[2], Hiroto Yokaryo[3]
([1]AIST, [2]Konan Chemical Ind. Co., Ltd., [3]Okinawa Ind. Technol. Center)

Key words 3-hydroxybutyric acid, glycolic acid, polyurethane, biodegradation

2P-J197 *Halomonas* sp. OITC1261 株による高光学純度（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸の好気的発酵生産

○世嘉良 宏斗[1], 照屋 盛実[1], 花城 隆二[1], 合田 雅浩[1], 常盤 豊[2]
（[1]沖縄県工技セ, [2]産総研・バイオメディカル）
yokryouh@pref.okinawa.lg.jp

（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸（3-HB）はヒトの体内では肝臓で合成されるケトン体と呼ばれる物質のひとつで脳のエネルギー源となるほか，認知機能改善などの機能も報告されている．また 3-HB は生分解性樹脂として知られるポリヒドロキシ酪酸（PHB）の構成単位であり，そのエステル結合部位は優れた生分解性を示すことから，機能性樹脂原料としても注目されている．3-HB は食品・医療・化学などの幅広い分野で機能性原料として注目されており，大量生産技術は確立されていない．光学活性体である 3-HB の生産については微生物が菌体内に蓄積させた PHB を加水分解して得る方法が検討されてきた．しかし菌体内に蓄積できる PHB 量には限界があるため，生産性向上ためには PHB 分解工程を必要とせずに直接 3-HB を生産する菌株が必要となる．そこで我々は 3-HB を効率的に生産する微生物を探索し，好気条件下で高濃度の 3-HB を生産する野生株 *Halomonas* sp. OITC1261 を見いだした．OITC1261 株は様々な炭素源から 3-HB の生産が可能で，2L スケールの培養試験ではスクロースから 50g/L を超える濃度で生産することができる．
本研究では OITC1261 株による 3-HB 発酵生産の実用化に向けたスケールアップ試験の結果を報告する．90L の培養装置を用いた試験ではスクロースを炭素源とする培地 40L を用いて好気培養（80L/min，500rpm）を行った結果，65 時間後には培養液中に 100g/L の 3-HB を生産した．3-HB の生産と同時に菌体内に蓄積した PHB の菌体重量割合は 17 時間後には 62%に達し，培養終了時まで 60%以上を維持していた．さらに，1,000L 培養装置（培地 400L）を用いた試験においても好気培養による 3-HB の生産速度は 1.01g/L/h で良好な値を示した．また，発酵液中から回収・精製した純度 98％以上の 3-HB をキラル分析（HPLC 法）した結果，*S* 体は検出されず，高い光学純度の *R* 体であることが分かった．

Production of (*R*)-3-hydroxybutyric acid of high optical purity by *Halomonas* sp. OITC1261 under aerobic conditions

○Hiroto Yokaryo[1], Morimi Teruya[1], Ryuji Hanashiro[1], Masahiro Goda[1], Yutaka Tokiwa[2]
([1]Okinawa Ind. Technol. Cent., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words 3-hydroxybutyric acid, fermentation, aerobic culture, *Halomonas*

2P-J198 低温菌を活用したシンプル酵素触媒によるマンニトールの効率的変換

○冨田 晃佑[1], 田島 誉久[1], 渡邉 研志[1], 秋 庸裕[1], 岡村 好子[1], 松村 幸彦[2], 中島田 豊[1], 加藤 純一[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工）
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】低温菌を用いたシンプル酵素触媒は，中温菌由来の酵素を発現させた低温菌を熱処理するという簡便な操作で低温菌由来の代謝酵素の失活による副産物生成の抑制と基質の膜透過性向上により効率的な変換が可能な触媒である．これまでに低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を用いてマンニトールをフルクトースに変換する触媒を構築し，生成されたフルクトースはシンプル酵素触媒により消費されないことを確認している．本研究では，低温菌を活用したシンプル酵素触媒を用いて海洋大型藻類の主成分であるマンニトールを，高度不飽和脂肪酸を生産するラビリンチュラ類が資化できる糖類への効率的な変換を目的とした．

【方法及び結果】*S. livingstonensis* Ac10 に中温菌由来のマンニトールデヒドロゲナーゼと NAD 再生系酵素として NADH オキシダーゼを発現させたシンプル酵素触媒を用いてマンニトールの変換反応を行ったところ，フルクトースが高収率で得られた．また，昆布由来のマンニトールからも同様にフルクトースが生成された．試薬マンニトールを基質として反応を行った際，補酵素再生系の中間体としてマンニトールデヒドロゲナーゼを阻害する過酸化水素が生じたが，昆布抽出液を基質とした場合，過酸化水素はごく微量しか検出されなかった．さらに，シンプル酵素触媒により変換されたフルクトースを基質として，ラビリンチュラ類の培養を行った結果，試薬フルクトースと同様に昆布由来のマンニトールから変換されたフルクトースでもラビリンチュラ類の増殖を確認した．現在，マンニトール変換プロセスの検討を行っている．

Efficient conversion of mannitol derived from brown seaweed by the psychrophile-based simple biocatalyst

○Kousuke Tomita[1], Takahisa Tajima[1], Kenshi Watanabe[1], Tsunehiro Aki[1], Yoshiko Okamura[1], Yukihiko Matsumura[2], Yutaka Nakashimada[1], Jyunichi Katou[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words psychrophile, mannitol, D-fructose, simple biocatalysis

2P-J199 *Citrobacter* 属細菌の生産するキトサン様バイオ凝集剤の中空糸膜による濃縮

○武尾 正弘[1], 長山 尚輝[1], 木村 和幸[2], バランワル プリヤンカ[1], 柏 雅美[1], 加藤 太一郎[3], 根来 誠司[1]
（[1]兵庫県大院・工, [2]（株）兵庫分析センター, [3]鹿児島大院・理工）
takeo@eng.u-hyogo.ac.jp

我々のこれまでの研究により，*Citrobacter* 属細菌の菌株の中に，強い凝集活性を有するキトサン様多糖を培地に分泌する菌株が存在することを明らかにした．本研究では，このキトサン様バイオ凝集剤の実用生産を目指し，その低エネルギー回収法として，中空糸膜による濃縮について検討を行った．
我々の保有する５株の高い凝集活性を示す菌株を酢酸培地で培養し，培地中に生産されるキトサン様多糖をエタノール沈殿などで回収し，その分子サイズをゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ，いずれも分子量数万から数千万に及ぶ幅広い分子量分布を持つものであることが明らかになった．また，そのピークトップは分子量１66万以上にあった．この多糖の低エネルギー濃縮法として，3 種の親水性素材の中空糸膜モジュール（100kDa 分画）を用いて濃縮を行ったところ，容易に 100 倍程度の濃縮が可能であり，その活性の回収率も 90％以上で大きな活性損失は認められなかった．そこで，成績の良かった PES 製の 100kDa, 300kDa, 500kDa 分画の中空糸膜モジュールを用いて濃縮を試みたところ，300kDa 及び 500kDa 分画の膜モジュールでは，数％の活性が濾液側に移行したが，100kDa 分画のモジュールでは完全に濃縮側に活性が残った．フラックスは，１回目の濃縮で大きくダウンするが，２回目以降の繰り返し濃縮で大きく落ちることはなく，繰り返し使用が可能と判断した．また，膜面積 5000cm^2 にいたる中規模中空糸膜モジュールへの移行を実施し，この規模で実用的な濃縮が可能であることがわかった．

Concentration of chitosan-like bioflocculant from *Citrobacter* strains using hollow fiber membranes

○Masahiro Takeo[1], Naoki Nagayama[1], Kazuyuki Kimura[2], Priyanka Baranwal[1], Masami Kashiwa[1], Dai-ichiro Kato[3], Seiji Negoro[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Hyogo, [2]Hyogo Analysis Center Co. Ltd, [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Kagoshima Univ.)

Key words bioflocculant, chitosan-like biopolymer, *Citrobacter*, hollow fiber membrane

2P-J200 ホモ三量体ファイバータンパク質 AtaA の菌体外分泌生産の検討

○唐鎌 智也[1], 石川 聖人[1], 石井 慧[1], 吉本 将悟[1,2], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

背景・目的
グラム陰性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 は，細胞表層上のファイバータンパク質 AtaA を介して様々な材質の固体表面へ強固に付着する．以前の研究において，細胞から切り離された AtaA ファイバーも接着性を保持していることが分かり，AtaA は新たな接着材料として利用できる可能性が示された [1]．有用な AtaA タンパク質を大量に得るために，我々はタンパク質の大量生産に汎用される菌体外発現に着目した．しかし，複雑なホモ三量体構造の AtaA を菌体外で発現させることは容易ではないと想定される．本研究では，AtaA の組換えタンパク質を用いて，菌体外で AtaA の三量体形成が可能であるかを調べた．
方法・結果
大腸菌発現系において三量体形成が確認されている組換えタンパク質（Nhead-AtaA）を菌体外発現系に適用することにした．菌体外発現系には *Brevibacillus* Expression System (タカラバイオ)を用いた．製品マニュアルに従って Nhead-AtaA の N 末端側には分泌シグナル配列を付加し，得られたプラスミドで *B. choshinensis* を形質転換した．また，Nhead-AtaA の三量体形成を促進する目論見で，C 末端側に GCN4 タグを導入した．
得られた *B. choshinensis* 形質転換体を培養したところ，培養液上清に Nhead-AtaA の発現を確認することができた．回収した Nhead-AtaA をゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ，三量体の形成が示唆された．また，精製タンパク質の CD スペクトルおよび動的光散乱解析の結果，正しい立体構造を形成していることがわかった．我々の知る限り，複雑な多量体ファイバータンパク質を菌体外発現させた事例は本研究が初めてである．

[1] Yoshimoto, S. *et al., Sci Rep.* 6, 28020 (2016).

Investigation of extracellular expression of a homo trimeric fiber protein AtaA

○Tomoya Karakama[1], Masahito Ishikawa[1], Satoshi Ishii[1], Syogo Yoshimoto[1,2], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]VBL, Nagoya Univ.)

Key words *Brevibacillus choshinensis*, trimeric autotransporter adhesin, extracellular expression, nanofiber protein

2P-J201 低分子化抗体精製用アフィニティークロマト担体の機能評価

○西八條 正克[1,2], 村田 大[1,2], 吉田 慎一[1,2], 水口 和信[1,2]
（[1]（株）カネカ, [2]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
Masakatsu.Nishihachijo@kaneka.co.jp

【背景と目的】
低分子化抗体は，Fab や scFv に代表されるような多様なフォーマットがあり，次世代型抗体医薬品や検査診断薬として開発が進められている．これまでは汎用性のある高性能な低分子化抗体精製用のアフィニティー担体が入手できなかったことから，品目毎にイオン交換担体等を組み合わせた複雑な条件設定が必要であり，プロセス開発に時間と労力を要することが課題であった．我々は，低分子化抗体の精製工程のプラットフォーム化の確立を目指し，Fab 結合能が高い改変型プロテイン G および抗体結合スペクトルの広い改変型プロテイン L をそれぞれセルロース基材に固定化した KANEKA KanCap™ G と KANEKA KanCap™ L を開発した．今回，これらの担体の基本性能と培養液を用いた実使用条件での性能評価を行った．
【方法と結果】
KANEKA KanCap™ G は，市販のモノクローナル抗体から調製した 3 種類の Fab について，市販の PG 担体（2 種類）と比較して，いずれの Fab にも 2 倍以上高い動的結合容量を示した．酵母培養上清中に発現させた Fab を精製したところ，高結合容量と高回収率により，市販担体に比べ約 6 倍高い生産性で Fab が精製できた．また，不純物である軽鎖ダイマーが効率良く除去され，1 段のクロマトで高純度精製が可能であった．KANEKA KanCap™ L も，市販の PL 担体と比較して，高い Fab 結合容量を示し，市販品では動的結合容量が 3 mg/mL であった Fab に対して，25 mg/mL と約 8 倍高い結合容量を示した．本発表では，上記 Fab の精製に対する性能に加え，その他のフォーマットの低分子化抗体の精製結果についても報告する予定である．

Functional evaluation of affinity chromatography resins for antibody fragments purification

○Masakatsu Nishihachijo[1,2], Dai Murata[1,2], Shinich Yoshida[1,2], Kazunobu Minakuchi[1,2]
([1]Kaneka Corporation, [2]Manufacturing Technology Association of Biologics)

Key words Protein G, Protein L, affinity chromatography, antibody fragments

2P-N202 新規プロテイン L アフィニティー充填剤の抗体との結合親和性解析と機能評価

○小林 秀峰[1], 松葉 隆雄[1], 円谷 健[2], 藤井 郁雄[2]
（[1]東ソー, [2]阪大院・理）
hidetaka-kobayashi-ey@tosoh.co.jp

【背景】近年，抗体医薬品分野では，薬剤複合抗体，二重特異性抗体，一本鎖抗体断片（scFv），抗体断片（Fab）などの多様な抗体構造の開発が活発になっている．通常抗体（IgG）は Fc 領域を持つため，プロテイン A 充填剤を用によるアフィニティー精製が広く利用されているが，多様化する抗体開発において Fc 領域を含まない構造の抗体もある．そこで，我々は改良組換えプロテイン L をリガンドとした新規プロテイン L 充填剤「TOYOPEARL® AF-rProtein L-650F」を開発，商品化した．本商品は，市販プロテイン L 充填剤と比較して，高い吸着量とアルカリ安定性能を持ち，κ 軽鎖を含む抗体や抗体断片などに対して効率的な精製を可能にすることが示された．天然型プロテイン L は，κ 軽鎖に結合するとされているが，一部の κ 軽鎖サブグループはプロテイン L と結合しないことが報告されている．本商品の改良組換えプロテイン L とヒト抗体の κ 軽鎖の各サブグループに対する結合性やマウス抗体に対する結合性の詳細は不明であった．
【評価・結果】ヒト抗体の配列を抗体データベースから抽出し，全サブグループの scFv を設計し，動物細胞発現系で産生させた scFv を用いて，本商品との結合性を評価した．その結果，改良組換えプロテイン L は野生型と一致した選択性を示し，さらに未報告であったサブグループの結合性も明らかになった．さらに κ 軽鎖のフレーム I 領域の一部のアミノ酸を改変した scFv に対する結合性評価から，改良組換えプロテイン L と κ 軽鎖フレーム I 領域の結合に関与するアミノ酸が明らかとなり，天然型プロテイン L に対するアミノ酸と同様であることが示唆された．またマウス抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を用いた結合性と配列解析から，マウス抗体もヒト抗体と同様にフレーム I 領域のアミノ酸が結合に関与していることが推定された．

Functional evaluation and affinity analysis for antibodies of a novel protein L chromatography resin.

○Hidetaka Kobayashi[1], Takao Matsuba[1], Takeshi Tsumuraya[2], Ikuo Fujii[2]
([1]Tosoh Corp., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

Key words Protein L chromatography, affinity purification, antibody fragments, amino acid sequence

2P-J203 ムコン酸生産の律速反応である “Protocatechuate decarboxylase” を活性化する因子の機能解明

○尾形 拓哉, 栗本 祐樹, 園木 和典
（弘前大院・農生）
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【背景】ムコン酸は樹脂や繊維の合成原料へと展開できる基幹化合物である．植物バイオマスからムコン酸を効率よく生産するためには Protocatechuate decarboxylase (Pdc) 反応の高活性化が必要であり，我々はこれまでに，Pdc と共に 4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit B (KpdB) を発現することが，Pdc 活性を約 20 倍と飛躍的に向上させることを明らかにした(1)．本研究では KpdB の機能について解析を進め，Pdc 反応機構を明らかにすることを目的とした．
【結果と考察】KpdB のアミノ酸配列は，*Escherichia coli* 由来の Flavin prenyltransferase (UbiX) のアミノ酸配列と 49%の相同性を示した．近年 UbiX が 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase (UbiD) の補酵素として prenylated FMN (prFMN) を合成することが報告されたことから(2)，KpdB も同反応を触媒し，Pdc が prFMN を補酵素として利用することが推測された．ubiX::Km 遺伝子型を保持する E. coli JW2308 株において Pdc を発現した結果，Pdc 反応は進行しなかったが，Pdc と UbiX を発現した JW2308 株形質転換体においては Pdc 反応が進行したことから，Pdc 反応は UbiX により合成される prFMN を要求する反応であることが明らかとなった．また，Pdc と KpdB を発現した JW2308 株形質転換体においても Pdc 活性が確認されたことから，KpdB は UbiX と同様に prFMN を合成することが示唆された．さらに，JW2308 株は親株である BW25113 株と比較して μ_{max} が約 1/2 に低下したが，UbiX または KpdB の発現によって μ_{max} が回復したことから，KpdB は UbiX と同様の Flavin prenyltransferase であることが強く示唆された．
本研究の一部は科学研究費補助金, 野田産研研究助成, 弘前大学若手研究者支援事業の支援を受けて実施した．
(1)今ら，第 67 回日本生物工学会大会，2015．(2)White M. D，et al. Nature. 522, 502-506，2015

Characterization of the enhancer-like factor of Protocatechuate decarboxylase, a bottleneck in muconic acid production.

○Takuya Ogata, Yuki Kurimoto, Tomonori Sonoki
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)

Key words muconic acid, protocatechuate decarboxylase, flavin prenyltransferase

2P-N204 タンパク質成分の導入による酸化還元応答性ハイドロゲルの細胞培養基材としての機能化

○神谷 典穂[1,2], 濱田 祐成[1], 香川 元気[1], 南畑 孝介[1], 若林 里衣[1], 後藤 雅宏[1,2]
（[1]九大院・工, [2]九大・未来化セ）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

生体外で生体類似の環境を構築可能なハイドロゲルは，細胞培養のための足場材料として広く利用されている．本研究では，ハイドロゲル中へのタンパク質成分の効果的な組み込みを通して，細胞培養における機能性足場材料としての酸化還元応答性ハイドロゲルの作製を目標とした．ハイドロゲルの形成には，チオール (SH) 基を有する高分子，フェノール誘導体，西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の各水溶液を混合し，常温・過酸化水素フリーでジスルフィド結合を介してゲル化反応を進行させる HRP 触媒による独自の手法 [1] を採用した．
まず，細胞接着性の導入に際し，既往の報告に基づきゼラチン (Gel) を選択した．これに SH 基を化学修飾した Gel-SH をハイドロゲルネットワーク中に組み込むことで，接着性細胞をハイドロゲル上で培養することができた．さらに，SH 基を化学修飾したヘパリンの導入を介した増殖因子の固定化が，細胞増殖挙動に与える影響を評価した．次に，ゲル中への機能性分子の固定化に際し，Cys 残基を導入した組換えストレプトアビジン (C-SA [2]) を選択した．これに SpyCatcher-SpyTag (SC-ST) システムの機能を導入した組換え C-SA-SC 融合タンパク質を調製し，ハイドロゲル中に固定化された当該融合タンパク質を反応点として，avidin-biotin 相互作用，SC-ST 間の共有結合形成の２つの異なる固定化機構に基づくハイドロゲルの機能化に成功した．
【参考文献】[1] Moriyama et al., Chem. Commun, 50, 5895-5898 (2014); [2] Mishina et al., Biomacromolecules, 17, 1978-1984 (2016)

Functionalization of redox-responsive hydrogel with biologically active proteinaceous units for cell culture

○Noriho Kamiya[1,2], Yusei Hamada[1], Genki Kagawa[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]CFC, Kyushu Univ.)

Key words cell, enzyme, protein engineering, hydrogel

2P-J205 神経筋接合部解析のための細胞アッセイデバイスの開発

○山岡 奈央[1], 清水 一憲[1], 今泉 裕[1], 伊藤 卓治[2], 岡田 洋平[2], 本多 裕之[1,3]
（[1]名大院・工, [2]愛知医大・神経内科, [3]名大・予防早期医療創生セ）
honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】神経筋疾患では，運動神経細胞や骨格筋細胞の変性，あるいはそれらの接着部である神経筋接合部の異常により，生命をも脅かす進行性の運動機能障害がもたらされる．これまでに神経筋疾患の発症メカニズム解明を目指し，運動神経細胞と筋管細胞を別々の領域で培養し，その間を神経軸索だけが通ることができるマイクロ流路でつなげたマイクロデバイスが開発されている．しかし，従来のデバイスは閉鎖系であり，標的とした一細胞の採取および解析が困難であった．そこで本研究では，標的細胞の採取・解析を可能にするマイクロデバイスの開発を行った．
【方法】デバイスはマイクロパターン化基板を鋳型にポリジメチルシロキサンで作製した．軸索用マイクロ流路でつながった 2 つの細胞培養チャンバーがあり，細胞採取を可能にするため，それぞれのチャンバー上部を開放系とした．また筋管細胞同士の重なりを防ぐため骨格筋細胞用チャンバーの幅を狭くし，筋管細胞の向きをそろえて培養した．
【結果と考察】開発したデバイス上で，ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞とマウス骨格筋筋芽細胞との共培養を行った．運動神経細胞播種 4 日目で筋管細胞側に軸索が到達した．共培養 10 日目で運動神経細胞軸索と筋管細胞のアセチルコリン受容体の重なりが観察され，デバイス上での神経筋接合部の形成に成功した．さらに遺伝子改変細胞を用いることで，神経筋接合部のライブイメージングにも成功した．次に，標的細胞を採取する実験を行った．マニピュレーターに装着したガラスキャピラリーを用いて，狙った一細胞を採取することに成功した．今後，これらの技術を応用し，神経筋接合部の変性メカニズム解明を目指す．

Development of cell assay devices for neuromuscular junction analysis.

○Nao Yamaoka[1], Kazunori Shimizu[1], Yu Imaizumi[1], Takuji Ito[2], Yohei Okada[2], Hiroyuki Honda[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Aichi Med. Univ., [3]PME, Nagoya Univ.)

Key words microdevice, cell assay, co-culture, neuromuscular junction

2P-J206 B 型肝炎ウイルス由来ペプチドを用いた AFM による肝細胞の受容体検出

○西田 真一朗[1], 竹中 武蔵[1], 森田 健太[2], 西村 勇哉[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[3]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大研究基盤センター, [3]神戸大院・イノベ）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

B 型肝炎ウイルスの感染においては，表面抗原が肝細胞の受容体と結合し，エンドサイトーシスが引き起こされている可能性が高い．現在，B 型肝炎ウイルスの表面抗原にある PreS1 領域中の 21-47 アミノ酸残基が肝細胞の受容体と結合することが報告されている．また，プラストサーチを用いた方法によって，この 21-47 アミノ酸残基と結合するタンパク質が探索され，インターロイキン 6 やリポタンパクリパーゼが確認されている．しかし，これらが実際に感染機構に関与するかは不明である．そのため，感染機構を明らかにするには肝細胞の受容体や媒介する物質を特定する必要がある．そこで本研究では実際に肝細胞モデルである肝癌細胞(HepG2)を固定化しその表面との相互作用が検出可能な原子間力顕微鏡（AFM）を用いた．つまり PreS1 ドメインを AFM のカンチレバーに修飾し，細胞表面との相互作用を測定することで感染機構に関与する受容体の検出を目指した．
蛍光プローブと AFM によるアプローチを可能とするため GFP を融合させた PreS1S2GFP を作製した．作製した PreS1S2GFP と肝細胞表面受容体の平衡状態での相互作用の評価を行うために，HepG2 及びコントロールとして膵臓腺癌細胞(BxPC3)を対象としフローサイトメトリー(FACS)を用いて蛍光強度の解析をおこなった．同様に相互作用の速度論的評価をおこなうために AFM のカンチレバーに PreS1S2GFP を修飾し，HepG2 及び BxPC3 の相互作用の測定を行った．FACS を用いた解析では HepG2 の蛍光強度が最大で BxPC3 の蛍光強度の二倍となり，PreS1S2GFP の HepG2 に対する特異的な結合を確認できた．また AFM を用いた測定では，BxPC3 表面で観測された相互作用が 30~160 (pN)であり，HepG2 表面で観測された相互作用が 10~250 (pN)でありより大きな相互作用が HepG2 表面で観測された．これらの結果から肝細胞表面受容体の検出が示唆された．

Detection of hepatic receptor by atomic force microscopy using hepatitis B virus- derived peptide

○Shinichiro Nishida[1], Musashi Takenaka[1], Kenta Morita[2], Yuya Nishimura[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[3]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Inst. Anal. Div., Kobe Univ, [3]Grad.sch.sci.Tech.Innov.,Kobe Univ)

Key words Atomic Force Microscopy, flow cytometry, Hepatic receptor, PreS1S2GFP

2P-J207 B 型肝炎ウイルスの新規細胞接着ドメインの同定及び DDS への応用

○劉 秋実[1,2], 曽宮 正晴[1], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大・産研, [2]阪大院・生命機能）
akinomi101044@sanken.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】バイオナノカプセル（BNC）は，B 型肝炎ウイルス（HBV）のヒト肝臓特異的感染機構を担う外皮 L タンパク質を出芽酵母で発現させることにより得た直径約 50 nm の中空ナノ粒子である（山田ら，NBT 2003; 曽宮と黒田，ADDR 2015）．近年，HBV 受容体として NTCP（Na-taurocholate co-transporting protein）が同定されたが，我々のミリストイル化 BNC（HBV モデル）を用いた解析では，細胞表層 NTCP は細胞内侵入過程に無関係で，ヘパリンにより強く阻害された（曽宮ら，Virology 2016）．本研究では，細胞表層の非 NTCP・HBV 受容体の同定を目指す．
【方法と結果】NTCP リガンドで HBV 感染を阻害するミリストイル化 pre-S1 領域ペプチド（myr-2-47）を中性リポソーム（LP）表層に提示した後，ヒト肝癌由来細胞 HepG2 への侵入過程を解析したところ，myr-2-47 提示 LP は，NTCP と関係なく HepG2 細胞内部に取り込まれた．欠失変異ペプチド解析から，HepG2 細胞との結合並びに細胞内侵入活性の中心は（30-42）にあり，（myr-2-47）よりも強く，ヘパリンにより阻害された．また，比較的，ヒト肝臓特異的な結合能を示した．さらに，各 HBV genotype の pre-S1 領域の中で（30-42）は高度に保存されていた．以上から，本領域が細胞表層のヘパラン硫酸依存的・非 NTCP な HBV 受容体結合部位であり，細胞表層では同受容体は NTCP よりも優先的に HBV と結合すると推察された．また，30-42 提示 LP は，従来（myr-2-47 提示 LP 等）と異なり効率の良い HBV 感染機構を模倣したナノキャリアになる可能性を示していた．

Identification of novel cellular binding and entry domain of hepatitis B virus

○Qiushi Liu[1,2], Masaharu Somiya[1], Shun'ichi Kuroda[1,2]
([1]ISIR, Osaka Univ, [2]Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)

Key words Bio-nanocapsule, hepatitis B virus, heparan sulfate proteoglycan, peptide

2P-J208 抗体提示型 GL-Virosome によるマクロファージ特異的薬剤送達法の開発

○李 昊[1,2], 立松 健司[1,2], 曽宮 正晴[1,2], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大・産研, [2]阪大院・生命機能）
skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp

バイオナノカプセル（BNC）は，B 型肝炎ウイルスの外皮 L タンパク質を出芽酵母で発現することにより得られた直径約 30 nm の中空ナノ粒子で，ヒト肝臓特異的なドラッグデリバリーシステムである（山田ら，*Nat. Biotech*. 2003）．ヒト肝臓以外への送達を狙い，L タンパク質の肝臓認識ドメインを Protein G の IgG Fc 領域結合ドメインと Protein L 由来の IgG Fab 領域結合ドメインのタンデム配列に置換した GL-BNC を作製した．マウス IgG2a 提示型 GL-BNC は，マクロファージ RAW264.7 及び樹状細胞 DC2.4 に効率よく取り込まれることがフローサイトメトリー解析及び共焦点レーザー顕微鏡観察により示され，ファゴサイトーシス阻害剤により同細胞内取込みが顕著に抑制されることが判明した．次に薬剤搭載用リポソームを GL-BNC と融合させた GL-Virosome を作製し，マウス IgG2a を提示させたところ，マクロファージ RAW264.7 に効率よく取込まれた．また，マウスにクロドロン酸（マクロファージの選択的排除に用いられる ATP 類似体）を内封したマウス IgG2a 提示 GL-Virosome を静脈内投与すると，肝臓及び脾臓におけるマクロファージマーカー（F4/80，CD68）の mRNA 量が減少した（現在，肝臓及び脾臓の免疫染色を行いマクロファージ特異的な細胞毒性が発揮されているか確認中である）．本研究により，抗体提示型 GL-Virosome は従来型リポソームよりもマクロファージ特異的薬剤送達において優れていることが示唆された．本マクロファージ標的化 DDS 技術は，マクロファージが関与する骨粗しょう症，動脈硬化，がん等に対する新しい治療法に応用できる可能性がある．

Development of antibody-displaying GL-virosome for macrophage-specific drug delivery

○Hao Li[1,2], Kenji Tatematsu[1,2], Masaharu Somiya[1,2], Shun'ichi Kuroda[1,2]
([1]Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ., [2]FBS, Osaka Univ.)

Key words drug delivery system, antibody, macrophage, phagocytosis

2P-J209 数理システム生物学に基づく黄色ブドウ球菌病原性発現兆候の早期特定と早期治療

○濱田 浩幸[1,2], 浅村 健太[2], 出口 真里[2], 岡本 諒太[2], 花井 泰三[1,2], 岡本 正宏[1,2]
（[1]九大院・農, [2]九大院・シス生科）
hamada@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】 黄色ブドウ球菌は留置式医療器具や植込み型医療機器の出口部周辺に常在細菌叢を形成し，肺炎，髄膜炎，敗血症などの致死的感染症を引き起こす原因菌として知られている．黄色ブドウ球菌の病原性発現は Accessory Gene Regulator（AGR）system の正のフィードバック機構により活性化されるため，重症化を回避するには，病原性発現の早期発見と早期治療が極めて有効となる．しかしながら，病原性発現兆候を特定する手段は未だ確立されていない．本研究では，数理システム生物学の観点から，病原性発現兆候を追究し，その兆候の出現を抑制する手法を探索した．
【方法】 Miller ら，Jabbari ら，Gustafsson らの生物学的知見に基づいて，クオラムセンシングにより静菌状態から病原性発現状態へ遷移する黄色ブドウ球菌多細胞系の数理モデルを構築し，病原性発現動態の確率的数値シミュレーションを実践した．次に，安定性解析を用いて，病原性発現レベルの変動と状態遷移の関係を精査し，病原性発現兆候を特定した．最後に，兆候の出現を阻害または遅延させる治療標的を感度解析により得た．
【結果と考察】 AGR system の構成要素レベルの経時変化はシグモイダル挙動を示し，そのレベルのゆらぎは病原性発現の前に極大値を呈した．次に，安定性解析により，ゆらぎのピーク時刻は状態遷移の臨界点であること，ゆらぎの極大化は病原性発現兆候であることが示された．そして，感度解析により，病原性発現兆候の出現を阻害または遅延させるいくつかの細胞外生化学反応過程が特定され，これらを標的にした併用療法は抗生物質を適用することなく黄色ブドウ球菌の病原性発現を阻害する可能性が示唆された．これらの解析結果は，静菌状態から病原性発現状態への遷移を阻止する新しい治療概念であり，種々の感染症の発症制御への応用が期待できる．

Early detection and early treatment for *Staphylococcus aureus* pathogenic expression based on mathematical systems biology

○Hiroyuki Hamada[1,2], Kenta Asamura[2], Mari Deguchi[2], Ryota Okamoto[2], Taizo Hanai[1,2], Masahiro Oakamoto[1,2]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words *Staphylococcus aureus*, stochastic mathematical analysis, pathogenic expression, symptom

2P-N210 ポリウレタンナノファイバー表面へのタンパク質吸着挙動の解析とその構造および活性変化の評価

○森田 祐子[1], 坂元 博昭[1,2], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大学・生命セ）
hi-saka@u-fukui.ac.jp

【背景と目的】 ポリウレタン（PU）は本来，フィルム形状ではタンパク質吸着抑制能を有する高分子材料として知られており，人工血管などの生体材料として応用されている．この PU をナノファイバー形状にすると，表面構造が分子レベルで変化することを，以前に我々のグループで見出した．形状を変えることで，表面構造が変化したことから，本来のタンパク質が吸着しにくいという表面物性に影響を与えるのではないかと考えた．そこで，本研究では，PU ナノファイバー表面へのタンパク質吸着挙動を評価し，その機序を明らかにするとともに，吸着したタンパク質の構造および活性変化を検討した．
【方法】 PU ナノファイバーを作製し，荷電の異なる 2 種類の蛍光標識したタンパク質（bovine serum albumin : BSA pKa 4.7 と lysozyme : Lyz pKa 11）を吸着させ，蛍光顕微鏡によってタンパク質吸着量を定量した．その後，非イオン性界面活性剤（Tween20）を用いて，タンパク質が吸着した PU ナノファイバーを処理して同様に観察した．観察後，すべての PU ナノファイバーの太さを SEM で計測した．
吸着タンパク質の構造および活性評価は，PU ナノファイバーに西洋わさびペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase : HRP pKa 7.2）を吸着させ，FTIR によって構造解析し，発光基質との反応で生じる化学発光を定量することで活性測定した．
【結果と考察】 荷電の異なる BSA・Lyz どちらも，PU ナノファイバー表面に吸着した．また，タンパク質を吸着させた PU ナノファイバーを非イオン性界面活性剤で洗浄すると，吸着タンパク質が脱離した．よって，疎水性相互作用による吸着の可能性が高いと考えられる．
FTIR による吸着タンパク質の二次構造解析では，PU ナノファイバーの径が細くなるにつれて構造が保持されており，これに伴い，酵素活性も保持される傾向にあった．

Analysis of protein adsorption behavior onto the surface of polyurethane nanofibers and of its conformation and activity change

○Yuko Morita[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui,, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui,)

Key words polyurethane nanofiber, protein adsorption, secondary structure, activity

2P-N211 Development of a label-free, sample recoverable detection system for the early diagnosis of pancreatic cancer

○Dohyun Lee, Jangsun Hwang, Saad Muhammad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Sch. Integr. Eng., Chung-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

Early diagnosis is an essential pathway to the effective treatment of pancreatic cancer(PaCa), one of the most fatal and problematic cancers worldwide. A novel method of approach would involve sensitive and specific isolation, as well as the extensive analysis of exosomes associated with PaCa.
Although exosomes have been ignored as vehicles of waste material, recent studies have brought into light that they indeed serve as a vital method of communication between cells, and could be used as a means of therapy, as well as diagnosis. However, current methods of exosome isolation have the issue of having either low purity or low recovery rates, yielding disappointing results when it comes to the assessment of clinical samples due to the possibility of passing-by critical exosomes containing information-rich contents such as mRNA, miRNA, and proteins.
Therefore, a high-throughput system which accumulatively captures and releases specific exosomes for the sequential evaluation of inner contents would undoubtedly be desirable. This would ensure the recovery of target exosomes in high concentration for a more sensitive and precise diagnosis. In this study, we introduce such a method, employing a label-free and sample recoverable detection system by utilizing a thermoresponsive nanogel, allowing us to remotely initiate recovery once the sample set has been obtained at an appropriate level.

Development of a label-free, sample recoverable detection system for the early diagnosis of pancreatic cancer

○Dohyun Lee, Jangsun Hwang, Saad Muhammad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Sch. Integr. Eng., Chung-Ang Univ.)

Key words exosome, cancer, diagnosis, sensor

2P-N212 Aptamer grafted hydroxyapatite for promoting angiogenesis and bone regeneration

○Jaewoo Son, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

Aptamers are short oligonucleotide structures that are capable of targeting molecules and proteins. Aptamers apply to therapeutic agents that can capture specific target molecules with stability, non-toxicity, and non-immunogenicity.
Hydroxyapatite is a typical material used for bone grafting due to its structural and chemical similarity to the mineral phase of hard tissue. Hydroxyapatite is not only used as an alternative to bone grafting, it is also used to promote bone regeneration by modifying the surfaces.
In this study, we have developed the novel aptamer conjugated hydroxyapatite (Apt-HA) that promotes bone regeneration and angiogenesis. 3R02 bivalent aptamer, which specifically captures the vascular endothelial growth factor (VEGF) protein, was used. Certain cross linkers were used to graft the aptamers on the surface of hydroxyapatite, which was identified by the FT-IR spectrometer. Apt-HA was tested for its ability to capture VEGF protein, which was observed under a fluorescence microscope using FAM-labeled aptamers. The result showed that Apt-HA has higher capturing ability to VEGF protein rather than original hydroxyapatite.
In summary, Apt-HA can be used as advanced bone graft by promoting bone regeneration and angiogenesis.

Aptamer grafted hydroxyapatite for promoting angiogenesis and bone regeneration

○Jaewoo Son, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words aptamer, cross-linking, hydroxyapatite, VEGF

2P-N213 Preparation of Beta glucan particles as an efficient drug delivery system

○Kyungwoo Lee, Youngmin Seo, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Chanhwi Park, Dohyun Lee, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chugang Univ.)
nanomed@cau.ca.kr

β-glucans are a diverse range of carbohydrate polymers of differing lengths and structures that make up the cell walls of yeast, fungi, algae and some plants. They are also used as supplements in human nutrition and adjuvants in vaccine design because of their pathogen-associated molecular pattern. Previous studies of β-glucans showed this patterns are recognized by the pattern-recognition receptor dectin-1, a highly expressed lectin on the surface of phagocytic macrophages. So β-glucans can be efficiently taken up by macrophages in vitro. Therefore, increasing the activity of macrophages would help in increasing the effectiveness of drug transfer and disease treatment .With these advantages of β-glucan we designed here self assembled β-glucan particles(SGP) as a novel drug delivery carrier with isoniazid(INH), anti-tuberculosis drug and doxorubicin(DOX), anti-cancer drug. β-glucans have special helical structure. So we synthesized SPG by controlling the structure through in acidic and alkaline environment to lead self assembly and incorporated drugs physically at the same time. We confirmed the successful loading of the drugs in SPG through FT-IR spectrometer. The INH, DOX loading and encapsulation efficiency of SGP were analyzed using a average weight quantitative analysis, absorbance analysis and Fluorescence analysis. These results suggest that our SGP may be able to be utilized as a promising platform for drug delivery systems.

Preparation of Beta glucan particles as an efficient drug delivery system

○Kyungwoo Lee, Youngmin Seo, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Chanhwi Park, Dohyun Lee, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chugang Univ.)

Key words drug carrier, drug delivery system, beta glucan

2P-N214 Synthesis of oxygen containing microbubbles for reversal of hypoxia in cancer cells

○Muhammad Saad Khan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

It is widely known that hypoxic conditions reduce the effectiveness of chemotherapy and radiotherapy in cancerous tissues, which may lead to metastasis and spreading of cancer. Therefore, several researchers have investigated usage of microbubbles to raise oxygen level in tissues. Microbubbles have an advantage that they can be injected intravenously and used as a drug delivery vehicle. Microbubbles are echogenic and therefore can be imaged and monitored by ultrasound. High Intensity Ultrasound causes cavitation and destruction of microbubbles which releases the core gas. Core gas also diffuse out of the shell across the concentration gradient and therefore higher oxygen level can be delivered through this mechanism.
In present research, microbubbles have been synthesized by sonication method using three lipid DSPC, DSPE-PEG-2000(amin) and DSPE-PEG-2000(biotin) dissolved in PBS solution. Oxygen was continuously supplied during the sonication process. Optical and fluorescence microscopy were used to observe the size and distribution of microbubbles. DLS was performed to observe effects of sonication on the solution. We propose that this method will be effective for reversal of hypoxia in cancer cells.

Synthesis of oxygen containing microbubbles for reversal of hypoxia in cancer cells

○Muhammad Saad Khan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Yeonho Jo, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words Hybrid materials, Biomolecular Imaging, Drug Delivery

2P-N215 Production of Apoferritin (AFTN) nanoprobes for the detection of sensitive pathogen

○Sachin Chavan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

The ferritins (FRTs) is a protein that major iron storage protein that naturally occurs in the human and living organism. Each ferritin is composed 24 subunits which self-assemble to form a cage-like nanostructure. The Ferritin protein is composed two type of subunits H type (heavy) and L-type (light) they are encoded by separated gene with nonexchangeable function. The Iron Free ferritin is called Apoferritin (AFTN), it has been produced by chemically reducing iron within the ferritin of prokaryotic bacteria. The resulting apoferritin (AFTN) protein expression from *Escherichia coli* bacterial host cell while higher efficiency depends on a high copy of the gene. T7 RNA polymerase expression of the gene specially induced AFTN protein on N- terminal and C- Terminal His Tag Sequence site.

Production of Apoferritin (AFTN) nanoprobes for the detection of sensitive pathogen

○Sachin Chavan, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words apoferritin expression, E coli Bacteria

2P-N216 Study of tumor cell characteristic changes by culturing in different platforms

○Yeonho Jo, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

For decades, scientists have been using two dimensional (2D) culture technique which is easy to handle, maintain and analysis cell growth. It makes biologists study cells and tissues easier, and gives the fundamental biological information. With these reasons, 2D cell culture has proven indispensable for a variety of applications ranging from research to industrial perspectives. Most tumor studies also rely on the analysis of cells grown in 2D cell culture. However, these models failed to reconstitute the in vivo cellular microenvironment. As a result, it showed different characteristics from the in vivo model. To fully understand the nature of the tumor, it is important to study in environments that are similar to complex biological conditions.
In this study, we have attempted a variety of cell culture platforms including a traditional 2D cell culture, a microfluidic shear stress cell culture model similar to body fluid or blood vessel environment, and a 3D spheroid cell culture model mimicking in vivo ECM environment to compare and overcome the limitations of traditional 2D cell culture and mimic more close in vivo conditions. In addition, we have analyzed several functions such as diffusion, apoptosis, protein release and surface receptor expression based on various culture platforms.

Study of tumor cell characteristic changes by culturing in different platforms

○Yeonho Jo, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Chanhwi Park, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words cell culture, tumor microenvironment

2P-N217 Synthesis of silver/copper/graphene oxide composite and its antimicrobial effects

○Chanhwi Park, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

In recent years, there have been a lot of problems associated with bacteria, especially super bacteria, which have a strong resistance against antibiotics. They are currently considered to be an urgent global issue due to the lack of effective treatments.
Graphene oxide (GO), a two-dimensional carbon material, displayed inhibition effects of bacterial growth on its surface. The inhibition effect was demonstrated on GO nanowalls with both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In addition, metal nanoparticles such as copper and silver have also known as antibacterial agents for centuries.
Herein, we synthesized silver and copper nanoparticles supported onto GO surface (Ag/Cu/GO) by an effective chemical reduction method and demonstrated the antimicrobial effects against several species of bacteria.
Ag/Cu/GO composite was characterized by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). We showed its antibacterial activity towards Streptococcus mutans, Bacillus subtilis and *Escherichia coli*.

Synthesis of silver/copper/graphene oxide composite and its antimicrobial effects

○Chanhwi Park, Youngmin Seo, Jangsun Hwang, Muhammad Saad Khan, Sachin Chavan, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Kyungwoo Lee, Jonghoon Choi
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words graphene oxide, metal nanoparticles, antimicrobial

2P-N218 Study of anti-biofilm activity and mechanism of copper nanoparticles / multi-walled carbon nanotubes complexes

○Jonghoon Choi, Jangsun Hwang, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Wyungwoo Lee, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Chanhwi Park, Youngmin Seo, Hojeong Jeon
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)
nanomed@cau.ac.kr

Biofilms are any group of microorganisms of bacterial cells attached to the surface to self-produce extracellular polymeric materials and protect themselves from external stress by using produced extracellular polymeric materials. These biofilms are especially present in places of humidity such as shower rooms or heat exchangers in air conditioners and vehicles, or difficult to clean areas. Also, these biofilms have a foul odor and cause chronic infectious diseases in animals and humans. Generally, chemical or antibiotic chemical compounds are used to remove biofilm and harmful bacteria, but biofilms interfere with the contact between bacteria and antibiotics to counteract antibacterial activity. Socially serious problems concerning biofilm formation and their toxicity, along with antibiotic resistance, demonstrate the need for novel material developments for the effective extermination of bacterial biofilms.
In this study, Cu/MWCNTs complexes were synthesized by chemical reduction of Cu cations and characterized by TEM, XRD and EDS. Cu/MWCNTs indicated effective antibacterial activity against *Methylobacterium spp.* which formed biofilm. The biocompatibility of Cu/MWCNTs were tested on human fibroblast cells with the minimum concentration required to have antibacterial properties. In addition, we confirmed to remove the biofilm in biochip and the mechanism of antibacterial activity against *Methylobacterium spp.*

Study of anti-biofilm activity and mechanism of copper nanoparticles / multi-walled carbon nanotubes complexes

○Jonghoon Choi, Jangsun Hwang, Yeonho Jo, Jaewoo Son, Wyungwoo Lee, Muhammad Saad Khan, Sachin Ganpat Chavan, Chanhwi Park, Youngmin Seo, Hojeong Jeon
(Grad. Sch. Eng., Chug-Ang Univ.)

Key words antibacterial activity, multi-walled carbon nanotube, cytotoxicity, biofilm

2P-J219 掻痒感抑制を目的とした新規アトピー性皮膚炎抑制デバイスの創製

藤澤 彩乃[1], 鄭 雄一[1], ○下畑 宣行[2]
（[1]東大院・工, [2]立命館大・生命科学）
n-shimoh@fc.ritsumei.ac.jp

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) は，増悪・寛解を繰り返すアレルギー性炎症疾患であり，患者に見られる皮膚バリア機能障害と症状の拡大との関連が指摘されている．また，同皮膚炎は強い掻痒を伴う場合も多く，掻破行動による皮膚バリア機能破壊も大きな増悪因子とされている．現在行われている治療法は，ステロイド剤や免疫抑制剤などの外用薬塗布療法などの対症療法が中心となっているが，副作用の問題，適用部位もしくは年齢による制限といった複数の問題点があるため，新たな治療法の開発が望まれている．
我々は，あるセラミド類似構造を有するバイオマテリアルに着目して，新規 AD 抑制デバイスの開発を試みた．高 IgE を表現型とする NC/Nga マウスの背部を剃毛し，ダニ抗原を 4 週間塗布することで AD モデルマウスを作出した．4 週間のステロイド外用剤治療を行い，その後 4 週間の経過観察を行った．ステロイド治療期およびステロイド停止期にスプレー状の抑制デバイスの噴霧を行い，治療効果を評価した．また，セラミド類似バイオマテリアルの炎症抑制効果を解析するために，炎症性細胞株を用いた *in vitro* 解析も併せて実施した．
ダニ抗原によって惹起された AD 様症状は，その後のステロイド処置により回復した．しかし，ステロイド停止によって症状が再燃あるいは悪化する個体が見られた．抑制デバイスをステロイド治療期から停止期にかけて処置し続けた群においては，背部の炎症や掻破行動が抑制される傾向にあった．また，*in vitro* 解析によって，このバイオマテリアルにはリポポリサッカライドによって惹起された炎症性サイトカインの産生昂進を抑制する効果があることが明らかとなった．従って，本研究で使用した抑制デバイスは，炎症抑制効果を有し，ステロイドとの併用によって掻痒感を含めた症状の抑制効果をも高めることが示唆された．

Development of novel device for suppressing atopic dermatitis

Ayano Fujisawa[1], Ung-il Chung[1], ○Nobuyuki Shimohata[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words inflammation, allergy

2P-N220 B 型肝炎ウイルス感染機構に基づく NF-κB 転写活性抑制ペプチド sMPAID の肝臓特異的送達法の開発

○徐 子暢[1,2], 立松 健司[1], 岡本 一起[1], 曽宮 正晴[1], 黒田 俊一[1,2]
（[1]阪大院・理, [2]阪大・産研）
jyosityoudate44@sanken.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】岡本により発見された MTI-II タンパク質（Macromolecular-Translocation Inhibitor-II; 11.5kDa）は，ステロイド剤に匹敵する強力な内在性抗炎症性物質であり，NF-kB に直接作用して同転写活性を抑制する．現在，MTI-II 誘導体として，6 アミノ酸残基の sMPAID (short MTI peptide anti-inflammatory drug)が開発されているが，副作用の多いステロイド剤の代替とするには炎症部位及び核内特異的な DDS ナノキャリアの開発が必須である．一方，我々は B 型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質からなる直径約 30 nm の中空粒子バイオナノカプセル(BNC)を，ヒト肝臓特異的 DDS ナノキャリアとして開発してきた．本研究では，BNC に sMPAID を搭載して肝臓特異的抗炎症剤とすることを目指している．
【方法と結果】BNC 表面に sMPAID を搭載し細胞内で放出するために，リソソーム内の低 pH 環境下で切断されるヒドラゾン結合，または細胞内の還元的条件下で切断されるジスルフィド結合を有するクロスリンカーを用いて BNC 表面に蛍光標識 sMPAID を結合させた．次に，両 sMPAID/BNC 複合体をヒト肝臓由来細胞 Huh7 及び HepG2 の培地中に添加して共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ，sMPAID が細胞内に速やかに取り込まれていた．つぎに，ヒドラゾン結合による sMPAID/BNC 複合体の NF-κB 転写活性に対する効果をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討したところ，炎症性サイトカイン TNF-α による NF-κB 転写活性上昇が抑制された．以上の結果は，sMPAID 搭載 BNC が，副作用の少ない肝臓特異的抗炎症薬となる可能性を示している．

Liver specific delivery of NF-κB represser peptide, sMPAID, by using hepatitis B virus infection machinery

○Zichang Xu[1,2], Kenji Tatematsu[1], Kazuki Okamoto[1], Masaharu Somiya[1], Shun'ichi Kuroda[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [2]ISIR., saka Univ.)

Key words DDS, NF-kB, sMPAID, BNC

2P-J221 機能性銀ナノ粒子を利用した迅速・高感度芽胞検出技術の開発

○池野 慎也[1,2], 前川 貴宏[1]
（[1]九工大院・生体工, [2]九工大・バイオマイクロ技セ）
ikeno@life.kyutech.ac.jp

【背景と目的】バチルス属やクロストリジウム属などの芽胞形成菌は，生育環境によって栄養細胞と芽胞の形態をとる．生育環境が悪化すると栄養細胞は菌体内に耐久性の高い芽胞とよばれる堅い殻を形成し，生存を図る．この芽胞は熱，紫外線，乾燥，化学薬品などに対して強い耐性を示し，生育環境が回復すると発芽し元の菌体に戻る性質がある．これらの性質を持つため，芽胞が食品や医薬品などの製品へ混入すると食中毒や医療事故などを引き起こすことがあり，それらの製造現場では芽胞そのものを検出する技術が求められている．本研究では，高感度に芽胞由来のバイオマーカーである DPA を検出するため，表面増強ラマン散乱(SERS)法に着目した．この DPA と特異的に結合する機能性銀ナノ粒子を構築し，SERS により DPA を定性的に検出，蛍光法により定量的に検出する方法を検討した．
【結果と考察】調製した Fe_3O_4/Ag コアシェルナノ粒子に対して，テルビウム錯体を表層に固定化した機能性銀ナノ粒子を構築した．DPA 溶液に調製した機能性銀ナノ粒子を添加すると，蛍光強度の増加を確認した．これは粒子表面のテルビウムと DPA の錯形成による電荷移動遷移に起因すると考える．DPA 標準溶液を用いて蛍光測定における DPA 標準曲線を作成し，DPA 濃度(10~1000nM)において直線性を得た．芽胞から抽出したサンプルを用いてラマン測定を行った結果，機能性銀ナノ粒子に起因する SERS 効果によるラマンシグナルの増大が起こり，1001，1073，1337，1429，1574 cm^{-1} に DPA 由来のピークを確認した．抽出サンプル中の複雑なラマンシグナルから DPA の定性分析が可能であることを示した．この機能性銀ナノ粒子を用いて，蛍光検出法と SERS により DPA を定量・定性的な検出ができ，芽胞由来の DPA を検知できる濃度は数十 nM であった．

Development of rapid and highly sensitive endospore detection technology utilizing functional silver nanoparticles

○Shinya Ikeno[1,2], Takahiro Maekawa[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., [2]RCBT, Kyutech)

Key words Endospore, SERS, DPA, Silver nanoparticles

2P-J222 ジカウイルスの迅速・高感度検出に向けた量子ドット・金ナノ粒子間局所表面プラズモン共鳴効果の安定化

○竹村 謙信[1], Adegoke Oluwasesan[2], 朴 龍洙[1,2], 鈴木 哲朗[3]
（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化, [2]静岡大グリーン科技研, [3]浜医大・医・医学科）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】胎児の小頭症を引き起こすことが知られるジカウイルスの大規模感染が，2015 年ブラジルで確認された．前年の FIFA ワールドカップ開催に合わせた旅行客の急増が一因とされるが，地球温暖化に伴うウイルス媒介蚊の生活圏拡大によって，ジカウイルスの集団感染が他国でも発生しうると想定される．ジカウイルスの拡散防止を達成するためには，感染初期患者からのウイルス検出を迅速に行い，周辺地域における蚊の駆除や注意喚起を早期に達成する必要性ある．本研究ではジカウイルス表面上で量子ドット(QD)と金ナノ粒子(AuNP)を用いた局所表面プラズモン共鳴（LSPR）蛍光増強効果を極大化し，ジカウイルの高感度・迅速検出法の開発を試みた．蛍光増強効果にはウイルス表面上におけるナノ粒子間距離が密接に関係している．そこで，安定した蛍光増強効果を得るためにナノ粒子表面上に修飾する化合物の極性の影響を検討し，報告する．
【方法・結果】光学的性質が類似し，官能基の極性が大きい Glutathione と極性が小さい L-Cysteine を修飾した QD を用いた．AuNP は還元法により作製，表面には極性の小さい 3-mercaptpropionic acid を修飾した．これらの粒子にジカウイルス特異的な抗 NS1 抗体を修飾した．QD と AuNP を最適な割合で混合した検出溶液にジカウイルスを加え，蛍光増強効果を調べた（励起光 450 nm，励起光 630 nm）ところ，L-Cysteine 修飾系列でのみ強い蛍光増強効果が見られた（検出感度：10 copies/ml）．極性が強い官能基を使用した場合，ウイルス表面上における粒子同士の吸着が蛍光増強効果を阻害していることが示唆された．この結果は，LSPR 効果を更に増強する可能性を示唆するものであり，今後夾雑タンパク質の多い血清を用いた検証を行う予定である．

Stabilization of the localize surface plasmon resonance (LSPR) between quantum dots (QDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for rapid and high sensitivity detection of Zikavirus

○Kenshin Takemura[1], Oluwasesan Adegoke[2], Enoch Y Park[1,2], Tetsuro Suzuki[3]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., [3]Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Key words Localize surface plasmon resonance, Zika virus, quantum dot, gold nanoparticle

2P-N223 酸化鉄/金ナノ粒子を修飾したカーボンナノマテリアルを用いた導電性モニタリングシステムによるインフルエンザウイルス DNA 検出法

○森田 真広[1], Lee Jaewook[2], 朴 龍洙[1,2]
（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻, [2]静大・グリーン科技研）
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】インフルエンザウイルスは季節性の感染性ウイルスで，8 本の一本鎖 RNA を持つエンベロープウイルスである．インフルエンザウイルスのうち，A 型ウイルスは表面タンパク質であるヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) に変異が生じやすく，新型のインフルエンザの流行によるパンデミックが危惧されている．パンデミックを未然に防ぐためには，感染の早期診断が重要であり，インフルエンザウイルスの高感度検出法が求められている．カーボンナノマテリアル複合体は表面増強ラマン散乱 (SERS) や電気伝導性の増強効果といった特徴的な特性を有することから，近年注目を集めている．特にナノ粒子をカーボンナノチューブ (CNT) に修飾した複合体はバイオセンサーや触媒などに利用されている．本研究では，酸化鉄/金ナノ粒子複合体を修飾した CNT (IO/Au-CNT) を作製し，電気伝導性のモニタリングシステムとして利用し，インフルエンザ DNA の検出を行うことで，インフルエンザウイルスの高感度検出を目指した．
【方法・結果】IO/Au-CNT を合成し，作製した IO/Au-CNT を白金指交差電極 (PT-IDE) 状に修飾した．この Pt-IDE 上に IO/Au-CNT を堆積した電極を検出チャネルとした．インフルエンザの NA 遺伝子内に相補的な配列を持つチオール基修飾 DNA を金ナノ粒子表面にコンジュゲートした．インフルエンザ DNA を加え，電気抵抗の変化をモニターリングすることで，DNA の検出を行った．本検出系における検出感度は 1 pM であり，高い検出感度が得られた．また，非相補的な DNA に対して高い選択性を有していた．本結果から，本検出系は高感度，高選択的な検出系であり，他の感染性ウイルスの検出への応用が期待できる．

Influenza virus DNA sensing using conductivity monitoring system with Iron oxide/gold nanoparticles decorated carbon nanomaterials

○Masahiro Morita[1], Jaewook Lee[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Dept. Agriculture, Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words IO/Au-CNT, Influenza, DNA sensing, electrical monitoring sensor

2P-J224 Iron oxide/gold nanoparticles decorated graphene for biosensing application

○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[2], Masahiro Morita[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Functionalized hybrid carbon nanomaterials have been spotlighted due to their amazing synergic properties such as surface enhanced Raman scattering (SERS), plasmonic resonance energy transfer (PRET), magneto optical (MO) effect, enhanced electrical conductivity. Based on these kinds of synergic properties, nanoparticles decorated graphene (NP-GRP) could be used for various field, for example, energy device, bio or gas sensor, and optical devices. Among of various applications, in our study, NP-GRP has been successfully applied for biosensing field. Especially, we have prepared iron oxide/gold nanoparticle (Au NP) decorated GRP (IO/Au-GRP) for Norovirus like particles (NoroVLP) detection with electrical monitoring system. Firstly, IO/Au-GRP was synthesized in deionized water under ambient conditions and deposited on platinum-interdigitated electrode (Pt-IDE). In this case, these hybrid materials could play a role as a sensing channel to monitor the resistance change. Secondly, NoroVLP antibody (Ab) was bound on the surface of IO/Au-GRP through EDC/NHS coupling reaction to capture target NoroVLP. To demonstrate biosensing application, several concentrations of NoroVLP was added into each sensing system. In this case, excellent sensitivity was shown; 0.01 pg/ml of NoroVLP. Indeed, its selectivity against various biomolecules was remarkable. Consequently, these hybrid material showed excellent potential to apply for biosensing channels and these sensing systems possess excellent prospects to detect infectious diseases.

Iron oxide/gold nanoparticles decorated graphene for biosensing application

○Jaewook Lee[1], Kenshin Takemura[2], Masahiro Morita[2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Iron oxide/gold nanoparticles modified graphene, Hybrid nanomaterials for infectious virus detection, Nano biosensor, Norovirus detection

2P-N225 ナノファイバーをガイドとしたカーボンナノチューブ配向電極の開発と そのバイオデバイスへの応用

○藤原 郁也[1], 森田 祐子[1], 松崎 祥平[1], 坂元 博昭[1,2], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大学・生命セ）
hi-saka@u-fukui.ac.jp

【目的】カーボンナノチューブ(Carbon nanotube, CNT)は，強度が高く，銅が耐えられる電流量の約 1000 倍まで耐えられるため従来の金属材料に変わる導電性材料として注目されている．CNT を電極材料とすることで比表面積が大きく，また高効率な電子移動が可能となることから，高出力バイオデバイスへの応用が期待される．
しかし，電極材料として単に CNT 膜を作製しただけでは，ファンデルワールス力により凝集する傾向があり電気的・熱的に抵抗が生じてしまうため CNT の特性を最大限活かすことが出来ない．そこで，本研究ではエレクトロスピニング法により紡糸したナノファイバーを CNT のガイドとする事で導電性基板表面へ CNT を一定方向に配置する手法の確立とその基板を電極としたバイオデバイスの構築を目的とした．
【方法】10% PU 溶液に CNT 100 mg 加え一晩撹拌し，5 時間超音波処理を行う事により CNT を分散させた．その後，エレクトロスピニングによって基板表面へファイバーを紡糸した．PU/CNT ナノファイバー作製後，電気炉内 400℃で加熱する事で PU ナノファイバーのみを熱分解させ，CNT が焼失したナノファイバーに沿って配列した基板を得た．そして，ラマン分光法や SEM を用いて基板上に残った CNT の物性や形態を観察した．
【結果と考察】10%PU と CNT 混合溶液からエレクトロスピニングによりナノファイバーを作製出来た．また，その直径は約 1150nm であった．作製した PU/CNT ナノファイバーを熱分解すると，焼失したナノファイバーに沿って CNT が存在している事が観察された．燃焼後の CNT をラマン分光により分析した結果 CNT に特徴的に現れる D-band(1350cm^{-1})及び G-band(1590cm^{-1})が観察された事から CNT は構造物性を保持したままであると示唆された．今後は，この作製した CNT 配列電極表面へ酵素を修飾し，バイオデバイスとしての評価を進める．

Development of carbon nanotube arranged electrode using nanofibers and its application for bio devices

○Ikuya Fujiwara[1], Yuko Morita[1], Shohei Matsuzaki[1], Hiroaki Sakamoto[1,2], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui,, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui,)

Key words CNT, biodevices, electrospinning, one-dimensional alignment

2P-J226 Colorimetric detection of Norovirus-like particles using peroxidase-like activity of positively-charged gold nanoparticles

○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Tetsurou Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infectious Disease, Hamamatsu Univ. Sch. Med.)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Since Norovirus is highly infectious and has low infection dose, it becomes a necessity to develop a reliable point-of-care bioassay in detecting Norovirus. Nowadays, there are available bioassays used for detecting Norovirus, such as RT-PCR and ELISA. RT-PCR has good sensitivity in detecting Norovirus but it requires advanced equipment as well as handling the operation and time-consuming. In this study, a rapid and sensitive colorimetric immunoassay detection with positively-charged gold nanoparticles [(+)AuNPs] conjugated with antibodies recognizing Norovirus GII.4 was developed. AuNPs were synthesized by reduction of gold ions (HAuCl4) by sodium borohydride and were capped with cysteamine. AuNPs were positive surface charge with zeta potential of +40 mV. Norovirus-like particles (NoV-LPs) were immobilized in the 96-wells microplate. Antibodies conjugated with (+)AuNPs were added into the wells and bound to the NoV-LPs in the wells. (+)AuNPs catalysed the oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) by H_2O_2 and blue color was developed. 10% H_2SO_4 was added to stop the reaction and absorbance at 450 nm was measured. This developed assay was revealed to exhibit concentration-dependent response in range of 10 pg/mL to 100 ng/ml. The limit of detection (LOD) of the system was calculated about 13 pg/mL which is 300 times more sensitive than commercial kit with LOD of 3.8 ng/ml. This shows a promising colorimetric detection immunoassay which can be further investigated towards for on-site detection of Norovirus.

Colorimetric detection of Norovirus-like particles using peroxidase-like activity of positively-charged gold nanoparticles

○Indra M. Khoris[1], Kenshin Takemura[2], Jaewook Lee[3], Tetsurou Suzuki[4], Enoch Y. Park[1,2,3]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ, [4]Dept. Infectious Disease, Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Key words Colorimetric immunoassay, Norovirus-like particles, peroxidase-like activity, gold nanoparticles

2P-J227 固定化酵素方式バイオセンサを用いた L-アラニル-L-グルタミン定量法の開発

○奥河内 貴大, 林 隆造
（王子計測機器）
okugouchi009511@oji-gr.com

【目的】ジペプチド L-アラニル-L-グルタミンは，動物細胞培養の培地中に L-グルタミンの代替として添加される．L-アラニル-L-グルタミンは，L-グルタミンと比較し，溶解性や熱安定性に優れており，細胞培養時のアンモニア蓄積を低減させる効果があることが知られている．固定化酵素方式バイオセンサは，特定の物質を簡便かつ迅速に定量可能であることを特徴としており，バイオ医薬品や，発酵食品生産時の培養プロセス管理などに広く利用されている．本検討では，固定化酵素方式バイオセンサによる L-アラニル-L-グルタミンを定量する方法の開発を目的とした．
【方法】アミノペプチダーゼ，グルタミナーゼ，グルタミン酸オキシダーゼをシリカゲル上に固定化し，カラムに充填した．固定化酵素カラムと過酸化水素電極をフロー式バイオセンサに装着し，L-アラニル-L-グルタミンを 3 段階の酵素反応により過酸化水素に変換し，得られた過酸化水素を電気化学的に定量する測定系を構築した．本測定系を用い，測定時の pH，温度，使用緩衝液等の種々の測定条件を検討した．
【結果】アミノペプチダーゼ，グルタミナーゼ，グルタミン酸オキシダーゼは，固定化体の状態でも高い活性を示した．アミノペプチダーゼ固定化体の至適 pH は 7.5～8.5 の弱アルカリ域であった．また，37℃で 30 日以上の連続使用が可能であることが明らかとなった．これら固定化体を装着したバイオセンサを用い，グルタミン酸，グルタミン，L-アラニル-L-グルタミンの 3 成分を 120 秒以内に同時定量することが可能となった．

Quantitative analysis of L-alanyl-L-glutamine by immobilized enzyme biosensor

○Takahiro Okugochi, Ryuzo Hayashi
(Oji Scientific Instruments Co., Ltd.)

Key words biosensor, immobilized enzyme, L-alanyl-L-glutamine

2P-F228 精確な濃度が付与された DNA 認証標準物質の開発

○柴山 祥枝 [1], 松倉 智子 [2], 佐々木 章 [2], 藤井 紳一郎 [1], 稲垣 和三 [1], 山崎 太一 [1], 吉岡 真理子 [1], 関口 勇地 [2], 野田 尚宏 [2], 高津 章子 [1]
（[1]産総研・物質計測標準, [2]産総研・バイオメディカル）
s-shibayama@aist.go.jp

現在，食品分野や医療分野，環境分野など，様々な分野で DNA を対象とした定量分析が日常的に行われている．使用される DNA 定量法には，吸光度による定量や，DNA に結合する蛍光色素を用いた定量，定量的 PCR(qPCR)などがあるが，吸光度による定量では定量換算時の係数による不正確性の問題や，蛍光色素による定量および qPCR では，定量時に他の DNA 参照物質を必要とする等の問題がある．そのため，別々の定量法を用いた場合の比較同等性の確保に困難が生じている．このような背景を鑑み，本研究では，DNA 定量における普遍的な比較同等性の確保や，方法の妥当性確認，品質管理等に使用可能な国際単位系(SI)にトレーサブルかつ精確な濃度が付与された DNA 認証標準物質(NMIJ CRM 6205-a)を開発した．本発表では，DNA 認証標準物質開発のコンセプトおよび認証方法について発表する．
本 DNA 標準物質は，特定の遺伝子をコードしないランダムな配列を持つ人工 DNA(600-bp)の水溶液であり，総 DNA 濃度(塩基対の数や配列に依らず試料中に含まれる全ての DNA 濃度)が認証されている．高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて標準物質中に含まれる不純物 DNA の分離分析を行い，不純物 DNA は 1 %未満であることを確認した．濃度決定は，SI トレーサブルかつ精確な DNA 定量を目指し，核酸塩基を対象とした同位体希釈質量分析法(IDMS)と DNA 中のりんを測定対象とした誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)の 2 手法を用いた．また，標準物質の均質性および安定性は HPLC により確認し，認証値の不確かさに含めた．
従って，本 DNA 認証標準物質は，ほぼ単一の DNA からなる水溶液の濃度が認証されており，様々な DNA 定量装置および DNA 定量法の妥当性確認や精度管理に使用することが可能である．

Development of DNA certified reference material with accurate concentration

○Sachie Shibayama[1], Satoko Matsukura[2], Akira Sasasaki[2], Sin-ichiro Fujii[1], Kazumi Inagaki[1], Taichi Yamazaki[1], Mariko Yoshicoka[1], Yuji Sekiguchi[2], Naohiro Noda[2], Akiko Takatsu[1]
([1]NMIJ, AIST, [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words DNA, certified reference material, quantification, digital PCR

2P-J229 微小液滴の融合・分割機構を利用した 1 細胞レベルでのゲノム増幅と特異的遺伝子配列検出法の開発

○高橋 海 [1], 西川 洋平 [1], 細川 正人 [2,3], 竹山 春子 [1,3,4]
（[1]早大・先進理工, [2]JST・さきがけ, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]産総研・早大CBBD-OIL）
haruko-takeyama@waseda.jp

当研究室では，マイクロ流体デバイスを用いてピコリットルサイズの液滴に 1 細胞を網羅的に封入したのち，液滴内に試薬を順次添加することで 1 細胞から全ゲノム増幅を行う手法を開発している．本研究では，この 1 細胞ゲノム増幅産物を様々な解析に応用するために，増幅反応後の液滴を分割し，増幅産物を分配する技術を開発することを目指した．続く応用として，分割した一部の全ゲノム増幅物から対象生物特異的な遺伝子配列を含む液滴を検出する方法を開発し，特定微生物や変異動物細胞の検出に応用することを目的とした．PDMS(Poly(dimethylsiloxane))を用いて液滴形成，液滴融合，液滴分割の 3 種のマイクロ流体デバイスを作製した．大腸菌と枯草菌の混合微生物集団をモデルサンプルとして調製し，液滴に 1 細胞レベルで封入した．その後，液滴の融合技術を用いて全ゲノム増幅試薬を添加することで，1 細胞からの全ゲノム増幅を行った．液滴内での 1 細胞ゲノムの増幅確認後，液滴分割デバイスを用いて，全ゲノム増幅産物を含む液滴を 4 つに分割した．分割前後で液滴の蛍光比率は概ね一致し，全ゲノム増幅産物が 4 つの液滴に分配されていることが確認された．分割した液滴の一部を，再度融合デバイスに導入し，微生物特異的遺伝子をターゲットとしたデジタル PCR を行った．デジタル PCR の結果，導入した細胞数から想定される理論値通りの存在比率が観測された．本研究の成果により，1 細胞ゲノム増幅産物を網羅的に調製したのち，複数の解析に用いることが可能となった．液滴分割・融合を用いた全ゲノム増幅とデジタル PCR の統合により，環境中の特定微生物や生体内の変異細胞を 1 細胞単位で検出・定量する事が可能となる．

Development of a droplet-based assay to detect target sequences at single cell level

○Kai Takahashi[1], Yohei Nishikawa[1], Masahito Hosokawa[2,3], Haruko Takeyama[1,3,4]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]PRESTO, JST, [3]Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University, [4]CBBD-OIL, AIST)

Key words droplet microfluidics, single-cell analysis, droplet PCR

2P-J230 光切断性ペプチドアレイと質量分析計の組み合わせによる配列網羅的なプロテアーゼ切断部位同定技術の開発

○栗本 昌樹 [1], 清水 一憲 [2], 越智 浩 [1], 阿部 文明 [1], 本多 裕之 [2,3]
（[1]森永乳業, [2]名大院・工, [3]名大・予防早期医療創生セ）
m-kurimoto@morinagamilk.co.jp

【背景・目的】食品タンパク質由来のペプチドには，近年多様な生理活性が見出されてきており，プロテアーゼによる食品タンパク質加工技術は今後ますます重要になると考えられる．一方で，食品加工に用いられる産業用プロテアーゼは多種多様な酵素活性を有しており，その切断特異性が明らかになっていないものは多い．加工に最適な酵素を選出し，機能性ペプチドの効率的製造条件を見出すためには，各種プロテアーゼの切断特異性を正確に把握することが重要である．本研究では光切断性ペプチドアレイと質量分析計（LC/MS）を併用し，配列網羅的にプロテアーゼの切断部位を同定する技術の開発を目指した．
【方法】Fmoc 固相合成法によりセルロースメンブレン上にペプチドを合成し，乳タンパク質の配列を網羅したペプチドアレイを作製した．C 末端にはフォトリンカーを使用し，ペプチドに光切断性を付与した．プロテアーゼ溶液中でアレイを酵素処理し，洗浄・乾燥させたアレイに UV を 2 時間照射したのち，各 SPOT 上で遊離したペプチド切断片を回収した．回収断片を質量分析計で分析し，検出されたペプチドピークをもとに，酵素の切断部位を特定した．
【結果】乳タンパク質のアミノ酸配列をターゲットに，各種プロテアーゼで切断評価を実施したところ，酵素毎の特有の切断パターンを特定することができた．豚由来のトリプシン酵素を用いた基質特異性評価の正答率は 93.1%であり，高い分析精度を有することが確認できた．微生物酵素を用いた処理条件の比較評価では，温度の違いによるわずかな基質特異性の変化や，酵素切断の時間変化を表現できる可能性が示された．本技術を用いて得られるデータは，機能性ペプチドを効率的に製造するための有用なデータになるものと考えられる．

Development of a comprehensive protease cleavage site identification technique by combining photo-cleavable peptide array and mass spectrometer

○Masaki Kurimoto[1], Kazunori Shimizu[2], Hiroshi Ochi[1], Fumiaki Abe[1], Hiroyuki Honda[2,3]
([1]Morinaga Milk Ind., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]PME., Nagoya Univ.)

Key words peptide array, LC/MS, photo-cleavable linker, protease

2P-J231 MMLV 逆転写酵素，耐熱型 DNA ポリメラーゼおよび DNA/RNA ヘリカーゼの組み合わせによる高感度な one-step RT-PCR

岡野 啓志[1], 馬場 美聡[1], 山﨑 朋美[1], 秀瀬 涼太[2], 藤原 伸介[2],
柳原 格[3], 宇治家 武史[4], 林 司[4], 兒島 憲二[1], 滝田 禎亮[1],
○保川 清[1]
([1]京大院・農, [2]関西学院大, [3]大阪母子医療センター, [4]カイノス)
yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】One-step PCR は Two-step PCR よりも，DNA のコンタミのリスクが低いという長所をもつが，感度が低いという欠点をもつ．本研究では，耐熱型モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素 MM4（E286R/E302K/L435R/D524A），好熱性細菌 *Thermotoga petrophila* K4 株由来ファミリー A DNA ポリメラーゼ（K4pol）において，RNA との結合でリボース 2'位水酸基と立体障害を起こすと予測された Leu329 が Ala に置換されて逆転写活性を獲得した $K4pol_{L329A}$，超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来スーパーファミリー 2 ヘリカーゼである *Tk*-EshA を組み合わせて，高感度な One-step RT-PCR の開発を試みた．
【方法】モデル RNA を用いて，20 nM *Tk*-EshA 存在下での cDNA 合成反応，PCR および One-step RT-PCR の感度に与える MM4，$K4pol_{L329A}$，$MgCl_2$，$Mn(OCOCH_3)_2$ の各濃度の影響を調べた．
【結果】$K4pol_{L329A}$ による cDNA 合成反応および PCR は，$MgCl_2$ 非存在下ではともに $Mn(OCOCH_3)_2$ 濃度は 3 mM が最適であったが，10 mM では PCR のみ強く阻害された．一方，$Mn(OCOCH_3)_2$ 非存在下では，両反応とも $MgCl_2$ 濃度は 3 mM 以上が最適で，10 mM でも阻害されなかった．本検討で最適と思われた 10 nM MM4，1000 nM $K4pol_{L329A}$，3 mM $MgCl_2$，0.5 mM $Mn(OCOCH_3)_2$ での One-step RT-PCR の感度は，本 3 酵素による cDNA 合成と *Taq* ポリメラーゼによる PCR から成る Two-step PCR と同程度であった [1)]．
【考察】DNA 合成反応では 2 個の 2 価カチオンが酵素の活性部位に結合する．近年，遷移状態において，さらに 1 個の 2 価カチオンが鋳型 DNA と結合することが報告された [2)]．今回見られた高濃度 Mn^{2+} による阻害は，鋳型 DNA への阻害的な結合によるものであり，鋳型 RNA では起きないことが示唆された．

1) Okano H et al. (2017) *Biophys Biochem Res Commun*, in press
2) Gao Y et al. (2016) *Science* 352, 1334-1337

High sensitive one-step RT-PCR using MMLV reverse transcriptase, DNA polymerase with reverse transcriptase activity, and DNA/RNA helicase

Hiroyuki Okano[1], Misato Baba[1], Tomomi Yamasaki[1], Ryota Hidese[2],
Shinsuke Fujiwara[2], Itaru Yanagihara[3], Takeshi Ujiiye[4], Tsukasa Hayashi[4],
Kenji Kojima[1], Teisuke Takita[1], ○Kiyoshi Yasukawa[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kwansei-Gakuin Univ, [3]Med Center for Maternal and Child Health, [4]Kainos)

Key words DNA polymerase, helicase, reverse transcriptase, one-step RT-PCR

9月13日（水）

受賞講演（15:10 ～ 15:30）

C 会場（56 号館 1 階），A 会場（57 号館 2 階）

〈生物工学奨励賞（江田賞）〉

受賞者　渡部 潤（ヤマサ醤油）

醤油酵母における香気成分の生成機構に関する研究　3A-Cp01　p. 175

〈生物工学奨励賞（斎藤賞）〉

受賞者　古賀 雄一（阪大院・工）

超好熱菌由来酵素の構造機能相関研究とその応用　3A-Ap01　p. 175

※生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者講演 3P-E014 は
特別口頭発表 B3（E 会場，9:00 ～ 11:00）にて行います．
講演要旨については一般講演要旨をご覧ください．

シンポジウム（午前の部 9:00 ～ 11:00）

A, B 会場（57 号館 2 階）/ C, D 会場（56 号館 1 階）

設計生物学による組み合わせ：人工細胞から組織デバイスまで　3S-Aa01 ～ 06　p. 176

発酵醸造微生物育種の新発想アプローチ　3S-Ba01 ～ 05　p. 179

国際展開する日本の生物工学～海外事業化研究の実例から～　3S-Ca01 ～ 04　p. 181

生合成再設計の深化で挑む複雑骨格機能分子の創出
共催：科研費新学術領域研究・生合成リデザイン　3S-Da01 ～ 05　p. 183

シンポジウム（午後の部 15:30 ～ 17:30）

A, B 会場（57 号館 2 階）/ C, D 会場（56 号館 1 階）/ G, H 会場（52 号館 2 階）

“Smart Cell Industry” A New Trend in Bioeconomy《国際シンポジウム》
3S-Ap01 ～ 05 p. 186

細菌からヒトにおける多彩な抗菌ペプチド：その作用機序，生体防御機能などを探る
3S-Bp01 ～ 04 p. 188

醸造技術～もの造りの原点と将来【本部企画】 3S-Cp01 ～ 04 p. 190

脳機能活性化や健康長寿の鍵となる機能性食品素材・農産物
共催：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」
「次世代機能性農林水産物・食品の開発」，バイオインダストリー協会　機能性食品研究会
3S-Dp01 ～ 05 p. 192

医薬品・化成品開発のためのインビトロ細胞培養技術開発の新展開 3S-Gp01 ～ 07 p. 195

未培養微生物（微生物ダークマター）の培養，解析，利用に関する研究開発の
最前線と展望 3S-Hp01 ～ 04 p. 198

一般講演　特別口頭発表 A･B（9:00 ～ 11:00）E, F, G, H, I, J 会場（52 号館 1 ～ 3 階）
ポスター発表（ポスター掲示時間 9:00 ～ 18:00）　ポスター会場（63 号館 2 階）

遺伝子工学	3P-N001 ～ G026	p. 200
酵素学，酵素工学	3P-G027 ～ G047	p. 207
タンパク質工学	3P-N048 ～ H063	p. 212
発酵生理学，発酵工学	3P-H064 ～ H081	p. 216
代謝工学	3P-H082 ～ H097	p. 220
醸造学，醸造工学	3P-H098 ～ H107	p. 224
食品科学，食品工学	3P-H108 ～ H117	p. 227
環境浄化，修復，保全技術	3P-I118 ～ I130	p. 229
環境工学，廃水処理技術	3P-F131 ～ N140	p. 233
バイオマス，資源，エネルギー工学	3P-I141 ～ I159	p. 235
生物化学工学	3P-N160 ～ I177	p. 240
培養工学	3P-I178 ～ J197	p. 244
セル＆ティッシュエンジニアリング	3P-N198 ～ J212	p. 249
システムバイオロジー	3P-J213 ～ N218	p. 253
バイオセンシング，分析化学	3P-N219 ～ J229	p. 255
生合成，天然物化学	3P-J230 ～ J236	p. 257

3A-Cp01 醤油酵母における香気成分の生成機構に関する研究

○渡部 潤
（ヤマサ醤油）
j_watanabe@yamasa.com

醤油は日本の食文化に欠かすことができない重要な調味料であり，その香りは私たちの食欲を強く刺激する．醤油中の香気成分については古くから研究が行われ，現在では 300 種類を超える香気成分の存在が確認されている．この中には，醤油のオフフレーバー成分（産膜性の醤油酵母によって生産されるイソ吉草酸など）や，醤油の特徴香成分（醤油酵母によって生産される 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3(*2H*)-furanone（HEMF 又はホモフラネオール）など）も含まれるが，その生成機構は不明確であった．これらの香気成分の生成機構を明らかにし，その量をコントロールすることができれば，醤油の高品質化が可能になると考えられる．そこで演者らは，これらの香気成分の生成機構の解明に取り組み，以下の結果を得た．

1. 醤油のオフフレーバー成分の生成機構
諸味に混入する蔵付き酵母の中には，産膜を形成し，オフフレーバーを生成する株が存在する．醤油酵母の産膜形成は浸透圧依存的に起きることが知られており，この事実は *Saccharomyces cerevisiae* とは異なる醤油酵母独自の産膜形成機構が存在することを示唆していた．遺伝学的な手法により，醤油酵母における産膜原因遺伝子 *FLO11D* をクローニングし，この遺伝子の発現が浸透圧依存的に誘導されることで，浸透圧依存的に産膜形成が起きることを明らかにした．さらに，この遺伝子を複数コピー持つ株は，浸透圧環境において高い適応度を示し，*FLO11D* 遺伝子のコピー数の増加は醤油酵母における高浸透圧環境への適応機構の 1 つであることを明らかにした．次に，産膜形成とオフフレーバー成分の生成との関連を明らかにするため，産膜形成株と，その *FLO11D* 遺伝子破壊株とを様々な条件で培養し，生産される香気成分を比較した．その結果，(1)イソ吉草酸などのオフフレーバー成分はエーリッヒ経路を介した分岐鎖アミノ酸の異化によって生成すること，(2)ロイシンの異化には，これまで知られていた Bat1p に加え Aro8p も *in vivo* で関与すること，(3)産膜形成により細胞が空気に暴露され，エーリッヒ経路が酸化側に傾くことがオフフレーバー成分の生成の直接的な原因であり，細胞が空気に接触しない条件下ではオフフレーバー成分の生成は抑制されることが明らかになった．醤油諸味に産膜が形成された場合，産膜を諸味に押し込む「カビ消し」と称する作業が伝統的に行われてきたが，その作業の意義については必ずしも明確ではなかった．しかし，この研究結果から考察すると「カビ消し」は産膜形成した細胞を嫌気的な諸味中に留めることでオフフレーバーの生成を抑制する，理にかなった作業であると解釈することができる．

2. 醤油の特徴香成分の生成機構
HEMF は醤油の特徴香成分の 1 つとして知られており，カラメル様の甘い芳香を有するだけではなく，抗酸化活性などを有することから機能性成分としても注目されている．これまでに，HEMF のさまざまな生成機構が提案されてきたが，完全な解明には至っていなかった．そこで，演者らは *S. cerevisiae* の遺伝子破壊株コレクションを用い，HEMF 生成に関連する遺伝子の網羅的探索を行った．この検討から，HEMF 生成を抑制する遺伝子群と促進する遺伝子群とが明らかになった．最も高い HEMF 生成活性を示したのはアルコールデヒドロゲナーゼをコードする *ADH1* 遺伝子の破壊株であった．*ADH1* 遺伝子破壊株の HEMF 高生産は，HEMF の前駆体の 1 つと考えられるアセトアルデヒドの濃度上昇により引き起こされていた．次に，HEMF 生成を触媒する酵素遺伝子を明らかにするため，*S. cerevisiae* の無細胞抽出液から生化学的な手法により HEMF 生成活性を示す酵素，YNL134Cp を単離した．この酵素は，イチゴの芳香成分である 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(*2H*)-furanone (HDMF)/HEMF の生成に関与するエノン酸化還元酵素と低い相同性を示したことから，醤油中の HEMF もイチゴと類似の機構で生成すると考えられた．酵素反応液中の物質を詳細に検討した結果，(1)リボースとグリシンのメイラード反応により 4-hydroxy-5-methyl-3(*2H*)-furanone (HMF)が生成し，(2)この HMF が発酵で発生したアセトアルデヒドと化学的に縮合することで (2E)-2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(*2H*)-furanone (EDHMF)が生成し，(3)EDHMF が YNL134Cp により NADPH 依存的に還元されることで，HEMF が生成することが明らかになった．

Studies on flavor production mechanism in soy sauce yeast

○Jun Watanabe
(Yamasa Corp.)

Key words soy sauce, *Zygosaccharomyces rouxii*, off-flavor, furanone

3A-Ap01 超好熱菌由来酵素の構造機能相関研究とその応用

○古賀 雄一
（阪大院・工）
kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp

酵素が産業上幅広く利用され，研究者がその仕組みに興味を持つのは，酵素が高い基質特異性と反応特異性を有するためである．ところが実際に酵素を利用するためには，研究や生産の現場において目的に合致した特異性を有する酵素を入手する必要がある．しかし，理想的な酵素を選び出すには非常に大きな時間と労力を（ときには運も）要するうえ，運良く目的の反応をしてくれそうな酵素が見つかっても，実際に利用するためには，酵素の生産性，安全性，酵素特性（温度，pH，塩濃度，金属イオン要求性）等の諸条件が十分に実用的でなければならない．天然の酵素の中から，最も理想に近い酵素を選択し，工学的な改変を加えて使用条件に適した機能や特性を酵素に付与するというタンパク質工学的アプローチは魅力的である．今日，遺伝子工学技術の発展のおかげで，アミノ酸配列を改変して変異酵素を得ることは比較的容易にできる．しかし，アミノ酸配列の変異がどのような構造変化に結びつくか，その構造変化がどのような機能変化に結びつくのかを予測すること，すなわち，タンパク質の配列-構造相関，構造-機能相関の予測はまだまだ未熟で，タンパク質機能を自由にデザインすることは困難であると言わざるをえない．極限環境微生物が生産する酵素は，100℃近い高温や，極端な高塩濃度環境などに適応した天然構造の見本である．極限環境に適応した酵素それ自体は産業上非常に有用であるだけでなく，大腸菌などの通常環境に適応した生物種の酵素とその構造を比較することで，特殊な機能を発現する構造を見つけることもできる．我々は，超好熱古細菌（始原菌）*Thermococcus kodakarensis* KOD1 が生産する耐熱性酵素の構造と機能の比較研究を行い，耐熱性をはじめとする酵素特性がどのような分子メカニズムによって獲得されているかを明らかにしてきた．特に本菌から取得された Subtilisin family protease （Tk-subtilisin と Tk-SP）について展開している，構造-機能相関の基礎研究と，産業用酵素としての応用研究を紹介したい．

超好熱古細菌（始原菌）*T. kodakarensis* KOD1 は培養上清にプロテアーゼ活性を示すタンパク質を分泌することが確認されており，2001 年に subtilisin ホモログ Tk-subtilisin をクローニングし酵素学的特性解析をすることが出来た．また，2010 年にはゲノム配列上に別の subtilisin ホモログ遺伝子が 2 つ存在することがわかり，そのうちの一つが，強いプロテアーゼ活性を示す酵素 Tk-SP であることが確認できた．Tk-subtilisin と Tk-SP はいずれも，90～100℃で最大活性を示す耐熱性酵素で，SDS や Urea などの変性剤に対しても非常に強い耐性を示すなど，既存の subtilsin の中で世界最高レベルの構造安定性を持つことが明らかになった．我々はこれらの酵素の自己分解を抑制する手法を確立し，物理化学的解析手法（CD 測定，X 線結晶構造解析）を用いる事によって，安定化をもたらす構造因子として，独自の挿入配列と Ca イオンの配位（Tk-subtilisin）や，C 末端へのドメイン付加（Tk-SP）があることを証明するとともに，subtilisin に特有の分子の成熟化機構が，高温条件下でいかに効率的に進行するのかを明らかにすることができた．

構造-機能相関の情報の蓄積により，取扱いの難しい超好熱菌由来プロテアーゼを産業用酵素として取り扱うためのノウハウを確立できた．Tk-subtilisin・Tk-SP は，80℃以上の高温環境や，変性剤・界面活性剤存在下でもタンパク質の分解反応できるため，全く新しい酵素の利用方法が可能である．例えば，アミロイドを形成している難分解性タンパク質を物理的，化学的に構造を不安定化させながら分解したり，難溶性のタンパク質を界面活性剤で可溶化した状態で酵素反応させたりすることができる．これまでに，プロテアーゼ耐性があると言われていた，異常プリオンタンパク質を分解したり，非エンベロープ型ウイルスのキャプシドを不活化できることなどを実証してきた．現在，Tk-subtilisin および，Tk-SP の産業化を目指し酵素の高効率生産系を開発しており，今後，極限環境に適応した酵素ならではの応用展開をすすめたいと考えている．

Studies on structure-function relationships of hyper-thermostable enzymes and their application.

○Yuichi Koga
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words hyperthermophile, subtilisin, enzyme, *Thermococcus*

3S-Aa01 設計生物学：生物工学を指数関数的に進展させる方策

鮎川 翔太郎[1], ○木賀 大介[2]
（[1]早大・理工総研, [2]早大・先進理工）
kiga@waseda.jp

ゲノム合成プロジェクトを背景の一つとして，合成生物学を深化させた設計生物学により，生物工学を指数関数的に進展させることが見込まれている．工学一般における指数関数的な技術の進展は，技術群が密に接続されたポジティブフィードバックに起因する．この接続の基盤は，数理モデルで示された各技術の動作原理にあり，結果として，2 か所で開発された技術を第 3 者が組み合わせることが可能になっている．
各種研究目的に必要な生命システムの組み合わせを得るための効率の良い手法として，合成生物学では，数理モデルを基盤とする生命システムの構築を行うことで，効率化を達成してきた．実際，発表者のグループは，細胞内の動作と理論上の動作がおおむね一致する人工遺伝子ネットワークを組み合わせることで，より大きなサイズのシステムを構築し，その動作が種々の実験条件で設計通りとなることを確認している．例えば，合成生物学の最初のターゲットは，細胞とウィルスに共通して重要な運命決定機構について，機構内の相互作用をより単純化した genetic toggle switch であった．この研究が高く評価される点が，人工遺伝子回路を構成する遺伝子の On-Off に関するパラメタ変化による細胞の挙動の変化を，数理モデルによってクリアに説明したことにある．本発表では，我々による組み合わせの例として，toggle switch と遺伝子大量発現を組み合わせて細胞を初期化した後に多様化させた例，細胞間通信に依存した遺伝子発現の活性化と toggle switch とを組み合わせることによって細胞を多様化させた例，の 2 つをまず紹介する．その後，これらを物質生産系に応用するための現在進行中の研究についても紹介したい．

Design Biology: towards exponential growth of bioengineering

Shotaro Ayukawa[1], ○Daisuke Kiga[2]
([1]Res. Ins. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words synthetic biology, cell-cell interactions, gene expression, mathematical model

3S-Aa02 微生物表現型を制御する人工遺伝子回路設計

○相馬 悠希[1], 花井 泰三[2]
（[1]九大・生医研, [2]九大院・農）
y-soma@bioreg.kyushu-u.ac.jp

生物の持つ様々な機能は複雑に相互作用する生体分子ネットワークによって実現されており，生体分子の機能を理解して適切に組み合わせることで新たな機能を持つ生体分子ネットワークを再構築することができる．合成生物学の分野では，プロモータや転写因子などの生体分子パーツを組み合わせて設計・再構成される遺伝子発現制御システムを人工遺伝子回路 (Synthetic genetic circuit) と呼び，概日リズムや細胞間コミュニケーションなど，生物特有の現象を担うシステムの理解と設計原理の解明を目的として利用してきた[1]．一方で，人工遺伝子回路は，その設計次第で標的遺伝子に望みの発現動態を与えることができることから，さまざまな生物工学分野への応用が期待されている．本発表では，遺伝子発現制御を介して微生物表現型を制御するための人工遺伝子回路の設計とその代謝工学的応用の有用性について紹介する．
異種生物由来の酵素遺伝子を複数組み合わせて構築される合成代謝経路 (Synthetic metabolic pathway) は，既往の遺伝子組換え微生物によって生産されてきた様々な化合物の生産性を飛躍的に向上させたほか，微生物が本来は生産することができなかった化合物の生産をも可能とし，代謝工学・バイオプロダクション分野の発展に大いに貢献してきた[2]．ただし，新たに生産可能となった化合物について十分な生産性が達成されているわけではなく，生産性向上に向けた研究が続けられている．代謝工学の分野では，目的化合物の生産経路に関連する遺伝子の過剰発現や，生産経路と競合する内在性代謝経路に関連する遺伝子のノックアウトなど，宿主の遺伝子改変を通じて生産性の向上 t が達成されてきた．これは言い換えれば，目的とする化合物生産に最適な表現型を示す遺伝子型の探求であり，結果として暫定的に最も目的化合物の生産性が高い改変株が選抜されてきた．しかしながら，バイオプロセスの各工程を通じて最適な表現型は決して画一的ではなく，細胞内外の状態変化に応じて適切に制御される必要がある．例えば，Acetyl-CoA やケト酸を前駆体として要する多くのバイオアルコール生産系にとって，菌体増殖に重要な TCA 回路やアミノ酸合成経路などの内在性経路は，必要十分な菌体密度に到達した系においては不要な競合経路と成り得る．上述の通り，競合経路関連遺伝子のノックアウトは代謝工学の常套手段だが，増殖に重要な内在性経路の欠損は著しい菌体増殖阻害を引き起こすため，結果的に目的化合物生産を担う菌体数を低減させ，総合的な生産性の低下を招く．また，十分な前駆体が細胞内に存在しない状況下における合成代謝経路の過剰発現は，細胞内の核酸・アミノ酸・エネルギーを必要以上に消費することで菌体増殖・生理活性の低下を招き，化合物生産を担う菌体数の低減につながる．このように，菌体を確保する段階と化合物を生産させる段階のそれぞれにおいて適切な表現型は必ずとも一致しないため，効率的なバイオプロセスを達成するためには，内在性経路と合成代謝経路の双方が適切に制御され，宿主の代謝状態や表現型をその時々に適した状態へと導く必要がある．
我々は有用化合物生産を担う微生物において，菌体増殖に重要な複数の内在性代謝酵素遺伝子と合成代謝経路の発現動態を制御可能な人工遺伝子回路を設計・構築し，「菌体増殖に適した表現型」と「物質生産に適した表現型」を人為的に切り替えることで，この様な課題の解決に取り組んだ．バイオアルコール生産の回分培養において，増殖期と物質生産期における表現型の最適化を図ることで，化合物生産を担う菌体数を担保しながら個々の菌体あたりの生産性を向上させ，プロセス全体での生産性を向上させることに成功した[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 (Quorum sensing) 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ている[4]．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資化性の向上など，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]．このように，人工遺伝子回路を応用することで生命システムを人為的に書き換えながら，その影響をオミクス解析によって読み解く，ボトムアップとトップダウンからの双方向のアプローチは，今後の生命システム設計とその理解をより習熟した段階へと展開していく上で不可欠な戦略の 1 つである．

1. Nandagopal, N., & Elowitz, M. B. (2011). science, 333(6047), 1244-1248.
2. Lee, J., *et al*. (2012). Nat chem biol, 8(6), 536-546.
3. Soma, Y. *et al* (2014). Metab eng, 23, 175-184.
4. Soma, Y., & Hanai, T. (2015). Metab eng, 30, 7-15.
5. Soma, Y., *et al*. (2017). J Biosci Bioeng, 123(5), 625-633.

Design and construction of synthetic genetic circuits controlling microbial phenotypes

○Yuki Soma[1], Taizo Hanai[2]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words synthetic biology, metabolic engineering, genetic circuit, metabolic analysis

3S-Aa03 機能的な組織培養モデル構築による人工生命システムの試み

○玉井 美保[1,2], 藤山 陽一[3], 田川 陽一[2]
（[1]北大院・歯, [2]東工大・生命理工, [3]島津製作所）
mtamai@den.hokudai.ac.jp

医薬品開発には，その過程での毒性試験が必要不可欠である．個体レベルの (*in vivo*) 試験では，細胞，組織，臓器間における複雑な相互作用を解析することができるが，ヒトと実験動物の間における種差が存在するため，ヒトでの正確な生体反応を評価することは難しく，動物愛護の観点からも動物実験代替法の開発は必要不可欠である．培養細胞を用いた (*in vitro*) 試験では，分子レベルで明確な結果を再現性良く得られるが，単純な平面培養では実際の生体内環境を再現できないため，細胞が本来有している機能を発揮することが出来ない．そのため，*in vitro* 試験のためのモデルでは，生体内環境を再現するための工夫が必要である．

我々は，細胞－細胞間，細胞－細胞外基質間における相互作用が，細胞の機能を発揮するためには必要不可欠であると考え，マイクロ流体デバイスを用いることにより，これらの相互作用と細胞外環境を考慮した培養モデルの構築を試みている．近年のマイクロ流路を有する培養デバイス技術の発展は著しく，それぞれの臓器に対応して樹立され利用されている各々の細胞株をマイクロ流路培養デバイスで培養し連結した in vitro システムは，body (living system) on a chip と呼ばれている．しかし，このデバイスは生物という概念からはほど遠いのが現状である．まず，哺乳類の臓器は，複数種の細胞が秩序的な配列で構成される組織構造により構築されて，各々の特異的な機能が発揮されている．単一の細胞種では動的な反応は再現できないことが多い．さらに，用いられている細胞が腫瘍に由来する細胞であり，細胞の有している特異的な機能は低いかほとんどない．腫瘍細胞で構成されているシステムは正常な生命体とは言えない．

シングル細胞から樹立されているＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を用いて個体発生と同様にモノクローナルな分化過程から構成される *in vitro* 生命システムを作出することを試みてきた．1つの系内に「拍動心筋」を誘導することによって，内皮細胞ネットワークと肝細胞からなる「肝様組織」の構築に成功した．構築した肝組織に極性が再構築できていることを確認し，物質に対する生理的応答が肝灌流法による応答と一致していた．さらに構築した肝組織の肝細胞にグリコーゲンの貯蔵が観られたことから，血糖調節能を評価した結果インスリンやグルカゴンに応答し培地中の血糖レベルを調節することか確認された．そこで，インスリンやグルカゴンが系内で産生されている可能性があるため，免疫染色により評価したところ，インスリン陽性細胞とグルカゴン陽性細胞が観察され，インスリンとグルカゴンを独立で産生する細胞集団である「膵島様組織」への分化誘導・組織構築が確認された．

また，培養環境を常に一定に保ち，生体環境に近づけることを目的に，独自に開発したポリジメチルシロキサン製のマイクロ流体デバイスを用いて，血液の流れを模した培地の流れ（フロー）やシェアストレスを付与した．細胞・組織を培養すると，細胞が浮遊してしまう現象がある．さらに，接着性細胞が浮遊するとアノイキスによる細胞死が起き，細胞の崩壊によりマイロ流路を閉塞することが考えられる．我々の培養デバイスには，培養液の排出側にフィルターを挟むことにより，排出側の流路が詰まることなく，培養液の流入排出が可能となる設計とした．マウス ES 細胞を用いて，培養デバイス内で組織構築をおこない免疫染色法により評価した結果，アルブミン陽性の肝細胞と，PECAM-1 陽性の内皮細胞が確認され，肝組織の構築が確かめられた．また，代謝の一つであるアンモニアの解毒能を評価した結果，静置培養と比較して高い尿素合成能が確認された．フロー培養中に培養廃液中のｐＨと溶存酸素濃度を測定すると，一定の値を維持しており非常に安定していることが確認された．現在，人工透析機能を付与した透析チップの開発や，腸管吸収を考慮したデバイスモデル，生体と微生物が共生している組織モデルの構築も試みている．また，これらを連結した哺乳類 *in vitro* モデルを動物実験や前臨床試験の代替システムとして応用展開したいと考えている．

Synthesized living system using culture systems of functional tissue models

○Miho Tamai[1,2], Yohichi Fujiyama[3], Yoh-ichi Tagawa[2]
([1]Fac. Dent. Med., Hokkaido Univ., [2]Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, [3]Shimadzu Corp.)

Key words Culture model, ES/iPS cells, Fulidic device

3S-Aa04 多様な遺伝子の連結組み合わせを実現する OGAB 法による長鎖 DNA 合成

○柘植 謙爾
（神戸大院・科学技術イノベーション）
ktsuge@port.kobe-u.ac.jp

DNA は生物の設計図である遺伝子の普遍的構成要素である．ヒトの遺伝子を大腸菌によりクローニングすることが可能なように，生物種の違いを乗り越えて取り扱うことが可能である．今までにない生体分子の組み合わせを細胞内に実現することを考えた場合，この性質は極めて便利である．例えば，その生体分子自身を細胞内に注入するという直接的な方法も不可能ではないかもしれないが，一般化された方法というものは知られておらず，導入する物質ごとに最適な条件は異なっているものと考えられ，仮に導入できても，全ての細胞に導入可能なほどに高効率に行うことは困難である．よって，遺伝子工学が発達している現在では，その生体分子を作り出す遺伝子を細胞内に導入し，発現させる方法が，目的の生体分子の違いに関係なく DNA を細胞内に導入する条件だけを検討すればよい点や，様々な遺伝子をつなぎかえることで，多様な生体分子の組み合わせを実現できる点，導入効率が悪くともその細胞を増殖することが可能な点において，極めて有利である．これらの生体分子を作り出す遺伝子を個々に導入することは効率が悪く，これらを１つに連結した DNA を構築し，一度に細胞内に導入することが望ましいが，多数連結した遺伝子群は，10kb やそれ以上の長さの長鎖 DNA となるため，これらの DNA を効率的に構築する方法は重要である．演者らは，この実現のために，枯草菌のプラスミド形質転換系を用いた遺伝子集積法の OGAB を開発した．本方法は，集積対象の DNA を，環状ではなく，集積するプラスミドの単位が同一方向に繰り返し出現するように，タンデムリピート状に連結した産物を構築し，枯草菌の自然形質転換能を利用して菌体内で環状化する，効率的な遺伝子を集積する方法である．さらに最近，従来の OGAB 法を改良した第二世代 OGAB 法を開発した．本方法は，材料となる DNA 断片の大きさを究極的に等しい大きさとすることで，OGAB 法の肝となるタンデムリピート状の DNA の連結において不可欠な，材料 DNA の等モル混合を容易にする改良法で，従来の OGAB 法が１５断片程度の集積が可能なのに対して，５０断片以上の DNA を一度に集積可能である．現在よく用いられる Gibson Assembly 法，Golden Gate 法，LCR 法などの方法が，材料となる複数の DNA 断片を試験管内で環状に連結するのとは大きく異なり，100kb 程度の DNA の集積が可能な点，一度に世界最多の５０個以上の二本鎖 DNA 断片を集積できる点，得られる DNA に変異が導入されない点などで，OGAB 法は優れている．

OGAB 法を用いると，多様な生体分子遺伝子群の連結が可能となる．現在までに，抗生物質生産遺伝子群，色素生産遺伝子群，一次代謝経路遺伝子群などを組み合わせた数個から数十個の遺伝子を連結した多様な遺伝子集積体を構築し，これらの増殖速度や生産量を指標に生体分子の組み合わせのパフォーマンスを評価してきた．さらにこれらの評価に基づいて新たな組み合わせを構築し，評価するという，いわゆる Design-Build-Test-Learn（DBTL）サイクルを繰り返し行うことにより，生体分子のより良い組み合わせを探索した．OGAB 法を用いたこれらの組み合わせの探索技法について紹介し，本技術の今後の活用について議論したい．

Long DNA synthesis by OGAB method realizing combinatrial connection of various genes

○Kenji Tsuge
(Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ.)

Key words gene assembly, OGAB, combinatorial library, genome design

3S-Aa05 2 次元・3 次元膜ダイナミクスの再構成と細胞信号伝達

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

【細胞膜について】
細胞膜が，細胞の内側と外側を隔てている界面を形成しているというのは，高校生物の教科書にも記載されている．しかし実際には，単なる境界面を形成しているだけでなく，情報の伝達，変換に極めて重要な役割を担っている．
膜が情報伝達に関わっていると考えられるようになった最初のきっかけは，「脂質メディエーター」の発見であろう．プロスタグランジン類，ロイコトリエン類などに代表される脂質メディエータは，細胞膜脂質に由来する生理活性物質で，痛み，発熱，睡眠，覚醒など，重要な生理応答に関与している．身近なところでは，鎮痛解熱剤として広く用いられているアスピリンの作用機序が，膜脂質のアラキドン酸をプロスタグランジン類の前駆体であるプロスタノイドに分解するシクロオキシゲナーゼ（COX）の阻害である事が挙げられる(1).
また，我々が学生時代に講義や教科書で学んだ細胞膜は，「流動モザイクモデル」であった．つまり膜中を，リン脂質，コレステロール，膜タンパク質等が，一様に分散している状態として膜構造は，理解されていた．しかし「ラフト仮説」では，「膜中にコレステロールや糖脂質を多く含む相分離領域（ラフト）が存在し，受容体や脂質アンカー型シグナル伝達分子が濃縮されシグナル伝達のプラットフォームを形成している．」という考えである(2).
このラフト仮説は，非常に魅力的であり，生物学はもちろん，物理学の一分野としてのソフトマター物理の研究者達の興味を惹いた．ソフトマターとは，両親媒性分子はもちろん，液晶，コロイドなど大きな内部自由度を特徴とする物質の総称であり，外部からの刺激に対してゆっくり応答し，多くの非平衡現象を示し，生命現象の背景にある秩序構造（膜やタンパク質の構造）やダイナミクスとも深い関わり合いがある．

【2 次元（２Ｄ），3 次元（３Ｄ）ダイナミクス】
我々は，膜のダイナミックな動きに関して，以下の 2 つの側面を考えている．つまり，ラフト構造に代表される膜相分離構造の形成や集積等の変化（相分離構造変化）としての，2 次元(2D)ダイナミクス，そして膜の変形を伴うエンドサイトーシス，エキソサイトーシス，オートファジー等に代表される，形態変化としての 3 次元（3D）ダイナミクスである．このような 2 つの側面に分けて，膜のダイナミクスと細胞信号伝達の関連性を理解しようと試みてきた．しかし，実際には，膜相分離と膜変形とは連動しており，不可分の関係にある．

膜ダイナミクスについては，当学会和文誌でも何度か紹介させて頂いているが(3,4)，本シンポジウムでは，細胞や人工膜を用いた研究例に関して，ダイナミクスの再構築，そしてそこから考えられる，細胞信号伝達のメカニズムについて，私どもの最近の研究例を紹介したいと考えている．

(1)Vane, J. R.: Nature: New Biology. 231, 232 (1971).
(2)Simons, K. and Ikonen, E.: Nature, 387, 569 (1997).
(3)高木昌宏：生物工学会誌 92, 142 (2014)
(4)下川直史，高木昌宏：生物工学会誌 94, 746 (2016)

Reconstitution of 2D ・3D membrane dynamics and cell signal transduction

○Masahiro TAKAGI, Naofumi SHIMOKAWA
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words membrane lipids, cell membrane, signal transduction, receptor

3S-Aa06 人工細胞を用いた，生命科学における還元的方法と構成的方法の統合

○青木 航, 古村 峻, 植田 充美
（京大院・農）
aoki.wataru.6a@kyoto-u.ac.jp

生命科学の一つの目的は，研究対象となる生物学的システム（転写・翻訳・代謝など）を理解することである．「生物学的システムを理解する」という状況を正確に定義することは難しいが，Richard Feynman が述べた“What I cannot create, I do not understand”という標語に表されるように，対象を因子に分解し，機能を解析し，in vitro で再構成し，モデル化することができれば，その生物学的システムをひとまずは理解できたといえるだろう．
生物学的システムを理解するために，分子生物学者はさまざまな手法を開発してきた．それらの手法はすべて，2 種類の概念的枠組み―還元的手法と構成的手法―に分類される（哲学で用いられる用語とは少し異なる意味で用いている）．還元的手法とは，研究対象となる生物学的システムに必要とされる因子を探索・同定・解析する探索的方法論であり，遺伝学やオミックスなどが相当する．還元的手法を用いることで，研究対象を複雑な全体から個別因子に落とし込んで解析することができるが，システムが全体としてどう働くかを理解することは難しい．この欠点を克服するために，構成的手法が用いられる．構成的手法とは，還元的手法で同定された因子を組み合わせて，生物学的システムの in vitro 再構成・システム解析・モデル化を試みる証明的方法論であり，合成生物学やシステム生物学などが相当する．in vitro 再構成と正確なモデル化に成功すれば，その生物学的システムを理解したといえるが，失敗した場合には何が足りないのかを知ることは難しい．分子生物学の研究プロセスでは，個別関連因子の探索・同定・解析（還元的手法）と再構成によるシステム理解（構成的手法）が相補的に用いられ，一つの到達点として完全再構成に至る．しかし，従来の分子生物学の研究プロセスでは，生物学的システムの理解に莫大な労力と時間が必要とされ，大腸菌レベルでさえブラックボックスが多数残されている．たとえば，大腸菌 ribosome 生合成プロセスは最も複雑な生物学的システムの一つであり，60 年以上にわたり多数の研究がなされてきたが，いまだその完全再構成は達成されていない．
従来の分子生物学では，還元的手法と構成的手法を交互に繰り返すことで生物学的システムの理解が進められる．しかし，このプロセスではブラックボックスを完全に明らかにするために莫大な労力が必要とされることをすでに述べた．それではこの弱点を克服し，生命科学研究をハイスループット化することはできないのだろうか．我々は，従来別個の方法論として扱われていた還元的手法と構成的手法の融合，すなわち，“因子の探索”と“再構成”を同時に行える方法論を開発できれば，上記弱点を克服できるのではないかと考えた．これは，研究の最初のステップとして生物学的システムの完全再構成を目指し，あとから生化学的解析やシステム解析を行うことを意味する．生物学的システムの全体像を把握するというもっとも難易度の高いステップを最初にクリアすることが可能であるならば，各因子の機能解析も迅速化することができ，生命科学のスループットを大幅に向上させられるだろう．
我々の提唱する新規方法論のコアが，人工細胞作製技術である．人工細胞とは，脂質二重膜（liposome）内部に完全再構成型転写翻訳システム（PURE system）を含む人工の構造体である．この人工細胞に遺伝子断片を封入すると，それに対応したタンパク質を発現させられる．この人工細胞に対して，全遺伝子ライブラリをランダムに封入し，次世代シーケンサーと組み合わせることで，任意の生物学的システムの完全再構成が一度の実験で達成可能となる．この方法論の特徴は，研究対象となる生物学的システムに必要とされる遺伝子を発見するという遺伝学的手法を，生きた細胞を用いるのではなく，完全再構成型転写翻訳システム（PURE system）を用いて実行することである．そのため我々は，本方法論を『構成的遺伝学』と名付けた．本シンポジウムでは，構成的遺伝学の概念的証明とその展開について講演する．

Integrating reductive and synthetic approaches in biology using man-made cell-like compartments

○Wataru Aoki, Ryo Komura, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words constructive genetics, homologous recombination, *Escherichia coli*

3S-Ba01　リファンピシン耐性による納豆菌の育種法と応用

○木村 啓太郎[1], 久保 雄司[2]
（[1]農研機構 食品部門, [2]茨城県工技セ）
keitarou@affrc.go.jp

抗生物質耐性付与による微生物育種は古くから抗生物質高生産株のスクリーニング手法の一つとして試みられてきた．近年，耐性変異がもたらす生理的変化の分子的背景が明らかにされたことにより，この手法はより洗練されたものとなった（1）．放線菌や枯草菌の抗生物質耐性と 2 次代謝制御に関する研究成果が豊富に公開されており，使用する薬剤から耐性変異遺伝子，allele 毎の表現型などをある程度予測することが可能である．2 次代謝制御に関しては，食品総合研究所（現・農研機構食品研究部門）と理化学研究所が行った開放融合研究「リボゾーム工学の構築と生物の潜在能力開発（1998 年－2002 年）」の成果の一つとして，普段は発現していない“潜在遺伝子”が抗生物質耐性獲得により活発に転写されること，また，獲得変異によって発現が上昇する遺伝子と逆に低下する遺伝子が存在することがすでに報告されている．菌対外酵素生産に関する報告は比較的少ない．ストレプトマイシン耐性付与による枯草菌 α - アミラーゼの高生産やリファンピシン耐性付与による *B.licheniformis* や納豆菌の育種が事例として挙げられる（2,3）．本シンポジウムでは，納豆製造に使われる納豆菌 *Bacillus subtilis* (natto)のリファンピシン耐性株がプロテアーゼなどの菌対外分解酵素を多く生産すること及び関連する研究事例を紹介する．

発酵醸造微生物の育種を考える上で，使用菌株の素性を知ることは重要である．なぜならば，実験室株と産業株は例え同種であっても異なる結果を示すことがあるからである．加えて，発酵に必要な諸性質を予め規定しておき発酵適性を確認することも必要である（抗生物質耐性を獲得した株が発酵適性を失っていたら，後々困ります(・_・.)）．我々は納豆発酵適性株に共通する性質として，①細胞密度情報伝達系の鍵遺伝子 *degQ* が高発現タイプのプロモーター配列を有し，納豆の粘り物質（γPGA）を活発に生産すること，②細胞の運動性に関わる *swrA* 遺伝子が活性化型であり，被り”と呼ばれる菌膜を形成すること，③ビオチン合成オペロンに欠損変異を有しビオチンを合成できないことを指標として用いた(4).

【育種の具体的な手法と結果】

抗生物質はストレプトマイシンとリファンピシンを選択した．ストレプトマイシン耐性株はリボゾームタンパク質 S12 に，リファンピシン耐性株は RNA ポリメラーゼ β - サブユニット（RpoB）に変異を持つことが先行研究から予測された．自然（spontaneous）変異株の選択であるため相当数のプレートを使用し，抗生物質濃度を適宜振ってリファンピシンの場合は 0.01～2 μg/ml，ストレプトマイシンは 10～1000 μg/ml の範囲を試した．尚，使用する培地は富栄養なものと最少培地の両方を試した．結果的に，冨栄養培地 + リファンピシン 2 μg/ml の条件がよい成績を示した．

リファンピシン耐性株の *rpoB* 遺伝子配列を調べたところ，S487L，Q469N，H482Y に変異が確認でき，この内 S487L 変異を持つ耐性株では菌体外プロテアーゼ生産量が 3 倍以上に上昇した．他に Azo-CMC 分解を指標としたセルラーゼ活性と γ - グルタミルトランスペプチダーゼの生産量も増えた．更に，ザイモグラフと 2 次元電気泳動で分析をしたところ，NprE（中性プロテアーゼ），YwaD（アミノペプチダーゼ），EglS（エンド β - グルカナーゼ），AmyE（α - アミラーゼ）など菌体外分解酵素群の発現量が増えたことが明らかとなった．この株を種皮の硬い黒大豆用の新規納豆種菌候補とした．

【納豆作成と予想外の展開】

種皮の硬い黒大豆を用いて納豆を作成したところ，従来株に比べて柔らかく仕上がり且つ粘り具合も増強されていた．そこで，粘り物質について詳しく調べた．意外なことに γPGA 生産量は微増であったが，レバン（フルクトース多糖）の生産量が顕著に増加していた（0.53±0.03→4.52±0.16 mg/g 納豆，レバンは γPGA の粘りを増強する）．レバンはプレバイオティクスとしての機能性が報告されており，この新規種菌に予想外の“おまけ”がついた形となった．官能評価でも良好な結果が得られ，この新種菌を利用して作られた黒大豆納豆が上市されるに至った（5）．

【参考文献】 (1) Ochi K. et al., *J Ind Microbiol Biotechnol* (2014), (2) Kurosawa K. et al., *Appl Environ Microbiol* (2006), (3) Kubo Y. et al., *J Biosci Bioeng* (2013), (4) Kubo Y. et al., *Appl Environ Microbiol* (2011),
(5) http://www.nattouya.jp/SHOP/mametono01.html

Development of a new natto starter by screeing rifampicin resistant strains of *Bacillus subtilis* (natto)

○Keitarou Kimura[1], Yuji Kubo[2]
([1]NFRI, [2]ITI, Ibaraki Pref.)

Key words　*Bacillus subtilis*, natto, rifampicin resistance, RNA polymerase

3S-Ba02　染色体数の異なる清酒酵母の作出とその醸造特性―遺伝子組換を使わない染色体操作技術―

藤丸 裕貴[1], 門脇 真史[1], 田口 誠我[1], 阪本 真由子[1], 野口 英樹[2,3], 豊田 敦[3], 藤山 秋佐夫[2,3], 赤尾 健[4], ○北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]情報・システム研究機構, [3]国立遺伝研・DDBJ研究セ, [4]酒総研）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

1 清酒酵母育種の歴史

清酒酵母の育種は明治時代の自然界からの分離から始まり，1960-1970 年代の清酒酵母の生化学的研究の成果を活用して，1980 年代からの化学物質に対する耐性株の分離による特異的な代謝経路を改変した清酒酵母の育種や細胞融合による育種へと発展していった．1990 年代に分子生物学の技術が導入され，意図した遺伝子を改変できるようになり，外来遺伝子を排除したセルフクローニング酵母も開発されたが，消費者へのアクセプタンスの点で現時点でも課題を抱えている．現在普及している 1801 号などの吟醸香高生成酵母には 1980 年代の研究成果が活用されていると言えるが，近年進捗した分子生物学的技術やゲノム解析技術が新たな清酒酵母の育種に充分に活用されているとは言えない状況である．そこで，我々はゲノム解析が普及した時代の清酒酵母の育種の参考としてもらうため，新しいゲノム解析技術を用い，遺伝子組換技術を使わない，清酒酵母の自然に起きる現象を利用した遺伝子改変技術の開発に着手した．

2 ピルビン酸低減清酒酵母の突然変異による育種

まず，我々は，ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送を増強するとの発想の下，突然変異を利用して，ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤に耐性を持つ清酒酵母きょうかい 7 号を分離した．この株はミトコンドリア活性が増加して清酒醸造時のピルビン酸が低減しており，オフフレーバーの発生が少ないことから低アルコール清酒の製造に実用化されている．

3 ピルビン酸低減酵母は染色体 11 番，14 番を 3 本持つ

この清酒酵母株がピルビン酸低減性になった原因を探るため，そのゲノムを次世代ゲノムシークエンサーを用いて解析したところ，この株は染色体 11 番と染色体 14 番を 3 本有していることが明らかになった．この結果から，清酒酵母において特定の染色体が部分的に増加することがピルビン酸低減を引き起こすのではないかとの仮説を立てた．

4 染色体数部分倍加がピルビン酸を引き起こすという仮説

この仮説を立証するために，染色体数の異なる一倍体を多数取得することを試みた．染色体数の異なる清酒酵母が多数取れれば，その染色体数とそれぞれの株のピルビン酸生産性を調べれば，染色体数がピルビン酸生産性に及ぼす影響がわかるからである．ピルビン酸低減株から 45 株の一倍体を取得した．それらの株のゲノムを解析した結果，22 株が異数性の染色体を有していた．

5 染色体が部分倍加した一倍体株ではピルビン酸が低減している

これらの 45 株の一倍体を用いて清酒を醸造しそのピルビン酸濃度を測定したところ，染色体の数とピルビン酸生産性は逆相関の関係にあった．特に染色体 11 番が増えていてかつ他の染色体が増えている場合に，ピルビン酸濃度が減少していた．さらにそれらの株の代謝をメタボローム解析により調べた結果，ピルビン酸濃度が減少している株はミトコンドリア活性も高くなっていると考えられる結果を得た．

6 分子生物学は使うが遺伝子組換技術は使わない清酒酵母の育種へ

これらの結果は，清酒酵母からは染色体数がばらついた一倍体が高頻度で取得できること，および染色体の数をモニタすれば意図した醸造特性を持った株を取得できることを示している．この手法は遺伝子組換技術を使わず染色体数がばらつくという自然現象を用いた育種方法であるため，消費者へのアクセプタンスも高く，実用化の可能性も高いと考えられる．本技術（特定の染色体増加を調べて一倍体をスクリーニングする）により，分子生物学的技術を活用して，しかし遺伝子組換え技術は使わずに，清酒酵母をスクリーニングできるようになった．本技術は RTPCR や定量 PCR 試薬などの廉価な機器や試薬を用いれば簡便にかつ短時間で実行可能であるため，実用的な清酒酵母育種の技術として今後普及することが期待される．

今後，本技術を参考にしていただき，分子生物学は使うが，遺伝子組換技術に当たらない清酒酵母育種の技術が多く開発されることを祈念している．

1) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74 (4), 843-847 (2010)
2) 生物工学会誌，89 (5), 222-227 (2011)
3) Annual Review of Food Science and Technology, 4, 215-235 (2013)
4) Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(4):383-393 (2014)
5) FEMS Yeast Research, 14(2):249-260 (2014)

Breeding of favarable sake yeast strains having extra chromosomes-Chromosome-manupulating technique which corresponds to non-GMO

Yuki Fujimaru[1], Masafumi Kadowaki[1], Seiga Taguchi[1], Mayuko Sakamoto[1], Hideki Noguchi[2,3], Atsushi Toyoda[3], Asao Fujiyama[2,3], Takeshi Akao[4], ○Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Research Organization of Information and Systems, [3]DDBJ Center, Natl. Inst. Genet., [4]NRIB)

Key words　sake yeast, genome, *Saccharomyces cerevisiae*, non-GMO

3S-Ba03 出芽酵母において染色体の大規模改変を可能にするCRISPR-PCS 法を用いた菌株育種

○笹野 佑[1], 杉山 峰崇[2], 原島 俊[1]
（[1]崇城大・生物生命, [2]阪大院・工）
sasano@bio.sojo-u.ac.jp

近年，微生物育種技術としてゲノム工学技術の注目が高まっている．ゲノム工学技術は，個々の遺伝子に着目し組換え操作を繰り返す従来の遺伝子工学による育種技術とは異なり，短時間に多数の遺伝子を一挙に操作することが可能であり，大規模なゲノム機能解析や多様なゲノムの創出により，従来の技術では取得困難な有用微生物の育種が期待される．
このような背景のもと当研究室では，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象として，染色体分断技術 PCS 法(PCR-mediated chromosome splitting)を開発してきた[1]．本技術は，分断予定部位の上流及び下流の配列をそれぞれ含む 2 つの分断用 DNA（形質転換体選抜のために *loxP* 配列で挟まれたマーカー遺伝子を持つ）を酵母細胞に導入し，相同組換えにより目的部位に取り込まれることで，1 本の染色体を 2 本の機能的な染色体に分断させる技術である．PCS 法の派生技術として，任意染色体領域の欠失技術（PCD 法），重複技術（PCDup 法），ゲノム再編成工学技術（GREO 法）が開発されている[2),3),4)]．これらの技術を用いることで未知のゲノム機能の解明や有用菌株育種がなされている．なかでも GREO 法は菌株育種を直接の目的とした技術である．本法では，PCS 法を用いて酵母染色体を様々な個所で分断しておき，多数のミニ染色体を持つ菌株を予め作製する．このような菌株をストレス環境などの特定の条件で培養すると，ミニ染色体のランダムな脱落が起こり，結果的にその培養条件下での生育に最適なゲノム組成を持つ菌株を集積させる育種技術である．しかしながら，PCS 法では一度に一か所の染色体分断が限界であるため，複数個所の染色体分断には多大な労力と時間を要するという問題があった．

１）CRISPR-PCS 法の開発
染色体分断の効率を向上させるため，ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 に注目した．本技術は任意の箇所で DNA 二重鎖切断（DSB）を引き起こすことが出来る技術である．出芽酵母では DSB が発生した箇所近傍の相同組換え活性が少なくとも数百倍上昇することが知られているため，染色体分断を行いたい箇所の近傍を CRISPR/Cas9 により切断すれば染色体分断の効率が向上するのではないかと考えた．Cas9 ヌクレアーゼ発現株に，分断用 DNA と分断予定部位近傍を標的に設計した gRNA 発現プラスミドを同時に導入した．その結果，得られる形質転換体の数が PCS 法と比較して約 200 倍増加した．得られた形質転換体では目的の箇所のみに分断が起こっており，意図しないゲノムの再編成は観察されなかった．以上より，CRISPR/Cas9 を PCS 法に取り入れることで染色体分断の効率を大幅に向上させることに成功した（CRISPR-PCS 法と命名）．染色体分断効率が向上したことにより，これまで不可能であった，複数染色体の同時分断が可能となった．これまでに最大 4 か所までの同時分断に成功している[5)]．

２）多様な染色体操作技術への応用
上述したように，PCS 法を応用することで任意染色体領域の欠失や重複が可能である．そこで，CRISPR-PCS 法により複数領域の同時欠失や同時重複が可能か検討したところ，一度の操作で 2 領域の同時欠失（CRISPR-PCD 法）や同時重複（CRISPR-PCDup 法）に成功した．さらに，他の染色体操作（相互転座，染色体融合，環状化など）においても CRISPR-PCS 法を適用することにより高効率で行う事が出来ることを示した．
一方，CRISPR-PCS 法では複数箇所の染色体分断操作を行った際に，得られる形質転換体のうち目的とする複数分断が起きた株の割合が低いという問題があった．目的とする分断が起きていない形質転換株のシーケンス解析の結果，このような株では 2 つの異なる分断用 DNA が *loxP* 配列を介して相同組換えにより融合した状態でゲノムに組み込まれていることが判明した．そこで，分断用 DNA 間で相同組換えが起きないように *loxP* 配列を除いた分断用 DNA を作製し，これを用いて複数箇所の同時分断を行ったところ，得られた形質転換体の全てで目的の分断が起きていることが明らかとなった．

３）ゲノム多様性創出の試みと菌株育種への展開
これまでに確立した複数染色体領域の同時操作技術を用いて，多様なゲノム組成を持つ菌株集団を創り出すことを試みた．出芽酵母の 17 箇所の染色体末端領域について，各々の領域を欠失させるために必要な DNA（欠失用 DNA と gRNA 発現プラスミド）全てを一挙に形質転換時に加えることで，17 領域が様々な組み合わせで複数箇所欠失した菌株集団を得ることを試みた．その結果，17 領域のうち少なくとも 2 領域がランダムな組み合わせで欠失している多様なゲノム組成を持つ菌株集団が得られた．今後は得られた菌株集団からストレス耐性などの有用形質を示す菌株を選抜し，本技術の菌株育種における有用性を実証したい．

1) M. Sugiyama *et al., Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84,1045-1052 (2009).
2) S. Kaboli *et al., Nucleic Acids Res.*, 42, 9838-9853 (2014).
3) W. Natesuntorn *et al., Sci. Rep.*, 5, 12510 (2015).
4) Y. Ueda *et al., J. Biosci. Bioeng.*, 113, 675-682 (2012).
5) Y. Sasano *et al., Sci. Rep.*, 6, 30278 (2016).

Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* by utilizing CRISPR-PCS technology that enables large scale chromosome engineering

○Yu Sasano[1], Minetaka Sugiyama[2], Satoshi Harashima[1]
([1]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, chromosome splitting, CRISPR-PCS, genome engineering

3S-Ba04 麹菌における Cre-*loxP* システムの利用と TALEN を用いたゲノム編集

○水谷 治[1,2], 山田 修[2], 家藤 治幸[2]
（[1]琉球大・農, [2]酒総研）
mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp

産業微生物である麹菌は，ゲノム解析が終了し，微生物ゲノム中，最大規模のゲノムサイズ，遺伝子数を有していることが報告されている (1)．また，非相同末端結合反応に関与する遺伝子群の破壊が相同組み換え効率の劇的上昇を引き起こす事が報告され (2, 3)，麹菌を含む多くの糸状菌で遺伝子破壊が容易に行えるようになった (4)．これにより，単独遺伝子破壊のみならず，多重遺伝子破壊株の作成が期待され，他の *Aspergillus* 属と比較して，マーカー遺伝子の少ない麹菌では，マーカー遺伝子のリサイクリングは重要な技術の一つと考えられた．そこで，我々は，Cre-*loxP* system によるマーカー遺伝子回収技術の構築を試みた．Cre-*loxP* システムは，マーカー遺伝子リサイクリングが行える方法の一つであるが，このシステムを実行するには Cre 組換え酵素発現カセットを作成し，菌体内に導入後，発現誘導を行い，マーカー遺伝子が除去された株の選抜を行うといった非常に煩雑なステップが必要である．そこで我々は，Cre 酵素を菌体内で発現させずに，直接菌体核内に Cre 酵素を導入する事で *loxP* 配列に挟まれたマーカー遺伝子の除去が行えるかを，麹菌を用いて検討した．その結果，核酸を酵素キャリアとする事で，市販 Cre 酵素を効率良く麹菌核内に導入しうることを見出し，マーカー遺伝子再利用が簡便に，且つ迅速に行える技術の開発を行った (5)．加えて，精製リコンビナント Cre 組換え酵素を準備し，高濃度で Cre 酵素の単独導入を試みた所，酵素キャリアを用いたときと同定度の効率でマーカー遺伝子回収が行えることも明らかにした．
続いて，酵素を細胞外から麹菌に導入する技術を Cre 酵素だけでなく，人工ヌクレアーゼ (TALENs) に応用できれば，遺伝子を導入しない，新規な有用菌株の造成が可能になり，麹菌の育種技術の大きな発展につながると考えた．TALENs は，Transcription Activator-Like Effector Nucleases の略で，植物病原菌キサントモナス属が有する任意の塩基配列を認識する DNA 結合ドメインに，2 量体時に DNA 切断活性を示す酵素 FokI のヌクレアーゼドメインを融合させた人工キメラタンパク質であり，人工ヌクレアーゼとも呼ばれている．TALENs によりゲノム上の任意の位置に 2 本鎖切断を引き起こすと，切断された DNA は，非相同末端又は，相同末端結合により修復されるが，この時に修復エラー等により目的の遺伝子を改変すること，即ちゲノム編集が可能となる．欠失するとセレン酸塩耐性になる *sC* 遺伝子をターゲットとしたリコンビナント精製 TALENs を作成し，単独及び核酸等のキャリアを用いて，麹菌に直接導入実験を行ったが，残念ながら現在のところ，ゲノム編集株を見出すことが出来ていない．そこで，そもそも麹菌で TALEN が機能するかを調べた．糸状菌コドン使用頻度に最適化された高活性型 Platinum-Fungal TALENs (6) 発現プラスミドを用いて非相同末端結合 (Nonhomologous end-joining : NHEJ) 修復エラーを引き起こすコンストラクトで，麹菌のゲノム編集を行った．発現は，タンパク質導入に近いと思われる，一過性的発現を選択した．ターゲットには，同様に *sC* 遺伝子を選択し，セレン酸耐性になることを利用してセレクションを行った．その結果，得られた株の 95 % 以上で切断活性が認められた．また，興味深いことに，欠失が観察された株の半分程度が 1 kb 以上の大規模な欠失が引き起こされていた．続いて，この大規模欠失が引き起こされるメカニズムを探る最初のとりかかりとして，NHEJ 修復機構の末端結合に必要な *ligD* 遺伝子破壊株を宿主として，ゲノム編集を試みた．その結果，*ligD* 遺伝子破壊株でも野生株とほぼ同程度の割合で，ゲノム編集による変異が観察され，更に，野生株で観察された大規模欠失が，*ligD* 破壊株では部分的に抑制されていた (7)．今後も，この大規模欠失のメカニズム解明に取り組み，新規な麹菌育種法の開発に繋げていきたい．

【参考文献】
(1) Machida M. et al., Nature (2005), (2) Ninomiya Y. et al., Proc Natl Acad Sci USA (2004), (3) Ishibashi K. et al., Proc Natl Acad Sci USA (2006), (4) Mizutani O. et al., Fungal Genet Biol (2008), (5) Mizutani O. et al., Appl Environ Microbiol (2012), (6) Arazoe T. et al., Biotechnol Bioeng (2015), (7) Mizutani et al., J Biosci Bioeng (2017)

Marker recycling and genome editing using Cre-*loxP* system and TALENs in *Aspergillus oryzae*

○Osamu Mizutani[1,2], Osamu Yamada[2], Haruyuki Iefuji[2]
([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]NRIB)

Key words *Aspergillus oryzae*, Cre/LoxP system, TALEN, genome editing

3S-Ba05 麹菌実用株の分子育種を可能にする—CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集

片山 琢也, ○丸山 潤一
（東大院・農生科・応生工）
amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な醸造食品の製造に利用され，酵素や異種タンパク質の生産にも用いられている産業上重要な糸状菌である．このような産業で使用されている麹菌実用株は多くの種類が存在し，性質は多様であるため，日本酒・醤油・味噌などそれぞれの用途に適した株が選定され用いられている．全ゲノム配列が解読され遺伝子解析が進められてきた麹菌野生株 RIB40 では，これまでに非相同末端結合に関わる *ku70* や *ligD* の欠損株が取得され，効率的な遺伝子改変が可能となっている．しかし，多数の麹菌実用株に対して *ku70* や *ligD* の欠損株を取得し，遺伝子改変を行うには多大な労力と時間を要する．

近年，細菌由来の DNA 切断酵素を用いて標的遺伝子を改変するゲノム編集技術が確立されてきている．なかでも CRISPR/Cas9 システムは，*Streptococcus* 属由来のヌクレアーゼ Cas9 とそれをゲノム上の標的部位に誘導するガイド RNA (gRNA)のみからなる簡便な手法であり，動物や植物など多くの生物の遺伝子改変で利用され，農業や医療分野への応用が期待されている．

我々は最近，CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を麹菌で初めて確立した [1,2]．まず，コドン改変を行った *cas9* 遺伝子と gRNA を発現するためのゲノム編集用プラスミドを作製し，これを麹菌のゲノムに直接挿入することで変異導入を試みた．その結果，日本酒用 RIB128 株および醤油用 RIB915 株において 10~20%の割合で標的部位に変異が導入された株が取得された．

この時点では，ゲノム編集用プラスミドの導入に形質転換マーカーとして，硝酸塩資化に必要な *niaD* 遺伝子を使用していたため，*niaD* 遺伝子の機能欠損株を作製する必要があった．そこで，栄養要求性株を作製する必要のない薬剤耐性マーカーとして，ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* を使用した．また，ゲノム編集用プラスミドに *Aspergillus nidulans* 由来の AMA1 (autonomously maintained in *Aspergillus*)配列を挿入することによって，プラスミドの自律複製を可能とした．以上の改変型プラスミドを使用した結果，変異株取得効率は 50~100%まで向上した．

ゲノム編集用プラスミドは，変異導入が終われば細胞内に保持され続ける必要はない．また，目的とする性質を得るには，複数の遺伝子を対象とした改変が必要である場合がほとんどであると想定される．不要になったプラスミドの脱落は薬剤非存在下での継代により可能であると考えられるが，多くの遺伝子改変を行うにはプラスミド脱落の効率化が必要である．そこで，誘導性の α-アミラーゼ遺伝子 *amyB* のプロモーター制御下で *Aoace2* 遺伝子を発現する断片を，ゲノム編集用プラスミドに挿入した．我々はこれまでに，分化に関わる転写因子をコードする *Aoace2* 遺伝子について，過剰発現させることにより生育が著しく低下することを示している [3]．このプラスミドを用いて標的遺伝子に変異を導入した後，*amyB* プロモーターの誘導条件で培養することでプラスミドを脱落した変異株を選択・単離した．さらに，その株に別の遺伝子を標的とするゲノム編集用プラスミドを導入することによって，複数の遺伝子に変異を導入した株の取得に成功した．

以上の結果から，本研究で確立した方法を用いることで，麹菌実用株において効率的に多重変異株を作製できることが示された．これまで困難であった麹菌実用株の分子育種の効率が大幅に改善されることにより，従来にない醸造食品の開発や有用物質の大量生産につながると期待される．

1) Katayama *et al.* (2016) *Biotechnol. Lett.* 38, 637-642
2) Nakamura *et al.* (2017) *J. Gen. Appl. Microbiol.* in press
3) 中村ら，第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89, 2015

CRISPR/Cas9-mediated genome editing for molecular breeding in industrial strains of *Aspergillus oryzae*

Takuya Katayama, ○Jun-ichi Maruyama
(Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

Key words *Aspergillus oryzae*, genome editing, CRISPR/Cas9

3S-Ca01 バイオテクノロジー分野におけるグローバル知財戦略

○秋元 浩
（知的財産戦略ネットワーク）
info@ipsn.co.jp

バイオテクノロジー産業は，他のコンシューマー製品の産業とは異なり，産業化（出口）まで長期間の研究開発が必須であり，また，バイオマスなどの素材系を除いて，医薬品に代表される如く，その最終製品は主として人々の健康福祉はもとより生命そのものに係わるものである．日本が今後とも世界の中で生き残っていくための基幹となる重要な産業分野であるからこそ，知財戦略についてもグローバルな観点から国家戦略として推進して行く必要がある．

本講演では，特に，研究開発から事業化までに長期間（～１５年）を要し，莫大な先行投資（～数１００億円）を必要とし，そのうえ候補化合物が見つかっても上市までの成功確率（～５％）が極めて低い医薬品を中心として，産業界での生きた経験に基づく幾つかの実効性のある事例を取り上げつつ，技術革新に基づくパラダイムシフトを踏まえて，如何にして知財という面から世界に挑戦していったら良いのかを，“知的財産制度の意義とその利活用，ライフサイエンス産業における研究開発と知財戦略，グローバルな知財戦略～米国における訴訟対策を含めて，及び，知財戦略のパラダイムシフト”，などに焦点をあてながら総括的に紹介する．

さらに，知財という面で如何にしてオールジャパン体制を構築していったら良いのかに関して，その幾つかの事例として，全く新しいビジネスモデル「創知産業：ＩＰＳＮ」，国家的実験として公的資金を中心としたライフサイエンス知財ファンド（ＬＳＩＰ），東京都ライフサイエンスＨＵＢ事業，及び，ゲノム編集における知財戦略などについても併せて紹介する．

Global Strategy of the Intellectual Property in the Field of Biotechnology

○Hiroshi Akimoto
(Intellectual Property Strategy Network Inc.)

Key words intellectual property, global strategy, biotechnology, pharmaceuticals

3S-Ca02 ハラールサイエンスとバイオセンサー

○民谷 栄一
（阪大院・工）
tamiya@ap.eng.osaka-u.ac.jp

グローバルビジネスが進行する中でイスラム圏の人々向けのハラール対応の食品，化粧品，医薬品などへの開発ニーズが高まっている．演者は，2008 年からマレーシアやブルネイの大学研究者や政府関係者とハラールサイエンスおよび関連ビジネスに関する取り組みを行ってきた．2013 年からはブルネイ政府と大阪大学が MOU(交流協定同意書)を締結し，さらなる展開を行なっている．特に，演者の専門とするバイオセンサーを用いてハラールに適合するかを判断する研究が注目されており，本講演では，ハラールの分析研究と関連した動向や現状と展望について紹介する．

Halal science and Biosensor

○Eiichi Tamiya
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words biosensor, bio-industry, food security, halal business

3S-Ca03 酒米新品種と革新的栽培・醸造技術の活用による日本酒輸出促進への取組

○杉本 琢真
（兵庫県立農林水産技術総合センター）
matsutakuma@gmail.com

【研究の背景】 近年「和食」のユネスコ無形文化遺産登録や国酒プロジェクトの成功により，日本酒の輸出量は右肩上がりに伸びており，海外輸出向けの日本酒の開発が重要視されている．日本酒の原料米としては全国 1 位の栽培面積を占める「山田錦」が多く使用されているが，長稈で倒れやすく，病害に弱いなど栽培特性に課題がある．全国第 2 位の栽培面積を占める「五百万石」は早生品種であり，高温条件で登熟するため，醸造過程での米の溶解性が低いなど，酒造適性の改良が求められている．また，近年の温暖化や気候変動の影響により，酒造適性の低下や乳白粒の発生や小粒化が進行し，いもち病，縞葉枯病などの病害の発生も年々増加しているため，栽培地域からは気候変動や病害虫に強い酒米新品種が求められている．一方，新品種に対応した最適な醸造行程を設計するには多くの熟練技術と年月が必要とされ，その年限短縮が重要な課題となっている．また，新品種により醸造された日本酒の海外輸出促進のためには，輸出相手国の嗜好を予め把握し，その嗜好に合った日本酒を開発することが求められている．

【研究の目的】 以上の課題解決にむけて，次世代コンソーシアムでは研究課題「山田錦」レベルの優れた適性を有する酒米新品種と革新的栽培・醸造技術の活用による日本酒輸出倍増戦略」を立ち上げた．すなわち，全国有数の酒米産地である兵庫県，栃木県，石川県，京都府において，気候変動や病害虫に強い「山田錦」レベルの酒造適性をもつ有望系統と品種を用いて，酒米としての品質が高く，安定生産が可能な栽培法を確立して現地実証試験を行い，栽培面積の 20%以上の拡大を図る．また，山口県ではＩＣＴを活用した酒米の生産支援システムの確立を行い，現状の 20%収量増を目指す．得られた現地生産物を用いて，各地域の酒造メーカーによる試験醸造を実施する．醸造サンプルについては，酒類総合研究所，京都市産業技術研究所において試験醸造製品の内容成分を精査し，既に「山田錦」等で得た指標を基に栽培・醸造技術を最適化するとともに，海外向けに適する日本酒製造方法を検討し，海外シェアをとれる日本酒を造ることを目指す．このように開発した醸造製品については，海外輸出を支援する各府県の関係機関や酒造組合と協力して輸出倍増戦略の構築を行い，日本酒の輸出量ならびに輸出額の 20%以上の増加をめざす．

【研究の内容】 兵庫県では「兵庫錦」と「兵系酒 85 号」，栃木県では「栃木酒 27 号」，石川県では「石川酒 68 号」，京都府では「祝」と「京の輝き」，山口県では「山田錦」を用いて，酒米としての品質が高く，安定して多収となる栽培条件を確立する．山口県は施肥試験と並行して，レーザー式生育センサによる低層リモートセンシングと圃場センサ情報に基づいた生育診断技術ならびに，ＩＣＴのネットワークを活用した気象，生育等のデータおよび栽培管理記録の共有により，酒米の生産拡大を試みる．平成 28 年度に得られた研究成果を参考にして，5 府県合計 14 箇所で現地実証試験を行い，供試品種の栽培適応性を把握するとともに栽培体系を確立して，早期に普及拡大を行うため，普及関係機関との連携を深める．
栽培試験や現地試験で得られた生産物を用いて，5 府県合計 17 社の酒造メーカーで試験醸造を行う．酒類総合研究所，京都府立大学，京都市産業技術研究所，石川県では，産地や収穫年度，施肥体系の異なる様々な酒米についてのプロテオーム解析，および生成酒に関するメタボローム解析を継続して行い，その関係性および醸造特性の把握を行うとともに，コンソーシアム構成員と設定した品質目標を目指した醸造法の最適化をおこなう．原料米由来の醸造製品に固有の香りが指摘された場合には，GC-MS 等による香気成分の高感度分析を実施する．
日本酒の海外輸出促進のため，想定している輸出相手国の日本酒に対する嗜好調査を行う．これらの結果とともに，得られた酒米の醸造特性を酒造メーカーにフィードバックし，海外輸出向けの日本酒製品の商品コンセプトに適した酒米品種を選定するとともに，その商品コンセプトに応じた醸造法を開発する．このように開発した醸造製品は，本コンソーシアムの「酒米新系統・品種による輸出用のオリジナル日本酒」として，海外の展示会へ出展する計画である．また，海外輸出を支援する各府県の関係機関や酒造組合，ＪＥＴＲＯ等と連携して，開発したこれら製品の輸出倍増戦略の構築を行う．

【謝辞】本研究は平成 27 年度農林水産省補正予算事業「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて実施している．

Research Project of Export Promotion of Japanese sake using new varieties of sake brewing rice and innovative technologies for cultivation and brewing

○Takuma Sugimoto
(Hyogo Agricultural Institute for Agriculture, Forestry and Fisheries)

Key words Sake brewing rice, Export Promotion of Japanese sake, innovative technologies

3S-Ca04 酵素技術によるクラスターデキストリンの実用化と国際展開

○古屋敷 隆[1], 高田 洋樹[2], 栗木 隆[1]
([1]江崎グリコ（株）健康研, [2]江崎グリコ（株）グループ研企室)
furuyashiki-takashi@glico.co.jp

江崎グリコの健康科学研究所は，糖質工学をコアコンピタンスと定め，長年研究を積み重ねてきた．これまでに数多くの糖質加工に関連する酵素を開発し，開発した酵素を利用することで，デンプンやスクロースから高機能な糖質素材を生み出す研究を続けてきた．その 1 例として，ブランチングエンザイムとクラスター デキストリンの開発について説明するとともに，現在進めている米国を中心とした海外への展開について紹介する．

グリコの社名は，グリコーゲンが起源である．創業者が牡蠣の煮汁に含まれていたグリコーゲンをキャラメルに配合したことが由来だ．グリコーゲンはデンプンのアミロペクチンと同様の α-1-4/1-6 グルカンであり，動物性のデンプンとも呼ばれる．その構造は，デンプンと比較すると分岐が多く，約 2 倍の分岐で構成されているため，球状に近い形状をしている．我々はアミロペクチンからグリコーゲンを合成する技術を開発することを目的とし，分岐を増やす役割を持つブランチングエンザイムに着目した．ワキシーコーンスターチに土壌菌から得られたブランチングエンザイムを作用させたところ，著しく粘度が低下し，グリコーゲンが合成されたと考えたが，実際にはグリコーゲンではなく高度に分岐した環状構造を有する多糖が生成していることが分かった．これがクラスター デキストリンである．

一般的なデキストリンは，デンプンを酵素により加水分解することで得られ，加水分解の程度によって溶解性，甘味，吸湿性，粘度，保存安定性等の性質が決まる．低分子化されたデキストリンほど溶解性は高く，甘味が強くて吸湿性が高くなる傾向にある．一方，高分子のデキストリンは，吸湿性は低いが溶解しにくく，甘みは弱いが粉っぽい．クラスター デキストリンは，高分子のデキストリンでありながら，溶解しやすく，吸湿しにくい性質をもち，味はほぼ無味である．また，低分子をほとんど含まないため，浸透圧が非常に低く，5%の水溶液の浸透圧はわずかに 2 mOsm 程度である．これらの性質を生かした応用研究を進めた結果，クラスター デキストリンには以下の 4 つの用途があることが分かった．

①スポーツニュートリション用途
低浸透圧である特徴を利用して，胃から腸への排出速度が速く，運動中に摂取しても胃腸の不快感が起こりにくいスポーツドリンクを設計できる．また，運動後の速やかなエネルギー補給に有用である．

②粉末基材用途
吸湿しにくい性質があるため，果汁や動植物のエキス，魚油などを粉末化する時の基材に有用で，吸湿しにくく，かつ安定性の高い粉末を作ることができる．

③風味改良用途
クラスター デキストリンは構造上，包接作用を有しており，クエン酸の酸味やカテキンの苦味をマスキングする効果があり，風味改良に有用である．

④物性改良用途
高分子であるために枯渇効果を引き起こし，増粘剤などの粘度を低下させる効果があり，高粘性溶液の物性改良に利用できる．

これらの特徴を背景に，2002 年から国内で食品原料として販売し，順調に拡大してきた．2008 年から海外展開を開始した．2012 年には米国で FDA notified GRAS (Generally recognized as safe)認証を取得し，スポーツニュートリションの分野で大きな飛躍を遂げた．現在は，米国以外にも，欧州，アジア諸国で各国のレギュレーションに対応しながら海外展開を拡大中である．

Practical applications of Cluster Dextrin by the enzyme technology and international development

○Takashi Furuyashiki[1], Hiroki Takata[2], Takashi Kuriki[1]
([1]Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd., [2]Office of Strategic Research Planning, Ezaki Glico Co., Ltd.)

Key words enzyme reaction, dextrin

3S-Da01 Cyclopenase, hemocyanin-like enzyme converting 6,7-bicyclo ring of cyclopenin to form 6,6-quinolone core of viridicatin-type fungal alkaloid

○Kenji Watanabe
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)
kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp

Objectives

Microbes produce a wide range of secondary metabolites with sophisticated structures, which are synthesized by biosynthetic enzymes catalyzing unprecedented or predictable reaction in a biosynthetic pathway. Discovering a new class of biosynthetic enzymes and elucidating the mechanism of their catalytic activities allow us to provide with many benefits such as methods for ecological synthesis of bioactive substances, ideas for designing catalysts and landmarks for discovering novel metabolites by genome mining thus far. Example of the 6,6-quinolone scaffolds of the viridicatin type of fungal alkaloids were found in various quinolone alkaloids that often exhibit useful biological activities. Thus, it is of interest to identify viridicatin-forming enzymes and understand how such alkaloids are biosynthesized from cyclopenin class of natural product. Here we present a detailed in vitro characterization of cyclopenase catalyzing unprecedented reaction for the formation of viridicatin from cyclopenin in an Aspergillal secondary metabolite.

Methods

First, we tried to purify cyclopenase from mycelia of fungi producing viridicatin type of compounds. Various filamentous fungi classified as *Aspergillus* or *Penicillium* produce cyclopenin-type and viridicatin-type compouds, e.g. *Penicillium* sp. FKI-2140 and *Aspergillus nidulans* produce penigequinolones and aspoquinolones, respectively. We fractioned mycelium extract of FKI-2140 using FPLC and searched for cyclopenase on the basis of catalytic activity of transforming 4'-methoxycyclopenin (MCPN) to 4'-methoxyviridicatin (MVDT). Next, we searched for cyclopenase gene from biosynthetic gene cluster of penigequinolone (*png* cluster) and that of aspoquinolone (*asq* cluster). Target genes were expressed in *E. coli* and extract of each transformant was assayed for cyclopenase activity. Heterologous product of cyclopenases were fused with His-tag and purified by immobilized metal ion affinity chromatography and subsequent gel filtration chromatography. Purified protein was used for *in vitro* assay to study substrate availability, cofactor requirements and inhibitor, and was crystallized for detailed analysis of the catalytic mechanism.

Results

Partially-purified cyclopenase was obtained from mycelium extract of *Penicillium* sp. FKI-2140 and it showed accelerated catalysis in the presence of $NADP^+$, however, cyclopenase was not identified. On the other hand, heterologous expression of fungal gene in E. coli produced good results. Hemocyanin-like proteins PngL and AsqI catalyzed conversion of MCPN to MVDT. AsqI was obtained as a soluble protein and it showed wider substrate availability than PngL. Catalytic activity of purified AsqI was elevated by adding $NADP^+$ to the reaction as in the case of cyclopenase partially purified from fungal extract and was inhibited with EDTA and metal ligand such as KCN.

Conclusion

In our study, we found hemocyanin-like proteins are cyclopenase. This is the first report on hemocyanin-like proteins involved in secondary metabolite biosynthesis. AsqI converted cyclopenin type compounds to form viridicatin type compounds releasing toxic compound methyl isocyanate. The catalytic activity was inhibited with metal chelator and ligands, suggesting some metal ions are involved in the catalysis. Detailed analysis of catalytic mechanism using AsqI crystal and inhibitor is underway.

Cyclopenase, hemocyanin-like enzyme converting 6,7-bicyclo ring of cyclopenin to form 6,6-quinolone core of viridicatin-type fungal alkaloid

○Kenji Watanabe
(Grad. Sch. Integr. Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

Key words biosynthesis, antibiotics, enzyme activity

3S-Da02 放線菌の持つ二次代謝産物生合成に用いられる亜硝酸生合成経路

○勝山 陽平
（東大院・農生科）
aykatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

放線菌の生産する二次代謝産物は免疫抑制剤であるタクロリムスや抗生物質であるストレプトマイシンに代表されるように重要な医薬品資源である．これらの代謝物の生合成に関する知見は急速に蓄積している一方，まだその生合成機構が明らかとなっていない化合物も数多く存在する．その代表例の 1 つが窒素窒素 (N-N) 結合を持つ化合物群である[1]．このような化合物は放線菌から数多く単離されているにも関わらず，その生合成機構が明らかとなった例は存在しない．そのため，これらの生合成メカニズムの解明は本分野の重要課題の一つである．

この課題を解決すべく，我々は N-N 結合の結合の中でもジアゾ基を持つ天然物，cremeomycin に着目し，その生合成経路を解析した．生産菌である *Streptomyces cremeus* より cremeomycin 生合成遺伝子クラスターをクローニングし，明らかになった生合成遺伝子を異種発現，組換えタンパク質の in vitro 解析を行った結果，cremeomycin の生合成経路の大半を明らかにすることに成功した[2]．この経路において特に重要な反応は CreE, CreD が担う亜硝酸生合成反応である．これらの酵素によりアスパラギン酸から生産された亜硝酸が cremeomycin の主骨格の源となる 3-amino-5-hydroxy-4-methoxybenzoic acid の持つ芳香族アミンと反応することでジアゾ基が形成される．CreE, CreD からなる亜硝酸生合成経路は従来知られている硝化作用のものとは異なり，放線菌において二次代謝産物生産に用いるために進化したものであると考えられる．すでにデータベース上で明らかになっているゲノム配列から *creE*, *creD* ホモログより構成されているオペロンを探索したところ，このようなオペロンは *Streptomyces* 属に属する菌のみならず，*Nocardia* 属，*Kitasatospora* 属を含む様々な放線菌ゲノム上に存在した．また，これらのうちいくつかは二次代謝産物の生合成遺伝子クラスター中に存在し，この経路が様々な二次代謝産物の生合成に関与することが示唆される．

そこで我々はこの亜硝酸生合成経路を用いて生産される新たな二次代謝産物を探索すべくゲノムマイニングを行なった．*Streptomyces*，*Kitasatospora*，*Kutzneria* など複数の放線菌において creE ホモログ遺伝子を破壊し，野生株と代謝産物を比較することで目的化合物を探索した．その結果，いくつかの菌株において代謝産物に変化が見られた．これらの化合物はこの亜硝酸生合成経路により生合成されることが強く示唆される．現在これらの化合物の生合成研究に取り組んでいる．

また，CreE, CreD は酵素としても興味深い特徴を持つ．CreE はアスパラギン酸のアミンを三回連続的に酸化し，ニトロ基へと変換するフラビン依存型のモノオキシゲナーゼである．これによりニトロコハク酸が生成する．また，CreD はニトロコハク酸から亜硝酸を脱離させる新規酵素である．これらの酵素がこのような反応を触媒するメカニズムを解明するためにこれらの酵素の X 線結晶構造解析に取り組んだ．我々は CreD の X 線結晶構造を単独及び生成物であるフマル酸との共結晶の形で解くことに成功した．構造解析及び，部位特異的変異導入による解析から CreD は Ser と Arg をそれぞれ酸と塩基触媒として用いることで亜硝酸の脱離を触媒することが示唆された．

本発表では発表者の研究室で行われた最近の研究とこの亜硝酸を用いた二次代謝産物の生合成に関する今後の展望について議論する．

1. Le Goff, G., Ouazzani, J. (2014) Bioorg. Med. Chem. 22, 6529-6544.
2. Sugai, Y., Katsuyama, Y., Ohnishi, Y. (2016) Nat. Chem. Biol. 12, 73-75.

Nitrous acid biosynthetic pathway used for secondary metabolite biosynthesis in actinobacteria

○Yohei Katsuyama
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words actinomycetes, biosynthesis, secondary metabolite

3S-Da03 麹菌異種発現系を利用した糸状菌由来二次代謝産物の生合成研究

○南 篤志, 及川 英秋
（北大院・理）
aminami@sci.hokudai.ac.jp

微生物や植物が生産する天然物は，分子量が 500 程度のコンパクトな骨格に多数の官能基が巧妙に導入された複雑な化学構造を有する．その中でも優れた生物活性を示す天然物は医薬品を中心として利用され，人類の福祉向上に大きく貢献してきた．その重要性は，1981 年から 2010 年に承認された新規医薬品（1355 種）の約半数が天然物に関連した有機化合物であったことからも明らかである．21 世紀に入り，さまざまな微生物のゲノム情報が解読されると，天然物を合成するために必要な遺伝子のセットを一つの微生物が多数保有していることが明らかになってきた．放線菌と並ぶ生物活性天然物の宝庫である糸状菌に限定しても，*Aspergillus nidulans* に 71 種類，*A. niger* に 81 種類，*A. oryzae* にも 75 種類もの遺伝子クラスターが存在しており，その数は各菌から発見された天然物の数を大きく上回る．すなわち，我々は微生物が潜在的にもつ物質生産能力の一部を活用していたにすぎず，ゲノム解析により明らかになった未開拓遺伝子資源を十分に活用することができれば，新たな医薬品資源となり得る天然物を獲得することができるはずである．本発表では，ゲノム上に存在する機能未知遺伝子の強制発現による天然物の生産（ゲノムマイニング）に関する最近の取り組みについて紹介する．

① 二機能性環化酵素の強制発現によるセスタテルペンの生産

イソプレノイド生合成の初発段階は，鎖状前駆体の合成とそれに続く環化反応である．一般に，この反応はプレニル基転移酵素と環化酵素により触媒されるが，両酵素が融合した特異な二機能性環化酵素も存在する．例えば，山形大学の豊増・佐々らによって世界で初めて発見された二機能性環化酵素（PaFS）は，特徴的な 3 環性骨格を有する fusicoccadiene を生成物として与える．この PaFS をクエリーとしてデータベース検索を行うと相同な酵素遺伝子が数多く見いだされ，各酵素の環化ドメインに着目して系統樹解析を行うと，主に 3 つのクレードに分類されることがわかった．機能解析がなされていた 3 種の環化酵素（PaFS, PaPS, AcOS）が同一のクレードに分類されていたことからその共通点を探ると，いずれの環化酵素も 5-11 員環をもつ 2 環性中間体を経由した環化反応を触媒することに気がついた．これより，環化酵素のアミノ酸配列と環化機構との間には関連性があるのではないかと考え，約 25%の環化酵素が分類されるクレード A の環化酵素遺伝子に着目して機能解析を開始した．複数の候補遺伝子を麹菌内で強制発現させたところ 5 種の環化体が得られ，それぞれ 2 環性，3 環性，4 環性骨格を有していた．最も複雑な 4 環性骨格を持つ環化体を与えた NfSS をモデルとした同位体標識実験から推定された環化機構は，取得した環化体の構造と良い一致を示した．これより，クレード A に分類される環化酵素は環化の位置とその順序が共通した経路で反応を触媒する一方，環化に関わる二重結合の面選択性を自在に制御することで環化体の構造多様性を創出していることが示唆された．以上の結果は，アミノ酸配列に基づいた論理的な機能推定（＝環化体の構造新規性の推定）あるいは酵素機能改変に繋がるのではないかと期待している．

② PKS-NRPS の強制発現によるポリケタイド系天然物の生産

比較的遺伝子サイズの小さい二機能性環化酵素遺伝子での成功を受け，糸状菌が有する天然物生合成遺伝子クラスターのおよそ半数を占める骨格構築酵素遺伝子（PKS-NRPS）の強制発現にも着手した．ただし，12 kbp にも及ぶ PKS-NRPS のクローニングを考えると標的遺伝子の選択には慎重を期する必要があった．そこで，菌体内で転写されている遺伝子であれば対応する生成物が生産されていなくても機能するのではないか？という仮説のもと，糸状菌 *Alternaria solani* から候補遺伝子（*asolS*）を選択した．骨格構築に関わるもう一つの酵素遺伝子 *asolC* と共に麹菌へと導入したところ，テトラミン酸構造をもつポリケタイドを取得した．また，近傍に位置していた修飾酵素遺伝子（*asolA*）を追加導入すると，海産糸状菌から単離例のある既知天然物 didymellamide B が生産された．同時に取得できた副生成物の化学構造などから，didymellamide 類の生合成経路を提唱するに至った．

以上，麹菌を宿主とした異種発現系を用いることで，機能未知遺伝子の強制発現による天然物の生産が可能であることを示すことができた．本手法では遺伝子を導入するだけで対応する化合物を得られるため，合成 DNA を最大限に活用すれば，地球上の 99%を占めるとも言われている難培養性微生物由来の生合成遺伝子の機能解析も可能となる．今回紹介した二機能性環化酵素のように，アミノ酸配列から生成する化合物の構造新規性を（ある程度）予測することができるようになれば，オリジナリティーの高い化合物ライブラリーの構築も可能になると期待される．

Biosynthetic study of fungal natural products by harnessing the enzymatic assembly line in *A. oryzae*

○Atsushi Minami, Hideaki Oikawa
(Div. Chem. Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words biosynthesis, *Aspergillus oryzae*

3S-Da04 テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する

○梅野 太輔, 小野 航央, 田代 美希, 大谷 悠介, 河合 繁子
（千葉大院・工）
umeno@faculty.chiba-u.jp

テルペノイドの効率的な微生物生産系の確立を目指し，原料供給量の増強，生産物耐性の向上，競合経路のノックダウンなど，さまざまな努力が重ねられてきた．イソプレンやアモルファジエンなどにおいては，25～60 g/L もの生産性を達成している例がある反面が，その他の多くのテルペン化合物については，それよりもはるかに少ない生産量に留まっている．これらを就職して更に複雑な化学構造を生合成するために，そして元来弱い人工/人造の酵素活性を使った非天然テルペノイド類の生合成経路を確立するために，テルペノイドの生産能力は更に向上させることが望ましい．
本講演では，検討されてこなかった幾つかの点に着目し，大腸菌を宿主としたテルペン・テルペノイドの効率生産についての再検討の結果をご報告する．

[1] 酵素そのものを鍛える：代謝工学が或る程度進んだ現在，テルペノイド生産のボトルネックは，テルペン合成酵素そのものの性能に移りつつある．私たちは，テルペン酵素の細胞活性の進化デザイン技術を開発した．この手法を用いて得た活性変異体を発現させると，たしかに全体の生産性が高まることが分かった．

[2] 上流経路の共進化：上で得た活性改良形のゲラニオール合成酵素の発現は，株によっては致死となることを見出した．この現象を選抜原理とした原料供給経路の活性スクリーニング法を完成した．非メバロン酸経路は，力価においては異種メバロン酸経路に劣るが，炭素収率の上では明確に優れている．そこで，大腸菌内在の非メバロン酸経路をなす全ての酵素に対し，ランダム変異導入→活性選抜，を実施し，カロテノイド，テルペン生産量を一桁ほど向上させることに成功した．こうして得た変異体の解析によって，細胞のテルペン生産性は，ジメチルアリルピロリン酸（DMAPP）/ イソペンテニル二リン酸（IPP）の供給比の変更によって大きく改良できることがわかった．

[3] イソプレニル二リン酸の隠れた漏出口を閉じる：テルペン・テルペノイドの原料は DMAPP，IPP，そしてそれらの縮合物である．私たちは，これらの化合物が内在のフォスファターゼによって一部加水分解されていることを見出した．現在，Target-AID 法（Nishida et al., Science, 353, 6305 (2016)）を用いて，大腸菌の持つ 70 超のフォスファターゼ遺伝子を組織的にノックアウトする作業を行っている．この「隠れた原料漏出口：を塞ぐ試みは現在も進行中であるが，現段階でも，テルペン生産性が明らかに向上した株が数多く得られている．本講演では，作出した最新の大腸菌株の能力検定の結果を報告する．

Re-engineering logistics for terpenoid/ isoprenoid pathways

○Daisuke Umeno, Koyo Ono, Miki Tashiro, Yusuke Otani, Shigeko Kawai
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words directed evolution, selection and screening, metabolic engineering

3S-Da05 放線菌由来天然化合物の骨格形成機構の解明

○葛山 智久
（東大・生物工学セ）
utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

はじめに
天然化合物は，複数の不斉点を含む多様な骨格をもつことから様々な生体分子と相互作用する可能性があり，結果として多様な生物活性を示す．そのため，これまでに上市された医薬品の約 6 割が天然化合物と関連がある [1]．また，天然化合物からは人知を越えた構造を有する化合物が多数発見されており，したがって，天然化合物は今後も医薬品リード化合物の重要な探索資源であり続けると考えられる．一方，天然化合物の生合成機構を明らかにすることで，微生物などを用いた環境低負荷型の物質生産や改変酵素を利用した新規類縁体の合成が可能になると期待されている．また，特徴的な骨格を生合成する酵素には，ユニークな反応を触媒するものが多く存在するため，天然化合物の生合成経路の解明はその構造多様性を生み出す分子機構を理解する上で重要である．生合成研究から得られた知見を利用して新たな生物活性物質を創製することも期待されている．さらには，新奇な生合成反応を触媒する酵素を利用することで，新たな生物活性物質を創出することも可能になる．
本発表では，放線菌が生産するユニークな構造をもつ３つの生物活性物質，cyclooctatin，versipelostatin，trichostatin の生合成酵素の同定とその反応機構について紹介する．

Cyclooctatin の生合成マシナリー
Cyclooctatin は，*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 の生産する 5-8-5 員環構造を有する C_{20} のジテルペン化合物である．Cyclooctatin は CotB1 から CotB4 の 4 つの遺伝子産物で生合成され，CotB1 が GGDP を合成し，CotB2 が geranylgeranyl diphosphate (GGPP)の環化反応を触媒して 5-8-5 員環を持つ cyclooctat-9-en-7-ol を生成し，次いでシトクロム P450 である CotB3 と CotB4 によってそれぞれ炭素 5 位と炭素 18 位に水酸基が付加されて最終的に cyclooctatin が生合成される [2]．これらの生合成酵素の中で，CotB2 は 5-8-5 員環骨格を構築するための鍵酵素である．テルペン環化酵素によって触媒される環化反応は一連の化学反応が酵素によって精巧に制御されている代表例である．CotB2 のユニークな環化反応機構とその構造基盤について紹介する [3,4,5]．

Versipelostatin の生合成マシナリー
Versipelostatin（VST）は，*Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 によって生産されるスピロテトロン酸構造を有する大環状ポリケタイド化合物である．スピロテトロン酸構造は放線菌から単離されるポリケタイド化合物群にのみ見出されるユニークな構造であり，スピロ炭素により連なったテトロン酸骨格と 6 員環，および C－C 結合のみから構成される大環状骨格に特徴づけられる．VST の 100 kb を越える生合成遺伝子クラスターの同定と，BAC（バクテリア人工染色体）ベクターを用いた VST の異種生産について紹介する．また，VST 生合成遺伝子クラスター中に存在するわずか 142 アミノ酸残基から成る VstJ 酵素による分子内 [4+2]-環化付加反応を介した VST の大環状構造構築機構についても紹介する [6,7]．

Trichostatin の生合成マシナリー
Trichostatin A (TSA) は放線菌が生産する二次代謝産物の一つで，ヒストン脱アセチル化酵素の強力な阻害剤としてエピジェネティクス分野において広く用いられている．阻害活性には末端のヒドロキサム酸基が重要であることが明らかになっている．今回，TSA 生産菌 *Streptomyces* sp. RM72 株から I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子を含む TSA 生合成遺伝子クラスターを同定し，グルタミン酸 γ ヒドロキサム酸を介する末端ヒドロキサム酸基の生合成機構を解明したので紹介する [8]．様々な骨格の化合物への人為的な末端ヒドロキサム酸導入の可能性についても議論したい．

1) Newman D. J. & Cragg G. M. J. Nat. Prod. 2012, 75: 311.
2) Kim S-Y. *et al*. Chem. Biol. 2009, 16: 736.
3) Meguro A. *et al*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2015, 54: 4353.
4) Sato H. *et al*. Sci. Rep. 2015, 5: 18471.
5) Tomita T. *et al*. ACS Chem. Biol. 2017, doi: 10.1021/acschembio.7b00154.
6) Hashimoto T. *et al*. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137: 572.
7) Hashimoto T. & Kuzuyama T. Curr Opin Chem Biol. 2016, 35: 117.
8) Kudo K. *et al*. J. Am. Chem. Soc. 2017, doi: 10.1021/jacs.7b02071.

Studies on the formation of natural product skeletons from actinomycetes

○Tomohisa Kuzuyama
(BRC, UTokyo)

Key words biosynthesis, *Streptomyces*, terpenoid, polyketide

3S-Ap01 Introduction: "Smart cell industry" a new trend in bioeconomy

○Toshiya Muranaka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Based on the rapid and world-wide development of various technologies including NGS, genome editing, and synthetic biology, great expansion of "Bioeconomy" is expected in the field of biotechnology. In Japan, new project of "Development of Production Techniques for Highly Functional Biomaterials Using Smart Cells of Plants and Other Organisms" (Smart Cell Project) (NEDO ; New Energy and Industrial Technology Development Organization) has launched since 2016. In this symposium, new trend toward Bioeconomy both in China and Japan will be discussed.

次世代シーケンサー，ゲノム編集技術あるいは合成生物学などバイオ分野における先端研究の急速な発展に伴い，バイオに関わる経済活動分野「バイオ経済（bioeconomy）」の拡大が期待されている．この国際的な潮流を受け，国内でも 2016 年度より NEDO による新事業「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」がスタートした．本シンポジウムでは，国内における本事業の関係者，および，近年バイオ研究の発展が著しい中国からの演者による講演を行い，本分野の特にアジアを中心とした国際的展開について議論する．

3S-Ap02 Natural product synthetic biology: From bacteria to plant

○Yong Wang
(Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences)
yongwang@sibs.ac.cn

Natural products (NPs) are important drug pools for human disease prevention and treatment. The great advances in synthetic biology have greatly revolutionized the strategies of NPs development and production. However, attempts to produce complex natural products with synthetic biotechnology, have been hampered until now by the limited characterized parts, parts incompatible and products tolerance. To address these problems, in the past years, we made specific efforts to identify and characterize more parts from various resources, develop tools and methodologies for parts assembly and modulation, engineer transporters to improve the compounds production. Lots of parts related to the natural products biosynthesis were collected and characterized for the further design. In silico tools and system biology based methodology were developed for parts design and optimization. We got different representative natural products, such as terpenoids, polyketides and phenylpropanoids, produced successfully in the engineered E. coli or Nicotiana benthamiana systems. Some of the products and technologies have been getting started the industrial research collaborated with the enterprise.

Introduction: "Smart cell industry" a new trend in bioeconomy

○Toshiya Muranaka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, P450, plant cell culture, genome editing

Natural product synthetic biology: From bacteria to plant

○Yong Wang
(Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences)

Key words natural products, synthetic biology

3S-Ap03 Higher fungus as a promising cell factory: A story about Lingzhi (Reishi)

○Jian-Jiang Zhong, Han Xiao, Wen-Fang Wang
(State Key Lab. Microb. Metab., Dept. Bioeng., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)
jjzhong@sjtu.edu.cn

Higher fungi (also known as macrofungi), including divisions of Ascomycetes, Basidiomycetes, and Deuteromycetes, can form easily observed and collected sporocarps as a result of septate hyphae development. With greater than 70 000 species, they have been recognized as an abundant and important group of organisms to humans for centuries. These fungi are of particular interest not only because of their importance as food resources but also as traditional medicines, and they are regarded as a rich source of various natural compounds including terpenoids, heterocyclics and polyketides, the production of which represents a wide range of interest in pharmaceutical and healthcare industries. *Ganoderma lucidum*, called as Lingzhi in Chinese or Reishi in Japanese, is a famous traditional medicinal higher fungus, having been used as folk medicine since ancient times in China. Its secondary metabolite - ganoderic acid has recently been found to possess significant anti-tumor and anti-metastasis activities. However, further (pre-)clinic evaluations are severely hampered by lack of sufficient amount of pure individual ganoderic acids. To overcome the bottleneck of a targeted compound supply, advanced fermentation technology and smart bioseparation protocol are very helpful and important. In addition to our previous liquid shaking-static two-stage cultivation mode, our recent efforts for enhancing the production and recovery of ganoderic acids from the mycelial fermentation of *G. lucidum* included signal transduction engineering of calcium/calcineurin signaling system, genetic and metabolic engineering, novel chemical conversion and simultaneous extraction/hydrolysis, etc. In the first part of this presentation, our recent research results will be shared with the audience regarding the engineering of higher-fungus cell factory for efficient production of bioactive secondary metabolites, by taking *G. lucidum* for production of anti-tumor ganoderic acid as a typical example.

In the following part, this presentation will highlight the current state-of-the-art regarding genetic manipulation of higher fungi. As well known, there is a lack of methods of genetic manipulation, such as gene disruption, which hinders the studies on biosynthesis and its regulation of those useful natural products in mushrooms - an important group of higher fungi. Recently, the CRISPR-Cas9 assisted gene disruption was established by taking *Ganoderma* species as typical examples. With double strand break (DSB) introduced by CRISPR-Cas9, non-homologous end joining (NHEJ) was induced and further assisted the gene disruption. As proof of concept, the *ura3* gene of *G. lucidum* 260125 and *G. lingzhi* was successfully disrupted by the codon-optimized Cas9 and *in vitro* transcribed gRNA. This work may help to provide a widely applicable approach of gene disruption in higher fungi.

Finally, this presentation will discuss the latest approach enabling heterologous microbes to produce higher-fungus derived products, especially with regard to the construction of 'smart' cell factories via synthetic biology. The merits and demerits of heterologous versus native hosts as cell factories will also be debated.

Ref.

1. Zhong JJ, Xiao JH. (2009) Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. Adv Biochem Eng Biotechnol 113, 79-150.
2. Wang JL, et al. (2012) Enhanced recovery of antitumor ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia by novel chemical conversion strategy. Biotechnol Bioeng 109, 754-762.
3. Xu YN, Zhong JJ. (2012) Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Biotechnol Adv 30, 1301-1308.
4. Xu JW, et al. (2012) Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Appl Environ Microbiol 78, 7968-7976.
5. Xiao H, Zhong JJ. (2016) Production of useful terpenoids by higher-fungus cell factory and synthetic biology approaches. Trends Biotechnol 34, 242-255.
6. Qin H, et al. (2017) CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *Ganoderma* species. Process Biochem 56, 57-61.

Higher fungus as a promising cell factory: A story about Lingzhi (Reishi)

○Jian-Jiang Zhong, Han Xiao, Wen-Fang Wang
(State Key Lab. Microb. Metab., Dept. Bioeng., Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ.)

Key words fungus, metabolic engineering, genome engineering, fermentation

3S-Ap04 Production of high functional products using plants by manipulation of gene expression and growth

○Eiji Goto
(Fac. Horticul., Chiba Univ.)
goto@faculty.chiba-u.jp

In 2016 New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) launched a new project "Development of Biotechnology to Produce Industrial Materials with Plants and Microorganisms -Making Full Use of Japanese Genome Editing Technology to Realize a "Smart Cell Industry"-". The aim of the project is to develop innovative biotechnologies for production of industrial materials such as reagents, perfumes, cosmetics, and plastics in plants and microorganisms through full use of the Japanese original genome editing technologies, as well as the latest IT and AI technologies.

In the project, "smart cells" will be created to maximize the potential of plant and microorganism cells to produce the industrial materials which are difficult to synthesize through conventional chemical processes. It is also expected that "smart cells" will contribute to development of a low-cost and energy-saving manufacturing processes.

Over a period of five years, NEDO aims to build a "smart cell industry", a next-generation industry in collaboration with an "all-Japan" consortium of 40 industrial and academic institutions.

In this presentation I will introduce the concept and research outline of the project and also introduce our ongoing research on production of high functional products using plants by manipulation of gene expression and growth.

Production of high functional products using plants by manipulation of gene expression and growth

○Eiji Goto
(Fac. Horticul., Chiba Univ.)

Key words secondary metabolite, plant factory, genome editing, plant cell culture

3S-Ap05 Challenge to development of “smart” microorganisms based on information analysis and its application to production of highly functional compounds

○Tomohisa Hasunuma
(Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ)
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

Living organisms can produce many chemical substances in their metabolic systems. It is possible to produce highly functional substances with high efficiency without going through chemical synthesis process by making full use of their functions it can. In recent years, major technological innovation has occurred in DNA sequence analysis, metabolite analysis, annotation and design of genome sequence, synthesis and editing of genome, etc., which are fundamental biotechnologies, and by newly recognizing and using biological functions, new era when wide variety of materials can be manufactured is being opened. For example, rapid evolution of various analyzers including next generation sequencers and mass spectrometers has made it possible to accurately and rapidly obtain gene information and product information. Machine learning using huge data makes it possible to estimate the genome sequence involved in high productivity. In addition, cultivation of microorganisms is carried out in robotics, and genome synthesis/editing techniques are developed, whereby breeding of microorganisms is accelerated. In the United States, the Living Foundries Program aiming at the development of tools to compress the cycles relating to the design, building, test and learning of gene sequences, the creation of completely new substances using the tools, and the high production of known substances has been set up. EU also promotes R & D on processing and production of materials, chemicals etc. by sustainable use of biological resources by industry, academia and government collaboration. In the UK, as a place to promote research based on biological design, we established a center where 30 organizations and companies gather, and is promoting this field as the most important policy task. In this way, progress in this field is becoming a global competition, and strengthening the country's competitiveness is an urgent task. To date, we have developed metabolic pathway design techniques typified by M-path, information analysis techniques such as unique gene sequence design, long-chain DNA synthesis/utilization technology, dynamic metabolome analysis technology (dynamic metabolic profiling technology), which has utilized it for microbial breeding. For example, M-path can generate exhaustive metabolic pathways including estimation of unknown enzyme and unknown compound, and can present an effective metabolic pathway from among them, it has wide search range and high calculation efficiency. Long-chain DNA synthesis technology using OGAB method already has the world's highest accuracy and throughput, which realizes further speed-up and synthesis of synthesis, thereby improving practicality and potential to lead the world largely. Since long-chain DNA can control (enhance, suppress, etc.) the expression of many genes by a single recombination, a novel metabolic pathway constructed by information analysis can be realized in a short period of time. Metabolome analysis has been used to overview metabolite accumulation in cells in a snapshot-like manner. By combining *in vivo*^{13}C labeling technology using stable isotope carbon with metabolome analysis, the turnover of compounds can be observed. Also, it became possible to simultaneously overview the accumulated amount of metabolite and dynamic fluctuation (time change). As a result, the distribution of carbon atoms within the cell was found, and the identification of the bottleneck reaction in the metabolic pathway advanced. The NEDO project "Development of Production Techniques for Highly Functional Biomaterials Using Smart Cells of Plants and Other Organisms" (Smart Cell Project) will further advance the elemental technologies that have been developed so far. We are aiming to build a platform that integrates the technologies and systematize it. In this presentation, I will present the recent progress on the comprehensive analysis technology of intracellular metabolites, metabolic pathway design technology by information analysis, microbial high-speed breeding technology using long-chain DNA, etc., which can be applied for producing high functional substances with microorganisms.

Challenge to development of “smart” microorganisms based on information analysis and its application to production of highly functional compounds

○Tomohisa Hasunuma
(Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ)

Key words microorganisms, metabolic engineering, synthetic biology, information analysis

3S-Bp01 ランチビオティック研究のパラダイムシフト：その作用機序，生合成機構など

○園元 謙二, 中山 二郎, 善藤 威史
（九大院・農）
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

ランチビオティックは細菌によって生産される抗菌性ペプチドであり，リボソーム上で前駆体ペプチドとして合成された後，ペプチド中のセリン，トレオニン残基の脱水によりデヒドロアラニンなどの不飽和アミノ酸が形成され，その後，特定の不飽和アミノ酸と C 末端のシステイン残基との分子内環化反応によりランチオニン環などの異常アミノ酸が導入される．ランチビオティックは，その特異構造に起因する特殊な生理機能を有する(1).
我々は，*Staphylococcus warneri* ISK-1 が生産する nukacin ISK-1 の生合成・自己耐性機構，構造と活性相関の研究，特に，異常アミノ酸形成酵素 NukM の機能解析（2,3），リーダーペプチダーゼ・菌体外輸送タンパク質 NukT の機能解析（4,5），新奇自己耐性タンパク質の機能の解明（6-8），作用機構の解明（9-11）などを行ってきた．本講演では，その作用機序を中心に，生合成機構についても，最新の研究成果を紹介したい．

【作用機序】nukacin ISK-1 は 27 アミノ酸残基から成り，N 末端の線状領域と C 末端の環状領域から構成されている．環状領域には，異常アミノ酸であるランチオニン環が 3 つ存在する（Rings A, B, C）．これまで，nukacin ISK-1 は細胞壁前駆体 lipid II を標的分子として細胞壁合成を阻害すること（10），等温滴定型熱量計を用いて Ring A が lipid II と強く相互作用すること（11）を明らかにしてきた．しかし，Ring A のどのアミノ酸残基，lipid II のどの部位が相互作用に関与しているのか，nukacin ISK-1 の他の領域は無関係なのかなど不明な点が多かった．そこで，lipid II と相互作用する nukacin ISK-1 の各アミノ酸残基を簡便に決定するために，*Bacillus subtilis* の 2 成分制御システム，LiaRS（*L*ipid II cycle *i*nterfering *a*ntibiotic *r*esponse regulator and *s*ensor）レポーターアッセイを検討した．LiaRS は lipid II と特異的に作用する抗生物質の簡便な検索システムである．先ず，nukacin ISK-1 の Ring A 領域のアミノ酸変異体を精製して用いた結果，Ring A が lipid II との特異的な相互作用に関与していることを再確認した．さらに，nukacin ISK-1 の他の領域の変異体について検討したところ，N 末端の線状領域中の Lys1，Lys2，Lys3 および Gly5，Ring B と Ring C も lipid II との相互作用に関与していた．同時に，これら nukacin ISK-1 変異体の抗菌活性と lipid II との相互作用に相関があることも確認された（12）．
次に，nukacin ISK-1 − lipid II 複合体構造情報をさらに詳細に得るために，nukacin ISK-1 に対して界面活性剤 n-octyl-β-D-glucoside（βOG）と lipid II の二段階滴定を行い，NMR を用いて nukacin ISK-1 の ^{1}H-^{15}N 二次元相関スペクトルの測定を行った．nukacin ISK-1 への βOG の添加に伴い，疎水性アミノ酸に富む Ring C 領域において，各残基の高磁場側への化学シフト変化が観測された．続く lipid II の添加により，Ring A の近傍領域と Ring C 領域の残基に化学シフト変化が認められた．これらの結果から，Ring C は lipid II のイソプレノイド鎖と相互作用することが推定された．また，リン酸基を含む界面活性剤ドデシルホスホコリンの添加でも，Ring A 近傍領域の化学シフト変化が観測されたことから，この領域が lipid II のリン酸基と相互作用していることも示唆された．これらの相互作用情報は，前述した LiaRS レポーターアッセイの結果によっても支持された．

【生合成機構】nukacin ISK-1 生合成の最終段階は，リーダーペプチドの切断および菌体外輸送であり，膜タンパク質 NukT が司る．NukT は N 末端側にはシステインプロテアーゼと相同性を示すペプチダーゼドメイン（PEP），C 末端側には ATP 結合ドメイン（ABD），4 回膜貫通ドメイン（TMD）を有する ABC transporter Maturation and Secretion（AMS）型タンパク質である．NukT の異種発現株より調製した反転膜小胞を用いた実験より，NukT は ATP 依存的にリーダー領域を切断した（4）．また，PEP，ABD の部位特異的変異体を用いた結果，これら二つのドメインが協調的に作用することが示唆された（5）．さらに，NukT やその変異体を異種発現・精製し，リポソームに再構成することに成功した．これら NukT proteoliposomes によって，ATPase 活性とペプチダーゼ活性は互いに正に影響を与える（Interdomain cooperation）という新たな知見が得られた．

(1) Biochem Soc Trans, 40, 1528, 2012; (2) Mol Microbiol, 72, 1438, 2009; (3) Appl Microbiol Biotechnol, 86, 891, 2010; (4) J Biosci Bioeng, 108, 460, 2009; (5) J Biol Chem, 286, 11163, 2011; (6) J Bacteriol, 190, 356, 2008; (7) Appl Environ Microbiol, 74, 7613, 2008; (8) J Bacteriol, 192, 2801, 2010; (9) Appl Environ Microbiol, 72, 6012, 2006; (10) Antimicrob Agents Chemother, 53, 3595, 2009; (11) J Amer Chem Soc, 134, 3687, 2012; (12) J Biosci Bioeng, 123, 398, 2017

Paradigm shift in lantibiotic studies: The mode of action, biosynthetic machinery, *etc.*

○Kenji Sonomoto, Jiro Nakayama, Takeshi Zendo
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words lantibiotic, mode of action, lipid II-binding motif, ABC transporter

3S-Bp02 食品タンパク質由来抗菌ペプチドの作用機序と多彩な生理活性の解明

○谷口 正之, 落合 秋人
（新潟大・自然研）
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【抗菌ペプチドの特徴】近年，抗生物質の乱用によって，それらに対する耐性菌の出現が大きな社会に問題となっており，抗生物質の利用を制限する動きがある．一方，抗菌ペプチドは，抗菌スペクトルが広く，ヒトを含む宿主に対して毒性が低い，耐性菌を生じにくいなどの特徴から，耐性菌の出現と蔓延が危惧される従来の抗生物質に代わる医薬品として注目され，国内外で研究されている．
【食品タンパク質由来抗菌ペプチドの探索】演者らは，長い食経験がある食品タンパク質のアミノ酸配列およびその酵素加水分解物から抗菌ペプチドを探索した結果，10 種類以上を見出し，既に報告している [1]．これらの抗菌ペプチドのうち，米 alpha-amylase（Amyl-1）由来の 18 残基のアミノ酸からなるペプチド（Amyl-1-18）は，最も抗菌スペクトルが広く，抗菌活性も高かった．すなわち，Amyl-1-18 は，*Porphyromonas gingivalis*，*Streptococcus mutans*，*Candida albicans* などに対して抗菌活性を示した．また，Amyl-1-18 は抗菌活性ばかりでなく，抗炎症，血管新生促進，細胞遊走促進などの多彩な生理活性を発揮した．本講演では，Amyl-1-18 とそのアミノ酸置換体の生理活性を中心に紹介したい．
【抗菌ペプチドの細胞膜への作用】 Amyl-1-18 の *P. gingivalis* に対する作用機序を解明するために，蛍光プローブ（$diSC_3$-5）を用いた細胞膜脱分極アッセイを実施した．その結果，$diSC_3$-5 の放出量は濃度依存的に増加したが，ポジティブコントロールとして用いたハチ毒由来の melittin の場合に比べて，最大でも 10％であった．また，フローサイトメーターを用いて核酸染色蛍光色素（PI）によって染色される細胞数を測定する細胞膜損傷アッセイを実施し，Amyl-1-18 の細胞膜に対する作用を検討した．Amyl-1-18 の *S. mutans* および *C. albicans* の細胞膜への作用を検討した結果，Amyl-1-18 は *S. mutans* に対して，melittin と同じように，細胞膜を損傷することがわかった．一方，*C. albicans* 細胞は PI によって染色されず，細胞膜が損傷されないことが明らかになった．これらの Amyl-1-18 の細胞膜選択性は，微生物間の細胞膜の構造とリン脂質の組成の差異によると考えられる．さらに，Amyl-1-18 の特定のアミノ酸を Helical wheel projection に基づいて，アルギニンやロイシンに置換することによって，カチオン性や塩基性を高めた場合に Amyl-1-18 の細胞膜損傷作用が増大し，抗菌活性を高められることが明らかとなった．
【抗菌ペプチドのタンパク質合成阻害作用】 上述したように，Amyl-1-18 の *P. gingivalis* と *C. albicans* の細胞膜への作用は弱いことから，他の作用機序によって主に殺菌していると考えられた．細胞内におけるタンパク質合成は転写，翻訳，およびフォールディング（折りたたみ）の各ステップから構成されている．そこで，演者らは大腸菌の無細胞タンパク質合成システム（Rapid Translation System: RTS）を用いたアッセイ系，および分子シャペロンによるフォールディングプロセスを用いたアッセイ系を利用して，AmyI-1-18 のタンパク質合成阻害作用について検討した．その結果，AmyI-1-18 は，翻訳ステップとフォールディングステップを阻害することによって，タンパク質合成を阻害することがわかった．また, Biacore を用いた生体分子間相互作用解析の結果から, AmyI-1-18 は翻訳ステップにおいて RNA に，フォールディングステップにおいて DnaK に，それぞれ作用してタンパク質合成を阻害している可能性が示唆された．
【抗菌ペプチドの多彩な生理活性】Amyl-1-18 の抗炎症作用を，内毒素であるリポ多糖（lipopolysacchride; LPS）で刺激したマウスマクロファージ（RAW264）細胞を用いて検討した．その結果，LPS によって刺激した場合に，一酸化窒素（NO）産生量は大幅に増加したが，添加する AmyI-1-18 の濃度に依存して減少し，Amyl-1-18 が抗炎症作用を発揮することがわかった．また，AmyI-1-18 の創傷治癒作用を，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の血管新生（管腔形成）促進作用と細胞遊走促進作用に基づいて評価した．ヒトの生体防御ペプチドである LL-37 をポジティブコントロールとして，AmyI-1-18 の血管新生促進作用と細胞遊走促進作用を検討した．その結果，AmyI-1-18 は，LL-37 と同じように，創傷治癒作用（血管新生促進作用と細胞遊走促進作用）を有することがわかった．

1) M. Taniguchi and A. Ochiai: *Biosci. Biotechnol. Biochem*., Vol.81, No.4, p.634-650 (2017).

Mechanisim of action of antimicrobial peptides from food proteins and clarification of their multiple bioactivities

○Masayuki Taniguchi, Akihito Ochiai
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, membrane disruption, inhibition of protein synthesis, multifunctional peptide

3S-Bp03 昆虫由来抗菌ペプチドの高活性化と作用機序解明のための新アプローチ

○松本 謙一郎 [1], 山崎 蔵亨 [1], 川上 駿 [1], 三吉 大地 [1], 堀 千明 [1], 田口 精一 [1,2], 大井 俊彦 [1], 橋本 茂樹 [3]
（[1]北大院・工, [2]東農大・生命科学, [3]東理大・基礎工）
mken@eng.hokudai.ac.jp

抗菌ペプチドは，抗生物質耐性菌に対しても生育阻害効果を示すことから，新しい抗菌剤としての利用が期待される．抗菌ペプチドの利用をより促進するための重要な課題に，抗菌活性の向上と作用メカニズムの解明が挙げられる．抗菌ペプチドは，抗生物質と比較すると抗菌活性が低いものが多いため，活性を向上させる手法を開発できれば，相対的にコストの削減が期待できる．作用メカニズムについては，細胞膜破壊作用を持つペプチドに関してはペプチドが細胞膜に孔を形成するモデルが提案されているが，細胞内にターゲットを持つペプチドについては，作用機序に未解明な点も残っている．
我々は抗菌ペプチドの一つであるミツバチ由来のアピデシンに着目した．本ペプチドは，18 残基の L 型アミノ酸から構成されるランダムコイル型ペプチドであり，グラム陰性菌に対して特異的に静菌的な抗菌作用を示す．すなわち，生育が阻害される濃度のアピデシンで処理した菌体を，別の培地に植継いでアピデシンを希釈すると，再び増殖を開始する．抗生物質等に対する薬剤耐性菌が発生する原因の一つとして，細菌の大部分を薬剤の作用で死滅させることにより，わずかに生き残った自然発生の耐性菌がその後優勢になるという仕組みが指摘されていることから，菌を殺さずに生育を抑制するアピデシンに関心が持たれた．アピデシンの作用機序については，膜破壊を伴わずに抗菌作用を発揮することが知られている．例えば，大腸菌を被検菌として抗菌活性を発揮する濃度のアピデシンを加えても，ATP の漏出などの膜破壊に特徴的な現象は見られない．既往の研究により，アピデシン添加条件でアミノ酸の取り込みが低下することから，アピデシンの作用機序としてタンパク質合成阻害が示唆されていた．
アピデシンは，上述のように興味深い抗菌作用を持っているものの，抗菌ペプチドの中でも，比較的活性が低いことが知られていた．そのため，アピデシン研究の初期段階では，高活性変異体の作成を検討した．機能マッピングに基づいて特定されたアピデシンの可変残基のうち，N 末端 3 残基に対してランダム変異を導入したライブラリーを作成し，これを in vivo アッセイシステムを用いて high-throughput スクリーニングした．その結果，抗菌活性が約 30 倍(被験菌：大腸菌)に向上した高活性変異体 RVR が取得された．次に，このランダムスクリーニングにより得られた変異体の高活性機構の解析に取り組んだ．上述したように，アピデシンの作用には，細胞内への導入と，細胞内ターゲット分子との相互作用という二段階があるため，第一段階である細胞内導入効率を評価した．蛍光ラベルを付与したアピデシン誘導体を大腸菌に作用させて細胞内導入量を評価したところ，RVR 変異体では野生型と比較して細胞内導入効率が約 6 倍に向上したことが分かった．このことから，N 末端 3 残基を野生型の GNN から RVR に置換することにより，膜透過効率の向上に起因する高活性化が起こることが分かった．また，アピデシンは特異的な膜タンパク質によって細胞内に輸送され，このタンパク質の欠失株はアピデシンに対する感受性が低下することが知られているが，RVR 変異体はこの欠失株に対しても活性を示した．このことから，本変異体は，天然型とは異なるルートを通って細胞内に侵入する能力を獲得していることが示唆された．
次に，N 末端への変異導入が，細胞内標的分子との相互作用にどのように影響したかを調べた．前述したように，アピデシンの標的分子はタンパク質合成系であることが示唆されていた．実際，レポーターである β ガラクトシダーゼ (LacZ)を発現する大腸菌にアピデシンを作用させ，real-time PCR および western blot を行うことにより，アピデシンが翻訳を阻害することが確認できた．近年，いくつかのプロリンリッチペプチドについて，同様の結果が報告されている．そこで，大腸菌の無細胞転写翻訳系（PURE System）を用いて，LacZ 発現系に対するアピデシン添加実験を行ったところ，in vivo と同様にタンパク質合成阻害が見られた．そこで，RVR 変異体を同条件で作用させたところ，野生型とほぼ同じ効率でタンパク質合成が阻害された．このことから，アピデシンの N 末端への変異導入は，主に細胞内への導入効率のみを向上させる作用があることが示唆された．
さらに我々は，アピデシンが抗菌活性を発揮する作用機序をより詳細に調べることを検討した．この目的のため，大腸菌の遺伝子型の違いによるアピデシンに対する感受性の違いを検出することを試みた．遺伝子型の異なる大腸菌株を宿主として，細胞密度を精密に制御した培養系を用いてアピデシンの抗菌活性を測定することにより，わずかな感受性の違いを検出する系を構築した．これを用いて数十の大腸菌株を比較した結果，アピデシンの作用に関係すると推定されるタンパク質を同定することができた．本講演では，このスクリーニング方法の詳細と，結果から推定されるアピデシンの作用メカニズムについても議論したい．

Engineering of antimicrobial peptide apidaecin for increasing activity and investigation on its mode of action

○Ken'ichiro Matsumoto[1], Kurato Yamazaki[1], Shun Kawakami[1], Daichi Miyoshi[1], Chiaki Hori[1], Seiichi Taguchi[1,2], Toshihiko Ooi[1], Hashimoto Shigeki[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Dept. LifeSci. Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. BioSci&Tech. Tokyo Univ. Sci.)

Key words antimicrobial, peptide, apidaecin, evolutionary engeneering

3S-Bp04 α ディフェンシン：自然免疫，腸内細菌との共生，疾病への関与

○綾部 時芳, 櫻木 直也, 中村 公則
（北大院・生命科学）
ayabe@sci.hokudai.ac.jp

抗菌ペプチドは感染防御の最前線に位置する自然免疫の主要な作用因子であり，植物，昆虫から哺乳類まで生物界に広く存在している．哺乳類において抗菌ペプチドは，好中球など貪食細胞や，皮膚上皮および鼻咽腔粘膜，消化管粘膜，気道粘膜，泌尿器粘膜などの外界と接する様々な上皮細胞に発現しており，細菌，真菌，原虫，ウイルスなどに対して殺微生物作用を示し，耐性菌を生じにくいことが知られている．哺乳類の抗菌ペプチドには，ディフェンシン (defensin) ファミリーとカセリシジン (cathelicidin)ファミリーがある．Defensin は３つのサブファミリー (α-defensin, β-defensin, θ-defensin)からなる．α-defensin は 32～36 個のアミノ酸からなる比較的小さな塩基性ペプチドであり，6 個のシステイン残基が 3 つのジスルフィド結合を形成する複雑な高次構造を持つ．ヒト，マウスをはじめとする哺乳類の消化管粘膜上皮において，α-defensin は小腸の陰窩基底部に位置する Paneth 細胞の細胞内顆粒のみに発現しており，マウスでは６つのアイソフォーム (cryptdin1～cryptdin6)が，ヒトでは HD5 と HD6 の２つがある．β-defensin は様々な上皮細胞に存在しており，感染刺激によって産生が誘導される．ヒト cathelicidin である LL37 は好中球，皮膚上皮細胞および大腸上皮細胞などに発現している．近年，抗菌ペプチドが哺乳類における感染防御と生体恒常性維持に極めて重要な役割を果たしていることがわかってきた．

腸は食事から栄養素を吸収すると同時に，侵入しようとする様々な病原体を免疫系によって排除する．また，腸には莫大な数の常在菌が腸内細菌叢を形成しており，共生の場でもある．小腸の Paneth 細胞は，細菌刺激やコリン作動性刺激等にすばやく反応して，細胞内顆粒中の α-defensin を分泌する．われわれは，分泌された α-defensin は病原菌を強く殺菌する一方で，常在菌に対してはほとんど殺菌活性を示さない選択的殺菌活性によって腸内細菌叢を制御していることを明らかにした．さらに，Paneth 細胞は腸上皮幹細胞と共に幹細胞ニッシェを形成し，腸上皮の再生と分化を制御することが知られている．

腸内細菌叢組成の異常 (dysbiosis)と肥満，II 型糖尿病などの生活習慣病，炎症性腸疾患，自閉症，大腸癌，アレルギーなど様々な疾病との関係が報告されている．しかし，それらのメカニズムは未だほとんど不明である．われわれは，Paneth 細胞 α-defensin が腸内環境の恒常性維持に貢献していることを明らかにし，その異常が疾病の発症や進展に関与することを示した．α-defensin sandwich ELISA を樹立して，疾患モデルマウスにおける α-defensin 分泌量と dysbiosis の関係を明らかにした．すなわち，炎症性腸疾患モデル IL10 欠損マウスでは糞便中の α-defensin が有意に低下すること，高脂肪食摂取による肥満では Paneth 細胞の顆粒形態異常と分泌量低下を認めることを示した．また，移植片対宿主病では Paneth 細胞が傷害されて α-defensin 分泌量が著しく低下するために，菌交代現象を伴う dysbiosis が生じて感染死に至ることを明らかにした．さらに，小腸上皮の三次元培養系である enteroid (小腸 organoid)を用いて，Paneth 細胞の顆粒分泌応答を可視化解析する系を確立した．そして，細菌抗原やコリン作動性の刺激による Paneth 細胞の顆粒分泌を共焦点レーザー顕微鏡で time-lapse 観察し，α-defensin 分泌メカニズムの一端を明らかにした．α-defensin は腸内細菌を制御し，Paneth 細胞および α-defensin の異常は様々な疾病につながる可能性がある (Nakamura K et al., Biosci Microbiota Food Health 2016).

Alpha-defensin: innate immunity, symbiosis, and association with disease

○Tokiyoshi Ayabe, Naoya Sakuragi, Kiminori Nakamura
(Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.)

Key words alpha-defensin, innate immunity, Paneth cell, intestinal microbiota

3S-Cp01 清酒醸造の技術革新 これまでとこれから

○秦 洋二
（月桂冠・総研）
y_hata@gekkeikan.co.jp

【はじめに】

人類が初めてお酒に触れたのはいつであるかは定かではないが，ブドウなどの果物の果汁が自然に発酵し，これを口にした偶然に端を発するのではないかと考えられている．その後，この偶然の産物を，人類が自らの手で「必然」に作られるようになるには，非常に長い年月がかかったと推定できる．当時発酵とは，まさしく神秘な現象である．現在では，酵母菌という目に見えない微生物が，糖分をアルコールに変換することによってお酒ができることは，小さな子供でも知っている．しかし，当時の理解では，ブドウ果汁がなぜかプクプクと泡立って，香り豊かなお酒になることは，「神のなせる業」以外の何物でもない．そして何らかの手順を誤り，神様のご機嫌をそこねると，まずくて飲めないものになってしまう．彼らは，神様のご機嫌をそこねないように酒造りの製造方法を改良に改良を重ね，微生物という知識がなくても，立派に酒造りの技術を確立することができた．ワイン，ビール，日本酒，世界中に存在する酒類の製造技術は，まさしくこのような試行錯誤の結晶として生み出されてきたものである．ある種，これこそ「神業」かもしれない．酒造りの特徴は，人類が酵母や麹菌といった微生物に関する知識を獲得するはるか以前から，試行錯誤の繰り返しによって製造方法が確立されたことである．近代の科学技術の発展は，最初に原理・原則が解明され，その理論を応用することによって様々な技術へ展開されてきたことと対照的である．

【酒造りの基本にみる発明】

理屈がわからない試行錯誤とはいえ，先人たちは酵母を巧みに扱う技術を確立していった．例えば，雑菌などの微生物に汚染されることなく清酒酵母だけを純粋に培養する技術「酒母造り」や，酵母の増殖にあわせて仕込みを拡大培養する「三段仕込み」などである．また 1583 年には，奈良の東福寺の学侶の随記である「多門院日記」の中に，お酒に対して「火入れ」と呼ばれる加温操作を施すことにより，雑菌汚染を防ぎ長期に品質を安定できることが記載されている．パスツールがワインを用いて実証したパスツリゼーション（低温殺菌法）が発明されるはるか 300 年も昔のことである．このように清酒醸造とは，世界に誇ることができる多くの発明を含む我が国の技術資産といっても過言ではない．

【清酒醸造の技術革新 これまで】

酒造技術の近代化の一つに「四季醸造」があげられる．これは，冬場に集中的に行われていた酒造りを，一年を通じて製造できるように作業環境を整えたことだけを指すものではない．季節労働者である杜氏集団は，冬場の短期間により集中的に労働して，高い現金収入を獲得しようと考える．このような集約労働を通年雇用の社員に対して，年間通じて要求することは困難であり，機械化・自動化による作業の効率化も同時に進めていかなければならない．ここに先人たちの非常にユニークな発想が含まれている．例えば，米麹を製造する工程では，従来は「蓋」や「箱」といった木製の四角の容器に入れて培養することを行っていたが，回転する丸い円盤の上で通風しながら培養する方法へと革新された．同様に，お酒を搾る工程では，袋に入れたもろみを木製容器に積み上げて，てこの原理で上から圧力をかけていたものが，横から圧力をかけることにより原酒と酒粕を完全に分離する圧搾装置が開発された．人間が行っていた作業を単純に機械に「させる」ことを機械化と考えがちであるが，当時は非常に大胆な発想で本来の手作業とは全く異なる方法で自動化を成し遂げている．「四角いものを丸くする」「縦のものを横にする」などまさしく発想の大転換である．

【清酒醸造の技術革新 これから】

清酒製造技術はまだまだ発展し続けている．特に急速に進歩する異分野の技術との融合を図りながら，より高品質な酒造りを目指せるようになってきている．例えば，最新のセンサリング技術を用いれば，現在の培養状態をリアルタイム監視することが可能になったり，通信技術の発展は工程全体を遠隔管理できるユビキタス環境の構築に役立っていたり，情報処理技術は，膨大なもろみ・仕込データの解析・有用データの抽出を可能にしたりしている．そして分子生物学の発展は，清酒醸造に最も重要な麹菌と酵母の菌株育種や培養方法の開発に大きく貢献している．実際にこれらの科学的知見を利用して開発された酵母菌が，様々な酒造りに実用化されている．これらの分野はいずれも今後さらに発展する領域であり，清酒醸造への応用についてもまだまだ期待できる部分が大きい．

【おわりに】

清酒醸造の 2000 年を振り返って，現在の技術はまさしく先人たちのたゆまぬ努力の結晶であることを改めて認識する．特に酒造技術の近代化で取り上げた，杜氏から社員への酒造りのための自動化技術の開発については，既存の固定概念を持っていては生み出せない発想である．今こそ，発想を転換して新しい醸造技術に挑戦する必要性を強く感じる．

Technical innovation for sake making, past and future

○Yoji Hata
(Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words sake, yeast, *Koji* making

3S-Cp02 醤油醸造技術の伝統を受け継ぎ未来へ活かす

○仲原 丈晴
（キッコーマン）
tnakahara@mail.kikkoman.co.jp

醤油はアジアの伝統的な調味料で，ルーツは約 3000 年前の中国の醤まで遡る．わが国への伝来時期については明確な記録はないが，古くからの中国・朝鮮との交易の中で度々伝わってきたものと考えられ，701 年の大宝律令には大豆を原料とした醤が作られていたことが記載されている．室町時代には醤から固液分離された液体調味料の醤油が登場し，その後も各地で製法の改良が重ねられ，江戸時代後期に現在の濃口や淡口等の本醸造醤油の製法が確立するなど，“日本式醤油”として，他のアジアの醤油とは異なる独自の発展を遂げてきている．
本醸造醤油の製法の概要は以下のとおりである．
(1)大豆と小麦を加熱変性処理し，これらを固体培地として麹菌を生育させ，麹を作る．
(2)麹を食塩水と共に仕込んで諸味とし，半年～数年間発酵・熟成させる．
(3)熟成後の諸味を濾布で包んで圧搾し，生醤油を得る．
(4)加熱殺菌（火入れ）を行い，加熱変性で生じた沈殿物（オリ）を含まない清澄な上清が醤油となる．なお最近では，火入れを行わずフィルター除菌を行い，生醤油として出荷されるものもある．
他の日本の伝統的な発酵食品である清酒やみりん，味噌等と同様に，麹を使用することが本醸造醤油の特徴である．麹菌が産生した種々の酵素の作用により原料のタンパク質やデンプンが分解され，醤油の複雑な味を形作るアミノ酸，ペプチドや糖が生成する．さらに，乳酸菌や酵母の発酵によって，乳酸やエタノールをはじめとした多くの代謝物と香気成分が生成する．微生物学や酵素学の概念が知られるより遥か昔から，経験と伝承に基づいて醤油醸造技術が確立されてきた．学問以前のバイオテクノロジーを巧妙に使いこなしてきた先人達の知恵に感服するばかりである．
キッコーマンでは，醤油醸造の科学的解明と技術開発を目的として 1904 年に醸造試験所を設立した（当時は野田醤油醸造組合．現在は研究開発本部および商品開発本部として存続）．以来 100 年以上にわたって上述の醤油製造工程の様々なポイントに着目した研究・開発がなされている．さらに，醤油業界各社でも多くの優れた研究開発が行われ，切磋琢磨しながら日本の醤油の品質向上に努めてきた．例えば，原料処理工程を改善し麹菌酵素がはたらきやすくしたり，麹菌の育種によって酵素力価が向上したり，乳酸発酵・酵母発酵の安定化により風味が向上するなど，技術改良の事例は枚挙に暇がない．
本講演では，醤油醸造におけるこれまでの技術開発を概説し，伝統的な職人技で発展してきた醤油醸造に科学の光を当ててきた歴史を再確認したい．さらに，最近の醤油を取り巻く課題と，その解決に挑戦した研究・商品開発事例も紹介し，本シンポジウムテーマ「ものづくりの原点と将来」について議論を深める一助としたい．

Leading-edge developments of soy sauce based on traditional soy sauce brewing technology.

○Takeharu Nakahara
(Kikkoman Corp.)

Key words soy sauce, peptide

3S-Cp03 本格焼酎の製造技術の独自性，酒質の多様化および機能性

○髙峯 和則
（鹿児島大・農・焼酎・発酵学教育研究センター）
k6943994@kadai.jp

1. 本格焼酎とは
もともと「焼酎」とは日本の蒸留酒の総称であった．しかし，明治の末期に，高純度アルコールをつくることのできる連続式蒸留機が導入され，これを希釈したものを「新式焼酎」としたために，原料由来の微量香味成分を含む伝統的な焼酎を「旧式焼酎」と呼ぶようになった．その後，前者は甲類，後者は乙類と呼ぶようになったが，乙類は劣るイメージがあるために，本格焼酎とも呼ぶことが認められた．以後，焼酎乙類イコール本格焼酎となったが，全国的な焼酎ブームを受けて，より消費者に分かりやすいように焼酎乙類の中に本格焼酎の規定を作った．その後，平成 18 年の酒税法の改正により甲類を連続式蒸留焼酎，乙類を単式蒸留焼酎として法律的に区別させ，現在に至っている．本格焼酎とは，平成 14 年 11 月 1 日に「酒税の保全及び酒類業組合等に関する法律施行規則」で新たな定義が設けられ，単式蒸留焼酎（焼酎乙類）のうち，麹を用い，添加物がなく，特定の原料のみを使用した焼酎を本格焼酎と呼称できるようになった．
2. 製造技術の歴史
本格焼酎製造技術の変遷は，明治の中頃までは，蒸煮した原料と米麹，水を同時に仕込む「どんぶり仕込み法」，明治 36 年には蒸煮した原料と麹を二回に分けて仕込む「清酒式二段仕込み法」が導入され，大正元年頃麹と水だけでまず醪を造り，これに蒸煮した原料と水を加えて拡大する「二次仕込み法」が鹿児島の芋焼酎において定着し，球磨の米焼酎や壱岐の麦焼酎には，昭和 17 年頃普及した．この方法は焼酎独自の仕込み法である．昭和 35 年頃には回転式ドラム製麹機が普及し製麹の機械化が進み，昭和 47 年頃には減圧蒸留機が，昭和 50 年代にはイオン交換処理装置が導入され酒質の多様化が図られた．また，焼酎に含まれる成分が酸化することで発生する“油臭”の生成メカニズムが解明され，濾過技術の改良が進み酒質の安定化に繋がったのもこの頃である．
3. 本格焼酎の製造技術
一次仕込みは，麹原料 100 に対して汲み水が 120 の割合で加えられるのが一般的である．汲み水には，麹 300kg に対して酵母培養液を 600ml 添加する．焼酎製造の主産地は温暖な地域のため，雑菌による汚染の危険性が高い．しかし，麹に含まれるクエン酸が一次醪の pH を 3.0～3.5 に低下させ，耐酸性に優れた焼酎酵母が優先的に増殖し雑菌の増殖を抑制できる．焼酎製造の独自性として酵母培養液添加の変わりに差し酛が行われる．差し酛とは，仕込みのとき酵母培養液の代わりに一次醪の一部を加える焼酎製造特有の手法である．3～4 日目の一次醪を麹重量の 100~500 分の 1 量を加える．
二次仕込みは，一次醪に主原料である穀類や芋類と汲み水を加える操作である．加える主原料により焼酎の冠表示（芋焼酎や麦焼酎などの呼称）が決まる．二次仕込みに使用する一次醪は，酸度が 25 前後，pH が 3~3.5，アルコール分が 16%前後，糖濃度が 6~10%，酵母濃度が $2\sim4\times10^8$ 個/ml である．この状態の一次醪に主原料と汲み水を加えると，一次醪が 3~5 倍に希釈され，醪 pH は 4.2 前後に上昇し雑菌も生育できる環境となるので，二次醪では pH による雑菌の増殖を抑制することができなくなる．しかし，一次醪と同様に雑菌汚染することなく安全に発酵できる．その要因は，①二次仕込み即下の醪アルコールが 3% 前後であることと，②二次仕込み即下の酵母濃度が $4\sim8\times10^7$ 個/ml と圧倒的に高濃度に存在することで，雑菌の増殖を抑制できるためである．
蒸留は単式蒸留機を用いて行う．酒税法によると連続式蒸留機とは“連続して供給されるアルコール含有物を蒸留しつつ，フーゼル油，アルデヒドその他の不純物を取り除くことができる蒸留機”と定義づけ，この蒸留機以外の蒸留機を単式蒸留機としている．単式蒸留機には常圧蒸留機と減圧蒸留機があり，前者は主に芋焼酎や黒糖焼酎，泡盛に，後者は麦焼酎や米焼酎などの穀類焼酎に使われる．
4. クエン酸の効果
焼酎麹菌の生産するクエン酸は醪の腐造防止の作用のみならず，揮発成分形成にも大きく寄与している．焼酎の香り成分は醪 pH が低いほど，ローズオキサイドやリナロール，β-ダマセノンの生成量が増加する．そのため酸度の異なる麹を用いて芋焼酎を製造すると酒質としては，麹酸度が高くなるほど醪 pH が低くなりモノテルペン化合物に起因する柑橘や，花様，マスカット様の香気が強いものとなり，一方麹酸度 5 程度 (醪 pH 4.5) では蒸し芋を連想させる芋焼酎らしい香りがより感じられるものになる．
5. 本格焼酎の機能性
食事中に 3 種類（ビール，清酒，本格芋焼酎）の酒と水を異なる日に飲むと，芋焼酎を食中酒にした場合，血中のグルコース（血糖値）の上昇が他のアルコール飲料のみならず，対照の水摂取群に比較しても有意に抑えられることが明らかになった．また，インスリン分泌も抑えられ，糖代謝の改善が示唆された．本格芋焼酎は様々な料理との相性が良く，食中酒として飲む機会が多く，食後の血糖値上昇を抑制でき，糖尿病の予防にも繋がると考えられる．

Traditional *shochu*, its originality of manufacturing technology, diversification of aroma and health functionality

○Kazunori Takamine
(Educ. and Res. Center for Ferment. Studies, Fac. Agric. Kagoshima Univ.)

Key words shochu making, sweet potato, aroma, health functionality

3S-Cp04 日本のワイン葡萄の父，川上善兵衛とその作出ブドウ品種

○棚橋 博史
（岩の原葡萄園）
hiroshi_tanahashi@iwanohara.sgn.ne.jp

近年，日本のワイン市場は堅調な成長を見せているが，本格的に日本にワインづくりが導入されたのは，明治時代の初期，政府の近代化政策の中の一つとして取り入れられたことが原点である．そのような中，後に‘日本のワイン葡萄の父’と呼ばれるようになった川上善兵衛（以下善兵衛）は１８６８年（慶応４年（明治元年））現在の新潟県上越市の大地主の嫡男として生まれ７歳で家督を継いだ．当時の農民の困窮状況を知る善兵衛は政府の国利民福政策に呼応して立志し，何人もの先達を尋ね当地に相応しい事業を模索した．２２歳となりその道をワイン用葡萄栽培とそれを使ったワイン造りと定め，自宅敷地をことごとく毀し葡萄園を作った．これが現在も残る岩の原葡萄園である．
善兵衛は，葡萄園の拡張と醸造所の建設を次々と行なうが，元来乾燥地を好む欧州系ブドウ品種(Vitis vinifera)は年間降水量２,７５５ mm（１９８１－２０１０年 高田観測所平均値）という日本でも有数の降水量の地での葡萄栽培が難しいことに直面する．また，日本の気候に比較的順応し栽培し易いアメリカ系ブドウ品種(Vitis labrusca)はワインにすると本格的なワインの香味とは異なるものをつくる事もわかってきた．
１９２２年（大正１１年）善兵衛は欧米系ブドウ品種単独でのワインづくりの挑戦を断念する．しかし根本となる志は変えず，当地をはじめとする日本の気候風土に順応でき，優良なワインをつくることのできる品種を当時の先端技術，メンデルの遺伝の法則を応用た品種交雑によって獲得しようと方向転換をする．１万回を越す交雑実験からは多くのブドウ特性データが集められた．それらを解析して樹態は弱いがワインにすると香味の良くなる欧州系品種を父親に，樹態は強いがワインの香味特性の悪いアメリカ系品種を母親にした時，両者の長所を併せ持つ交雑種を得る確立が高くなるという法則を見つけ出す．こうして現在赤ワイン用としては日本ワイン国内出荷量第１位，全体でも第２位となるマスカット・ベーリーＡを含む２２品種の交雑種を作出することになる．この中には現在でも生産規模で栽培されている，ブラック・クイーンやローズ・シオター，レッド・ミルレンニューム，ベーリー・アリカントＡ等も存在する．
マスカット・ベーリーＡは，前述した数量だけでなく栽培地域も広く日本の各地域に拡がり，本年で交雑後９０年となった．２０１３年にはOIV（国際ブドウ・ワイン機構：本部パリ）で品種としての登録がなされた．これは日本固有品種としては，２０１１年に日本固有の白ワイン用品種として初めて甲州に対して登録されたことに続くもので，赤ワイン用品種としては初めてになる．近年，日本産農産物が世界各地で評価され始めているが，この登録によりマスカット・ベーリーＡの国際的認知が飛躍的に高まったものと思われる．ここで留意されたいのは登録時に使われたサンプル樹が岩の原葡萄園にあるブドウ樹であるという事である．
マスカット・ベーリーＡの特徴は，高温多湿な日本の気候でも病害耐性が強いということである．そのため，現在では九州南部から東北地方北部に至るまで広範な地域に栽培されている．ワイン用葡萄を栽培する土地とその品質について，テロワール，ティピシテという専門用語がある．これはそのワイン用葡萄が栽培された土地の気候や土壌，畑の方角や傾斜，地下水位等数多くの自然環境（テロワール）によって発現する品質特異性（ティピシテ）の事である．マスカット・ベーリーＡは広範な地域で栽培されているために，そのテロワールとの組み合わせが多岐にわたり，ティピシテの幅が広いという点が特質の一つであろう．とりわけ他の品種と大きく異って，フラネオールという物質を多く生成するという特徴がある．通常，この物質がワインに多く含まれるとイチゴ様の香りが強まるが，他の共存成分などによってニュアンスの強弱が生まれる．単純にイチゴ様の香りが卓越する場合もあるが，イチゴだけでなく他の果実を想起させる場合もある．こういったバリエーションを収穫地，テロワール毎に楽しむことができるのもこの品種の魅力でもある．
最後に善兵衛にとって非常に重要な人物について触れておきたい．それは，善兵衛と同郷の新潟県高田市（当時）に生まれた東京大学農学部農芸化学科の坂口謹一郎博士（以後坂口）である．生化学や応用微生物学の分野でその名を知らない人はないといっても過言ではないが，彼と善兵衛とは縁戚関係り，互いに強い影響を及ぼしあった．善兵衛は坂口の協力を得て，葡萄全書と呼ばれる３冊からなるブドウ栽培・ワイン醸造学のバイブルとまで呼ばれた集大成を完成させた．また，善兵衛が交雑で作出した品種は坂口の研究室で試験醸造され品質評価されている．また，坂口は壽屋（現サントリーホールディングス）の創業者である鳥井信治郎に善兵衛を紹介し，３人で現在のサントリー登美の丘ワイナリーの葡萄園を開発した．今年は坂口の生誕１２０周年という記念すべき年であり，来年２０１８年は善兵衛生誕１５０年となることを付記しておく．

Zenbei KAWAKAMI, Father of grape in Japan, and the hybrid created by him

○Hiroshi Tanahashi
(Iwanohara Vinyard)

Key words Muscat Bailey A, Zenbei Kawakami, Hybrid

3S-Dp01 発酵食品「酒粕」による老化抑制及び脳機能活性化の検討

○藤井 力[1,2], 伊豆 英恵[1], 松原 主典[3]
（[1]酒総研, [2]広島大院・生物圏, [3]広島大院・教育）
tsfujii@hiroshima-u.ac.jp

「酒粕」と「発酵食品」,「酒粕」と「老化抑制」・「脳機能活性化」．結びつかない方も多いのではないか．
酒粕は清酒醸造で得られる固形の副産物で，麹菌や清酒酵母，生もと造りでは乳酸菌も関与しており，ヨーグルトや味噌，塩麹ほど発酵食品のイメージはないものの，成り立ちは，れっきとした「発酵食品」といえる．また，酒粕は，麹菌の生産する機能性成分と清酒酵母の生産する機能性成分を多く含み，外国にはない，日本固有の発酵食品ともいえ，健康イメージの強い麹や甘酒と含有する機能性成分でも関連が深い．
さらに，後述するように，酒粕中には処方箋薬や補助食品として流通している複数の機能性成分が機能性を示してもおかしくない含量含まれている．これらの機能性成分は代謝経路上も近くに存在し，知られている機能性が似ているものも多く，摂取後の代謝で変換される可能性や協調的に効果を示す可能性も考えられる．
我々は，酒粕の発酵食品としての特長を明らかにすることを目的に，酒粕中に含まれている機能性成分を調査するとともに，内閣府の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」に参加し，酒粕の成分や酒粕そのものによる老化抑制や脳機能活性化について検討した．

＜酒粕と機能性成分＞
酒粕は，米，米麹，水を仕込み，清酒酵母で発酵した「もろみ」を濾した際の固形部で，液体部分が清酒である．麹や酵母の機能性成分は，液体部分の清酒ではなく，菌体とともに固形部の酒粕に移行するものが多い．また，麹由来の成分であっても，酒粕は麹より成分が豊富になる場合がある：麹の機能性成分含量がもろみ中で減少しない場合で麹歩合 20%かつ粕歩合 20%の場合，機能性成分含量は麹中と酒粕中でほぼ同じになる．麹歩合が増えたり，粕歩合が減った場合には麹の機能性成分は酒粕に濃縮されることになる．さらに，酒粕では，酵母や乳酸菌（生もとの場合）の機能性成分が加わるほか，β グルカン等の菌体成分や食物繊維様活性を持つレジスタントプロテイン等も加わることになる．酒粕は，山上憶良が万葉集の「貧窮問答の歌」で，糟湯酒（かすゆざけ：酒粕をお湯で溶いたもの）で寒さをしのぐ様子をうたったほど食経験が長い．

＜酒粕の機能性成分＞
微生物の中でも，酵母，特に清酒酵母が *S*-adenosylmethionine (SAM)を高生産することが 1984 年に Shiozaki らにより報告された．SAM は，海外では処方箋薬やサプリメントとして流通しており，気分改善効果や抗肝障害効果，抗関節炎効果などが知られている．SAM は生体の主要なメチル基供与体で，一炭素代謝の主要成分であり，エピジェネティックな効果にも関係がある．
清酒酵母が SAM を高生産できるなら酒粕にも多く含まれるかもしれない．そこで，清酒製造場の協力のもと酒粕 109 点を集め分析したところ，SAM の含量は，酒粕 100 g 当たり平均 49 mg，最大 210 mg であった．この量は現実的な摂取量で機能性を示してもおかしくない含量である．SAM は一般の食品から摂取できないとされている．つまり，酒粕は処方箋薬やサプリメント以外で機能性を示してもおかしくない SAM が摂取できる唯一の食品ということになる．
代謝上，SAM と関連が深いグリセロホスホコリン（GPC）や葉酸，ポリアミン等についても酒粕中の含量を測定した．その結果，これらの成分含量はいずれも他食品に比べ，酒粕に高含有されていることが分かった．
SAM や GPC・葉酸は処方箋薬や食品への添加で効果が知られており，酒粕は証拠がすでに明らかな機能性成分を複数含んでいることになる．さらに，これらの成分は代謝が近く，知られている効果が似ているものが多かった．

＜酒粕摂取によるマウスの老化抑制効果と脳機能活性化効果の検証＞
我々はまず SAM と GPC に着目し，これらの成分や酒粕をマウスに経口投与することで，老化や脳機能にどのような効果が出るのか検証した．老化の抑制を見るには時間がかかる．そこで老化促進マウスを用いた．5%もしくは 10%の酒粕を，タンパク含量等が同じになるよう調整した餌に添加した．SAM や GPC の投与量は酒粕含有餌の含量に近い量とした．
老化の様子を老化スコアで評価したところ，SAM 群や GPC 群，SAM と GPC の併用群，10%酒粕群で老化の遅延効果が見られた．抗不安作用や学習記憶についても同様であった．興味深いことに，酒粕投与マウスでは餌の摂取量が増えたのに体重増加は見られず，対照より握力が強くなり，腸内細菌叢の変化が観察されるなど，老後 QOL の改善に役立つ知見も得られた．
現在，酒粕の機能性をヒトで証明できないか，ヒト試験に向けた準備を進めている．

＜謝辞＞
貴重な酒粕試料や清酒製造条件等をご提供いただきました清酒製造場の皆様に，心より御礼申し上げます．一部を除き，本研究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」により実施されました．

***Sakekasu*, a potential “fermented food” for anti-aging and brain function activation**

○Tsutomu Fujii[1,2], Hnae Izu[1], Kiminori Matsubara[3]
([1]NRIB, [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [3]Grad. Sch. Edu., Hiroshima Univ.)

Key words sake cake, sake yeast, functional food, fermentation

3S-Dp02 腸内細菌由来ポリアミンを標的とした健康寿命伸長食品の開発

○松本 光晴
（協同乳業・研・技術開発）
m-matumoto@meito.co.jp

我々は，腸内環境を介した機能性食品の開発を目指し，腸管上皮細胞から吸収され血中に移行し全身の細胞へ作用する可能性が高い腸管内の低分子代謝産物に着目して研究を進めて来た．これまでに，基礎的知見として，無菌マウスと通常菌叢定着マウスの結腸内容物と前頭前皮質をキャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析装置（CE-TOFMS）にてメタボロミクス解析し，腸内常在菌の影響を受ける代謝物が多数存在し[1,2]，その一部は血流を介して全身に移行していることを見出してきた[3].
数多く存在する腸内常在菌の代謝産物の中でも，我々は，多岐に渡る機能を有し，全生物種（原核生物～哺乳類および高等植物）の細胞内に普遍的に存在する生理活性物質ポリアミン（プトレッシン，スペルミジン，スペルミン）に注目している．ポリアミンは主として細胞内で RNA と結合して存在し，様々なストレスから核酸を保護し細胞増殖や分化に重要な役割を果たしているが，加齢と共に細胞内での産生能が低下する．大腸内プトレッシンおよびスペルミジンは腸内細菌により産生されており[1]，生理機能としては，腸管バリア機能の成熟・維持作用，マクロファージ由来炎症性サイトカイン産生抑制，オートファジー促進作用等が報告されている．そこで，腸内常在菌にポリアミンを産生させれば，これら生理効果が得られ，疾病の予防・軽減に繋がり保健効果を得られると仮説を立案し検証してきた．これまでに，10 ヶ月齢マウスに腸内ポリアミン産生作用が認められているビフィズス菌（*Bifodobacterium animalis* subsp. *lactis*）LKM512 を約 1 年間投与し，腸内ポリアミン濃度の上昇と共に寿命伸長効果を確認している[4]．更に，個体差が大きい腸内菌叢に安定的にプトレッシン産生を誘導させる物質を，統一食事を摂取したヒト糞便の CE-TOFMS メタボロミクス解析データを用いてプトレッシンと相関性のある成分からスクリーニングし，アルギニンがプトレッシン産生を強く誘導することを見出した．14 ヶ月齢より ICR マウスにアルギニンとビフィズス菌 LKM512 の長期混合投与を行った結果，寿命伸長効果と共に 20 ヶ月齢時点でのモリス水迷路試験による空間認識記憶力の成績が対照群と比較し高いことを確認した[5].
複雑な腸内菌叢において，ポリアミン産生菌種の特定は長年困難であった．最近，我々は，単独菌種ではなく異菌種の腸内細菌間で中間物質アグマチンを介してアルギニンからポリアミンが産生・放出されることを見出した．そして，この代謝系はビフィズス菌の産生する酸をトリガーとしていることが確認された.
これらの成果は，腸管内ポリアミンをターゲットとした機能性食品の可能性を示すと共に，個体差がある腸内常在菌に狙った機能性物質を安定的に産生させる技術開発およびその産生メカニズムの解明に成功したことを示している.

[1] M. Matsumoto et al.: Sci. Rep. 2, 233 (2012).
[2] M. Matsumoto et al.: Front Syst Neurosci 7, 9 (2013).
[3] M. Matsumoto et al.: PloS ONE 12, e0169207 (2017).
[4] M. Matsumoto et al.: PloS ONE 6, e23652 (2011).
[5] R. Kibe et al.: Sci. Rep.4, 4548 (2014).

Development of functional food targeting polyamines produced by intestinal microbiome

○Mitsuharu Matsumoto
(Dairy Sci. Technol. Inst. Kyodo Milk Ind.)

Key words microbial flora, polyamine, longevity, arginine

3S-Dp03 アミノ酸代謝が鍵となる酵母の長寿メカニズム

○水沼 正樹
（広島大院・先端物質）
mmizu49120@hiroshima-u.ac.jp

老化・寿命研究は，生物学的老化の仕組みを明らかにするのみならず，ヒトの老化を理解し，“健康寿命”の延長を実現するうえで極めて重要な課題である．老化過程は非常に複雑なプロセスであるが，その謎が遺伝子レベルで理解されつつある．老化・寿命研究において，酵母，線虫，ショウジョウバエ，マウスなどのいわゆる真核モデル生物を用いて世界中で研究が活発に行われている．実際，これらモデル生物を用いた研究によって，多くの寿命制御因子が同定され，老化の基本的な仕組みには共通点が多いことが明らかになった．特に，インシュリン様シグナル，酸化ストレス，カロリー制限などが老化・寿命制御の一要因として見出され，それらが関わるシグナル伝達経路が同定されている．出芽酵母は，寿命が他のモデル生物と比較して圧倒的に短い上，ゲノム情報が整備され，分子遺伝学が駆使できるという実験系の優位さに加え，高等生物と機能的に保存性が高い分子をもつという利点を持つ.
私は，Ca^{2+}恒常性維持機構の解明のため，出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いて解析を行なってきた．その過程で，Ca^{2+}シグナルは細胞周期，増殖，分化のみならず寿命といった当初の予想をはるかに超えた生理機能に関わることを発見した．Ca^{2+}シグナル伝達で機能関連する因子の一つは，メチオニン代謝系酵素の *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素をコードしている *SAH1*(必須遺伝子)であった．*sah1* 変異株は顕著に短命となった．そこで，*sah1* 変異株の短命を抑圧する変異株をスクリーニングすることにより，新規長寿遺伝子の取得を試みた．その結果，長寿を示した変異株の取得に成功した(優性変異株を *SSG1* と命名)．*SSG1* の長寿の原因を探るため，遺伝子マイクロアレイを実施したところ，メチオニン代謝や糖代謝に関わる遺伝子の増加が認められた．特に，糖代謝に関与する遺伝子群は，カロリー制限で誘導される遺伝子との重複が観察された．実際，カロリー制限(2%グルコースから 0.5%グルコース濃度の培地にシフト)を行った *SSG1* 変異株の寿命は，カロリー制限した野生株の寿命と同程度となったことから，*SSG1* 変異はカロリー制限を模倣することが示唆された．さらに，代謝産物についても調べたところ，*SSG1* 変異株では，有意に *S*-アデノシルメチオニン(SAM)が高蓄積していた．SAM は，メチオニン代謝経路においてメチオニンと ATP により生合成され，メチル基供与体としてタンパク質，DNA，脂質など様々な生体分子のメチル化反応に利用される生体にとって必須の物質である．*SSG1* 変異株で観察された SAM 高蓄積は，SAM 合成の促進が原因で，酵母 AMPK(長寿遺伝子)である Snf1 の高活性が観察された．さらに，SAM 合成酵素過剰発現株においても Snf1 が活性化され，*SSG1* 変異株の寿命延長には Snf1 が重要であることが支持された.
古くから清酒酵母は SAM を高蓄積することが知られていたがこの原因や意義は不明であった．SAM 高蓄積である *SSG1* 変異株は飢餓や高温などのストレスに対して耐性を獲得していたことから，清酒酵母は SAM 合成活性化とカップルした形で清酒醸造中の過酷なストレス環境下に適応していると想像される．SAM はうつ病や肝硬変などの疾患にも効果が示されていることから，SAM の作用メカニズムはこれらの病態の理解にも貢献できると考えられる．本シンポジウムでは，*SSG1* 変異株の表現型の解析を通して明らかになってきた SAM による長寿メカニズムや清酒酵母における SAM 蓄積の意義についてもお話ししたい.

Metabolic control of longevity in yeast

○Masaki Mizunuma
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words yeast, metabolism, lifespan

3S-Dp04 玄米機能成分を活用した脳機能の改善

○益崎 裕章[1], 小塚 智沙代[1,2], 金城 綾乃[1], 與那嶺 正人[1],
岡本 士毅[1], 田仲 秀明[1,3], 島袋 充生[4]
([1]琉大院・医, [2]ハーバード大・ジョスリン糖尿病セ, [3]田仲医院,
[4]福島県立医大)
hiroaki@med.u-ryukyu.ac.jp

世界に類を見ない超高齢社会に突入した我が国における重要な健康問題は認知機能の低下（コグニ）や依存症（アデイクション）に代表される脳機能異常である．マウスを用いた研究から動物性脂肪の過剰摂取が認知機能の低下や身体活動量の低下，動物性脂肪に対する強固な依存行動を引き起こすことが明らかになっている．私達は沖縄在住のメタボリックシンドローム男性を対象としたクロスオーバー介入臨床試験を実施し，２か月間，主食の白米を等カロリーの玄米に置換することにより，肥満の改善，食後の高血糖・高インスリン血症の改善，血管内皮細胞機能の改善，脂肪肝の改善，および，動物性脂肪に対する嗜好性の軽減効果を確認した（British J Nutr 111:310-320, 2014）．また，動物脂肪による食餌性肥満マウスや初代培養脳神経細胞を用いた研究から，玄米（米ぬか）に高濃度に含有される gamma-オリザノールがこれらの作用の中核を担うこと，gamma-オリザノールが食欲中枢である視床下部に直接的に作用して過剰な小胞体ストレスを緩和する“分子シャペロン”として機能し，動物性脂肪に対する強固な嗜好性を改善する作用を持つことを世界で初めて明らかにした（Diabetes 61:3084-3093, 2012）．経口摂取された gamma-オリザノールはエステル結合が保持されたままの完全体として脳に移行し，小胞体ストレスの緩和を介して脳神経細胞のアポトーシスを防ぎ，脳機能の改善効果を発揮することが私達の研究によって明らかになっている（Endocrinology 156: 1242-1250, 2015）．ドパミンは特異的な受容体を介する細胞内信号伝達によって様々な臓器・組織の機能調節を担っている．膵 beta 細胞ではドパミン２型受容体（D2R）シグナルがグルコース応答性インスリン分泌（GSIS）を抑制することが知られており，動物性脂肪食によって肥満・糖尿病を誘導したマウスの単離膵島では D2R をはじめドパミンシグナル関連分子群の発現が顕著に増加している．私達は gamma-オリザノールが膵島におけるドパミン受容体シグナルの亢進を是正し，cAMP/PKA 経路を介して GSIS 反応の減弱を改善させ，糖尿病の予防や改善に寄与する新規のメカニズムを明らかにした（British J Pharmacol 172: 4519-4534, 2015）．さらに，gamma-オリザノールは消化管からの吸収効率が極めて低いことを踏まえ，ナノ粒子カプセル化した gamma-オリザノールを開発したところ，通常用量の 100 倍以上の糖脂質代謝改善効果を発揮することがマウス実験から確認され（Drug Delivery 24:558-568, 2017），gamma-オリザノールがナノ技術の応用において極めて相性の良い生理活性物質であることが期せずして明らかになった．現在，ナノ粒子カプセル化 gamma-オリザノールの実用化に向けて研究開発を加速している．さらに最近，私達は，gamma-オリザノールが高動物脂肪肥満マウスの脳内報酬系に直接的に作用して DNA メチル基転移酵素（DNMT）活性を抑制するエピゲノム・コントローラーとして機能し，“満足できない脳”を“足る を知る脳”に変える機能を持つことを分子レベルで明らかにした（Diabetetologia in press, 2017）．ヒトゲノム解読が完了し，人類が持つすべての遺伝子が明らかになったにもかかわらず，２型糖尿病や肥満症の発症・進展メカニズムは遺伝子の構造自体の異常（ゲノム変異）では殆ど説明出来なかった．SNP を含む遺伝子自体の構造異常ではなく，不健康な生活習慣の積み重ねが遺伝子の読み取りパターンを変えてしまうエピゲノム機序の解明と臨床応用が生活習慣病予防・改善の新たなブレークスルーになることが確実視されており，エピゲノム・コントローラーとしての一面を持つ gamma-オリザノールの可能性が注目される．gamma-オリザノールは化学合成された低分子医薬には期待出来ないような広範で多彩な作用点を持つことが特色であり，天然食品に由来する機能性分子に注目した新しい生活習慣病予防の展開が期待される．

謝辞: 本研究の主要部分は農林水産省・内閣府による国家戦略プロジェクト：戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)の一環として行われた研究成果であり，ここに深甚の感謝を表するものである．

Brown rice-specific gamma-oryzanol-based novel approach toward dysfunction of brain by excess animal fat and aging

○Hiroaki Masuzaki[1], Chisayo Kozuka[1,2], Ayano Kinjyo[1], Masato Yonamine[1], Shiki Okamoto[1], Hideaki Tanaka[1,3], Michio Shimabukuro[4]
([1]Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus., [2]Joslin Diabetes Center., Harvard Med. Sch., [3]Tanaka. Clin., [4]Fukushima. Med. Univ.)

Key words gamma-oryzanol, brain, ER stress, reward system

3S-Dp05 ロスマリン酸による脳機能改善機作の解析

○小林 彰子[1], 篠原 もえ子[2], 浜口 毅[2], 山田 正仁[2]
([1]東大院・農生科, [2]金沢大院・医)
ashoko@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ポリフェノールにはアルツハイマー病(AD)を遅延する疫学的知見が示唆されているが，科学的エビデンスについては不明な点が多い．金沢大学医学部神経内科では，アミロイドβペプチドを用いた *in vitro* 試験および AD モデルマウス（Tg2576）を用いた *in vivo* 試験により，シソ科ハーブ類に含まれるポリフェノールの一種，ロスマリン酸（RA）が高い抗 AD 効果を示すことを見出した（Hamaguchi et al., *Am J Pathol.* 2009）．現在金沢大学において，ヒトへの応用を目指し，軽度 AD 患者を対象とする臨床試験及び地域高齢者を対象とする認知症予防介入試験を実施中であるが，臨床試験を実施するにあたり，効果および安全性の確保は不可欠である．
本講演ではこれまでに行ってきた，RA の安全性評価の取り組みについて，また AD モデルマウスを用いた RA 摂食による AD 遅延機作の解析について解説する．

【RA のヒト動態試験による安全性評価】
臨床試験用に開発された RA 製剤を用いて，健常人ボランティアを対象とした RA の体内動態試験を実施した（Noguchi-Shinohara et al., *PLOS One*, 2015）．マウス実験の結果から，ヒトにおいて生涯に渡り毎日摂取し続けても影響が出ないと考えられる量（一日摂取許容量，ADI）を算出した．RA は経口摂取 1 時間後に最高血中濃度（Cmax）に達し，24 時間で血中より排泄された．さらに Cmax および血中濃度―時間曲線下面積（AUC）を算出し安全性の指標とした．

【RA 摂食による AD 発症遅延効果の解析】
In vivo での RA 摂食後における作用メカニズムは不明な点が残されていたため，我々はマウス脳のトランスクリプトミクス解析を行った．脳内の遺伝子発現変化の解析により RA 摂食による AD 遅延機作を見出した．また，Tg2576 マウスを用いた検討では，12 か月間 RA を摂食した群はコントロール群に比べて，行動試験において，有意に認知機能低下が抑制された．

今後も本プロジェクトにおいて，動物実験や臨床試験を通して，RA の生体での AD 遅延・改善機作を解析すると共に，安全性試験の実施を通して，最終的には RA の臨床での有用性を明らかにしたいと考えている．

本研究は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」の助成により実施中である．

Elucidation of brain function improvement mechanism by rosmarinic acid

○Shoko Kobayashi[1], Moeko Shinohara[2], Tsuyoshi Hamaguchi[2], Masahito Yamada[2]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Med. Sci., Kanazawa Univ.)

Key words Alzheimer's disease, polyphenol

3S-Gp01 創薬プロセスにおけるインビトロセルベーストアッセイ

○荒木 徹朗
（旭化成ファーマ・医薬研究セ・安全性動態研）
araki.tcf@om.asahi-kasei.co.jp

医療用医薬品の研究開発には約 10 年から 20 年という多大な年月と費用が必要であり，大規模スクリーニングによるヒット化合物取得，ヒット構造からの構造展開によるリード化合物取得，薬物動態や毒性も加味したリード最適化，そして開発候補化合物の決定，といった多段階の探索研究フェーズを経た後，製造販売承認申請に向けた非臨床および臨床での評価が行われる．インビトロセルベーストアッセイの果たす役割は多岐に渡り，薬効薬理・薬物動態・安全性の各種スクリーニングのみならず，分子生物学的メカニズム解明のために試行錯誤的に行われるものや，GLP あるいは信頼性保証下において極めて厳格なプロトコールの下に実施されるものなど，その目的や内容は様々である．
近年，医薬品研究開発の成功確率は急激に低下しており，その改善は業界全体の喫緊の課題となっている．非臨床研究も例外ではなく，三次元培養，iPS 細胞，ハイコンテントイメージング，オミクス，ゲノム編集をはじめとした最新の科学知見に基づいた新たなアプローチが各フェーズで導入・検討され，今なお精力的に研究されている．
たとえば，薬物性肝障害 (DILI)は心毒性と並ぶ，安全性を理由とする医薬品開発の中止要因の一つであるが，非臨床における予測は容易ではなく，臨床試験や市販後に多くの人々に投与されてから初めて明らかになる場合が多い．その原因としては，化合物の生理学的特性や物理化学的特性だけでなく，薬物代謝プロファイルの動物種差や，遺伝的あるいは環境的要因（年齢，性別，疾病，喫煙や飲酒の有無など）に起因する個人差が DILI の発症に寄与しているためと考えられている．現在，薬物代謝の動物種差については，様々な動物種の初代肝細胞や肝抽出物を用いることで，動物種差を考察することが可能である．また，DILI のリスク要因とされる分子生物学的メカニズムに基づいた，インビトロセルベーストアッセイが多数構築されており，それらリスク要因を評価することで，個々の化合物の DILI リスクを評価しようとする試みがなされている．一方，個人差については，有効な予測手法がいまだ見出だされていないが，近年では，iPS 細胞やゲノム編集といった技術に期待が集まっている．
初代肝細胞は，今日のインビトロ DILI 研究におけるゴールドスタンダードであるが，解凍播種直後に薬物代謝活性が急激に低下することが長年の課題であり，医薬品安全性あるいは薬物動態研究者にとって，培養系研究に対する大きな動機となっている．また，近年では，クッパー細胞や星細胞など肝非実質細胞との共培養によって，より多様な DILI の病態をインビトロで再現しようとする試みがなされている．このように，細胞培養技術開発に対する医薬品研究者の興味関心は依然として非常に高いものがある．
本発表では，演者の専門とする医薬品安全性評価におけるインビトロセルベーストアッセイの現状について，実例も交えながら紹介する．さらに，演者の所属するヒト iPS 細胞応用安全性評価コンソーシアム(CSAHi)で行われている，会社の枠を超えた新たな研究アプローチについて紹介し，細胞工学や培養技術研究に寄せる今後の期待についても議論したい．

3S-Gp02 化学物質安全性試験に利用されるインビトロセルベーストアッセイ

○斎藤 幸一
（住友化学）
saitok5@sc.sumitomo-chem.co.jp

農薬，化粧品，一般化学品などの有用な化学物質の開発において，ヒトへの安全性評価は必須であるが，近年，それを実施する上で様々な課題がある．例えば，欧州化学品規制（REACH）等の新たな規制への迅速な対応，欧州での化粧品開発における動物実験の全面禁止に見られるような動物福祉への対応，科学的にはヒトと実験動物の種差の詳細な解明，内分泌かく乱物質，発達神経毒性など新しい毒性概念に対する対応などがあげられる．
化学物質を開発する企業では，これら課題に適切に対応しつつ，安全な化学物質の開発を進める使命があり，可能な限り短期間・低コストで開発することが望ましい．これら課題の解決手段の一つとして，実験動物を使用しないインビトロ評価手法を利用した安全性試験が注目され，積極的にその開発が進められている．
インビトロ安全性評価手法の中で培養細胞を用いたインビトロセルベーストアッセイの歴史は古く，例えば遺伝毒性においては 1980 年代に「哺乳類の in vitro 染色体異常試験（TG473）」が OECD ガイドラインとして採択されている．その後，遺伝毒性以外でも 2004 年には 3T3NRU 光毒性試験（TG432），2009 年には内分泌かく乱物質に対応したヒトエストロゲンレセプター α 転写活性試験（TG455），最近では培養細胞を用いた感作性物質のスクリーニング法の h-CLAT 法（TG422E）等がガイドライン化されている．
これら化学物質安全性試験に利用されるインビトロセルベーストアッセイは，科学技術の進歩に応じて様々な観点から改良が進められている．例えば，アッセイに使用する細胞ソースに関しては，近年，ES/iPS 細胞といった，多能性幹細胞を利用した生体に近い細胞（特にヒト）の利用が進められている．各種エンドポイントの簡便かつ精度の高い検出に関しては，FACS やハイコンテントイメージングシステムなど新しい機器を導入した試験法開発が進められている．しかしながら，開発が進んでいる細胞試験は多くの場合，遺伝毒性や局所毒性試験に限られており，今後は反復投与毒性，発生毒性などの全身毒性に対応した試験開発が課題となっている．全身毒性に対応するにはインビボを想定した薬物動態を加味した試験法開発が重要であり，最近では，Organs-on-a-chip などの新しい技術が提唱されている．
本発表では科学技術の進展を取り込みながら開発が進められている，化学物質安全性試験に利用されるインビトロセルベーストアッセイに関して，我々の取組みも含めて報告するとともに，今後の新たな可能性などを論じたい．

In vitro cell-based assays for safety assessment in pharmaceutical research and development

○Tetsuro Araki
(Lab. for Safety Assessment and ADME, Pharm. Res. Center, Asahi Kasei Pharma)

Key words 3D culture, cell-based assay, iPS cells, drug-induced liver injury

In vitro cell-based assays for safety assessment of chemicals

○Koichi Saito
(Sumitomo Chemical Co., Ltd.)

Key words toxicity, bioassay, cell

3S-Gp03 創薬に求められる細胞規格と培養技術について：再生医療と比較した考察

○伊藤 弓弦
（産総研・創薬基盤）
yuzu-itou@aist.go.jp

創薬の過程で候補化合物の薬物動態評価を行う場合，また化学物質の安全性評価を行う場合にも，従来は動物実験を主たる検証法の一つとして採用してきた．しかしながら，ヒトとの種間差に伴う外挿性の問題，統計的に有意な結果を生み出すための繰り返し実験にかかるコスト，そして近年さらに重要視されている動物愛護の問題などから，ヒト臓器細胞／組織を用いた試験法への期待が高まっている．培養細胞を用いた検証系を構築する上での細胞源としては，ヒト臓器の初代培養細胞や不死化した細胞株が良く使用されるが，細胞機能のバラツキや外挿性の低さから，やはり検証結果の信頼性に対しての問題性が指摘されている．それらの問題を解決する手段として，再生医療の分野でも研究開発が進められているヒト iPS 細胞等幹細胞から分化誘導したヒト臓器細胞を上記検証に利用することも世界中で検討されているが，最適な分化方法の開発が不十分なのが現状である．
上記のような問題を生み出す理由の一つに，実際に薬物動態／安全性試験を行うユーザーの要求仕様を満たすための，各種ヒト臓器細胞の規格が定められていないことがあげられる．よく，「良い細胞を作ればいい」「我々の生体内にある細胞と同じ細胞を作ればいい」といったコメントが聞かれるが，その判断をするための規格が不在であれば，初代臓器細胞が「適切に」採取されたかどうかも，ヒト iPS 細胞から検証用の臓器細胞が「適切に」誘導されたかどうかも，わからないことは自明である．本発表では，創薬に求められる細胞規格と，その規格を満たす上での培養技術のＳＯＰ化に関して，求められる考え方，作成の難しさ，作成されることにより生み出される効果に関して，再生医療分野における同様の研究との比較を行いながら考察してみたい．

Standard and culture technology of cells required for drug discovery: Compared with regenerative medicine

○Yuzuru Ito
(BRD, AIST)

Key words drug discovery, organ cells, stable supply, standalization

3S-Gp04 創薬応用を目指した肝細胞組織工学

○酒井 康行[1,2], 篠原 満利恵[2], 小森 喜久夫[1]
（[1]東大院・工, [2]東大・生研）
sakaiyasu@chemsys.t.u-tokyo.ac.jp

細胞アッセイのための初代培養肝細胞の培養方法としては，単層培養にマトリックスを配置したサンドイッチ培養と，スフェロイドのような三次元培養とが主要な２種として挙げられ，用途に応じて使い分けがされている．すなわち，前者は代謝に加えて胆汁排泄を観測可能であることから薬物動態解析に，後者は広範な肝機能を長期に維持可能であることから毒性評価に，それぞれ好んで用いられる．しかしながら現在，最新の培養技術と細胞ソースに基づき，薬効毒性評価だけでなく疾患モデルとしても適用可能なより生理学性の高い肝組織モデルが求められている．幸いなことに，従来からの凍結肝細胞に加えて，キメラ動物を用いるヒト肝細胞生産技術や，iPS 細胞からの肝分化も急激に進歩してきている．肝細胞の置かれたインビボ微小環境に今一度学び，このような有益な細胞を用いて再構成するという当たり前の作業を，今一度行うべきである．

酸素供給の重要性が理解されているバイオリアクターに比べてはるかにスケールの小さなディッシュ・プレートにおける酸素供給不足は一種の盲点である．すなわち，培養液の流動がない静置条件では，気液界面と細胞層との約２ミリの培養液層での酸素拡散が大きな障害となる．この問題は約 50 年前に指摘されたものの，現在まで根本的な解決が図られていない．この場合，細胞は好気呼吸を取れず，嫌気呼吸を余儀なくされ，場合によっては死に至ることとなる．生体ではこのように厚い液相を介して酸素が拡散で供給されることはなく，簡便な培養系に特有の問題である．

実際，細胞をプレートやディッシュで培養すると，底面一杯に増殖をした後，たとえ増殖能の高い細胞でもせいぜい部分的に 2 層程度までの増殖に留まる．血管非配備型の組織の厚みが酸素の拡散と消費とによって決まるならば，全域にわたって細胞数層まで重層化してもいいはずであるが，決してそのようなことは起こらない．これは，拡散による酸素供給フラックスが細胞の要求フラックスを下回っていることによる．実際我々は，底面を高酸素透過性のシリコーンゴム(PDMS)に交換し，その上で背面から酸素を供給しつつ培養すると，増殖性の細胞は底面全域にわたって数層の重層化組織を自発的に形成することを確かめている．この培養法では，比較的低く酸化的障害の少ない生理学的な濃度でも十分な供給フラックスを確保することができ，赤血球を用いる生体に近い酸素供給環境を培養下で構築することができる．ラット肝細胞を通常のプレートとシリコーンゴム上で単層培養し，細胞層近傍の酸素濃度を計測することで，酸素消費量を求めたところ，同じ細胞層の酸素濃度でも消費フラックスは約 10 倍異なるということとなる．要するに，培養環境における酸素の供給可能性が細胞の呼吸回路を決定し，酸素濃度は供給と消費のバランスによって結果的に決まる，という当たり前のことを示している．

興味深いのは，階層的重層化組織が時間差播種操作で簡単に構築できることである．類洞内皮細胞株とラット肝細胞との共培養について，ポリスチレンプレート上では，プレート底面にて島状になった肝細胞の隙間を類洞内皮細胞が埋める同一平面上でのヘテロな単層形成が観察されたのに対し，PDMS 上では下層に肝細胞・上層に類洞内皮がそれぞれ単層を形成，生体内と同様に個々の細胞レベルでの完全な階層的重層化共培養組織を構築することができた．PDMS 上のマトリゲルサンドイッチ培養に比較して，アルブミン合成・解毒酵素・胆管形成・各種トランスポーター発現のどれにおいても，更なる向上が見られた．また，肝実質細胞，星細胞，血管内皮細胞の三層の階層構造の培養も可能であった．このような共培養肝組織では，炎症刺激に対する一種のロバストネスが観測された．このように，肝細胞単独ではなく，共培養を行い生体に近い構造の組織を形成することで，単一の細胞で構成される組織では得られなかった，より生理的応答を得られる組織構築が可能となることが期待される．以上のような静置培養では再現できないせん断応力の影響については，マイクロ流体デバイス技術の利用が望まれる．ヒト iPS 細胞からの肝分化誘導への適用を開始しており，類洞内皮細胞を含む自律的な三次元化とそれに伴う早期または亢進した肝機能を観測している．

以上，培養下で最大の制限要因である酸素について述べたが，他の重要な栄養素や老廃物も次に考慮されるべきである．これら基本的な環境を整備し，まずは細胞の自己組織化能をフルに発揮させることが重要な視点である．なぜならば，生体内ではこれらは全く自律的に行われているからである．体内で細胞の置かれた環境に今一度学び，細胞や生体が本来持っている自己組織化能をフルには引き出すことで培養の効率化を図ることが重要であると考えている．

Liver tissue engoineering for efficacy/toxicity predictions

○Yasuyuki Sakai[1,2], Marie Shinohara[2], Kimuo Komori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]Inst. Ind. Sci, Univ. Tokyo)

Key words tissue engineering, liver

3S-Gp05 創薬応用を目指した骨格筋細胞培養マイクロデバイスの開発

○清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]
([1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ)
shimizu@chembio.nagoya-u.ac.jp

医薬品開発プロセスでは，臨床試験に先立ち，候補化合物の有効性を培養細胞や動物を用いて評価する非臨床試験が行われる．非臨床試験で有効性・安全性が期待された候補化合物を用いて臨床試験が行われるが，期待通りの有効性・安全性が得られず，開発が断念される候補化合物も多い．この要因の一つとして，従来の非臨床試験法で用いられる平面培養細胞や実験動物では，ヒトの生体応答を正確に評価することが難しい場合があることが挙げられる．そこで，候補化合物に対するヒト生体応答をより正確に評価できる，新たな非臨床試験法の開発が望まれている．

我々は骨格筋細胞を用いた非臨床試験法の開発を行ってきた．骨格筋は体重の約半分を占める組織であり，体の動力源としてだけでなく，循環・内分泌・代謝などの生理的な機能も担っている．このため骨格筋関連疾患は全身性疾患であることが多く，発症すると生活の質が大きく低下する．従来の非臨床試験では，筋管細胞を平面培養し，筋タンパク質発現量の増減や筋管細胞の太さの変化が評価されている．しかし，これらの指標は骨格筋の特徴的な表現型である収縮を評価するには不十分である．

我々は，筋管細胞やそれを含む筋組織を用いた非臨床試験法では，それらの収縮を測定することが重要であると考え，細胞培養技術・ティッシュエンジニアリング技術・マイクロデバイス技術などを融合し，筋管細胞や筋組織の収縮力や量を測定する技術を開発してきた[1-4]．MEMS 技術で作製したシリコン製のマイクロデバイスを用いて，筋管細胞一本の収縮力測定に成功した[2]．細胞接着性タンパク質をマイクロパターニングし，温度応答性高分子を犠牲層とすることで，デバイス上に筋管細胞をうまく配置した．この技術を用いて，一細胞当たり約 1 μN の収縮力を発生することを見出した．短冊状コラーゲン薄膜を利用した収縮力測定技術の開発も行った[3]．薄膜上で筋管細胞を培養し，筋管細胞が収縮することで薄膜が発生する力を，半導体ひずみゲージを用いて数か月にわたり非侵襲測定することに成功した．マイクロ流体技術を応用し，マイクロ流路内部に収縮能をもつ培養骨格筋組織を有するマイクロ流体デバイスを開発し，収縮量の測定に成功した[4]．

本講演では，これらの技術を紹介するとともに，最近我々が進めている筋萎縮モデル開発や iPS 由来運動神経細胞との共培養マイクロデバイスを用いた神経筋接合部モデル開発などの創薬応用に向けた取り組みを紹介する．

【参考文献】

1. Shimizu, K., Fujita, H., Nagamori, E.: *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 115-121 (2013). (Review)
2. Shimizu, K., Sasaki, H., Hida, H., Fujita, H., Obinata, K., Shikida, M., Nagamori, E.: *Biomed. Microdevices*, 12, 247-252 (2010).
3. Fujita, H., Shimizu, K., Nagamori, E.: *Biotechnol. Bioeng.*, 106, 482-489 (2010).
4. Shimizu, K., Araki, H., Sakata, K., Tonomura, W., Hashida, M., Konishi, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 212-216 (2015).

Skeletal muscle on a chip for drug development

○Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME, Nagoya Univ.)

Key words Cell assay, Stem cell culture, BioMEMS, Microdevice

3S-Gp06 Organs on a chip 研究の世界最新動向

○藤田 聡史[1,2]
([1]産総研・バイオメディカル, [2]神戸大院・工)
s-fujita@aist.go.jp

現在，医薬品開発や化粧品・農薬・化成品などの非医薬品の安全性評価において，治験に先立ち非臨床試験として，ヒト培養細胞試験や動物試験による毒性評価や機能評価が行われる事が一般的である．しかし，ヒト培養細胞を用いた *In vitro* 試験では，生体中の本来の細胞機能がしばしば消失する上，臓器間相互作用を含む全身性の評価が不可能である．一方，動物実験ではヒトに対する評価結果と必ずしも反映しない．結果として，治験の際の脱落率（attrition rate）が高率となるため，特に開発コストが膨大な医薬品開発では開発効率の最大化が課題となっている．一方，化粧品産業に代表される非医薬品では，動物愛護の観点から，今後動物実験を回避する流れがある．EU においては 2013 年に動物試験を行った成分を使用した化粧品の販売が完全に禁止となり，今後 EU 以外の先進国に同様の規制が広がると共に，化粧品以外の非医薬品にも適用が広がると考えられる．以上の世界的潮流の中で，ヒト個体への影響を評価できる動物実験代替法の開発が急務の課題となっており，Organs on a chip（多臓器チップ）というコンセプトが注目されるようになってきた．

Organs on a chip とは，可能な限りヒトの生体環境を模した複数の人工臓器を連結したチップデバイスである．ハーバード大学 Wyss 研究所の Ingber 教授らは，さらにこれを拡張し，すべての臓器を連結した Body on a chip（全身チップ）の概念も提示している．これらのチップを用いる事で，化合物評価や毒性評価において，それぞれの人工臓器がお互いにどのように影響するかを調査する事ができ，ヒト個体に対する応答と非常に近い結果が得られると期待される．

米国では DARPA（国防高等研究計画局），NIH（国立衛生研究所），FDA（食品医薬品局）が中心となり，5 年総額 170 億円のプロジェクトが 2012 年より開始された．ドラッグスクリーニングや薬剤評価のため，人体システムとして機能するヒト組織機能を模倣した複合チップを作成する事や，10 臓器を複合した Body on a chip プラットフォームを構築し，軍事防衛用途を含めた薬効予測，ワクチン，毒性，薬物動態，前臨床試験に役立てる事を目指している．2017 年度からは，その後継プロジェクトが開始され，全米 3 か所の組織チップ試験センターが設置され，プラットフォームの検証，疾病モデルの有効性テスト，宇宙での活用が検討される予定となっている．

欧州では EU-FETs（欧州委員会・未来最先端技術プログラム）において，Insphero 社（スイス）が中心となった 3 年総額 2 億円の Body on a chip プロジェクトが 2012 年に開始されたのを始めとして，ここ数年の間にチッププラットフォームの構築，*In vitro* 組織のバリア形成評価，*In vitro* 血管構築，糖尿病解析やドラッグスクリーニングなどの Organs on a chip 関連プロジェクトが立続けに開始された．

一方，国内ではこのような世界的潮流があまり注目されておらず，個々の研究者が独自に研究を進めてきたのが実情だった．今後，医療や薬剤テストの個別化の流れの中，本技術群の特許化，デファクト化，標準化が進み，毒性評価技術（医薬品，化粧品，農薬，食品添加物など）や創薬プロセス技術（創薬ターゲット探索，シード化合物探索，リード化合物の評価など）のパラダイムシフトが進む事は疑いない．国策として本研究開発をすすめ，日本が国際的なイニシアチブを取る事が重要と考えられる．

The latest world trend of organs-on-a-chip research

○Satoshi Fujita[1,2]
([1]Biomed. Res. Inst., AIST, [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words microfluidic device, Organs-on-a-chip, Cell-based assay, Animal use alternative

3S-Gp07 Organs-on-a-chip を用いたインビトロセルベーストアッセイの産業化に向けた取り組み

○杉浦 慎治, 金森 敏幸
（産総研・創薬基盤）
shinji.sugiura@aist.go.jp

Organ-on-a-chip (OOC)はマイクロ流体デバイス上で臓器特有の三次元組織構造や血流，動きを再現し，インビトロで臓器機能を再現する新しい培養法として注目されている[1]．さらに，複数の臓器モデルを連結した Multiorgans-on-a-chip (MOC)は，通常であれば動物実験や臨床試験が必要とされる「動物の個体としての応答」を検出しうる評価技術として期待されている[2]．OOC/MOC に対する産業界の期待が急速に高まる中，医薬品・化成品開発のためのインビトロアッセイ法として普及させ得るためには，いくつかのハードルをクリアする必要がある．本講演では製造技術開発とユーザー評価の観点で，OOC/MOC の産業化に向けた演者らの取り組みを紹介する．

OOC/MOC を創薬や化成品開発の現場に導入するためには，ニーズに対応した試作開発と機能検証，バリデーションを用途毎に行う必要がある．このためには 10 枚程度の試作から数 1,000 枚程度の中規模生産までをシームレスにつなぐ「要品種要量生産技術」の開発が鍵となる．開発の初期では数枚～数十枚の試作品を，数日から１～２週間以内に製造する迅速生産技術が求められる．試作品の性能評価を行うためには，数十枚～数百枚の試作品を用い，培養プロトコル検討とモデル化合物を用いた培養試験を行う必要がある．創薬や化成品開発の現場での採否を決めるためには，多数のモデル化合物を用いた実証試験を行う必要があり，これには数百枚～数千枚の製品が必要となる．実際の医薬品・化成品開発の現場での利用の際には数千枚～数万枚の需要に対応できる製造技術が必要となると考えられる．このように規模の異なる生産をシームレスに行う際には，生産に使用する材料選択も重要な要素となる．インビトロ細胞アッセイに利用するためには，細胞培養，薬物の吸着・収着，透明性・自家蛍光性の観点で適切な成型材料もしくは表面処理方法を選択する必要がある．

我々はこの問題に答えるべく，3D 光造型プロセスを用いて迅速かつ低コストで OOC/MOC を製造する技術の開発を進めている[3]．これまでに，位相差観察および蛍光観察が可能なマイクロ流体デバイスを厚み方向の解像度 20 μm，平面解像度 100 μm 程度の解像度で加工可能であることを確認しており，試作デバイスを用いて NIH3T3 細胞の灌流培養が可能であることを確認している．

また，OOC/MOC の産業界での利用を促進するためには，その機能検証と実証試験をユーザーの手によって行うのが好ましい．一般的に OOC/MOC のようなマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養は多数のチューブ接続やシリンジポンプによる送液を必要としており，生物系の研究者が使用するにはあまりにも複雑な装置構成となっている．我々はこの課題を解決すべく，圧力駆動型の灌流培養マイクロ流体デバイスを開発してきた[4]．空気圧は配管を通じて分配することができるため，複数の薬液を同時に送液するマルチスループット化が容易となる．また，エアフィルターを使うことで無菌空間の管理も容易となる．簡便なアタッチメントと組み合わせることで，OOC/MOC の簡便な取り扱いが可能となる[5]．この生物系の研究者が利用できる簡便さとスループットを兼ね備えた「圧力駆動型マルチスループット OOC/MOC」を様々な臓器を対象としたデバイスの開発プラットフォームとすることで，開発コストの削減とユーザーの継続的な利用が実現し，産業化への道を開拓できるのではないかと考えている．

今後は「圧力駆動型マルチスループット OOC/MOC」をベースとした関連技術開発を進め，ユーザーが目的に応じて自在に臓器／疾患モデルを選択し，組み合わせ，化学物質の評価系をデザインできる技術基盤が確立されると考えている．近い将来，医薬品，化粧品，農薬，食品などの業界の企業が，OOC/MOC を用いて目的毎に新しい評価法を開発し，その有効性を検証し，利用できるようになると期待している．

1) S. N. Bhatia and D. E. Ingber, Nat. Biotechnol., 32, 760 (2014); C. Y. Chan, et al., Lab Chip, 13, 4697 (2013).
2) J. H. Sung, et al., Lab Chip, 10, 446 (2010); I. Wagner, et al., Lab Chip, 13, 3538 (2013).
3) S. Sugiura, et al., Proc. μTAS 2015, 2101 (2015).
4) S. Sugiura, et al., Biotechnol. Bioeng., 100, 1156 (2008).
5) T. Satoh, et al., Proc. μTAS 2016, 519 (2016).

Toward industrialization of *in vitro* cell-based assays using organs-on-a-chip

○Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori
(BRD AIST)

Key words microfluidic device, Organs-on-a-chip, Cell-based assay

3S-Hp01 未知微生物資源探索におけるファンクショナルメタジェノミクス法の可能性

○木村 信忠[1,2]
（[1]産総研・生物プロセス, [2]筑波大院・生命環境）
n-kimura@aist.go.jp

近年の微生物学の進歩により，土壌に存在する微生物の 99.9 %以上は未知微生物であることが明らかとなり，以来，産業上において有用な新たな生物資源を獲得することを目的に，未知微生物の分離培養や未知遺伝子・酵素の探索手法の開発が進められている．特に，「メタゲノム解析」は微生物の分離培養に依存しない画期的な手法として注目されている．

一般的に，「メタゲノム解析」とは次世代シーケンサーを利用して未知微生物を含むメタゲノム DNA の塩基配列情報を解析することを指すことが多いが，特に，土壌や活性汚泥，海水などの環境サンプルから，多種多様な微生物ゲノムの混合 DNA を抽出し，DNA ライブラリーを作製して，酵素活性，または特定の遺伝子配列を指標に目的の遺伝子を分離する方法を「ファンクショナルメタジェノミクス法」と呼ぶ．同手法は，スクリーニング法を変えることで，１種類のライブラリーから様々な機能を有する未知遺伝子を分離できる魅力的な手法である．近年，ファンクショナルメタジェノミクス法を利用した未知微生物資源の探索が行われ，産業上有用性の高い遺伝子や酵素，生理活性物質の分離が次々と報告されている．

しかし，「ファンクショナルメタジェノミクス法」が手法として汎用される為には，いくつかの技術的なハードルを残している．最も悩ましい問題は，スクリーニングの効率である．例えば，環境サンプル中に分離の対象となる遺伝子の量が少ない場合，目的の遺伝子を保持するクローンを取得する為には，数十万から数百万という膨大な数のメタゲノムライブラリーのクローンを解析する必要がある．しかし，従来のメタゲノム解析技術において，遺伝子の検索はプレート上におけるコロニーの反応試薬に対する呈色等により行われる例が多く，研究者の主観に依存している．

そこで，目的遺伝子を含むコロニーの検出に機器を利用することで，環境サンプルから遺伝子を高感度・高精度に検索するシステムの開発が行われている．例えば，オートインデューサーの一種である *N*-アシル-L-ホモセリンラクトン（AHL）の合成する遺伝子を網羅的に検索するシステムの構築を行われている．AHL により転写誘導されるプロモーターを上流に連結した GFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子を大腸菌内へ導入し，さらに土壌 DNA を連結したメタゲノムライブラリーを導入して，GFP が発現されないクローンを取得することで，土壌 DNA から AHL 合成に関わる未知遺伝子を検索することに成功している．また，マイクロ流路を活用したスクリーニング法の検討も行われており，数十万から数百万のクローンから効率的に目的のクローンを検索することが可能になってきている．

一方，ファンクショナルメタジェノミクス法による探索の対象となる未知生物資源は原核生物が中心である．これは真核生物の遺伝子はタンパク質のアミノ酸配列をコードする領域（エクソン）が非コード領域（イントロン）によって分断された複雑な構造をとっている為であり，真核生物の遺伝子を DNA レベルで検出・捕捉することは非常に難しい．そこで，微生物の遺伝子を RNA レベル（cDNA)で検出・捕捉する方法など，真核生物由来の遺伝子や酵素を捕捉する遺伝子資源の探索技術の研究開発が行われている．

本講演では，以上のような内容を中心に，ファンクショナルメタジェノミクス法に関する技術開発の動向と共に，課題と将来展望ついて紹介する．

A technical perspective of functional metagenomics in exploring for unknown microbial resources

○Nobutada Kimura[1,2]
([1]BRI. AIST, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words metagenomic libraries, bacteria

3S-Hp02 分離培養手法の革新：難培養性微生物の正体と資源としての可能性

○青井 議輝
（広島大院・先端物質）
yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

【緒言】
微生物（細菌・古細菌）は体内から極限環境まで地球のあらゆる場所に生息し，その多様は極めて大きい．またバイオリソースという観点においてもすでに医薬，環境，食品，農業など幅広い分野で多大な貢献をもたらしていることは周知の事実である．しかし 99%以上の微生物は培養不可能であることが一般的に理解されている．これは微生物学上の最も大きな命題の一つであるにもかかわらず，分離培養手法そのものは 150 年前から大きく進展してない．したがって，環境微生物の実態解明やリソースとしての再開拓は様々な分野における重要課題であるにも関わらず，純粋培養を伴う解析は多大な困難を伴うのが実情である．一方で，近年は培養を必要としない分子生態解析手法の進展が著しい．しかし，抽出した遺伝子情報に基づく方法論だけでは本当に知りたい情報については“推測”や“仮説”に留まることが多く，「利用」という観点においても多くの制限が存在している．したがって，「培養を基盤とした方法」を拡充することで，微生物から得られる情報の質，量，さらにバイオリソースとしての可能性は飛躍的に向上すると見込まれる．
我々のグループでは，１）新しいコンセプトに基づく複数の新規分離培養手法の開発，２）環境中で重要な未培養微生物の培養化およびそれらの機能解明，さらには３）難培養性微生物の増殖をコントロールするメカニズムを明らかにすることを目的としている．本講演では，革新的な分離培養手法の開発とそれを通じて見えてきた難培養性微生物の正体や本質的な性質について議論することとする．

【新しい分離培養手法】
これまでに，それほど多くの新しいコンセプトに基づいた分離培養手法は開発されていないが，我々のグループでは数種類の分離培養法法を開発しその有効性を実証している．以下にその一部を挙げる．
１）微生物の罠：ナノメートルオーダーの構造体をデザインすることで，現場に設置するだけで自動的に複数の菌株をサンプリング・分離・培養する全く新しいタイプの分離培養手法．本手法は，人為的に微生物を分離・植菌するのではなく，「微生物自身が能動的に分離し，隔離した状態で増殖する」という点で既存の方法論に対して大きく異なる．
２）対象微生物の選択的分離：セルソーターを用いて形態学的な情報に基づいて対象微生物を生きたまま選択的に分離する方法．複数の微生物が混在するサンプルから，対象の細胞群だけを選択的に分離することで分離培養の成功率は著しく向上すると見込まれる．
３）in situ 培養：微生物は通過しない膜を用いた独立した培養チャンバーで構成された培養デバイスを用いた，実環境を模擬する培養手法（in situ 培養法）．対象微生物が実際に増殖している条件，つまり実環境中(複合系)で培養を行う．微生物間相互作用や自身が産出する阻害因子を排出しながらの培養が実現可能．
４）超高密度植菌法：培養初期の菌体密度を従来の方法の１万倍以上に高めることができ，培養期間中お互いに混在しないで分離した状態で増殖させる方法．培地条件は同一にもかかわらず従来法の 10 倍程度高い培養効率（コロニー形成率）を示すことが判明した．

【難培養性微生物の正体に迫る】
そもそも「培養できない微生物」，または「難培養性微生物」と呼ばれる微生物は何か？どのような性質を持っているものと定義できるのか？といった疑問に対しては，初歩的なレベルでも十分に答えられないのが現状である．寒天平板培養法では植菌数に対して出現するコロニーの数が著しく少ないことは 100 年以上前から報告されている現象でもある．しかし，多種多様な微生物を特定の培養条件で培養した結果でもあるため，「ある特定の微生物」だけが増殖し，結果としてコロニー形成率が低くなることを「１%以下の微生物しか培養できない」と断定することは非科学的であるという主張も存在する．一方で，本講演では，上記に挙げた「個々の微生物種の適合性」だけでなく，普遍的に環境微生物の難培養性をコントロールする未知因子やメカニズムが存在する可能性について，上記に挙げた新規分離培養手法を用いて獲得した微生物から得られたデータなどを用いて議論する．

【まとめ】
これまで未培養であった微生物を培養化することは，微生物の「難培養性」について本質的な理解を得ること，すなわち増殖という微生物の活動の本来根幹となる部分を理解することに直結する．さらに微生物の生態および環境中での活動（増殖）を人為的に制御するという究極の目標にもリンクしていると言える．さらに，分離培養手法の革新や培養可能な微生物の拡充，そして環境微生物の「難培養性」を解明することにより，直接利用できるバイオリソースの大幅な拡大が見込まれることも期待できる．

Innovation in microbial cultivation: nature of fastidious microbes and their potential

○Yoshiteru Aoi
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words uncultured bacteria, isolation, microbial cultivation

3S-Hp03 従来の微生物培養法の特性：問題点と解決策の提案

○青柳 秀紀, 高橋 将人, 斉藤 諒, 長谷川 智弘, 小林 和輝, 高野 力
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【はじめに】 約 100 年前にパスツールやコッホらにより確立された微生物純粋培養法により，多くの有用微生物が自然界から探索・単離・培養され，微生物関連産業は大きく発展してきた．近年，遺伝子情報の解析により，“従来の微生物培養法では自然界に存在する微生物のわずか 1%程度しか培養できない”ことが明らかとなり，その限界が指摘されている．残された 99%の未培養微生物は“微生物ダークマター”（*Nature* doi:10.1038/nature.2015. 16675）と呼ばれ，国内外で学術，産業面での利活用が期待され，次世代シークエンサー等を用いた網羅的な環境ゲノム解析が活発に行われている．しかしながら，塩基配列だけでは分からない微生物機能の解明や実用的利用を実現するためには，実際にダークマター微生物の培養化が必要になる．また，生物工学的視点から，ダークマター微生物の解析，探索，分離・単離，培養，評価，保存および利用に関する新たな技術開発や，これまで得られたビッグデーターとの連携も重要になる．この様な背景から，2016 年より日本生物工学会の研究部会として，微生物ダークマターに関連する研究・基盤技術開発の活性化を目的とした，“未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会”がスタートした．
本講演ではこれまで微生物培養に広く使用されてきた各種培養法（寒天平板培養や振盪フラスコ培養）に焦点を当て，演者の研究室で実施してきた研究を中心に，実験の過程で見出した課題と解決策について紹介する．

【特殊セルロースフィルムを用いた培養基材の開発】 自然界から微生物を単離培養する際，一般的に寒天平板培養法が国内外で広く用いられている．近年，従来の寒天平板培養法では，自然界に存在する微生物の 1%未満しか培養できないことが明らかとなり，その限界が指摘されている．このような背景から，これまで，種々の培養法が開発されてきたが，実用面に問題があり，一般的普及に至っていない（寒天培地は操作の簡便性やコスト面で優れているため，依然として国内外で広く使用されている）．この現状を踏まえ，演者らは，従来の寒天平板培養法の問題点を排除した，実用的で一般的普及が可能な未培養微生物の効率的な培養基材を考案し，特殊セルロースフィルムを活用した培養基材（SCF 法）を開発した．本培養基材は，特殊セルロースフィルムと足場部材で構成され，両素材を積層し，足場部材に液体培地成分を保持させることで，栄養成分の供給の律速なしに，特殊セルロースフィルム上に栄養成分を透過させ，フィルム上で微生物を培養する．SCF 法を用いて，種々の環境試料（土壌，海水，淡水，植物など）を培養し，得られた培養微生物群集を DGGE 法によって比較解析し，特異的なバンドを DGGE ゲルから切り出し 16SrRNA 塩基配列の解析を行い，BLAST 検索によって近縁種との塩基配列の相同性を調べた．その結果，SCF 法によって従来の寒天平板培養法とは異なる微生物群集が得られ，従来法では得られなかったバンドの中に既知の微生物との塩基配列相同性が 97%以下の新規性の高い微生物が複数検出された．また，本培養基材は寒天平板培養法では対応できない系（強酸性，強アルカリ性条件下での培養，培養中の成分のサンプリングやモニタリング，培地交換など）での使用が可能である．

【振盪フラスコ培養の気相環境の解析と利用】 振盪フラスコ培養法は微生物の好気的培養に広く使用されてきた．演者らは，三角フラスコを用いて土壌試料を 50℃で振盪培養し，微生物のスクリーニング実験を行う過程で，サンプリングの有無により異なる培養微生物群集が形成していることを独自に見出した．サンプリング操作を行う際の培養栓の開封に着目し，培養中に意図的に培養栓を 30 sec 開封する培養実験を，土壌試料と YPD 培地を用いて実施した結果，培養栓の開封の有無や開封条件によって異なる培養微生物群集が形成した．この現象は様々な培養条件や環境試料でも認められた．種々検討した結果，短時間の間歇的な培養栓の開封やフラスコ気相部への通気等による，フラスコ気相環境の変化は集積される培養微生物群集に影響を及ぼすことが示唆され，この現象（従来の振盪フラスコ培養とは異なる培養環境の作成）は，新規微生物の探索などに活用できることが示唆された．

謝辞：本研究の一部は科研費，（公財）新技術開発財団，科研費特別研究員奨励費 16J00800 の助成をうけて実施されました．また，村山晃一（フタムラ化学），澤田宜介（いわしやバイオサイエンス）にご協力いただきました．

The characteristics of the conventional microbial cell culture method: Problems and proposed solutions

○Hideki Aoyagi, Masato Takahashi, Ryo Saitoh, Tomohiro Hasegawa, Kazuki Kobayashi, Chikara Takano
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Agar plate culture, Erlenmeyer flask, Microbial dark matter, uncultured bacteria

3S-Hp04 共生微生物によって生合成される海洋天然化合物

○中尾 洋一, 町田 光史, 親泊 安基
（早大・先進理工）
ayocha@waseda.jp

【はじめに】
研究者がスキューバダイビングを利用できるようになった 1970 年代ごろから，海洋に生息する多様な無脊椎動物を研究対象として，有用物質の探索研究が盛んになった．その結果，陸上の生物からは見出されないような新奇な構造とユニークな生理活性を有する海洋天然化合物が数多く見出されてきた．これまでに 2 万 5 千を超える新規化合物が海洋生物から報告されており（Nat. Prod. Rep. 2016, 33, 382-431, DOI: 10.1039/c5np00156k），現在も東アジア海域を中心にその報告数を伸ばしている．
海洋生物から見出される化合物の多くがユニークな構造と生理活性を有するため，これらを有効活用するためにその真の生産者として共生微生物の存在に注目が集まっている．もし医薬品として有望な化合物を生産する微生物を同定できて，さらに大量培養法を確立できれば海洋天然化合物の莫大な多様性を人類の健康福祉に役立てることができる．しかしながら実際には，海洋共生微生物の多くは難培養性の微生物であるため，目的とする化合物を生産している微生物を特定することは容易ではなく，その先にある単独培養法の開発も現時点ではまだまだ困難であると言わざるを得ない．
【海洋無脊椎動物に含まれる二次代謝産物の比較解析】
このような背景下，共生微生物の培養法確立による目的化合物の生産法確立の将来的な実現に向けて海洋天然物化学者ができることとして，われわれは LC-MS による海洋天然化合物のメタボローム解析を行っている．各地で採集した近縁の海綿サンプルに対してメタボローム解析を行い，共通して含まれる成分と採集地によって特徴的な成分を絞り込み，それぞれを単離・構造決定することで，新規化合物を効率的に見出すだけではなく，それぞれのサンプルを特徴づける化合物の生産者である共生微生物を絞り込むことが可能と考え研究を行っている．
【まとめ】
本発表では，これまでに行ってきた研究を例にあげて，われわれアプローチの有効性・将来性について紹介するとともに，よりよいアプローチについても議論したい．

Marine Natural Products Biosynthesized by Symbiotic Microbes

○Yoichi Nakao, Koshi Machida, Yasuki Oyadomari
(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words marine sponge, symbiosis

3P-N001 白神こだま酵母より分離した酸化ストレス耐性株の解析

○金田 絵里[1], 中沢 伸重[1], 高橋 慶太郎[2]
（[1]秋田県大院・生資, [2]秋田総食研）
nnakazawa@akita-pu.ac.jp

1997 年白神山地の腐葉土から採取された白神こだま酵母の胞子クローンである IB1306 株は酸化ストレスに高い耐性を示す．この株のカタラーゼをコードする *CTT1* 遺伝子は非ストレス条件下でも高発現していることが観察されている．本研究では，IB1306 株の酸化ストレス耐性のメカニズムの解明を試みた．
CTT1 遺伝子の転写因子である *MSN2*，*MSN4*，*YAP1* あるいは *SKN7* 遺伝子の破壊株を造成し，非ストレス条件下での *CTT1* 遺伝子の発現を試験した．その結果，*msn2Δ*，*msn4Δ* および *skn7Δ* 株でその発現は著しく低下した．IB1306 株において，実験室株と同じように制御されている *GPX2* 遺伝子の発現に Msn2/4 が関与していないことから，以降は Msn2 に焦点を当て研究を進めた．Msn2 の局在を調べたところ，非ストレス条件下でも約 40％の Msn2 が核に局在することが観察された．Msn2/4 の活性化に必要な *RIM15* 遺伝子を破壊すると，非ストレス条件下での *CTT1* 遺伝子の発現は約半分に減少した．以上の結果から，IB1306 株では Rim15 を介する経路による Msn2/4 の活性化が，*CTT1* 遺伝子の高発現を引き起こしていると推察される．ところで，木質系バイオマスを使ったエタノール生産では前処理において活性酸素種が生じるため，酸化ストレス耐性を有する酵母が求められる．そこで，酸化ストレスに高い耐性を有する IB1306 株がバイオエタノール生産に使用可能かを検討した．IB1306 株から 2 倍体株を造成し，フルフラール存在下での *CTT1* 遺伝子の高発現を確認した後，発酵試験を実施した．フルフラール存在下における，2 倍体株の最終的な増殖とエタノール生成量は，フルフラール無添加のそれらと同じ値を示した．この結果は，木質系バイオマスを使ったエタノール生産に IB1306 株が応用可能であることを示唆している．

Machanism of high tolerance to oxidative stress in a spore clone isolated from Shirakami kodama yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

○Eri Kaneta[1], Nobushige Nakazawa[1], Keitaro Takahashi[2]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Sci., Akita Pref. Univ., [2]ARIF)

Key words Shirakami kodama yeast, oxidative stress, *CTT1*

3P-G002 GPCR 拮抗薬のポジティブ検出を可能とする反転型レポーター発現系

○福田 展雄[1], 石井 純[2], 本田 真也[1]
（[1]産総研・バイオメディカル, [2]神戸大院・イノベ）
nob-fukuda@aist.go.jp

G タンパク質共役受容体（GPCR）は，細胞外の刺激を内部に伝えるシグナル伝達の要であり，創薬標的としても極めて重要である．GPCR に作用する薬物は薬理学的に作動薬と拮抗薬に大別される．作動薬の機能は，GPCR に結合した際に惹起される生理作用を観察することで検出（ポジティブ検出）される．一方，拮抗薬の機能は，作動薬が惹起する生理作用に対する抑制効果を観察することで検出されてきた．しかしながら，競合試験における生理作用抑制の評価では，真偽判定に特段の注意を必要とする．
そこで表現型の改変が容易な出芽酵母を宿主として，GPCR 拮抗薬のポジティブ検出を可能とする新たなレポーター発現系を構築することとした．出芽酵母には内在性の GPCR シグナル伝達経路が 2 種類あり，本研究ではフェロモン受容体 Ste2 から連なる経路を利用した．Ste2 が活性化されると様々な遺伝子の転写レベルが変化することが知られている．その変化量を指標として，内在性の約六千種類のなかから，レポーター遺伝子の発現に適したプロモーター配列を決定した．
モデルケースとして，フェロモン様ペプチドを拮抗薬とした競合試験を行ったところ，フェロモンのみを添加した場合と比べて，10 倍以上のレポーター遺伝子の発現が観測された(Fukuda *et al.*, 2017, *ACS Synth Biol.*, in press)．また本研究で構築したレポーター遺伝子の発現カセットはプラスミドベクター上に搭載されており，他所で GPCR 研究のために開発されてきた酵母菌株にも容易に移植することが可能である．ヒト GPCR を発現するよう改変された酵母菌株に導入すれば，その拮抗薬候補物質の探索を大いに加速するものと期待する．

Positive detection of GPCR antagonists using a system for inverted expression of a reporter gene

○Nobuo Fukuda[1], Jun Ishii[2], Shinya Honda[1]
([1]Biomed. Res. Inst., AIST, [2]Grad. Sch. Sci, Technol. Innov. Kobe Univ.)

Key words signal transduction, G-protein-coupled receptor, antagonist, yeast

3P-G003 担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* の遺伝子操作法の開発

○鎗水 透[1], 下飯 仁[1], 森田 友岳[2], 小池 英明[3], 山下 結香[1], 田中 拓未[1], 北本 宏子[1]
（[1]農研機構・農業環境セ, [2]産総研・機能科学, [3]産総研・生物プロセス）
kitamoto@affrc.go.jp

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* は，リパーゼや糖脂質など産業に有用な物質を生産する．しかし，遺伝子改変が困難であるため，機能解析や実用株の作出が遅れていた．我々は，本酵母が分泌するプラスチック分解酵素に注目し，これを大量生産する GB-4(0)株をイネから分離した．本研究では，宿主に GB-4(0)株を用いて，簡便な遺伝子操作方法の開発を目的とした．
はじめに，広く利用されている子嚢菌酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での手法を踏まえて，相同組換えによる遺伝子の破壊を試みた．GB-4(0)ゲノム配列中の標的部位として，*S. cerevisiae* のウラシル生合成関連遺伝子(*URA3*)に相同性が高い領域（*PaURA3*）を選んだ．また，遺伝子組換えの選択マーカーには，*S. cerevisiae* で使われる薬剤耐性遺伝子 *natMX4* を用いた．*natMX4* 両末端に *PaURA3* の塩基配列を付与した断片を導入した形質転換体から，ウラシル要求性の株(PGB015)を得て，染色体上の *PaURA3* が *natMX4* に置換されたことを確認した．次に，PGB015 を宿主として *PaURA3* の回復を試みた．PGB015 のウラシル要求性は *PaURA3* 遺伝子断片によって相補されたが，相補株の大半では，*PaURA3* 断片が染色体上のランダムな位置に挿入されていた．このことから，*P. antarctica* は *S. cerevisiae* と比べて相同組換えの活性が低いことが示唆された．
続いて，従来 *P. antarctinca* への遺伝子導入に用いられていたエレクトロポレーション法に代わり，専用の機器が必要ないリチウムイオン処理法の確立を試みた．子嚢菌で一般に用いられる実験条件に比べ，*P. antarctinca* では，ヒートショックの温度を下げる必要があった．最適化した反応条件下では，従来に比べ遺伝子導入効率を高めることができた．これらの手法は，*P. antarctica* の遺伝子改変の基礎となる．

（本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業で実施した．）

Establishment of transformation method for the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica*

○Tohru Yarimizu[1], Hotoshi Shimoi[1], Tomotake Morita[2], Hideaki Koike[3], Yuka Yamashita[1], Takumi Tanaka[1], Kitamoto Hiroko[1]
([1]Institute for Agro-Environmental Sciences., [2]AIST, [3]BRI. AIST)

Key words transformation, yeast, basidiomycetes

3P-G004 *Pichia pastoris* におけるセントロメア配列を含む自律複製型プラスミドの開発

○中村 泰之[1], 西 輝之[2], 野口 理紗[3], 伊藤 洋一郎[1], 渡邉 徹[2], 西山 陶三[2], 藍川 晋平[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 八十原 良彦[2], 近藤 昭彦[1]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ, [3]高機能遺伝子デザイン技術研究組合）
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景・目的】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は菌体増殖能に優れ，蛋白質の分泌生産能が高い特性を有する．遺伝子発現系においてはゲノム組込み型ベクターが一般的に用いられているが，ベクターをゲノム組込みする形質転換法では，低い形質転換効率や組込み位置の影響等の問題がある．また，従来の自律複製配列（ARS）を含むプラスミドでは安定的なプラスミド保持が難しいため，評価結果にバラつきが生じてしまう問題がある．そこで本研究ではセントロメア DNA 配列を同定し，その配列を含む自律複製型プラスミドを構築することで，高安定性自律複製型プラスミドベクターを開発することを目的とした．
【方法・結果】*P. pastoris* における高安定性自律複製型プラスミドの開発には，セントロメア DNA 配列と ARS が必須であるため，RNA-Seq を実施し *P. pastoris* のセントロメア DNA 配列の同定を行った．次にセントロメア配列を含むプラスミドを構築し，自律複製活性の有無を調べた．その結果，同定したセントロメア DNA 配列全長（Cen2）を含むプラスミドの形質転換体は大きなコロニーを形成したことから，Cen2 は自律複製活性を有することが示唆された．さらに，プラスミド複製および保持に関する安定性評価を行うため，緑色蛍光蛋白質（GFP）発現ベクターに長さの異なる 4 種類のセントロメア DNA 配列を導入して自律複製型プラスミドとし，*P. pastoris* に形質転換させることで GFP を細胞内で発現させ，フローサイトメーターにより 1 細胞ごとの蛍光強度を測定した．その結果，Cen2 ベクターの形質転換体は安定的にプラスミドが保持されていることが示唆された．セントロメア配列を含む自律複製型プラスミドを構築することで，*P. pastoris* における高安定性自律複製型プラスミドの開発に成功した．

Construction of a new stable autonomous replicating plasmid vector containing centromere DNA sequence in *Pichia pastoris*

○Yasuyuki Nakamura[1], Teruyuki Nishi[2], Risa Noguchi[3], Yoichiro Ito[1], Toru Watanabe[2], Tozo Nishiyama[2], Shimpei Aikawa[1], Tomohisa Hasunuma[1], Jun Ishii[1], Yoshihiko Yasohara[2], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Kaneka Corp., [3]TRAHED)

Key words *Pichia pastoris*, centromere, autonomous replicating plasmid, plasmid retention

3P-N005 赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* における遺伝子工学技術の開発

○八木 周和[1], 山元 啓輔[2], 森田 敏彦[2], 近藤 昭彦[2,3], 原 清敬[1,3,4]
（[1]静県大・食栄, [2]神戸大院・工, [3]神戸大院・科技イノベ, [4]静県大院・環科）
k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp

カロテノイドは抗酸化作用や呈色作用を有することから，医療・食品・化粧品分野で非常に有用な化合物群である．赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* は，非常に強力な抗酸化作用を有するカロテノイド色素の一種であるアスタキサンチンを生合成可能な特異な酵母である．赤色酵母によるアスタキサンチンの発酵生産法は，これまでに様々な改良が行われてきた．赤色酵母は，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などの他の酵母と比較して，テルペン合成系が強いため，アスタキサンチンに限らず様々なカロテノイドを生産するプラットフォームとなる可能性を有する．本研究では，この赤色酵母 *X. dendrorhous* の代謝を改変し，アスタキサンチン以外のカロテノイドを生産することを目的としている．本目的を達成するためには，*X. dendrorhous* の遺伝子組換え系が必要である．そこで，本研究では，効率的な赤色酵母の遺伝子組換え系の開発を目指している．各種カロテノイドを生産するために必要な遺伝子組換え系としては，①目的の遺伝子を強力に発現するための目的遺伝子強発現系，②複数の遺伝子を同時に発現するための複数遺伝子同時発現系，③標的の遺伝子を破壊するための標的遺伝子破壊系の３つである．本研究では，これらの３つの遺伝子組換え系の構築を可能とする基盤的な遺伝子工学技術の開発を行っている．本発表では，これらの取り組みについて報告する．

Development of genetic engineering technology in red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Shuwa Yagi[1], Keisuke Yamamoto[2], Toshihiko Morita[2], Akihiko Kondo[2,3], Kiyoaka Hara[1,3,4]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Thechnol. Inov, Kobe Univ, [4]Grad. Div. Environ. Life Sci., Univ. Shizuoka)

Key words yeast, carotenoid

3P-G006 メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* における遺伝学的基盤解析系の確立

小松崎 亜紀子[1], 吉原 瑛梨奈[1,2], 千葉 靖典[1], ○横尾 岳彦[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]東薬大・生科）
t.yoko-o@aist.go.jp

メタノール資化性酵母は，糖タンパク質をはじめとした異種タンパク質生産に適した酵母である．私達の研究室では，メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いて，バイオ医薬品等をターゲットとした異種タンパク質生産系の開発を試み，一定の成果を挙げてきた．本酵母種を生物学的に理解するとともに，さらに優れた宿主とするため，この酵母において自在な遺伝学的解析を可能とすべく，有性生殖が可能な株を確立するとともに，自律的に複製可能なプラスミドの構築を行うことを試みている．
本種において接合型を決定する *MAT* 遺伝子座位の解析を行ったところ，近縁の *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* と同一の順序で *MATa1*，*MATα1*，*MATα2* 遺伝子が染色体上に配置されていることを見出した．また，*O. polymorpha* と同様に，*MAT* 遺伝子座の外側に 1 組の逆向き反復配列が存在し，窒素源飢餓環境下において，これらの逆向き反復配列に挟まれた染色体上の領域が反転することにより，接合型変換が生じることを明らかにした．
O. minuta の自律複製配列（ARS）を取得するために，ゲノム DNA からプラスミドライブラリを構築し，プラスミドが染色体上に組み込まれることなく細胞内に存在できるようなクローンを検索した．その結果，ARS の候補となる DNA 断片を複数取得した．これらの ARS 候補を含んだプラスミドを保持した細胞を培養し，選択圧をかけない状況下でプラスミドの保持率を調べたところ，培養中にプラスミドが染色体上に組み込まれる可能性があることを見出した．
本酵母種が接合および胞子形成を効率よく行うための条件検討や，二倍体として栄養増殖できる可能性を検討した結果についても，併せて報告する．

Molecular breeding of the yeast *Ogataea minuta* to which genetical methods are applicable

Akiko Komatsuzaki[1], Erina Yoshihara[1,2], Yasunori Chiba[1], ○Takehiko Yoko-o[1]
([1]Biotechnol. Res. Inst. Drug Discov., AIST, [2]Sch.Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words methylotrophic yeast

3P-G007 メタノール資化性酵母 Ogataea minuta を用いたウイルス様粒子（VLP）の発現と特性解析

○中谷 侑紀[1], 馬場 悟史[1], 野中 浩一[1], 吉田 久美[2], 染谷 和彦[2], 小野寺 宜郷[2], 遠藤 淳[1], 星野 一樹[2], 武下 文彦[1], 千葉 靖典[3]
（[1]第一三共, [2]北里第一三共ワクチン, [3]産総研）
nakatani.yuki.nd@daiichisankyo.co.jp

ウイルス様粒子（virus-like particle （以下 VLP））はウイルス同様の構造を有している一方，遺伝情報を持たないため感染性が無く，安全なワクチンとしての開発が期待されている．これまでに承認されている B 型肝炎ウイルスワクチンやヒトパピローマウイルスワクチンの製造には，昆虫細胞や酵母が用いられており，今後様々な VLP ワクチンを開発する上で，バイオテクノロジー応用医薬品として安全かつ安価に製造する技術開発が求められている．
我々は独自の酵母発現系の開発を目指して，メタノール資化性酵母 Ogataea minuta を用いたバイオ医薬品生産系の開発に取り組んできた．その結果，より汎用性の高い生産系の構築を目指した分子育種において，3 種類の分子シャペロン（PDI，ERO，KAR2）の強（共）発現が，モデルタンパク質としたモノクローナル抗体の分泌生産能を飛躍的に向上させることを見出した 1)．本発表では，さらに改良された O. minuta 発現系を用いてノロウイルス様粒子を発現させ，精製したタンパク質の構造及び活性を評価した結果について報告する．
1) Suzuki T, et al.(2017), J Biosci Bioeng, In press.

Characterization of virus-like particle (VLP) expressed in the methylotrophic yeast Ogataea minuta.

○Yuki Nakatani[1], Satoshi Baba[1], Koichi Nonaka[1], Kumi Yoshida[2], Kazuhiko Someya[2], Yoshikuni Onodera[2], Atsushi Endo[1], Kazuki Hoshino[2], Fumihiko Takeshita[1], Yasunori Chiba[3]
([1]Daiichi Sankyo Co., Ltd., [2]KitasatoDaiichi Sankyo Vaccine Co., Ltd., [3]AIST)

Key words methylotrophic yeast, Ogataea minuta, VLP, vaccine production

3P-G008 バイオ医薬品製造を目指したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* の分子育種と生産系の開発

○津田 将志[1], 中谷 侑紀[1], 馬場 悟史[1], 野中 浩一[1], 横尾 岳彦[2], 千葉 靖典[2]
（[1]第一三共(株), [2]産総研）
tsuda.masashi.ep@daiichisankyo.co.jp

近年，急速にバイオ医薬品市場が拡大している．バイオ医薬品製造には，CHO 細胞などの動物細胞，昆虫細胞，大腸菌，酵母等を宿主とした遺伝子組換え技術が応用されている．その中でも微生物宿主の利用は，製造期間，製造コストの面でメリットがあると考えられている．
我々は，独自の酵母発現系の開発を目指し，メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を用いたバイオ医薬品生産系の開発に取り組んできた．その結果，より汎用性の高い生産系の構築を目指した分子育種において，3 種類の分子シャペロン（PDI，ERO，KAR2）の強（共）発現が，モデルタンパク質としたモノクローナル抗体の分泌生産能を飛躍的に向上させることを見出した [1]．
O. minuta 発現系の更なる改良を目指し，*O. minuta* NBRC 10746 からの単コロニー分離，メタノール資化能の改変，主要な酸性プロテアーゼの欠損によるプロテアーゼ活性の抑制を行った．本発表では，これらを組み合わせた生産系の改良について報告する．
1) Suzuki T, et al. (2017), J Biosci Bioeng, In press.

Genetic engineering of the methylotrophic yeast *Ogataea minuta* and its application for biologics production

○Masashi Tsuda[1], Yuki Nakatani[1], Satoshi Baba[1], Koichi Nonaka[1], Takehiko Yoko-o[2], Yasunori Chiba[2]
([1]Daiichi Sankyo Co., Ltd., [2]AIST)

Key words methylotrophic yeast, *Ogataea minuta*, genetic engineering, biologics production

3P-G009 コンビナトリアル手法を利用した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるタンパク質高分泌生産技術

○梶原 翔太, 山田 亮祐, 荻野 博康
（阪府大院・工・化工）
ogino@chemeng.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は，タンパク質の分泌生産や代謝工学などに広く用いられている．*S. cerevisiae* によるタンパク質の分泌生産には，目的タンパク質の遺伝子の他に，プロモーター配列・分泌シグナル配列・ターミネーター配列が必要である．これらのうち何れかの配列を別の配列に置換することで目的タンパク質の分泌生産量が様々に変化することが報告されている．しかし，目的タンパク質によって各配列の適切な組合せは異なり，それを探索するのは困難である．そのため，これら全てを様々に置換し，目的タンパク質の高分泌に適した組合わせを探索する方法は報告されていない．そこで，本研究はコンビナトリアル手法を利用して適切な組合せを探索することで，タンパク質の分泌生産量の向上を目的とした．
【方法および結果】 本研究は，モデルタンパク質として熱安定リパーゼ(BTL2)を用いた．種々のプロモーター配列，分泌シグナル配列，およびターミネーター配列からなる発現カセットを含むコンビナトリアル DNA ライブラリーを作製し，作製したコンビナトリアル DNA ライブラリーを用いて *S. cerevisiae* を形質転換した．その後，トリブチリンを含むプレート培地と 96 穴プレートを用いてリパーゼの細胞外活性を検討し，約 14,000 の形質転換体の中から BTL2 を高分泌生産するものを 4 つ選抜した．最も高分泌した形質転換体の培養上清中のリパーゼ活性は，一般的に分泌発現に用いられるプロモーター，シグナル配列，ターミネーターによりリパーゼを分泌した形質転換体の約 130 倍であった．BTL2 の mRNA 転写量は，コントロール株の 2.5 倍以上であった．本研究で開発したタンパク質分泌量向上技術は，細胞内外における様々なタンパク質の過剰発現に応用可能な技術であると考えられる．

Oversecretion of a target protein in *Saccharomyces cerevisiae* using combinatorial library strategy

○Shota Kajiwara, Ryosuke Yamada, Hiroyasu Ogino
(Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words expression, *Saccharomyces cerevisiae*, combinatorial library strategy, lipase

3P-G010 YHp プラスミド：醸造酵母への 2 μm プラスミド再構成によるタンパク質高生産

美澄 幸恵[1], 西岡 佐都子[1], 上村 毅[2], 星田 尚司[1], ○赤田 倫治[1]
（[1]山口大院・創成科学・化学, [2]JXTGエネルギー）
rinji@yamaguchi-u.ac.jp

有用タンパク質生産のために高発現プロモータや染色体への多コピー挿入などの様々な方法が開発されてきた．特に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多コピープラスミドである YEp ベクターは，酵母が本来持っている 2 μm プラスミドの複製起点だけを持たせた有能な高発現ベクターである．しかし，YEp ベクターでも脱落が起こり不安定である．これは，複製を担うタンパク質が 2 μm プラスミドから供給されるため，YEp プラスミドの複製と 2 μm プラスミドの複製の綱引きが行われるせいではないかと考えられる．もし 2 μm プラスミド自身をベクターとすれば安定に維持され，さらに多コピーによる高発現が期待できる．しかし，2 μm プラスミドを本来持つ酵母株に，組換えでプラスミド上に遺伝子を入れても，その一部にしか遺伝子を挿入できない．また，2 μm プラスミドは長いリピート配列が 2 か所にあるので，大腸菌へのクローニングも容易ではない．そこで，2 μm プラスミドを持たない酵母株で，2 μm プラスミドを再構成することを着想した．酵母ではギャップリペア法を用いると容易にプラスミドが構築できる．2 μm プラスミドのリピート配列を別々に分けるようにしながら全長プラスミド領域を PCR で合成し，さらに，３本めとして *TDH3* プロモータ下流に赤色蛍光タンパク質遺伝子の yEmRFP を持つ配列と *URA3* 選択マーカーを持つ断片を用意し，合計 3 本の DNA 断片を混合し，2 μm プラスミドを持たない醸造協会酵母株へ形質転換した．再構成 2 μm プラスミドを持つ協会酵母は，YPD 培地でもほぼすべてのコロニーが可視光下で強い赤色を示したので，今までにない安定なタンパク質高発現が達成できた．このプラスミドを YHp と名づけた．

YHp plasmid: protein overproduction by reconstituted 2 μm plasmid in sake yeast

Yukie Misumi[1], Satoko Nishioka[1], Takeshi Uemura[2], Hisashi Hoshida[1], ○Rinji Akada[1]
([1]Dept. Appl. Chem., Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Yamaguchi Univ., [2]JXTG energy)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, plasmid, protein overproduction

3P-N011 油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母の育種

○秦野 琢之, 遊佐 一希, 松崎 浩明
（福山大・生命工）
hatano@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

【目的】油脂生産微生物のほとんどは，油脂を細胞内に蓄積する．我々は，産物油脂を菌体外に分泌する「油脂分泌型微生物」の育種を行い，生産能の強化と抽出コストの低減化を目指している．
【方法・結果】*S. cerevisiae* の STG1 変異株は，TG を菌体外に分泌する．STG1 株の TG 分泌（Halo^{+}）形質は 1 遺伝子変異に由来し，野生型遺伝子により相補されるが，細胞凝集性が強く，遺伝子クローニングの障壁ともなってきた．変異遺伝子特定のために，Yeast-Knock-Out collection（YKO，約 4800 株）より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした．得られた候補株について，STG1 株との相補試験並びに菌体外 TG の検出を行った結果，候補遺伝子は 3 つに絞られた．親株（YP1）の候補遺伝子をそれぞれ破壊したところ，菌体外に TG が検出されるようになったため，候補遺伝子の塩基配列を親株のそれとそれぞれ比較したが，いずれの候補遺伝子も ORF の上流数百塩基から下流数百塩基までに変異点は存在しなかった．また，STG1 株の微小管や核を観察すると *spc72Δ* 株と同様の形質を有していた．そこで *spc72* 遺伝子の RT-PCR を行い発現の有無や強弱を確認したが，どちらの株でも発現しており，有意差は認められなかった．一方，これまでの知見をもとに，*S. cerevisiae* 以外の酵母で TG 分泌を可能にできるか検討することとした．食用油脂生産に用いられている *Kluyveromyces lactis* と全ゲノム配列が同定されている *Yarrowia lipolytica* を材料に用いて，*S. cerevisiae* において TG 分泌抑制に関わると推定される遺伝子とのオルソログ遺伝子を破壊することで，TG 蓄積型実用酵母から TG 分泌型への変換を試みている．

Breeding of the yeast secreting triacylglycerol

○Takushi Hatano, Kazuki Yusa, Hiroaki Matsuzaki
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words secretory production, triglyceride, yeast

3P-G012 組換え *Pseudozyma hubeiensis* SY62 株による MEL-D 生産

○牧野 幹[1], 小西 正朗[2]
([1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工業大学・工・地域未来デザイン工学)
konishim@mail.kitami-it.acjp

Mannosylerythritol lipid (MEL)は優れた界面活性や自己集合性などの物理学的特性，細胞分化活性や抗癌活性などの生理的特性を有する天然の界面活性物質である． MEL は *Pseudozyma* 属真菌や *Ustilago* 属真菌などの黒穂菌に属する酵母様担子菌によって植物油やグルコースから MEL を大量生産されることが知られている．また，アセチル化度の違いにより MEL-A , MEL-B , MEL-C , MEL-D に分別できる．これまで，アセチル基を付加していない MEL-D 生産菌は見い出されていない．*Pseudozyma hubeiensis* SY62 株は優れた MEL 生産菌であるもののアセチル化された MEL を優先的に生産する(129 g / L / week). そこで SY62 株の MEL 特異的アセチルトランスフェラーゼ(*mat1*)遺伝子を破壊し，MEL-D の選択的生産方法について検討した．ハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカーとして用いた相同組換え法により，mat1 破壊株を得た．破壊株の代謝物を TLC 分析したところ，既存の MEL より移動度の小さい GL-1 ならびに，MEL-A と同程度の移動度の GL-2 が検出された．それぞれを精製し構造解析(1H-NMR , 13C-NMR , GC-MS , MALDI-TOF/MS)したところ GL-1 は MEL-D と同定され，GL-2 はオレイル基が付加した MEL-D(TriMEL-D)であることが示唆された．MEL-D の CMC(臨界ミセル濃度)は 2.0×10－5 M，γCMC(CMC 時の表面張力)は 29.7 mN/m となり，報告がある MEL と比較して高い親水性を示した．三本鎖 MEL-D の CMC は 3.0×10－5 M，γCMC は 29.6 mN/m となった．*mat1* 破壊株を 5 L 容量ジャーファメンターを用いて流加培養したところ，MEL-D を 91 g / L / week 生産した．

MEL-D production by gene disruptant mutant of *Pseudozyma hubeiensis* SY62.

○Motoki Makino[1], Masaaki Konishi[2]
([1]Dept. Bioltechnol. Environ. Chem., Grad. School of Eng., Kitami Inst. Tech., [2]Dept. Bioltechnol. Environ. Chem., Kitami Inst. Tech.)

Key words *Pseudozyma hubeiensis*, mannosylerythritol lipid, yeast, acetyltransferase

3P-N013 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する 2 つのアシル CoA 結合タンパク質の細胞生化学的解析

○樋口 裕次郎[1], クウォン ヒースー[1], 川口 航平[2], 菊間 隆志[2], 北本 勝ひこ[3], 竹川 薫[1]
([1]九大院・農, [2]東大院・農生科, [3]日薬大・薬)
y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp

アシル CoA 結合タンパク質 (ACBP) は出芽酵母から動物細胞まで真核生物において広く保存されている．ACBP はアシル CoA の細胞内における輸送やアシル CoA エステル形成に関与しており，脂質代謝やシグナル伝達といった細胞内の重要な機構を制御している．出芽酵母においては ACBP として Acb1p が存在し，その破壊株では生育が悪化し，胞子形成能も低下する．最近まで糸状菌において ACBP に関する報告は無かったが，黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において ACBP として AoACBP が同定され，パルミトイル CoA に親和性が高いことが示された[1]．AoACBP の生化学的解析がなされた一方で，我々は AoACBP の生理学的機能解析を目的に *AoACBP* 破壊株を作製したが，顕著な表現型は見出されなかった．そこで AoACBP-EGFP 発現株を作製し細胞内局在を解析したところ，動くドット状の構造体が確認された．この動態は微小管細胞骨格に依存し，ACBP ドメインが必要であることを明らかにした．出芽酵母の Acb1p はオートファジーの分子機構依存的に細胞外に分泌される．そこで，AoACBP の細胞内局在とオートファジー関連因子との解析を行ったところ，実際に AoACBP がオートファジーの機構で液胞まで輸送されていることが示唆された[2]．さらに我々は黄麹菌ゲノム中にもう一つの ACBP を見出し，これを AoAcb2 と名付けた．これら 2 つの黄麹菌 ACBP は，シグナルペプチドを持たないものの，AoAcb2 は炭素源枯渇条件において培養上清に分泌されていることを見出した．そして，この特殊分泌には通常の分泌経路において機能する t-SNARE タンパク質 AoSso1 に依存することを明らかにした．AoAcb2 の特殊分泌にオートファジー関連因子が必要か，AoAcb2 のどの部位が特殊分泌において重要であるかさらなる解析を行っている．1) Hao et al. (2016) Biotechnol Lett 38, 519-525. 2) Kawaguchi et al. (2016) BBRC 480, 8-12.

Cellular and biochemical analysis of two acyl-CoA binding proteins in *Aspergillus oryzae*

○Yujiro Higuchi[1], Hee Su Kwon[1], Kouhei Kawaguchi[2], Takashi Kikuma[2], Katsuhiko Kitamoto[3], Kaoru Takegawa[1]
([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [3]Sch. Pharm., Nihon Pharm. Univ.)

Key words acyl-CoA binding protein, *Aspergillus oryzae*, autophagy, secreted protein

3P-E014 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における分泌糖タンパク質に関する解析

○李 秋実, 竹川 薫, 樋口 裕次郎
（九大院・生資環）
y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp

現在，バイオ医薬品の中には糖タンパク質が約 7 割を占め，生産量の確保が重要課題となっている．また，糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖構造は，その薬効に大きな影響を与えることが多く，糖鎖構造の均一性も求められている．黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は安全性や高いタンパク質分泌能力を持つため，異種タンパク質の生産宿主によく利用されている．これまでに黄麹菌を用いた分泌有用異種タンパク質生産の研究はよく行われてきたが，分泌糖タンパク質の場合，その糖鎖構造に着目した報告はほとんどない．そこで我々は，黄麹菌において有用糖タンパク質の分泌高生産を目指し，特に糖鎖構造に関連した解析を行った．黄麹菌においては，実験室では液体培養が主に用いられる一方で，穀物を培養基質に用いた固体培養の方が醸造の現場で必要な多種類の酵素を大量に生産でき，液体培養よりもアミラーゼやセルラーゼ等の酵素生産性が優れている．そこで，黄麹菌を液体・固体の各種条件で培養した際に，内在性分泌糖タンパク質である alpha-アミラーゼや異種分泌糖タンパク質のモデルであるウシ由来の凝乳酵素キモシンの生産性と糖鎖構造に関して検討を行った．また最近，黄麹菌のタンパク質高分泌時には小胞体ストレスが恒常的に起こっていることが報告された．これに関連して，異種糖タンパク質高生産時における小胞体関連分解経路の関与についても検討を行っている．

Analysis of secretory glycoproteins in *Aspergillus oryzae*

○Qiushi Li, Koru Tkegawa, Yujiro Higuchi
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, glycoprotein, secretion

3P-G015 麹菌の固体培養における転写因子 FlbC のプロテアーゼ遺伝子の発現制御への関与

○荒井 啓, 田中 瑞己, 吉村 緑, 新谷 尚弘, 五味 勝也
（東北大院・農）
katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp

麹菌は醸造や酵素剤生産で用いられる固体培養条件下で産業上有効な酵素を多量に分泌する．さらに，それらの中で固体培養においてのみ生産される酵素も存在する．しかし，そのような固体培養特異的な遺伝子発現制御機構についてはほとんど解明されていない．我々はこれまでに固体培養特異的な発現を示し，清酒醸造において最も重要な酵素であるグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* が転写因子 FlbC によって制御されていることを明らかにしてきた(1)．本発表では固体培養条件で発現量が特に上昇するプロテアーゼ遺伝子に着目し，それらが FlbC による制御を受けているか解析した結果を報告する．
ΔflbC 株及び相補株を用いてプロテアーゼ活性測定を行った結果，pH3.0 では *ΔflbC* 株で顕著な活性の低下が観察された．一方 pH6.0 と pH9.0 では大きな活性の変化は観察されなかった．ノーザン解析の結果，酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA* と中性プロテアーゼ遺伝子 *nptB* は *ΔflbC* 株で発現量が著しく低下した．逆に野生株や相補株で発現が認められない中性プロテアーゼ遺伝子 *nptA* は *ΔflbC* 株で発現が見られるようになり，*nptA* と *nptB* とでは FlbC によって逆の発現制御が行われていることが明らかになった．このことが *ΔflbC* 株で pH6.0 におけるプロテアーゼ活性に変化が観察されなかった理由と考えられる．また，アルカリプロテアーゼ遺伝子 *alpA* も *flbC* 欠損によって発現量が上昇した．一方，*ΔflbC* 株においてその他の主要なプロテアーゼである Aorsin や，ペプチダーゼなどの遺伝子発現に顕著な変化は認められなかった．さらに，*flbC* は液体培養では発現量が極めて低く，固体培養で発現が上昇する転写因子であることから，液体培養条件で構成的に *flbC* を高発現する株を用いた解析を行った．その結果，*flbC* を構成的に高発現させた株では液体培養時にも *glaB* を発現するようになり，活性も有意に上昇した．

Involvement of the transcriptional factor FlbC in the regulation of protease gene expression in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*

○Hiraku Arai, Mizuki Tanaka, Midori Yoshimura, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, gene expression, Solid-state culture, FlbC

3P-G016 麹菌におけるカーボンカタボライト抑制転写因子 CreA による有機酸生産制御

○一瀬 桜子, 田中 瑞己, 新谷 尚弘, 五味 勝也
（東北大院・農）
sakurako.ichinose.q2@dc.tohoku.ac.jp

麹菌は多様な多糖類分解酵素遺伝子を有するものの，その発現はグルコースによるカーボンカタボライト抑制（CCR）を受ける．モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において CCR 制御因子として，広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されている．我々はこれまでに麹菌の *creA* 及び *creB* 遺伝子の単独及び二重破壊株をマルトースを含む完全培地で培養して α-アミラーゼ活性を測定した結果，野生株と比較して全ての破壊株において活性が増加することを明らかにした．一方，0.1%ポリペプトンを窒素源とした最小培地で培養すると，*creB* 破壊株と *creA*/*creB* 二重破壊株では野生株よりも高い α-アミラーゼ活性を示すのに対し，*creA* 破壊株では顕著に低い活性を示した．そこで本研究では，最小培地において *creA* 破壊株の α-アミラーゼ生産性が低下する原因を特定することを目的とした．
まず α-アミラーゼ遺伝子 *amyB* の転写量を解析した結果，*creA* 破壊株は野生株よりも高い転写量を示した．次に培養上清の pH を測定したところ，興味深いことに野生株では pH5 前後を示すのに対し *creA* 破壊株では pH4 以下を示した．そこで，マイクロアレイ解析を行なった結果，*creA* 破壊株では野生株と比較して有機酸生合成に関する遺伝子の発現量が増加していた．さらに HPLC により培養上清中の有機酸量を解析したところ，ピルビン酸やフマル酸の量が増加していた．以上の結果より，*creA* 破壊株では培養上清中の有機酸の量が増加したことで pH が低下し，α-アミラーゼが失活したと考えられる．現在は，*creA* 破壊株において窒素源や炭素源の変化による有機酸生産への影響を解析しているところである．

Effect of *creA* disruption on organic acid production in *Aspergillus oryzae*

○Sakurako Ichinose, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, carbon catabolite repression, organic acid

3P-G017 麹菌における *creB* 破壊と CreD 脱リン酸化変異導入によるアミラーゼ生産量の増加

○田中 瑞己[1], 平本 哲也[2], 多田 日菜子[2], 河原崎 泰昌[1], 新谷 尚弘[2], 五味 勝也[2]
（[1]静県大・食栄, [2]東北大院・農）
mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp

糸状菌の加水分解酵素遺伝子の発現は，グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制（CCR）によって強く抑制される．我々は，麹菌において CCR 制御に関わるユビキチンプロテアーゼ (CreB) を破壊することで CCR が解除され，アミラーゼ生産量が増加することを明らかとした (Ichinose et al. 2014)．また，*creB* 破壊による CCR 解除には，ユビキチンリガーゼと標的タンパク質のアダプターとして働く CreD が必要であり，CreD が 2 箇所のセリンでリン酸化修飾を受けることを明らかとした．本発表では，麹菌の CreD のリン酸化部位への変異導入によるアミラーゼ生産への影響について報告する．
creB 破壊株において CreD のリン酸化部位に脱リン酸化（アラニン）および擬リン酸化（グルタミン酸）変異を導入した結果，擬リン酸化変異を導入することで，グルコース混合デンプン培地で *creB* 破壊株が示すハロー形成能が抑制された．対照的に，脱リン酸化変異を導入した株では宿主の *creB* 破壊株よりも大きなハローを形成した．液体培養時の α-アミラーゼ活性を調べた結果，*creB* 破壊株は野生株の 1.6 倍の活性を示し，さらに creB 破壊株に CreD 非リン酸化変異を導入した株では野生株の 2.6 倍の活性を示した．このことから，CreD の脱リン酸化変異を導入することで *creB* 破壊による CCR 解除が促進され，アミラーゼ生産量が増加することが示された．

Improved α-amylase production by combination of *creB* disruption and CreD de-phosphorylation mutation in *Aspergillus oryzae*

○Mizuki Tanaka[1], Tetsuya Hiramoto[2], Hinako Tada[2], Yasuaki Kawarasaki[1], Katsuya Gomi[2], Katsuya Gomi[2]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, ubiquitination, amylase, gene expression

3P-G018 *Aspergillus luchuensis* におけるプロトプラスト形成と α-1,3-glucan 合成遺伝子 *agsE* の影響

○渡嘉敷 直杏[1], 利田 賢次[2], 林 梨咲[2], 西堀 奈穂子[2], 山田 修[2], 渡邉 泰祐[3], 水谷 治[1,2], 外山 博英[1]
（[1]琉大院・農, [2]酒総研, [3]日大・生資科）
mizutani@agr.u-ryukyu.ac.jp

黒麹菌は主に沖縄の泡盛醸造の現場で伝統的に用いられてきた．醤油や味噌，清酒の製造で用いられる黄麹菌と共に，黒麹菌は日本における国菌として認定されている．黒麹菌は，プロトプラスト化が困難であるため，これまでプロトプラスト-PEG 法による形質転換が用いられず，分子生物学的解析が黄麹菌と比べて非常に遅れている．また，黒麹菌は菌体外に耐酸性酵素を多く分泌することやクエン酸生産能に優れる等，その有用利用に興味が持たれている．我々は，これまで困難であった黒麹菌のプロトプラスト化を α-1,3-glucanase を使用することで可能とし，プロトプラスト-PEG 法による形質転換系を開発してきた．ゲノム中に存在する 5 つの α-1,3-glucan 合成に関わる遺伝子のうち，*A.nidulans* の主要な α-1,3-glucan 合成遺伝子である *agsB* のホモログにあたる遺伝子，*AlagsE* をアグロバクテリウム法によって欠失した黒麹菌 Δ*ligD*::*ptrA* Δ*agsE*::*hph* (Δ*agsE*) では，予想通り黒麹菌のプロトプラスト化が黄麹菌と同程度まで行えた．この Δ*agsE* 株においてオリゴマイシン耐性遺伝子 (*AloliC31*) を用いた外来 DNA を用いた形質転換（ゲノム上の *oliC* との相同組換）をプロトプラスト-PEG 法によって行えることを確認した．

Influence of α-1,3-glucan synthase gene *agsE* on protoplast formation for gene manipulation in *Aspergillus luchuensis*

○Jikian Tokashiki[1], Kenji Toshida[2], Risa Hayashi[2], Nahoko Nishibori[2], Osamu Yamada[2], Taisuke Watanabe[3], Osamu Mizutani[1,2], Hirohide Toyama[1]
([1]Grad. Agric., Univ. Ryukyus, [2]NRIB, [3]Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ.)

Key words *Aspergillus luchuensis*, protoplast, alpha-1, 3-glucan

3P-N019 糸状菌の鉄恒常性を担う転写因子 HapX の C-末端システインリッチ領域の機能解析

○辻上 誠也, 村田 俊輔, 小森 誠也, 志水 元亨, 加藤 雅士
（名城大・農）
mkato@meijo-u.ac.jp

【背景と目的】
HapX は，我々の研究グループが初めて見出した CCAAT-box 結合因子(HapB/C/E 複合体)と相互作用する真菌類に特有の転写因子である． HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の転写を制御することから，鉄の恒常性維持の中心的な役割を果たしている．我々は既に HapB/C/E 複合体存在下における HapX の DNA 結合様式について詳細に研究を進めており， HapX の N-末端側にモチーフが HapB/C/E 複合体との相互作用に重要な働きをしていることが明らかになった．一方， C-末端側ドメインには HapX オルソログ間で保存されたシステイン残基が連続する 4 つのモチーフ(Cysteine-rich motif A-D; Crm A-D)が存在しているが，その機能については不明である．本研究では，糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX の C-末端側ドメインに存在する Crm A-D の機能を解明した．
【結果と考察】
HapX とそのオルソログ間のアミノ酸配列のアラインメントを解析した結果，C-末端側に高度に保存されたシステイン残基が連続した 4 つのモチーフ(Crm A-D)を見出した．また，野生型 $HapX^{WT}$ および CrmA-D を含む領域を欠損させた $HapX^{\Delta 200}$ をリコンビナントタンパク質として調製し紫外可視吸収スペクトルを測定したところ，
$HapX^{WT}$ では波長 420 nm 付近にピークが検出された．このことから HapX は鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆された．さらに HapX の C-末端側に存在している Crr A-D に存在するそれぞれのシステインをセリンに置換した変異型 HapX を調製し，吸収スペクトルを測定したところ $HapX^{CrmC1\text{-}4}$, $HapX^{CrmA1\text{-}4C2\text{-}4}$, $HapX^{CrmB1\text{-}4C1\text{-}4}$ のシステイン残基を変異させたものでは鉄硫黄クラスターに由来する 420nm のピークが低下した．このことから HapX の鉄硫黄クラスターの保持には CrmC が大きく関与することが示唆された．

Functional analysis of the cysteine-rich motif of HapX, a regulator involved in iron-homeostasis

○Masaya Tsujikami, Shunsuke Murata, Masaya Komori, Motoyuki Shimizu, Masashi Kato
(Meijo Univ.Agric)

Key words HapX, *Aspergillus*, iron-sulfur cluster, CCAAT

3P-G020 細胞生存を指標としたエピトープ選択的抗体選択法の開発

○江口 晃弘, 長棟 輝行, 河原 正浩
（東大院・工）
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

抗体は特定の抗原に高い親和性で結合するタンパクであり，その性質から創薬や疾病治療の領域で注目されている．しかし標的抗原の一部には，ウイルス表面タンパクのように変異の多いものが存在するため，変異の少ない部位に結合する有用な抗体を開発することが求められている．本研究では，タンパク結合の競合を利用することでエピトープ特異的に抗体の親和性成熟を行える系を開発した．
本研究では，クラスタリングにより細胞死シグナルを伝達する受容体 Fas に注目し，その細胞内ドメイン及び標的膜タンパクの細胞外ドメインを，$FKBP_{F36V}$ という Dimerizer 依存的に二量化するタンパクを介して融合した抗原/F36V/Fas キメラを作製した．また，標的抗原特異的 scFv と $FKBP_{F36V}$ を融合した scFv-$FKBP_{F36V}$ を作製した．これらのタンパクを共発現させた細胞に Dimerizer を加えると，二つの二量化ドメインの協調により Fas 細胞内ドメインがクラスタリングし，発現細胞に細胞死シグナルを伝達する．次に，この細胞に対してまた別の scFv を free scFv として分泌発現させる．その scFv が scFv-$FKBP_{F36V}$ と同じエピトープにより高親和性で結合する場合，scFv-$FKBP_{F36V}$ の結合及びそれに伴う Fas のクラスタリングが阻害されるために細胞は生存し，阻害されない場合は細胞死が誘導される．このようにして，細胞生存を指標としたエピトープ特異的な抗体選択が可能である．
本系が機能することの実証として，抗原として受容体チロシンキナーゼ ErbB2 を，抗体として ErbB2 特異的 scFv を用いたところ，Dimerizer 依存的に細胞死が誘導されることを確認した．また，上記 scFv への変異導入で得られる高親和性 free scFv の導入により細胞死誘導が阻害されることを確認した．
今後は，本系によりライブラリスクリーニングが行えることを，既存報告の存在する親和性成熟系を再現することにより示す．

Development of an epitope-selective antibody selection system using cell survival as a readout

○Akihiro Eguchi, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kalahari
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words chimeric receptor, antibody, apoptosis

3P-G021 効率的な細胞運命制御を指向したチロシンモチーフのスクリーニング

○梅根 輝来人, 長棟 輝行, 河原 正浩
（東大院・工）
kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

【背景と目的】再生医療においては生体外で目的細胞の効率的かつ低コストな増殖や分化誘導が必要であるが，未だ多くの種類の細胞に関してこれは達成されていない．細胞運命の制御に関わる機構の一つに，受容体を介したシグナル伝達機構が存在する．これまで，受容体のリガンドとなるサイトカインやアゴニストを用いた方法が取られてきたが，本研究では新たに受容体自身を人工的に作製することを考え，さらにフェノタイプを指標としたスクリーニングを行うことで目的の機能を有する受容体を効率的に見出した．具体的には，受容体の細胞内ドメインのうち，シグナル伝達分子との相互作用に重要なチロシンモチーフと呼ばれる配列のライブラリを作製し，細胞増殖を指標としたスクリーニングを行った．
【方法・結果】単一モチーフのみを有する人工受容体を作製するために，AP20187 依存的に二量体化する $FKBP_{F36V}$，Thrombopoietin 受容体由来の Janus Kinase 結合ドメイン，Interferon γ 受容体由来の STAT1 結合モチーフをそれぞれ融合した．次に STAT1 結合モチーフのチロシン下流の三残基を，全アミノ酸配列を取りうるようにランダム化したライブラリを作製し，この受容体のライブラリを IL-3 依存的に増殖する Ba./F3 細胞に遺伝子導入し発現させた．次にこの細胞に AP20187 を添加して数日間培養し，増殖が誘導された細胞を選択した．得られたクローンを解析したところ，チロシン下流の一残基目にバリンを有する配列が多く含まれていることが分かった．これを再度確認するため，チロシン下流を様々なアミノ酸に固定したライブラリを作製し同様に増殖を指標としたスクリーニングを行ったところ，電荷や極性を有するアミノ酸を含むものと比べてバリンを含むライブラリで多くのコロニーが形成されることがわかった．

Screening of tyrosine motif which can induce efficient cell fate regulation

○Kirato Umene, Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara
(Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo)

Key words signal transduction, screening, tyrosine motif, cell fate

3P-E022 ミミズにおける最適な異種遺伝子導入法の検討

○山谷 竜大, 町田 悠, 土田 喜野, 伊佐 猛, 赤澤 真一
（長岡高専・物質工）
s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】近年．遺伝子組換え生物を用いて治療薬を生産するバイオ医薬が注目されており，特に動植物個体を用いた生産法は高額な生産設備を必要としないため次世代型生産法として注目されている [1]．そこで我々は，新規宿主としてシマミミズ *Eisenia feida* に注目し，異種遺伝子発現系の構築を目指してきた．本ミミズは生物毒性試験のモデルとして世界的に認められているため，本技術の進展により分子生物学的研究が加速化される事も期待される．これまでの研究で，我々はマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することにより，切断した *E. fetida* 尾部への遺伝子導入に成功し，遺伝子導入に最適な培地及びエレクトロポレーション条件等を明らかにしてきた [2]．本研究では，さらなる形質転換効率の向上を目指して組織再生時間について検討すると共に，完全なミミズ形質転換体の作成を試みた．
【方法】切断した *E. fetida* 尾部を 0 ～48 時間培養した後，組織再生面にルシフェラーゼ遺伝子を導入した．遺伝子導入の確認は，ルシフェラーゼの発光強度を計測することにより行った．また，遺伝子導入を行った *E. fetida* 頭部断片からゲノムを抽出し，ルシフェラーゼ遺伝子の確認を PCR 法で検証した．
【結果】切断後 24 時間培養した後に遺伝子を導入したものが生存率，形質転換効率共に最大となった．また，PCR により遺伝子が組込まれている事を確認した．頭部については現在実施中である．本研究は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究（15K14713），基盤研究 C（17K07767）の助成を受けて実施された．
[1]赤澤真一．バイオ医薬品とその生産宿主．Medical Science Digest．42 (10), pp. 5-8，2016.
[2]町田悠他．日本農芸化学会．2016 年 3 月．2G059.

Investigation of optimal heterologous gene transfer method of earthworm

○Tatsuhiro Yamaya, Yu Machida, Kino Tsuchida, Takeru Isa, Shin-ichi Akazawa
(Dept. Material Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll.)

Key words biological medicine, earthworm, transformation, *Eisenia fetida*

3P-G023 Glycoengineering baculovirus host insect cell lines with CRISPR-Cas9 technology

○Hideaki Mabashi-Asazuma[1], Donald L. Jarvis[1,2]
([1]University of Wyoming, Mol. Biol. Dept., [2]GlycoBac, LLC)
hideakiasa@gmail.com

CRISPR-Cas9 technology is a powerful system that can be used to improve existing recombinant protein production platforms by knocking-out or modifying endogenous genes. The baculovirus insect cell system (BICS) has been widely used to produce recombinant proteins. The BICS is a binary system comprising a baculovirus and its host cell line and therefore both can be engineered to modify or improve the system. However, the host cell line engineering has been restricted to a knock-in approach because of technological limitations. Thus, we developed new CRISPR-Cas9 tools for lepidopteran insect cell lines used as baculovirus hosts, such as Sf9 and High Five, using newly identified functional U6 promoters. We demonstrated our CRISPR-Cas9 tools can target endogenous N-glycan processing pathway genes in these insect cells. First, we targeted fdl, a gene encoding an N-acetylglucosaminidase that antagonizes N-glycan extension and is the enzyme directly producing the paucimannosidic N-glycans usually found in BICS products. The fdl-knockout cells will enable us to humanize the N-glycans more efficiently and homogeneously. Second, we targeted Mgat1 because cell lines lacking Mgat1 are commonly used by crystallographers for glycoprotein structural analysis. Both CRISPR-Cas9 modified insect cell lines showed expected dramatic N-glycan profile changes without having a loss of protein production level. Our CRISPR-Cas9 tools and the new cell lines created using this tool will significantly expand BICS utility.

Glycoengineering baculovirus host insect cell lines with CRISPR-Cas9 technology

○Hideaki Mabashi-Asazuma[1], Donald L. Jarvis[1,2]
([1]University of Wyoming, Mol. Biol. Dept., [2]GlycoBac, LLC)

Key words baculovirus, insect cell, CRISPR-Cas9, Glycoengineering

3P-G024 メラニン形成における白色・黒色細胞のメラニン形成関連遺伝子に関する DNA メチル化解析

○前田 翔大[1], 栗原 誠[1,2], 飯田 泰広[1,2]
([1]神奈川工大院・工学研究科, [2]神奈川工大・応用バイオ)
iida@bio.kanagawa-it.ac.jp

[背景と目的]
メラニンは紫外線から細胞や DNA を保護しているが，表皮で過剰に産生・蓄積されるとシミが形成される．メラニン形成経路として cAMP-PKA 経路が知られ，その中でも Tyrosinase はメラニン形成に大きく関与している．本研究室では，B16 メラノーマ細胞のメラニン形成について，エピジェネティックな制御を受けている可能性があるという知見を得ている．この機構の解明は，メラニン形成に関する新たな知見を得ることに繋がると期待できる．また，今回用いた細胞は白色，黒色細胞といった表現型の違いが生じているが，シミ研究は従来，白黒混在した細胞集団に対して評価を行っている．しかし，細胞を白色，黒色細胞ごとに選別し，各表現型のメラニン形成の比較を行うことで新たな知見が得られると考えられる．そこで，本研究では，表現型の異なる細胞ごとの *Tyrosinase* を含むメラニン形成関連遺伝子の発現評価を行うこと，また各遺伝子プロモーターの DNA メチル化解析を行うことを目的とした．
[方法]
B16 メラノーマ細胞を DMEM 中で培養後，白色または黒色細胞を各 100 個ずつ選別し，DNA と RNA を抽出した．次に，*Tyrosinase*，*MITF-A*，*M*，*Creb1*，*CBP*，*p300* を対象に，RNA はリアルタイム PCR を行い遺伝子発現量を評価し，DNA はバイサルファイトシーケンシングによって各遺伝子プロモータ領域の DNA メチル化解析を行い比較した．
[結果と考察]
遺伝子発現量解析の結果，解析した全ての遺伝子に関して黒色細胞は白色細胞より発現量が多いことが示唆された．また，各遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析の結果，*Tyrosinase* は両細胞ともメチル化され，*MITF-A*, *M* は両細胞ともメチル化されていないことが示唆された．このことから，今回解析した遺伝子プロモーターについては差がないことが示唆された．他遺伝子の DNA メチル化の差異については現在検討中である．

DNA methylation analysis of the melanogenesis-related genes in white and black B16 melanoma cells

○Shota Maeda[1], makoto Kurihara[1,2], Yasuhiro Iida[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Kanagawa Inst. Technol., [2]Dept. Appl. Biosci. Kanagawa Inst. Technol.)

Key words phenotype, DNA methylation, melanogenesis

3P-G025 生体制御分子硫酸体の生理機能評価技術開発

○下平 武彦[1], 黒木 勝久[1], Liu Ming-cheh[2], 水光 正仁[1], 榊原 陽一[1]
（[1]宮崎大院・農工総合, [2]Dep. Pharmaco. Coll. of Pharmacy and Pharm. Sci., Univ. Toledo.）
ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

【背景・目的】 生体制御分子の一種であるポリフェノール化合物は，抗ガン作用等の様々な生理機能を持つ．これらの化合物は摂取されると肝臓や腸管で硫酸転移酵素(SULTs)などの薬物代謝第二相酵素により代謝される．近年，このようなポリフェノールの代謝産物が，様々な細胞応答に関与し，多くの疾病に関わる G タンパク質共役型受容体(GPCR)に作用し機能することが報告された．硫酸体においても同様に GPCR へ作用する可能性が考えられるが，その機能性も未だ解明されていない．そこで本研究では生体制御分子硫酸体の GPCR への作用に焦点をあて，GPCR に対する機能評価系の構築および，硫酸体の生理機能解明を目的に研究を行った．
【方法】 様々な生体制御分子硫酸体は，SULT を発現させた大腸菌により遺伝子工学的に調製した．得られた生体制御分子硫酸体は HPLC 解析，質量分析，NMR 解析にて構造決定した．次に，調製した硫酸体を用いて，ヒト肝がん由来細胞株（HepG2）に対する増殖抑制効果を確認した．さらに，各種 GPCR を強発現させたヒト胎児腎細胞(293T)に，GPCR シグナルの下流の転写応答に関与する様々な応答配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを遺伝子導入し，GPCR を介した機能評価系を構築した．この評価細胞を用いて調製した生体制御分子硫酸体の GPCR に対する機能評価を行った．
【結果・考察】 いくつかの生体制御分子硫酸体にガン細胞増殖抑制効果があることが確認できた．さらに GPCR の機能評価系にて，いくつかの硫酸体において硫酸体未処理区と比較しルシフェラーゼ活性の変化が確認できた．以上の結果から，生体制御分子硫酸体の GPCR を介したシグナル伝達系への関与が示されたので，今後更なる作用メカニズム解明を行う．

Functional analysis of sulfated bioregulatory molecules

○Takehiko Shimohira[1], Katsuhisa Kurogi[1], Ming-dheh Liu[2], Masahito Suiko[1], Yoichi Sakakibara[1]
([1]Interdiscip. Grad. Sch. Agric. and Eng., Univ. Miyazaki., [2]Dep. Pharmaco. Coll. of Pharmacy and Pharm. Sci., Univ. Toledo.)

Key words Sulfotransferase, sulfated polyphenol, GPCR, luciferase assay

3P-G026 微小組織採取システムを用いた生体組織の空間的 RNA-seq

○依田 卓也[1], 細川 正人[2,3], 高橋 清文[2], 坂梨 千佳子[2], 神原 秀記[2], 竹山 春子[1,2,4]
（[1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]JST・さきがけ, [4]産総研・早大CBBD-OIL）
haruko-takeyama@waseda.jp

生体組織は多様な細胞から構成され，その構造と機能は密接に関わっている．複雑な生命現象を正しく理解するには，組織を構成している様々な細胞の位置情報と遺伝子発現情報を統合的に知る必要がある．一般的に任意の位置から組織切片を採取する技術として Laser capture microdissection (LCM)が用いられている．しかし，1 つの採取に時間がかかるために多くの微小切片を採取するには適さない．したがって，同じ組織切片から多地点を短時間に採取できるシステムが求められる．
我々は，組織切片から微小領域を高速採取し，その微小組織片から RNA-seq を行うシステムを開発した．本システムでは，組織切片の観察像から採取部位を指定することができ，先端を鋭利に加工したステンレス製で中空の採取針を用いて，選択領域（直径約 100 μm）を短時間（最大 96 箇所の採取を 8 分）に採取してプレートに回収することができる．また，試料回収時の２つのモードを選択できる．(1)マニュアルモード：試料を見ながら目的の箇所を選択し採取できる．(2)自動マトリックスモード：切片上の 1 点選択すると，そこから設定したピッチで正確なマトリックス状に採取できる．本システムは LCM などの既存の組織採取法と比べて，短時間での採取が可能で試料の劣化が少ないため，同一組織中の多地点のトランスクリプトミクス比較解析に応用できる．本ポスターでは，マウス脳凍結切片の微小組織の網羅的な遺伝子発現解析を例に，本システムの組織空間トランスクリプトミクス解析への応用について紹介する．将来的には本システムから得られる位置情報と遺伝子発現データを統合することで，２次元または３次元の生体組織遺伝子発現マップの構築が可能と考えている．

Spatial RNA-seq for frozen tissue slice using an automated tissue micro-dissection punching system

○Takuya Yoda[1], Masahito Hosokawa[2,3], Kiyofumi Takahashi[2], Chikako Sakanashi[2], Hideki Kambara[2], haruko Takeyama[1,2,4]
([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ, [2]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ, [3]PRESTO, JST, [4]CBBD-OIL, AIST)

Key words Site-specific gene expression analysis, transcriptome, Sampling system

3P-G027 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの非触媒 β-プロペラドメイン上に存在する基質特異性に重要な残基

○東海 彰太[1], 美藤 友博[2], 清水 克彦[3], 有馬 二朗[2]
（[1]鳥取大院・連農, [2]鳥取大・農, [3]鳥取大・産学）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【目的】我々はこれまでに，加水分解と拮抗してペプチド結合形成反応を触媒するプロリルオリゴペプチダーゼをエリンギから見出した．本酵素の基質特異性の改変は，酵素で合成できるペプチド類を広げ，その有用ペプチド類の合成ツールとしての利用に繋がる．一方で，本酵素は非触媒 β-プロペラドメイン上にある Met203 が酸化されると，基質特異性が変化する．本研究ではこの性質に着目し，基質取り込み機構の解明と特異性の制御を目指し，Met203 の周辺残基の機能解析を行った．
【方法及び結果】Met203 の酸化や Ala への置換により，本酵素の基質特異性は芳香族アミノ酸-pNA に対して厳格となり，それ以外のアミノ酸-pNA に対する活性は極端に低下する．そこで，Met203 近傍の His76，Phe180，Trp198 についても Ala に置換し，特異性への影響を評価した．その結果，全ての変異酵素で芳香族アミノ酸-pNA に対する活性が減少し，L-Leu-pNA に対する活性が維持された．これは Met203 の酸化や Ala への置換とは逆の効果であり，Met203 以外にも，本酵素の基質特異性に影響を与える残基が非触媒 β-プロペラドメイン上に存在することが明らかとなった．上記の三残基は側鎖に環構造を持つため，これらの残基が協調して芳香環を持つ基質の取り込みに重要であると考えられた．H76A，F180A，W198A 変異酵素について酸化処理を行うと，再び L-Phe-pNA に対する活性が上昇した．また W198A 変異酵素の Met203 を酸化型の構造を模した Gln に置換しても，酸化処理と同様の効果が観察され，L-Phe-pNA に対する活性が上昇した．以上の結果から，Met203 及び上記残基は全て基質の通り道の形成に関わるが，基質の種類によって，その取り込みに果たすそれぞれの役割が異なると考えられた．

Key residues, which laid on non-catalytic β-propeller domain, for the substrate specificity of prolyl oligopeptidase from *Pleurotus eryngii*

○Shota Tokai[1], Tomohiro Bito[2], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]Org. Reg. Ind. Acad. Coop., Tottori Univ.)

Key words prolyl oligopeptidase, beta-propeller domain, substrate specificity, peptide bond formation

3P-G028 高電圧バイオ電池構築のための酸化還元電位シフトを目指した超好熱性アーキア由来マルチ銅オキシダーゼの遺伝子改変

○高村 映一郎[1], 坂元 博昭[2,4], 里村 武範[3,4], 櫻庭 春彦[5], 大島 敏久[6], 末 信一朗[2,3,4]
（[1]福井大学院・工・総合, [2]福井大学院・工・繊維, [3]福井大学院・工・生物応用化, [4]福井大学・生命セ, [5]香川大・農, [6]大阪工大）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

[背景]
バイオ電池 (biofuel cell:BFC) は次世代エネルギーの一つとして注目されているが，電池電圧の低さが実用化への障害の一つとなっている．BFC の電池電圧は，主に酵素およびメディエータの酸化還元電位に依存する．我々は，長期安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) を BFC のカソード触媒として用いてきた．しかし，McoP は酸化還元電位の低い MCO（+ 0.37~+ 0.45 V）に分類されるため，BFC を構築した際の電池電圧の低さが問題であった．本研究では，McoP の酸化還元部位である T1Cu の軸配位子（Met）を Leu もしくは Phe へ置換することで McoP の酸化還元電位の正側へのシフトを試みた．
[実験方法及び結果]
McoP の 442 番目の Met を Leu もしくは Phe へ置換した変異型 McoP（M442L, M442F）は組換体より精製した．McoP は高温において活性を示すため，50℃での電気化学測定による酸化還元電位の評価を行った結果，酸化還元電位は野生型，M442L，M442F の順に 426，555，544 mV（vs. SHE）であった．2 つの変異体ともに野生型と比較して 100 mV 以上酸化還元電位が正側へシフトした．これは，電子吸引性基を有する Met が Leu，Phe に置換されることで T1Cu の酸化状態が不安定になるためである．M442F と M442L を比較すると Phe の方が Leu よりも電子供与性が大きいが，両者の酸化還元電位はほぼ同じであった．一方，野生型と比較して M442F の熱安定性が低下していることから，嵩高い側鎖を有する Phe へ置換されることで T1Cu 周辺構造への影響が大きくなってしまった可能性が考えられる．今後，得られた変異体をカソード触媒として用いてバイオ電池の構築を行っていく．

Directed evolution of multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon for high voltage biofuel cells

○Eiichiro Takamura[1], Hiroaki Sakamoto[2,4], Takenori Satomura[3,4], Haruhiko Sakuraba[5], Toshihisa Ohshima[6], Shin-ichiro Suye[2,3,4]
([1]Dept. Adv. Interdiscip. Sci. Technol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [5]Fac. Agric., Kagawa Univ., [6]Osaka Inst. Tech.)

Key words biofuel cells, multicopper oxidase, directed evolution, redox potential

3P-N029 アミノ酸を燃料とするバイオ電池のための多段階酵素反応系を有するバイオアノードの構築

○小松 丈紘[1], 山﨑 晃司[1], 坂元 博昭[1,3], 里村 武範[2,3], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[1,2,3]
（[1]福井大院・工・繊維, [2]福井大院・工・生物応用化, [3]福井大学・生命セ, [4]香川大・農, [5]大阪工大）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

[諸言]バイオ電池 (BFC)には常温菌由来の酵素が電極触媒として用いられており，安定性の低さが電池寿命への問題となっている．そこで我々はより安定性の高い超好熱菌由来の酵素を用い，さらに基質一分子からより多くの電子抽出が期待される複数酵素による多段階酵素反応系を用いた BFC 用アノードに着目した．本研究では L-プロリンを開始基質としてピロリン-5-カルボン酸 (P5C)，L-グルタミン酸を介して 2-オキソグルタル酸への多段階酵素反応系を触媒する超好熱菌由来の 4 種の脱水素酵素 (DHs: L-プロリン DH (LPDH)，NADHDH 複合体 (PDH)，P5CDH，グルタミン酸 DH (GDH))を用いて NADH とメディエータを介した電極との高効率な電子伝達を行う BFC 用アノードの構築を検討した．
[実験]電極への酵素の足場材料としてニトリロ三酢酸 (NTA)基とスクシンイミド (NHS)基を末端に有する自己組織化単分子膜 (SAM)を用いて金電極上へ混合 SAM を形成した．P5CDH と GDH を NHS 基に共有結合で固定化し，NTA 基にニッケル原子を配位させることで末端にヒスチジンタグが導入された LPDH と PDH を配向固定化した．この電極を用いて，多段階酵素反応系における電極上への電子伝達を確認するために電気化学的評価を行った．
[結果・考察]本反応系の一部と全体のステップについて，酵素電気化学反応を確認した．その結果，基質とメディエータの存在下で各々の反応系で酸化波の増大が確認されたことから円滑に反応が進行することがわかった．さらに，より円滑な酵素反応を目指し混合 SAM の混合比を検討した結果，2 種類の SAM の混合比が 1:1 となり，電極上でのすべての酵素の分子数が等しいとき最大電流密度を示した．このことから本バイオアノードデバイスを用いることで，アミノ酸からの高効率発電が期待される．

Construction of bioanode with multi-enzyme system for amino acid biofuel cells

○Tomohiro KOMATSU[1], Koji YAMAZAKI[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,3], Haruhiko SAKURABA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3]
([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

Key words biofuel cell, bianode, bio-device

3P-G030 光触媒活性に及ぼす酸化還元酵素内包半導体ナノ粒子の分散性の影響

○安田 信幸, 油井 信弘, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】生体分子とナノ材料をハイブリットしたナノバイオ材料は単体とは異なる触媒活性を発現し，環境や医療分野に応用されている．演者らは酵素を内包した光半導体ナノ粒子を作製し，そのハイブリット型ナノ粒子が新たな触媒特性(例えば，酵素の耐熱性や酵素反応の光制御)を示すことを明らかにしている．本報告では，逆ミセル法によりジアホラーゼ内包硫化カドミウムナノ粒子(DA-CdSNP)を作製し，種々のチオール化合物で表面修飾した DA-CdSNP の分散性と光触媒活性との関係について述べる．

【方法】常温常圧下で逆ミセル法により DA-CdSNP を作製し，粒子表面に 2-ジメチルアミノエタンチオールで正電荷(DA-CdSNP-N^+)または 2-メルカプトエタンスルホン酸で負電荷(DA-CdSNP-SO_3^-)を修飾した．ハイブリット型ナノ粒子の一次粒径は，粒子を ITO 電極上に静電的に吸着させ，原子間力顕微鏡(AFM)によって測定した．また，二次粒径(一次粒径の凝集体)は，粒子の水溶液を動的光散乱法(DLS)によって室温で測定した．ハイブリット型ナノ粒子の光触媒活性は，NADH の酸化反応を分光学的に測定することで評価した．

【結果と考察】得られたハイブリット型ナノ粒子の一次粒径は，AFM イメージより約 13 nm であることが分かった．その二次粒径は，一次粒径と比較して DA-CdSNP-SO_3^-は DA の内包の有無に関係なく同程度であり，DA-CdSNP-N^+は DA の内包によりさらに大きくなる傾向を示した．おそらく，正電荷の場合は，修飾剤の導入量の低下あるいはジメチル基の相互作用による粒子の凝集が生じたため，一次粒径より大きくなったと推察される．光照射下における NADH 酸化反応は，DA-CdSNP-SO_3^-は一定の速度で進行したが，DA-CdSNP-N^+は飽和することが分かった．これら触媒活性の差異は，粒子の分散性を反映していると考えられる．

Effect of dispersibility on photocatalytic activity of enzyme-CdS nanoparticles

○Nobuyuki Yasuda, Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words CdS nanoparticles, enzyme-semiconductor hybrid, photocatalyst, NADH oxidation

3P-G031 緑膿菌の飢餓状態における生存戦略：クォーラムセンシング物質アルカリプロテアーゼの役割

○星子 裕貴[1], Garcia-Contreras Rodolfo[2], 前田 憲成[1]
（[1]九工大院・生体工, [2]Dept. Microb. Parasitol., Fac. Med., UNAM, Mexico）
toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

【目的】日和見感染症の原因菌である緑膿菌は，細菌の密度に応じてクォーラムセンシング(QS)と呼ばれる仕組みから色素や酵素などの様々な物質を生産する．その中でも，アルカリプロテアーゼ，エラスターゼは宿主細胞の免疫系を阻害し，ピオシアニンも同じく宿主の防御機能を妨害することで知られている．偶然，炭素源のない飢餓状態において，以上の 3 種類の QS 物質の生産を測定したところ，アルカリプロテアーゼのみ生産されていることが分かった．本研究では，飢餓状態において緑膿菌が，アルカリプロテアーゼを生産する生物学的意義を明らかにすることを最終目的に，クォーラムセンシングの関わりについて追求した．
【方法】緑膿菌 PA14 株の野生株，*lasI* 変異株，*rhlI* 変異株，*lasR rhlR* 二重変異株の 4 株をそれぞれ初期濁度 2.0 となるように M9 緩衝液中に懸濁させ，37℃，200 rpm，好気性条件で培養させた．0, 3, 6, 9, 24, 48 時間においてサンプリングを行い，その後，アルカリプロテアーゼ，エラスターゼ，そして，ピオシアニンを測定した．
【結果・考察】試験した 4 株のうちアルカリプロテアーゼが検出された菌株は，野生株と *rhlI* 変異株の 2 株であった．その他の QS 物質は検出されなかった．このことから，アルカリプロテアーゼの生産には *las* 系が関与していることが分かった．現時点では，炭素源のない飢餓状態におけるアルカリプロテアーゼの生産は，生存戦略の一つとして，自身の細胞を溶菌させるための手段であると考えられる．

Survival strategy of *Pseudomonas aeruginosa* under starvation: role of a quorum sensing product, alkaline protease.

○Yuki Hoshiko[1], Rodolfo Garcia-Contreras[2], Toshinari Maeda[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci. Syst. Eng., Kyushu Inst. Technol., [2]Dept. Microb. Parasitol., Fac. Med., UNAM, Mexico)

Key words quorum sensing, Survival strategy, alkaline protease, lytic enzyme

3P-G032 固定化ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素によるアセチル-CoA 生成

○竹中 慎[1,2], 尹 基石[1,2,3], 松本 崇弘[1,2,3], 小江 誠司[1,2,3]
（[1]九大院・工・応化, [2]WPI-I2CNER, [3]九大・小分子エネルギーセ）
ogo.seiji.872@m.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】アセチル-CoA は代謝経路の中心となる化合物であり，医薬や農薬として利用可能なポリケチド化合物を合成するための前駆体として知られている．近年，固定化アセチル CoA 合成酵素（ACS）による触媒的なアセチル-CoA 生成が報告されている[1]．しかし，ACS の場合は基質であるアデノシン三リン酸（ATP）由来のアデノシン一リン酸（AMP）と二リン酸が副生成物として生じるため，反応後のアセチル-CoA の分離・精製が課題となる．一方，ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素（PFOR）はピルビン酸と CoA を基質とし，副生成物は分離が容易な二酸化炭素，プロトンおよび電子であることから，アセチル-CoA 生成への応用が期待される．本発表では *Citrobacter* sp. S-77 から精製した PFOR を用いた固定化 PFOR の作製とアセチル-CoA 生成反応の特性評価について報告する[2]．
【方法と結果】PFOR は，発表者らが新規に単離した細菌 *Citrobacter* sp. S-77 から嫌気的条件下で精製した．精製 PFOR は分子量 120 kDa のサブユニットからなるホモ二量体酵素であった．固定化 PFOR は，精製酵素をハイドロキシアパタイト粒子に吸着させた後，アルギン酸ハイドロゲルに内包させて作製した．固定化 PFOR の触媒活性は，メチルビオロゲンを電子受容体として用い，生成したアセチル-CoA を HPLC 分析で定量することで求めた．その結果，反応条件（30℃，pH 7.0）における触媒回転頻度（TOF）は 37 s^{-1} であり，遊離酵素の TOF（102 s^{-1}）と比較して触媒活性は低下した．しかし，固定化 PFOR は 10 回の繰り返し使用後も初期活性を約 70%保持していた．本研究は，固定化 PFOR の作製とアセチル-CoA 生成反応への利用に成功した初めての例である．
（1）L. Ionov et al., ACS Appl. Mater. Interfaces 2015, 7, 1500-1507.
（2）M. Takenaka et al., Bioresour. Technol. 2017, 227, 279-289.

Acetyl-CoA production by immobilized pyruvate-ferredoxin oxidoredcutase

○Makoto Takenaka[1,2], Ki-Seok Yoon[1,2,3], Takahiro Matsumoto[1,2,3], Seiji Ogo[1,2,3]
([1]Dept. Chem. Biochem., Grd. Sch. Eng., Kyushu Univ., [2]WPI-I2CNER, [3]sMol, Kyushu Univ.)

Key words acetyl-CoA production, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, immobilization

3P-N033 両親媒性を有する有機-無機ハイブリッド多孔体の酵素反応への応用

○松浦 俊一[1], 池田 卓史[1], 山本 勝俊[2]
（[1]産総研・化学プロセス, [2]北九大・国際環境工）
matsuura-shunichi@aist.go.jp

【背景・目的】産業用酵素を利用した機能性化学品の生産では，反応プロセスの高効率化および製造コストの低減に向けた酵素の分離回収・再利用技術の開発が求められている．この課題解決に向けた酵素固定化技術が進展しているが，反応時の固定化担体からの酵素の脱離が問題となっており，より吸着能に優れた担体の開発が必要である．最近我々は，両親媒性のナノ空間を有する新規の有機-無機ハイブリッド多孔体（KCS-2）の合成に成功した．KCS-2 はアルミノシリケート組成の骨格を有し，親水性と耐水性に優れていることから酵素の固定化に好適であり，これまでにリゾチーム等の酵素に対する優れた吸着能を確認している．本研究では，KCS-2 が有する特異な細孔を利用した持続的かつ高効率の酵素反応場の構築を目指し，機能性アミノ酸合成のおける KCS-2 の優位性を検証した．
【方法・結果】各種の固定化担体（KCS-2，メソポーラスシリカ，非多孔質シリカ）に対するグルタミン酸脱炭酸酵素の吸着評価を行った結果，KCS-2 は非多孔質シリカより 4 倍高い固定化量を示し，メソポーラスシリカと同等の吸着能が認められた．次に，固定化酵素を用いたグルタミン酸の脱炭酸による γ-アミノ酪酸（GABA）の合成反応における繰り返し耐久性評価を行った．その結果，非多孔質シリカでは酵素が脱離し再利用が困難であったが，KCS-2 およびメソポーラスシリカを用いた固定化酵素では１０回の繰り返し使用において３割程度の活性を保持した．また，これらの固定化酵素の初期反応速度は，遊離の酵素と比較して，メソポーラスシリカでは低下したが，KCS-2 では著しく増大した．さらに，低温域での反応速度も増大したことより，酵素の安定な固定化場および活性向上場としての KCS-2 の優位性が認められた．
【謝辞】本研究の一部は，JSPS 科研費（16K05861）の助成を受けて実施した．

Application of amphiphilic organic-inorganic hybrid porous material to enzymatic reaction

○Shun-ichi Matsuura[1], Takuji Ikeda[1], Katsutoshi Yamamoto[2]
([1]Res. Inst. Chem. Proc. Technol., AIST, [2]Fac. Env. Eng., Univ. Kitakyushu)

Key words immobilized enzyme, porous material, glutamate decarboxylase, GABA

3P-N034 規則性ナノ空孔材料を含んだ多孔質成形体の開発とバイオプロセス応用

松浦 俊一, 長瀬 多加子, ○角田 達朗
（産総研・化学プロセス）
matsuura-shunichi@aist.go.jp

【背景・目的】酵素法による機能性化学品（医薬・化粧品原料など）の生産プロセスにおいて，酵素の安定性の向上および繰り返し利用を可能にするための酵素の固定化担体の開発が切望されてきた．しかし，従来の活性炭等の担体では固定化時に酵素活性が低下する場合が多く，また，粉末状の担体ではハンドリング性に欠けており，バイオリアクターの一部として直接利用することは困難であった．この技術課題を解決するために，我々は，無機のナノ空孔材料（メソポーラスシリカ）を含んだ新規の多孔質成形体を開発した[1]．この多孔質成形体は優れたハンドリング性を有し，粉落ちや微粉化といった現行技術の問題点も克服している．さらに，精密な細孔径の制御によって酵素の固定化状態を最適化することで安定性や再利用性を向上できる．本研究では，各種の産業用酵素を対象とした多孔質成形体への固定化および反応評価を実施した．
【方法・結果】表面性状および細孔径（2~8 nm）の異なるメソポーラスシリカ粉末を含んだ８種類の多孔質成形体（ペレット状および中空糸状）を作製し，産業用酵素（プロテアーゼ，リパーゼ，グルコース脱水素酵素，アゾ還元酵素など）の吸着評価を行った．ここで作製した多孔質成形体は，有機高分子（熱可塑性樹脂）をバインダーとして適宜の形状に成形しているにもかかわらず，メソポーラスシリカ本来の物性（細孔径，表面積）をほぼ維持し，粉末状シリカと同様の酵素の吸着挙動を示した．さらに，活性炭では吸着後の酵素活性が大幅に低下し，再利用が困難であったが，メソポーラスシリカの多孔質成形体では，細孔径の最適化を図ることによって酵素の繰り返し耐久性を著しく向上させることに成功した．
1) 特願 2016-230602「ミクロないしメソポーラス微粒子の多孔質成形体，酵素担持用担体，その酵素複合体及びこれらの製造方法」

Development of porous compact containing ordered nanoporous material and its application to bioprocess

Shun-ichi Matsuura, Takako Nagase, ○Tatsuo Tsunoda
(Res. Inst. Chem. Proc. Technol., AIST)

Key words immobilized enzyme, mesoporous silica, porous compact, bioreactor

3P-G035 スチレンモノオキシゲナーゼを用いたインディルビン誘導体生産

○戸田 弘[1], 黒田 千尋[2], 伊藤 伸哉[1]
（[1]富山県大・生工研セ, [2]富山県大・工）
htoda@pu-toyama.ac.jp

インディルビンは藍染め染料の主成分であるインディゴの構造異性体であり，慢性骨髄性白血病に処方される生薬「青黛」に含まれる活性成分である．インディルビンは腫瘍細胞内のシグナルカスケード系やリン酸化酵素を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮することが知られており，近年では各種修飾基を付加したインディルビン誘導体による抗腫瘍作用の向上についても研究されている．
スチレンモノオキシゲナーゼ(SMO)はスチレンを立体選択的に(*S*)-スチレンオキシドへと酸化すると同時に，インドールの酸化によるインディゴ生成も触媒する．我々は SMO 発現大腸菌によるインディゴ生成を研究する過程で，微量ながらインディルビンが生成されることを見出した．インドールは SMO によりインドキシル(3-ヒドロキシインドール)へと酸化され，さらに空気による酸化重合反応を経てインディゴへと変換されるが，一部はインドキシルからイサチンへと酸化された後，インドキシルとの重合によりインディルビンになると推測される．そこで我々は，インディルビン生成効率の向上を目指し反応条件の最適化を試みた．その結果，反応 pH 8.0，インドール 20 mM に対してイサチン 50 mM を添加した時に最大 2.5 mM のインディルビンが得られた．また反応時に純酸素を添加封入した場合，インディルビン生成量が減少しインディゴ生成量が増加することが明らかとなった．酸素の添加によりインドキシルの酸化重合が促進されインディゴ生成量が増加すると示唆されることから，反応系中の溶存酸素濃度(DO)をコントロールすることによりさらにインディルビン生成効率を向上できることが期待される．また，インドールおよびイサチンの 4,5,6,7-位にハロゲンや各種修飾基が付加した基質を用いて反応を行い，様々な修飾基の組合せを有するインディルビン誘導体が生成されることが明らかとなった．

Bioproduction of indirubin derivatives using styrene monooxygenase (SMO)

○Hiroshi Toda[1], Chihiro Kuroda[2], Nobuya Itoh[1]
([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words styrene monooxygenase, indirubin, indigo

3P-G036 メタゲノムからのアルコール脱水素酵素遺伝子の探索とバルキーケトン不斉還元反応への応用

○粟谷 晃也, 八箇 裕子, 戸田 弘, 伊藤 伸哉
（富山県大・工）
nbito@pu-toyama.ac.jp

【目的】光学活性なアルコールは医薬品の中間体として用いられている．*Leifsonia* sp. S749 由来アルコール脱水素酵素 (LSADH)は，ケトンの不斉還元を触媒し光学活性なアルコールを生産すると同時に，2-プロパノールを水素供与体として補酵素 NADH を再生する有用な酵素である．我々は，これまでにメタゲノム DNA を鋳型として直接 PCR を行い，各種有用酵素遺伝子を効率的に取得可能な S-GAM 法(Screening Gene-specific Amplicons from Metagenomes)を開発・提唱し，LSADH 類縁酵素遺伝子を取得，解析している[1]．本研究では同法を用いて，嵩高い置換基を持つケトンをターゲット化合物として，これらを効率的に不斉還元できる *lsadh* 類縁遺伝子(*hladh*)を環境 DNA から取得することを目指した．
【方法・結果】LSADH 及び SDR(short-chain alcohol dehydrogenase)のアライメント情報を基に相同性の高い領域を選択し，目的遺伝子(*hladh*)が増幅されるように縮重 GAM プライマーを設計した．高温発酵中のバーク堆肥より抽出したメタゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行い，*hladh* 遺伝子の増幅を試みた．その結果，約 750 bp の複数バンドの増幅を確認した．増幅した PCR 産物を In-Fusion 反応により発現ベクターと融合させ，*E. coli* JM109 へ形質転換してライブラリーを作製し，得られた約 600 クローンについて，1,1-ジクロロアセトン及びバルキーケトンの還元活性を示すクローンをスクリーニングした．その結果，約 30 クローンにおいてバルキーなケトン A の不斉還元活性が認められた．これらのクローンの *hladh* をシークエンス解析するとともに，より高い立体選択性と変換能を示した HLADH-28 についてその酵素特性を解析した．
1) N. Itoh, et al., *Appl. Environ. Microbiol*. 2014, *80*, 6280/Erratum 2016, *82*, 61.

Exploring alcohol dehydrogenase genes from metagenomes and their application to asymmetric reduction of bulky ketones

○Akinari Awatani, Yuko Hakka, Hiroshi Toda, Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words metagenome, alcohol dehydrogenase, bulky ketone reduction, chiral alcohol

3P-G037 リウマチ薬メトトレキサート新規標的タンパク質としてのマクロファージ遊走阻害因子の機能及び相互作用解析

○杉島 小雪[1], 松村 洋寿[1], 面川 歩[2], 尾高 雅文[1], 廣川 誠[2], 涌井 秀樹[1]
（[1]秋大院・理工, [2]秋大院・医）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【概要と目的】 メトトレキサート(MTX)は，関節リウマチの第一選択薬として利用されており，既知の薬効として，ジヒドロ葉酸還元酵素への葉酸代謝拮抗作用がある．しかしながら，それだけでは免疫系に対する MTX の薬理作用の全てを説明することはできない．また，MTX は副作用として関節性肺炎を合併することが報告されており，その発生機序も未解明である．我々はこれまでに，MTX の新規標的タンパク質候補として，マクロファージ遊走阻害因子(MIF)を同定することに成功した．本研究では，MTX の詳細な薬理作用の解明を目的として，ヒト由来 MIF の大腸菌による発現系構築を行い，MTX の MIF の機能と構造に及ぼす影響について解析した．
【結果及び考察】 精製 MIF の SDS-PAGE 解析によって，MIF のアミノ酸一次配列から推定される分子量約 12.5 kDa に単一なバンドが確認された．基質に L-dopa methyl ester を用いたトートメラーゼ活性を測定したところ，MTX の添加により酵素活性の阻害が見られた．また，蛍光スペクトル変化による MTX の MIF への結合定数の評価は，K_d=24 uM と算出された．MTX が MIF の高次構造に与える影響を SEC-MALLS 測定によって解析したところ，MTX の添加，無添加にかかわらず，MIF の三量体構造は保たれていた．従って，MTX は MIF の高次構造には影響を及ぼさず，基質ポケットに直接結合することで阻害効果を示すことが示唆された．

Effects of Rheumatic drug methotrexate on functional and structural features of a novel target protein macrophage migration inhibitory factor

○Koyuki Sugishima[1], Hirotoshi Matsumura[1], Ayumu Omokawa[2], Masafumi Odaka[1], Makoto Hirokawa[2], Hideki Wakui[1]
([1]Grad. Sch. of Sci. and Eng., Akita Univ., [2]Grad. Sch. of Med., Akita Univ.)

Key words methotrexae, macrophage migration inhibitory factor, rheumatic drug

3P-G038 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来タンナーゼ(AoTanB)の諸性質

○市川 響太郎, 佐々木 克仁, 塩野 義人, 小関 卓也
（山形大農）
tkoseki@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

【目的】タンナーゼはタンニンやカテキンガレート中の没食子酸エステルの加水分解を触媒する．本酵素は茶飲料やワイン及びビールの清澄に用いられ，食品産業に活用されている．本研究では *Aspergillus oryzae* 由来の *AotanB* 遺伝子を *Pichia pastoris* で発現させ，その酵素学的諸性質を解析した．
【方法】大腸菌でクローン化した *AotanB*（AO090023000047）遺伝子を *P.pastoris* GS115 株に組み込み，リコンビナント酵素を発現させた．AoTanA と AoTanB の活性中心セリンの近傍には共通の GXSXG モチーフが存在する．*A.oryzae* を含む *Aspergillus* 種由来 TanA での GXSXG モチーフの配列は GCSDG であり，一方，TanB では GCSEG であった．そこで，AoTanB の GXSXG モチーフを TanA と同じ配列にした AoTanB_E203D を作成し，タンナーゼ活性に及ぼす影響を検討した．
【結果】*P.pastoris* は通常の 30℃の培養では AoTanB の産生が低いが，18℃の培養で高い生産性を示した．精製したリコンビナント AoTanB は，至適温度 30℃，至適 pH6.0 であった．AoTanA は Kex2 によってプロセッシングされるため，SDS-PAGE では 2 本のバンドを示したが，AoTanB は Kex2 認識部位がなく，SDS-PAGE で 1 本のバンドのみを示した．また AoTanB の至適 pH は，至適 pH5.0 の AoTanA よりやや高く，至適温度は 30℃で同じであったが，比活性は顕著に低かった．一方，特許 4370395 で *A.oryzae* を宿主に産生された AoTanB は至適 pH7.0，至適温度 70℃であり，至適 pH，至適温度ともに *P.pastoris* で発現させた AoTanB とは著しく異なった．AoTanA と AoTanB の活性の違いを検討するために AoTanB_E203D を作成し，グルタミン酸残基の影響を調べたところ AoTanB_E203D はタンナーゼ活性が極端に低下した．このことから，AoTanB の GXSXG モチーフにあるグルタミン酸残基は本酵素の活性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された．

Biochemical characterization of recombinant tannase (AoTanB) from *Aspergillus oryzae*

○Kyotaro Ichikawa, Katsuto Sasaki, Yoshihito Shiono, Takuya Koseki
(Fac. Agric., Yamagata Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, tannase

3P-G039 イネいもち病菌 Maganporthe oryzae 由来新規ヘム含有膜タンパク質の分泌酵母 Pichia pastoris による発現系構築

○本間 陽名[1], 松村 洋寿[1], 鮫島 正浩[2], 五十嵐 圭日子[2], 小川 信明[1], 伊藤 英晃[1], 尾高 雅文[1]
（[1]秋大院・理工, [2]東大院・農生科）
matsumuh@gipc.akita-u.ac.jp

【背景】 糸状菌による植物細胞壁の分解では，近年，酸化還元酵素の働きが注目されている．特にセロビオース脱水素酵素(CDH)は，植物細胞壁の主成分であるセルロースの分解反応において，セルラーゼの生成物阻害を妨げる働きをすることが明らかにされてきた(とか何とか)．CDH の活性には電子伝達が必須であるが，電子伝達パートナーは未だ不明である．本研究ではイネいもち病菌 Magnaporthe oryzae において，CDH の電子伝達パートナーの探索を目的とした．
【結果及び考察】 先行研究が多い担子菌 Phanerochaete chrysosporium 由来 CDH (PcCDH)のヘムドメインのアミノ酸一次配列を用いて，M. oryzae のゲノムデータベースにて BLAST 検索を行い，MGG01225 遺伝子を発見した．MGG01225 遺伝子の N 末端側は PcCDH のヘムドメインと，C 末端側はシトクロム b 561 とそれぞれ高い相同性を示す新規ヘム含有膜タンパク質であると示唆された．分泌酵母 Pichia pastoris にて発現誘導後，得られた菌体はヘムタンパク質に特徴的な赤い色を示した．破砕後の上清を超遠心し得られた沈殿を 1% n-decyl-β-maltopyranoside を用いて可溶化し，超遠心後得られた上清を 12 % SDS-PAGE により解析した結果，アミノ酸一次配列から予想される分子量である約 43 kDa 付近にバンドが確認された．UV-vis スペクトル測定を行った結果，410，527，560 nm にヘム由来の吸収ピークが観測された．以上より，ヘム含有新規膜タンパク質の発現系を構築できたと考えられる．

Construction of Pichia pastoris expression system for novel heme-containing membrane proteins from rice blast fungus Magnaporthe oryzae

○Haruna Homma[1], Hirotoshi Matsumura[1], Masahiro Samejima[2], Kiyohiko Igarashi[2], Nobuaki Ogawa[1], Hideaki Itoh[1], Masafumi Odaka[1]
([1]Grad. Sch. of Sci. and Eng., Akita Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words biomass, heme containg membrane protein, rice blast fungus

3P-G040 麹菌のクチナーゼ様エステラーゼ CutC が示す特徴的な酵素学的諸性質

○小幡 公平, 山岸 純也, 竹内 俊輔, 新谷 智子, 渡部 昭, 新谷 尚弘, 阿部 敬悦, 五味 勝也
（東北大院・農）
katsuya.gomi.a6@tohoku.ac.jp

クチナーゼは植物表面に存在するクチクラ層(クチン)を分解する能力を持つ酵素で，これを分泌する植物病原菌が植物体に感染する際に重要な役割を担っている．また，クチナーゼは天然の脂肪族ポリエステルであるクチンを分解することから，可溶性エステルや長鎖脂肪酸，種々のポリエステルに対しても分解能を有するため，化学反応触媒や油脂成分等の除去酵素として食品・繊維の加工, 洗剤やクリーニングなどの目的で工業的に利用される. 一方, 麹菌 *Aspergillus oryzae* は脂肪族ポリエステルであるポリブチレンサクシネート/アジペート(PBSA)を唯一の炭素源として生育させるとクチナーゼ様エステラーゼであるCutL1 を分泌することが知られており(1)，加えて麹菌ゲノム上にはこの他に *cutL1* の 3 つのホモログ遺伝子(*cutB*，*cutC*，*cutD*)が存在する．これまで本研究室では，これらの遺伝子について高発現株を作製し，精製した酵素を用いて酵素学的諸性質を明らかにしてきた．今回は精製した CutC が示す特徴的な酵素学的諸性質について報告する．
tef1 遺伝子のプロモーターにより *cutC* を高発現する株を作製し，生産させた CutC を精製した．本酵素のエステラーゼ活性を *p*-nitrophenyl butyrate を基質として測定することにより至適温度を決定したところ，4℃であり，それ以上の温度では 30℃までは緩やかに活性は低下し，40℃以上ではほとんど活性を示さなくなった．この活性の温度依存性は，CutC のホモログである CutL1 や CutB とは大きく異なるもので，中温性である麹菌がこのような好冷性を示す酵素を生産することは興味深い．この他，現在解析中である本酵素の温度安定性やポリマー基質における活性についても併せて報告する予定である．

(1) Maeda et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 67, 778－788 (2005)

Novel psychrophilic characteristics of the cutinase-like esterase CutC from Aspergillus oryzae

○Kohei Obata, Jun'ya Yamagishi, Syunsuke Takeuchi, Tomoko Shintani, Akira Watanabe, Takahiro Shintani, Keietu Abe, Katuya Gomi
(Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, cutinase, esterase, cold-active enzyme

3P-G041 好熱性アーキアに存在する色素依存性 L-乳酸脱水素酵素複合体の機能解析

○里村 武範[1,2], 宇野 紘平[1], 角間 真人[1], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大・工, [2]福井大・ライフ, [3]香川大・農, [4]大阪工大・工）
satomura@u-fukui.ac.jp

[緒言]
色素依存性 L-乳酸脱水素酵素（Dye-LDH）は，2,6-ジロロインドフェノールのような人工色素存在下で L-乳酸からピルビン酸への酸化反応を触媒する酵素である．本酵素は，基質である L-乳酸を酸化することにより基質の電子を呼吸鎖電子伝達系へ導入する初発酵素として，細胞内のエネルギー生産に重要な役割を果たしていると考えられている．我々は，超好熱性アーキアのゲノム情報から Dye-LDH をコードしていると予測される遺伝子を見出した. Dye-LDH をコードしていると考えられる遺伝子は，超好熱性アーキアのゲノム内で複数の機能未知遺伝子とクラスターを形成していた．本研究では，Dye-DLDH ホモログの機能同定と機能解析を目的として研究を行った.
[方法・結果]
Dye-DLDH ホモログをコードする遺伝子を含む遺伝子クラスターを好熱性アーキア *Sulfolobus*-大腸菌シャトルベクターへ導入し好熱性アーキア組換えタンパク質発現用ベクターを構築した．構築した組換えタンパク質発現用ベクターを *S. acidocaldarius* にエレクトロポレーションにより導入し，Dye-DLDH ホモログ遺伝子クラスターの発現を行った．その結果，組換えタンパク質の発現に成功した．発現タンパク質を精製し，Dye-DLDH 活性を測定したところ酵素活性を確認することに成功した．また，本酵素は，Dye-DLDH 遺伝子と遺伝子クラスターを形成していた遺伝子群の発現タンパク質と複合体を形成していた．現在，これら複合体を形成するタンパク質の詳細な機能解析を進めている．

Identification and characterization of dye-linked L-lactate dehydrogenase from thermophilic archaea.

○Takenori Satomura[1,2], Kohei Uno[1], Masato Kakuma[1], Haruhiko Sakuraba[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch Eng., Univ. Fukui, [2]Life Sci., Univ Fukui, [3]Fac. Agric., Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech.)

Key words L-lactic acid, thermophilic archaea, dye-linked dehydrogenase, electron transport chain

3P-G042 好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に存在する新規な色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の解析

○角間 真人[1], 里村 武範[1,2], 黒沢 則夫[3], 櫻庭 春彦[4], 大島 敏久[5], 末 信一朗[1,2]
（[1]福井大院・工, [2]福井大ライフ, [3]創価大, [4]香川大・農, [5]大阪工大・工）
satomura@u-fukui.ac.jp

[背景と目的] 色素依存性 D-乳酸脱水素酵素（Dye-DLDH）は FAD を補酵素とし，人工酸化還元色素存在下で D-乳酸からピルビン酸への脱水素反応を触媒する酵素である．我々は，好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* から 2 種類の異なる Dye-DLDH をコードする *stk_06490*，*stk_22950* 遺伝子を見出した．これら 2 種類の Dye-DLDH をコードする遺伝子は，お互いに 31%の相同性しか認められないが，両遺伝子発現産物はともに Dye-DLDH 活性を有していた．しかしながら，これら 2 種類の Dye-DLDH の細胞内での生理的機能は全く不明であり，これらの細胞内での機能に興味が持たれる．そこで，本研究では，*S. tokodaii* に存在するこれら Dye-DLDH の機能解析を行うことを目的とした.
[方法] 2 種類の Dye-DLDH をコードする遺伝子 *stk_06490*，*stk_22950* をそれぞれ *Sulfolobus* 属組換えタンパク質発現用ベクター pSAVex ベクターに導入した．構築した発現用ベクターを宿主である *S. acidocaldarius* SK-1 株に導入した形質転換株を作成し組換えタンパク質の発現，精製を行った．次に，精製酵素について酵素化学的性質の解析を行った.
[結果と考察] 精製酵素の SDS-PAGE の結果より，目的タンパク質が発現，精製されていることが確認できた. 精製できた両酵素の酵素化学的性質の比較を行ったところ，両酵素に大きな違いは認められなかった．現在，これら酵素のさらに詳細な解析を進めている.

Characterization of novel dye-linked D-lactate dehydrogenases from thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*

○Masato Kakuma[1], Takenori Satomura[1,2], Norio Kurosawa[3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Life Sci. Univ. Fukui, [3]Souka Univ., [4]Fac. Agric., Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

Key words dye-linked dehydrogenase, D-lactate, thermophilic archaea

3P-G043 酵素分子密度制御によるバイオ電池用高性能バイオデバイスの構築

○末 信一朗[1,5], 大西 拓[1], 坂元 博昭[2,5], 里村 武範[1,5], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4]
（[1]福井大院・工, [2]福井大テニュアトラック事業本部, [3]香川大農, [4]大阪工大, [5]福井大学ライフイノベセンター）
suyeb10@u-fukui.ac.jp

【緒言】本研究室ではバイオ電池の長期安定化，高出力化を目指して超好熱性アーキア由来 Multicopper oxidase (McoP) をカーボンナノチューブ(CNT)表面へ His-tag を介し配向性を有して固定化することで高出力バイオカソードを構築している．AFM 画像解析から材料表面に固定化された酵素分子は揺動(ゆらぎ)していることが示唆され，電子授受に影響を与えていると考えられる．His-tag を介した配向固定化では，McoP 分子が CNT 上に稠密に配置されており，揺動はある程度制限されていると推定される．そこで CNT 表面にスペーサーを導入し，CNT 表面の酵素分子密度を制御することで，酵素の揺動性を上げ酵素と CNT 間の電子移動効率の向上を目指した．
【実験】スペーサー(1-Pyrenecarboxylic acid)で CNT を修飾することで，カーボンナノチューブ表面の酵素分子密度の異なる MWCNT-McoP 複合体を調製した．複合体はグラッシーカーボン電極に修飾し，3 電極系による電気化学的評価を行った．
【結果・考察】MWCNT-McoP 複合体の酵素活性はスペーサーの有無でそれぞれ 0.08，0.17 units/mg であった．スペーサー導入により，酵素固定化量および密度の制御が可能となった．複合体を修飾した電極の電気化学的評価を行った結果，McoP による溶存酸素の還元開始が+0.45 V 付近より見られた．作製したデバイスを用いて構成した電池の電池出力は，スペーサーの有無により 0.021 及び 0.023 μW/cm^2 であった．これは，MWCNT 表面の酵素分子密度の制御によって，酵素分子の揺動が促進し，酵素分子とカーボンナノチューブ間の距離が近くなり，電子移動効率が向上するものと考えられる．

Construction of high performance biodevice for biofuel cell by control of enzyme density on nano-carbon material

○Shin-ichiro Suye[1,5], Ohnishi Taku[1], Sakamoto Hiroaki[2,5], Satomura Takenori[1,5], Saskuraba Haruhiko[3], Toshihisa Ohshima[4]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Tenure-track, Univ. Fukui, [3]Fac. Agric. Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Technol., [5]Life Sci. Innov. Center, Univ. Fukui)

Key words biofuel cell, biodevice, archaea

3P-G044 特異的タグ付加によるタンパク質の分子シャペロニンへの優先的捕捉

○藤原 伸介, 秀瀬 涼太, 高 楽
（関西学院大・理工）
fujiwara-s@kwansei.ac.jp

【目的】超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の分子シャペロニンは２種類のサブユニット CpkA と CpkB により構成され，CpkA は低温ストレス下，CpkB は高温環境下で発現する(1)．両サブユニットはヘテロオリゴメリック複合体を構成するが，それぞれは単独でも機能する(2)．両シャペロニン分子の一次構造上の違いは C 末端側 20 アミノ酸に顕著に認められ，CpkA では弱疎水性，CpkB では酸性アミノ酸に富む(3)．この領域はタンパク質捕捉に関与しているため，CpkB には塩基性タンパク質の優先的捕捉が考えられた．本研究では配列の異なる塩基性タグを設計し，標的タンパク質に付与し，CpkB への捕捉効率への影響を調べた．
【結果と考察】構造モデリングにより，複数の候補配列から CpkB の C 末端側配列に，親和性向上が期待される塩基性タグを設計した．これらを緑色蛍光タンパク質（GFP）ほか２種類のタンパク質に付与し，CpkB を加えて 75℃で熱処理を行い，残存活性を評価した．CpkB の添加により残存活性の向上がみられ，塩基性タグを付加した場合，全てのタンパク質でさらなる向上が認められた．この効果は酸性タグでみられなかった．次にタグを付加した GFP タンパク質と CpkB を大腸菌で共発現させ，細胞破砕液を 75℃で熱処理し，可溶性画分の残るタンパク質を検証した．塩基性タグを付加した GFP は多くが可溶性画分に残り，タグのない GFP あるいは酸性タグを付加した GFP は可溶性画分から消失した(4)．これらの結果は塩基性タグにより，CpkB への優先的捕捉が行われたことを示唆する．
(1) Gao et al., J.Bacteriol., 179, 2642 (2015) (2) Fujiwara et al., Appl. Environ. Microbiol., 74, 7306(2008) (3) Gao et al., Appl. Environ. Microbiol., 78, 3806 (2012), (4) Gao et al., J. Biosci. Bioeng. (2017) in press

Function of a thermophilic archaeal chaperonin is enhanced by electrostatic interactions with its targets

○Shinsuke Fujiwara, Ryota Hidese, Le Gao
(Sch. Sci. Technol., Kwansei Gakuin Univ.)

Key words archaea, chaperonin, thermophile, *Thermococcus kodakarensis*

3P-E045 *In vitro* 人工代謝経路による L-システイン生産のモデル化と最適化

○花谷 燿平[1], 谷口 博範[1], 岡野 憲司[1], 本田 孝祐[1], 井村 誠[2], 岩切 亮[2]
（[1]阪大院・工・生命先端工, [2]興人ライフサイエンス株式会社）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】L-システインは食品素材や医薬品原料などとして高い商業価値を有したアミノ酸である．我々のグループでは，各種の好熱菌に由来する耐熱性酵素を *in vitro* で組み合わせた人工代謝経路を構築し，これを用いた L-システインの新規製造法を提供することを試みている．本法では，反応液に添加する酵素量を任意に調節することで目的物質の生産速度をコントロールすることが可能となる．本研究では，所定量の酵素存在下で L-システイン生産速度を最大化すべく，人工代謝経路による L-システイン生産速度のモデル化と添加酵素濃度比の最適化を試みたので報告する．

【実験手法・結果】グルコースを出発物質として L-システインを生産可能な 9 つの耐熱性酵素からなる人工代謝経路をデザインし，各酵素の反応速度を可逆反応型ミカエリス・メンテン式で表した．得られた連立常微分方程式を解くことで，各酵素の添加量を入力変数として L-システイン生産速度を算出できるモデルを構築した．次に反応液に添加する酵素の総量に任意の上限を設け，この範囲内で各酵素の濃度比をランダムに割り振ったデータセットを複数発生させた．各データセットを上記の連立方程式に代入し，それぞれの L-システイン生産速度を算出するとともに，生産速度を最大化しうるデータセットを抽出する *in silico* スクリーニングプログラムを作成した．抽出された最適データセット（酵素濃度比）を用いて 0.1 mM グルコースを基質とした L-システインの *in vitro* 生産を実施しところ，得られた生産プロファイルはモデルによって予測されたものと比較的良い一致を示した．現在，本モデルをより高濃度のグルコースを基質とした反応系へと適用すべく，補酵素再生反応の速度等を加味した改良型モデルの構築を進めている．

Modeling and optimization of an *in vitro* metabolic pathway for L-cysteine production

○Yohei Hanatani[1], Hironori Taniguchi[1], Kenji Okano[1], Kohsuke Honda[1], Makoto Imura[2], Ryo Iwakiri[2]
([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]KOHJIN Life Sciences Co.,Ltd.)

Key words *in vitro* metabolic engineering, thermostable enzyme, cysteine

3P-N046 タンパク質熱変性に応答する好熱菌遺伝子の RNA-Seq 解析

○鈴木 宏和[1], 奥村 友太[2], 大城 隆[1]
（[1]鳥取大院・工・化生応工, [2]鳥取大院・持社創生・工）
hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】我々は，好熱菌（*Geobacillus kaustophilus*）細胞を用いた耐熱化変異酵素遺伝子の発生法を研究している．本手法の有用性は，複数の耐熱化変異酵素の創出によって実証されているが，その選別が対象酵素の活性に基づく生育選択圧によるため，そのような選択圧がかけられない多くの酵素については対象にできない．そこで近年では，耐熱化変異酵素の遺伝子を保持した好熱菌細胞を，対象酵素の活性に依存することなく，蛍光レポーター分析のみで選別する新手法の開発にも取り組んでいる．本会では，熱変性タンパク質が好熱菌細胞内に蓄積された際に発現量を変化させる遺伝子の RNA-Seq 解析について報告する．
【実験】過去の研究で得られた非耐熱性酵素（$BSpyrF_A$）と，その耐熱化変異酵素（$BSpyrF_V$）の遺伝子を pGKE75 にクローニングし，pGKE75-$BSpyrF_A$ と pGKE75-$BSpyrF_V$ を得た．本プラスミドを *G. kaustophilus* MK244 に導入し，得られた形質転換体を 55℃および 65℃で培養した．菌体濁度が 1.0 になった時点の細胞から total RNA を精製し，RNA シークエンス解析に供することで，*G. kaustophilus* がもつ全遺伝子の発現量を RPKM 値に基づき定量化した．
【結果】好熱菌を 65℃で培養した場合，$BSpyrF_V$ は活性をもつが，$BSpyrF_A$ はもたない．よって，これらタンパク質を好熱菌細胞内で産生させた場合，$BSpyrF_V$ は 65℃でも安定であるが，$BSpyrF_A$ は概して熱変性していると考えられる．そこで $BSpyrF_V$ もしくは $BSpyrF_A$ を産生する好熱菌を 55℃と 65℃で培養し，その際の遺伝子発現レベルを RNA-Seq を用いて解析・比較したところ，55℃培養においては大差がないにもかかわらず，65℃培養においては発現レベルに差がある遺伝子が複数見出された．これら遺伝子は，耐熱化変異酵素を産生する好熱菌細胞を変異ライブラリーから選別するマーカーとして利用できるかもしれない．

RNA-Seq analysis of thermophile genes in response to protein thermodenaturation

○Hirokazu Suzuki[1], Yuta Okumura[2], Takashi Ohshiro[1]
([1]Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci, Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus kaustophilus*, thermostable enzyme, molecular evolution, screening

3P-G047 好熱菌細胞内で発生した耐熱化変異酵素を蛍光レポーターで検出する

○奥村 友太[1], 大谷 千晶[2], 八木 寿梓[3], 大城 隆[2], 鈴木 宏和[2]
（[1]鳥取大院・持社創生・工, [2]鳥取大・工, [3]鳥取大・工・GSC）
hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】我々は，好熱菌（*Geobacillus kaustophilus*）細胞を用いた耐熱化変異酵素遺伝子の高効率発生法を研究している．本手法の有用性は，複数の耐熱化変異酵素の創出によって実証されているが，耐熱化変異酵素の選別が対象酵素の活性に基づく生育選択圧に依存するため，そのような選択圧がかけられない多くの酵素については対象にできない．そこで近年では，耐熱化変異酵素の遺伝子を保持した好熱菌細胞を，対象酵素の活性に依存することなく，蛍光レポーター分析のみで選別する新手法の開発に取り組んでいる．本研究では，そのための設計した 2 種類の手法（蛍光レポーター直列法と蛍光レポーター融合法）の有用性について検証した．
【実験と結果】これまでの研究で得られた非耐熱性酵素（$BSpyrF_A$）と，その耐熱化変異酵素（$BSpyrF_V$）の遺伝子をモデルにしながら，設計した手法の有効性を検証したところ，蛍光レポーター融合法では，$BSpyrF_V$ をもつ好熱菌においてわずかに高い細胞蛍光強度を示した．蛍光レポーター直列法では，細胞蛍光強度に差異が見られなかったが，翻訳を均一化させる改良により差異を生むことができた．その際の細胞蛍光強度はコドンや培養条件による影響も受けたことから，本方法の確立にはさらなる検証が必須であるが，以上の結果は，蛍光レポーター直列法や蛍光レポーター融合法が実用的なものへと昇華させられる可能性を示している．いずれの手法も未だ検証段階だが，その確立は蛍光フローサイトメトリーによる大規模かつ高速な耐熱化変異酵素の選別を可能にする．さらに好熱菌変異発生法と組み合わせれば，耐熱化変異酵素創出の全工程（変異導入と選別）を全自動化することも可能であり，大きな技術革新に発展することも期待できる．

Development of fluorescence reporter system to identify thermostable enzyme variants generated in the thermophile *Geobacillus kaustophilus*

○Yuta Okumura[1], Chiaki Otani[2], Hisashi Yagi[3], Takashi Oshiro[2], Hirokazu Suzuki[2]
([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci, Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ., [3]GSC, Faculty of Eng., Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus kaustophilus*, thermostable enzyme, molecular evolution, screening

3P-N048 *Streptococcus pyogenes* 由来ストレプトリジン O の大腸菌組換え生産

○角田 洋輔, 北澤 宏明, 川井 淳, 岸本 高英
（東洋紡）
Takahide_Kishimoto@toyobo.jp

【背景と目的】
A 群レンサ球菌は，咽頭炎，扁桃炎などの上気道感染症や猩紅熱など多くの化膿性疾患の原因となることが知られている．その診断方法として，A 群レンサ球菌が産生するストレプトリジン O(SLO)に対する抗体(ASO)価の測定が行われている．検査薬の原料に用いられる SLO は，これまでレンサ球菌を用いて製造されてきたが，生産性が低いため，低コストかつ高品質な SLO を製造することは困難であった．そこで，組換え大腸菌の利用も進んでいるが，大腸菌由来のプロテアーゼにより，SLO が低分子化されることも報告されている．また，SLO は元来，溶血活性を有するため，工業スケールでの製造及び使用時の安全性の観点から溶血活性を欠損させることが望まれていた．そこで，我々は発現宿主由来のプロテアーゼによる分解を受けず，溶血活性を持たない改変型 SLO を高生産することを目指した．
【方法と結果】
プロテアーゼによる分解を防ぎ，溶血活性を欠損させるため，溶血活性に関与している C 末端領域を欠失させた A 群レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来 SLO を発現させる大腸菌発現用プラスミドを構築した．本プラスミドを導入した組換え大腸菌を培養し，各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製を進めたが，プロテアーゼによる分解は見られず，SDS-PAGE にて単一バンドとなった改変型 SLO を調製した．本改変型 SLO の特性を評価したところ，溶血活性試験では活性が検出限界以下に低減されていることを確認した．また，市販の ASO 試薬を用いた競合法による評価の結果，改変型 SLO は全長型 SLO と比較して，タンパク質当たりの抗原活性が向上していることが明らかとなった．さらに，熱安定性を評価したところ，改変型 SLO は全長型 SLO と比較して熱安定性が向上していた．発表当日は，本改変型 SLO の特性に加え，ASO 試薬としてのパフォーマンスも含めて報告予定である．

Production of recombinant Streptolysin O from *Streptococcus pyogenes*

○Yosuke Sumida, Hiroaki Kitazawa, Atsushi Kawai, Takahide Kishimoto
(TOYOBO Co., LTD.)

Key words Streptococcus pyogenes, Steptolysin O, antigen, ASO IVD reagent

3P-G049 カルボキシソーム外殻タンパク質のリクルートに関与する足場タンパク質 CcmN の発現系構築

○大畠 昌也[1], 中村 隆太郎[2], 中口 雄貴[3], 三木 智寛[3], 松村 洋寿[2], 福谷 洋介[3], 野口 恵一[3], 養王田 正文[3], 小川 信明[2], 尾高 雅文[2]
（[1]秋大・理工, [2]秋大院・理工, [3]農工大院・工）
modaka@gipc.akita-u.ac.jp

【緒言】カルボキシソームはシアノバクテリアに広く保存されているタンパク質コンパートメントであり，Riburose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)を内包し，二酸化炭素固定を促進する．カルボキシソームの形成モデルにおいて，CcmN は RubisCO の集合体と外殻タンパク質 CcmK2 に結合することで，殻タンパク質と RubisCO を架橋する役割がある足場タンパク質と考えられている．そのため，CcmN の機能を明らかにすることは，カルボキシソーム形成機構を理解し，利用技術を開発する上で重要である．しかし，これまでは可溶化タグとしてトリガーファクター(TF)を付加した TF-CcmN の解析しか行われていなく，詳細な生化学的性質は明らかになっていない．そこで本研究では，TF を付加していない野生型 CcmN の発現系を構築し TF-CcmN との比較を行った．
【方法】好熱性シアノバクテリア Thermosynechococcus elongates BP-1 由来 CcmN 遺伝子をベクター pET30b または pCold-TF に導入し，野生型 CcmN と TF-CcmN の発現ベクターをそれぞれ構築した．野生型 CcmN と TF-CcmN の組換え体を大腸菌 BL21 (DE3)または BL21(DE3) pLysS で発現させ，超音波破砕後 SDS-PAGE により発現確認を行った．
【結果】SDS-PAGE の結果から，野生型 CcmN と TF-CcmN ともに，予想される分子量にバンドが確認された．現在，発現させた野生型 CcmN と TF-CcmN を精製し，耐熱性の評価実験や外殻タンパク質 CcmK2 との Pull-down assay などで生化学的な性質について解析を進めている．

Expression of CcmN involved in recruitment of carboxysome shell proteins

○Masaya Ohata[1], Ryutaro Nakamura[2], Yuki Nakaguchi[3], Tomohiro Miki[3], Hirotoshi Matsumura[2], Yousuke Hukutani[3], Keiichi Noguchi[3], Masafumi Yohda[3], Nobuaki Ogawa[2], Masafumi Odaka[2]
([1]Fac of Sci. Eng, Akita Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. Eng., Akita Univ., [3]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Univ. Agri. Tech.)

Key words Carboxysome, CcmN

3P-G050 *In vitro* membrane protein synthesis inside a contact droplet for fluorescence based functional assay

○Maie Elfaramawy, Hajime Watanabe, Tomoaki Matsuura
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Membrane proteins (MPs) play important roles in cells, while they hardly have been used in biotechnology applications due to their difficulty in purification and functional assay. In this study, MPs are express by reconstituted *in vitro* protein transcription-translation system (IVTT), which will overcome the drawback of MP preparation from living cells. We developed a method to evaluate the function of synthesized MPs as a fluorescence signal by combining reconstituted IVTT with droplet interface bilayer (DIB), a method to form lipid bilayer by contacting two aqueous droplets with a volume of 2 μL in oil phase containing phospholipids only by ordinary pipets.

We used pore-forming α-hemolysin (AH) from *Staphylococcal aureus*, used as a model MP. The first droplet contained DNA encoding AH, reconstituted IVTT, and fluorescein di-β-D-glucuronide (FDGlcU), a fluorescent substrate of β-glucuronidase (GUS). The second droplet contained GUS. When the droplets were incubated at 37℃ for 2 h, second droplet started to emit green fluorescence, indicating AH synthesis in the first droplet, and nano meter pore formation at the DIB resulting in influx of FDGlcU into the second droplet. Because the aforementioned system consists of only defined components, phospholipid composition and components in the aqueous droplets can be altered easily. We thus believe that the system can be used in various applications including biochemical characterization of various MPs and construction of MP based-biosensors.

***In vitro* membrane protein synthesis inside a contact droplet for fluorescence based functional assay**

○Maie Elfaramawy, Hajime Watanabe, Tomoaki Matsuura
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Droplet interface bilayer, Reconstituted *in vitro* transcription-translation system, Membrane protein, Fluorescence based functional assay

3P-G051 ペプチド転移酵素を用いた機能性アミロイドポリマーの作製

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

【背景と目的】アミロイド模倣材料に関して，アミロイド性タンパク質の凝集関連部位をモチーフにした，10 前後のアミノ酸からなる合成ポリペプチドを用いた報告が多い．しかし，固定する機能性分子の種類によって，アミロイド形成ペプチドのデザインを見直す必要があり，多様なナノマテリアルを調製するにはいまだ困難が多い．本研究では，ペプチド転移酵素の基質ペプチドタグを遺伝子工学的に付与したアミロイド性タンパク質と機能性分子をそれぞれ調製し，ペプチド転移反応を行うことで，アミロイド上に機能性分子を共有結合的に固定した機能性材料を調製することを目的とした．
【方法】アミロイドタンパク質としてトランスサイレチン(TTR)，機能性タンパク質として GFP，ペプチド転移酵素として SortaseA(srtA)を用い，すべて大腸菌タンパク質発現系を構築した．TTR は凝集性の高い variant である V30M, L55P 変異体も作製した．srtA の基質タグとして，Gly5 を GFP の N 末端に融合し，LPETGG を TTR の C 末端に融合した．TTR 2g/L を pH4.4 のリン酸バッファーに溶解し，37 度 72 時間のインキュベートでアミロイド化を行った．得られたアミロイドは遠心分離で回収後洗浄の後，GFP を添加し srtA による転移反応を行った．
【結果と考察】ThT 分析によるアミロイド化の評価を行ったところ，TTR L55P は基質タグ融合の影響なくアミロイド繊維形成が行われた．TEM 観察においても繊維凝集体の形成が確認された．さらに，基質タグ融合の TTR L55P アミロイドにおいて，srtA 存在下で Gly5-GFP の固定化が確認された．このとき，GFP の蛍光スペクトルは固定前と変化がないことから，固定化による失活は認められなかった．したがって，TTR L55P はペプチド転移酵素を用いた機能性アミロイドポリマー作製の骨格として適していることが示された．

Preparation of functional amyloid polymer using peptidyl transferase.

○Masafumi Sakono, Tatsuki Ohshima
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

Key words amyloid fibril, peptidyl transferase

3P-G052 Q-body 化に適した抗体選抜のための新規抗体結合プローブの構築

○塚原 知也[1], 三宅 千絢[2], 董 金華[3], 北口 哲也[3], 上田 宏[3]
（[1]東工大院・生命理工, [2]東工大院・総理工, [3]東工大・化生研）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景と目的】 Quenchbody (Q-body) は抗体の Fab 断片に部位特異的に蛍光色素を修飾した免疫センサーであり，抗原添加後 Fab の Trp 残基による蛍光色素のクエンチが解除され蛍光を発するという原理に基づいた簡便迅速かつ高感度な測定が可能である．しかし，新規抗体の Q-body 化には時間と労力を要することが課題であった．そこで今回，抗体結合タンパク質 Protein M（PM）に蛍光色素を修飾したプローブを抗体断片と結合させた際の蛍光輝度変化を測定することで Q-body に適した抗体が判別できないか試みた．さらに作製した PM プローブを天然抗体と混合することで，その抗体を Q-body として機能させることも目的とした．

【方法】PM の N 末側にチオレドキシン(Trx)，C 末側に蛍光修飾用システイン残基(Cys)をもつ短いタグを付加したプローブタンパク質の，Trx に含まれるシステイン(Cys)残基の有無，抗原結合を阻害する可能性のある PM C 末 23 アミノ酸の有無が異なる計 4 種類のコンストラクトを pET32a ベクターに組み込んだ．大腸菌 (SHuffle T7 express lysY) を形質転換しタンパク質を発現させ，精製後に蛍光色素 TAMRA 又は ATTO520 を修飾し精製し，PM プローブに抗体，抗原を加えたときの蛍光スペクトル変化を分光蛍光光度計で観察した．さらに PM プローブ発現ベクターの C 末側に EGFP を付加し，同様にタンパク質発現，蛍光色素修飾，蛍光測定を行い FRET による定量性の向上を試みた．

【結果】4 種類のタンパク質のうち，Trx の Cys なし C 末領域ありの PM プローブにおいて，抗オステオカルシン(BGP) 抗体 KTM219 の Fab / IgG による蛍光強度の顕著に減少した．また，抗原添加による蛍光強度の回復が見られたことから，PM プローブが Q-body 化可能な抗体の判別に適用可能なことが判明した．また，PM-EGFP プローブでは EGFP 及び TAMRA の特有のスペクトルが観察できた．

Development of antibody-binding probe for evaluation of Q-body suitability

○Tomoya Tsukahara[1], Chihiro Miyake[2], Jinhua Dong[3], Tetsuya Kitaguchi[3], Hiroshi Ueda[3]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [2]Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech, [3]Chem. Life Sci. Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

Key words Q-body, fluorescence, Protein M

3P-G053 発光酵素融合クエンチ抗体を用いた生物発光抗原検出系の構築

○高橋 里帆[1], 大室 有紀[2], 上田 宏[2]
（[1]東工大院・生命理工, [2]東工大・化生研）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景】クエンチ抗体 (Q-body) は，抗体の抗原結合部位近傍に蛍光色素を部位特異的に修飾した免疫センサーである．抗原非存在下では抗体内部に存在するトリプトファン残基により蛍光色素の蛍光が消光 (Quench) され，抗原結合により色素が抗体外に放出されるため消光が解消，蛍光を発するという原理に基づき，抗原を検出できる．しかし検出には励起光が必要であり，Q-body の量が変化すると測定値も変化する．本研究では，発光強度の強い luciferase の一種である Nanoluc (Nluc) を Q-body に融合させ，生体に有害な励起光を必要としない bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 原理に基づく，発光色変化を伴う抗原検出系の構築を行った．
【方法】オステオカルシン (BGP) を認識する一本鎖抗体 scFv の N 末端側に，Nluc (171 アミノ酸) を融合させ，大腸菌で発現させ，精製を行った．そして各種マレイミド修飾蛍光色素で修飾しさらに精製を行った後，発光スペクトルを測定した．
【結果】Nluc 融合 Q-body に，抗原として BGP C 末ペプチドを加えると BRET 効率が向上し，抗原濃度依存的に蛍光色素由来の発光ピークが増大した．特に色素として ATTO520 を用いた場合，色素由来の発光ピークが Nluc 由来ピークを上回り，さらに発光色変化を肉眼で観察できた．現在，骨芽細胞からの BGP 産生の発光検出を試みている．

Construction of bioluminescent immunoassay by luciferase-fused Quenchbody

○Riho Takahashi[1], Yuki Ohmuro[2], Hiroshi Ueda[2]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [2]Chem. Life Sci. Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

Key words Q-body, bioluminescence

3P-G054 細胞内酵素活性の可視化によるアシル-(アシル-ACP)還元酵素の進化分子工学

○林 勇樹, 新井 宗仁
（東大院・総合文化）
arai@bio.c.u-tokyo.ac.jp

微生物の生成するアルカン（軽油相当）は石油を代替するバイオエネルギーの 1 つとして注目されている．ラン藻では，アシル-（アシル-ACP）還元酵素（AAR）が脂肪酸合成経路の中間産物である脂肪酸アシル-ACP を基質として脂肪酸アルデヒドを生成し，続いて，アルデヒド脱ホルミル化酸素化酵素（ADO）がアルカンへと変換する．しかし，これら 2 つの酵素活性は非常に低いため，微生物を用いたアルカン合成の実用化にはこれらの酵素の高活性化が必要である．タンパク質の高活性化を行う手法として進化分子工学が挙げられる．人工的な変異と選択を高速で繰り返すことで，目的の機能（活性）を有するタンパク質を創出する手法である．より高活性な変異体を取得するためには，多数の変異体の活性を迅速に評価・選択する必要がある．現在，AAR の活性を測定するには，大腸菌で AAR と ADO を共発現し，AAR により生成された不安定なアルデヒドを ADO によってアルカンへと変換した後，大腸菌破砕液から有機溶媒でアルカンを抽出し，ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）により定量分析することで求められる．1 つの変異体の活性を調べるためにはこうした多段階のプロセスを要するため，時間と労力を伴う．そこで，当研究室では大腸菌内で発現した AAR の活性を外部から可視化できる全く新しい評価系を構築した（昨年度年会にて報告）．本検出法を用いることで多数の AAR 変異体の活性をコロニー（もしくは液体培地）の状態で非侵襲的，かつリアルタイムに同時に評価することができる．本会では，本評価法を用いた進化分子工学による AAR の高活性化について報告する．

Directed evolution of an acyl-(acyl-ACP) reductase by visualizing *in vivo* enzyme activity

○Yuuki Hayashi, Munehito Arai
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words protein engineering, Directed evolution, alkane biosynthesis, visualization

3P-G055 マレートデヒドロゲナーセの部位特異的変異による比活性向上および構造的解釈

○下澤 勇弥, 西矢 芳昭
（摂南大院・生命科学）
nisiya@lif.setsunan.ac.jp

マレートデヒドロゲナーゼ（MDH）は，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）測定用検査薬に含まれる酸化還元酵素である．AST は肝機能の低下に伴い血中に漏れ出る逸脱酵素として知られており，定量することで肝機能評価の指標となる．
われわれは昨年度の本学会にて，AST 測定用として市販酵素の中でも *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH（gs-MDH）が最も優れていることを，AST 測定シミュレーターを作成し実証した．そこで，活性中心の立体構造を基に部位特異的アミノ酸置換変異をデザインし，安定性や基質親和性などの gs-MDH の優れた点を保ちつつ，実用温度での比活性の向上を試みた．
ドッキングシミュレーションにより，gs-MDH の 228 番目の Ser 側鎖は基質であるオキサロ酢酸（OAA）に非常に近く，立体障害が予測された．また，86 番目の Arg は基質との相互作用に重要な残基であることが，これまでの研究で明らかになった．それらの情報を基に変異体を作成した結果，野生型 gs-MDH よりさらに比活性の高い変異体を得ることができた．各変異体の酵素特性と，AST 測定用としての有用性についても報告する．

Improvement of specific activity of malate dehydrogenase by site-diected mutagenesis and its structural interpretation

○yuya Shimozawa, Yoshiaki Nishiya
(Setsunan Univ. Life Sci)

Key words Malate dehydrogenase, *Geobacillus stearothermophilus*, Specific avtivity, mutagenesis

3P-G056 乳酸オキシダーゼのタンパク質工学によるマンデル酸オキシダーゼへの改変

○西矢 芳昭, 比留田 美咲
（摂南大院・生命科学）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【目的】 *Enterococcus* 属由来乳酸オキシダーゼ（LoxL）は，乳酸測定用として血液検査やバイオセンサに活用されている．われわれは，立体構造モデルを基に LoxL の基質特異性を改変する変異をデザインすることで，本来反応性の乏しい基質に反応する変異酵素の開発を目指している．野生型 LoxL の L-マンデル酸オキシダーゼ活性は著しく低く，L-乳酸オキシダーゼ活性の 10^{-4} 以下である．そこで，LoxL 構造モデルと L-マンデル酸とのドッキングシミュレーションを行い，野生型 LoxL と L-マンデル酸との間に生じる立体障害を確認，部位特異的変異による立体障害の軽減を試みた．
【方法および結果】 活性中心とその周辺をターゲットに，立体障害を軽減すると予想される三重変異をデザインした．Inverse PCR により各変異体を作成し，精製後，L-乳酸オキシダーゼ活性および L-マンデル酸オキシダーゼ活性を測定した．その結果，野生型では L-マンデル酸に対する比活性が極微少（L-乳酸の 6.6×10^{-5}）で，kinetic parameter を算出できなかった．これに対して三重変異体は，L-マンデル酸オキシダーゼ活性が L-乳酸の約 10 倍に向上した．三重変異体の L-乳酸に対する比活性は微少で，kinetic parameter を算出できなかったが，L-マンデル酸に対する K_m 値は 0.17mM と見積もられた（野生型 LoxL の L-乳酸に対する K_m 値は 1.0mM）．以上より，活性部位周辺のポケットを広げ，嵩高い基質との立体障害を軽減することで，L-マンデル酸の L-乳酸に対する活性比率が大幅に増加することが分かった．
【結論】 嵩高い基質に対してより高い反応性を示す変異をデザインし，効果を確認することができた．今後は，さらに効果的，効率的な改変とその応用を目指したい．

Improvement of substrate specificity of *Enterococcus* lactate oxidase using protein engineering

○Yoshiaki Nishiya, Misaki Hiruta
(Grad. Sch. Life Sci., Setsunan Univ.)

Key words lactate oxidase, substrate specificity, mandelate, biosensor

3P-E057 アスベストのバイオイメージングと細胞毒性解析

○藤原 暢哉, 石田 丈典, 舟橋 久景, 池田 丈, 廣田 隆一, 黒田 章夫
（広島大院・先端物質）
akuroda@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】アスベストは微細な繊維状鉱物で，肺組織内に蓄積すると悪性中皮腫や肺がんなどを引き起こすことが知られている．このガン化の過程にはマクロファージが関わっていると考えられている．マクロファージがアスベストを取り込むと ROS が誘導され，炎症性サイトカインである IL-1β や IL-18 などが産生する．これら ROS を含む酸化的ストレスにより細胞がガン化すると考えられている．以上のようにマクロファージが関与するガン化の過程には，まず，アスベストを取り込む段階と，取り込んだアスベストにより ROS が産生される段階がある．そこで，本研究では蛍光標識したアスベストを用いて，まず，マクロファージの貪食作用をリアルタイムで観察し，次に，ROS 産生を観察することで，アスベストの細胞毒性について解析を行った．
【方法・結果】まず，アスベストに対するマクロファージの貪食作用を観察した．観察するに当たり，蛍光修飾したアスベスト結合タンパク質を用いてアスベストを蛍光標識した．そのアスベストをマクロファージ培養液に添加し，貪食作用の蛍光タイムラプスイメージングを行った．その結果，マクロファージがアスベストを取り込む様子をリアルタイムで観察することに成功し，特徴的な挙動を示す細胞をいくつか観察することもできた．また，共焦点レーザー顕微鏡を使用し，細胞内部にアスベストが取り込まれていることを確認した．次に，ROS 検出試薬である DCFH-DA を用いてマクロファージの産生する ROS の評価を行った．その結果，アスベストを添加することでより多くの ROS を産生することがわかった．

Bioimaging of asbestos and cytotoxicity analysis

○Nobutoshi Fujihara, Takenori Ishida, Hisakage Funabashi, takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words bioimaging, asbestos, phagocytosis

3P-G058 CutA1 をリガンド足場として利用した生体分子間相互作用高感度検出のための分子デザイン

○伊達 弘輝[1], 石田 尚之[1], 今村 維克[1], 清瀬 紀彦[2], 宮崎 誠生[2], 今中 洋行[1]
（[1]岡山大院・自科, [2]アーク・リソース（株））
imanaka@okayama-u.ac.jp

目的：生体分子間相互作用の検出において，バイオ分子の固体表面への固定化は重要な基盤技術の一つとして挙げられる．我々のグループでは，表面親和性ペプチドタグを介した固体表面への生体分子の機能的固定化配向制御技術の開発を進めてきた．本研究では，ペプチドタグに加え，超好熱菌由来タンパク質 CutA1 を固体表面との直接的な相互作用を緩和するクッションならびに足場タンパク質として利用し，リガンドの固定化後の機能維持ならびに相互作用検出の高感度化を図ることを目的とした．
方法・結果：リガンドモデル分子として Strep-TagII (STII: WSHPQFEK)(ペプチド)および VHH 抗体（タンパク質）を用い，様々にデザインした各種リガンドバイオ分子の発現ベクターをそれぞれ構築後，発現・精製を行った．生体分子間相互作用は，金表面上では水晶振動子マイクロバランス法(QCM)を用いて検出した．その結果，ペプチド-タンパク質間相互作用については，アナライト分子である Streptavidin(SA)を添加した際，CutA1 内にフレキシブルリンカー，EK-coil をスペーサーとして挿入し，STII を束縛することで相互作用検出量が顕著に向上した．また，N 末端あるいは C 末端にそれぞれ STII を遊離状態で連結した場合，相互作用直後に SA の解離が見られた.一方，STII を両末端に連結することで解離が抑制されるとともに相互作用検出量が格段に向上した．これらのことから，リガンドの高密度化により SA との多点結合が生じたことが示唆された．タンパク質間相互作用では，分子デザインにおいて CutA1 内に VHH を挿入した場合，可溶化率の低下がみられたが，C 末端に連結することで，VHH の構造変化を抑制できた．そこで両末端への連結による高密度化が相互作用に及ぼす影響も検討した．

Molecular Designs Utilizing Hyperstable CutA1 as a Scaffold for Highly Sensitive Biomolecular Interaction Detection System

○Koki Date[1], Naoyuki Ishida[1], Koreyoshi Imamura[1], Norihiko Kiyose[2], Nobuo Miyazaki[2], Hiroyuki Imanaka[1]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ., [2]ARK Resource Co. Ltd.)

Key words affinity peptide, immobilization, biosensing, vhh antibody

3P-G059 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の機能による GST 固定シリカ粒子の構築

○小林 大起[1], 西 美智佳[2], 天野 太郎[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]鳥取大産学）
arima@muses.tottori-u.ac.jp

【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 条件下でケイ酸をグラシン溶液に添加すると，速やかにシリカ粒子が形成される．このとき，グラシンは形成されたシリカ粒子に埋め込まれるため，遺伝子工学の手法により別のタンパク質をグラシンと融合してシリカ粒子を形成させることで，タンパク質をシリカ粒子に固定化することが可能であると考えられた．これまでに，緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合することで，GFP 固定化シリカ粒子の形成が認められた（2016 年度生物工学会大会）．本研究では，酵素タンパク質への利用可能性を検証するため，グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）を融合し，GST のシリカへの固定化を試みた．
【方法及び結果】GST をグラシンと融合したタンパク質（GST-グラシン）の大腸菌による発現系を構築し，得られた GST-グラシンをグルタチオンアフィニティーカラムで精製した．GST-グラシンは，グラシンと同等のシリカ粒子形成能を示した．シリカ粒子形成後における GST-グラシン溶液中の GST 活性は，形成前と比較して減少していること，得られたシリカ粒子が GST 活性を保有していることを確認した．これらの結果から，GST とグラシンを融合し，シリカ粒子を形成させることにより，触媒機能を保持した状態での GST 固定シリカ粒子の構築が可能であることが明らかとなった．現在，GST の固定化効率の算出や固定化条件の最適化を行っている．また，シリカ粒子への固定化による GST 活性の低下や基質親和性，安定性等への影響が懸念されるため，固定化 GST の諸性質や安定性を評価している．

Construction of GST immobilized silica particles by the function of silica particle formation promoting protein “glassin”

○Hiroki Kobayashi[1], Michika Nishi[2], Taro Amano[1], Tomohiro Bito[2], Katsuhiko Shimizu[3], Jiro Arima[2]
([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]Org. Reg. Ind. Acad. Coop., Tottori Univ.)

Key words *Euplectella*, Immobization of protein, Silica particle formation promoting protein

3P-H060 微生物触媒の固定化を目指したナノファイバー蛋白質 AtaA の小型化

○青木 壮太[1], 吉本 将悟[1,2], 石川 聖人[1], 堀 克敏[1]
（[1]名大院・工, [2]名大・VBL）
khori@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
高接着性グラム陰性細菌 Tol 5 由来のナノファイバー蛋白質 AtaA を産業的に有用な微生物の細胞表層に生やすことで，様々な材料表面に対して強固に微生物を固定化することができる．この固定化法はゲル包括などの既存の固定化法の課題を解決すると期待されている．しかし一部のグラム陰性細菌では *ataA* 遺伝子を導入してもうまく発現できず AtaA の接着性を付与できないことが課題である．我々は AtaA が 3630 アミノ酸残基からなる巨大なポリペプチドのホモ三量体であることに着目し，AtaA 分子を小さくして発現負荷を減らすことで異種微生物での AtaA の発現量が向上するのではないかと考えた．
そこで本研究では AtaA の構成ドメインを部分欠損した変異体（IFD）を構築し，その接着性を評価することで接着機能ドメインを探索し，その知見を元に固定化能力を維持したまま AtaA を小型化することを目的とした．
【方法】
IFD の構築は AtaA の各ドメインをつなぐコイルドコイル構造の周期性を利用し，AtaA の三量体構造を崩さないように欠損領域をつないだ．構築した IFD は Tol 5Δ*ataA* 株に導入し，菌体表層に発現させて機能評価に用いた．培養した IFD 発現株を純水で洗浄後，無機塩バッファーで OD_{660}= 1.0 に合わせた．ポリウレタン担体が入ったフラスコに菌懸濁液を分注し，115 rpm で振とうした．上清 OD_{660} の変化量から各 IFD の接着機能を評価した．
【結果と考察】
欠損領域が異なる 26 種の IFD を構築し，その接着機能評価を行った．構築した IFD はその全てがフローサイトメトリー，CLSM によって菌体表層に正しく提示されていることを確認した．26 種の IFD の機能評価結果から，AtaA が微生物細胞の固定化に必要な接着力を発揮するには，長さも重要な因子であることが示されたが，全長の半分以下の小型化に成功した．

Miniaturization of the nanofiber protein AtaA for immobiazation of microbial catalysts

○Sota Aoki[1], Shogo Yoshimoto[1,2], Masahito Ishikawa[1], Katsutoshi Hori[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]VBL, Nagoya Univ.)

Key words *Acinetobacter* , immobilization, microbial catalysis

3P-H061 配列情報を利用した SUMO2 変異体ライブラリからの HER2 親和性選択

○牧野 祥嗣, 河上 佳奈, 伊藤 伸哉
（富山県大・工）
makino@pu-toyama.ac.jp

【目的】乳がんの 20～25％を占める HER2 陽性乳がんでは，細胞表面に HER2 が過剰に発現し，大量の細胞増殖シグナルが発生している．抗体医薬ペルツズマブは，HER2 に結合してその二量体化を抑制し，細胞増殖シグナルの発生を抑制する．我々は，微生物で組換え生産でき，高価な抗体医薬の代替えとなるようなタンパク質の開発を進めている．本研究では，ペルツズマブと同様の HER2 二量体化の抑制機能を持つような代替タンパク質の創出を見据え，まず HER2 に親和性を持つ代替タンパク質の選択を試みた．
【方法】我々は既に，SUMO2（small ubiquitin-related modifier 2）の分子表面上 5 アミノ酸残基のランダムアミノ酸置換体を提示する，ファージディスプレーライブラリを構築し利用している．まず，HER2 タンパク質と本ライブラリを混合し，親和性選択を行った．次に，選択された遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に解析した．その後，オリジナルライブラリと比較して高頻度に見いだされた遺伝子について，組換えタンパク質の調製，親和性解析を行った．
【結果】親和性選択は，NNK コドン置換ライブラリ (Lib1)，NNB コドン置換ライブラリ (Lib2) の 2 ライブラリを用いて行った．続くシーケンス解析により，HER2 存在下での親和性選択特異的に高頻度に出現する配列があることがわかった．そのような遺伝子配列を Lib1 から 12 種類，Lib2 から 17 種類選び，組換えタンパク質を調製した．ELISA，Biacore による親和性解析を行ったところ，少なくとも 1 つのクローンで HER2 への親和性によるシグナルが認められた．

Selection of SUMO2 mutants with HER2 affinity using amplicon sequencing

○Makino Yoshihide, Kana Kawakami, Nobuya Itoh
(Fac. Eng., Toyama Pref. Univ.)

Key words protein engineering, phage display, next-generation sequencing, affinity selection

3P-H062 アミロイド β（Aβ）凝集体の形態に与える Aβ 凝集阻害物質の効果の 3D 観察

○楊 卓朗, 板田 鉄平, 大柄 俊貴, 上井 幸司, 徳楽 清孝
（室工大・応理化）
tokuraku@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景と目的】アルツハイマー病（AD）は脳内でアミロイド β（Aβ）というタンパク質が凝集・蓄積することで発症するといわれていることから，Aβ の凝集を阻害する物質が AD の予防や治療において重要な鍵となる．最近我々は量子ドットによる Aβ 凝集体のリアルタイムイメージング法，およびこの手法を応用した Aβ 凝集阻害物質の微量ハイスループットスクリーニング（MSHTS）法を開発した．この MSHTS 法を用いて，香辛料や海藻から Aβ 凝集阻害物質のスクリーニングを行ったところ，シソ科香辛料に含まれるロスマリン酸（RA）や海藻熱水抽出物に含まれる多糖類が Aβ 凝集に影響を及ぼすことが明らかになった．本研究では，溶液中で凝集体の 3D 観察が可能であるという本イメージング法の特長を活かし，海藻熱水抽出物や RA が Aβ 凝集体形成にどのように影響するのか，溶液中で直接観察した．
【方法】量子ドット(QD)で蛍光標識した 30 nM QDAβ と未標識の 30 μM Aβ を凝集阻害物質と共に混合し，24 h，37℃でインキュベートした．これを蛍光顕微鏡で観察し，画像解析により凝集体量を定量化，凝集阻害活性の指標となる EC50 を決定した．同時に，Aβ 凝集体の形状を共焦点レーザー顕微鏡で観察し，阻害物質が凝集体の形態にどのように影響するか 3D 観察した．
【結果と考察】海藻熱水抽出物の添加は Aβ 凝集体の厚みを増したが，熱水抽出物を事前に超音波で処理することで Aβ 凝集体の厚みが減少することが明らかになった．このことから多糖類の線維構造が凝集体の沈着を防ぐことが出来ることが示唆された．また RA は，60 μM 以上で Aβ の凝集を阻害したが，凝集の阻害が見られない 0.48 μM の低濃度においては凝集体の束化や沈着を抑制することで疎な凝集体を形成することが明らかになった．

3D observation of the effect of Aβ aggregation inhibitors for morphology of Aβ aggregates

○Takuro Yo, Teppei Itada, Toshiki Ogara, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku
(Dept. Appl. Sci. Muroran Inst. Technol.)

Key words Alzheimer's diease, amyloid beta aggregation, 3D observation

3P-H063 腫瘍免疫応答の活性化をモニタリングする抗体検査診断薬の標準化

○二見 淳一郎[1], 丸山 悠[1], 新土居 奈緒美[1], 大川 裕也[1], Ahmad Hannaneh[1], 勝河 祐希[2], 吉岡 実咲[2], 本荘 知子[1], 木下 理恵[3]
（[1]岡山大院・自科, [2]岡山大・工, [3]岡山大院・医歯薬）
futamij@okayama-u.ac.jp

腫瘍局所の免疫は抑制状態にあるため，免疫チェックポイント阻害剤等で「腫瘍免疫応答の活性化」を誘導する治療法は極めて有望である．しかし腫瘍の抗原性や免疫応答は個人差が大きく，長期間穏やかに効く例もあり，腫瘍免疫応答を正確にモニタリングできる診断薬が治療法の選択や創薬において強力なツールとなる．腫瘍免疫応答が活性化すると，がん細胞内に含まれるがん抗原に対する複数の抗体価が上昇する Antigen-spreading が誘導されるため，この抗がん抗原抗体は治療効果を反映するバイオマーカーとなる．我々はがんと精巣に限局した発現を示す Cancer-Testis(CT)抗原に注目しているが，現時点で 156 種類のファミリーが存在し，エピトープ配列も患者によって異なることから，全長抗原の網羅的調製が必要である．大半の CT 抗原は不安定で不溶化しやすい物性であるため，Cys 残基に対する S-カチオン化法を用いて可溶化し，Multi-plex 磁気ビーズを用いてごく微量の血清から抗体価を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．本法を用いてがん治療の臨床検体を測定すると，臨床経過に極めて相関する抗体価の変動が観察されており，コンパニオン診断薬としての実用化が見えてきた．現在，抗原固定化ビーズの品質チェックを可能とするため，自家製陽性コントロールを得るためウサギに CT 抗原を免疫して得た血清で解析を進めている．これまでの解析の結果，免疫する抗原として S-カチオン化抗原をそのまま使用した場合に極めて良好に陽性コントロール抗血清が調製できることを見出しており，診断薬の定量性や検出感度を保証するシステム整備が進んでいる状況である．本発表では MUSCAT-assay の原理と，診断薬の可能性についてご紹介したい．

Standardization of antibody detection system for monitoring antitumor immune response

○Junichiro Futami[1], Haruka Maruyama[1], Naomi Niidoi[1], Yuya Ohkawa[1], Hannaneh Ahmad[1], Yuki Katsukawa[2], Misaki Yoshioka[2], Tomoko Honjo[1], Rie Kinoshita[3]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ., [2]Fac. Eng., Okayama Univ., [3]Grad. Sch. Med. Dent. Pharm, Sci., Okayama Univ.)

Key words protein engineering, Cancer immunology, companion diagnosis, antibody

3P-H064 新規ポリγ－グルタミン酸誘導体の製造方法とその物性評価

○丸山 裕慎, 栗田 修, 佐合 徹, 梅谷 かおり, 苔庵 泰志, 山岡 千鶴
（三重・工業研）
maruyh00@pref.mie.jp

・背景と目的
Poly - γ - glutamic acid（以下 PGA）は L－もしくは D－glutamic acid を構成単位とするポリマーである．PGA は生体適合性に優れ，かつ保湿性や増粘性など多くの特性を持つため，食品から化粧品まで幅広い用途で利用されている．
かねてから，PGA の機能性は分子量に依存することが知られており，その分子量の調整は複雑な工程を経て生産されている．このことから，本研究ではより簡略化した方法で新たな機能を持った PGA 誘導体の開発を目的とし，新規 PGA 誘導体の製造及び同誘導体の物性評価を行った．

・方法
液体培地中で納豆菌（*Bacillus subtilis*）により PGA を生成し，その培地にメタリン酸ナトリウムまたはメタリン酸カリウムを添加しリン酸化を行い，リン酸化 PGA 誘導体を得た（以下 J-5，J-6）．未修飾 PGA（以下 J-1）と当該リン酸化 PGA 誘導体について赤外分光光度計（FT-IR）等で分析し，リン酸修飾状況について確認した．更に，同誘導体について水和性及び粘性を評価し，円偏光二色性（CD）測定等から，同誘導体の立体的な二次構造についても解析した．

・結果と考察
J-5 及び J-6 は J-1 に比べ，水に溶けやすいことを確認した．また，粘性の測定結果から，J-5 及び J-6 は J-1 に比べ粘性が低下しており，特に J-5 において，粘性の低下が顕著である等の特性を確認した．
CD 測定等によるリン酸化 PGA 誘導体の立体的な二次構造の解析結果から，J-5 及び J-6 は PGA 分子内へのリン酸基の導入により分子の凝集が引き起こされていることが示唆され，特にメタリン酸ナトリウムを添加した J-5 でより凝集していることが示唆された．
これらのことから，PGA にリン酸基を導入することで，PGA の分子量を調整することなく，PGA とは異なる物性を持った PGA 誘導体を製造できることが分かった．

Production of phosphorylated poly-γ-glutamic acid derivative from *Bacillus subtilis* (natto) and its physicochemical evaluation

○Hironori Maruyama, Osamu Kurita, Toru Sago, Kaori Umetani, Yasushi Kokean, Chizuru Yamaoka
(Mie Pref. Industrial Res. Inst.)

Key words poly-gamma-glutamic acid, phosphorylation, viscosity

3P-N065 サツマイモ焼酎に含まれる成分の育毛活性

○章 超, 河野 邦晃, 岩井 謙一, 髙瀬 良和
（霧島酒造）
zhang_chau@kirishima.co.jp

【背景と目的】 サツマイモ焼酎はサツマイモを主原料とした本格焼酎であり，高級アルコール，脂肪酸エステル，モノテルペンアルコール等の成分を含んでいる．サツマイモ焼酎には自律神経に働く香り成分であるリナロール等が含まれ，ストレスを軽減させる作用が報告されている．また，サツマイモ焼酎の香りが血栓を溶解する酵素を活性化させることも報告されている．これらのストレス改善効果や血行促進効果等が毛髪活性に繋がり，育毛効果が期待される．本研究では，焼酎成分の育毛メカニズム及び育毛活性成分を解明することを目的とした．
【方法と結果】 サツマイモ焼酎原酒を冷却し，表面に浮いた物質を採取して液液分離し，油脂成分 (焼酎油)を得た．供試試料は焼酎油の凍結乾燥したものとした．ヒト毛乳頭細胞を用いた細胞賦活試験は血管内皮増殖因子 VEGF 産生促進効果が認められた．C3H 系マウスを用いた育毛促進作用試験では育毛促進作用が確認された． 活性成分は GCMS によりパルミンチン酸エチル，リノール酸エチル，α-リノレン酸エチルと同定された．
(1) Kwack, M.H., et al, *Journal of Dermatological Science*, 62(3), 154-159 (2011)
(2) Müller-Röver S, et al, *J Invest Dermatol*. 117, 3-15 (2001)

Hair growth activity of ingredients in the sweetpotato *shochu*

○Cho Sho, Kuniaki Kawano, Ken-ichi Iwai, Yoshikazu Takase
(Kirishima Shuzo Co., Ltd.)

Key words Sweetpotato *shochu*, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fatty acid ester

3P-H066 Subcritical water extraction of polyphenols from fermented soybean curd residue with *Ganoderma lucidum*

○Yuchen Zhao, Hongyi Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

A large amount of soybean curd residue (SCR) rich in protein, carbohydrate and polyphenol has been produced annually as food waste from soybean food production processes such as tofu or soybean milk. In Japan, the total amount of food industry waste is about 4.9 million tons, among which about 13.5% is SCR. Traditional treatment methods of waste SCR are burning or landfilling, thus a great amount of proteins, carbohydrates and polyphenols are wasted. On the other hand, *Ganoderma lucidum* is a genus of polypore mushrooms that grow on wood. As a traditional herbal medicine widely used in Asia, especially in China, Korea and Japan, *Ganoderma lucidum* has been reported to have beneficial effects on human health. Previous studies indicate that more than 400 bioactive compounds have been isolated and identified in *Ganoderma lucidum*, and polyphenols are one kind of them usually contained and known to have antioxidant activity. Recently, an environment-friendly extraction method, subcritical water technology has been attempted for various bioactive compounds extraction with high efficiency and cost-effectiveness. In this work, waste SCR was used as solid media to ferment with *Ganoderma lucidum*, and then the optimization of subcritical water extraction of polypheonls from the fermented SCR was carried out to establish a new way to reuse SCR more efficiently.

Subcritical water extraction of polyphenols from fermented soybean curd residue with *Ganoderma lucidum*

○Yuchen Zhao, Hongyi Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words Soybean curd residue, *Ganoderma lucidum*, Polypheonls, Subcritical water extraction

3P-H067 β-1,3-グルカン合成阻害剤処理により *Candida albicans* から遊離する乳化物質の解析

○根路銘 伸介, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

抗真菌薬の開発は，細胞構造が真菌とヒトで類似していることから選択毒性の点で難しい．使用可能な薬剤は限られており，耐性菌の出現からも新たな薬剤が求められている．我々は，酵母を用いてヒトにはない真菌特有の構造体である細胞壁の研究を進めてきた．これまでに，パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や病原性酵母 *Candida albicans* の細胞壁を Zymolyase 処理することにより，乳化物質が細胞から遊離する現象を見いだした．さらに，浸透圧保護下で β-1,3-グルカンの合成阻害薬 micafungin を添加して培養することにより培養上清に乳化活性を見いだした．昨年度の本大会では，これらの結果から細胞壁に作用する化合物の新たなスクリーニング法として乳化現象を指標とすることを提案した．
本研究では，*C. albicans* で観察された乳化現象の要因を明らかにするため，micafungin 処理により細胞から遊離する乳化物質の同定を進めている．別途研究を進めている *S. cerevisiae* 由来の乳化物質の解析から，*C. albicans* の乳化物質は細胞壁タンパク質であると考えている．現在，*S. cerevisiae* の結果を参考にしながら，micafungin 処理により得られる細胞から遊離した乳化物質の精製を進めており，それらの結果について報告する．また，乳化を指標としたスクリーニングについては，小スケールで大量処理が可能なスクリーニング系を確立し，一次スクリーニングとして，ケミカルライブラリーや微生物培養サンプルからのスクリーニングを進めている．

Analysis of emulsifiers released from *Candida albicans* cells after treatment with a β-1,3-glucan synthase inhibitor

○Shinsuke Nerome, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Candida albicans*, cell wall, micafungin, emulsifier

3P-H068 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の乳化およびマクロファージ活性化に関与する物質の解析

○齋藤 大輝, 大西 将也, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

酵母の細胞壁変異株の応用研究の一つとして，免疫担当細胞であるマクロファージとの接触により，マクロファージを強く活性化する酵母変異株（Δ*mcd4*）を見いだし，その特性と細胞表層の解析を進めてきた[1]．さらに，実用パン酵母でも変異処理により同様の性質を持つ酵母を取得できることを示した[2]．また，Δ*mcd4* 以外に実験室酵母で同様の性質を持つ酵母変異株を見いだし，それらの性状解析を進めてきた．その結果，マクロファージ活性化株の共通の特性として，細胞壁マンナン量の減少の他に，細胞自身に油を乳化する活性を見いだした．乳化活性はマクロファージ活性化能が高い変異株ほど高い傾向を示した．その他にも，酵母遺伝子ノックアウト株のセットから乳化能を持つ株をスクリーニングし，その結果得た変異株にマクロファージ活性化能を見いだした．以上のような結果から乳化とマクロファージ活性化の密接な関係が示されたが，それら活性が生じるメカニズムについては不明である．本研究では，これらのことを明らかにするため，パン酵母の変異株から得られる乳化物質やマクロファージ活性化物質の同定を進めている．培養後の菌体を PBS に懸濁することにより菌体から乳化物質が遊離することを確認し，遊離した乳化物質の精製を進めたが，現状では同定にまでには至っていない．おそらく複数の乳化物質が存在していると考えられた．また，この遊離物によるマクロファージ活性化を検出しており，マクロファージ活性化物質についても精製を進めている．発表ではこれらの結果について報告する．

1) Sakai et al., J Biosci Bioeng., 2007, 103(2):161-6.
2) Takada et al. FEMS Yeast Res., 2014, 14(2), 261-9.

Analyses of substances involved in emulsification and macrophage activation from *Saccharomyces cerevisiae*

○Daiki Saito, Masaya Ohnishi, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, biosurfactant, macrophage, emulsification

3P-E069 蛍光タンパク質を用いた新規レシオメトリック酸化センサーの開発

○坂元 仁[1,2], 古田 雅一[1,2,3], 土戸 哲明[1]
（[1]阪府大・21科研セ・微制研セ, [2]阪府大・放研セ, [3]阪府大院・工・量子）
sakamoto.jj@gmail.com

【目的】これまで蛍光タンパク質を遺伝子改変した多くの活性酸素検出用センサーが開発されてきた．これらは Cys 残基を導入し，ジスルフィド結合形成を利用している．その一つである HyPer は大腸菌 OxyR のジスルフィド結合ドメインが組み込まれている．我々は大腸菌の抗酸化システム多重欠損株を用いた HyPer 発現系での細胞内 H_2O_2 濃度調査から感度上限の問題に直面した．さらに過酸化水素は他の反応性の高い活性酸素種とっては還元剤でもあり，過酸化水素のみの指標に基づくモニタリングは，細胞内レドックスの一側面でしかない可能性があった．そこでジスルフィド結合に依存しない異なる原理に基づく遺伝子コードされた酸化センサーの開発を試みた．
【方法と結果】GFP 系の蛍光タンパク質の蛍光団形成は，3 つのアミノ酸の環化，脱水，酸化という翻訳後修飾による．蛍光タンパク質にもルシフェラーゼにとってのルシフェリンのような基質が必要であり，それは酸素である．蛍光タンパク質の蛍光団形成速度は，蛍光タンパク質の種類により異なる．我々は，抗酸化酵素多重欠損株の研究の過程で，細胞内の過酸化水素レベルまたはスーパーオキサイドレベルが高い株において，ある種の蛍光タンパク質の蛍光団形成が非常に早いことを見出した．通常の大腸菌の細胞質内は還元力が高く，酸化されにくい環境であるためであると考えられた．蛍光団成熟速度の違いが蛍光団の酸化されやすさの違いによるのならば，異なる蛍光団成熟速度の蛍光タンパク質を連結し，その蛍光比を測定することで，細胞質内の“酸化されやすさ”を Cys 残基の酸化修飾に依存せず検出することができる．この新原理の蛍光タンパク質型酸化センサーを Odd-dye (Oxidation differential display-dye)と名付けた．この Odd-dye と HyPer を用いた液体および固体培養による細胞内酸化状態の特性について報告する．

Development of novel ratiometric reactive oxygen sensor

○Jin Sakamoto[1,2], Masakazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1]
([1]MCRC, Res. Org. C. 21C., Osaka Pref. Univ., [2]Rad. Res. C., Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum Rad. Eng.,Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words oxidative stress, reactive oxygen species, GFP, sensor

3P-H070 味噌漬け豆腐から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する 多成分バクテリオシンの精製と遺伝子クローニング

○河原 あい[1], 山下 奈菜[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）
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの精製と遺伝子クローニングを行うことを目的とした．
【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清について，70%飽和硫安分画，透析（MWCO 1,000），逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製し，HPLC で得られた Fraction 1~7 について *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157[T] を用いたバイオアッセイの結果，Fraction 1 および 4 で抗菌活性がみられた．Fraction 4 のアミノ酸配列分析の結果，既知のバクテリオシンと相同性を示さず，新規バクテリオシンあるいは機能不明タンパク質の分解物である可能性が示唆された．Fraction 1 については，HPLC による精製をさらに進めたところ，新たに 8 つのピークが得られ，全てに抗菌活性が検出された．抗菌活性が高かった 3 つのピークのアミノ酸配列を調べた結果，plantaricin A, NC8β および F と相同性を示した．これらバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い，増幅産物の塩基配列を決定した結果，plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出し，*plnNC8*，*plnA* および *plnFE*（逆向き）の並びで存在していることが明らかとなった．これらの遺伝子の位置や BLAST 検索の結果から，PUK6 株の多成分バクテリオシンの構造遺伝子および生合成関連遺伝子は，これまでに報告されている *L. plantarum* 8P-A3 の *pln locus* と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた．

Purification and cloning of the multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* PUK6 isolated from Tofu pickled in Miso

○Ai Kawahara[1], Nana Yamashita[2], Takeshi Zendo[3], Hiromi Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words bacitracin, *Lactobacillus plantarum*, lactic acid bacteria

3P-H071 熊本県環境中から分離した抗菌性乳酸菌の同定とそれらが生産するバクテリオシンの特性

○八浪 早季[1], 山下 奈菜[2], 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）
matusaki@pu-kumamoto.ac.jp

【目的】乳酸菌が生産するバクテリオシンは，安全な食品保存料としての利用が期待されている．本研究では，新たな特徴をもつ新規バクテリオシンを探索することを目的として，熊本県環境中から抗菌性乳酸菌を分離し，それらの菌株の同定と生産されるバクテリオシンの特性を調べた．
【方法および結果】熊本県環境中から分離された抗菌性乳酸菌について，16S rRNA 遺伝子解析および糖類資化性試験，さらに *Leuconostoc* 属の種特異的プライマーを用いたゲノム DNA の PCR を行い，ダイコン由来分離菌を *Enterococcus* sp. PUK2，2 つの土壌由来分離菌を *Leuconostoc lactis* PUK4 および PUK5 と同定・命名した．次に，PUK2 株が生産するバクテリオシンの特性を調べるため，その精製法を検討した．PUK2 株を MRS 液体培地にて 37℃，9 時間培養した培養液上清について，硫安沈殿分画（70％飽和），透析（MWCO 1,000）を行い，0-0.6 M NaCl のリニアグラジェントによる陽イオン交換クロマトグラフィーにてバクテリオシンを溶出させ 2 つの活性画分（Fraction I および II）を得た．この活性画分のうち Fraction I について，逆相系前処理カラム Sep-Pak tC_{18} を用いて精製・濃縮し，逆相 HPLC を行った．各精製段階のバクテリオシンの抗菌活性を *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T を指標菌としたバイオアッセイにより測定した．また，PUK2 株が生産するバクテリオシンは，100℃，30 分の加熱でもその活性が保持されることがわかった．現在，PUK2 株が生産するバクテリオシンのさらなる精製を進めている．

Identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from environment in Kumamoto prefecture and characterization of the bacteriocins

○Saki Yatsunami[1], Nana Yamasita[2], Hiromi Matsusaki[1,2]
([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words bacitracin, lactic acid bacteria, *Enterococcus*

3P-N072 発酵阻害耐性酵母由来強力な ENO1 プロモーターの発現解析

○Nurlina B. Azmi[1], Prihardi Kahar[1], 糸見 明穂[1], 紀平 知枝[1], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大院・イノベ）
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 NBRC の酵母ライブラリーのスクリーニングにより優れた阻害剤耐性を持つ *Saccharomyces cerevisiae* F118 株 (以下，F118)を獲得している．F118 の代謝経路の主な遺伝子の発現量を定量 PCR で確認したところ，解糖系を触媒する ENO1 の発現量は多いことが確認されている．しかも，阻害剤存在有無関係なく安定している．本研究では F118 のゲノム上に存在する ENO1 の 5'フランキング領域の解析を行い，発酵阻害剤存在下での ENO1p の発現調節機構を明らかにする．
【方法】 転写因子結合部位の分布解析により，5'フランキング領域(ENO1p, 1347bps)の異なる長さを F118 のゲノムからクローニングし，蛍光タンパクである GFP の遺伝子とインフュージョンして ENO1p のレポーター発現系の構築を行った．各 ENO1p の発現活性の評価には，実験室酵母 YPH499 と ENO1p 由来酵母 F118 に形質転換し，阻害剤存在の有無の条件で発酵を行い，FACS (セルソーター)法で細胞内の GFP の蛍光強度の測定により，ENO1p の発現活性の評価を行った．
【結果と考察】 発酵阻害剤の存在無しで発酵培養した際，ENO1p の全長領域(800bps)を導入した YPH499 形質転換体は ENO1p の下流領域(300 bps)を導入した YPH499 形質転換体よりも蛍光強度が 100 倍に高くなっていることが判った．YPH499 由来 ENO1p と比較したところ，F118 株には-149 および-668 座に TATA ボックスが存在しており，各 TATA ボックスに対して異なった UAS(GCR1p)が存在している．実験室酵母 YPH499 には-668 座にしか TATA ボックスが存在しておらず，両株における発現差の原因はここにあると考えられる．また，転写開始(ATG)から最も近縁である UAS 配列と URS 配列の間には新規な転写因子が存在する可能性があり，阻害剤存在下でもこの領域の発現活性が維持されていった．

Profiling of Strong ENO1 Promoter Expression Derived from Inhibitory Chemical Tolerant Yeast

○Nurlina B. Azmi[1], Prihardi Kahar[1], Itomi Akiho[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words inhibitory chemical, fermentation, eno1 promoter, inhibitor tolerant yeast

3P-H073 オキサロ酢酸蓄積型リジン生産 *Corynebacterium glutamicum* の代謝プロファイル解析

○佐藤 桃梨, 柳瀬 真紀, 愛甲 徹, 和田 大, 横田 篤
（北大院・農・微生物生理学）
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景・目的】オキサロ酢酸（OAA）はリジンなどのアスパラギン酸（Asp）属アミノ酸の前駆体となる重要な代謝中間体である．我々は *C. glutamicum* において OAA の供給強化によるリジン生産の効率化を目指し，これまでに 4 つの変異(1) Phosphoenolpyruvate carboxylase のフィードバック阻害解除（PEPC^{fbr}）変異，(2) Pyruvate kinase 欠失（ΔPYK）変異，(3) Citrate synthase の活性低下（CS^{low}）変異，(4) OAA を消費する Malate dehydrogenase の欠失（ΔMDH）変異がリジン生産に与える影響の解析を行ってきた．Aspartokinase にフィードバック阻害解除変異を導入したリジン生産基準株に PEPC^{fbr}，ΔPYK，CS^{low}，ΔMDH の順に変異を導入した結果，PEPC^{fbr}，ΔPYK，CS^{low} の 3 つの変異は相乗的にリジン生産を向上させたが，ΔMDH 変異は効果がなかった．本研究では，メタボローム解析により 4 つの変異がリジン生産時の代謝プロファイルに与えた変化を解析した．
【方法・結果】基準株と上記の(1)~(4)の変異を順次導入した 1～4 重変異株を，ジャーファーメンターを用いて培養し，対数増殖期後期の菌体の代謝産物をメタノール抽出した後，CE-MS により同定・定量した．その結果，PEPC^{fbr} と ΔPYK の両変異を有する株は，PEPC^{fbr} の単変異株よりも，2-オキソグルタル酸の減少と Asp の増加が観察され，両変異の共存で炭素がよりリジン生合成方向へ向かったと考えられた．2 重変異株に CS^{low} 変異を導入した 3 重変異株では Asp とピルビン酸の増加が観察され，OAA 供給に加えピルビン酸増加もリジン増産に貢献したと考えられた．一方，3 重変異株に ΔMDH 変異を導入した 4 重変異株では，Asp 増加が観察されたが，ピルビン酸は減少し，ΔMDH 変異に効果がなかったのはピルビン酸の不足が影響したためと考えられた．

Analysis of metabolite profile during lysine production in *Corynebacterium glutamicum* modified to increase intercellular oxaloacetate.

○Tori Sato, Masaki Yanase, Tohru Aikoh, Masaru Wada, Atsushi Yokota
(Lab. Microbial Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, Lysine production, Metabolome analysis, Oxaloacetate

3P-H074 耐熱性乳酸生産糸状菌のイオンビーム変異誘導による Xylose 発酵性向上における機能解析

○高野 真希[1], 山下 聖樹[1], 畑下 昌範[2], 星野 一宏[1]
（[1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研）
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】未利用バイオマスを原料とした生物変換による有用物質生産において，セルロース分解効率などの観点から高温発酵プロセスが注目されている．*Rhizopus oryzae* NBRC5384 は 40℃以上の高温でも増殖および乳酸発酵が可能な菌株であるため，バイオマスからの高温乳酸生産に利用可能である．しかし本菌株はリグのセルロースの主成分である Xylose の変換効率に乏しいため，イオンビーム照射による Xylose 発酵性を獲得した変異株の構築を前回報告した．本研究では親株と本変異株の Xylose 代謝の変化について生化学および分子生物学的に比較検討した．【方法・結果】*R.oryzae* NBRC5384 の分生子懸濁液に若狭湾エネルギー研究センター(WERC)にてイオンビーム（Carbon 2,500 Gy，LET 42.0 KeV/μm）を照射し変異誘導を行い，40℃における乳酸生産量が高い XM-41 株を選択した．Xylose からの乳酸生産能を比較したところ，親株は 0.04 g/L であった．一方，XM-41 株では 14.7 g/L であった．XM-41 株はイオンビーム照射により Xylose 代謝関連酵素群および乳酸生成酵素の耐熱性が向上したと推測されたことから，28℃および 40℃において培養した両菌株の菌糸を回収し，細胞内の Xylose reductase(XR)，Xylitol dehydrogenase (XDH)および Lactate dehydrogenase (LDH)活性を分析した．その結果，親株と比較して XM-41 株は 40℃において XR 活性が約 2 倍，LDH 活性が約 10 倍向上していた．さらに両酵素活性は高温耐性が向上していることも判明した．また，XR 遺伝子構造を解析した結果，大幅に変化していることが示唆された．現在，これらの酵素に関する遺伝子発現を解析中である．

Analysis of Xylose-fermentating Mechanism on Thermotolerant Lactic acid-producing Fungus Mutated by Ion-beam Irradiation

○Maki Takanno[1], Satoki Yamashita[1], Masanori Hatashita[2], Kazuhiro Hoshino[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, [2]Wakasa Wan Energy Res. Center)

Key words *Rhizopus oryzae*, lactic acid, ion-beam, xylose fermentation

3P-N075 発酵阻害物質耐性 *Candida boidinii* K212 のキシロース発酵の解析

○Kahar Prihardi[1], 紀平 知枝[1], 大塚 裕美[1], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[1,2]
（[1]神戸大院・工, [2]神戸大・自科・研究環）
pri@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 リグノセルロース系バイオマス（実バイオマス）はグルコースポリマーである澱粉と違って糖化の過程でグルコースの他にキシロースも同等量で分解される．一方，エタノールの生産システムの多くは既存のワインやビールの製造技術を採用しており，現在ではエタノール生産性および安全性の高い酵母 S. cerevisiae は生産株として用いられている．しかし，本酵母はグルコースをエタノールに代謝するものの，キシロースに対しては全く代謝しない．対糖生産収率をあげるために，キシロース発酵機能の付与は進められたが，導入されたキシロース代謝系は高効率的に機能せず，キシロースからのエタノール発酵の効率は向上されていない．主な原因は実バイオマスから放出された発酵阻害物質（ICC）による酸化ストレスで酵母の全体的代謝活性が低下していると考えられる．そこで，本研究では酵母ライブラリーから ICC 耐性酵母をスクリーニングし，当酵母におけるキシロース発酵機能についてメタボロームおよび遺伝子発現解析によって評価してみた．
【結果と考察】 酵母ライブラリーからエタノール生産酵母を選定し，そのうちキシロースを利用できる約 240 株に対してスクリーニングを行った結果，実バイオマスの分解液に多く含まれている発酵阻害物質であるフルフラール，5-HMF，バニリン，シリンガアルデヒド，酢酸，ギ酸およびレブリン酸に耐性を示した Candida boidinii K212 株を獲得した．当酵母株は，キシロースからキシリトールを生成せずにエタノール発酵ができる．そこで，De Novo アセンブリにより K212 の全ゲノム解読を行い，キシロース発酵関係の ORF が特定できた．さらに，メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行い，NAD(H) 生産に関わる解糖系と NADP(H)生産に関わるペントースリン酸系の活性が非常に向上されているとわかった．

Analysis of xylose fermentation of inhibitory chemical tolerant yeast *Candida boidinii* K212

○Prihardi Kahar[1], Chie Kihira[1], Hiromi Otsuka[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words xylose, fermentation, *Candida boidinii*, yeast

3P-N076 出芽酵母中心代謝酵素欠損株のトランスオミクス解析

○松田 史生, 西野 駿佑, 清水 浩
（阪大院・情報）
fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の高い増殖およびエタノール生産能の背景には，酵素発現量の調節を通じた代謝フラックスの制御が寄与していると考えられる．そこで本研究では，代謝関連遺伝子破壊株 11 株から，発酵プロファイル，中心代謝中間体濃度，代謝フラックス，酵素発現量データを取得し，酵母解糖系の代謝制御機構の解明を試みた．
【方法】出芽酵母 S288C 株および *KanMX* 遺伝子と置換した 1 遺伝子欠損変異株を用いた．SD 培地中 (100 mL)，30℃，150rpm で回分培養した菌体から，イオンペア LC-MS 法で代謝物濃度を，定量プロテオーム解析法 (Shimadzu LCMS-8040, MRM モード) で酵素発現量を測定した．[1-13C]グルコース含有培地で培養した菌体のタンパク由来アミノ酸の 13C 濃縮度データから代謝フラックス分布を推定した．
【結果】出芽酵母野生株 (S288C) と，中心代謝酵素遺伝子が欠損した 1 遺伝子破壊株を回分培養し，物質収支および中心代謝中間体濃度，代謝フラックス，酵素発現量データを取得した．トランスアルドラーゼの Tal1p が欠損した tal1Δ 株は，NADPH 再生にかかわるペントースリン酸経路 (PPP) の代謝フラックスが約 60%低下し，比増殖速度も約 30%低下したが，比グルコース消費速度，比エタノール生産速度は野生株と同等だった．また tal1Δ など PPP の酵素遺伝子欠損株では，アミノ酸生合成関連酵素群の発現量が低下し，解糖系酵素群の発現量が増加する傾向があった．これらの株では，細胞周期の G1 期で行うアミノ酸生合成に必要な NADPH が不足するため，解糖系が亢進する休止 （G0 期）期に入ることで高いエタノール生産能力を維持していると推測された．

Transomics analysis of yeast central metabolism

○Fumio Matsuda, Shunsuke Nishino, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Transomics analysis, central metabolism, cell cycle

3P-H077 好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 が排出する香気成分と硫黄代謝についての研究

○中山 宗一郎[1], 白須 未香[1,2], 小倉 一将[1], 新井 博之[1], 東原 和成[1,2], 石井 正治[1]
（[1]東大院・農生科, [2]JST, ERATO）
amishii@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Hydrogenobacter thermophilus TK-6 は，伊豆の峰温泉から単離された好熱性絶対独立栄養性の水素細菌である．本菌は硫黄源として硫酸やチオ硫酸を使用することができる．発見以降，本菌の培養後の香気が特徴的であることが確認されており，硫黄が絡んだ物質による香気であることは予想されていたものの，詳細な解析はなされてこなかった．また，本菌の生育における硫酸利用度の定量を行うため，培地の初発硫酸濃度を 1mM から 20mM まで変化させて生育試験を行ったところ，生育に差は見られなかったが，硫酸の消費量が初発濃度依存的に増減することが明らかとなり，かつ培養後の香気には違いが感じられた．そこで，含硫化合物をターゲットとして，匂い嗅ぎ GCMS システムと呼ばれる機器を用いて，培養後の香気成分の解析を行い，硫黄代謝を中心とした本菌の代謝との関連を見出すことを目的とした．
方法としては，本菌を硫酸制限培地やチオ硫酸を硫黄源として生育させた後のバイアル瓶より，香気成分を匂い捕集剤を用いて回収し，匂い嗅ぎ GCMS システムに導入することで香気成分解析を行った．通常培地（本菌特有の無機培地）における野生株の生育後の香気の解析では，ジメチルジスルフィドやジメチルトリスルフィドなどの含硫化合物が検出された．また，硫酸を利用できないよう遺伝子を破壊した株（ΔHTH_0443 株；HTH_0443 は *cysI,cysH* の融合遺伝子）において，チオ硫酸を硫黄源として生育させたサンプルでもこれらの化合物は検出された．しかしながら，本菌の特徴的な香気に最も寄与すると考えられる成分は匂いの検知閾値が低いためか，ヒトの鼻を利用した匂い嗅ぎシステムからは確認されたものの，具体的な化合物の特定には至っておらず，現在さらなる検討を行っている．

Studies on the volatile compounds and sulfur metabolism of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○Soichiro Nakayama[1], Mika Shirasu[1,2], Kazumasa Ogura[1], Hiroyuki Arai[1], Kazushige Touhara[1,2], Masaharu Ishii[1]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]ERATO, Touhara Chemosensory Signal Project, JST)

Key words volatile organic compound, metabolism, sulfur content, *Hydrogenobacter thermophilus*

3P-H078 Functional analysis of bacterial acyl-CoA reductases generating fatty aldehydes for alkane production

○Yu-An Sui[1], Shigenobu Kishino[1], Yuki Nakatani[1], Kosuke Fujii[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Jun Ogawa[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Toyota Motor Corp.)
kishino@kais.kyoto-u.ac.jp

【Background】 *n*-Alkanes, the main components of automobile fuel, can be derived from decarbonylation of aldehydes. Thus, aldehydes are considered as important intermediates in the production of *n*-alkanes. We discovered an acyl-CoA reductase AcrI through the screening of fatty acid reducing microorganisms. Transformed *E. coli* possessing AcrI converted tetradecanoyl-CoA to tetradecanal. Futhermore, we conducted functional analysis of AcrI, in an aim to develop a novel bioprocess for efficient microbial tridecane production.
【Methods and results】 An *E. coli* transformant expressing *AcrI* (from *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* NBRC3321) was constructed. His_6-tagged AcrI was purified by nickel column chromatography and gel filtration chromatography. Analysis of AcrI-catalyzing reaction was performed under optimized conditions for 15 minutes. AcrI showed optimal activity at 40 ºC at a pH of 8.0 in 20 mM bicine buffer with 0.4 mM NADH and 5 mM 2-mercaptoethanol. Under optimized reaction conditions, kinetic analysis of AcrI-catalyzing reaction was performed. The K_m and V_{max} values for tetradecanoyl-CoA were 13.8 μM and 9.26 nM s^{-1}, respectively. The comparison of the substrate selectivity among acyl-CoA reductases (AcrI from *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, EutE from *E. coli*, Ald from *Clostridium beijerinckii*) was performed. As a result, these enzymes converted 6 acyl-CoAs with different chain length into corresponding fatty aldehydes.

Functional analysis of bacterial acyl-CoA reductases generating fatty aldehydes for alkane production

○Yu-An Sui[1], Shigenobu Kishino[1], Yuki Nakatani[1], Kosuke Fujii[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Jun Ogawa[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Toyota Motor Corp.)

Key words acyl-CoA, aldehyde, alkane

3P-H079 *Acetobacter* 属酢酸菌の TCA サイクル周辺経路を中心とした酢酸過酸化能発現メカニズム

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

【目的】食酢醸造用酢酸菌である *Acetobacter pasteurianus* および *Acetobacter aceti* は，いずれも酢酸発酵により生じた酢酸を細胞内で完全酸化する酢酸過酸化能を示す．しかしながら，過酸化に重要な基幹代謝経路は両株間で大きく異なっている．我々はこれまでに，酢酸過酸化時における細胞内代謝メカニズムの解析を行い，過酸化能の発現には両株に共通して TCA サイクルにおけるスクシニル-CoA からコハク酸への変換バイパスするアセチル-CoA ヒドロラーゼ(AarC)が第一義的な役割を果たすことを明らかにしている[1]．本研究では，両株の酢酸過酸化能の発現メカニズムについて更に詳細に調べるため，AarC 以外の TCA サイクル周辺経路に着目し，それらの酢酸過酸化能への関与について検討を行った．
【結果・考察】両株の基幹代謝経路構成遺伝子を比較したところ，*A. pasteurianus* のみが酢酸からアセチル-CoA への変換に関与するアセテートキナーゼ (Ack) とフォスフェートアセチルトランスフェラーゼ (Pta) を保持していた．そこで，それら遺伝子破壊株を構築してエタノール存在下での生育挙動を調べたところ，*ack*, *pta* 遺伝子破壊株は，親株と比較して酢酸過酸化時期が大きく亢進することがわかった．また興味深いことに，それら遺伝子破壊株の生育挙動は，*ack*, *pta* 遺伝子を保持しない *A. aceti* の生育挙動と類似するという特徴を示した．以上のことから，過酸化能発現は AarC が第一義的な役割を担うものの，Ack, Pta も重要な役割を果たしており，*Acetobacter* 属酢酸菌間の過酸化能を比較する上で重要な因子である可能性が考えられた．
1) 佐々木ら 第 68 回 日本生物工学会 講演要旨集. pp.103.

Study on acetate overoxidation pathway on TCA cycle in the genus *Acetobacter*

○Daiki Sasaki[1], Morio Ishikawa[1], Toshihiro Suzuki[1], Kentaro Imai[1], Yuki Yamamoto[1], Takuya Matsbara[1], Yu Kanesaki[2], Hirohumi Yoshikawa[2,3], Akiko Okamoto-Kainuma[1]
([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words acetic acid bacteria, *Acetobacter*, acetic acid fermentation, acetate overoxidation

3P-H080 大腸菌の NADH 脱水素酵素 I とシトクロム bo_3 オキシダーゼ両欠損株における異常な糖代謝の解析

○瀬島 祐大, 紀平 千枝, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤
（北大院・農・微生物生理学）
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

【背景と目的】大腸菌の好気呼吸では主に酸化的リン酸化で ATP が合成される．酸化的リン酸化には呼吸鎖で形成されるプロトン駆動力（pmf）が用いられるため，pmf 形成能は ATP 合成に重要である．当研究室では呼吸鎖酵素の欠損株が構築され，代謝解析が行われてきた．その結果，pmf 形成能が高い NADH 脱水素酵素 I とシトクロム bo_3 オキシダーゼの両方を欠損させた株（ΔΔ 株）では，野生株やその他の欠損株では生成されないグルタミン酸（Glu）が，50 g/L のグルコースから約 7 g/L 生成することが観察された．これは pmf 形成能低下の影響と推測されたが，その生理的意義は不明であった．そこで，本研究では ΔΔ 株のトランスクリプトーム解析，およびメタボローム解析を行い，pmf 形成能の低下が糖代謝に与える影響を調べた．
【方法】*Escherichia coli* W1485（野生株）と ΔΔ 株をジャーファーメンターで無機塩発酵培地を用いてバッチ培養し，対数増殖期後期の菌体を回収した．回収した菌体を用いて，RNA-seq，およびメタボローム解析を行った．
【結果と考察】ΔΔ 株でペントースリン酸経路酵素の転写量の増大，中間体の蓄積がみられ，同経路の活性化が示唆された．ペントースリン酸経路の活性化は Glu 生成に必要な NADPH の供給に必要な応答であると推測した．さらに，ΔΔ 株で Glu 脱炭酸反応/膜輸送系を担う *gadA* と *gadB*，*gadC* の転写量が著しく増大し，かつ細胞内の γ-アミノ酪酸（GABA）濃度が上昇しており，Glu 脱炭酸反応系の促進が示唆された．本経路は，細胞内 H^+の消費と GABA の排出を介して pmf を形成することから，この応答は呼吸鎖酵素欠損による pmf 形成能低下を補完する生理的意義があると推測した．以上のように ΔΔ 株では Glu 生成系と Glu 脱炭酸反応/膜輸送系を活性化することによって，pmf 形成能の低下を補うという，新奇な恒常性維持機能を発現していると考えた．

Analysis of unusual glucose metabolism in an *Escherichia coli* mutant defective in both NADH dehydrogenase I and cytochrome bo_3 oxidase

○Yudai Sejima, Chie Kihira, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota
(Lab. Microbial Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words L-glutamate, GABA, respiratory chain, *Escherichia coli*

3P-H081 好熱菌発酵産物がブタ腸内の乳酸代謝に与える影響

○吉川 翔太[1], 梶原 悠[2], 宮本 浩邦[3,4,5], 須田 亙[3], 井藤 俊行[2], 服部 正平[3,6,7], 大野 博司[3], 中西 裕美子[3], 田代 幸寛[8], 酒井 謙二[8], 古原 俊哉[8], 長 雄一郎[9], 児玉 浩明[5]
([1]千葉大院・融合, [2]京葉プラントエンジニアリング, [3]理研・IMS, [4]サーマス, [5]千葉大院・園芸, [6]東京大院・新領域, [7]早稲田大院・先進理工, [8]九大院・農, [9]東京医科歯科大院・保健衛生)
kodama@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】海産資源を 70~80°C の高温下で発酵させた飼料(好熱菌発酵産物)をブタに与えると，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様々な生理作用が認められる．好熱菌発酵産物を給与した豚の排泄糞をオミックス解析によって調べると糞中の乳酸含量が低下しており，乳酸代謝に関わるバクテリアの種類が変化していることが示唆された．糞中の菌叢解析の結果，非給与区は *Streptococcus alactolyticus* が大勢を占めていたのに対し，給与区では *Lactobacillus amylovorus* が大勢を占め，更に乳酸資化菌である *Megasphaera elsdenii* が有意に増加していた．上記 3 種のバクテリアを単離したのち，代表菌株を選抜し，形態学的・生化学的特性を明らかにすることを目的とした．
【実験方法】各代表菌株について電子顕微鏡観察，有機酸産生能試験を行った．更に乳酸菌の 2 種は代謝産物のメタボローム解析を実施すると共に，腸上皮細胞との生着性やリポ多糖(LPS)結合能を有し，生体防御に関与する S-layer protein(SLP)や抗菌物質であるバクテリオシンの有無について解析評価した．
【結果と考察】*in vitro* 嫌気培養上清を解析した結果，*L. amylovorus* と *S. alactolyticus* の間で，代謝レベルの違いが確認されたが，乳酸の生成量自体には大きな差異は認められなかった．したがって糞便中の乳酸の減少には乳酸資化菌の *M. elsdenii* が関与している可能性が考えられた．また，*L. amylovorus* の産生するバクテリオシンによって，腸内菌叢が変化する可能性を検討したが，単離した *L. amylovorus* には既知のバクテリオシン遺伝子を検出できなかった．また *L. amylovorus* はいずれも SLP 遺伝子を有していたため，腸上皮細胞や LPS に付着する可能性が示唆された．以上の結果から，これらの単離菌群がブタの腸内環境に与える影響とその分子機序について考察する．

Lactate metabolism in pig gut administrated with a thermophile-fermented compost.

○Shota Yoshikawa[1], Yu Kajihara[2], Hirokuni Miyamoto[3,4,5], Wataru Suda[3], Toshiyuki Ito[2], Masahira Hattori[3,6,7], Hiroshi Ohno[3], Yumiko Nakaishi[3], Yukihiro Tashiro[8], Kenji Sakai[8], Toshiya Kohara[8], Yuichiro Cho[9], Hiroaki Kodama[5]
([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Keiyo Plant Eng., [3]RIKEN IMS, [4]Sermas, [5]Grad. Sch. Fac. Horticul., Chiba Univ., [6]Fro. Sci., Tokyo Univ., [7]Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [8]Fac. Agric., Kyushu Univ., [9]Health care sci., Tokyo Medical and Dental Univ.)

Key words probiotics, lactic acid bacteria, gut microbiota, compost

3P-H082 アセト酢酸エステルを基質としたイソプレノイド大量生産大腸菌株の作出

千田 大樹, ○原田 尚志
（鳥取大院・工）
harada@bio.tottori-u.ac.jp

＜背景・目的＞
テルペン化合物は自然界で最も多様な化合物群の一つであり，その多くが複雑な構造から有機合成が困難かつ天然存在量が希少であることから，異種生産系の開発が期待されている．これまでに大腸菌を宿主として，異種細菌由来メバロン酸（MVA）経路遺伝子群の導入により，テルペン生産能が大幅に向上することを報告した．本研究では，実用生産に適した新たな基質候補化合物としてアセト酢酸エステル体に注目し，これを効率的に基質として利用できる新規生産システムの構築を目指した．
＜方法・結果＞
種々の細菌由来エステラーゼについて，アセト酢酸エステル体を高効率で加水分解可能な酵素のスクリーニングを行った結果，枯草菌由来のカルボキシルエステラーゼ PnbA が最も加水分解活性が高いことが確認された．そこで MVA 経路遺伝子群とともに PnbA を過剰発現した大腸菌株を作出し，アセト酢酸エステル体を基質としてテルペン生産を評価した結果，既存の大量生産系とほぼ同等の生産性を示した．これにより，従来よりも数十倍安価な基質であるアセト酢酸エステル体からの大量生産系構築を達成した．
本研究は，経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施された．

Development of the isoprenoid overproduction system from acetoacetate ester as the substrate in *Escherichia coli*

Daiki Senda, ○Hisashi Harada
(Grad. Sch. Eng., Tottori Univ.)

Key words pathway engineering, mevalonate pathway, isoprenoid, esterase

3P-H083 Construction of a molecular sensor for the detection of intracellular methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1

○Viviane Carnier Casaroli, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Tokyo Tech)
tfukui@bio.titech.ac.jp

Background: Facultative methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* AM1 has become a prominent biotechnological platform, bioconverting methanol to other valuable chemicals. *M. extorquens* is capable of using both C_1 and multi-carbon compounds as sole carbon sources, whereas it is unable to oxidize methane, a next-generation carbon feedstock. We are currently attempting to heterologously express a methane oxidizing enzyme in *M. extorquens* AM1, assuming that the intracellular methanol concentration derived from methane will be very low. The aim of this study is to establish a sensor system capable of detecting very low concentrations of methanol within the cells of *M. extorquens*.

Methods and Results: In order to detect intracellular methanol, a molecular sensor system consisting of a methanol-inducible promoter and a green fluorescent protein (GFP) gene was constructed and introduced into the chromosome of *M. extorquens* AM1. Expression of GFP was analyzed by fluorescence spectrophotometry and fluorescence microscopy. The obtained sensor strain was cultivated in minimal medium containing various concentrations of methanol. The engineered *M. extorquens* sensor cells emitted fluorescence during growth on methanol as sole carbon source, even when methanol concentration was as low as 0.001%. Considerably weaker fluorescence was observed when succinate or nutrient medium were used. These results suggest that our sensor strain can be used to detect methanol intracellularly.

Construction of a molecular sensor for the detection of intracellular methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1

○Viviane Carnier Casaroli, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Tokyo Tech)

Key words methylotroph, methanol, biosensor, GFP

3P-H084 大腸菌を宿主とした人工経路によるグルコースからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成

○齊藤 周, Insomphun Chayatip, 折田 和泉, 福居 俊昭
（東工大院・生命理工）
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は広範な微生物が貯蔵物質として菌体内に蓄積する生分解性ポリエステルである．自然界で最も一般的な PHA であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] は硬くて脆い物性を示すのに対して，C_4 ユニットと C_6 ユニットの共重合体であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸）[P(3HB-*co*-3HHx)]は融点が低く，柔軟性に富んだ実用的な物性を示す．我々はこれまでに P(3HB)生産菌 *Ralstonia eutropha* H16 株を改変し，植物油や糖質から P(3HB-*co*-3HHx)生合成が可能な株を作製した．本研究では物質生産の宿主として汎用される *Escherichia coli* に人工生合成経路を導入し，グルコースを基質とした効率的な P(3HB-*co*-3HHx)の生合成を目指した．
【方法および結果】アセチル-CoA から(*R*)-3HB-CoA を生成し PHA へと重合する経路，(*R*)-3HB-CoA からブチリル-CoA を生成する経路，および 2-エノイル-CoA と 3-オキソアシル-CoA 間の変換経路を構成する外来遺伝子群を挿入したプラスミドベクター 3 種を構築し，塩化カルシウム法を用いて *E. coli* JM109 株に導入した．作製した三重形質転換体を 2% グルコースおよび 0.5 mM IPTG を添加した LB 培地で 48 時間振とう培養したところ，蓄積した PHA への C_6 ユニット導入はほとんど見られなかった．上記の遺伝子群に加えて，*R. eutropha* 由来広基質特異性 β-ケトチオラーゼ遺伝子 $bktB_{Re}$ をさらに導入したところ，乾燥菌体重量あたり 31 wt%の P(3HB-*co*-14 mol% 3HHx)生合成を達成した．一部の遺伝子を欠失させたベクター導入株を用いて行った PHA 生合成能の検討から，C_4 ユニットはアセトアセチル-CoA の(*R*)-特異的還元により供給される一方で，C_6 ユニットは 3-オキソヘキサノイル-CoA から(*S*)-3HHx-CoA を経由して供給されることを明らかにした．

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose by artificial pathway in *Escherichia coli*

○Shu Saito, Chayatip Insomphun, Izumi Orita, Toshiaki Fukui
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate), biodegradable plastic, *Escherichia coli*

3P-H085 *Methylobacterium extorquens* の代謝改変によるメタノールからのポリヒドロキシアルカン酸共重合体の生合成

○折田 和泉, 海野 源人, 中村 聡, 福居 俊昭
（東工大院・生命理工）
tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】*Methylobacterium extorquens* AM1 は次世代資源として有用なメタノールを単一炭素源として生育可能な通性メタノール資化性細菌である．本菌はメタノール代謝中に C_4 モノマーユニットのみからなるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を蓄積する．PHA は石油由来プラスチックの代替として期待されている微生物産生の生分解性ポリエステルであるが，炭素鎖数の異なるモノマーユニットと共重合することで物性が改善することが知られている．本研究では，*M. extorquens* を宿主とした代謝改変によりメタノールから PHA 共重合体を生合成する菌株を育種することを目的とした．
【方法と結果】本菌のメタノール代謝に必須の代謝経路であるエチルマロニル-CoA 経路（EMCP）上に C_5，C_6 モノマーの前駆体であるプロピオニル-CoA とブチリル-CoA が存在することに着目した．まず，PHA 重合酵素を広基質特異性の酵素遺伝子に置換した組換え株をメタノールを炭素源として培養した結果，驚くべきことに重合酵素の置換のみで C_4，C_5，C_6 ユニットが共重合したポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシ吉草酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸）[P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx)]三元共重合体を蓄積したが C_5，C_6 ユニット分率は 1 mol%以下と低かった．つぎに C_5，C_6 モノマー前駆体の供給量を強化するために EMCP を逆行させるエチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼを導入した結果，生育速度が顕著に低下し予想通り EMCP が逆行していることが推測されたが PHA 組成に効果は得られなかった．そこで，モノマー合成経路として逆向きの β-酸化経路を構築した結果，C_5，C_6 ユニット分率が数 mol%まで向上した．また，これらの分率は EMCP の回転が遅い条件で高いことが明らかになった．

Metabolic engineering of *Methylobacterium extorquens* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol

○Izumi Orita, Gento Unno, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words methylotroph, polyhydroxyalkanoate, methanol, biodegradable plastic

3P-H086 *Lactobacillus reuteri* のグリセリン共流加による乳酸生産の抑制

○一瀬 涼, 福田 雄一, 山崎 思乃, 片倉 啓雄
（関西大・化生工）
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】乳酸菌は増殖に伴い著量の乳酸を生産し，培養液の pH は低下する．例えアルカリで pH の低下を抑えても，乳酸自体による阻害のため，乳酸菌の高密度培養や高効率の物質生産は難しい．乳酸菌が乳酸を生産するのは，解糖系で消費した NAD^+を乳酸脱水素酵素（LDH）の反応で再生するためであるから，LDH 以外の系で NAD^+を再生できれば乳酸の生産を抑制できるはずである．本研究では，そのモデルとして，グリセリンから 1,3-propanediol（1,3-PD）を生成し，NAD^+を再生する代謝経路を持つ *Lactobacillus reuteri* JCM1112 株について検討した．
【方法】培養は嫌気的に 37℃で行った．前培養液を 100 mL の MRS 培地に植菌して 3.5 h 撹拌培養し，得られた菌体をグルコースを含まない MRS 培地 100 mL に植菌した．その後，グルコース，もしくは，グルコースとグリセリンを含む MRS 培地を，比増殖速度 0.2 /h に設定して 5 h，NaOH で pH6.5 に制御しつつ指数的に流加した．
【結果と考察】1,3-PD に向かうフラックスはさほど大きくないと予想されたので，グルコースを流加することによって解糖系のフラックスを制限して検討した．グルコースのみを流加した場合，乳酸の比生産速度は 0.85 g/g-cell/h，乳酸あたりの菌体収率は 0.24 g-cell/g-lactate であった．これに対して，グルコースに 2 当量のグリセリンを加えて流加した場合，0.63 g/g-cell/h で 1,3-PD が生産され，乳酸比生産速度は 0.53 g/g-cell/h に抑制され，菌体収率は 0.48 g-cell/g-lactate に増加した．菌体収率は 4 当量のグリセリンを添加した場合に最大の 0.61 g-cell/g-lactate となり，これ以上添加すると逆に低下した．本実験により *L. reuteri* のような LDH 以外の NAD^+再生系を有する乳酸菌であれば，その代謝経路に関わる炭素源とグルコースを共流加することで乳酸の生産を抑えながら培養できる可能性が示唆された．

Suppression of lactic acid production by co-feeding of glycerol with glucose in the culture of *Lactobacillus reuteri*

○Ryo Ichinose, Yuichi Fukuda, Shino Yamasaki-Yashiki, Yoshio Katakura
(Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words *Lactobacillus reuteri*, fed-batch culture, propanediol, glycerol

3P-H087 乳酸菌培養における乳酸生産の抑制

○河合 美桜[1], 原田 里紗[2], 土屋 麻美[3], 依田 伸生[3], 山崎 思乃[4], 福崎 英一郎[2], 片倉 啓雄[4]
([1]関西大院・理工, [2]阪大院・工, [3]明治, [4]関西大・化生工)
katakura@kansai-u.ac.jp

【背景と目的】乳酸菌は糖をピルビン酸に代謝することによって ATP を獲得し，この過程で必要となる NAD^+ を乳酸脱水素酵素（LDH）によりピルビン酸から乳酸へと変換することで再生する．このため，増殖に連動して生産された乳酸が蓄積し，たとえ pH を維持しても乳酸自体による阻害のため，乳酸菌の高密度培養は困難とされている．そこで本研究では，LDH 以外で NAD^+ が再生される経路，もしくは解糖系以外で ATP を獲得する経路を利用することによって乳酸生産の抑制を試みる．
【方法と結果】市販クロレラ粉末（ヤエヤマクロレラ）に 5 倍量の水を加えて沸騰水浴中で 20 分加熱し，オートクレーブ滅菌後に遠心分離により固形分を除いたものを培地として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC12007 などの乳酸菌を培養したところ，MRS 培地における培養と比較して乳酸量が低下した．親水性代謝産物の GC/MS 分析の結果，スクロースを炭素源として増殖していることが示唆された．そこで，グルコースを炭素源として乳酸が著量生産する菌体と，スクロースを炭素源として乳酸生産が抑制された菌体の代謝産物を解析したところ，後者ではコハク酸，リンゴ酸が増加しており，これらの生産による NAD^+ の再生が示唆された．また，オルニチンおよび尿素が増加しており，アルギニンからの ATP 獲得も示唆された．また，MRS 培地でスクロースを炭素源として指数流加培養すると，回分培養と比較して菌体増加量当たりの乳酸生産量が低下した．グルコースで抑制される NAD^+ 再生系や ATP 生産経路の寄与が相対的に高まったことが乳酸生産の抑制につながったと考えられる．

Repression of lactic acid production in cultivations of lactic acid bacteria

○Mio Kawai[1], Risa Harada[2], Asami Tutiya[3], Nobuo Yoda[3], Shino Yamasaki[4], Eiichiro Fukusaki[2], Yoshio Katakura[4]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Kansai Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Meiji Co., Ltd., [4]Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words lactic acid bacteria, sucrose, redox balance, metabolome

3P-H088 生デンプンを基質とした高光学純度 L-乳酸の発酵生産

○植松 元太郎[1], 岡野 憲司[2], 濵 真司[3], 野田 秀夫[3], 近藤 昭彦[4], 本田 孝祐[2]
([1]阪大・工, [2]阪大院・工, [3]Bio-energy, [4]神戸大・院・科イノ)
okano@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【研究背景】乳酸の重合体，ポリ乳酸はバイオマスから製造可能な環境調和型のプラスチックとして普及が期待されている．乳酸には L 体，D 体の光学異性体が存在するが，ポリ乳酸の強度の向上には乳酸を高い光学純度で生産することが重要である．一方，わが国には古米，屑米等の未利用米が豊富に存在し，有効利用が求められている．玄米は微生物の生育に必要な栄養分を豊富に含むため，微生物にデンプンの資化能を付与することで，未利用米のみを原料とした物質生産が可能となる．そこで，本研究では未利用米のみを原料とした乳酸生産に向け，デンプンから高光学純度の L-乳酸を生産する技術の開発を行った．
【方法と結果】乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* はピルビン酸より L-乳酸と D-乳酸のラセミ体を生成する．そこで，D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする *ldhD* 遺伝子の破壊を行ったが，D-乳酸生成の抑制は認められなかった．本株は L-乳酸と D-乳酸の相互変換を行う乳酸ラセマーゼをコードするオペロン（*larA-E*）を有するため，Δ*ldhD* 株の *larA-E* オペロンを破壊した．その結果，D-乳酸の生成が完全に抑制され，L-乳酸のみを生産する株の構築に成功した．続いて Δ*ldhDΔlarA-E* 株に生デンプンの分解能を賦与すべく，生デンプンを強力に分解することが知られる乳酸菌 *Streptococcus bovis* 148 株由来の α-アミラーゼ（AmyA）の分泌発現を行った．得られた株を用いて，100 g/L の生デンプンを基質とした発酵実験を行ったところ，発酵 72 時間で 64 g/L の糖の減少と 51 g/L の乳酸の生産が確認された．また，得られた L-乳酸の光学純度は 99.3% と高い値を示し，生デンプンを基質とした高光学純度の L-乳酸生産に成功した．

Direct production of optically pure L-lactic acid from raw corn starch

○Gentaro Uematsu[1], Kenji Okano[2], Shinji Hama[3], Hideo Noda[3], Akihiko Kondo[4], Kohsuke Honda[2]
([1]Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Bio-energy Corp., [4]Grad. Sch. Sci. Technol. Innovation, Kobe Univ.)

Key words *Lactobacillus plantarum*, L-lactic acid, raw starch, alpha-amylase

3P-H089 ^{13}C 代謝フラックス解析およびプロテオーム解析を用いた *n*-ブタノール生産シアノバクテリア株の代謝解析

○和田 圭介[1], 植林 希代加[1], 戸谷 吉博[1], 傳寶 雄大[2], Putri Sastia[2], 松田 史生[1], 福崎 英一郎[2], Liao James[3], 清水 浩[1]
([1]阪大院・情報, [2]阪大院・工, [3]UCLA・Chem. Eng.)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

n-ブタノール（BuOH）は，ガソリンの代替燃料として利用できる優れた物性のアルコールで，微生物による生産が可能である．先行研究において，6 種類の異種遺伝子を導入した BuOH 生産シアノバクテリア株が構築されたが，大腸菌などの他の微生物による BuOH 生産量と比べると非常に少ないため，代謝改変による生産プロセスの効率化が望まれている．この目的に対し，細胞内の代謝の流れを明らかにできる ^{13}C 代謝フラックス解析および代謝反応を触媒する酵素量を明らかにできるプロテオーム解析を適用し，BuOH 生産株の現在の代謝状態を評価した．BuOH 生産株および BuOH 生合成経路の遺伝子をもたないコントロール株を，150 μE/m²/s の照光下で培養し，対数増殖期中の生育速度および酸素発生速度を調べた．また，対数増殖期中の培養液に $NaH^{13}CO_3$ を添加し，^{13}C 添加後 0-60 分までの細胞を回収し，代謝物の ^{13}C 標識割合（^{13}C 代謝フラックス解析用）および細胞内酵素（プロテオーム解析用）のデータを得た．生育特性について，BuOH 生産株では生育速度および酸素発生速度が低下していた．カルビン回路の炭酸固定反応について，BuOH 生産株では酵素量およびフラックス量共に低下した．シアノバクテリアは光化学系を用いて炭素固定のためのエネルギーを得るため，光化学系の酵素についてプロテオーム解析したところ，BuOH 生産株では光化学系 II およびチトクロムに関する酵素量が低下していることが示された．光化学系の酵素量が低下した理由として生産した BuOH による影響が考えられる．コントロール株を BuOH 含有培地および BuOH を含まない培地で培養したところ，750 mg/L 以上の濃度において増殖速度および酸素発生速度が低下した．このことから，細胞内外の BuOH 濃度に差があり，細胞内の BuOH が BuOH 生産株の生理に悪影響を与えたと考えられる．

^{13}C-metabolic flux analysis and proteomic analysis for *n*-butanol producing strain of *Synechococcus elongatus* PCC 7942

○Keisuke Wada[1], Kiyoka Uebayashi[1], Yoshihiro Toya[1], Yudai Dempo[2], Sastia Putri[2], Fumio Matsuda[1], Eiichiro Fukusaki[2], James Liao[3], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [3]Dept. Chme. Eng., UCLA)

Key words metabolic flux analysis, proteome, *Synechococcus*, butanol

3P-N090 LC/MS-based widely targeted metabolomics for the improvement of 1-butanol titer in transgenic *Synechococcus elongatus*

○Artnice Mega Fathima[1], Walter Lavina[1], Sastia Putri[1], James Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Previous study on cyanobacteria *Synechococcus elongatus* 1-butanol producing strain (BUOHSE) has revealed the reduction step from butanoyl-CoA to butanal as the rate-limiting step in the CoA-dependent pathway. Moreover, an increase in acetyl-CoA synthesis rate was also observed in this strain from an apparent improvement in free CoA regeneration. In the present study, a new strain (DC7) with an improved pduP enzyme activity for conversion of butanoyl-CoA to butanal was constructed using BUOHSE as the back ground strain. Strain DC7 showed a 33% increase in 1-butanol production compared to the BUOHSE strain. For a deeper understanding of the metabolic state of the DC7 strain, widely targeted metabolomics approach using IP-RP-LC/QqQ-MS system was performed. Result showed a decreased level of butanoyl-CoA and increased level of acetyl-CoA in DC7 compared to the BUOHSE strain. This indicated that the previous bottleneck has been solved and free CoA regeneration increased upon the improvement of the pduP enzyme.

LC/MS-based widely targeted metabolomics for the improvement of 1-butanol titer in transgenic *Synechococcus elongatus*

○Artnice Mega Fathima[1], Walter Lavina[1], Sastia Putri[1], James Liao[2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

Key words cyanobacteria, butanol, metabolic analysis, metabolic engineering

3P-H091 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学反応を精緻化したゲノムスケールモデルを用いた様々な光条件における代謝シミュレーション

○豊島 正和, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

光合成生物は光エネルギーを利用し，様々な物質を生産している．しかし，過剰な光エネルギーの利用は光合成システムの傷害を引き起こすため，光合成生物は生育環境に対して光エネルギーの利用効率を最適化している．そのため，光が過剰な環境下で光エネルギーの利用効率を上げるためには，光環境に対する光合成生物の適応メカニズムを理解し，光エネルギーの効率的な利用と過剰光からの防御のバランスを再最適化することが重要である．そこで本研究では，様々な光条件に対する光化学反応の変化を表現できるようなゲノムスケール代謝モデル（GMM）を構築し，シミュレーションを行った．当研究室で開発されたシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の GMM の光化学反応の記述を素反応レベルに精緻化した．この代謝モデルを用いて，光化学系 I と光化学系 II の入射エネルギー比（PSI/PSII 比）を任意に変えたときの代謝の変化をシミュレーションした．PSI/PSII 励起比が小さいときは光化学系での ATP 合成速度が大きく，PSI/PSII 比が大きくなると ATP 合成速度が減少し，NADPH 合成速度が増加した．また，細胞増殖速度も増加した．さらに光化学系 II 複合体の D 1 タンパク質の合成分解式を記述することにより，D 1 タンパク質の分解・修復のためのエネルギー負荷が細胞増殖に与える影響について解析した．受け取る光量子当たりに生じる D1 タンパク質の分解・修復のためのエネルギー負荷量は，細胞増殖に必要なエネルギー量に比較して十分小さく，強光時に見られる増殖阻害を引き起こす主要因でないことが示唆された．このように光化学反応を精緻化した *Synechocystis* sp. PCC 6803 の GMM により様々な光環境における代謝シミュレーションが可能になった．

Metabolic simulation of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 grown under the various light conditions using the genome-scale metabolic model with the detail photosystem reactions

○Masakazu Toyoshima, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words cyanobacteria, photosystem II, metabolic flux

3P-E092 光合成電子伝達系との電子授受を媒介する細胞親和性レドックスポリマー

○中西 周次[1,2], 田中 謙也[2], 金子 真大[3], 石川 聖人[1,4]
（[1]阪大・太陽エネセ, [2]阪大院・基礎工, [3]東大院・工, [4]名大院・工）
nakanishi@chem.es.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】生細胞代謝は多数の酸化還元反応（電子移動反応）の連鎖から成り立っている．生物工学的観点からは，医療・環境・化学など目的は何であれ，細胞内の電子フラックスの自由な制御に対するニーズは高い．我々は，電子移動反応（酸化還元反応）を操ることに長けた電気化学的手法に着目し，生細胞と電極とをつなぐ電子メディエーターとして，細胞親和性の高い両親媒性レドックスポリマーを開発してきた．これまでに，レドックスポリマーの適切な分子設計を介した微生物への電子注入や電子排出を実現している．本発表では，当レドックスポリマーと光合成電子伝達系のプラストキノン（PQ）との間の選択的電子授受について報告する．
【方法・結果】電子メディエーターとしてホスホリルコリン基とフェロセンを含有する両親媒性レドックスポリマー（pMFc，E_M = 0.3 V vs. Ag/AgCl）を使用し，抽出した光合成チラコイド膜を使った in vitro 実験を行った．この実験では，PQ の上流および下流の光合成電子伝達を堰き止める阻害剤（DCMU および DBMIB）と pMFc を共に導入し，光照射により発生する酸素量を定量した．その結果，DBMIB 添加時には酸素発生量は変化しなかったが，DCMU 添加時には酸素発生が停止することが確認された．この結果は，pMFc が電子伝達系の PQ と選択的に相互作用することを明確に示している．pMFc におけるレドックス活性部位が疎水性であることから，疎水性チラコイド膜内にある PQ との選択性が得られたものと推測される．

Cytocompatible redox polymers that specifically interact with the photosynthetic electron transport chain

○Shuji Nakanishi[1,2], Kenya Tanaka[2], Masahiro Kaneko[3], Masahito Ishikawa[1,4]
([1]RCSEC, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [4]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words electrochemical cultivation, photosynthetic bacteria

3P-N093 *Euglena gracilis* における有機酸生産の強化のための培養条件検討

○冨田 結芙子[1], 森 若葉[2], 小山内 崇[1,2]
（[1]明治大院・農, [2]明治大・農）
tosanai@meiji.ac.jp

【背景と目的】*Euglena gracilis* (以下 *E. gracilis*)は，緑藻由来の葉緑体を二次共生により獲得したといわれている真核微細藻類である．一方で鞭毛による自律的な運動性を示すなど，動物的な側面も併せ持つ原生動物の一種であるとされている．近年，*E. gracilis* を用いた物質生産としては，貯蔵多糖であるパラミロンや，化石燃料の代替エネルギーとしてワックスエステルの研究が盛んに行われているが，まだそれらの効率的な生産系は確立されていない．また，*E. gracilis* は嫌気培養時に細胞外にコハク酸や乳酸などの有機酸を細胞外に排出することが知られている．[1)] これらの有機酸は，それぞれバイオプラスチックの原料などに利用することができる有用な化合物である．そこで，*E. gracilis* における有機酸生産を強化させるような条件検討を試みた結果を報告する．
【方法・結果】明・好気条件下で光独立栄養的に生育させた *E. gracilis* を暗・嫌気条件下に移行し，3 日間嫌気培養を行った．嫌気培養後の培養上清中の有機酸量を HPLC にて測定した．条件検討としては，明・好気条件時の窒素欠乏期間と暗・嫌気培養条件を変化させた．窒素欠乏処理としては，窒素充足培地である CM 培地で 14 日間培養した *E. gracilis* を，窒素を除いた CM 培地に移して培養し，嫌気培養を開始するまでの窒素欠乏期間を検討した．また *E. gracilis* は，窒素欠乏の期間によって，細胞内のパラミロンの蓄積量が変化するため，嫌気培養前後におけるパラミロン量の変化および細胞形態の観察を行った．有機酸量に関しては，窒素欠乏の期間によって変動がみられ，パラミロン量に関しては定量・解析中である．

1)Tomita et al. (2016) Succinate and Lactate Production from Euglena gracilis during Dark, Anaerobic Conditions. Frontiers in Microbiology ,7.

Culture condition examination for strengthening organic acid production in *Euglena gracilis*

○Yuko Tomita[1], Wakaba Mori[2], Takashi Osanai[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words production, microorganisms

3P-H094 Milking 方式による藻類バイオ燃料生産の実現に向けた技術基盤の構築

○加藤 明宏[1], 高谷 信之[1,4], 鵜瀬 和秀[1], 池田 和貴[2,4],
愛知 真木子[3,4], 前田 真一[1,4], 小俣 達男[1,4]
（[1]名大院・生命農学, [2]理研・IMS, [3]中部大・応生, [4]JST CREST）
omata@agr.nagoya-u.ac.jp

[背景・目的]
Milking 方式とは，生産物を継続的に細胞外に放出させて回収する生産方法のことを意味しており，①生産物の細胞毒性の緩和による生産性の向上，②生産物の回収コストの削減，③細胞容積の制約がなくなって生産量の上限の拡大などの利点がある．我々は，ラン藻が遺伝子操作によって遊離脂肪酸（FFA）を細胞外へと放出することに着目し，*Synechococcus elongatus* PCC7942 を利用した Milking 方式による FFA の大量生産系の構築を目指している．実用化に向けた目標数値として，FFA の生産速度は 3 mg L^{-1} h^{-1}，細胞乾燥重量あたりの FFA 生産量は 4 g FFA g^{-1} DCW を設定した．
[方法・結果]
野生株由来の FFA 生産株（dAS1T）を作製して生産能力を評価すると，dAS1T では FFA の放出速度が生産速度よりも遅く，生産された FFA の 85%が細胞内に蓄積して生育不良を引き起こしていた．細胞外への FFA の受動拡散を促すために有機溶媒を利用した二相培養系を構築すると，dAS1T の FFA 放出速度は培養期間全体の平均値で 1.5 mg L^{-1} h^{-1}，最大では 3.1 mg L^{-1} h^{-1} に到達した．しかし，二相培養によって細胞の生育も同時に改善したことで，細胞乾燥重量あたりの FFA 放出量は 0.36 g FFA g^{-1}DCW に留まった．そこで細胞の増殖を抑制した状態で FFA を放出させるために，硝酸イオンの取り込みに関与する高親和性輸送体の欠損株から FFA 生産株（dAS2T）を作製し，硝酸イオンを唯一の窒素源とする培地で二相培養した．dAS2T では細胞の生育とともに FFA の放出量も dAS1T の数分の一に減少したが，*S. elongatus* がもつ FFA の排出型輸送体である RND1 を dAS2T で過剰発現させて能動輸送も強化すると，FFA の放出量のみが dAS1T と同程度に回復した．このように，本研究では細胞の増殖と有用物質の生産を切り離すことに成功し，Milking 方式によるバイオ燃料生産に向けた技術基盤を構築することができた．

Establishment of a technical basis for algae-based biofuel production via “Milking”

○Akihiro Kato[1], Nobuyuki Takatani[1,4], Kazuhide Use[1], Kazutaka Ikeda[2,4],
Makiko Aichi[3,4], Shin-ichi Maeda[1,4], Tatsuo Omata[1,4]
([1]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., [2]RIKEN center for Integr, Med. Sci, [3]Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., [4]JST CREST)

Key words cyanobacteria, biodiesel fuel, fatty acid, Milking

3P-H095 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の暗・嫌気条件培養での有機酸生産

○保田 知香, 小山内 崇
（明治大・農）
tosanai@meiji.ac.jp

[背景と目的]シアノバクテリアは酸素発生型の原核光合成生物である．その中で *Synechocystis* sp. PCC 6803 は，増殖が速く形質転換が容易であるため，最も幅広く研究で利用されている．さらに，暗・嫌気条件で有機酸や水素を生成することが知られている．本研究では，培養日数と *Synechocystis* sp. PCC 6803 の有機酸生成の関連性について検討することを目的とした．
[方法] S*ynechocystis* sp. PCC 6803 を OD_{730}= 0.2 になるように BG-11 培地で培養した．それぞれ培養日数を 8, 10, 14, 18 日間に変化させ，培養後に嫌気処理を行った．嫌気処理では，OD_{730}= 20 になるようにバイアル瓶に移し，10 mL の 20 mM Hepes-KOH(pH=7.0)で細胞を懸濁後，N2 ガスを 30 分間吹き込んだ．バイアル瓶をアルミ箔で包んで暗条件とし，30℃で 3 日間振盪培養した．3 日後にガスクロマトグラフィーを用いて水素生成量を測定した．また，バイアル瓶から遠心管に移し，遠心分離(25℃，8000 rpm，2 分間)して菌体と上清に分けた．1 mL 分の上清をエッペンチューブに移し，凍結乾燥機で 1 日間凍結乾燥した．HPLC を用いて有機酸量を測定した．
[結果]培養日数を変化させることで水素生成量および有機酸生成量が変化することが示唆された．水素生成量と有機酸生成量の関連性について解析中である．

Organic acid production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in dark and anaerobic culture

○Chika Yasuda, Takashi Osanai
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words *Synechocystis*

3P-H096 アスタキサンチン生産能を付与した高増殖性ラン藻のトランスクリプトミクスおよび動的メタボロミクス

○高木 綾湖, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神大院・イノベ）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景】赤色カロテノイドであるアスタキサンチン（Ax）は，強力な抗酸化能を有することから栄養補助剤や食品添加剤として利用されている．Ax は緑藻 *Haematococcus pluvialis* による大規模生産が実用化されているが，生育速度が遅く，異種生物の雑菌汚染に対し脆弱であることが課題である．そこで，本研究では新しい Ax 生産宿主として海洋性ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002（*S.* 7002）に着目した．*S.* 7002 は他の藻類と比較して生育が速く，光独立栄養条件下で高密度化するため，Ax の生産性向上が期待できる．
【方法及び結果】*S.* 7002 は Ax を生合成しないため，海洋性細菌 *Brevundimonas* sp. SD212 由来 β-カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子（*crtZ*）および β-カロテンケトラーゼ遺伝子（*crtW*）を相同組換えによって導入し，Ax 生産株（ZW）を作出した．30 ºC，4% (v/v) CO_2，400 µmol photons m^{-2} s^{-1} の光独立栄養条件で 96 時間培養を行ったところ，Ax の生産性は最大で 11 mg/L/day となり，*H. pluvialis* での報告より約 3 倍高くなった．ZW の乾燥菌体重量あたりの全カロテノイド含有率は CT より約 2.4 倍高かった．72 時間培養後のメタボローム解析を行ったところ，ZW は CT と比較して，3-ホスホグリセリン酸，2-ホスホグリセリン酸およびホスホエノールピルビン酸の高い蓄積を示した．また，ZW ではアセチル CoA の蓄積量が低い反面，デオキシキシルロース 5 リン酸の蓄積量が高かった．このことから，*crtZ* および *crtW* 遺伝子の過剰発現は *S.* 7002 の炭素分配を変化させることが示唆された．現在，炭素分配や代謝フラックスの変化を詳細にとらえるため，安定同位体標識炭酸ガス（$^{13}CO_2$）を用いたトレーサー実験を行っている．本講演ではトランスクリプトーム解析と併せて報告し，*crtZ*/*crtW* 遺伝子の過剰発現が *S.* 7002 の一次および二次代謝に与える影響について考察する．

Transcriptomics and dynamic metabolomics of a recombinant astaxanthin-producing and fast-growing cyanobacterium

○Ayako Takaki, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ)

Key words astaxanthin, carotenoid, cyanobacteria, metabolic engineering

3P-H097 ATP 消費系の導入による *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の代謝改変

○岡本 諒太[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・農）
okamotor@brs.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】シアノバクテリアに異種生物由来の遺伝子群からなる合成代謝経路を構築することで，空気中の CO_2 から直接的な有用物質の生産が可能である．このシアノバクテリアによる物質生産を向上させる方法の一つとして，細胞内に蓄積されている Glycogen を物質生産に利用する考えがある．本研究では，Glycogen 合成反応で ATP が利用されることに着目し，別の反応で積極的に ATP を消費させ，Glycogen 合成反応を抑制するという方法を考えた．そのため，シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に，ATP 加水分解酵素である大腸菌由来の ATPase の遺伝子(ATP 消費遺伝子)を導入した．さらに，この株に Glycerol 合成代謝経路を導入し，Glycogen の合成抑制による物質生産への影響を調べた．
【結果・考察】野生株に ATP 消費遺伝子を導入した ATP 消費株では，IPTG 濃度依存的に Glycogen の合成が抑制されたが，特に高濃度の IPTG 存在下では細胞増殖が大きく低下した．この際，Glycogen がほとんど蓄積されず，最も生育した IPTG 濃度は 0.05 mM であった．しかし，この濃度であっても，野生株と比べて生育は悪化した．これは Glycogen 合成反応に必要な ATP だけでなく，生育に必要な ATP も消費したためだと考えられた．この IPTG 濃度で培養すると，Glycerol 生産株は 11.2 mM の Glycerol を生産した．一方，ATP 消費遺伝子を導入した Glycerol 生産株は 15.8 mM の Glycerol を生産し，本手法の有効性が示された．

Metabolic modification of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 by overexpression of ATPase

○Ryota Okamoto[1], Yasutaka Hirokawa[2], Taizo Hanai[2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words ATPase, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, Glycogen, Glycerol production

3P-H098 醤油乳酸菌のアルギニン分解性に関する研究

○脇中 琢良, 渡部 潤, 月岡 祐一郎
（ヤマサ醤油）
wakinaka@yamasa.com

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は，アルギニンをオルニチンへ変換するアルギニンデイミナーゼ経路を有する．この反応は，細胞内で ATP を生産するとともに，遊離したアンモニアが細胞外に放出され乳酸生成による pH 低下を抑制することで，菌の増殖を促進する．諸味中で pH 低下が抑制されると乳酸発酵が過多になるおそれがあり，またこの経路の中間生成物であるシトルリンが生醤油中に存在すると，火入れの際に発がん性が指摘されるカルバミン酸エチルが生じるため，醤油醸造上は好ましくない反応である．*T. halophilus* にはアルギニンをオルニチンへ変換しない株の存在も知られており，実際に醤油諸味から株を分離し，各株のアルギニン分解性を調べたところ，非常に素早くアルギニンを分解する株，全く分解しない株，速度は遅いながらも分解する株など，多様性が確認された．乳酸菌 *Enterococcus faecalis* などではアルギニンデイミナーゼ経路の詳細な解析がなされており，反応へ関与する酵素遺伝子群がクラスターを形成していることが知られている．アルギニン分解性を有する *T. halophilus* NBRC 12172 株のゲノム上にもこのクラスターに相同な遺伝子群がコードされているが，分解性を有さない株がどのような遺伝的背景を持つのかは不明であった．そこで，分解性が異なる株の該当するクラスター部分の DNA シーケンス解析を実施し，比較検討を行った．

A study for the arginine deiminase pathway in *Tetragenococcus halophilus*

○Takura Wakinaka, Jun Watanabe, Yuichiro Tsukioka
(Yamasa Corp.)

Key words lactic acid bacteria, soy sauce, arginine deiminase, *Tetragenococcus*

3P-H099 黄麹菌が生産する難消化性澱粉分解酵素の探索

○伊藤 俊彦, 広幡 千紘, 藤田 直子, 橋爪 克己
（秋田県立大・生資科）
toito@akita-pu.ac.jp

[目的]
澱粉合成酵素及び澱粉分枝酵素のアイソザイム SSIIIa，BEIIb の二重欠損変異体米（ΔSSIIIa/BEIIb）（以下#4019 と表記）は，アミロース含量 46%の超高アミロース米であり，難消化性を示す．演者らはこれまでに＃4019 を基質とし，グルコース生成量で評価する難消化性澱粉分解酵素活性測定法を構築し[1]，焼酎用白麹菌 (*Aspergillus kawachii*)が生産する耐酸性グルコアミラーゼに高い活性を認めた．同様に#4019 を麹米とし，清酒麹菌 (*A. oryzae*) で製麹した麹にも難消化性澱粉分解酵素活性が認められたので関与する酵素を探索した．
[方法]
#4019 を 70%精米したものを原料米とし，清酒用麹菌 (No. 5 : 秋田今野商店) を用いて 31℃, 湿度 90% で 24 時間麹菌を生育した後，手入れを行いその後 38℃, 湿度 85% で 22 時間生育し，出麹とした．得られた麹から 0.5% NaCl を含む酢酸緩衝液で酵素を抽出，透析した後，陰イオン交換クロマトグラフィー (Syncropak AX300 : Eperogen) 及びゲルろ過クロマトグラフィー (TSK gel G3000SW : 東ソー) を用いて精製した．
[結果]
酵素抽出液の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製の過程で難消化性澱粉分解活性が消失したが，２つのクロマトフラクションを混合することで，活性が復活した．これらフラクションの一つはグルコアミラーゼ活性を有し，他方は α-アミラーゼ活性を有する酵素であった．
1) 第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.207

Investigation of resistant starch digestive enzyme form *Aspergillus oryzae*.

○Toshihiko Ito, Chihiro Hirohata, Naoko Fujita, Katsumi Hashizume
(Dept. Bioresour. Sci. Akita Pref. Univ.)

Key words *Aspergillus oryzae*, Resistant starch

3P-N100 紫芋焼酎粕を原料とする機能性飲料および食品開発

○多賀 直彦, 椛田 聖孝, 村田 達郎, 芝田 猛, 荒木 朋洋, 安田 伸, 松田 靖, 本田 憲昭
（東海大・農）
ntaga@agri.u-tokai.ac.jp

【背景】焼酎粕は，焼酎製造時に製品となる焼酎の約 2 倍量発生するため，その処理あるいは利用が求められている．焼酎粕の性質は，物性として粘性の高い泥状の半固体であり，衛生面では腐敗しやすいなど食品として取り扱うのに注意が必要である．紫芋を原料とする焼酎粕は，鮮やかな色調，加熱により衛生的，そのまま食用可能，およびアントシアニン色素など機能性成分を豊富に含むなど，機能性食品原料として多くの利点を有している．【目的】本格焼酎“阿蘇之魂”の紫芋焼酎粕を原料とする機能性飲料および食品の開発を目的とした．紫芋焼酎粕の物性，成分，および加工方法について検討した．【方法・結果】1. 紫芋焼酎粕の取得と取り扱い：高熱の焼酎粕を安全に取り扱う方法および色調に関わる紫芋焼酎粕の温度調整条件を確立した．2.紫芋焼酎粕を部分利用した飲料の開発：飲料メーカーと共同で紫芋焼酎粕を 10%含む飲料を開発した．3. 紫芋焼酎粕の固液分離：紫芋焼酎粕の使用比率の高い飲料開発のため，薮田式固液分離装置で色調が良好な紫芋焼酎粕液分を取得した．4.紫芋焼酎粕液分のアルコール除去：紫芋焼酎粕液分に含まれる 1%弱のエタノールを酢酸発酵により除去した．5.紫芋焼酎粕を原料とするデザートソースの開発：食品メーカーと共同で紫芋焼酎粕への簡単な処理および調味によるデザートソースを開発した．以上から，紫芋焼酎粕を食品原料として利用出来ることが示された．他の焼酎粕への応用が期待される．

Development of beverage and food using distillery wastewater from purple sweet potato

○Naohiko Taga, Kiyotaka Kabata, Tatsurou Murata, Takeshi Shibata, Tomohiro Araki, Shin Yasuda, Yasushi Matsuda, Kenshou Honda
(Sch. Agric., Tokai Univ.)

Key words shochu distillery wastewater, ethanol, acetic acid

3P-N101 α-EG の用途開発

○尾関 健二, 山本 ゆかり, 佐藤 銀河
（金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】α-EG には，動物実験で外用と飲用で荒れ肌改善効果が高いことが報告されている．ヒトでは内外美容素材として非常に有望である結果を取得している．今回外用として現実的な濃度で浴用剤としての可能性を検討する．また真皮層の線維芽細胞に影響が報告されている，低分子量のクロロゲン酸と α-EG との有効濃度の比較を行い，美容素材としての可能性を検証する．
【方法】浴用剤としての評価は，前腕を 42℃で保温後，小仕込の日本酒と一般的な炭酸風呂条件（炭酸水素ナトリウム 30g ＋クエン酸 15g/ 200 L）を混合したパッチ試験を実施し，15 分～120 分後の角質水分量を測定（Corneometer）した（男性 3 名＋女性 5 名，平均年齢 22 歳）．ヒト成人線維芽細胞を用いる細胞実験は，α-EG（208 Da）とクロロゲン酸（345 Da）試薬を希釈し，各試薬を含む DMEM 培地で 48 時間培養し，培地を除去した後，細胞数と細胞が生産しているコラーゲンを定量した．
【結果および考察】パッチ試験では炭酸風呂条件で 0.0005%α-EG 濃度で 120 分後の角質水分量に有意差が認められた．これにより 0.5%α-EG の日本酒（一般的な濃度）200 mL を炭酸風呂 200 L に混合すれば保湿効果が期待でき，日本酒の新たな用途として効果が認められる浴用剤としての展開ができる．線維芽細胞実験では α-EG は 0.24μM（0.000005%）から細胞増殖率およびコラーゲン生産量共に有意差があり，クロロゲン酸では 0.96μM の濃度から共に有意差があり，α-EG の方が低濃度で有効であった．α-EG は飲用で分解をほとんど受けずに小腸からグルコーストランスポーターにより吸収され，毛細血管から線維芽細胞に影響を及ぼすことが推察できる．

Application development of alpha-EG

○Ozeki Kenji, Yamamoto Yukari, Sato Ginga
(Dept. Appl. Biosci., KIT)

Key words alpha-EG, baths, fibroblast

3P-H102 α-EG の美容食品・化粧品素材としてのコラーゲンスコアへの影響

○三井 雅貴[1], 遠藤 佳純[1], 横田 大輝[1], 山本 ゆかり[1], 塩谷 侑子[2], 徳田 耕二[2], 尾関 健二[1]
（[1]金沢工大・バイオ・化学・応用バイオ, [2]車多酒造）
ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

【目的】α-EG には，真皮層にある線維芽細胞の賦活とコラーゲン生産量を増やし，各関連遺伝子発現に低濃度で影響することを報告した．今回コラーゲン密度を測定する装置で，α-EG 純米酒と α-EG 試薬配合ハンドクリームの塗布試験および同純米酒とそのノンアルコール清酒の飲用試験によるコラーゲンスコアへの効果があるか検証する．
【方法】純米酒配合（α-EG 濃度 0.09-0.1%），0.1%α-EG 試薬配合と無配合のハンドクリームを朝晩 2 回，2 週間の前腕内側への塗布試験を行い，週間単位でのコラーゲンスコアの測定（Derma Lab）を行った（1 回目；男性 3 名＋女性 8 名，平均年齢 22 歳．2 回目；男性 4 名＋女性 6 名，平均年齢 22 歳．3 回目；男性 2 名＋女性 9 名，年齢 20～60 代）．飲用試験では 1 回目は 1.7%α-EG 純米酒を毎晩 180mL を 8 日間飲用し，週間単位での前腕でのコラーゲンスコアの測定を行った（男性 6 名+女性 3 名，平均年齢 22 歳）．2 回目はノンアルコール清酒で行った（男性 5 名+女性 3 名，平均年齢 22 歳）．3 回目は 1.1%純米酒を 50 mL，6 日間行った（女性 5 名，年齢 20～40 代）．
【結果・考察】純米酒配合のハンドクリーム塗布試験では，1 回目で無配合に比べ 2 週間で平均 3 ポイントコラーゲンスコアが有意に上昇した．2 回目では 2 週間で試薬配合と純米酒配合が無配合に比べ有意差があり，試薬配合は 5 週目まで有意差が認められた．3 回目では純米酒配合で 2 週間で 7 ポイント程度年齢が高いと大きくなった．飲用試験では 1 回目で開始 1 週間で有意差があり，3 週間目で 22 ポイント程度高くなった．2 回目のノンアルコール清酒では 1 週間で有意差があり，2 週目で 9 ポイント高くなり，3 週目まで有意差が認められた．3 回目では 1 週目で有意差が認められ，4 週目で 9 ポイント高くなった．これらのことにより α-EG はコラーゲンを高める内外美容素材として大いに期待できる．

Effect of collagen score on alpha-EG as internal and external beauty materials

○Masaki Mitsui[1], Kasumi Endo[1], Daiki Yokota[1], Yukari Yamamoto[1], Yuko Siotani[2], Koji Tokuda[2], Kenji Ozeki[1]
([1]Dept.Appl.Biosci.,KIT, [2]Shata Syuzo)

Key words alpha-EG, collagen score, beauty materials

3P-N103 ホエイを原料とする新規酒類の開発-麹菌の種類および材料の選定並びに醸造条件の検討-

○石山 真乃介, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】ホエイとは，チーズ生産の主な副産物で，牛乳成分から乳脂成分やカゼインを除いた水溶液である．1980 年頃まではほとんどのホエイが河川に投棄されており，悪臭の発生や BOD の増加など環境汚染問題を引き起こしたため，ホエイの処理が深刻な問題として浮上した．一方，ホエイは高タンパク，低脂肪で栄養価が高く，機能性についても高い関心が持たれている．そこで，このホエイに注目し，ホエイを原料とした新規酒類の開発を目的として，醸造に用いる麹菌の種類と麹材料の選定，さらに醸造条件を検討した．
【方法・結果】ホエイ中のラクトースを加水分解するために，β-ガラクトシダーゼ活性が最も高くなる麹菌と麹材料の選定を行った．選定の結果，麹菌に *Aspergillus oryzae* の 2 菌株 (液化仕込み，強力糖化)，麹材料に小麦ふすま，加水率 150%で作製した液化仕込み麹および強力糖化麹が最も高い活性を示したため醸造の際にはこれらの麹を用いた．
次に，上述の 2 つの麹および酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて醸造を行った．滅菌および脱タンパク処理をしたホエイに麹を添加し，これを 24 時間ごとにサンプリングを行い糖濃度，β-ガラクトシダーゼ活性，プロテアーゼ活性を測定した．麹によるラクトースの加水分解反応終了後，濾過で麹を除き得られた溶液に酵母を添加し，発酵によるエタノール生産を行った．酵母添加後 24 時間ごとにサンプリングし，糖濃度およびエタノール濃度を測定した．その結果，エタノール濃度は液化仕込み麹を添加したサンプルが 8.5%，強力糖化麹を添加したサンプルが 7.6%にまで達した．またどちらのサンプルも 10 日間で糖をすべて消費した．醸造終了後，HPLC を用いてサンプルに含まれるアミノ酸の分析を行った．以上のことをふまえて，ホエイ由来の新規酒類の醸造の可能性について検討した．

Development of new liquor made from whey - selection of Aspergillus and raw materials for koji preparation, and examination of brewing conditions

○Shinnosuke Ishiyama, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Whey, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

3P-H104 ホエイ由来新規醸造飲料の開発

○山畑 直樹, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】
本研究の目的は，チーズ生産時の副産物であるホエイ（乳清）を用いて新しい醸造飲料を開発することである．乾燥処理後のホエイは約 75%がラクトースであるため，ラクトース資化性の酵母を用いてエタノール発酵を行うことで醸造飲料を開発できる．代表的なラクトース資化性の酵母として *Kluyveromyces lactis* がある．*K. lactis* はエタノール生産量が最大 5 v/v%程度と低く，エタノール生産速度も遅い．一方，他の醸造飲料に一般的に用いられる *Saccharomyces cerevisiae* は，エタノール生産量が高く生産速度も速いが，ラクトースを資化することができない．そこで，*K. lactis* と *S. cerevisiae* をプロトプラスト融合することで，ラクトース資化性かつ高エタノール生産性のハイブリッド酵母をえることができる．このハイブリッド酵母を用いることで，他の酒類と競合しない 8-10 v/v%程度のエタノールを含む新しい醸造飲料の開発が期待できる．

【方法・結果】
本研究ではまず *K. lactis* を用い，10 w/v%ホエイ水溶液から，ホエイ由来醸造飲料をえた．結果，4.8 v/v%のエタノールを含む醸造飲料を開発することができた．次に，ホエイ由来醸造飲料のエタノール濃度を上げるために，ハイブリッド酵母の取得を試みた．最初に親株の発酵特性および還元糖資化性，エタノール耐性を調べた．また，最適なプロトプラスト化条件を検討した．結果，親株である *K. lactis* および *S. cerevisiae* とハイブリッド酵母をスクリーニングする方法として，8 v/v%エタノールを含む YPD 培地を用いる方法が最適であるとわかった．プロトプラスト化に際して，最適な浸透圧条件は 1.2 M ソルビトールを用いたときであった．

Production of fermented beverages made from whey

○Naoki Yamahata, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words yeast, cell fusion, beverage, whey

3P-N105 *Zymomonas mobilis* を用いたホエーを原料とするアルコール発酵および食酢醸造の検討

○荻山 大輝, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】
ホエーはチーズ生産における副産物であり，世界中で大量に生産されている．ホエーにはラクトース，タンパク質，ミネラルといった成分が含まれるため栄養的に優れた素材である．しかし，ホエーは味が悪く，保存性も悪いことからその大部分が廃棄されている．ホエーの活用法としては家畜の餌，バイオエタノール生産への利用があげられるが，ホエーにより高い付加価値を付与する活用法が求められている．本研究ではホエーの栄養分を生かした新規食酢(ラクトー酢)を提案することで，保存性の良い高栄養な食品を作ることでホエーの高付加価値化を試みた．特に，本研究では食酢醸造のエタノール生産段階で，酵母菌よりもエタノール生産速度が速いとされる *Zymomonas mobilis* を使用することで，食酢醸造の効率化を目指している．これにより一般的な食酢とは風味の異なった新規食酢の生産が期待できる．

【方法・結果】
ホエーと水を混合し加熱処理後，濾過し，ホエー液を準備した．ホエー液中に *Aspergillus oryzae* を生育させた小麦ふすまを添加し，ホエー中のラクトースおよびタンパク質を加水分解した．続いて，*Z. mobilis* を添加し，エタノール生産を行った．その後，*Acetobacter pasteurianus* を添加し，酢酸発酵を行った．酢酸発酵終了後，遠心，濾過した液体を 70℃で 30 分火入れ殺菌し，ラクトー酢とした．ラクトー酢中の 17 アミノ酸，Ca^{2+}を測定した結果，17 アミノ酸が市販されている食酢よりも数十倍多く，Ca^{2+}も多く含む栄養価が高い食酢が得られ，ホエーの栄養価を活かした食酢の生産に成功した．また，一般的な食酢には含まれていない機能性成分が含まれていることが確認できた．現在までにホエーを原料とした食酢醸造の基礎を確立でき，現在はスケールアップを検討しつつ，更なる機能性の解明や健康食品としての食酢の利用方法を模索している．

Ethanol Fermentation from Whey Using *Zymomonas mobilis* and Lacto-vinegar Production

○Daiki Ogiyama, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Whey, vinegar, *Zymomonas mobilis*, fermentation

3P-N106 新規調味液 Lact-sho（酪醤）の醸造法の検討

○服部 俊, 若山 守, 林 順司
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】牛乳は，タンパク質やカルシウム，アミノ酸，脂肪などの栄養分を豊富に含む食品であり，様々な有用性が報告されている．一方で，牛乳は保存が難しく，生産の調節が困難であるため，大量に廃棄されることがある．そこで牛乳の新たな有効活用法の探索が望まれている．酪醤は，大豆タンパク質に代わり，牛乳タンパク質を使った醤油様調味料である．酪醤の開発によって，廃棄されている牛乳やホエーの有効利用に繋がるとともに，新たな調味料の創出が期待できる．本研究では，新たな酪醤醸造法の確立を目的として，製麹工程の条件検討を行った．さらに検討した醸造条件において酪醤の仕込みを行い，完成した酪醤の官能検査とアミノ酸分析を行った．
【方法・結果】最初に，麹の原料，加水率の検討を行った．麹原料の検討では，脱脂粉乳麹，カード麹，煎り割砕小麦麹，小麦ふすま麹，混合麹（小麦ふすま：煎り割砕小麦=1：1）を作製し，4 つの活性（プロテアーゼ，β-ガラクトシターゼ，α-アミラーゼ，グルコアミラーゼ）を測定した．その結果，混合麹において各種酵素が最も高い活性を示した．
次に，混合麹を用いた麹の加水率の検討を行った．混合麹を各加水率条件（30，40，50，60，70，80，90，100 %）にて作製し，上記 4 つの活性測定を行った結果，加水率 70 %にて最も高い活性が見られた．これらの条件（混合麹，加水率 70 %）を用いて作製した麹を使い，酪醤を仕込み，醪の経時変化を上記 4 つの活性測定に加え，還元糖定量，乳酸定量，pH，塩濃度にて測定した．完成した酪醤の醪をろ過・火入れし，その後官能調査，HPLC によるアミノ酸分析を行った．官能調査の結果，酪醤は一般的な醤油に比べ塩味とチーズ味が強いことが分かった．

A study on brewing method of a new seasoning Lact-sho

○Shun Hattori, Mamoru Wakayama, Zyunnzi Hayasi
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Lact-sho, soy sauce, kouji, fermented food

3P-H107 甘酒に含まれる脂質成分のマクロファージへの作用解析

○阪本 真由子[1], 藤川 彩美[1], 酒谷 真以[1], 柘植 圭介[2], 北垣 浩志[1]
（[1]佐賀大・農, [2]佐賀工技セ）
ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

甘酒は日本の伝統的な発酵飲料であり，栄養価が高く古くから「飲む点滴」として親しまれてきた．また近年の研究から白血球，特に好中球の数を上昇させる，睡眠障害，下痢便秘を解消するといったさまざまな健康機能が報告され注目が集まっている．[1)]
甘酒は米麹と米を原料としてつくられる．我々は甘酒の原料である麹に糖脂質 N-2′-hydroxyoctadecanoyl-l-O-β-d-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine と N-2′-hydroxyoctadecanoyl-l-O-β-d-galactopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine（β-glycosylceramide）が 8.8±1.9μg/mL と多く含まれていることを明らかにしてきた．iNKT 細胞は抗原提示細胞が示す糖脂質を認識して活性化され癌細胞を攻撃する．そのため iNKT 細胞の活性化は新たな癌治療法とされ注目を集めている．以前の研究から我々は麹に含まれる糖脂質 β-glycosylceramide によって，抗原提示細胞の一種である株化マクロファージ細胞 RAW264.7 が活性化されることを明らかにしてきた．そこで実際に飲用する甘酒の状態においても麹由来 β-glycosylceramide がマクロファージ活性化能を持つか調べた．

［実験方法］
RAW264.7 細胞に被験物質を添加し LPS を用いて炎症を誘発させ，一酸化窒素産生量と生細胞率を測定した．被験物質は甘酒, 0.01 - 10 μL から得られた脂質抽出物を培地 1mL に溶解させ細胞に添加した．

［結果と考察］
甘酒脂質添加区において有意な差は確認されなかったものの，マクロファージの活性化傾向が確認された．また生細胞率に変化が見られなかったことから細胞毒性は示さないことが分かった．本実験では甘酒脂質の添加濃度が低く統計的に有意な差が確認できなかったことが考えられるため，今後被験物質の添加濃度を高めて実験を行いより明確な作用の検証を行っていく予定である．

1)Nagao et al., J Nutr Food Sci 3:223.

Analysis of the influence of amazake lipid fraction on macrophage cells

○Mayuko Sakamoto[1], Ayami Fujikawa[1], Mai Sakatani[1], Keisuke Tsuge[2], Hiroshi Kitagaki[1]
([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Saga Ind. Technol.Center)

Key words Amazake, glycosylceramide, macrophage

3P-H108 麹発酵物より新規に発見された制御性樹状細胞を誘導する 14-デヒドロエルゴステロール

○阿野 泰久[1], 井門 久美子[2], 新藤 一敏[3], 小泉 英樹[2], 藤原 大介[2]
（[1]キリン(株)・健康研, [2]キリン(株)・基盤研, [3]日本女子大）
Yasuhisa_Ano@kirin.co.jp

【目的】日本食は近年の健康ニーズの高まりもあり，世界的に注目が集まっている．日本食の中でも麹菌を使った発酵食品は他国にない特徴である一方，麹発酵食品の健康機能性に関しては未解明な部分が多い．我々は，近年多様な疾患の原因として慢性炎症が注目を集めていることを受け，慢性炎症の抑制に働く制御性樹状細胞(DCreg)を誘導する成分を麹発酵物から探索することにした．
【方式】麹発酵物より各種クロマトグラフィーにより制御性樹状細胞(DCreg)を誘導する活性物質を単離，精製し，NMR を中心とした構造解析を行った．各単離サンプルの活性評価は次のように行った．マウス骨髄由来の樹状細胞を各サンプルおよび LPS で処理し，培養上清中のサイトカインを ELISA にて，樹状細胞(DCs)の細胞表面分子の発現をフローサイトメーターにて評価した．また，同定された活性物質で処理した DCs とナイーブ T 細胞との共培養により，T 細胞の分化に及ぼす影響を評価した．さらに，活性物質のヒト由来細胞への作用について，ヒト末梢血単核球由来の樹状細胞を用いて先と同様に評価した．
【結果】探索の結果，最も比活性が高い化合物として 14-デヒドロエルゴステロール(14-DHE)を同定した．14-DHE はマウス骨髄およびヒト末梢血由来 DCs の炎症刺激に対する IL-12 の産生を抑制し，IL-10 の産生を亢進した．また，MHC classII および CD86 の発現上昇を抑制した．さらに，14-DHE 処理 DCs と共培養した T 細胞は，コントロールと比較して制御性 T 細胞へ分化する割合が有意に増加した．以上の結果により，14-DHE が DCreg の誘導活性を有していることが示された．
【結論】本研究では，制御性樹状細胞(DCreg)を誘導する成分として，麹発酵物から 14-DHE を新規に同定することに成功した．麹由来の 14-DHE は慢性炎症の改善を通じ，多様な慢性疾病予防など健康の維持増進への寄与が期待できる．

Identification of 14-dehydroergosterol from Koji as a novel anti-inflammatory compound inducing tolerogenic dendritic cells

○Yasuhisa Ano[1], Kumiko Ikado[2], Kazutoshi Shindo[3], Hideki Koizumi[2], Daisuke Fujiwara[2]
([1]Res. Lab. for Health Sci., KIRIN Co., Ltd., [2]Central Lab. for Key Technol., KIRIN Co., Ltd., [3]Japan Woman's Univ.)

Key words inflammation, *Aspergillus niger*, sterols

3P-F109 14-デヒドロエルゴステロールを含む白麹 *Aspergillus kawachii* 抽出エキスの経口摂取による肌質改善効果

○杉原 圭彦[1], 生嶋 茂仁[1], 三宅 美加[1], 矢田 幸博[3], 桐浴 隆嘉[2], 藤原 大介[2]
（[1]キリン（株） 健康技術研究所, [2]キリン（株） 基盤技術研究所, [3]筑波大院 グローバル教育院）
Yoshihiko_1_Sugihara@kirin.co.jp

【目的】麹菌を用いた食品から微量成分として同定した 14-デヒドロエルゴステロール（14-DHE）は，制御性樹状細胞（DCreg）を誘導することから，老化形質の原因の一つとされる慢性炎症を改善する効果が期待されている．14-DHE は培養角化細胞の UV-A に対する抵抗性を高めることも報告されているが，ヒトでの効果は今なお明らかにされていない．そこで本研究では，複数の菌種の中から我々が見出した 14-DHE を高生産する菌種により開発した 14-DHE 高含有エキスを経口摂取した際の肌質に与える影響について検討した．
【方法】*Aspergillus* 属を中心に公共バンクで入手した菌株を寒天培地で培養し，その菌体から抽出した 14-DHE の量を評価することで 14-DHE 高生産菌を選抜した．次に，液体培養した選抜菌に対して含水エタノールとナタネ油を混合して，その油層を食用途エキスとして抽出した．肌質への効果を調べるヒト試験は，乾性肌の健常女性 70 名（30 歳以上 50 歳未満）を 35 名ずつの 2 群に分け，14-DHE 含有麹エキスまたはプラセボ（ナタネ油）をそれぞれ 12 週間にわたり 1 日 200 mg 摂取させた（プラセボ対照ダブルブラインド並行群間比較試験）．摂取期間中（0，4，8，12 週）および摂取期間終了 4 週間後に，客観指標として皮膚水分量，主観指標として肌質に関する VAS アンケート調査を実施した．
【結果と考察】最も 14-DHE を高生産する菌種として *Aspergillus kawachii* を選抜し，14-DHE を 0.1%含有する食用途エキスを抽出することができた．14-DHE 含有麹エキスを用いたヒト試験では，34 名ずつが試験を完遂し，14-DHE 摂取群では，プラセボ摂取群に比べて，前腕部の皮膚水分量の有意な増加と主観指標における肌状態の各種パラメータで有意な改善が認められた．以上の結果から，麹菌から見出された抗炎症効果を有する 14-DHE は，健常な肌質形成に寄与する可能性が示唆された．

Improvement of skin conditions by oral administration of *Aspergillus kawachii* (Koji) extract containing 14-dehydroergosterol in human

○Yoshihiko Sugihara[1], Shigehito Ikushima[1], Mika Miyake[1], Yukihiro Yada[3], Takayoshi Kirisako[2], Daisuke Fujiwara[2]
([1]Res. Lab. for Health Sci., KIRIN Co., Ltd., [2]Central Lab. for Key Technol., KIRIN Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Integr. Global Majors, Univ. Tsukuba)

Key words 14-dehydroergosterol, *Koji*, *Aspergillus kawachii*, skin moisture

3P-N110 糠床浸漬による野菜に付着する微生物叢の変化

○古田 吉史, 田中 貴絵, 甲斐 達男
（西南女学院大・保健福祉）
furuta@seinan-jo.ac.jp

【目的】米糠を自然発酵させて調製する糠床に，種々の野菜を漬け込んで造る糠漬けは，日本の伝統的発酵食品の一つである．糠床自体の微生物叢に関する研究は多いものの，糠漬け野菜の微生物叢とその変化についてはほとんど報告されていない．本研究では，糠床にナスとキュウリを漬け込み，それら野菜に付着する微生物叢（一般細菌，酵母，乳酸菌）の変化を調べた．
【方法】85 年以上経過した北九州市近郊の熟成糠床並びに米糠から新たに調製した糠床に，約 18 時間浸漬した（又は未浸漬の）10g の野菜切片を水洗いし，滅菌した 9 倍量の生理食塩水を加えて 120 秒間ストマッカー（Interscience 社製）にかけた後，生菌数を測定した．糠床の生菌数は，各糠床 10g をストマッカー袋に封入後，同様の手順に従い測定した．一般細菌測定には日水製薬株式会社製の標準寒天培地を，酵母測定には 0.01%クロラムフェニコールを添加した YPD 寒天培地を，乳酸菌測定には 1%炭酸カルシウム，0.005%シクロヘキシミド，0.001%アジ化ナトリウムを添加した MRS 寒天培地（BD 社製）を用いた．また，糠床の水分量を 60～75%に調整し，水分量が糠床および野菜に付着する生菌数に及ぼす影響についても併せて検討を行った．
【結果】本研究で使用した糠床間で，乳酸菌数と酵母数，並びにその比率は大きく異なっていた．コントロール（未浸漬の野菜）と比べ糠床に浸漬した野菜では，何れの糠床に浸漬した場合でも，一般細菌数が著しく減少し，乳酸菌数・酵母数は増大した．付着した乳酸菌数・酵母数は全体的にキュウリと比べてナスの方が多く，糠床自体の菌数が多いほど付着菌数も多いと思われた．また，糠床の水分量が高くなるほど，糠床中の菌数および野菜に付着する菌数（特に乳酸菌数）も多くなる傾向にあった．

Changes in Microbiota Adherent to Pickled Vegetables during Nukadoko Fermentation

○Yoshifumi Furuta, Yoshie Tanaka, Tatsuo Kai
(Fac. Health and Welfare, Seinan Jo Gakuin Univ.)

Key words nukadoko, nukazuke, microbiota

3P-H111 ベーカリーのパン種から分離された乳酸菌種について

○伊藤 恵介, 藤本 章人, 成島 典子
（MCフードスペシャリティーズ株式会社 製開研）
Keisuke_Itou@mc-foodspecialties.com

パン種とは穀物に水や糖分を加えて，自然発酵させた乳酸菌と酵母からなる発酵物である．パン種はパンの生地膨張や風味や食感などの品質を高める理由で多くのベーカリーにて種継がれて使用されている．これまで演者らは関西圏ベーカリー（4 店舗）のパン種に含まれる乳酸菌や酵母菌の分離を行った結果，乳酸菌種については各店舗で菌種が異なっており，それぞれ *Lb.brevis*, *Lb.sakei*, *Lb.sanfranciscensis*, *Lb.vaccinostercus* が主要な菌種として同定され，それら乳酸菌の違いがパンの風味や食感の違いに影響を与えていることを報告してきた 1).
本研究では，関東のベーカリー 3 店舗で種継がれ，使用されているパン種を入手し，そこに存在する乳酸菌と酵母菌の同定を行った．乳酸菌は MRS 北原変法培地で検出された菌株を 16S rDNA 配列で，酵母菌は YM 培地で検出したものを，18 S r DNA 配列の解析により同定した．また，食品成分の分析としては有機酸，遊離アミノ酸，糖を HPLC にて定量した．
その結果，酵母菌は全店舗のパン種で *S.cerevisiae* が同定された．一方，乳酸菌は店舗毎に主要な菌種が異なっており，*Lb.helveticus*，*Lb.paracasei*，*Lb.sanfranciscensis* が主要な菌種として同定された．パン種中の食品成分の違いとしては有機酸量，遊離アミノ酸量に違いがみられ，製法や乳酸菌叢が影響を与えているものと考えられた．
関西圏と関東圏におけるベーカリーのパン種の乳酸菌叢に着目すると，*Lb.sanfranciscensis* の検出頻度が高い傾向が見られた．欧米で報告されるように *Lb.sanfranciscensis* はパン種中の主要な乳酸菌種であることが日本のパン種でも考えられた．

Identification of lactic acid bacteria isolated from the sourdough made in bakery shop.

○Keisuke Ito, Akihito Fujimoto, Noriko Narushima
(Food R&D lab.,MC Food Specialties Inc.)

Key words Sourdough, lactic acid bacteria, yeast

3P-H112 Metabolomics-based approach for the study of *Garcinia mangostana* (mangosteen) ripening stages

○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Sobir Ridwani[2], Fenny Martha Dwivany[3], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Center of Tropical Fruit Stud., Bogor Agricultural Univ., [3]School of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Metabolomics, the study of total profiling of metabolites, is an important tool to support postharvest fruit development and ripening studies. Monitoring the changes in the metabolome during fruit ripening is important to obtain insight into the mechanisms involved and improve postharvest management strategies. In this study, a metabolomics-based approach for analysis of small hydrophilic metabolites was conducted to study the ripening of mangosteen. Mangosteen is one of the most important tropical fruits, which is often called as the queen of fruits due to its excellent flavor. Mangosteen is a climacteric fruit with ethylene playing a major role in the regulation of the ripening process and affecting the ripening rate. GC/MS analysis in combination with multivariate analysis of mangosteen from seven ripening stages was performed. We first categorized mangosteen samples in different ripening stages based on color changes, an established indicator of ripening. Using gas chromatography/mass spectrometry, small hydrophilic metabolites were profiled from non-ripened to fully ripened (ripening stages 0 to 6). These metabolites were then correlated with color changes to verify their involvement mangosteen ripening. The results from this study suggests several metabolites might be indicated to play a role in mangosteen fruit ripening process.

Metabolomics-based approach for the study of *Garcinia mangostana* (mangosteen) ripening stages

○Anjaritha Aulia Rizky Parijadi[1], Sobir Ridwani[2], Fenny Martha Dwivany[3], Sastia Prama Putri[1,3], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Center of Tropical Fruit Stud., Bogor Agricultural Univ., [3]School of Life Sci. and Technol., Inst. Technol. Bandung)

Key words *Garcinia mangostana*, mangosteen, ripening stages, metabolomics

3P-H113 Non-targeted metabolomics approach for the discrimination of Indonesian specialty coffee based on species and geographical origin

○Sastia Putri[1,2], Tomoya Irifune[1], Yusianto[3], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, [3]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

The consumption of high quality coffee such as specialty Arabica and fine Robusta coffee is increasing steadily in recent years. Development of single origin coffee is one of the most important strategies to maintain coffee quality, grade and high cupping score. However, there is an increasing concern regarding quality and authenticity of high quality coffee because the method for authentication is limited to cupping test by skilled panelists. Metabolomics is an excellent tool for detection of counterfeit in food products because it can effectively distinguish phytochemical compositions of food among different origins, varieties, and cultivars. In this study, a non-targeted GC/MS metabolome analysis was used to classify high quality Indonesian coffees from different geographical origins such as Java, Sumatra, Bali and Toraja coffee that are well-known in the global specialty coffee market. Extracts of 16 green and roasted coffee beans from different cultivation areas in Indonesia were analyzed and subjected to principal component analysis. Ten Specialty Arabica coffee from 7 cultivation areas and five Fine Robusta from 3 cultivation areas were used to further classify Indonesian coffee according to origin of cultivation. The result from this study demonstrate that the species and origins can be rapidly discriminated by evaluating the major metabolites of green coffee beans using GC/MS-based metabolite profiling. This is the first report of the application of metabolomics to classify Indonesian specialty coffee.

Non-targeted metabolomics approach for the discrimination of Indonesian specialty coffee based on species and geographical origin

○Sastia Putri[1,2], Tomoya Irifune[1], Yusianto[3], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sciences and Technology, Bandung Institute of Technology, [3]Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute)

Key words metabolic analysis, coffee, metabolomics, geographical origin

3P-H114 Evaluation of the effect of chitosan coating on postharvest quality of *Musa acuminata* (banana) using metabolomics approach

○Kana Yamamoto[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sci. and Technol., Inst.Technol. Bandung)
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Metabolomics, the comprehensive analysis of a wide range of metabolites, is an important tool to support postharvest fruit development and ripening studies. In this study, a metabolomics-based approach for the analysis of low molecular weight hydrophilic metabolites was conducted to study the effect of chitosan coating for banana storage to obtain insight of component changes during ripening. Banana is a climacteric fruit in which ethylene plays a major role in ripening. Ethylene increases during ripening simultaneously with respiration rate. Chitosan is one of the promising biopolymers for edible coating which can inhibit the oxygen penetration to the plant tissue. Gas chromatography/mass spectrometry analysis (GC/MS) was performed for banana sampled during ripening. Principal component analysis showed the changes of component profiles during ripening and the difference between control and chitosan-coated group. The results from partial least squares projection to the latent structure showed that several metabolites are correlated to ripening based on a variable importance in the projection score. Some other metabolites that might be related to ripening were inhibited by chitosan coating such as ethylene biosynthesis pathway. This study suggested that GC/MS-based metabolic profiling coupled with multivariate statistical analysis might be valuable for evaluation of the effect of chitosan as an edible coating. This is the first report to identify the difference between non-coated banana and chitosan coated banana.

Evaluation of the effect of chitosan coating on postharvest quality of *Musa acuminata* (banana) using metabolomics approach

○Kana Yamamoto[1], Fenny Martha Dwivany[2], Sastia Prama Putri[1,2], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]School of Life Sci. and Technol., Inst.Technol. Bandung)

Key words edible coating, banana ripening, metabolomics, gas chromatography/mass spectrometry

3P-H115 イメージング質量顕微鏡で「旨味をみる」！

○新間 秀一[1], 三好 航平[2], 村田 貴輝[1], 福崎 英一郎[1]
([1]阪大院・工, [2]阪大・工)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

イメージング質量顕微鏡は，質量分析による試料表面の成分分析から様々な分子が可視化できるツールとして注目されている．その応用範囲は動物やヒト組織を用いた医学・生物学分野以外に広がり，食品においても「ある成分が・どこに・どれだけ」分布しているかを知ることが可能である．このように，新たな技術を新たな分野へ適用することにより，今後新たな視点が提供される期待がある．食品の中でも，特に発酵食品へのイメージング質量分析の適用は，発酵の過程で産生される小分子化合物の，これまで全く未知であった空間分布情報が取得できることから非常に興味を持たれる分野の一つである．しかし，発酵食品をイメージング質量分析法に適用するにあたり，試料形態が極めて特殊であることからサンプル調製法の開発が非常に重要となる．現在我々は鰹節を対象として，「旨味をみる」すなわち旨味成分の空間分布情報を取得しようと試みている．しかしながら，鰹節は食品の中でも最も硬い食品であることが知られており，イメージング質量分析用の試料調製法は存在していない．また，鰹節は近年健康食品としても欧米を始め注目を集めており将来的に研究の発展が見込めるテーマであると期待される．本ポスターでは，イメージング質量顕微鏡を鰹節に適用し，その旨味の成分を「みる」ことで発酵プロセスとの関連を検証することを試みた．鰹節のイメージングに必要な試料前処理法の紹介を含めて本ポスターで議論したい．

Visualization of *Umami* related molecules using Mass Microscope

○Shuichi Shimma[1], Kohei Miyoshi[2], Atsuki Murata[1], Eiichiro Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Eng., Osaka Univ.)

Key words metabolic analysis

3P-H116 大豆ボディ構造体高度可溶化酵素生産麹菌の探索

○中嶋 優里, 笠井 尚哉
（阪府大院・生環科）
kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp

［背景］大豆は良質な脂質やタンパク質を豊富に含み，世界的に広く生産・利用される非常に重要な食品素材である．しかしながら，大豆自体の構成組織やその特徴は十分に解明されておらず，食品素材への利用も十分になされていないのが現状である．大豆細胞は，一次細胞壁（1CW），二次細胞壁（2CW），細胞内部のプロテインボディとオイルボディの貯蔵組織である大豆ボディ構造体（BCSS）から構成されている．これらすべてを可溶化することができれば，新規食品素材・加工への利用などの展開が可能となる．特に，細胞内部のほとんどを占める BCSS は主に膠着性のタンパク質であり，強アルカリ条件下でしかプロテアーゼで可溶化できないことからその利用が困難であった．そこで，中性から弱酸性域で高い BCSS 可溶化活性を有する菌株を麹菌より探索し，得られた酵素による完全消化とその特徴化を行うことを目的とした．
［方法と結果］発酵食品由来の麹菌 44 株をオカラを炭素源として 1％含む液体培地で培養し，その培養上清を別途調製した 1CW，2CW，BCSS ペーストとそれぞれ反応させ，位相差顕微鏡を用いて可溶化を観察確認することでスクリーニングを行った．その結果，1CW，2CW に加えて BCSS に対しても高い可溶化活性を有する 4 菌株を見出すことができた．続いてこれら 4 菌株の可溶化活性をさらに評価するにあたり，それぞれの可溶化活性測定方法を確立した．即ち 1CW，2CW の可溶化活性については位相差顕微鏡を用いて観察し，可溶化した細胞の個数を計測することにより測定，BCSS については豆乳ペーストを基質として反応させた後，ニンヒドリン反応により測定し，評価した．また BCSS 可溶化物について平均ペプチド鎖数を算出したところ，4 菌株ともほぼアミノ酸にまで分解することが確認された．本菌株群は，大豆の一段階高度可溶化に有用であると考えられた．

Exploring for koji high digesting body complex of soybean seed

○Yuri Nakajima, Naoya Kasai
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words soybean, protein

3P-H117 Steam pressure process yields better antibacterial and antioxidant activity in Indonesia traditional fermented soybean

○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)
s152736u@st.go.tuat.ac.jp

Tempe is Indonesian fermented soybean that utilized *Rhizopus oligosporus* as fermentation agent. Experiment was designed by performing boiling and steam pressure to the grain, followed by quantifying retention of nutrition compound, investigating fungal growth, measuring antibacterial and antioxidant activity in both steam pressure and boiling tempe. Antioxidant *in vitro* was evaluated using DPPH, ABTS and reducing power, whereas *in vivo* test was evaluated using *Saccharomyces cerevisiae* as a model. The result shows that steam pressure process have higher retention in carbohydrate, protein, ash and moisture than tempe produced by boiling. High retention in nutrition compound might promoted fungal growth in tempe. Promotion of fungal growth resulted in better antibacterial and antioxidant activity. Stronger anti-bacterial activity was found in steam pressure tempe both in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Anti-bacterial activity in tempe was found in early fermentation and have strongest activity in the middle of fermentation period. Antioxidant *in vitro* test show that anti-oxidant in tempe is tend to increase by fermentation period and has stronger activity in steam pressure tempe. *In vivo* tests using *S. cerevisiae* also clarified that tempe produced by steam pressure released growth arrest faster than boil tempe. Observation in *S.cerevisiae* shows that tempe supplementation might act as adaptogen compound that induce mild stress in short time incubation and trigger resistance against H_2O_2 in long incubation.

Steam pressure process yields better antibacterial and antioxidant activity in Indonesia traditional fermented soybean

○Dewi Kusumah[1], Isamu Maeda[1,2]
([1]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Fac. Agric., Utsunomiya Univ.)

Key words oxidative stress, fermentation, soybean, *Saccharomyces cerevisiae*

3P-I118 脱窒作用を促進させる新規水処理装置の開発

○脇 孝典, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】
止水域において，有機物の流入量が微生物による分解量を上回ると，未分解有機物が底土に蓄積されていく．その結果，底土の微生物への酸素の供給量が低下し，水質悪化が生じる．我々は水域の対流と微生物分解による自浄作用を利用した対流型水処理装置の開発を行ってきた．しかし，現在の装置では脱窒作用が十分ではないことが課題である．これは微生物増幅カラム内の環境が，脱窒菌の生育及び活性が十分でないことが考えられた．本研究では，脱窒菌の生育により適したカラムを製作し，脱窒作用を促進する対流型水処理装置を開発することを目的とした．
【方法】
脱窒菌に適した吸着担体を検討するため，市販の資材に自然池底土中の環境微生物を吸着させ，脱窒カラムを作製した．担体素材として PVA シート，aG10，ZL 団粒ビーズ，マイクロプレス(ソフト)，マイクロプレス(ハード)，ポリエステル培土の 6 素材を用いた．硝酸濃度を高く調整した富栄養水をカラムに通過させ，窒素減少量と担体中の総細菌数の量から各担体の脱窒能を評価し，素材の選択を行った．31 日間の長期的な連続窒素除去実験を行うことで，カラムの生物的浄化能を評価した．
【結果と考察】
6 種類の担体素材すべてにおいて，硝酸態窒素の減少が観測された．特に，PVA シートおよびポリエステル培土において添加したほぼすべての硝酸態窒素が減少した．また，連続窒素除去実験の結果，PVA シート端材カラムに比べてポリエステル培土カラムの方が，約 1.5 倍の窒素除去能があることが分かった．本研究で観測された硝酸態窒素の減少が 31 日間安定的に継続したことから，担体による物理的な吸着ではなく，微生物による脱窒の結果であることが確認できた．以上の結果から，ポリエステル培土が，長期的に高効率な脱窒を可能とする脱窒カラムの保持担体として適していた．

Development of a new water treatment system promoting denitrification.

○Takanori Waki, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words denitrification, bacterial column, water purification, water circulation

3P-I119 Purification of natural static water environment by a new water treatment system

○Nimatus Salamah Lutfi, Yudha Perwira Ima, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)
gr0261ir@ed.ritsumei.ac.jp

[Introduction and Purpose] Ocean and river have naturally purification mechanism through water flow to maintain the organic matter at a low level. While, limited water flow in pond cause inefficient self-purification. A water circulation can be used to reduce carbon and nitrogen in the water by allowing contact between organic materials and bacteria. In previous study, a new water treatment system based on material circulation was constructed. The system consists of microbial columns (semi-aerobic and semi-anaerobic column). The system reduces Chemical Oxygen Demand (COD), Total Carbon (TC) and Total Nitrogen (TN) of the water in small-scale experiment. In this study, purification of natural static water environment by a new water treatment system was carried out.
[Methods and Results] The experiment was carried out in Kitanoshin pond (Kusatsu, Shiga, Japan) from 2014 to 2016. The pond is surrounded by natural forest, with 121 m long, 43 m wide, and 4 m deep. Scaled up and modified new system, was applied to the pond. The microbial column units were placed on pond to enrich microorganisms. A water pump was also set up to circulate water. Water and sediment properties were analyzed for 2 years. This system was able to circulate the water 180 cycle/year. The system successfully increased DO of water (1.3 to 5.5 mg/L), while COD, TC, and TN were decreased 17 to 7, 8 to 7, 0.5 to 0.4 mg/L, respectively. The system increased total bacterial number in the sediment twice, and reduced TC and TN of sediment 1.5 times.

Purification of natural static water environment by a new water treatment system

○Nimatus Salamah Lutfi, Yudha Perwira Ima, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words water treatment, material circulation, semi-aerobic column, semi-anaerobic column

3P-I120 脱窒菌が引き起こす代謝電流による同位体効果の計測

○山田 哲也[1,2], 松下 伸広[2], 中村 龍平[1]
([1]理研, [2]東工大)
ryuhei.nakamura@riken.jp

今日，地球温暖化などの環境の変化が問題視されている．この地球規模での環境変化を調べるためには物質の流れを理解することが必要である．そして，この物質の流れを評価するためには物質循環に関わるそれぞれの素過程における動的同位体効果を理解することが重要になってくる．動的同位体効果とは物質や化合物を構成する同位体により反応速度が変わることを言う．そして，この動的同位体効果を調べることで物質循環のフラックスを定量的に評価し，全地球規模での物質循環を俯瞰的に理解することが可能となる．例えば，動的同位体効果を指標に用いることで地球温暖化の原因となる温室効果ガスがどこで発生し，どこに流れ，どのようにして消えて行くかを予測できるようになる
同位体効果を分析する手法は質量分析器と同位体比赤外分光があり，これら二つの手法は確立されたものであり，極めて精度の高い測定方法である．しかし，非常に高価な分析機器であり，複雑な前処理のような高度な分析技術を要するだけでなく前処理の段階でサンプルの同位体比が変化する可能性もある．さらに，同位体比は反応後の最終生成物の情報であり，実際の生物活動を反映していない．そのため，自然現象というブラックボックスを取り扱うには情報量が少ないと言える．
本研究ではこれまで行なってきた脱窒菌(Pseudomonas stutzeri)が引き起こす細胞外電子移動の研究を応用し，脱窒代謝により発生する微弱電流を計測することで動的同位体効果のモニタリングを試みた．この手法によりこれまでほとんど不可能であった環境中での代謝電流と動的同位体効果を同時かつその場でモニタリングする技術への可能性を見いだした．

Measuring Isotope Effect by Metabolic Current Caused from *Pseudomonas stutzeri*

○Tetsuya Yamada[1,2], Nobuhiro Matsushita[2], Ryuhei Nakamura[1]
([1]Riken, [2]Tokyo Tech)

Key words denitrification, sensor, iron respiration, metabolism

3P-I121 *Acinetobacter baylyi* GFJ2 株の 3,4-ジクロロアニリン分解遺伝子の機能解析

○佐藤 里咲[1], 小林 巧[1], 木内 勇貴[1], Vangnai Alisa[2], 笠井 大輔[1], 福田 雅夫[1]
([1]長岡技科大, [2]Chulalongkorn Univ.)
dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】塩素化芳香族アミン類であるクロロアニリンは，環境中での蓄積性や水性生物・人体への影響が懸念されている環境汚染物質の一つである．*A. baylyi* GFJ2 株は，3,4-ジクロロアニリン (34DCA)や 4-クロロアニリン (4CA)をはじめ，ブロモまたはフルオロ置換された様々なハロゲン化アニリンの分解能を有する．これまでの解析から，本株のクロロアニリン分解に関与すると考えられる遺伝子群が単離された．本遺伝子群には，芳香族化合物の水酸化に関与する酸素添加酵素のオキシゲナーゼとレダクターゼ成分をそれぞれコードすると考えられる *dcdA* 及び *dcdB* が存在した．本研究では，*A. baylyi* GFJ2 株のクロロアニリン分解酵素系の全容解明を目指して，GFJ2 株の *dcdA* 及び *dcdB* の機能解析を行った．
【結果・考察】*dcdA* 及び *dcdB* 遺伝子産物の機能解析を明らかにするために，*E. coli* を宿主として各遺伝子を発現させた．*dcdA* と *dcdB* の片方またはその両方を持つ *E. coli* の休止細胞を用いて 34DCA と反応させた結果，両遺伝子をもつ場合でのみ 34DCA の顕著な分解が示された．以上の結果から，*dcdA* 及び *dcdB* 遺伝子産物が 34DCA 分解に直接関与することが示唆された．*dcdA* 及び *dcdB* を破壊した結果，両遺伝子破壊株は 34DCA 及び 4CA の分解活性を失ったことから，これら遺伝子が GFJ2 株のクロロアニリン分解に必須であることが示唆された．*dcdA* 及び *dcdB* の転写誘導性を明らかにするために，各遺伝子間領域を増幅するプライマーを用いて逆転写 PCR 解析を行った．その結果，34DCA 存在下での培養時に目的サイズの DNA の増幅が観察されたことから，*dcdA* 及び *dcdB* はオペロンを構成しており，それらの転写は 34DCA 代謝時に誘導されることが示唆された．

Identification and characterization of the genes are responsable for the 3,4-dichloroaniline degradation in *Acinetobacter baylyi* GFJ2

○Saki Sato[1], Takumi Kobayashi[1], Yuki Kinouchi[1], Alisa Vangnai[2], Kasai Daisuke[1], Fukuda Masao[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Chulalongkorn Univ.)

Key words chloroaniline, oxygenase, *Acinetobacter*

3P-I122 微生物のゴム分解における残渣の資源としての有効活用法の探索

○一木 葉月, 笈木 宏和
(久留米高専)
oiki@kurume-nct.ac.jp

【背景と目的】
Enterobacter MOE-1 を用いたスチレンブタジエンゴム（SBR）の廃棄物処理では多くの分解残渣が生成するため，その処分が必要となる．そのため，残渣の二次的な利用法の考案が求められている．
我々は，ゴムの微生物分解にて生じた残渣の生物資源としての利用法について，バクテリアに対する残渣の増殖および代謝促進作用を評価した．ゴム分解残渣が増殖，代謝促進作用を示すならば，培地としての利用や代謝産物生産能力の向上などへの応用が期待できる．
【方法】
実験対象として乳酸菌 *L.lactis* NBRC 12007 株とビフィズス菌 *B.Bifidum* JCM 1254 株を使用した．12007 株はナイシンを，1254 株は抱合胆汁酸分解酵素を生産することから，それぞれの菌の生育と代謝産物の生産能について解析を行った．要旨では 12007 株についての操作のみを記す．
Enterobacter MOE-1 を用いた SBR ゴムの分解において生じた残渣を疎水カラムにより吸着分離した．この残渣を CMG 培地に加えて 12007 株を培養し，分光光度計を用いて生育を測定した．また，培養液中のナイシンを抽出し，ペーパーディスク法を用いて *B.subtilis* NBRC 16412 株に対する抗菌活性を評価した．
【結果】
ゴム分解残渣は生育に関して，通常濃度の CMG 培地を使用した際は 12007 株の生育を促進しないが，1/10 濃度 CMG 培地を用いた際は促進することが確認された．よって，12007 株は培地濃度が低い場合，残渣を培地成分と同様に使用できることが示唆された．代謝に関して，通常濃度の CMG 培地を用いた時，分解残渣の添加により抗菌作用の向上が見られた．これより，残渣にはナイシン産生促進作用があると考えられた．一方で，1/10 濃度 CMG 培地を用いた際は，抗菌活性に大きな差が生じなかったことから，12007 株は培地の濃度を高くすることで，残渣を生育から代謝物質生産への利用に切り替えることが推測された．

Research of the effective utilization as useful resource for the rubber residue from rubber decomposing bacteria

○Hazuki Ichiki, Hirokazu Oiki
(Kurume Natl. Coll. Technol.)

Key words biodegradation, *Enterobacter*, *Lactococcus lactis*, bifidobacterium

3P-I123 合成ゴム分解微生物の分解遺伝子解明に関する研究

○笈木 宏和
（久留米高専）
oiki@kurume-nct.ac.jp

車の生産台数の増加により，廃棄されるタイヤの量も増えてきている．そのような中，環境に負荷を与えないゴム製品の微生物処理が注目を集めている．
我々の研究室では，スチレン-ブタジエンゴム(SBR)を栄養源にして利用し，低分子化できる微生物(MOE-1)のスクリーニングに成功しており，特許も取得している．この微生物は生育速度が極めて遅いため，分解能力の強化や生育速度の向上などの分子育種を必要とする．
本研究では，「トランスポゾンを用いた合成ゴム分解微生物変異体の効率的な作成および検出方法の検討」というテーマで，高速ゴム分解微生物の育種を目指す．トランスポゾンには，Ez-Tn5 を使用し，エレクトロポレーション法を用いて挿入を行った．導入効率の比較のため，プラスミドである pJB861 も同様に挿入を行った．MOE-1 のコンピテントセルを使用し，挿入時の電圧および抵抗を変化させて挿入を行い，プレートにまいた後，培養を行った．その結果，同条件においては Ez-Tn5 は pJB861 の 100 の 1 程度しか組み換え体が得られなかった．
各変異体の分解能欠落株の検出は，マイクロプレートを用いたシッフ試薬による染色法を用いた．寒天プレートにラテックス無機培地を作製し，MOE-1 及び比較のための *E.coli* を植菌して培養を行った後，希釈したシッフ試薬を塗布して染色後，亜硫酸ナトリウムによる脱色を行い，染色の度合いを観察した．
野生株を用いて最適なシッフ試薬の濃度および染色時間を検討したところ，培養を 5 日間行った後，24 時間染色を行ったものが最適の染色結果が得られ，かつ大腸菌の染色が確認されなかった．この条件を用いて，変異体染色試験を試みた結果，複数回の試験により染色の行われない株が検出された．同株は今後，次世代シーケンサーによる解析を行い，野生株と比較を行う予定である．

Study of the elucidation of rubber-decomposing mechanism from rubber-decomposing bacteria.

○Hirokazu Oiki
(Kurume Natl. Coll. Technol.)

Key words degradation, bacteria, rubber, transposon mutagenesis

3P-I125 効率的な PET 分解菌スクリーニング方法の開発

○小山内 稚尋, 川西 琢也, 滝口 昇
（金沢大院・自科）
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】ポリエチレンテレフタレート（PET）は，軽くて安価，そして丈夫という特長から，さまざまな用途に利用されている一方，その丈夫さゆえに使用後の処理方法が問題となっている．現在注目されている方法の一つに微生物による分解処理があるが，これまでに知られている PET 分解菌の種類は非常に少なく，実用化にはまだ至っていない．本研究ではより多くの種類の PET 分解菌をより簡便に取得できるスクリーニング方法の開発を目的として，PET 前処理のスクリーニングに与える効果について検討を行った．
【方法】試料として 1 cm 角の PET 片（タキロンシーアイ（株）, PET-6010, 厚さ 1 mm）を用いた．PET を水酸化カリウムのエタノール溶液中にてアルカリ処理した後，生理食塩水で洗浄し，乾燥した．ゴミ埋立地から採取した土壌 1 g を PET 片を加えた 1 M Tris-HCl バッファーで馴養した．7 日後，得られた懸濁液を LB 寒天培地に塗布して培養し，寒天培地上に形成されたコロニーをカウントするとともに単離した．単離した菌体は，PET 片を加えた 1 M Tris-HCl バッファーに再度植菌して 2 週間培養した．エタノールによる脱水処理後に菌体を固定化し，付着した菌体および PET 表面構造を SEM で観察した．
【結果と考察】未処理の PET で馴養したサンプルでは LB 寒天培地上にコロニーの形成が見られなかったのに対し，前処理をしたサンプルでは複数の種類のコロニーが形成された．単離菌体による培養後の PET 片の SEM 像から，PET 片に菌糸体が確認され，また分解痕も確認することができた．アルカリ処理前は分解前の PET 片の表面は平滑であったが，アルカリ処理後に亀裂が発生するなど粗くなっていることから，表面構造の変化により菌体の付着が容易となり，分解菌が取得出来たと考えられる．

Development of efficient screening method for PET degrading bacteria

○Chihiro Osanai, Takuya Kawanishi, Noboru Takiguchi
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

Key words bacteria, degradation, screening

3P-N124 1,4-ジオキサンを分解する微生物コンソーシアムの解析

○李 特[1], 崔 舸[1], 井上 千弘[1], 冨士田 浩二[2],
Shrihari Chandraghatgi[2]
（[1]東北大院・環境, [2]エコサイクル）
inoue@er.kankyo.tohoku.ac.jp

1,4-ジオキサン(1,4-dioxane) は塩素系溶剤の安定剤，抽出・反応用溶剤として幅広く使用されてきたほか，シャンプーなどにも添加されていたため，排水処理場の原水や廃棄物埋立場の浸透水に含まれているが，その分解性は低くしばしば処理水中に残存している．本研究では，排水処理場から採取した汚泥サンプルから 1,4-ジオキサンの分解能力を有するコンソーシアムを作成するとともに，コンソーシアム中の微生物叢の解析を行なった．50ppm の 1,4-ジオキサンを唯一の炭素源として添加した無機塩液体培地を用い，集積培養を 13 代目に渡って繰り返し，安定な 1,4-ジオキサン分解速度を持つコンソーシアムを得た．このコンソーシアムにおいて，1,4－ジオキサンの分解は初期 1 週間程度の誘導期がみられ，その後の 1 週間以内で完全分解し，1,4－ジオキサンの分解に伴って培養液中の細菌数の増加がみられた．1,4－ジオキサンの分解濃度の上限を調べたところ，450ppm までの完全分解が観測された．PCR-DGGE 解析により，コンソーシアム中には 4 種の優占種が存在したことから，平板培地でこれらの単離を試みたところ，うち 3 種を単離できたもののいずれも 1,4－ジオキサン分解活性を示さなかった．

Analysis of 1,4-dioxane degrading consortium

○Toku Ri[1], Ka Sai[1], Chihiro Inoue[1], Koji Fujita[2], Chandraghatgi Shrihari[2]
([1]Grad. Sch. Environ. Stud. Tohoku Univ., [2]Ecocycle Co.,Ltd.)

Key words 1, 4-dioxane, stable enrichiment, bacterial consortium, bioremediation

3P-I126 熱可塑性コポリエステルの酵素分解を促進する前処理方法の検討

○山田 裕次郎[1], 川西 琢也[1,2], 滝口 昇[1,2]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・理工）
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】近年，CFRTP という炭素繊維と熱可塑性樹脂を複合させた新素材が注目されている一方で，有効なリサイクル技術が確立されていないという課題がある．我々はこれまで薬品を用いた前処理による樹脂表面の改質が，酵素分解の早期開始に効果的であることを報告している．本研究では，CFRTP のモデル母材として生分解性を有する新規コポリエステル（APEXA）を想定し，環境配慮や安全性の観点から危険な薬品を使用しない前処理方法として，紫外線照射の効果について検討を行った．
【実験方法】APEXA 表面の前処理には紫外線による光分解を用いた．1 cm 四方に切断した APEXA フィルムに紫外線（λ=254 nm）を室温にて照射した（0, 2, 4, 7 day）．その後，リン酸バッファー（0.05 M, pH 8.0）とリパーゼ TL（名糖産業）の溶液（酵素濃度 5 g/L）5 mL に紫外線照射したフィルムを 1 枚加えて 50℃，160 rpm の条件で 1 週間インキュベートした．紫外線が与えるフィルム表面への影響を評価するため SEM を用いて観察を行った．また，酵素分解後の溶液を HPLC にかけ，分解生成物の測定を行った．
【結果と考察】紫外線照射したフィルムを加えた酵素分解後の溶液から，APEXA の分解生成物を確認することができ，紫外線照射が APEXA の前処理として有効であることが示唆された．SEM 画像の比較から，紫外線の光分解によって APEXA の分子鎖が切断され，フィルム表面構造が劣化したことが推察された．不均一系の酵素分解反応が起こるには固体表面へ酵素が吸着する必要があるため，この表面構造の劣化がフィルム表面への酵素の吸着を容易にして，分解反応を促進したのではないかと考えられる．

The study on the UV-irradiation pretreatment for the acceleration of enzymatic hydrolysis of the thermoplastic co-polyester

○Yuujirou Yamada[1], Takuya kawanishi[1,2], Noboru Takiguchi[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words APEXA, pretreatment, UV-irradiation, enzymatic hydrolysis

3P-N127 *Penicillium* sp. CHY-2 株を用いた炭化水素類化合物の低温条件下における分解

○細貝 俊貴, 藤澤 宗一郎, 矢島 由佳, 張 惓喆
（室工大院・工・環境創生）
ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

【背景・目的】経済発展に伴い，ガソリンなどの石油系燃料の消費が増加しており，同時にガソリンスタンドなどの跡地において残存する炭化水素類化合物による汚染問題が深刻化してきている．ガソリンスタンド跡地は，北海道のような地方圏に多く存在しており，北海道のように寒冷な地域環境にも対応可能な微生物の開発が依然として必要である．本実験では，南極から単離された *Penicillium* sp. CHY-2 株（GeneBank accession number AB980801）の低温下における炭化水素類化合物の分解能力を検討する上，最優先課題といえる最適条件の検討を行い，CHY-2 株の低温環境への適応可能性を評価した．
【方法及び結果】*Penicillium* sp. CHY-2 株による炭化水素類化合物の低温条件下における至適分解条件の検討を行うため，デカンを指標とした至適条件の検討を行った．まず，無機塩培地（MS 培地）にグルコース（5 g/L）を添加したのち，CHY-2 株を植菌し，さらにデカンの最終濃度が 100 mg/L となるように添加し，4℃で 28 日間静置培養をした．培養後は経時的にガスクロマトグラフィー（GC）でデカンの残存濃度の測定を行った．また，培地に 5 種の混合炭化水素類化合物を添加し，4℃で 62 日間静置培養を行った． 4℃下におけるデカン分解の至適 pH 検討の結果，至適 pH は pH6 であった．培養後の GC によるデカン残存濃度の測定結果から，4℃下で最大 81％のデカンの分解が確認できた．また，4℃下で CHY-2 株による 5 種の混合炭化水素類化合物の分解もみられた．混合炭化水素類化合物の分解がみられたことは注目すべき点であり，CHY-2 株が複数の炭化水素類化合物で汚染されている汚染現場に利用できる可能性が示唆された．

Biodegradation of hydrocarbons using *Penicillium* sp. CHY-2 at low temperature conditions

○Toshiki Hosogai, Soichiro Fuzisawa, Yuka Yajima, Young-Cheol Chang
(Grad. Sch. Eng., Muroran Inst. Technol.)

Key words biodegradation, fungi, hydrocarbons, Penicillium

3P-I128 *Ralstonia solanacearum* の走化性センサー遺伝子の機能発現に関する研究

○竹下 正記, 緋田 安希子, Mattana Tunchai, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
jun@hiroshima-u.ac.jp

【背景・目的】走化性とは生物が走化性センサータンパク質（以下，MCP）で化合物を感知して移動する行動である．この MCP を大腸菌は 5 種類保有する．一方で，環境細菌は数十種類の MCP を保有し，より複雑な走化性機構を有すると考えられる．当研究室で研究対象としている青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は 22 種類の MCP（MCP01-22）を保有する．*R. solanacearum* の走化性を解析する中で MCP の機能的発現に関する興味深い現象を発見した．22 MCP を全て破壊した MCP 全破壊株にクエン酸センサー MCP05 のみをプラスミドで再導入したところクエン酸走化性が見られなかった．大腸菌の保有する 5 種類の MCP ではこのような現象は見られてない．このことから多数の MCP を保有する環境細菌では，未だ知られてない MCP 機能発現メカニズムが存在するのではないか．そこで本研究では *R. solanacearum* の MCP05 をモデルに MCP の機能的発現に関する解析を行った．
【方法・結果】MCP05 は MCP 単独発現株で機能しなかった．では他の MCP が存在する場合はどのようになるのか．22 MCP を段階的に破壊した MCP 多重破壊株を用いた解析を行った．MCP 多重破壊株に MCP05 をプラスミドで再導入しクエン酸走化性を測定したところ，MCP03 を破壊することでクエン酸走化性が見られなくなった．このことから MCP05 の機能には MCP03 の存在が重要である可能性が示唆された．そこで MCP03 と 05 の二つのセンサーのみを持つ株を作製し解析を行った．その結果，クエン酸走化性が回復し，このことから確かに MCP03 が存在することで MCP05 が機能することが証明された．MCP は細菌細胞膜上でホモ二量体をとして存在するとされている．しかし MCP の中には異種 MCP がヘテロ二量体を形成して相互に作用して機能を獲得するものもあるのかもしれない．現在この仮説を検証すべく，さらなる解析を行っている．

Study on functional expression of chemotactic sensor gene in *Ralstonia solanacearum*

○Masaki Takshita, akiko Hida, Tunchai Mattana, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, methyl-accepting chemotaxis protein, expression

3P-I129 アゾ染料の微生物分解に関する研究（第 3 報）

○鈴木 健太, 中川 克彦, 牛尾 一利, 早瀬 伸樹
（新居浜高専）
hayase@chem.niihama-nct.ac.jp

【背景・目的】合成染料の一種であるアゾ染料は，様々な用途で多量に利用されており，廃水に含まれるアゾ染料が下水や環境中に放出され問題となっている．これまでの研究より，アゾ染料は，嫌気条件下において比較的容易に微生物によりアゾ結合が還元的に開裂され芳香族アミンが生成することが明らかになっている．ここで生成する芳香族アミン化合物は難分解性で，環境や人体に悪影響を及ぼす原因の一つになっているため，アゾ染料を完全に分解し，無毒化することが必要である．そこで，本研究では，アゾ染料の一種である OrangeII をモデルとして，完全分解，無毒化する系の検討を試みた．
【方法・結果】土壌より OrangeII 脱色能力の優れた微生物を 6 株単離した．OrangeII を含む L 液体培地に分離菌株を植菌して静置培養し，OrangeII の脱色を観察したところ 24 時間で 90%以上の脱色率を示した．その培養液上清を HPLC で測定したところ，脱色に伴って化学量論的にスルファニル酸の生成が観察され，アゾ結合の還元的開裂が示唆された．一方，振とう培養では，静置培養と比較すると OrangeII の脱色速度及び最終脱色率は低く，スルファニル酸への変換率も低かった．現在，OrangeII 脱色微生物と当研究室で単離したスルファニル酸分解微生物を組み合わせて OrangeII の完全な無毒化について検討を行っている．

Biodegradation of azo dyes

○Kenta Suzuki, Katsuhiko Nakagawa, Kazutoshi Ushio, Nobuki Hayase
(Niihama Natl. Coll. Technol.)

Key words azo dye, biodegradation

3P-I130 ビーチロック周辺から単離したウレアーゼ生産菌 *Pararhodobacter* sp.の全細胞酵素活性評価

○中島 一紀, 藤田 賢大, 川﨑 了
（北大院・工）
nakashima@geo-er.eng.hokudai.ac.jp

【緒言】 微生物を利用した環境負荷の小さい地盤改良技術の研究が国内外で注目されている．尿素分解酵素（ウレアーゼ）を用いる系では，尿素がウレアーゼにより加水分解され，アンモニア（アルカリ性）と共に炭酸イオンが生成し，溶液中に Ca^{2+} イオンが共存すると炭酸カルシウム（$CaCO_3$）を析出させる．生成した $CaCO_3$ は土壌粒子を結合するための強力なセメント物質として利用することができる．我々は，沖縄のビーチロック周辺からウレアーゼ生産菌 *Pararhodobacter* sp.を単離し，この微生物と尿素および $CaCl_2$ を用いることで砂供試体の固化に成功している．固化反応を効率的に行うためには，微生物のウレアーゼ活性の定量評価が重要である．本研究では，*Pararhodobacter* sp.の whole-cell でのウレアーゼ活性評価と酵素の局在について検討した．
【実験】 海洋性細菌用 Zobell 2216 培地を用いて *Pararhodobacter* sp.を 30℃で培養した．一定時間ごとに培養液を採取し，0.3M 尿素を含む基質溶液に添加することで尿素の加水分解反応を行った．分解により生じたアンモニアをアンモニアメーターで測定することでウレアーゼ活性を算出した．また，2 日目の培養液を用い，培養上清および菌体の活性，菌体破砕液の可溶・不溶性画分の活性の評価，および Native-PAGE を行った．
【結果と考察】 *Pararhodobacter* sp.の増殖とともにウレアーゼ活性が増加し，14 日後においても高い活性を維持していた．培養液（2 日）の上清にはウレアーゼ活性はほとんど見られず，菌体に活性が見られたことからウレアーゼは分泌されていないことが推察された．菌体破砕液では可溶性画分に高いウレアーゼ活性が確認され，可溶性画分の Native-PAGE においてもゲル上にてウレアーゼ活性を検出した．
【参考文献】 M. Fujita et al., *Biochemical Engineering Journal*, 124, 1-5, 2017.

Evaluation of urease activity of *Pararhodobacter* sp. isolated from periphery of beachrock

○Kazunori Nakashima, Masahiro Fujita, Satoru Kawasaki
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words growth rate, environmental bacteria, soil

3P-F131 Designing a microbial co-culture for ammonification and nitrification of organic nitrogen

○You-Shan Tsai[1], Sakuntala Saijai[1], Akinori Ando[1,2], Wakako Okada[1], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Jun Ogawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO)
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

Ammonification and nitrification of organic nitrogen occurs in soil, even though most autotrophic nitrifying bacteria are not able to metabolize organic nitrogen compounds. Designing a simple system is required for the investigation of complex interactions of soil microbial communities. In this study, we construct a simple microbial co-culture using a heterotrophic bacterium, an ammonia-oxidizing bacterium, and a nitrite-oxidizing bacterium to perform ammonification and nitrification.
Twelve heterotrophic bacteria were selected as candidates for co-cultivation with Nitrosomonas europaea NBRC 14298 and Nitrobacter winogradskyi NBRC 14297 to promote ammonification and nitrification of organic nitrogen under aerobic conditions. The strains were co-cultivated with various kinds of organic compounds at a concentration below 0.2%(w/v), a C/N ratio of 10 to 50, and a pH of 7-10. The co-culture of Bacillus badius NBRC 15713 with nitrifying bacteria showed enhanced ammonification and nitrification. Complete nitrification was achieved within 11 days in the medium containing Polypepton NF (Total-N 120 mg, C/N ratio 10) at 28 ℃. The population of nitrifying bacteria was analyzed by RT-PCR. Results showed that the increase in the population of N. europaea and N. winogradskyi was related to increase of nitrite and nitrate concentration respectively. This simplified co-culture system can be used for further study in ammonification and nitrification of organic nitrogen.

Designing a microbial co-culture for ammonification and nitrification of organic nitrogen

○You-Shan Tsai[1], Sakuntala Saijai[1], Akinori Ando[1,2], Wakako Okada[1], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Makoto Shinohara[5], Jun Ogawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO)

Key words nitrification, nitrifying bacteria, coculture

3P-I132 自家発酵熱型高温好気消化プロセスによるし尿の液肥化における諸要因の解明

○田代 幸寛, 朝倉 侑弥, 柴崎 良直, 酒井 謙二
（九大院・生資環）
tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】福岡県築上町では，自家発酵熱型高温好気消化プロセスにより，し尿を液肥へ変換している．実機における理化学特性・細菌群集構造解析より，本プロセスはユニークな 3 段階で進行することを初めて報告した（Tashiro et al., in revision）．本プロセスの更なる解明・効率化を目指すには，小規模な検討が現実的かつ有効であるが，これまでにラボスケールで再現した報告はない．そこで本研究では，ラボスケール発酵槽による実機の本プロセスの再現を目的とした．
【方法】発酵槽には，かくはんにより空気を自発的に取り込む，自吸式通気かくはん発酵槽を用い，実機の温度変化の再現に成功している（前回大会 3P-1a105）．発酵槽にし尿試料 1.0 L を張り込み，実機の温度変化を再現できるプログラムを用いて，10 日間発酵した．実機の常在細菌の影響を検討するため，実機における発酵終了後の発酵液を種菌として 5%(v/v)添加したし尿および種菌無添加のし尿を用いて，K_La13.6 h^{-1}，かくはん速度 490 rpm で発酵を行った．さらに，かくはん速度が発酵中の微生物に及ぼす影響を検討するため，吸気量を絞り，かくはん速度を 1000 rpm で同等の K_La 値で発酵を行った．
【結果・考察】種菌を添加した場合，1 段階から 2 段階への変遷が 1 日早くなり，全炭素の減少率も高くなったが，種菌添加の有無に関わらず，アンモニア態窒素濃度および全窒素の減少率は実機よりも著しく高くなり，細菌群集構造も実機とは異なる変遷を示した．一方，吸気量を減少してかくはん速度を増加した場合，DO，ORP，pH，有機酸に加えて，アンモニア態窒素濃度・全炭素・全窒素の減少率は実機と類似した．さらに，細菌群集構造も 1 段階および 3 段階で実機と同一のクラスターで変遷した．以上より，かくはん速度が本プロセスで重要要因として特定され，本プロセスを再現できる可能性を示した．

Elucidateion of factors in autothermal thermophilic aerobic digestion process for conversion of human excreta to liquid fertilizer

○Yukihiro Tashiro, Yuya Asakura, Yoshinao Shibasaki, Kenji Sakai
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words autothermal thermophilic aerobic digestion, bacterial community structure, self-inducing reactor, human excreta

3P-I133 大腸菌の自発的なフロック形成と有害物分解への利用

○大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之
（阪市大院・工・化生系）
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【目的】環境微生物の一部は，フロックと呼ばれる凝集体を形成する．微生物フロックは静置による沈降・回収が容易であることから活性汚泥法等の水処理技術で利用されている．本研究グループは，通常フロックを形成しない大腸菌に，セルロース生合成経路の遺伝子 *bcsB* を過剰発現させることにより，数 mm 程度の大きさのフロックが自発的に形成することを報告している．本研究ではこの大腸菌フロックを利用した有害物分解について検討を行った．
【方法および結果】有機リン系農薬であるパラチオンの中間分解物であるパラオキソンは強力なアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として働き，毒性が強い．*bcsB* を過剰発現した大腸菌に対して，さらに *Brevundimonas diminuta* 由来のパラオキソン分解酵素である phosphotriesterase（PTE）を発現するプラスミドを導入し，グルコースを含む LB 培地で 37℃，一晩培養し，フロックを形成させた．得られたフロックについて，ウェスタンブロットにより PTE の発現を確認した．続いて，分解反応としてパラオキソン 10 μM に対して，精製したフロックをタンパク質量換算で 67 μg/mL 加え，25℃で 1 時間反応させた．反応後，フロックを遠心分離で取り除き上清の吸光度を測定したところ，PTE を発現させたフロックでは約 90％のパラオキソンが分解されていた．一方で，PTE を発現させていないフロックでは，ほとんど分解は確認されなかった．
以上の結果より，自発的に形成する大腸菌フロックを機能化することで，有害物分解反応への利用が可能であることが実証された．

Functionalization of *Escherichia coli* floc and its application to degradation of toxic compounds

○Mio Otsuka, Yoshihiro Ojima, Masayuki Azuma
(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch.Eng., Osaka City Univ.)

Key words flocculation, *Escherichia coli*, degradation, paraoxon

3P-N134 固定床担体による廃水処理バイオリアクターの反応制御と効率化

○上野 嘉之[1], 多田羅 昌浩[1], 北島 洋二[2]
（[1]鹿島技術研究所, [2]鹿島環境本部）
uenoyo@kajima.com

廃水処理では，自然界に存在する微生物を単離することなく，混合系で浄化を行う．固定床式リアクターは，微生物付着担体を反応槽に充填することで，菌体を高濃度化し反応速度を向上させる，また，増殖の遅い微生物を連続式反応槽内に留めることを可能にするリアクター様式である．
筆者らは，各種廃水処理バイオリアクターの目的に応じて，担体素材，および形状を検討し，培養条件とともに機能の最大化を図ってきた．本報では，三種類の連続固定床式バイオリアクターについて，パフォーマンスと菌叢を関連付けて評価した結果を報告する．
（1）メタン発酵：炭素繊維不織布にメタン生成菌が高濃度に付着し，一方で，発酵液画分ではメタン生成菌はウォッシュアウトし，加水分解菌の割合が高いことがわかった．高効率なメタン発酵は，固定床部が効果的に働くことにより可能になっているものと考えられた．
（2）部分亜硝酸化：アナモックス反応では，反応基質である亜硝酸の安定的な供給が必要である．ポリエステル製スケルトン担体を用いることで，アンモニア酸化菌（AOB）を特異的に付着させ，バイオフィルムの成長を一定量以下に制御することで，亜硝酸酸化菌の反応を抑制し，アンモニアから安定的に等モルのアンモニアと亜硝酸が生成できるものと考えられた．
（3）一槽式アナモックス：ポリ塩化ビニリデン製リングレース担体を用いることで，アナモックス菌を高濃度に保持するとともに，曝気を制御することで，好気性の AOB との共生バイオフィルムを構成できるものと考えられた．
これらの結果は，固定床自体が，菌体の高濃度化以外の機能を有し，担体の種類や形状によって，目的に応じたリアクター内の反応制御が可能であることを示唆している．

Performance enhancement and controll by selection of media spicies in packed-bed reactor

○Yoshiyuki Ueno[1], Masahiro Tatara[1], Youji Kitajima[2]
([1]Kajima Tech. Res. Inst., [2]Kajima Corp. Env. Div.)

Key words biofilm, methane fermentation, anaerobic ammonium oxidation, nitritation

3P-N135 酸性鉱山廃水処理に有用な鉄酸化細菌の単離と性質

○上村 一雄[1], 山本 康次郎[1], 渡邉 里咲[3], 赤堀 文雄[4], 高田 潤[2], 金尾 忠芳[1]
([1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大院・自科, [3]岡山大・農, [4]卯根倉鉱業)
kamimura@okayama-u.ac.jp

【背景と目的】 閉山された鉱山などからは重金属を含んだ酸性鉱山廃水が流出し，河川や湖の酸性化・重金属汚染などの環境問題の原因となっている．これらの問題を解決するため，pH 2 付近で生育する鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* によって Fe^{2+}を Fe^{3+}に酸化した後，$CaCO_3$ で中和しすることによって，Fe^{3+}の除去が行われている．この鉱山廃水処理は，鉱山内に鉱石が存在する限り続くため，処理コストの低減が望まれている．本研究では，鉱山廃水処理施設に流れ込む鉱山廃水の pH である pH 3.5 付近で鉄を酸化して生育する鉄酸化細菌を処理システムに使用することによって，中和に要するコストを低減化することを目的に，柵原鉱山処理施設および周辺環境から中等度酸性環境で生育する鉄酸化細菌の探索および単離・培養を試みた．
【方法と結果】 岡山県美咲町の柵原鉱山廃水処理施設内鉄酸化槽から採取した試料の微生物群集を DGGE で分析した結果，これまで鉄酸化処理槽内では，*A. ferrooxidans* が鉄を酸化していると考えられていたが，*Ferrovum* に近縁な鉄酸化細菌が優勢な菌として検出された．*Ferrovum* は中等度酸性環境で生育するという報告があり，処理システムに利用できるのではないかと考え，培地組成や温度を変えて培養を行った結果，APPW 培地を用い 20℃で培養を行うことで，*Ferrovum* が優勢に生育する培養液を得ることに成功した．アガロースの重層培地を用いて *Ferrovum* に近縁な新規の鉄酸化細菌が単離できた．また，旧坑道内貯留池から採取した試料を解析した結果，中性～弱酸性環境に生育すると報告のある *Gallionella* 属に近縁な鉄酸化細菌が検出された．重層培地を用いて，新規な *Gallionella* に近縁な細菌の単離にも成功し，その性質を明らかにした．

Isolation and characterization of iron-oxidizing acidophiles useful for treatment of acid mine drainage

○Kazuo Kamimura[1], Koujiro Yamamoto[1], Risa Watanabe[3], Fumio Akahori[4], Jun Takada[2], Tadayoshi Kanao[1]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ., [3]Fac. Agric., Okayama Univ., [4]Unekura Mining)

Key words acid mine, iron oxidation, acidophile

3P-I136 *De novo* RNA-seq：活性汚泥微生物群の網羅的遺伝子発現解析で見えた希少種の決定的な役割

○佐藤 由也[1], 堀 知行[1], 小池 英明[2], Navarro Ronald[1], 尾形 敦[1], 羽部 浩[1]
([1]産総研・環境管理, [2]産総研・生物プロセス)
yuya-satou@aist.go.jp

【背景・目的】活性汚泥は 100 年以上世界中で水処理に利用されてきた，最も身近で重要なバイオテクノロジーといえる．しかし数千種以上の微生物で構成される複雑なコミュニティであるため，その水処理メカニズムは今なおブラックボックスとして残り，予期せぬトラブルが尽きないのが現状である．本研究ではこの課題を解決すべく，遺伝子発現解析（RNA-seq）を活性汚泥に適用した．従来，ゲノム情報に乏しい活性汚泥には同手法は利用できなかったが，鋳型ゲノムに依存しない *de novo* assembling アプローチを採用することでこれを打開し，微生物コミュニティによる複雑な水処理反応の解明に挑んだ．
【結果・考察】対象としたのは難分解性の重油含有廃水を処理するバイオリアクターである．２つのリアクターを同じ条件で運転したにもかかわらず，両リアクターの重油処理性能には大きな差が生じた．RNA-seq 解析を行ったところ，重油主成分のアルカンは嫌気的に分解されており，それら分解酵素は主に脱窒菌が発現していることが示された．一方で，分解酵素の発現量は両リアクター間で大差なく，重油処理性能を二分する要因は別にあることが示唆された．そこで脱窒菌の呼吸基質である NO_3^-に着目した．NO_3^-は脱窒菌の活性維持に重要であるが，廃水成分には含まれていなかったため，由来となりうる窒素化合物代謝系を解析した．その結果，アンモニア酸化系遺伝子の発現量には大きな差があり，高処理能リアクターでのみ，廃水成分の NH_4^+から NO_3^-が効率的に生成され，脱窒菌の重油分解が促進されていたことが明らかになった．興味深いことに，アンモニア酸化細菌群の存在量は全体の 0.25%にも満たないわずかなものであったが，この希少種の活性によって水処理システム（微生物コミュニティ）全体の重油分解活性が左右されていたことを見出した．

Metatranscriptome analysis revealed a crucial role of minor microbes in heavy-oil degradation by activated sludge

○Yuya Sato[1], Tomoyuki Hori[1], Hideaki Koike[2], Ronald Navarro[1], Atsushi Ogata[1], Hiroshi Habe[1]
([1]EMRI, AIST, [2]BRI. AIST)

Key words activated sludge, transcriptome, wastewater treatment, bioinformatics

3P-I137 固定化光合成細菌ビーズを用いたバイオリアクターによる廃液中のセシウム除去及び放射能除去

○佐々木 慧[1], 中村 薫[1], 佐々木 健[1], 松尾 健司[2], 中島田 豊[2], 金原 和秀[3], 大塚 祐一郎[4], 中村 雅哉[4], 加藤 純一[2]
([1]広島国際学院大院・工, [2]広島大院・先端物質, [3]静岡大院・工・化学バイオ, [4]森林総合研)
j.sasaki@hkg.ac.jp

福島県内には今もなお放射能に汚染されたバイオマス等が大量に仮保管されており，その処理が問題になっている．我々は汚染されたバイオマスを湿式ミリングにより糖化させ，その糖化液をメタン発酵させることで減容化する技術を開発している．この度はその過程で生じる放射能に汚染された廃液から，光合成細菌を固定化したビーズを用いて放射性物質を吸着除去する試験を行った．
方法：光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* SSI 株は水中の重金属を吸着除去する性質がある．この菌体をアルギン酸 Na で固定化し，直径約 1cm の球状に成型した(SSI ビーズ)．リアクターに処理液と SSI ビーズを入れ，30℃，通気条件の下で 4~12 日間浄化処理を行った．Cs を含む人工下水を用いた試験では，エアリフト式，多段式，ロータリー式の 3 種のバイオリアクターを用い，様々な条件下で Cs の減少率を測定した．放射能に汚染されたイナワラ粉末液，及びこれを糖化してメタン発酵して生じるメタン発酵消化液の浄化試験には多段式バイオリアクターを用いた．
結果：10 mg/L の Cs を含む人工下水を用いた試験では，多段式バイオリアクターでは最大除去率 99.1%となり，3 種のリアクターの中で最も除去率が高くなった．イナワラ粉末液を用いた試験では，放射能が最大で 3260 Bq/kg から 889 Bq/kg まで減少した．またメタン発酵消化液を用いた試験では，499 Bq/kg から 263 Bq/kg まで減少した．加えてこれらの試験では COD を減少させることができた．以上のように SSI ビーズを用いることで放射能に汚染された廃液から，放射性物質を吸着除去可能であることを実証できた．なお本研究は，文科省国家課題対応型研究開発推進事業“原子力基礎基盤研究イニシアティブ”の委託費で行った．

Removal of cesium and radioactivity in waste liquid with bioreactor using immobilized photosynthetic bacteria beads

○Kei Sasaki[1], Kaoru Nakamura[1], Ken Sasaki[1], Kenji Matsuo[2], Yutaka Nakashimada[2], Kazuhide Kimbara[3], Yuichiro Otsuka[4], Masaya Nakamura[4], Junichiro Kato[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Kokusai Gakuin Univ., [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [3]Dept. Appl. Chem. Biochem. Eng. Grad. Sch. Eng. Shizuoka Univ., [4]Forestry and Forest Products Res. Ins.)

Key words radioactivity removal, cecium removal, photosynthetic bacteria beads, bioreactor

3P-I138 水中からアンチモンを除去する微生物集積系の構築と特性評価

○森 健太朗[1], 馬形 さやか[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]立命館大・理工)
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】アンチモン(Sb)は，繊維製品の難援助剤や化合物半導体材料などの様々な製品に利用されている．一方で，生体への毒性が高いため，水質環境基準の要監視項目に指定されているが，従来の方法では除去が難しく，有効な処理技術の開発が必要である．一方，液相の Sb(V)を Sb(III)へと還元し，硫化物として沈殿させる微生物がこれまでに報告されており [1]，低コスト・低環境負荷な環境調和型の Sb 除去プロセスへの応用が期待されている．本研究では，微生物による Sb 除去技術の確立を研究目的とし，水中から Sb を除去する微生物集積系を構築し，その特性を評価した．
【実験方法】十三干潟(大阪府)から採取した底質試料 1 g-wet を，100 mg-Sb/L の $K[Sb(OH)_6]$，2 mM の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$(硫黄(S)源)，2 mM の乳酸(炭素源)を含む無機塩培地 20 mL に懸濁してバイアル瓶に密封し，気相部を N_2 ガスで置換した嫌気条件・28°C で回転振盪(120rpm)した．硫化アンチモン(Sb_2S_3)特有の橙色沈殿物の形成を確認後，培養液 0.2 mL を新たな培地に継代することを繰り返した．また対照実験として，底質を入れない系を用いて同様の実験を行った．
【結果・考察】培養の結果，溶存 Sb 濃度が減少し，それに伴い橙色の沈殿物の形成が確認された．この反応は，対照系において観察されなかったことから，微生物作用によるものであることが示唆された．生じた沈殿物を TEM-EDX で観察したところ，沈殿物中の Sb と S の空間分布は一致し，その比率(Sb : S)は約 2: 3 であったことから，乳酸を電子供与体，$Sb(OH)_6^-$を電子受容体とする還元反応が生じ，生成された $Sb(OH)_3$ が SO_4^{2-}の還元により生じた S^{2-}と反応することで難溶性の Sb_2S_3 が沈殿したと考えられた．
【参考文献】1) Nguyen et al.(2014) Geomicrob. J. 31, 855-861

Enrichment and Characterization of Microorganisms for Removing Antimony from Water

○Kentaro Mori[1], Sayaka Magata[1], Masashi Kuroda[1], Satoshi Soda[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Sch. Sci. Technol., Ritsumeikan Univ.)

Key words antimony, biological reduction, microbial community, wastewater treatment

3P-I139 生物ろ過による地下水からの鉄・マンガン除去法に関与する細菌群集構造の比較

○鈴木 市郎
（横国大院・工）
suzuki-ichiro-db@ynu.ac.jp

【緒言】「生物ろ過」による鉄(Fe)，マンガン(Mn)除去法は，地下水に生息する Fe 酸化細菌(FeOB)や Fe・Mn 酸化細菌(MnOB)を含む微生物群集を活性炭などの微生物担体に定着させたろ過槽を用いて地下水に含まれる Fe や Mn を除去する上水処理法である．しかし，浄化に関与する FeOB や MnOB をはじめ，生物ろ過槽内細菌叢の全体像は解明されていない．そこで，実稼働する 3 か所の生物ろ過槽とその地下水原水，逆洗排水について，16S rRNA 遺伝子アンプリコンの次世代シーケンスによる解析にて細菌群集構造を比較した．
【方法】京都府城陽市，奈良県大和郡山市，大阪府交野市の生物ろ過槽よりろ材，地下水原水，逆洗排水を採取し，DNA 抽出後，16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅し，Illumina MiSeq による塩基配列の解読を行った．得られた配列データについて Qiime を用いて分類学的組成を解析した．
【結果】3 か所ともに，原水と逆洗排水の組成は比較的類似しているのに対し，ろ材の組成は大きく異なっていた．FeOB である *Gallionella* は深層地下水である原水中には多い(13-30%)がろ材上では 1%前後であり，好気的なろ過槽内では定着せずに排出されることが分かった．また，MnOB である *Leptothrix* はそもそも地下水内にほとんど存在していなかった．C1 化合物資化性菌である *Hyphomicrobium* や亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* はどの生物ろ過槽でもろ材上での優占的な生育がみられ，地下水に含まれる栄養を利用し好気的条件下で生育する細菌群が形成する生態系により，生物ろ過槽での Fe・Mn 除去が行われることが明らかとなった．

Comparison of the bacterial compositions involved in the biological filtration systems for removal of iron and manganese from groundwater.

○Ichiro Suzuki
(Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

Key words microbial consortia, grondwater, next generation sequencing

3P-I141 主成分分析によるバイオエタノール生産に影響を及ぼす阻害物質探索

○渡辺 一樹[1], 小西 正朗[2]
([1]北見工大院・工・バイオ環境化学, [2]北見工大・工・地域未来デザイン工学)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

非可食部位バイオマス等を用いたバイオエタノール生産において，原料は，植物種，生育環境，利用部位などにより大きく成分組成が異なるため，発酵効率に影響を与えることがある．そこで，我々はこのような天然物の培地中成分に対し，培養実験と分析，統計解析を組み合わせて，バイオエタノール生産に影響を与える因子を解析した．まず，コーンコブに加え，サクラ・リンゴ・ウィスキーオーク・ヒッコリー・ポプラのウッドチップ，計 6 種のバイオマスを用意し，原料に対し 20 w/v%の 1%希硫酸溶液を加え，121℃，60 分オートクレーブした．次に，pH を 5.00 に合わせ，原料に対し 1 wt%のセルラーゼを加え，40℃，170 rpm，3 日間振盪して酵素糖化し，フィルター滅菌したものを糖化液とした．各種糖化液を 500 ml 容量のフラスコに 50 ml 加え，YM 液体培地で前培養した Saccaromyces cerevisiae を 2 ml ずつ植菌し，70 rpm,30℃で 3 日間本培養した(n=2)．培養終了次の OD_{600} は，コーンコブ，リンゴチップ，サクラチップの順に，それぞれ 14.35，6.85，3.77 であり，他 3 種の糖化液では増殖が見られなかった．また，コーンコブ糖化液を用いた場合のみエタノール発酵が認められ，濃度は 5.98(g/L)であった．一方，各種糖化液を HPLC で糖組成分析し，GC/MS で揮発性の発酵阻害物質を一斉分析した．GC/MS 分析結果をもとに，統計解析ソフト R による主成分分析を行ったところ，第一主成分得点位置はコーンコブと 5 種のウッドチップとの間で明確に解離した．第一主成分の因子負荷量プロットから，ウッドチップに特徴的に含まれている成分は，Syringaldehyde(4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzaldehyde)であることがわかった．以上から，第一主成分は，培地のエタノール発酵に対する適正を示していると考察された．また，統計解析を用いて，ウッドチップ糖化液における発酵阻害物質を推定できた．

Estimation of inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysate during ethanol fermentation by principle component analysis

○Kazuki Watanabe[1], Masaaki Konishi[2]
([1]Dept. Biotechnol. Environ. Chem.,Grad. School of Eng. Kitami Inst Techol.,
[2]Dept. Biotechnol. Environ. Chem., Kitami Inst Tech.)

Key words lignocellulosic materials, hydrolysates, ethanol fermentation, principle component analysis

3P-N140 係留気球を用いた南極上空の大気バイオエアロゾルの採集と生物分析

○小林 史尚
（弘前大院・理工）
fumihisa@hirosaki-u.ac.jp

【背景と目的】南極におけるアイスコア採取・分析において，微生物が発見され，過去数十万年前の微生物に関する情報が注目されている．この南極アイスコア微生物解明が古環境復元のための環境指標として利用できるので，地球環境の将来を予測する上で，古気候古環境の復元が望まれている．しかしながら，南極アイスコア微生物の起源が南極で独自に進化したものであるのか，大気を通じて飛来してきたのか，進化学にとって重要な問題であるにもかかわらず，明らかになっていない．
【方法】著者は第 54 次日本南極地域観測隊に参加し，南極上空大気バイオエアロゾル採集を実施した．2013 年 1 月 3 日に係留気球を用いて昭和基地 C ヘリポート上空，高度約 1,000 m のバイオエアロゾル採集を実施した．係留気球には，独自に開発されたバイオエアロゾルサンプラーが吊り下げられ軽量強力ポンプによって滅菌済みの特殊なフィルターにバイオエアロゾルが捕集された．生物分析は，MiSeq シーケンサーを用いて行った．
【結果と考察】係留気球を用いた南極上空大気バイオエアロゾルの採集と生物分析結果から，南極上空約 1,000 m には，枯草菌などの Bacilli 綱や Chloroplast 綱の細菌が浮遊・風送されていることがわかった．

The sampling and bioanalysis of atmospheric bioaerosol over the Antarctic using a tethered balloon

○Fumihisa Kobayashi
(Grad. Sch. Sci. Tech., Hirosaki Univ.)

Key words bioaerosol, Antarctic, atmosphere, bioanalysis

3P-N142 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与

○松崎 浩明, 上田 賢一, 山崎 新平, 早田 亮太, 秦野 琢之
（福山大・生命工）
matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

近年，エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている．そこで，バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている．しかし，食料となるサトウキビやトウモロコシなどの糖・デンプン系バイオマスの利用は，食料不足や食料の価格高騰を招く．本研究では，アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により，セルロース系バイオマスからのバイオエタノールの生産を目指している．過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル（CM）-セルラーゼ（CMC1）や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来の β-グルコシダーゼ（BGL1）の生産能を付与したが，CM-セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった．エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた．そこで，BGL1 及び細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ（cenA）とエキソ型セルラーゼ（cex）の 3 種のセルラーゼ生産能の付与を検討した．そのためのプラスミドとして，*cenA* と *cex* を *GAP1* プロモーター，*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP1* ターミネーターとの間に連結した *S. cerevisie* 分泌発現型 *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した．また，*BGL1* を *GAP1* プロモーター下流に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型プラスミド pHM1062 を構築した．pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は，コンゴレッド染色と *p*-NPG 活性によりセルラーゼと β-グルコシダーゼを分泌生産していることが確認できた．しかし，セルラーゼ活性が低いと考えられた．さらに *CMC1* を *GAP1* プロモーター下流に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体はセルラーゼ活性が高くなった．三重形質転換体による紙の分解について検討している．

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○Hiroaki Matsuzaki, Ken-ichi Ueda, Shinpei Yamasaki, Ryota Wasada, Takushi Hatano
(Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ.)

Key words cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

3P-I143 Xylose 資化性出芽酵母における Xylose 消費速度は Xylose 由来 Ribose 5-phosohate に影響される

○小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一, 藤森 一浩
（産総研・生物プロセス）
k-fujimori@aist.go.jp

【目的】 これまで，我々は *Xylose isomerase* を導入した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において，Glucose と Xylose の両者を含む培地を用いた 36℃の発酵条件では，*TKL1* の遺伝子発現を強化することにより Xylose 消費速度が向上することを報告している （2017 年度 日本農芸化学会）が，その理由は不明であった．TKL1 は Xylulose 5-phosohate (X5P)を変換するために Ribose 5-phosphate (R5P)が必要であることから，Xylose の代謝は R5P の供給が一つの鍵であると考え，R5P をもたらす糖代謝経路と Xylose 消費速度向上の関係について以下の研究を行った．
【方法】 Xylose 資化性酵母を親株とし，Xylose 及び Ribose 等を炭素源とした培地を用いて生育・発酵試験を行うとともに，さらに *ZWF1* 欠損株および *RPE1* 欠損株を作成することで，R5P を供給する炭素源の解明を試みた．
【結果】 すべての PPP 遺伝子強化株は Xylose を唯一の炭素源とした培地では生育速度の向上を示さなかったが，Ribose を唯一の炭素源とした培地では *TKL1* 発現株のみ生育速度の向上を示した．また，Glucose と Xylose の両者を含む培地において，*ZWF1* 欠損株は親株と同程度の発酵性能を示した．しかし，*RPE1* 欠損株は Xylose を資化することができなくなり，Xylose または Ribose を唯一の炭素源とした培地でも生育できなかった．ところが，Xylose と Ribose の 2 つを含む培地では生育が可能だった．これらの結果から，Xylose を効率良く資化するために必要な R5P は，主として Xylose に由来することが明らかになった．また，X5P から R5P を生成する代謝フローの改善によって Xylose 消費速度が向上することが示唆された．

Xylose consumption rate of the xylose-assimilating yeast is influenced by Ribose 5-phosphate from xylose

○Yosuke Kobayashi, Takehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Yoichi Kamagata, Kazuhiro E. Fujimori
(BRI. AIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol, pentose phosphate pathway

3P-I145 セルロースエタノールの商業化に向けた酵母菌開発

○保谷 典子[1], 多田 宣紀[1], 伊藤 順二[1], 平尾 理恵[1], 菊田 弘和[1], 林田 真生[1], 神戸 浩美[1], 池内 暁紀[2], 片平 悟史[2], 徳弘 健郎[2], 中村 里沙[2], 村本 伸彦[2], 大西 徹[2]
（[1]トヨタ自動車, [2]豊田中研）
noriko_yasutani@mail.toyota.co.jp

トヨタでは木質・草本系バイオマスを原料とするセルロースエタノール生産に用いる酵母を開発している．第２世代バイオエタノールの商業化のためには，発酵に用いる酵母のエタノール収率向上が必須である．そのために，バイオマスからの非発酵性炭素源のエタノール変換技術開発を実施してきた．これまで，キシロースの効率的なエタノール変換経路を導入し，高収率を達成してきた．同時に，前処理されたバイオマスから生じる発酵阻害物質に対する耐性向上のための施策を実施し，阻害物に対する耐性能力向上にも取り組んできた．更に実用化に耐え得ることを，46kL 規模のスケールアップにより実証したことを過去に報告した．
本年の報告では，更なる高収率化を目指した，アラビノースのエタノール変換/酢酸のエタノール変換能力付与に関する技術開発の結果に関しても報告する．

Development of cellulosic ethanol yeast for commercial production

○Noriko Yasutani[1], Nobuki Tada[1], Junji Ito[1], Rie Hirao[1], Hirokazu Kikuta[1], Masao Hayashida[1], Hiromi Kambe[1], Akinori Ikeuchi[2], Satoshi Katahira[2], Kenro Tokuhiro[2], Risa Nakamura[2], Nobuhiko Muramoto[2], Toru Onishi[2]
([1]Toyota Motor Corp., [2]Toyota Cent. R&D Labs. Inc.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol production, xylose

3P-N144 希硫酸浸漬爆砕処理バガス SSCF において高いエタノール発酵性能を有する C5C6 酵母変異体の単離

○藤森 一浩, 小林 洋介, 佐原 健彦, 扇谷 悟, 鎌形 洋一
（産総研・生物プロセス）
k-fujimori@aist.go.jp

【背景】これまで，我々は，同時糖化並行複発酵（SSCF）プロセスによるセルロース系バイオマスエタノール生産の実用化のために，産業用酵母 IR-2 に各種要素技術を集約・実装し，高効率 Xylose 代謝，高温発酵（36～38℃）を可能にする B16 株及びそのホモ２倍体 B22 株を開発した．これらの株は，前処理バイオマスとしてアルカリ処理バガスを用いた高濃度スラリー SSCF プロセスにおいて，理論エタノール収率に対し最大約 95%の変換効率（副産物をほとんど生産せずエタノールを生産可能），かつ 27 時間以内に 50 g/L を超える生産性を示す，非常に高いポテンシャル性能を有するものであった．しかし，この株は，高濃度の発酵阻害物質を含む希硫酸浸漬爆砕バガスを前処理バイオマスとして用いた SSCF では，Xylose はおろか，Glucose さえもほとんど資化できなかった．そこで，本研究では，希硫酸浸漬爆砕バガスを用いた SSCF において，高いエタノール発酵性能を有する株を取得するため，以下の独自の手法を用いて検討を行った．
【方法と結果】従来は，バイオマス糖化液を用いた SHF あるいは好気条件で馴養を行う例が多かったが，SSCF に適した株は取得することは困難であると考え，ラボスケール SSCF と馴養を同時に行う方法を考案した．4 日間の発酵試験終了後のスラリーから，コンタミ菌を排除するため B16 が耐性を持つ Aureobasidin A を選択マーカーとして各種固体培地上でシングルコロニーを単離し，その発酵性能をまた SSCF で評価するというサイクルを繰り返し最大５回行った．独立 10 試行から，少なくとも 5 クローンの変異体を取得でき，これらはいずれも希硫酸浸漬爆砕処理バガスにおいても，アルカリ処理バガスと同様，高いエタノール発酵性能を示した．また，一度，発酵性能が向上した株は，その後繰り返し SSCF を行っても，その性能が低下することはなく固定されていた．

Isolation of mutant C5C6 yeast strains for Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation with Sulfuric acid pre-treated sugarcane bagasse.

○Kazuhiro E. Fujimori, Yosuke Kobayashi, Takehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Yoichi Kamagata
(BRI. AIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Cellulosic ethanol, SSCF, Acclimation

3P-I146 *Penicillium* 属由来新規キシラナーゼを導入した *Trichoderma reesei* による高効率糖化酵素の開発

○柴田 望, 末次 真梨, 五十嵐 一暁, 瀧村 靖
（花王）
takimura.yasushi@kao.co.jp

【背景・目的】地球上で最も豊富に存在するセルロース系バイオマスを効率的に利用していくためには，より高効率な糖化酵素をより安価に獲得していくことが必要不可欠である．糸状菌 *Trichoderma reesei* は多様な糖化酵素を菌体外に多量に分泌生産することから，糖化酵素の生産宿主として広く利用されている．しかし，本菌が元来生産する糖化酵素の性能はバイオマスを利用していく上では不十分であり，これまでに異種由来 beta-glucosidase を強化するなどの試みがなされてきている．本研究では，より高効率な糖化酵素の開発を目的とし，*T. reesei* の酵素製剤に対して相乗効果を示す新規酵素の探索を行い，さらに得られた酵素を組み込んだより効率的な酵素を生産する菌株の構築を試みた．
【方法・結果】自社所有の糸状菌株ライブラリを用い，セルロースを単一炭素源とする培地にて培養することで，糖化酵素を含む培養上清を取得した．*Aspergillus aculeatus* 由来 beta-glucosidase I を導入した *T. reesei* JN11 株が生産する酵素（以下 JN11 酵素）に対し，ライブラリ菌の各培養上清を添加した酵素カクテルを用い，アルカリ処理バガスの糖化性を評価した結果，*Penicillium* sp. F532 株の培養上清が非常に高い添加効果を示した．その有効成分を同定し配列決定を行った結果，GH family 10 に属する新規キシラナーゼであった．本キシラナーゼは C 末端側に CBM1 を有しており，CBM を切除してセルロースへの吸着性を無くすことでその添加効果が低下することを確認した．このことから，高い添加効果にはセルロースへの吸着が重要であることが示唆された．さらに，本キシラナーゼを異種発現させた株 *T. reesei* JNK25 株を構築した．この菌株が生産する糖化酵素の性能を評価した結果，JN11 酵素と比較して 1/2 以下の配合量で同等のアルカリ処理バガスの糖化性を示した．

Development of highly efficient saccharification enzyme by recombinant *Trichoderma reesei* expressing a novel xylanase of *Penicilluim* sp.

○Nozomu Shibata, Mari Suetsugu, Kazuaki Igarashi, Yasushi Takimura
(Kao Corp.)

Key words *Trichoderma reesei*, cellulase, xylanase, saccharification

3P-F147 白色腐朽菌 *Phanerochaete* sp. K-20 株のブタノール産生特性について

○笠井 稜子[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】
現在，化石資源の枯渇が問題とされており，これらの化石資源に代わるバイオ燃料等の再生可能エネルギーの開発に関する研究が活発に行われている．特に，現在実用化されているバイオエタノールと比較してエネルギー価が高いなどの利点を持つバイオブタノールが注目されている．また，可食性バイオマスとの競合を避けるため，自然界に最も豊富に存在する木質バイオマスの利用が求められているが，木質バイオマスは脱リグニンおよび糖化処理にコストがかかることが問題となっており，理論上ワンステップで最終産物を産生可能な白色腐朽菌の利用技術確立が急務である．これまでにブタノール産生能を有する白色腐朽菌の存在は報告されていない．そこで当研究グループではブタノール産生能を有する白色腐朽菌の探索を行い，ブタノール産生白色腐朽菌として *Phanerochaete* sp. K-20 株の選抜に成功したので，ブタノール生合成経路の推定も含め，発表する．
【方法と結果】
自然界より分離した白色腐朽菌 108 株を液体培地で好気前培養後，酸素供給制限下で 10 日間培養を行い，培養液を HPLC 分析に供した．その結果，K-20 株および M-75 株においてブタノールの産生を確認した．そこで，18S rDNA 及び ITS 領域を解析し，K-20 株は *Phanerochaete* 属である事が示された．HPLC 及び GC 分析においてアセトン産生が確認されなかったことから，アセトン・ブタノール・エタノール発酵（ABE 発酵）とは異なる経路であると推測した．ABE 発酵以外に組換え酵母におけるスレオニン由来のブタノール産生経路があり，これと同様のブタノール産生経路であると予想し，K-20 株培養系にスレオニンを添加したところ，ブタノール産生量は大幅に増加した．この結果より，*Phanerochaete* sp. K-20 株のブタノール産生は酵母と同様の産生経路であると推察した．

Characterization of butanol productivity in white-rot fungus *Phanerochaete* sp. K-20

○Ryoko Kasai[1], Toshio Mori[1], Hirokazu Kawagishi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words *Phanerochaete* sp. K-20, Butanol production, threonine, white-rot fungi

3P-I148 グルコースによるセルラーゼ生産阻害が抑制された糸状菌 *Trichoderma reesei* 変異株の特性解析

○新井 俊陽, 掛下 大視, 五十嵐 一暁, 瀧村 靖
(花王)
takimura.yasushi@kao.co.jp

【背景・目的】食糧と競合しないセルロース系非可食バイオマスの高度利用のためには高糖化性かつ安価な糖化酵素の開発が必須である．糸状菌 *Trichoderma reesei* は糖化酵素を菌体外に多量に分泌することから，糖化酵素の生産宿主として世界中で広く研究されている．日本においても標準株 QM9414 から複数回の変異導入によって高生産変異株が作出されているが，産業利用を行う上では更なる酵素生産性の向上に加え，カタボライト抑制が解除されている株や炭素源の利用効率向上株など，これまで以上に優れた生産株が求められる．本検討では，通常では糖化酵素が生産されない高濃度グルコース含有培地においても糖化酵素生産が可能な変異株の取得と解析を行った．
【方法・結果】イオンビームを用いた変異処理を行い，最小培地にセルロースと高濃度グルコースを含有するプレートにおいてハロ選抜を行った．取得された変異株はコロニー形態が変化しており，さらに親株ではほとんど酵素が生産されない高濃度グルコース仕込み時においても酵素生産性が維持されていた．このような形質をもたらす主要因を探るため本変異株のゲノム変異点解析を実施し，得られた変異点のうちステロール合成制御に関わる転写因子 *sre1* に着目した．親株に対し *sre1* 遺伝子の破壊検証を実施した結果，変異株と同様に形態変化とグルコースによる酵素生産阻害が緩和されていることが確認された．また，グルコースの消費や生育の向上など酵素生産に優れた特徴を示し，本変異株の有用な形質をもたらす要因として *sre1* 遺伝子の機能欠失が関与していることを明らかとした．

Characterization and genome analysis of glucose de-repressed mutant of *Trichoderma reesei*

○Toshiharu Arai, Hiroshi Kakeshita, Kazuaki Igarashi, Yasushi Takimura
(Kao Corp.)

Key words *Trichoderma reesei*, cellulase, glucose repression, sterols

3P-I149 高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株の単糖消費速度増加によるエタノール発酵能強化について

○近藤 旺次郎[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】 本研究室では，木質バイオマスからワンステップで再生可能エネルギーや化成品を高生産可能な微生物を育種することを目的とし，高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株をベースとした木質バイオリファイナリー菌の作出を試みてきている．発酵産物の収率増加には，出発物質であるグルコースの取り込み速度を増加させ，解糖系の活性化を促す必要がある．そこで本研究では，ヘキソーストランスポーター遺伝子（*Pshxt*）高発現株を作出し，単糖の取り込み速度を増加させた際のエタノール発酵能について調査した．
【方法・結果】 *P. sordida* YK-624 株と近縁の *P. chrysosporium* において，グルコースの取り込みに関わるヘキソーストランスポーター（*hxt*）と高い相同性を示す *P. sordida* YK-624 株由来の遺伝子（*Pshxt*）高発現プラスミドを構築し，*Pshxt* 導入株を作出した．*Pshxt* 導入株の中で最も高いグルコース消費が認められた hxt31 株では，グルコース消費速度が野生株に対し最大で 1.77 倍増加した．また，キシロース消費速度も 1.84 倍増加した．これにより取得したトランスポーターは六炭糖の他に，五炭糖であるキシロースの取り込みにも関与していることが明らかになった．さらにグルコース消費速度と培養系内の酸素濃度には相関があり，好気培養での hxt31 株のグルコース消費量は，酸素供給を制限した場合に対し 2.29 倍高かった．また，5%のグルコースを含む富栄養条件では，好気培養でもエタノールを産生し，hxt31 株は野生株に対し 1.5 倍高いエタノール産生量を示した．

Improvement of ethanol fermentability by enhancement of monosaccharide-uptake rate in hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624

○Ojiro Kondo[1], Toshio Mori[1], Hirokazu Kawagishi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words *Phanerochaete sordida*, hexose transporter, ethanol fermentation

3P-I150 ハイブリッド酵母 FSC の凍結保存株の活性化と並行複発酵

○山田 泰地, 酒井 遥行, 田中 修三
(明星大・理工)
tanakash@es.meisei-u.ac.jp

五炭糖を含む木質バイオマスからのエタノール生産を目指して，我々は *S. cerevisiae* 変異株と *C. intermedia* 変異株の細胞融合によりキシロースの発酵能を付与したハイブリッド酵母 FSC 株を 2014 年に製造した．FSC 株を用いたエタノール生産の実用化に向けて，本研究では FSC の凍結保存株の活性化及び模擬木質バイオマス（セルロースとキシランの混合基質）の並行複発酵について調べた．なお，糖化酵素は CTec2 を用い，実験は温度 30℃で行った．
凍結保存株の活性化において，キシロース消費後培地を交換して繰り返し培養する方法（XC 法），毎日培地を交換して繰り返し培養する方法（DC 法）の 2 法を検討した．培養を 13 回以上繰り返すと，いずれの方法においてもキシロース（Xyl）は消費されたが，アラビノース（Arb）は XC 法では消費されず，DC 法では 9〜10 回目以降消費され，活性化の方法によって FSC 株の基質利用能が異なることが分かった．そこで，各活性化株のコロニー形成を調べたところ，XC 法の活性化株は均一なコロニー（小さく，表面が滑らか）を形成したが，DC 法の活性化株は滑らかな小コロニーに加えて，粗い大コロニーを形成した．それぞれのコロニーの発酵能を調べると，XC 法と DC 法の小コロニーは Xyl を消費するが，Arb は利用せず，一方 DC 法の大コロニーは Xyl も Arb も全く利用せず，エタノールも生成しなかった．活性化方法によって，FSC 株の異なる表現型が出現することが分かった．
XC 法の活性化株を用いた 10 日間の並行複発酵により，酵素と基質の質量比が 1/14 で，理論値に対する収率で 0.74 のエタノール生成を達成した．発酵過程で，糖化の中間産物であるセロビオース，キシロビオース及び Xyl の蓄積が確認され，このうちキシロビオースは最後まで残留したが，セロビオースと Xyl はやがて消費された．

Activation of a frozen strain of hybridized yeast FSC and simultaneous saccharification and co-fermentation of holocellulose

○Taichi Yamada, Haruyuki Sakai, Shuzo Tanaka
(Sch. Sci. Eng., Meisei Univ.)

Key words SSCF(simultaneous saccharification co-fermentation), cell-fused strain, xylose, phenotype

3P-I151 エタノール発酵のための木質バイオマスのアルカリ酸化処理による前処理

○酒井 遥行, 山田 泰地, 田中 修三
（明星大・理工）
16mb003@stu.meisei-u.ac.jp

木質バイオマス（BM）からのエタノール生産を実用化するには，リグノセルロース構造を改変する前処理がボトルネックとなっている．本研究では，木質BM の前処理法としてアルカリ酸化処理（AO 処理）を取り上げ，その処理条件と効果について検討した．
木質 BM は楢と杉を選び，粉砕 BM1g に NaOH1g と $H_2O_2$0.025～0.4 g を添加し，オートクレーブにて加熱処理（120℃，1h）した．AO 処理は NaOH と H_2O_2 を同時に加える同時処理，NaOH 処理後に H_2O_2 を加える二段階処理の 2 方法を検討し，NaOH のみによる処理（A 処理）を比較対象とした．前処理の効果は，前処理済 BM の 2%スラリーに酵素 CTec2（novozymes）を添加し，30℃・24h で生成された糖の量により評価し，またリグニンや炭水化物の組成変化も検討した．
AO 同時処理は H_2O_2 添加量 0.025～0.1 g の間で糖生成の改善に効果を示し，A 処理に比べて，0.1g 添加系（AO-0.1）で楢は約 1.5 倍，杉は約 3.3 倍の糖生成が達成された．糖化率で言うと，それぞれ楢が 61.4%，杉が 34.9%であった．なお，H_2O_2 添加量 0.1g 以上では更なる改善は見られなかった．BM 中のリグニンの含有量は，AO 処理により楢で減少したが，A 処理に比べて減少量は低く，また杉ではリグニンの減少は見られなかった．従って，AO 処理による糖生成の改善は脱リグニンが必ずしも不可欠ではなく，木質構造の膨潤化が寄与していると考えている．炭水化物の含有量については，楢も杉も AO 処理済 BM 中のグルカンが増加しており，これは脱リグニン又はキシランの減少（溶出）により相対的に増加したためである．AO-0.1 の系で，AO 同時処理に比べて，AO 二段階処理は楢で 1.14 倍の糖が生成された．しかし，杉では二段階処理は同時処理とほとんど同じであった．

Alkali-oxidation pretreatment of wood biomass for ethanol fermentation

○Haruyuki Sakai, Taichi Yamada, Shuzo Tanaka
(Sch. Sci. Eng., Meisei Univ.)

Key words alkali-oxidation pretreatment, NaOH, H_2O_2, wood biomass

3P-I152 イオンビーム照射による直接 Ethanol 生産のための Cellulase 分泌糸状菌の構築

○山下 聖樹 [1], 高野 真希 [1], 畑下 昌範 [2], 星野 一宏 [1]
（[1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研）
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】近年，イオンビーム照射は生物に対して高頻度で欠失変異を生じさせることができることから新規な育種法として注目されている．一方，我々は新規発酵技術として糖化発酵同時進行(CBP)の開発を進めており，この一端として耐熱性 Ethanol 生産菌の育種を進め，ある種の接合菌が 40℃以上で増殖および Ethanol 生産が可能であることを見出した．そこで本研究では CBP の構築を目指し，イオンビーム照射を用いた本菌株の変異誘導を行い Cellulase 分泌糸状菌の構築を検討した．
【方法・結果】本研究では *Rhizopus microspores* NBRC100014 株を使用した．変異株の構築はカーボンイオンビーム(2,500 Gy)を用いて胞子懸濁液に照射し実施した．一次スクリーニングとして CMC 寒天培地で 50℃静置培養を行い 14 株の変異株を得た．二次スクリーニングでは 40℃での発酵試験を行い Ethanol 生産能の高い 003 株を得た．本菌株を用いて 40℃，嫌気振盪培養を行った結果，72 h で 100 g/L Glucose から 23.53 g/L の Ethanol を生産した (wild 株: 22.15 g/L)．また培養温度による Ethanol 生産性を培養 72 h 目で比較した結果，42℃で 22.54 g/L (wild 株: 22.55 g/L)，45℃で 14.15 g/L (wild 株: 14.79 g/L)の Ethanol を生産できた．一方，CBP の可能性評価のため，Cellulase 活性を比較したところ，wild 株の Cellobiohydrolase 活性より 8 倍高い分泌生産が確認できた．さらに，β-Glucosidase 活性は wild 株よりも 12 h 早く生産され始めることがわかった．以上の結果より，Ethanol 生産能力を損なわず，Cellulase 活性が向上した変異株を構築することができた．現在，この株を用いた各種 Cellulose からの直接生産を検討中である．

Construction of Cellulase-secreting Fungi for Direct Ethanol Production by Ion-beam Mutation

○Satoki Yamashita[1], Maki Takano[1], Masanori Hatashita[2], Kazuhiro Hoshino[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, [2]Wakasa Wan Energy Res. Center)

Key words *Rhizopus microsporus*, ion-beam, ethanol production, cellulase

3P-N153 超好熱性アーキアの代謝改変～キシラン分解能の付与

○福田 青郎 [1], 林 千広 [1], 大垣 裕亮 [1], 川村 実央 [1], 佐藤 喬章 [2], 金井 保 [2], 跡見 晴幸 [2], 今中 忠行 [1]
（[1]立命館大・生命科学, [2]京大院・工）
imanaka@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】高い水素生産能を有する超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の代謝経路を改変して，キチン・キシランなどの非食性バイオマスからの水素生産を目指す．【実験結果】大分県の別府温泉サンプルや，家庭用コンポスト，立命館大学周辺の土壌を分離源として，難分解性多糖であるキチンまたはキシランの分解菌のスクリーニングを行った．その結果，いくつかのキチン分解菌やキシラン分解菌が得られた．特に別府温泉白池地獄の温泉サンプルより，70℃で生育可能なキシラン分解菌（*Caldicellulosiruptor* 属細菌 45-6 株）の単離に成功した．45-6 株について全ゲノム DNA のドラフト解析を行ったところ，ゲノム上に xylanase 遺伝子ホモログ（3 種）をはじめとするキシラン分解関連の酵素が多数見出された．これらのうち特に β-1,4-xylanase（*xyl1, 2, 3*）をコードすると予想された遺伝子について，その性質を解析した．組み換え型 Xyl1 を取得し酵素活性を測定したところ，超好熱菌 *T. kodakarensis* の至適生育温度である 85℃においても 2 時間以上の間 50%以上の酵素活性を維持するという高い耐熱性を有することも分かった．そこで *xyl1* について分泌タンパク質として発現するように *T. kodakarensis* ゲノムに組み込んだ．野生株及び得られた *xyl1* 導入株をキシラン含有固体培地上で生育させたところ，*xyl1* 導入株コロニー周辺では，野生株コロニーでは見られなかったキシランの分解帯が観察された．このように *T. kodakarensis* にキシラン分解能を付与することに成功した．今後は必要に応じてキシラン資化に関する遺伝子を追加導入していく予定である．

Alteration of metabolic pathway of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*: biodegradation of xylane

○Wakao Fukuda[1], Chihiro Hyashi[1], Yusuke Ogaki[1], Mio kawamura[1], Takaaki Sato[2], Tamotsu Kanai[2], Haruyuki Atomi[2], Tadayuki Imanaka[1]
([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.)

Key words hyperthermophile, xylanase, gene expression, hyperthermophilic archaeon

3P-I154 アメフラシ 21K セルラーゼのセルロース分解における機能解析

○辻 明彦, 湯浅 恵造, 淺田 元子, 中村 嘉利
（徳島大学・生物資源産業学部）
tsuji.akihiko@tokushima-u.ac.jp

糸状菌のセルロース分解系は，複数のエンドグルカナーゼ(EG)，セロビオハイドロラーゼ(CBH)，グルコシダーゼ(GL)等の酵素に加えてスオレニン等セルロース分解を助ける蛋白質から構成され，中でもセルロース鎖に結合したまま，加水分解しながらセルロース鎖を移動する CBH は，水不溶性のセルロース分解において重要な役割を果たしている．一方，動物では巻貝などの軟体動物は腸内微生物に依存しないセルロース分解系を有しているが，全体的なセルロース分解機構については不明である．我々は，微生物や糸状菌とは異なる動物独自の進化したセルロース分解系を明らかにし，バイオマスの酵素分解に役立てることを目的としている．これまでに，軟体動物（腹足綱）のアメフラシ消化液を解析し，分子量が異なる 4 種類の EG, 2 種類の GL によって海藻中のセルロースはグルコースに分解されることを明らかにしたが，糸状菌と異なり，CBH は同定されていない．今回，アメフラシ消化液に CBH が存在していないのか明らかにするため，まず消化液中のセルロース結合タンパク質 (CBP) を検索した．コントロールとしてメイセラーゼ（T. viride 分泌タンパク質）を用いた．CF-11 と反応後，結合タンパク質を SDS-PAGE で分離し，アミノ酸配列解析によって同定した．メイセラーゼ中には 2 種類の CBP が分離され，CBH I と CBH II であった．アメフラシ消化液では，21K タンパク質が分離され，21K EG と同一であることが判明した．この結果は，21K EG が CBH の機能を果たしていることを示唆するが，21K EG は触媒ドメインのみから構成され，糖鎖結合ドメインを持っていない．現在，21K EG のセルロース結合性と触媒活性，他の EG との相乗作用，セルロース分解能力との相関について解析中である．

Fuctional analysis of Aplysia 21K cellulase in cellulose digestion

○Akihiko Tsuji, Keizo Yuasa, Chikako ASADA, Yoshitoshi Nakamura
(Fac. Bioscience & Bioindustry., Tokushima Univ.)

Key words cellulase, cellulose, cellulose-binding domain, cellulosic biomass

3P-N155 ベタイン型添加剤によるセルロース糖化効率向上に対するセロビオハイドロラーゼ活性化の評価

○山本 真史, 甲元 一也
（甲南大・FIRST）
koumoto@center.konan-u.ac.jp

再生可能資源としてのセルロース系バイオマスに注目が集まっており，その実用化に向けた課題はセルラーゼによるセルロース糖化プロセスの効率化である．セルラーゼによるセルロース糖化の鍵となるのが，その主成分であり，固体セルロースに吸着し，遊離糖を生成するセロビオハイドロラーゼ(CBH)である．我々の研究室では代謝産物を基体に開発したベタイン型添加剤がセルラーゼによるセルロースの糖化効率を向上することを見出し，報告してきた．これまでの研究結果から，ベタイン型添加剤を加えると，α-セルロース，アビセルなどのセルロース基質の糖化効率がベタイン型添加剤の濃度依存的に上昇することが明らかとなっている．また，セルラーゼに含まれ，セルロース分解に関わる主要酵素（エンドヌクレアーゼ，β-グルコシダーゼ）に対する特異基質を用い，ベタイン型添加剤がエンドヌクレアーゼを不活性化，β-グルコシダーゼを活性化することも見出された．これらの結果とセルラーゼによるセルロース分解の機構から CBH をベタイン型添加剤が活性化していることが強く示唆されていた．本研究では，ベタイン型添加剤による CBH 活性化を調べるために，活性化が明らかとなっている β-グルコシダーゼの阻害剤を用いた解析を行った．その結果，阻害剤によって β-グルコシダーゼが不活化した条件下においてもベタイン型添加剤による濃度依存的な遊離糖濃度は向上が確認され，ベタイン型添加剤が CBH を活性化していることが同様に示唆された．発表では CBH のセルロースへの吸着活性の評価も含めた CBH の活性化機構についても報告したい．

Evaluation of cellobiohydrolase activation on cellulose saccharification efficiency improvement in the presence of betaine-type metabolite analogs

○Masafumi Yamamoto, Kazuya Koumoto
(Fac. FIRST, Konan Univ.)

Key words cellobiohydrolase, cellulase, betaine, biomass

3P-I156 アルカリ加水分解により得られる稲わらリグニン由来芳香族化合物を原料としたムコン酸のバイオ生産

○菊地 晟弘[1,3], 東 勇太[1,3], 高橋 健司[2,3], 上村 直史[2,3], 政井 英司[2,3], 園木 和典[1,3]
（[1]弘前大院・農生, [2]長岡技大・生物, [3]JST-ALCA）
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【背景】
ムコン酸は多様なポリマーの合成原料に変換可能な基幹化学品である．我々はこれまでに，プロトカテク酸及びムコン酸の資化能を欠損させた *Pseudomonas putida* IDPC 株を宿主として，protocatechuate decarboxylase，flavin prenyltransferase，catechol 1,2-dioxygenase，vanillate *O*-demethylase，*p*-hydroxybenzoate hydroxylase を発現させた株 (IDPC/pTS094 株) は，リグニン由来芳香族化合物モデルである *p*-クマル酸，*p*-ヒドロキシ安息香酸，フェルラ酸及びバニリン酸から理論収量のムコン酸を生産できることを報告してきた．本研究では，稲わらをアルカリ加水分解処理して得られるリグニン由来芳香族化合物を原料としたムコン酸の生産能力を評価した．
【方法・結果】
1 %(w/v) NaOH 溶液を用いて，稲わらを 170℃で 10 分間加水分解処理した．得られた上清を酸性化し，酢酸エチルで抽出された画分を水に溶解して，基質溶液とした．フラスコ培養の結果，IDPC/pTS094 株は基質溶液中の *p*-クマル酸，フェルラ酸，カテコール及び安息香酸をムコン酸へと代謝したことが示された．また 250 ml 容ミニジャーファメンターを用いた流加培養の結果，基質溶液の添加量に比例したムコン酸生産量の増加が確認されたことから，稲わらのアルカリ加水分解処理により得られたリグニン由来芳香族化合物の混合物からムコン酸を生産できることを明らかにした．さらに，2 L 容ミニジャーファメンターを用いて，基質溶液中と同じ割合で上記の 4 化合物のみからなる加水分解物モデルを基質として流加培養を行った結果，17 g/L 以上のムコン酸を生産できることを明らかにした．
本研究の一部は，戦略的創造研究推進事業先端的低炭素技術開発 (ALCA)，科学研究費補助金の支援を受けて実施した．

Muconic acid production from rice straw lignin-derived aromatic compounds

○Akihiro Kikuchi[1,3], Yuta Azuma[1,3], Kenji Takahashi[2,3], Naofumi Kamimura[2,3], Eiji Masai[2,3], Tomonori Sonoki[1,3]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., [3]JST-ALCA)

Key words lignin, muconic acid, rice straw, bio-production

3P-I157 木質系・草本系バイオマス由来のリグニン分解物を原料としたムコン酸生産

○東 勇太[1,4], 佐藤 匠[2,4], 高橋 健司[3,4], 上村 直史[3,4], 政井 英司[3,4], 園木 和典[1,2,4]
（[1]弘前大院・農生, [2]弘前大・農生, [3]長岡技大・生物, [4]JST-ALCA）
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【背景】
ムコン酸 (ccMA) はポリアミドやポリエチレンなどの多様なポリマーの合成原料へと展開できる基幹化学品である．我々はこれまでに，ccMA はカテコールの代謝中間体であること，カテコールはプロトカテク酸（PCA）を脱炭酸することにより生化学的に合成できること，*Pseudomonas putida* KT2440 株はバニリン酸（VA）や *p*-ヒドロキシ安息香酸（HBA）などのリグニン由来芳香族化合物モデルを PCA へと代謝することに着目し，多様なリグニン由来芳香族化合物モデルから高い収率で ccMA を生産できる微生物株の分子育種について報告してきた(1)．しかし非可食バイオマスから調製したリグニン由来芳香族化合物からの生産については十分に検討されてこなかった．そこで本研究ではスギリグニンおよび稲わらリグニン由来芳香族化合物を調製し，これらを原料とした ccMA 生産について検討した．
【方法・結果】
リグニン由来の芳香族化合物は，アルコール－ベンゼン抽出処理したスギまたは稲わらを，アルカリニトロベンゼン酸化分解処理することにより調製した．*P. putida* KT2440 株の PCA と ccMA の分解能を欠損させ，さらに PCA decarboxylase と flavin prenyltransferase および catechol 1,2-dioxygenase と VA *O*-demethylase を発現させた微生物株（IDPC/pTS094 株）を，250 mL 容ミニジャーファメンターを用いて培養した．IDPC/pTS094 株は，スギ・稲わらリグニン由来芳香族化合物中の少なくともバニリン（Vn），VA，*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBAL），HBA を ccMA へと変換し，スギリグニン由来の芳香族化合物からは 1 g/L 以上，稲わらリグニン由来の芳香族化合物からは 500 mg/L 以上の ccMA を生産できることを明らかにした．
本研究は，JST 戦略的創造研究推進事業 先端的低炭素技術開発 (ALCA) の支援を受けて実施した．
(1)菊地ら，第 68 回日本生物工学会大会，2016.

Muconic acid production from softwood and grass lignin-derivatives

○Yuta Azuma[1,4], Takumi Sato[2,4], Kenji Takahashi[3,4], Naofumi Kamimura[3,4], Eiji Masai[3,4], Tomonori Sonoki[1,2,4]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [3]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., [4]JST-ALCA)

Key words muconic acid, bio-based monomer, *Pseudomonas putida*, lignin

3P-I158 酵素糖化残渣リグニンからのリグニンナノ粒子の作製およびその特性評価

○杉野 雄規[1], 柘植 陽太[2], 高橋 憲司[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】近年，化石資源に代わるエネルギーとしてバイオマス資源を利用したバイオマスリファイナリーの研究が進んでいる．特に，食物との競合がないリグノセルロースバイオマスを前処理・酵素糖化することによる，バイオエタノールなどの生産が期待されている．しかし，その残渣物である糖化残渣リグニンは構造が複雑であり，高分子量化合物であるため有効な活用法が確立されていない．ここで，リグニンはその構造と，フェノール性水酸基により抗酸化活性，抗菌作用，抗 UV 作用を示すことが言われている．そこで本研究では，糖化残渣リグニンの高付加価値化としてナノ粒子化を行うことで，機能性の向上を目指すと共に，イオン液体と希硫酸の異なる前処理法による違いを比較した．
【方法および結果】イオン液体前処理においては，110℃で 16 h，希硫酸前処理においては，180℃で 30 min 前処理を行い糖化残渣リグニンを作製した．その後メタノールとアセトン比を変えた各条件で抽出することで糖化残渣リグニンオリゴマーを作製した．また，1%リグニンオリゴマー溶液に純水を加え 10 min 撹拌しナノ粒子化を行った．
各抽出条件の糖化残渣リグニンオリゴマーを評価したところ，収率，分子量，水酸基当量ともにメタノール対アセトン比が 5:5 のものが最も大きくなった．また，イオン液体前処理したものの方が収率，水酸基当量ともに優れることが分かった．これは，イオン液体前処理は温和な条件で反応が進むため，リグニンの凝集，変性が少ないためだと考えられる．また，SEM によってナノ粒子化されたことが確認され，抗酸化活性を測定したところナノ粒子化なしと比較し約 2 倍になった．

Fabrication and characterization of enzymatic saccharification residue lignin and lignin nanoparticles

○Yuki Sugino[1], Yota Tsuge[2], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words Lignin nanoparticle, Lignocellulosic biomass, Antioxidant activity

3P-I159 気生微細藻類単離株における低温条件下オレイン酸の高蓄積

○西田 章弘[1], 油井 信弘[1], 藤原 祥子[2], 都筑 幹夫[2], 阿部 克也[1]
([1]工学院大・先進工・生化, [2]東京薬科大・生命科・応用生命科)
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】陸上に生活している気生微細藻類は，栄養源の欠乏，光，温度などのストレスに曝されていることから，光・温度ストレス耐性および高い脂質蓄積能をもつことが期待される．また，この微細藻類には大気中の二酸化炭素を直接固定して脂質を合成する種（例えば，*Coccomyxa* sp.）が知られている．本報告では，気生微細藻類を積層させた細胞フィルムの低温培養における一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の蓄積能を評価した結果を述べる．

【方法】東京都奥多摩地区の壁面から気生微細藻類のコロニーを採集した．マイクロピペット法によって単離した藻細胞は，光強度 15 μmol photons m^{-2} s^{-1}，温度 15±1℃において 1 週間そして窒素源が枯渇する時期まで培養し，生育能および脂質蓄積能を評価した．前者の培養を 1 次選抜，後者を 2 次選抜とした．細胞フィルムは藻細胞をメンブレンフィルターに吸着させることで作製し，湿ったコットン上で同様の光強度・温度において 1 週間気相培養した．生育能はセルカウントあるいは乾燥細胞重量により評価した．脂肪酸分析はガスクロマトグラフィーを用いて行った．

【結果と考察】単離操作の結果，直径 10 μm 程度の球状や楕円形の藻株が 26 種得られた．それらの藻株をマイクロプレートで 1 次選抜した結果，すべて増殖することが分かった．生育能が比較的高かった 7 種の藻株を三角フラスコで 2 次選抜した結果，脂肪酸蓄積能が比較的高い 3 種を選定した．それらの細胞フィルムを気相培養したところ，脂肪酸含有量が著しく増加する藻株が認められた．さらに，低温培養においてオレイン酸含有量率が約 50%であり，一価不飽和脂肪酸の蓄積能が高いことが分かった．現在，培養温度や光強度変化に対する脂質蓄積能について詳細に検討している．

Aerial microalgae producing high content of oleic acid in low-temperature environment

○Akihiro Nishida[1], Nobuhiro Aburai[1], Shoko Fujiwara[2], Mikio Tsuzuki[2], Katsuya Abe[1]
([1]Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ., [2]Dept. Appl. Life Sci., Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

Key words aerial microalgae, algal biofilm, oleic acid, biofuel

3P-N160 Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodosporidium toruloides*

○Dung Pham Khanh[1], Atsushi Miyata[1], Yosuke Shida[1], Harutake Yamazaki[2], Kazuo Masaki[3], Kazuki Mori[4], Kosuke Tashiro[4], Satoru Kuhara[2], Wataru Ogasawara[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]NRIB, [4]Fac. Agric., Kyushu Univ.)
s157021@stn.nagaokaut.ac.jp

In recent years, carotenoids have received increasing attention as they have extensive use in medicine, cosmetic, chemistry, food and feed industry as an antioxidant, vitamin A precursor and food colorants. Carotenoids widely distribute in diverse microorganisms including the bacteria, the algae and fungi. Among them, the yeast *Rhodosporidium toruloides* is convenient for large-scale fermentation due to its unicellular nature and high growth rate. However, the biotechnological synthesis of carotenoids is influenced by many factors such as carbon source, light, temperature, aeration, metal ions and salts. Light is an important factor to considerate during the production of microbial carotenoids; hence, it improves carotenogenesis. This is well-known response for *R. toruloides* but molecular mechanism of light response has been unknown. The purpose of this study is to obtain insight of light response for carotenoids biosynthesis in *R. toruloides*. To carry out comparative analysis with wild type, carotenoids non-producing mutants and higher carotenoid mutants were created. After 3 cycles of UV - mutation and screening, white mutant M18.10 was successfully obtained. From microarray analysis with Wild type and White mutant, we found some genes related to light response in *R. toruloides*. In addition, red mutants already were created and now, transcription response of genes encoding carotenoid biosynthesis are analyzing.

Analysis of light response mechanisms in carotenoid synthesis of the yeast *Rhodosporidium toruloides*

○Dung Pham Khanh[1], Atsushi Miyata[1], Yosuke Shida[1], Harutake Yamazaki[2], Kazuo Masaki[3], Kazuki Mori[4], Kosuke Tashiro[4], Satoru Kuhara[2], Wataru Ogasawara[1]
([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [3]NRIB, [4]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Rhodosporidium toruloides*, carotenoid biosynthesis, light response mechanism, mutagenesis

3P-I161 微生物分泌性膜小胞の物質送達媒体としての機能向上

○高木 航太郎[1], 長谷川 雄将[1], 二又 裕之[1,2], 田代 陽介[1]
([1]静大院・総合科技, [2]静大・グリーン研)
tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp

細菌が細胞外に分泌するナノオーダーのリポソーム様構造体 membrane vesicles (MVs)は，その内腔または表層に供与菌由来の物質を保持している．実環境中ではこれらの物質が MVs により媒介されることで，微生物細胞間での相互作用が行われている．この特徴より MVs は細胞標的型の物質輸送媒体として，ドラッグデリバリーシステムや DNA 導入技術などへの応用が期待される．しかし，細胞が MVs を取り込むメカニズムは不明である．本研究では，MV 内在タンパク質と微生物の MV 取り込みとの関係性を明らかにするとともに，MVs の物質輸送媒体としての機能向上を試みた．
高 MV 生産能を示す *Buttiauxella agrestis* CUETM77-167 をモデル微生物として用いて，当細菌が分泌する MVs の構成タンパク質の同定を行った．MVs を構成する主要因子をコードする遺伝子の欠損株を作製し，各株の MV 生産能を比較したところ，ペリプラズムに局在する TolB の欠損株において，生産量の顕著な向上が確認された．次に，野生株ならびに欠損株を MV 受容菌として，野生株由来の MVs の取り込み能を評価した．その結果，*tolB* 欠損株を受容株とした場合に野生株に比べて高効率な MV 取り込みが示された．さらに *tolB* 欠損株由来の MVs を用いて同様に MV 取り込み能を比較したところ，*tolB* 欠損株の MV 受容能にさらなる向上が見られた．以上の結果から，TolB が MVs の分泌及び取り込みに関与していること，さらには *tolB* 欠損が MVs の物質送達媒体としての機能向上に有効であることが示された．今後，MVs の取り込み機構を解明することにより，送達効率や対象細胞の選択性など更なる詳細な制御が期待される．

Improvement of bacterial membrane vesicles as delivery vehicles

○Kotaro Takaki[1], Yusuke Hasegawa[1], Hiroyuki Futamata[1,2], Yosuke Tashiro[1]
([1]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Rest. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words membrane vesicle, TolB, liposome

3P-N162 GFP 酵母を内包した単分散微細水滴の氷点下保存

○齋藤 友紀, 山根 克己, 西崎 徹彦, 中川 智行, 稲垣 瑞穂, 今泉 鉄平, 山内 亮, 岩本 悟志
（岐阜大院・自然科学技術）
isatoshi@gifu-u.ac.jp

【目的】生細胞の保存方法として凍結保存は有効だが，氷結晶の成長が細胞に損傷を与える．山根ら 1）は，単分散油中水滴型（W/O）エマルションの微細水滴内に出芽酵母の野生株(BY4741)を内包し，-10℃で 1 週間氷結晶の生成が起こらない状態での BY4741 株の保存に成功した．本研究では，氷点下での氷結晶の成長が，微生物に与える損傷について観察するために，各種細胞小器官に緑色蛍光タンパク質(GFP)を遺伝子導入した GFP 酵母を用いて，バルクで氷点下保存した試料と微細水滴内に内包し氷点下保存した試料について観察を行った．
【方法】培地は SD 培地を使用した．また GFP 酵母試料を-20℃のフリーザーに入れ，完全に凍結させ観察を行った．あわせて光学顕微鏡を用いメチレンブルー染色法で GFP 酵母の生死を判別した．連続相にシリコーン油，分散相に酵母培養液を用いてマイクロチャネル（MC）乳化により単分散微細水滴内に酵母を内包した．液滴の平均液滴径(Dav)は顕微鏡画像から求めた．調製した W/O エマルションは-10℃で 1 週間保存を行い，生存率を求めた．蛍光顕微鏡による観察を行い保存前との比較を行った．
【結果】-20℃において，完全に凍結した試料では酵母生存率はほぼ 0% になり死細胞では緑色蛍光タンパク質の蛍光が消失した．蛍光が消失したため，細胞小器官の破壊は確認が困難であった．SD 培地での MC 乳化では単分散微細水滴の内包に成功したが，Dav=90 μm と大きくなり，調製した液滴を氷点下で保存し観察を行ったところ，微細水滴の凍結が見られた．過冷却解除温度は，液滴径の増大により高温側に移動するので，氷結晶が容易に形成したと考えられる．現在 MC のデザインを変えて小さな液滴を作成中である．
1）山根 克己ら：第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集: 225, 2015 (鹿児島).

Preservation of monodisperse droplets containing GFP yeast at subzero temperatures

○Yuki Saito, Katsuki Yamane, Tetsuhiko Nishizaki, Tomoyuki Nakagawa, Mizuho Inagaki, Teppei Imaizumi, Ryo Yamauchi, Satoshi Iwamoto
(Grad. Sch. Natural. Sci.Technol., Gifu Univ.)

Key words GFP, subzero temperatures, microchannel array, encapsulation of microorganism

3P-N163 フロー式粒子像分析装置を用いた微生物集団のモルフォロジー解析

○原田 雄斗, 中川 智行, 稲垣 瑞穂, 今泉 鉄平, 岩本 悟志
（岐阜大院・自然科学技術）
isatoshi@gifu-u.ac.jp

【目的】発酵プロセスの精密計測は，プロセス効率化につながる．発酵に利用されている酵母の生活環は，発酵条件に影響を受け，酵母の粒径や出芽する時期などが変化する．フロー式粒子像分析装置（FPIA-3000,Sysmex）は，系に含まれる多数の粒子を個別かつ短時間で撮影し，その画像から粒径や円形度などを算出できる．取得した画像から微生物の生育状況等を迅速に把握することが可能となれば，発酵プロセスの計測・制御への応用が期待できる．本研究では，微生物集団の形態把握の手始めとして異なる条件で培養した試料の酵母を撮影しモルフォロジー解析を行い，系内の出芽個体の割合の算出を試みた．
【実験方法】YPD 培地, 30℃で一晩振盪培養した *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株を集菌し，条件①あるいは条件②で本培養を行った．条件①：アネロパックと試料を嫌気ジャーに密封し 30℃で静置培養．条件②：試料をバッフル付き三角フラスコに移し，30℃で振盪培養．培養 2,4,8,12 時間について各試料から継時的に 5.00 ml をサンプリングし FPIA-3000 で撮影・解析した．
【結果】各試料中の酵母総個体数，ならびに全ての酵母の円形度および粒径を得ることができた．円形度が 0.95 未満の酵母画像を選別したところ，いずれの条件においても出芽個体画像のみが抽出でき，酵母総個体数のデータから出芽個体割合を算出することができた．また円形度が 0.95 以上の未出芽酵母については，各条件において娘細胞と考えられる小さな粒径の個体の出現時間に差が生じた．また，出芽個体割合は培養時間とともに変化したが条件②の方が数値の変動が少なく，4 時間，12 時間培養の際に条件①と条件②で大きな差が見られた．これは主要な生活環にずれが生じているからであると思われる．以上の結果より，モルフォロジーによる微生物集団の形態把握が可能であることが示唆された．

Morphological analysis of microbial population using Flow Particle Image Analyzer

○Yuto Harada, Tomoyuki Nakagawa, Mizuho Inagaki, Teppei Imaizumi, Satoshi Iwamoto
(Grad. Sch. Natural. Sci. Technol., Gifu Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, morphology, FPIA-3000

3P-I164 *Mucor circinelloides* の二形性変化を応用した D-アミノ酸の生理活性解明

○岩倉 遼, 高野 真希, 星野 一宏
（富山大院・理工）
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】二形性真菌とは，温度，pH，血清，CO_2 の有無などの様々な環境の変化に応じて酵母体と糸状体の形態をとる．*Candida albicans* などは酵母体から糸状体に形態変化し，病原性を示す．また，本研究室で開発した *Mucor circinelloides* 4572J は好気条件で糸状体，完全嫌気条件で酵母体へと形態変化する真菌である．二形性変化時の細胞内代謝や遺伝子発現メカニズムは不明である．一方近年，発酵食品中などに含まれる D-アミノ酸に注目が集まっている．しかし現在，D アミノ酸の詳しい生理活性について不明である．そのため，二形性真菌培養時に D-アミノ酸を添加し菌体の変化を観察することによってその効果を簡易的に分類することができると考えられる．そこで本研究では 4572J の二形性メカニズムの解明とその二形性変化を応用した D-アミノ酸の生理活性の検討を行った．
【方法・結果】4572J を 70%N_2+30%CO_2 の完全嫌気条件下で培養し酵母体とし，4572J の酵母体を本培養に用いた．二形成変化には細胞内 cAMP 濃度が関係しているとされている．そのため，cAMP の生合成に関係する Adenylyl cyclase (AC)および Phosphodiesterase (PDE)の遺伝子発現量を解析した．AC の発現量は酵母体では糸状体と比べると常に高い水準で発現し，cAMP 分解酵素の PDE の発現量は酵母体では増加し，糸状体では減少していた．細胞内 cAMP 濃度を測定した結果，酵母体では培養を通して高い cAMP の水準を維持し，糸状体では培養初期の cAMP 含量が高く培養を通して減少していた．次に，D-アミノ酸を培地に添加し好気条件下で 4572J を培養した．その結果，12 種類のアミノ酸が菌糸伸長に影響し一部酵母体が確認できた．特に D-Met 添加時に，AC が高発現し cAMP 含量は糸状体の約 2 倍であった．これらのことから D-Met は cAMP 蓄積に影響を与えることが示唆された．

Elucidation of Bioactivity on D-Amino Acid by Applied Dimorphic Change of *Mucor circinelloides*

○Ryo Iwakura, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino
(Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama)

Key words *Mucor circinelloides*, dimorphism, D-amino acid, cAMP

3P-I165 スエヒロタケ変異株を用いた糖化発酵同時進行によるリグノセルロースからの直接 L-リンゴ酸生産

○星野 一宏[1], 高野 真希[1], 畑下 昌範[2]
（[1]富山大院・理工, [2]若狭エネ研）
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】近年，化石燃料の代替資源としてして，草本や木質バイオマスなどの未利用なバイオマス資源の利用法の開発が急務となってきた．特に，我国のような貧資源国では，それらバイオマスから新規エネルギー資源および有用化学物質原料として開発が進められている．このような背景から，我々は発酵技術である糖化発酵同時進行(CBP)プロセスの新規開拓を行い，スエヒロタケ *Schizophyllum commune* が CBP によりリグノセルロースから直接 L-リンゴ酸(LMA)を生産できることを見出した．すなわち，本菌株は，セルラーゼを多量に分泌するとともに発酵代謝が可能である．しかし，分泌セルラーゼにおいて β-Glucosidase (BGL) および Cellobiohydrolase (CBH)の生産は良好であるものの *endo*-β-Glucanse (EG) の分泌が乏しい．そこでイオンビーム変異法を活用し高セルラーゼ分泌変異株の構築を行い，各種リグノセルロースから効率良く L-リンゴ酸を検討した．
【結果】本研究で使用した菌株は，イオンビーム変異により構築した *S.commune* 4928A 株である．この野生株を 37℃，100 g/L の α-Cellulase を基質として 12 日間の好気培養を行った結果，24.5 g/L の LMA を直接生産できた．さらに，この培養において，セルラーゼ BGL と CBH はそれぞれ 11.9 と 0.98 U/ml と極めて高い酵素生産が確認できたが，EG の分泌は 0.2 U/mL 程度とかなり低いことが判明した．そこで，本変異株の菌糸懸濁液に対してカーボンイオンビーム(照射強度: 500 Gy)で照射し，α-Cellulose 寒天培地でスクリーニングおよび育種を行い変異株 A1 を獲得した．本変異株は各種リグノセルロースを基質とした CBP において，EG の分泌生産量も向上し，4928A 株では LMA の生産が達成できなかった Avicel, 稲わらなどから LMA を良好に生産できた．さらに，本変異株を用いた嫌気条件下での CBP による直接エタノール生産を報告する．

Direct Production of L-Malic Acid from Lignocellulose by Consolidated Bioprocessing with *Schlzophyllum commume* Mutant

○Kazuhiro Hoshino[1], Maki Takano[1], Masanori Hatashita[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, [2]WERC)

Key words Ion-beam mutation, lignocellulosic materials, malic acid, *Schizophyllum commune*

3P-N166 可視光・近赤外光応答性光半導体加工フィルムの抗菌特性に関する研究

○山本 幸次郎[1], 辻塚 誠一郎[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
（[1]近畿大院・産理工・生環化, [2]伊都研）
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】 伊都研究所が開発した平板状銀ナノ粒子(A)・ホウ素樹脂(B)・クレイ(C)からなる ABC 複合体粒子は，溶媒分散性と安定性に優れ，かつ可視光や近赤外光を吸収し，光電変換機能を有する．すなわち，塗料タイプの新奇な光半導体材料として薄膜太陽電池など様々な用途が期待される．当研究室は，ABC 粒子が微量で暗所下でも病原細菌や黒カビに対して強い殺菌効果を有し，室内灯程度（1000 lx）の可視光照射により，さらに殺菌能が向上することを明らかにしている．今回，薄膜太陽電池などへの利用を目的として作製した ABC 光半導体表面加工フィルムについて，暗所と光照射条件下での抗菌特性を検証した．
【方法】 『ファインセラミックス-可視光応答型光触媒抗菌加工製品の抗菌性試験方法』である JIS R1752 法を参考に，本物質の抗菌活性を測定した．新規な製法で作製された量産型の ABC 粒子を機械的に表面塗布・加工した PET フィルムを試験片とし，その上に所定の菌数に調整した大腸菌などの菌液 150μL を滴下して素の PET フィルムを被せた後，暗所もしくは LED 光（1000 lx）照射下に放置した．8 時間後に菌液を回収し，平板コロニー形成計数法で大腸菌の生残菌数の減少を調べることにより，抗菌活性を測定した．
【結果】 フィルムへの加工量（塗布回数）によっても異なるが，ABC 非加工フィルムに較べて大腸菌の生菌数は，当研究室独自に設定した“完全”暗所では 3 桁，JIS 法に従った“標準”暗所で 4 桁以上減少し，可視光照射下ではさらに 1 桁から 2 桁減少した．また，黒コウジカビやアオカビなどの生残胞子数を 2 桁から 3 桁減少させ，さらにインフルエンザウイルスにも効果があった．現在は，黄色ブドウ球菌などの病原細菌に対する殺菌効果を調べている．

Investigation on antibacterial activity of the visible light and near infrared light responsive photosemiconductor coated film

○Kojiro Yamamoto[1], Seiichiro Tsujituka[1], Kengo Itou[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Grad.Sch.Humanity-Oriented Sci.&Eng.,Kindai Univ, [2]Ito Laboratory)

Key words antibacterial, near infrared ray-responsible photosemiconductor, nanosilver

3P-N167 新規な塗料状光半導体材料の暗所と可視光及び近赤外光照射下での抗菌特性に関する研究

○辻塚 誠一郎[1], 山本 幸次郎[1], 伊東 謙吾[2], 田中 賢二[1]
（[1]近大・産理工, [2]伊都研究所）
tanaka@fuk.kindai.ac.jp

【目的】 平板状銀ナノ粒子 （AgNPL），ボロン樹脂(B)，クレイ(C)で構成されるABC 複合粒子は有機溶媒での分散性と安定性に優れ，物体表面への塗布による薄膜化が可能であり，可視光・近赤外光照射下で明瞭な光電変換機能を有する．すなわち，ABC 粒子分散液は，画期的な塗料型光半導体として多様な用途が期待される．また，我々は微量の ABC 粒子を吸着させた PET フィルムは，暗所で細菌やカビ胞子に対する強い殺菌効果を示し，可視光・近赤外光照射により殺菌力がさらに増強されることを明らかにしている．今回，量産化に向けて新たな製法で作製された ABC 粒子の抗菌活性に対する光照射の効果について検討した．また，暗所での抗菌活性についてその原因を検証した．
【操作】 JIS R 1752 のフィルム密着法を参考に抗菌試験を実施した．バインダーをコートした PET フィルムに ABC 粒子溶媒分散液の希薄液を塗布・乾燥し吸着させた．この試験片に所定量の検定菌の菌液をマウントしその上に素の PET フィルムを被せ，シャーレ中の湿らせた濾紙の上に置いて蓋をした．暗所・白色光照射下（照度 1000 lx）・近赤外照射下（放射照度 12.5μW/mm2）で８時間放置した．その後，フィルムから菌液を回収し，平板培地で培養することで生残菌数を計数した．
【結果】 量産型 ABC 粒子も暗所で強い抗菌活性を示し，さらに可視光や近赤外光照射により抗菌活性が増大した．ABC 粒子光半導体は，コンデンサー的電気応答を示し遮光後もしばらくの間電流放出が続く．これが本物質の暗所での抗菌活性に寄与しているのではないかと考え，JIS 法と異なり抗菌試験前段階の試験片の調製と菌液のマウント作業もほぼ完全な遮光条件(照度 1 lx 以下)で行ったところ，従来の暗所条件に較べて抗菌活性の明白な低下が認められた．

Investigation on antibacterial activity of novel printable photosemiconductor in the dark place and the visible light and the near infrared light irradiation conditions

○Seichiro Tsujitsuka[1], Kojiro Yamamoto[1], Kengo Ito[2], Kenji Tanaka[1]
([1]Fac. Humanity-Oriented. Sci. Eng., Kinki Univ., [2]Ito Laboratory)

Key words dark place, visible light, near infrared light

3P-N168 二価カチオンが誘起する負電荷脂質膜での相分離

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

【背景と目的】生体模倣膜として，リン脂質から成るリポソームが用いられている．多成分リン脂質では相分離構造が形成され，これは細胞膜におけるラフト構造と対応すると考えられている．そのため，多成分リン脂質での相分離は広く研究が行われてきている．現在までの多くの研究では，電気的に中性のリン脂質を用いた研究例が多いが，実際の細胞膜には，負電荷脂質も多く含まれている．我々は，負電荷脂質を含むリポソームに，NaCl のような 1 価の金属イオンを添加する事により，相分離構造の制御をおこなってきた．しかし，細胞内外には，Na^+だけではなく Mg^{2+}や Ca^{2+}などの金属イオンやポリアミンなどの多価カチオンが存在する．多価カチオンの影響を明らかにするために，本研究では負電荷脂質含有リポソームに，２価の金属イオンと鎖長の異なるジアミンを添加した際の相挙動を観察し，2 価カチオンの構造の違いが負電荷脂質膜における相分離に与える影響を考察する事を目的とした．
【方法】負電荷不飽和脂質として DOPG と DOPS，中性飽和脂質として DPPC を用いた．DOPG：DPPC ＝ 50：50 のリポソームを静置水和法で作製し，観察直前に塩溶液($MgCl_2$，$CaCl_2$，プトレシン，ヘキサメチレンジアミン)と混合し，3 分静置した後，蛍光顕微鏡で観察した．実験温度は 25℃に設定して行い，それぞれの系で 50 個以上のリポソームを観察した．
【結果と考察】DOPG：DPPC=50：50 のリポソームにおいて，塩を混合しない場合，ほとんど相分離構造は観察できなかった．$MgCl_2$ を 1nM～100nM 混合した場合は約 40％程度，1μM を混合した場合はほぼ 100%の割合で相分離が観察できた．他のカチオンでも同様に実験を行い，相分離構造の形成におけるカチオンの電荷密度の違いを考察する．

Phase separation of negatively charged lipid membrane induced by divalent cations

○Yamamoto Yogo, Shimokawa Naofumi, Takagi Masahiro
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words liposome, negatively charged lipid membrane, phase separation, divalent cation

3P-N169 酸化コレステロール存在下における生体模倣膜での相分離ドメイン形成

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

【背景と目的】生体膜にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだラフトと呼ばれる領域が形成されていると考えられており，細胞機能の理解において重要視されている．ラフトの構成成分であるコレステロールは，活性酸素により，容易に酸化される．しかし，生成された酸化コレステロールがラフトに及ぼす影響についての理解は十分ではない．単純な組成，特に飽和脂質・不飽和脂質・コレステロールから成るリポソームは，低温においてラフトのモデル系として注目されている飽和脂質とコレステロールに富んだ液体秩序相を形成する．そこで本研究では，酸化コレステロールを含むリポソームを作製し，顕微鏡により相分離の観察を行う．飽和脂質・不飽和脂質・コレステロールから成る系をコントロールとし，コレステロールを徐々に酸化コレステロールに置き換え，段階的に酸化されることにより液体秩序相がどのような影響を受けるか考察する．
【方法】不飽和脂質（DOPC），飽和脂質（DPPC），コレステロール（Chol）を用いて，液体秩序相を形成しやすい組成，DOPC/DPPC/Chol=40:40:20，20%のコレステロールを 5%ずつ酸化コレステロール(7-keto,7β)に置き換え観察を行った．また，固体秩序相を形成しやすい組成，DOPC/DPPC/Chol=45:45:10 においても同様の実験を行った．
【結果と考察】DOPC/DPPC/Chol=40:40:20 において,酸化コレステロールである 7-keto にすべて置き換わると，ドメインが形成されることなく，No domain のリポソームが半分以上形成される．また，7β の場合は，徐々に増加するにつれ No domain が増加することが分かった．これら，7-keto，7β の違いを詳細に議論するため，Chol を徐々に酸化コレステロールに置き換えドメインの安定性について議論する．

Formation of phase-separated domains in biomimetic membranes with oxidized cholesterol

○Makoto Shimizu, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words liposome, phase separation, raft, oxidized cholesterol

3P-F170 LAL 固定化ビーズ法を用いたエンドトキシンの高感度・迅速検出法の開発と利用（第 4 報）

○猪瀬 陽加, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 臨床現場では，敗血症などのエンドトキシン（ET）ショック症状を示す救急患者に対して，血中の ET 濃度の迅速かつ正確な測定が求められている．血中の ET 濃度は非常に低いとともに，LAL 反応に影響を与える因子が存在するため，正確な ET 測定が困難である．ヒト血清試料の前処理に希釈加熱法が用いられているが，加熱処理がヒト血清中の ET に及ぼす影響は未解明な部分が多い（加熱によりヒト血清中の ET が凝集して正確な測定ができない場合がある）．本研究では，我々が開発した ET の高感度・迅速測定が可能な LAL 固定化ビーズ法 [1] を用いて，加熱処理がヒト血清中の ET に及ぼす影響を解析するとともに，本法の有効性を評価した．また，本法の利用性の拡大についても検討した．
【方法と結果】 前報 [1] に従い，LAL 固定化ビーズを作成した．CSE（*Escherichia coli* UKT-B 由来の ET）を添加したヒト血清を希釈加熱法により前処理後，適宜希釈し，ヒト血清中での ET の添加回収率を求めた．その結果，LAL 固定化ビーズ法では，非常に低濃度の ET（約 0.0001EU/ml）を迅速かつ正確に測定することが可能であった．さらに，加熱がヒト血清中の ET に及ぼす影響も把握することができた．従来は測定が困難であった，LAL 反応に影響を与える因子が存在する試料中でも正確かつ迅速な測定ができる本法の特徴を活かし，胆汁酸（Oxgall 等）の ET 不活化効果を評価した．その結果，*E. coli* Seattle 1946 由来の ET は胆汁酸で不活化されたが，CSE は不活化されず，胆汁酸による ET の不活化には選択性があることが初めて明らかになった．
1）H25 生物工学会要旨 p.152. 本研究の一部は(公財)広沢技術振興財団の助成を受けて実施された．

Development of a rapid and sensitive method for assessing endotoxin by using LAL-conjugated-microbeads and it's application (part 4).

○Haruka Inose, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bile acid, endotoxin, Limulus amebocyte lysate, serum sample

3P-I171 LAL 固定化ビーズ法を用いたグラム陰性菌の培養に伴うエンドトキシンの遊離特性の定量的解析（第 2 報）

○大瀧 賀也, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 エンドトキシン（ET）はグラム陰性菌の外膜構成成分の一種で，血中へ混入すると人体に重篤な症状を引き起こす．一般的に，ET は菌体に安定に保持され，菌体外への漏出は溶菌によってのみ生じるとされている．しかしながら，我々が開発した ET の高感度，迅速測定法（LAL 固定化ビーズ法）を用い，種々のグラム陰性菌の培養に伴う ET の挙動を定量的に解析した結果，“溶菌だけではなく，菌体の分裂に伴い ET が菌体外へ顕著に遊離する”タイプと，“溶菌の際にのみ ET が菌体外へ遊離する”タイプのグラム陰性菌が存在することが明らかとなった [1]．本研究では，研究対象とするグラム陰性菌の範囲を広げ，タイプ分けを行うとともに，それぞれが生成する ET の特性の違いについて比較解析を行った．

【方法および結果】 802 培地を用い *Escherichia coli*，*Pseudomonas aeruginosa*，*Serratia marcescens*，*Klebsiella pneumoniae*，*P. putida*，*Salmonella enterica* の培養を行い，LAL 固定化ビーズ法で菌体内と培養液中の ET 濃度および $U.O.D._{600}$ と生菌数も同時に測定した．種々検討した結果，*E. coli*，*S. marcescens*，*K. pneumoniae*，*P. putida*，*S. enterica* では対数増殖期に ET が菌体外へ遊離した一方，*P. aeruginosa* では ET が殆ど遊離しなかった．また，単位菌体当たりの総 ET 量（菌体内の ET ＋培養液中に遊離した ET）や遊離率（総 ET 量に対する遊離 ET の割合）は菌種によって大きく異なった．更に，各々の菌株が生成した ET の活性炭への吸着性を比較したところ，異なる吸着特性を示すものも認められた．また，種々の菌株の対数増殖期における培養液中と菌体内の ET を抽出，精製後，SDS-PAGE で比較分析した結果，異なる分子量を示すバンドもみられ，生成した ET には多様性がある可能性が示唆された．

1) H28 生物工学会要旨集 p. 311.

（杉山産業化学研究所の助成を受けました．）

Application of LAL-conjugated-microbeads method for quantitative analysis of endotoxin-releasing characteristics of gram-negative bacterial cultures (part2)

○Kaya Ohtaki, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words endotoxin, cultivation, gram-negative bacteria, Limulus amebocyte lysate

3P-I172 固定化培養を活用したシロアリ腸内の未培養微生物の培養化

○森 峻一 [1], 吉村 剛 [2], 青柳 秀紀 [1]
([1]筑波大院・生命環境, [2]京大・生存研)
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【緒言】 シロアリは腸内に多様な有用微生物を共生・共存させているが，大部分は未培養微生物である．未培養微生物の培養化は，新たな微生物資源の開拓をおこなう上で重要性が高い．我々は，シロアリの腸の形状を壊して培養することが，培養化できる微生物種を制限している一つの原因ではないかと考えた．この問題を解決するため，本研究では，シロアリの腸をゲル等で包括固定化し，腸の形を維持したまま，シロアリの腸内微生物を培養化する方法を開発し，その有効性の評価を試みた．

【方法と結果】 シロアリのモデルとして *Coptotermes formosanus*（イエシロアリ）の職蟻を実験に用いた．*C. formosanus* の腸を抜腸後，腸を破砕した系と非破砕の系で液体培養（100 rpm, 30°C, 72 h）をおこない，集積された培養菌叢と，それらを寒天平板培地に播種，培養し，得られた培養菌叢を PCR-DGGE 法で比較解析した．種々検討した結果，腸の破砕の有無により，培養化される菌叢が異なることが明らかとなった．腸の形状を維持しながら培養するために，*C. formosanus* の腸をアルギン酸 Ca ゲルビーズに包括固定化し，液体培養したところ，培養の経過に伴いゲルビーズから菌体の漏出が認められた．寒天平板培地に播種し，培養したところ，漏出した菌はコロニー形成能が高いことが示唆された．培養液中とゲルビーズ内部の菌叢を PCR-DGGE 法で解析した結果，本系で特異的に培養化される微生物の存在が認められた．現在，本系の最適化について検討中である．

Utilization of immobilized cell culturing method for cultivation of uncultured microbes isolated from termite intestines

○Shunichi Mori[1], Tsuyoshi Yoshimura[2], Hideki Aoyagi[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]RISH, Kyoto Univ.)

Key words alginate, cell immobilization, symbiosis, termite

3P-I173 腸内有用細菌のストロンチウム除去特性の解析（第 3 報）

○遠藤 輪, 青柳 秀紀
（筑波大院・生命環境）
aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp

【目的】 原子力発電所の事故などで放出された放射性元素が食品などを介して消化管内に侵入した場合，適切に体外へ排出する必要があるが，良好な方法は確立されていない．我々は，これまでに副作用が無い放射性物質の消化管からの新規な排出法として乳酸菌の利用を考案し，Sr の除去に利用できる可能性を示してきた [1, 2]．本研究では，乳酸菌の Sr 吸着メカニズムを明らかにするために吸着部位の特定とその吸着様式の解析を試みた．

【方法と結果】 種々検討した結果，乳酸菌（*Lactobacillus* 属）の Sr 吸着部位は細胞外多糖（EPS）であることが推測された．そこで，37℃で 9 h 培養した乳酸菌の菌体を加熱処理後，遠心分離し，その上清にエタノールやトリクロロ酢酸を用いた沈殿法によって EPS の抽出，精製を行った．得られた EPS を用いて Sr 吸着実験を実施し，ICP-MS によって Sr 濃度を測定した．その結果，溶液中の Sr 濃度の減少が認められた．また，乳酸菌の菌体による Sr 除去量と EPS 量を測定したところ，どちらも培養経過に伴って減少する傾向があり，両者の間には正の相関関係が認められた．以上の結果から，推測したように乳酸菌の Sr 吸着部位は EPS であることが示された．更に，任意の濃度の Sr 溶液を用いて乳酸菌による Sr 吸着量を測定した結果，Langmuir 型の吸着等温式で表現できることが明らかになった．本研究は，乳酸菌の Sr 除去メカニズムを明らかにした初めての研究である．

1） H27 生物工学会要旨集 p. 139, 2） H28 生物工学会要旨集 p. 315

Analysis of strontium removal characteristics of probiotics (part 3)

○Rin Endo, Hideki Aoyagi
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words extracellular polysaccharide, lactic acid bacteria, metal adsorption, strontium

3P-I174 High Production of single cell oil from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Hiromi Otsuka[1], Hana Matsumoto[1], Chie Kihira[1], Ahmad Thontowi[2], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[1,4]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]BSN, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Lipomyces starkeyi is a particularly well suited host given its native abilities, including the capability to utilize a wide variety of carbon sources for lipid production. In this study, we investigated the potential of *L. starkeyi* NBRC10381 to produce single cell oil in synthetic limited nitrogen mineral medium and artificial lignocellulose feedstock medium with mix inhibitory chemical compounds. Six culture condition differences in carbon sources (glucose and/or xylose) as well as the presence of inhibitory compounds were used for batch fermentation in several initial OD_{600nm}. The fermentation using glucose and xylose as mixed carbon sources generated highest biomass production at 40.8 g/L, and total lipid was achieved at 84.9% (w/w). When glucose or xylose was used as a sole carbon source, the total lipid was achieved at 79.6% (w/w) and 85.1% (w/w), respectively, with the cell biomass production at 30.3, 28.7 g/L for glucose and xylose, respectively. The inhibitory chemical compounds were used as a cocktail mixture, containing 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural, acetic acid, formic acid, levulinic acid, vanillin and syringaldehyde, almost similar those were released with real biomass hydrolysate upon the hot water treatment. The lipid production in the medium with mix inhibitory compounds showed rapid degradation of inhibitory compounds, resulted in the high amount of lipid production (± 80%, w/w) and cell biomass (± 37 g/L).

High Production of single cell oil from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*

○Ario Betha Juanssilfero[1,2], Prihardi Kahar[1], Rezky Lastinov Amza[1], Hiromi Otsuka[1], Hana Matsumoto[1], Chie Kihira[1], Ahmad Thontowi[2], Yopi[2], Chiaki Ogino[1], Bambang Prasetya[3], Akihiko Kondo[1,4]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]LIPI, [3]BSN, [4]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, single cell oil, fermentation

3P-I175 *Pichia pastoris* のタンパク質分泌生産における新規有用因子の獲得とその蓄積による効果の検証

○伊藤 洋一郎[1], 中村 泰之[1], 西 輝之[2], 藍川 晋平[1], 蓮沼 誠久[1], 石井 純[1], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]カネカ)
akondo@kobe-u.ac.jp

【背景】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* 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，有用タンパク質生産の微生物宿主としてよく利用されている．しかし目的とするタンパク質によっては，分泌生産性が低下することが知られており，その向上に向けて様々なアプローチでの研究がなされてきた．本研究では，難分泌タンパク質の分泌生産性向上を目指して，ランダム遺伝子欠損株ライブラリのハイスループットスクリーニングより分泌生産性に影響を与える有用因子群を探索し，有用因子の蓄積による分泌生産性への影響を検証した．
【方法・結果】*P. pastoris* の非相同組換え機構を利用した REMI 法（restriction enzyme mediated integration）を用いて，ランダム遺伝子欠損株ライブラリを作製した．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 穴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，ランダム遺伝子欠損ライブラリのスクリーニングを行った．約 19,000 株のランダム遺伝子欠損株をスクリーニングしたところ，野生株と比較して 1.3～1.6 倍分泌生産量が増加した 20 株が得られた．それぞれの遺伝子破壊部位を決定し，同遺伝子の破壊株を新たに作製，再評価することで，遺伝子破壊が分泌生産向上に影響を与える新規の 6 遺伝子を同定した．またそれらのうち 4 遺伝子を順に破壊した株を作製し scFv の分泌生産量を評価した結果，有用因子の蓄積効果が確認できた．また上記の 4 遺伝子破壊株は，野生型と比較して，scFv の分泌生産量が約 3 倍増加していた．本大会では，*P. pastoris* におけるタンパク質分泌発現のボトルネック解消方法に関しても議論したい．

Enhanced protein secretion by accumulation of novel effective factors in *Pichia pastoris*

○Yoichiro Ito[1], Yasuyuki Nakamura[1], Teruyuki Nishi[2], Shimpei Aikawa[1], Tomohisa Hasunuma[1], Jun Ishii[1], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Kaneka Corp.)

Key words *Pichia pastoris*, Protein secretion, high-throughput screening, effective factor

3P-I176 The establishment high cell density culture of oleaginous *Lipomyces starkeyi* D35 for high cell and lipid production

○Rezky Lastinov Amza[1], Prihardi Kahar[1], Ario Betha Juanssilfero[1,3], Hiromi Otsuka[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [3]LIPI)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

Oleaginous microorganisms such as oleaginous yeasts are well known for the ability to accumulate lipid within their cells more than 20 % in certain conditions. *Lipomyces starkeyi* D35 (LsD35) is one of promising oleaginous yeast for lipid production. The purpose of this research is to establish the optimum condition for high cell and lipid production of LsD35 using high cell density culture in jar fermentor. The high cell production must be achieved prior to the high lipid production. The evaluation of high cell production was performed in batch culture by using agitation speed and initial carbon/nitrogen (C/N) ratio as parameters. Two types of agitation speed (200 and 500 rpm) and four conditions of initial C/N ratio (9.17; 17; 33.3; and 70) were performed in order to find the optimum condition for cell production respectively. It became apparent that the agitation speed at 500 rpm is more optimum condition for high cell production. The total dried cell weight at 500 rpm in medium with C/N ratio of 33.3 was 27.85 g/L. Meanwhile, batch culture with initial C/N ratio of 17 at 500 rpm resulted in 28.36 g/L of total dried cell weight with 18.15 g/L of cell only (total lipid 36 %, wt/wt). This result is the most optimum cell production condition for LsD35 in batch culture. It is expected that this result could be improved by fed-batch culture strategy.

The establishment high cell density culture of oleaginous *Lipomyces starkeyi* D35 for high cell and lipid production

○Rezky Lastinov Amza[1], Prihardi Kahar[1], Ario Betha Juanssilfero[1,3], Hiromi Otsuka[1], Chie Kihira[1], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [3]LIPI)

Key words oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi* D35, high cell density culture, cell and lipid production

3P-I177 麹菌による複数遺伝子の同時高発現を可能にするプロモーターセットの開発

○片山 周平[1], 若井 暁[2], 堤 浩子[3], 秦 洋二[3], 荻野 千秋[1], 近藤 昭彦[2]
([1]神戸大院・工, [2]神戸大院・イノベ, [3]月桂冠・総研)
ochiaki@port.kobe-u.ac.jp

【背景】
酵素製剤は生物化学工学および食品産業などの様々な分野で利用されており，単一の酵素からなるものだけでなく，複数の酵素のカクテルとして供給されているものがある．これらの酵素を生産する代表的な宿主として，麹菌が利用されている．麹菌を用いて複数の酵素からなる酵素製剤を製造する場合，それぞれの酵素を個別に生産するより，単一の宿主で同時に生産する方が生産コストの観点から有利である．酵素を同時生産するためには，複数の酵素の遺伝子を同時に高発現する必要があるが，遺伝子の共発現に適したプロモーターの解析はこれまでに行われていない．本研究では，麹菌での複数遺伝子の同時高発現を目的として，プロモーターの探索を行った．
【方法・結果】
Maeda ら（AMB 2004）は，*Aspergillus oryzae* RIB40 を glucose で培養した際の遺伝子発現について報告しており，本研究では，この中で高発現とされた遺伝子を候補として選抜した．*A. oryzae* RIB40 を基質（glucose，xylose，starch，wheat bran）や培地組成（peptone 有・無），加えて塩ストレス（1 M NaCl 有・無）や温度（25℃，30℃，37℃）などの培養条件を変更し，全 72 条件で培養した．培養 2 日目および 4 日目の菌体を回収し，全 RNA を抽出した．qPCR により各遺伝子の発現量を評価した．
その結果，xylose では peptone の有無にかかわらず 30℃，starch では peptone 有りの 37℃，wheat bran では peptone 有りの 25℃で，3 種類以上の遺伝子が高発現していた．これらの発現量は，glucose での培養時よりも高く，塩ストレスで一様に低くなった．したがって，今回各種培養条件で高発現していた遺伝子上流のプロモーターが新規高発現用プロモーターの候補となる．今後は，これらの条件でプロモーターのレポーターアッセイを行い，酵素分泌生産量の観点から評価する．

Development of promoter sets for high co-expression of multiple genes in *Aspergillus oryzae*

○Shuhei Katayama[1], Satoshi Wakai[2], Hiroko Tsutsumi[3], Yoji Hata[3], Chiaki Ogino[1], Akihiko Kondo[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [3]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

Key words *Aspergillus oryzae*, promoter, co-expression, enzyme

3P-I178 非有機溶媒耐性菌による疎水性物質生産への隔壁二相培養システムの適用

○石川 大将[1], 川西 琢也[1,2], 滝口 昇[1,2]
([1]金沢大院・自科, [2]金沢大・理工)
tackey@se.kanazawa-u.ac.jp

【背景と目的】近年，持続可能な物質生産法の一つにバイオプロセスの利用が注目されている．しかし，疎水性物質の生物毒性からその適用範囲は親水性物質生産に限定される．そこで疎水性物質生産を可能にするため，疎水性の有機溶媒を培養相に重層し，基質・生産物の毒性を抑制する二相培養システムが提案されている．通常，二相培養には有機溶媒耐性菌が用いられるが，有用物質を生産する耐性菌や，生産物質は限られる．我々は，隔壁二相培養システムが，二相の乳化を抑制するだけでなく，更なる毒性軽減に有効であることを示している．本研究では，本システムを用いた非耐性菌による疎水性物質生産を目的とし，フラスコおよびファーメンタで検討を行った．
【方法】トルエンの 3 - メチルカテコール(3MC)への変換をモデルとし，トルエン変換遺伝子を *E. coli* DH5α に組み込んだ非耐性菌を用いた．フラスコ培養では，有機相に 1-デカノール 50 ml，水相に LB 培地 100 ml を用い，基質としてトルエンを 600 µl/ 9 h で加え，それぞれ一相と二相で比較培養を行った．継時的に水相からサンプリングし，菌体濃度，グルコース濃度，3MC 濃度を測定した．ファーメンタ培養では，有機相に 1-デカノール 375 ml，水相に MSB 培地 750 ml を用いて，フラスコ培養と同様の項目について測定した．
【結果と考察】一相のフラスコ培養では 3MC は生産されなかったが，二相では 40 h で菌体あたり 40 mg/ l の 3MC 生産が確認された．これは *P. putida* を用いた場合の約 1/10 の結果であった．隔壁の効果を確認したファーメンタ培養では，40 h で 140 mg/l の 3MC 生産が確認された．これは *P. putida* の約 1/4 の結果であり，フラスコとファーメンタの違いはあるが，隔壁の効果が示唆された．ただし，30 h にグルコースの枯渇による生産低下が見られるため，グルコース再添加により生産が向上する可能性がある．

Application of the partition equipped two-phase fermentation system on hydrophobic substance conversion by solvent-intolerant bacteria

○Hiromasa Ishikawa[1], Takuya Kawanishi[1,2], Noboru Takiguchi[1,2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Coll. Sci. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words two-phase fermentation system, partition, hydrophobic substance, solvent-intolerant bacteria

3P-I179 water-in-oil エマルションを用いた微生物培養技術の開発

○大田 悠里[1,2], 斉藤 加奈子[1,2], 松倉 智子[2], 髙木 妙子[2], 常田 聡[1], 野田 尚宏[1,2]
([1]早大・先進理工, [2]産総研・バイオメディカル)
noda-naohiro@aist.go.jp

【目的】環境中には多種多様な微生物が生息しているが，既存の手法では培養が困難な微生物が 99%以上を占めると言われている．これら微生物を培養することで有用な微生物の発見や未利用微生物資源の活用化が期待されることから，新規培養手法の開発が課題となっている．近年，water-in-oil (w/o) エマルションをバイオリアクターとして用いたシングルセル解析やバイオ燃料の生産などに関する研究が行われてきている．これらの研究において w/o エマルションの使用により，ハイスループットに培養場を作製できることやシングルセルから培養を開始できることが報告されており，これまで培養できなかった微生物の培養場として利用できる可能性がある．これらを踏まえて本研究では w/o エマルションを用いた難培養微生物の培養技術の確立を目指す．【方法】水相に用いる微生物培養用培地としては LB 培地を選択し，これを油相中に分散させて w/o エマルションを作製した．LB 培地の濃度や w/o エマルションの大きさを変化させて各条件における w/o エマルションの安定性を評価した．さらに大腸菌培養液や土壌由来微生物の懸濁液を適宜希釈し，LB 培地と混合したのちに油相に分散させて w/o エマルションを作製し，経過観察を行うことで微生物の増殖の有無を評価した．【結果・考察】40-120 μm 径の様々なサイズの w/o エマルションの作製に成功し，培養開始後 2 週間程度安定的に保存できた．また水相に微生物培養用培地を用いて作製した w/o エマルションを経過観察したところ，w/o エマルション内で大腸菌および土壌由来微生物の増殖が観察された．w/o エマルションを用いた微生物培養技術はハイスループットな培養技術として有用であることが示唆された．

Development of a microbial culturing platform based on water-in-oil emulsions

○Yuri Ota[1,2], Kanako Saito[1,2], Satoko Matsukura[2], Taeko Takagi[2], Satoshi Tsuneda[1], Naohiro Noda[1,2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words microbe, water-in-oil emulsion, microfluidics droplet, cultivation

3P-N180 エマルジョンドロップレットを用いた微生物培養

○村井 雄大[1], 森田 直樹[1], 土居 克実[2], 久原 哲[1], 田代 康介[1]
([1]九大院・生資環, [2]九大院・農・遺資研セ)
murai@grt.kyushu-u.ac.jp

【緒言】 環境中には膨大な量と種の微生物が存在しており，多種多様な微生物が相互に関わって系をなしている．その中には，他の微生物が生産した因子やシグナルに影響を受け，単離培養された状態では見られなかった代謝反応や物質生産を示す微生物も存在すると考えられているが，ほとんど未解明である．本研究では，エマルジョンドロップレットという微小環境で様々な環境微生物を培養する手法を検討した．微生物を組み合わせて封入することで，複合培養によって起こる代謝反応や物質生産を評価できる系を構築することを最終的な目標とする．
【実験】 ドロップレットジェネレータを用いて，直径 40-50 μm のエマルジョンドロップレットを生成し，封入する溶液や培養方法などの最適条件を検討した．また，*Escherichia coli*，*Saccharomyces cerevisiae*，*Lactobacillus rapi*，*Pediococcus lolii* をそれぞれドロップレットで封入・培養し，増殖など評価した．
【結果および考察】 2×YT 培地，YPD 培地，MRS 培地，GYP 培地を用いて安定したドロップレットの生成に成功した．また，温度などの諸条件を検討し，少なくとも 7 日間ドロップレットの状態を維持する条件を確立した．さらに，*Escherichia coli*，*Saccharomyces cerevisiae*，*Lactobacillus rapi*，*Pediococcus lolii* のドロップレット培養が可能であることを確認した．エマルジョンドロップレットは封入する溶液や培養温度が耐久性に大きく影響することが明らかとなり，更に安定な条件の検討が必要であるが，*Escherichia coli*，*Saccharomyces cerevisiae*，*Lactobacillus rapi*，*Pediococcus lolii* などのドロップレット内での培養法を確立したことから，今後様々な環境微生物を用いたエマルジョンドロップレットによる複合培養が期待できる．

Culture of micro-organisms by emulsion droplet

○Yuta Murai[1], Naoki Morita[1], Katsumi Doi[2], Satoru Kuhara[1], Kosuke Tashiro[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Inst. Genet. Resour., Kyushu Univ.)

Key words microfluidic device, microorganisms, coculture

3P-F181 リグノセルロース系バイオマスを用いたキシリトールの効率的微生物生産

○姜 林涛, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

[目的] 本研究室では未利用バイオマスを原料としたバイオプロセスによるキシリトール生産を検討している．これまで，キシロース資化性酵母 *Candida magnoliae* を用い，コーンコブを原料としたキシリトールの効率的生産について報告してきた[1]が，実用化のためには更なる効率化が必要である．そこで生産コストの低減を目的に固定化酵母を用いたエアリフト型バイオリアクターによる効率的なキシリトール生産プロセスの検討を行った．
[実験方法] コーンコブの加水分解にはコーンコブの粉砕物を 10 倍量の 1.5% H_2SO_4 を用い，121℃，処理時間 60min の条件下で加水分解を行い,中和後，培地として使用した．菌株としてキシロース資化性酵母である *Candida magnoliae* (FERMP-16522) を使用した．菌体の固定化はアルギン酸ナトリウムによる包括法を用いた．1.5L のキシリトール生産培地を含む有効容量 2 L のエアリフトバイオリアクターを用い，温度 30℃，pH 7.0 の条件で，初期キシロース濃度及び酸素移動速度条件(OTR)を変化させ，固定化菌体を用いた繰り返し回分培養及び連続培養を行った．
[結果] 固定化菌体を用いた連続培養では高い収率を維持した連続運転が可能であったが培養中コンタミが観察され，長期的運転は難しかった．次に繰り返し回分培養を行ったところ，安定した運転が可能で，80 日以上にわたり，最大 117.2g/L のキシリトールを高い収率に維持しつつ生産することができた．固定化菌体を用いた繰り返し回分培養はキシリトール生産における収率及び生産性の向上に有効と考えられた．
［参考文献］ 1) 堀内淳一；化学工学,77,12,845-848(2013)

Effective microbial production of xylitol using lignocellulosic biomass

○Lintao Jiang, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words xylitol, biomass, immobilization, airlift bioreactor

3P-I182 赤色酵母を用いた未利用バイオマスからのアスタキサンチン・キシリトールの同時発酵生産

○井上 順允, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

[背景と目的] リグノセルロース系バイオマスの生物的利用においては，バイオマスを加水分解して得られるグルコース及びキシロースをともに利用し，付加価値の高い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資化し，アスタキサンチン及びキシリトールを生産する．本研究では，この *X. dendrorhous* を用い，コーンコブ(とうもろこしの穂軸)及び竹粉の加水分解液を原料としてアスタキサンチン及びキシリトールの同時生産を試みた．
[方法] 菌株は *Xanthophyllomyces dendrorhous* NBRC (10129)を用いた．コーンコブ及び竹粉を 10 倍量の 1.5 %希硫酸中で 121 ℃，60 min の条件で酸加水分解し，中和後，メイセラーゼを添加し 50 ℃及び 60 h の条件で酵素糖化を行った．この加水分解液を活性炭処理し，YMP 培地成分を添加し培地とした．培養は有効容量 5L のジャーファーメンターを用い，pH 5.0，通気量 1vvm とし，溶存酸素濃度 5.0 mg/L 以上となるように撹拌速度を制御して，種々の培養条件において回分培養を行った．
[結果と考察] グルコース及びキシロースを 25 g/L 含む合成培地を用い，回分培養を行ったところ良好な菌体増殖が確認され，アスタキサンチン及びキシリトールがそれぞれ 2.9 mg/L，10.2 g/L 生産された．次に，グルコース及びキシロースをそれぞれ 25g/L，23g/L 含むコーンコブの加水分解液を用いた場合，菌体増殖が促進され，アスタキサンチンは最大 3.1 mg/L 生産された．一方キシリトールは一時的に蓄積し，培養後期に資化され消失した．温度条件を検討したところ，キシリトールの代謝が培養温度に依存することが明らかとなったことから，培養温度制御によるキシリトール生産の向上を検討している．本研究は財)発酵研究所及び科研費基盤(C)の支援を得た．

Co-production of astaxanthin and xylitol from renewable resources by *Xanthophyllomyces dendrorhous*

○Kazumasa Inoue, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words astaxanthin, xylitol, *Xanthophyllomyces dendrorhous*

3P-I183 コーンコブ酸加水分解残渣を原料とした同時糖化発酵による D-乳酸の効率的生産

○谷口 麻菜美, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

[諸言] 本研究室ではバイオリファイナリー研究を進め，これまでコーンコブを原料とした L-乳酸やキシリトールの生産について報告した[1]．一方近年ポリ L-乳酸にポリ D-乳酸を混合させることで耐熱性等が向上することが明らかになり，D-乳酸の需要が高まっている．そこで本研究では D-乳酸を選択的に生産する乳酸菌を用い，コーンコブ酸加水分解残渣(CCR)を原料とした D-乳酸の効率的生産を目的とした．
[方法] 原料の CCR はコーンコブ(中国産)を 1.5％硫酸(固液比 1:10)により 121℃，60min の条件で加水分解処理後，残渣を洗浄，乾燥させたものである．この処理によりコーンコブ中のリグニン及びヘミセルロース成分が主に分解され，CCR のセルロース含有率は約 60％となる．乳酸生産プロセスとして酵素糖化と乳酸発酵を並行させる同時糖化発酵(SSF)を検討した．有効容量 2.0L のジャーファーメンター(ABLE, BMZ-02KP2)を用いて，CCR を含有する培地 1.0L にセルラーゼとしてメイセラーゼを 51.8FPU/g-CCR となる様添加し，同時に乳酸菌前培養液を 100mL 植菌した．
[結果] 種々の D-乳酸生産菌を比較し，高い D-乳酸光学純度を示した *Lactobacillus delbrueckii* 及び *Sporolactobacillus leavolacticus* を検討することとした．*L. delbrueckii* を用いて CCR43.6g-dw/L を添加した SSF を行ったところ，約 48 時間で 30.6g/L の D-乳酸が得られ，収率は 63.7%(g/g-CCR)生産性は 0.64g/L/h であった．これは CCR 中のセルロース成分のほぼ全量が D-乳酸に変換されたことに相当し，CCR を用いて SSF により効率的に D-乳酸生産が可能なことが明らかになった．次に乳酸の高濃度化を図るため，培養中に CCR を逐次添加する Fed-batch SSF を行ったところ D-乳酸濃度を 51.6g/L まで増加させることができた．現在，*S. leavolacticus* を用いた SSF について検討中である．
[文献] 1) 堀内淳一;化学工学, 77, 12, 845-848 (2013)

Efficient production of D-lactic acid from corn cob residues by simultaneous saccharification and fermentation

○Manami Taniguchi, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words corn cob, D-lactic acid, Simultaneous saccharification and fermentation, biorefinery

3P-I184 木材腐朽時における白色腐朽菌と細菌間相互作用解明のためのモデル共培養系の構築

○松村 真輝[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
（[1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院）
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】白色腐朽菌は木材腐朽菌の一種であり，木材主要成分である難分解性高分子リグニンを高度に分解可能な唯一の生物として知られている．木材を完全分解可能であるため，森林環境における炭素循環に重要な役割を担うと考えられている．自然界では木材腐朽菌は様々な細菌と共存しており，相互に作用し合うことで木材分解能をさらに高めることがある．しかし，木材腐朽菌 - 細菌間相互作用に関する報告は少ない．これは，自然界の腐朽木材中の非常に高い細菌多様性や環境要因による菌叢の不安定性が要因となり，相互作用の発見・解明が困難になるためであると考えられる．近年では，分子生物学的手法を用いた木材腐朽菌 - 細菌間相互作用に関する研究が活発化しているが，主として網羅的な菌叢や発現解析などが中心であり，木材腐朽に直接的に影響する木材腐朽菌 - 細菌間相互作用機構の解明には至っていない．そこで，本研究では木材腐朽菌 - 細菌間相互作用による木材分解機構の解明を目標とし，まず，菌叢が安定化し多様性を低減しつつ，高い木材腐朽能を持つ白色腐朽菌 - 細菌モデル共生系の構築を目指した．
【方法・結果】高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株が蔓延した菌床に，自然界において細菌叢を混入させた後に，木粉培地への継代・腐朽を繰り返すことで，細菌叢が安定化した白色腐朽菌 - 細菌複合菌床の構築を目指した．継代毎に木粉の重量減少率，リグニン減少率，ホロセルロース減少率を測定し，これらが *P. sordida* YK-624 株の純粋培養系と比較して，安定して高い数値を示した複合菌床を選抜した．さらに，継代による菌叢の変動を観察するとともに，木材腐朽菌 - 細菌間相互作用の一端の解明のため，メタゲノム法を用いて *P. sordida* YK-624 株による木材腐朽時に産生される代謝産物が細菌遺伝子へ与える影響を調査している．

Construction of model co-culture systems for elucidation of interactions between white-rot fungi and bacteria during wood decay

○Masaki Matsumura[1], Toshio Mori[1], Hirokazu Kawagishi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words wood decay, fungal-bacterial interaction, white-rot fungus, coculture

3P-J185 空気封入下の光合成細菌－枯草菌共培養におけるニトロゲナーゼ活性発現

○前田 勇[1], 嵐田 遥[1], 渡辺 昌規[2]
（[1]宇都宮大・農, [2]山形大農）
i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

生物学的窒素固定を触媒するニトロゲナーゼの活性は酸素により強く阻害されるために，非共生窒素固定細菌である光合成細菌の窒素固定を空気中の窒素を基質として持続的に行わせるために枯草菌との共培養を検討した．無機態および有機態窒素の非存在下，および空気存在下において共培養による増殖が確認された．枯草菌は窒素固定能を持たないため，共培養菌体の増殖のための窒素源は，光合成細菌の窒素固定により供給されたと考えられた．これを裏付けるためにニトロゲナーゼをコードする *nif* 遺伝子の発現量を，共培養菌体から抽出した RNA を鋳型とした逆転写反応の後にリアルタイム PCR により測定した．その結果，塩化アンモニウムを添加して培養した光合成細菌菌体の発現量と比較し，共培養時には発現量が大幅に増加することが明らかになった．さらにアセチレン還元法にて，無機態および有機態窒素の非存在下で得られた培養液のニトロゲナーゼ活性を測定したところ，共培養液についてのみ活性が認められた．また，培地と菌体を含む培養液から凍結乾燥により水分を除き，得られた乾燥物の C/N を元素分析装置により求めた．その結果，純粋培養と比較し共培養では有意な C の減少と N の増加が認められた．培地に含まれる有機酸が細菌の増殖により二酸化炭素に変換され気相に移行したことと，封入した空気中の窒素が窒素固定により窒素化合物として菌体および培地に移行したためと推察された．これらの実験結果から，光合成細菌と枯草菌の共培養時においては空気を封入した培養容器中においてもニトロゲナーゼ活性が発現し持続的に窒素固定が行われることが明らかとなった．

Expression of nitrogenase activity in co-culture of photosynthetic bacterium and *Bacillus subtilis* in a sealed reactor containing air

○Isamu Maeda[1], Haruka Arashida[1], Masanori Watanabe[2]
([1]Fac. Agric., Utsunomiya Univ., [2]Fac. Agric., Yamagata Univ.)

Key words nitrogen fixation, photosynthetic bacteria, *Bacillus subtilis*

3P-J186 気生微細藻類を用いた壁面緑化法の開発：窒素固定菌が産生する産生粒状多糖の特徴づけ

○塚越 崇之[1], 油井 信弘[1], 阿部 克也[1]
（[1]工学院大・先進工・生化, [2]工学院大・先進工・生化, [3]工学院大・先進工・生化）
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】近年，ヒートアイランド現象が問題となっており，その対策として壁面緑化が注目されている．そこで演者らは，栄養源や水分が乏しい基物表面で生活している気生微細藻類に着目し，その微生物を用いる新たな壁面緑化法を提案した．本報告では，気生微細藻類と窒素固定菌の共生系を用いた壁面緑化に関する研究の一環として，液体培地における共培養条件および産生された粒状多糖の特徴について検討した結果を述べる．
【方法】藻株は，八王子キャンパス内で単離した *Coelastrella* sp. KGU-HN001 を用いた．窒素固定菌は，NBRC から分譲された *Rhodobacter sphaeroides* を用いた．その菌株は，炭素源添加改変 BB 培地において光照射下で 14 日間通気培養した．また藻細胞と細菌を炭素源無添加改変 BB 培地において同条件で共培養した．培養細胞は，DAPI と PI により染色し蛍光顕微鏡観察を行った．培養細胞の全炭素量（TOC）と全窒素量（TN）は TOC・TN 計で測定した．ニトロゲナーゼ活性は，アセチレン還元法によって評価した．
【結果と考察】*R. sphaeroides* を単独培養した結果，乾燥細胞重量は 2 日目まで増加し，8 日目までほぼ一定となったが，その後再び増加し 14 日目で約 4 倍になった．その培養において，粒状多糖をマトリックスとする細胞塊が観察された．DAPI と PI により染色し蛍光顕微鏡観察を行ったところ，細胞塊中に生細胞が存在することが確認された．また，アセチレン還元法によって培養 14 日目の細胞懸濁液のニトロゲナーゼ活性を評価した結果，その酵素活性が維持されていることが分かった．また，気生微細藻類と窒素固定菌の共培養においても細胞塊が形成され，蛍光顕微鏡観察により両微生物の存在が認められた．このことから，細菌から分泌された粒状多糖内で藻細胞と細菌は共生系を構築していると考えられる．

Development of green wall technique using aerial microalgae: characterization of exopolysaccharides produced by nitrogen-fixing bacteria

○Takayuki Tsukagoshi[1], Nobuhiro Aburai[1], Katsuya Abe[1]
([1]Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ., [2]Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ., [3]Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, nitrogen-fixing bacteria, co-cultivation, exopolysaccharides

3P-N187 フォトバイオリアクターを用いた合成代謝経路導入シアノバクテリアによる 1,3 プロパンジオール生産

○端 暸太[1], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2], 村上 明男[3]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]九大院・農, [3]神戸大院・工）
horiuchi@kit.ac.jp

[背景・目的] 我々はシアノバクテリア（藍藻）に新たな代謝経路を導入し，光合成に基づき炭酸ガスから直接有用化学物質を生産する研究を進めている．本発表では 1,3 プロパンジオール(1,3PDO)合成代謝経路を導入したシアノバクテリアを用い，エアリフトバイオリアクターシステムにより 1,3PDO の効率的生産について検討した結果を報告する．
[方法・結果]菌株としてシアノバクテリア Synechococcus elongatus PCC7942 にカルビンサイクル中の DHAP からグリセロールを経て 1,3PDO を合成する代謝経路を導入した TA2984 株を用い，培地に 20 μg/ml kanamycin,spectinomycin,20 mMHEPES(pH7.5),1 mM IPTG を含んだ BG11 培地を用いた．2.0 L 容量のエアリフト型バイオリアクターを用いて 30℃，蛍光灯照射により遊離菌体を用いた連続培養を行った．結果，希釈率 0.051 day-1 連続培養は約 30 日間良好に進行し，1.45 mM の 1,3PDO が生産された．次に生産性の向上を目指し，前回の報告 1) に基づき，アルギン酸カルシウム法による固定化菌体を用いた連続培養を行った．その結果希釈率 0.065 day-1 において，良好な増殖と 0.45 mM の 1,3PDO が生産されたが，その後希釈率を 0.11 day-1 に増加させたところ，グリセロールの急激な減少と，1,3PDO 濃度の低下が観察され菌株の変異が生じられたと考えられた．次に固定化菌体を用いた繰り返し回分培養を試みたところ 4 バッチに渡り安定した繰り返し回分培養を行うことが可能で，最大 1,3PDO 濃度 1.3 mM の生産が得られた．
1.端 暸太；第 68 回日本生物工学会講演要旨集.3P-2p144:314（2016）

1,3PDO production by photobioreactor using recombinant cyanobacteria

○Ryota Hashi[1], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1], Yasutaka Hirokawa[2], Taizo Hanai[2], Akio Murakami[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words cyanobacteria, fermentation, photobioreactor, recombinant production

3P-J188 合成代謝経路経路導入シアノバクテリアを用いた D-乳酸の高効率生産

○高井 あまね[1], 熊田 陽一[1], 堀内 淳一[1], 広川 安孝[2], 花井 泰三[2], 村上 明男[3]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]九大院・農, [3]神戸大院・理）
horiuchi@kit.ac.jp

[背景と目的] 光合成生物の機能を活用し，二酸化炭素と太陽エネルギーから直接有用物質を効率的に生産できれば，資源枯渇や地球温暖化問題の解決に貢献できる．近年 D－乳酸由来のポリ乳酸はポリ乳酸の耐熱性を向上させることが明らかになり，D-乳酸の需要が高まっている．本研究ではシアノバクテリアにカルビンサイクルの中間体から D-乳酸を生産する合成代謝経路を導入し，光合成による二酸化炭素からの D-乳酸の直接生産について，培養工学的検討を行った．
[方法] シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 に，カルビンサイクルの中間体 DHAP からメチルグリオキサール (MG) を合成する遺伝子 mgsA を導入し，DHAP から MG を経て D－乳酸を生産する代謝経路を導入した TA3335，及び TA3335 に乳酸トランスポーター遺伝子 (lldP) を導入した TA3504 を用いた．MG は細胞毒性を有することが知られている．基礎培地 BG11 に HEPES (pH7.5) を必要に応じて添加した培地を用いて，白色 LED，赤青 LED 及び蛍光灯照射によりフラスコ培養及びエアリフト型バイオリアクターを用い回分培養を行った．
[結果と考察] 白色 LED，赤青 LED 及び蛍光灯照射下で TA3335 及び TA3504 のフラスコ培養を行った結果，約 20 日間の培養で約 100～600 mg/L の D-乳酸が蓄積したことから，本菌を用いて光合成により二酸化炭素から直接 D-乳酸を生産できることが明らかになった．次に pH が D-乳酸生産に及ぼす影響を検討するため HEPES 添加の培地と無添加培地を比較したところ D-乳酸生産は pH に依存し，HEPES 無添加培地を用いた場合 D-乳酸生産量は最大約 1400 mg/L に達した．エアリフト型バイオリアクターを用いた培養においても約 200 mg/L の D-乳酸生産が確認され，現在 CO_2 供給により pH を制御する pH-stat によるバイオリアクターシステムにより，生産性の向上を試みている．

Efficient production of D-lactate by genetically engineered cyanobacteria

○Amane Takai[1], Youichi Kumada[1], Jun-ichi Horiuchi[1], Yasutaka Hirokawa[2], Taizo Hanai[2], Akio Murakami[3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Dept. Biology., Kobe Univ.)

Key words cyanobacteria, D-lactic acid, photosynthetic bacteria, photobioreactor

3P-J189 焼酎蒸留残液を利用した哺乳類細胞培養のための培地添加剤の効果

○中村 彰宏, 外薗 英樹
（三和酒類）
nakamura-a@kokuzo.co.jp

【目的】
医療分野のバイオテクノロジーにおいて，哺乳類細胞培養工程での目的物の高効率生産は，製造コストを下げ，治療者の医療費負担を軽減することに繋がる．本研究では，大麦焼酎蒸留残渣を精密ろ過，濃縮した培養基材「バーレックス」及びその分画物を既存の哺乳類細胞用培地に添加して，その性能を向上させることが可能か検討した．

【方法】
バーレックスを合成吸着剤(ダイヤイオン HP20)に供し，吸着と素通りに分画した．さらに吸着物を 10,20,40,60％とエタノール濃度を段階的に上昇させて溶離して分画し，凍結乾燥して培地添加用の試料を作製した．
ヒト細胞として HEK293 細胞を，抗体医薬生産モデルとして抗 IL-8 ヒト化組み換え抗体生産株 CHO DP-12 細胞（ATCC, CRL12445）を用い，10%牛胎児血清を添加した D-MEM 培地を基本培地として，静置培養で添加物の有無による細胞増殖を評価した．また CHO DP-12 細胞を抗体産生用のケミカリー・ディファインド培地を基本培地として培養し，添加物の有無による抗体生産性への影響を評価した．

【結果・考察】
試験の結果，バーレックスの添加により HEK293 細胞と CHO DP-12 細胞の増殖促進効果が認められた．特に吸着物を 10%エタノールで溶離した画分(P10)の添加で HEK293 細胞は対照の 1.77 倍，CHO DP-12 細胞は 1.89 倍の細胞増殖促進効果が見られた．また，CHO DP-12 細胞の抗体産生は P10 添加により対照の 1.53 倍となった．バーレックスは植物起源であることから，人獣共通感染症のリスクが極めて少ない非動物性の哺乳類細胞培養の培地添加剤として応用できる可能性がある．

Effects of shochu distillery by-product for mammalian cell culture media

○Akihiro Nakamura, Hideki Hokazono
(Sanwa Shurui Co., Ltd)

Key words medium, CHO cell, HEK293 cell, IgG

3P-J190 トリプシンに依らない付着性培養細胞の解離法の開発

○市川 航平[1], 池田 丈[1], 重藤 元[2], 廣田 隆一[1], 舟橋 久景[1], 黒田 章夫[1]
（[1]広島大院・先端物質, [2]産総研）
ikedatakeshi@hiroshima-u.ac.jp

【背景と目的】多くの動物細胞は細胞外基質への接着が生存に不可欠である．接着細胞の培養基質からの解離には，トリプシンによる処理が広く用いられている．タンパク質分解酵素であるトリプシンは，接着を担うタンパク質を分解することで細胞を培養基質から解離している．しかし，トリプシンは細胞表層のタンパク質まで分解してしまうという問題を抱えている．細胞接着は，細胞外マトリックスを構成する接着タンパク質と細胞表層の受容体との結合を介して起こる．多くの接着タンパク質には RGD (Arg-Gly-Asp) 配列が存在し，細胞接着に重要な役割を果たしている．そこで，本研究ではこの RGD 配列に着目し，ペプチドやアミノ酸との競合により細胞を解離することを目指した．
【方法と結果】由来の異なる三種類の細胞（HEK293，PC-12，NIH/3T3）の培養ディッシュに対して，ペプチドやアミノ酸を加えた HEPES buffer (pH 7.4)を添加し 37℃で 5 分間インキュベートを行った．細胞接着を阻害すると報告されている GRGDS ペンタペプチドでは細胞解離が見られなかったが，数種類の単一のアミノ酸で 5 分以内に細胞が解離することを発見した．特に RGD 配列を構成するアミノ酸の 1 つであるアルギニンが有効であったため，アルギニン溶液による細胞解離についてさらに検討した．アルギニンによる解離後の生存率は，使用した三種類の細胞でいずれも 100%に近い高い値を示し，また本手法によって解離した細胞の継代にも成功した．また NIH/3T3 細胞に関してディッシュに 100%コンフルエントの状態まで培養したものにアルギニン溶液を添加したところ，一枚のシート状に細胞が解離することを発見した．アルギニンにはタンパク質凝集抑制効果やポリスチレンからのタンパク質の脱着などの効果が報告されており，アルギニンによる細胞解離にもこれらの性質が寄与している可能性が考えられる．

Development of a dissociation method for cultured adherent cells without using trypsin

○Kouhei Ichikawa[1], Takeshi Ikeda[1], Hajime Shigeto[2], Ryuichi Hirota[1], Hisakage Funabashi[1], Akio Kuroda[1]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]AIST)

Key words cell detachment, arginine, trypsin, RGD motif

3P-N191 ソホロースリピッドの細胞凍結保存液としての利用可能性

○野上 明日香[1], 龍見 宗樹[1], 大河原 弘達[2,3], 齋藤 充弘[2,3], 竜 瑞之[1], 平田 善彦[1], 宮川 繁[3], 澤 芳樹[3]
（[1]サラヤ, [2]阪大病院・未来医療開発部, [3]阪大院・医）
ryu@saraya.com

【背景と目的】細胞の凍結保存は，細胞の変質や雑菌汚染などを防止するのに必須の技術である．しかし，凍結過程で形成される氷晶は，細胞膜や細胞内小器官などに障害を与え，細胞の機能に影響をもたらす恐れがある．このため，凍結保存する際にこのような凍害から細胞を保護する成分を添加するなどの工夫が必要となる．我々は，凍結保護成分として，水溶液中で各種の超分子を形成する糖脂質型界面活性剤であるソホロースリピッド(SL)に着目し，これを用いて体細胞と幹細胞における凍結保存効果を検討したので報告する．
【方法】(1)凍結保存前の添加培養試験を実施した．ヒト線維芽細胞およびヒト間葉系幹細胞に SL および蒸留水を添加し 1~6 時間まで培養した．細胞を回収し 10% DMSO 含有細胞培養培地(DMEM)に懸濁したのち，-80℃で凍結保存した．保存効果は，凍結前後の生細胞率および増殖率を評価し，SL 未添加(蒸留水)の場合と比較した．(2)凍結保存時の添加試験を実施した．培養したヒト線維芽細胞を回収し DMEM に懸濁した．DMSO および SL ＋プロピレングリコールを加え -80℃で凍結保存試験した．同様にして保存効果を評価し，10% DMSO を添加した場合と比較した．
【結果】ヒト線維芽細胞およびヒト間葉系幹細胞に 0.05% SL を添加して 1 時間以上培養してから凍結保存すると，どちらの試験細胞の生細胞率および増殖率も SL 未添加と比べて上昇し，培養中に SL を添加することで凍結保存効果が高まることがわかった．また，凍結保存時に 0.01% SL と 10% プロピレングリコールをヒト線維芽細胞に添加すると，生細胞率および増殖率は従来の凍結保護成分である DMSO と同等の効果が認められた．このことから，SL は新しい凍結保護成分として応用できる可能性が示された．

Possibility of application as cell cryopreservation solution with Sophorolipid

○Asuka Nogami[1], Motoki Tatsumi[1], Hirotatsu Ohkawara[2,3], Atsuhiro Saito[2,3], Mizuyuki Ryu[1], Yoshihiko Hirata[1], Shigeru Miyagawa[3], Yoshiki Sawa[3]
([1]Saraya co. LTD, [2]Dept. Med. Innov., Osaka Univ. Hosp., [3]Grad. Sch. Med., Osaka Univ.)

Key words cryopreservation, sophorolipid

3P-N192 概日リズムを考慮した肝毒性試験

○守矢 恒司[1], 玉井 美保[2,3], 古賀 匠[2], 田川 陽一[1,2]
（[1]東工大院・生命理工, [2]東工大・生命理工学院, [3]北大院・歯）
ytagawa@bio.titech.ac.jp

【諸言】化合物の一般的な肝毒性評価では，概日リズム（昼夜の繰り返し約 24 時間の変動周期）が考慮されることは少ない．しかし，生物の生理機能は概日リズムを有しており，薬物応答性は投与時刻で異なるため，概日リズムを考慮した薬物の動態は重要である．本研究では，肝毒性誘発物質として過剰摂取により肝障害を誘導する解熱鎮痛剤アセトアミノフェン（APAP）を用い，マウス個体における時刻による応答性，さらには肝細胞の調製時刻による肝毒性発現の違いを検証した．
【方法】日照条件 8-20 時で野生型および DsRed 発現 BALB/cA（雄，6~11 週齢）マウスを飼育し 10 時，22 時の肝臓における時計遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子の発現を定量解析した．同時刻に APAP を腹腔内投与し，体温測定，生化学及び組織学的解析をおこない，投与時刻の比較をおこなった．また初代培養肝細胞を調製・接着後，10 時または 22 時における時計遺伝子や薬物代謝酵素遺伝子発現を定量 PCR により解析した．DsRed 発現マウスより調製した初代培養肝細胞を APAP 含有培地に暴露し，蛍光強度や培養上清への LDH 放出率を算出し，細胞傷害性を評価した．
【結果および考察】マウス個体における時計遺伝子及び薬物代謝酵素遺伝子の発現は 10 時よりも 22 時において高かった．各時刻に APAP を投与したところ，体温の高い時刻である 22 時投与群で体温が有意に低下し，肝障害の増大も観察され，APAP 代謝酵素の発現との相関が観られた．また初代培養肝細胞においても時計遺伝子や薬物代謝酵素遺伝子は 22 時に高く発現しており，APAP による細胞傷害性も強く，培養系においても個体同様，投与時刻における細胞傷害の違いを観察することができた．以上により，個体だけでなく培養系においても肝毒性が概日リズムの影響を受けることが示され，精確な肝毒性試験の構築には概日リズムの導入が必要であると考えられる．

Hepatotoxic assay model in consideration of circadian rhythm

○Koji Moriya[1], Miho Tamai[2,3], Takumi Koga[2], Yoh-ichi Tagawa[1,2]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech, [2]Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech, [3]Fac. Dent Med., Hokkaido Univ)

Key words circadian rhythm, hepatotoxicity

3P-J193 シングルユースバイオリアクターを用いた巨核球系細胞株の大量培養条件の検討

Nurhayati Retno[1], ○尾島 由紘[2], 堂田 丈明[1], 紀ノ岡 正博[1]
（[1]阪大院・工, [2]阪市大院・工・化生系）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】高まる再生医療分野での需要に対して，目的細胞の安価で安全な供給システムの構築は急務である．本研究では，独自のシングルユース培養バッグを用いた槽振とう型バイオリアクターを設計し，巨核球分化能を有する細胞株 Meg01 の 1 L スケール培養を行った．主に振とう速度をパラメータとした際の酸素供給やせん断力の変化が，細胞増殖に与える影響を評価した．
【方法および結果】藤森工業株式会社との共同開発により，1 L の円筒型培養バックを培養槽とするバイオリアクターシステムを構築した．10%の FBS が添加された IMDM 培地を用いて，5%CO_2 の空気を 10 mL/min の上面通気で供給し，培養バックを 50, 100, 125 rpm で振とうした．播種密度 2.0×10^8 cells/L で培養した結果，100 rpm で振とうした際に最も増殖し，6 d 間の培養後に培養ディッシュの静置培養と同等の 12.4×10^8 cells/L に達した．一方，50 rpm の場合では 3.0×10^8 cells/L となりほとんど増殖せず，125 rpm では播種後，生存細胞数が低下し続けた．各振とう速度における総括酸素移動容量係数やせん断力の算出を行った結果，50 rpm では酸素供給量に対して効果的に増殖しておらず，培養バック内の不十分な振とうによって生じた細胞の沈降と凝集が，125 rpm の場合は高いせん断力による細胞へのダメージが，それぞれ Meg01 細胞の増殖を阻害したと推測された．

Large scale culture of megakaryocytic cell line with a single-use bioreactor system

Retno Nurhayati[1], ○Yoshihiro Ojima[2], Takeaki Dohda[1], Masahiro Kino-oka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words bioreactor, single-use bag, megakaryocyte, large-scale

3P-J194 微粒子状 ECM スキャホールドを用いる肝細胞の 3 次元培養と機能評価

○矢嶋 祐也, 山田 真澄, 鵜頭 理恵, 関 実
（千葉大院・工）
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【背景と目的】
3 次元的環境における細胞培養は，通常の平面的な培養法と比較して，生体内の環境をより高度に模倣できるため，in vitro において細胞の機能をより正確に評価できるものと期待されている．一般的な 3 次元培養法としては，コラーゲンスポンジなどの足場材料を用いる手法や多細胞スフェロイド等を集積化する手法が提案されてきたが，これらの手法では（1）細胞密度の制御，（2）細胞外基質（ECM）成分の組織内への均一な導入，および（3）適切な細胞-細胞間相互作用の実現，という要素を同時に達成することは困難であった．一方当研究グループではこれまでに，コラーゲンからなる微粒子を細胞接着性の足場材料として用いることで，細胞と ECM で構成された 3 次元細胞培養系を開発してきた．本研究では，本手法を用いて肝細胞（HepG2）の 3 次元培養を行い，特に粒子の種類などの条件が肝特異的機能に与える影響を評価した．
【実験および結果】
まず，膜乳化法を用いてコラーゲン水溶液の液滴を形成し，有機溶媒中における脱水現象を利用することで直径約 5 um のコラーゲン微粒子を作製した．得られた粒子を細胞（HepG2）と混合し，細胞非接着性の培養チャンバー上へ高密度に播種し培養した結果，1 日後にコラーゲン微粒子と細胞からなるシート状の 3 次元組織体が形成された．得られた組織の形態は，粒子の種類（安定化方法）によらず安定に維持されることを確認した．また，作製した組織はチャンバーに接着していないため，容易に操作・回収することが可能であった．5 日間の培養後，RT-PCR 法を用いて遺伝子発現量の評価を行った結果，細胞のみで作製した組織と比較すると，コラーゲン微粒子を導入した組織において，肝時的遺伝子の発現量が増加することが確認された．また，粒子の種類によって，遺伝子発現量に差が生じることも確認された．

3D cultivation of liver cells using particulate ECM scaffolds and its evaluation

○Yuya Yajima, Masumi Yamada, Rie Utoh, Minoru Seki
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words tissue engineering, collagen, liver regeneration, 3D culture

3P-J195 リアルタイム細胞形態プロファイリングを用いた効率的細胞培養工程管理

○今井 祐太[1], 吉田 啓[1], 松本 恵[1], 岡田 真衣[1], 蟹江 慧[1],
清水 一憲[2], 本多 裕之[2], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬科学, [2]名大院・工）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年再生医療の実現は加速的に進みつつあり，従来主流であった自家細胞による細胞治療は，他家細胞を用いたより工業的な細胞医療等製品展開の可能性を見せつつある．産業化が進む再生医療の更なる発展には，安定かつ経済的な細胞製造を実現する生物工学的な細胞製造のプロセス設計技術や品質管理技術が，現在より強く必要とされつつある．
再生医療・細胞治療のための細胞性製品には，高い安全性と安定した治療効果が強く望まれているが，現状その生産プロセスにおける品質管理技術はまだ充分ではない．特に，クオリティ・バイ・デザインというコンセプトのもとで「工程から細胞品質を作る」ことが求められている細胞調製加工工程では，緻密かつ細かいプロセスの定量化とプロセスのモニタリングが極めて重要である．しかし現状では，従来の分子生物学的な評価方法の多くは破壊的な方法なためにモニタリングに導入することは難しく，再生医療等製品の価格を破格のものにしてしまっている原因である製造コストを低減するためには経済的な評価方法であることと同時に，早期にトラブルや歩留まりを回避するための予測・推定能も品質評価技術には求められている．これまで我々のグループでは，培養中の細胞画像から得られる細胞形態情報の解析を用いて，破壊的にしか得られなかった細胞品質を評価する技術を開発・提案してきている．本研究では，この細胞画像情報解析技術を応用し，様々な細胞培養工程におけるエラーやトラブルをリアルタイムに可視化し，定量的に推定する技術開発について検証したのでこれを報告する．

Real-time morphological profiling for quality control in effective cell processing

○Yuta Imai[1], Kei Yoshida[1], Megumi Matsumoto[1], Mai Okada[1], Kei Kanie[1],
Kazunori Shimizu[2], Hiroyuki Honda[2], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words Mesenchymal stem cell, Morphological profiling, Real-time evaluation, Cell processing

3P-J196 3 次元培養スフェロイド画像から得られる非破壊情報解析の意義

○加藤 寛人[1], 渋田 真結[1], 長谷部 涼[1], 蟹江 慧[1], 清水 一憲[2],
本多 裕之[2], 清田 泰次郎[3], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院創薬科学, [2]名大院・工, [3]ニコン）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

近年，がん研究や創薬開発，再生医療等の現場において，二次元培養と比較して構造的に生理的環境に近いモデルである三次元培養により作成された細胞凝集塊（スフェロイド）に注目が集まっており，薬剤の安全性や機能性評価への応用が期待されている．しかし，いまだにスフェロイド状態は明確に定義されておらず，細胞数・培養時間・成熟度などの様々なパラメータによって，その品質を安定的に製造することは難しい．全く同一な組織由来の細胞を用いて作成されたスフェロイドであっても，凝集形態やタンパク質の発現，薬剤応答などが異なる多様なスフェロイドが形成されることが報告されている．薬剤評価などでスフェロイドが今後より広く活用されていくためには，大量に製造されたスフェロイドを一定の基準をもって製造し，安定かつバラツキの少ない状態を実現する品質管理が重要である．従来，スフェロイドとしての「完成」は，破壊的なマーカータンパク質などによる定量化などによって規定されてきているが，製品としてその後薬剤評価に応用されるスフェロイドを製造するためには破壊的試験やサンプリング検証にはまだ課題がある．このため，現状としては，スフェロイドの出来は人の都合によって規定した培養期間や，凝集状態の見た目によって判定されてきていた．我々はこれまで二次元的に培養された細胞の画像情報を解析することによる細胞品質管理の可能性を提唱してきているが，本研究ではこれをスフェロイドの評価へと応用し画像から得られる高次元の形態情報量を最適に組み合わせることによって，高精度で細胞の種類や活性を判定できる可能性を見出したのでこれを報告する．

Development of non-invasive image-based evaluation of spheroid cells

○Hirohito Kato[1], Mayu Shibuta[1], Ryo Hasebe[1], Kei Kanie[1], Kazunori Shimizu[2],
Hiroyuki Honda[2], Yasujiro Kiyota[3], Ryuji Kato[1]
([1]Dept. Basic Med.Sci., Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [3]Nikon Corp.)

Key words 3D culture, image analysis, cancer classification, spheroid

3P-J197 iPS 細胞未分化逸脱評価のためのコロニー画像から得られるビッグデータ活用法

○吉田 啓[1], 蟹江 慧[1], 清田 泰次郎[2], 古江-楠田 美保[3],
清水 一憲[4], 本多 裕之[4], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬科学, [2]ニコン, [3]医薬基盤研究所, [4]名大院・工）
yoshida.kei@a.mbox.nagoya-u.ac.jp

iPS 細胞は，創薬研究から再生医療に至るまで幅広い可能性を秘めた有用なツールである．近年，このような iPS 細胞の産業化に向け，iPS 細胞の調整・加工技術に関する工学的技術開発が進められており，細胞培養の機械化による培養環境の安定化・効率化においては，多くの産業的な技術が導入されつつある．しかしながら，細胞培養の機械化を目指す技術開発において，細胞製品の製造工程には未だに細胞品質のバラツキをもたらす原因不明の変動要因がいくつか存在している．特に，iPS 細胞の培養においては，培養者のスキルによって細胞品質が不安定化しやすく，このため安定した細胞培養の実現にはクオリティ・バイ・デザインを実現するための培養工程の徹底的な数値化や，これに基づく解析と原因究明が重要である．我々のグループはこれまで，リアルタイムに得られる位相差顕微鏡画像から得られる iPS 細胞コロニーの形態情報をデータ抽出し，様々なコンピュータ解析に興じることによって培養状態を評価できる可能性を示してきた．近年，AI などの様々なデータ解析技術は急速に進んでいるが，データサイエンスの世界ではこれら発展的な情報処理技術を盲目的に新しいデータに転用する危険性も強く指摘されている．そこで我々は，コロニー形態から得られるフェノタイプデータという新しいタイプのバイオビッグデータが有する特殊性や課題点，およびこれを有効に活用するための情報処理的コンセプトについて工学的培養工程管理の観点から報告する．

Big data analysis for the understanding of iPS colony morphology information in image-based quality control

○Kei Yoshida[1], Kei Kanie[1], Yasujiro Kiyota[2], Miho Furue-Kusuda[3],
Kazunori Shimizu[4], Hiroyuki Honda[4], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., [2]Nikon Corp., [3]NIBIO, [4]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words human iPS cell, big data analysis, morphology information, quality control

3P-N198 ビオチンリガーゼと基質タンパク質間の相互作用を利用した細胞間連結促進技術の開発

杉若 隆一[1], 中道 祐希[1], 田川 澪[1], ○末田 慎二[1,2]
（[1]九工大院・情報工・生命情報, [2]九工大・RCBT）
sueda@bio.kyutech.ac.jp

【目的】近年，スフェロイドや細胞シート等の人工的な細胞集合体の調製技術の開発が活発に進められている．人工的な細胞集合体は，再生医療に応用できるだけでなく，新規なバイオマテリアルとしての活用も期待できる．しかし，細胞間の接着には細胞膜表面のタンパク質が関与しているため，異種細胞間の連結など細胞間の連結が起こりづらい系も存在する．そこで，本研究では古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系に着目し，細胞間連結を人工的に促進する技術の開発を試みた．
【実験方法及び結果】*S. tokodaii* 由来のビオチン化酵素反応系は，酵素であるビオチンリガーゼ（BPL）がビオチン化された基質タンパク質（BCCP）と非常に安定な複合体を形成するという特異な性質を有している[1),2)]．ここでは BCCP を一回膜貫通タンパク質（TM）との融合タンパク質（BCCP-TM）として発現させることにより，細胞表層に BCCP を提示させた．一方で，２分子の BPL を人工的に架橋することにより BPL ダイマーを調製し，それを BCCP-TM を発現させた細胞に作用させビオチン化反応を行うことにより，細胞間の人工的な連結を試みた．その結果，BPL ダイマー存在下では，コントロールと比較して，より短時間で細胞凝集体の形成が観察され，細胞表層における BPL と BCCP 間の相互作用によって細胞間の連結を促進できることがわかった．
【参考文献】
1) S. Sueda, Y.-Q. Li, H. Kondo, Y. Kawarabayasi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 344, 155-159.
2) S. Sueda, H. Tankaka, M. Yamagishi, *Anal. Biochem.*, 2009, 393, 189-195.

Development of a cell-cell adhesion technology based on the interaction between biotin ligase and its substrate protein

Ryuichi Sugiwaka[1], Yuki Nakamichi[1], Mio Tagawa[1], ○Shinji Sueda[1,2]
([1]Dept. Biosci. Bioinf., Kyushu Inst. Technol., [2]RCBT, Kyushu Inst. Technol.)

Key words cell-cell interactions, cell surface engineering, protein interaction, biotin ligase

3P-J199 不飽和カルボニル化合物による細胞傷害機構の解明

○東 恒仁, 眞井 洋輔, 真崎 雄一
（北大院・医・細胞薬理）
thigashi@med.hokudai.ac.jp

【背景】アクロレインやクロトンアルデヒドに代表される不飽和カルボニル化合物は，煙や車の排気ガス，高温に熱せられた食物油などに含まれるとともに，各種化学物質の合成材料としても幅広く使われている．これら不飽和カルボニル化合物は，細胞毒性が極めて高いことから，近年は環境因子としても注目されている．しかしながら，不飽和カルボニル化合物による細胞毒性の分子機構については，これまで殆ど分かっていなかった．我々は，以前，タバコの煙に含まれる主要な細胞傷害因子として，不飽和カルボニル化合物であるアクロレイン・メチルビニルケトン・2-シクロペンテン-1-オンを見出した．そこで，本研究では，これらの化合物による細胞傷害の分子機構を解明することを目的とした．
【方法】細胞の生残率の評価方法としては MTS 還元活性測定法を，アポトーシスの検出方法としては DNA 断片化アッセイを，細胞膜傷害の評価方法としては PI 染色を，それぞれ用いた．GFP を融合させた PKC を細胞に発現することで，PKC の局在解析を行った．
【結果】アクロレイン・メチルビニルケトンは，プロテインキナーゼ C（PKC）依存的に細胞傷害（アポトーシス誘導による細胞生残率の低下，細胞膜傷害）を惹起した．またアクロレイン・メチルビニルケトンは PKCalpha の活性化を誘導した．これらの化合物による細胞傷害や PKC の活性化は，細胞内カルシウムのキレーターである BAPTA-AM によって完全に抑制された．一方，細胞外カルシウムのキレーターである BAPTA は，全く効果を示さなかった．以上の結果から，不飽和カルボニル化合物による細胞傷害には，細胞内カルシウムストアから動員されるカルシウムが重要な役割を果たしていることが強く示唆された．

Elucidation of molecular mechanisms for cell damage by unsaturated carbonyl compounds

○Tsunehito Higashi, Yosuke Mai, Yuichi Mazaki
(Dept. Cell. Pharm., Grad. Sch. Med., Hokkaido Univ.)

Key words toxicity, signal transduction, carbonyl compounds, calcium

3P-J200 毛細血管様構造を有する多細胞スフェロイドをビルディングブロックとして作製した 3 次元組織についての生細胞数の評価

○神並 美華[1], 高橋 憲司[2], 仁宮 一章[1]
（[1]金沢大院・自科, [2]金沢大・新学術）
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】現在，再生医療において細胞凝集塊であるスフェロイドを用いた研究に注目が置かれている．これは従来の細胞シートを用いた方法に比べ，スフェロイド自体高さがあり，より大きな組織を作ることが容易となるためである．しかし大きな組織を作ることが可能であっても，その状態を少しでも良く維持できなければ再生医療に活かすことはできない．そこで本研究では，多細胞スフェロイドをビルディングブロックとして 3 次元組織を作製し，培養中の組織内の細胞がどれだけ生存しているかを知り，外的条件の変化でその生存率を上げることを目的とした．
【方法および結果】本研究ではヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用し，10:0 または 8:2 で 20000 cells/well のスフェロイドを作製した．次にバイオ 3D プリンターを用いて立方体(3×3×3)・管状(4×3×3 内に 2×1×3 の穴あり)・平面(9×1×3)の 3 種類の 3 次元組織を作製し，培地中で 0~7 日間培養した．培養方法として剣山上で培養を続ける On needle 培養と 2 日後に剣山から抜き培養を行う Off needle 培養で行った（ただし管状・平面に関しては NHDF:HUVEC=10:0 のみ，NHDF:HUVEC=8:2 は立方体のみで比較を行った）．培養中，顕微鏡による形態変化を行い，そして培養日数 0, 1, 3, 5, 7 日目でシングルセル化をすることにより生細胞数及び生存率の評価を行った．この結果 NHDF100%の組織に関しては，形状の維持が可能で細胞が培地に触れやすい平面構造の On needle 培養が最もよいという結果が得られた．また立方体では HUVEC を加えることで生存率が大幅に上がった．この結果は，透明化および多光子レーザー顕微鏡による 3 次元観察から，組織内に血管構造ができた効果と考えられた．

Evaluation of viable cells number of 3D tissue produced by using micro-vascularized multicellular spheroids as building block

○Mika KANNAMI[1], Kenji TAKAHASHI[2], Kazuaki NINOMIYA[1]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words Bio-3D printer, Multicellular spheroids, 3D tissue

3P-J201 DMSO フリー細胞凍結保存液の開発と凍結融解が細胞に与える影響

○永井 悠也[1], 大和屋 健二[1], 寺本 直純[2], 中田 一弥[1], 八木 透[3], 宮本 義孝[3]
（[1]東理大・理工, [2]千葉工大・工, [3]東工大・工学院）
myoshi1230@gmail.com

【目的】近年，再生・細胞医療や創薬研究開発プロセスにおいて，細胞を用いた評価は必須である．特に，培養細胞株や組織由来細胞は，動物やヒト臨床試験(in vivo)の前段階として重要な役割を担っている．なかでも，細胞の品質管理において，(1) 安全性，(2) 有効性，(3) 同一性・均一性は極めて重要な項目である．これらの品質を保証するためには，細胞を供給する前段階，「凍結保存」のプロセスが必要不可欠となる．
その中でも，凍結保護剤は，細胞の凍結保存に大きな影響を及ぼす．ジメチルスルホキシド(DMSO)は，細胞内へ高い浸透性を有し，凍結融解後の生存率も高いが，その一方，毒性が高く，細胞本来の機能低下からその影響が懸念される．これまでに，宮本らは，DMSO(＋)とカイコ繭由来タンパク質セリシン，マルトースが，ヒト由来細胞の凍結保存に有効なことを示した．そこで，本報告では，さらなる凍結融解後の細胞機能を向上させるために，DMSO に代わりうる細胞凍結保存液の開発から，凍結融解が細胞に与える影響を検討した．
【方法】DMSO フリー細胞凍結保存液を用いて，HEK293 細胞株の凍結融解後の生細胞率，回収率，増殖率および形態観察からその有効性を評価した．特に，保存液組成内の DMSO が，凍結融解後の生存率に与える影響を検討した．凍結方法は，－80℃下で 24 時間凍結した後，液体窒素内で保管した．融解は，凍結保存サンプルを 37℃温浴中に移し急速解凍した．
【結果】保存液組成内の DMSO(＋)，その代替物 DMSO(－)ともに，凍結融解後の細胞生存率に差は見られなかった．また，市販製と比べて，生存率，増殖能ともに差がないことから，有効な DMSO フリー細胞凍結保存液組成を見出すことに成功した．本研究は，培養細胞株だけでなく，組織由来細胞へ応用すると共に，ひいては，再生・細胞医療で品質が保証された細胞供給が期待される．

Cryopreservation of human and mammalian cell by using DMSO-free cryoprotectant and the effect of cell function after freezing and thawing process

○Yuya Nagai[1], Kenji Yamatoya[1], Naozumi Teramoto[2], Kazuya Nakata[1], Tohru Yagi[3], Yoshitaka Miyamoto[3]
([1]Fac. Sci. Technol., Tokyo Univ. Sci., [2]Fac. Eng., Chiba Tech, [3]Sch. Eng., Tokyo Tech)

Key words cell, cryopreservation, DMSO free, cell quality

3P-J202 高生産株の構築を目指した抗体生産 CHO 細胞内の分泌過程解析

○兼吉 航平[1], 内山 圭司[2], 鬼塚 正義[3,4], 山野 範子[1,4], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,4]
（[1]阪大院・工, [2]徳島大・疾患酵素学研セ, [3]徳島大院・社会産業理工, [4]MAB組合）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【研究背景】これまで抗体医薬品を生産する CHO 細胞内の分泌過程を対象として様々な改変が行われ，抗体の生産性を向上させることに成功している．しかし，その分泌過程は未だ不明な点も多く，高生産株を論理的に構築するためには，モデル細胞ではなく「無血清浮遊培養され，組換えタンパク質を高生産する工業用 CHO 細胞の分泌過程」を直接解析し，分泌にかかる問題点の解明と，生産性の向上と品質管理のために対象とするべき過程の探索を行う必要がある．本研究では，すでに確立された組換え IgG 高生産株の分泌にかかる時間，IgG の局在，凝集性について詳細な解析を行った．
【手法】IgG の分泌に要する時間を解析するため，チェイスアッセイを行った．翻訳阻害剤シクロヘキシミドを含有する 20 ml の無血清培地中で，IgG 高生産細胞を振とう培養した．2 時間ごとに細胞ペレットと培養上清を取得し，各分画中の IgG 量を定量的ウェスタンブロットにより解析した．IgG の局在は蛍光免疫染色により，凝集性はサイズ排除クロマトグラフィにより解析した．
【結果】2 種類の異なる IgG の高生産株を用いたチェイスアッセイの結果，細胞外の IgG 量は翻訳阻害 4-6 時間後に頭打ちとなり，細胞内の IgG 量は 4-6 時間後までは減少，それ以降は一定となった．すなわち生産された IgG は細胞内に残留し，完全には分泌されなかった．蛍光免疫染色の結果，ゴルジ体ではなく主に小胞体内に抗体が残留していた．サイズ排除クロマトグラフィの結果，一部の抗体重鎖が凝集体を形成するものの，多くは重鎖と軽鎖の 4 量体からなるフルボディを形成していた．これらの結果を踏まえ，抗体分泌の律速が小胞体内部に存在し，糖鎖修飾などの 4 量体形成後の品質管理に問題が存在するため長時間抗体が残留するものと考えられる．

The analysis of intracellular secretion process in CHO cells producing therapeutic antibodies for constructing high producers

○Kohei Kaneyoshi[1], Keiji Uchiyama[2], Masayoshi Onitsuka[3,4], Noriko Yamano[1,4], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,4]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Inst. Enzyme Res., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Technol., Ind. Soc. Sci., Tokushima Univ., [4]MAB)

Key words CHO cell, antibody, secretion pathway

3P-F203 高濃度アミノ酸入り培地を用いた未分化ヒト iPS 細胞の選択的細胞死

○長島 拓則[1], 清水 一憲[1], 松本 凌[1], 本多 裕之[1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創成セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】 ヒト iPS 細胞から分化させた細胞群を用いた再生医療の実用化が期待されている．しかし，分化誘導後に未分化のまま残存したヒト iPS 細胞は，移植後にテラトーマを形成する可能性が懸念されている．このため，ヒト iPS 細胞由来の分化細胞群から残存未分化 iPS 細胞を選択的に除去する技術の開発が求められている．我々は除去手法の探索を行い，高濃度アミノ酸入り培地が有効である可能性を発見した．そこで本研究では，高濃度アミノ酸入り培地を用いた未分化ヒト iPS 細胞除去手法の開発を目指した．
【方法】ヒト iPS 細胞維持培地にアミノ酸を添加し，アミノ酸含有培地を作製した．これを未分化ヒト iPS 細胞 201B7 株（iPS）と正常ヒト線維芽細胞（NHDF）に曝露し，細胞活性への影響を WST-8 法で評価した．
【結果と考察】個別に培養した iPS と NHDF を種々の濃度のアラニン含有培地に曝露したところ，高濃度領域で NHDF は死滅せずに iPS のみが選択的に死滅した．このことから，iPS は高濃度アミノ酸含有培地に対する耐性が NHDF に比べて弱いことが分かった．それぞれ蛍光標識した iPS と NHDF を共培養し，高濃度アミノ酸含有培地に曝露した後にフローサイトメーターでそれぞれの細胞数を計測したところ，対照群では約 15%含まれていた iPS が，アラニン含有培地に曝露することで約 1.8%以下に低下した．さらにもう一度曝露処理を行うことで iPSC の残存率が 0.1%以下に減少した．また，iPS と iPS 由来線維芽様細胞を高濃度アミノ酸含有培地に曝露した場合においても，iPS が選択的に除去された．
以上の結果から，本手法は分化誘導後の細胞群から残存未分化ヒト iPS 細胞を除去するための有用な手段になると期待される．

Selective elimination of residual undifferentiated human iPSCs using high-concentration amino acid medium.

○Takunori Nagashima[1], Kazunori Shimizu[1], Ryo Matsumoto[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME, Nagoya Univ.)

Key words human iPSCs, regenerative medicine, osmotorelant, amino acid

3P-J204 ヒト iPS 細胞の未分化維持培養における集塊形成機構の解明

○金 美海, 竹内 一博, 百川 拓実, 紀ノ岡 正博
（阪大院・工）
kino-oka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】ヒト iPS 細胞の産業利用に繋げるためには，質と量の両面で安定に培養・増幅し，特定の細胞に効率よく分化誘導する培養技術が不可欠である．培養系としては，3 次元立体集塊培養を中心に改善され，未分化状態を維持しつつ細胞増殖可能な浮遊集塊を形成させる培養法が広く用いられているが，細胞株や培養条件によって細胞の質と量の両面で不安定さが見られている．そのため，集塊形成過程を解析することは細胞の培養技術を確立するために重要であると考えられる．そこで本研究では，培養中の iPS 細胞の挙動観察に基づいて，集塊形成機構の解析を試みた．
【方法および結果】ヒト iPS 細胞を 2 次元平面培養と 3 次元立体集塊培養を行い，ヒト iPS 細胞集塊形成過程を，接着期（細胞接種後の培養面への接着・伸展または細胞同士の接着），増殖期（細胞分裂），停止期（細胞密度があがり細胞同士の接触阻害による増殖停止）の 3 つのフェーズに分けて，個々のフェーズにてオンラインで観察可能な固有のパラメータ評価を行った．細胞観察装置により培養 48 時間内の初期細胞の生存率とコロニー形成パターンを比較したところ，2 次元平面培養では，細胞の活発な分裂や細胞遊走による細胞同士の合一によって高い生存率とコロニー形成率を示した．しかし，3 次元立体集塊培養では，分散培養開始直後の単一細胞から生じる細胞死と細胞分裂の際に起こる細胞死が生存率とコロニー形成率を低下させることが確認された．以上の結果から，細胞挙動（細胞-基質接着，細胞-細胞間接着，遊走）の変化が細胞集塊形成過程において大きな影響を及ぼすことが明らかとなり，今後のヒト iPS 細胞の増幅培養系の確立に当たって有益な示唆を与えるものと思われる．

Elucidation of aggregate formation process in expansion culture of human iPS cells

○Mee-Hae Kim, Kazuhiro Takeuchi, Takumi Momokawa, Masahiro Kino-oka
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words Human induced pluripotent stem cells, Aggregate formation process, Kinetic analysis, Expansion culture

3P-J205 羊毛ケラチンの透明な薄膜の調製

森 英樹, 酒井 千尋, ○原 正之
（阪府大院・理）
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【目的】我々は硬蛋白質のケラチンを生体材料として加工し，組織工学の足場材料に用いる研究を行っている．今回は，羊毛ケラチンの透明な薄膜の調製を行ったので，その方法と薄膜の分解性や生体適合性の評価について報告する．
【方法】羊毛ケラチンを 8 M 2-mercaptoethanol と 1.66 M guanidine を含む水溶液で，60℃で 18 時間可溶化し，得られた粗抽出液を常温で純水 6 時間透析して，円板状のケラチン多孔質ハイドロゲルを得た（以下，ゲル）．これを直径 1.4 cm の円形にくり抜き，油圧圧縮装置を用いて 28MPa で圧縮処理し，ガラス板に挟んで乾燥させ，透明なケラチン薄膜を得た（以下，薄膜）．この薄膜の光透過率の測定，AFM 観察を行い，また 0.05%(w/v) トリプシン溶液に浸し，1, 3, 6 週目で乾・湿重量を測定して分解性を評価した．比較の対照にはゲル，非分解性の PET 薄膜を用いた．同様の試料を ICR マウスの皮下へ移植し，3 日，1, 3, 6, 10 週目に残存試料を含む皮下組織を採取し，凍結切片を作製して HE 染色後に顕微鏡で観察した．
【結果と考察】白濁したゲルを光透過率 80%前後の透明な薄膜に加工できた．しかし加熱蒸気滅菌処理後により透過率は再度低下した．6 週間のトリプシン処理ではゲルは脆くなり，乾重量では初期値の約 40%に減少したが，薄膜は初期値の 85%程度に留まった．マウス皮下に移植したゲルでも重量，面積ともに大幅に減少したが，薄膜は乾重量の減少が少なかった．薄膜は圧縮処理により隙間の表面が減少し，蛋白質分解酵素への耐性が高まった為と思われる．また炎症反応も PET 薄膜と同様に 3 週目に沈静化しており，PET 製の移植用材料と同程度の生体適合性であると考えられた．我々は透明なケラチン薄膜の生体材料としての利用可能性が示されたと考えている．

Preparation of transparent wool keratin film

Hideki Mori, Chihiro Sakai, ○Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words wool, keratin, film, transparency

3P-J206 蛋白質修飾ナイロン網目を用いた神経幹細胞／前駆細胞の三次元培養

○藤田 雅徳, 森 英樹, 原 正之
（阪府立大院・理・生物科学）
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】神経幹細胞/前駆細胞（NSPC）は，中枢神経系を構成する神経細胞やグリア細胞への多分化能と自己複製能を持ち，無血清培地下で細胞集塊を形成しながら増殖する．培養経過に伴い細胞集塊同士が接着し大きな塊になることは細胞の増殖や分化の制御を難しくする．そこで網目状の繊維に部分的に細胞集塊を固定できれば，NSPC の増殖や分化の制御に有利な条件で培養できるのではないかと考えた．本研究では，蛋白質修飾ナイロン網目を用いて，マウス及びヒトの NSPC の接着培養を試み，比較した．
【方法】繊維幅 70μm，目開き 180μm のナイロン網目に 10 kGy の γ 線を照射した後，アクリル酸溶液に浸しナイロン繊維表面にポリアクリル酸をグラフト重合，さらに EDC/NHS 法を用いて繊維表面のグラフト鎖に gelatin, BSA, Matrigel といった蛋白質を修飾した．マウス及びヒト NSPC を，調製した各ナイロン網目が入った培養容器上に播種し，無血清培地下，5%CO_2，37℃下で培養した．繊維への接着細胞数と 7 日間培養における細胞増殖率を評価し，さらに細胞マーカーとなる nestin や tubulinβIII 等の抗体を用いた蛍光免疫染色によって細胞の分化状態を確認した．
【結果】AFM でナイロン繊維表面へのポリアクリル酸の導入が確認された．ナイロン網目上に播種された NSPC はいずれの繊維表面でも接着が見られたが，特にマウス NSPC は未修飾ナイロン及び Matrigel 修飾繊維上への接着細胞数が多く，ヒト NSPC ではそれらの繊維に加えゼラチン修飾繊維でも細胞接着数が多かった． Matrigel 修飾繊維では，接着した NSPC が繊維に沿って移動し広がり，最も高い細胞増殖率を示した．いずれのナイロン網目上で接着培養した細胞でも nestin 陽性の細胞が多く見られた．以上，細胞増殖基材としては Matrigel 修飾ナイロン網目が適当であると考えられる．

Three-dimentional culture of neural stem/progenitor cells using protein-immobilized nylon mesh

○Masanori Fujita, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Prefecture Univ.)

Key words three-dimentional culture, neural stem cell, nylon, mesh

3P-J207 両イオン性を有する共重合体 CAT の温度応答性培養基材としての有用性検討

○鳴海 勇希[1], 岩井 良輔[2], 高木 睦[1]
（[1]北大院・工, [2]岡山理大・技科研）
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)（PNIPAM）を用いた温度応答性細胞培養基材が開発されている．本研究では，両イオン性と温度応答性を有する共重合体 CAT（Cation, Anion and Temperature-responsible copolymer）の有用性を検討するため，PNIPAM および CAT をそれぞれコートした培養基材でヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hBM MSC）を培養し比較した．

【方法】ポリスチレン製の細胞培養ディッシュに PNIPAM 及び CAT 水溶液を滴下し，12 時間乾燥固着によりコートした後，hBM MSC を 2.5×10^3 cells/cm^2 の密度で播種した．7 日間培養し，接着効率，増殖倍率および低温処理による細胞回収効率を求めた．

【結果・考察】MSC の接着，伸展を指標としてコート密度を検討した結果，PNIPAM は 3.2 μg/cm^2，CAT は 0.2~1.0 μg/cm^2 が適していた．また接着効率は，PNIPAM よりも CAT を用いた方が約 1.4 倍と高かった．MSC の増殖倍率は PNIPAM よりも CAT(0.2 μg/cm^2)で約 1.4 倍と高く，低温処理による細胞回収効率はほぼ同程度であった．以上の結果から温度応答性培養基材としての CAT の有用性の可能性が認められた．

Temperature responsible culture dish containing a novel zwitterionic copolymer

○Yuki Narumi[1], Ryosuke Iwai[2], Mutsumi Takagi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]RIT, Okayama Univ. Sci.)

Key words mesenchymal stem cell, zwitterionic, temperature responsible, PNIPAM

3P-J208 不織布を用いた間葉系幹細胞増殖における増殖倍率の増加

○傅 博, 藤原 政司, 高木 睦
（北大院・工）
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【緒言】
間葉系幹細胞（MSC）は，分化能と活発な増殖能を有する体性幹細胞である．これまでに当研究室では，MSC を用いた軟骨様細胞シートの作製に成功し，同種移植への応用を目指している．この実現に必要となる数（約 1×10^{10} cells）の MSC を得るために，当研究室ではポリエステル不織布（NWF）を利用した MSC の培養を試みたが，増殖倍率は 13 倍しかなかった．そこで本研究では，播種細胞の NWF 中での分布を改良することにより増殖倍率を高くすることを目的とした．

【方法】
直径 15.5 mm，厚さ約 0.1 mm の NWF ディスク中央に，GFP 産生マウス MSC を播種し，0〜2 時間後，10 μl の培地を同じところに追加し，NWF 中での細胞の分布を観察した．ヒト骨髄由来 MSC を播種した培養で細胞増殖倍率を定量した．

【結果と考察】
播種 1 時間後に 10 μl の培地を追加して培養した結果，MSC が不織布全体に見られるようになり，増殖倍率も最大 45 倍に増えた．また，NWF で増殖後の細胞の CD90，CD166 陽性細胞の割合は増殖前と比べて維持されていた．さらに，不織布で培養した MSC はディッシュ培養した細胞と比べて同等以上の多分化能を持っている可能性が考えられた．

Increase in fold-increase of mesenchymal stem cells during culture in nonwoven fabrics

○Bo Fu, Masashi Fujiwara, Mutsumi Takagi
(Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words nonwoven fabrics, mesenchymal stem cells, growth, inoculation

3P-J209 安定染色体を標的とした抗体遺伝子導入による抗体生産 CHO 細胞株の構築

○田中 航[1], 吉冨 耕太[1], 山野 範子[1,2], 鬼塚 正義[2,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB組合, [3]徳大院・社会産業理工）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景及び目的】
CHO 細胞はバイオ医薬品生産の宿主細胞として多用されているが，抗体生産株構築において，通常，外来遺伝子は染色体上の不特定位置に導入され，その導入位置により細胞間で抗体生産性が異なる．近年，外来遺伝子を標的位置に導入することができる遺伝子ターゲティング法が注目されているが，外来遺伝子の効率発現に有用な染色体上の領域は十分には解明されていない．本研究では，細胞株間で高度に保存されている 1 番染色体を標的として，CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子導入による抗体生産株の構築を試みた．
【方法】
CHO-K1 細胞を宿主細胞とし，CRISPR/Cas9 システムを用いて 1 番染色体の異なる 3 領域を標的とした IgG_1 発現遺伝子の導入を行った．構築した細胞株について回分培養を行い，生細胞濃度，抗体濃度の経時変化を測定した．また，リアルタイム PCR を用いて抗体遺伝子のコピー数を測定した．
【結果及び考察】
IgG_1 発現遺伝子のターゲティング位置が異なる 3 種類の細胞株並びに，比較対象とする不特定位置に抗体発現遺伝子が導入された細胞株を構築した．構築した細胞株間において比増殖速度に差は見られず，抗体遺伝子導入位置は細胞増殖能に影響を与えなかったと考えられた．一方，遺伝子ターゲティングにより構築された 3 株は全て，コントロールに比べて高い抗体比生産速度を示し，最も高い株において約 6.4 倍となった．抗体遺伝子のコピー数を測定した結果，重鎖及び軽鎖について，遺伝子ターゲティングにより構築された株におけるコピー数はコントロールの株におけるコピー数を下回った．以上より，1 番染色体において選択した領域が外来遺伝子発現に有用な領域である可能性が示唆された．

Construction of antibody-producing cell lines by targeting the IgG1 gene to the stable chromosome

○Wataru Tanaka[1], Kota Yoshitomi[1], Noriko Yamano[1,2], Masayoshi Onitsuka[2,3], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]MAB, [3]Grad. Sch. Technol., Ind. Soc. Sci., Tokushima Univ.)

Key words CHO cells, CRISPR/Cas9, antibody production, chromosome targeting

3P-J210 Multicolor fluorescent *in situ* hybridization (mFISH)法を用いた Chinese hamster ovary (CHO)細胞における染色体多様性の解析

○北 一真[1], 山野 範子[1,2], 鬼塚 正義[2,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,2]
（[1]阪大院・工, [2]MAB組合, [3]徳島大院・社会産業理工）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

[背景・目的]バイオ医薬品の生産で多用される遺伝子組換え宿主である CHO 細胞は，染色体に不安定性を持つことが知られている．当研究室のこれまでの結果において，染色体数が通常より多い CHO 細胞を宿主として構築した生産株が高い抗体生産能をもつことが示されているが，その染色体不安定性については解明されていない．そこで本研究では，構築された染色体数の異なる CHO 細胞株の染色体多様性を解析することで各染色体の安定性を調べ，効率的な生産株を構築するためのターゲティング対象となる染色体を特定するための知見を得ることを目的とした．
[実験材料・方法]これまでの本研究において単離した染色体数が 20 本，及び 39 本の CHO-DG44 細胞，それらを宿主としたヒト化 IgG 抗体生産細胞，また，樹立した CHO-K1 細胞株由来のヒト化 IgG 抗体高生産株を用いた．各細胞に対してコルセミド処理を行い metaphase の細胞を回収し，カルノア液で細胞を固定，mFISH 法を用いて染色後，正立型蛍光システム顕微鏡(Axio Imager.Z2)を用いて核型の画像を入手した．
[実験結果・考察]各細胞 50 細胞の核型画像から細胞毎に染色体の多様性を分類し，各細胞が保有する 1 から 10 番および X 染色体の平均本数，並びに，変動係数を算出した結果，染色体数の多い (39 本付近)細胞において，2 番，5 番，6 番染色体の平均本数の変動係数が，他の染色体と比較して 0.39 倍小さく，比較的安定しており，かつ，その本数が通常染色体数 (20 本付近)の細胞と比較して約 2 倍(平均 3.92±0.05 本)に増加していた．一方，K1 細胞由来の抗体高生産株では，2 番染色体の平均本数の変動係数が他の染色体と比較して 0.49 倍小さく，比較的安定しており，かつ，その本数が平均 3.92 本存在していた．これらの変動の少ない染色体に目的遺伝子を導入することで，長期間安定した生産を実現する細胞株構築につながる可能性がある．

Analysis of chromosomal diversity in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell lines using Multicolor fluorescent *in situ* hybridization (mFISH) method

○Kazuma Kita[1], Noriko Yamano[1,2], Masayoshi Onitsuka[2,3], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]MAB, [3]Grad. Sch. Technol., Ind. Soc. Sci., Tokushima Univ.)

Key words chinese hamster ovary, chromosome, multicolor fluorescent *in situ* hybridization, aneuploidy

3P-J211 遺伝子改変フィーダー細胞を用いた iPS 細胞の運動神経分化誘導

○吉岡 貫太郎[1], 井藤 彰[1], Paerwen Paerhati[2], 河邉 佳典[1], 上平 正道[1]
（[1]九大院・工, [2]九大院・シス生科）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

[目的]
iPS 細胞を未分化維持もしくは特定の細胞に分化誘導する手法の一つに，iPS 細胞の足場となり必要なシグナルを伝達するフィーダー細胞を使用する方法がある．フィーダー細胞から iPS 細胞へのシグナル伝達は，細胞同士の接着に関わる細胞間接着タンパク質を介した細胞間相互作用により引き起こされる．これまで，我々は細胞間接着タンパク質の中でもカドヘリンに着目し，iPS 細胞の神経細胞への分化を支持するマウスストローマ細胞株 PA6 を用いて実験を行なってきた．PA6 細胞に対して iPS 細胞で発現している E-カドヘリンもしくは神経細胞で発現している N-カドヘリンを遺伝子導入した遺伝子導入フィーダー細胞を作製 (PA6/E 細胞，PA6/N 細胞)し，それぞれの細胞上で iPS 細胞を培養することで，iPS 細胞とフィーダー細胞の細胞間相互作用強化による分化シグナル伝達を促進させ，運動神経細胞への分化効率向上を目指した．
[実験方法と結果]
マウス由来 iPS 細胞を遺伝子導入フィーダー細胞上で培養し，培養 4 日目からレチノイン酸および purmorphamine を添加ながら，9 日間分化誘導実験を行なった後，免疫染色により運動神経分化を評価した．その結果，神経マーカー (TuJ) および運動神経マーカー (HB9)の両方で染色されたコロニー数が PA6/N 細胞上で培養した条件で最も増大した．さらに上記の方法で分化誘導を行なった iPS 細胞由来運動神経細胞と C2C12 筋芽細胞を共培養したところ，共培養 4 日目で神経伝達物質であるグルタミン酸添加による筋管の収縮が見られた．これらの結果より，遺伝子導入フィーダー細胞を利用することで運動神経分化効率が向上し，さらに誘導された運動神経細胞が筋管と機能的な神経筋接合を形成していることがわかった．

Motoneuronal differentiation of iPS cells using genetically modified feeder cells

○Kantaro Yoshioka[1], Akira Ito[1], Paerhati Paerwen[2], Yoshinori Kawabe[1], Masamichi Kamihira[1]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

Key words iPS cell, cadherin, feeder cell, cell surface engineering

3P-J212 −80℃下における細胞の長期凍結保存: 保存温度が細胞に与える影響

○宮本 義孝[1,2], 池内 真志[1], 野口 洋文[3], 生田 幸士[1], 林 衆治[2]
（[1]東大・先端研, [2]名大院・医, [3]琉大・医）
myoshi1230@gmail.com

【目的】凍結保存は，様々な細胞を長期間安定に供給することができる唯一無二の方法である．その一方では，細胞は凍結プロセスなどの環境変化に伴い，大きなダメージを受けることが報告されている．特に，凍結保存液の組成，凍結方法や保存温度などが，凍結融解後の培養細胞の機能回復に影響を及ぼしている．その中でも，細胞の品質を安定に維持する保存温度は，液体窒素下が一般的であり，−80℃下では長期間品質を維持することが難しいとされている．そこで，本報告では，8 年以上前に−80℃下で凍結保存した細胞を用いて，保存温度が細胞に与える影響について検討した．
【方法】本実験では，細胞凍結保存液としてセルバンカー 1 を用いた．細胞株は，HepG2 細胞（ヒト肝臓癌由来細胞株），NIH 3T3 細胞（マウス繊維芽細胞株），HH 細胞（ウシ頸動脈正常血管内皮細胞株）を使用した．培養細胞をトリプシン処理した後，1 本あたり約 1×10^6 cells/ mL の細胞密度で，急速冷凍（−80℃ディープフリーザー）にて凍結した．凍結細胞株は，−80℃ディープフリーザー内で長期間保存した（8 年以上）．対照群として，液体窒素下で保存した細胞株を用いた．融解後，凍結細胞株の生存率，培養細胞の形態観察，増殖能を評価した．HepG2 細胞については，STR（short tandem repeat）遺伝子多型解析，およびアルブミン分泌能も評価した．
【結果】−80℃および液体窒素下で凍結保存した細胞株は，解凍後の生存率は 90％以上であり，それぞれ細胞の形態も良く，増殖能も差は見られなかった．また，STR 解析により−80℃および液体窒素下で凍結保存した細胞ともに，HepG2 細胞株と同定することができ，アルブミン分泌能も同程度であることが確認できた．以上の結果より，−80℃下で長期間保存した細胞株は，再生医療，創薬開発など，様々な分野へ有効に利用できることが期待される．

Long-term cryopreservation of cells at -80℃: Effects of storage temperature on cells

○Yoshitaka Miyamoto[1,2], Masashi Ikeuchi[1], Hirofumi Noguchi[3], Koji Ikuta[1], Shuji Hayashi[2]
([1]RCAST, Univ. Tokyo, [2]Grad. Sch. Med., Nagoya Univ., [3]Fac. Med., Univ. Ryukyus)

Key words cell, cryopreservation, long term storage

3P-J213 数理解析に基づく 3 因子定常振動系人工遺伝子回路の設計

○浅村 健太[1], 成瀬 裕紀[2], 伊庭 斉志[2], 岡本 正宏[3], 花井 泰三[3], 濱田 浩幸[3]
（[1]九大院・シス生科, [2]東大院・工, [3]九大院・農）
taizo@brs.kyushu-u.ac.jp

【緒言】 人工遺伝子回路の構築では，目標とする定性的なシステム動態を実現するために，構成因子の遺伝子数，翻訳効率など多数の項目を最適化しなくてはならない．このため，多数の実験を試行錯誤して行うことになる．本研究では，転写，翻訳，遺伝子発現制御などを詳細に組み込んだ多階層数理モデルを用いて，定性的な動態の一つである振動系の人工遺伝子回路を設計する手法を構築した．
【方法】 AraC 発現系，LacI 発現系，TetR 発現系の遺伝子発現動態を表現する数理モデルを構築した．これらのモデルを統合し，3 種のタンパク質濃度が振動動態を示すと考えられる数理モデルを構築した．そして，実数値遺伝的アルゴリズムを用いて，振幅，周期間隔などの目標値を実現する，数理モデル内のプラスミドコピー数，遺伝子発現制御における活性および抑制の相互作用係数などの最適値を探索した．
【結果】 各発現系のプラスミドコピー数の最適値は 30 個または 70 個であった．次に，これらのコピー数の条件下で，遺伝子発現制御の相互作用係数などの最適値を探索し，5 組の組み合わせを得た．これらの条件下で，3 因子から成る定常振動系を構成できる可能性が示唆された．
【考察】 数理解析により導かれた遺伝子発現系のコピー数は，Bujard の知見[(1)]に基づき p15A または ColE1 プラスミドを用いれば実現可能と考えられた．また，遺伝子発現制御の相互作用係数などの最適値から，3 因子間の転写および翻訳強度の定量的な大小関係が示された．そして，感度解析を通してそれらの係数の振動動態への寄与度が明らかとなった．今後，解析で得られた知見を実験により検証する．
1) Nucleic Acids Res., 25(6).1203-1210(1997)

Artificial gene circuit design of 3 factor steady-state oscillator based on mathematical analysis

○Kenta Asamura[1], Yuki Naruse[2], Hitoshi Iba[2], Masahiro Okamoto[3], Taizo Hanai[3], Hiroyuki Hamada[3]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [3]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words mathematical analysis, oscillator, artificial gene circuit, synthetic biology

3P-J214 大腸菌による有用物質生産の改善のためのコアモデルの構築

○厨 祐喜[1], 大山 彰[2], 荒木 通啓[1,3]
（[1]神戸大院・科技イノベ, [2]インシリコバイオロジー, [3]京大院・医）
araki@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】近年，微生物による有用物質の生産が盛んに研究されている．このような有用物質の生産に，ゲノムスケールモデルを用いた *in silico* での解析・設計が有用なことが示唆されている．また，微生物による生産のターゲットとして様々な有用物質が挙げられている．そのため，このような種々の有用物質へと展開可能な代謝物 (ハブ化合物) の大量生産株の構築は，目的物質の生産に非常に有用と考えられた．そこで，本研究では，そのハブ化合物を大量に生産しうる株の設計のためのモデル (コアモデル) を構築し，そのモデルの有用性を検証することを目的とした．
【方法・結果】今回は，大腸菌をホストとして選択した．まず，ゲノム配列や KEGG などの反応データベースを基にラフなモデルを自動構築した．次に，構築されたラフなモデルに反応の追加・削除・修正などの処理を施し，コアモデルとした．そして，構築したコアモデルの評価のために，Flux balance analysis による大腸菌のゲノムスケールモデル (iJO1366) やそれを基にした EColiCore2 モデルとその特性を比較した．また，有用物質生産のケーススタディとして，グルコースからのシキミ酸・コリスミ酸，リコペン生産を例に，FBA を用いてこれらの目的物質の生産改善に有用な改善方策を探索し，既報の実験的知見と比較した．コアモデルの特性は，iJO1366 および EColiCore2 モデルと比べ，最大増殖速度が少し低い傾向が見られた．また，コアモデルによる予測は，全てではないものの，シキミ酸・コリスミ酸，リコペン生産の増大に関する実験的知見と概ね一致していた．

Core model construction for improvement of valuable chemical productions in *Escherichia coli*

○Yuki Kuriya[1], Akira Ohyama[2], Michihiro Araki[1,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]in silico biology, Inc, [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Key words *Escherichia coli*, flux balance analysis, core model

3P-J215 珊瑚礁海域における環境細菌叢ダイナミクスと環境ネットワーク解析

○井手 圭吾[1,3], 伊藤 通浩[2], 藤村 弘行[2], 須田 彰一郎[2],
中野 義勝[2], 油谷 幸代[3], 竹山 春子[1,3]
（[1]早大・先進理工, [2]琉球大・理, [3]産総研・早大CBBD-OIL）
haruko-takeyama@waseda.jp

海洋中の細菌叢さらにそれらの機能遺伝子発現も環境因子との相互関係があることが知られている．しかしそのメカニズムは未だ完全に明らかにはなっていない．本研究では，海洋中の細菌叢と環境因子が相互に影響を与えるメカニズムを情報科学的に理解するために，海洋細菌のメタゲノム，メタトランスクリプトームおよび海洋環境因子情報を用いて，ネットワーク・関連解析を行った．
海洋メタゲノム・メタトランスクリプトームは日本，沖縄県瀬底島のサンゴ礁海域２地点において，2014 年 11 月から 2016 年 3 月までの月ごとに採取した．また，採取地点における 8 つの環境因子を経時的に計測した．測定したメタゲノム・データと環境因子データに対して交差相関を適用し，細菌叢解析および環境因子間の因果関係を環境ネットワークとして構築した．また海洋環境中における機能遺伝子と環境因子の関連を求めるために，メタトランスクリプトームの情報を用いて海洋環境因子と相関の高い遺伝子を抽出し，代謝パスウェイとの関連を解析した．
メタゲノム解析から，サンゴ礁海域の細菌叢の 5 割以上は Synechococcus sp.によって占められていることが明らかになった．また Vibrio 属及び Glaciecola sp.が季節特異的に増加することが示唆された．海洋環境ネットワークでは観測した海洋環境因子のうち，海水温・光量は高い関係性で微生物に対して影響を与えていた．また溶存酸素量はシアノバクテリアによって影響を受けていた．Glaciecola sp.と Synechococcus sp.はネットワークにおいて様々なクラスタを仲介していた．
海水温・光量が特定の細菌を介することによって，海洋環境ネットワークに対して影響を及ぼしていることが示唆された．サンゴ礁海洋環境において Glaciecola sp.と Synechococcus sp.が海洋環境ネットワークの中心的な役割を担っていることが示唆された．

Environmental bacterial flora dynamics and environmental network analysis in coral reef ocean

○Keigo Ide[1,3], Michihiro Ito[2], Hiroyuki Fujimura[2], Shoichiro Suda[2],
Yoshikatu Nakano[2], Sachiyo Aburatani[3], Haruko Takeyama[1,3]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Fac. Sci., Univ. Ryukyus, [3]CBBD-OIL, AIST)

Key words marine environment, microbiology, bioinformatics, Network Analysis

3P-J216 出芽酵母における解糖系タンパク質の発現限界を決める要因

○江口 優一[1], 蒔苗 浩司[2], 守屋 央朗[2]
（[1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大・異分野コア）
hisaom@cc.okayama-u.ac.jp

【背景と目的】細胞内のタンパク質が最適な量から逸脱し過剰に発現すると，細胞の機能に様々な影響を与える．これまでの研究から，過剰発現した際に細胞増殖に強い悪影響を与えるタンパク質と，ほとんど影響を与えないタンパク質があることが分かっている（Sopko 2006, Makanae 2013）．しかし，これらのタンパク質の違いが何から生じるかは殆どわかっていない．そこで本研究では，出芽酵母において細胞増殖が阻害される限界までタンパク質を発現した時に，どれくらいの量で細胞増殖を阻害するのか，そしてその原因となるメカニズムは何かを明らかにすることを目的とした．
【方法】上記の目的のため，我々は出芽酵母の解糖系に関わる 29 のタンパク質を選定し，それらの過剰が細胞の増殖を阻害する限界（発現限界）を調べることにした．解糖系タンパク質は出芽酵母の中でそもそも発現量の高いタンパク質群であり，これらを用いることで細胞増殖が阻害される限界までタンパク質が発現されることが期待された．解糖系遺伝子を強力なプロモーターである *TDH3* プロモーターから発現させる多コピープラスミドに導入し，そのプラスミドを持つ酵母の増殖と標的タンパク質の発現量を測定した．
【結果と考察】出芽酵母の 29 の解糖系タンパク質のうち最も発現量の高いタンパク質は Gpm1 であり，Gpm1 は酵母細胞内の全タンパク質の約 15％発現した．また大半の解糖系タンパク質の低活性変異体の発現限界は，野生型のそれとほぼ同じであり，例外は Pfk1・Pfk2 のみであった．このことから過剰発現されたタンパク質の持つ酵素活性が細胞増殖に与える影響は小さいことが示唆された．この他にも Adh3 はそのタンパク質のもつミトコンドリアへの局在性が発現限界を決めていることや，Glk1 の発現量はそのタンパク質がコードされる遺伝子のコドン最適化度が決めていることを明らかにした．

Determining factors for expression limits of glycolytic enzymes in yeast.

○Yuichi Eguchi[1], Koji Makanae[2], Hisao Moriya[2]
([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ., [2]RCIS, Okayama Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, protein overproduction, glycolysis, protein expression

3P-J217 ニューラルネットワークを網羅的かつハイスループットに解析する新規方法論

○松倉 秀典[1], 横山 治樹[1], 青木 航[1,2], 植田 充美[1]
（[1]京大院・農, [2]JST・さきがけ）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】
動物の高次行動は，ニューラルネットワークによって生み出される．ニューロン間の接続状態を表すコネクトームは徐々に明らかになってきているが，それが高次行動を生み出すメカニズムはよくわかっていない．
近年開発されたオプトジェネティクスは，ニューロンに光作動性イオン輸送体であるオプシンを発現させ，光照射下でその活動を制御できる技術である．本手法により，神経活動と高次行動との関係性を検証することが可能となった．しかし本手法は，解析対象となるニューロンを事前に決定せねばならず，仮説検証のたびに異なる変異体を構築する必要があるため，スループットが低い．したがって，本手法は既に存在する仮説の精密な検証には適しているが，全く新規の発見は起こりにくい．さらに，1 細胞レベルでの解析も困難であるという問題点も存在する．
【手法・結果】
そこで我々は，仮説を必要とせず，ハイスループットで網羅的な神経解析手法である「リバースオプトジェネティクス」を開発した[1].
本手法では，1 つ 1 つのニューロンにおいて，オプシンが恒常発現するかどうかがランダムに決定される．これにより，様々なパターンでオプシンが発現した動物個体集団を簡単に得ることができる．この集団に対して光を照射することで，どのニューロンがどの行動に影響するのかを，ハイスループットに解析することができる．また，オプシンが発現する確率を制御することで，回路レベルから 1 細胞レベルまで，幅広いレベルでの解析も可能となる．
本手法の概念実証のため，線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて，オプシンを発現するニューロンをランダム化することに成功した．また，本手法を用いて産卵行動を司る HSN ニューロンの再同定が，ハイスループットに行えることを証明した[2].

[1] W. Aoki et al. submitted
[2] H. Matsukura et al., submitted

Novel approach for the high-throughput functional annotation of the neural network in *Caenorhabditis elegans*

○Hidenori Matsukura[1], Haruki Yokoyama[1], Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]PRESTO, JST)

Key words Optogenetics, *Caenorhabditis elegans*, neural networks, single cell level analysis

3P-N218 「構成的遺伝学」を用いた大腸菌相同組換え機構の解明

○古村 峻, 青木 航, 植田 充美
（京大院・農）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景と目的】転写・翻訳・代謝など様々な生物学的システムを解明するため，従来の生命科学研究では，トップダウン型とボトムアップ型の二つの方法論が用いられてきた．トップダウン型では，システムを構成する因子の同定が試みられる．すなわち，遺伝学やオミックス解析がトップダウン型に該当する．一方，ボトムアップ型では，生物学的システムの再構成が試みられる．すなわち，合成生物学やシステム生物学がボトムアップ型に該当する．これまでの生命科学の知見は，これら二つの方法論を交互に適用することで蓄積されてきた．しかし，複雑な生物学的システムを解明するためには，膨大な時間・労力を要するという問題点がある．そこで，本研究では，これら二つの方法論を融合させた第三の方法論を考案し，「構成的遺伝学」と名付け，その方法の開発に取り組んでいる．「構成的遺伝学」では，研究対象の生物学的システムを構成する因子の同定と *in vitro* 再構成を同時に達成できる利点がある．本方法論を確立することで，複雑な要素の絡む生命科学研究の効率化を目指している．
【内容】本方法論の概念実証を行うためには，複数因子間のネットワークから構成される，未知の生物学的システムに挑戦する必要がある．そこで，大腸菌の遺伝子相同組換えシステムを研究対象に選択した．大腸菌の遺伝子相同組み換えは，ポリメラーゼやエキソヌクレアーゼなどの複数の因子から構成されるとともに，クローニング技術に応用できるため，有用な展開が期待できる．しかし，その機構は完全に明らかになっていない．本報告では，この大腸菌の相同組み換えを「構成的遺伝学」の概念実証の対象に選択し，機構の解明を試みたので，まとめて報告する[1].

[1] Komura *et al.*, submitted.

Elucidation of the mechanism of homologous recombination in *Escherichia coli* by Constructive Genetics

○Ryo Komura, Wataru Aoki, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words constructive genetics, homologous recombination, *Escherichia coli*

3P-N219 イメージング質量分析を用いた炎症モデルマウスにおけるプロスタグランジン可視化法の開発

○安田 優太郎[1], 杉浦 悠毅[2], 東 達也[3], 福崎 英一郎[1], 新間 秀一[1]
([1]阪大院・工, [2]慶応大, [3]東理大・薬)
sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

イメージング質量分析は，分子をイオン化して分析する質量分析に位置情報を反映した分析方法で，分子の相対的な強度分布を MS イメージとして得ることができる．その中でも，マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）をイオン化に用いた MALDI イメージング質量分析法（MALDI-IMS）は，高感度・高解像度で多くの物質の分布情報を可視化することができることから，薬物動態解析などの医療分野に適用されてきた．しかし，最適なマトリックスの探索等の技術的な改善を行ったとしても，イオン化しにくい微量成分の分布可視化には未だに課題が残っている．そのような物質の一例として，プロスタグランジン（PG）が挙げられる．
PG は生体内での存在量が極めて微量であるにもかかわらず強力な生理活性を有しており，炎症などの重要な生体反応に関わっている．しかし，生体内の PG は存在量がそもそも少なく分析が難しいため，疾患との関係を見つけるのが難しいといった問題がある．PG の生理活性作用機序や疾患との関連性を議論する際，その位置情報が求められる．現在用いられている免疫染色などの PG の分布可視化方法は，非常に高感度である反面，多成分の情報を一度に可視化することが難しく，酵素の位置情報を間接的に可視化しているにすぎない．そのため実際にその分子の分布情報を直接可視化していない可能性を否定できない．本研究では，これら PG の生体内微量成分の分布を直接可視化するための，MALDI-IMS の新規高感度分析方法の構築を試みた．分析の高感度化のために，組織上誘導体化とマトリックス再結晶法を併用した分析法を開発した．さらに，開発した方法を脊髄損傷モデルマウスの脊髄切片に適用することで，損傷による炎症部位における PGE2 及び PGD2 の分布を可視化することに成功した．

Applicability of imaging mass spectrometry to in vivo prostaglandins

○Yutaro Yasuda[1], Yuki Sugiura[2], Tatsuya Higashi[3], Eiichiro Fukusai[1], Shuichi Shimma[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Keio Univ., [3]Fac. Pharm ., Tokyo Univ. Sci.)

Key words prostaglandin, MALDI-IMS, inflammation, matabolomics

3P-J220 GC-MS を用いた糞便中短鎖脂肪酸の一斉分析法の開発

○杉立 久仁代[1], 古橋 剛[2], 石原 玄基[2], 軸丸 裕介[1], 中井 隆志[1], 中村 貞夫[1]
([1]アジレント, [2]アニコム先進医療研)
kuniyo_sugitate@agilent.com

【背景・目的】近年，腸内細菌の代謝産物とアレルギー疾患，炎症性腸疾患，過敏性大腸炎，肥満，精神疾患といった種々の疾患との関連性が報告されている．特に腸内細菌の代謝産物で注目されている短鎖脂肪酸は，細胞に存在する特異的レセプターが同定されるに伴い，その生理作用や病態形成における意義が解明されつつある．また，腸内環境改善効果を目的とした乳酸菌等の菌種研究や，機能性表示食品/サプリメントの開発が著しい．このような背景から，腸内細菌の産生する短鎖脂肪酸をプロファイリングし，量比を測定することは極めて重要であると考えられる．
これまで短鎖脂肪酸は HS-SPME による分析が多かったが，酢酸や酪酸などが実際に存在する糞便サンプルを用いて定量する場合は標準添加法が必要な上，化合物の極性が高いために GC カラムの選択を含めた分析条件の最適化が難しかった．一方，MTBSTFA による TMS 誘導体化の報告もあるが TMS 化は水分が残っていると誘導体化が進まないため，誘導体化前に乾固する必要があるが，短鎖脂肪酸は揮発してしまい正確な定量ができない欠点があった．
【方法・結果】短鎖脂肪酸は揮発性が高いため，水中での誘導体化が可能な Chloroformate に着目し，誘導体化の検討および最適化を行った．Chloroformate による誘導体化は瞬時に進み，ブチル化された短鎖脂肪酸は n-ヘキサンで抽出後，GC/MS 測定に供した．その結果，ギ酸を含む 14 種の直鎖および分岐短鎖脂肪酸の一斉分析が可能であった．段階的に希釈した各濃度の短鎖脂肪酸を誘導体化させたところ，反応に直線性が認められたため，これらを検量線として用い，糞便サンプルに適用したところ，夾雑成分の影響もなく良好な結果を得ることができた．

Development of profiling method for short chain fatty acids in feces using GC-MS

○Kuniyo Sugitate[1], Takeshi Furuhashi[2], Genki Ishihara[2], Yusuke Jikumaru[1], Takashi Nakai[1], Sadao Nakamura[1]
([1]Agilent, [2]Anicom Specialty Medical Inst.)

Key words short chain fatty acids, chloroformate, feces, GC-MS

3P-J221 多様な魚類における腸内細菌叢・有機物組成データの統合解析手法の構築

○佐藤 有穂[1,2], 朝倉 大河[2], 坂田 研二[2], 伊達 康博[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
([1]横市大院・生命医, [2]理研 CSRS, [3]名大院・生命農学)
jun.kikuchi@riken.jp

【背景・目的】自然環境中には様々な微生物が複雑な相互関係を築きながら生存している．とりわけ魚類の腸内に棲息する微生物叢は，宿主である魚類と相互作用を及ぼしているのみならず，魚類の生息環境とも何らかの関係を築いて存在すると思われる．しかしながら魚類腸内環境生態系において，魚類と腸内微生物叢が共代謝した代謝産物やそれに関わる微生物叢の包括的な関係性に関する知見は乏しいのが現状である．そこで本研究では，多様な魚類における魚類腸内細菌叢の構成と腸内代謝産物との関係性を明らかにするために，自然環境中から多様な魚類をサンプリングし，各腸内容物から細菌叢と有機物組成に関するデータを集め，得られたデータを統合的に解析し，関係性を抽出するような解析手法の構築を目指した．
【方法】日本の多様な水圏環境から得た 20 目 66 科 120 属 160 種 351 個体の魚類を解剖し，腸内容物を取り出し凍結乾燥した．各サンプルから DNA を抽出し，MiSeq を用いて 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し，RDP classifier によって細菌叢のデータを得た．また，核磁気共鳴（NMR）装置を用いて，有機物組成のデータを得た．これらについて各種解析を行った．
【結果・考察】魚類腸内には Proteobacteria をはじめとする様々な細菌が存在し，多くの有機物が含まれていた．細菌叢と有機物組成のデータをそれぞれ主成分分析により解析したところ，系統分類学上の違いや食性の違いによってクラスタリングされる傾向にあった．また，ツノザメ目やメジロザメ目のような肉食魚は TMAO 等に特徴があることもわかった．さらに，魚類の定性情報と組み合わせたマーケットバスケット分析や，Hub 関係を浮き彫りにする相互作用ネットワーク分析によって，多様な魚類の特徴と細菌叢および代謝物群の関係性について明らかにした最新の知見についても本会で議論したい．

Construction of integration analysis method of intestinal bacterial flora and organic composition data in fish diversity

○Yuho Sato[1,2], Taiga Asakura[2], Kenji Sakata[2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words Bacterial flora, Organic composition, Integrated analysis, Biodiversity

3P-J222 ドロップレットデジタル PCR によるサンゴ共在細菌量の地点間・季節間変動の追跡

○竹田 裕貴[1], 細川 正人[2,3], 西川 洋平[1], 小川 雅人[1,6], 須田 彰一郎[4], 中野 義勝[5], 伊藤 通浩[5], 竹山 春子[1,3,6]
([1]早大・先進理工, [2]JST・さきがけ, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]琉球大・理, [5]琉球大・熱帯生物圏研究セ, [6]産総研・早大 CBBD-OIL)
haruko-takeyama@waseda.jp

サンゴには様々な細菌が共在し，その菌叢組成や存在量はサンゴの健康状態や周辺環境による影響を受けて変動していると考えられている．本研究ではドロップレットデジタル PCR（dPCR）を用いて，サンゴ組織から抽出した DNA 中に含まれる共在細菌由来の 16S rRNA 遺伝子数を定量し，サンゴ中の総細菌存在量の指標として経時的に計測した．得られた細菌量のデータを菌叢組成の解析結果と照合し，サンゴの生息地点・季節間における共在細菌の変動を詳細に捉えることを目的とした．
沖縄県瀬底島周辺海域でサンゴ (*Acropora tenuis*) の枝を定期採取し，その枝から剥離した組織から DNA を抽出した．液滴作成には Poly dimethylsiloxane で作製した液滴形成デバイスを用いた．液滴にサンゴ抽出 DNA を封入し，ユニバーサルおよび *Endozoicomonas* 属特異的 16S rRNA 遺伝子を標的とした dPCR を行い，16S rRNA 遺伝子数を定量した．
同一種のサンゴにおいてもその生息地や採取季節よって 16S rRNA 遺伝子数は大きく異なっており，サンゴ生息地点間では最大約 25 倍，季節間では最大約 20 倍の変化が観測された．16S rRNA 遺伝子数が大きく変化する時期には，同時に細菌叢の全体組成も大きく変動していることが明らかとなった．また，一部のサンゴでは *Endozoicomonas* 属が圧倒的多数を占め，その 16S rRNA 遺伝子数はユニバーサル 16S rRNA 遺伝子数と同様な変動を示した．
本研究によりサンゴ共在細菌が周辺環境による影響を受けて，その存在量や菌叢組成を変動させていることが明らかとなった．特に *Endozoicomonas* 属は顕著に環境変化による影響を受け，その存在量が変動していることが示唆された．今後は細菌存在量や菌叢に加えて環境データなどの情報を統合し，より詳細に細菌とサンゴ並びに環境との関連性を明らかにすることを目指す．

Monitoring of seasonal and locational changes of coral associated bacterial 16S rRNA gene by droplet digital PCR

○Hiroki Takeda[1], Masahito Hosokawa[2,3], Yohei Nishikawa[1], Masato Kogawa[1,6], Shoichiro Suda[4], Yoshikatsu Nakano[5], Michihiro Ito[5], Haruko Takeyama[1,3,6]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]PRESTO, JST, [3]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [4]Fac. Sci., Univ. Ryukyus, [5]Biosphere Res. Center, Univ. Ryukyus, [6]CBBD-OIL, AIST)

Key words coral associated bacteria, droplet digital PCR, 16S rRNA gene, *Endozoicomonas*

3P-J223 微小液滴を用いた単一細胞からの超並列ゲノム解析技術の開発

○西川 洋平[1], 細川 正人[2,3], 小川 雅人[1,4], 竹山 春子[1,2,4]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創研, [3]JST・さきがけ, [4]産総研・早大CBBD-OIL)
haruko-takeyama@waseda.jp

MDA（Multiple displacement amplification）に代表される全ゲノム増幅法の開発により，単一細胞を対象としたゲノム解析が実現可能となりつつある．しかしながら，従来までのセルソーターとマルチウェルプレートを用いた全ゲノム増幅法では，一度に処理できる細胞数が限られており，また反応環境中に混入した目的外の DNA により，予期せぬ配列の増幅や偏りが生じていた．そこで本研究では，シングルセル由来のゲノム情報をより高精度かつハイスループットに取得するための技術開発を目的とし，ピコリットル容量の微小液滴を反応場として用いた新たな全ゲノム増幅法を開発した．
PDMS (Poly(dimethylsiloxane))を用いて，内部に十字構造を配したマイクロ流体デバイスを作製した．液滴成分および分散媒であるオイルをデバイス内に導入することで，ピコリットル容量の微小液滴を毎秒約 700 個の割合で連続生成可能とした．本システムを用いて微小液滴中に単一細胞を連続的に封入した後，全ゲノム増幅のための試薬を含んだ液滴との融合を行うことで，10,000 個の細胞に対して並列的に全ゲノム増幅が可能となった．モデル生物として大腸菌および枯草菌を封入して全ゲノム増幅を行い，個々の液滴を分取して 2 次増幅を行った．得られた増幅産物に対して次世代シーケンサーを用いた配列解析を行った結果，80%以上のゲノムカバー率が達成された．また，本手法で得られた増幅産物では，目的外の DNA に由来する配列の割合が従来法に比べて大幅に抑制されることが判明した．さらに，本手法は土壌細菌およびがん細胞に対しても適用可能であることが確認された．以上の結果により，本手法は環境微生物および真核細胞を対象とした単一細胞の網羅的な全ゲノム解析に有効であることが示唆された．

Massively parallel whole genome amplification of single-cells for accute and contamination-free genome sequencing

○Yohei Nishikawa[1], Masahito Hosokawa[2,3], Masato Kogawa[1,4], Haruko Takeyama[1,2,4]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]PRESTO, JST, [4]AIST-Waseda Univ. CBBD-OIL)

Key words single-cell analysis, whole genome amplification, microfluidic device

3P-J224 蛍光標識材料への応用を見据えた新規青色蛍光材料の開発

○矢下 亜紀良[1], 川上 隼人[1], 河合 功治[1], 村井 利昭[2]
([1]ミヨシ油脂株式会社, [2]岐阜大学)
YASHITAA@so.miyoshi-yushi.co.jp

【背景と目的】
蛍光発光物質は有機 EL ディスプレイ，有機 EL 照明，分子イメージ用プローブ，バイオセンサー等の様々な分野で注目されており，生物分野では，タンパク質，核酸など生体分子の染色または化学的標識に用いられている．蛍光色素で化学的に標識された特異的抗体などの精製生体分子は，セルイメージング，ハイコンテント分析，フローサイトメトリー等の実験における蛍光プローブとして，標的抗原や相互作用パートナーの検出に利用されている．これらの用途で使用される蛍光色素は，ストークスシフトが小さいと標識されたターゲットが発する蛍光を励起光から切り離して観察するのが非常に困難であり，またバックグラウンド蛍光の問題も生じてしまうことから，ストークスシフトの大きい化合物が好ましい．
今回，我々は，新規合成方法によりチアゾール骨格の特定部位に窒素原子を含む官能基を導入した新規蛍光発光材料の有機アミノチアゾール化合物を合成した．得られた化合物の光学特性（蛍光励起・発光スペクトル，蛍光発光収率，ストークスシフト等）を評価し，新規蛍光標識分子としての適用性を検討した．
【結果と考察】
金属ナノ粒子触媒を用いたワンステップの合成により，蛍光発光する種々の低分子量のアミノチアゾールが得られた．アミノチアゾール化合物は，導入するアミン化合物の置換基等で蛍光発光波長のチューニングが可能であり，クロロホルム溶液中，蛍光極大波長が４５０～５００ｎｍの水色～青色蛍光発光波長領域に，ストークスシフトが約１００ｎｍ以上のピークを示した．これらの化合物は，アミノ基等の反応性官能基の導入が可能であり，蛍光標識分子として有用性が高いことが示唆された．詳細は，当日のポスターで報告する．

Development of new blue fluorescence materials in anticipation of the application to fluorescent labeling materials.

○Akira Yashita[1], Hayato Kawakami[1], Koji Kawai[1], Toshiaki Murai[2]
([1]Miyoshi Oil & Fat Co., Ltd., [2]Gifu Univ.)

Key words fluorescent labeling materials, fluorescent materials, blue fluorescence

3P-J225 光合成微生物におけるカロテノイドの蛍光イメージング：金属イオンによる蛍光増幅

○油井 信弘, 阿部 克也
（工学院大・先進工・生化）
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】光合成微生物は，栄養源の枯渇や強光などの環境ストレス下でカロテノイドを多量に蓄積する種が存在し，光合成微生物を用いたカロテノイド大量生産系を確立するためには，様々な培養条件を検討する必要がある．演者らは，光合成微生物である気生微細藻類のカロテノイド蓄積を選択的に評価できるアッセイ系の開発に取り組んできた．藻細胞内のカロテノイドを蛍光イメージングするためには，クロロフィルの自家蛍光と区別する必要がある．本報告では，金属イオンによるカロテノイドの蛍光増幅を検討した結果について述べる．
【方法】気生微細藻類から有機溶媒を用いて色素を抽出し，TLC によりクロロフィル画分を得た．市販の β-カロテンのエタノール溶液に種々の金属イオンを添加することで蛍光体を得た．蛍光体は，TLC および HPLC によって分離し，NMR 測定および MS 測定により構造解析を行った．各色素と蛍光体の蛍光スペクトルを励起波長 440 ~ 500 nm においてプレートリーダーで測定した．
【結果と考察】藻細胞内のカロテノイドの蛍光強度は微弱であることが分かっている．そこで，β-カロテン溶液に対して Ag あるいは Pd の金属イオンを添加させたところ，それらの溶液中に蛍光性を示す物質が含まれ，Ag^{+}添加によって蛍光波長 600 nm の強度が 50 倍増幅することが分かった．おそらく，β-カロテンの共役系が Ag と電荷移動型の錯体を形成することで発達した可能性がある．クロロフィルの蛍光波長は 680 nm 付近であったことから，細胞内のカロテノイドのイメージングが金属イオンとの錯形成によって可能になることが示唆された．今後は，精製した蛍光体の化学構造を推定することで蛍光のメカニズムを明らかにし，藻細胞におけるカロテノイドのイメージング法を詳細に検討する．

Fluorescence imaging of carotenoid in photosynthetic microorganisms: fluorescence amplification by metal ions

○Nobuhiro Aburai, Katsuya Abe
(Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ.)

Key words aerial microalgae, carotenoid, fluorescence imaging, metal ions

3P-J226 Multi-functional magnetic nanoparticles for tumor cell isolation

○Liu Chi-Hsien, Soubhagya Laxmi Sahoo
(Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Univ., Taiwan,)
chl@mail.cgu.edu.tw

The early detection of B-cell lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma has a wide impact on the diagnosis and therapy of lymphoma patients. Capturing and sorting tumour cells with magnetic nanoparticles (MNPs) have received considerable attention in recent years. However, the usage of antibody-conjugated MNPs for separation of B-lymphocyte cells expressing CD20 antigen has been rarely reported in literature. Therefore, we functionalized MNPs with anti-CD20 antibody through a carbodiimide activating reaction for highly efficient tumor cell detection and isolation. In addition, specific ligands on magnetic nanoparticles are prepared to increase the specific affinity of the monoclonal antibody. The receptor-recognition ability of the antibody was fully retained after conjugation with MNPs. Herein three applications of MNPs are investigated and discussed. Cellular imaging of the nanoparticles in the mammalian cell has shown their excellent DNA targeting and cell imaging. The advantages such as the fluorescence and specific targeting made the multiple functional MNPs promising for biomedical applications.

Multi-functional magnetic nanoparticles for tumor cell isolation

○Liu Chi-Hsien, Soubhagya Laxmi Sahoo
(Grad. Inst. Biochem. Biomed. Eng., Chang Gung Univ., Taiwan,)

Key words nanoparticle, monoclonal antibody, tumor, isolation

3P-J227 細胞高集積化デバイスを用いた単一がん細胞からの分泌タンパク質の免疫測定

○前田 義昌[1], 太田 健人[1], 畠山 慶一[2], 吉野 知子[1], 田中 剛[1]
([1]農工大院・工, [2]静岡県立静岡がんセンター研究所・遺伝子診療研究部)
tsuyo@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】がん細胞分泌タンパク質はがん進展や転移に関与していると考えられており，がんマーカーとしての応用も期待される．これまで，がん細胞分泌タンパク質の解析は細胞集団を用いて行われてきたが，がん細胞の不均一性が明らかとなった現在，単一細胞レベルでの解析が求められている．そこで本研究では，がん細胞の集積化から個々のがん細胞からの分泌タンパク質の検出までを統合的に実施することのできる細胞高集積化デバイスを用い，単一がん細胞からの分泌タンパク質の免疫測定を行った．
【方法】細胞高集積化デバイスは，孔径 20 μm の微細孔が 6×10^5 個設計された鉛ガラス製キャピラリープレートの微細孔内に，ゾル-ゲル法により合成したモノリス構造を持つシリカが充填された構造をしている．このモノリスシリカに分泌タンパク質に対する抗体を固定化した．種々の濃度の細胞懸濁液 (1ml) を滴下し，毛細管現象に伴う細胞懸濁液の吸引により単一がん細胞の微細孔上へのアレイ化を行った．その後 24 時間，タンパク質を分泌させ，抗体による抗原捕捉を行った．細胞除去後に蛍光標識二次抗体を添加し，サンドイッチ免疫測定を行い，得られる蛍光シグナルを蛍光顕微鏡で解析した．
【結果と考察】デバイス上に導入する細胞数を 4×10^3 細胞以下にすることで 94 % 以上の効率で細胞集団を単一細胞レベルでアレイ化できることを確認した．次いで，アレイ化された単一がん細胞からの分泌タンパク質の蛍光免疫測定を実施したところ，421±44 個のモノリスシリカ充填微細孔上において蛍光シグナルが観測された．このことから，標的としたタンパク質を分泌する細胞は，アレイ化した細胞集団の約 1 割であることが明らかとなり，本デバイスが単一のがん細胞から分泌されるタンパク質の検出に有効であることが示された．

Immunoassay for secretory proteins from single-cancer cells using high-density cell-arraying device

○Yoshiaki Maeda[1], Kento Ota[1], Keiichi Hatakeyama[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Med. Genet. Div., Shizuoka Cancer Center Res. Inst.)

Key words single-cell analysis, cecretory proteins, cancer cells, cell-arraying device

3P-J228 Microcavity array 方式に基づく血中循環腫瘍細胞の迅速な遺伝子発現解析

○根岸 諒[1], 小泉 史明[2], 澤田 武志[2], 下山 達[2], 松永 是[1], 田中 剛[1], 吉野 知子[1]
([1]農工大院・工, [2]がん・感染症センター都立駒込病院)
y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

【背景と目的】がん患者血液中に存在する血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells: CTC) の単一細胞レベルでの遺伝子発現解析は，がん転移機構の解明や，新たな治療標的の発見への利用が期待されている．しかし，従来法では単一 CTC の分離に 2～4 時間を要し，正確な遺伝子発現解析を行うことは困難であった．一方，当研究室で開発している "Microcavity array (MCA)" は迅速な CTC の濃縮が可能であり，光硬化性ハイドロゲルを用いた簡易・迅速な細胞分離を実現している．そこで，本研究では MCA 方式に基づく簡易・迅速な細胞分離技術を利用し，単一 CTC レベルでの遺伝子発現解析への応用を試みた．
【方法】孔径 8 μm の MCA を用いてがん患者血液又はがん細胞懸濁液 1 ml をフィルトレーションした．MCA 上の細胞に対し，RNA の安定化処理，CellTracker Green 及び抗 CD45 抗体による染色を行った．光硬化性ハイドロゲルである poly(ethylene glycol) diacrylate を添加し，カバーガラスを積層して顕微鏡観察を行った．CellTracker+/CD45-細胞を CTC として光照射 (λ= 365 nm, 30 sec)を行い，単一細胞をハイドロゲルで包埋した．このハイドロゲル包埋単一細胞を分離し，全トランスクリプトーム増幅及び Digital PCR による遺伝子発現解析に用いた．
【結果と考察】全トランスクリプトーム増幅の結果，ハイドロゲル包埋細胞から安定的な RNA 増幅が可能であることを確認した．また，ハウスキーピング遺伝子の発現量は，既存法で分離した単一細胞と同等であり，本手法で分離した単一細胞の遺伝子発現解析における有効性が示された．また，血液からの CTC 濃縮及び RNA 安定化までに要する時間は約 40 分であり，既存の CTC 解析技術と比較して迅速化を達成した．さらに，実際にがん患者血液からの CTC の分離を行い，遺伝子発現解析での利用性を評価した．

Rapid isolation and gene expression analysis of single-circulating tumor cells using a microcavity array

○Ryo Negishi[1], Fumiaki Koizumi[2], Takeshi Sawada[2], Tatsu Shimoyama[2], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Tokyo Metropolitan Cancer Center Infectious Disease Center Komagome Hosp.)

Key words single-cell analysis, cell sorter, gene expression, Circulating tumor cell

3P-J229 顕微ラマン分光法と多変量スペクトル分解法を組み合わせたペニシリンの *in situ* 検出

○吉田 雅駿[1], 宮岡 理美[1], 安藤 正浩[2], 中島 琢自[3], 野中 健一[3], 高橋 洋子[3], 濵口 宏夫[4], 竹山 春子[1,2,5]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]早大・ナノライフ創新研, [3]北里大, [4]台湾国立交通大, [5]産総研・早大CBBD-OIL)
haruko-takeyama@waseda.jp

微生物の二次代謝産物である抗生物質は現代医療にとって不可欠な存在である．一般的な抗生物質の探索方法では多くの時間と費用を要するため，二次代謝産物を生産する微生物を迅速に直接検出可能な新たなスクリーニング技術が求められている．そこで，我々は顕微ラマン分光法を抗生物質の検出に応用した．先行研究として，当研究室では顕微ラマン分光計を用いて，*Streptomyces nodosus* における抗生物質 Amphotericin B の *in situ* 検出に成功している[1]．しかし，主要なラマンバンドが生体成分由来のラマンバンド 1004 cm^{-1} と重なる penicillin では従来の単一ラマンバンドに着目した解析手法では検出が難しい．本研究では，多変量スペクトル分解法を顕微ラマン分光法と組み合わせることで，penicillin の *in situ* 検出を試みた．
複数種類の *Penicillium chrysogenum* 株に抗生物質産生を誘導する液体培地と寒天培地にて培養した．培養後の菌体をそれぞれエタノールで抽出し，LC-UV と抗菌活性検定試験により二次代謝産物の同定と抗菌活性有無の確認を行った．さらにレーザー波長 532 nm の顕微ラマン分光計を用いて，培養した菌体のマッピング測定を行った．測定して得られたラマンスペクトルデータを多変量スペクトル分解法により解析した．
LC-UV と抗菌活性検定試験により penicillin の産生が確認された．また，多変量スペクトル分解法により複雑な生体由来のマッピングデータから penicillin 類に由来するスペクトルを抽出し，penicillin の生体内分布を可視化することに成功した．本研究の結果から，多変量スペクトル分解法を用いることにより，従来は検出困難であった化合物に対して顕微ラマン分光法による *in situ* 検出が可能となり，本手法を様々な化合物のスクリーニングに応用可能であることが示唆された．
[1]R.Miyaoka, H. Takeyama et al., Marine drug (2014)

***In situ* detection of penicillin using confocal Raman microspectroscopy combined with multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS)**

○Masatoshi Yoshida[1], Rimi Miyaoka[1], Masahiro Ando[2], Takuji Nakashima[3], Kenichi Nonaka[3], Yoko Takahashi[3], Hiro-o Hamaguchi[4], Haruko Takeyama[1,2,5]
([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Org. for Nano Life Innov., Waseda Univ., [3]Kitasato Inst. for Life Sci., Kitasato Univ., [4]National Tsing Hua Univ., [5]CBBD-OIL, AIST)

Key words Raman microspectroscopy, MCR-ALS, Penicillin

3P-J230 気生微細藻類から単離された抗菌活性を有する新規クロロフィルの構造

○三田 一至[1], 福田 裕介[1], 油井 信弘[1], 伊世井 湧太[2], 真弓 智仁[2], 小林 正美[2], 阿部 克也[1]
([1]工学院大・先進工・生化, [2]筑波大・物質工学域)
bt10335@ns.kogakuin.ac.jp

【目的】直射日光による乾燥など光合成生物にとって過酷な環境下でも生育する気生微細藻類には，油滴を形成することができる種が多く存在し，それらは様々な生理活性物質（抗菌，摂食阻害など）を産生する苔類と類似しているところがある．本報告では，気生微細藻類のコロニーから単離された抗菌活性を有する新規クロロフィルの構造について検討した結果を述べる．

【方法】気生微細藻類のコロニーは，奥多摩地区の幹線道路沿いの壁面から採集した．緑化処理したコロニーからクロロホルム/メタノールを用いて粗抽出物を得た．粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー，TLC，HPLC を用いて分離した．単離した物質の構造は，NMR，LC-MS 測定等により推定した．また，抗菌活性評価は，*Kocuria rhizophila*（*K. rizophila*，NBRC 12708）を試験菌として用い，ペーパーディスク法により行った．なお，抗菌活性は，ペーパーディスクの周りに形成された阻止円の大きさにより評価した．

【結果と考察】気生微細藻類のコロニーから得た粗抽出物は抗菌活性を示さなかったため，シリカゲルカラムクロマトグラフィーで 3 画分（画分 A～C）に分けた．その結果，画分 B と C に抗菌活性を示すことが分かった．したがって，本研究では画分 B と C に着目した．画分 B と C を詳細に分離したところ，*K. rhizophila* に対して強い抗菌活性を示す緑色と青緑色の物質を単離することができた．可視吸収スペクトルおよび質量分析の結果，600 および 670 の分子量をもつ新規クロロフィルであることが分かった．また，フェオフィチン化処理したところ，クロロフィル a とは異なる脱金属反応を示したことから，別の金属イオンが配位している可能性が示唆された．

Structures of new chlorophylls with antibacterial activities in aerial microalgae

○Kazushi Mita[1], Yusuke Fukuda[1], Nobuhiro Aburai[1], Yuta Isei[2], Tomohito Mayumi[2], Masami Kobayashi[2], Katsuya Abe[1]
([1]Dept. Chem. Life Sci., Sch. Adv. Eng., Kogakuin Univ., [2]Inst. Mat. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words aerial microalgae, chlorophyll, antibacterial activity, demetallation

3P-J231 BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質

○新倉 春香[1], 丸山 千登勢[1], 小笠原 泰志[2], 大利 徹[2], 濱野 吉十[1]
([1]福井県大・生物資源, [2]北大院・工)
hamano@fpu.ac.jp

【目的】 抗生物質 BD-12 は streptothricin（ST）類抗生物質の 1 つであり，放線菌 *Streptomyces luteocolor* NBRC 13826 によって生産される．その化学構造の特徴は，*N*-formimidoyl-glycine 側鎖であり，生合成中間体である glycylthricin および glycinothricin を経由して生合成されることが考えられる．BD-12 生合成遺伝子クラスター中に見出した Orf 1 は，*N*-formimidoyl 基転移酵素に相同性を示したことから，これら生合成中間体を基質に *N*-formimidoyl 基を導入すると考えられた．そこで，本研究では，本酵素遺伝子の破壊による生合成中間体の同定および本酵素の酵素学的諸性質の解明を行った．
【方法と結果】 *orf 1* 遺伝子を破壊した BD-12 生合成遺伝子クラスターを異種放線菌に導入したところ，その導入株が生合成中間体 glycinothricin を生産することを LC/MS および NMR 解析によって確認した．そこで組換え Orf 1（rOrf 1）を構築し，本化合物を基質とした酵素反応を行った．*N*-formimidoyl 基転移酵素は，フラビン酵素であることが知られているが，大腸菌で発現した rOrf 1 に FAD との結合は観察されず，酵素活性も検出することはできなかった．そこで，rOrf 1 を異種放線菌で発現させたところ，その精製酵素はフラビン酵素に特徴的な UV 吸収を示したことから，活性型酵素として発現していることが示唆された．そこで，glycinothricin を基質とした酵素反応を行い，その反応液を HPLC/ESI-MS で分析したところ，BD-12 の分子量 486 に一致する化合物の生成を観察し，本酵素の *N*-formimidoyl 化活性を検出することができた．さらに，本酵素の基質特異性を調べたところ，glycinothricin 以外にも β-lysine 側鎖を有する ST が基質となることが判明したことから，これら基質を用いた反応速度論的解析の結果についても報告する．

Enzymatic properties of *N*-formimidoyl synthase in the BD-12 biosynthesis

○Haruka Niikura[1], Chitose Maruyama[1], Yasushi Ogasawara[2], Tohru Dairi[2], Yoshimitsu Hamano[1]
([1]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words *N*-formimidoyl synthase, flavoprotein, FAD

3P-J232 streptothricin 類縁化合物における *O*-acylpeptide 構造生合成遺伝子群の同定 および機能解析

○坂上 莉奈[1], 丸山 千登勢[1], 橋本 絢子[2], 新家 一男[3], 濱野 吉十[1]
([1]福井県大・生物資源, [2]JBIC, [3]産総研)
hamano@fpu.ac.jp

【目的】抗生物質 streptothricin（ST）の生合成遺伝子ホモログが放線菌 *Streptomyces* sp. SF-2111 に存在する．本菌株は，ST 類縁化合物である SF-2111 を生産することから，これら化合物の生合成遺伝子クラスター（*sbb* 遺伝子クラスター）であると考えられた．さらに，別の *Streptomyces* 属放線菌から *sbb* 遺伝子クラスターに高い相同性を示す *sbc* 遺伝子クラスターを見出した．SF-2111 は，L-セリン，メチルマロン酸，L-アラニンから成る特徴的な *O*-acylpeptide 構造を有しており，その生合成機構は大変興味深い．そこで本研究では，*sbc* 遺伝子クラスターを用い，*O*-acylpeptide 生合成遺伝子の同定および機能解析を行った．【方法と結果】*Streptomyces prunicolor* NRRL B-12281 より，*sbc* 遺伝子クラスター（約 80 kbp）を含む BAC クローンを取得し，異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入した．形質転換体の培養液を LCMS にて分析したところ，SF-2111 を検出した．したがって，*sbc* 遺伝子クラスターには *O*-acylpeptide 生合成遺伝子を含め，SF-2111 の生合成に必要な全ての遺伝子セットが含まれていることが判明した．*sbc* 遺伝子クラスターは，機能未知の非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子（NRPS 遺伝子）を複数有しており，これらが *O*-acylpeptide 構造の生合成に関与していると推測された．そこで，単独型 A domain である Orf1197 の組換え酵素を用いその基質特異性を調べたところ，L-セリンに高い酵素活性を示した．さらに，T domain と 2 つの C domain（C_1TC_2）から成る Orf1198 の組換え酵素を用いて酵素反応を行ったところ，Orf1197 によって活性化された L-セリンが，Orf1198 の T domain に補酵素 4′ホスホパンテテイン基を介してローディングされることを見出した．本発表ではこれら機能解析の結果をもとに推定される *O*-acylpeptide 構造の生合成経路について紹介する．

Biosynthesis of a streptothricin analogue possessing *O*-acylpeptide side chain

○Rina Sakagami[1], Chitose Maruyama[1], Junko Hashimoto[2], Kazuo Shinya[3], Yoshimitsu Hamano[1]
([1]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

Key words peptide, non-ribosomal peptide synthetase, biosynthesis

3P-J233 *Jatropha curcas* の産生するホルボールエステル類の生理活性評価

○柳内 知哉[1], 小田垣 瑞穂[1], 高田 果歩[1], 松川 哲也[1], 西海 史子[2], 名倉 由起子[2], 柳原 格[2], 梶山 慎一郎[1]
([1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]大阪母子医療センター・研究所)
kajiyama@waka.kindai.ac.jp

【目的】中南米原産の落葉低木であるジャトロファ（ナンヨウアブラギリ *Jatropha curcas*）は，その種子中にバイオディーゼルの生産に適した流動性の高い中性脂質を５０％以上含み，病害虫に強く，半乾燥地でも栽培可能であることから，バイオ燃料としてすでに東南アジア・アフリカなどで，試験栽培と生産性や経済性の実証研究が開始されている．しかし，本植物には油脂以外に発がんプロモーション活性を有するホルボールエステル類（JFPEs）を含み，安全な普及にはその毒性の詳細な検討が必要である． 我々はこれまで，実際にジャトロファ栽培者やバイオディーゼル生産者が触れる機会の多い粗油や搾油滓，および，種子，根，茎，葉などの様々な器官に存在する JFPEs の機器分析を用いた定性・定量分析行ってきた． 今回 JFPEs の生理活性について，発がんプロモーション活性物質の標準として多用されるハズ油由来のホルボールエステルである PMA（phorbol 12-myristate 13-acetate）と比較検討したので報告する．
【方法・結果】ジャトロファ種子から，ヘキサン抽出により中性脂質を除去したのちアセトンにて JFPEs 含有画分を得，各種クロマトグラフィーによって精製を行った．本試料と，PMA，さらにこれらの混合物について，マウス皮膚 2 段階発がん試験，Raji 細胞 EBV-EA 転写誘導試験，細胞増殖活性試験，および細胞形態変化誘導能試験に供し，活性の検討を行った．その結果 JFPEs は，発がん誘導，細胞増殖活性では，PMA と比較して弱く（約 1/100 程度），かつ，PMA との混合によって PMA の活性を抑制したことにより，拮抗的に働くことが示された．一方，細胞形態変化の誘導に関しては PMA と同程度の活性が見られ，JFPEs の活性の特徴が示された．

Physiological activities of phorbol esters from *Jatropha curcas*

○Tomoya Yanagiuchi[1], Mizuho Odagaki[1], Kaho Takada[1], Tetsuya Matsukawa[1], Fumiko Nishiumi[2], Yukiko Nakura[2], Itaru Yanagihara[2], Shin'ichiro Kajiyama[1]
([1]Grad.Sch. BOST., Kindai Univ., [2]Res. Inst, Osaka Women's and Children's Hospital)

Key words *Jatropha curcas*, tumor promoter, phorbol ester

3P-J234 種々のストレス状況下におけるカンキツ類の二次代謝物質のプロファイリング

○伊佐木 芳[1], 松川 哲也[1,2], 梶山 慎一郎[1]
([1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]近畿大・附属農場)
kajiyama@waka.kindai.ac.jp

[目的] カンキツ類は古くから世界的に栽培されている商業的価値の高い果樹で，果実の保存環境や，果実に含まれる代謝産物に関する研究が数多く行われてきた．一方で，果実以外の葉や枝に関する研究は少なく，特にこれらのストレス応答に関する研究はあまり例がない．我々はこれまでに，数種のカンキツ類の葉において，ストレス応答時に香気成分や一次代謝成分が変動することを見出すとともに，ハッサクの葉からは新規傷害誘導性物質を単離・同定してきた．本研究ではストレス応答反応時において，系統間で共通する変動や系統特異的に変動する物質を見いだすことを目的とした．今回これまで研究対象としてきたハッサクと，カンキツ 3 祖先種の一種であり，ハッサクの祖先種と考えられているブンタンの葉を対象として，LC/MS/MS を用いた不揮発性二次代謝物質の網羅的解析を行い，これら 2 種間のストレス応答性の相関を検討した．
[方法および結果] 実験材料は，近畿大学附属農場にて栽培されているワコウハッサクとヒラドブンタンの成熟葉を用いた．採取直後の葉に 6 mm 間隔で刺傷を与え，これを蒸留水に浮かべて 25℃，常光下で一定時間培養した試料を傷害処理葉とし，採取直後に 0.2 mM の SA および JA 溶液に葉柄部を浸した状態で培養した試料をストレス関連ホルモン処理葉とした．各処理葉は液体窒素中で磨砕した後，メタノールを加えて懸濁した．懸濁液を遠心分離し，上清を回収して粗抽出液とした．抽出液を Triple TOF (ABSCIEX) に供し，Information Dependent Acquisition 法により検出した結果，各処理葉より 300 個以上のピークが検出された．得られたピークデータを多変量解析に供し，数種のストレス応答性ピークを見出した．現在，各処理に応答していると考えられるピークの解析と 2 種間の比較を行っており，その結果も併せて報告する．

Metabolic profiling of secondary metabolites in *Citrus* leaves under various stress conditions

○Kaoru Isaki[1], Tetsuya Matsukawa[1,2], Shin'ichiro Kajiyama[1]
([1]Div. Biotechnol. Sci., Grad. Sch. BOST, Kindai Univ., [2]Experimental Farm, Kindai Univ.)

Key words *Citrus*, stress related compounds, metabolomics analysis

3P-J235 バイオポリエステル生合成における補酵素供給強化の影響評価

○宮原 佑宜, 太田 美乃, 柘植 丈治
（東工大院・総理工）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】 ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は，ある種の微生物が合成するバイオプラスチックである．PHA は糖や植物油といったバイオマス資源から生合成可能であり，さらに生分解性や生体適合性を有するため，近年，環境・医療分野などで応用が期待されている．代表的な PHA であるポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸]（P(3HB)）の生合成では，モノマー合成に補酵素 NADPH が必要であり，細胞内へ供給される NADPH が律速段階である可能性が指摘されている．もし，NADPH の供給で P(3HB)生産が制限されているのであれば，NADPH を細胞内へ十分に供給することで P(3HB)生産性の向上が期待できる．本研究では，亜リン酸デヒドロゲナーゼ二重変異体（$PtxD_{EAAR}$）を利用した補酵素供給系を構築し，P(3HB)生産へ与える影響を評価した．
【方法】 過剰量の NADPH を細胞内へ供給するために P(3HB)合成大腸菌に *Pseudomonas stutzeri* 由来の亜リン酸デヒドロゲナーゼ二重変異体（$ptxD_{EAAR}$）遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製した．続いて，作製した大腸菌を用いて P(3HB)生合成を行い，ポリマー生産性を評価した．さらに，*Ralstonia eutropha* H16 由来の P(3HB)合成酵素群（PhaA，PhaB，PhaC）および亜リン酸デヒドロゲナーゼ（$PtxD_{EAAR}$）を精製し，*in vitro* 系を用いた評価を行った．
【結果・考察】 酵素活性測定により，大腸菌における $PtxD_{EAAR}$ 異種発現を確認し，培養上清中の亜リン酸・リン酸濃度を測定することで補酵素供給系が機能していることを確認した．グリセロールを炭素源として用いた場合，NAD(P)H 過剰供給により P(3HB)生産はそのままで酢酸や乳酸の生産が強化されたことから，これらの代謝産物生産を抑制することで P(3HB)生産のさらなる向上が期待できる．

Effect of enhanced NADPH supply on biopolyester biosyhnthesis.

○Yuki Miyahara, Mino Ohta, Takeharu Tsuge
(Interdiscip. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech)

Key words PHA, Phosphite dehydrogenase, NAD(P)H

3P-J236 Direct secretory production of D-lactate oligomers by engineered *Escherichia coli*: a shortcut in the process of polylactide production

○Camila Utsunomia[1], Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Chiaki Hori[1,3], Seiichi Taguchi[2,3]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]CREST, JST)
st206172@nodai.ac.jp

Polylactides (PLAs) are attractive polyesters entirely produced from renewable biomass. In the industry, PLAs are conventionally produced via ring-opening polymerization of lactide, and lactate (LA) oligomers are needed for the generation of lactide. The preparation of LA oligomers, which includes the purification of fermented LA and the polycondensation, is an energy-consuming process which depreciates the sustainability of the material. To address this issue, here, we report the secretion of enantiomerically pure D-lactate-based oligomers (D-LAOs) by recombinant *Escherichia coli*. Moreover, the secretion of D-LAOs was further enhanced by supplementing the *E. coli* medium with effective chain transfer (CT) agents, which increased the frequency of the chain termination reaction. Among the CT agents tested, diethylene glycol (DEG) was the most effective in enhancing the D-LAOs production and secretion efficiency. The highest yield of D-LAOs production of 8.3 ± 1.5 g L^{-1} from 20 g L^{-1} glucose corresponded to 57% of the theoretical maximum. Moreover, NMR analyses revealed that the D-LAOs were almost fully covalently bound to DEG at the carboxyl terminal. The secreted D-LAOs were successfully converted into lactide using zinc oxide as catalyst, and the DEG moiety at the carboxyl terminal of D-LAOs did not inhibit the lactide formation. We propose here a novel shortcut route in the process of PLA production that has the potential to save time, energy and costs in the synthesis of both PDLA and PLLA/PDLA stereocomplex.

Direct secretory production of D-lactate oligomers by engineered *Escherichia coli*: a shortcut in the process of polylactide production

○Camila Utsunomia[1], Ken'ichiro Matsumoto[1,3], Chiaki Hori[1,3], Seiichi Taguchi[2,3]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]CREST, JST)

Key words LA oligomer, Secretion, Biobased polyester, Polylactide

9月14日（木）

※生物工学学生優秀賞（飛翔賞）受賞者講演 4P-E084 は特別口頭発表 B5（E 会場，9:00 ～ 11:00），4P-F202，4P-F213 は特別口頭発表 B6（F 会場，9:00 ～ 11:00）にてそれぞれ行います．
講演要旨については各講演番号の一般講演要旨をご覧ください．

シンポジウム（午前の部 9:00 ～ 11:00）

A, B 会場（57 号館 2 階）/ C, D 会場（56 号館 1 階）

醗酵生産技術の温故知新～その歩みと新展開	4S-Aa01 ～ 05	p. 263
地球の未来資源に貢献する生物工学【本部企画】	4S-Ba01 ～ 04	p. 265
動物・臨床現場から学ぶ成育医療研究～検査から診断・治療への応用～	4S-Ca01 ～ 05	p. 267
若手研究者が切り拓く，1 細胞解析技術の最先端	4S-Da01 ～ 05	p. 270

一般講演　特別口頭発表 A･B（9:00 ～ 11:00）E, F, G, H, I, J 会場（52 号館 1 ～ 3 階）
ポスター発表（ポスター掲示時間 9:00 ～ 15:00）　ポスター会場（63 号館 2 階）

分類，系統，遺伝学	4P-G001 ～ G007	p. 272
酵素学，酵素工学	4P-G008 ～ N033	p. 274
抗体工学	4P-G034 ～ N049	p. 280
代謝工学	4P-G050 ～ G069	p. 284
オミクス解析	4P-H070 ～ E084	p. 289
醸造学，醸造工学	4P-N085 ～ H098	p. 293
環境浄化，修復，保全技術	4P-N099 ～ H115	p. 297
環境工学，廃水処理技術	4P-H116 ～ I128	p. 301
バイオマス，資源，エネルギー工学	4P-I129 ～ I154	p. 304

植物細胞工学，組織培養，育種工学	4P-N155 〜 I163	p. 311
セル＆ティッシュエンジニアリング	4P-I164 〜 N182	p. 313
生体情報工学，バイオインフォマティクス	4P-F183 〜 J192	p. 318
センサー，計測工学	4P-J193 〜 J195	p. 320
生合成，天然物化学	4P-N196 〜 N206	p. 321
有機化学，高分子化学	4P-N207 〜 J209	p. 324
核酸工学	4P-J210 〜 J212	p. 324
ペプチド工学	4P-F213 〜 J219	p. 325
脂質工学	4P-N220 〜 J221	p. 327
糖鎖工学	4P-N222 〜 J229	p. 327

4S-Aa01 蛍光 DO・蛍光 pH センサーとシングルユースリアクター

○石川 陽一[1,2]
（[1]エイブル, [2]バイオット）
ishikawa@biott.co.jp

蛍光式 DO センサー
著者らは 1970 年代後半，繰り返し蒸気滅菌が可能な隔膜式 DO センサーを開発し，以来 DO 計測に基づく制御が可能になった．このセンサーは今でも主流として利用されている．しかし，近年，蛍光式 DO センサーの性能向上に伴い，蛍光式 DO センサーが急速に普及しはじめた．
原理
白金ポルフィリンを 550nm の光源で励起すると，580nm の蛍光を発する．その蛍光強度が酸素に阻害されるので，蛍光強度を測定すれば，DO が計測できる．しかし，蛍光強度は光源や受光器の劣化，蛍光物質の量，汚れや経年変化等で変化してしまうので，蛍光強度の代わりに蛍光の消光速度の時定数等を測定している．
隔膜式センサーと蛍光式センサーの比較
１．隔膜式は電極が酸素を消費するので撹拌が必須で，測定値は撹拌速度の影響を受けてしまうが，蛍光式センサーは酸素消費がないので撹拌の影響を受けない
２．蛍光式は隔膜や電解液が必要なく，蛍光物質は滅菌 50 回程度利用できる
３．蛍光式では寿命期間中，０点が殆ど変動しない．従って０点のキャリブレーションが不要
４．蛍光式でも蒸気滅菌により飽和出力は変化するが，一度校正すれば次回の滅菌まで殆ど変動しない
５．隔膜があると圧力変動の物理的な影響を受けるが，蛍光式では物理的な影響を受けない
６．蛍光物質と測定器を分離できる．蛍光物質を容器透明部の内壁に固定し，容器外から計測が可能．従って，シャーレ等でも測定可能
７. 蛍光物質はガンマ線滅菌にも耐性があるのでシングルユースへの対応が可能.

蛍光式ｐ H センサー
ガラス電極はｐ H 0～14 と驚異的に広いレンジの測定が可能で，その信頼性は高い．しかし，近年要求されるシングルユース化や培養槽の小型化へは適応しにくく，この用途での蛍光式 pH センサーへの期待が高い.
原理
蛍光物質 HPTS を 410nm 及び 460nm の光源で励起すると，共に 520nm に蛍光を発する．この 2 種類の蛍光強度の比が pH に依存する.
ガラス電極との比較
１．測定範囲が 6.5～8 程度と狭い
２．励起回数に依存するが，測定値がドリフトする（およそ pH0.1～0.2/7 日）
３．励起回数に依存するが，寿命が短い（およそ 14 日）
４．蛍光物質と測定器を分離できるのでシングルユースへの応用が可能
５．安定性等の性能向上を図っているが，DO に比べ完成度は低い

リアクターへの応用
DO，ｐ H とも蛍光物質は直径 3mm 程度で良いので，リアクター内壁に固定してリアクター外部から照射すればよく，各種シングルユースリアクターや小型リアクターに利用されている.

Fluorescent DO・pH sensor and single use reactor

○Yoichi Ishikawa[1,2]
([1]ABLE, [2]BIOTT)

Key words oxygen sensing, ph sensing, reactor, fluorescence

4S-Aa02 撹拌技術の温故知新

○仁志 和彦
（千葉工大・工・機械）
nishi.kazuhiko@p.chibakoudai.jp

発酵，醸造，微生物や動植物細胞培養等においては，様々な場面，フェイズで撹拌技術が登場する．本講演では，撹拌技術に関連する知見を今一度整理し（温故），発酵生産技術との関わりにおける課題，その解決に寄与するであろう新しい技術について議論したい（知新）.
まず，撹拌翼を用いた流体（液体）の撹拌については以下の内容を概説する.
１．撹拌の目的
２. 撹拌装置：撹拌槽，撹拌翼（小型翼，大型翼，大型特殊翼），邪魔板（バッフル）
３．撹拌槽内の流動：翼形状と流動状態，翼回転数および液粘度と流動状態，流動状態の定量化（吐出流量）
４．撹拌所要動力
５．気液撹拌（通気撹拌）
６．撹拌装置のスケールアップ
新しい撹拌技術の紹介としては，
１．低剪断撹拌を指向した非対称撹拌
２．高濃度通気撹拌技術
３．往復動撹拌を用いた生物細胞培養装置
４．撹拌装置の数値シミュレーション
について話題提供する.

Technology progress for liquid mixing; the past, today, and tomorrow

○Kazuhiko Nishi
(Dept. Mech. Eng., Chiba Inst. Technol.)

Key words mixing, aeration, CDF

4S-Aa03 FK506 発酵培地原料のリスク回避戦略

○竹下 敏一, 二瀬 彩子, 岡崎 宣恭, 渡辺 国晴, 清水 志保
（アステラス ファーマテック 株式会社）
toshikazu.takeshita@astellas.com

FK506（タクロリムス）は，1984 年当社探索研究所によって筑波山の土壌より分離された Streptomyces tsukubaensis No.9993 株の培養液から発見された免疫抑制活性を有するマクロライド化合物である．現在，臓器移植時の拒絶抑制薬およびアトピー性皮膚炎治療薬として世界的に市販されており，原薬を安定的に供給することが我々企業の使命である．
FK506 などの二次代謝産物の生産は，細胞外から提供された栄養源を取り入れて生育する一次代謝と，その後に誘導される二次代謝の複雑なメカニズムで制御されており，一定品質の医薬品を欠品することなく市場に提供する商用製造を難しくしている．
その原因のひとつは，天然物由来の培地原料を用いていることである．Chemically defined の培地原料と比較して，安価であることと，微生物の栄養要求特性を満たす充分な栄養成分を保持していることが，天然物原料を用いるメリットである．その一方で，天然物原料は，その出発原料となる作物等の生産環境の変化により原料の製造ロット間で品質が変動し，結果的に生産性の低下，品質の劣化を招くことを我々は経験している．また，一社購入によるビジネスリスクも考慮する必要がある．同一の培地原料で複数社のベンダー持つことが，培地欠品なく，継続的に生産を続けるためのリスク回避策となる．しかし，天然物由来であるため同じ培地原料名でも，ベンダーが異なると二次代謝発酵に異なる影響を与えることがある．FK506 では，窒素源のひとつである脱脂小麦胚芽について，現用の A 社製に加え，B 社製，C 社製の利用可能性を検討したが，C 社製では全く生産性が得られない結果となった．本発表ではその原因と解決策を紹介する．
また，FK506 は商用製造開始後約 20 年を経過しており，長期にわたる商用生産で蓄積した大量のデータは培地原料ロット間の品質変動を顕在化させると同時に，回顧的に分析することで改めて生産性向上の糸口となり得る知見が得られる．商用生産のトレンドデータを解析することで FK506 高生産発酵の特徴を抽出し，原料の品質変動により低下した生産性を改善した事例についても併せて紹介する．

Risk Mitigation Strategies for Raw Materials of FK506 Fermentation

○Toshikazu Takeshita, Ayako Futase, Noriyasu Okazaki, Kuniharu Watanabe, Shiho Shimizu
(Astellas Pharma Tech Co., Ltd)

Key words fermentation, raw material, FK506

4S-Aa04 ガスバリア性（DLC）PET ボトルの開発と実用化

○山崎 照之, 中谷 正樹, 加藤 克哉
（キリン パッケージング技術研）
t-yamasaki@kirin.co.jp

１．背景
飲料・食品分野では様々な樹脂容器が使用されているが，特に PET ボトルが，軽い，割れない，透明で中が見える，蓋を何回も開閉できるなど，消費者の利便性に合致し，主流な容器となっている．
近年，環境負荷低減，アセプティック充填技術の発展・普及等の諸要因を背景に PET ボトルの軽量化が進んでいる．しかし，ボトル壁が薄くなると気体が透過しやすくなるため [1]，内容物の酸化劣化や炭酸ガスの気抜けを抑制するガスバリア技術への関心が高まっている [2]．主要なガスバリア技術には，(1)薄膜コーティング技術，(2)多層成形技術，(3)酸素吸収剤等の分散技術がある [2]．薄膜コーティング技術は，(2)や(3)に比べて気体の種類によらず高いガスバリア性を発揮できることが特徴であり，リサイクル性にも優れている．

２．開発の経緯
1980 年前後，国内ビール業界ではいわゆる容器戦争が始まり，1990 年前後まで様々な形状・大きさの樹脂容器が次々と上市された．当時のビール用 PET 樽は，MXD6 ナイロンをブレンドしてガスバリア性を 2 倍程度まで向上させたもの等が見られたが，酸化劣化しやすいビールの性質を考慮すると，さらに高いガスバリア性が望まれた [3]．
このような時代を経て，次世代の樹脂容器は，高いガスバリア性に加えて経済性やリサイクル性を兼ね備えることが必要とされ，キリン社では，薄膜コーティング技術に着目・開発することとした．ビールのおいしさは，酸化劣化と炭酸ガスの気抜けの両方に対する配慮を必要とするばかりでなく，微妙な香気成分のバランスのうえに成り立っている．薄膜の不活性さや各種ガスに対するバリア性の高さはビールの品質保持に効果的であると期待された．また，DLC は酸性からアルカリ性まで各種水溶液に安定であり，300℃近い耐熱性を有しているため，容器の樹脂材料に適合すれば，リターナブル樹脂容器としての展開も期待された．

３．コーティング方法
キリン社開発技術はプラズマ化学気相堆積法に基づいており，DLC 膜を形成するために容量結合方式のプラズマ発生装置を用いる．この方式では，二つの電極間に高周波電力を印加することで，供給された気体はプラズマ状態となり，成膜活性のある電子，イオン，ラジカル等に分解される．プラズマ中のイオンは，発生する自己バイアス電位により，特に一方の電極上に配置された基板表面（容器内表面）に誘引・加速されて衝突する．イオンとラジカルが協奏的に作用し，基板表面上に均一かつ緻密な薄膜が形成される．

４．コーティング容器の性能
500 ml PET ボトルの酸素透過率は，未コートの場合，約 0.035 cc（標準状態）/本/日である．このボトルに DLC コーティングを施したところ，酸素透過率が 0.002 cc（標準状態）/本/日にまで低下した．未コートのボトルに対して，酸素バリア性が 17 倍以上に向上している．同様に，炭酸ガスバリア性は 10 倍以上，水蒸気バリア性は 7 倍以上に向上させることができた．また，DLC 膜により，ガスバリア性以外の品質保持性能も向上させることができる．例えば，PET ボトルからのアセトアルデヒド溶出の抑制や，PET ボトルへのリモネンをはじめとする各種有機化合物の収着抑制に効果があることが確認されている [4]．

５．採用事例
2004 年，キリンビバレッジ社の加温販売用「生茶」,「午後の紅茶」に採用されて以来，炭酸飲料，酒類，食用油，調味料などに採用され，上市されている．また，近年では家庭用サーバー専用のビール用 PET ボトルや，業務用サーバー専用のビール用 PET ボトルにも採用され，お客様への新たな価値提案に大いに貢献している．

６．参考文献
1) 仲川勤，"包装材料のバリアー性の科学"，日本包装学会，p.28 (2003)
2) "バリア PET ボトルの開発と今後の市場性"，東洋紡パッケージング・プラン・サービス (2005)
3) 鹿毛剛, "食包協 50 年の歩み", 一般社団法人日本食品包装協会, p.95-98 (2012)
4) 松田晃一，"PET ボトル製品における香味品質管理とその有用技術"，日本包装技術協会 (2007)

Development and practical use of high gas barrier (DLC) PET bottle

○Teruyuki Yamasaki, Masaki Nakaya, Katsuya Kato
(Res. Lab. for Packaging Technol., Kirin Co., Ltd.)

Key words beer, DLC, PET

4S-Aa05 発酵プロセス産業における，IoT テクノロジーの活用事例と今後の可能性

○天辰 健一, 上塘 広也, 杉本 勇
（カマルク特定技術研究所・CTO）
k.amatatsu@kamarqx.jp

工業製品のものづくりを中心した製造業界では，欧州の Industry4.0 に端を発したインターネットのテクノロジーを駆使して製造業の高度化を図る機運が高まりを見せ，米国の”industrial internet”へと波及し，今や製造現場へのインターネットテクノロジーの活用は常識となりつつある．
インターネットテクノロジーの活用とは，単に公のインターネットを活用するという意味と等価ではない．無限に広がるインターといった 1 つの世界を形成できるだけのテクノロジーを製造現場で活用するという意味である．これまで拠点毎にバラバラだったり，サンプリング数に差があったり，集約が緩慢だったりした生産活動及び生産設備や周辺情報を，自社の 1 つの世界に迅速に纏め上げる事にである．ひいては，その高度に集約された情報を基に，生産活動の改善や経営情報及び会計情報との紐付けを強化し，企業価値の向上を目論むものである．

本講演では，他の高度化された製造業や乙類焼酎製造現場での実例を交え，今後の発酵プロセス産業への適用の可能性を提言したい．

Application example and future possibility of IoT technology on fermentation process industry.

○Kenichi Amatasu, Hiroya Kamitomo, Isamu Sugimoto
(CTO, KAMARQ EXPLORATION K.K.)

Key words IoT, Industry4.0

4S-Ba01 サトウキビ産業の農工横断型技術革命による砂糖・エネルギー同時増産の実現

○小原 聡
（アサヒグループホールディングス）
satoshi.ohara@asahigroup-holdings.com

世界的な人口増加と新興国の台頭に伴い，食料増産と石油に頼らないバイオエネルギーの増産が求められている．これらの課題はいずれも農地に依存する．優良農地が減少する中で，課題の解決には，下流の工業技術（生物工学，化学工学分野）の改良だけでなく，持続的で高度な土地利用技術（上流の原料増産技術）の開発が必須である．我々は熱帯・亜熱帯地域で広範に栽培され，かつバイオマス生産力が高いサトウキビに着目し，農工横断的思考によって更にサトウキビの品種改良を進めると共に，砂糖（食料）とバイオエタノール・電力（エネルギー）の同時的増産を可能にするプロセス技術の開発を同時に進めてきた．
農業側では，（独）農研機構・九州沖縄農業研究センターと共同で，不良環境条件（干ばつ，低肥沃土壌等）に適応性が高く，安定的に多収性を発揮する高バイオマス量サトウキビ KY01-2044 を開発（品種登録）した．原料開発においては，砂糖・バイオエタノールの同時増産と製造エネルギー自給（＝石油を使わずにサトウキビの繊維分だけを燃料として砂糖・エタノールを製造すること）を同時に可能にする，サトウキビ原料の要件（単位面積あたりの糖生産量，繊維生産量）を工学的に設計し，サトウキビ野生種や近縁種との交配により育種した多収系統から，設計要件を満たす系統を選抜した．不良環境下でのサトウキビ増産によって，優良農地を他の食料作物の生産に転用できるため，砂糖増産のみならず他の食料増産にも寄与できることになる．原料として農地あたりの糖・繊維分を増加させることには成功したものの，高バイオマス量サトウキビには，砂糖製造を阻害する還元糖（ショ糖の結晶化を阻害する）や繊維分（ショ糖抽出を阻害する）を多く含む傾向があるため，従来の砂糖製造プロセスでは砂糖回収率が低下するという課題があった．これでは，原料としての糖生産量が増えても，従来の製造方法では砂糖生産量が減り，副産物として，糖蜜由来のバイオエタノールばかり増産してしまう（同時増産は達成できない）．
そこで工業側において，新しい原料に適した製造プロセスを開発した．ショ糖を資化せず，還元糖のみを資化する特殊な酵母（インベルターゼ欠損酵母）によって，ショ糖の結晶化（砂糖製造）の阻害物質である還元糖のみを選択的にエタノールに変換させ，その後に残るショ糖から砂糖を高効率に製造するという『砂糖・エタノール逆転生産プロセス』である．従来の砂糖・エタノールの生産順序を世界で初めて逆転させた本プロセスは，バイオエタノール生産によって還元糖を選択的に除去することで砂糖回収率を飛躍的に向上させることが最大の特徴である．また，増加したサトウキビ繊維分をボイラーで燃焼し，発電することによって，製造に必要なエネルギー（石油・電力）を賄えるだけでなく，余剰分を売電することも可能にした．逆転生産プロセスは，経済性，環境性に優れた製造プロセスであることに加え，長年，製糖業界の世界的課題であった還元糖の除去を可能とし，還元糖の多さのためにこれまで利用されてこなかった多収性原料や収穫期間外原料の利用（収穫期間の延長）を可能にした．また，砂糖：エタノールの生産比率を自由に調節でき，原油や砂糖の相場に合わせて生産比率を変えることも可能にした．
食料とバイオ燃料の原料競合が問題となっている今，逆転生産プロセスは「バイオエタノール生産による食料（砂糖）増産」というパラダイムシフトを起こした．これまで産業上利用されてこなかった多収性サトウキビ，インベルターゼ欠損酵母を利用するという各産業の常識を破る発想によって，農業（サトウキビ生産），工業（砂糖生産，エタノール生産，バガスからのバイオマス発電）における各産業での単独の技術開発だけでは解決できなかった課題について，農工横断的思考により解決し，食料競合の回避でなく，バイオエネルギー増産によって，本質的な食料増産をも同時に可能にした．本技術は既に多くの国で特許登録されており，世界の砂糖産業から注目を集めている．現在，本技術の社会実装化を目指して検討を進めている．

Simultaneous increase of sugar and bioenergy from sugarcane by integrating agriculture with engineering

○Satoshi Ohara
(Asahi Group Holdings, Ltd)

Key words sugarcane, raw sugar, ethanol, selective fermentation

4S-Ba02 藻類がもたらす資源の有価物化と産業創生

○鈴木 健吾
（ユーグレナ）
suzuki@euglena.jp

微細藻類は古くから食用に用いられてきた歴史があり，一例として 16 世紀のメキシコやアフリカではスピルリナが食されていたことが，大航海時代のヨーロッパの旅行記に記載されている．食用を目的とした微細藻類培養は第一次世界大戦前後に始まっており，ヨーロッパやアメリカなどで本格的に研究が行われてきた．第二次世界大戦後，将来起こりうる食糧問題への対策として微生物タンパク質の食飼料利用の研究が世界的に盛んとなった．日本国内においては，東京大学の微生物研究所のグループは同じ発想で光合成真核生物であるクロレラ，原核生物であるラン藻類に注目し，低栄養下で培養可能であり，必須アミノ酸，ビタミン類を豊富に含むことから有効な食糧資源となる可能性に言及した．この一連の研究がわが国における微生物の食糧資源化への始まりとなった．それ以降，食糧危機などに備えたタンパク質の生産に主眼をおいた食糧自給率の向上を目的とした研究が進められ，微細藻類培養の基礎が構築されてきた．1960 年代にはクロレラの商業生産が開始され，微細藻類を食品利用することが一般的となっていった．微細藻類の中でも和名ミドリムシとして知られるユーグレナは，日本を中心に食品利用の実用化に向けた研究がなされ，2005 年に食品用大量培養が実現した後は，日本国内において食品素材として認知が広まり始めている．

生産された新たなバイオマスの利用方法として，バイオマスの 5F という考え方があり，微細藻類においてもこの考え方が適用可能である．バイオマスの 5F は，食品（Food），繊維（Fiber），飼料（Feed），肥料（Fertilizer），燃料（Fuel）という 5 種類の用途を指し，一般的にこの順で付加価値が高く，一方で付加価値の低いものほど社会におけるバイオマス消費量が大きい．これらの 5F を，生産量に従い付加価値の高い用途からの利用を試みることで，環境負荷の軽減と高い事業性を同時に実現することが可能である．生産された微細藻類の用途は，現在は食品等の高付加価値のものが主であるが，多くの微細藻類は細胞内に油脂を蓄積することができるため，国内外で微細藻類をカーボンフリーの燃料として活用することの可能性が注目されている．ユーグレナを例にとって 5F に則った展開例を紹介すると，貯蔵多糖であるパラミロンや細胞外に分泌するコハク酸を利用したバイオプラスチックを繊維として利用することが検討され，大量に生産したユーグレナ藻体や特定成分を抽出した残渣を飼料や肥料として利用することの検討が進んでいる．また，ユーグレナは，嫌気状態におかれるとパラミロンをワックスエステルに変換するため，これを燃料の原料として活用する方法が検討されている．

微細藻類を用いて油脂を生産して，実際に燃料等を精製，供給していく事業を成立させるためには，生産した藻体の安定供給を可能とすることに加えて，藻体の回収，油脂抽出，精製方法など，様々な解決すべき共通課題も多い．これらの課題の一部は，適切か微細藻類株の選定と品種改良により克服可能であり，ユーグレナを油脂原料とするための開発においても，育種研究への注力もされており，重イオンビームを変異原として利用した種々の品種改良が行われている．また，藻類から燃料を生産するシステムを実現するにあたっては，油脂を抽出した後の脱脂藻体等の副産物を有効利用することも全体としての経済性を考慮する上で重要である．ユーグレナの場合においては，前述のように脱脂藻体を飼料として活用することが検討されており，ユーグレナ由来の油脂からは，化粧品分野で活用されるような高付加価値のオイルを燃料と同一ラインで生産することも検討されている．最終的には，燃料を供給していく体制を整える上で，藻体に含まれる成分を余すところなく効率的に社会で活用して，経済合理性を満たすことが事業としての成功に必要と考えている．

本講演では，株式会社ユーグレナにおける事業展開例を交えて微細藻類の産業利用可能性を議論し，技術開発の一部と将来の展望について，総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）の一環として実施したものを含む形で紹介する．

Production of value-added algae biomass and its industrialization

○Kengo Suzuki
(Euglena Co., Ltd.)

Key words microalgae, *euglena*, biomass, algal extract

4S-Ba03 プラチナ社会における植物資源の役割

○菊池 康紀
（東大・総括プロ・プラチナ講座）
kikuchi@platinum.u-tokyo.ac.jp

環境負荷の制御，エネルギーシステムの設計，少子高齢化への対策など，社会課題は山積みであり，「課題先進国」とされる日本において，課題解決指向の研究成果の導入促進が必要である．「プラチナ社会」はそうした中で，２１世紀のビジョンとして提唱されたものであり，有限の地球の中で文明が進展した結果，先進国で衣食住・移動・情報を一般市民が手にした状態，言い換えれば，モノがいきわたった状態において，人々が何を欲するのかを議論するために提案されたものである．そのような充実した豊かさの中では，枯渇性資源から脱却し，資源を循環させ，再生可能資源を有効に利用するシステムの構築は，前提ともいえる条件といえる．特に化石資源は世界中でエネルギーと物質を生産するための重要な資源であるとともに，太陽光や風力，地熱，植物資源などの再生可能資源をより良い形でミックスさせなければ完全には代替しきれないものでもある．植物資源はその他の再生可能資源と異なり，物質として得られるものであるため，その活用方法は十分な検討がなされるべきである．本講演では，プラチナ社会における植物資源の役割を議論し，そこに必要となる技術や仕組み，システムの要件を特定していく．

植物資源は主に一次産業から得られるものであり，これを変換することで食料/食糧，素材，飼料などの付加価値の高い製品を古くから得てきた．さらに，植物資源からは化成品やエネルギーも得ることができるが，食料など代替不能で付加価値が高いものに比べれば，その優先度は高くない．そのため，植物資源から高付加価値なものを取り除いた，バイオマス，から化成品やエネルギーを得る研究が行われてきている．ここで，実際に入手できるバイオマスとしては，製材所残渣や一部の廃棄物など，既に集中して存在しているものもあるが，間伐材や圃場残渣など，有効利用のためには収集をしなければならないものもある．これらを有効利用するかどうかは，その地域において，資源が持つ価値や役割を分析する必要がある．

例として，種子島におけるサトウキビ製糖工場を中心とした地域エネルギーシステムの設計例を示す．製糖工場では絞りかすであるバガスを用いた熱電併給を行っているが，製糖に必要な量以上にエネルギーが発生している場合があり，再生可能資源由来の未利用エネルギーが存在する．一方，サトウキビの輪作体系にあるイモを加工する焼酎・でんぷん工場では化石燃料の高騰による影響が出ている．製糖工場の排熱はこれらの工程で必要とする熱需要の一部を満たすことができる．蓄熱輸送などの技術を用いることで，熱の時空間的需給ギャップを乗り越えた地域エネルギーマネジメントが可能となりうる．ここでは，種子島におけるサトウキビ，木材，加工用いも，公共電力といったライフサイクルが関連しており，多業種の合意による推進が必須である．原料糖以外の製品の複合生産によるサトウキビおよび製糖業の高付加価値化は，生産者および糖業において重要な課題であり，受容性が高いことが分かっている．サトウキビを基幹産業とする地域においては，伝統・文化としてサトウキビが定着しているためといえる．これはサトウキビに関係する組織だけでなく，地域の高校生や住民にとっても同様であった．伝統文化とは異なる側面として，林業の健全化も重要な課題である．これは国内であれば多かれ少なかれ同様であり，サトウキビバガスと複合的に木質バイオマスを利用することは，地域の社会受容性が高いということが分かっている．

植物資源からの高付加価値品とバイオマスの供給は，プラチナ社会において必須な物質の流れといえるが，こうした社会への実装可能性までを考慮した活動が不可欠となっている．特に，農林工業を横断した形での植物資源の利活用は，国土の大半を占める一次産業地域を活性化させるだけでなく，植物資源から産み出しうる様々な価値の創出につながりうるものであり，適切な技術開発とシステム設計が不可欠である．このとき，研究開発には段階があり，実験室等から実際の現場において技術やシステムを試すフェーズがあることが知られている．この段階は実用化や実証化，社会実装といった形で表現されている．この中でも社会実装は，研究開発成果が想定していた地域・組織等で受け入れられているだけでなく，当初予定以外にも水平展開されている状態を含んでいる．このとき，制度的，経済的・社会慣習的及び社会心理的な障害により，社会への導入が困難かあるいは長期間を要するものが多いとされており，定着に向けては技術とシステムの成熟化だけでなく，導入者側の受容性を高める活動が必要といえる．

新しい技術やシステムの導入においては既存のインフラと融和しながら進むシナリオが不可欠といえる．技術や資金，制度も必須であるが，風土/文化にあったシステムの提案とそれを支える人材がなければ技術・システムの社会実装は進みえない．植物資源を中心に，農林業・工業・サービス業が連携するライフサイクルについて，環境影響や社会経済性を可視化していくことによって，社会課題解決に臨むことができる．

Role of plant-derived resources in Platinum Society

○Yasunori Kikuchi
(Platinum Lab. Org. Interdisciplinary Res. PJ, UTokyo)

Key words life cycle thinking, socio-economic analysis, process system simulation, regional energy system

4S-Ba04 二酸化炭素を資源化する生体触媒を基盤とした人工光合成技術

○天尾 豊
（阪市大・複合先端研）
amao@ocarina.osaka-cu.ac.jp

太陽光エネルギーから次世代型低炭素燃料を生成する人工光合成の達成には生体材料・光機能性材料等をハイブリッドさせた技術も選択肢の一つである．二酸化炭素を還元あるいはカルボキシル基として付加する反応を加速する生体触媒と光増感剤，電子伝達体からなる光レドックス反応とを連結させることにより，可視光照射により二酸化炭素を有機分子に変換することが可能となる．当研究室ではこれまでに可視光増感分子と電子伝達体 1,1’-ジメチル-4,4’-ビピリジン（メチルビオローゲン）及びギ酸(FDH)，アルデヒド(AldDH)，アルコール脱水素酵素(ADH)からなる反応系に可視光照射することで二酸化炭素をメタノールに分子変換できることを見出している．二酸化炭素をカルボキシル基として有機分子に導入可能な人工光合成系として，炭素数３のピルビン酸を炭素数４のリンゴ酸に変換する反応を触媒するリンゴ酸酵素（ME）と可視光増感分子－電子伝達体からなる NADP の光還元系とを連結したシステムも構築できている．本講演では，二酸化炭素をギ酸に還元する反応を触媒するギ酸脱水素酵素や二酸化炭素を有機分子に取り込む反応を触媒するリンゴ酸酵素の触媒活性とメチルビオローゲンに代表される人工補酵素との直接的な相互作用の解明及び，これら相互作用の解明に基づき二酸化炭素を資源化する光レドックス反応の効率化について紹介する．
二酸化炭素の光還元系では，可視光増感分子によるビピリジニウム塩の光還元と様々な脱水素酵素の触媒機能を連動させ，水素イオンを協奏させた多電子還元を達成し，二酸化炭素を還元しギ酸や低炭素燃料であるメタノールの生成につなげたものである．
二酸化炭素を原料として炭素―炭素結合生成を可能とする人工光合成系について，ビルビン酸に二酸化炭素をカルボキシ基として導入する反応を触媒する生体触媒 ME に着目し，可視光増感分子によるジフェニルビオローゲン誘導体の光還元と ME の触媒機能を連動させることにより，二酸化炭素をカルボキシ基として有機分子に導入，つまり炭素―炭素結合生成が可能となることを示した．これまでの研究では，NADP から NADPH の光還元系を組み込まなければならず，反応が多段階となり非常に複雑であるばかりでなく，NADP や FNR 等の生体分子は非常に高価であり，反応系の単純化が必要であったが，ジフェニルビオローゲン誘導体の光還元を利用することにより，反応系は単純化され，なおかつ簡便な炭素 - 炭素結合に基づく炭素数拡張可能な人工光合成系に展開できた．

Artificial photosynthesis with biocatalyst for CO_2 utilization

○Yutaka Amao
(Adv. Res. Ins. Nat. Sci. Tec., Osaka City Univ.)

Key words enzymatic conversion, CO_2 fixation, catalytic efficiency, artificial photosynthesis

4S-Ca01 生殖工学と生殖医学の融合～育種から不妊診断・治療への展開～

○宮戸 健二[1], 花井 慎弦[2], 康 宇鎭[1], 中村 彰宏[2], 河野 菜摘子[2]
（[1]国立成育医療研究センター, [2]明治大・農）
miyado-k@ncchd.go.jp

人口増加にともない，自然の成り行きに任せていた家畜の生産法では食料の確保ができなくなってしまった．生産物を安定して得るためには，家畜の子供（子畜）を継続的に増やし続けることが重要である．自然な状況下では，動物の雌が繁殖可能な状態になれば雄と交尾して妊娠する．自然界では，雌牛が生涯に残せる子畜の数は 10 頭程度である．しかし，この自然交配では，家畜の生産力を上げることは非常に難しい．また，ある品質の高い雄の子孫だけを残そうとすると，限られた雄に交配の負担がかかる．高い品質を持つ個体をうまく増やすには，動物の繁殖メカニズムを理解し，効率的に家畜を生産する技術の開発が必要である．これらの根源にあるのは，配偶子は有限な資源であるという考えである．しかし，技術的に工夫すると，わずかな数の精子だけで受精は成立する．そこから，1 頭の雄を 1 頭の雌だけの交配に使うより，雄から精液を採取して小分けにし，複数の雌の受精に使うことができれば，1 頭の雄の遺伝形質（例えば，良質な肉を生産）を多くの子畜に遺伝させることができるといった考えが産まれた．そこで，採取精液を入れた注射筒を雌の子宮内に差し入れる人工授精とよばれる方法が考案された．現在，日本で誕生している牛の 98％は，自然交配ではなく人工授精によって誕生している．採取した精子は，そのまま放置すれば数時間のうちに受精する能力を失ってしまうが，液体窒素で保存する技術が可能になり，精子は半永久的な保存と世界中に運搬が可能になった．液体窒素による保存法は，現在では卵にも応用され，受精卵や胚を凍結保存することが可能になっている．
生殖医療もまた配偶子は有限であるという考えに基づいている．精子の特徴は運動能力を持っていることで，運動しない精子は自然交配では卵にたどり着くことはできない．しかしながら，生殖医療では運動能をもたない精子（不動精子），しかも 1 個の精子があれば，細胞質内精子注入法（ICSI 法）を用いて子供が誕生することが可能である．また，畜産分野と同様に配偶子および受精卵を凍結し，治療の際に融解して施術に用いるといった「体外受精と配偶子の凍結保存」を組み合わせた方法が生殖医療の分野でも一般的になってきた．しかしその結果，いくつかの問題点が出てきた．
畜産領域では家畜の不妊化が急激に進んでいる．おそらく，あと 50 年前後で繁殖能力を失った牛が問題になると予想される．ヒトの場合は牛ほどではないものの，生殖補助医療技術（ARTs）によって誕生した子供が年間 5 万人を越え，さらに年々増加する傾向にある．また，日本産婦人科学会に登録された不妊治療ビッグデータの解析から，凍結融解胚を用いた場合，自然分娩に比べて新生児の体重が 50 グラム，新鮮胚を用いた ARTs で産まれた新生児に比べて 100 グラム体重が重くなることがわかった．出産時の体重増加は，低体重に比べて発育の点からは良いとも考えられるが，その後の体重や健康に問題がないか今のところ不明である．また，50 グラムや 100 グラムといった一定の体重差が存在することから，特定の臓器に凍結融解の影響が出ている可能性がある．現在の技術のさらなる改善，または全く異なる原理に基づいた生殖工学および生殖医学の確立が必要になるかもしれない．
こうした状況の中，生殖研究を出発点として，様々な研究開発の芽が産まれている．例えば，精子を「女性の腫瘍をダーゲットにした抗がん剤の運び屋」といった研究も行われている．精子の本来の目的は，DNA を特定の目標（すなわち卵）に届け，卵と融合してその中身を注ぎ込むことにある．鞭毛をもつ精子は，単細胞にもかかわらず，これを自律的に行っている．さらに精子は，生殖器官内部の敵対的な状況（免疫系の攻撃による破壊）に抵抗するための装備ももっている．さらには，近年注目されている細胞外微粒子であるエクソソームの研究も生殖分野で進んでいる．今回は，生殖工学や生殖医療の現状を紹介し，今後の動向について議論したい．

Fusion between reproductive technology and medicine: Development for better outcomes from breeding to ARTs

○Kenji Miyado[1], Maito Hanai[2], Woojin Kang[1], Akihiro Nakamura[2], Natsuko Kawano[2]
([1]Natl. Ctr. for Child Health Dev., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words Breeding, ARTs, Semen, Exosome

4S-Ca02 タンデムマス(LC-MS/MS)を用いた新生児マススクリーニングの現状と今後ついて

○渡辺 淳
（島津製作所・分析計測事業部・ライフサイエンス事業統括部・MSBU ソリューション開発G）
jun_wtnb@shimadzu.co.jp

【はじめに ＜新生児マススクリーニングについて＞】
新生児マススクリーニングとは，新生児における先天性代謝異常などの疾患を早期にスクリーニングし，さまざまな症状が現れる前に発見すること，発病前から治療ができるようにすることを目的とした検査のことをいいます．
1977 年から，ガスリー法（アミノ酸代謝異常症；フェニルケトン尿症，メープルシロップ尿症，ホモシスチン尿症），酵素法（ガラクトース血症），ELISA 法（先天性副腎過形成症，先天性甲状腺機能低下症）により 6 種類の疾患についてスクリーニングが行われてきましたが，2004 年から国内でタンデムマスを用いたパイロットスタディが始まり，アミノ酸代謝異常症，有機酸代謝異常症，脂肪酸代謝異常症で合わせて２０種類以上の疾患がタンデムマス（トリプル四重極型質量分析計；LC-MS/MS，TQ)でスクリーニング可能であることが確認されました．
【タンデムマス法による新生児マススクリーニング】
新生児マススクリーニングで使用されるタンデムマスは，質量分析計を直列に２つ並べた構造の分析機器です．乾燥ろ紙血から調整したサンプルを使用して測定を行います．タンデムマスでは，1 回の分析で多種のアミノ酸，アシルカルニチンを分析することができます．また，1 回の分析時間が 1 分程度であるため，たくさんの検体を処理することができます．これにより，一度のサンプル測定で，多くの対象疾患でマーカーとなっている化合物を測定することで，効率的かつ効果的なマススクリーニングを行うことができます．
【新生児マススクリーニングでの新規分析手法】
先天性副腎過形成症（ステロイド分析）副腎皮質では，種々の酵素の作用でステロイド生合成経路にしたがって，コレステロールからコルチコイド，エストロゲン，アンドロゲンが作られます．種々の酵素のうち，どれかが欠けることで特定のステロイドが過剰に蓄積する異常が生じます．これが先天性副腎過形成症です．このうち，最も多い 21 水酸化酵素欠損症は，これまで ELISA 法により検査されていました．しかし，この検査手法では，指標が 11-deoxy coritsol の前駆体である 17-OH progesterone（17-OHP）のみであり，他のステロイドと交叉反応の可能性があることから，擬陽性による高い再検率が問題となっています．タンデムマスでの分析手法においては，多指標による高精度な分析が可能であり，21 水酸化酵素欠損症のみでなく，先天性副腎過形成症に関連する 4 つの酵素欠損症を確認できる可能性があります．
二次検査（2nd-tier test） アミノ酸，アシルカルニチンのスクリーニングにはフローインジェクション法が用いられますが，ここで陽性と判断された検体については，より精度の高い分析による再検査により，陽性率の向上が求められます．この検査を二次検査といいます．アミノ酸，アシルカルニチンの二次検査として，オンカラム分析によるタンデムマス法が検討されています．

本発表では，タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングについて，現在行われている分析手法の説明と，新規分析手法の紹介をあわせて行います．

Current and future situation of the newborn mass screening using tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)

○Jun Watanabe
(Shimadzu Corporation)

Key words new born screeing, tandem mass spectrometer, LC-MS/MS

4S-Ca03 ゲノム編集による疾患モデルマウスの作製と解析

○乾 雅史
（明治大・農）
inui_m@meiji.ac.jp

ゲノム編集技術は人の手でデザインされたヌクレアーゼによって細胞のゲノムの特定の領域を特異的に切断し，標的領域の機能欠損あるいは新規配列の挿入を行う技術である．2000 年代初頭の Zinc Finger Nuclease から開発が始まり，第二世代である TALEN を経て現在は 2013 年に哺乳類細胞への応用が発表された第三世代 CRISPR/Cas9 の技術開発が進んでいる．これらの技術は従来の遺伝子改変技術に比べて標的配列を任意に選べること，適用できる生物種が幅広いこと，正確性や効率が格段に高まったことなどの面で大きな前進があり，特別な設備や技術を必要としないことや近年のシーケンス技術の発展に伴う各種配列情報の蓄積にも支えられ急速な広がりを見せている．ゲノム編集は植物，無脊椎動物から哺乳類まで幅広い種でその有効性が示されており，基礎研究の分野においては新たな loss of function ツールとしてスクリーニングに用いられたり，多様な種での逆遺伝学的解析が行われるなど広く利用されており，応用分野では作物や家畜の品種改良の可能性が示されたり遺伝子改変により不稔を導くことで病原性細菌を媒介する昆虫を環境中から排除する試みも進められている．このような技術の応用は食料生産や衛生環境などの面で画期的な改善の機会と考えられる一方で，ゲノム編集技術を用いて作出された生物は遺伝子組換え生物として捉えるべきか，環境や生態系に与える影響はなど議論も引き起こしている．
我々にとって最も身近で関心の高いゲノム編集技術の応用分野として医療が挙げられる．疾患にはゲノムに起こる変異が原因であるものも多いことから，ゲノムを自在に改変できる技術は病態の解明や治療法の開発に大きな期待が寄られている．疾患原因遺伝子の変異の修復，ウィルス感染の制御などヒト体内の細胞のゲノムを改変する試みや，患者由来 iPS 細胞の遺伝子改変と病態評価など様々な分野で検討が進められている．
医療応用を目指したゲノム編集技術の重要な分野として疾患モデル動物の作成がある．ゲノム編集を用いた疾患モデル動物の作成とは端的にはヒト疾患に関連して見出されたゲノムの変異を動物で再現し，病態の再現を試みるものである．前述の通り次世代シーケンスや CGH アレイなどヒトゲノム情報の解析技術の高まりによって疾患患者から同定される変異の数や種類が増加する一方で，どの変異が病態に結びついているのか配列情報のみから判断することは困難である．そのような際に候補となる変異を再現したモデル動物で病態における重要性を判断することは有用であり，ゲノム編集は効率の良さと正確に様々な変異を導入できるという利点からこの目的に最適である．さらに従来の疾患モデル動物は疾患の原因遺伝子候補のノックアウトマウスを作成することが多かったが，この手法ではミスセンス，ナンセンス，欠損など多様な変異に対して単一のモデルとなり必ずしも疾患ゲノムの再現とは言えなかった．また遺伝子非コード領域の変異や大規模な欠失，転座などの染色体再編などのモデル動物の作成にも困難があった．これらの課題に対しても近年ゲノム編集技術を用いた新しい病態再現モデルが報告されている．我々はこれまで主に受精卵への顕微注入によりマウスゲノムへ小規模欠失及び 1 アミノ酸レベルの点変異を導入する手法を検討し，複数の成育疾患の原因遺伝子について解析を行ってきた．受精卵に guideRNA，Cas9 mRNA 及び鋳型 DNA を顕微注入することで効率よく変異マウスを作成する系を確立し，病態の再現を試みた．その結果ヒトでの疾患症状を再現する場合，関連するが異なる表現型が見られる場合，特に顕著な表現型が見られない場合など様々な結果が得られ，この実験系の有用性と課題がともに示される結果となった．また，変異の忠実な再現に加えて疾患原因遺伝子の翻訳後修飾アミノ酸を標的とすることで機能亢進の表現型が得られたことから，この系は治療標的の評価にも利用が可能であることが示唆された．本発表では上記のような我々自身の経験を中心に，ゲノム編集を用いたモデル動物作成の有用性や今後応用が期待される方向性について議論したい．

Generation of disease model mouse using genome editing

○Masafumi Inui
(Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words genome editing, animal model, post-translational modification

4S-Ca04 ペプチドマイクロアレイ解析技術によるアレルギー症状の経過予測

○大河内 美奈
（東工大・物質理工）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

近年，食物アレルギーの患者数は増加傾向にあり，乳幼児における食物アレルギーの発症率は約 1 割と報告されている．これらの患者は成長とともに 8 割が自然寛解するが，一部にアレルギー症状が残る．食物アレルギーの原因抗原は，乳児においては鶏卵で約 60%，乳製品で約 20%を占めると報告されている．食物アレルギーなどの即時型アレルギー反応は，アレルゲンが肥満細胞あるいは好塩基球に結合したアレルゲン特異的 IgE 抗体を架橋することで反応（脱顆粒）が始まる．次に，活性化されたこれらの細胞が迅速に様々な化学伝達物質を産生することで，周辺組織のアレルギー炎症が誘導される．すなわち，脱顆粒が起こるためには，単に 1 つの IgE 抗体がアレルゲンと結合するだけでは不十分であり，少なくとも 2 箇所以上の IgE 結合サイトが単一のアレルゲンに存在することが必要であると考えられる．したがって，アレルギー反応を惹起するのに有効な生体内の抗体エピトープをペプチドアレイにより解析することで，アレルギー症状や重症度に基づいたアレルゲン特異的抗体を特定することが可能となる．このことは，現行の精製アレルゲンに結合する IgE 量を測定する特異的 IgE 抗体検査における偽陽性に対する問題点を解消するばかりでなく，バイオマーカーペプチドによる患者群判別や症状の経過予測など治療指標を提供できる可能性を示唆する．そこで本研究では，ペプチドマイクロアレイを用いたペプチドレベルでの抗体エピトープ解析により，自然寛解群と持続性アレルギー群の患者血清サンプルを用いたアレルゲンエピトープ解析を行い，患者群判別に有益なエピトープを探索した．
小児ミルクアレルギーに着目して個々の患者の抗原特異的 IgE 抗体エピトープを解析するため，ペプチドアレイを作製した．ペプチドは牛乳の全タンパク質 6 種（α-ラクトアルブミン, β-ラクトグロブリン, αS1-, αS2-, β-, κ-カゼイン）のアミノ酸配列をもとに 16 残基の長さ，3 残基ずらしのペプチドライブラリーを合成し，ピエゾ素子微小液滴吐出法により固定化した．血清 10 µl を，1%オボアルブミンを含む生理食塩水で 10 倍希釈してアレイ上のペプチドと相互作用させた後，蛍光標識した抗 IgE 抗体と反応させ，アレイスキャナーで検出した．ミルクアレルギーを対象として，医療機関から患者血清をご提供いただき，100 人規模の IgE 抗体エピトープ情報の解析により，アレルギー反応を惹起する上で重要となる配列を明らかにした．また，ミルクアレルギー患者血清の時系列解析を行ったところ，治療経過の良好群と不良群では IgE および IgG4 結合パターンに変化が認められ，ペプチドアレイを用いて患者群を判別できる可能性が示唆された．さらに，アレルギー発症時（1 歳前後）と寛解時，経口免疫療法におけるアレイ経過解析から，各検体のエピトープ位置が変わらないことが示唆されたことから，エピトープなターンを解析することで，発症時に寛解時期を推定できる可能性が示された．特に，経口免疫療法の寛解群と非寛解群において一部のエピトープが異なることから，免疫療法における効果を事前に予測できる可能性が示唆された．これより，アレルギーの治療指針となる解析が可能となることが示された．また，ペプチドマイクロアレイによる患者群の判定を行ったところ，正診率 88%が得られ，高い正答率が得られた．以上の結果から，ペプチドマイクロアレイを用いたアレルギー解析の有用性が示唆された．

Peptide array analysis technology for evaluation and prediction of milk allergy outgrow

○Mina Okochi
(Dept. Chemical Science & Technol., Tokyo Tech)

Key words peptide chip, allergy, epitope peptide

4S-Ca05 非 IgE 依存性消化管アレルギー診断における血便中 EDN 測定の有用性

○折原 芳波[1,2], 野村 伊知郎[2], 森田 英明[2], 斎藤 博久[2], 松本 健治[2]
（[1]早大・先進理工, [2]国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部）
kanami.orihara@aoni.waseda.jp

【背景・目的】
消化管アレルギーは 2015 年に難病指定された好酸球性消化管疾患の一種であり，食物などが抗原となって消化管に好酸球が非常に多く集積し，慢性的に炎症を起こす疾患である．このため，食道・胃・腸などの正常な機能が障害されてしまう．特に新生児期～乳児期の患者は，1990 年台末から世界中で急速に増加していると考えられている．病型，病態が多様であり，負荷試験以外に診断を確定する方法がない．これまでの研究により，国立成育医療研究センター研究所を中心とするグループは嘔吐，血便の症状の有無により 4 つ臨床病型に分類できることを提唱してきた（*J Allergy Clin Immunol. 2011 Mar; 127(3):685-8*）．また，最近の研究により，消化管アレルギーの 1 つである食物タンパク質誘発胃腸炎 （FPIES）の患児では，便中の好酸球性顆粒タンパクである Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)が上昇していることが示された（*Pediatr Allergy Immunol. 2014 Oct;25(6):617-9*）．便中 EDN は非侵襲的に測定でき，臨床検査データとしての有用性も非常に高い．そこで，新生児期～乳児期を中心とする消化管アレルギー疾患について，便中 EDN が他の病型の診断にも有用なバイオマーカーとなるかを検討した．
【方法】
対象は 65 名の新生児 - 乳児期の消化管アレルギー患児と 99 名の非アレルギー対照児および 22 名の他疾患血便対象群で，前述の既報に基づき患児群を 4 群に分類した：クラスター 1（嘔吐＋，血便＋）12 名，クラスター 2（嘔吐＋，血便－）18 名，クラスター 3（嘔吐－，血便－）15 名，クラスター 4（嘔吐－，血便＋）20 名．採取便はプロテアーゼインヒビターを含むバッファーを用いて抽出液とし，便中 EDN を ELISA キットで測定した．
【結果】
便中 EDN は対照群と比較して，クラスター 1・4 で有意に高く，クラスター 2 が次いで高かった．また，ROC 曲線解析の結果は 3 群とも AUC≧0.8 であった．特に，血便を呈するクラスター 1 ・ 4 において，他疾患の血便群との便中 EDN 値の差も有意であり，妥当なカットオフ値を算出することもできた．一方，クラスター 3 の便中 EDN レベルは対照群と同等であった．
【結論】
便中 EDN 濃度の測定が，クラスター 3 を除く，新生児 - 乳児期の消化管アレルギーの診断に広く有用なバイオマーカーとなりうることが強く示唆された．また，クラスター 1 ・ 4 を中心に，特に血便群を対象に得られたカットオフ値の適正性および，各クラスターにおける症状の増悪と本試験値の変動について今後さらに研究を進め，本試験の実用化を加速させていくことが重要であると考える．

Stool EDN levels in different clusters of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy

○Kanami Orihara[1,2], Ichiro Nomura[2], Hideaki Morita[2], Hirohisa Saito[2], Kenji Matsumoto[2]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Department of Allergy and Clinical Immunology, National Research Institute for Child Health & Development)

Key words allergy, eosinophil, inflammation

4S-Da01 CUBIC による全身全細胞のオミクス的網羅解析

○洲崎 悦生 [1,2,3]
([1]東大院・医・システムズ薬理学, [2]科学技術振興機構さきがけ, [3]理研・QBiC・合成生物学研究G)
esusaki@m.u-tokyo.ac.jp

多細胞生物は多種の細胞種から構成され，相互に結合・連絡をしながら機能している．個体レベルの生命機能や疾患のメカニズムは，このような多細胞からなる回路やシステムに実装されている．本講演では，このような多細胞システムの解析スキーム「個体レベルのシステム生物学」の実現にむけた要素技術として，細胞および細胞回路の網羅的解析技術 CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis)を紹介する．CUBIC は高効率な組織・全身透明化法，高速な全組織・全身の 3 次元イメージング，画像情報解析を組み合わせた解析パイプラインであり，細胞階層の omics 的アプローチ（Cell-omics）を実現することを目指す．CUBIC は遺伝学的・組織学的な種々の細胞ラベリング技術に対応しており，複数のモダリティでの同時計測や多サンプル・多条件での比較解析を可能としている．このような 3 次元イメージング技術や Cell-omics による個体レベルのシステム生物学は，今後幅広い生命科学・医学分野での応用が期待される．

参考文献:
Susaki EA, Tainaka K, Perrin D et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157:726-739, 2014.
Tainaka, Kubota et al. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159:911-924, 2014.
Susaki EA, Tainaka K, Perrin D et al. Advanced CUBIC protocols for the whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nature Protocols* 10, 1709-1727, 2015.
Susaki EA and Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals (Review). *Cell Chemical Biology* 23: 137-157, 2016.

CUBIC: a cell-omics pipeline toward comprehensive cell and cell-circuit analysis

○Etsuo A. Susaki[1,2,3]
([1]Dept. Systems Pharamacol., Grad. Sch. Med., UTokyo, [2]JST PRESTO, [3]Lab. Synthetic Biol., RIKEN QBiC)

Key words Imaging, Tissue clearing, Cell-omics

4S-Da02 微小試料からの機能ゲノミクス解析―組織から 1 細胞，微生物まで―

○細川 正人 [1,2]
([1]早大・ナノライフ創新研, [2]JST・さきがけ)
m.hosokawa@aoni.waseda.jp

次世代シーケンサーを用いた 1 細胞のゲノム・遺伝子発現解析は Single-cell sequencing と呼ばれ，この技術により，細胞集団の不均質性の解明や希少な細胞集団の発見が現実のものになっている．最近では，1 細胞中の mRNA の 3’末端を網羅的に読み取り，遺伝子発現情報を数千から数万の 1 細胞単位で調べる事ができるようになった．この技術革新を背景に，人体版の Google map とも呼べる Human cell Atlas(ヒト細胞地図)を作る国際プロジェクトが発足している．これは，生体の組織中の，どこにどんな細胞が存在しているかを詳細に把握し，疾患や発生の過程での細胞の役割を正しく理解することを目標としている．この壮大な人体地図の作製において，Single-cell sequencing は欠かすことができない解析技術である．一方で，組織中の微小な興味領域や特定の 1 細胞試料をどのように調達して解析に供するかという「試料調製プロセス」については，課題が多く残されている．本発表では，微小試料からの機能ゲノミクス解析の効率化に向けて，我々が開発を進めている最先端の「試料調製・解析」支援技術について，複雑な組織試料から微生物までを対象とした応用例を紹介する．
微小組織領域の位置情報と遺伝子発現情報を紐付けられる試料採取法としては，レーザーマイクロダイセクション」が代表的だが，採取速度が遅いため，100 箇所の微小領域を回収するには 10 時間程度を要する．そこで我々は，組織切片から高速かつ自動的に微小組織領域を採集するシステムを開発した．本システムでは，組織切片の観察像から採取部位を指定し，選択領域（直径約 100μm）を短時間（最大 96 箇所の採取を 8 分）に採取して 96well プレートに自動回収することができる．既存の組織採取法と比べて，短時間での採取が可能で試料の劣化が少ない．例えば，マウス脳凍結切片から複数箇所の微小組織領域を採取し，抽出した RNA から RNA-seq を行うことで，各採取箇所から数千種の遺伝子の発現情報を定量し，各脳領域に特異的な遺伝子発現を捉えることができる．他にも腎臓・肝臓・リンパ節などの正常・癌組織領域の選択的回収にも使用可能で，様々な微小組織領域の迅速採取と網羅的な遺伝子発現解析を統合することができる．
次に，採取組織から取り出される大量の 1 細胞をどのように扱うかに課題が生じる．例えば，核酸増幅反応は細胞毎に個別に行う必要があるため，集団から細胞を取り分けた後に，個別の反応槽を用意せねばならない．大量に生み出される 1 細胞サンプルを高速に処理するプラットフォームが新たに必要である．この技術は，微量対象物を扱う精度とスループット性を備える必要があるが，対象物のロスやコンタミネーションをいかに防止できるかも重要である．そこで我々は，微小な液滴を反応場として用いる新しい 1 細胞解析プラットフォームを開発した．この技術では，水溶液の定常流をオイルでせん断することで液滴を毎秒 1000 個の速度で生成する．この時，液滴径は 30-140 μm (14 pL-1.4 nL) の範囲で自由に制御できる．細胞や DNA 分子を含む水溶液をデバイスに導入すると，細胞や分子がポアソン分布に従って液滴中に封入・区画化される．本液滴は熱安定性が高く，核酸増幅のための加熱・酵素反応を経ても安定的に維持できる．さらに，液滴の融合，分割，分取などの液滴操作技術を組み合わせることにより，より複雑な反応系を液滴内で再現することができる．我々は現在，液滴の融合反応を用いて液滴内に 1 細胞を高速封入し，対象となる細胞集団に対して網羅的に 1 細胞全ゲノム増幅を行う技術の開発を進めている．液滴は油の中に漂う「動く試験管」として機能し，この「動く試験管」が流路を流れるうちに，細胞が液滴内部で試薬と反応し，細胞溶解と DNA 増幅が段階的に処理されていく．液滴は高速に生み出されるため，1 細胞の単離からゲノム増幅までを高速に行い，多量の 1 細胞ゲノムを並列的に処理することが可能である．例えば，大腸がんや乳がんの細胞，バクテリアを対象として，数万個の 1 細胞ゲノム DNA を 3 時間で並列的に増幅することができる．1 細胞全ゲノム増幅の反応工程がピコリットルサイズの液滴内部で完了するため，コンタミネーションがきわめて少ない高精度なゲノム情報を獲得することができる．実際に本手法を用いて，多様な環境微生物から 1 細胞を分取し完全に近い微生物ゲノム情報を取得することに成功した．また，乳がん細胞株の保有するがん抑制遺伝子の変異を 1 細胞レベルで検出できることも明らかにしている．
以上のように，研究対象とする微小試料を効率よく採取し，1 細胞解析へとプロセスするための要素技術を開発している．これの試料調製技術を統合し，組織内の細胞多様性や環境微生物の多様性を多階層の情報から解明する新しい解析プラットフォームとして確立したいと考えている．

Functional genome analysis from small quantities of biological samples - from a tissue to single cells and microbes-

○Masahito Hosokawa[1,2]
([1]Res. Org. Nano&Life Innov., Waseda Univ., [2]PRESTO, JST)

Key words single-cell analysis, genome, transcriptome, microfluidic device

4S-Da03　1細胞メタボロミクスに向けた基盤技術開発

○和泉 自泰[1], 原 健士[1], 中谷 航太[1], 秦 康祐[1], 山村 昌平[2],
松本 雅記[1], 馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]産総研・健康工学）
izumi@bioreg.kyushu-u.ac.jp

生命の最小単位である細胞は特異的な機能を持つ細胞集団に分類することができるが，近年の研究から同一細胞集団であっても多様性・不均一性を有することが知られている．この多様性が環境適応や疾患発症の過程において極めて重要な役割を担っていると考えられ注目されている．1細胞単位で細胞内分子の網羅的観測が可能となれば，量×時間×空間で構成されるビッグデータを基に生命システムの状態を記述でき，そのようなデータの解析は生命システムの動作原理の理解や疾患の発症機構の解明に貢献できることが期待される．メタボローム解析は，ゲノム情報から転写，翻訳過程を経て生成した酵素に基づく低分子化合物の化学変化を包括的に捉えたものであり，ゲノム情報に最も隣接した高解像度表現型解析手段である．すなわち，メタボロームは，生命活動の表現型として，遺伝子，あるいは薬物や環境などの外的要因によって，複合的かつ連続的に変化する有益な指標を提供できる．一方で，従来のメタボローム解析は，分析系の感度やその他の技術的限界から，組織 (10~15 mg) や複数細胞 (10^6~10^7 個) などある程度の集団サンプルを対象として測定が実施されてきた．1細胞でのメタボーム解析ついてはこれまでいくつかのグループによって検討されてきたが，基本的に細管を用いて細胞内成分を吸い出しそのままクロマト分離をすることなくダイレクトインフュージョンにより質量分析計へ導入しているため，夾雑物によるイオン化抑制の影響を大きく受け，目的成分が検出できない，定量性や再現性が低下するなどの問題をかかえている．また，試料調製を少数の細胞から実施することは，通常の実験室で行われている手法に依存している限り不可能であり，試料調製を微小空間内で完結し，そのまま分析系に直結して導入することが必須である．本研究では，液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS/MS) を基盤とした代謝物の高感度計測技術および試料調製・試料導入技術を連携・連動させるシステムを構築し，最終的に，細胞分離から LC/MS/MS への導入までを一体化した1細胞メタボローム分析システムを開発することを目的としている．

はじめに「カラム内径のダウンサイジング」による LC/MS/MS 分析系の高感度化について検証した．LC/MS の感度は，微小内径のカラムを用いて低流量で実施することによって，①移動相による物質希釈率が低減しカラム内物質濃度が上昇し，②エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 部で微細な液滴を生じることでイオン化効率の上昇が期待でき，③ESI ニードルをオリフィスへ近づけることによりイオン導入効率を向上すると考えられている．①について，理論的にはカラム内での物質濃度は，カラム断面積の逆数，つまりカラム内径の二乗の逆数に比例して大きくなる．現状のメタボローム解析では，内径 2.1 mm のセミミクロカラムが汎用的なカラムとして使用されているが，例えばカラム内径を 0.1 mm まで微小化することで，理論的にはカラム内物質濃度は 441 倍に上昇する．ここで，内径 0.1 mm のカラムでは，数 100 nL/min での流速で分析を行うため，一般的にこれをナノフロー LC (ナノ LC) と呼んでいる．実際に，カラム内径のダウンサイジングによってどの程度感度が向上するかについて，親水性代謝物の保持が良好であったペンタフルオロフェニルプロピル (PFPP) 担体 (3 μm) を内径 0.1 mm のフューズドシリカキャピラリーに充填したナノ LC カラムを用いて検証した．その結果，内径 2.1 mm のセミミクロカラムを用いた汎用 LC/MS/MS と比べて約 100 倍の高感度化を達成し，100 amol から 10 fmol の絶対感度で親水性代謝物の一部の分析が可能となった．また，本分析系感度は，1細胞代謝物抽出液をロスなくシステムへ導入できれば，細胞内に多量に存在する代謝物 (細胞内濃度がおよそ 1 μM 以上) については観測できることを示唆するものであった．続いて，試料調製を微小空間内で実施するための要素技術開発を行った．顕微鏡下で目的とする細胞を回収するために，倒立型蛍光顕微鏡に低流量で溶液を吐出・吸引可能なナノシリンジポンプを搭載したナノピペットデバイスを試作した．当該装置に内径 150 μm のフューズドシリカキャピラリーを接続し，数 100 nL/min の速度で吸引することで，標的とする細胞の迅速な回収操作が可能となった．また，キャピラリー先端へのフリット作製技術や固相担体の充填法についても確立した．さらに，細胞を吸引したキャピラリーと前処理操作用キャピラリーおよび分析用ナノ LC カラムを接続し，各種溶媒を分析用のナノ LC ポンプで送液することで細胞の溶解，前処理，分析カラムへの導入までを完全インラインで実施するシステムの構築に成功した．本発表では，1細胞メタボロミクスに向けた基盤技術を紹介するとともに，今後の課題についても議論したい．

謝辞：本研究は科学技術振興機構 (JST) CREST「統合1細胞解析のための革新的技術基盤 (研究課題番号 JPMJCR15G4)」の支援により実施された．

Development of basic technology for single cell metabolomics

○Yoshihiro Izumi[1], Takeshi Hara[1], Kohta Nakatani[1], Kousuke Hata[1],
Shohei Yamamura[2], Masaki Matsumoto[1], Takeshi Bamba[1]
([1]Med. Inst. Bioreg. Kyushu Univ., [2]Health Res. Inst. AIST.)

Key words　Single cell metabolomics, Single cell analysis, Nano-LC, Mass spectrometry

4S-Da04　クロマチン高次構造のイメージング

○宮成 悠介
（岡崎統合バイオサイエンスセンター）
miyanari@nibb.ac.jp

生命情報の根幹を担うゲノム DNA は，クロマチンとして細胞核内に折り畳まれて存在する．クロマチン繊維は核内でランダムに存在するのではなく，組織化されたクロマチン高次構造を取ることで，転写や複製などの様々な核内現象を制御している．中でも，エンハンサーやプロモーターなどの転写制御領域は，転写因子などが DNA にアクセスできるよう，ヌクレオソームによって占有されておらずオープンクロマチン構造をとる．このように，DNA へのアクセシビリティは，細胞特異的な遺伝子発現の制御には非常に重要な役割を担っている．これまでのクロマチンアクセシビリティを解析する技術は，ChIP-Seq 法などの次世代シーケンサーを用いたアプローチが主流であり，得られる結果はクロマチン構造の「平均値」である．最近では，ATAC-seq 法と呼ばれる，勘弁でかつ感度の良い実験系が報告され，単一細胞レベルでのクロマチン構造の解析が可能となっている．一方で，クロマチンのアクセシビリティを解析する手法は限られており，核内のオープンクロマチン領域をイメージングすることは，これまで不可能であった．そこで，我々は，オープンクロマチン構造をイメージングできる独自の技術を開発に着手し，細胞核内におけるクロマチン高次構造を観察することに成功した．ここでは，本技術の有用性を紹介するとともに，クロマチン高次構造研究におけるイメージング技術の可能性を議論する．

Imaging of chromatin structures

○Yusuke Miyanari
(Okazaki Institute for Integrative Bioscience)

Key words　chromosome, chromatin structure

4S-Da05 1 細胞解析を支援する合成分子ツールの開発

○山口 哲志
（東大・先端研）
yamaguchi@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp

近年，細胞生物学の基礎研究から病理検査，再生医療までの幅広い分野において，一細胞レベルで細胞を解析し，ハイスループットに選別する技術が求められている．一細胞解析や選別にはさまざまな目的があり，多様な細胞群から目的とする細胞をたった一つ検出すれば良い場合から，該当する細胞をすべて確実に分取しないといけない場合まで，求められる技術もさまざまである．また，日進月歩の再生医療，細胞加工産業において，どのような技術が産業上のコア技術として市場を席巻するのかまだ誰にも分からないのが現状である．したがって，従来の技術では及ばない，従来技術が不得意な「ニッチな」対象に対応可能な一細胞解析・選別技術を開発することも，汎用的な技術の開発と同じく重要であるといえる．そこで，我々は，このような背景から，従来法だけでは達成が難しいニーズに応えるために，1 細胞解析を支援する合成分子から成る道具（合成分子ツール）の開発を行ってきた．本発表では，光応答性の材料を用いた浮遊細胞の単一細胞解析と光誘導型の選別技術の開発について報告する．
我々は，これまでに光に応答して，望みのタイミングで望みの場所に細胞を固定化し，また，望みの細胞のみを光照射に応じて取り外すことができる材料を開発してきた[1,2]．これらの材料は，ポリエチレングリコール（PEG）と光分解性リンカー，脂質とから成る PEG 脂質であり，光照射によって一本の脂質部分が切り離される設計になっている．例えば，光に応じて細胞を固定化できなくする材料の場合，この材料を修飾した表面上に光のパターンを照射すると，照射していない表面では脂質部分が細胞膜と相互作用して細胞を固定化し，照射した表面では脂質部分が切断されて存在しないため細胞を固定化できない．従って，基板に材料を修飾し，細胞の大きさの非照射領域が並ぶように光照射を施すだけで，簡単に 1 細胞アレイが作成できる[3]．この材料上では，細胞底面の細胞膜の一部が PEG 脂質によって捕捉されるため，接着性のない浮遊細胞も固定化され，その回転や振動が止められる．そのため，従来法では困難であった浮遊細胞上での疾患関連タンパク質などの動態変化解析が可能である．我々は，この材料を用いて作成した 1 細胞アレイ上で，炎症や動脈硬化などへの関連が報告されている pH 応答性 GPCR の定量的な動態解析を網羅的に行った[4,5]．
上記の光分解性 PEG 脂質を用いて固定化した細胞は，光照射によって選択的に取り外すことも可能である 1)．従って，上記のようなユニークな 1 細胞解析後に，回収したい細胞のみを光によって簡便に取り外すことも原理的には可能である．そのような光誘導型の 1 細胞ソーティング技術の開発のために，PEG 脂質の改良や新たな光溶解性ゲル材料の開発を行ってきた．本発表ではその一端も簡単に紹介したい．

1) Yamaguchi, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 128-131, 2012
2) Yamahira, *et al.*, *in preparation*
3) Yamahira, *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 14, 1670-1676, 2014
4) Lan, *et al.*, *FASEB J.*, 28, 3965-3974, 2014
5) Tan, *et al.*, *Lab on a Chip*, *in press*, DOI: 10.1039/C7LC00198C, 2017

Synthetic molecular tools for supporting single-cell analysis

○Satoshi Yamaguchi
(RCAST, Univ. Tokyo)

Key words single cell, cell immobilization, PEG

4P-G001 海藻分解性好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 のドラフトゲノム解析

○藤井 健太, 大城 隆, 鈴木 宏和
（鳥取大院・工・化生応工）
kf.bb.0311@gmail.com

【目的】海藻類は，リグニンを含まない高増殖性バイオマスで，バイオ燃料の原料などに利用できる．しかし，特殊な構造をもった糖類を大量に蓄積するものも多く，それら海藻多糖類は，一般的なモデル微生物では概して分解・資化できない．このことから海藻多糖類を分解できる微生物は，海藻の有効活用において重要な役割を果たすと考えられている．我々が海藻分解性好熱菌として単離した *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 は，様々な海藻糖類を資化することができ，さらに海藻を微粒子化しながら糖質を遊離させる．本会では，*G. thermodenitrificans* OS27 のドラフトゲノム解析について報告する．
【方法】OS27 株の染色体 DNA を調製し，MiSeq（2 x 300 bp ペアエンド法）を用いたドラフトゲノム解析を行った．得られたコンティグ配列に含まれる ORF は，GeneMarkS プログラムを用いて推定した．OS27 株の系統学的分類を，Average Nucleotide Identity 法を用いて再確認した．
【結果】MiSeq シークエンスのリード数は 4,910,538 で，1 リードあたり 300 bp とすると約 3.0 G bp のデータが収集できた．これは推定ゲノム長 4 Mbp の約 740 倍に相当する．総コンティグ数は 164，最長コンティグは 366 kbp で，その総計は 3.44 Mbp であった．OS27 株の推定全ゲノム長は，Jellyfish による予測では 3.50 Mbp で，Velvet アセンブルを用いた予測では 3.47 Mbp であった．DNA の GC 含量は 49%で，3771 個の ORF が見出された．Average Nucleotide Identity 法から，本好熱菌は *G. thermodenitrificans* に分類できることが改めて確認された．OS27 株の海藻資化能に関与しうる遺伝子として，38 個の糖加水分解酵素遺伝子を見出した．その数は *G. kaustophilus* HTA426 の全ゲノム配列中に見出される糖加水分解酵素の遺伝子数（20）よりも多く，少なくとも一部は海藻資化に関与していると考えられる．

Draft genome sequencing of the thermophilic seaweed degrader *Geobacillus thermodenitrificans* OS27

○Kenta Fujii, Takashi Ohshiro, Hirokazu Suzuki
(Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ.)

Key words *Geobacillus thermodenitrificans*, seaweed, macroalga, degradation

4P-G002 *Pseudomonas putida* とその近縁種の MALDI-TOF MS を用いた迅速同定法の確立

○岩崎 卓己, 田頭 彩佳, 則武 ちあき, 上條 知昭, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）
iwasaki-takumi@nite.go.jp

【背景・目的】*Pseudomonas putida* とその近縁種は産業上非常に有用な株が多く，様々な環境から多くの株が単離・同定されてきた．しかし，同定の指標として用いられる 16S rRNA 遺伝子配列の多型度が低く，正確な識別・同定が困難である．近年のゲノム配列決定技術の飛躍的な発展に伴い *P. putida* とその近縁種のゲノム配列は多数公開されてきている．NITE・NBRC では，識別が困難な種のゲノム情報から種特異的バイオマーカーを推定し，バイオマーカーを MALDI-TOF MS を用いて検出する迅速で高精度な識別・同定法の開発を行っている．本研究では，*P. putida* とその近縁種の迅速かつ高精度識別法を確立したので報告する．
【方法】*P. putida* とその近縁種の計 76 株のゲノム情報からリボソームタンパク質遺伝子を抽出，その理論分子量を算出した．同時に，ゲノム解読株の ANI 値を用いたクラスター解析を行った．ANI 解析に基づくクラスター毎に特徴的なリボソームタンパク質を抽出，それらをバイオマーカー候補とした．*P. putida* と近縁株の計 77 株について，MALDI-TOF MS によるタンパク質スペクトラを取得，バイオマーカー候補を検証し，安定して検出されるリボソームタンパク質を迅速な高精度識別用バイオマーカーとした．
【結果】リボソームタンパク質の理論分子量と ANI 値に基づくクラスタリング解析の結果，バイオマーカー候補として 20 種のリボソームタンパク質を選抜した．MALDI-TOF MS による検証実験の結果，識別・同定用バイオマーカーとして 18 種を選抜した．菌体を MALDI-TOF MS 解析に供し，得られた全スペクトルの中から，18 種のリボソームタンパク質の m/z のプロファイルを比較することで，16S rRNA 遺伝子配列からでは非常に識別が困難である *P. putida* と *P. monteilii* や *P. plecoglossicida*，*P. fulva* と *P. parafulva* を迅速かつ正確に識別・同定出来る方法を確立した．

Rapid and accurate identification method for *Pseudomonas putida* and closely related species by using MALDI-TOF MS

○Takumi Iwasaki, Ayaka Tagashira, Chiaki Noritake, Tomoaki Kamijo, Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words MALDI-TOF MS, *Pseudomonas putida*, biomarker, ribosomal protein

4P-N003 MALDI-TOF MS を用いた *Aspergillus* 属糸状菌の識別ライブラリーの構築

○上條 知昭, 伴 さやか, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）
kamijo-tomoaki@nite.go.jp

【背景と目的】MALDI-TOF MS を用いた細菌の迅速同定は臨床分野だけではなく，食品の品質管理分野に広がりつつあるが，糸状菌については種の識別ライブラリーの構築が十分でないなどの理由から，現場で使われる例は少ない．そこで本研究では，産業的に有用な菌と有害な菌が系統的に混在し，迅速な識別が困難である *Aspergillus flavus* 類縁菌（*A. flavus*，*A. oryzae*，*A. tamarii*，*A. parasiticus*，*A. sojae*，*A. nomius*）について，MALDI-TOF MS を用いた種レベルの識別を目的としたタンパク質ライブラリーの構築を行った．
【方法】NITE・NBRC が保有する *Aspergillus flavus* 類縁菌 123 株を対象に，PDA 培地で 10 日間培養した菌体をエタノール，ギ酸及びアセトニトリルで処理を行った．続いてマトリックス剤 CHCA でイオン化し，MALDI-TOF MS AXIMA［(株）島津製作所］を用いてタンパク質 MS スペクトルの取得を行い，株毎の MALDI-TOF MS タンパク質ライブラリーを構築した．次に，SARAMIS software を用いて，MS スペクトルのクラスタリング解析を行い，*A. flavus*/*A. oryzae*，*A. tamarii*，*A. parasiticus*，*A. sojae*，*A. nomius* の 5 つのクラスターに分かれたことから，それぞれのクラスターに特異的なタンパク質を選抜し，同定識別用 Super spectra ライブライリーを構築した．
【結果と考察】株毎の MALDI-TOF MS タンパク質ライブラリーは，類縁菌とのクラスタリング解析用として利用可能である．一方，上記 5 クラスターの同定識別用 Super spectra ライブライリーについて，A. flavus 類縁菌の MS スペクトルを用いた検証実験を行ったところ，正確に 5 クラスターのいずれかに迅速同定できることを確認した．食品の品質管理や環境中糸状菌の検出において，この 2 種類のライブライリーを利用することにより，MALDI-TOF MS を用いた *A. flavus* 類縁菌の迅速同定を可能とした．

Development of MALDI-TOF MS protein library for the filamentous fungi, *Aspergillus*

○Tomoaki Kamijo, Sayaka Ban, Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words MALDI-TOF MS, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, identification

4P-N004 MALDI-TOF MS を用いたパン用酵母の識別方法の検討

○半谷 朗, 安田（吉野） 庄子, 小野 奈津子
（あいち産科技セ）
a-hanya@aichi-inst.jp

【背景と目的】パン製造では多くの場合，パン用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の濃縮菌体を含む生酵母や乾燥酵母が用いられる．製造工程においてパン生地に *S. cerevisiae* の野生菌株や別のパン用菌株が混入した場合，製品の品質に影響する恐れがある．そのため，パン用酵母の菌株の種類を迅速かつ簡便に検査する方法が求められている．近年，MALDI-TOF MS を用いた微生物の迅速同定検査法が臨床分野で実用化され，食品分野でも活用されつつある．MALDI-TOF MS による微生物同定法は，主にリボゾームタンパク質群に由来するマススペクトルの差異により細菌・酵母等の種の同定を行うもので，一部の細菌種では株レベルの識別も試みられている．そこで本研究では，MALDI-TOF MS を用いたパン用酵母の株レベルでの識別方法について検討した．
【方法及び結果】市販パン酵母 10 株および花弁より分離した酵母 1 株(倍数体の *S. cerevisiae*)について，(1)平板培養したコロニー，(2)液体培養後の菌体，(3)平板培養コロニーを冷蔵保存したもの，および(4)液体培養後の菌体を冷蔵保存したもの，をそれぞれ試料とした．MALDI-TOF MS 微生物同定システムにより試料のマススペクトルを複数回(12 回)測定し，付属の解析ソフトウェアを用いて系統樹を作成した．その結果，試料(3)の場合にのみ，菌株毎のマススペクトルのグルーピングが可能となり，株レベルの識別が可能な系統樹を作成することができた．
本研究は公益財団法人エリザベス・アーノルド富士財団平成 28 年度研究助成により行った．

Identification of bread yeast strains using MALDI-TOF MS

○Akira Hanya, Shoko Yoshino-Yasuda, Natsuko Ono
(Food Res. Center, ACIST)

Key words bread yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, MALDI-TOF MS

4P-G005 麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規制御因子 KpeR の機能解析

○荒川 弦矢[1], 江口 優一[1], 小川 真弘[2], 小山 泰二[2], 徳岡 昌文[1], 進藤 斉[1], 穂坂 賢[1]
（[1]東農大院・農, [2]野田産研）
m3tokuok@nodai.ac.jp

【目的】我々はこれまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーに対するスクリーニングを実施し，コウジ酸生産や分生子形成，気中菌糸伸長に関わる新規遺伝子を見出した．本遺伝子は広く糸状菌に保存されており，通常 N 末端に存在する $Zn(II)_2$-Cys_6 モチーフがアミノ酸配列中央に存在する特徴的な構造の制御因子をコードすると推定された．本発表では形態観察及び遺伝子発現解析を進めた結果を報告する．
【方法・結果】遺伝子破壊によりコウジ酸生産量が増加することから，本遺伝子を *kpe* (*k*ojic acid *p*roduction *e*nhancement)*R* と命名した．*kpeR* 破壊株はコウジ酸生産量が増加する一方で，ペニシリン生産量が減少した．これらの差異は生合成遺伝子の発現レベルで生じていたことから，*kpeR* が複数の二次代謝を転写レベルで制御することが示された．*kpeR* 破壊株は頂のうが少なく，電子顕微鏡観察から頂のうのサイズが親株より約 40%小さいことが分かり，これらの要因により分生子数が減少したと考えられた．また，*kpeR* 破壊株において *brlA* の発現が減少したことから，*kpeR* は *brlA* を介して二次代謝と分生子形成を制御することが強く示唆された．
分生子形成シグナル伝達系における *kpeR* の位置を明らかにするため，関連遺伝子破壊株における *kpeR* の発現量を解析した結果，*nsdD* 破壊株では発現量が変わらない一方で，*flbB*，*flbC*，*flbD* の各遺伝子破壊株では *kpeR* の発現が増加した．この結果より *kpeR* が *flbB*，*flbC*，*flbD* と *brlA* の間で機能することが予想された．現在，*kpeR* 破壊株における分生子形成関連遺伝子の発現解析を行っている．

Functional analysis of a novel regulator, KpeR, in *Aspergillus oryzae*

○Genya Arakawa[1], Yuichi Eguchi[1], Masahiro Ogawa[2], Yasuji Koyama[2], Masafumi Tokuoka[1], Hitoshi Shindo[1], Masaru Hosaka[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Noda Inst. Sci. Res.)

Key words *Aspergillus oryzae*, transcriptional regulator gene, secondary metabolite, conidiation

4P-G006 山形県，新潟県及び兵庫県で分離した油脂酵母 Lipomyces 属の解析

○山崎 敦史, 宮崎 由美子
（NITE・NBRC）
yamazaki-atsushi@nite.go.jp

【背景と目的】*Lipomyces* 属酵母は，Saccharomycetales 目，Lipomycetaceae 科の子嚢菌であり，本酵母が生産する油脂はバイオ燃料に活用できると期待されている．本研究では，山形，新潟及び兵庫県で収集した土壌から *Lipomyces* 属の分離を行い，種分布情報の蓄積と高油脂生産能の新規酵母株取得を目的とした．
【方法と結果】無窒素培地(NDM)を用いた希釈平板培養法により土壌試料から単離したムコイド状の酵母コロニーに対し，MALDI-TOF-MS 解析並びに 26S rRNA D1/D2 領域及び *EF1α* 遺伝子塩基配列を用いた系統解析による同定を行った．
山形県の土壌からは，Lipomycetaceae 科酵母が合計 85 株得られ，そのうち 82 株(96.5%)が *Lipomyces starkeyi* 及びその近縁種であり，残りの 3 株(3.5%)が *Lipomyces kononenkoae* であった．
新潟県の土壌から分離された 36 株のうち 31 株(88.6%)が *L. starkeyi* 関連種であり，残りの 5 株(13.9%)は沖縄県で分離されていた *Lipomyces* 属の新種候補株と同一種であった．
兵庫県の土壌からは 89 株が得られ，そのうち 71 株(79.8%)が *L. starkeyi* 関連種となり，続いて山梨県で分離されていた *Myxozyma* 属クレードの新種候補株と同一の種が 16 株(18.0%)，*Myxozyma monticola* が 2 株(2.2%)であった．
以上の結果から，各地域から分離される Lipomycetaceae 科酵母の大多数は *L. starkeyi* 及びその関連種であり，これらが Lipomycetaceae 科酵母として各土地の土壌中で優占していることが示唆された．他方，分離手法が異なるものの亜熱帯の沖縄と冷涼な新潟で共通の新種候補株が分離されたことと，熱帯において高頻度で分離される *L. kononenkoae* が冷涼な山形で分離された事実は，気候と種分布との関係を否定するケースになり得るため興味深い．
上記に加え，遺伝的に異なる分離酵母株の脂肪酸組成及び生産量を測定し，分離地域や分類との関連性を報告する．

Isolation and analysis for lipid production ability of oleaginous yeasts genus Lipomyces in Yamagata, Niigata and Hyogo prefecture.

○Atsushi Yamazaki, Yumiko Miyazaki
(NBRC, NITE)

Key words *Lipomyces*, Lipomycetaceae, ecology, biodiesel fuel

4P-G007 Smart utilization of jumbo phages for biological control of zoonotic diseases

○Alaaeldin M. Saad[1], Ahmed M. Soliman[2], Hirofumi Nariya[2], Tadashi Shimamoto[2], Takashi Yamada[1], Takeru Kawasaki[1]
([1]Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)
takeru@hiroshima-u.ac.jp

Introduction: Jumbo phages with genome size more than 200 kbp are characterized by their sustainability and broad host range, so they are suitable alternative control for the most of pathogenic bacteria especially zoonotic ones. Some groups tried to isolate jumbo phages but very limited number of these phages have been characterized since their discovery.

Methods and Results: We examined variable sewage samples to screen for jumbo phages infecting Escherichia coli strains. we succeeded to isolate three large phages, two of them have a genome size bigger than 200 kbp determined by PFGE. After that we have tried to read full genome sequences for our three phages by utilizing Next-Generation Sequencing techniques (Illumina, Roche and PacBio). We succeeded to get the full genome sequence for only one phage while we couldn't read any genome sequence of the other phages due to presence of some modifications in their genomes. So for genome sequencing of the second large phage we tried to get its mRNA via propagation with its host and sequencing by illumina. For the third one, we tried to digest its genome by sixteen restriction enzymes and only one enzyme succeeded. So, we made cloning for some of its fragments to help us for genome sequencing. The morphology of our phages under Electron Microscope revealed that they are related to family Myoviridae. Moreover, we found that our phages have broad host range beside E. coli strains they can affect pathogenic Salmonella enteritidis and Shigella sonnei strains.

Smart utilization of jumbo phages for biological control of zoonotic diseases

○Alaaeldin M. Saad[1], Ahmed M. Soliman[2], Hirofumi Nariya[2], Tadashi Shimamoto[2], Takashi Yamada[1], Takeru Kawasaki[1]
([1]Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

Key words phage, zoonotic, host range, sequencing

4P-G008 *Pseudomonas* 属細菌の ABC 輸送体基質結合タンパクと推定されていた新規なアコニット酸イソメラーゼの発見

○平磯 一輝, 滝口 有沙, 丸海老 純也, 桐村 光太郎
（早大・先進理工・応化）
kkohtaro@waseda.jp

【背景・目的】 アコニット酸イソメラーゼ (EC 5.3.3.7, AI) は，*cis*-アコニット酸 (*c*AA) と *trans*-アコニット酸 (*t*AA) の異性化反応を触媒する酵素である[1]．AI 活性は植物や細菌に検出されていたが，AI の酵素的諸性質の解明や遺伝子の同定は行われていなかった．当研究室では，AI 活性を有する *Pseudomonas* sp. WU-0701 を土壌より単離し，当該細菌由来の AI (PwAI) の精製と酵素的諸性質の決定，遺伝子のクローニングと同定に世界で初めて成功した[1]．また，AI を使用したクエン酸からの *t*AA 生産にも成功した[2]．AI のアミノ酸配列は，既知の酵素と相同性をほとんど示さず (10%未満)，AI が新奇な酵素であることが示唆された[1]．本研究では，新規な AI の取得を目的として PwAI のアミノ酸配列と相同性を示す遺伝子産物を対象として，AI 活性の有無について検証した．
【方法】BLAST 検索により，*P. oryzihabitans* NBRC 102199 に PwAI と 90%の相同性を示す ABC 輸送体基質結合タンパクとアノテーションされているタンパク (WP_027599585.1) と，*Escherichia coli* W3110 に 18%の相同性を示す ABC 輸送体モリブデン酸結合タンパク (EcModA) をコードする遺伝子を見出した．それぞれの遺伝子をクローニングし，*E. coli* BL21(DE3) を宿主として組換えタンパクを生産させた．基質を *c*AA または *t*AA とし，既報[1]にしたがって AI 活性を測定した．
【結果・考察】組換え WP_027599585.1 タンパクは AI 活性を示し，タンパク量当りの比較では PwAI の 56%の比活性を示した．一方，EcModA タンパクは AI 活性を示さなかった．以上より，AI 活性を示すタンパクが ABC 輸送体基質結合タンパクとアノテーションされているものの中に潜んでいる可能性が示唆された．

[1] K. Yuhara, et al., FEBS J., 282, 4257-4267 (2015).
[2] K. Kobayashi, et al., Chem.Select, 1, 1467-1471 (2016).

Discovery of novel aconitate isomerase, annotated as an ABC transporter substrate-binding protein in *Pseudomonas*

○Kazuki Hiraiso, Arisa Takiguchi, Junya Maruebi, Kohtaro Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words aconitate isomerase, aconitic acid, ABC transporter substrate-binding protein, *Pseudomounas*

4P-G009 *Xanthomonas campestris* WU-9701 由来 α-グルコース転移酵素を用いた ethyl α-D-glucopyranoside の選択的な高収量生産

○恩田 裕, 中里 美穂, 桐村 光太郎
（早大・先進理工・応化）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】日本酒に約 4 g/L 含まれている ethyl α-D-glucopyranoside（α-EG）は，整肌作用や保湿作用を有するため化粧品素材としての用途がある．しかし，既往の方法では高収量の生産は困難であり，酵素的合成法ではオリゴ糖などの副生があった．演者らは，*Xanthomonas campestris* WU-9701 由来の α-グルコース転移酵素（XgtA）を取得しており[1, 2]，酵素的諸性質を明らかにし，遺伝子クローニングと高発現にも成功している[3]．本研究では，XgtA を使用した ethanol の α-グルコシル化によって，α-EG の選択的かつ高収量の生産を可能にした．
【方法および結果】精製 XgtA を使用して，maltose を糖供与体，ethanol を糖受容体とした酵素反応による α-EG 生産の最適条件を検討した．maltose や glucose，生成物としての α-EG は HPLC により定量した．シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより酵素反応後の生成物を単離精製し，MS と NMR によって α-EG と同定した．反応条件の検討により，酵素量 2.5 U，温度 45°C，pH 8.0，maltose 濃度 1.2 M，ethanol 濃度 0.8 M を最適条件と決定した．この酵素反応により生産される配糖体は α-EG だけで，マルトオリゴ糖などの副生はない．最適条件下 60 h の 1-batch の反応で，42.1 g/L の α-EG 生産に成功した．

[1] H. Nakagawa *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 89, 138-144 (2000).
[2] J. Kurosu *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 93, 328-330 (2002).
[3] T. Sato *et al.*, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 80, 20-17 (2012).

Selective and high-yield production of ethyl α-D-glucopyranoside by α-glucosyl transfer enzyme of *Xanthomonas campestris* WU-9701

○Yutaka Onda, Miho Nakazato, Kohtaro Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words Ethyl alpha-D-glucopyranoside, alpha-glucosidase, Glucosylation, *Xanthomonas campestris*

4P-G010 耐熱性を向上した *Naxibacter* 属由来イソアミラーゼの開発

○馬場 将弘, 佐野 涼子, 伊豫谷 愛, 小川 俊, 堀口 博文, 塩田 一磨, 吉川 潤
（合同酒精・酵素医薬品研）
j-yoshikawa@oenon.jp

【目的】
糖化工業において，デンプン中の α-1，6-グルコピラノシド結合を加水分解する酵素として，プルラナーゼ及びイソアミラーゼが知られている．このうち，プルラナーゼと β-アミラーゼを併用したマルトース製造においては，20%（w/v）以上という高濃度基質存在下で，生成物の蓄積による逆反応を生じることが収率の点で問題になることがある．一方，*Naxibacter haematophilus* などが生産するイソアミラーゼを用いた際は，逆反応が見られない為，より高純度のマルトースが製造できることが知られている．しかしながら，イソアミラーゼは至適温度が 45~55℃と低く，55℃以上である β-アミラーゼと至適反応温度が合致しない点，また，雑菌汚染防止の観点から 60℃以上で反応を行う点より，十分な能力を発揮できていない．そこで本研究は，マルトースの効率的な製造を目的に，耐熱性を向上した *Naxibacter haematophilus* 由来イソアミラーゼの開発を行った．
【方法と結果】
大腸菌においてイソアミラーゼ発現プラスミドを構築し，エラープローン PCR 等で変異導入後，45~70℃の温度範囲で 10 分加熱後の残存活性を測定する方法で，野生型より残存活性が向上した耐熱化株の取得を行った．数種を取得し，変異点を解析した結果，6 種類の耐熱化変異を特定した．それら変異点を最適化し，野生型イソアミラーゼに集約して 6 重変異体を造成後，耐熱性試験を行った結果，野生型に比べて耐熱性が約 10℃向上した．また，デキストリンに β-アミラーゼおよび，野生型または 6 重変異体イソアミラーゼを反応後，生成したマルトース量を HPLC により測定した．その結果，野生型イソアミラーゼを用いた時のマルトース収量が 23.4%だったのに対し，6 重変異体イソアミラーゼを用いた時は 25.4%になり，およそ 108%に歩留りが向上することを確認した*1.
*1 特許公開番号 WO2016088870 A1

Development of heat resistant isoamylase from *Naxibacter haematophilus*

○Masahiro Baba, Ryoko Sano, Ai Iyotani, Shun Ogawa, Hirofumi Horiguchi, Kazuma Shiota, Jun Yoshikawa
(Godo shusei Co., Ltd.Enzyme Pharm. Lab.)

Key words *Naxibacter haematophilus* , isoamylase, heat resistant

4P-G011 好熱性アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来耐熱性酵素が有する UDP-GlcNAc 合成活性の人為的向上

○本田 裕樹[1], 河原林 裕[2]
（[1]奈良女子大・理・化学, [2]産総研）
honda@cc.nara-wu.ac.jp

【背景と目的】*S. tokodaii* strain 7 由来 ST0452 タンパク質は，N 末領域に糖 1 リン酸とヌクレオシド三リン酸から糖ヌクレオチドを合成する活性を，C 末領域にアミノ糖 1 リン酸へのアセチル基転移活性を有する[1,2]．本酵素は高い熱安定性を示す一方，大腸菌由来類縁酵素である GlmU と比較して活性が小さいことが課題である．演者らは，ST0452 タンパク質において基質と相互作用するアミノ酸残基への変異導入による活性向上について検討しており，とくに 97 番目のチロシンをアスパラギンに置換すると GlcNAc-1P と UTP から UDP-GlcNAc を合成する活性が，野生型 ST0452 タンパク質の約 5 倍に上昇することを明らかにした[3]．そこで本研究では，本タンパク質の新たなアミノ酸残基への変異導入によるさらなる活性向上を目指した．
【方法および結果】バクテリア類縁酵素の立体構造中での 97 番目残基の基質との位置情報から，類似の位置関係にある 2 つのアミノ酸残基を変異導入する残基として選択した．各残基を全てのアミノ酸に置換した ST0452 変異体タンパク質を大腸菌で作製し，その熱安定性を確認した．全ての変異体が 80℃，20 分の加熱処理でも変性しないことから，全ての変異体タンパク質は野生型と同等の安定性を有していた．変異体タンパク質の UDP-GlcNAc 合成活性を測定したところ，1 つ目の残基に変異を導入したものでは全てのアミノ酸への置換で活性が大きく低下した．もう 1 つの残基では，5 種類のアミノ酸に置換した際，野生型 ST0452 タンパク質よりも高い活性を示し，最も高いものでは野生型の 3 倍を超える活性を示した．さらに多重変異の導入についても検討する予定である．

[1] Zhang Z, et al., J. Biol. Chem., 280, 9698-9705 (2005).
[2] Zhang Z. et al., J. Bacteriol., 192, 3287-3293 (2010)
[3] Honda Y, et al., Appl. Environ. Microbiol., 83, e02291-16 (2017).

Increase of sugar-1-phosphate nucleotidylyltransferase activity of archaeal thermophilic bifunctional ST0452 protein without decreasing of its stability

○Yuki Honda[1], Yutaka Kawarabayasi[2]
([1]Fac. Sci., Nara Women's Univ., [2]AIST)

Key words site-directed mutagenesis, ST0452, *Sulfolobus tokodaii*, UDP-GlcNAc

4P-G012 酵素触媒タンパク質架橋法によるキチナーゼ集合体の設計と機能評価

○田中 悠佑[1], 南畑 孝介[1], 平良 東紀[2], 神谷 典穂[1,3]
（[1]九大院・工, [2]琉球大・農, [3]九大・未来化セ）
kamiya.noriho.367@m.kyushu-u.ac.jp

抗真菌薬は医薬品や農薬として現在幅広く用いられているが，人に対する副作用が課題となっている．キチン加水分解酵素キチナーゼは真菌細胞壁に特有なキチンを分解することで抗真菌活性を示すことから，副作用の少ない抗真菌薬への利用が期待されている．本研究では，モデルとしてリュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ (ChiA) を選択し，酵素反応を用いた部位特異的な架橋反応により，高い真菌活性を発現する人工キチナーゼ集合体の創製を目指した．キチナーゼ集合体の形成には，西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) 触媒反応によるペプチドタグ選択的なタンパク質架橋化法を採用した．
まず，遺伝子工学的手法により，両末端にチロシンを含むペプチドタグ (Y-tag) を導入した ChiA (Y-ChiA-Y) を調製した．Y-ChiA-Y についてキチン分解触媒活性を測定したところ野生型 ChiA より若干高い活性を示し，ペプチドタグの導入は活性に悪影響を与えないことが示された．次に，Y-ChiA-Y を含む溶液に，HRP と過酸化水素を適量添加することで，チロシン部位の酸化的重合反応を開始し，末端 Y-tag 同士の架橋を介して ChiA の高分子量集合体を調製することに成功した．ChiA 集合体についても同様にキチン分解触媒活性を測定したところ，単量体と集合体ではほぼ同程度の活性を示し，集合体化による大幅な活性の上昇は見られなかったが，活性の向上に繋がる集合体の設計方針を示唆する結果を得た．発表では，抗真菌活性に関する基礎評価の結果も報告したい．

Design and functional evaluation of functional chitinase assembly by an enzymatic cross-linking strategy

○Yusuke Tanaka[1], Kousuke Minamihata[1], Toki Taira[2], Noriho Kamiya[1,3]
([1]Fac. Eng., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [3]CFC, Kyushu Univ.)

Key words chitin, enzyme, protein polymer

4P-N013 *Streptomyces thermodiastaticus* 由来耐熱，好酸性キチナーゼの諸性質の検討

○武 慶太郎, 藤木 英寿, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】キチンは N-アセチルグルコサミンが β-1,4 結合した，セルロースに次いで豊富な生物資源である．キチナーゼ (EC.3.2.1.14)は，キチンの加水分解を触媒する酵素であり，キチン含有資源の分解に利用されている．通常キチン処理は高温かつ極端な pH 条件下で行われることから，キチンの分解に使用する酵素には，厳しい環境に耐性を持つものを使用した方が有利である．本研究では，中度好熱性細菌である *Streptomyces thermodiastaticus* が持つキチナーゼ遺伝子をクローニングし，精製酵素の諸性質を検討した．

【方法・結果】
Streptomyces thermodiastaticus が生産する多種類のキチナーゼのうち，Chi1 と名付けた酵素の遺伝子配列を同定し，増幅を行った．増幅断片を pET21a に組み込み，*E. coli* Rosetta-Gami B 株を宿主として長さの違う 2 種類の酵素を発現させた．
精製後の Chi1Δnp は，低 pH 領域において活性を示さなかったが，Chi1ΔnpHis は，低 pH 領域でも顕著な活性を示した．Chi1 の配列と高い相同性を持つ *Streptomyces thermoviolaceus* 由来の Chi40 は，Chi1 とは異なる pH 領域を至適としていた．この違いの要因を，今後解明していく．

Thermostable and acidic chitinase from *Streptomyces thermodiastaticus*

○Keitaro Take, Hidehisa Fujiki, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

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

4P-N014 サルコシンオキシダーゼの合理的な変異による L-チオプロリンオキシダーゼへの改変

○黒部 督恵, 岡島 奨, 吉田 知左, 西矢 芳昭
（摂南大・生命科学）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

【背景および目的】 サルコシンオキシダーゼ（Sox（EC1.5.3.1））はサルコシンの酸化的脱メチル化を触媒する酵素であり，さらにサルコシンと構造的に類似性のある L-プロリンに対しても非常に微弱な反応性を有する．われわれは，Sox の構造モデルをもとに行った基質とのドッキングシュミレーションより，L-チオプロリンの方が L-プロリンよりも親和性が高いと予想し，実験的に検証した．さらに，Sox の L-チオプロリンに対する反応性を高める変異を L-チオプロリンの結合モデルからデザインし，その変異酵素の活性評価を行ったので報告したい．
【実験方法および結果】 はじめに，ソフトウェア MOE を用いて Sox と基質の結合モデルを作成し，Sox を構成するアミノ酸のうち L-チオプロリンとの反応に関与するアミノ酸を Y254 であると推察した．インバース PCR により Y254 の変異体を種々作成し，精製後，サルコシンと L-チオプロリンに対する比活性を調べた．その結果，254 番目のアミノ酸が V よりも小さいもの（A or G）に置換されると L-チオプロリンへの反応性が向上した．Y254A および Y254G は，サルコシンよりもむしろ L-チオプロリンに対して高い反応性を示した．
【結論】 ドッキングシュミレーションにより，L-チオプロリンと反応性の高い Sox 変異体を予測し，そのことを実験的に確認した．本酵素の構造と性能の関連について，引き続き検討したい．

L-Thioproline oxidase modified from sarcosine oxidase by a rational mutation

○Masae Kurobe, Tasuku Okajima, Tisa Yoshida, Yoshiaki Nishiya
(Life Sci.,Setsunan Univ.)

Key words sarcosine oxidase, L-thioproline, L-proline, substrate specificity

4P-N015 サルコシンオキシダーゼの基質親和性および基質特異性の改良に関する基礎的検討

○松本 美徳, 竹本 淳一, 山本 眞知, 西矢 芳昭
（摂南大・生命科学）
nishiya@lif.setsunan.ac.jp

[背景および目的] 腎機能評価のマーカーであるクレアチニンは，酵素法により高い精度で測定されている．クレアチニン測定酵素法はクレアチニナーゼ・クレアチナーゼ・サルコシンオキシダーゼ(Sox)によりクレアチニンを過酸化水素に導き発色定量する．しかし Sox は基質との親和性が高いとは言えず安定性も低いため，この 2 点を改善していく必要があった．そこで我々は，好熱性光合成細菌由来 Sox(SoxCa)をインシリコ・スクリーニングし，高基質親和性と高熱耐性を有することを見出した．今回，Sox の基質親和性および基質特異性の改良を目的とし，サルコシンの類似物質に対するキネティックパラメータの算出および SoxCa のみに存在する Q255 の役割を検討した．

[実験方法および結果]サルコシンの類似物質に対するキネティックパラメータを Linweaver-Burk plot により算出した．また，構造モデルより基質親和性に影響を与えていると予想された Q255 に変異を導入し，その役割を調べた．
結果として，SoxCa はサルコシンより側鎖の大きいアミノ酸との反応性，特に親和性がかなり高い．これは，活性中心付近の構造モデルからの予想と一致した．一方，Q255 変異体は側鎖サイズが小さくなるほど Km 値が大きくなり，最大で 14 倍ほどの差が見られた．このことから Q255 はサルコシンに対する酵素反応，特に基質親和性において非常に重要であると分かった．

[結論]SoxCa の高基質親和性は，１残基の貢献であることが分かった．また，基質特異性と酵素構造に相関が認められた．Sox の技能改良に本知見を活かしたい．

Investigation of improving substrate affinity and specificity of sarcosine oxidase

○Minori Matsumoto, Junichi Takemoto, Machi Yamamoto, Yoshiaki Nishiya
(Life Sci,Setsunan Univ.)

Key words sarcosine oxidase, substrate affinity, substrate specificity, active site structure

4P-G016 好熱性真菌 D-アスパラギン酸オキダーゼの機能解析と基質親和性の向上

○高橋 祥司, 大杉 航平, 新保 晃, 阿部 勝正, 解良 芳夫
（長岡技科大院・生物機能工）
shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景・目的】D-アスパラギン酸オキダーゼ（DDO）は酸性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD を補酵素とするフラビン酵素である．DDO は真核生物に広く見出されているが，原核生物には見出されていない．DDO は酸性 D-アミノ酸の検出・定量やアミノ酸ラセミ体の光学分割などに有用であることから，高い安定性と触媒能を有する DDO が求められている．我々はゲノムデータベースの探索から好熱性真菌 *Thermomyces dupontii* に DDO 遺伝子（TdDDO）を見いだした．そこで本研究では，大腸菌で発現させた TdDDO を精製し，その諸特性を解析した．また，部位特異的変異導入による基質親和性の向上を検討した．
【方法・結果】TdDDO を His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させたところ，その精製酵素は酸性 D-アミノ酸および D-Gln を基質とし，D-Glu を最もよい基質とする DDO であった．また，DDO 競争阻害剤で阻害された．TdDDO はフラビン酵素特有の吸収スペクトルを示し，基質との反応により吸収極大は消失した．至適温度は 60℃であり，この時 D-Glu に対する k_{cat}/K_m 値は 104,000 s^{-1} M^{-1} であった．50％失活温度は約 51℃であり，既知の DDO よりも高い熱安定性を有していた．また，FAD の添加により熱安定性の増加が観察された．TdDDO 三次元構造モデルにおいて，既知 DDO で保存されている基質と相互作用する Tyr 残基が観察されなかったことから，同位置に存在する Phe248 残基を Tyr 残基に置換した変異体を作成したところ，触媒活性は低下したが基質親和性の向上が観察された．

Characterization of D-aspartate oxidase of a thermophilic fungus and improvement of its substrate-binding affinity

○Shouji Takahashi, Kohei Osugi, Akira Shinbo, Katsumasa Abe, Yoshio Kera
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ. Tech.)

Key words D-aspartate oxidase, thermophilic fungus, *Thermomyces dupontii*, site-directed mutagenesis

4P-E017 不斉水酸化反応とアミノ基立体転換反応を組み合わせた酵素法による(2*R*)-ヒドロキシアミノ酸の生産

○日比 慎[1,2], 角田 洋輔[3], 北澤 宏明[3], 岸本 高英[3], 杉山 明生[3], 小園 祥子[4], 高橋 里美[1], 小川 順[4]
（[1]京大院・農, [2]富山県大・生工研セ, [3]東洋紡, [4]京大院・農）
ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】
2*R* 体ヒドロキシアミノ酸は天然にも見出されているアミノ酸であるが，複数の不斉点を持ち，選択的合成が困難であることから，その機能性に関する知見に乏しい．これまでに我々は高い活性と選択性を持つ酵素触媒として，*N*-スクシニル-L-アミノ酸ヒドロキシラーゼ，*N*-スクシニルアミノ酸ラセマーゼ，および *N*-スクシニル-D-アミノ酸デスクシニラーゼをそれぞれ微生物より取得している．本研究では，これらの酵素触媒をタンデムに組み合わせたバイオプロセスを構築することで，多様な構造を持つ 2*R* 体ヒドロキシアミノ酸を汎用的に生産する手法を検討した．高光学純度の 2*R* 体ヒドロキシアミノ酸を調製して評価・解析することで，有用な機能性を持つ新規な分子種として開発することを目的としている．
【方法・結果】
Burkholderia ambifaria AMMD 株由来 *N*-スクシニル-L-アミノ酸ヒドロキシラーゼ（SadA），*Chloroflexus aurantiacus* 由来 *N*-スクシニルアミノ酸ラセマーゼ（NSAR），*Cupriavidus* sp. P4-10-C 株由来 *N*-スクシニル-D-アミノ酸デスクシニラーゼ（DSA）をそれぞれ発現した組み換え大腸菌の菌体を触媒として用いたタンデム酵素反応系を構築した．本タンデム酵素反応系において，まず SadA の作用により *N*-スクシニル-(2*S*)-アミノ酸の 3 位が不斉水酸化され *N*-スクシニル-(2*S*)-3-ヒドロキシアミノ酸が生じる．次いで NSAR と DSA を利用した動的光学分割によりアミノ基の立体転換が起こり，(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸が生成する．この過程において，基質から(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸への変換における理論収率は 100%となる．これまで本反応系により様々な脂肪族(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸がグラムスケールで調製可能となっている．また本反応系に用いる触媒を変更することで，(2*R*)-4-ヒドロキシアミノ酸類など希少性の高い分子種の生産法への応用も検討している．

Enzymatic production of (2*R*)-hydroxyamino acids by the coupling of assymetrical hydroxylation and stereoinversion

○Makoto Hibi[1,2], Yosuke Sumida[3], Hiroaki Kitazawa[3], Takahide Kishimoto[3], Akio Sugiyama[3], Shoko Kozono[4], Satomi Takahashi[1], Jun Ogawa[4]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [3]TOYOBO Co., LTD., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words (2*R*)-hydroxyamino acid, *N*-succinyl-L-amino acid 3-hydroxylase, *N*-succinylamino acid racemase, *N*-succinyl-D-amino acid desuccinylase

4P-G018 進化工学的手法を用いた放線菌由来 L-グルタミン酸オキシダーゼの熱安定性の向上

○林 優花[1], 中村 誠彌[1], 酒瀬川 信一[2], 杉森 大助[1]
（[1]福島大・共生システム理工, [2]旭化成ファーマ）
sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp

【背景・目的】我々は，これまでに *Streptomyces* sp. NT1 から新規 L-グルタミン酸オキシダーゼ（$LGOX_{NT1}$）を見出し，大腸菌による組換え発現を行った．本酵素は，既報 LGOX のうち最も高い比活性と耐熱性に匹敵するレベルを有するものの，実用化にはさらに高い比活性と耐熱性が要求される．また，高い耐熱性を得るには組換え生産酵素のプロテアーゼ処理が必要であることも技術的課題となっている．そこで，進化工学的手法を用いて $LGOX_{NT1}$ の熱安定性の向上を試みた結果，プロテアーゼ処理なしでも耐熱性を 5℃向上させることに成功した．現在，我々はさらなる耐熱性向上を目指し，温度因子（B-factor）に基づいた変異導入を進めている．
【方法・結果】$LGOX_{NT1}$ の立体構造モデルを作成し，その座標データから B-factor を算出することにより，酵素分子中で揺らぎが大きいペプチド領域とアミノ酸残基を予測した．その結果，B-factor が高いアミノ酸が多数検出された．なかでも，N190，D361，D397，R453，F537 の B-factor が特に高いことがわかった．耐熱性向上に効果的な変異導入部位をスクリーニングするために，エラープローン PCR によるランダム変異導入を行った．その結果，複数の変異体で耐熱性が向上した．そのうち，変異体 No. 42（MT_42）は，比活性 2.42 U/mg-protein，60℃で 30 min 活性低下が認められず，既知 LGOX よりも高い比活性と耐熱性を有していた．MT_42 の変異導入部位を確認したところ，D397 が Glu に置換されていることがわかった（D397E）．この結果から，B-factor の計算から理論的に導かれた変異導入部位と実験結果が一致することがわかり，B-factor による変異導入部位の推定の有用性が示唆された．そこで，$LGOX_{NT1}$ のさらなる耐熱化を目指し，B-factor を指標とした変異導入と解析を進めている．

Thermostability improvement of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. NT1 by evolutionary engineering approach

○Yuka Hayashi[1], Masaya Nakamura[1], Shinichi Sakasegawa[2], Daisuke Sugimori[1]
([1]Fac. Symbio. Syst. Sci., Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma)

Key words L-glutamate oxidase, thermostability, evolutionary engeneering, B-factor

4P-N019 ジペプチド Trp-His 合成能を有する $_L$-アミノ酸エステラーゼのクローニングと諸性質の検討

○牧 慶子[1], 田中 貴大[1], 高木 一好[2], 林 順司[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学・生工, [2]立命館大院・生命科学・応化）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

[目的] Trp-His は細胞内の Ca^{2+}濃度を調節する Ca^{2+}チャネルブロッカーであり，唯一の血管拡張作用ジペプチドとして，アテローム性動脈硬化の発症を防止する．これまでにテトラペプチド Lys-Arg-Glu-Ser の抗アテローム性動脈硬化に関する研究が報告されているが，トリペプチドより長いペプチド鎖は，小腸の上皮細胞の粘膜に吸収されない．既存のアテローム性動脈硬化治療薬である Ca^{2+}チャネル拮抗薬は心臓疾患患者への投与が忌避されるが，Trp-His は併発していても使用可能である．しかし，Trp-His が非常に高価であることから，健康食品や医薬品への利用が進みにくいのが現状である．そこで本研究では，$_L$-アミノ酸エステラーゼを用いて Trp-OMe および His から Trp-His の効率的な酵素的合成の確立を目的とし，土壌微生物のスクリーニングを行い，*Pseudomonas* sp. KM1 由来 $_L$-アミノ酸エステラーゼ(KM1LAE)が高い Trp-His 合成能を持つことを見出した．今回は KM1LAE のクローニングおよび諸性質の検討を行ったことを報告する．

[方法・結果] *Pseudomonas* sp. UW4 由来 S9 peptidase からプライマーを設計し，*Pseudomonas* sp. KM1 のゲノムより PCR によって目的遺伝子の増幅を試みた．得られた DNA 断片を pCold TEV ベクターに組込み，大腸菌 BL21 (DE3)株に導入した．さらに，His tag アフィニティー，陰イオン交換，およびゲル ろ過クロマトグラフィーにより，酵素の精製を行った．最終精製酵素は，精製倍率 17.26 倍，比活性 22.15 μmol/min/mg (50 mM トリブトファニルメチルエステル，300 mM ヒスチジン，40℃，pH 9.0，30 分反応)を示した．本酵素の至適 pH は 9.5，至適温度は 45℃，安定温度は 30℃~45℃，安定 pH は 7.0~9.0 であった．組換え体酵素と *Pseudomonas* sp. KM1 由来，高度精製酵素標品が同様の諸性質と分子量を示したことより，クローニングした DNA を KM1LAE 遺伝子と判断した．

Gene cloning, purification and characterization of $_L$-amino acid esterase catalyzing synthesis of dipeptide Trp-His

○Keiko Maki[1], Takahiro Tanaka[1], Kazuyosi Takagi[2], Junji Hayashi[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Biotechnol., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Applied. Chem., Graduate School of Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words dipeptide, Trp-His, L-amino acid esterase, gene cloning

4P-N020 *Pseudomonas nitroreducens* 由来 γ-グルタミルトランスペプチダーゼの構造と機能に関する研究

○佐野 千晴[1], 岡住 脩平[1], 今岡 大士[1], 日并 隆雄[2], 林 順司[1], 若山 守[1]
（[1]立命館大院・生命科学, [2]福井県大・生物資源）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は，細菌から哺乳類に至る多くの生物が有する酵素であり，γ-グルタミル化合物の γ-グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドなどの γ-グルタミル基受容体へ転移する反応と，γ-グルタミル化合物の加水分解を触媒する．本研究では，テアニンの合成に優れ，既報の GGT とは異なる特性を示す *Pseudomonas nitroreducens* 由来の GGT (PnGGT) に着目した．この酵素の反応特性に関わるアミノ酸残基を，PnGGT の立体構造に基づき，W385，F417 および W525 と推定した．本研究では，W385，F417 および W525 における変異型酵素を作製し，PnGGT の反応におけるこれらのアミノ酸残基の機能を解明することを目的とした．

【方法および結果】1 アミノ酸変異型である W385T，F417Y および W525A，2 アミノ酸変異型である W385T&F417Y および F417Y&W525A，そして 3 アミノ酸変異型である W385T&F417Y&W525A を作製後，それぞれ精製し，酵素を単一化した．活性測定の結果，全変異型酵素において野生型酵素と比較すると加水分解活性が減少し，転移活性が増大した．さらに基質の立体選択性を比較したところ，W525A のみ野生型酵素や他の変異型酵素とは異なる性質を示した．PnGGT の反応における W525 の役割をより詳細に検討するため，W525 における変異型酵素を更に作製し，反応特性を比較した．その結果，6 種類の変異型酵素 (W525V，W525A，W525G，W525S，W525D，W525K) では転移活性が加水分解活性を上回った．中でも W525D では，加水分解活性に対する転移活性の比が 19.6 と，野生型酵素の 0.26 に比べて大幅に増加した．一方，変異型酵素の中で W525F のみ，野生型酵素と同じく加水分解活性が転移活性を上回った．以上の結果より，W525 の位置における芳香族側鎖が，PnGGT の反応特性に関与しているということが示唆された．

Structure and characteristics of γ-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*

○Chiharu Sano[1], Shuhei Okazumi[1], Masashi Imaoka[1], Takao Hibi[2], Junji Hayashi[1], Mamoru Wakayama[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]Fac. Biotechnol., Fukui Pref. Univ.)

Key words gamma-glutamyltranspeptidase, mutants, substrate specificity

4P-G021 D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離とその D-アミノ酸オキシダーゼの酵素学的諸特性の解析

○七五三掛 湧也, 高橋 祥司, 阿部 勝正, 解良 芳夫
（長岡技科大院・生物機能工）
shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp

【背景・目的】D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）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 FAD 酵素である．これまでに，DAO はバクテリアからヒトに至る生物種に広く見出されている．DAO は抗生物質原料である 7-アミノセファロスポラン酸の生産や D-アミノ酸の検出・定量などに有用である．したがって，高安定性および高活性でかつ多様な基質に作用する DAO が求められている．真菌由来 DAO は高活性かつ広基質特異性を有することから，好熱性真菌由来 DAO は高い安定性を有しかつ高活性・広基質特異性を有すると考えた．そこで本研究では，D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離とその DAO 遺伝子の探索および大腸菌で発現させた好熱性真菌 DAO の諸特性解析を検討した．
【方法・結果】堆肥懸濁液を抗生物質を含む PDA 培地に塗布し，50℃で培養を行ったところ 3 株の糸状菌が生育した．これら糸状菌はいくつかの D-アミノ酸を窒素源とした培地上で生育した．これら糸状菌の ITS 領域の塩基配列解析から，1 株は *Rasamsonia emersonii*，他は *Thermomyces dupontii* と同種であることが判明したため，それぞれ *R. emrsonii* YA1 株，*T. dupontii* PB1 および PE1 株と名付けた．*R.emrsonii* YA1 株から DAO ホモログ遺伝子（ReDAO 遺伝子）を単離したところ，その推定アミノ酸配列には DAO の触媒活性に重要なアミノ酸残基が全て保存されていた．ReDAO 遺伝子の cDNA を合成し，大腸菌において His タグ融合タンパク質として発現させた．その粗抽出液の DAO 活性を測定したところ，ReDAO は多様な D-アミノ酸に対して活性を示した．現在，大腸菌で発現させた ReDAO の酵素学的諸特性を解析している．

Isolation of thermophilic fungi capable of assimilating D-amino acids and the enzymatic characteristics of a thermophilic fungal D-amino acid oxidase

○Yuya Shimekake, Shouji Takahashi, Katsumasa Abe, Yoshio Kera
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Nagaoka Univ. Tech.)

Key words D-amino acid oxidase, thermophilic fungus, *Rasamsonia emersonii*, enzyme characteristics

4P-N022 食品中アクリルアミド低減に向けた L-アスパラギナーゼ高生産乳酸菌の探索及び諸性質の検討

○古川 慎, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【目的】L-アスパラギナーゼは，L-アスパラギンを加水分解して L-アスパラギン酸とアンモニアを生じる反応を触媒する酵素である．現在，L-アスパラギナーゼは白血病およびリンパ腫の治療薬として利用されている．食品においては，発がん性物質であるアクリルアミドの低減化剤として注目されている．アクリルアミドは食品を高温加熱処理する際に形成され，アスパラギンがアクリルアミドの重要な前駆体であることが報告されている．
乳酸菌は，多くが食品から見出されていることから，幅広く食品に利用されている．しかし，乳酸菌由来アスパラギナーゼに関する報告はほとんどない．本研究では，加工食品中のアクリルアミド低減化剤としてアスパラギナーゼを応用することを目的として，乳酸菌アスパラギナーゼの網羅的な探索および L-アスパラギナーゼの精製，諸性質の検討を行った．
【方法・結果】乳酸菌 10 菌株より，高い L-アスパラギナーゼ活性を有する乳酸菌の探索を行った．L-アスパラギナーゼ活性の検出にはネスラー法を用いた．その結果，*Streptococcus thermophilus*，次いで *Lactococcus lactis subsp. cremoris* に強い L-アスパラギナーゼ活性が見られた．そこで，*S. thermophilus* 由来 L-アスパラギナーゼ遺伝子を pET28a(+)ベクターに組込み，大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて L-アスパラギナーゼ (StAsn) の発現系を構築した．最終精製 StAsn は，精製倍率 28.5 倍，比活性 46.98μmol/min/mg を示した (30mM L-アスパラギン，pH 7.0，30℃，15 分反応)．また，StAsn は至適 pH8.5，至適温度 50℃であり，pH7.0-9.0，50℃以下で 70%以上の活性を維持した．次いで，*L. lactis subsp. cremoris* 由来 L-アスパラギナーゼ遺伝子についても上記と同様の方法でクローニングし，大腸菌における L-アスパラギナーゼ (LcAsn) の発現系を構築し，精製を行った．

Screening of lactic acid bacteria highly producing $_L$-asparaginase for acrylamide reduction in food and characterization of $_L$-asparaginase

○Makoto Furukawa, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words $_L$-asparaginase, acrylamide, lactic acid bacteria

4P-N023 L-アミノ酸エステラーゼによるイミダゾールペプチドの酵素合成に関する研究

○小塩 茂々子, 林 順司, 若山 守
（立命館大院・生命科学・生工）
wakayama@sk.ritsumei.ac.jp

【背景と目的】イミダゾールペプチドとは，イミダゾール基を含むペプチドのことであり，本研究では，カルノシン(β-アラニルヒスチジン)及びホモカルノシン(GABA-ヒスチジン)に注目した．カルノシンは，哺乳動物の筋肉や脳，心臓中に多く存在しており，抗酸化作用や疲労回復効果，抗老化作用を有している．ホモカルノシンは，哺乳動物の骨格筋や脳，脳髄液中に存在しており，抗酸化剤や神経伝達物質，金属キレート剤としての機能を有している．イミダゾールペプチドの既知の生産法では，食料との競合や，低い合成効率といった欠点がある．そこで，本研究では，L-アミノ酸エステラーゼにより β-アラニンのメチルエステルもしくは γ-アミノ酪酸のメチルエステルとヒスチジンからそれぞれカルノシンとホモカルノシンを酵素合成する方法を確立することを目的とし，土壌からイミダゾールペプチド合成能を有する L-アミノ酸エステラーゼを生産する菌のスクリーニング，菌の同定，及び L-アミノ酸エステラーゼの精製と精製酵素の諸性質の検討を行った．
【方法と結果】比色法，および HPLC を用い，日本各地の土壌よりイミダゾールペプチド合成能を有する微生物のスクリーニングを行った．その結果，単離した菌株のうち，*Chryseobacterium* 属菌の一種に最も高い合成活性が見られた．*Chryseobacterium* sp. MK-4 由来の L-アミノ酸エステラーゼにおける合成活性は，ホモカルノシンよりもカルノシンの方が高かった．L-アミノ酸エステラーゼを精製倍率 16.2 倍，比活性 48.6 nmol/min/mg まで精製した．L-アミノ酸エステラーゼは 25-30℃，pH 6.5-10.0 の範囲で安定であり，最適反応条件は，25℃，pH9.5 だった．

Enzymatic synthesis of imidazole peptides using L-amino acid esterase

○Momoko Koshio, Junji Hayashi, Mamoru Wakayama
(Biotechnol., Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words L-amino acid esterase, carnosine, homocarnosine, imidazole peptide

4P-G024 プロリン生合成系酵素 GPR の機能解析 ~γ-glutamyl cysteine 合成の観点から~

村田 瑠偉[1], ○松浦 秀幸[1], 蓮池 友香[1], 赤石 健児[1], 川下 理日人[2], 原田 和生[1], 平田 收正[1]
（[1]阪大院・薬, [2]近畿大・理工）
hmhide@phs.osaka-u.ac.jp

プロリンは，タンパク質合成のみならず，細胞のストレス応答等に深く関与する重要なアミノ酸である．大腸菌や酵母などの微生物では，グルタミン酸を初発物質とする一段階目の反応を GK (γ-glutamyl kinase)，続く二段階目の反応を GPR (γ-glutamyl phosphate reductase)が触媒する（高等植物や動物の場合，GK 及び GPR ドメインからなる二機能性酵素がこれら二つの反応を触媒する）．ところが近年大腸菌において，GK によって産生される γ-glutamyl phosphate がシステインと反応することにより，γ-EC (γ-glutamyl cysteine; 抗酸化物質グルタチオン[GSH]の前駆体)が合成されることが示された(Nat. Chem. Biol, 2011)．本研究では，プロリン生合成酵素の機能進化プロセスの解明を目的とする研究の一貫として，緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 GPR (CrGPR)のクローニング及び大腸菌由来 GPR (EcGPR)との機能比較解析を行う中で，GPR が GK を介した γ-EC 合成を規定する重要な因子であることを示す結果を得たので報告する．
クローニングした CrGPR 配列を解析したところ，大腸菌や酵母由来の GPR と比較して N 末端側に約 200 アミノ酸残基長の余分配列を有していた．精製組換え酵素を用いて酵素活性評価を行ったところ，CrGPR は EcGPR と同様，プロリン生合成における二段階目の反応の触媒活性を有している一方，特徴的な N 末端側領域に GK 活性は認められなかった．一方で CrGPR には，EcGPR とは異なり，GK を介した γ-EC 合成を誘導する活性がほぼ認められなかった．しかし CrGPR の特定のアミノ酸残基を大腸菌と同様のアミノ酸残基に変化させたところ，CrGPR の γ-EC 合成誘導活性が著しく増加した．これらの結果から GPR は，重要なストレス応答物質であるプロリンと GSH の生合成経路の分岐を制御する因子である可能性が示された．

Functional analysis of a proline biosynthetic enzyme GPR ~from the viewpoint of γ-glutamyl cysteine synthesis~

Rui Murata[1], ○Hideyuki Matsuura[1], Yuka Hasuike[1], Kenji Akaishi[1], Norihito Kawashita[2], Kazuo Harada[1], Kazumasa Hirata[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci.&Eng., Kinki Univ.)

Key words proline, *Chlamydomonas reinhardtii*, gamma-glutamylcysteine

4P-G025 ペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素 QhpD における架橋形成配列長および配列特異性の解析

○小酒井 一輝[1], 中井 忠志[2], 谷澤 克行[1], 岡島 俊英[1]
（[1]阪大・産研, [2]広島工大・生命）
tokajima@sanken.osaka-u.ac.jp

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素をコードする *qhp* オペロンには，小サブユニット QhpC の翻訳後修飾に関わるタンパク質がコードされている．そのうち QhpD は *S*-アデノシル-L-メチオニン（SAM）を用いて各種の難化学反応を触媒するラジカル SAM 酵素であり，QhpC 内の特定の Cys 残基と Glu/Asp 残基の間において，分子内チオエーテル架橋を 3 ヵ所形成する．これら架橋は，Cys 残基が常に Glu/Asp 残基の 6〜9 残基前に存在し，架橋で生じるキラル炭素原子がすべて *S* 型の立体配置をとる共通性をもつため，QhpD の活性部位が基質特異性を決定していると推定される．一般的にペプチドは環状化により様々な生理機能が付与されるため，ペプチドの分子内架橋により環状構造を形成する QhpD の触媒機構を解明することは，新規の機能性環状ペプチドの創出にも有用である．私たちはこれまでに *Paracoccus denitrificans* 由来の QhpD を用いて，QhpC の *in vitro* 架橋反応系を確立し，SAM と還元剤（$Na_2S_2O_4$）の存在下で架橋形成に成功している．QhpC は N 末端 28 残基のリーダー配列の下流に 3 ヵ所の架橋部位もつが，リーダー配列と 1 番目の架橋部位（CTTSFDPGWE）のみの短縮型（sQhpC）でも，QhpD によって *in vitro* で反応が進行する．そこで，sQhpC をベースとした各種コンストラクトを作成し，架橋形成部位間の配列長およびその配列特異性について検討した．
まず，架橋ループの長さに着目し，複数の変異体を基質として活性を測定した結果，架橋ループが 5, 7, および 8 残基であれば架橋形成することが判明した．さらに，架橋ループの配列特異性を明らかにするため，架橋ループを 8 残基に固定したランダム変異体を用いて解析を行ったところ，ある程度の配列許容性があることがわかった．現在，クローン数を増やして解析を進めており，その傾向について報告したい．

Loop length and sequence specificity for peptide intramolecular thioether crosslinks catalyzed by QhpD

○Kazuki Kozakai[1], Tadashi Nakai[2], Katsuyuki Tanizawa[1], Toshihide Okajima[1]
([1]ISIR, Osaka Univ., [2]Fac. Life Sci., Hiroshima Inst. Technol.)

Key words radical SAM enzyme, thioether bond, cyclic peptide

4P-G026 キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素のキノン補酵素含有サブユニットの翻訳後修飾機構

○大関 俊範[1], 中井 忠志[2], 谷澤 克行[1], 岡島 俊英[1]
（[1]阪大・産研, [2]広島工大・生命）
toshinori-oozeki44@sanken.osaka-u.ac.jp

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素は，各種のグラム陰性細菌において一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒するヘテロ三量体酵素である．最小の γ サブユニット（QhpC）は，ユニークな 2 種類の翻訳後修飾として，3 つの分子内チオエーテル架橋，および Trp 残基と Cys 残基から形成されたキノン補酵素システイントリプトフィルキノン（CTQ）を含有している．チオエーテル架橋形成は酵素オペロンにコードされた *qhpD* が関与している一方で，CTQ 形成に関与する因子は不明である．これまでに，遺伝子破壊実験の結果，オペロン内の別遺伝子 *qhpG* が CTQ 形成に必須であることが判明している．そこで，本研究は QhpG に着目し，QhpC の翻訳後修飾，特に CTQ 形成に果たす役割を解明することを目的としている．最終的に CTQ 形成に伴うペプチド環状化を利用した機能性ペプチドの創成を目指している．
まず大腸菌発現系を用いて *Pseudomonas putida* QhpG の調製を試みた．その結果，精製 QhpG は酸化型 FAD を結合しており，配列上 FAD 含有オキシゲナーゼと相同性を示すこととも合致した．おそらく，QhpG は CTQ 前駆体 Trp 残基の特異的な水酸化反応に関わると推測される．一方，QhpD と QhpC を共発現し，精製された複合体を用いて，試験管内で QhpC のチオエーテル架橋形成を試みたが，不十分な架橋形成しか起こらなかった．各種の反応条件を探索したところ QhpG を QhpD/QhpC 複合体に添加することによって，QhpC の架橋形成が促進され，試験管内で完全な架橋形成が起こることが判明した．さらに，Native-PAGE による解析の結果，架橋の有無に関わらず QhpC/QhpD/QhpG は 3 者複合体を形成することがわかった．これらの結果は，QhpC の架橋形成が 3 者複合体において進行することを示唆している．さらに QhpG による反応も同一複合体上において起こるものと考え，現在解析を進めている．

Mechanism of posttranslational modification of the quinone cofactor-containing small subunit in quinohemoprotein amine dehydrogenase

○Toshinori Oozeki[1], Tadashi Nakai[2], Katsuyuki Tanizawa[1], Toshihide Okajima[1]
([1]Osaka Univ., ISIR., [2]Hiroshima Inst. of Tech., Fac. of Life Sci.)

Key words post-translational modification, cross-linked peptide, quinone cofactor, monooxygenase

4P-N027 放線菌由来 M24 アミノペプチダーゼ特異性に関する新たな知見

○畑中 唯史[1], 万 クン[1], 裏地 美杉[1], 中東 良太[2]
([1]岡山生物研, [2]ナガセケムテックス（株））
hatanaka@bio-ribs.com

【背景および目的】 放線菌は，様々なタンパク質を菌体外に分泌することが知られ，タンパク質生産の有用宿主として，近年注目を集めている．M24 ファミリーに属するアミノペプチダーゼ（M24AP）は，亜鉛を活性中心にもち，Xaa-Pro ペプチド特異的作用し，N 末端からアミノ酸を遊離させる活性をもつと報告されてきた 1)．今回我々は，カゼイン消化物に含まれる 2 種の苦味およびアレルゲンペプチドをモデルに，*S. lividans* 1326 株を宿主として発現させた放線菌由来 M24AP のペプチド分解能力を評価した．
【方法および結果】 放線菌由来の市販 M24AP（ナガセケムテックス（株）製，デナチーム XPO DUET）を，陰イオン交換体で精製し，ウシ由来カゼインのトリプシン・キモトリプシン消化物のペプチド（VLPVPQK, FFVAPFPEVFGK, VAPFPEVFGK, APFPEVFGK, PEVFGK）に対する分解能を，イオントラップ型 LC-MS を用いて評価した．その結果精製 XPO DUET は，VLPVPQK に対しては活性を示さなかったものの，他の 4 種に対しては，加水分解活性をもつことを明らかにした．次いで，アミノ酸オキシダーゼ法により，合成ペプチドを基質として検討を行った．その結果精製 XPO DUET は，Met-Pro-Gly と比べ値は低いものの，Phe-Phe および Phe-Phe-Phe に対しても加水分解活性を示すことを確認した．

1) Arima J, *et al*. Protein Eng Des Sel, 21(1), 45-53 (2008).

A novel activity of *Streptomyces* M24 aminopeptidase

○Tadashi Hatanaka[1], Kun Wan[1], Misugi Uraji[1], Ryota Nakahigashi[2]
([1]RIBS, Okayama, [2]Nagase ChemteX)

Key words *Streptomyces*, aminopeptidase

4P-N028 放線菌フェルラ酸エステラーゼにおけるアルコリシス活性と加水分解活性の関わり

○裏地 美杉, 万 クン, 畑中 唯史
（岡山県生科総研）
hatanaka@bio-ribs.com

【目的】 フェルラ酸は, イネ科植物細胞壁中に豊富に存在し，紫外線吸収作用および抗酸化能などの性質を持つ．しかしながら，水への溶解度が低いため，一部の食品添加物や化粧品原料としての利用にとどまっている．フェルラ酸エステラーゼ（FAE）は，細胞壁の糖にエステル結合した状態のフェルラ酸を遊離させる活性を持つ酵素である．我々が見出した放線菌由来 FAE の R18 は，イネ科バイオマスからフェルラ酸を抽出可能であるとともに，桂皮酸エステル結合の加水分解時に，水の代わりにアルコールを転移（アルコリシス反応）することが可能な酵素であった．
本研究では，放線菌 FAE のアルコリシス反応を用いた水溶性桂皮酸類エステル合成を目指して，放線菌 FAE の R18 および類似遺伝子 TH2-18 のキメラ遺伝子を作成し，FAE の加水分解活性およびアルコリシス活性の関係性について解析を行った．
【方法と結果】 TH2-18 は，R18 とアミノ酸配列で 74%の相同性を示すが，エチルフェルラ酸に対する FAE 活性は R18 の約 1/10 である．R18 と TH2-18 のキメラ遺伝子を RIBS シャッフリング法（Mori et al., 2005, Appl Environ Microbiol, 71(2):754-760）を用いて作成し，得られたキメラ遺伝子のリコンビナントタンパク質を発現させた．キメラ FAE の加水分解活性は，R18 と TH2-18 の加水分解活性値の中間値であった．また，野生型 FAE およびキメラ FAE では，メチルフェルラ酸を基質とした酵素反応液中に 4-32%のエタノールを添加すると，アルコリシス反応による生成物であるエチルフェルラ酸が検出できた．エチルフェルラ酸生成量は，加水分解活性の高さと比例していた．現在，加水分解活性を指標としたキメラ FAE の解析によって，FAE 活性を高めた変異体を得ており，この変異体を用いたアルコリシス反応についても報告する．

Study on relationship between alcoholysis and hydrolysis in *Streptomyces* feruloyl esterase

○Misugi Uraji, Kun Wan, Tadashi Hatanaka
(Res. Inst. Biol. Sci., Okayama Pref.)

Key words *Streptomyces* sp., feruloyl esterase

4P-G029 *Gluconobacter* 属酢酸菌のデヒドロキナ酸脱水酵素の細胞内局在とその制御

○中村 謙太郎[1], 松谷 峰之介[1], 片岡 尚也[1,2], 薬師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大学院・創科, [2]山口大・中高温微セ）
Kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp

【目的】シキミ酸は芳香族アミノ酸合成経路の共通中間体であり，炭素六員環を持ち分子内に 3 つの不斉炭素を有する事から各種の合成原料として有用である．近年では，特に抗インフルエンザ薬であるタミフル (oseltamivir) の原料として重要な化合物となっている．*Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 は，キナ酸脱水素酵素，3-デヒドロキナ酸脱水酵素 (DQD)，シキミ酸脱水素酵素の 3 つの酵素を持ち，キナ酸からのシキミ酸発酵を行う可能性を有している．我々は以前，この第 2 酵素 DQD はシグナル配列を持っており，本菌細胞質膜のペリプラズム側に存在する膜酵素であると報告した．しかし，推定されたシグナル配列は，シグナルとしての必要条件を満たしていないように見られた．本研究では，*G. oxydans* における DQD の細胞内局在を再検討した．
【方法・結果】 提唱されたシグナル配列を含むプラスミド (long *aroQ*) と，含まないプラスミド (short *aroQ*) を構築した．これらのプラスミドで *G. oxydans* を形質転換し，組み換え株を作製した．short *aroQ* 株と long *aroQ* 株で DQD 活性とデヒドロシキミ酸生産について比較実験を行った結果，両者に違いはほとんど見られなかった．即ち，long *aroQ* にあるシグナル配列と提唱されている配列は，*G. oxydans* NBRC 3244 における DQD の活性，細胞内局在および 3-デヒドロシキミ酸生産性に関与しない事が明らかにされた．次に，人工的にシグナル配列を取り付けた Sec-*aroQ* をプラスミドに構築し組み換え体を作製した．Sec-*aroQ* 株は，short aroQ 株と比べて 3-デヒドロシキミ酸の生産と消費が速かった．すなわちシグナル配列の有無により DQD の機能が変化することが分かった．今後，Sec-*aroQ* 株によるデヒドロシキミ酸生産の条件を最適化する．

Subcellular localization of dehydroquinate dehydratases in acetic acid bacteria.

○Kentaro Nakamura[1], Minenosuke Matutani[1], Naoya Kataoka[1,2], Toshiharu Yakushi[1,2], kazunobu Matushita[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Key words *Gluconobacter oxydans*, shikimate pathway, dehydroquinate dehydratase, 3-dehydroshikimate

4P-G030 *Gluconacetobacter* 属酢酸菌の膜結合型ソルボソン脱水素酵素の解析

○高橋 亮太[1], 松谷 峰之介[1], 片岡 尚也[1,2], 薬師 寿治[1,2], 松下 一信[1,2]
([1]山口大院・創科, [2]山口大・中高温微セ）
juji@yamaguchi-u.ac.jp

【背景・目的】工業的に生産される L-アスコルビン酸(ビタミン C)は医薬品として，またその酸化能を利用した防腐剤もしくは酸化防止剤や食品などの添加物として広く利用されている．D-グルコースを還元して得られる D-ソルビトールは，*Gluconobacter* 属酢酸菌によって L-ソルボースへ酸化され，さらに一部の *Gluconobacter* 属酢酸菌によって膜結合型ソルボース脱水素酵素(SDH)を介して L-ソルボースから L-ソルボソンに酸化される．また，酢酸菌 *Gluconacetobacter liquefaciens* の膜結合型ソルボソン脱水素酵素(SNDH)は L-ソルボソンを，ビタミン C 生産においての重要中間体 2-ケト-L-グロン酸に変換することが知られている(1)．本研究では，未だその詳細が明らかでない SNDH の解析を行った．
【方法・結果】現在 SNDH の基質となる L-ソルボソンは市販されていない．本実験ではまず，基質調製のために *Gluconobacter* 属の *sdh* 発現プラスミドを構築し，*Gluconobacter* 属酢酸菌の SDH 高発現組換え株を作製した．組換え酢酸菌株による生物変換によって，200 mM L-ソルボース溶液からおよそ 40 mM L-ソルボソン溶液を調製した．最近，*Pseudomonas* 属細菌が持つ 2-ケト-D-グルコース脱水素酵素がピロロキノリンキノン(PQQ)依存であると報告された(2)．SNDH はそのホモログ(同一性 63%)であることから，SNDH が PQQ 依存酵素であると推察した．そこで，*Ga. liquefaciens* の *sndh* を発現する組換え大腸菌株を作製した．この組換え株の膜画分は，PQQ によるホロ酵素形成依存的に L-ソルボソン酸化活性を有していた．すなわち，SNDH が PQQ 依存酵素であることが明らかとなった．

(1) Shinjoh et al., *Appl Environ Microbiol.*, 61: 413-420 (1995).
(2) Umezawa et al., *J Bacteriol.*, 197: 1322-1329 (2015).

Biochemical characterization on membrane-bound sorbosone dehydrogenase of *Gluconacetobacter* sp.

○Ryota Takahashi[1], Minenosuke Matsutani[1], Naoya Kataoka[1,2], Toshiharu Yakushi[1,2], Kazunobu Matsushita[1,2]
([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., [2]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Key words pyrroloquinoline quinone, dehydrogenase, *Gluconacetobacter*, acetic acid bacteria

4P-N031 *Pimelobacter* sp. Z-483 株由来プロテアーゼ前駆体遺伝子のプロセシング機序

○大橋 大志[1], 浴野 圭輔[2], 尾山 廣[1]
（[1]摂南大院・理工, [2]崇城大・生物生命）
oyama@lif.setsunan.ac.jp

【目的】*Pimelobacter* sp. Z-483 株が産生する菌体外金属プロテアーゼ(Z483P)は，pH9.0，50℃に最適反応条件を有し，1,10-phenanthroline で阻害され，EDTA の影響を受けない．Z483P 遺伝子は，プレプロ領域 86 残基と成熟酵素領域 187 残基をコードする 819 塩基対からなる．本研究では，Z483P 前駆体のプロペプチドに着目し，それらの欠失変異体を用いて大腸菌での可溶かつ活性型酵素の発現を試みた．
【方法】Z483P 遺伝子の発現は，*Escherichia coli* KRX 株と pET25b ベクターを用いて行った．Z483P 遺伝子の発現は，菌体破砕上清と残渣をサンプルに，SDS-PAGE 後の抗 His-tag 抗体によるウエスタンブロッティングで確認した．酵素活性は，1%カゼインを含む寒天プレートを用いて，ハロー形成の有無によって確認した．
【結果・考察】Z483P の前駆体遺伝子(273 残基)を発現させたところ，ほとんどが封入体として発現され，成熟型酵素が可溶性画分にわずかに確認された．推定シグナルペプチドを含む N 末端から 29 残基を欠損させた変異体(Δ29)と 33 残基を欠損させた変異体(Δ33)を構築したところ，Δ29 は酵素活性が可溶性画分に確認されず，Δ33 は可溶性画分に酵素活性が確認され，成熟型酵素の分子量に相当する位置にシグナルが出現した．以上より，Z483P の可溶性発現には，プロペプチドの鎖長が重要であることが示唆された．現在，31 残基及び 35 残基を欠損させた変異体を作成しており，前駆体から成熟型へのプロセシングに最適なプロペプチドの鎖長を解析している．

Processing mechanism of an alkaline proteinase precursor gene from *Pimelobacter* sp. Z-483

○Taishi Ohashi[1], Keisuke Ekino[2], Hiroshi Oyama[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Eng., Setsunan Univ., [2]Fac. Biotechnol. Life Sci., Sojo Univ.)

Key words *Pimelobacter*, solubilized protein, metalloproteinase, propeptide

4P-N033 *Aspergillus oryzae* 由来 Amidase におけるカルバミン酸エチルの分解

○藤原 可菜子[1], 柿薗 ダララット[2], 奥田 将生[2], 向井 伸彦[2], 正木 和夫[1,2,3]
（[1]広島大院・生物圏, [2]酒総研, [3]岐阜産技セ）
masaki-kazuo@rd.pref.gifu.jp

カルバミン酸エチル（EC）は国際がん研究機関（IARC）によって「ヒトに対する発がん性」がおそらくあるとされるグループ 2A に属するウレタン化合物である．EC を分解する酵素は Urethanase と呼ばれ，EC をエタノール，二酸化炭素，アンモニアに加水分解する反応を触媒する．我々は，これまでに酵母由来の Urethanase の機能解析，配列解析を行っており，今回は，この酵素と配列相同性を有する *Aspergillus oryzae* 由来の Amidase（AmdS 遺伝子産物）について Urethanase としての機能を調べた．
Aspergillus oryzae RIB40 の Amidase（AmdS 遺伝子産物）については，これまでに，*A. oryzae* 発現系においてアセトアミドを窒素原とした場合のマーカーとしての有用性については報告があるものの，EC 分解活性については，調べられていない．そこで，AmdS 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて *A.oryzae Δamy* CB を形質転換した後，EC を唯一の窒素源とする培地で培養し，EC 資化性を示す株を得た．
次に，発現酵素の精製とその性質解明を行った．形質転換株を 2×DP 培地で培養後，菌体を回収し，ガラスビーズで破砕することで細胞抽出液を得た．透析後，イオン交換クロマトグラフィーにより目的酵素の精製を行った．得られた精製酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にて調べたところ，配列から計算された理論値と同じ約 60 kDa の位置に単一のバンドを示した．また，BlueNative-PAGE では，240 kDa 付近に単一のバンドを示したことから，この酵素はホモ 4 量体であることが示唆された．また，EC を基質とした場合，経時的に同モルのアンモニアとエタノールの生成が確認できた．続いて，最適 pH，最適温度を調べた結果，それぞれ pH 10.0，40 ℃であった．基質特異性については，アセトアミドなどのアミド化合物に強い分解活性を示した．

Degradation of ethyl carbamate by an amidase from *Aspergillus oryzae*

○Kanako Fujihara[1], Dararat Kakizono[2], Masaki Okuda[2], Nobuhiko Mukai[2], Kazuo Masaki[1,2,3]
([1]Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2]NRIB, [3]Ind. Technol. Center, Gifu Pref. Gov.)

Key words *Aspergillus oryzae*, amidase, marker gene

4P-G032 担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* 由来の生分解性プラスチック分解酵素の簡便な濃縮・殺菌および安定化

○田中 拓未, 鈴木 健, 山下 結香, 鎗水 透, 北本 宏子
（農研機構・農業環境センター）
kitamoto@affrc.go.jp

【背景・目的】これまでに我々は，イネ常在性の担子菌系酵母 *Pseudozyma antarctica* から，強力な生分解性プラスチック（生プラ）分解酵素 PaE の大量生産に成功し(1,2)，生プラ製農業用フィルムの分解促進剤としての実用化を検討している．微生物培養液から酵素製剤を調製する場合，保存性や流通性を高めるために製品のコンパクト化・安定化を図るとともに，酵素生産株を環境中への逸出させないことにも配慮する必要がある．そこで本研究では，*P. antarctica* 培養濾液中の PaE を簡便に精製・濃縮し，活性を安定的に保ちつつ *P. antarctica* を殺菌し，さらに外来微生物による汚染も防ぐ方法を検討した．

【方法・結果】まず，*P. antarctica* 培養濾液へのエタノール添加を検討した．エタノール終濃度 30% で処理することにより，培養液中の *P. antarctica* は死滅した．また，エタノール終濃度 90% の際の沈殿画分として，培養濾液比 121.5% の比活性を持つ粗精製 PaE を 100% の活性回収率で得た．次に，精製度向上とエタノール使用量低減のため，硫安沈殿とエタノール沈殿を組み合わせた方法を検討した．硫安沈殿画分は PaE 活性を維持しており，さらにエタノール沈殿することで，培養濾液比 342% の比活性を持つ粗精製 PaE を 90% 以上の活性回収率で得ることができた．培養濾液や精製済み PaE は，20% エタノール中，常温で数日間経過しても活性が 80% 以上維持されていた．以上から，*P. antarctica* 培養濾液を殺菌しつつ簡便に PaE を濃縮し，エタノール中で一定期間 PaE を安定的に保管可能であると示唆された．
（本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 25017AB の助成を受けて実施した）

(1) Kitamoto H et al. *AMB Express* (2011) 1:44
(2) Watanabe T et al. *Appl Microbiol Biotechnol* (2016) 100:3207-3217

A simple method for concentration, sterilization, and stabilization of biodegrable plastic degradation enzyme (PaE) from a *Pseudozyma antarctica* culture solution

○Takumi Tanaka, Ken Suzuki, Yuka Yamashita-Sameshima, Tohru Yarimizu, Hiroko Kitamoto
(NIAES, NARO)

Key words biodegradable plastic, esterase, basidiomycetous yeast, *Pseudozyma*

4P-G034 抗体遺伝子変異能力を操作できるニワトリＢ細胞を用いた動物細胞ディスプレイ

○金山 直樹, 太田 愛美, 中谷 元紀, 中谷 耕治, 植月 英智, 西山 由美子, 仲尾 祐輝, 曲 正樹, 徳光 浩
（岡山大院・自科）
nkanayam@okayama-u.ac.jp

我々は抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 可能なニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いて，*in vitro* 抗体作製技術を構築してきた．この抗体作製技術では，ニワトリ抗体ライブラリーからの抗体スクリーニングだけでなく，定常部をヒト IgG1 に置換した抗体ライブラリーのスクリーニングも可能である．また，DT40 細胞の変異能力は外来遺伝子の改変に応用可能であることから，任意の抗体の可変部遺伝子を DT40 細胞の可変部に導入して改良する系を構築してきた．その発展型として，DT40 細胞の抗体重鎖定常部遺伝子をヒト IgG1 抗体 Fc 遺伝子に置換することにより，非抗体タンパク質や一本鎖抗体などを Fc 融合タンパク質として DT40 細胞表面にディスプレイし，DT40 細胞の変異能力によって改変する系を構築した．これまでに，蛍光タンパク質 mCherry およびラマ由来 VHH 抗体の DT40 細胞への発現と変異導入によって，蛍光タンパク質の蛍光波長改変，VHH 抗体の抗原に対する親和性の向上に成功している．さらに，ヒト抗体由来 scFv 抗体の細胞表面の発現にも成功し，現在，その親和性成熟についても検討中である．一方，mCherry のような非抗体タンパク質遺伝子は，抗体可変部遺伝子と比べて変異導入効率が低い可能性があり，変異導入に必須な因子として同定したスプライシング関連因子 SRSF1-3 の過剰発現が，変異導入効率の低い遺伝子への変異向上に有効であることを見いだした．また，転写伸長因子 ELL2 の過剰発現は，DT40 細胞における抗体分泌能力の向上に有効であった．これらの方法の利用は，動物細胞ディスプレイにおいて標的タンパク質の改変し，分泌された変異タンパク質を評価する上で有用であると考えられる．

Animal cell display using the hypermutating chicken B cell line

○Naoki Kanayama, Manami Ohta, Haruki Nakatani, Kouji Nakatani, Hidetomo Uetsuki, Yumiko Nishiyama, Yuuki Nakao, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu
(Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Okyama Univ.)

Key words antibody, DT40 cells, somatic hypermutation, protein display

4P-G035 糖鎖改変によるカイコバキュロウイルス発現系由来抗 Her2 抗体の高品質化

○江頭 由里子[1,2], 長門石 曉[3], 木吉 真人[4], 石井 明子[4], 津本 浩平[2,3]
（[1]シスメックス, [2]東大院・工, [3]東大・医科研, [4]国立医薬食衛研）
tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

抗体は，非常に高い特異性をもって標的分子に結合する．そのため抗体医薬は目的分子を特異的に攻撃することができ，副作用が少ないという特徴をもつ．抗体の N 結合型糖鎖は，抗体の機能や安定性などに大きな役割を果たしており，医薬品用抗体の産生には哺乳類型の N 結合型糖鎖を有する CHO 細胞が一般的に利用されている．
カイコバキュロウイルス発現系は，高発現かつ組換えタンパク質を活性のある状態で生産可能な発現系として知られているが，作製したタンパク質の糖鎖構造は哺乳類型と異なる．そこで，抗体医薬であるトラスツズマブ（抗 Her2 抗体）をモデル抗体として，糖鎖構造を哺乳類型に近づけたカイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体を作製し，その安定性と機能について，通常のカイコバキュロウイルス発現系由来抗体および CHO 細胞由来抗体との比較を行った．
カイコバキュロウイルス発現系を用いた抗体は，CH2 領域の熱安定性は CHO 細胞由来抗体よりわずかに劣るものの，抗原結合活性および凝集性に関しては同等であった．また，カイコバキュロウイルス発現系を用いた N-アセチルグルコサミン型糖鎖付加の改変抗体において，熱安定性の向上，抗体依存性細胞傷害活性の上昇が確認された．

Quality improvement of anti-Her2 antibody using silkworm expression system by glycoengineering

○Yuriko Egashira[1,2], Satoru Nagatoishi[3], Masato Kiyoshi[4], Akiko Ishii[4], Kouhei Tsumoto[2,3]
([1]Sysmex, [2]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [3]IMSUT, [4]Natl. Inst. Health. Sci.)

Key words IgG, glycosylation, baculovirus

4P-G036 単ドメイン抗体に基づくネオバイオ分子免疫センサー mini Q-body の構築

○上田 宏[1], Banwait Bhagat[2], 董 金華[1], Kristensen Peter[2]
（[1]東工大・化生研, [2]オーフス大学・工）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景】我々はこれまで，一本鎖抗体 scFv あるいは Fab 断片を部位特異的に蛍光標識することで，各種抗原の結合を蛍光強度変化で高感度検出できる免疫センサー蛋白質 Q-body の構築に成功してきた．しかしこれらの構築にはやや手間と時間を要する問題もあった．今回，よりサイズの小さなヒト V_H 断片に基づく Q-body (mini Q-body)の構築と，これによる低分子ケトン体検出を試みたので報告する．

【方法】ヒト型 V_H の CDR3 をランダム化した Predator ファージ提示ライブラリより選択された，抗リゾチーム(HEL)抗体 C3，抗ケトン体(アセト酢酸)アダクト(MW. 270)抗体 3 種類 [1]の計 4 種の V_H 断片を用い，その N 末端側に，蛍光色素修飾用の Cys タグを付加したタンパク質を調製した．これを数種のマレイミド色素で修飾し，分光蛍光光度計で蛍光スペクトルの抗原濃度依存性を測定した．

【結果】ELISA より，各色素修飾 V_H は未修飾 V_H と同等の抗原結合能を保持していた．変性剤 7 M GdnHCl, 100 mM DTT の添加により，TAMRA-C5, ATTO520, R6G で修飾した mini Q-body が 3 倍以上の蛍光増加を示した事から，これらの色素がクエンチされている事が確認された．そこで C5 に抗原 HEL を添加し 5 分後の蛍光を測定した所，これらは従来の HEL 認識 scFv の応答を上回る抗原依存的な 3 倍以上，最大 5 倍(R6G)の蛍光増加を示した．またアセト酢酸アダクト認識 V_H においても，抗原添加により C3 と同等以上の最大 6 倍強の蛍光強度増大が観察された．

【結論】従来型抗体より小さく安定な V_H でも Q-body 様の検出素子が作製可能な事が示された．今後ライブラリからの選択により，より簡便に各種 mini Q-body が構築出来ると期待される．

Ref. 1) Holmquist, EF et al., *Anal. Chem.* 2017, 89, 5066.

Construction of mini Q-body, a fluorescent "Neobio" immunosensor based on a monodomain antibody

○Hiroshi Ueda[1], Bhagat Banwait[2], Jinhua Dong[1], Peter Kristensen[2]
([1]Lab. Chem. Life Sci., Tokyo Tech, [2]Dept. Eng., Aarhus Univ.)

Key words biosensor, fluorescence quenching, antibody, ketone body

4P-G037 *Serratia marcescens* type 1 secretion system 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], 浜垣 秀平[1], 辻 明彦[2], 大森 謙司[3], 湯浅 恵造[2]
（[1]徳島大院・先端技科, [2]徳島大院・生物資源産業, [3]名古屋大学院・創薬科学）
kyuasa@tokushima-u.ac.jp

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．しかしながら，菌体内生産では菌体破砕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 *S. marcescens* などのグラム陰性菌には 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．T1SS 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り，分泌タンパク質は N 末端シグナルペプチドを持たず，C 末端側領域が分泌に関わっている．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価を有する一本鎖抗体（scFv）が分泌されることを見出した．分泌された scFv-FLAG の C 末端から 17-19 番目に存在する VTV 配列の Val を Ala に置換した scFv ATA-FLAG 変異体は分泌されないこと，また，LipC 単独によっても scFv が分泌されることを明らかにした．本研究では，このシステムがラクダ科動物抗体フラグメント（Nanobody）の分泌生産にも応用できるかを検討した．scFv-FLAG の分泌に関係した VTV 配列は scFv の重鎖部分の定常領域にあり，GFP-Nanobody の C 末端にも同様に VTV 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 LipC とともに大腸菌 BL21 株に導入し，Nanobody の菌体外分泌を調べた．LipC 非存在下では Nanobody は分泌されなかったが，LipC によって Nanobody の分泌が認められ，LipC を利用した低分子抗体分泌生産システムの構築の可能性が考えられた．現在，LipC による低分子抗体分泌の分子機構について，タンパク質相互作用の観点から解析しており，併せて報告したい．

Secretory production system of small molecule antibody using the type 1 secretion system from *Serratia marcescens*

○Daichi Takagi[1], Syuhei Hamagaki[1], Akihiko Tsuji[2], Kenji Omori[3], Keizo Yuasa[2]
([1]Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words antibody, ABC transporter, *Escherichia coli*, secretory production

4P-G038 抗体データベースを利用した大規模変異導入による難発現抗体断片の発現量向上プロセスの提案

○服部 修平, 二井手 哲平, 中澤 光, 本田 亜由美, 梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

遺伝子工学の発展により，大腸菌などの宿主細胞を用いたタンパク質発現は比較的容易に行えるようになったが，タンパク質を活性型として調製できる確実性は未だ予測することができない．その大きな要因の一つに，異種な細胞内でタンパク質が活性型のフォールディングが形成されないことがあり，タンパク質の構造形成を向上させることが異種な細胞内でもタンパク質が活性型の構造を形成し易くする可能性がある．そこで本研究では，天然で良く使われるアミノ酸配列はタンパク質の構造形成を容易にするという仮説をたて，抗体データベースを利用し，難発現抗体断片に大規模な変異導入を行い新たな発現量向上プロセスを提案する．
抗体中の分子認識機能を持つ断片(Fv)は，相補性決定領域(CDR)以外のフレームワーク領域(FR)ではアミノ酸配列の相同性が高い．我々は，Fv について，他の抗体の Fv と比較して配列相同性が低い残基を高い残基へ置換していった．野生型抗体の配列を抗体データベースである abYsis により配列相同性を算出し，フレームワーク領域の配列相同性を 5 段階の変異体を作製した．その結果，FR 中の 30%までに至る 50 個のアミノ酸を相同性の高いアミノ酸へ置換することによって発現量が 3 倍以上向上した．しかし，表面プラズモン共鳴法(SPR)により標的との結合親和性を測定したところ，発現量向上した変異体では結合力が 10 倍程度低下した．現在，結合力を維持した状態での発現量向上を目指し，大規模変異導入残基に局所変異を行っている．

Database-depend mutagenesis process for promoting the expression of antibody fragment in *E. coli*

○Shuhei Hatttori, Teppei Niide, Hikaru Nakazawa, Ayumi Honda, Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, mutagenesis, database, expression

4P-N039 タンパク質の機能改変を効率化するライブラリーデザインサイクルの提案

○菊池 沙也香, 服部 峰充, 中澤 光, 二井手 哲平, 梅津 光央
（東北大院・工）
mitsuo@tohoku.ac.jp

指向的進化工学はタンパク質の機能改変法として広く用いられている手法であり，変異体群の作製と目的機能を有した変異体の選択から構成される．しかし，現行の手法は多大な時間および労力を必要とするため，目的のタンパク質を簡便に得るためには一連の操作の効率化を目的としたライブラリー設計とスクリーニング法の選択が重要となる．そこで本研究では，部位特異的化学接合に適した発現量および安定性に優れたリジン変異体の作製を例として，効率的な飽和変異法と飽和変異法から取得された情報を元にした複数部位同時変異導入を繰り返すことにより，解析が必要な変異体数およびステップ数を削減した効率的な指向的進化工学手法の開発を試みた．
はじめに，一本鎖可変領域断片のうち，軽鎖フレームワーク(FR)中に存在する5つの各リジン残基に対して1残基変異体を作製し，抗体を大腸菌発現系にて調製し，培地上清画分を用いたELISAにて発現量，結合活性および熱安定性を野生型と比較した．野生型に対して各指標が0.8以上となる変異体は3残基に対して存在したため，導入されたアミノ酸とその部位を抽出し，これらの情報を元に変異導入箇所とアミノ酸残基を限定した小規模ライブラリーを作製，変異体の機能解析を行ったところ，野生型と同程度の機能を有した変異体ARQの取得に成功した．そこで，この変異体を鋳型として該当する変異体の存在しなかった2ヶ所のリジン残基に対し再度変異導入を行うと，初回の変異導入とは異なる各指標が0.8以上に該当する変異体の取得に成功し，変異体ARQ取得と同様の過程により全5残基を置換した軽鎖FRリジン残基欠損変異体の取得に成功した．この手法により既存の方法と比較して解析が必要なクローン数を約1/45に削減でき，本手法は効率のよい進化工学的手法であることが示唆された．

Library design cycle for the optimization of functional modification to protein

○Sayaka Kikuchi, Takamitsu Hattori, Hikaru Nakazawa, Teppei Niide, Mitsuo Umetsu
(Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody, directed evolution, protein engineering

4P-G040 Ecobody 法によるヒトシングル B 細胞由来抗インフルエンザモノクローナル抗体の取得

○内田 由乃, 加藤 晃代, 兒島 孝明, 中野 秀雄
（名大院・生命農学）
hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

【目的】モノクローナル抗体（mAbs）は病気の治療や診断に必須であり，近年その用途はますます拡大している．しかしハイブリドーマ法等の従来法では新規mAbsの取得に長い時間を要する．一方，我々の研究グループは，動物の末梢血から得られるB細胞から，一細胞逆転写反応とPCRにより抗体遺伝子を増幅し連続的に大腸菌無細胞タンパク質合成系で抗体合成・評価することが可能な高速mAbsスクリーニング法であるEcobody法を開発してきた．そこで本研究ではヒトB細胞からのEcobody法の確立を目的とし，市販の不死化ヒトB細胞からのヒト抗体取得を試みた．

【方法・結果】不死化ヒトB細胞群から，インフルエンザウイルス（IV）に対するmAbsを産生する細胞をセレクションした．まずは赤色蛍光色素で標識したanti human IgG抗体でIgG抗体を提示するB細胞群を染色し，セルソーターによりソーティングした．次に回収した細胞の中から，IVに対し結合能を有する細胞を選択した．細胞のセレクションにはIVワクチンをコートした磁気ビーズを用いた．選択された細胞は96wellプレートに1cell / wellになるように分注し，mAbs遺伝子特異的プライマーによる逆転写反応および2段階のPCRを行い，mAbcDNAを増幅した．得られたmAbscDNAを解析したところ，いずれも新規CDRを含んでいることがわかった．得られたmAbscDNAから，大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いて抗体フラグメントFabを合成し，SDS-PAGE解析により目的サイズのL鎖とH鎖を確認した．またELISA解析により，抗原IVに対する結合活性がみられた．現在，得られた抗体について詳細な解析を行っている．

Generation of anti-influenza virus monoclonal antibody from human single B cells by the Ecobody technology

○Yoshino Uchida, Teruyo Kato, Takaaki Kojima, Hideo Nakano
(Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words antibody, inflienza, cell-free protein synthesis, cell sorter

4P-E041 NanoLuc 由来ペプチドタグを用いた簡便迅速な免疫測定法の開発

○大室（松山） 有紀, 蘇 九龍, 高橋 里帆, 上田 宏
（東工大）
ueda@res.titech.ac.jp

【背景】オープンサンドイッチ免疫測定法（OS法）は，抗体可変領域VH-VL間の親和性が，抗原結合時に顕著に高まることを利用した免疫測定法である．通常の蛋白質間相互作用検出系Protein-fragment Complementation Assay (PCA)では，酵素等のプローブを２つに分断して相互作用蛋白質に融合させ，相互作用を検出する．本研究では，OS法における二つの抗体断片と，検出試薬として発光酵素NanoLuc (NLuc)断片を用いた３分子間PCAを原理とする，迅速ホモジニアス抗原検出系の構築を試みた．
【方法】通常のNLuc PCAではNLucを分割したLgBit (18 kDa)とSmBit (11 aa)をプローブとして用いる．今回，LgBitを遺伝子合成したMidBitとSmBit2 (11 aa)に分割し，可溶化タグであるチオレドキシン(Trx)融合MidBit，Trx-(VHまたはVL)(SmBit，SmBit2あるいはLgBit)融合タンパク質を大腸菌で発現精製し，これらを用いた溶液中での抗原検出を試みた．材料としては抗BGP抗体VH，VLとエピトープペプチドBGP-C7を用い，混合後に基質を加えて発光強度を測定した．
【結果と考察】VL融合SmBit，VH融合SmBit2，およびMidBitを混合し，OS法を試みた．0.5 μMのBGP-C7添加による相互作用誘導により，発光値が非添加時に比べ79倍上昇した．これに対し，VH融合LgBitとVL融合SmBitを用いたPCAでは，BGP-C7を添加しても発光値が上昇しなかった．VH融合プローブをSmBit2にしすることで，大腸菌内での融合タンパク質の機能的発現が促進されたと考えられる．さらにSmBitをLgBitと親和性の高い配列に変更したところ抗原応答性を保ちつつ発光値が約300倍上昇し，肉眼での観察が可能になった．
【結論】Nluc PCA原理に基づく低分子の試験管内検出系が構築できた．各種抗原ならびに相互作用検出への応用が期待される．

Development of rapid homogeneous immunoassay using peptide tags made from NanoLuc

○Yuki Ohmuro-Matsuyama, Jiulong Su, Riho Takahashi, Hiroshi Ueda
(Tokyo Tech)

Key words antibody, biosensor, enzyme

4P-G042 検査・診断薬開発に役立つ Flow Cytometer を利用した立体構造を選択的に認識するモノクローナル抗体作製法の開発

○中嶋 千佳[1], 赤城 幸[2,3], 背戸川 千春[1], 栗原 靖之[2]
（[1]横国大, [2]横国大院・工, [3]アステラス製薬）
kurihara-yasuyuki-xh@ynu.ac.jp

モノクローナル抗体は医学生物学の基礎研究をはじめ医薬品として実用化されつつあり，有用な研究及び商業リソースである．我々はモノクローナル抗体作製方法に様々な工夫を施し，免疫開始から約2ヶ月で高品質のモノクローナル抗体を作製できているが，未だ2回のスクリーニングとクローニングといった煩雑で手間のかかる作業が必要である．さらに，免疫染色やフローサイトメータに利用可能で，医薬品や検査診断薬開発に欠かせない構造認識抗体を取得するのは困難で，未だ技術改良と省力化の余地がある．私達はこれらの問題点を解決する画期的な作製法に取り組んでいる．
抗体を産生するハイブリドーマ細胞は分泌抗体と同じ結合特異性を持つ膜型免疫グロブリンを発現していることを明らかにした．さらに，蛍光を結合した抗原をハイブリドーマに添加すると抗原特異的にハイブリドーマを蛍光標識できることをフローサイトメーターを使って明らかにしてきた．これらの知見をもとに，ペプチド抗原で免疫したマウスB細胞と細胞融合したハイブリドーマをフローサイトメーターでスクリーニング・クローニングした．その結果，選択的にIgG産生ハイブリドーマを取得でき（93%），また交差反応性がなく特異性の高い抗体を従来の方法より30倍高い効率で取得できた．特筆すべき点は，生理条件下の抗原の立体構造を強く認識する抗体を優先的に取得できたことである．現行法はモノクローナル抗体の最初のスクリーニングにELISAを利用していたが，今回の方法では，構造を保持した抗原を用いていることから，構造を強く認識する抗体を優先的に取得できたと考えられる．以上のことから，本方法は立体構造を選択的に認識し，フローサイトメータや免疫染色，さらに医薬品，検査・診断薬などに利用可能なモノクローナル抗体を効率よく作製できる手法である．

A novel flow cytometric method for generating monoclonal antibodies that recognized physiological structure of the antigen preferentially

○Chika Nakajima[1], Sachi Akagi[2,3], Chiharu Setogawa[1], Yasuyuki Kurihara[2]
([1]Yokohama Natl. Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., [3]Astellas Pharma. Inc.)

Key words monoclonal antibody, flow cytometry, biomedicine

4P-N043 エクソソームの高効率アフィニティ分離が可能な単鎖抗体固定化担体の開発

○新 裕太[1], 赤井 亮太[1], 熊田 陽一[1], 堀内 淳一[1], 片山 淳子[2], 的場 一孝[2]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]日産化学）
kumada@kit.ac.jp

【緒言】 近年，疾病の早期診断が可能なバイオマーカーとして，エクソソームが注目されている．従来，エクソソームは，超遠心分離や抗体固定化ビーズなどで回収されてきたが，純度やコストに問題があった．そこで本研究では，エクソソーム上の膜タンパクを特異的に認識する単鎖抗体を作製し，安価でかつ選択的にエクソソームを回収することを目的とした．また，単鎖抗体に材料親和性ペプチドタグを導入することで，単鎖抗体の固定化密度ならびに，エクソソームの回収率の向上を試みた．
【実験】 抗 CD9 scFv をファージライブラリから単離し，C 末端部に PMMA-tag を融合した融合タンパク質を生産した．IMAC 精製後，scFv-PM を PS ラテックスビーズ上に固定化した．2% BSA-PBS で吸着サイトをブロッキング後，Hela 細胞培養上清ならびに市販キットで精製したエクソソームと混合した．PS ビーズ上に捕捉されたエクソソームは，フローサイトメトリーおよびウェスタンブロッティングで解析した．
【結果と考察】 scFv-PM は，培養上清中に 44mg/L の濃度で発現した．scFv-PM 固定化ラテックスビーズによって精製エクソソームを回収し，フローサイトメーターで解析したところ，蛍光シグナルの大幅なシフトが見られたことから，当該ビーズによってエクソソームが回収可能であることが明らかとなった．さらに，血清培地を用いた場合もわずかではあるが蛍光シグナルのシフトが見られ，培養上清からエクソソームを回収可能であることが示唆された．ウェスタンブロット解析の結果，回収されたエクソソームから CD9 が検出されたことから，当該ビーズを用いて CD9 positive なエクソソームを選択的に回収可能であることが示された．

Efficient and specific recovery of exosomal vesicles using scFv-immobilized solid support

○Yuta Atarashi[1], Ryota Akai[1], Youichi Kumada[1], Jyun-ichi Horiuchi[1], Jyunko Katayama[2], Kazutaka Matoba[2]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Nissan Chem.)

Key words Exosome, scFv, CD9, PMMA-tag

4P-G044 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

○坂本 祐一朗, 李 歓, 熊田 陽一, 堀内 淳一
（京工繊大院・工芸科学）
horiuchi@kit.ac.jp

【緒言】 whole 抗体と同じ抗原認識機能を持つ単鎖抗体(scFv)を，遺伝子組換え大腸菌を用いて安価に大量生産する研究を進めている．本研究では，種々の scFv 遺伝子を導入した組換え大腸菌を用い，精密に制御された流加培養を行い，scFv の菌体外への大量生産を試みた．
【方法】 anti-CRP scFv を含む 3 種類の scFv をモデルとし，これらの N 末端側にペリプラズム分泌シグナル（pelB leader），C 末端側に精製用の 6xHis タグを導入した pET-22 発現ベクターを用いて，大腸菌 Rosseta2(DE3)株を形質転換した．更に，scFv の高密度配向固定化を可能とする材料親和性ペプチドタグを導入した株も構築した．流加培養は，2L ジャーファーメンターを用い，PID 制御に基づく精度の高い DO stat によりグルコースを流加し，約 100 時間流加培養を継続した．
【結果と考察】 Anti-CRP scFv 生産株を用いて培養を行った結果，IPTG 添加後まず scFv が封入体として蓄積し，その後菌体外に scFv が蓄積され始め，最大約 4.8g/L の scFv が上清中に生産された．次に，アミノ酸配列の異なる 2 つの scFv 生産株を用いて培養を行った結果，ほぼ同様の経過をたどり，それぞれ最終的に 4.4g/L，2.1g/L の scFv 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た．培養上清中には scFv 以外に様々な細胞内タンパク質が溶出したことから，pelB leader の導入により，細胞膜の透過性が高まり，その菌株を用いて長時間流加培養を継続することで大量の scFv が菌体外に溶出したと考えられる．一方，材料親和性ペプチドタグを導入した場合，scFv の菌体外生産 は大幅に減少し，これはペプチドタグが細胞膜表面に吸着し，scFv の菌体外生産が抑制されたためと考えられた．

Extracellular production of single-chain variable fragments (scFvs) using recombinant E.coli by precisely controlled fed-batch culture with DO stat

○Yuichiro Sakamoto, Huan Li, Yoichi Kumada, Jun-ichi Horiuchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words *Escherichia coli*, fed-batch culture, scFv, DO-stat

4P-N045 ウサギ単鎖抗体を用いた高感度ラテックス凝集検査法の開発

○谷端 怜奈[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ, [3]デンカ生研）
kumada@kit.ac.jp

【諸言】現在，疾患の指標であるバイオマーカーに対する特異抗体を用いた免疫測定法が数多く存在する中，抗体固定化ラテックスを用いたラテックス凝集検査は簡便かつ短時間で定量的な検査が可能である．一方，この検査法は他の方法(ELISA 法など)と比べ検査濃度範囲が狭く，高感度化が必要である．また，抗体固定化ラテックス製造の際，高価な Whole 抗体を大量に使用する必要があるため製造コストが高額となる．そこで，安価に大量生産可能な単鎖抗体(scFv)に注目した．これまでの研究において，scFv のアミノ酸配列や等電点等の違いによって固定化時の抗原結合活性が大きく異なることが明らかとなっている．本研究では 3 種類のモデル scFv を用い，scFv 固定化ラテックスの凝集反応性や分散性を比較検討することを目的とした．
【方法】CRP をモデル抗原とし，異なるエピトープを認識する 3 種類の scFv を調製した．SPR センサで scFv の解離定数(溶液中の Kd，固定化時の Kd)，固定化時の相対抗原結合容量(Rmax) を定量した．scFv 1mg/ml を 50mM MES(pH6.0) 中で PS 製ラテックス粒子に固定化し，分散後 160ng/ml の CRP 抗原と混合した．混合直後から 10 分間の吸光度変化を測定した．
【結果と考察】溶液中の Kd 値と比較して固定化時の Kd 値は増加する傾向にあり，抗原結合容量もクローンによって大きく異なっていた．R2-6 scFv 固定化ラテックスは自己凝集のため分散状態になく，吸光度はほとんど変化しなかった．一方，R2-45 scFv 固定化ラテックスは最も反応性が高く，10 分間で 0.2 以上の吸光度変化が得られた．反応 pH を最適化したところ，R2-6 固定化ラテックスも凝集反応がみられたが，R2-45 および R3-2 と比較して反応性は低かった．以上の結果より，scFv 固定化ラテックスの反応性は，scFv のアミノ酸配列，固定化方法，分散条件等，様々な要因に大きく影響を受けることが示された．

Development of sensitive latex turbidimetric assay with rabbit scFv

○Reina Tanibata[1], Koichi Takahashi[2], Yoshiaki Hirayama[2], Fumio Gondaira[3], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Denka, [3]Denka seiken)

Key words scFv, latex agglutination, immunoassay

4P-N046 高親和性ウサギ scFv-Fc の開発とインフルエンザ検査への応用

○神吉 菜摘[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ株式会社, [3]デンカ生研株式会社）
kumada@kit.ac.jp

[緒言] Whole 抗体を検査用プレートやメンブレン等，担体上に固相化する際，担体上における抗体の密度，配向性，残存活性が，抗原検出時のシグナル強度に大きく影響する．そこで本研究では免疫検査の高感度化のために，バイオパニングにより高い抗原親和性を有するウサギ scFv を選別し，多価抗原への結合活性を増強するために scFv に IgG の Fc 部位を融合し，2 量化した scFv-Fc を開発した．
[実験] バイオパニングにより抗原に対する特異性・親和性が高いウサギ scFv クローンを選定した．scFv-Fc の遺伝子を設計・合成し，pFASTBAC DUAL ベクター(Life technologies)に導入した．本発現ベクターを Bac-to-Bac システムを利用して組換え Bacmid を調製，無血清培地であらかじめ培養した Sf9 細胞に導入し，培養上清中に scFv-Fc を分泌生産させた．scFv-Fc の発現は SDS-PAGE 及び Western Blotting により確認した．さらに，Protein A カラムを用いて scFv-Fc を精製後，Sandwich ELISA を用いて固定化状態における scFv-Fc の抗原結合活性を scFv ならびにマウス Whole 抗体(既製品)と比較した．
[結果と考察] SDS-PAGE 及び Western Blotting を行った結果，非還元状態において 120 kDa 付近にバンドを確認出来たことから，scFv-Fc が 2 量体として生産されていることを確認できた．さらに scFv-Fc を精製後，PBS(pH7.5)中で固定化し，Sandwich ELISA にて抗原検出を行った．その結果，scFv-Fc は scFv およびマウス Whole 抗体と同等の結合活性を示した．また非イオン性界面活性剤を含む TAPS(pH 8.5)中において抗体を固定化した際，マウス Whole 抗体の抗原結合シグナルは大きく低下したがウサギ scFv-Fc は高い結合活性を示した．この結果からウサギ scFv や scFv-Fc は，非イオン性界面活性剤共存下においても固相化が可能であり，特に scFv-Fc は，Avidity 効果により抗原を高感度に検出可能であると考えられる．

Development of high affinity scFv-Fc for detection of influenza virus in clinical diagnosis

○Natsumi Kamiyoshi[1], Kouichi Takahashi[2], Yoshiaki Hirayama[2], Fumio Gondaira[3], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Denka Co. Ltd., [3]Denka-Seiken Co. Ltd.)

Key words immuno assay, scFv-Fc, insect cell culture

4P-G047 インフルエンザ高感度診断のための高親和性ウサギ単鎖抗体の開発

○岡西 崚輔[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ, [3]デンカ生研）
kumada@kit.ac.jp

【緒言】単鎖抗体（scFv）は，大腸菌を宿主として，低コストで生産でき，分子量は Whole 抗体の 1/5 であるため，検査プレート上へ高密度に固定化できる．特に，ウサギ scFv は，従来のマウス scFv と比べて，安定性並びに抗原親和性に優れているため，臨床検査薬としての利用が期待されている．本研究では，インフルエンザ検査薬の高感度化を目的として，単離されたウサギ scFv を物理吸着法とアミンカップリング法にて基板上に固定化し，抗原結合活性を比較することで，ウサギ scFv の利用可能性を検討した．
【方法】マーカー抗原 NP に結合する 6 種類のウサギ scFv と検査用 Whole 抗体（5E7,9D12）を 10 μg/ml の濃度で Maxisorp プレート上に物理吸着した．このプレートを用いて Sandwich ELISA を行い，各抗体の固定化状態における抗原結合活性を評価した．上述のウサギ scFv を Sensor Chip CM5 上にアミンカップリングにて固定化し，SPR センサを用いて抗原濃度を 3.1～200 μg/m;に変化させながら連続的に添加した．得られたセンサグラムより解離定数 Kd と残存活性を算出した．
【結果と考察】物理吸着法によって scFv を検査プレート上に固定化した場合，6 種類の scFv クローンの内，特に，R4-10 および R4-41 は，検査用 Whole 抗体と同程度かそれ以上のシグナル強度で抗原検出が可能であった．アミンカップリング法によって scFv を SPR センサチップ上に固定化した場合，クローン R3-47 は固定化状態において抗原が全く結合せず，カップリング反応によって抗原結合活性を完全に喪失していることが示唆された．また，クローン R4-10 と R4-41 は，両者ともカップリング後も高い抗原結合活性を保持しており，特に，R4-41 の方が固定化後の残存活性が高く検出された．以上より，scFv のアミノ酸配列の違いによって，アミンカップリング後の抗原結合活性は大きく異なることが明らかとなった．

Development of rabbit scFv antibodies for sensitive detection of Influenza virus in clinical diagnosis

○Ryosuke Okanishi[1], Koichi Takahashi[2], Yoshiaki Hirayama[2], Fumio Gondaira[3], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Denka, [3]Denka Seiken Co., Ltd)

Key words scFv, Influenza virus, immobilization, biopanning

4P-N048 B 細胞由来培養細胞を利用した抗体分子進化基盤技術の開発

○橋本 講司, 黒澤 恒平, 村山 晃歩, 瀬尾 秀宗, 太田 邦史
（東大院・総合文化）
kohta@bio.c.u-tokyo.ac.jp

抗体は，医薬品等にも利用されており，抗体作製技術および抗体高機能化技術の開発は重要である．我々はニワトリ B 細胞由来の培養細胞である DT40 細胞を利用した抗体作製法を開発してきた（ADLib システム）．DT40 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A（TSA）処理のもとで培養すると，染色体弛緩の促進により抗原認識領域である可変領域の遺伝子配列が著しく多様化される．この現象を利用して DT40 細胞由来の抗体ライブラリを樹立し，磁気ビーズ等により抗原に特異的に結合する抗体を発現する細胞を選抜できる．ADLib システムは独自の多様性と簡便性，さらに迅速性の点で従来技術に対する優位性があり，これまでに多くの抗体作製実績がある．
本発表では，DT40 細胞を利用した抗体高機能化技術について報告する．まず，Fc エンジニアリングを簡便に実現する技術を開発した（Cre-In システム）．Cre-In システムでは，重鎖定常領域遺伝子座に対して遺伝子編集手法を応用することで，loxP 配列と薬剤耐性マーカーを含む遺伝子カセットをノックインする．これにより Cre リコンビナーゼ発現依存的に高効率に Fc 領域を入れ換えることが可能となった．この新規技術を利用し，ADLib システムで作製した抗体のエフェクター細胞親和性を強化することに成功した．ADLib システムと Cre-In システムを組み合わせることで，de novo の抗体作製とその高機能化までを同一の DT40 細胞内で完結できると考える．
さらに，抗体可変領域を任意の配列に変換し，外来性の抗体分子を発現提示させる技術も開発中である．これにより抗体ライブラリを作製し，高親和化抗体などの高機能化抗体を選抜できる．本技術を Cre-In システムと組み合わせることで，任意の外来性抗体に関しても親和性向上や Fc 領域の変換などの高機能化を簡便に行える進化分子工学技術の実現を目指す．

Development of the Platform Technology for Molecular Evolution of Antibodies Using B cell-derived cultured cells

○Koji Hashimoto, Kohei Kurosawa, Akiho Murayama, Hidetaka Seo, Kunihiro Ohta
(Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words DT40 cells, antibody, molecular evolution, genome engineering

4P-N049 イムノクロマトグラフィの高感度化を目指した抗体固定化技術の開発

○岡林 雪乃[1], 高橋 浩一[2], 平山 吉朗[2], 権平 文夫[3], 犬飼 忠彦[4], 川瀬 三雄[4,5], 堀内 淳一[1], 熊田 陽一[1]
（[1]京工繊大院・工芸科学, [2]デンカ株式会社, [3]デンカ生研株式会社, [4]株式会社TBA, [5]東北大院・医工）
yumada@kit.ac.jp

〔緒言〕イムノクロマトグラフィは迅速かつ簡便な操作で検査が行えるため広く利用されている．ニトロセルロース（NC）膜に吸着固定された抗体は構造変化を伴って変性・失活し，高感度化を妨げる一因となっている．本研究ではイムノクロマトグラフィの高感度化を目的とし，DNA Hybridization を利用した新しい抗体固定化技術を開発した．NC 膜上に UV 照射により固定化したリガンド DNA を介し，相補 DNA 修飾抗体を DNA Hybridization を利用して特異的に固定化することで，変性・失活を抑制し，検出シグナルの大幅な向上を目指した．
〔実験〕モデル抗原として，B 型インフルエンザ Nucleoprotein (NP 抗原)を用いた．Ligand DNA をインクジェット技術，または，スポッティングによって NC 膜上に塗布し，UV 照射によって固定した．Ligand DNA の固定化位置近くに相補 DNA 修飾抗 FluB 抗体 1 を 1μL スポットし，DNA Hybridization により抗 FluB 抗体 1 を固定化した．
１）DNA Hybridization の確認
NC 膜上に固定化された抗 FluB 抗体 1 に対し，AP 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ，BCIP/NBT による発色反応によって，抗 FluB 抗体 1 の所在を確認した．
２）イムノクロマト
抗体固定化ストリップを展開液 50 μL（抗原＋抗 FluB 抗体 2 固定化青色ラテックス）に浸すことで，NC 膜上の抗 FluB 抗体 1 に抗原-ラテックス複合体を捕捉させた．室温で 15 分間インキュベート後，検出ラインの色調を観察した．
〔結果〕実験 1 において，0.1% Tween 80 共存下で NC 膜上に DNA Hybridization による抗体の強固な固定化が可能であることが明らかとなった．実験 2 では，モデル抗原である NP-B は 5ng/ml まで目視で判定可能であり，既製品と比較すると 5 倍低濃度の抗原を検出可能であった．以上の結果から，DNA Hybridization を利用して抗体を固定化することでイムノクロマトグラフィの高感度化が可能である．

Immobilization of antibody utilizing DNA hybridization

○Yukino Okabayashi[1], Koichi Takahashi[2], Yoshiaki Hirayama[2], Fumio Gondaira[3], Tadahiko Inukai[4], Mitsuo Kawase[4,5], Jun-ichi Horiuchi[1], Yoichi Kumada[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]DENKA Co. Ltd., [3]DENKA SEIKEN Co. Ltd., [4]TBA Inc., [5]Grad. Sch. Biomed. Eng., Tohoku Univ.)

Key words antibody immobilization, nitrocellulose, DNA hybridization

4P-G050 *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株のシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析

○山本 泰誠, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛
（関西大・化生工）
iwaki@kansai-u.ac.jp

【目的・背景】シクロヘキサノンモノキシゲナーゼ(CHMO)は，環状ケトンからラクトンへの Baeyer-Villiger 酸化反応を触媒する酵素である．これまでに報告されている細菌由来の CHMO は，主に 4～7 員環のシクロアルカノン(CAON)に対して作用する．一方，シクロヘキサノール資化性酵母様真菌 *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N 株由来の精製 CHMO は，4～11 員環の CAON に対して作用する広い活性スペクトルを有する．本研究では，*E. jeanselmei* KUFI-6N 株の CHMO 遺伝子の配列を決定し，大腸菌 pET 発現系を構築した．
【実験方法と結果】細菌由来の Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ(BVMO)の保存配列より設計したプライマー(BV-F, BV-R)を用いて，*E. jeanselmei* KUFI-6N 株のゲノムを鋳型として PCR を行った結果，約 1 kbp の PCR 産物が得られた．得られた断片を TA クローニングし，塩基配列を決定した結果，4 種類の BVMO 様遺伝子の部分配列が得られた．CHMO 遺伝子(*chnB*)を特定するために，インバース PCR 法でこれら 4 種の BVMO 様遺伝子周辺領域を増幅し，全塩基配列を決定した．しかし，これら 4 種の BVMO 様遺伝子の推定アミノ酸配列には，精製 CHMO の N 末端アミノ酸配列と一致する領域が存在しなかった．そこで，精製酵素の N 末端アミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し，BV-R と組み合わせて PCR を行い，*chnB* 部分遺伝子断片を増幅・解析した．次に，インバース PCR 法で周辺領域を増幅し，推定アミノ酸配列の N 末端領域が精製 CHMO のものと一致する *chnB* 遺伝子全域の塩基配列を取得した．決定した配列をもとに RT-PCR 法で cDNA を増幅・解析した結果，*chnB* 遺伝子は 1 つのイントロンおよび，1710bp のコード域を有することが明らかとなった．ChnB の CAON に対する活性を確認するために，大腸菌 pET 発現系を構築した．構築した ChnB 発現大腸菌の無細胞抽出液は 4～11 員環ケトンに対して活性を有していた．

Isolation and characterization of a gene encoding cyclohexanone monooxygenase from yeast-like fungus *Exophiala jeanselmei* KUFI-6N

○Taisei Yamamoto, Hiroaki Iwaki, Yoshie Hasegawa
(Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ.)

Key words cyclohexanone monooxygenase, Baeyer-Villiger monooxygenase, yeast-like fungus, *Exophiala*

4P-G051 DIT1 ターミネーターと 2 つの RNA 結合タンパク質による目的タンパク質の増産技術

○松山 崇[1], 伊藤 洋一郎[1], 北川 孝雄[2], 山西 守[1], 片平 悟史[1], 井沢 真吾[3], 入江 賢児[4], 清木 誠[2]
（[1]豊田中研, [2]山口大院・医系, [3]京工繊大院・工芸科学, [4]筑波大）
e1215@mosk.tytlabs.co.jp

出芽酵母において，目的タンパク質の生産量を特異的に高める新たな仕組みを遺伝学的に明らかにし，代謝工学やタンパク質生産に応用可能なことを示した[1]．代謝工学的な手法を用いて，バイオ樹脂原料やバイオ燃料を生産する遺伝子組換え酵母を育種するには，目的物質の代謝に関わる酵素遺伝子を導入し，強力に発現させることが求められる．
遺伝子のターミネーター領域は，転写の終了や polyA の付加などの役割に加え，3'-UTR の部分が，mRNA 半減期・翻訳効率・細胞内局在等の制御を通じて遺伝子発現を調節する．これまで発表者らは，出芽酵母の 5,302 種類のターミネーター領域（全体の約 90%）について，ターミネーター領域の上流にコードされた目的タンパク質生産量を増減させる活性を網羅的に測定した[2]．これらのターミネーターの中で *DIT1* ターミネーター（*DIT1t*）の活性が最も強く，標準的な *PGK1t* と比較して，上流の目的タンパク質を 2 倍以上増産することを明らかにした[3]．
今回，*DIT1* ターミネーターの 3'-UTR 部分の *cis* 配列 GUUCG/U に RNA 結合タンパク質 Nab6p が結合し，Nab6p が Pap1p をリクルートして，*DIT1t* の上流にコードされた目的タンパク質の生産を増産することを遺伝学的に明らかにした[1]．Nab6p と Pap1p の過剰発現によって，生育は遅くなるものの，*DIT1t* 上流の目的タンパク質の生産量は 2.5 倍増加し，標準的な発現系の 5 倍となった．
DIT1 ターミネーター配列に変異を導入し，活性を高める変異を集積した．その結果，変異型 *DIT1t*-d22 は，生育に影響を与えることなく，最大で野生型 *DIT1t* の 1.5 倍の増産活性を示した．

1) Ito Y., et al.: Sci Rep, 6, 36997. (2016)
2) Yamanishi M, et al.: ACS Synth Biol, 2, 337-347. (2013)
3) Ito Y., et al.: J Biotechnol, 168, 486-492. (2013)

Enhancement of protein production via the strong *DIT1* terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*

○Takashi Matsuyama[1], Yoichiro Ito[1], Takao Kitagawa[2], Mamoru Yamanishi[1], Satoshi Katahira[1], Shingo Izawa[3], Kenji Irie[4], Makoto Seiki[2]
([1]Toyota Cent. R&D Labs. Inc., [2]Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol., [4]Univ. Tsukuba)

Key words protein overproduction, terminator, RNA-binding protein, *Saccharomyces cerevisiae*

4P-N052 出芽酵母のメバロン酸経路強化遺伝子破壊の探索と評価

○神田 義貴, 戸谷 吉博, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【目的】出芽酵母のメバロン酸経路強化は，カロテノイド，テルペノイド，ステロールなどのイソプレノイド化合物生産能向上につながる．そこで，本研究では出芽酵母のメバロン酸経路の強化を目指し，フラックスバランス解析 (FBA) に基づく代謝シミュレーションを行い，メバロン酸経路の強化に有効な遺伝子破壊を予測した．そして，予測した遺伝子破壊株を実際に培養，評価し，メバロン酸経路の強化に有効な 1 遺伝子破壊の同定を行った．
【方法】FBA に基づく代謝シミュレーションは酵母ゲノムスケールモデル iMM904 を用いて実施した．親株として出芽酵母 BY4742 株を用い，1 遺伝子破壊株は The Yeast Knockout (YKO) Collection で作成されたものを用いた．構築株はグルコースを炭素源とする SC 培地で培養し，菌体中のスクアレンはガスクロマトグラフ-質量分析器 (GCMS) で定量した．
【結果】まず，メバロン酸経路の活性の指標となる代謝物を探索し，メバロン酸経路の下流の物質であるスクアレンをメバロン酸経路の活性の評価として用いることとした．続いて，FBA に基づく 1 遺伝子破壊代謝シミュレーションを実施し，スクアレンの生産量を向上させる遺伝子破壊を予測した．予測した 1 遺伝子破壊株を SC 培地で培養し，スクアレン生産量を測定したところ，スクアレンの生産量を向上させる遺伝子破壊を複数見出した．

Identification of gene deletions for improving a mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae.*

○Yoshiki Kanda, Yoshihiro Toya, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, Mevalonate, isoprenoid

4P-G053 Improved cellulase production and efficiency of consolidated bioprocessing using recombinant yeast strains engineered with functional genes involved in stress tolerance

○Xinshui Yu[1], Fengwu Bai[1], Xinqing Zhao[2]
([1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China)
xqzhao@sjtu.edu.cn

Fuel ethanol production using lignocellulosic materials has attracted widespread attention. However, high production cost of cellulose impedes economic production. Consolidated bioprocessing (CBP) integrates cellulase production, cellulose hydrolysis and ethanol fermentation in a single step, but the cellulase production and secretion of *Saccharomyces cerevisiae* still are not efficient. In our previous study, overexpression of several stress tolerance genes and artificial zinc finger protein (AZFP) resulted in improved acetic acid tolerance of *S. cerevisiae*. In this study, we investigated similar strategy to improve cellulase secretion of *S. cerevisiae*. Significantly increased cellobiohydrolase production was achieved by overexpression of *MDG1*, which is involved in G protein-mediated pheromone signaling pathway. Further studies are ongoing to unveil the detailed mechanisms and explore novel functional genes to improve cellulosic ethanol production using the CBP strain of *S. cerevisiae*.

Improved cellulase production and efficiency of consolidated bioprocessing using recombinant yeast strains engineered with functional genes involved in stress tolerance

○Xinshui Yu[1], Fengwu Bai[1], Xinqing Zhao[2]
([1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, cellulase, stress resistance, protein expression

4P-G054 Enhanced cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of the fermentation process for efficient xylitol production from kraft pulp

○Gregory Guirimand[1], Kentaro Inokuma[1], Takahiro Bamba[2], Kengo Sasaki[1], Chiaki Ogino[2], Tomohisa Hasunuma[1], Akihiko Kondo[2,3]
([1]Grad. Sch. of Sci., Technol. & Innov., Kobe Univ., [2]Dept. of Chem. Sci. & Eng., Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., [3]RIKEN, Biomass Eng. Program)
akondo@kobe-u.ac.jp

Xylitol is a valuable pentitol widely used in both pharmaceutical and food industries. The demand of xylitol is constantly growing worldwide and its value remains high, despite of extensive studies aiming to reduce its costs of production. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic waste may constitute an advantageous option to solve this issue. In the present study, xylitol was produced from kraft pulp derived from paper industry by using a recombinant *S. cerevisiae* YPH499 strain expressing cytosolic xylose reductase (XR), along with β-glucosidase (BGL), xylosidase (XYL) and xylanase (XYN) enzymes co-displayed on the cell surface. All these enzymes contributed to the consolidated bioprocessing (CBP) of the lignocellulosic material to xylitol to produce 2,3 g/L xylitol with 39,3% of yield from xylose contained in the biomass after 72 hours of fermentation. Further improvement of the cell surface display of xylosidase (XYL) and xylanase (XYN) by using a *SED1* "SSS" cassette, containing the coding sequences of the *SED1* promoter, the *SED1* secretion signal and the *SED1* anchoring domain, could be obtained. The optimized recombinant strain showed a significantly improved performance in xylitol production (3,4 g/L) with 57,4% of yield from xylose contained in the biomass after 72 hours of fermentation. A small scale optimization of fermentation conditions besides scaling up experiments have been conducted too and promising results for bio-refinery industrial production of xylitol have been obtained.

Enhanced cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of the fermentation process for efficient xylitol production from kraft pulp

○Gregory Guirimand[1], Kentaro Inokuma[1], Takahiro Bamba[2], Kengo Sasaki[1], Chiaki Ogino[2], Tomohisa Hasunuma[1], Akihiko Kondo[2,3]
([1]Grad. Sch. of Sci., Technol. & Innov., Kobe Univ., [2]Dept. of Chem. Sci. & Eng., Grad. Sch. of Eng., Kobe Univ., [3]RIKEN, Biomass Eng. Program)

Key words lignocellulose, cell surface display, fermentation, xylitol

4P-N055 長期間の継代培養を基盤とした出芽酵母へのグリセロール資化能の賦与

河合 一輝[1], 兼崎 友[2], 吉川 博文[3], ○平沢 敬[1]
([1]東工大・生命理工学院, [2]東農大・ゲノムセンター, [3]東農大・応生科)
thirasawa@bio.titech.ac.jp

有用物質生産の宿主として用いられる微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は，グリセロールを分解する代謝経路を有しているものの，グリセロール炭素源下で増殖はほとんど見られない．本研究では，グリセロールからの有用物質生産の宿主として利用するために，高いグリセロール資化能を有する出芽酵母の創製を目的とした．そのために，グリセロールを炭素源とした長期間の継代培養を行い，グリセロール資化能を細胞に賦与することを試みた．そして，継代培養により得られた細胞のトランスクリプトームデータをもとにグリセロール資化能をもつ出芽酵母の再構築を試みた．
出芽酵母の実験室株をグリセロール炭素源下で培養したところ，300 時間以上の長い導入期がみられ，その後増殖を開始した．増殖を開始した細胞について，指数増殖後期での植え継ぎを長期間繰り返す継代培養を行った．この継代培養の初期，中期，後期 (培養開始からそれぞれ 3，35，85 世代)の細胞についてグリセロール炭素源下であらためて培養したところ，世代数を重ねることで比増殖速度が上昇したことが確認された．植え継ぎ初期および後期の細胞について RNA-sequencing により遺伝子発現量を定量し，その発現量を比較した結果，後期の細胞では TCA サイクルおよび酸化的リン酸化にかかわる遺伝子の発現量が全体的に増加しており，またペントースリン酸経路にかかわる一部の遺伝子の発現量が大幅に減少していた．そこで，これらの代謝経路にかかわる遺伝子の発現を制御するタンパク質をコードする遺伝子について過剰発現や破壊を行ったところ，*HAP4* 遺伝子の過剰発現および *RIM15* 遺伝子の破壊がグリセロール資化能の賦与に有効であることが明らかとなった．

Construction of glycerol-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* based on long-term passage culture

Kazuki Kawai[1], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[3], ○Takashi Hirasawa[1]
([1]Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech., [2]Genome Res. Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol, passage culture, RNA sequencing

4P-G056 長期継代培養によりグリセロール資化能を獲得した出芽酵母の代謝フラックス解析

○湯澤 太路[1], 河合 一輝[1], 白井 智量[2], 近藤 昭彦[2,3,4], 平沢 敬[1]
([1]東工大・生命理工学院, [2]理研・バイオマス, [3]神戸大・科学技術イノベーション, [4]神戸大院・工)
thirasawa@bio.titech.ac.jp

【背景】バイオディーゼル製造時の副産物として生じるグリセロールは，世界中で供給過多状態にある物質のひとつである．当研究室では，さまざまな有用物質生産に実績を持つ出芽酵母を宿主として，グリセロールから有用物質生産を行う系の構築を目指している．出芽酵母はグリセロール分解経路を有するものの，これを炭素源として増殖することはほとんどできない．そこで，グリセロールを炭素源とした継代培養を行い，グリセロール資化能を有する出芽酵母細胞を獲得した．継代培養株について ^{13}C 代謝フラックス解析を行い，グリセロールを資化して増殖する際の出芽酵母の代謝状態を明らかにした．
【方法と結果】グリセロールを炭素源とした継代培養細胞は，世代数を重ねることに比増殖速度が上昇していった．継代培養において 35 世代および 85 世代経た細胞についてシングルコロニーアイソレーションを行い，ランダムに選んだ複数のコロニーを改めて液体培地で培養することで，比増殖速度を評価した．ランダムに選んだコロニーのうち最も高い比増殖速度を示したものを対象に，^{13}C 標識グルコースあるいは ^{13}C 標識グリセロールを含む培地を用いた代謝フラックス解析を行った．その結果，グルコース炭素源では世代数が高い株ほどエタノール生産のフラックスが向上していることが明らかとなった．また，グリセロール炭素源においては，世代による中央代謝経路における代謝フラックス分布に大きな違いは見受けられず，細胞内へのグリセロール取込みの違いが増殖速度の差に影響していることが推測された．

Metabolic flux analysis of glycerol-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* obtained by long term passage culture

○Taiji Yuzawa[1], Kazuki Kawai[1], Tomokazu Shirai[2], Akihiko Kondo[2,3,4], Takashi Hirasawa[1]
([1]Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech., [2]BMEP, RIKEN, [3]Grad. Sch. Shi. Tech. Innov., Kobe Univ., [4]Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words metabolic flux analysis, *Saccharomyces cerevisiae*, glycerol

4P-G057 Deletion of endogenous genes on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* improves xylitol yield during aerobic fed-batch fermentation

○Baixue Yang, Min Gou, Zhaoyong Sun, Yueqin Tang
(Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ.)
tangyq@scu.edu.cn

Xylitol, a five-carbon sugar alcohol, has been classified as one of the most promising chemicals among the top 12 bio-based chemicals by the US Department of Energy. Introducing the gene of xylose reductase (XR, coded by *XYL1*) to *Saccharomyces cerevisiae* can make it reduce xylose to xylitol. However, in *S. cerevisiae*, products of several endogenous genes including *XYL2* and *SOR1/SOR2* are able to oxidize xylitol to xylulose, though the oxidization activity is probably rather weak. By xylulokinase (XK, coded by *XKS1*) in *S. cerevisiae*, xylulose is converted to xylulose 5-phosphate and then enters pentose phosphate pathway (PPP). The consumption of xylitol by products of these endogenous genes makes the xylitol yield lower than the theoretical yield of 1.0. Recombinant *S. cerevisiae* strains, overexpressing NADPH-dependent *Candida tropicalis* XR (CtXR), were constructed via delta-region integration. By CRISPR-Cas9 system, *XYL2* or *XKS1* or *SOR1/SOR2* was disrupted to investigate their effects on xylitol yield. During aerobic fed-batch fermentation with 45 g/L xylose and 5 g/L glucose, the deletion of *XYL2* showed no effect on the xylitol yield, while the deletion of *XKS1* or *SOR1/SOR2* increased the xylitol yield from 0.75 to 0.98. However, when the initial glucose concentration was increased to 60 g/L, the xylitol yield was near 1, and not affected by the deletion of *XYL2* or *XKS1* or *SOR1/SOR2*.

Deletion of endogenous genes on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* improves xylitol yield during aerobic fed-batch fermentation

○Baixue Yang, Min Gou, Zhaoyong Sun, Yueqin Tang
(Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, xylose metabolism, CRISPR-Cas9, xylitol yield

4P-G058 分裂酵母の代謝改変株を用いた 3-ヒドロキシプロピオン酸生産

○高山 征也, 小西 理絵, 田中 勉, 近藤 昭彦
(神戸大院・工)
tanaka@kitty.kobe-u.ac.jp

＜研究背景・戦略＞
近年地球温暖化等の環境問題の観点から，再生可能資源であるバイオマスを原料として微生物の代謝を利用し，有用物質を生産するバイオリファイナリー型の社会への転換が求められている．本研究では耐酸性に優れた分裂酵母を用いて 3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)生産を試みた．CRISPR Cas9 system を用いて分裂酵母内の代謝経路を改変することで，3-HP 生産能に優れた分裂酵母を作製することを目指した．
＜結果・今後の展望＞
野生株に malonyl-CoA reductase(MCR)のみを導入したコントロール株は 3-HP を 0.33 mM 生産した．細胞質内の acetyl-CoA，malonyl-CoA 供給量の増加させることを目指し，CRISPR Cas9 system を用いてエタノール生産遺伝子やプロテアーゼ遺伝子の破壊を行い，代謝経路に関する遺伝子を *S. pombe* に導入した代謝経路強化株はコントロール株に比べ約 2.2 倍の 3-HP 生産量となった．
更なる生産量の増加を目指して本研究では酵素 MCR の生体内酵素活性の調整を行った．Malonyl-CoA から 3-HP への 2 段階反応を触媒する酵素 MCR を C 末端側ドメイン(MCR-C)と N 末端側ドメイン(MCR-N)の二つの酵素として設計し，*S. pombe* に様々なコピー数で導入した．本研究で作製した酵素活性調整株の中で C:N=3:2 とした株が最も 3-HP を生産し，コントロール株に比べ約 25 倍の生産量となった．
今後は代謝経路強化戦略と酵素活性調整戦略を組み合わせる事で更なる 3-HP 生産量の向上を目指す．

3-Hydoroxypropionic acid production using genome edited *Schizosaccharomyces. pombe*

○Seiya Takayama, Rie Konishi, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

Key words *Scizosaccharomyces pombe*, 3-hydroxypropionic acid, CRISPR Cas9 system, metabolic engineering

4P-N059 ピルビン酸代謝フローの転換による出芽酵母 2,3-ブタンジオール生産性の向上

○森田 啓介[1], 松田 史生[1], 岡本 浩二[2], 石井 純[3], 近藤 昭彦[3], 清水 浩[1]
([1]阪大院・情報, [2]阪大院・生命機能, [3]神戸大院・イノベ)
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では，様々な有用物質生合成の前駆体であるピルビン酸が細胞質とミトコンドリアに存在し，その制御メカニズムには不明な点が多い．本研究では細胞質中のピルビン酸プール量の向上を目指し，ミトコンドリアピルビン酸輸送体（Mpc1p）やミトコンドリア分解（マイトファジー）の必須因子（Atg32p）に着目した．そしてピルビン酸輸送の阻害や，ミトコンドリアの過剰蓄積が出芽酵母代謝に与える影響を解析し，得られた知見を 2,3 ブタンジオール（23BD）生産株の育種へと応用した．
【方法】出芽酵母 BY4742 株，*MPC1* 欠損株および *ATG32* 欠損株に酢酸リチウム法でベクターを導入し，形質転換体を構築した．培養は 5 mL の 20 g/L グルコース SD 培地で行い，培養 1 日目の菌体をから抽出した代謝物中間体を LC-MS/MS で分析した．また，培養 2 日目の培溶液をガスクロマトグラフィーで測定し 23BD 発酵能を評価した．
【結果】出芽酵母 BY4742 株に対する *MPC1* 欠損株と *ATG32* 欠損株の代謝変動を調べるため，各株から抽出した代謝物中間体のプール量を比較した．その結果 *MPC1* 欠損株と *ATG32* 欠損株では，ペントースリン酸経路や解糖系上流の代謝物量が変化していた．さらに，ピルビン酸プール量が *MPC1* 欠損株と野生株は同程度であるのに対し，*ATG32* 欠損株では 2.3 倍に向上しており，*ATG32* の欠損がより 23BD 生産に有効な可能性が示唆された．そこで，出芽酵母に 23BD 生産能を付与するため，ピルビン酸から 23BD を生産する反応を触媒する 3 つの代謝酵素遺伝子の過剰発現株を構築した．発酵性試験の結果，23BD 生産能を付与した BY4742 株の 23BD 生産濃度は培養開始 48 時間後で 23.5±12.8 mg/L だったが，*MPC1* 欠損株と *ATG32* 欠損株では，それぞれ 14.3 倍と 23.6 倍の 23BD を生産し（336.4±113.5 mg/L，557.0±20.6 mg/L），*ATG32* 欠損株でより高い生産濃度を達成した．

Redirection of pyruvate metabolic flow for 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae*

○Keisuke Morita[1], Fumio Matsuda[1], Koji Okamoto[2], Jun Ishii[3], Akihiko Kondo[3], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., [3]Grad. Sch. STI, Kobe Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, mitophagy, transporter, 2, 3-butanediol

4P-G060 低温ストレスにより誘導される南極産担子菌酵母が持つ二次代謝産物の探索

○辻 雅晴
（国立極地研）
spindletuber@gmail.com

南極のような極地に生息している菌類は氷点下でも細胞が凍る事無く，生存する事が可能なことから有機物の最終分解者として極地における物質循環に重要な役割を果たしている．菌類の二次代謝産物は成長や生殖には直接，関与していない代謝産物であるが，ストレス耐性の向上などに関与していると考えられている．しかし，南極のような極限環境下で生存している菌類が，氷点下という低温ストレスに晒された場合，二次代謝産物の生合成にどのような影響が出るのかは不明であった．そこで，昭和基地周辺から分離した担子菌類 Mrakia 属菌と Cystobasidium 属菌さらに Tausonia 属菌を至適生育温度と氷点下でそれぞれ培養した場合，どのような二次代謝反応に影響が出るのかをメタボローム解析により調べた．その結果，低温での生育に優れた Mrakia 属菌では，大きな二次代謝産物の変化は見られなかったが，Cystobasidium 属菌では ATP 阻害物質の分泌量が大きく減少し，Tausonia 属菌では細胞分裂の促進する効果があるサイトカイニンの分泌量が大幅に増加した．このことから南極産の菌類でも属ごとに全く異なる二次代謝反応を行っていることが明らかになった．
また，南極域は微生物資源調査の最後のフロンティアとされている．そこで，昭和基地周辺から分離した菌について，有用な二次代謝産物の探索を行なった．その結果，エタノール吸収阻害剤のカメリアサポニン B，気管支拡張薬の Pirbuterol，抗悪性腫瘍薬のアルトレタミンなどと類似の有用と思われる二次代謝産物を分泌していた．これらのことから，南極産菌類は微生物資源として有用であることが明らかなとなった．

Change in the secondary metabolite of Antarctic fungi by cold stress

○Masaharu Tsuji
(NIPR)

Key words Antarctic yeast, cold-adapted microorganism, metabolic analysis, cold stress

4P-G061 Isolation of thermotolerant mutants and characterization of fatty acid profile in *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16

○Chih Chan Wu[1], Takao Ohashi[1], Yung Yu Tsai[1], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., Japan, [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand)
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

Oleaginous yeast, *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16 (TK16) isolated from Thailand, is believed to be an ideal platform for lipid production because of its outstanding lipid production ability of accumulating lipid content up to nearly 70% of dry cell weight. So far, the lipid production and fatty acid profile of any oleaginous yeast growing at high temperature have never been assessed. Here, we isolated one thermotolerant mutant L1-1 from TK16 by breeding via stepwise adaptation. This mutant strain was able to grow at 39°C on YM plate in comparison to wild-type. The L1-1 also showed higher lipid yield and biomass at 39°C. Apart from its thermotolerance and higher lipid yield, this mutant strain displayed different fatty acid profile with the increased content of stearic and oleic acids along with the decreased content of linoleic and linolenic acids at 39°C. Based on the fatty acid profile, we speculated higher unsaturated fatty acid ratio in the cells may be related to cell growth and survival for maintaining cell membrane integrity growing at higher temperature. Although the underlying mechanism is needed to be unveiled, this study highlighted the thermotoletance and possibility of tuning fatty acid profile toward lipid production in this mutant strain.

Isolation of thermotolerant mutants and characterization of fatty acid profile in *Rhodosporidium toruloides* DMKU3-TK16

○Chih Chan Wu[1], Takao Ohashi[1], Yung Yu Tsai[1], Ryo Misaki[1], Savitree Limtong[2], Kazuhito Fujiyama[1]
([1]ICBiotech, Osaka Univ., Japan, [2]Fac. Sci., Kasetsart Univ., Thailand)

Key words *Rhodosporidium toruloides*, thermotolerance, lipid production, alteration of fatty acid profile

4P-G062 糸状菌 *Aspergillus niger* における alternative oxidase 遺伝子高発現によるシュウ酸生産速度の向上

○吉岡 育哲, 小林 慶一, 桐村 光太郎
（早大・先進理工・応化）
kkohtaro@waseda.jp

【目的】糸状菌 *Aspergillus niger* は，シトクロム鎖の他にシアン非感受性呼吸系を有している[1, 2]．当該呼吸系では alternative oxidase (AOX) によって ATP の生成を伴わずに NADH の再酸化が行われるため，AOX はクエン酸生産に寄与している [1, 2]．一方，*A. niger* は pH 5.5 以上，とくにアルカリ性の条件や高いリン酸濃度などの培養条件下ではシュウ酸を生産する [3]．シュウ酸はサイトゾルに局在する oxaloacetate hydrolase (OAH) によって生成する．クエン酸生産糸状菌を宿主とした OAH 遺伝子高発現株 EOAH-1 は最適条件下で 30 g/L のグルコースから 9 日間で 28 g/L のシュウ酸を生産する [3]．本研究では，AOX 遺伝子と OAH 遺伝子の高発現株を作製し，シュウ酸の高収量生産に利用した．

【方法および結果】AOX をコードする遺伝子 *aoxA* [2] と OAH をコードする遺伝子 *oahA* [3]の両者を高発現させた EAOXOAH-1 株を作製した．EAOXOAH-1 株は 7 日間で 30 g/L のグルコースを消費し，28 g/L のシュウ酸を生産した．これは EOAH-1 株による最終的なシュウ酸生産量と同量であり，培養日数が短縮された．以上より，*aoxA* の高発現はシュウ酸生産条件下でグルコースの代謝を促進し，シュウ酸生産の速度向上に寄与することを明らかにした．

[1] K. Kirimura, *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 2034-2039 (2000).
[2] K. Kirimura, *et al.*, Curr. Genet., 34, 472-477 (1999).
[3] K. Koboyashi, *et al.*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 41, 749-756 (2014).

Increase of oxalic acid production rate by overexpression of the alternative oxidase gene in *Aspergillus niger*

○Isato Yoshioka, Keiichi Kobayashi, Kohtaro Kirimura
(Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

Key words alternative oxidase, *Aspergillus niger*, metabolic engineering, oxalic acid

4P-N063 生きた麹菌摂取が宿主の腸内細菌叢及び腸内代謝物に与える影響

○都築 翔[1], 山田 和広[1], 高田 真由香[1], 村田 俊輔[1], 丸井 萌子[1], 長澤 麻央[1], 林 利哉[1], 片山 琢也[2], 丸山 潤一[2], 兒島 孝明[3], 中野 秀雄[3], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
([1]名城大・農, [2]東大院・農, [3]名大院・農)
mkato@meijo-u.ac.jp

【背景と目的】
わが国では古くから，味噌，醤油，清酒などを醸造し，豊かな食文化を形成してきた．これらの発酵食品，醸造食品中では麹菌が生きたまま存在しており，それらを食すことで人類は麹菌を生きたまま摂取していたことが考えられる．また，糸状菌は動植物の体内といった比較的低酸素環境にも棲息し，病徴を引き起こすこと，麹菌 *Aspergillus oryzae* および麹菌と近縁の *Aspergillus nidulans* は低酸素条件下(O_2 濃度が 0.5 % 以下）でも生存し，アミノ酸や有機酸を発酵生産することが明らかになっている．このことは，腸内といった比較的低酸素条件化において，麹菌が活動できることを示唆している．
本研究では，マウスに生きた麹菌を摂取させることにより，麹菌が生きたまま腸内に届くのか，酸素濃度が低い腸内で麹菌が活動しているのか，発酵などの代謝を行っているのであれば生成された代謝物や酵素によって腸内細菌叢および糸状菌叢にどのような影響を与えているのかを明らかにすることを目的とした．
【方法・結果】
人口胃液を調製し，麹菌が生存できるのかを評価したところ麹菌は pH1 の胃酸に 3 時間暴露されても，50 % 以上生存していた．このことから，麹菌は高い胃酸耐性を有することがわかった．
生理食塩水のみ（コントロール），生理食塩水に懸濁した生きた麹菌の胞子 5.0 $\times10^2$, 10^3 , 10^4 個をそれぞれ 30 日間毎日マウスに経口投与し，マウスの糞便を回収した．GC-MS および LC-MS を用いて糞便中の代謝物を解析した．コントロールと比べ，麹菌の胞子を与えたものでは Ala や Val などのアミノ酸やコハク酸などの有機酸が増加していた．さらに，糞便から DNA を抽出後，次世代シークエンサーを用いてメタゲノム解析した．コントロールに比べ，生きた麹菌の胞子を与えたものでは *Bacteroides* 門に属する細菌が増加していた．

Effect of intake of “Alived Koji” on the gut microbiota and metabolome.

○Sho Tsuduki[1], Kazuhiro Yamada[1], Mayuka Takada[1], Shunsuke Murata[1], Moeko Marui[1], Mao Nagasawa[1], Toshiya Hayashi[1], Takuya Katayam[2], Jun-ichi Maruyama[2], Takaaki Kojima[3], Hideo Nakano[3], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Meijo Univ, [2]Tokyo Univ, [3]Nagoya Univ)

Key words Aspergillus oryzae, metabolome, metagenome

4P-G064 *Clostridium perfringens* の毒素産生抑制に関わる内在性クオラムクエンチングの解析

○安達 桂香, Ravindra Pal Singh, 園元 謙二, 中山 二郎
（九大院・農）
nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp

〔背景〕
クオラムセンシング（QS）とは，同種・異種細菌間で共通の化学シグナルを介した菌密度依存的コミュニケーション機構のことであり，これにより細菌は毒素生産やバイオフィルム形成を集団的に行う．例えば，ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* は自己誘導性ペプチド（AIP）をシグナルとして，VirSR 二成分制御系（VirSR TCS）を介した *agr*-like QS により複数の毒素遺伝子を発現する．ところが，溶血毒素 PFO の遺伝子 *pfoA* の発現は一過的であり，対数増殖期中期以降著しく低下する．このことから，本菌は自身の QS を自ら抑制する内在性クオラムクエンチング（sQQ）機構を有することが予想された．そこで我々は，本菌の sQQ 誘導機構について解析し，一次代謝産物である酢酸や酪酸の蓄積にともなう pH の低下により QS-sQQ シフトが誘導されることを見出した．本研究では，この QS-sQQ シフトの全容解明を目指して，さらなる解析を行った．
〔方法・結果〕
C. perfringens strain 13 の菌体由来 total RNA を逆転写定量 PCR に供し，毒素と AIP を遺伝子レベルでモニタリングした．また，馴化培養液を各種毒性試験および LC-MS/MS に供して，毒素と AIP を分子レベルでモニタリングした．まず，培養 pH を 5.7 に制御した条件下，*C. perfringens* strain 13 を 0~6 時間嫌気培養したところ，*pfoA* の発現量は対数増殖期中期に最大値に達し，その値は pH を制御しない時と比較して 10 倍近く高い値を示した．更に，pH 変動による QS-sQQ シフトの影響を調査するため，*pfoA* 以外の VirSR TCS 制御下遺伝子に関して sQQ 誘導期馴化培養液の添加／無添加時の発現変動を解析した結果，VirSR TCS の直接的制御下にある遺伝子の多くが sQQ により下方制御されていた．現在，sQQ の分子機構解析を進行中であり，実環境中における QS-sQQ ネットワークの解明に繋がることが期待される．

Analysis of self-quorum quenching for virulence regulation in *Clostridium perfringens*

○Keika Adachi, Pal Singh Ravindra, Kenji Sonomoto, Jiro Nakayama
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Clostridium perfringens*, quorum sensing, quorum quenching, toxin regulation

4P-G065 Target-AID を利用したゲノム編集による高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種

○向山 正治[1], 市毛 栄太[1], 田中 勉[2], 西田 敬二[2], 近藤 昭彦[2]
([1]日本触媒, [2]神戸大学)
masaharu_mukoyama@shokubai.co.jp

【目的】n-ブタノールは化学品，自動車燃料として利用可能であるため，再生可能原料からの ABE 発酵が再検討されているが，ブタノール収率が低い問題がある．Clostridium saccharoperbutylacetonicum ATCC27021 株の pta と ptb1 の二つの遺伝子機能を破壊すると n-ブタノール収率が高くなることを見出しており，ゲノムを切らないゲノム編集技術 Target-AID を利用して遺伝子組み換え株にあたらない菌株構築を進めている．pta の破壊について 2017 年度日本農芸化学会大会において報告した．1) 今回は，ブタノール高収率に必要なもう一つの遺伝子である ptb1 の破壊について検討した結果を報告する．
【方法】Target-AID を構成する dCAS9-PmCDA と g-RNA を発現する遺伝子断片を挿入したクロストリジウム用のゲノム編集用ベースプラスミドに ptb1 破壊のため①ptb1 中に終止コドンを形成②PTB1 の活性中心 2)と推定される Arg を Lys に置換，③PTB1 の酵素タンパク質の構造を改変する変異を導入できる g-RNA をデザインし，ベースプラスミドに挿入してゲノム編集用プラスミドを作成した．これらプラスミドで C. saccharoperbutylacetonicum ATCC27021Δpta 株（Target-AID による pta 破壊株）を形質転換し，得られた形質転換体を継代培養した後，単一コロニーを形成させ，ptb1 配列を解析した．
【結果】上記ゲノム編集によって ptb1 上の 4 か所，P148L と V251I，A219T，G155R，G155E を編集した株を得た． これらの編集を組み合わせることで n-ブタノール収率の高い株を取得した．
1) 向山，市毛，田中，西田，近藤 2017 年度日本農芸化学会大会要旨集
2) Lawrence et.al. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2006, p. 1143-1154

Breeding of high yield butanol fermentative Clostridia by genome editing with Target-AID

○Masaharu Mukoyama[1], Eita Ichige[1], Tasutomu Tanaka[2], Keiji Nishida[2], Akihiko Kondo[2]
([1]Nippon Shokubai, [2]Kobe Univ.)

Key words *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, butanol, Genome editing, metabolic engineering

4P-N066 代謝物濃度絶対定量値を用いたエタノール生産シアノバクテリア代謝律速点の解析

○西口 大貴, 永井 暉, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】先行研究でエタノール生産能を付与したシアノバクテリア *Synechocystis sp.* PCC 6803 が構築されたが，その比生産速度は未だ小さいのが現状である．本研究ではこの比生産速度向上のために中心代謝中間体の絶対定量を行い，代謝状態の変化を熱力学，反応速度論の観点から解析した．これにより，比生産速度向上のための効果的な遺伝子改変箇所の特定を試みた．
【実験方法】シアノバクテリアを BG11 培地 (100 mL) で培養し，菌体を回収後，コールドメタノール法で代謝反応を止めるクエンチを行い，クロロホルム - メタノール - 水法で代謝物質を抽出した．液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置とガスクロマトグラフィー・質量分析計で各代謝物の非標識体と ^{13}C 標識体を別個に測定し，そのピーク面積比から代謝物濃度を求めた．
【結果】エタノールを生産しない野生株，エタノール生産株 Et 株，グリコーゲン合成経路を破壊することで比生産速度を向上した Et-g 株の代謝状態を比較するために 23 種類の中心代謝中間体の絶対定量を行った．3 株間で代謝物濃度に大きな違いが見られるものは無く，代謝状態はほぼ一定に保たれていることが分かった．得られた絶対定量値を用いて，各酵素反応がどれほど平衡から乖離しているかを示すギブス自由エネルギー変化 (ΔG) を算出したところ，PYK 反応の ΔG が負に大きくなり (Et-g 株: -24.5 kJ/mol)，細胞内で律速となっていることが示唆された．また，ENO 反応では *KM* 値 (文献値: 0.043 mM) と比較して基質となる 2PG の濃度 (Et-g 株: 0.70 mM) が著しく大きくなっており，酵素が飽和によって反応が進みにくくなっていることが示唆された．得られた 2 つ代謝改変候補の遺伝子の過剰発現を Et-g 株に対して行い，その比生産速度を評価した．構築した 2 株では共に比生産速度が向上し，特に *eno* 過剰発現株では 1.2 倍となった．

Rational metabolic engineering of ethanol-producing cyanobacteria using absolute quantification of primary metabolites

○Hiroki Nishiguchi, Hikaru Nagai, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words metabolic engineering, metabolic analysis, ethanol, photosynthetic bacteria

4P-G067 任意の栄養要求生変異株構築に向けた代謝シミュレーション法の開発

○徳山 健斗, 戸谷 吉博, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
環境中の化合物含有量を微生物の増殖挙動より定量するバイオアッセイ法は，簡便かつ感度の良い手法として注目されている．しかしながら，対象となる化合物は，微生物の細胞増殖に必須なビタミン類や，増殖阻害を起こす毒性物質などに限られている．対象化合物の範囲を拡充するには，目的化合物に感受型の菌体を単離または構築する必要がある．近年，与えた環境条件における細胞の増殖挙動を予測するシミュレーション技術が開発された．この手法を応用することで，遺伝子破壊による細胞増殖の応答を網羅的に探索できる．本発表では，任意の化合物の存在下でのみ生育が可能な代謝系を持つ栄養要求生変異株の設計に向けた，シミュレーションの利用法と予測結果について報告を行う．

【方法と結果】
大腸菌のゲノムスケール代謝モデル iJO1366 を用い，増殖速度を微小値 (0.1 h^{-1}) に固定し，定常状態における対象化合物の取り込み速度の最小値を線形計画法により計算した．対象化合物の取り込み速度の最小値が 0 の場合，細胞は対象化合物の要求性を持たないが，最小値が正の実数の場合は要求生を示すと考えられる．そこで，網羅的な遺伝子破壊の組み合わせについてシミュレーションを行い，目的化合物の要求性を示す遺伝子破壊候補を探索した．チロシンを対象に本手法を実施したところ，実際にチロシン要求生を示す事が知られているチロシン生合成経路中の *tyrA* 遺伝子の破壊が予測された．3－ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) が対象の場合，ウラシル分解経路中の *rut* 遺伝子と aspartate 1-decarboxylase をコードしている *panD* 遺伝子の 2 重遺伝子破壊により，3HP 要求生変異株が設計された．この 2 重遺伝子破壊株は，細胞内で補酵素 A の前駆体となるパントテン酸を生合成できず，細胞外から 3HP を取り込んで異化することで補酵素 A を供給することが予測された．

In silico design of auxotrophic mutant strain with using genome-scale metabolic model

○Kento Tokuyama, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words bioassay, metabolic simulation, auxotrophic mutant, *Escherichia coli*

4P-G068 相関解析を基盤としたメタボロミクスによる，1-ブタノール生産大腸菌改良における遺伝子改変標的の捜索

○新田 克章[1], Putri Sastia[1], Pontreli Sammy[2], Liao James[2], 福崎 英一郎[1]
（[1]阪大院・工, [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA）
sastia_putri@bio.eng.osaka-u.ac.jp

メタボロミクスは生体内の代謝物を網羅的に分析および解析する学問であり，生体サンプルの精密表現型を捉えることが可能であることから様々な学問領域で注目されている．その学問領域のひとつが代謝の最適化によって有用物質の生産量向上を目指す代謝工学分野である．本研究では次世代バイオ燃料の候補である 1-ブタノールを生産する遺伝子組み換え大腸菌にメタボロミクスの解析手法のひとつである PLS (Projection to Latent Structures / Partial Least Squares) 回帰分析を適用した．異なる 1-ブタノール生産能を有する複数の大腸菌の 1-ブタノール生産量を応答変数とし，各菌株のメタボロームを説明変数とした PLS 回帰分析を行い,生産量向上のための遺伝子改変標的の捜索を行った．結果として 1 - ブタノール生産に重要な前駆体であるアセチル - CoA が生産量に最も正に相関した．本結果を受けて,細胞内のアセチル - CoA 量を増やすためにアセチル-CoA を消費する主要な反応である酢酸生成反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を破壊する形質転換によりアセチル - CoA 量を増やすことに成功したが,多量のピルビン酸の蓄積が観測され 1 - ブタノール生産量増加を達成できなかった．本知見と相関解析において生産量に大きく負に寄与する代謝物が遊離 CoA およびメチオニン (遊離 CoA 生産に必要なシステインの代謝物) であったことから,・アセチル - CoA は炭素流速の律速点であること ・遊離 CoA の不足が 1 - ブタノール生産を妨げているというふたつの仮説が示唆された．上記を受けて本 2 点の問題を同時に解決可能な 1-ブタノール生産経路の初反応の酵素をコードする遺伝子を過剰発現することによって上記 2 点の問題を解決し,最大生産菌株と比べて 1-ブタノール生産量を 34%改善することに成功した．

Gene targets selection for 1-butanol production improvement in _Escherichia coli_ by correlation analysis-based metabolomics

○Katsuaki Nitta[1], Sastia Putri[1], Sammy Pontreli[2], James Liao[2], Eiichirou Fukusaki[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Eng., UCLA)

Key words metabolomics, butanol, *Escherichia coli*, PLSR

4P-G069 耐熱性 NAD⁺サルベージ合成酵素遺伝子群の大腸菌内での共発現とモジュール化

○谷口 博範, 岡野 憲司, 本田 孝祐
（阪大院・工）
honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD^+）は，酸化還元酵素反応の補酵素として働き，臨床診断薬補助剤としてや酵素を用いた物質変換プロセスでの利用などその用途は多岐にわたる．一方，NAD^+は熱安定性が低く，特に高温・塩基性下において容易に分解を受ける．我々は先行研究で，好熱菌由来の耐熱性酵素群を用いて，NAD^+の熱分解産物から NAD^+を再合成するサルベージ合成経路を *in vitro* で構築し，高温で NAD^+濃度を一定に保つことに成功している [1]．本研究では，高温での NAD^+濃度の安定化を可能にする実用性の高いモジュールを提供することを目的に，上記の経路に用いた 6 つの酵素を共発現する大腸菌株を作成したので報告する．
【方法と結果】
耐熱性酵素は，大腸菌などの中温菌を宿主として発現させたのち，熱処理のみにより精製できるという利点を有している．本研究では，まず NAD^+サルベージ合成に必要な 6 つの遺伝子をコードするポリシストロニックな人工オペロンを作成し，単一プロモーターによってその発現を制御できるベクターを構築した．本ベクターを大腸菌に導入して得られた共発現株から熱処理により精製した酵素群をモジュールとして利用することで，NAD^+の分解産物であるニコチンアミドと ADP リボースから NAD^+の再合成が可能であることを確認した．
現在，高温域で NAD^+の濃度を長時間一定に保つために必要なモジュール添加量の最適化に取り組んでいる．また，NAD^+/NADH 依存型の耐熱性酵素による有用物質生産反応と本モジュールとを組み合わせることで，当該モジュールの有用性を実証する実験を進めている．
[1] Honda K *et al*., (2016) Metab Eng, 35: 114-120

Modularization of _in vitro_ metabolic pathway for the salvage synthesis of NAD+

○Hironori Taniguchi, Kenji Okano, Kohsuke Honda
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words *in vitro* metabolic engineering, NAD^+ salvage synthesis, thermophilic enzyme

4P-H070 時空間に対して離散的・連続的に採取した環境水のプランクトンと物理化学プロファイルの特徴抽出

○種田 あずさ[1], 大島 嵩裕[2], 坪井 裕理[1], 伊達 康博[1,2], 守屋 繁春[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
（[1]理研・CSRS, [2]横市大院・生命医, [3]名大院・生命農学）
jun.kikuchi@riken.jp

【背景と目的】水環境中の生態が関わる事象（例えば赤潮）は，栄養塩や水温などの物理化学的性質に強く影響を受けることが知られている．そこで，本研究では，時空間に対して離散的・連続的に採取した環境水の物理化学プロファイル解析に，次世代シークエンス解析を統合的に組み合わせることによって，より重要な特徴を効率的に抽出するための統合的解析ストラテジーの構築を目的とした．
【方法】日本各地の海洋，淡水域等の時空間を離散的に採取した環境水試料（n=748）について，ICP-OES により無機元素群を一斉分析し，主成分分析と機械学習（ランダムフォレスト）を用いて分類した．次に，これらのうち時空間で連続的な印旛沼，西表島，お台場試料を選び（n=126），^{1}H-NMR により有機物群を一斉分析し，主成分分析後，お台場（n=36）について，非負値行列因子分解（NMF）によりシグナル帰属を遂行した．さらに，時系列連続的なお台場の 12 試料について，次世代シーケンサーに基づく原核・真核微生物群解析も追加し，無機元素群，有機物群（NMF 後），気温・水温などの物理情報と合わせて，多変量自己回帰（VAR）モデルを用いて赤潮優占種の藻類を含む分類群（綱）の増加に関与する環境因子を推定した．
【結果と考察】機械学習を用いた全サンプルの解析では，海水（Na と Si が多い），汽水（Na が少なく Si が多い），淡水（Na も Si も少ない）が特徴づけられた．次に地域を絞り，有機化合物データを用いた解析では，季節変動や空間分布が捉えられた．さらに，お台場における通年サンプルについて，物理化学プロファイルとプランクトンの解析結果を統合的に用いた VAR モデルにより，渦鞭毛藻の変動には無機元素（K，Mg，B，Sr）と物理的条件（水温，COD，T-N）が，ラフィド藻や珪藻の変動にはアミノ酸やアミノ酸誘導体の影響が大きいことが示唆された．

Profiling physicochemical and planktonic features from discretely/continuously sampled environmental water

○Azusa Oita[1], Takahiro Oshima[2], Yuuri Tsuboi[1], Yasuhiro Date[1,2], Shigeharu Moriya[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]CSRS, RIKEN, [2]Grad. Sch. Med. Life Sci., [3]Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ.)

Key words suface water, spatio-temporal analysis, machine learnig, vector autoregressive models

4P-N071 魚類・底泥分析データの AI 重要変数選択法による沿岸生態系の特徴抽出

○朝倉 大河[1], 坂田 研二[1], 伊達 康博[1,2], 菊地 淳[1,2,3]
（[1]理研・CSRS, [2]横市院・生医, [3]名大院・生命農）
jun.kikuchi@riken.jp

世界的な人口増加・都市化に伴い，沿岸地帯の埋め立てや富栄養化による生物多様性の損失が進んでいる．高い生態系サービスを有する河口・沿岸環境は生態恒常性の維持が嘱望され，これらの維持に影響する生物と環境の相互作用の変数の探索や選択方法の構築が重要となる[1]．また魚類は底生の無機物や細菌叢を取り入れることが考えられ，魚類の生態・生理の地域特異性は底生環境中の無機物・微生物群が強く関わることが予想され，日本の豊富な水産資源を支える環境変数として重要な役割を持つと考えられる[2]．我々は生態恒常性の維持に資する底生環境から魚類に至るまでの有機物・無機物・微生物群の相互関係性を捉える重要変数選択法の構築を目的とした．

【方法と結果】
魚類およびその生息環境における有機物・無機物・微生物群の評価のため，関東・東北地方の河口・沿岸域から採取した 24 種の魚類および底泥に対し，^{1}H-および ^{13}C-NMR による魚類筋組織・腸内代謝物，ICP-OES による魚類腸内・河口沿岸底泥の無機元素，次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子に基づく魚類腸内・底泥微生物群の計測を行った．得られたデータの相互関連を分析するため主成分分析
（PCA）や機械学習を行った結果，魚類筋組織および腸内代謝プロファイルから運動性や食性，生息域の違いが判別可能であることを見出した．本会では，異種計測群プロファイルを統合し，相関係数及び機械学習結果に基づく重要変数の選択と生態ネットワーク解析による視覚化を行うことにより，底生の魚類の生息域や生態によって異なる相互関係を俯瞰的に議論する．

Feature extraction of coastal ecosystem based on AI-assited important variable selection of analytical data from fishes and sediments

○Taiga Asakura[1], Kenji Sakata[1], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3]
([1]Riken・CSRS, [2]Grad.Sch.Med.Life Sci.,Yokohama City Univ.,
[3]Grad.Sch.BioAgrSci.,Nagoya Univ.)

Key words metabolome, microbiome, machine learning, network analysis

4P-N073 シグマ因子 SigE によるシアノバクテリア代謝制御の定量プロテオーム解析

○徳丸 雄磨[1], 植林 希代加[1], 小山内 崇[2], 松田 史生[1], 清水 浩[1]
（[1]阪大院・情報, [2]明治大・農）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のシグマ因子 *sigE* は，窒素枯渇時に発現が誘導され，糖異化遺伝子群を正に制御する転写調節因子である．本研究では，SigE の代謝制御機構をタンパク質レベルで解明することを目指し，定量プロテオーム解析をおこなった．従来の発見型プロテオーム解析とは異なり，定量プロテオーム解析では事前に決定した分析対象のタンパク質を選択的かつ高感度に定量する点に特徴がある．
【方法と結果】*Synechocystis* sp. PCC 6803 の野生株（WT），*sigE* 破壊株（Δ*sigE*），*sigE* 過剰発現株（*sigE*ox）を 100 mL の BG11 培地中で 40 μE の光独立栄養条件で培養した．対数増殖期の細胞からタンパク質を抽出し，トリプシン消化したペプチド断片を nano LC-MS/MS（島津製作所 LCMS-8060）の MRM モードを用いて分析した．分析ターゲットとした中心代謝および光化学系に関わるタンパク質 112 個のうち，81 個のタンパク質の定量に成功した．SigE は酸化的ペントースリン酸経路の酵素である Gnd，Zwf，TalB の発現量を正に制御し，光化学系タンパク質の発現量を負に制御する傾向がみられ，過去の遺伝子発現解析結果と一致していた（Osanai et al., 2006; 2011）．一方，遺伝子発現量に変化が見られなかった窒素同化経路の酵素発現量が（GdhA），*sigE*ox および Δ*sigE* で増減していたことから，SigE が窒素同化を翻訳レベルで制御していることが示唆された．これらの結果から，SigE は炭素取り込みを抑制し窒素同化を促進して細胞内の C/N バランスを制御するグローバルレギュレーターであることが確かめられた．

Target proteome analysis of a sigma factor SigE dependent metabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Yuma Tokumaru[1], Kiyoka Uebayashi[1], Takashi Osanai[2], Fumio Matsuda[1], Hiroshi Shimizu[1]
([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Sch. Agric., Meiji Univ.)

Key words cyanobacteria, sigma factor, proteomics, metabolic analysis

4P-H072 メタボローム解析によるオーランチオキトリウム属のドコサヘキサエン酸及びアスタキサンチン生産性の改善

○渡邉 研志[1,4], Hazel V. Arafiles Kim[1,4], 岡村 好子[1,4],
田島 誉久[1,4], 松村 幸彦[2,4], 中島田 豊[1,4], 松山 恵介[3], 秋 庸裕[1,4]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工, [3]長瀬産業, [4]JST・CREST）
aki@hiroshima-u.ac.jp

【研究背景】海洋性真核微生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は，ドコサヘキサエンエン酸（DHA）やアスタキサンチンなどの高付加価値油脂を著量生産する．当研究室では，未利用・廃棄物バイオマスを利用したエネルギー生産系とのコストバランスのため，それら有用油脂の生産系の構築に取り組んでいる．本研究では，DHA 及びアスタキサンチンの生産効率の向上のため，細胞内メタボロームの解析による育種標的の探索と，その情報をもとにした培養条件の検討を通じて，これらの代謝工学的戦略の有用性を検討した．
【結果・考察】演者らは褐藻由来のマンニトールを炭素源として酢酸菌 *Gluconobacter* 属によるフルクトースへの糖質変換と DHA 高生産性の *Aurantiochytrium* 属株による油脂発酵からなる二段階培養系を構築したが，グルコースを炭素源とした場合と比較すると脂肪酸生産量が低下していた．メタボローム解析によって，フルクトース資化時にトリカルボン酸（TCA）回路の抑制が認められたため，その活性化因子であるカルシウムイオンをフルクトース培地に添加したところ，TCA 回路関連物質の増加に伴い，DHA 生産量が 1.2 倍に増加した．また，カロテノイド高生産変異株として新たに単離した *Aurantiochytrium* sp. RH-7A 株の細胞内メタボロームを GC-TOF-MS によるノンターゲット解析に供したところ，野生株と比較して Myo-inositol や Ribose-5-phosphate の顕著な増加が認められた．これらの物質はアスタキサンチン生産性のヘマトコッカス藻における酸化ストレスマーカーとして報告されていることから，*Aurantiochytrium* 属においても酸化ストレスによりカロテノイド生産が誘導されることが予測された．そこで，酸化ストレス誘導物質である鉄イオンを培地へ添加すると，RH-7A 株のアスタキサンチン生産量は 7.6 倍に増加した．

Improvement of docosahexaenoic acid and astaxanthin productivity of *Aurantiochytrium* sp. through metabolome analysis

○Kenshi Watanabe[1,4], Kim Hazel V. Arafiles[1,4], Yoshiko Okamura[1,4], Takahisa Tajima[1,4], Yukihiko Matsumura[2,4], Yutaka Nakashimada[1,4], Keisuke Matsuyama[3], Tsunehiro Aki[1,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ, [3]NAGASE & CO. LTD., [4]CREST, JST)

Key words metabollomics, lipid production, *Aurantiochytrium*

4P-H074 枯草菌中枢代謝経路における酵素発現レベルとフラックス分布の関係

○戸谷 吉博, 富田 淳美, 松田 史生, 清水 浩
（阪大院・情報）
shimizu@ist.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】
枯草菌は遺伝学，生化学の知見が豊富なモデル微生物であり，そのゲノム縮小株は分泌タンパク質の高い生産能を有することから物質生産の宿主として注目されている．目的物質生産を効率化するには，代謝の仕組みに基づいたフラックスの最適化が必要であるが，枯草菌の中枢代謝がどのように制御されているか，十分に解明されていない．本研究では，代謝フラックスと酵素量を統合的に解析することで，その制御機構の解明を試みる．
【方法】
枯草菌の野生株およびゲノム縮小株 (MGB874) を好気回分培養し，対数増殖期において 13C 代謝フラックス解析とプロテオーム解析を行った．培養にはグルコース，もしくはグルコースとグルタミン酸を炭素源とする合成培地を用いた．代謝フラックス解析では，13C 標識グルコースを用いて細胞を培養し，タンパク質由来アミノ酸の 13C 濃縮度に基づいてフラックス分布を推定した．定量プロテオーム分析では，トリプシン消化した代謝酵素に由来するペプチド断片を nano-LC-MS/MS (Shimadzu) で定量した．
【結果】
解糖系と酢酸合成のフラックスはゲノム縮小株において 80%に低下した．解糖系下流および酢酸合成経路の酵素量はゲノム縮小株において減少しており，これらのフラックスの変化は酵素量レベルの制御によることが示唆された．また，両株ともグルタミン酸添加時には，クエン酸合成酵素のフラックスが 20%程度に抑制され，酢酸合成フラックスが約 2 倍に増加した．定量プロテオーム分析においては，クエン酸合成酵素の酵素量は減少したが，酢酸合成経路の酵素量には変化が見られなかった．グルタミン酸添加時には，クエン酸合成酵素の減少により TCA 回路への流入フラックスが抑制され，前駆体のアセチル CoA が酢酸としてオーバフローしたことが示唆された．

Relationship between protein expressions and flux distribution of central carbon metabolism in *Bacillus subtilis*

○Yoshihiro Toya, Atsumi Tomita, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu
(Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, metabolic flux analysis, proteomics, central metabolism

4P-H075 サンゴと共在細菌叢の構造解明に向けた細菌叢解析及び関連遺伝子群の推定

○伊藤 遼[1,2], 伊藤 通浩[3], 中野 義勝[3], 大久保 悠介[1], 森 一樹[2], 竹山 春子[1,2,4]
([1]早大・先進理工, [2]産総研・早大CBBD-OIL, [3]琉球大・理, [4]早大・ナノライフ創新研)
haruko-takeyama@waseda.jp

海中の生物多様性に寄与しているサンゴの生態に共在細菌叢は関わっているとされている．サンゴの共在細菌叢の割合は寄生するサンゴの条件によって変動することもあるがその理由も明らかとなっていない．また，共在細菌叢の多くは難培養微生物であることが多く，菌叢の割合が示す意味も理解できていない部分が多い．そのため本研究では 16S rDNA 解析を用いたサンゴ共在細菌叢の解明と，サンゴの共在細菌のゲノム解析も行い，明らかとなっていない点の多いサンゴ内での生活する微生物の働きの推定を行った．
2014 年から数回にわたり沖縄県にてサンゴ(*Acropora tenuis*)の枝を採取した．このサンゴの枝からメタ DNA を抽出し，微生物の 16S 配列を対象としたアンプリコンシーケンスを行った．このデータを元に季節ごと地点ごとの細菌叢解析を実施した．さらにサンゴ内の微生物を分離，ゲノム配列を取得し，その機能を解析した．
本研究にて採取したサンゴ内の細菌叢は採取した地点によって変化することが観察された．またさらに地点内で比較すると季節によりが変化する微生物が存在することも示唆された．この菌叢解析によって，多くのサンプルにおいて，*Endozoicomonas* 属が大きな割合を占めることがわかった．この *Endozoicomonas* 属はサンゴ以外の他の海洋生物内にも存在することが知られている微生物であり，本研究によってゲノム情報を解析すると，共生に関わると示唆される遺伝子を含んでいた．さらに同じ *Endozoicomonas* 属の中でも地点によりその種も異なっており，比較ゲノム解析を行うことでその種間の相違を推定した．これらを総合すると，サンゴの共在細菌は地点，共生主に適した微生物の割合が多くなることが示唆された．

Analysis of bacterial composition and estimation of related gene group for structural elucidation of coral and coral bacterial flora

○Haruka Ito[1,2], Michihiro Ito[3], Yoshikatsu Nakano[3], Yusuke Okubo[1], Kazuki Mori[2], Haruko Takeyama[1,2,4]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Fac. Sci., Univ. Ryukyus, [4]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ.)

Key words 16S rDNA, bacteria, coral, *Endozoicomonas*

4P-H076 生物間相互作用の俯瞰的理解に向けた統合オミクス解析

○丸山 徹[1,2], 伊藤 通浩[3], 若王子 智史[1], 大久保 悠介[1], 新里 宙也[4], 藤村 弘行[5], 中野 義勝[3], 須田 彰一郎[5], 竹山 春子[1,2,6]
([1]早大院・先進理工・生医, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]琉大・熱生研, [4]OIST・マリンゲノミクスユニット, [5]琉大・理, [6]早大・ナノライフ創新研)
haruko-takeyama@waseda.jp

言葉や文字といった信号を用いてヒトが意思疎通をするように，生物間にも何らかの信号を介した相互作用が存在する．我々は，この信号にあたる情報を大規模に収集し，そこから生物間相互作用を読み解くことを目指している．
サンゴは微生物とユニークな共同体を構築している．細胞内には褐虫藻という微細藻類を共生させており，体表・体内には海水中の物とは異なる細菌を共在させている．近年，共生藻・共在細菌がサンゴの生理状態に重要な役割を持つことが報告されており，サンゴの保全に向けて注目を集めているが，実験的制約の多さから，彼らの生物間相互作用の全容を捉えるには程遠い現状にある．そこで我々は，サンゴ・共生藻・共在細菌から収集したオミクス情報の統合解析によって，彼らの生物間相互作用を網羅的・俯瞰的に表現することを目指した．
沖縄に生息する造礁サンゴ（コユビミドリイシ）7 個体から約 1 年半に亘って計 48 本の枝を採取し，そこから「1.サンゴのトランスクリプトーム」「2.共生藻のトランスクリプトーム」「3.共在細菌叢のメタ 16S」「4.単離培養した細菌のゲノム」の 4 種類のオミクス情報を獲得した．
共発現遺伝子ネットワーク解析によって，サンゴと共生藻のトランスクリプトームの統合解析を行ったところ，生物間で協調して発現変動する遺伝子群が抽出された．この遺伝子群は，過去に報告されてきたサンゴ・共生藻の相互作用を捉えており，これらのメカニズムを説明する知見を含んでいることが見出された．また，メタ 16S 解析で菌種組成を調べたところ，サンゴの健康への寄与が予想されている *Endozoicomonas* 属細菌が一部の個体に存在することが見出された．これらの個体で特異的に発現する遺伝子群と，この細菌のゲノムを解析すると，過去に提唱されたサンゴ-*Endozoicomonas* 間の相互作用に関する仮説を裏付ける結果が見出された．

Multi-omics analysis to decipher interspecific communications

○Toru Maruyama[1,2], Michihiro Ito[3], Satoshi Wakaoji[1], Yusuke Okubo[1], Chuya Shinzato[4], Hiroyuki Fujimura[5], Yoshikatsu Nakano[3], Shoichiro Suda[5], Haruko Takeyama[1,2,6]
([1]Dept. Life Sci. Med. Biosci., Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Tropical Biosphere Res. Center, Univ. Ryukyus, [4]Marine Genomics Unit, Okinawa Inst. Sci. Technol., [5]Dept. Chem., Biol. Marine Sci., Univ. Ryukyus, [6]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ.)

Key words multi-omics, systems biology, symbiosis, coral holobiont

4P-N077 Proteomic analysis reveals the underlying mechanisms of improved acetic acid stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by *SET5* overexpression

○Xinqing Zhao[1], Mingming Zhang[2], Fengwu Bai[1]
([1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China)
xqzhao@sjtu.edu.cn

Improvement of inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* benefits efficient cellulosic ethanol production. In our previous study, *SET5* overexpression exerted improved acetic acid tolerance of S. cerevisiae. Meanwhile, fermentation efficiency was increased in the *SET5* overexpression mutant in the presence of acetic acid. To explore the underlying mechanisms of *SET5* overexpression on acetic acid tolerance, proteomic analysis was performed. It was shown that 467 proteins were changed, among which 380 proteins were upregulated and 87 downregulated. Functional category analysis revealed that proteins involved in glycolysis and PP pathway were upregulated, which was conducive to energy supply and precursor supplementation. The upregulation of proteins involved in MAPK and TOR/ROS pathway represented a positive response to inhibitors in strain BSET5. Meanwhile, Set5p overexpression promoted synthesis, processing and transport of proteins, which enable high efficiency and stability of cell growth and metabolism. Finally, four genes, *YPS1*, *RCN2*, *YRO2* and *RTC3* which encode the upregulated proteins in the proteomic analysis were examined for their functions in acetic acid tolerance. Decreased acetic acid tolerance was revealed when these four genes were deleted in BSET5, suggesting that the function of Set5p overexpression is closely related to these four genes. Further studies are ongoing to unveil the detailed mechanisms and explore novel functional genes to improve cellulosic ethanol production using *S. cerevisiae*.

Proteomic analysis reveals the underlying mechanisms of improved acetic acid stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by *SET5* overexpression

○Xinqing Zhao[1], Mingming Zhang[2], Fengwu Bai[1]
([1]Sch. Life Sci. Biotechnol., Shanghai Jiao Tong Univ., China, [2]Sch. Life Sci. Biotechnol., Dalian Univ. Technol., China)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, stress resistance, acetic acid, fuel ethanol

4P-H078 *N*-アセチルグルコサミン資化性酵母 *Scheffersomyces stipitis* の基質別代謝特性の解析

○猪熊 健太郎, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・イノベ）
akondo@kobe-u.ac.jp

【目的】*N*-アセチルグルコサミン（以下，GlcNAc）は，甲殻類の殻や昆虫の外骨格，および多くの糸状菌，酵母，藻類の細胞壁の主要成分の 1 つであるキチンの主要な構成単糖である．キチンの自然界における年間生産量は 10^{10}～10^{11} トンと試算されており，セルロースに次いで豊富に存在するバイオマス資源であると考えられている．酵母 *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* は，幅広い基質資化性を持ち，GlcNAc に対しても高い資化能力を持つことが分かっている．しかしながら，アミノ糖である GlcNAc が細胞内でどのように代謝されているかについては，未だ不明な点が多い．そこで本研究では，capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)を用いて，*S. stipitis* の基質別代謝経路の解析を試みた．
【結果および考察】酵母 *S. stipitis* を用いて，異なる 3 種類の糖（グルコース，キシロース，GlcNAc）を炭素源とした嫌気発酵試験を行った．そして，発酵開始から 24 時間後の細胞から代謝物を抽出し，各代謝物の蓄積量を CE-MS を用いて網羅的に解析した．その結果，GlcNAc を炭素源とした場合には，芳香族アミノ酸をはじめとした一部の窒素含有化合物の蓄積量が，グルコースやキシロースを炭素源とした場合に比べて増大していることが分かった．また，GlcNAc を炭素源とした場合の代謝経路上のボトルネックも明らかになった．今後，代謝解析により得られた情報を元に *S. stipitis* の代謝改変を進めることで，GlcNAc を基質とした新たな有用物質生産法の開発が期待できる．

Metabolic analysis of *N*-acetylglucosamine-assimilating yeast *Scheffersomyces stipitis*

○Kentaro Inokuma, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words *N*-acetylglucosamine, yeast, metabolic analysis, *Scheffersomyces stipitis*

4P-H079 LC-MS/MS によるマウス糞便中の代謝物測定 －若齢マウスと老齢マウスの測定例－

○國澤 研大[1,2], 服部 考成[1,2], 岡 有香里[1], 川名 修一[1],
河野 慎一[1,2], 早川 禎宏[1], 飯田 順子[1,2], 福崎 英一郎[3], 松本 光晴[4]
（[1]島津製作所, [2]阪大・島津分析イノベーション共同研, [3]阪大院・工, [4]協同乳業）
aki-kuni@shimadzu.co.jp

＜目的＞近年，腸管内の腸内細菌叢が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになりつつある．腸内細菌叢による宿主への影響を考える上で，腸内細菌叢が産生する代謝物が関係していると考えられる．本発表では，腸内細菌叢が産生する代謝物を測定するために，イオンペア条件およびイオンペアフリー条件での LC-MS/MS 測定を実施した．また，糞便メタボロミクスへの応用として，週齢の異なるマウスの糞便を，イオンペアフリー条件で分析し比較した．
＜方法＞通常環境下で飼育した C57BL/6J マウス糞便を回収し，新鮮糞便 50 mg にリン酸緩衝生理食塩水 450 µL を添加し，撹拌．その上清を遠心分離，限外濾過させ，測定用サンプルとした．LC-MS/MS 測定には，LCMS-8040 および LCMS-8050（島津製作所）を使用し，以下の 2 条件で測定を行った．イオンペア条件では，分離カラムに Mastro C18（島津ジーエルシー）を用い，15 mM 酢酸，10 mM トリブチルアミンを含む水溶液とメタノールを移動相とした分析を行った．イオンペアフリー条件では，分離カラムに Discovery HS F5-3（Sigma-Aldrich）を用い，0.1%ギ酸水溶液と 0.1%ギ酸メタノール溶液を移動相とした分析を行った．
＜結果＞イオンペア条件の LC-MS/MS では，アミノ酸を中心に 17 成分が検出された．イオンペアフリー条件の LC-MS/MS では，アミノ酸，ヌクレオチド，ヌクレオシドや TCA サイクルに関わる有機酸等 76 成分が検出された．また，イオンペアフリー条件での若齢マウスと老齢マウスの比較の結果，両者間で 40 種を超える代謝産物に大きな差があることが認められた．詳細は現在解析中である．

Measurement of Metabolites in Mice Feces by LC-MS/MS: Comparison between Young Mice and Old Mice

○Akihiro Kunisawa[1,2], Takanari Hattori[1,2], Yukari Oka[1], Shuichi Kawana[1], Shinichi Kawano[1,2], Yoshihiro Hayakawa[1], Junko Iida[1,2], Eiichiro Fukusaki[3], Mitsuharu Matsumoto[4]
([1]Shimadzu Corp., [2]Osaka Univ. Shimadzu Anal. Innov. Res. Lab., [3]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [4]Kyodo Milk Ind. Co., Ltd.)

Key words metabolic analysis, LC-MS/MS, Mice Feces

4P-H080 メタボロミクス解析を用いた山廃日本酒製造に関わる代謝産物の同定

○油屋 駿介[1,2], 立上 陽平[1,2], 森坂 裕信[1,3], 青木 航[1,3],
高阪 千尋[3,4], 谷 雅史[3], 廣岡 青央[3,4], 山本 佳宏[3,4], 北岡 篤士[5],
藤原 久志[5], 若井 芳則[5], 植田 充美[1,3]
（[1]京大院・農, [2]日本学術振興会特別研究員（DC1), [3]京都バイオ計測セ, [4]京産技研, [5]黄桜）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

[概要・目的] 山廃日本酒は，乳酸菌を酒母造りの初期段階で加えるため，発酵過程が複雑になり安定的な製造が難しい．山廃日本酒では，乳酸のみを添加したものと比べて酵母の生存力が高く，醪造りにおいて発酵が進んでも死滅しない．また興味深いことに，添加した乳酸菌由来の代謝産物などの影響により種々の有機酸やペプチドなどを含んでいる．このような理由から，山廃日本酒は乳酸のみを添加したものと比べて味わいが豊かである，と言われている．このような山廃日本酒を世界的に広めていくためには，これまでの職人的な手法だけではなく，より定量的かつ再現性の高い生産プロセスの確立が求められる．我々は，山廃日本酒に含まれる代謝産物が，より安定的な生産プロセスの確立にとって重要な指標となると考えた．具体的には，各生産プロセス段階において山廃日本酒中に含まれる代謝産物を網羅的に測定・評価し，その代謝物プロファイルを参照することで，再現性の高い発酵プロセスの開発ができると期待した．そこで本研究では，山廃日本酒の製造過程において優位に変動する代謝産物をメタボロミクス解析によって探索した．

[手法・結果] 山廃酛を用いた日本酒を黄桜において 2 ロット作製し，これらを時系列でサンプリングした．これらの時系列サンプルを nano LC-MS/MS を用いたノンターゲットメタボロミクスに供して，得たデータから m/z と保持時間のリストを作成し，主成分分析を行うことで変動の大きい代謝産物を抽出し，その代謝産物を同定した．また，トリプル四重極 LC-MS を用いたターゲットメタボロミクスにより，その代謝産物の経時的変化を定量的に測定した．本研究により同定した代謝物は，再現性の高い生産プロセスを確立する上で，重要な指標となる可能性が示唆された．[1]
[1] Tatsukami et al. submitted

Identification of metabolites involving manufacturing process of yamahai-Japanese sake using metabolome analysis

○Shunsuke Aburaya[1,2], Yohei Tatsukami[1,2], Hironobu Morisaka[1,3], Wataru Aoki[1,3], Chihiro Kohsaka[3,4], Masafumi Tani[3], Kiyoo Hirooka[3,4], Yoshihiro Yamamoto[3,4], Atsushi Kitaoka[5], Hisashi Fujiwara[5], Yoshinori Wakai[5], Mitsuyoshi Ueda[1,3]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]KISTIC, [4]KITC, [5]Kizakura)

Key words metabolic analysis, sake, production, manufacturing process

4P-N081 柑橘類の果皮に含まれるセラミド素材の LC-MS/MS による分析

柳川 大樹, ○今井 博之
（甲南大院・自然科学・生命・機能科学）
imai@konan-u.ac.jp

【背景と目的】柑橘類の果皮，あるいは搾汁残渣を機能性素材として積極的に活用する技術の開発が望まれている．私たちは最近，植物に存在するスフィンゴ脂質を LC-MS/MS を使用することによって，精製せずに，より低コストで簡便に同定・定量する方法を開発・報告している．本研究では，LC-MS/MS を使用し，柑橘類に比較的多く含まれるスフィンゴ脂質のグルコシルセラミド（GlcCer）について，搾汁残渣となる果実部位を試料として解析した．
【方法】試料を有機溶媒でホモジナイズし，全脂質を抽出した．全脂質を弱アルカリ処理し，生じた遊離脂肪酸をシリカゲルカラムで除いた後，GlcCe を含む脂質画分を LC-/MS/MS によって分析した．GlcCer 試料の分離には，SUPERIOREX ODS カラム(炭素含量 24%，粒子径 5 micro m，2.0 mm I.D. x 250 mm，資生堂)を直列に 2 本つないだ条件で行った．また，溶離液として，A 液：メタノール/ギ酸(1,000/1, v/v)，B 液：水/ギ酸(1,000/1，v/v)を使用し，0.2 ml/min の流速でグラジエント分析を行った．GlcCer 分子種の同定・定量は，タンデム四重極型質量分析計 ACQUITY®TQD (Waters)を使用した．また，GlcCer 分子種のプロダクトイオンの検出はスフィンゴイドの部分で行った．
【結果と考察】調べた 15 種類の柑橘類の果皮において，2-ヒドロキシパルミチン酸(16h:0)を有する GlcCer 分子種がほぼ 80%以上であった．また，GlcCer の構成スフィンゴイドについては，4,8-スフィンガジエニン[d18:2(4,8)]が多く，8-スフィンゲニン[t18:1(8)]も比較的多く検出された．

LC-MS/MS analysis of ceramide materials from citrus peels

Daiki Yanagawa, ○Hiroyuki Imai
(Life Funct. Materi. Sci, Grad. Sch. Natur. Sci., Konan Univ.)

Key words sphingolipids, glucosylceramides, Citrus, LC-MS/MS

4P-H082 メタボローム解析に資する次世代型多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理法の開発

相馬 悠希[1], 山下 俊幸[1], 高橋 政友[1], 秦 康祐[1], 川向 孝知[2],
塩田 晃久[2], 山田 佳代子[2], 宮川 浩美[1], 鈴木 健一[3], 杉立 久仁代[4],
芹野 武[4], 和泉 自泰[1], ○馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]エーエムアール, [3]ジーエルサイエンス, [4]アジレント・テクノロジー）
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】メタボローム解析に際しては，生体サンプルからの代謝物の抽出，精製，乾固，再溶解，誘導体化など，解析対象化合物の特性に応じて多段階の分析前処理が必要であり，各段階における実験誤差や誤操作が蓄積すれば，解析結果の再現性や信頼性の低下を招く可能性が高い．現状でメタボローム解析の再現性・信頼性の良し悪しは実験者の手技の習熟度に依る場合も多い．また，こういった前処理には多大な時間と労力を要するため，メタボローム解析のスループットの律速の 1 つとなっている．本研究では，メタボローム解析に際するサンプル前処理の正確性を担保しながら，これに要する時間・労力の削減を達成するため，次世代型多機能オートサンプラー/前処理ロボットによる自動前処理システムの構築に取り組んだ．
【方法・結果】同一試料から疎水性代謝物画分と親水性代謝物画分を回収し，それぞれ超臨界流体クロマトグラフィー質量分析(SFC/MS) によるリピドーム解析と，ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) による親水性代謝物のメタボローム解析を実施可能な抽出法として Bligh and Dyer 抽出法を採用し，血清サンプル用に最適化した．その後，次世代型多機能オートサンプラー/前処理ロボット PAL RTC (CTC Analytics AG, Zwingen Switzerland) を用いて，同手法を自動化し，同一のラット血清試料を手動と自動化法で抽出し，それぞれ該当画分を SFC/MS，GC/MS に供して解析結果を比較した．両者の間で著しい解析結果の相違は見られず，習熟した実験者と同等の結果を自動化手法で得られることが確認された．疎水性・親水性両画分を包括的に解析可能なサンプル自動前処理プロトコルを構築することに成功した．

Automation of sample preparation using robotic platform for metabolomic analysis

Yuki Soma[1], Toshiyuki Yamashita[1], Masatomo Takahashi[1], Kosuke Hata[1], Takatomo Kawamukai[2], Teruhisa Shiota[2], Kayoko Yamada[2], Hiromi Miyagawa[1], Kenichi Suzuki[3], Kuniyo Sugitate[4], Takeshi Serino[4], Yoshihiro Izumi[1], ○Takeshi Bamba[1]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]AMR Inc., [3]GL Sciences Inc., [4]Agilent Technologies Ltd.)

Key words metabolic analysis, metabolomics, lipidomics, automated sample preparation

4P-E083 GC/MS によるメタボローム解析に資する新規 Calibration-Curve-Locking Database の構築

○相馬 悠希[1], 山下 俊幸[1], 秦 康祐[1], 高橋 政友[1], 杉立 久仁代[2], 芹野 武[2], 宮川 浩美[3], 鈴木 健一[3], 川向 孝知[4], 塩田 晃久[4], 山田 佳代子[4], 和泉 自泰[1], 馬場 健史[1]
（[1]九大・生医研, [2]アジレント・テクノロジー, [3]ジーエルサイエンス, [4]エーエムアール）
bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】 代謝物の包括的な解析を目指すメタボロミクスでは，一分析あたりに幅広い化合物の解析が可能なことから各種クロマトグラフィー質量分析系が用いられている．化合物検出を担う質量分析部 (MSD) は，日間・バッチ間における感度変動が比較的大きいため，代謝物濃度算出に要する検量線を用時取得する必要がある．しかし，解析対象が多岐にわたるメタボローム解析において各代謝物の検量線を用時取得することはコスト・労力の面から非常に困難であり，定量的メタボローム解析は十分に実施できていないのが実情である．ただし，ガスクロマトグラフィー質量分析系においては，各代謝物に関して MSD 検出感度比が一定となるように調整するターゲットチューニングを用いることで，事前取得した検量線に基づく定量が可能とされている．この手法は，Calibration Curve Locking Database (CCLD) と呼ばれ，法医学・環境分析・農薬分析の分野で運用されている．本研究では，定量メタボローム解析に資する新たな CCLD の構築に取り組んだ．
【方法・結果】 MSD チューニングには DFTPP チューニングを採用し，化合物同定・定量解析には MassHunter および Fiehn ライブラリを用いた．中央代謝に関連する 52 代謝物の標準品混合物をオキシム化，トリメチルシリル化した後，Agilent Technologies GC-MS system (7890A-5975C) に供して検量線を取得した．試料調製・誘導体化・測定を複数日間で繰り返して再現性を検証した後，リテンション・MS スペクトル情報・検量線情報等を登録した新規メタボロミクス用 CCLD を構築した．マウス・ラットの血清サンプルプールを作製・冷凍保存し，複数日間にわたって分析して CCLD を用いて算出した代謝物濃度の日間誤差を確認した．算出濃度の再現性は化合物安定性・誘導体化効率・イオン化効率などの違いに依存することが明らかになった．

Construction of a novel Calibration Curve Locking Library for metabolomic analysis

○Yuki Soma[1], Toshiyuki Yamashita[1], Kosuke Hata[1], Masatomo Takahashi[1], Kuniyo Sugitate[2], Takeshi Serino[2], Hiromi Miyagawa[3], Kenichi Suzuki[3], Takatomo Kawamukai[4], Teruhisa Shiota[4], Kayoko Yamada[4], Yoshihiro Izumi[1], Takeshi Bamba[1]
([1]Med. Inst. Bioreg., Kyushu Univ., [2]Agilent Technologies Ltd., [3]GL Sciences Inc., [4]AMR Inc.)

Key words metabolic analysis, metabolomics, gas chromatography mass spectrometry, Calibration Curve Locking Database

4P-E084 ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発

○中野 洋介, 紺屋 豊, 谷口 百優, 福崎 英一郎
（阪大院・工）
fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

メタボロミクス研究を進める上で，代謝物の包括的な解析を実現するには代謝物のもつキラリティーについて考慮する必要がある．光学異性体どうしで生理学的活性が異なるものがあることは一般的に良く知られており，例えば D-アミノ酸は L-アミノ酸とは異なる生物学的機能を担い，疾病のバイオマーカーや食品開発に資する呈味物質としての D-アミノ酸の新規利用が検討されている．多くの光学異性体はほぼ等しい物理化学的性質をもつことから，通常の手法ではそれらの分離分析が困難である．そのため，従来の光学異性体選択的分析手法では，ターゲット化合物の誘導体化といった特殊な前処理を行うことで，望ましい分離や感度を得ている一方，分析の煩雑性やスループットの点で改善すべき問題が多い．近年，我々は光学分割能のあるクラウンエーテルを固定相にもつ分離カラムを利用した液体クロマトグラフ－タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて，誘導体化を行わずに高感度にタンパク質構成アミノ酸鏡像体を分離分析できる手法を構築したが，本研究では非構成タンパク質アミノ酸や核酸代謝物および生理活性アミンなどおよそ 120 種類の化合物にまで対象を広げ，さらに MS/MS パラメーターの最適化を詳細に行うことで，高感度かつ高再現性を示すハイスループットな分析系を構築した．また，本手法を食品分析に供し，D-アミノ酸をはじめとする極低濃度の代謝物の測定に成功し，結果としてキラリティーを考慮した興味深い代謝物情報が得られた．これらの結果は，本手法が食品を初めとする様々なサンプルのキラルメタボローム解析に応用できる新規分析手法として大きな可能性を有することを実証した．

Development of LC-MS/MS method for targeted chiral metabolomics

○Yosuke Nakano, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki
(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words D-amino acid, enantioselectivity

4P-N085 味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* 酵母の接合育種

○黒木 克明[1], 伊藤 功起[1], 近藤 彬文[1], 中村 建介[2], 尾形 智夫[1]
（[1]前橋工科大・工・生工, [2]前橋工科大・工・生命情報）
tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp

【目的】*Zygosacchromyces* 酵母は，味噌醤油製造に用いられる．接合育種は，育種された酵母株は，「遺伝子組換え体」には該当しないので，実用的に有効な育種法と考えられる．酵母の接合性は，接合遺伝子座(*MAT*)に，Ya 配列が挿入されると，その接合性は，a となり，Yalpha 配列が挿入されると，その接合性は，alpha となる．しかし，*Zygosaccharomyces* 酵母の接合遺伝子座(*MAT*)に関する知見が十分ではなく，接合が生じたかを調べることは容易ではなかった．そこで，接合に用いた *Zygosacchromyces* 酵母を次世代シークエンサーを用いて，ゲノム解析し，*MAT* 遺伝子座の知見を得ること及び接合の確認をおこなうこととした．
【方法】接合に用いた *Zygosaccharomyces* 酵母は，NBRC0740 と NBRC1876 である．接合は，マニュプレーターを用いて，二つの細胞を接触させておこなった．次世代シークエンサーは，HiSeq2500 を用い，配列のアセンブルは，Platanus でおこなった．
【結果】NBRC0740 では，Chromosome C に 2 か所（染色体中央領域と染色体末端領域），Chromosome F（染色体末端領域）に 1 か所の *MTL*(Mating type like)遺伝子座が見いだされた．そのすべてに Yalpha 配列が挿入されていた．一方，NBRC1876 では，Chromosome C の中央領域の *MTL* 遺伝子座周辺配列に，ゲノムデータベースと異なる配列が存在していた．その結果，接合に用いた 2 株では，Chromosome C の中央領域と Chromosome F の染色体末端領域の 2 か所の *MTL* 遺伝子座に差異があることが見いだされた．得られた接合株には，NBRC0740 と NBRC1876 の両方に由来する *MTL* 遺伝子座が存在することが見出され，接合していることを PCR 及び DNA 塩基配列決定により確認することができた．
本研究の一部は，中央味噌研究所平成 27，28 年度研究助成を受けて実施した．

Strain breeding of miso shoyu *Zygosaccharomyces* yeast by mating

○Katsuaki Kuroki[1], Koki Ito[1], Akifumi Kondo[1], Kensuke Nakamura[2], Tomoo Ogata[1]
([1]Dept. Biotechnol., Maebashi Institute of technology, [2]Dept. Life Sci. informa., Maebashi Institute of Technology)

Key words yeast, soy sauce, miso, mating

4P-H086 老香を発生させにくい清酒酵母の育種

○若林 興[1], 井上 豊久[1], 池田 優理子[2], 神田 涼子[2], 磯谷 敦子[2], 藤井 力[2], 中江 貴司[1]
（[1]日本盛, [2]酒総研）
kou.wakabayashi@nihonsakari.co.jp

【背景・目的】ジメチルトリスルフィド(DMTS)は清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分である． 酒類総合研究所では清酒における DMTS の主要な前駆物質として 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1)を同定し [1]，酵母のメチオニン再生経路の遺伝子である *MRI1*, *MDE1* のいずれかを破壊した株を用いることで清酒中の DMTS-P1 及び DMTS 生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 量）が顕著に減少することを明らかにしてきた [2]．そこで我々は突然変異による清酒酵母の *mri1*, *mde1* 変異株の取得を目的として研究を行うこととした． これまでにメチオニン再生経路の代謝中間体である 5'-methylthioadenosine (MTA)を利用した *mri1*, *mde1* 変異株のスクリーニング方法を確立し，清酒酵母協会 701 号(K701)の一倍体から DMTS-P1 生産能の低い *mri1*, *mde1* 変異株を各 1 株ずつ取得している [3]． 本報告では，取得した一倍体 *mde1* 変異株からのホモ変異型二倍体株の取得と，取得した二倍体変異株の清酒小仕込試験結果について報告する．
【方法・結果】変異型一倍体株と野生型一倍体株を接合させヘテロ変異型二倍体株を取得し，ランダムスポア法によりもとの変異株と接合型が異なる変異型一倍体株を複数株取得した．接合型の異なる変異型一倍体株を接合させることにより，最終的に 5 株のホモ変異型二倍体株を取得した．取得した 5 株について清酒小仕込試験を実施した結果，製成酒の DMTS-P1 濃度，DMTS 生成ポテンシャルともに対照の K701 の製成酒と比べて顕著に低く，発酵が若干遅れるものの，K701 とほとんど遜色のない清酒を製造できる酵母が取得できた．

1)磯谷ら, 日本醸造協会誌, 104(12), 919-925 (2009)
2) Wakabayashi *et al*., *J. Biosci. Bioeng*., 116, 475 (2013)
3)若林ら, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 講演番号 3C23a07

Cross breeding of sake yeast which resists generating the deterioration flavor “hineka” during the storage of sake

○Kou Wakabayashi[1], Toyohisa Inoue[1], Yuriko Ikeda[2], Ryoko Kanda[2], Atsuko Isogai[2], Tsutomu Fujii[2], Takashi Nakae[1]
([1]Nihonsakari Co., Ltd., [2]NRIB)

Key words dimethyl trisulfide, sake yeast, methionine salvage pathway

4P-H087 釜石「はまゆり酵母」の特性と日本酒醸造への応用

○齊藤 隆行[1], 山田 美和[1], 笠井 宏朗[2], 井上 論宜[3], 下飯 仁[1]
([1]岩手大学院・農, [2]北里大学・海洋生命科学部, [3]釜石市)
simoi@iwate-u.ac.jp

【目的】釜石「はまゆり酵母」は 2013 年に北里大学感染制御研究機構釜石研究所と独立行政法人製品評価技術基盤機構により，釜石市の花である「はまゆり」から分離された複数の酵母である．*Saccharomyces cerevisiae* に属しアルコール発酵力を持つことから，現在ビール醸造などに利用されている．本酵母を清酒醸造に利用できればその用途が大きく広がることから，本研究では「はまゆり酵母」を用いた清酒小仕込試験を行い，清酒酵母としての利用可能性を検討した．また，従来使用されている「きょうかい清酒酵母」との異同を調べるために生理学的および遺伝子レベルでの試験を行った
【方法及び結果】アルコール発酵性力が高い「はまゆり酵母」6 株を用いて，総米 200 g の清酒小仕込試験を行い，炭酸ガス減量，アルコール度，日本酒度，酸度などを分析し，生成酒についての官能評価を行った．用いた 6 種類の「はまゆり酵母」の内 2 株（KS5，KS6）は比較的アルコール発酵力が高く，対照として用いたきょうかい 7 号（K7）には及ばないものの 16%以上の高濃度のアルコールを生成した．生成酒は香が良く酸味と甘みのバランスがとれたものであった．発酵能の高かった KS5 及び KS6 について，キラー活性，TTC 染色性，ヨウ素染色，*PHO3/PHO5* 及び *RIM15* の遺伝子型を調べ K7 と比較した．その結果，KS5 及び KS6 はキラー性（−），TTC 染色（赤），ヨウ素染色（＋），*PHO3/PHO5*（実験室酵母型），*RIM15*（実験室酵母型）であった．以上の結果から，「はまゆり酵母」KS5 及び KS6 は比較的高いアルコール発酵能を持ち，系統的にはきょうかい清酒酵母とは異なることから，特徴のある清酒醸造への利用が期待できると考えられた．

Characterization of Kamaishi Hamayuri yeast and its application in sake brewing

○Takayuki Saito[1], Miwa Yamada[1], Hiroaki Kasai[2], Yuki Inoue[3], Hitoshi Shimoi[1]
([1]Grad. Sch. Agric.,Iwate Univ., [2]Sch.Marine.Bioscince.,Kitasato Univ., [3]Kamaishi City)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, yeast, fermentation

4P-H088 酢酸ナトリウム資化性を指標として育種した寡酸性酵母の諸性質解析

○中瀬 舞[1], 西本 遼[1], 窪寺 隆文[1], 田代 康介[2], 明石 貴裕[1]
([1]白鶴酒造, [2]九大院・農)
mai-nakase@hakutsuru.co.jp

清酒中の有機酸の大半は酵母が生産する．有機酸の量や組成は清酒の味に大きな影響を及ぼすため，それらを変えることでバリエーションに富んだ清酒の醸造が可能となる．これまでに我々は，清酒中の主な有機酸であり，過剰に存在するとエグ味となるコハク酸に着目し，寡酸性酵母の新規育種技術の開発を試みた．コハク酸は TCA サイクル内の α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ Kgd1 によって大半が合成される．*kgd1*Δ 株は酢酸ナトリウムを単一炭素源とした最小培地（YNBA 培地）では生育可能であるが，酢酸ナトリウムを単一炭素源とした栄養豊富な YPA 培地においては生育できないことが報告されているため，酢酸ナトリウム資化性を指標とした寡酸性酵母育種方法を開発した．UV 照射で変異誘導した清酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）から YPA 培地で生育できない株を取得し，二次スクリーニングとして YNBA 培地で生育可能な株を取得したところ，約半数の株は発酵性を維持しつつ，酸度およびコハク酸量が低下した株が取得できた．さらに YPA 培地・YNBA 培地における生育の違いにより，異なる有機酸組成の株を取得できることを報告した．
今回，上記育種株の諸性質を詳細に解析したところ，YPA 培地で生育できず YNBA 培地で生育可能な育種株では，製成酒のグリセロール量が親株と比較して 3 割減少し，α-EG も減少傾向にあることを確認した．今後，育種株の変異点同定と発現解析により，有機酸組成および糖組成の変化に関して詳細な解析を進めていく予定である．

Characterization of low acid producing yeasts bred by screening method based on sodium acetate-utilizing

○Mai Nakase[1], Haruka Nishimoto[1], Takafumi Kubodera[1], Kosuke Tashiro[2], Takahiro Akashi[1]
([1]Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake

4P-H089 エタノール耐性清酒酵母きょうかい 11 号における Ras2 活性化の効果

○石田 義大[1], 山田 美和[1], 森中 和也[2], 赤尾 健[2], 下飯 仁[1]
([1]岩手大院・農, [2]酒総研)
simoi@iwate-u.ac.jp

「背景および目的」清酒酵母きょうかい 11 号（K11）はきょうかい 7 号 （K7）の変異株であり，エタノールをはじめとする様々なストレスに耐性である．K11 の表現型の原因となる変異を探索した結果，アデニル酸シクラーゼをコードする遺伝子 *CYR1* の変異が原因であることがわかった．この変異（*CYR1*^{G2066A}）は Cyr1 の活性調節因子である Ras2 と相互作用する領域に存在することから，この変異が K11 における Ras2 と Cyr1 のシグナル伝達に影響を与えており，その結果エタノール耐性が向上することが考えられた．そこで本研究で，*RAS2* に常時活性型変異を導入し，その表現型を調べることとした．
「方法」*RAS2* の常時活性型変異遺伝子である *RAS2*^{val19} を含む YIp 型プラスミドを作成し，制限酵素で 1 箇所切断後，二倍体実験室酵母 X2180，清酒酵母 K7 及び K11 にそれぞれ形質転換した．また，ネガティブコントロールとして正常な *RAS2* を形質転換した株も作成した．それぞれの形質転換体について，ヒートショック耐性試験及び清酒小仕込試験を行った．
「結果」X2180 及び K7 の *RAS2*^{val19} 形質転換体は予想通りコントロール株と比較してヒートショック耐性の低下が見られた．しかし，このヒートショック耐性の低下は K11 の *RAS2*^{val19} 形質転換体においても観察され，K11 でも実験室酵母や K7 と同様に活性化 Ras2 のシグナルが Cyr1 へ伝達されることがわかった．また，清酒小仕込試験では，X2180 の *RAS2*^{val19} 形質転換体は初期のアルコール発酵が活性化したが，K7 の *RAS2*^{val19} 形質転換体では発酵力の低下が見られ，K11 の *RAS2*^{val19} 形質転換体ではわずかな発酵力の低下が見られた．

Effect of Ras2 activation of ethanol tolerant sake yeast K11

○Yoshihiro Ishida[1], Miwa Yamada[1], Kazuya Morinaka[2], Takeshi Akao[2], Hitoshi Shimoi[1]
([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Iwate Univ., [2]NRIB)

Key words sake yeast, heat shock

4P-H090 カプロン酸エチルを高生産する尿素非生産性清酒酵母 S9arg の実用化

○栗林 喬[1], 佐藤 圭吾[1], 城 斗志夫[2], 金桶 光起[1]
([1]新潟県醸造試, [2]新潟大・農)
kuribayashi.takashi@pref.niigata.lg.jp

【目的】*FAS2-G1250S* 変異を有するカプロン酸エチル高生産性清酒酵母は，高級酒製造用として広く利用されている．また近年，飲食品の安全志向への対応や，国外への輸出拡大に向け，カルバミン酸エチルの低減を目的とした尿素非生産性清酒酵母が各所で開発されている．我々は，醸造特性の低下が懸念される変異処理を用いることなく，カプロン酸エチル高生産性と尿素非生産性を付与した新潟吟醸酵母 S9arg の育種に成功した．[1)] 本研究では，実用規模による S9arg 株の清酒醸造試験を行ったので報告する．
【方法および結果】新潟吟醸酵母 G9NF 株から，酵素による遊離脂肪酸定量法を応用したハイスループットスクリーニング法 [2)] を使用し，カプロン酸エチル高生産性株を 1 株分離した．さらに，この分離株から，尿素非生産性酵母の選択培地（CAO 培地）を用いて S9arg 株を選抜した．新潟県内 5 酒造場による S9arg 株を用いた実地醸造試験において，5-7 mg/L のカプロン酸エチルを含む，良好な酒質の製成酒が得られた．また，何れの製成酒からも尿素は不検出であったことから，S9arg 株が優れた醸造特性を有することを確認した．
1) Kuribayashi et al., Mycoscience, in press (2017). DOI: 10.1016/j.myc.2017.02.005
2) 新潟県: 酵母の取得方法（特許第 5963123 号）

Isolation of a spontaneous non-urea-producing sake yeast carrying a *FAS2* mutation

○Takashi kuribayashi[1], Keigo Sato[1], Toshio Joh[2], Mitsuoki Kaneoke[1]
([1]Niigata Pref. Sake Res. Inst., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

Key words non-urea-producing sake yeast, ethyl caproate, cerulenin-resistant, spontaneous mutant

4P-H091 花から分離した野生酵母の糖資化能と清酒の成分に及ぼす影響

○大原 礼仁[1], 三井 俊[2], 船越 吾郎[2], 伊藤 彰敏[2], 志水 元亨[1], 加藤 雅士[1]
([1]名城大院・農, [2]あいち産科技セ)
moshimi@meijo-u.ac.jp

【目的】多様化した食文化を背景に国内での清酒の消費量は減少傾向にあり，新たな特徴を付与した清酒の開発が求められている．我々はキャンパス内の花(カーネーション)から酵母を分離し，清酒の醸造に用いることで，従来の清酒とは異なる香味を持つ名城大学ブランド清酒『華名城(はなのしろ)』を開発した．本研究では，花から分離した野生酵母 MC7-1 と一般的な清酒製造に用いられる酵母 K901(協会酵母 9 号)を用いて製造した清酒の成分比較，および協会酵母と野生酵母の糖資化能の違いが清酒の香味に及ぼす影響を明らかにした．

【方法・結果】本学附属農場の花から分離した *Saccharomyces cerevisiae*(MC7-1)を用いて清酒の小仕込み試験を行なった．また，還元糖分析用 HPLC などを用いて醸造した清酒中の成分を解析した．対照には K901 を用いた．
K901 を用いて醸造した清酒に比べて，MC7-1 を用いた清酒では著しく日本酒度が低かった．このことから MC7-1 を用いて醸造した清酒には多くの糖が含まれていると考えられたため，還元糖 HPLC を用いて清酒に含まれる糖を分析した．その結果，MC7-1 を用いて醸造した清酒には K901 を用いて醸造した清酒の 25 倍のイソマルトースが含まれていた．そこで次に，酵母の発酵に伴うイソマルトース量の変化を調べるため，麹菌による米糖化液を調製後，K901 と MC7-1 をそれぞれ加え，発酵液中のイソマルトース量を経時的に測定した．調製した米糖化液中のイソマルトース濃度は 46 mM であったが，K901 を加えると 18 日後には 9.0 mM まで減少した．一方，MC7-1 を加えて 18 日経過しても 41 mM のイソマルトースが残存していた．
以上の結果から，MC7-1 はイソマルトース資化能が低いため，MC7-1 を用いて醸造した清酒にはイソマルトースが多く存在することが明らかとなった．また，『華名城』のほのかな甘味はイソマルトースに起因することが示唆された．

Effect of the sugar assimilability of a wild yeast on sake components.

○Reiji Ohara[1], Shun Mitsui[2], Goro Funakoshi[2], Akitoshi Ito[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1]
([1]Meijo Univ. Agric., [2]Food Res. Center, ACIST)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, sake, isomaltose

4P-H092 清酒中オリゴ糖の構造解析

○本田 千尋, 山田 真理子, 徳岡 昌文, 進藤 斉, 穂坂 賢
(東農大院・農)
m3tokuok@nodai.ac.jp

【目的】清酒中のオリゴ糖は甘味に寄与するだけでなく，アルコールや酸などの刺激を和らげ粘張性を高めるなど，清酒の味の調和に不可欠であると考えられている．我々はこれまでに，親水性相互作用クロマトグラフィー/飛行時間型質量分析計 (HILIC-TOF/MS) により，清酒には少なくとも重合度 18 までのオリゴ糖が含まれることを示した[1]．これらのオリゴ糖は β-アミラーゼで分解されない共通構造を持つことから，清酒オリゴ糖として，現在研究を進めている．本研究では，清酒オリゴ糖の構造について検討した．
【結果及び考察】エバポレーターにより脱エタノールした清酒を活性炭処理後，アミノカラムを用いた液体クロマトグラフにより重合度 6，7，8 の清酒オリゴ糖をそれぞれ精製した．取得した重合度 6 の清酒オリゴ糖は，β-アミラーゼ及びイソアミラーゼで全く分解されなかったが，グルコアミラーゼでは完全に分解された．次に，酵素量を減らした条件では，清酒オリゴ糖は直鎖標準品よりもグルコアミラーゼによる分解が遅く，その一部は分解されなかった．また，生成物にグルコース以外は検出されなかった．これらの結果から，重合度 6 の清酒オリゴ糖の非還元末端には，グルコース 1 単位が α-1，4 と異なる様式で結合していること，及び重合度 6 の清酒オリゴ糖溶液中には，グルコアミラーゼによる分解性が異なる異性体が存在することが示された．重合度 7 と 8 の精製品でも同様の結果が得られたことから，清酒オリゴ糖は上記の構造的特徴を共通して持つことが示唆された．現在，より詳細な構造決定のために，メチル化解析及び NMR の検討を行っている．
1) Tokuoka, M., *et al.* : *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press (2017)

Structural analysis of the oligosaccharides in sake

○Chihiro Honda, Mariko Yamada, Masafumi Tokuoka, Hitoshi Shindo, Masaru Hosaka
(Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric.)

Key words sake, oligosaccharide, HLICTOF/MS

4P-H093 The significance of the solid-state saccharification process in *Xiaoqu-Mijiu* production

○Xuan Yin[1], Yumiko Yoshizaki[2], Kayu Okutsu[2], Taiki Futagami[2], Hisanori Tamaki[2], Kazunori Takamine[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Agric., Kagoshima Univ.)
k7814020@kadai.jp

Xiaoqu-mijiu is a type of traditional Chinese spirits made from rice and *Xiaoqu*. *Xiaoqu* is prepared by culturing mold and yeast naturally on cereals and thus used as a source of enzyme and yeast for brewing. The *Xiaoqu-mijiu* production begins with solid state saccharification, where steamed rice is mixed with 1% (w/w) *Xiaoqu* and incubated for 24 hours at about 35°C. The mash is then mixed with water, left to ferment 7 days, and finally distilled. This solid state saccharification process is unique compared with the processes for other alcoholic beverages; however, its significance in *Xiaoqu-mijiu* making is still obscure. To reveal the significance of solid state saccharification process, we investigated the changes of the microbes and components induced by solid state saccharification. We confirmed that 77% of rice starch was degraded to glucose, the growth of mold increased about 10 times, and the enzyme activities of α-amylase, glucoamylase, and protease were also increased 46, 73 and 21 times, respectively after saccharification. Furthermore, levels of lactic acid were increased about 4000 times so that pH of the mash was lowered from 5.2 to 3.7. In addition, we observed that 35°C is the optimal temperature for the mold growth in *Xiaoqu*. These results indicate that mold grows during saccharification followed by production of enzymes to accelerate the saccharification and lactic acid to prevent a contamination during brewing.

The significance of the solid-state saccharification process in *Xiaoqu-Mijiu* production

○Xuan Yin[1], Yumiko Yoshizaki[2], Kayu Okutsu[2], Taiki Futagami[2], Hisanori Tamaki[2], Kazunori Takamine[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Agric., Kagoshima Univ.)

Key words *Xiaoqu-mijiu*, spirits, mold, solid state saccharification

4P-H094 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の酸性プロテアーゼ遺伝子 *pepA* 破壊および高発現が芋焼酎醸造に与える影響

○瀬戸口 翔[1,4], 水谷 治[2], 高橋 徹[3], 山田 修[3], 岩井 謙一[4], 髙瀬 良和[4], 外山 博英[2], 二神 泰基[5], 玉置 尚徳[5]
([1]鹿児島大院・連農, [2]琉球大・農, [3]酒総研, [4]霧島酒造, [5]鹿児島大・農)
s-setoguti@kirishima.co.jp

【目的】黒麹菌 *A. luchuensis* が生産する酸性プロテアーゼは焼酎もろみの酸性条件下でも作用することから焼酎香味への影響も大きいと考えられる．本研究では酸性プロテアーゼが焼酎麹菌の育種指標として有望かを調べるために *A. luchuensis* が持つ酸性プロテアーゼ遺伝子の破壊株および高発現株を作製し，これらの株を用いた製麹試験と芋焼酎の小仕込み試験を行った．
【方法・結果】
本研究では酸性プロテアーゼ遺伝子として，アスパラギン酸プロテアーゼをコードする遺伝子 *pepA* をターゲットとし，はじめに *A. luchuensis* RIB2604 および *A. luchuensis* RIB2604Δ*ligD* を親株としてアグロバクテリウム法により *pepA* 破壊株（Δ*pepA* 株）および高発現株（OE*pepA* 株）を作製した．*pepA* 高発現には *glaA142* プロモーターおよび *agdA* ターミネーターを用いた．次に，フラスコ製麹試験を行い，得られた米麹の酸性プロテアーゼ活性を測定した．その結果，Δ*pepA* 株は親株の 50％程度まで活性が低下し，OE*pepA* 株は親株の 24 倍という非常に高い活性を示した．さらに，フラスコ製麹によって得られた米麹を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行った．得られた芋焼酎の香気成分について分析した結果，複数の成分に差が確認され，Δ*pepA* 株の麹を用いると親株と比較してイソアミルアルコールなどの高級アルコール類が多く，酢酸イソアミルや *β*-フェネチルアルコール，酢酸 *β*-フェネチルなどの成分も多くなった．これに対して OE*pepA* 株の麹を用いるとこれらの香気成分は親株と比較して少なくなった．以上の結果より，麹菌の酸性プロテアーゼは芋焼酎の香気成分に深く関わっており，焼酎麹菌の育種指標として有望であることが示された．

Effect of *pepA* gene deletion and overexpression in *Aspergillus luchuensis* on sweet potato *shochu* brewing.

○Sho Setoguchi[1,4], Osamu Mizutani[2], Toru Takahashi[3], Osamu Yamada[3], Kenichi Iwai[4], Yoshikazu Takase[4], Hirohide Toyama[2], Taiki Futagami[5], Hisanori Tamaki[5]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [2]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [3]NRIB, [4]Kirishima Shuzo Co., Ltd., [5]Fac. Agric., Kagoshima Univ.)

Key words *shochu*, *Aspergillus luchuensis*, *pepA*, protease

4P-H095 泡盛醸造に甕（カメ）を使用する効果の検討

○仲村 佑介, 玉城 康智
（沖縄高専・生物資源）
tamaki@okinawa-ct.ac.jp

【背景と目的】泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒であり，特徴の一つとして古酒化がある．3 年以上熟成された泡盛は古酒（クース）と呼ばれ，芳醇な香りとまろやかな口当たりで人気が高い．古酒には多くの香味成分が含まれており，最近は古酒香の一つとして 4,5-ジメチル-3-ヒドロキシ-2(5H)-フラノン（ソトロン）が注目されている．ソトロンはメープルシロップに似た香りを持ち，カメ熟成した古酒の特徴香と言われている．これまで，ソトロンはガラスやステンレス貯蔵の泡盛から検出されず，カメ貯蔵の泡盛に含まれていることが報告されている．本研究では，泡盛醸造工程でもろみの発酵や泡盛熟成にカメを使用することで，泡盛香味成分に及ぼす効果を検討する．
【方法】ガラス容器に泡盛もろみ発酵後期のアルコール濃度 20%に調製した溶液 40ml を注ぎ，泡盛香味成分（フェルラ酸，4-VG，バニリン）をそれぞれ 100ppm となるよう添加した．さらにカメ粉末を 10g 加え，これをモデルカメ仕込みもろみとし，もろみの発酵期間と同様 15 日間，常温暗所で静置した．その後，モデルカメ仕込みもろみから溶液を採取し，高速液体クロマトグラフ分析装置（HPLC）で泡盛香味成分およびソトロンの分析を行った．また，市販の泡盛（4 銘柄）も同様に分析を行った．分析した 4 銘柄のうち，2 銘柄はもろみ発酵容器にステンレス，泡盛熟成容器にカメを使用し，残りの 2 銘柄はもろみ発酵容器と泡盛熟成容器にカメを使用している．
【結果と考察】モデルカメ仕込みもろみ及び市販の泡盛（4 銘柄）から，ソトロン標準物質と同様のピークが検出されたことから，ソトロンが含まれていることが確認された．ソトロンが検出された要因として，もろみ発酵及び熟成に用いられるカメの関与が示唆された．

Study on the effect of using pot for awamori brewing

○Yusuke Nakamura, Yasutomo Tamaki
(Dept. Bioresour. Eng., Natl. Inst. Technol. Okinawa Coll.)

Key words awamori, sotolon, pot

4P-H096 蛍光指紋による泡盛の簡易・迅速品質評価に向けた基礎的検討

蔦 瑞樹[1], 相山 怜子[1], ○塚原 正俊[2], 塚原 恵子[2], 平良 英三[3]
（[1]農研機構・食総研, [2]バイオジェット, [3]琉球大・農）
mizukit@affrc.go.jp

【背景・目的】
泡盛は沖縄で独自に発展した蒸留酒で, 600 年以上の歴史を有する日本最古の蒸留酒でもある.長期間貯蔵させた泡盛は「古酒（クース）」と呼ばれ,古来より珍重されている. また, 醸造所や蒸留方法, 貯蔵期間の違いにより泡盛の品質は多岐にわたる. しかし, ウイスキーや日本酒と比べて泡盛に関する科学的な知見は少なく, 客観的な品質評価法の開発が求められている. そこで本研究では蛍光指紋に着目した. 蛍光指紋とは, 試料に照射する励起光の波長を連続的に変化させながら測定した複数の蛍光スペクトルを 3 次元的に重ね合わせた等高線状のデータである. 等高線のパターンは成分に固有であり,マンゴーの産地判別等, 蛍光指紋による様々な食品評価の研究が報告されている. 本研究では, 蛍光指紋を用いた泡盛品質の簡易・迅速評価について基礎的な検討を行った.
【方法・結果】
泡盛と，古酒の特徴香成分であるバニリン，その前駆体である 4-ビニルグアイアコール（4-VG）標準試薬の蛍光指紋を測定した. 泡盛試料の蛍光指紋は明確な 3 つの蛍光ピークを有しており，そのうち 2 つは試料の貯蔵期間の長いほど減少する傾向があった. また, 微弱ながら貯蔵期間が長いほど蛍光強度が増加する波長領域も存在した. 蛍光指紋データの主成分分析により, 新酒と古酒が主成分スコアプロットで明確に分離された. 泡盛, 標準試薬の蛍光指紋と及び主成分ローディングのピーク位置を比較すると, これらのピークは 6 つのグループに分類できることが明らかになった. そのうち, 2 つのグループは 4-VG の, 他の 2 つはバニリン蛍光に由来することが分かった. これらの結果から, 蛍光指紋により貯蔵期間等の泡盛品質を簡易かつ迅速に評価できる可能性が示唆された.

A preliminary study of Awamori fluorescence fingerprint for its easy and rapid quality inspection

Mizuki Tsuta[1], Ryoko Aiyama[1], ○Masatoshi Tsukahara[2], Keiko Tsukahrara[2], Eizo Taira[3]
([1]NFRI, [2]Biojet, [3]Fac. Agric., Univ. Ryukyus)

Key words aging, distillation, 4-vinylguaiacol, vanillin

4P-H097 栽培条件の異なった京都産酒米における貯蔵タンパク質の解析

○沼本 穂, 下司 友仁香, 森本 陽子, 増村 威宏
（京府大院・生命環境）
masumura@kpu.ac.jp

【背景・目的】 酒造りにおける米貯蔵タンパク質は，清酒の香味を形成する重要な成分である一方，過多のタンパク質は雑味の原因となる．このため，酒造米にはタンパク質含量の少ない品種が用いられる．貯蔵タンパク質には，グロブリン，グルテリン，プロラミンが存在する．グルテリンは全貯蔵タンパク質の 60%以上を占め，発酵工程における製麹や酵母の重要な窒素源であることから，清酒の呈味を決定する一因であるとされている．本研究は，京都産酒米の品質向上と清酒の地域ブランド向上を目指し，作期や施肥の異なる条件下で栽培された京都産酒米（京の輝き，祝）の貯蔵タンパク質について解析を行った．
【方法・結果】 平成 27 年産の京都府農林水産技術センターで栽培された京都産酒米（京の輝き，祝）を使用した．作期と施肥の異なる条件下で栽培した計 24 点からタンパク質を抽出し，SDS-PAGE および 2 次元電気泳動を行った．また，ペプチドマスフィンガープリント解析により貯蔵タンパク質を同定し，各タンパク質量を調べた．その結果，京の輝きは，祝と比較してグロブリンが多く，グルテリン B が少なかった．また，作期の条件下において，普通植と比較して，京の輝きは晩植で貯蔵タンパク質量が増加し，祝は早植で貯蔵タンパク質量が低下した．これらの酒米を用いた清酒の官能評価においても作期による違いがあることから[1]，作期の違いによるタンパク質量が清酒の香味に関与することが示唆された．
本研究は，平成 28 年度農水省「地域戦略プロジェクト 次世代酒米コンソーシアム」で実施された．
[1] 清野 等，第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

Analysis of storage proteins in sake brewing rice with different cultivation history

○Minori Numamoto, Yunika Geshi, Yoko Morimoto, Takehiro Masumura
(Grad. Sch., Life Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ.)

Key words Sake brewing rice, storage protein, glutelin

4P-H098 メタボローム解析による栽培履歴の異なる酒米の醸造適性評価

○清野 珠美[1], 和田 潤[1], 高阪 千尋[1], 山本 佳宏[1], 藤原 久志[2], 北岡 篤士[2], 若井 芳則[2], 廣岡 青央[1]
（[1]京産技研, [2]黄桜）
kiyono@tc-kyoto.or.jp

【背景・目的】清酒の地域ブランド力向上を目指し，地方自治体は特色ある酒米品種の開発を行っている．京都の酒米には，酒造好適米「祝」，酒造用米「京の輝き」があるが，清酒の高品質化のため，この 2 品種の品質向上と生産量の安定が製造現場からは求められている．本研究では，京都産酒米の安定栽培技術開発を目的とし，作期や施肥条件の違いによって栽培されたこの 2 品種を使用した清酒の官能評価と，清酒及び蒸米消化液のメタボローム解析の結果を統合して，栽培方法の異なる酒米の醸造適性の評価を試みた．
【方法】京都産酒米（祝，京の輝き）は，京都府下の圃場で栽培された平成 27 年産のものを使用した．作期，施肥条件を変えた酒米計 24 点について，清酒試験製造と蒸米消化性試験を行った．得られた清酒，蒸米消化液についてメタボローム解析を行うとともに，清酒については官能評価も行った．メタボローム解析から，酒米の評価指標となり得る成分のうち，香味に関係のある成分を選択し，官能評価と栽培履歴の異なる酒米の関係性について考察した．
【結果】メタボローム解析結果から，評価指標となり得る成分のうち，相関関係の低い成分同士で二次元プロットを作成した．蒸米消化液では，特にマルトースとバリンによる二次元プロットで，祝と京の輝きを分類することができ，さらに品種ごとでは作期の違いを分類することができた．清酒については，グルコースとリンゴ酸による二次元プロットを作成したところ，2 品種とも作期によりグルコースとリンゴ酸のバランスが異なる可能性が示唆された．官能評価と合わせると，グルコースが高くリンゴ酸が少ない早植で高評価，グルコースが低くリンゴ酸が高い晩植で低評価となる傾向が見られた．この結果から，栽培方法により清酒の香味を制御できる可能性が示唆された．

Metabolomics in evaluation of brewing aptitude of sake brewing rice with different cultivation history

○Tamami Kiyono[1], Jun Wada[1], Chihiro Kosaka[1], Yoshihiro Yamamoto[1], Hisashi Fujiwara[2], Atsushi Kitaoka[2], Yoshinori Wakai[2], Kiyoo Hirooka[1]
([1]KITC, [2]Kizakura Co., Ltd.)

Key words metabolic analysis, sake brewing rice, cultivation history

4P-N099 蓄電性バイオミネラル生成細菌 *Desulfovibrio* sp. HK-II 株の細胞外電子伝達

○安藤 翔太[1], 由井 嵐士[1], 片桐 美紀[2], 田代 陽介[1], 二又 裕之[1,3]
（[1]静大・創科技院, [2]静大・工, [3]静大・グリーン研）
futamata.hiroyuki@shizuoka.ac.jp

これまでに我々は，蓄電性バイオミネラル（RBM: Rechargeable Bio Mineral）生産微生物を微生物燃料電池（MFC: Microbial Fuel Cell）の負電極表面から嫌気的に分離した．16S rRNA 遺伝子の解析結果から硫酸還元細菌 *Desulfovibrio* sp. と同定され，HK-II 株と命名した．現時点において，硫酸還元細菌の細胞外電子伝達に関する知見は非常に乏しい．そこで HK-II 株の細胞外電子伝達（EET: Extracellular Electron Transfer）機構について若干の知見を得たので報告する．
まず，HK-II 株が EET 機構を有するかどうか確認するため，カーボングラファイトを負電極，電子供与体として乳酸を添加した MFC を構築した．その結果，乳酸の減少に伴う電流生産が確認された．HK-II 株は硫酸呼吸条件下で培養すると酢酸を蓄積する不完全酸化型であるにも関わらず，電極呼吸時では硫酸は減少傾向にあり完全酸化型へ移行可能である事が示唆された．また RBM を内包した負電極を設置し MFC を運転した結果，RBM 未添加系と比較して 7.8 倍のクーロン効率が得られ，RBM 添加無添加共に硫酸添加によって電流密度の増加が観察された．電気化学的解析の結果，RBM 未添加系において HK-II 株はメディエーターを介した間接型 EET を行う事が示された．硫酸呼吸および電極呼吸条件下で培養した HK-II 株を回収しタンパク質分画後 SDS-PAGE を行った結果，RBM 添加無添加共に電極呼吸条件下では 75~135 kDa のタンパク質が特異的に発現され，それらのタンパク質が外膜に局在していることが示唆された．
以上の結果から，HK-II 株は外環境に適応した呼吸形態を発揮可能である事が示された．RBM および硫酸イオンの EET 促進機構については解析中である．

Extracellular electron transfer mechanism of rechargeable biomaterial producing *Desulfovibrio* sp. strain HK-II

○Shota Ando[1], Arashi Yui[1], Miki Katagiri[2], Yosuke Tashiro[1], Hiroyuki Futamata[1,3]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [2]Fac. Eng. Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green. Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

Key words Extracellular electron transfer, Biomaterial, *Desulfovibrio*

4P-H100 海洋セレン酸還元微生物によるセレンを含む金属アモルファス微粒子の生成

○阪口 利文[1], 田中 星奈[1], 岡村 好子[2], 富永 依里子[2], 前田 誠[3]
（[1]県大広島・生命科学, [2]広島大院・先端物質, [3]広島大・N-BARD）
sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp

【背景・目的】カルコゲン元素であるセレンは地殻・生体構成元素として地圏・生物圏に幅広く分布している．また，材料素材としてもガラス染色や半導体素子をはじめ，電子材料産業などで多方面に利用されている．微生物とセレンとの関連性においてもセレン酸は嫌気呼吸における異化代謝によるセレン酸の還元から元素体セレンナノ微粒子の形成が可能である．また，硫黄代謝に似た同化的なプロセスによってセレンオキサニオンを還元できることが明らかにされ，セレン元素の回収，変換プロセスに微生物反応を用いることが期待されている．そこで，本研究では海洋魚類から新規に分離され，好気条件でのセレン酸還元が可能な *Shewanella* sp. KND-1 株を用いた化合物半導体微粒子の形成について調査した．
【方法・結果】分離株 KND-1 は三重大学練習船勢水丸による海洋調査航海において東シナ海で漁獲されたカナド内蔵から分離された．KND-1 株はセレン酸（1mM）を添加したマリンブロスで良好に生育し，好気的な条件でセレン酸を元素体セレンまで還元できた．16SrDNA 配列に基づく系統解析の結果，本株は *Shewanella* 属の微生物であり，セレン酸の他に亜セレン酸，テルル酸をそれぞれ元素体セレン，テルルにまで還元しながら好気，嫌気両条件で生育した．次に，KND-1 株による II-VI 族化合物半導体微粒子の合成について検討したところ，セレン酸と各重金属イオン（鉛，ニッケル，コバルト）をそれぞれ 1mM 添加して培養した菌体から，元素体セレンと同時にセレンと各重金属イオンが含まれた多くのアモルファス状粒子の存在が確認された．この結果から本分離株による嫌気プロセスを必要としない II-VI 族化合物半導体微粒子の合成への活用が期待された．

Formation of amorphous bionanospheres contained selenium and heavy metal by a marine microbe capable of reducing selenate under aerobic condition

○Toshifumi Sakaguchi[1], Seina Tanaka[1], Yoshiko Okamura[2], Yoriko Tominaga[2], Makoto Maeda[3]
([1]Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima, [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [3]N-BARD, Hiroshima Univ.)

Key words *Shewanella*, biomineralization, nano-biospheres

4P-H101 *Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析

○黒田 真史[1], 櫻井 紫乃[1], 山下 光雄[2], 池 道彦[1]
（[1]阪大院・工, [2]芝浦工大・応化）
kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】セレンは半導体原料等に利用されるレアメタルである一方で，水溶性のセレン酸及び亜セレン酸は非常に毒性が高く，水環境汚染物質として知られている．セレン製錬工場排水溝より単離された細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I は，好気及び嫌気条件下でセレン酸を亜セレン酸に還元し，また，亜セレン酸を好気条件で水に不溶な元素態セレン及び揮発性のセレン化メチル化合物にまで段階的に還元する高いセレン代謝能力を持ち，セレン含有排水の生物学的処理プロセスへの適用が期待される．本研究では，特に嫌気的セレン酸還元に関わる遺伝子群を同定し，機能を明らかにすることを目的とした．
【結果・考察】接合伝達性トランスポゾン mini-Tn*5* のランダムな挿入によって作製した破壊株ライブラリより，3 株のセレン酸還元能変異株を得た．うち 2 株のゲノム中の mini-Tn*5* 挿入位置の近傍には，既報のセレン酸還元酵素遺伝子群と極めて高い相同性を示すオペロン *serABDC* と，機能未知遺伝子から成るオペロン *serXSR* が存在した．*serXSR* はそれぞれ，二成分制御系の溶質結合タンパク質，ヒスチジンキナーゼ，およびレスポンスレギュレーターをコードするものと推定された．相同組換えにより *serXSR* を破壊した変異株のセレン酸還元能力は，好気条件下では著しく低下し，嫌気条件下では全く還元が生じなかった．リアルタイム PCR により *serA* の転写量を測定したところ，野生株ではセレン酸を添加した際に *serA* の転写が著しく促進されたのに対し，*serXSR* 破壊株では，セレン酸の有無によらず抑制されることが明らかとなった．これらの結果より，*serXSR* はセレン酸の存在下でセレン酸還元酵素遺伝子群 *serABDC* の転写を正に制御する働きを持つ，新規の二成分制御系センサー／レギュレーターをコードするものと推定された．

Characterization of genes related to selenate reduction in *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○Masashi Kuroda[1], Shino Sakurai[1], Mitsuo Yamashita[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Appl. Chem., Coll. Eng., Shibaura Inst. Technol.)

Key words selenium, anaerobic respiration, two component regulatory system

4P-H102 廃糖蜜に含まれるポリフェノールとその六価クロム還元性に関する解析

○広瀬 佑紀, 池上 健仁, 杉山 友康
（東京工科大院・バイオニクス）
tsugiyama@stf.teu.ac.jp

[はじめに]
我々の研究室では過去の研究で廃糖蜜が六価クロム還元性を持つことを発見した．
廃糖蜜は製糖工程で排出される産業廃棄物であるため，安価な浄化手段として確立されている．その一方で六価クロムを還元する廃糖蜜中の成分は解析されていない．本研究では植物の多くに含まれるポリフェノールを対象に，六価クロム還元性との関係を明らかにすることを目的とした．

[方法]
ポリフェノールの定量をするにはタンパク質定量にも用いられる Folin-Denis 法を用いた．
すなわち，フェノール性水酸基がアルカリ性でリンタングステン酸・モリブデン酸を還元し，生じた青色を波長 750nm で測定する．検量線には L-DOPA と呼ばれるポリフェノールを構成する物質を用いた．イオン交換樹脂カラムで分離した廃糖蜜の 103 個のフラクションサンプルを，最も色素濃度が高いサンプルを基準に希釈を行った．希釈した 103 個のサンプル中のポリフェノール量を定量するため，フラクションサンプルを 100μL 採取し，発色剤であるフェノール試薬 10μL を添加後，3 分間室温で反応させ 10%炭酸ナトリウム水溶液 10μL 加え室温で 1 時間反応させた．検量線で使用する L-DOPA も同様の操作を行った．作成された検量線からフラクションサンプル毎のポリフェノール量を算出した．
六価クロム濃度の測定はジフェニルカルバジド法を用いて六価クロム濃度を求めた．

[結果]
廃糖蜜サンプルのフラクション毎のポリフェノール濃度は，六価クロム還元性を示したフラクション 70–90 番と相関を示した．また，ポリフェノールは廃糖蜜の色素の濃さも関連を見せた．この結果から，廃糖蜜の六価クロム還元能にはポリフェノールが関連していることが示唆された．

Analysis on polyphenols and hexavalent chromium reducing properties contained in molasses

○Yuuki Hirose, Kento Ikegami, Tomoyasu Sugiyama
(Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol.)

Key words molasses, hexavalent chromium

4P-N103 Adsorption of metal ion in *Saccharomyces cerevisiae*

Tu Dang[1], Hidehiro Iwata[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Shunji Kiyoda[1], Masakazu Furuta[1]
([1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)
masyksd@biochem.osakafu-u.ac.jp

Bioaccumulation of metals by *Saccharomyces cerevisiae* has been studied by many researchers due to its safety and easy availability from various fermentation processes. Taking this advantage, it is prominsing for the east to accumulate different types of metal ions toxic to human health contaminated with environmental water. In this research, we examined manganese accumulating ability of the wild-type of yeast strain *S. cerevisiae* BY4741 growing under toxic level of manganese concentration (ca. 15 mM) in the growing media (YPD liquid media).
The increasing concentration of manganese ion in the media showed a restrained impact on the growths of the yeasts, however one variant, named IM3, could grow up in very high concentration of manganese (15mM) and could absorb manganese over 4 times more than the BY4741 strain.
Thereafter, both strains BY4741 and IM3 was cultured in YPD liquid contain metal ions of Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Cr^{3+} , Fe^{3+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, with concentration vary from 0.1 mM to 100 mM. Growth curve and metal absorbance amount of each samples was recorded with reference to the appropriate standard, showing the range and effect of different metal and its concentration on growing process. The result is also providing information about the ability for metal adsorption of those 2 strains under different condition of pH and temperature.

Adsorption of metal ion in *Saccharomyces cerevisiae*

Tu Dang[1], Hidehiro Iwata[2], Tuan Anh Do[1], ○Masao Kishida[2], Shunji Kiyoda[1], Masakazu Furuta[1]
([1]Dept. Quant. Rad. Eng. Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Appl. Life Sci. Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, metal absorption

4P-N104 菌叢構造解析に基づく嫌気性菌を利用した重金属除染法の構築

○岡野 凌一[1], 舟木 裕哉[2], 倉橋 健介[2], 吉原 静恵[3], 徳本 勇人[3]
([1]阪府大院・工, [2]阪府大高専, [3]阪府大院・理)
tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

農用地における重金属汚染は，農作物を経由して人体に摂取されることで大きな健康被害を生むことが広く知られている．土壌に含まれた重金属は水や大気に含まれたものと比べ移動性が低く，拡散，希釈されにくいため長期間にわたり汚染される．除染技術の一つとして土壌洗浄が挙げられるが，洗浄水の処理などによって処理費用が嵩むため低コストの除染法の開発が求められている．そこで，微生物を用いた除染法であるバイオレメディエーションに着目した．バイオレメディエーションは除染後の洗浄水処理など大規模な設備を必要としないことに加え，微生物が吸収した重金属を線虫による捕食で結果として安価に回収することができれば，低コストかつ汎用的な除染技術の開発に繋がることが期待される．本研究では，土壌由来の微生物が生息している消化発酵汚泥を用い，重金属存在下でのバイオガス生成量の測定と，次世代シークエンサー(NGS)を用いた重金属吸収菌の同定を試みた．
除染対象の重金属として，公害の原因となる Cd と作物へ生育被害を及ぼす Cu，Zn を用いた．消化発酵汚泥を植菌率 40%，各重金属濃度を， 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm，Control として 0 ppm，基質としてでんぷん 2 g/L となるよう混合し，気相を窒素置換後，37℃で静置培養を行った．ガスクロマトグラフィーを用いて気相中の H_2, CO_2, CH_4 を測定した結果，いずれの重金属の場合でも 10 ppm の時に CO_2 と CH_4 の生成量が Control と比較して 1.5 倍から 2 倍増加した．また，ICP-AES により固相への重金属の移行を測定したところ，液相に添加した重金属の 85%以上が 3 日で固相へ移行した．また，NGS を用いてそれぞれの菌叢構造を解析した結果，重金属の添加によって CO_2 と CH_4 の生成量が増加した菌叢では，特異的に *Clostridium* 科が増殖することが明らかになった．

Analysis of anaerobic microbiota for bioremediation of heavy metal pollution

○Ryoichi Okano[1], Yuya Funaki[2], Kensuke Kurahashi[2], Shizue Yosihara[3], Hayato Tokumoto[3]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol., [3]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words Anaerobic microbiota, Heavy metal pollution, bioremediation

4P-H105 セシウム蓄積細菌の探索及びセシウム蓄積変異株の作成

○吉岡 潤一, 渡辺 剛, 林 秀謙
（前工大院・工・生物工）
h-hayashi@maebashi-it.ac.jp

【背景と目的】2011 年 3 月に福島第一原発事故が起き，放射性核種が放出された．そのため環境からの放射性セシウム除去は急務である．一部の微生物は菌体内にセシウムを蓄積することが判明している．菌体内に取り込まれたセシウムは負電荷を持つポリリン酸と結合し，セシウムの毒性が弱まることでセシウムを菌体内に保持すると考えられている．また，チオストレプトン耐性変異株は菌体内ポリリン酸量の増加が見込まれ，セシウム蓄積量が上昇すると推定される．本研究では，高いセシウム蓄積能を持つ菌株の選抜を行い，それらの菌株のポリリン酸増加した変異株を作成し，菌体内セシウム蓄積量の増加した菌株の取得することを目的とする．
【方法】NBRC より提供を受けた菌株を 1 mM CsCl を含む液体培地で培養し，菌体内にセシウムを蓄積させた．菌体を回収後，乾燥重量を測定し，濃硝酸を用いて加熱溶菌を行った．調製した溶菌液を原子吸光分析により，セシウム量を測定し蓄積量を算出した．高セシウム蓄積能を示した菌株については，変異株を作製した．野生株をチオストレプトン含有寒天培地に塗布し，チオストレプトン耐性変異株を取得した．その後，耐性変異株のセシウム蓄積量を測定した．セシウム蓄積能が上昇した菌株は菌体内ポリリン酸量の測定を行った．
【結果及び考察】RD のセシウム蓄積能を測定したところ，放線菌でセシウム蓄積の傾向が見られ，特に *Rhodococcus* 属で約 160 μmol/g [dry weigt]を示す高蓄積細菌を取得した．また，以前に取得した *Dietzia timorensis* のチオストレプトン耐性変異株は，野生株と比較してセシウム蓄積能が 2 倍程度に上昇した．しかし，この菌株のポリリン酸の増加は確認できなかった．今後，菌体内ポリリン酸量の高い変異株を選抜し，セシウム蓄積能との相関関係について解析する予定である．

The search of cesium accumulation bacteria and the constraction of cesium accumulation mutant

○Junichi Yoshioka, Go Watanabe, Hidenori Hayashi
(Dept Biotechnol., Eng., Maebashi Inst.Technol.)

Key words actinomycetes, cesium, polyphosphate, bioremediation

4P-N106 生物濃縮を利用した線虫による土壌からの Cs 回収

○合田 亮[1], 伊藤 みさご[1], 星 英之[2], 倉橋 健介[3], 吉原 静恵[4], 徳本 勇人[4]
([1]阪府大院・工, [2]阪府大院・人社, [3]阪府大高専, [4]阪府大院・理)
tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

原子力発電所事故では，放出される放射性物質により膨大な量の汚染土壌が発生する．そのため，費用対効果の高い微生物による除染が注目されている．しかし，土壌中の微生物は回収コストに課題があり，微生物による除染は実用化に至っていない．そこで，土壌中に生息する線虫が微生物を捕食し，光や熱を避ける習性に着目し，土壌からの線虫の分離が容易ではないかと考えた．本研究では，土壌中において Cs 吸収菌から線虫への Cs 移行の確認を行い，次世代シークエンサー（NGS）を用いて，Cs 回収に適した線虫の探索と同定を試みた．モデル実験として，*Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）及び Cs を吸収させた *Rhodococcus erythropolis* CS98 株（*R. erythropolis*）を滅菌土壌で共培養した．その結果，*R. erythropolis* から *C. elegans* へ 3.0%の Cs 移行量が確認できた．この移行量は，ヒマワリを用いた CsCl に対するファイトレメディエーションと比較すると，*C. elegans* を用いた場合の方が一度に回収できる Cs 量は少ない．しかし，プロセスとしては，回収にかかる期間を約 1/9 に短縮できる利点を挙げることが出来る．そこで，線虫による Cs 回収プロセスを連続化すれば，土壌中から Cs を短期間で定量に回収できるのではないかと考えている．また，NGS を用いた 18S rRNA 遺伝子解析のプロトコルを作成し，土壌中に生息する線虫から Cs 回収に適した種の探索を行った結果，*Rhabditis* 目の線虫が Cs 回収に適している可能性が示唆された．*Rhabditis* 目には本実験で用いた *C. elegans* が含まれており，土壌中に生息する線虫を用いて，Cs を含有する土壌を効率的に除染することができるのではないかと考えられる．

Cs recovery from soil by Nematodes using bioaccumulation

○Ryo Goda[1], Misago Ito[1], Hidenobu Hoshi[2], Kensuke Kurahashi[3], Shizue Yoshihara[4], Hayato Tokumoto[4]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Humanities and Sustainable Syst. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Osaka Pref. Univ. Coll. Technol., [4]Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Caenorhabditis elegans*, Radioactive substances, bioremediation

4P-H107 *Dehalococcoides* 属細菌由来還元的脱ハロゲン化酵素の発現と機能解析

○田中 良拓[1], 小畑 智弘[1], 中村 龍貴[1], Meinhold Sarah[2], 渡辺 文雄[3], Jianzhong He[4], 養王田 正文[1]
([1]農工大院・工, [2]ミュンヘン工科大学, [3]鳥取大・農・生資環, [4]シンガポール国立大学)
yohda@cc.tuat.ac.jp

ハロゲン呼吸細菌は還元的デハロゲナーゼ(RDase) を用いてハロゲン化合物を最終電子受容体とする嫌気呼吸によりエネルギーを獲得している．RDase は触媒部位の RdhA と膜アンカー部位の RdhB から構成されている．RdhA は補因子に活性中心であるコリノイドおよび電子伝達体である鉄硫黄クラスターを有する．*Dehalococcoides* 属細菌はクロロエテンをエテンまで完全に脱塩素化できることで知られているが，ゲノム上の RDase の機能はほぼ未解明である．我々は *Geobacter* 由来 PCE RdhA を Trigger Factor (TF)融合タンパク質と発現し，嫌気条件で *in vitro* で再構成することで機能的発現に成功した．本研究ではこの手法を用いて *Dehalococcoides* 属細菌由来 RdhA の機能的発現を試みたので報告する．
Dehalococcoides 属細菌由来 PceA，TceA 及び VcrA 遺伝子を TF 融合型発現ベクター pCold TF に導入し，大腸菌の可溶性画分で発現した．大腸菌破砕液から変性条件下で，Ni アフィニティクロマトグラフィーを用いて TF-RdhA 精製した．嫌気条件下で，TF-RdhA にビタミン B_{12} および $FeCl_3$，Na_2S を添加し，脱塩カラムでバッファー交換を行い，TF-RdhA をリフォールディングさせた．TF-TceA については，UV-Vis スペクトル解析からコリノイドと鉄硫黄クラスターの導入を示唆する結果を得たので，TF-TceA に Ti(III) Citrate (電子供与体)，メチルビオローゲン，PCE を混合し，ガスクロマトグラフィーにより活性測定した．またある種の RdhA はシュードビタミン B_{12} と呼ばれる特有のコリノイドを補因子とすることで活性を示すことが明らかになったため，他のコリノイドを用いることで機能的発現が可能であるか検討している．本発表では，TceA 及び VcrA も含めて *Dehalococcoides* 属細菌由来 RdhA の機能的発現の結果について報告する．

Expression and characterization of reductive dehalogenase from *Dehalococcoides*

○Yoshihiro Tanaka[1], Tomohiro Obata[1], Ryuki Nakamura[1], Sarah Meinhold[2], Fumio Watanabe[3], He Jianzhong[4], Masafumi Yohda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Technical Univ. of Munich, [3]Agri. Biol. and Env. Sci., Tottori Univ., [4]National Univ. of Singapore)

Key words enzyme, bioremediation

4P-N108 バイオ脱硫菌による芳香族複素環化合物の脱硫分解

○練 子荷[1], 藤井 啓史[2], 古谷 陸[2], 望月 康佑[2], 浦瀬 太郎[1,2], 筒井 裕文[1,2], 松井 徹[1,2]
([1]東京工科大院・バイオニクス, [2]東京工科大・応生)
matsuitor@stf.teu.ac.jp

【目的】環境汚染関連物質には，ジベンゾチオフェン（以下 DBT，石油含有物としての酸性雨の原因物質である），ベンゾチアゾール（人工ゴム合成中間体），イペリット（遺棄化学兵器）など汚染源は異なるものの硫黄を含んだ有機化合物（以下，有機硫黄化合物）が少なくない．我々は CS 結合特異的分解系を有するいわゆる脱硫菌を用いた有機硫黄化合物の微生物分解に注目し，環開裂型分解微生物との比較を行っている．本研究では，DBT 脱硫菌，ベンゾチオフェン（以下 BT）脱硫菌を用いて各種芳香族縮合型複素環化合物の分解について検討を行った．
【方法及び結果】研究室保存の脱硫菌ライブラリーを用いて，各種芳香族有機硫黄化合物を唯一の硫黄源とした培養を行った．その結果，DBT 脱硫菌は，フェノキサチイン，フェノチアジン，チアンスレンを硫黄源として生育したのに対し，BT 脱硫菌は生育しなかった．得られた培養液の酸性酢酸エチル抽出物を GC-MS 分析することにより分解中間体の構造を推定した結果，上記のいずれの基質を用いた場合においても，CS 結合開裂により生成すると推定されるフェノール性化合物が認められ，これまで報告のある芳香環開裂型分解菌と異なる分解経路によることが明らかとなった．また，脱硫遺伝子群 *dsz* オペロンを *Rhodococcus-E.coli* シャトルベクター pRHK1 にクローニングした発現ベクター pRKPP を *Rhodococcus* sp.に導入した遺伝子組換え脱硫菌を用いて，DBT 脱硫酵素と芳香族有機硫黄化合物分解の関連について検討した．

Biodesulfurization of aromatic heterocycles

○Zihe Lian[1], Hiroshi Fujii[2], Riku Furutani[2], Kosuke Mochizuki[2], Taro Urase[1,2], Hirofumi Tsutsui[1,2], Toru Matsui[1,2]
([1]Grad. Sch. Bionics., Tokyo Univ. Technol., [2]Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Univ. Technol.)

Key words *Rhodococcus*, desulfurization, biodegradation, *Gordonia*

4P-H109 Enhancement of microorganisms and material circulation in agrochemical-contaminated soil by using organic materials

○aziz amin ABD[1], Adhikari Dinesh[2], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agriculture Promotion Center)
abd.azizamin22@gmail.com

(Background and Aim) In our previous study, we found very low levels of bacterial biomass and material circulation activities in agricultural fields with long-term agrochemical use. This study was aimed to find suitable organic conditions for enhancing soil microorganisms and materials circulation in agrochemical-contaminated soils.
(Materials and Results) An agriculture soil contaminated by agrochemicals for about 30 years was used for this experiment. The soil had a very low bacterial number (< 6.6×10^6 cells/g-soil) and low nitrogen and phosphate circulation activities. The soil was treated by different kinds of organic materials. After 4 weeks treatment, bacterial number increased (up to 2.3×10^8 cells/g-soil), but the bacterial number gradually decreased. Re-treatment of cow manure slightly led to increase the bacterial number (up to 4.4×10^8 cells/g-soil) while re-treatment of undecomposed organic materials significantly increased the bacterial number (up to 1.5×10^9 cells/g-soil). The undecomposed organic materials also increased nitrogen and phosphate circulation activities. The results suggest that use of undecomposed organic materials lead to enhance not only the microorganisms but also material circulation in agrochemical-contaminated soils.

Enhancement of microorganisms and material circulation in agrochemical-contaminated soil by using organic materials

○aziz amin ABD[1], Adhikari Dinesh[2], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agriculture Promotion Center)

Key words agrochemical-contaminated soil, organic materials, microorganisms

4P-H110 細菌に対する農薬の影響に関する研究

○森田 涼斗, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】 現在の慣行農業では化学肥料と農薬が多用されている．特に，農薬を用いることで害虫防除にかかる労働力を削減し，広い耕地での栽培管理を効率的に行っている．しかし，近年では農薬が標的以外の生物にまで影響を及ぼすことが問題となっている．特に，農薬成分が農地の土壌に残留した場合，農薬の連用による土壌中の微生物数の減少や菌叢の偏りが指摘されている．土壌微生物は土壌中で分解者として機能するため，微生物数が減少すると物質循環が滞り，作物の生育が妨げられることが懸念される．しかし，農薬が微生物にどの程度影響するかといった，農薬存在下での土壌微生物の挙動は十分に理解されていない．
本研究では，土壌に農薬を添加した際の細菌の挙動を調べ，農薬の細菌に対する影響を明らかにすることを目的とした．
【方法・結果】 *Escherichia coli* JM109 および *Bacillus subtilis* (natto) TAKAHASHI を LB 液体培地で振盪培養後 (12 h, 37 ℃, 150 rpm)，農薬 (クロルピクリン，DD 剤，ネマトリン) を加え，さらに振盪培養した．その後，LB 寒天培地に塗布・静置培養 (24 h,37 ℃) し生菌数を測定した．また，土壌に農薬を添加し静置後，0，1，4，7 日目の土壌中の総細菌数を測定し，土壌細菌の経時変化を調べた．液体培養実験ではクロルピクリンと DD 剤の場合は両菌株で生菌数が 99%以上減少した．ネマトリンの場合，生菌数はコントロールと差がなかった．土壌実験ではクロルピクリン抽出液や DD 剤を用いた場合，初期に総細菌数が減少したが，DD 剤では 7 日目で総細菌数の回復が見られた．一方，ネマトリンを用いた場合，コントロールと差が見られなかった．これらの結果から，農薬の種類によって細菌に与える影響の大きさに差があり，土壌消毒剤は，土壌細菌を効果的に殺菌する効果が高かった．

Study for the impact of agricultural chemicals on bacteria

○Ryoto Morita, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Chloropicrin, DD agent, *Escherichia coli*, bacteria

4P-H111 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* のクエン酸走化性と植物感染への重要性

○緋田 安希子, Tunchai Mattana, 田島 誉久, 中島田 豊, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
jun@hiroshima-u.ac.jp

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* はトマトなどの植物に感染し萎凋を引き起こす病原菌である．本菌は土壌伝染性であり，その感染の最初期段階には走化性が重要とされている．走化性とは，運動性細菌が走化性センサータンパク質（MCP）により化合物を感知して集まる行動である．*R. solanacearum* は 22 種類の MCP を保有しており，これまでにアミノ酸やリンゴ酸などに対する複数の MCP の機能特定に成功している．そしてさらに，当該 MCP 破壊株を用いることで，*R. solanacearum* の植物感染に L-リンゴ酸走化性が重要であることを明らかにした．しかし一方で，その他の走化性も感染に関与することが示唆された．L-リンゴ酸は植物根滲出液に含まれる主要有機酸であることから，同様に主要な「クエン酸」に対する走化性も感染に重要な可能性が高い．そこで本研究では，*R. solanacearum* の植物感染におけるクエン酸走化性の重要性について解明を試みる．
【方法・結果】植物感染への重要性を評価するにあたり，まずはクエン酸を感知する MCP の特定を試みた．*R. solanacearum* の保有する 22 MCP について，単独破壊株ライブラリにより解析を行ったところ，クエン酸への走化性応答が顕著に低下する MCP 破壊株は存在しなかった．このことから，クエン酸走化性には複数の MCP が関与していることが示唆された．そこで，22 MCP を段階的に破壊した 22 MCP 多重破壊株ライブラリを用いて解析を行った．その結果，12 種類の MCP を破壊した段階で 0.5 mM クエン酸に対する走化性が解消し，クエン酸走化性に関わる 2 つの MCP の特定に成功した．これら MCP の二重破壊株ではクエン酸走化性はほぼ解消することが確認され，この 2 つがクエン酸のメインセンサーであることが明らかとなった．現在，当該 MCP 破壊株（単独および二重）を用いてクエン酸走化性の植物感染への重要性について評価している．

Chemotaxis toward citrate by *Ralstonia solanacearum* and its importance in bacterial wilt

○Akiko Hida, Mattana Tunchai, Takahisa Tajima, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, Citrate, Methyl-accepting chemotaxis protein, Plant pathogen

4P-H112 植物保護効果を有する *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質生産制御機構の解析

○久勝 順平[1], 染谷 信孝[2], 竹内 香純[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]農研機構）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

土壌や根圏に生息する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の一部は，植物病原菌に対する様々な抗菌物質を生産することが知られている．蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌が生産する主な抗菌物質として，2,4-ジアセチルフロログルシノール（DAPG），ピロールニトリン（PRN），ピオルテオリン（PLT），リゾキシン（RXN），シアン化水素（HCN）などが挙げられる．蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌は，これらの複数の抗菌物質を生産し，それぞれの抗菌物質がシグナルとなる複雑な生産制御機構が存在することが明らかとなっている．本研究では，ナズナ根由来 *P. protegens* Cab57 株，イネ根由来 *Pseudomonas* sp. Os17 株，ジャガイモ根由来 *Pseudomonas* sp. St290 株の染色体上の抗菌物質生合成遺伝子を全ての組み合わせで破壊した多重破壊株を作製し，植物病原菌に対する生育阻害効果の検証を行った．
本研究で使用した 3 菌株の全ゲノム配列を決定したところ，Cab57 株は，DAPG，PRN，PLT，HCN 生合成遺伝子を，Os17 株は，DAPG，RXN，HCN 生合成遺伝子を，St290 株は DAPG，HCN 生合成遺伝子を有することが明らかになった．次に，3 菌株について相同性組換えを利用したノンマーカー変異により，各抗菌物質生合成遺伝子をすべての組み合わせで破壊した多重破壊株を作製した．これらの変異株を用い，各種植物病原菌に対する生育阻害効果を検証したところ，DAPG 及び PRN 生合成遺伝子の保有が阻害に重要であることが確認された．一方で，植物病原菌阻害効果を有するものの，植物体にも有害な物質である RXN 欠損株においては，病害抑制効果は低下しないにも関わらず植物体への阻害作用の低減が認められた．

Characterization of regulatory mechanisms of antibiotic production in *Pseudomonas* biocontrol agents

○Junpei Hisakatsu[1], Nobutaka Someya[2], Kasumi Takeuchi[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]NARO)

Key words *Pseudomonas*, antibiotics, biocontrol agent

4P-H113 連作土壌の環境変化の分析

○森谷 政孝, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】同じ土壌で同じ植物を繰り返し栽培すると土壌中の菌叢が偏る．その結果として植物に対する病原菌の増加や作物の成長障害が起こる．改善策として利用される農薬による土壌消毒や化学肥料中心の施肥は，土壌中の細菌数にも影響し，一時的には病原菌を抑え，植物の生育を促進させるが，将来的には土壌環境を悪化させる．したがって，土壌中の微生物環境を良好な状態で維持し，連作障害の発生を抑制する農法の確立が必要である．しかし，連作による土壌環境の変化を詳細に調べた例がなく，連作障害の改善に有効な方法が確立されていない．施肥や管理方法が異なる連作を行った土壌を分析し，連作による土壌環境の変化を明らかにすることを本研究の目的とした．
【方法・結果】ネギを連作し連作障害が生じている土壌，生じていない土壌を使用した．トウキは異なる施肥条件で栽培を行った．これらは農地土壌で栽培したものを分析した．有機肥料によって調整した土壌に，農薬のクロルピクリンを投与した土壌，未投与の土壌を用意し，ホウレン草を連作し，1 週間ごとの菌叢の変化について PCR-DGGE 法に基づき菌叢の解析を行った．
分析の結果，ネギの連作障害の生じている土壌の総細菌数は，生じていない土壌の 1/3 以下であった．トウキでは化学肥料を施肥した土壌は有機肥料を施肥した土壌を比較すると，総細菌数が 1/2 以下であった．ほうれん草を連作した土壌の細菌叢は，クロルピクリンを使用した土壌で，DGGE バンド数の減少が確認された．栽培後も同様に，クロルピクリンを使用した土壌条件で未投与よりバンド数が減少した．総細菌数及びバンド数は，クロルピクリンの投与によって減少したが，完全に死滅することはなかった．
連作障害は土壌の総細菌数の減少が影響しており，これらの減少は農薬，化学肥料の使用が関係し，適切な管理が必要である．

Analysis of environmental change in continuous cropping

○Masataka Moriya, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words Coutinuous cropping

4P-H114 笹侵食湿地土壌中のメタン生成を抑制する嫌気酢酸酸化微生物の同定

青柳 智[1,2], Ho Cuong[3], 成廣 隆[4], 眞弓 大介[5], 尾形 敦[1], 羽部 浩[1], ○堀 知行[1]
（[1]産総研・環境管理, [2]石巻専修大, [3]ベトナム科学院, [4]産総研・生物プロセス, [5]産総研・地圏資源）
hori-tomo@aist.go.jp

【目的】湿地は主要な大気メタン放出源のひとつであるが，笹に侵食された区域ではメタン生成が抑制される．酢酸は嫌気有機物分解過程において重要な中間代謝産物であり，そのほとんどは酢酸資化性のメタン生成菌により利用される．その一方，一部の酢酸は二酸化炭素へ嫌気的に酸化されることが示唆されている．この反応を担う嫌気酢酸酸化微生物は，酢酸をめぐりメタン生成菌と競合関係にあり，メタンの放出を抑制すると考えられているが，その存在や多様性はほとんど分かっていない．本研究は，超高感度 stable isotope probing（SIP）によりメタン生成菌と基質競合する嫌気酢酸酸化微生物の同定を目的とした．
【方法・結果】笹侵食湿地土壌を滅菌水へ嫌気的に懸濁し，^{13}C 標識酢酸 5 mM または非標識酢酸 5 mM を添加，培養した（それぞれ ^{13}C 標識系，非標識系と定義する）．両培養系において，添加した酢酸は培養開始後次第に減少し，4 週間後にはほぼ全て分解された．^{13}C 標識系では培養期間中，$^{13}CH_4$ および $^{13}CO_2$ の生成が検出され，^{13}C 酢酸の分解によるものと示唆された．培養 2 週間の土壌に，超高感度 SIP を適用した．その結果，^{13}C 酢酸を分解し取り込んだ微生物が 36 種検出された．そのうち 2 種は酢酸資化性メタン生成菌である *Methanosaeta* 属の古細菌であった．嫌気酢酸酸化微生物としては，脱ハロゲン化呼吸能を有する *Dehalogenimonas* 属に近縁な細菌が検出されたが，その他の 33 種は既知微生物の 16S rRNA 遺伝子に対して低い配列相同性（77.8% − 92.5%）を示した．一方，培養開始時の微生物群集構造を解析した結果，上記で検出された嫌気酢酸酸化微生物はいずれも 0.15%以下の相対存在量を示し，土壌中の存在量は極めて小さかった．これらの結果から，笹に侵食された湿地において系統学的に新規で希少な微生物群が嫌気酢酸酸化を担っていることを見出した．

Unveiling acetate-assimilating microbiota under methanogenic conditions in *Sasa*-invaded wetland soils by ultra-high-sensitivity stable isotope probing of rRNA

Tomo Aoyagi[1,2], Cuong Ho[3], Takashi Narihiro[4], Daisuke Mayumi[5], Atsushi Ogata[1], Hiroshi Habe[1], ○Tomoyuki Hori[1]
([1]EMRI, AIST, [2]Ishinomaki Senshuu Univ., [3]VAST, [4]BRI. AIST, [5]GREEN, AIST)

Key words wetland soil, anaerobic acetate-oxidizing microorganisms, stable isotope probing (SIP), high-throughput sequencing

4P-H115 硝酸還元条件における津波打上げ海底堆積物の嫌気分解機構

○青柳 智[1,2], Navarro Ronald[1], 眞弓 大介[3], 羽部 浩[1], 片山 葉子[4], 高崎 みつる[2], 堀 知行[1]
([1]産総研・環境管理, [2]石巻専修大, [3]産総研・地圏資源, [4]農工大)
hori-tomo@aist.go.jp

【目的】東日本大震災の津波で大量の堆積物が陸上に打上げられ，開放系沿岸海域における堆積物蓄積の普遍性が明らかとなった．原位置での堆積物浄化技術確立のため，嫌気分解機構の解明が求められる．本研究は，次世代シークエンサー解析，分離培養および超高感度 stable isotope probing（SIP）により堆積物の嫌気分解機構の解明を目的とした．
【方法・結果】初めに，堆積物を人工海水へ嫌気的に懸濁し，硝酸塩 20 mM を添加して 5 日間培養した．培養物から DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子を対象に次世代シークエンサー解析を行った．培養開始後，脱窒及び硫黄酸化が観察され，*Sulfurimonas* 属および Chromatiales 目に属する細菌群の相対存在量が劇的に上昇した．硫黄化合物と硝酸塩を基質とした限界希釈培養により，培養 5 日目に主要であった二種の硫黄酸化細菌の分離培養に成功した．分離菌は脱窒能を有しており，これらの細菌群が堆積物中の脱窒と硫黄酸化に関与したことが示唆された．
次に，硝酸還元条件における堆積物中の微生物間相互作用を明らかにするため，^{13}C 標識重炭酸塩 10 mM と硝酸塩 20 mM を添加して 21 日間培養した堆積物に，超高感度 SIP を適用した．その結果，培養 4 日目における ^{13}C 取り込み微生物は，上述の硫黄酸化細菌群であった．その後，培養 9 日目には，*Desulfobulbus* 属細菌などの硫酸還元菌群の ^{13}C 標識 rRNA が検出された．一方，培養最終日において，^{13}C 標識されなかったものの，N_2O 還元菌や，メタン生成古細菌などの rRNA 発現の上昇が観察された．これらの結果から，硫黄酸化細菌群は堆積物中で $^{13}CO_2$ を固定して生育し，固定された ^{13}C は硫酸還元菌群へと直接的に伝達されたことが示された．さらにこれらの生命活動の間接的な影響により，他の微生物群の代謝活性化が引き起こされたことが明らかとなった．

Nitrate-driven metabolic interaction of sulfur-oxidizing bacterial communities in deposited marine sediments revealed by ultra-high-sensitivity stable isotope probing of rRNA

○Tomo Aoyagi[1,2], Ronald Navarro[1], Daisuke Mayumi[3], Hiroshi Habe[1], Yoko Katayama[4], Mitsuru Takasaki[2], Tomoyuki Hori[1]
([1]EMRI, AIST, [2]Ishinomaki Senshuu Univ., [3]GREEN, AIST, [4]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words marine sediment, stable isotope probing (SIP), high-throughput sequencing, 16S rRNA gene

4P-H116 Study on water disinfection in actual environment by using $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ photocatalyst

○Na Liu[1], Qi Zhu[1], Qiansu Ma[1], Xuehu Zhou[1], Ruilin Qi[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst., AIST, Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

WHO reported 12,600 deaths per day in children below 5 years were caused by virus or bacteria present in polluted water. Therefore, the drinking water has to be disinfected before use. Unfortunately, all of the conventional water disinfection methods, including chlorination, ozone and ultraviolet, have some disadvantages, such as high cost and formation of by products with potential carcinogenicity. Among the processes that are being developed, semiconductor photocatalysis has emerged as a very attractive technology for water disinfection due to its superior oxidation ability, low cost, nontoxicity and stability. According to the previous studies, a novel $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ photocatalyst, firstly synthesized by our lab, has been demonstrated as a promising material with remarkable photocatalytic efficiency in decomposing the organic matter under simulated solar light. In this study, the efficiency of photocatalytic disinfection was evaluated by inactivating *Escherichia coli* under different environmental conditions such as temperature, pH and different ions. The results showed that bacterial inactivation by this photocatalyst was more favorable under ambient temperature and natural or slightly alkaline condition (pH 7-8). The effect of different ions under environmental relevant level should have no significant impact on the bactericidal activity. The results suggest that this photocatalyst can be applied for actual water disinfection in outdoor environment.

Study on water disinfection in actual environment by using $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ photocatalyst

○Na Liu[1], Qi Zhu[1], Qiansu Ma[1], Xuehu Zhou[1], Ruilin Qi[1], Nobuaki Negishi[2], Yingnan Yang[1]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Environ. Mgt. Res. Inst., AIST, Tsukuba)

Key words $P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2$ photocatalyst, *Escherichia coli*, disinfection, actual environment

4P-H117 メタン発酵におけるアンモニア阻害抑制のための自然素材を加えたゼオライト開発

○平沼 貴紀, 張 楠, 楊 英男
（筑波大院・生命環境）
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

嫌気性消化におけるアンモニア阻害軽減方法として，ゼオライトによるアンモニア吸着が注目されている．しかし単なるゼオライトでは十分にアンモニア阻害を軽減することができない．一方，牡蠣の貝殻は多孔質で，Ca を多く含み，吸着能力向上の助力となる．加えて廃棄物として処理されるため豊富に存在し，低コストである．そこで本研究では牡蠣の貝殻によって修飾したゼオライトのアンモニア吸着能力向上及びメタン発酵におけるアンモニア阻害抑制効果の検討を目的とする．
A-3zeolite，牡蠣の貝殻，スターチ，褐炭を用い，修飾ゼオライトを作製した(Oyster)．また $CaCl_2$ による修飾ゼオライト（$CaCl_2$），コントロールとして市販の A-3zeolite を用意した．アンモニア態窒素濃度 3969 mg/L の水溶液中でのアンモニア吸着能力を測定した．アンモニア阻害軽減を検討するため，メタン発酵実験ではアンモニア態窒素濃度 3669 mg/L の合成培地を用い，作製した修飾ゼオライトを入れた固定床をそれぞれリアクターに取り付け，温度 35℃で 26 日間発酵を行った．
アンモニア吸着実験において，Oyster の吸着能力は 145 mg/g であり，$CaCl_2$（127 mg/g），A-3zeolite（102 mg/g）に比べ高い吸着能力を示した．また EDS 分析から，Oyster のイオン交換カチオンの増加が確認された．メタン発酵実験においては Oyster を用いたリアクターのメタン収率が最も高く（102 ml/g-$TOC_{removal}$），A-3zeolite の約 2.3 倍のメタン収率であった．ATP 値の測定及び SEM による固定床の観察より，高い微生物活性が確認された．以上の結果より牡蠣の貝殻による修飾ゼオライトはアンモニア阻害軽減に有効であることが明らかとなった．

Development of a novel zeolite absorbent modified by oyster shell for reduction of ammonia inhibition in methane fermentation

○Takanori Hiranuma, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words anaerobic degradation, zeolite, oyster shell, ammonia inhibition

4P-H118 微生物を利用した新規汚泥減容化システム

○柳瀬 亜美[1], 黒住 悟[2], 石田 秀樹[2], 倉根 隆一郎[1]
([1]中部大院・応生, [2]積水アクアシステム（株））
gr16020-3662@sti.chubu.ac.jp

日本の下水処理およびし尿処理のほとんどが活性汚泥法によるものである．それらの施設では，処理の過程で余剰汚泥が大量に発生する．発生した余剰汚泥は脱水，焼却，埋め立て等によって処分されるが，高コストや悪臭などの問題を抱えており，余剰汚泥の削減が求められている．現在，余剰汚泥を削減するために様々な方法が開発されているが，従来のエンジニアリング的な手法では設備コスト，エネルギーコストともに負担が大きくなることから普及には至っていないのが現状である．そこで，微生物学的な面からアプローチを行うことにより，より省エネルギー・低コスト化を可能とする新たな汚泥減容化技術を開発することを目的とした．
本研究では，し尿処理場の活性汚泥から汚泥減容に関与する微生物を単離した．そして，単離した微生物がどのようなメカニズムで汚泥を減容しているのかを明らかにするためにアミラーゼ，リパーゼ，プロテアーゼ，アセチルトランスフェラーゼの四種類の酵素活性測定を行った．その結果，高いプロテアーゼ活性およびアセチル化能を示す微生物が見つかり，これら二種類の微生物を組み合わせた新規汚泥減容化システムを考案した．

Novel method of sludge volume reduction by using microorganisms

○Ami Yanase[1], Satoru Kurozumi[2], Hideki Ishida[2], Ryuichiro Kurane[1]
([1]Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ., [2]Sekisui Aqua Systems Co.,Ltd)

Key words activated sludge, microorganisms, environmental engineering, sludge volume reduction

4P-H119 Optimization of illumination conditions for methane recovery in ammonium-rich anaerobic digestion

○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Anaerobic digestion is regarded as a promising method to deal with livestock waste. However, high ammonia nitrogen concentration in livestock waste inhibits the anaerobic digestion process. Conventional anaerobic digesters are operated under dark conditions, but intermittent illumination have been proved to be efficient in mitigating ammonia inhibition. However, there has been few reports on mitigating ammonia inhibition through anaerobic digestion under illumination, especially regarding optimum light conditions. Therefore, a study on the effective and appropriate light intensity and illumination time for the ammonium-rich anaerobic digestion is necessary.
In this study, bioreactors were conducted under different light intensity for the optimal condition investigation. The results showed that the highest methane concentration and methane production achieved from the bioreactors subjected to the light intensity of 72 W/m^2. Moreover, the exploration of the proper illumination time was carried out under the optimal light intensity. It have been proved 90 min/day of illumination period to be optimal for ammonium-rich anaerobic digestion. The ATP values indicated that the optimal light condition could improve the activity of anaerobes resulting in the better performance. It could be concluded that the optimal light conditions influenced the rate of methane production and the efficiency of VS removal in the anaerobic digestion with high ammonium nitrogen concentration.

Optimization of illumination conditions for methane recovery in ammonium-rich anaerobic digestion

○Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Chenyu Zhao, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words anaerobic digestion, ammonia inhibition, illumination, methane fermentation

4P-N120 異なる pH で運転した微生物燃料電池：アノード電極上の微生物群集に由来する細胞内代謝物の比較

○佐々木 大介[1], 佐々木 建吾[1], 柘植 陽太[2], 近藤 昭彦[1]
([1]神戸大院・科技イノベ, [2]金沢大・新学術創成)
daisuke@port.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】我々は微生物ないしは微生物群集を対象とした網羅的細胞内代謝解析を実施し，代謝状態と機能とを結びつけて評価することに成功している．すなわち *Geobacter* 単菌を利用した微生物燃料電池（MFC）では，電流の出力が高い事と菌体内の TCA 回路関連の代謝物濃度および ATP/ADP 比に正の相関が存在し，逆に解糖系関連の代謝物濃度は負の相関があることを報告してきた．本研究では電流生成に影響を与える因子の一つである pH に注目して，細かい pH 条件で運転した MFC において，微生物群集に対して代謝解析を実施し，発電性能の向上に貢献する微生物群代謝状態についての知見を得ることを目的とした．
【方法】電流生成に勾配をつけることを目的に，模擬排水の pH を 7.0，5.5，4.0 に調整した．250 mL 容量のエアカソード型 MFC を水理学的滞留時間：24h で運転し，各種運転パフォーマンスを解析した．代謝状態を比較するため，それぞれのアノード電極上から回収した微生物群集の細胞内代謝物を抽出し，トリプル四重極 LC-MS/MS・GC-MS を用いて網羅的に解析した．
【結果・考察】化学的酸素要求量の除去率に有意差は検出されなかったが，電流生成は pH7.0 > 5.5 > 4.0 の順に高かった．微生物群集における *Geobacter* に関連する微生物種の割合は，pH7.0 で最も高かった．代謝解析では，TCA 回路関連の代謝物濃度・ATP/ADP 比の上昇が電流生成量と正の相関を示した．これは *Geobacter* 単菌から得られた知見の傾向と同様だった．これらの結果から，微生物群集においても TCA 回路や ATP 生成の活性化が電流生成に重要であり，これらは *Geobacter* 種の菌により影響を受ける事が示唆された．

Comparative metabolic state of microflora on the surface of the anode electrode in a microbial fuel cell operated at different pH conditions

○Daisuke Sasaki[1], Kengo Sasaki[1], Yota Tsuge[2], Akihiko Kondo[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Inst. Front. Sci. Init., Kanazawa Iniv.)

Key words microbial fuel cell, metabolic analysis, microflora

4P-H121 高塩濃度条件下で生育可能な微生物による電力生産

○雪本 寛, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工）
tano@waka.kindai.ac.jp

微生物燃料電池（microbial fuel cells : MFCs）は微生物が有機物を分解する際に生じる還元力を電子として細胞外に取り出し，電極で回収することで発電する装置である．現在，日本で行われている廃水処理は活性汚泥法が主流であるがこの処理法は曝気が必要であり，それには大量の電力を消費する．
微生物燃料電池は嫌気条件で作動させるため，廃水処理と組み合わせることで曝気が不要となり省エネルギーになる．さらに，微生物を利用した発電であるため，廃水に含まれる多様な有機物が基質として利用できる．そのため微生物燃料電池は廃水処理と同時に電力生産を可能にする技術として期待されている．しかし，廃水中には様々な微生物が存在する．その中で発電に関与する微生物を優先的に保つことは困難であると考えられる．そこで，我々は通常の微生物は生存できない高塩濃度条件下で生育可能な極限環境微生物に注目した．
本研究では高塩濃度条件下で生育可能な微生物群をスクリーニングするため NaCl 1 M の高塩濃度培地を用い集積培養を行った．次に，電極に炭素棒電極を用い，陽イオン交換膜（NeoSepta CMX）で各槽を分離した二槽式 MFC 装置を使用し，得られた微生物群における発電能を調べた．電極間を 10 kΩ の外部抵抗で接続し，電圧を測定した．その結果，高塩濃度条件下で発電する微生物群 SD を得ることができた．その後，2 M の NaCl 濃度でも発電が認められ，その培養液から SD1 株と SD2 株を単離することができた．各単離菌を用い，微生物燃料電池を作動させた結果，SD1 株において高い電力が得られた．その SD1 株はグラム陰性で，NaCl 無添加培地において増殖が良好であり NaCl 2 M の条件でも生育したため耐塩性微生物であることが示された．

Construction of microbial fuel cell operating at high NaCl concentration conditions

○Hiroshi Yukimoto, Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words microbial fuel cells, halotolerant bacteria, extremophiles

4P-H122 抽水植物セキショウの根圏から分離した微生物による貴金属ナノ粒子の合成

○南川 泰輝[1], 黒田 真史[1], 惣田 訓[2], 池 道彦[1]
([1]阪大院・工, [2]立命館大・理工)
ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】貴金属ナノ粒子は，比表面積が大きいため，バルク材料とは異なる特性を示し，光学的・電気的・磁気的特性を利用した製品開発への研究が行われている．一般的には貴金属ナノ粒子は化学合成により製造されているが，微生物による合成が実用化できれば，環境負荷やコストの低減が期待できる．そこで本研究では，銀・金のナノ粒子の合成が可能な微生物の取得を試みた．
【方法・結果】金属精錬工場排水の浄化施設に植栽されていたセキショウの根圏から R2A 培地を用いて 10 株の微生物を単離した．各株を LB 培地 50 mL を用いて 28℃または 37℃で培養した．培養液を遠心分離した上清，または回収した菌体を超純水に懸濁し 24 時間振盪した後の上清 10 mL と，5 mM $AgNO_3$ または 1 mM $Na(AuCl_4)$・$2H_2O$ 10 mL を混合し，37℃または 60℃で静置した．24 時間後，銀及び金ナノ粒子の合成を 300-700 nm の波長における吸光度スペクトル ($A_{300\text{-}700}$) を測定することで評価した．その結果，銀ナノ粒子は 37℃で培養をした 2 株の微生物の培養液上清を用いて 60℃で反応させた条件において最も高い吸光波長ピーク(A_{420})が見られたが，他の 8 株の微生物では明確なピークが見られなかった．超純水懸濁液上清を用いて 60℃で反応させた条件においても，同様の 2 株において A_{420} のピークが確認され，培地成分を含まない純粋な銀ナノ粒子を合成できることが示唆された．一方，金ナノ粒子は銀ナノ粒子合成が可能であった 2 株を含む 9 株の微生物において生成された．微生物の種類や実験条件（反応温度，pH）によって最大の吸光を示す波長が異なったことから，様々な条件が粒子径の大きさに影響を与えているものと考えられる．今後，微生物の培養条件と合成反応条件が，貴金属ナノ粒子の生成量や粒径などに及ぼす影響を明らかにする．

Biosynthesis of precious metal nanoparticles by microorganisms isolated from rhizosphere of *Acorus gramineus*

○Taiki Minamikawa[1], Masashi Kuroda[1], Satoshi Soda[2], Michihiko Ike[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Dept. Sci. Eng., Ritsumeikan Univ.)

Key words biosynthesis, nanoparticle, microorganisms, precious metal

4P-H123 各種金属が 1,4-ジオキサン微生物分解に及ぼす影響

○井上 大介[1], 角田 翼[2], 澤田 和子[3], 山本 哲史[1,4], 黒田 真史[1], 池 道彦[1], 清 和成[2,3]
（[1]阪大院・工, [2]北里大院・医療系, [3]北里大・医衛, [4]大成建設）
d.inoue@see.eng.osaka-u.ac.jp

【背景・目的】1,4-ジオキサンは，洗浄剤等の用途で各種利用されている環状エーテル構造の合成有機化合物である．1,4-ジオキサンは極めて安定な物性を有しており，特に水環境中における残留性が高く，また，人に対する発がん性の疑いもあることから，近年，水道水質基準，水質環境基準，排水基準が設定された．同物質は生物難分解性であるとされてきたが，近年になり複数の分解菌が発見され，微生物分解が可能であることが見出されており，分解菌を活用した環境浄化，排水処理技術の確立が期待されている．しかし，その微生物分解には未だ不明な点が多い．本研究では，複数の 1,4-ジオキサン資化菌を対象とし，各種金属が 1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響について検討した．
【方法・結果】1,4-ジオキサン資化菌として，*Mycobacterium* sp. D6，*Pseudonocardia* sp. D17，*Pseudonocardia* sp. N23，*Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343 を使用した．また，試験金属には，Fe（2 価，3 価），Cu，Co，Mn，Zn，Ni（すべて 2 価），Mo（6 価）を選定した．MGY 培地で培養した各菌株を，100mg-C/L の 1,4-ジオキサンと各金属を単独を添加した無機塩培地に 50mg-TSS/L になるように植種し，28℃，120rpm で回転振盪培養を行って，1,4-ジオキサン濃度の継時変化を調べた．いずれの試験菌株でも Cu により 1,4-ジオキサン分解が顕著に抑制され，一部の試験菌株では Co，Zn，Ni によっても分解が抑制された．他方，*Pseudonocardia* sp. D17 と *Pseudonocardia* sp. N23 では Mn，*Mycobacterium* sp. D6 と *R. aetherivorans* JCM 14343 では Fe において分解促進が観察された．分解促進金属種の相違はこれらの菌株が保有する分解酵素の違いによるものと推測された．

Effects of metals on microbial 1,4-dioxane degradation

○Daisuke Inoue[1], Tsubasa Tsunoda[2], Kazuko Sawada[3], Norifumi Yamamoto[1,4], Masashi Kuroda[1], Michihiko Ike[1], Kazunari Sei[2,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Med. Sci., Kitasato Univ., [3]Dept. Health Sci., [4]Taisei Corp.)

Key words 1, 4-dioxane, microbial degradation, metals

4P-H124 Use of bio-stimulants to enhance microorganisms in agrochemical contaminated soil

○Rose Caroline Kirigo Mumbi[1], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1], Adhikari Dinesh[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agric promotion center)
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

Agrochemicals such as chemical fertilizers and pesticides are widely used to improve agricultural productivity.However,these chemicals cause damage to soil microorganisms.Our previous studies have shown that agricultural fields with long term application of agrochemicals have very low levels of microorganisms and poor material circulation activities.Several agrochemicals are not decomposed in soil but persist for a long time.Bio-stimulants have been investigated for their roles on improving biological activities such as plant growth promotion,soil fertility improvement etc.This study was carried out to enhance microorganisms and material circulation activities in agrochemical contaminated soils by use of bio-stimulants.Specially this resesearch focuses on use of bio-stimulants and in combination with organic materials.The experimental soil was contaminated by chloropicrin which had been applied for over 40 years.Chloropicrin is a broad-spectrum fumigant and is popular in Japan.The soil was analysed for total bacteria which was below detactable level and material circulation activities (Nitrogen and Phosphorus) were also low.The soil was treated with bio-stimulants like natural plant peptides and humic acid extracts alone or in combination with organic materials.Results showed that bio-stimulants alone slightly enhanced bacterial biomass whereas,bio-stimulants in combination with organic materials were effective to enhance bacterial biomass and Nand P circulation activities.

Use of bio-stimulants to enhance microorganisms in agrochemical contaminated soil

○Rose Caroline Kirigo Mumbi[1], Kiwako S. Araki[1], Motoki Kubo[1], Adhikari Dinesh[1,2]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agric promotion center)

Key words bio-stimulants, organic materials, microbial biomass, material circulation

4P-H125 工場冷却水中に存在する細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析

○山口 祐太朗[1], 謝 肖男[2], 諸星 知広[1]
（[1]宇都宮大院・工, [2]宇都宮大・バイオ）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

工場冷却水システムで発生するスライムは，熱交換器や配管の劣化や，熱効率の低下を引き起こすなど，様々な問題の原因となっている．スライムの発生には，主に微生物によるバイオフィルム形成が関与しているが，特にグラム陰性細菌のバイオフィルム形成においては，アシル化ホモセリンラクトン（AHL）をシグナル物質とした Quorum Sensing が関与していることが明らかになっている．Quorum Sensing を阻害することで，バイオフィルムの形成が抑制可能であることから，工場冷却水におけるスライム発生防止技術の開発には，冷却水中に生息する細菌の Quorum Sensing 機構を解析する必要があると考えられる．本研究では，工場冷却水及び発生したスライムから細菌を単離するとともに，これらの細菌の中から AHL 合成細菌をスクリーニングし，Quorum Sensing シグナリング機構を解析する事を目的とした．
工場冷却水やスライムをサンプルとし，5 倍希釈したトリプチケースソイ培地（1/5TSB）を用いてランダムに細菌を単離した．次に，AHL 合成細菌を単離するため，AHL に応答して紫色色素を生産する AHL レポーター株を使用して AHL 合成細菌をスクリーニングしたところ，*Aeromonas* 属細菌や *Methylobacterium* 属細菌といった既知の AHL 合成細菌が単離された一方で，*Lysobacter* 属細菌や *Bosea* 属細菌といった新規 AHL 合成細菌が存在することが明らかとなった．*Lysobacter* 属細菌や *Bosea* 属細菌については，ドラフトゲノム解析により AHL 合成遺伝子ホモログの存在が明らかとなり，これらの遺伝子を大腸菌に導入することで，親株と同等の AHL を生産することが明らかとなった．

Characterization of quorum-sensing signaling in industrial cooling water systems

○Yutaro Yamaguchi[1], Xiaonan Xie[2], Tomohiro Morohoshi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]C-Bio, Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, industrial cooling water system

4P-I126 水回りのピンク汚れ原因菌 *Methylobacterium populi* における Quorum Sensing 機構の解析

○茂呂 亮汰, 池田 宰, 諸星 知広
（宇都宮大院・工）
morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp

ピンク色の汚れは，風呂や流し等の水回りに発生するだけでなく，工場や水処理現場においても膜の目詰りを引き起こすなど，大きな問題となっている．本研究グループでは，家庭の水回りで発生したピンク汚れから，ピンク色を呈する微生物を分離したところ，大部分が *Methylobacterium* 属細菌であることを明らかにしている．その中でも，*Methylobacterium populi* P-1M 株は，ある種の *Methylobacterium* 属細菌株と組み合わせることで，バイオフィルム形成量を大きく向上させることが明らかになっている．そこで本研究では，P-1M 株の全ゲノムを明らかにするとともに，グラム陰性細菌のバイオフィルム形成に影響を及ぼすアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した Quorum Sensing を解析することを目的とした．
P-1M 株が生産する AHL を LC-MS/MS により解析したところ，アシル鎖内部に不飽和結合を有する C14:1-HSL を主に生産することが明らかとなった．次に，次世代シークエンサーを用いて P-1M 株の全ゲノムを決定したところ，染色体内部に AHL 合成遺伝子（*mpoI*）と AHL レセプター遺伝子（*mpoR*）が一組存在することが明らかとなった．P-1M 株の *mpoI* をノンマーカー変異により破壊したところ，*mpoI* 破壊株は AHL の生産が完全に消失したことから，MpoI によりすべての AHL が生産されることが明らかとなった．さらに，各菌株のバイオフィルム形成をガラス試験管表面で調べたところ，P-1M 親株と比較して，*mpoI* 破壊株はバイオフィルム形成量に変化は見られないものの，ガラス固体表面への付着の強度が大幅に向上することが明らかとなった．

Characterization of quorum sensing in *Methylobacterium populi* isolated from pink-pigmented biofilms

○Ryota Moro, Tsukasa Ikeda, Tomohiro Morohoshi
(Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ.)

Key words quorum sensing, acyl homoserine lactone, *Methylobacterium*, biofilm

4P-N127 植物成長促進根圏細菌 *Pseudomonas protegens* CHA0 のアミノ酸走化性センサー群の特性化

○松田 浩希, 緋田 安希子, 田島 誉久, 加藤 純一
（広島大院・先端物質）
jun@hiroshima-u.ac.jp

[背景・目的] 走化性とは，運動性細菌が走化性センサータンパク質(MCP)により化合物を感知して集まる行動である．植物成長促進根圏細菌（PGPR）は走化性により植物の根へ接近しコロニー形成することで，植物に有益作用をもたらす．これまでの研究で根コロニー形成には特にアミノ酸走化性が重要であることが判明した．このアミノ酸走化性を制御することで，より効果的な植物成長促進が期待される．そのためにはまず，アミノ酸走化性の詳細を解明する必要がある．そこで本研究では，PGPR である *Pseudomonas protegens* CHA0 株を供試株としてアミノ酸走化性の特性化を試みた．
[方法・結果]CHA0 は 42 種類の MCP を保有すると推定される．しかしそのいずれがアミノ酸 MCP であるかは不明である．CHA0 株の近縁種である *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 のアミノ酸 MCP の情報をもとにした BLASTP 解析により，4 つのアミノ酸 MCP（MCP01/02/09/34)が推定された．当該 MCP を *Pseudomonas* 異種株のアミノ酸 MCP 破壊株に相補し解析した結果，アミノ酸混合物に対して走化性応答を示した．これにより，これら 4 つの MCP がアミノ酸 MCP であると同定された．次に，これら MCP 異種相補株を用いて，20 種の個別アミノ酸に対する走化性を解析した結果，MCP01 は Asn，Gln，Met，Ser の 4 アミノ酸を，MCP02 は Asp，Glu の 2 アミノ酸を，MCP09 は Arg，Cys，His，Ile，Lys，Met，Pro，Val の 8 アミノ酸を感知し，MCP34 は 13 アミノ酸と幅広いアミノ酸を感知することが明らかとなった．アミノ酸の性質ごとに感知するアミノ酸が異なる MCP01/02 と幅広いアミノ酸を感知している MCP34 とでは，アミノ酸を感知する目的が異なるのではないかと予想できる．CHA0 株において，アミノ酸を感知する目的を明らかにするために，資化性や発現の点から解析中である．

Characterization of amino acid MCPs of *Pseudomonas protegens* CHA0 that is plant grouth promoting rhizobacteria

○Hiroki Matsuda, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis

4P-I128 Novel method to control *Ralstonia solanacearum* infection by targeting chemotaxis

○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Yutaka Nakashimada, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)
jun@hiroshima-u.ac.jp

Ralstonia solanacearum, a soil-borne plant pathogenic bacterium, causes globally dispersed bacterial wilt disease in many economically important crops such as tomato, potato, tobacco etc. This pathogen necessarily requires chemotaxis to locate plant root before migrate to and invade into it which is considered as the critical earliest step of plant infection. Thus, there is the possibility that soil amended with the key chemotactic compounds may cause a delay or even suppression the infection. Previously, we reported that malate chemoreceptor has play a role in facilitating *R. solanacearum* motility to tomato roots. In this study we evaluated the effect of malate on the pathogen's virulence. Interestingly, sand amended with D- or L-, or DL-malate resulted in about 70% reduction of tomato infection in gnotobiotic system. When non-chemotactic mutant strain was applied to the system, there were no difference of virulent level between L-malate and non-treatment indicating that L-malate may be able to suppress key chemotaxis of *R. solanacearum*. On the contrary, the inhibition effect on wilt disease still be observed from D-malate treatment. This result can be explain by the evident that D-malate exhibited suppression effect on twitching motility, which is also required for full virulence in *R. solanacearum*.

Novel method to control *Ralstonia solanacearum* infection by targeting chemotaxis

○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Yutaka Nakashimada, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt disease, malic acid

4P-I129 針葉樹リグニン分解物を唯一の炭素源とした糖質に依存しないムコン酸のバイオ生産

○園木 和典[1,3], 杉田 晴佳[1,3], 高橋 健司[2,3], 上村 直史[2,3], 政井 英司[2,3]
（[1]弘前大院・農生, [2]長岡技大・生物, [3]JST-ALCA）
sonoki@hirosaki-u.ac.jp

【目的】 我々はこれまでに，多様な芳香族化合物を利用して増殖できる *Pseudomonas putida* KT2440 株の代謝経路を利用して，リグニン由来の芳香族化合物モデルおよびその混合物から，また木質系・草本系バイオマスから調製したリグニン由来の芳香族化合物から，基幹化学品である *cis,cis*-muconic acid (ccMA) を生産できることを報告してきた[1),2)]．しかしこれらの方法では，代謝可能なリグニン由来の芳香族化合物を全て ccMA へと収束してしまうため，細胞増殖やエネルギー合成のためには糖質や有機酸などリグニン以外の炭素源が必要であった．本研究では，リグニン由来の芳香族化合物を唯一の炭素源として増殖し，かつ ccMA を生産できる，糖質に依存しない ccMA 生産微生物株の作出を検討した．
【結果】 KT2440 株の protocatechuate (PCA) 3,4-dioxygenase 遺伝子 (*pcaH, pcaG*) と ccMA cycloisomerase 遺伝子を破壊し，*pcaH, pcaG* と PCA decarboxylase 遺伝子を同一プロモーターの制御下に連結した遺伝子コンストラクトを組込むことで，リグニン由来の芳香族化合物モデルである vanillic acid や 4-hydroxybenzoic acid を利用して増殖しながら ccMA を生産できることを明らかにした．さらに，この形質転換微生物株が，スギリグニン由来の芳香族化合物 (アルコール－ベンゼン抽出処理したスギ木粉をアルカリニトロベンゼン酸化分解処理して得られた芳香族化合物) を唯一の炭素源とした条件下でも増殖し，かつ ccMA を生産できること，また vanillate *O*-demethylase と catechol 1,2-dioxygenase の発現の強化により収率を向上させることができることを明らかにした．
本研究は JST 戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の支援を受けて実施した．
[1)]菊地ら, 第 68 回日本生物工学会大会 (2016). [2)]東ら，第 69 回日本生物工学会大会 (2017).

Sugar-free bio-based muconic acid production from softwood lignin

○Tomonori Sonoki[1,3], Haruka Sugita[1,3], Kenji Takahashi[2,3], Naofumi Kamimura[2,3], Eiji Masai[2,3]
([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., [3]JST-ALCA)

Key words lignin, *cis, cis*-muconic acid, bio-based monomer, *Pseudomonas putida*

4P-I130 糖質に依存しない広葉樹リグニン分解物からのムコン酸のバイオ生産

○高橋 健司[1,3], 篠田 英里[1], 鈴木 祥央[1], 上村 直史[1,3], 園木 和典[2,3], 政井 英司[1,3]
（[1]長岡技大・生物, [2]弘前大・農生, [3]JST-ALCA）
emasai@vos.nagaokaut.ac.jp

【目的】 樹木の主要成分の 1 つであるリグニンは *p*-ヒドロキシフェニル (H)，グアイアシル (G)，シリンギル (S) リグニンにより構成される．これまでに H-及び G-リグニン由来化合物から基幹化学品である *cis,cis*-ムコン酸 (ccMA) をバイオ生産するための研究が行われてきた．しかしその生産には微生物の増殖源として，有効活用が可能な糖質を必要とする問題点があった．本研究では，糖質に依存しないバイオプロセスの確立を目指し，S-リグニン由来化合物を炭素源として生育しつつ H-及び G-リグニン由来化合物から ccMA を生産可能な微生物株を開発することを目的とした．
【結果】 初めに様々なリグニン由来化合物を唯一の炭素源として生育できる *Sphingobium* sp. SYK-6 株を ccMA 生産のための宿主微生物に選定した．リグニン由来化合物からの ccMA 生産はプロトカテク酸 (PCA) を経由するため，SYK-6 株の PCA 4,5-ジオキシゲナーゼ遺伝子を破壊した SME257 株を作製した．SME257 株は G-リグニン由来のバニリン酸 (VA) の変換産物である PCA の代謝能を欠損しているため VA の資化能を失ったが，S-リグニン由来のシリンガ酸 (SA) での生育能を保持していた．しかし，VA と SA の共存下では生育が著しく抑制された．そこで，培地中に微量のトリプトンを添加したところ，SA を炭素源として生育しつつ，VA を変換して PCA を蓄積した．また，PCA を ccMA に変換する ccMA 生産用プラスミドを導入した SME257 株は，SA を炭素源として VA から 79% (g/g) の収率で ccMA を生産した．さらに本株はシラカバリグニンのアルカリニトロベンゼン酸化分解で得られた芳香族化合物を炭素源として生育し，ccMA を生産できることを明らかにした．
本研究は JST 戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の支援を受けて実施した．

Sugar-free bio-based muconic acid production from hardwood lignin

○Kenji Takahashi[1,3], Eri Shinoda[1], Sachio Suzuki[1], Naofumi Kamimura[1,3], Tomonori Sonoki[2,3], Eiji Masai[1,3]
([1]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech., [2]Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ., [3]JST-ALCA)

Key words *Sphingobium*, lignin, *cis, cis*-muconic acid

4P-I131 管理放棄林における森林バイオマスの解析

○連 綾香, 荒木 希和子, 久保 幹
（立命館大院・生命科学）
kubo@sk.ritsumei.ac.jp

【背景・目的】里山に分布する森林は，人々が食料や燃料の生産地として利用することを通じて環境が維持されてきた．しかし，エネルギー源の変化によって森林の利用価値は失われ，管理放棄された森林が増加している．その結果，管理放棄された森林における生物多様性の減少や，森林の持つ機能および健全性の低下が課題となっており，森林の現状を把握した上で，森林資源を利用して環境を維持する管理が必要である．特に樹木葉は，森林の内部循環において植物成長の栄養分としての機能を有することから，農業における有機資材利用が期待されている．本研究では，管理放棄林の植生調査から，管理放棄による森林の環境変化の解明と，樹木葉の成分を明らかにすることによって，森林の資源価値を評価することを目的とした．
【方法・結果】立命館大学 BKC キャンパス内の雑木林において，毎木調査および土壌の成分分析を行った．また，生育する樹木の生葉，落葉の成分を分析した．土壌成分分析の結果，深度 25 cm では深度 0 cm と比較して全炭素量 (TC), 全窒素量 (TN), 全リン量 (TP) および総細菌数が著しく減少し，表層土壌での養分の蓄積が認められた．従って，調査林では微生物の活性が阻害され，物質循環の停滞が生じていることが推察された．各樹木葉の成分分析の結果，落葉広葉樹の生葉は，常緑針葉樹および常緑広葉樹と比較して，TN 及び TP が高い傾向が見られた．各樹種の生葉と落葉の有機態成分を比較すると，TN，TP，全カリウム量 (TK) には落葉で減少がみられた．これらの成分濃度の減少率は，落葉広葉樹 > 常緑針葉樹 > 常緑広葉樹の順で大きかった．従って，樹木葉が持つこれらの成分は，落葉後，土壌に供給されていることが示唆された．このことから，落葉広葉樹の生葉は，有機態成分の無機化効率が最もよく，利用しやすい有機資材であると期待できる．

Analysis of forest biomass in abandoned forests

○Ayaka Muraji, Kiwako S. Araki, Motoki Kubo
(Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

Key words forest soil, abandoned forest, forest biomass, material curculation

4P-I132 耕作放棄地 42 万 ha だけで全国民のカロリー必要量全量を供給可能な甘藷の格安生産法の実証試験

○鈴木 高広[1], 坂本 勝[1], 森岡 航[2]
（[1]近畿大・生物理工, [2]森岡産業）
tksuzuki@waka.kindai.ac.jp

国内の農作物を燃料にすると食料自給率が低下し食料不足になると考えられているが，これは科学的根拠がない錯誤である．2015 年の国内の全食料供給カロリーは 106 兆 kcal（農林水産省統計）であり，また，国民の摂取カロリー量は 83 兆 kcal（厚生労働省）だった．一方，甘藷の可食部は 1319kcal/kg（食品成分表）あり，国内の耕作放棄地 42 万 ha で甘藷を年平均 20kg/m^2 生産するとカロリー生産量は 111 兆 kcal に達し，必要量を大幅に上回る食料を毎年供給することができる．これが簡易な技術であることを実証するために，年間を通し甘藷の露地栽培が可能な沖縄（読谷村）において，10 月に苗を植え 4 月に収穫する冬季栽培における甘藷の量産試験を行った．
【実験方法と結果】 読谷村において，単層密集配列した 10L ポット（黒丸プラスチック鉢）に培養土を充填し，ベニアズマ，水軒金時，美ら恋，名護まさりの苗を 10 月に植え，太陽光・開放型・簡易ポット鉢栽培を行った．4 月末に収穫したところ 7.3kg/m^2 の収穫量を達成し，本州の露地栽培（5 月植～10 月収穫）と比べ単位面積当たり 3 倍の生産実績が得られた．
【考察】4 月末収穫時の茎葉は瑞々しく，栽培条件を最適化することで冬季栽培でも 10kg/m^2 を達成できると見込まれ，これまでの夏季栽培実績と合わせ年間 20kg/m^2 が実現可能である．
甘藷の栽培には 15℃ 以上の平均気温が望まれるため，沖縄以外では燃料作物を用いた地産地消型バイオガス発電の余熱などを冬季（12 月～2 月）に利用することが見込まれる．この栽培技術を改良し普及すれば，食料自給率を高めると共に，国内の年間化石燃料消費量 1850 万 TJ（2014 年）を，国産甘藷燃料だけで全量代替できることを報告する．

Cheap way to produce sweetpotatoes to supply all calorie-consumption of the whole nation, at the 420,000ha-abandoned farmlands only

○Takahiro Suzuki[1], Masaru Sakamoto[1], Wataru Morioka[2]
([1]Dept. Biotechnol. Sci., Fac. Biol. Orie. Sci. Tech., Kindai Univ., [2]Morioka Sangyo.,LTD)

Key words sweetpotato, food self-sufficiency, energy self-sufficiency, fuel crop

4P-I133 海岸林に生息する陸ガニ類がもつバイオマス分解活性について

知田 真之介, 上田 佳希, 馬場 保徳, ○三宅 克英
（石川県大・生物資源研）
miyake@ishikawa-pu.ac.jp

日本の海岸に面した森林，いわゆる水辺林では，アカテガニやクロベンケイガニといった陸ガニの生息がよく観察される．これらの陸ガニ類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用することが知られている．本研究では陸ガニ類の新規バイオマス分解システムを明らかにし，バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている．本発表ではアカテガニ及びクロベンケイガニ消化管由来粗酵素液のリグニン分解活性及びセルラーゼ活性の解析について報告する．
加賀地方や能登地方の水辺林に生息するアカテガニを採集し，解剖して消化管抽出液を作製し，そのバイオマス分解能力を解析した．消化管は前腸（胃），中腸腺（肝臓や膵臓に相当），後腸に分けて回収し，サンプルとした．リグニン分解活性はグアヤコール酸化活性測定によって検討した．その結果，非常に強いグアヤコール酸化活性を中腸腺から検出することができた．この中腸腺由来の強力なグアヤコール酸化活性はすべてのアカテガニ個体から見出されるわけではなく，一部のメスに限られることも明らかとなった．このことは，カニの食性研究で，メスの方が植物を好むといういくつかの報告と一致している．この強力なペルオキシダーゼの特徴について解析した．一方，もう一つのバイオマス分解活性であるセルラーゼについては，基本的にどの臓器からも，どの個体からも検出された．カニ自身のセルラーゼについては，既に有名なクリスマスアカガニなどでも報告されているので，検出された活性はカニ自身に由来する可能性が高いが，我々は腸内細菌の関与もあるのではと考え，研究を行っている．これまでにアカテガニ消化管から培養可能な細菌を分離しているが，その９割以上がセルラーゼ活性を示すことも明らかになっている．

Biomass degrading activities of land crab, *Chiromantes haematocheir*

Sninnosuke Chida, Yoshiki Ueda, Yasunori Baba, ○Katsuhide Miyake
(Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

Key words lignin-degradation enzyme, land crab, guaiacol oxidation, *Chiromantes haematocheir*

4P-N134 定量 PCR を用いたシイタケ(*Lentinula edodes*)を植菌した木材中の菌体バイオマスの定量

○桒山 知子[1], 上村 真由子[1], 丸山 温[1], 小松 雅史[2], 山口 宗義[2]
（[1]日大・生資科, [2]森林総研）
joumura.mayuko@nihon-u.ac.jp

森林における有機物分解過程は，物質・エネルギー循環や生物多様性といった森林生態系の機能を支える重要な過程である．有機物分解時に行われる微生物呼吸は，周囲の環境要因や有機物の基質要因，腐朽段階により影響を受けることが知られている．しかし，有機物分解において主な役割を担っている分解者微生物のバイオマスと分解呼吸速度との関係を示した研究はほとんどない．そこで本研究では木材腐朽菌に着目し，栽培方法が確立されているシイタケをモデルケースとして，シイタケを植菌した木材中の菌体バイオマスと分解呼吸速度について調べることを目的とした．
まず，木材中のシイタケ菌体バイオマスを定量するためのシイタケに特異的なプライマーを開発した．次に，木粉に既知量のシイタケ菌体を混ぜたサンプルを用いて検量線を得た．このとき，精度よく定量するための手法として，DNA 抽出時の CTAB 溶液の液量や，得られた DNA 溶液の希釈倍率について検討した．定量性の手法を確立後，以下の培養・栽培実験で得られサンプルを用いて，木材中のシイタケ菌体バイオマスと分解呼吸速度との関係を明らかにした．室内培養実験では，コナラ木片にシイタケ種駒を植え付け，102 日間の室内培養を行った．培養後期には，コナラ木片に環境ストレス（高温 40℃, 4 時間・湛水常温, 4 時間・乾燥ストレス常温, 15 時間×3 日間）を与え，ストレスの影響も調べた．野外栽培実験では，シイタケの種駒を植菌したコナラのホダ木を野外で栽培した．これらの木材中のシイタケ菌体バイオマスと，真菌，バクテリアの DNA コピー数の定量と分解呼吸速度の測定を，室内培養実験では週に 1 度，野外栽培実験では月に 1 度の頻度で行った．分解者である微生物バイオマスと分解呼吸速度の関係や環境ストレスの影響について，これらの実験から得られた結果を報告する．

Quantification of shiitake (*Lentidnula edodes*) biomass in a decompositing wood using qPCR assay

○Tomoko Kuwayama[1], Mayuko Jomura[1], Yutaka Maruyama[1], Masabumi Komatsu[2], Muneyoshi Yamaguchi[2]
([1]Coll. Bioresour. Sci., Nihon Univ., [2]FFPRI)

Key words decomposition respiration, qPCR, fungus, bacteria

4P-N135 植物生長促進細菌の単離と微生物農薬としての利用

○中岡 知規[1], 西山 紋加[2], 小林 誠治[2], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
([1]近畿大院・生物理工・生物工, [2]近畿大・生物理工・生物工)
okanami@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】細菌と植物は多様な相互関係を築いており，植物の生長を促進する細菌も存在している．このような細菌は植物生長促進細菌(PGPB)と呼ばれており，植物の生長を直接的または間接的に促進する．PGPB は植物ホルモン様物質の産生，リンや鉄の可溶化などを行っていると考えられる．さらに，一部の PGPB では植物生長促進作用(PGP 作用)に加え，植物病原菌の増殖を抑制する作用も併せ持つことが知られている．植物の生長促進と植物病原菌への感染抑制のための微生物農薬として PGPB を利用すれば，化学農薬に頼らない安全な食糧生産が期待できる．PGPB の中には陸上植物だけでなく水生植物にも作用を示すものが存在するため，PGPB を植物工場での養液栽培に利用すれば，気候に左右されることなく植物病原菌に感染しにくい，安定した食糧生産も期待できる．
【方法と結果】植物の生長促進，植物病原菌の増殖抑制などといった PGP 作用をもつ細菌を単離するため，まず，環境中から単離した細菌を 1/2×MS 液体培地中でウキクサ(*Lemna aoukikusa*)と共生させた．その結果，ウキクサの体積を増加，個体数を増加，あるいは，根の伸長を促進させることができる PGPB を多数得ることができた．これらの PGPB についてグラム染色を行ったところ，グラム陽性および陰性を問わず，球菌や桿菌など様々な細菌が単離されたことがわかった．次に，植物病原菌との対峙培養を行ったところ，一部の PGPB は植物病原菌の増殖を抑制する抗菌活性を併せ持つことがわかった．これらの PGPB を用いてレタス(ジェンティリナグリーン)の養液栽培における効果を調べた．その結果，レタスの生長を 1.5 倍以上促進させる PGPB が存在した．本大会では，これらの結果の詳細を報告する．

Isolation of plant growth-promoting bacteria and there application as microbial formulation

○Tomonori Nakaoka[1], Ayaka Nishiyama[2], Joji Kobayashi[2], Takashi Ano[1,2], Masahiro Okanami[1,2]
([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

Key words plant growth-promoting bacteria, hydroponic culture, microbial formulation

4P-N136 新規の植物生長促進細菌の単離と評価

○澤田 祥子[1], 中岡 知規[1], 西山 紋加[2], 吉水 芳織[2], 黒田 雄亮[2], 阿野 貴司[1,2], 岡南 政宏[1,2]
([1]近畿大院・生物理工, [2]近畿大・生物理工)
okanami@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】環境中に存在する微生物の中には植物に有益な影響を与え，植物の生長を促進するものもある．それらは植物生長促進細菌（plant growth-promoting bacteria: PGPB）とよばれる．PGPB は，植物ホルモン様物質の産生やリンの可溶化，シデロフォア産生による鉄の可溶化などを行うことにより，直接的に植物生長促進（plant growth promotion：PGP）作用を示すと考えられる．さらに，一部の PGPB では，直接的な PGP 作用に加えて植物病原菌の増殖を抑える抗生物質や病原性真菌の細胞壁を溶解する溶菌酵素の産生，三価の鉄イオンを利用する植物病原菌の増殖抑制を導くシデロフォアの産生などによって間接的に PGP 作用を示すものも知られている．これらの PGPB は従来の化学農薬に代わる微生物農薬としての利用が期待される．我々は，これらの PGP 作用を 1 つもしくは複数もつ新規の PGPB の単離を目的とした．
【方法と結果】ウキクサ（*Lemna aoukikusa*）を用いて新規の PGPB の単離を試みた．環境中（土壌圏または水圏）から単離した単離菌をウキクサの液体培地に添加し，PGP 作用を評価した．その結果，ウキクサの体積の増大，個体数の増加，あるいは，根の伸長の促進を導く PGPB を複数得られた．得られた PGPB について特に強い PGP 作用を示したものに関して，グラム染色や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析を行い，菌種の同定を行った．また，植物病原菌との対峙培養によって抗菌作用の有無を調べたところ，複数の病原菌に対して増殖抑制効果を示すものが存在した．現在，ウキクサに代わり，陸生植物であり分子生物学的なモデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を用いて，PGP 作用の評価および分子メカニズムに関する知見の収集を行っているところである．

Isolation and evaluation of novel plant growth-promoting bacteria

○Shoko Sawada[1], Tomonori Nakaoka[1], Ayaka Nishiyama[2], Kaori Yoshimizu[2], Yusuke Kuroda[2], taashi Ano[1,2], Masahiro Okanami[1,2]
([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

Key words plant growth-promoting bacteria, *Arabidopsis thaliana*

4P-I137 好熱菌発酵産物がサツマイモネコブセンチュウによる植物への寄生に与える影響

○柳瀬 裕介[1], 金子 由喜[2], 西川 あずさ[3], 井藤 俊行[4], 小野瀬 暁[4,5], 宮本 浩邦[1,5,6], 児玉 浩明[1]
([1]千葉大院・園芸, [2]千葉大・園芸, [3]千葉大院・融合, [4]京葉プラントエンジニアリング, [5]サーマス（株）, [6]理研IMS)
kodama@faculty.chiba-u.jp

当研究室では，未利用海産資源を好熱菌によって発酵させた好熱菌発酵産物の機能性を評価している．好熱菌発酵産物は多くの農家で使用されており，農作物の収量増加や作物中の硝酸含量の低下などの効果が確認されている．その中で，ネコブセンチュウの頭数が土壌中で変化しないにも関わらず，作物への被害が低減したという報告が寄せられている．ネコブセンチュウが植物根に侵入すると根が肥大化し，根瘤が形成される．根瘤中に寄生したセンチュウは，植物から養分を吸収して繁殖するため，農作物の収量低下を招く難防除性の害虫である．好熱菌発酵産物がネコブセンチュウによる植物の被害を低減させるメカニズムを解明することができれば，環境に負荷の少ないネコブセンチュウの制御方法として有用である．そこで，日本での主要害虫であるサツマイモネコブセンチュウを用いて，ネコブセンチュウによる根瘤形成に好熱菌発酵産物が与える影響をモデル植物としてタバコを用いて解析を実施した．まず，ネコブセンチュウが根に接近する様子を Attraction Assay によって確認した．Attraction Assay では，好熱菌発酵産物を施肥して生育させた発酵産物施肥区と非施肥区の植物の根端を用いて，ゲル内でネコブセンチュウの根端への接近程度を比較した．その結果，発酵産物施用区では，非施用区の根端と同様にネコブセンチュウが接近および侵入することが明らかとなった．また，恒温室で約二週間生育させたタバコにネコブセンチュウを投与し，50 日後に植物の形態を観察した結果，発酵産物施用区では非施肥区と比べて根瘤数が減少し，植物体重量が増加した．これらの結果から，好熱菌発酵産物はネコブセンチュウの根への接近および侵入には影響せず，植物への侵入後に根瘤を形成する過程に影響を及ぼしていることが示唆された．

Effects of thermophile-fermented compost on parasitism of *Meloidogyne incognita* to plants

○Yusuke Yanase[1], Yuki Kaneko[2], Azusa Nishikawa[3], Toshiyuki Ito[4], Akira Onose[4,5], Hirokuni Miyamoto[1,5,6], Hiroaki Kodama[1]
([1]Grad. Sch. Fac. Horticul., Chiba Univ, [2]Fac. Horticul., Chiba Univ., [3]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [4]Keiyo plant engineering Corp., [5]Sermas corp., [6]Riken Center for Integr. Med. Sci.)

Key words compost, root-knot nematode, Meloidogyne incognita

4P-N138 Identification of novel syntrophic fatty acid-oxidizing bacteria (SFAOB) in anaerobic chemostats via stable isotope probing (SIP)

Huizhong Wang, Yue Yi, Min Gou, Zhaoyong Sun, ○Yueqin Tang
(Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ., PR China)
tangyq@scu.edu.cn

Methane fermentation is based on a complex bacterial and archaeal community with wide phylogenetic diversities. It consists basically of four steps: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. Because of the unfavourable energetics under standard thermodynamics of acetogenesis (acetate- and hydrogen-producing fatty acid oxidization), fatty acids are syntrophically oxidized to produce methane by SFAOB and hydrogenotrophic methanogens. Due to the difficulties of isolation, limited SFAOBs are isolated to date and the knowledge of SFAOB is limited. It is of great importance to reveal the structure and function of fatty acid-oxidizing bacteria in community level. In this study, by using SIP technique, SFAOBs in three chemostats, separately fed with acetate, propionate, and butyrate as sole carbon source, were identified. The results revealed the existence of uncultured potential SFAOBs in all three chemostats and the diversity of these potential SFAOBs was high. These potential SFAOBs were mainly classified in Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, and Synergistetes.
This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (2016YFE0127700) and the National Natural Science Foundation of China (51678378).

Identification of novel syntrophic fatty acid-oxidizing bacteria (SFAOB) in anaerobic chemostats via stable isotope probing (SIP)

Huizhong Wang, Yue Yi, Min Gou, Zhaoyong Sun, ○Yueqin Tang
(Coll. Archit. Environ., Sichuan Univ., PR China)

Key words syntrophic fatty acid oxidization, stable isotope probing (SIP), volatile fatty acids, methane fermentation

4P-I139 ウシルーメン液によるメタン発酵前処理過程の微生物群集構造解析

○馬場 保徳[1,2,3], 松木 悠[2], 馬場（森） 裕美[1,2], 陶山 佳久[2], 多田 千佳[2], 福田 康弘[2], 三宅 克英[1], 齋藤 雅典[2], 中井 裕[2]
（[1]石川県大・生物資源研, [2]東北大院・農, [3]日本学術振興会特別研究員）
ybaba@ishikawa-pu.ac.jp

【背景・目的】
われわれは，ウシと畜廃棄物であるルーメン液を用いたメタン発酵前処理法を考案し，古紙や草本類のメタン収率が向上することを報告してきた．本研究では，この前処理に関わるリグノセルロース分解細菌を明らかにするべく，次世代シーケンサーによる群集構造解析に取り組んだ．
【材料・方法】
ナタネ栽培残さ（おもに茎葉）を，ルーメン液により，37℃で処理した．0，6および 24 時間後の処理液から DNA を抽出し，16S rDNA の V3-V4 領域を増幅した後，次世代シーケンサー MiSeq により配列情報を得て，QIIME software により解析した．アサイン（97% sequence similarity）された全 taxa の代表配列は，Blast 検索によりその最近縁種を決定した．酵素活性測定は，Mshandete et al. (2005) の方法に準じた．
【結果・考察】
7 種類のセルロース分解細菌，25 種類のセロオリゴ糖分解細菌，11 種類のキシラン分解細菌を検出した．とくに，Ruminococcus albus と R. flavefaciens の存在割合は経時的に増加し，最終的に両者で全 OTU の 48%を占めた．酵素活性の経時的観察は，処理 6 時間目にセルロースおよびキシラン分解活性が高まり，24 時間目にオリゴ糖分解活性が高まることを示した．既往研究において，リグニン分解性ルーメン細菌に言及した報告は殆ど無い．本研究は，リグニン由来芳香族化合物の分解に関与するであろう 7 種類の細菌を検出した．これらの細菌の生理的性質から，リグニン由来芳香族化合物は，Benzoate を経て酢酸へ変換されている可能性が示唆された．本研究で得られたリグノセルロース分解者を記載したリストは，今後のルーメン微生物に関する研究にとって，有用な基礎的知見と成り得る．

Bacterial community analysis of pretreatment of lignocellulosic biomass by cattle rumen fluid for methane production

○Yasunori Baba[1,2,3], Yu Matsuki[2], Yumi Baba(Mori)[1,2], Yoshihisa Suyama[2], Chika Tada[2], Yasuhiro Fukuda[2], Katsuhide Miyake[1], Masanori Saito[2], Yutaka Nakai[2]
([1]Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]JSPS Research Fellow)

Key words Lignocellulosic biomass, Rumen bacterial community, Next-generation sequencer, Enzyme activity

4P-I140 Enhanced biogas production from *Chlorella vulgaris* using photocatalytic pretreatment

○Aditya Sharma, Mishma Silvia Stanislaus, Qi Zhu, Chenyu Zhao, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Microalgal biomass has gained worldwide attention as a renewable bioenergy source. In the present research *Chlorella vulgaris* was used as a model of microalgae biomass to investigate the photocatalytic pretreatment. Conventional pretreatment methods for treating *Chlorella*, like thermal, alkali and acid are either energy intensive or toxic which makes it difficult for practical application. In this regard, photocatalytic pretreatment has various advantages over traditional methods. Therefore, the present study uses P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst, which has shown higher photocatalytic ability under simulated solar light and effective degradation of organic molecules from previous researches. Also, the stability and reusability of the P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 was enhanced by modifying the photocatalyst with polyethylene glycol (PEG), a binder and dispersant. On pretreatment of *Chlorella* using PEG modified P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst, the concentration of macromolecules like carbohydrate, proteins, and lipids increased significantly in 24hr indicating efficient cell wall disruption. Also, the fermentation experiments using the photocatalytic pretreated algae showed a higher methane production as compared to the untreated algae. Furthermore, the lipid released can be converted to bio-diesel as a value-added product. The high stability and reusability of the photocatalyst using solar light as energy source makes it a cost-effective pretreatment method for bioenergy generation from microalgal biomass.

Enhanced biogas production from *Chlorella vulgaris* using photocatalytic pretreatment

○Aditya Sharma, Mishma Silvia Stanislaus, Qi Zhu, Chenyu Zhao, Nan Zhang, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words biogas, *Chlorella vulgaris*, photocatalytic pretreatment, P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst

4P-I141 各種基質と海洋由来微生物源を使用した海水条件下での流加培養におけるメタン生産の改善と微生物の多様性

○三浦 豊和[1,3], 喜多 晃久[1,3], 岡村 好子[1,3], 秋 庸裕[1,3], 松村 幸彦[2,3], 田島 誉久[1,3], 加藤 純一[1], 中島田 豊[1,3]
（[1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工・エネ環, [3]JST・CREST）
nyutaka@hiroshima-u.ac.jp

【目的】 流加培養は嫌気消化によるメタン生産を活性化できるが，塩条件下での流加培養の効果はあまり知られていない．本研究では，糖，タンパク質，脂質の各種基質を使用して嫌気および塩条件下で海洋由来微生物源の流加培養を行い，流加培養によるメタン生産活性化が塩条件下で様々な基質に対して応用できるか調べると共に，微生物菌叢を調べた．
【方法】 基質として寒天，デンプン，牛血清アルブミン（BSA），トリオレイン酸グリセリルを，微生物源として海洋底泥を使用した．嫌気条件下で，37 °C，200 rpm で回転振とう培養し，累積メタン生成量からメタン生成速度を Gompertz の式により求めた．基質添加は 2 回行った．16S rRNA 遺伝子増幅産物をハイスループットシークエンシングすることにより菌叢を調べた．
【結果】 BSA を除く全ての基質から，理論収量に近い量のメタンが生産された．BSA からのメタン収量は，流加培養により理論収量に近づいた．いずれの基質の場合においても，メタン生成速度は流加培養により上昇した．培養液間の菌叢の多様性の比較により，基質由来，特に BSA 由来の培養液は，基質なしの培養液と異なっていることが分かった．基質に特徴的および基質間で共通の微生物が培養により増加した．基質に依存した多くの細菌は属レベルに分類されなかったが，多くの古細菌は既知の酢酸及び水素資化性メタン生成菌であった．

Improved methanization and microbial diversity during fed-batch cultivation using defined organic matter and marine sediment inoculum at seawater salinity

○Toyokazu Miura[1,3], Akihisa Kita[1,3], Yoshiko Okamura[1,3], Tsunehiro Aki[1,3], Yukihiko Matsumura[2,3], Takahisa Tajima[1,3], Junichi Kato[1], Yutaka Nakashimada[1,3]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Div. Ener. Environ., Inst. Eng., Hiroshima Univ., [3]CREST, JST)

Key words defined substrates, methane, seawater salinity, microbial community

4P-N142 Application of nano sparger for biological syngas methanation

○Ye Liu, Ying Wang, Xinlei Wen, Chenzhu Yin, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
liuye109929@163.com

The exhaust gas from steel mills containing CO, CO_2 and H_2 (i.e. syngas) can be reclaimed as potential renewable energy to mitigate its environmental pollution and health risk. Besides electricity generation, syngas can be utilized as the substrate for methanogens to produce biofuel like methane. Syngas fermentation is known to be typically limited by the gas-liquid mass transfer rate of insoluble gases like H_2 and CO. Compared with common bubbles, the micro-nano bubbles with much smaller size and higher specific surface area is prospected to improve gas-liquid mass transfer rate, and prolong gas retention time in the liquid. Thus methanogens can have more chance to contact with the gas, further promoting methane production. This study was conducted in two identical continuously stirred tank reactors (CSTRs) equipped with a nano sparger and a common sparger, respectively. Before incubation, the difference in gas-liquid mass transfer rate (kLa) of hydrogen was determined between nano sparger reactor (NSR) and common sparger reactor (CSR). Then the acclimated inoculums, being well adapted to H_2/CO_2 gas mixture (80/20, V/V) for 4 months' methane production were introduced. Results show that the mass transfer rate of hydrogen in NSR is higher than that in CSR with longer gas retention time achieved in the former. The increase in gas recirculation ratio can further increase dissolved hydrogen concentration, which will favor the improvement of methane production and substrate conversation.

Application of nano sparger for biological syngas methanation

○Ye Liu, Ying Wang, Xinlei Wen, Chenzhu Yin, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words syngas, methanation, nano bubbles, dissolved hydrogen concentration

4P-E143 大腸菌の代謝や細胞表層電子伝達系の改変が微生物燃料電池の性能に与える影響

○川口 太一[1], 福井 早紀[1], 駒 大輔[2], 大本 貴士[2], 尾島 由紘[1], 東 雅之[1]
([1]阪市大院・工, [2]阪技術研)
azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

バイオ燃料電池は，再生可能なクリーンエネルギーを生み出す技術の一つであり，廃液等からの発電が期待されている．しかしその出力はまだ低く，改善が求められている．我々は，バイオ燃料電池の触媒に大腸菌を用いて触媒能力の向上を目指し研究を進めてきた．解糖系や TCA サイクルによる糖代謝に対して，阻害的に働く遺伝子の欠損や代謝を促す遺伝子の高発現が出力に与える影響について 2016 年度本大会で報告した．本研究では，昨年度の結果を踏まえ，代謝および呼吸鎖関連遺伝子の染色体上でのさらなる改変を進め，さらに細胞表層での電子伝達に関わる異種タンパク質の発現が出力に与える影響を評価した．
出力は，各電極溶液量が 7.5 mL の 2 槽型セルを用い，18 時間電流と電圧を測定し評価した．また，負極槽のグルコース消費からクーロン効率を計算した．遺伝子改変は，染色体上での改変を行い，それらを組み合わせて大腸菌に機能を集約させた 1)．本研究では，NdhII 遺伝子をフマル酸還元酵素遺伝子上に，イソクエン酸脱水素酵素遺伝子を乳酸脱水素酵素遺伝子に導入した組換え株をベースとし，ここにさらなる改変を重ね合わせた．具体的には，ピルビン酸から TCA サイクルへの流入を強化する目的で，ピルビン酸デヒドロゲナーゼのリプレッサーである *pdhR* や，解糖系からエタノール発酵への分岐反応に関与する遺伝子 *adhE* の欠損，ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ及び *Rhizobium etli* 由来のピルビン酸カルボキシラーゼの発現を試みた．さらに，*Shewanella oneidensis* 由来の細胞表層電子伝達に関連するタンパク質の発現を試みており，これらの遺伝子改変の組み合わせが出力に与える影響について報告する．

Effect of modification of the metabolism and cell-sufece electron transport system on performance of microbial fuel cell using *Escherichia coli*

○Taichi Kawaguchi[1], Saki Fukui[1], Daisuke Koma[2], Takashi Ohmoto[2], Yoshihiro Ojima[1], Masayuki Azuma[1]
([1]Dept. Appl. Chem. & Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ, [2]Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology)

Key words *Escherichia coli*, microbial fuel cell, metabolism, *Shewanella oneidensis*

4P-I144 実はおもしろい化学合成菌のエネルギー代謝：『昇圧電子伝達経路』をめぐる葛藤！？

○庄野 暢晃, 中村 龍平
(理研CSRS)
nobuaki.shono@riken.jp

光合成と化学合成を行う独立栄養生物は有機物以外から，CO_2 を還元固定す NAD(P)H を得ることができる．こうして作られた有機物が地球上の全ての生命を支えているが，太陽光が届く範囲は地表付近に限られ，地中や深海など地球上の大半の生態系における一次生産は化学合成によって営まれている．
興味深いことに，化学合成のうち硫化水素，２価鉄などを電子源とするエネルギー代謝において，得られる電子のエネルギーは，光合成における光励起電子より小さく，NAD(P)H の生成には電位勾配に逆らった電子移動が必要となる．この一見物理法則に逆らった移動には膜を挟んだプロトン駆動力が利用されており，光のない膨大な生態系において極めて重要な機構である．しかし，光合成の電子伝達系に比べ，『昇圧電子伝達経路』に関する研究は進んでおらず，その進展は学術面だけでなく CO_2 固定プロセスへの応用に向けても大きな意義を持つ．
現在，筆者らは鉄酸化菌 Acidithiobacillus ferrooxidans の電気培養系を用いて，この経路の制御機構の解明に着手している．電気培養では電極から電子が直接菌に取り込まれ，酸素を還元してプロトン駆動力を獲得する経路かプロトン駆動力を消費して電子を昇圧し NAD(P)H を生成する経路に振り分けられる．NAD(P)H による CO_2 固定は増殖に必要であるが，プロトン駆動力はあらゆる生命活動に必要な ATP 生産に必要であり，鉄酸化菌は究極の選択を強いられていることになる．筆者らは電極電位などの培養条件が異なるときに，昇圧経路への電子の流入率が異なることと，昇圧経路に関わる遺伝子の発現が変化することを突き止めており，実際に菌が『増殖か生存か』という重大な戦略を臨機応変に変えていることがわかる．本発表では，この興味深い制御をもたらす機構を解明するための構想について議論するとともに現在の進捗状況について報告する．

Interesting Story about Energy metabolism of Chemotrophic Bacteria: Difficult Decision about “Voltage-multiplying Electron Transfer Pathway”

○Nobuaki Shono, Ryuuhei Nakamura
(RIKEN CSRS)

Key words energy metabolism, electrochemical cultivation, electron transfer pathway, CO_2 fixation

4P-I145 バイオ電池構築のためのバイオデバイスを目指したカーボンナノチューブ結合ペプチドによる酵素の配向固定化

○殿岡 愛菜[1], 坂元 博昭[2,5], 里村 武範[1,5], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,5]
([1]福井大院・工, [2]福井大テニュアトラック事業本部, [3]香川大・農, [4]大阪工大, [5]福井大学ライフイノベセ)
suyeb10@u-fukui.ac.jp

［目的］これまでにバイオ電池用電極の出力を向上させるため，2 つの方法が検討されてきた．1 つ目は高い比表面積を有する材料を用いる方法である．比表面積が非常に大きいカーボンナノ材料は電極上の電気化学的に活性な酵素量を増加させるため，電流密度が増加する．2 つ目は電極上の酵素の配向を制御する方法である．酵素の酸化還元部位と電極表面の距離が短い場合，電子移動の高速化により電流密度が増加する．つまり，高出力な電極を得るためにはカーボンナノ材料上に酵素を配向固定化する必要があるが，酵素を電極に特異的に結合させるには複雑な修飾過程が必要であるのが課題である．そこで本研究ではカーボン材料に特異的に結合するカーボンナノチューブ結合ペプチド (CBP) に着目した．*Pyrobaculum aerophilum* 由来のマルチ銅オキシダーゼ (McoP) に CBP を融合させた McoP-CBP を用いて，CBP を介した簡便な操作でのカーボンナノ材料上への酵素の高配向固定化を検討した．
［方法］McoP-CBP 発現用ベクター pET11a-PAE1888-CBP を用いて大腸菌内でタンパク質発現および酵素精製を行った．また CBP を介して McoP-CBP を直接グラッシーカーボン (GC) 電極に固定化した電極と，非特異的に McoP を吸着させた GC 電極の電気化学的特性について比較を行った．
［結果と考察］McoP と McoP-CBP の比活性を比較したところ両者ともに 0.5 units/mg であり，CBP 結合による酵素活性の低下は見られなかった．また電気化学的な評価を行ったところ，McoP および McoP-CBP 修飾電極の酸素の還元開始電位はそれぞれ 0.25V と 0.35 V (vs. Ag/AgCl)であった．McoP-CBP 固定化電極において酸素の還元開始電位が上昇したのは，CBP を介する特異的な結合により，酸化還元部位が電極近くに位置するよう McoP が配向固定化され酵素と電極間の電子移動が容易になったためだと考えられる．

Application of carbon nanotube binding peptide for immobilization of enzyme on the device

○Aina Tonooka[1], Hiroaki Sakamoto[2,5], Takenori Satomura[1,5], Haruhiko Sakuraba[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichro Suye[1,5]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Tenure-truck, Univ. Fukui, [3]Fac. Agric., Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Technol., [5]Life Sci. Innov. Center, Univ. Fukui)

Key words carbon binding peptide, multicopperoxidase, cathode, *pyrobaculum aerophilum*

4P-I146 好熱菌由来酸化還元酵素を用いたアミノ酸を燃料とするバイオ電池用アノードの構築

○田中 志乃[1], 里村 武範[1,2], 坂元 博昭[1], 櫻庭 春彦[3], 大島 敏久[4], 末 信一朗[1,2]
([1]福井大院・工, [2]福井大・ライフ, [3]香川大・農, [4]大阪工大・工)
satomura@u-fukui.ac.jp

[目的]
バイオ電池は，酸化還元酵素を用いて基質である糖やアルコールなどが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである．バイオ電池は安全であり小型化，軽量化が可能といったメリットがある．しかしながら酵素の安定性の低さに起因する電池の低耐久性や酵素-電極間の電子伝達効率の低さに起因する低電池出力がデメリットになっている．そこで本研究では，高い安定性を有する複数の好熱菌由来アミノ酸酸化還元酵素を組み合わせて多段階酸化反応を行うことで高い耐久性と高出力なアミノ酸を燃料とするバイオ電池用アノードの構築を目的とした．
[実験・結果]
アミノ酸の L-プロリンを燃料とするバイオ電池用アノードを構築するために，色素依存性 L-プロリン脱水素酵素，NAD^+依存性ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素，NAD^+依存性グルタミン酸脱水素酵素，ジアホラーゼの 4 種類の好熱菌由来酸化還元酵素をナフィオン溶液に混合し，グラッシーカーボン電極に固定化した．フェロセンカルボン酸を酵素-電極間のメディーエータとして用いてサイクリックボルタンメトリー測定を行い，4 酵素における多段階酸化反応の電気化学的評価を行った．その結果，各段階における酸化反応が進むにつれて酸化ピークの電流の増大が確認された．これらの結果より，複数の酵素を固定化した電極上で各酵素の多段階酸化反応が起っていることが確認できた．現在，本修飾電極を用いた電池の評価を進めている．

Construction of an anode using themophilic oxidoreductase for biofuel cell

○Shino Tanaka[1], Takenori Satomura[1,2], Hiroaki Sakamoto[1], Haruhiko Sakuraba[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichiro Suye[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., [2]Life Sci., Fukui Univ., [3]Fac. Agric., Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech.)

Key words Biofuel cell, oxidoreductase, amino acid, thermophile

4P-I147 微生物燃料電池を用いて余剰汚泥の分解して直接電力変換する

○高垣 俊宏, 柿薗 俊英
（広島大院・先端物質）
tkakizo@hiroshima-u.ac.jp

【目的】
現在，家庭や工場から出る一般排水の浄化には主に活性汚泥法が取られている．活性汚泥法では好気的な細菌の分解代謝を活用するため酸素通気が必須であり，国内総消費電力の 1%に近い膨大な電力が曝気に使われるとされる．
同時に，細菌が有機物を代謝して増殖する結果，余剰に発生する汚泥は国内産業廃棄物 5-6 割に相当する．それ故，下水処理によって河川汚濁問題は解消されてきたが，曝気電力と余剰汚泥処理は現状の深刻な課題である．
下水処理場で発生する余剰汚泥はおよそ 6 割が高温炉で焼却され，建築材等にリサイクルされるが，焼却処分する際に発生する亜酸化窒素が CO_2 の約 310 倍の地球温暖化係数をもつこと，および焼却の助燃剤費が問題である．また近年余剰汚泥を脱水後に炭化して炭化汚泥を燃料として活用する技術が国内各地で実用化されたが，水分含量の高い汚泥の炭化には大容量の熱エネルギーが必要となる為エネルギー収支の観点から炭化汚泥の有効性は疑問である．
そこで本研究では，より有効な余剰汚泥の処理に向けて，追加的エネルギーが不要な微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells, MFC)を用いて，余剰汚泥の高速分解処理，およびその電力変換の可能性の検証を試みた．

【方法及び結果】
本実験では，MFC の燃料は余剰汚泥であり，分解触媒は汚泥中の細菌である．本実験で使用した MFC では，前述のように正極の酸素還元反応において，水素燃料電池に用いられる高価な白金触媒ではなく，鉄イオンからなる安価な化学触媒を用いることが
特徴的である．
余剰汚泥の分解に関しては約 70%（約 30 日間）を記録し，従来のメタン発酵による分解（30 日間で約 50%）よりも良い結果となった．発生電流は初期汚泥濃度が高いほど大きくなった．また，発電収率は 34.2%を記録した．

Degradation of excess sludge and its power conversion by microbial fuel cells

○Toshihiro Takagaki, Toshihide Kakizono
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words excess sludge, microbial fuel cells, power conversion

4P-N148 Operation of plant based microbial fuel cells using electrochemical mediators

○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Minju Chang[1], Sok-young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Chang Joong Kim[1], Yung-Hun Yang[1], Sang Hyun Lee[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)
hyungkim@konkuk.ac.kr

In this study, a plant based microbial fuel cell (PMFC) using electrochemical mediator was investigated. A plant pot type microbial fuel cell system (250×150×80 mm) was constructed using *Ardisia pusilla*, humus, and electrodes. Both anode and cathode were made of graphite felt plates (15×15×2 mm) and placed in the rhizosphere of the plant and surface soil of the pot, respectively. Electrical potential between the two electrodes was measured using a computer controlled voltmeter. Various electrochemical mediators were tested their toxicity against the plant based on the measurement of the germination rate and the growth rate of plants. HNQ (2-Hydroxy-1,4-naphtoquinone) was selected as a most appropriated electrochemical mediator, and the selected mediator showed no serious toxicity against the plant germination and growth. When HNQ was added to PMFC for the operation, about 20% increase in potential development was observed (max. ca. 0.42 V per PMFC). These results suggested that the use of electrochemical mediators induced the increase in potential development from the PMFC. Subsequent current production using the mediator was also successful in the PMFC system and improving the performance of electrical power generation with plants and rhizobacteria in the system.

Operation of plant based microbial fuel cells using electrochemical mediators

○Tae Hang Yoon[1], Hak Jin Song[1], Kwang Jin Kim[2], Yong-Keun Choi[1], Minju Chang[1], Sok-young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Chang Joong Kim[1], Yung-Hun Yang[1], Sang Hyun Lee[1], Hyung Joo Kim[1]
([1]Dept. Biological eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

Key words Plant microbial fuel cell, Electrochemical mediator, Electrical potential, *Ardisia pusilla*

4P-I149 Identify of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production with optimal bedding material and initial substrate concentration

○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
yo.innan.fu@u.tsukuba.ac.jp

Hydrogen has drawn worldwide attention as it is a clean energy and generates water vapor as the only by-product on combustion. Biological hydrogen production through anaerobic digestion is an attractive process because of its environmental-friendly. Nevertheless, it still has limitations like low hydrogen production, bioreactor upset, etc. On the other hand, conventional fixed-bed was used in methane fermentation, which improved the efficiency of methane production effectively. However, the research about the usage of fixed-bed in the hydrogen fermentation is limited. Therefore, in this study, a series of experiment with three different bedding materials including loofah sponge (LS), chlorinated polyethylene (CPE) and porous nylon (PN) and without bedding materials as the control was carried out. As a result, CPE bioreactor showed the best performance compared to PN, LS and control reactor. Consecutively, the optimal initial substrate concentration of glucose was determined in the CPE fixed-bed bioreactor, and 20g/L showed highest hydrogen production as compared to other concentrations. The fixed-bed reactor showed efficient immobilization of microorganisms which enhanced the hydrogen production. Conclusively, the CPE fixed-bed bioreactor has the capacity to show better performance compared to reactor without fixed-bed and it could be a promising system for higher bio-hydrogen production.

Identify of fixed-bed bioreactor on higher bio-hydrogen production with optimal bedding material and initial substrate concentration

○Chenyu Zhao, Nan Zhang, Mishma Silvia Stanislaus, Yingnan Yang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words fixed-bed bioreactor, bio-hydrogen production, anaerobic digestion

4P-I150 マリンビブリオを生物触媒とした連続的水素生産システムの開発

○宮坂 信城, 美野 さやか, 澤辺 智雄
（北大院・水産）
sawabe@fish.hokudai.ac.jp

【背景と目的】 水素は二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーであり，食料との競合を引き起こしにくい海藻等の海洋バイオマスからもバイオ水素は産生できる．当研究室で分離された海洋性細菌 *Vibrio tritonius* AM2^T は高い水素生産能を有し，マンニトールを基質とした 5 L 規模のフェドバッチ培養にも成功している．しかし，この培養系では系内の基質量の減少及び代謝産物の蓄積による増殖の抑制により，水素生産量の向上が見込めない．そこで本研究では，これらを解決する連続培養系の構築を目的とした．
【方法】 *V. tritonius* AM2^T をマリンブロス(MB)で前培養後，200 mL の 3%マンニトールを添加した MB を加えた連続培養リアクターに接種し，24 時間のバッチ培養（pH 6.0, 37℃）に続き，連続培養（pH 6.0, 37℃）を行った．バイオガスはアルミニウムバックで回収した．連続培養の希釈率を 0.03～0.06 h^{-1} に変化させ，水素生産量，収率などに与える影響を調べた．経日的に培養液とバイオガスを採取し，培養液中のマンニトール濃度は LC によって，バイオガスの組成は GC によって分析した．
【結果】 この連続培養系は 22 日間以上の運転が可能であった．連続培養開始後 7 日目までは濁度と水素生産量が低下したが，その後は回復した．濁度変化が安定した 8 日目以降から 15 日間サンプルを採取し，各希釈率の濁度やマンニトール消費速度，マンニトール消費率，水素生産量，水素生産速度，水素収率といった水素生産に関連する指標を比較した結果，希釈率が高いほどマンニトール消費率は低下するが，マンニトール消費速度と水素生産量，水素生産速度は上昇する傾向にあった．一方，濁度と水素収率にはほとんど差がなかった．

Development of continuous hydrogen production system by marine *vibrio* as a biocatalyst

○Nobushiro Miyasaka, Sayaka Mino, Tomoo Sawabe
(Grad. Sch. Fish. Sci., Hokkaido Univ.)

Key words continuous culture, hydrogen, *Vibrio*, marine biomass

4P-I151 白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株による水素産生能向上に関する研究

○曽我 亜由美[1], 髙橋 沙綾[1], 森 智夫[1], 河岸 洋和[1,2,3], 平井 浩文[1,2]
([1]静大・農, [2]静大・グリーン研, [3]静大・創科技院)
hirai.hirofumi@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】
近年，地球温暖化や化石資源の枯渇問題から，利用段階で二酸化炭素を排出しないクリーンエネルギーである水素が注目されている．現在のところ，水素は一般的に水の電気分解や化石燃料を原料とした水蒸気改質などにより製造されているが，製造過程で二酸化炭素が排出されるなど，環境負荷が問題となっている．そこで，低炭素循環型社会の実現のため，カーボンニュートラルなバイオマスからの水素産生に関する研究が展開されている．本研究室ではこれまでに，木質バイオマスから水素産生可能な白色腐朽菌 *Trametes versicolor* K-41 株を自然界より分離しており，水素産生時にヒドロゲナーゼ遺伝子（*Tvhyd*）が発現することを確認している．そこで本研究では，*Tvhyd* 高発現株を作出することで，*T. versicolor* K-41 株の水素産生量を向上させることを目的とした．
【方法と結果】
各種 PCR により，*Tvhyd* 配列およびグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*Tvgpd*）のプロモーター，ターミネーター配列を取得した．*Tvgpd* プロモーター制御下で *Tvhyd* を高発現させる発現カセット，及びハイグロマイシン耐性遺伝子発現カセットを持つプラスミドをそれぞれ構築した．*T. versicolor* K-41 株のプロトプラストを調製し，PEG 法を用いて上記のプラスミドを共形質転換した．得られた *Tvhyd* 導入株を発酵液体培地に接種し，30℃で 5 日間好気培養後，密栓して 9 日間酸素供給制限下で培養を行った．GC-TCD 分析により各株の水素産生量を測定したところ，野生株と比較して有意に水素産生量が向上した *Tvhyd* 高発現株が得られた．

Improvement of hydrogen production by high expression of hydrogenase gene in white-rot fungus *Trametes versicolor* K-41

○Ayumi Soga[1], Saaya Takahashi[1], Mori Toshio[1], Kawagishi Hirokazu[1,2,3], Hirai Hirofumi[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words white-rotting fungi, hydrogen production, hydrogenase gene expression

4P-I152 燻炭が *Bacillus* 属細菌 IA 株の生育を促進するメカニズムの解明 2

○江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工）
tano@waka.kindai.ac.jp

イネの籾殻を焼成して得られる燻炭は，土壌へ施肥することで作物の収量増加をもたらすことが知られている．その理由として土壌の通気性や保水性といった物理性の改善や，土壌微生物の増殖を促進することで植物生長に寄与することが報告されている．我々はこれまでに燻炭と微生物の関係に着目し，燻炭の存在下で増殖が促進される微生物の探索を行った．結果，燻炭を添加した寒天培地上で増殖が促進される微生物 *Bacillus* 属細菌 IA 株を単離した．さらに IA 株の液体培養において燻炭を添加することが増殖・胞子化・抗生物質生産を促進することを見出した．本研究では燻炭が微生物の活性を促進するメカニズムの解明を目的とした．
イネはケイ酸を取り込み植物体内で二酸化ケイ素として蓄積することが知られている．そこで籾殻焼成後の燻炭にも残存する成分の一つである二酸化ケイ素に着目した．昨年の大会では二酸化ケイ素を主成分とするケイ酸塩鉱物用いて IA 株の培養を行い，燻炭と同様に増殖と抗生物質生産が促進されることを報告した．この結果から IA 株の増殖促進に二酸化ケイ素が関係していることが示唆された．そこで燻炭による微生物の代謝促進における二酸化ケイ素の役割を明らかにするため，（株）バイオシリカ研究所から提供を受けた籾殻を完全に燃焼させ作製したイネ籾殻由来アモルファスシリカ（以下バイオシリカとする）を実験に使用した．バイオシリカは籾殻の燃焼により炭素成分は残っておらず，構成成分の 98%以上を二酸化ケイ素が占める．このバイオシリカ 5 g/L を液体培地に添加し IA 株の培養を行ったところ，燻炭を 5 g/L 添加して培養を行った際と同様に増殖と胞子化，抗生物質生産の促進が認められた．
以上の結果から燻炭における微生物の活性促進には燻炭中に含まれる二酸化ケイ素が関係することを明らかにした．

Mechanisms of growth enhancement of *Bacillus* sp. IA in the presence of rice husk biochar 2

○Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words rice husk biochar, silicon dioxide, bacterial growth enhancement

4P-I153 燻炭抽出液による *Bacillus amyloliquefaciens* IA 株の iturinA 生産促進

○久野 龍之介, 江邉 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工）
tano@waka.kindai.ac.jp

稲作は世界の主要な穀物生産の一つである．イネから米にするまでの過程で多量の籾殻が排出される．日本では古くから籾殻を比較的低温，低酸素条件下で炭化させた燻炭を土壌改良剤として土壌へ施用してきた．土壌に燻炭を加えることで，土壌の物理性の改善や広い表面積と多孔質構造を持つことから土壌微生物の住処になり，農作物の収量が増加するという報告がある．しかしながら，その一方で収量が増加する機構の詳細についてはいまだ不明である．我々は燻炭を土壌に与えることで土壌微生物が活性化し，農作物の収量増加へつながると考えた．これまでの研究で，活性炭により寒天培地上で増殖が促進される微生物 *Bacillus amyloliquefaciens* IA 株を単離した．また，液体培地への燻炭添加により IA 株の増殖や胞子化が向上することを明らかにし，抗真菌活性物質 iturin A 生産量も向上することを見出した．iturin A は環状リポペプチドの強力な抗菌活性物質であり，幅広い抗菌活性スペクトルを持つ有用物質であるため，本研究では燻炭を用いた IA 株における iturin A の生産性向上を目的とした．
iturin A 生産の向上を図るため，iturin A 生産に適した培地である no.3S 培地に燻炭を添加し，IA 株の培養を行ったところ，燻炭を加えなかった培地よりも高い iturin A 生産を示した．次に，燻炭を蒸留水と混合し，高圧蒸気滅菌を行うことで水層に色がつくことに着目し，この水層を濾過滅菌した燻炭抽出液で no. 3S 培地を作製し，IA 株の培養を行った．その結果，燻炭抽出液で作製した no. 3S 培地においても iturin A 生産が促進されることが明らかとなった．しかし，その効果は直接燻炭を添加した培地における生産量よりも少ないものであった．以上の結果から，燻炭抽出液においても IA 株の iturin A 生産を促進することが認められた．

Effect of aqueous rice-husk-biochar extract on the production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* IA

○Ryunosuke Kuno, Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words rice husk biochar, iturin A, *Bacillus*

4P-I154 Astaxanthin production using alginate-derived from brown algae by *Aurantiochyrium* sp.

○Kim Hazel V Arafiles[1,4], Kenshi Watanabe[1,4], Akihisa Kita[1,4], Yoshiko Okamura[1,4], Takahisa Tajima[1,4], Yukihiko Matsumura[2,4], Yutaka Nakashimada[1,4], Keisuke Matsuyama[3], Tsunehiro Aki[1,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]NAGASE & CO., LTD., [4]CREST, JST)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【Introduction】 Since macroalgae are abundant in the ocean, grow rapidly, and have limited demands as food, they are a biomass resource suitable for production of bioenergy and valuable substances. However, their carbohydrate composition is largely different from that of terrestrial biomass, which emphasizes the need to develop new ways of pre-treating them for feeding to productive strains. We aimed to produce high value-added lipids from brown algae, which is the most abundant among macroalgae, using the marine oleaginous microorganism, *Aurantiochytrium*. In this study, a combination of alginate-assimilating microorganism and *Aurantiochytrium* sp. was evaluated, in order to construct a two-step fermentation system which can utilize alginate, a major saccharide of brown algae, to produce astaxanthin.
【Methods and Results】 Culture supernatant of anaerobic bacterium, *Dysgonomonas alginatilytica*, grown in medium containing alginate as carbon source was found to support the growth of *Aurantiochytrium* sp. The analysis of culture supernatant of *D. alginatilytica* by GC-MS revealed the formation of organic acids such as succinic acid and lactic acid. Culture test of *Aurantiochytrium* sp. RH-7A-7, a high-producer of carotenoid, using medium containing these organic acids as a sole carbon source showed that succinic acid among others enabled the cell to grow and produce astaxanthin. We are currently examining suitable culture conditions to maximize cell growth and astaxanthin productivity.

Astaxanthin production using alginate-derived from brown algae by *Aurantiochyrium* sp.

○Kim Hazel V Arafiles[1,4], Kenshi Watanabe[1,4], Akihisa Kita[1,4], Yoshiko Okamura[1,4], Takahisa Tajima[1,4], Yukihiko Matsumura[2,4], Yutaka Nakashimada[1,4], Keisuke Matsuyama[3], Tsunehiro Aki[1,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]NAGASE & CO., LTD., [4]CREST, JST)

Key words macroalga, biomass conversion, biocatalysis, *Aurantiochytrium* sp.

4P-N155 渦鞭毛藻類 Karenia mikimotoi が有する毒性因子の多彩な生物活性に関する研究

Kim Daekyung[1], 竹下 哲史[2], 山崎 康裕[3], 山口 健一[4], ○小田 達也[4]
（[1]Jeju Center, KBSI, Korea, [2]長崎大 産連戦略本部, [3]水大校, [4]長大水）
t-oda@nagasaki-u.ac.jp

[背景と目的] 赤潮原因プランクトンの毒性機構の詳細は多くの点が不明である．魚類に強い毒性を発現する事が知られているラフィド藻類である *Chattonella marina* 研究に取り組み，本種が高濃度の活性酸素を産生放出している事を見出している．一方，渦鞭毛藻類に属する *Heterocapsa circularisquama* は魚類に対しては無毒であるが，貝類に対して強い致死作用を示し，これまでの研究で溶血毒素の存在を見出している．一方，渦鞭毛藻類 *Karenia mikimotoi* は魚類及び貝類両方に対して強い毒性を示す事が知られている．本研究では *K. mikimotoi* の毒性機構解明を目的とした．
[方法] *K. mikimotoi* 及びその他のプランクトン株は常法に従い SWM-3 培地にて培養維持した．溶血活性はウサギ赤血球を用いて測定した．生物毒性測定として細菌(*Escherichia coli* 及び *Staphylococcus aureus* 等)及び動物プランクトンワムシ(*Brachionus plicatilis*)に対する暴露実験により調べた．
[結果及び考察] *K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* 細胞浮遊液は強い溶血活性を示したが，無細胞培養上清においては *H. circularisquama* のみに活性が検出された．*Chattonella* 種では溶血活性は検出されなかった．*K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* 細胞浮遊液はワムシに対して致死作用を発現したが，*Chattonella* 種は無毒であった．さらに，*K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* 細胞浮遊液は細菌に対しても毒性を示す傾向が観察された．なお，*Chattonella* 種の活性酸素産生は確認されたが，*K. mikimotoi* 及び *H. circularisquama* 細胞浮遊液では著しく低レベルであった．以上の結果から，*K. mikimotoi* は細胞表層に本来は動物プランクトン（捕食者）や感染症原因生物（細菌）に対する防御システムとして溶血性毒素を有していると推定された．

Biochemical characterization of the toxic factors of red tide phytoplankton Karenia mikimotoi

Daekyung Kim[1], Satoshi Takeshita[2], Yasuhiro Yamasaki[3], Kenichi Yamaguchi[4], ○Tatstuya Oda[4]
([1]Jeju Center, KBSI, Korea, [2]J. Res. Ce., Nagasaki Univ., [3]Dept. App.Aqua., Nat. Fish. Univ., [4]Div. Biochem. Fac. Fish., Nagasaki Univ.)

Key words red tide, plankton, toxin, toxicity

4P-I156 代謝工学による黄色天然色素ルテイン高蓄積クラミドモナス株の創出

○阪口 健太, 加藤 悠一, 蓮沼 誠久, 近藤 昭彦
（神戸大院・科学技術イノベーション）
hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 食品加工市場の拡大と消費者の安全・安心への関心の高まりから，天然着色料の市場は年々拡大している．その多くが植物を原料としているが，一方で需要の増大に伴う原料価格の高騰と豊不作による価格変動が問題となっている．急速な市場拡大に備え，安価な天然着色料の安定供給が重要である．カロテノイドの一種であり，マリーゴールド花弁から採取される黄色天然色素ルテインは，過度の光から目を守る効果を持つため，食用色素としてだけではなく健康補助食品としても注目されている．我々は，高いレベルでの安全・安価・安定なルテイン供給を実現するため，新たなルテインの生産者として微細藻類に着目した．微細藻類は，陸上植物と比較して増殖が早く，通年の安定的な収穫が望める．本研究では，ルテインを多く蓄積することが知られている緑藻 *Chlamydomonas reinhardti* 137c を親株として，ルテイン高蓄積株の変異育種に取り組んだ．
【方法】 常温常圧下でのプラズマ照射により細胞集団にランダムな突然変異を導入した．その後，超高速液体クロマトグラフィーによるルテイン量測定で，ルテイン高蓄積株の選別を行った．ルテイン蓄積メカニズムの解明を目的として，キャピラリー電気泳動質量分析により細胞内代謝物量を網羅的に解析した．
【結果と考察】 変異育種により，ルテイン含有率が親株の 1.5 倍以上に向上したルテイン高蓄積株の創出に成功した．現在もスクリーニングを継続し，ルテイン含有率のさらなる向上を目指している．メタボローム解析により，ルテイン生合成経路上流の代謝物であるピルビン酸と 1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸(DXP)の存在量に大きな差があることを明らかにした．ピルビン酸から DXP への変換がルテイン生合成のボトルネックである可能性があり，その強化がルテイン蓄積量のさらなる向上の鍵となりうる．

A metabolic engineering for the development of lutein-rich *Chlamydomonas* strains

○Kenta Sakaguchi, Yuichi Kato, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo
(Grad. Sch. Sci. Technol. Innov., Kobe Univ.)

Key words microalgae, metabolic engineering, metabolic analysis, pigment

4P-I157 糖誘導性プロモーターを用いた GUS 遺伝子高発現サツマイモの開発

小高 章宏, ○本間 洋平, 山川 隆
（東大院・農生科）
ayama@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

[背景と目的]我々はサツマイモの塊根の貯蔵タンパク質遺伝子のプロモーター Spo^{min} と GUS の cDNA を結合した融合配列を導入したサツマイモの塊根において，GUS の蓄積量が最大で約 0.22 mg/g 生重量，まで達したと発表した．そこで本研究では，GUS の蓄積量を 1 mg/g 生重量まで引き上げることを目的とした．さらに，サツマイモ組換え体作成の効率化を検討した．
[方法]Spo^{min}-GUS に色素体輸送配列を結合した融合配列をサツマイモに導入し，GUS の活性を測定した．加えて，組換え体作成に用いる胚性カルスを増殖するため，液体培地で振盪培養した．4 週間毎に再分化率を観察した．最後に半年以上かかる組換え体作成期間を短縮するため，再分化を経ずに形質転換体を作成することを試みた．
[結果と考察]組換えカルスにおける GUS の蓄積量は，Eudes らのシロイヌナズナから抽出した GUS 活性とタンパク質量の換算式を用いると，最大で約 1.94mg/g 生重量に達した．同等の蓄積量をもつ組換え塊根を作成するためには，より多くの胚性カルスが必要である．1 つの胚性カルスから増殖したカルスの再分化率は，培養開始後 12 週間目まで約 80%だった． 再分化を経ずに組換え体を作成する処理を施したところ，一部の組織のみに遺伝子が導入されたキメラ体が 3 週間で得られた．キメラ体の組換え組織から植物体を再生させることにより，完全な組換え体が得られると考えられる．
Spo^{min}-GUS に色素体輸送配列を結合したコンストラクト，液体培養による胚性カルスの増殖，再分化を経ない組換え体作成法を併用することで，導入タンパク質を 1 mg/g 生重量以上発現するサツマイモを短期間で開発することが可能だと考えられる．

High expression of GUS activities in sweet potato by sucrose inducible promoter

Akihiro Kodaka, ○Youhei hONMA, Takashi Yamakawa
(Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words sweet potato, embryogenic callus, GUS, sporamin promoter

4P-N158 Effect of electrical ground connection for plant growth

○Hyung Joo Kim[1], Chang Joong Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Min ju Chang[1], Hak Jin Song[1], Sok-Young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Yong-Keun Choi[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)
hyungkim@konkuk.ac.kr

In this work, the effect of electrical ground on plant growth was investigated. Electrically isolated plant pots (Vol: 300 ml) consisted with humus and graphite felt plate were made. Using a copper wire (13 AWG), electrical connection from the felt plate near the rhizosphere of the plant to the electrical ground point was made. As a control experiment, the plant pot without electrical connection between the felt plate and ground point was used. The germination and growth rates of plants (*Hordeum vulgare* and *Raphanus sativus*) in the pots were measured during 15 days. After the cultivation of the plants, a plant growth hormone (IAA, indole-3-acetic acid) in the plant trunk and leaf was analyzed using HPLC. To evaluate the rhizobacterial variation in the presence of the electrical ground, soil sample collected from the rhizosphere of the pot was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In the presence of electrical ground, both germination and growth rates in the plants species showed higher rates compare to the control groups. The plant hormone analysis also showed that the electrically grounded plant has higher IAA concentrations in their caulis and frond. The DGGE analysis showed that the electrical ground connection provided different bacterial flora in the rhizosphere than that of the control group.

Effect of electrical ground connection for plant growth

○Hyung Joo Kim[1], Chang Joong Kim[1], Kwang Jin Kim[2], Min ju Chang[1], Hak Jin Song[1], Sok-Young Shim[1], Wu-Young Jeong[1], Tae Hang Yoon[1], Yong-Keun Choi[1]
([1]Dept. Biological Eng., Konkuk Univ., [2]Natl. Horticultural Res. Inst., Rural Development Administration)

Key words Electrical ground, Plant growth, IAA, Rhizobacteria

4P-I159 根寄生雑草防除のための貯蔵糖プランテオース代謝に関わる酵素の探索

馬場 敦也[1], 徳永 智哉[1], 木場 康介[1], 小川 拓水[1], 杉本 幸裕[2,3], 太田 大策[1], ○岡澤 敦司[1,3]
（[1]阪府大院・生環科, [2]神戸大院・農, [3]JST/JICA・SATREPS）
okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】 ハマウツボ科の根寄生雑草は，アフリカを中心に世界の乾燥地農業に甚大な被害をもたらしており，世界の食料安全保障の脅威となっている．この問題の克服のために国内外で多くの研究が行われているが，未だ根本的な解決法の確立にはいたっていない．我々は，これら根寄生雑草の宿主の根から放出される発芽刺激物質を感知することによってのみ発芽するという特徴に着目し，メタボローム解析によって，プランテオースという三糖が発芽に重要な貯蔵糖であることを明らかにした．プランテオースの代謝について，これまでいかなる生物種においても明らかではないが，これに関わる酵素は根寄生雑草防除のための分子標的となると考えられた．そこで，本研究ではプランテオースの代謝に関わる酵素の探索を行った．
【方法と結果】 プランテオース代謝はガラクトース部位の加水分解から始まることが明らかになっていたため，これまでに取得していたヤセウツボ（*Orobanche minor*）のトランスクリプトームデータより，α-ガラクトシダーゼと推定されるcDNA 配列 *OmAGAL* を得た．この配列から移行シグナルペプチドと推定される配列を除き，N 末端側で GST と融合させた GST-ΔTP-OmGAL を大腸菌で発現させたところ，酸性条件下で顕著な α-ガラクトシダーゼ活性が確認された．さらに，ヤセウツボより単離精製したプランテオースを基質とした場合においても，やはり酸性条件下でその加水分解が確認できた．
【考察】 OmAGAL が移行シグナルペプチドと推定される配列をもつことと，酸性条件下で活性を示すことから，この酵素は液胞や細胞壁などのアポプラストで機能していると推定された．今後，本酵素の阻害剤をスクリーニングすることで，ヤセウツボ発芽種子中での OmAGAL の機能を解明するとともに，その阻害剤が発芽に与える影響を評価する．

Investigation of enzymes involved in metabolism of a storage carbohydrate planteose for control of root parasitic weeds

Atsuya Baba[1], Tomoya Tokunaga[1], Kosuke Koba[1], Takumi Ogawa[1], Yukihiro Sugimoto[2,3], Daisaku Ohta[1], ○Atsushi Okazawa[1,3]
([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [3]JST/JICA, SATREPS)

Key words parasitic plant, *Orobanche minor*, planteose, inhibitor

4P-E161 シロイヌナズナの Non photochemical quenching に関与する K+/H+ アンチポーター の輸送活性の評価

○辻井 雅[1], 解良 康太[1], 濱本 晋[1], 黒森 崇[2], 鹿内 利治[3], 魚住 信之[1]
（[1]東北大院・工, [2]理研・植物科学研究セ, [3]京大院・理）
uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp

シロイヌナズナでは，強光下で光合成明反応によりチラコイド膜のルーメン側に過剰に H+ が蓄積し，それに応答して光エネルギーを熱として安全に散逸する機構 (NPQ: Non photochemical quenching) が働く．一方で，弱光下では光エネルギーを効率的に利用するために，NPQ を抑制する機構が必要である．シロイヌナズナには，6 つの K+/H+アンチポーターホモログ遺伝子（KEA1-KEA6）が存在しており，KEA3 はチラコイド膜に局在し，弱光下で NPQ を抑制することが報告されている(Armbruster et al., 2014)．しかし，これまで各 KEA1-KEA6 の輸送活性が単独で実測されたことはなく，K+/H+アンチポーターという証明はない．本研究では，KEA1-KEA6 を大腸菌で発現させ，その輸送活性を評価した．大腸菌内在性の K+ 透過性トランスポーター欠損株を宿主細胞として，K+ と Na+ の取り込みを測定したところ，全ての KEA で K+ の輸送活性が見られたが，Na+ の輸送活性は見られなかった． また，Na+(K+)/H+ アンチポーター欠損株を用いて K+ の排出を測定したところ，KEA1-KEA3 と KEA5 で K+ の輸送活性が検出された．しかし，大腸菌の反転膜を用いてアンチポーター活性を測定したところ，KEA1-KEA5 の活性は見られなかった．さらに，KEA3 のスプライシングバリアントがコードするタンパク質， Na+/K+ 選択性に関与する可能性のあるアミノ酸を置換した KEA3-Q273D 置換体，K+/H+ 輸送活性を強めると推測される KEA3-G422R 置換体(Wang et al., 2016)を作製して，K+ 排出活性を計測したが，野生型と比べて輸送活性に変化は見られなかった．

Funcional identification of K+/H+ antiporter involved in Non photochemical quenching in Arabidopsis thaliana.

○Masaru Tsujii[1], Kota Kera[1], Shin Hamamoto[1], Takashi Kuromori[2], Toshiharu Shikanai[3], Nobuyuki Uozumi[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]PSC, RIKEN, [3]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

Key words *Arabidopsis thaliana*, transporter

4P-N160 *In vitro* regeneration of *Helicteres angustifolia* L. for production of bioactive secondary metabolites

○Siyu Sun, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Helicteres angustifolia L. (*H. angustifolia*) is a very famous traditional herb in China and Laos. Many reports demonstrate that *H. angustifolia* could produce a wide variety of secondary metabolites which contribute to its multiple pharmaceutical functions. However, the traditional collection way of herb is easy to cause excessive excavation, leading to resources stress and even species endangering. Moreover, weather and seasonal changes will bring about the instability of wild plant yield. In vitro regeneration method is an efficient method to solve above-mentioned problems. This study aims to establish an effective in vitro regeneration system for production of bioactive compounds from *H. angustifolia.* Meanwhile, the effects of plant growth regulators on biomass accumulation of adventitious shoots, active compounds accumulation and bioactive abilities are investigated. Results show that *in vitro* plantlets of *H. angustifolia* are a promising alternative for production of valuable secondary metabolites.

4P-N162 Optimization of cell suspension culture conditions for *Helicteres angustifolia* L. to effectively produce phenolic compounds

○Long Xiao, Xi Yang, Shuang Sun, Junyi Zhu, Siyu Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Helicteres angustifolia L. belonging to the family Sterculiaceae is widely distributed in Laos, and southeast of China. The roots of *Helicteres angustifolia* L. have long been used as traditional medicines for the treatment of flu, diabetes, cold and dysentery. Previous studies suggested that the aqueous and ethanol extracts from this plant contains high levels of polyphenols and flavonoids, which are responsible for strong antioxidant, antidiabetic, and anti-cancer activities. Due to numerous drawbacks brought about by traditional methods for phenolic compounds production, however, seeking new methods like callus suspension culture is promising and important. With the benefits of short growth cycle, easy control and no limitation by environmental factors, callus suspension culture is widely applied in plant biology to produce secondary metabolites. This study clearly identified the effects of cell suspension culture conditions on biomass accumulation and phenolic compounds production. In this work the effects of light, salt strength of medium, sucrose concentrations, pH and temperature were explored on the two calluses including adventitious root and normal callus. In addition, the optimum conditions for phenolic compounds production from *Helicteres angustifolia* L. were also determined.

In vitro regeneration of _Helicteres angustifolia_ L. for production of bioactive secondary metabolites

○Siyu Sun, Xi Yang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Helicteres angustifolia* L., *In vitro* regeneration, Plant growth regulators, Secondary metabolites accumulation

Optimization of cell suspension culture conditions for _Helicteres angustifolia_ L. to effectively produce phenolic compounds

○Long Xiao, Xi Yang, Shuang Sun, Junyi Zhu, Siyu Sun, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Kazuya Shimizu
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words cell suspension culture, phenolic compounds, plant cell culture, *Helicteres angustifolia* L.

4P-I163 グアユール(*Parthenium argentatum* Gray)のゴム生合成機構の解明

○梶浦 裕之[1,2], 鈴木 伸昭[1], 内山 俊宏[3], 毛利 浩[3], 渡辺 訓江[3], 中澤 慶久[1]
([1]阪大院・工, [2]立命館大院・生命科学, [3]株式会社ブリヂストン)
nakazawa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】現在，*cis*-ポリイソプレンを主成分とする天然ゴムの生産は東南アジアで栽培されているパラゴムノキに大きく依存し，その生産量は天候など外的因子の影響により容易に変動する．そのため，安定的な天然ゴム生産と供給には他の地域で栽培可能な第 2 のゴム産生植物の利用が望まれる．グアユール(*Parthenium argentatum* Gray)は，樹皮近傍の組織に多量の天然ゴムを生産することが知られている．しかしその商業利用を進めるにはその蓄積部位，生産時期，蓄積量等の情報を把握し，抽出工程を最適化する必要があるが，ゴム生産・蓄積機構に関してその知見が乏しい．本研究では顕微鏡観察による組織学的手法を用い，グアユールの時空間的なゴムの生合成と蓄積機構の解明を目指した．
【結果と考察】蓄積機構の組織学的解析のため，植物組織内に存在する *cis*-ポリイソプレンを特異的に染色し観察することに取り組んだ．染色試薬 Nile Red は細胞内脂質成分の染色に使用される試薬だが，染色対象分子の極性の違いに応じて発する極大波長が変化する特性を持つ．この特性を *cis*-ポリイソプレン染色に応用し，蛍光スペクトルを分離可能な共焦点レーザー顕微鏡で取得し，*cis*-ポリイソプレンに由来する蛍光のみを分離した．グアユールの樹皮では柔細胞に存在する管状組織周辺の 1 層からなる細胞集団に *cis*-ポリイソプレン由来の蛍光シグナルが確認でき，その他の細胞ではこの蛍光シグナルは確認できなかった．電子顕微鏡解析とグアユールの *cis*-ポリイソプレン合成に必須なタンパク質の組織内局在解析により，この細胞集団で *cis*-ポリイソプレンの合成と蓄積が行われていることを明らかにした．本研究により植物細胞内における天然ゴム合成の生合成・蓄積機構の 1 つが明らかとなった．

Elucidation of rubber biosynthesis in guayule (*Parthenium argentatum* Gray)

○Hiroyuki Kajiura[1,2], Nobuaki Suzuki[1], Toshihiro Uchiyama[3], Hiroshi Mouri[3], Norie Watanabe[3], Yoshihisa Nakazawa[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [3]Bridge stone Corporation)

Key words Guayule, *cis*-polyisoprene, Rubber biosynthesis

4P-I164 毛細血管様構造を有する多細胞スフェロイドをビルディングブロックとして作製した 3 次元組織の内部構造の定量的解析

○井上 優里[1], 高橋 憲司[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】再生医療において，移植治療の場合，実物に近い立体的な臓器や組織が要求される．しかし，そのサイズを大きくするにしたがって深部まで酸素や栄養が供給されにくくなり，機能維持が困難になることが懸念される．そこで，酸素や栄養の供給を行う「毛細血管」を組織に構築し，組織の機能維持を図ることを目的とした．この組織の作製には「剣山メソッド」を用いるが，現時点ではスフェロイドや 3 次元組織の内部を空間的な解像度を持ってデザインするのが困難なため，その最適なデザイン条件は確立されていない．よって，本研究では，スフェロイドや 3 次元組織の内部構造を明らかにし，機能維持に最適な組織の作製条件を決定することを課題とした．
【方法および結果】ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)と ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の播種数と混合比を変えることで，バイオ 3D プリンターに最適な形態であるスフェロイドの作製条件を検討した．また，HUVEC による毛細血管構造の構築と細胞死に及ぼす影響を評価した．その結果，細胞播種数を 20,000 cells/ well ，NHDF と HUVEC の混合比を 8:2 にすることで，バイオ 3D プリンターに最適な形態であり，且つ毛細血管構造を有するスフェロイドの作製に成功し，スフェロイド単位での細胞の機能維持に成功した．更に，このスフェロイドを用いて 3 次元組織の作製を行った結果，毛細血管構造の形成を確認することはできた．これら，毛細血管構造を持つ単一スフェロイドおよび 3 次元構造物について，切片を作成し，内部の毛細血管構造についてその位置的分布を 2 次元画像解析により定量した結果についても報告する．

Manufacturing of 3D tissue produced by using micro-vascularized multicellular spheroids as building block, and its 2D image analysis

○Yuri INOUE[1], Kenji TAKAHASHI[1], Kazuaki NINOMIYA[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words Bio-3D printer, Micro vascular structure, 2D image analysis

4P-I165 多細胞スフェロイド内部および多細胞スフェロイド間における細胞遊走の観察

○仁宮 一章[1], 今堀 夏奈美[2], 高橋 憲司[2]
([1]金沢大・新学術, [2]金沢大院・自科)
ninomiya@se.kanazawa-u.ac.jp

【目的】スキャフォールドを用いない組織作製法としてスフェロイド法が注目されている．スフェロイド法では，細胞の凝集塊であるスフェロイドをバイオ 3D プリンターなどで積層し融合させることで，立体構造を持つ組織を作製する．本研究ではビィルディングブロックであるスフェロイド内の細胞集団の挙動，そして，積層後に融合していく過程でのスフェロイド間の細胞集団の挙動を，それぞれ評価することを目的とする．
【方法および結果】本研究では，ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）のみを使用した．まず，スフェロイド内の細胞集団の挙動を観察するため，スフェロイドの内側（コア）と外側（シェル）の細胞を赤・緑 2 色に染め分けたスフェロイドを作製するために，まず Cell tracker Red で染色した細胞を低吸着 U 底 96 well プレートに播種し培養した．その後，Cell tracker Green で染色した細胞を播種した．作製したスフェロイドについて，作成後の培養時間 0，24，48，72 時間後にスフェロイドを固定化，透明化した後，多光子顕微鏡で 3 次元画像を取得し，3D 画像解析ソフト (Imaris) を用いて解析した．一方，スフェロイド間の細胞集団の挙動を観察するため，，Cell tracker Red/Green で染色した細胞をそれぞれ低吸着 U 底 96 well プレートに播種し作成したスフェロイドを，緑スフェロイドと赤スフェロイドが交互になるようにスフェロイド積層型バイオ 3D プリンター (Regenova) を用いて 1×1×3 に積層した．積層後の培養時間 0，24，48，72 時間後に組織を固定化，透明化した後，多光子顕微鏡で 3 次元画像を取得し，3D 画像解析ソフトを用いて解析した．スフェロイド内の細胞は移動していることが分かった．一方，3 つのスフェロイドを直列に積層した組織では，スフェロイドどうしは融合しているにもかかわらず，スフェロイド間では細胞の移動は起こりにくいことが分かった．

Observation of cell motion inside multicellular spheroids and between multicellular spheroids

○Kazuaki Ninomiya[1], Kanami Imahori[2], Kenji Takahashi[2]
([1]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

Key words Multicellular spheroids, 3D image analysis, Bio-3D printer

4P-I166 多細胞スフェロイドの 3 次元的な解析手法の開発

○稲垣 慶一[1], 高橋 憲司[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】近年，100%細胞のみから作られたスキャフォールドフリー組織の作製が検討されている．中でも 3 次元細胞凝集塊であるスフェロイドをビルディングブロックとして 3 次元組織を作製する手法は cm サイズの組織構築が容易であることから注目が高まっている．しかし，現段階ではビルディングブロックとして使用するスフェロイドの内部情報（サイズ，細胞数，細胞分布）の 3 次元的な解析手法が確立されていない．そこで我々は，「スフェロイドの 3 次元的な解析手法の確立」を目的とした．
【方法および結果】「スフェロイド内の全・死細胞を核蛍光染色後，スフェロイドを透明化させ，多光子顕微鏡で 3 次元画像を取得し PC 解析を行う」という新たに試行した評価法により，スフェロイドのサイズ・生・死細胞数・細胞の位置的分布を算出した．また同時に従来の評価方法でサイズ・細胞数・細胞の位置的分布を算出し，各項目で両手法の比較を行い新手法の妥当性を検討した．本研究で試行した手法では，細胞はヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)，染色試薬として PI (Propidium Iodidate)と DAPI (4’,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride)，透明化試薬として CUBIC を使用した．まず，10,000 cells/spheroid になるように作製したスフェロイドに PI を加え，組織内の死細胞を赤色に染色した．その後 PFA を加え組織を固定化し，DAPI を加えて全細胞を青色に染色した．染色後は CUBIC を用いて組織の透明化を行い，多光子レーザー顕微鏡で 3 次元画像を取得した．その 3 次元画像の解析を行い，スフェロイド全体の体積，全・死細胞数，全・死細胞の分布をそれぞれ算出した．その後，同じ条件で作製した別のスフェロイドを用いて従来法によるスフェロイドのサイズ・細胞数・位置的分布の算出を行った．各項目において両手法の結果が一致し，新手法の妥当性を確認できた．

Development of 3D image analysis method of multicellular spheroids

○Keiichi Inagaki[1], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[2]
([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., [2]Ints. Frontier Sci. Initiative, Kanazawa Univ.)

Key words Multicellular spheroids, 3D image analysis, Bio-3D printer

4P-I167 高次元細胞形態情報を用いたリアルタイム細胞培養工程パラメータ評価法の開発

○藤谷 将也, 蟹江 慧, 加藤 竜司
（名大院・創薬科学）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

【目的】近年，再生医療分野では法的制度の改正や産業界の活性化に伴い，医療・創薬のための細胞の受託培養・生産を請け負う，細胞培養加工施設が建設・認可されつつある．しかし，現在，細胞培養という長期間・高コストな培養プロセスは，人間の感覚や経験のみでまかなわれており，数値化管理がなされていない．評価する培養細胞の多くは，その後治療に用いることを考えると非破壊的な評価が望まれるが，多くは一部サンプリングによる細胞生存率のカウントなどしか評価方法が無い．我々は，これまでに非破壊的に得られる細胞画像から幹細胞の培養状態を定量的に評価する手法を開発してきた．本研究では，再生医療用幹細胞の培養加工施設における培養工程の標準化および最適化のため，位相差画像から細胞の培養環境や培養状態の数量化・記録・比較するための新しい手法を開発し，これを生物学的評価と連動させて，評価の感度・精度について検証することを目的とした．
【方法】細胞製造における品質管理のために最適化を検証すべきいくつかの工程パラメータとしてこれまで評価されてきていなかった基礎物理化学的条件を振った環境下において間葉系幹細胞（MSC）などの正常細胞を培養し，培養画像約20万枚を解析することで細胞の応答変化を定量化した．同時に，培養細胞の網羅的遺伝子発現データを取得し，培養環境による細胞品質の生物学的な変化を検証した．
【結果】培養中の細胞画像から得られる高次元形態情報を用いることで，培養環境による細胞応答を用いて細胞品質の変化をリアルタイムかつ定量的に検出でき，工程を最適化できる可能性が示唆された．
【考察】今回の結果から，培養中に得られる細胞画像により，培養環境によるデリケートな差を検出できることが明らかとなり，細胞画像情報解析による培養環境評価の有効性を示唆する結果となる．

Image-based real-time evaluation of cell culture parameters for optimization of stem cell culture

○Masaya Fujitani, Kei Kanie, Ryuji Kato
(Dept. Basic Med.Sci., Grad. Sch. Pharma. Sci., Nagoya Univ)

Key words image-based nalaysis, culture optimization, mesenchymal stem cell, non-invasive evaluation

4P-I168 Oxygen supply and oxidative stress in pancreatic β-cell spheroids

○Dina Myasnikova, Junji Fukuda
(Yokohama Natl. Univ.)
myasnikova-dina-md@ynu.jp

One of the major problems when fabricating 3D tissues *in vitro* is oxygen supply. Lack of vasculatures potentially leads to cell hypoxia in the core of 3D tissues. Increasing oxygen partial pressure in culture medium may alleviate this problem, but it may also cause severe oxygen stress on cells. To address this “double-edged” problem, in our experiment we combined two approaches: use of the specially fabricated oxygen permeable spheroid culture device and the addition of an antioxidant to the culture medium. The device was made from oxygen permeable polydimethylsiloxane that provided oxygen to spheroids not only through the culture medium but also through the bottom of the culture device. This approach decreased hypoxia level in pancreatic β-cell spheroids, comparing with the device but made of non-oxygen permeable polymethylmethacrylate; and improved expression of the INS1 gene (2.2 times) and insulin secretion (2.5 times). To reduce oxygen stress on the pancreatic spheroids in the device, we added a physiological amount of vitamin C derivative to the culture medium that led to further upregulation of the INS1 gene expression in 2.3 times. Moreover, the addition of antioxidant improved expression of the GLUT2 gene, which plays a major role in glucose sensing mechanism in mice. These results show the importance of controlling oxygen and antioxidant culture conditions for fabrication of pancreatic tissues.

Oxygen supply and oxidative stress in pancreatic β-cell spheroids

○Dina Myasnikova, Junji Fukuda
(Yokohama Natl. Univ.)

Key words oxidative stress, insulin secretion, pancreatic islet, spheroid

4P-I169 CHO 細胞を宿主としたサメ由来 IgNAR 抗体フラグメント分泌生産の検討

○有永 幹基[1], 野村 嘉紀[1], 鬼塚 正義[2,3], 山野 範子[1,3], 古賀 雄一[1], 大政 健史[1,3]
（[1]阪大院・工, [2]徳島大院・社会産業理工, [3]MAB組合）
omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

【背景と目的】近年注目されている重鎖抗体のひとつにサメ血清中で発見された IgNAR (Immunoglobulin New Antigen Receptor) がある．タンパク質の変性剤として知られる尿素を含むサメ体内においても IgNAR がその機能を失わないことから高い構造安定性が示唆され産業応用が検討されている．しかしこれを試みる上で同抗体を大量生産する技術が確立されていないという課題があり，抗体医薬品製造において確立されている基盤技術・生産プラットフォームを応用した宿主細胞生産系および分離精製プロセスの構築が望まれている．本研究では，抗体医薬品生産における代表的な宿主である Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた IgNAR の分泌生産系の構築を目的とした．
【方法】テンジクザメ由来 IgNAR の可変領域 (V NAR) を含み，定常領域 (N 末端から C1，C2，C3，C4，C5) のドメイン数の異なる各抗体フォーマットの C 末端にヒト IgG1 Fc 領域を融合した発現ベクターを，無血清馴化 CHO-K1 浮遊細胞へ一過性遺伝子導入した．ヒト Fc 領域を認識する一次抗体と酵素標識した二次抗体とでサンドイッチする ELISA 法により生産物濃度の測定を行い，Fc 領域を介した protein A カラムによる抗体精製を行った後，SDS-PAGE により抗体の分泌を確認した．
【結果と考察】培養上清の最終抗体濃度測定の結果，V NAR，C1 と Fc を融合した VC1-Fc，および V NARs，C1，C2，C3 と Fc を融合した VC1C2C3-Fc の濃度が高かった．培養上清から protein A カラムを用いて抗体の回収・精製を行い SDS-PAGE を用いて分析した結果，VC1-Fc，VC1C2-Fc，VC1C2C3-Fc のバンドが確認された．VC1C2C3C4-Fc および IgNAR-Fc は抗体分泌量が低かった，または IgG1 Fc 領域が正しく立体構造をとれておらず抗体精製の収率が低かったと考えられた．現在，各抗体の安定発現株を構築し mRNA 発現量の比較，安定性の評価を行っている．

Investigation of secretory production of immunoglobulin new antigen receptor fragments in Chinese hamster ovary cells

○Motoki Arinaga[1], Yoshiki Nomura[1], Masayoshi Onitsuka[2,3], Noriko Yamano[1,3], Yuichi Koga[1], Takeshi Omasa[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. of Technol., Ind. Soc. Sci., Tokushima Univ., [3]Manufacturing Technol. Association of Biologics)

Key words shark antibody, immunoglobulin new antigen receptor, Chinese hamster ovary cells, molecular design

4P-N170 低酸素応答型遺伝子発現システムを導入した細胞センサーの機能評価

○小野 章彦[1], 井藤 彰[2], 佐藤 智詠[2], 山口 雅紀[2], 鈴木 大雅[2], 河邉 佳典[2], 上平 正道[1,2]
（[1]九大院・シス生科, [2]九大院・工）
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

組織工学的に作製した血管網を持たない三次元組織は，組織内部が低酸素状態となり細胞死に陥る．本研究室では，低酸素ストレスに応答して蛍光タンパクを発現する遺伝子発現システムを細胞に導入することで，視覚的に低酸素状態を検出する低酸素応答型細胞センサーの開発を行ってきた．本遺伝子発現システムは，低酸素誘導型 RTP801 プロモーターと酸素依存的分解ドメインである ODD 領域を利用することで，低酸素状態において厳密に発現誘導されるように設計されており，さらに，人工的な遺伝子発現増幅システムである Tet-Off システムと組み合わせることで，高感度に低酸素状態を感知可能である．また Tet-Off システムを利用しているため，ドキシサイクリン（Dox）添加によって遺伝子発現を抑制することができる．本研究では，この低酸素応答型遺伝子発現システムを HeLa 細胞に遺伝子導入し，低酸素環境を感知する細胞株を樹立し，機能評価を行った．樹立した 4 種類の細胞株を，低酸素環境下・通常酸素環境下それぞれ Dox 有り/無し条件で培養し GFP 蛍光を観察した．その結果，4 種類のうち 2 種類の細胞株（#19, #24）が低酸素環境に応答して GFP 蛍光を示した．#24 は低酸素下において#19 に比べて約 10 倍高い蛍光強度を示したが，通常酸素下においても，低酸素下に比べて 1/60 ではあるものの依然として GFP 蛍光を示した．また，#24 は Dox 添加条件においても GFP 蛍光は完全には消失しなかった．一方で，#19 は Dox 添加によって，低酸素・通常酸素両条件においても GFP 蛍光が消失した．これらの結果より，樹立した細胞株は低酸素応答性にそれぞれ特徴を持つことが明らかになった．より厳密な酸素濃応答性を観察する場合など，目的に応じた使い分けが必要だと考えらえる．これらの細胞株を利用した三次元組織中の低酸素環境の検出への応用が期待できる．

Cell-based sensors equipped with a hypoxia-responsive transgene expression system

○Akihiko Ono[1], Akira Ito[2], Tomonaga Sato[2], Masaki Yamaguchi[2], Taiga Suzuki[2], Yoshinori Kawabe[2], Masamichi Kamihira[1,2]
([1]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words cell-based sensor, hypoxia, gene contol, synthetic promotor system

4P-I171 CHO 細胞における導入遺伝子高発現部位の解析

森 孔明[1], 淺井 聖也[1], 金岡 英徳[1], 石川 晃大[1], 上平 正道[2],
○西島 謙一[1]
（[1]名大院・工, [2]九大院・工）
nishijima@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景・目的】
CHO 細胞において外来導入遺伝子を高発現できる遺伝子座を見出すことが出来れば，近年発展の著しいゲノム編集技術を利用して目的遺伝子の高生産細胞株の樹立過程を効率化することが期待できる．我々はこれまでに，1 コピーの目的遺伝子をランダムにゲノムに挿入できるレトロウイルスベクターを用いて，CHO 細胞において導入遺伝子の高発現に適した遺伝子部位を探索してきた．今回，クロマチン免疫沈降法によりヒストン修飾解析を行った．
【方法・結果】
eGFP を発現するレンチウイルスベクターを導入した CHO-K1 細胞の中から，セルソーターにより高発現細胞および低発現細胞を分離・培養した．得られた細胞株は，平均蛍光強度が約 6 倍程度異なっていた．クロマチン免疫沈降法により，導入した eGFP 遺伝子のヒストン修飾を検討した．その結果，活性型染色体に多いアセチル化ヒストンは高発現/低発現細胞間で差がなかった．また，凝縮状態の染色体に多い H3K27 トリメチル化ヒストンの量も変化がなかった．一方，活性型のヒストン修飾である H3 ヒストン K4 トリメチル化が高発現細胞で有意に高いことが観察された．これらの領域がもともとどのようなヒストン修飾を受けているのか明らかとするために，クローン高発現/低発現細胞の遺伝子挿入部位を決定した．次に，遺伝子挿入前の CHO 細胞を用いてこれらの遺伝子部位のヒストン修飾解析を行った．その結果，一部の導入遺伝子高発現ローカスでは H3 ヒストン K4 トリメチル化がもともと高いことが観察された．現在，CRISPR/Cas9 を用いて目的ローカスに一本鎖抗体/Fc 融合タンパク質発現ベクターを挿入したクローンを作製中である．
なお，本研究は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合からの再委託を受けて行われた．

Analysis of genomic locus supporting high expression of transgene in CHO cells

Komei Mori[1], Seiya Asai[1], Hidenori Kaneoka[1], Akihiro Ishikawa[1],
Masamichi Kamihira[2], ○Ken-ichi Nishijima[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words chromosome, histone

4P-I172 ニワトリ始原生殖細胞への CRISPR/Cas9 システムの応用

○金岡 英徳, 奥嵜 雄也, 萩原 遥太, 村上 晴太郎, 西島 謙一,
飯島 信司
（名大院・工）
kaneoka@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】
近年の目覚ましいバイオ医薬品市場の拡大により，治療用抗体をはじめとしたタンパク質性医薬品の需要が増加している．それに伴い，有用タンパク質を安価に大量に生産できる技術の開発が必要とされている．我々はその需要に応えるため，トランスジェニックニワトリの卵中に有用タンパク質を生産させ，生きたバイオリアクターとして利用する技術開発を進めてきた．本研究では，従来のウイルスベクターによる遺伝子導入に代わり，ニワトリ始原生殖細胞（PGC: Primordial Germ Cell）へ遺伝子導入を行い，レシピエント胚へ移植する方法の検討を行なった．PGC は将来，精子・卵子に分化する細胞であり，この方法により生殖細胞へ遺伝子の導入が可能となれば，効率的なトランスジェニック子孫の取得が期待できる．
【方法・結果】
ニワトリ PGC の培養法には様々な報告があるが，いまだ確立した方法があるとは言えないため，培養条件の検討を行った．Whyte らの開発した FAIcs 培地をもとに検討を行った結果，ニワトリ PGC の継続的な培養が可能となった．この培養法で樹立した PGC 様細胞株の未分化細胞マーカーや生殖細胞マーカーを免疫染色や定量 PCR により確認すると，分離した直後の PGC と大差のない発現レベルであったため未分化・生殖細胞性ともに維持されていると考えられる．次に樹立したニワトリ PGC 様細胞株に CRISPR/Cas9 システムを用いて，eGFP 遺伝子のノックインを行った．PGC で強く発現する遺伝子を標的としノックインを行った結果，内在性のプロモーター活性により eGFP を安定的に発現するニワトリ PGC 様細胞株の樹立に成功した．この樹立した細胞株をレシピエント胚に移植したところ，最大で 80%の定着率が得られた．

Application of CRISPR/Cas9 system to produce transgenic chickens

○Hidenori Kaneoka, Yuya Okuzaki, Yota Hagihara, Seitaro Murakami,
Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima
(Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words transgenic chicken, CRISPR/Cas9

4P-I173 生きたスフェロイド内細胞のあるがままの形と分布を計測する

○田中 正太郎
（東女医大・医・生化学）
tanaka.shotaro@twmu.ac.jp

【目的】腫瘍組織の内部では，細胞増殖にかかわる要因（栄養，酸素濃度，空間の自由度）の偏りによって，細胞密度のばらつきが生じる．このばらつきは，細胞増殖速度や細胞分化，血管走行，薬剤浸透性などに影響するため，結果として患者間で治療効率に差が生じる一因となる．腫瘍内部の細胞の構造と配置を詳細に観察することができれば，細胞密度のばらつきの形成メカニズムを明らかにするだけでなく，治療効率を高める工夫が得られるだろう．そこで本発表では，細胞凝集塊（スフェロイド）をモデルとして，内部の細胞の構造と分布を生きたままの状態で観察する技術の開発を目標とした．【方法】肝がん細胞株 HepG2 からなるスフェロイドの培養液に蛍光色素を添加し，共焦点顕微鏡により連続断層画像を得た（撮像間隔：1 μm）．これを元に 3 D 像を構築し，構成する細胞一つ一つの構造情報を得た．【結果】蛍光色素は細胞間隙に浸透し，数分で内奥部まで到達した．しかし，細胞内部には侵入しないため，蛍光断層像を撮影することで細胞の陰性造影像が得られる．直径 100μm のスフェロイドは 500 程度の細胞で構成され，その体積は 2.1 x 106μm^3，細胞体積分布の中央値は 2100μm^3 であった．【考察と展望】本技術は，無標識のスフェロイドを生きたまま扱えること，100μm までの深部が観察できること，簡便であること，多波長観察が可能であるという点で優れている．現在この技術を利用し，薬剤浸透性および薬効評価，共培養（HUVEC）での細胞形状評価を進めている．

A novel method for detailed analysis of living cell structure in spheroid.

○Shotaro Tanaka
(Dept. Biochem., Sch. Of Med., Tokyo Women's Med. Univ.)

Key words live cell imaging, confocal microscopy, spheroid

4P-I174 一細胞回収を指向した新規光分解性 PEG 脂質共重合体の開発

○中宿 優太[1], 山平 真也[2], 山口 哲志[3], 金野 智浩[1], 石原 一彦[1],
長棟 輝行[1]
（[1]東大院・工, [2]産総研, [3]東大・先端研）
nagamune@bio.t.u-tokyo.ac.jp

高選択的かつ迅速な一細胞分離技術は，細胞生物学の基礎研究や新しい診断・治療法の開発といった幅広い分野への貢献が期待される．これまでに様々な一細胞分離技術が開発されてきた．FACS は現在最も広く使われている一細胞分離手法の一つであり，ハイスループットな細胞分離が可能である．一方で，マニピュレータ等を用いて細胞分離する手法は，細胞を選別する際，画像解析を用いるため，FACS より多角的で継時的な解析を行うことができるが，処理に時間を要する点で FACS に劣る．当研究室では，光分解性 PEG 脂質を用いた一細胞アレイ化によって，一細胞画像解析技術を確立している．本研究では，細胞選別時に画像解析が可能かつ迅速な一細胞回収を同時に実現できるプラットフォームの開発のため，光分解性 PEG 脂質と生体適合性材料である MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)との共重合体の開発を行った．この共重合体は光分解性 PEG 脂質モノマー，MPC，BMA (*n*-butyl methacrylate)の 3 つのモノマーを RAFT 共重合で合成したものである．この共重合体は PEG 脂質によって細胞の固定化を行うことができるが，紫外光を照射した後は，光分解が生じ PEG 脂質の遊離により細胞が脱離し，かつ MPC ユニットの効果により脱離細胞が再接着しないように設計されている．この共重合体の有用性を示すために，浮遊細胞のモデルとして蛍光タンパク質を発現させた Ba/F3 細胞を用い，選択的な一細胞分離を行った．この共重合体をコーティングしたスライドガラスに対し，Ba/F3 細胞と同程度の直径を持つスポットが格子状に並ぶようにフォトマスクを用いて紫外光を照射し，一部の共重合体を不活性化させた．その後，スライドガラス上に Ba/F3 細胞を播種し，一細胞レベルでのパターニングを行い，また，特定の細胞に対し，紫外光を照射することで選択的な細胞の遊離を試みた．

A novel photocleavable copolymer containing PEG lipid for single cell isolation

○Yuta Nakasuga[1], Shinya Yamahira[2], Satoshi Yamaguchi[3], Tomohiro Konno[1],
Kazuhiko Ishihara[1], Teruyuki Nagamune[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Tokyo, [2]AIST, [3]RCAST, Univ. Tokyo)

Key words single cell, single-cell analysis, cell sorter, cell immobilization

4P-N175 胚様体形成段階における GSK3β 阻害剤添加が ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化に及ぼす影響

○澤登 美空, 大貫 喜嗣, 黒澤 尋
（山梨大院・総研部）
kurohiro@yamanashi.ac.jp

【背景と目的】 心筋細胞は再生医療や新薬開発などへの応用が期待されている．現在，様々な方法でヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導が行われているが，低分子化合物によって Wnt シグナルを制御する方法は，心筋細胞を分化誘導する有力な手段となっている(1)．一方，胚様体（EB）を介する方法は，簡便で再現性の高い分化誘導法で，心筋細胞の分化誘導にも用いられている．本研究では，EB 形成の浮遊培養の段階で 2 種類の GSK-3β 阻害剤を添加すると，ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化にどのような影響が現れるのかを明らかにする．
【方法】 Feeder-free 条件下で培養したヒト iPS 細胞（201B7，理研 BRC）を Accutase によりシングルセルまで分散後 Lipidure コートした 96-well plate に 3000 cells/well で播種し 10 μM の Y-27632 を含有した各培地にて 4 日間浮遊培養により胚様体を形成した．その後，BIO(0-8 μM)と CHIR99021（CHIR）(0-16 μM)を組み合わせて添加した 30 種類の培地中で 3 日間の浮遊培養を行い，EB の形態および初期心筋細胞関連マーカー遺伝子の発現を解析して，心筋細胞への分化効率を評価した．
【結果と考察】CHIR を単独で添加すると濃度依存的に初期心筋細胞関連遺伝子（T など）の発現量が増大した．BIO を単独で 4 μM 以上の濃度で添加すると，EB の形態形成が不全となった．2 μM BIO の単独添加では，T の相対発現量は十分ではなかったが，2 μM BIO と 1 μM CHIR の共存下で胚様体を浮遊培養すると，T の発現量が顕著に増大した．この時の T の発現量は，16 μM CHIR 単独添加で得られる結果に相当した．以上の結果より，BIO（2 μM）と CHIR（1 μM）を併用すると，CHIR 添加量を低減しても，心筋分化を促進できることが示唆された．

(1) Itsunari Minami , et al. Cell Reports 2 (2012) 1448-1460

Effect of GSK-3βinhibitor on cardiomyocyte differentiation of human iPS cells in floating cultures for embryoid body formation

○Miku Sawanobori, Yoshitsugu Ohnuki, Hiroshi Kurosawa
(Grad. Fac. Interdisc. Res.,Univ. Yamanashi)

Key words iPS cells, Cardiomyocyte differentiation, GSK3beta inhibitor

4P-I176 ECM 微粒子を内包した複合型膵島様組織の作製

○亀田 真央, 堀 綾香, 矢嶋 祐也, 鵜頭 理恵, 山田 真澄, 関 実
（千葉大院・工）
m-yamada@faculty.chiba-u.jp

【緒言】
近年，血糖変動性を有する I 型糖尿病の治療法として膵島移植が注目を集めている．当研究グループではこれまでに，細胞外基質（ECM）成分からなる微粒子を作製し，主に肝細胞とともに培養することで，細胞機能が向上されることを報告してきた．本研究では，ECM 微粒子をインスリン分泌細胞である β 細胞の集塊内に導入することで，より細胞機能の高い膵島様組織を構築する新規手法を提案する．特に，コラーゲンまたはマトリゲルからなる微粒子を用いて複合的な膵細胞集塊を作製し，その機能を評価することを目的とした．
【実験及び結果】
はじめに，膜乳化法を用いて ECM 微粒子を作製した．多孔質膜を介して，水溶性有機溶媒中に ECM 成分を含む水溶液を押し出すことで液滴を形成させ，その後液滴を脱水させることにより，ECM 微粒子を作製した．本研究では，ECM 成分として，I 型コラーゲンおよびマトリゲルを用いて微粒子を作製した．次に，作製したコラーゲンおよびマトリゲル微粒子を MIN-6 細胞（マウス膵 β 細胞株）とそれぞれ混合し，細胞非接着性の培養ウェルに播種したところ，どちらの粒子を用いた場合でも，ECM 微粒子と β 細胞からなる，直径約 300~400 μm の膵島様細胞集塊が形成されることを確認した．また，大きさの異なる微粒子を用いて組織を形成し，組織断面の観察を行ったところ，直径が小さな粒子（10 μm）の場合は，組織内部へ均一に粒子が取り込まれたのに対し，直径が大きな（25 μm）粒子を使用した場合，粒子は組織の周縁部に局在化することを確認し，ECM 微粒子のサイズが膵島様組織を作製する上で重要な要因であることが確認された．今後は，ECM 微粒子が β 細胞の機能に及ぼす影響について評価を行う予定にしている．

Fabrication of composite islet-like tissues containing ECM microparticles

○Mao Kameda, Ayaka Hori, Yuya Yajima, Rie Utoh, Masumi Yamada, Minoru Seki
(Grad. Sch. Eng., Chiba Univ.)

Key words extracellular matrix, micro particle, pancreatic islet

4P-I177 三次元培養がん細胞自動選抜システムのための画像情報解析の有効性

○渋田 真結[1], 加藤 寛人[1], 田村 磨聖[2], 蟹江 慧[1], 松井 裕史[3], 杉浦 慎治[2], 金森 敏幸[2], 柳沢 真澄[4], 佐藤 琢[2], 高木 俊之[2], 加藤 竜司[1]
（[1]名大院・創薬, [2]産総研, [3]筑波大, [4]エンジニアリングシステム）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

創薬探索やがん研究の分野において，腫瘍組織を形成する細胞集団の不均一性（ヘテロ性）の理解や制御が重要であることが示されつつある．多くの先行研究から，腫瘍ヘテロ性はがん組織の薬剤耐性や浸潤能の獲得，転移，再発の一因である可能性が報告されており，この腫瘍ヘテロ性を加味した新規薬剤の開発が求められている．しかし，従来の分子生物学的手法において，タンパク質マーカーなどを用いた分類技術だけでは未知のヘテロ性を評価・分類することは難しく，腫瘍ヘテロ性やがんの特性の評価は病理組織などにおける組織学的な特徴の形態的評価が主流であった．また，in vitro において，がん細胞を生体内に近いような機能性を維持したまま培養することも技術的には難しく，3 次元での培養の有効性が知られてはいたが高いスループット性を維持しながら培養中の細胞情報を解析することは難しかった．そこで我々は，細胞の形態に着目し，形態情報に基づく細胞分類法を考案した．さらには高度に設計された光分解性ゲルを用いた 3 次元培養という培養環境と，細胞画像解析技術を用いた表現型による未知の集団の分類技術，およびこれを自動的に光照射・回収する装置の機能性を組み合わせ，3 次元培養した細胞を表現型（形態）で分類し，自動で評価細胞を選抜・クローニング可能なシステムを開発し，その有用性を検証しこれまで報告してきた．本研究では，いくつかのモデル細胞株を用いて細胞種特有の細胞形態や増殖パターンというリアルタイムな 3 次元培養情報を取得し，画像解析技術を用いた表現型解析の精度および有効性について検証した．

Image-based analysis for Automatic 3D culture cell selection system

○Mayu Shibuta[1], Hirohito Kato[1], Masato Tamura[2], Kei Kanie[1], Hirohumi Matsui[3], Shingi Sugiura[2], Toshiyuki Kanamori[2], Masumi Yanagisawa[4], Taku Sato[2], Toshiyuki Takagi[2], Ryuji Kato[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ., [2]AIST, [3]Univ. Tsukuba, [4]ESCO)

Key words cancer classification, Cell image analysis, Photoresponsive polymer

4P-I178 コラーゲンゲル上への紫外線照射処理による脳毛細血管内皮細胞と神経幹細胞／前駆細胞のパターン化

○森 英樹, 白岩 侑馬, 山尾 明日美, 土岐 麻菜, 原 正之
（阪府大院・理）
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】脳組織にある毛細血管は血管を構成する血管内皮細胞とアストロサイトなどの周辺の細胞によって血液脳関門を形成し，脳組織内への物質輸送を厳密に調節している．培養皿上で血管内皮細胞，アストロサイトや神経細胞へ分化する能力をもつ神経幹細胞／前駆細胞をパターン化及び共培養できれば，血液脳関門の形成過程の解析や脳血管モデルの開発に有用な情報を与えると期待できる．本研究では，コラーゲンゲル表面へ紫外線照射することによってゲル表面への細胞接着性や伸展性の変化を誘導し，コラーゲンゲル上に脳毛細血管内皮細胞と神経幹細胞／前駆細胞のパターンを作製すること試みた．
【方法と結果】0.5%コラーゲン溶液を中和し，線維化コラーゲンゲルを作製した．線維化コラーゲンゲルに紫外線（254nm）を 15 分間照射したものを UV 照射コラーゲンゲルとして実験に用いた．細胞はマウス由来脳毛細血管内皮細胞株である b End.3 細胞とマウス胎仔（E14）脳由来神経幹細胞/前駆細胞を用いた．SDS-PAGE や重量測定によって 15 分間の紫外線照射で多くのコラーゲン分子の架橋を確認，また粘弾性試験によって硬さの指標であるヤング率の増加が見られた．UV 照射コラーゲンゲル上への bEnd.3 細胞や神経幹細胞／前駆細胞の接着性を調べたところ，bEnd.3 細胞は未照射コラーゲンゲルに比べ UV 照射コラーゲンゲルの方がはるかに多くの細胞が接着し，培養経過に伴った細胞の伸展が見られたのに対し，神経幹細胞／前駆細胞ではどちらのゲルにも接着し，細胞数に大きな差は見られなかった．紫外線照射時に短冊状のマスキングを施し，コラーゲンゲル表面に紫外線照射部分のパターンを作製した．さらに，その部分的 UV 照射コラーゲンゲル上に bEnd.3 細胞を播種したところ，紫外線照射部に沿って大部分の細胞が接着した．

Patterning of brain capillary endothelial cells and neural stem/progenitor cells on a collagen gel using ultraviolet irradiation

○Hideki Mori, Yuma Shiraiwa, Asumi Yamao, Mana Doki, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words endothelial cell, neural stem cell, collagen, ultraviolet

4P-I179 ラット培養心筋細胞の拍動能及び脂肪酸組成に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果

○佐藤 大介[1], 小坂 薫[1], 斉藤 丈[1], 楠 正隆[2], 中村 孝夫[1]
([1]山形大院・医・生命情報工学, [2]名大・総合保体セ)
d_sato@yz.yamagata-u.ac.jp

再生医療領域において，心疾患の治療への適用を目指した in vitro 心筋再生組織の研究が盛んであるにもかかわらず，再生組織の発生応力は in vivo 心筋に比べていまだに著しく小さく，十分な心機能特性を得られているとはいえない．細胞培養に用いられる培地の成分は水溶性物質がほとんどであり，脂質はほぼ含まれていない．例えば多価不飽和脂肪酸（PUFA）は生理活性を有し，心筋を含む多様な組織の機能調節に極めて重要であるが，PUFA は生体内で合成できないため，外部からの補給が不可欠と考えられる．これまでに我々は，ラット胎児由来培養心筋細胞の PUFA 含有量が，新生児心筋組織のそれと比較して著しく低いことを明らかにした．本研究では，n-3 系 PUFA であるリノレン酸（ALA; 3-10 μM），ドコサペンタエン酸（DPA; 1-10 μM）またはドコサヘキサエン酸（DHA; 10-40 μM），ならびに n-6 系 PUFA であるリノール酸（LA; 10-30 μM）もしくはアラキドン酸（AA; 20-60 μM）の培地への単独添加が培養心筋細胞の拍動能及び脂肪酸含有量へ及ぼす影響について検討した．実験にはラット胎児の単離心筋細胞を用い，細胞播種の 2 日後から各脂肪酸とアルブミンとの結合物を，2 日に 1 回の培地交換時に毎回添加した．その結果，培養心筋細胞の拍動収縮率は，全ての脂肪酸添加群で高値を示す傾向にあり，ALA 3 μM，LA 20 μM，DHA 20 μM，AA 50 μM 及び DPA 3 μM 添加時にそれぞれ最大となって，脂肪酸無添加群との差が有意であった．また，そのときの添加脂肪酸の細胞内含有量は，全ての脂肪酸添加群で新生児心筋に近かった．以上のことから，これらの PUFA の培地添加は培養心筋細胞の拍動収縮能向上に有効であることが示され，そのときにそれぞれの細胞内脂肪酸組成が生体内のそれに最も近づく可能性が示唆された．

Effects of polyunsaturated fatty acid on contractility and fatty acid composition in cultured rat cardiomyocytes

○Daisuke Sato[1], Kaoru Kosaka[1], Jo Saito[1], Masataka Kusunoki[2], Takao Nakamura[1]
([1]Dept. Biomed. Info. Eng., Grad. Sch. Med. Sci., Yamagata Univ., [2]Res. Center Health Phys. Fitness Sports, Nagoya Univ.)

Key words cardiomyocyte, polyunsaturated fatty acid

4P-I180 疑似反磁性アセンブリにより構築した微小心筋組織の力学的特性の評価

○末永 寿恵[1], 杉原 惇嗣[1], 堀江 正信[2], 秋山 佳丈[1]
([1]信州大・繊維, [2]京大・RIRC)
aki@shinshu-u.ac.jp

近年，半導体微細加工技術を利用した MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) と呼ばれるマイクロマシン研究進展に伴い，生物の細胞を部品の一部に用いるバイオハイブリットデバイスに関する研究が注目を集めている．例えば生物の筋肉細胞をアクチュエーターとして取り込むことにより，高いエネルギー変換効率を持ち，生体親和性が高く，自己修復能力があるデバイスを創成できる可能性がある．従来研究では，2 次元細胞パターニングや生体組織の人の手によるマニュアルアセンブリが用いられてきたため，これまでに報告されたバイオハイブリッドデバイスは，単純かつ単一の機能をもったデバイスに限られてきた．そこで，我々は，任意の数の細胞を微小な構造体上の任意の位置へ 3 次元的にアセンブリし，そこで微小な組織を構築することで，より複雑で高機能なバイオハイブリッドデバイスの構築を目指している．これまでの研究において，磁気アルキメデス効果を利用した疑似反磁性アセンブリにより，ラット心筋細胞を 2 本のシリコンゴム製マイクロピラーを架橋するように 3 次元的に凝集させることに成功した．そして，この心筋細胞凝集体をそのまま培養し続けた結果，組織化し同期して自律拍動することを確認した．さらに，この心筋組織に電気パルス刺激を与えたところ，収縮しマイクロピラーの変形が見られた．そこで，周波数の異なる電気パルスを与えた時のマイクロピラーの変形に基づき，構築した心筋組織の応答性を評価した．骨格筋組織では刺激周波数がだいたい 5 Hz を越えると強縮する様子が見られるが，本組織は強縮せず最大 5Hz 程度の単収縮を行った．また，構築した心筋組織を α アクチニンおよび DAPI で染色し，心筋組織が構築されていることを確認した．

Evaluation of mechanical properties of micro myocardial tissue constructed by quasi-diamagnetic assembly

○Hisae Suenaga[1], Junji Sugihara[1], Masanobu Horie[2], Yoshitake Akiyama[1]
([1]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Div. Bio. Chem. Eng., RIRC, Kyoto Univ.)

Key words cell assebmly, biohybrid, magneto-Archimedes effect

4P-F181 Body on a Chip の実現に向けた細胞の自己凝集化誘導剤（CAT）を用いた 2D-3D 連結細胞構造体の作製と固定化

長島 諒[1,2], ○岩井 良輔[1,2]
([1]岡山理大・技科研, [2]岡山理大・工)
iwai@rit.ous.ac.jp

【研究背景】全身の薬物動態を評価し得る培養系「Body on a Chip」の概念が動物実験に代わる次世代の創薬スクリーニング評価系として提唱され盛んに研究が行われているが，その実現には細胞が評価に十分な機能を発揮できるように細胞種に応じて 2 次元 (2D) 単層，あるいは 3 次元 (3D) 組織の形態に作り分け，培養表面の決められた位置に配置する細胞操作技術の開発が必要である．本研究では，我々が独自に開発した 2D 接着細胞の自己凝集化（3D 化）技術を用いて，Body on a Chip 構築のための細胞の 2D-3D 連結構造体を作製することを目的とした．
【方法と結果】シリコーン板 (厚さ: 1 mm) を切り抜き培養皿の表面に貼付することで，長方形線形溝（長さ: 20～40 mm, 幅: 1~2 mm; 2D 接着培養ユニット）の中央部に正方形溝（一辺長: 3～4 mm; 3D 凝集化ユニット）を有する培養モールドを作製し，凝集化ユニットにのみ細胞自己凝集化誘導剤（CAT）を塗布し乾燥させた後，間葉系細胞を 5.0×10^5 cells/cm^2 以上の密度で播種すると，播種 1 時間以内に細胞は 2D 接着培養ユニットと 3 D 凝集化ユニットのいずれの培養表面にも接着して隙間のない細胞単層を形成したが，約 8 時間後に 3D 凝集化ユニットの細胞のみが 2D 培養ユニットの細胞単層との細胞間接着を維持した状態で自己凝集し 3D 化することで 2D 細胞単層と 3D 細胞組織体が連結した 2D-3D 連結細胞構造体が形成した．3D 凝集化ユニットの形状を円形や長方形に変えることで，それぞれ球形や細長い棒形の 3D 組織体が形成し，2D 細胞単層で固定化することもできた．
【まとめ】CAT を用いた細胞の自己凝集化技術を利用することで，細胞を自動的に任意の形状で 3D 組織化させ，2D の細胞単層と連結して固定化することができた．Body on a Chip を実現するための基盤技術としてのさらに開発を進めている．

Preparation and Anchoring of Organ-like 3D Cell Constructs Using Cell-self-aggregation Inducing Technology for the Development of Body on a Chip

Ryo NAGASHIMA[1,2], ○Ryosuke IWAI[1,2]
([1]RIT., Okayama Univ. Sci, [2]Fac. Eng., Okayama Univ. Sci.)

Key words tissue engineering, body on a chip, ADME, 3D culture

4P-N182 圧力駆動型 Organs-on-a-chip を用いた肝臓とがん細胞の連結培養による 抗がんプロドラッグの影響評価

佐藤 琢, ○杉浦 慎治, 進 和美, 金森 敏幸
（産総研・創薬基盤）
shinji.sugiura@aist.go.jp

複数の臓器モデルをチップ上で連結培養する Multiorgans-on-a-chip (MOC)が生体内の薬物動態を *in vitro* で解析する手法として注目を集めている．その利点として，従来の細胞実験では困難な複数臓器が関連する応答を評価できること，また，動物実験に付随するヒトとの種差の影響を排除できることが挙げられる．本研究では我々が開発した圧力駆動型 MOC システムを用いて，抗がん剤プロドラッグである Capecitabine の in vivo における作用機序を再現できることを示した．
圧力駆動型 MOC システムは培養器と圧力制御装置，ならびにエアーポンプで構成される．培養器には 2 個 1 組×8 連のチャンバーとそれらを連結するマイクロ流路が組み込まれており，チャンバー内の培地はポンプから供給される圧力によりチャンバー間を循環する．加圧操作における圧力，時間，および対象チャンバーは圧力制御装置に入力したプログラムに従い切り替えることができる．肝臓モデルとしてヒト肝がん由来 HepaRG 細胞を，がんモデルとしてヒト大腸がん由来 HCT 116 細胞を連結した別々のチャンバーに播種し，Capecitabine を 100 μM 含む培地を 10 分間で 1 循環する条件で灌流した．3 日間の培養後，細胞数を AlamarBlue 法で評価した．また，対照系として HCT 116 細胞のみの系で同様の試験を行った．
HepaRG 細胞と HCT 116 細胞を連結した系で HCT 116 細胞に対して増殖抑制効果が認められた．一方，HCT 116 細胞のみを培養した系では増殖抑制は起こらなかった．
Capecitabine は *in vivo* において肝臓，次いでがん組織で代謝されることにより細胞増殖を阻害する化合物に変化する．したがって肝臓に対する影響は小さく，がん組織に対しては強く作用する．HepaRG 細胞と HCT 116 細胞を連結した系における結果は上記の機序を反映したものと推測される．

Evaluation of the effect of anticancer prodrug by pressure-driven multiorgans-on-a-chip composed of liver and cancer organ modules

Taku Satoh, ○Shinji Sugiura, Kazumi Shin, Toshiyuki Kanamori
(BRD AIST)

Key words microfluidic device, Organs-on-a-chip, Cell-based assay

4P-F183 ヒト毛髪に付着する細菌の存在形態および群集構造の解析

○渡邉 康太[1], 西 英二[2], 田代 幸寛[1], 酒井 謙二[1]
（[1]九大院・生資環, [2]大分科捜研）
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】人体には多数の細菌が存在し，部位によりその細菌数および群集構造は異なる．我々は qPCR 法によるヒト毛髪に付着する細菌数の計測により，毛髪の毛幹部に 10^4 オーダーの細菌が存在することを初めて報告した（渡辺ら，第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会）．しかしながら，ヒト毛髪における毛根から先端にいたる全部位に付着する細菌の存在形態を明らかにした報告はない．そこで本研究では，毛髪に付着する細菌の存在形態と群集構造を明らかにすることを目的とし，電子顕微鏡による毛髪表面の細菌観察・計測および qPCR 法による細菌数の計測，MiSeq を用いた群集構造解析を行った．
【方法】毛髪を頭頂部から採取し，毛根部および毛幹（基底部・中間部・先端部）の 4 つの断片に切断した．各断片に付着する細菌 DNA を抽出した後，qPCR 法にて毛髪 1 cm 当たりのコピー数を定量した．さらに，MiSeq による 16S アンプリコン解析により細菌群集構造を解析した．次に，低真空下で電子顕微鏡（低真空 SEM）を用いて毛髪表面に付着する細菌の存在形態を観察した．
【結果】qPCR 法による細菌数計測により，毛根部分には平均 10^5 copies / cm，毛幹部にはどの部位でも平均 10^4 copies / cm の細菌が存在することが示された．低真空 SEM にて，毛髪表面に付着する細菌の直接観察に成功し，毛根部では毛幹部よりも多数の細菌を確認した．次に，細菌群集構造の β 多様性を解析した結果，毛幹部のどの部位も同一被験者内でクラスターが形成されたが，毛根部では形成しなかった．以上の結果から，ヒト毛髪には，毛根部および毛幹部で細菌数および細菌群集構造が異なり，毛幹部では，部位における細菌群集構造の類似性が高いことが示唆された．

Analysis of existence form and community structure of bacteria found on human hair

○Kota Watanabe[1], Eiji Nishi[2], Yukihiro Tashiro[1], Kenji Sakai[1]
([1]Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Oita. Pref. Police. HQ.)

Key words MiSeq, SEM, human hair, bacterial community structure

4P-J184 新しい抗菌薬としてのアンチセンス核酸

○木野 裕太, 中島 信孝
（東工大院・生命理工）
nnakashima@bio.titech.ac.jp

現在，抗生物質として利用されているものの多くは，抗菌スペクトルが広く，我々の健康や，環境を維持している多くの共生細菌まで殺してしまう．そこで我々は，アンチセンス核酸を用いることにより，細菌群集の中から標的とする細菌だけを特異的に殺すことを目的とした本研究を立ち上げた．アンチセンス核酸は，人工的に合成したオリゴ DNA やオリゴ核酸類似体などを指し，細菌内の mRNA に特異的に結合し，その翻訳を阻害する．この性質を利用して，標的細菌の生育に必須な遺伝子の mRNA のリボソーム結合領域（Shine-Dalgarno 配列）周辺を標的としたアンチセンス核酸を設計することにより，目的の細菌だけを殺すことが可能になる．そこで，我々は，環境から採取したサンプルに大腸菌を混ぜて，モデル系としての実験を行った．将来的にはバイオフィルムや皮膚細菌叢等などの複雑な集団に存在する 1 種類の細菌を配列特異的に殺菌することを目指している．

Antisence nucleic acid as new antibiotics

○Yuta Kino, Nobutaka Nakashima
(Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words microbial consortium

4P-N185 Difference of gene expression between upper and bottom side mycelia in liquid surface culture of *Cordyceps militaris* NBRC103752

○Suparmin Ahmad[1]
([1]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

Cordyceps militaris is entomopathogenic fungus and produced special metabolite known as cordycepin. Cordycepin is produced in fruiting body or can be excreted from mycelia in a solid or liquid culture. Mycelial morphology in liquid surface culture may produce different amount of Cordycepin. The upper side and bottom side mycelia are in an aerobic and hypoxic conditions, respectively, and have different biosynthetic pathway. However, there is no study about the different physiology in related to cordycepin biosynthesis and pathogen-host interaction. In this study, we analyzed the different transcriptome expression between the upper and bottom side mycelia of *C. militaris* NBRC103752. The RNA was isolated at 5th d, 12th, and 19th d after inoculation, where cordycepin was started produced at eleven days after inoculation. The bottom side mycelia showed 572 proteins were significantly up expressed and 140 proteins were down expressed, whereas 190 genes and 189 genes were up expressed and down expressed in the upper side, respectively. Further, a functional analysis showed much genes expressed relating to pathogen-host interaction and oxidoreductase activity were found on the bottom side than the upper side. Cordycepin biosynthesis-those related genes are also shown higher expressed on the bottom side. Our results provide important information about the upper and bottom side of *C. militaris* mycelial physiology and make sharpen the understanding of cordycepin and pathogen-host interaction process.

Difference of gene expression between upper and bottom side mycelia in liquid surface culture of *Cordyceps militaris* NBRC103752

○Suparmin Ahmad[1]
([1]Grad. Sch. Integ. Sci. Technol., Shizuoka Univ, [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ)

Key words *Cordyceps militaris*, mycelium, cordycepin, transcriptome

4P-J186 mRNA 切断部位の網羅的解析

○上野 大心, 山崎 将太郎, 出村 拓, 加藤 晃
（奈良先端大・バイオ）
kou@bs.naist.jp

外来遺伝子を細胞内で発現させる上で，mRNA の蓄積量を決定している転写の開始，伸長，終結，mRNA の分解などさまざまな過程の制御機構を理解することは非常に重要である．その中でも mRNA の安定性は，様々な生物学的プロセスにおいて mRNA の蓄積量を制御する重要な調節機構であることが報告されている．mRNA の安定性には，ポリ A 短縮，キャップ除去からの 5’-3’，3’-5’エキソヌクレアーゼによる分解，もしくはエンドヌクレアーゼによる切断からのエキソヌクレアーゼによる分解が大きく関与している．この中でエンドヌクレアーゼによる各 mRNA の切断率，すなわち分解率は mRNA 種により異なり，配列，もしくはその配列に依存した立体構造が切断部位および切断を規定していると考えられる．植物においては，切断部位を同定する網羅的な分解産物解析として Parallel analysis of RNA ends (PARE)が行われ，切断部位や microRNA のターゲット配列の同定につながっている．しかし，これらの解析では同一遺伝子内に存在する複数切断部位の同定や，蓄積 mRNA 量あたりの分解率の算出ができないなど，mRNA の配列的特徴，およびその立体構造に依存して，どのような重みで切断されているかを明らかにできていない．そこで本研究では，実験手法を改良し，次世代シークエンサーにより同一遺伝子内の複数切断部位を同定するとともに，各切断部位の量的な重み（切断率）についても数値化した．これらの解析により，導入する外来遺伝子について切断率が高いと予想される配列をあらかじめ除去することで，導入遺伝子の効率的発現に寄与すると考えられる．

Comprehensive analysis of mRNA degradation sites

○Daishin Ueno, Shotaro Yamasaki, Taku Demura, Ko Kato
(Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

Key words plant cell, mRNA stability, degradation sites, next generation sequencing

4P-J187 ゲノム情報に基づく微生物の安全性評価支援システム MiFuP Safety

○木村 明音, 牧山 葉子, 山本 美佳, 北橋 優子, 宮澤 せいは, 黄地 祥子, 市川 夏子, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）
kimura-akane@nite.go.jp

【目的】微生物を用いたバイオテクノロジー分野において，利用する微生物や微生物由来遺伝子の安全性評価は，産業上不可欠な要素である．安価で大量のゲノム塩基配列を決定する事が可能となった現状を鑑み，微生物のゲノム配列から有害性を推定する検索システム：Microbial Functional Potential Database for Safety（MiFuP Safety）を開発した（2017 年 10 月公開予定）ので報告する．
【方法】細菌で報告されている毒性，薬剤耐性等の有害性情報を，文献情報，法令，既存のデータベース等から選定し，関与する既知の遺伝子配列を収集した．収集した既知の遺伝子配列についてオーソログを検索可能とするために，相同性・モチーフについて検索条件を設定した．複数の遺伝子が有害性の発揮に必要であることが報告されている場合には，必要な遺伝子の組合せを「機能」として定義した．検索条件をデータベースに組み込み，ゲノム配列またはその部分配列から，遺伝子及び機能をオートマティックに検索可能とした．検証のために既知の遺伝子配列をクエリとして検索を実施し，ヒットすることを確認した．
【結果】毒性，薬剤耐性等に関連する 196 種類の遺伝子について検索条件を設定し，毒性に関連する 22 機能，薬剤耐性に関連する 25 機能，その他の有害性に関連する 4 機能について検索可能とした．加えて，有害性既知情報の解説ページを作成した．本システムを用いることにより，遺伝子配列情報から有害性情報を検索することを可能とし，微生物の安全性評価のツールのひとつとして利用されることを期待している．

MiFuP Safety: a search tool for functional potentials related to microbial risk information from genome sequences

○Akane Kimura, Yoko Makiyama, Mika Yamamoto, Yuko Kitahashi, Seiha Miyazawa, Shoko Ohji, Natsuko Ichikawa, Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words genome, micrbial risk infomation, MiFuP Safety

4P-J188 タンパク質合成反応を解析する大規模全成分計算機シミュレーターの開発と応用

○松浦 友亮[1], 清水 義宏[2]
（[1]阪大院・工, [2]理研・生命システム）
matsuura_tomoaki@bio.eng.osakak-u.ac.jp

タンパク質合成反応のような複雑な反応がどのような振る舞いを見せるかを理解し，さらに反応結果を予測することは，生命システムの動作原理の解明だけでなく，生命システムの産業利用にも重要である．タンパク質合成反応の数理モデルを開発し，計算機でシミュレーションを行う手法は，これまでに世界で複数のグループが，その複雑な事象を理解・予測するために用いてきた．しかし，従来のシミュレーションはタンパク質合成反応の分子種・反応数の多さのため，これを簡単化（粗視化）した数理モデルでしか行われていなかった．
我々は，最少成分からなるタンパク質合成反応で，全分子種の様子を観測可能とする数理モデルを世界で初めて開発した（Matsuura *et al., PNAS*, 2017）．以前に，東大のグループにより大腸菌由来のタンパク質合成反応に最小限必要な成分（最少成分）が実験で明らかにされている（Shimizu *et al., Nat Biotechnol*, 2001）．今回，我々は，これら最少成分を出発物質として３アミノ酸からなるタンパク質を合成する数理モデルを開発した．常微分方程式からなるこの数理モデルは，241 分子種，968 反応からなる大規模タンパク質合成反応シミュレーターであり，これにより世界で初めて，最少成分からなるタンパク質合成反応で全成分濃度の時間変化を観測することが可能となった．さらにこの数理モデルを用いてタンパク質合成反応のシミュレーションを行い，結果を詳しく検証し，実際の実験結果との整合性からシミュレーターの信頼性を示した．加えて，速度定数を網羅的かつシステマティックに変化させる事でタンパク質合成反応の律速段階・ボトルネックを明らかにした．今回の結果は，シミュレーターが再構成型無細胞翻訳系を用いた有用タンパク質生産量の向上指針の設計に有用である．

Reaction dynamics analysis of a reconstituted Escherichia coli protein translation system by computational modeling

○Tomoaki Mastuura[1], Yoshihiro Shimizu[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]QBiC, RIKEN)

Key words protein expression, bioinformatics

4P-J189 微生物叢解析のためのリファレンススタンダード（Mock Community）の作製

○三浦 隆匡, 平方 里美, 金 達英, 川﨑 浩子
（NITE・NBRC）
kawasaki-hiroko@nite.go.jp

【背景と目的】腸内細菌叢などのマイクロバイオーム解析は，健康管理，食品産業，医薬・診断分野と，その利用は広がりを見せている．本解析は，試料の採取にはじまり，輸送，DNA 抽出，シーケンス，データ解析までその工程は多岐に渡る．しかし，各工程における方法の違いが解析結果に大きく影響を与えることから，機関や個人毎の結果にばらつきが生じ，正確に他者の結果と比較できないのが現状である．その中でも，DNA 抽出方法の影響が最も大きいと言われている．そこで，本課題を解決する手段として，実験検証用のリファレンススタンダード（Mock Community）の開発とその提供を検討している．
【方法】Mock Community には，NBRC が保有する好気性菌を中心としたゲノム解読済みの 9 株を選抜し，株毎に至適培養条件で培養した後，集菌した細胞を希釈し，血球計算盤による細胞数を測定し，吸光度計にて検量線を作成した．加えて，CFU を計測し，血球計算盤による細胞数との相関を調べた．1 回の使用において，総細胞数が 108 個になるように各株を同数に調整して混合した．調製した Mock Community を用いて，Kim らの酵素法（DNA Research, 2013, 20, 241-253），5 種のビーズ破砕法と 2 種の化学的溶菌法を用いて DNA 抽出を行い，抽出 DNA 量の比較と，デジタル PCR による検証を行った．さらに，MiSeq を用いたアンプリコンシーケンスによる菌叢解析の傾向を比較した．
【結果と考察】調製した Mock Community を用いて DNA を抽出したところ，酵素法が最も抽出 DNA 量が多く，ビーズ破砕法の 4 キットでは化学的溶菌法の 2 キットよりも 2 倍以上の DNA が抽出されていた．デジタル PCR による検証結果では，手法による差異が大きいことが明らかになり，その違いが菌叢結果に影響を与えることが示唆された．現在，安定的な混合法についても検討しており，合わせて報告する．

Development of reference standard using mock community

○Takamasa Miura, Satomi Hirakata, Daryong Kim, Hiroko Kawasaki
(NBRC, NITE)

Key words microbial community, mock community, amplicon sequence, DNA extraction

4P-J190 微小液滴を用いて並列取得した微生物シングルセルゲノムデータに対する相互参照ゲノム解析法の開発

○小川 雅人[1,2], 西川 洋平[1], 森 一樹[2], 細川 正人[3,4], 竹山 春子[1,2,3]
（[1]早大・先進理工, [2]産総研・早大 CBBD-OIL, [3]早大・ナノライフ創新研, [4]JST・さきがけ）
haruo-takeyama@waseda.jp

シングルセルゲノム解析は，難培養性微生物を多く含む環境細菌叢に対して有用なゲノム解析手法となっている．しかしシングルセル解析で主に用いられるゲノム増幅手法である MDA 法において，増幅バイアスやキメラ配列および混入 DNA の増幅がランダムに生じるため，取得されるゲノム情報の質の低下が問題となっている．本研究では，複数のシングルセル情報を相互に参照し合うことでゲノムデータのクリーニングを行う解析手法を開発し，より高精度なゲノム配列の取得を目指した．
当研究室ではピコリットルサイズの微小液滴を用いたシングルセルゲノムの並列取得技術を開発してきた．当技術では液滴内にシングルセルを包埋することによって 1 分間に約一万の細胞を分離可能であり，各液滴内で個別にゲノム増幅を行うことでコンタミネーションの少ないゲノム情報が並列的に取得される．当技術を用いて，モデル微生物として大腸菌および枯草菌，環境サンプルとしてマウス腸内細菌のシングルセルゲノムを取得した．
本解析技術では，並列取得したシングルセル情報の相互参照によってキメラ配列および混入 DNA 配列が除去される．まずモデル微生物のシングルセルデータに対して相互参照ゲノム解析を行ったところ，キメラ配列の減少に伴い *de novo* アセンブリ結果の向上が確認された．さらに十分量のデータを用いた相互参照の結果，培養菌体から取得したものに匹敵する精度のゲノム情報がシングルセルデータから取得された．続いてマウス腸内細菌データを用いて相互参照ゲノム解析を行うことで，推定ゲノムカバー率 95%以上かつコンタミネーション 1.5%未満の，バクテロイデス門に属する 2 種類の高精度な新規ゲノムが取得された．微小液滴を用いたシングルセルゲノムの並列取得と相互参照ゲノム解析によって，種々の微生物の機能についての高速かつ詳細な解析が期待される．

Development of cross-reference genome analysis using single-cell genome data acquired by droplet-based genome amplification method

○Masato Kogawa[1,2], Yohei Nishikawa[1], Kazuki Mori[2], Masahito Hosokawa[3,4], Haruko Takeyama[1,2,3]
([1]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST, [3]Res. Org. for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [4]PRESTO, JST)

Key words single-cell analysis, microdroplet, multiple displacement amplification, bioinformatics

4P-J191 細胞画像情報を用いた凍結ストレスに対する幹細胞品質変化の評価

○松本 恵[1], 河合 駿[2], 岡田 真衣[2], 蟹江 慧[2], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1], 加藤 竜司[2]
（[1]名大院・工, [2]名大院創薬）
kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

ヒト間葉系幹細胞（hMSCs）は，採取が容易であるだけでなく多分化能を有するため，臨床再生治療に広く利用されている細胞源である．しかし，hMSCs は培養増幅を繰り返すことによって劣化や不均一性がもたらされ，また供給源や培養条件の違い，あるいはドナー個体の差によって増殖能や分化能のポテンシャルが異なることが知られている．
現状，培養工程における品質管理は，視覚的・経験的な顕微鏡観察だけで補われているおり，今後 hMSCs を商業化するためには定量性・作業量において限界が問題視されつつある．画像を用いる評価は非侵襲であるため，製品の出荷まで培養中の細胞をリアルタイムかつ繰り返し，ハイスループットに評価が可能である．我々は，hMSCs の増殖・維持培養において凍結・解凍処理という作業が与える hMSCs の品質への影響について，細胞形態の情報をもとに品質評価・予測が可能か検証した．本研究において，我々は増殖能と遺伝子発現プロファイルという２つ観点から良品質を定義し，細胞形態情報を用いた機械学習モデルを用いてこれらを高精度に予測することを検証した．また我々は今回の予測の中で，臨床施設において本手法を実装する場合に課題となる３つの実用的な条件についての最適化を行った：(1)画像解析に求められる最低必要データ量，(2)品質予測に必要な撮影期間，(3)新規来院患者の品質予測方法．本手法のような定量的な細胞状態の評価方法は，細胞培養における様々な品質の変化を記録・定量化することにつながり，細胞培養の標準化を実現するツールともなり得る．

Morphology-based evaluation of cellular quality change by cryopreservation stress

○Megumi Matsumoto[1], Shun Kawai[2], Mai Okada[2], Kei Kanie[2], Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1], Ryji Kato[2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words image-based analysis, mesenchymal stem cell, non-invasive analysis, cryopreservation

4P-J192 機能性遺伝子解析による自家熱型高温好気発酵プロセスの解明

○河野 祥尚, 朝倉 侑弥, 神田 昇佑, 田代 幸寛, 酒井 謙二
（九大院・生資環）
kensak@agr.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】福岡県築上町では，人の屎尿等を自家熱型高温好気発酵（ATAT）により液肥化し，作物栽培等に利用することによって資源の循環利用を行っている．細菌群集構造解析・理化学特性の先行研究から，本発酵が 3 段階に分けられる一方，アンモニア態窒素が全段階でほぼ維持されることが明らかとなっている．しかし，本発酵に寄与している微生物群集が有する機能性遺伝子に関連する知見は無い．そこで本研究では，ショットガンメタゲノミクスによる各発酵段階の機能性遺伝子の網羅的解析を行い，ATAT プロセスの詳細な解明を目的とした．
【方法】本実験の試料として，2014 年の 1 日目(1 段階目)，3 日目(2 段階目)，9 日目(3 段階目)および 2013 年の 3 日目(2 段階目)の発酵液を用いた．試料から抽出した DNA を酵素処理によりライブラリー調製を行い，その後 MiSeq に供した．得られたシーケンスデータについて，MG-RAST，KEGG のソフトウェアを用いて機能性遺伝子の存在量および各代謝経路の確認を行った．
【結果・考察】窒素代謝に関連する遺伝子は 1 段階目と比較して，2 段階目，3 段階目で減少した．その中でも，窒素固定に関連する遺伝子が存在したことから，窒素固定細菌が本過程におけるアンモニア態窒素の維持に寄与している可能性が示唆された．一方，脂肪酸，脂質，イソプレノイドの代謝と生合成に関する機能性遺伝子は発酵 3 段階目後半において大幅に増加したことにより，3 段階目で微生物がこれらを新たなエネルギー源として利用した可能性が示唆された．今後，ソフトウェアである STAMP を用いて各発酵段階の機能性遺伝子量の統計学的な比較をし，より正確な存在量の増減を明らかにする予定である．

Analysis of functional genes in autothermal thermophilic aerobic treatment process by metagenomics

○Yoshihisa Kawano, Yuya Asakura, Takahiro Kanda, Yukihiro Tashiro, Kenji sakai
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words metabolism, metagenomic libraries

4P-J193 発熱を指標とした嫌気性微生物の増殖過程の評価

○青木 奈緒子, 三宅 英雄
（三重大院・生資）
miyake@bio.mie-u.ac.jp

【目的と方法】嫌気性微生物の増殖過程の測定には，一般に煩雑な操作が伴い，更に菌体や培地が凝集・沈殿すると OD 測定では困難となる．我々は先に，可溶性の炭素源を用いたときの４種の嫌気性 *Clostridium* 属細菌の増殖過程において，増殖時の発熱が増殖過程を追跡する好個の指標となることを示した．本研究では，水に不溶性の炭素源を用い，*Clostridium* 属細菌の中でブタノール生産菌やセルロソーム生産菌の増殖過程を熱測定法により測定するとともに，並行して OD および ATP 量の測定を行った．これらの結果を比較することで熱測定の有用性を検討した．サンプルは，密栓式バイアルに，デンプンまたは結晶セルロースを含む培地を加えて嫌気状態にし，各菌種を植菌した．熱測定では，これを直ちに多試料等温型熱量計に収容し，増殖に伴う発熱過程を測定した．
【結果と考察】セルロソーム生産菌を結晶セルロースを含む培地で培養すると，OD 値の経時変化は不規則であった．一方，発熱過程を示すサーモグラムと ATP 量の経時変化は一般的な増殖曲線を示し，また両者には高い相関が見られた．ブタノール生産菌をデンプンを含む培地で培養した場合も同様の結果が得られた．この場合，サーモグラムでも ATP 量測定においても，培養初期においてスパイク状のシグナルが見られた．培地に含まれる糖を TLC で分析したところ，このスパイクは培地中の二糖類の速やかな消費に対応することが示された．
以上のことから，嫌気性細菌を不溶性の基質で培養しても，熱測定法を用いると増殖過程を簡便で精度よく測定できた．また，熱測定は ATP 測定に匹敵するほどの高感度で測定することができ，凝集や沈殿の影響を受けないことから微生物増殖過程の測定法として有望であることが示された．

Evaluation of the growth process of anaerobic microbes using calorimetry

○Naoko Aoki, Hideo Miyake
(Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

Key words *Clostridium*, calorimetry, anaerobes, growth processes

4P-J194 無細胞反応系を用いた抗菌剤検出のための紙基板バイオセンサーの開発

○氏家 和紀[1], 松浦 秀幸[1], Tran Thi My Duyen[1,2], 原田 和生[1], 平田 收正[1]
（[1]阪大院・薬, [2]カントー大・水産）
hmhide@phs.osaka-u.ac.jp

[背景・目的] 合成生物学の進展に伴い，生体高分子等を自在に組み合わせる構成論的アプローチにより，医療や環境分野において利用可能な分析デバイスを作製する試みがなされてきた．しかしそれらの多くは，細胞に人工設計回路を組み込んだものであり，バイオハザード等の観点から社会実装に向けた課題は多い．ところが近年，MIT のグループにより，人工回路などを含む無細胞反応系，しかも扱いづらさや安定性に難のある液相の反応系ではなく，紙に埋め込まれた反応系を利用した紙基板分析デバイスという新しいコンセプトが示された．本研究ではそのコンセプトを応用し，特に発展途上国において問題となっている残留抗菌剤（サルファ剤，アミノグリコシド系抗菌剤）を対象とするバイオセンサーを，複数の酵素反応やカスケード反応を紙に埋め込むことで開発した．
[結果・考察] サルファ剤センサーは，サルファ剤の作用点である葉酸生合成酵素の一種 DHPS の触媒作用によりサルファ剤依存的に放出される無機ピロリン酸を ATP に変換し，続いて ATP 依存的なルシフェラーゼ発光反応が進行する一連の酵素反応システムを紙に埋め込むことで構築した．一方，バクテリアのリボソームに作用するアミノグリコシド系抗菌剤を対象とするセンサーは，無細胞転写翻訳系を利用した T3 RNA polymerase (T3 RNAP)の合成と T3 RNAP を介した発光タンパク質 NanoLuc の合成反応系を紙に埋め込むことで構築した．これら反応系を，紙上に印刷された複数のワックス円内の反応スポットに添加し凍結乾燥した．これらセンサーの出力シグナルは，プレートリーダー等の高価な機器を使用する必要がなく，市販のデジタルカメラを用いることで十分に検出・識別できた．本研究の成果は，各種資源に乏しい地域で利用可能な，安価かつ簡便な分析デバイス開発への道を拓くものであると期待される．

Development of paper-based biosensors using cell-free system for detection of antibiotics

○Kazuki Ujiie[1], Hideyuki Matsuura[1], My Duyen Tran Thi[1,2], Kazuo Harada[1], Kazumasa Hirata[1]
([1]Grad. Sch. Pharm. Sci., Osaka Univ., [2]Coll. Aquaculture Ficheries, Can Tho Univ.)

Key words biosensor, synthetic biology approach, antibiotics, paper-based analytical device

4P-J195 Microsystem for viral disease detection

○Seri Choi[1], Soojeong Shin[3], Eunwon Lee[1], Kwanhun Lim[2], Sunyoung Lee[2], Hae Joon Park[2], Jong Wook Hong[1,3]
([1]Dept. Bionano. Technol., Grad. Sch., Hanyang Univ., [2]Dept. MDx., SD Biosensor, Inc., [3]Dept. Bionano. Eng., Hanyang Univ.)
jwh@hanyang.ac.kr

Recently, the importance of early diagnosis was emphasized by viral diseases. The point-of-care testing (POCT) kit is now being used for early diagnosis whether the virus is present or not. If quantitative detecting method is adopted into this POCT kit by molecular diagnosis such as ELISA and PCR, it is useful for speedy virulent characterization as well as decision of drug concentration. Here, we present a molecular diagnosis microchip for early diagnosis kit. To verify the chip, we used fish virus and human viruses such as VHSV and Zika, Dengue and Chikungunya, respectively. The developed chip for VHSV can control each step from the sample injection to the validation, using the pneumatic valve system. Only a few microliter of virus sample is need to generate the logarithmic gradient in a chip, but accurate detection is possible under the various condition in a single experiment. We also developed a POCT system for the qualitative and rapid diagnosis of Zika, Dengue and Chikungunya virus using isothermal nucleic acid amplification. These viruses recently caused large outbreaks in many Pacific Island Countries and Areas, associated with congenital diseases and neurological complications. Our system is particularly suitable to overcome the disadvantages of in-situ diagnostic tests in various environments through the development of POCT system for field diagnosis. These viral detection microsystems were able to detect virus using a trace amount of sample and confirm reproducibility.

Microsystem for viral disease detection

○Seri Choi[1], Soojeong Shin[3], Eunwon Lee[1], Kwanhun Lim[2], Sunyoung Lee[2], Hae Joon Park[2], Jong Wook Hong[1,3]
([1]Dept. Bionano. Technol., Grad. Sch., Hanyang Univ., [2]Dept. MDx., SD Biosensor, Inc., [3]Dept. Bionano. Eng., Hanyang Univ.)

Key words molecular diagnosis, microchip, virus detection

4P-N196 Biosynthesis of caffeic acid-based melanin polymer from L-Tyrosine in *Escherichia coli*

Jang Seyoung[1], Yang Yung-Hun[2], Kim Yun-Gon[3], ○Choi Kwon-Young[1]
([1]Dept. Environ. Eng., Ajou Univ., [2]Dept. Micr. Eng., Konkuk Univ.,, [3]Dept. Chem. Eng., Soongsil Univ.)
kychoi@ajou.ac.kr

Melanin is one of the naturally occurring pigment which is generally synthesized through polymerization of dopaquinone derived from L-tyrosine. It has attracted great attention for their various applications as coating materials, cosmetic additives, and even textile pigments because of their well-known protective function from UV damage. And its production has been of great interest as well. Herein we have developed ecofriendly method to prepare novel melanin using Escherichia coli BL21(DE3) cells expressing L-tyrosine converting enzymes of tyrosine ammonia lyase (TAL), p-coumarate 3-hydroxylase (C3H), feruloyl-CoA synthase (FCS), and enoyl-CoA hydratase/aldolase (ECH). Using the generated biotransformation cells, L-tyrosine was converted into caffeic acid by TAL and C3H enzyme, followed by CoA-dependent deacethylation by FCA and ECH enzyme simultaneously. In results, caffeic acid-based melanin formation was observed with production rate of 40.9 ± 6.2 mg/L/h. This is the first report regarding the caffeic acid-based melanin polymer in E. coli strain using FCS and ECH as far as we know, and these results will provide new possibilities for melanin pigment based industrial applications.

Biosynthesis of caffeic acid-based melanin polymer from L-Tyrosine in *Escherichia coli*

Jang Seyoung[1], Yang Yung-Hun[2], Kim Yun-Gon[3], ○Choi Kwon-Young[1]
([1]Dept. Environ. Eng., Ajou Univ., [2]Dept. Micr. Eng., Konkuk Univ.,, [3]Dept. Chem. Eng., Soongsil Univ.)

Key words L-tyrosine, melanin, fcs/ech, ecofriendly synthesis

4P-J197 放線菌由来生理活性物質が植物および植物病原菌に与える影響

○前田 みのり, 大池 達矢, 岡南 政宏, 松川 哲也, 梶山 慎一郎, 阿野 貴司
（近畿大院・生物理工・生物工）
tano@waka.kindai.ac.jp

【背景と目的】世界的な人口増加に伴い，農業における生産性向上の観点から，作物に悪影響を与える植物病原菌の防除が重要視されている．近年，化学農薬の代替案として，生物農薬が注目されている．植物病原菌の防除に微生物を利用する微生物農薬については， IPM (Integrated Pest Management) の観点から，様々な防除手法と併用可能な微生物農薬候補株が探索されている．これまでの研究により，当研究室保有の放線菌が数種類の植物病原菌に対して抗真菌活性を示すことが対峙培養の結果確認された．これらの放線菌の微生物農薬としての有用性を検討するにあたり，植物病原菌のみならず，植物への影響も調査する必要があると考え，本研究では，放線菌単離株が生産する生理活性物質についての知見を得ることを目的とした．
【方法と結果】放線菌単離株 12 種を用いて，それぞれ揮発性物質(VOC; Volatile Organic Compounds) による抗真菌活性試験を行った．放線菌培養液あるいは胞子懸濁液 100 μL を培地に全面塗布し，室温にて数日間培養した．その後 *Rhizoctonia solani* や *Fusarium oxysporum* など 9 種の植物病原菌の寒天片を植菌した PDA 培地と上下で組み合わせた．以降経過観察を行い，植物病原菌の生育をコントロール区と比較して抑制率を求めた．その結果，放線菌単離株を植菌した処理区では植物病原菌の生育が抑制された．また，放線菌単離株を植菌した場合の植物への作用を様々な条件下で調べたところ，単離株によっては植物生長を促進する PGP (Plant Growth Promoting) 効果を始めとする様々な効果を示すという結果が得られた．特に放線菌単離株由来の VOC については現在 GC-MS 分析による検討を行っている．

Effect of bioactive compounds derived from actinomycetes on plants and phytopathogens

○Minori Maeda, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Tetsuya Matsukawa, Shin'ichiro Kajiyama, Takashi Ano
(Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

Key words actinomycetes, bioactive substances, phytopathogens

4P-F198 スクアレン―アンブレイン環化酵素の創出：アンブレインはスクアレンから 2 つの経路を通して 1 つの酵素によって合成できる

○上田 大次郎, 奥野 琴音, 星野 力, 佐藤 努
（新潟大・自然研）
satot@agr.niigata-u.ac.jp

【背景】
我々は，一連のセスクアテルペンの生合成酵素の同定・酵素機能解析研究の過程で，*Bacillus* 属細菌由来の二機能性テルペン環化酵素（TC）を発見し，オノセロイド（スクアレンが両末端環化された化合物）合成酵素であることを証明した．また，片側が環化されていても残りの鎖状部分を環化するという新機能と，以前研究室で得られていた変異型スクアレン-ホペン環化酵素（SHC）を組み合わせることで，安価なスクアレンから希少物質であるアンブレインを 2 段階で合成する事に成功した．しかし，TC が触媒する 2 段階目の反応収率が低い（約 4%）問題点があった．

【結果】
2 段階目の収率を改善するため，様々な酵素反応条件を検討した結果，界面活性剤に Tween80 を使用し，酵素反応時に 0.1% アスコルビン酸を添加した条件では収率が以前の 2 倍に増加した．また，今まで 16 時間で酵素反応を行っていたが，TC は 64 時間までアンブレインを継時的に生産する事が分かり，従来の 13 倍である 27.1%まで収率が向上した．
さらなる収率向上を目指し，1 つの酵素でスクアレンからアンブレインを生産するような TC の変異酵素と新たな合成経路の探索を試みた．結果として，D373C 変異体において，対称構造のスクアレンからアンブレインのような末端に単環と二環骨格をもつ非対称化合物を 1 つの酵素で合成でき，1 つの基質から 1 つの生成物への反応が 2 つの中間体を経ることが判明した．「1 酵素 2 骨格形成反応」を触媒する酵素は前例がなく，新しい酵素触媒反応の反応モデルになることが期待される．
今回，スクアレンから二つの系を得てアンブレインを合成するスクアレン - アンブレイン環化酵素の創出に成功した．しかし，収率は未だ低いのが現状であり，さらなる改善を目指した研究を進行中である．

Creation of squalene-ambrein cyclase: ambrein can be synthesized from squalene by one enzyme through two pathways

○Daijiro Ueda, Kotone Okuno, Tsutomu Hoshino, Tsutomu Sato
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words terpenoid, biosynthesis, Ambrein

4P-J199 ポリプレニルアセトン類の生合成：活性酸素によるメナキノンの非酵素的開裂反応

○松ヶ根 沙織[1], 上田 大次郎[1], 岡本 渉[1], 橋本 昌征[2], 佐藤 努[1]
([1]新潟大・自然研, [2]成功大・分子医学研)
satot@agr.niigata-u.ac.jp

ポリプレニルアセトン類（C_5×n + C_3）の中には甲殻類ホルモンや昆虫フェロモンなどの生理活性物質が知られているが，生合成については未だ知られていない．今回，我々は，*Bacillus* 属細菌のテルペノイドの探索から，ポリプレニルアセトン類である C_{33} のファルネシルファルネシルアセトン（FFA）を天然物として初めて単離・構造決定したところ，メナキノン-7（MK-7）のケン化処理によって FFA を生産できることが分かった．生成機構の解析から，MK-7 が活性酸素（スーパオキシドアニオン：O_2^-）によって開裂して非酵素的に FFA を生成することが示唆された．枯草菌内においても同様な非酵素反応によって FFA が生成するのかどうか枯草菌破壊株を用いて解析した．MK-7 生合成遺伝子破壊株（*ΔmenA* と *ΔmenB*）が FFA を生産しなかったことから，枯草菌内においても MK-7 が FFA の前駆体であることが強く示唆された．O_2^-を分解する酵素（スーパーオキシドディスムターゼ）の遺伝子破壊株（*ΔsodA*）を高温度と低 pH のストレスにさらす実験を行った結果（両ストレスによって *Bacillus* 細胞内で O_2^-が増加することは既に報告されている），両ストレス条件下で FFA の増加が確認された．以上のことから，枯草菌内においても O_2^-が MK-7 を攻撃して FFA を生産していることが示唆された．ポリプレニルアセトン類の生合成機構として酵素反応が提唱されているが，非酵素反応は初めての例である．

Biosynthesis of polyprenylacetone : nonenzymatic cleavage reaction of menaquinone by superoxide

○Saori Matsugane[1], Daijiro Ueda[1], Wataru Okamoto[1], Masayuki Hashimoto[2], Tsutomu Sato[1]
([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]National Cheng Kung University)

Key words Polyprenylacetone, menaquinone, reactive oxygen species

4P-J200 放線菌 *Streptomyces rochei* の二次代謝を誘導するシグナル分子 SRB の生合成に関わる P450 モノオキシゲナーゼ SrrO の生理学的・生化学的解析

○手島 愛子, 波多江 希, 津田 直人, 荒川 賢治
(広島大院・先端物質)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は，シグナル分子 SRB がリセプター SrrA と結合し，アクチベーター SrrY の転写を活性化することで抗生物質ランカサイジン（LC）・ランカマイシン（LM）生産を厳密に制御している．当研究室ではこれまでに，シグナル分子 SRB1 および SRB2 の化学構造を決定している．本研究では，*S. rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍の，P450 モノオキシゲナーゼ遺伝子 *srrO* に着目した．我々はすでに，*srrO* が 6'位の酸化反応に関与していることを明らかにしており，今回はさらに 6'-deoxo-SRB の基質合成による構造確認，SrrO の基質特異性および 6'-deoxo-SRB の誘導活性について詳述する．
まず，1,6-ヘキサンジオールを出発物質として化学合成を行い，得られたシグナル分子の化学構造を ^{1}H-NMR で確認したところ，Δ*srrO* 株から得られた天然物と一致した．
次に SrrO の分子認識機構を解明するために，キラル HPLC 解析を行い，6'-deoxo-SRB1 の C-1'位ヒドロキシ基における立体構造異性体，すなわち(1'*R*)(1'*S*)体の両者とも SrrO によって認識され，同程度の変換効率にて SRB1 に変換されることを確認した．また，MS 解析により経時変化的に 6'-hydroxy-deoxo-SRB1 を経て，SRB1 に変換されることも確認できた．以上により，C-1'位の立体化学は SrrO の分子認識に無関係であることを明らかとした．
本発表では SRB 誘導活性も含めて報告する．

Physiological and biochemical properties of analysis of a P450 monooxygenase SrrO involved in the biosynthesis SRB, an inducer of secondary metabolites in *Streptomyces rochei*

○Aiko Teshima, Nozomi Hadae, Naoto Tsuda, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words biosynthesis, regulatory gene, secondary metabolite

4P-J201 Plasmid-assisted random genome deletion in *Streptomyces rochei* affects secondary metabolites production

○Yosi Nindita, Amirudin Akhmad Fauzi, Yiwen Zhang, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

Streptomyces rochei 7434AN4 produces two antibiotics lankacidin C (LC) and lankamycin (LM), and carries an 8.36 Mb of linear chromosome and three linear plasmids pSLA2-L (211 kb), pSLA2-M (113 kb), and pSLA2-S (18 kb). These biosynthesis gene clusters are located on pSLA2-L. Our previous study revealed that all of plasmidless mutants of 7434AN4 (2-39, YN-P7, and YN-P145) underwent chromosomal circularization following chromosomal telomere deletion. It is noteworthy that each of the plasmidless mutants shows variable phenotypes, including altered morphological differentiation. In this study, we focus on the effects of chromosomal rearrangement on the secondary metabolites production in *S. rochei* plasmidless mutants.

In order to compare the metabolite production profile, each of the plasmidless strain was cultured in different medium. TLC analysis showed several additional UV-active compounds in plasmidless mutants. Among them, strain YN-P145 produces cyclo(Phe-Pro), a cyclodipeptide compound with antifungal properties, when inoculated in oatmeal medium. Generally, cyclodipeptides in actinomycetes are synthesized through either aminoacyl-tRNA-utilizing enzyme or NRPS. Further analyses on cyclo(Phe-Pro) biosynthesis pathway in *S. rochei* 7434AN4 as well as other additional UV-active compounds will be described.

Plasmid-assisted random genome deletion in *Streptomyces rochei* affects secondary metabolites production

○Yosi Nindita, Amirudin Akhmad Fauzi, Yiwen Zhang, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words genome deletion, silent secondary metabolites

4P-F202 多価不飽和脂肪酸合成酵素における 3-ケトアシルリダクターゼとデヒドラターゼの機能解析

○林 祥平[1], 佐藤 康治[2], 小笠原 泰志[2], 氏原 哲朗[3], 大利 徹[2]
([1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]協和発酵バイオ)
dairi@eng.hokudai.ac.jp

[目的] ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA) に代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA) には健康増進効果が知られており，その需要は年々増加している．現在の主な PUFA 供給源は魚油等の海洋資源であるが，海洋資源の枯渇や安定供給が問題となっており，新たな供給源として微生物発酵が期待されている．ある種の海洋性微細藻類や細菌は PUFA をポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体（PUFA 合成酵素）により生合成することが知られている．しかし，巨大酵素であるため，組換え酵素を用いた *in vitro* 解析は困難であり，酵素の詳細な機能解析に関する報告は少ない．そこで本研究では 3-ketoacyl-ACP reductase (KR) と 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase (DH) ドメイン部分のみを発現，精製し，*in vitro* 反応を行い，機能解析を試みた．
[方法及び結果] *Photobacterium profundum* 由来 EPA 合成酵素のサブユニット A にある KR とサブユニット C にある DH のドメイン部分の組換え酵素を調製した．アシル ACP 基質を用意することが困難であるため，acetoacetyl-S-N-acetyl cysteamine (SNAC)，3-hydroxy-butyryl SNAC，crotonyl SNAC を合成し基質とした．それぞれの基質と対応する組換え酵素を用いて *in vitro* 反応を行い，LC/MS で解析した．その結果，それぞれのドメイン機能に対応する生成物が認められ，各ドメインは単独で発現でき，対応した触媒機能を有していることが確認された．

Functional analysis of 3-ketoacyl reductase and dehydratase domains in polyunsaturated fatty acid synthases

○Shohei Hayashi[1], Yasuharu Satoh[2], Yasushi Ogasawara[2], Tetsuro Ujihara[3], Tohru Dairi[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Kyowa Hakko Bio Co., LTD.)

Key words polyunsaturated fatty acid, 3-ketoacyl-ACP reductase, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, polyunsaturated fatty acid synthase

4P-J203 大腸菌による Ergothioneine の発酵生産

大澤 怜[1], ○上出 倫敬[1], 佐藤 康治[2], 河野 祐介[3], 大津 厳生[3], 大利 徹[2]
（[1]北大院・総合化学, [2]北大院・工, [3]筑波大）
dairi@eng.hokudai.ac.jp

＜背景と目的＞ Ergothioneine（ERG）はヒトをはじめ多くの生物に存在する含硫アミノ酸で高い抗酸化作用を示す．ヒトはその生合成経路をもたないが，ERG 特異的トランスポーター（OCTN1）で積極的に取込むことから，生命維持において重要な化合物と考えられている．現在，化粧品やサプリメント用にキノコ抽出物が利用されているが含有量は低く，新たな供給法が望まれていた．しかし生合成遺伝子を含め，ERG 生合成経路の詳細は長らく不明であった．このような背景下，2010 年に ERG を生産することが知られている *Mycobacterium smegmatis* から 5 個の遺伝子からなる ERG 生合成遺伝子クラスター（*egtABCDE*）が取得，解析され ERG の生合成経路が明らかにされた．そこで本研究では，ERG 生合成経路を再構築した大腸菌による発酵生産について検討した．
＜結果と考察＞ ERG の発酵生産には各生合成酵素の高発現が必須である．しかし，ERG 生合成中間体は入手困難であり，各酵素の活性を測定することは困難であったため，各酵素を可溶性に発現できる条件を確立し ERG の生産性を評価した．5 つの酵素のうち，EgtA は大腸菌も持つ γ-glutamylcysteine（γGC）合成酵素であるため，EgtB～E について各種プロモーターや可溶化のための融合タグを検討し，個々の酵素の高発現条件を確立した．
確立した条件下では 47 μM の ERG の生産性が得られたが，初発中間体である hercynine が著量蓄積していることが判明した．したがって hercynine を基質に用いる EgtB が律速反応であり，もう一方の基質である γGC の供給不足が示唆された．そこで供給強化を種々試み，最終的に 260 μM の ERG 生産性を達成した．以上，大腸菌を用いた ERG の発酵生産に成功するとともに代謝工学的アプローチによる生産性の向上も達成した．

Engineering of *Escherichia coli* for ergothioneine production

Ryo Osawa[1], ○Tomoyuki Kamide[1], Yasuharu Satoh[2], Yusuke Kawano[3], Iwao Ohtsu[3], Tohru Dairi[2]
([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [3]Univ. Tsukuba)

Key words ergothioneine, *Escherichia coli*, metabolic engineering

4P-N204 Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Helicteres angustifolia* L. root

○Shuang Sun, Long Xiao, Xi Yang, Kazuya Shimizu, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)
zhang.zhenya.fu@u.tsukuba.ac.jp

Helicteres angustifolia L., namely “Shan Zhi Ma” in Chinese, is a traditional medicinal herb widely distributed in China, Japan, Laos and Australia. Although numbers of studies have been conducted on this plant to explore its anticancer, antidiabetic and antivirus compounds, until now less attention has been paid to its polysaccharides separation and immunomodulatory activity identification. In the present study, crude polysaccharides from this plant were extracted, and used for fractionation by using column chromatography. According to the evaluation on its immunomodulatory activities, the polysaccharide fractions were found to strongly enhance macrophages proliferation, induce the phagocytic capacity, and stimulate nitric oxide and cytokines production, which followed a dose-dependent manner. In this work, a correlation was also established between these bioactivities and polysaccharides structure and chemical compositions.

Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Helicteres angustifolia* L. root

○Shuang Sun, Long Xiao, Xi Yang, Kazuya Shimizu, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang
(Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words *Helicteres angustifolia* L., immunomodulatory activity, polysaccharide, purification

4P-N205 *Bacillus cereus* は PHA 合成遺伝子クラスターに *R*-ヒドラターゼ遺伝子を有する

○木原 崇博[1], 廣江 綾香[2], 水野 康平[3], 柘植 丈治[1]
（[1]東工大院・物質理工, [2]農工大, [3]北九州高専）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

＜緒言＞ 微生物が炭素貯蔵物質として蓄積するポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は，生分解性，熱可塑性，生体適合性を有するバイオポリエステルとして利用できる．*Bacillus* 属の PHA 合成遺伝子クラスターについて比較すると，*B. cereus* などでは PHA 合成遺伝子クラスターに R-特異的エノイル CoA ヒドラターゼ（*R*-ヒドラターゼ，PhaJ）と高い相同性を示す遺伝子が存在するのに対し，*B. megaterium* などではその遺伝子がないことがわかってきた．本研究では，独自に分離した *B. cereus* YB-4 と DSMZ から入手した *B. thuringiensis* について，PhaJ の機能解析を行ったので報告する．
＜実験＞組換え大腸菌を用いて，PhaJ を含む粗酵素液を調製し，炭素鎖数 4 または 8 のエノイル CoA を基質として，その消費を吸光度測定(263 nm)で追跡した．PhaJ のモノマー供給能を解析するために，幅広いモノマーを重合できる *Pseudomonas* sp. 61-3 由来 PHA 重合酵素（$PhaC1_{Ps}$）と大腸菌内にて共発現させ，炭素鎖数 12 の脂肪酸から PHA を合成した．PHA 含有量と PHA モノマー組成は，ガスクロマトグラフィーにより決定した．
＜結果・考察＞ *B. cereus* 由来および *B. thuringiensis* 由来の PhaJ を発現させた粗酵素液では，C4 のエノイル CoA に対するヒドラターゼ活性は 9.6～10.4 U/mg であったのに対して，C8 のエノイル CoA では活性が観察できなかった．組換え大腸菌内での PHA モノマー供給能の解析では，PhaJ 非発現株では大腸菌に内在する中鎖型 R-ヒドラターゼの働きにより若干量の中鎖 PHA を合成したが，PhaJ 発現株では，3HHx(C6)を中心とした短鎖モノマーの分率が増加し，PHA 含有率も 22～27 wt%まで増加した．このことから *B. cereus* 由来および *B. thuringiensis* 由来の PhaJ は，PHA 合成における短鎖モノマー供給酵素として機能することが示唆された．

***Bacillus cereus* and its relatives possess *R*-hydratase to supply short chain-length PHA monomer.**

○Takahiro Kihara[1], Ayaka Hiroe[2], Kouhei Mizuno[3], Takeharu Tsuge[1]
([1]Dept. Mat. Sci. Eng., Tokyo Tech, [2]Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Kitakyushu Natl. Coll. Technol.)

Key words PHA, *Bacillus* sp., monomer supplier

4P-N206 不飽和ユニットを含む中鎖ポリヒドロキシアルカン酸の生合成

○黄 鵬涛, 大越 鷹哉, 廣江 綾香, 柘植 丈治
（東工大物質理工）
tsuge.t.aa@m.titech.ac.jp

【背景と目的】PHA は，自然界に存在する微生物によって分解される生分解性プラスチックであるため，環境に調和する高分子材料としての利用が期待されている．PHA は側鎖構造の違いにより多様性が存在し，側鎖に官能基を導入することで様々な機能性を付加できることが報告されている．*Pseudomonas* 属の細菌においては，糖や脂肪酸などを単一炭素源として培養すると，側鎖に不飽和結合を有する PHA を合成することが知られている．その上，側鎖の不飽和結合に化学修飾を行うことで官能基の付加が可能である．本研究では，各種類の *Pseudomonas* 属の細菌を用いて，培養条件（炭素源，培養温度など）を変えて不飽和モノマーを含む中鎖 PHA の生合成を検討した．また，本研究ではより簡便な方法で PHA 不飽和モノマーの存在とその不飽和結合位置の確認を行った．
【方法】各種類の *Pseudomonas* 属菌株は，炭素源を含む無機塩培地にて各培養温度で振とう培養した．PHA 含有率は GC により分析した．また，不飽和結合に DMDS を付加し，ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) の分析により，不飽和位置で分子が開裂することを利用した不飽和位置の特定法を導入し, PHA 不飽和モノマーの検出とその不飽和結合位置の確認を行った．
【結果と考察】三種類の *Pseudomonas* 属菌株が合成する PHA に関しては，30℃の培養温度で，炭素数 12 の 5 位および 6 位炭素の間に二重結合を有する PHA モノマー (3H5DD)を検出した．一方，同じの培養温度で *P. citronellolis* は，オレイン酸 (C18:1, Δ9) あるいはオレイン酸と糖類の混合炭素源を使用した際に，3H5DD と炭素数 14 の 5 位および 6 位炭素の間に二重結合を有する PHA モノマー (3H5TD)を確認した．20℃の培養温度でグルコン酸を炭素源として培養した時に，最も高い不飽和モノマー分率が得られた．今後，不飽和 PHA の応用に関する実験も行う予定である．

Biosynthesis of medium chain length polyhydroxyalkanoate containing unsaturation monomers.

○Pengtao HUANG, Takaya OKOSHI, Ayaka HIROE, Takeharu TSUGE
(Dept. Mater. Sci. Eng. Sch. Mater. Chem. Tech, Tokyo Tech)

Key words medium chain length polyhydroxyalkanoate, unsaturated monomers, GC-MS

4P-N207 ゴシポール配糖体の開発とその分光学的特性

○中村 真基[1], 天野 善継[1], 長谷川 輝明[2,3]
（[1]東洋大院・生命, [2]東洋大・生命, [3]東洋大・バイオナノ）
t-hasegawa@toyo.jp

綿実中に大量に含まれるゴシポールは，病原性真菌および昆虫に対する植物の防御システムとしての役割を有している．ゴシポールには精巣毒性をはじめとする人体への有害な生理活性もあるため，食用綿実油製造において除去すべき毒性不純物とされてきた．しかし近年，ゴシポールが HIV-1 や H_5N_1 インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性，抗がん活性などを有することがわかってきた．この点において，種々のゴシポール誘導体の開発は医薬品化学において非常に興味深い研究テーマである．特に，ゴシポール骨格への糖鎖の導入によって部位・細胞特異性を付与することは極めて興味深い．しかし，ゴシポール配糖体についてはこれまでほとんど研究されていない．我々は本研究において，有機化学的に合成した *p*-アミノフェニルマルトシドとゴシポールとを溶媒中で混和することにより，分子内に二つのマルトシドを有するゴシポール誘導体を合成した．また同様にして分子内に二つのラクトシドを有するゴシポール誘導体も合成した．各種分光学的特性を評価したところ，ゴシポールは極大吸収波長が 374 nm，極大蛍光波長が 505 nm であるのに対し，本研究で得られたゴシポール誘導体は極大吸収波長が 444 nm，極大蛍光波長が 510 nm であることが判った．

Synthesis and spectroscopic properties of gossypol glycosides

○Masaki Nakamura[1], Yoshitsugu Amano[1], Teruaki Hasegawa[2,3]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [2]Dept. Life Sci., Toyo Univ., [3]Bio-Nano Electronics Res. Centre, Toyo Univ.)

Key words gossypol, glycosylation, schiff base

4P-N208 シッフ塩基を連結部位として有するゴシポール配糖体の合成とその機能

○天野 善継[1], 白石 晋也[3], 塩澤 伸哉[2], 矢野 友啓[4], 萩尾 真人[3], 長谷川 輝明[3,5]
（[1]東洋大院・生命, [2]東洋大院・食環, [3]東洋大・生命, [4]東洋大・食環, [5]東洋大・バイオナノ研究セ）
t-hasegawa@toyo.jp

ゴシポール（Gos）は，綿実中に大量に含まれるテルペノイドであり，抗菌・殺虫作用および抗酸化作用によって植物の防御機構の一端を担っている．他方で，Gos は抗ガン作用や男性に対する避妊作用を示すことが報告されている．Gos が有する生理活性を薬学分野に応用することは非常に興味深い．Gos はそのアルデヒド基に由来する細胞毒性を有するとともに水溶性が極めて低く，これらの問題を解決することが，Gos を医薬品として応用するためには必須である．我々は，Gos のアルデヒド基に親水性の糖鎖を修飾することにより，上記 2 つの問題を同時に解決することを考えた．糖修飾により，糖鎖が有する細胞・部位標的性を Gos に付与できることも利点である．本研究では，ガラクトース（Gal）/ラクトース（Lac）/グルコース（Glc）/マルトース（Mal）を出発原料に，アセチル化およびアノマー位のブロモ化，および N-ヒドロキシスクシンイミドを用いたグリコシル化，さらにはヒドラジンを用いたスクシンイミド基とアセチル基の同時脱保護を経て，これらの糖のオキシアミノ配糖体を合成した．その後，市販の綿実由来 Gos と混和することにより，βGal/Lac/Glc/Mal 修飾 Gos（βGosGal，βGosLac，βGosGlc，βGosMal）を合成した．ヒト大腸癌由来細胞である DLD-1 およびヒト肝癌由来細胞である HepG2 に対する βGosGal，βGosLac，βGosGlc，βGosMal の IC_{50}（DLD-1/HepG2）はそれぞれ 77.3/59.0 μM，46.4/47.2 μM，50.4/77.5 μM，33.2/42.0 μM と極めて低い濃度であった．同時に，これらの結果は βGal/Lac が有する肝細胞標的性がゴシポールに付与されたことを示唆している．

Synthesis of gossypol Schiff bases having two carbohydrate units and their bioactivities

○Yoshitsugu Amano[1], Shinya Shiraishi[3], Nobuya Shiozawa[2], Tomohiro Yano[4], Masahito Hagio[3], Teruaki Hasegawa[3,5]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [2]Grad. Sch. Food Nutr. Sci., Toyo Univ., [3]Fac. Life Sci., Toyo Univ., [4]Fac. Food Nutr Sci., Toyo Univ., [5]Bio-nano Electron. Res. Center, Toyo Univ.)

Key words gossypol, glycosylation, antitumor, apoptosis

4P-J209 グリーンオルガノゲルの創製と応用

○白米 優一[1], 芦内 誠[2]
（[1]愛媛大院・連合農, [2]高知大・農）
ashiuchi@kochi-u.ac.jp

【背景】一般にゲルは湿潤で膨潤性を帯びている．分散媒を水とするものをハイドロゲル，有機溶媒とするものをオルガノゲルと呼ぶ．なかでもオルガノゲルは自重量よりもはるかに大量のオイルや有機溶媒を封じ込める特性をもつため，エネルギーやエレクトロニクス，環境等の多様な先端産業で注目され始めた新素材である．ただし，その開発の歴史は浅く，適用可能基材の種類も限られていた．これまでの適用基材はその多くが会合性低分子物質であり，また，その合成が石油化学技術に完全に依存しているという点も問題であった．最近，演者らは天然高分子を適用基材とする新たなタイプのオルガノゲル開発に成功した．我々の知る限り，本件は国の内外を通じても初の成功例となる．今回，当該環境先進型のオルガノゲル創製に関する詳細情報と新たな応用展開の実施例について報告する．
【方法・結果】放線菌のポリεリジン（PEL）を適用基材（高分子）に選んだ．次いで，ホモキラルポリγグルタミン酸のプラスチック化で実績のある“イオンコンプレックス（IC）”技術を PEL にも応用したところ，同様にプラスチック化が可能であった．これを PELIC と名付けた．種々の PELIC を検討する中で，そのひとつがオルガノゲルとしての特性を有することを発見した．しかも，既存の化成プラスチック材料の多くで耐久性強化が課題とされるクロロホルム溶剤を最良のゲル分散媒にするという画期的な特徴も備えていた．応用の新展開も視野に入る．例えば，葉緑素“クロロフィル”は水に不溶のため，汎用性に欠けていた．一方，クロロフィルは PELIC ゲルに容易に分散し，新生の緑色ゲルを与えた．さらに光を当てると，集光触媒として機能する可能性が高まった．集光反応に必要なクロロフィル会合構造が該ゲルの規則空間内で再構成されたものと予想される．

Development and application of green organogels

○Yuichi Hakumai[1], Makoto Ashiuchi[2]
([1]United. Grad. Sch. Agric. Sci., Ehime Univ., [2]Fac. Agric. Agric. Sci. Prog., Kochi Univ.)

Key words poly-epsilon-lysine, ion-complex, organogels, chlorophyll

4P-J210 広範なゲノム領域を正確に編集する新開発 CRISPR Nickase システムの構築

○黒田 浩一, 里村 淳, 植田 充美
（京大院・農）
miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景・目的】 近年注目されている CRISPR/Cas9 によるゲノム編集では，ガイド RNA が PAM 配列(NGG)に続く 20 塩基を認識して Cas9 が二本鎖切断を引き起こした後，相同組換えによるノックインや非相同末端結合により修復される．そのため，容易な遺伝子ノックイン・ノックアウトが可能であるが，全てのゲノム領域を編集することができないという大きな問題がある．すなわち，認識配列と PAM 配列以外の部位に変異を導入するような相同組換えを行う場合，編集後も認識配列が残るため Cas9 による再切断が起こりうる．再切断と非相同末端結合の結果，標的配列に望まない塩基の挿入・欠失が生じてしまうため，実際に正確な編集が可能な領域は PAM 配列と認識配列内に限定されてしまう．そこで，本研究では DNA の一本鎖を切断する Cas9 nickase を利用してゲノムワイドに正確な編集が可能な技術の構築を試みた．
【方法・結果】 DNA の一本鎖切断は，二本鎖切断と同様に相同組換えを誘導する一方で，非相同末端結合を誘導せず正確に修復される．このような一本鎖切断を起こすため，Cas9 に変異を導入して作製した Cas9 nickase を用いて酵母のゲノム編集を行った．その結果，非相同末端結合による余分な配列の挿入や欠失は見られず，認識配列と PAM 配列以外の一本鎖切断部位から離れた領域においても正確に編集することができた[1]．そのため，Cas9 nickase を用いた本システムでは，編集可能領域に制限がある CRISPR/Cas9 システムと比べて理論上ほぼゲノム全領域を編集でき，より自在にゲノム上の SNPs を編集するためのツールとして期待できる．

[1] A. Satomura *et al*., *Scientific Report*, in press.

Construction of ‘CRISPR Nickase’ system for precise editing of wider genomic region

○Kouichi Kuroda, Atsushi Satomura, Mitsuyoshi Ueda
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words genome editing, Cas9, nickase, *Saccharomyces cerevisiae*

4P-J211 G-quadruplex 構造及びタンパク質の相互作用に対する DNA メチル化の影響解析

○齋藤 史織, 塚越 かおり, 西尾 真初, 李 鎭熙, 池袋 一典
（農工大院・工）
ikebu@cc.tuat.ac.jp

血管内皮細胞増殖因子 VEGF は血管新生に関与する増殖因子の一つである．VEGF は選択的スプライシングを受けることで，複数のスプライシングバリアントが存在することが知られている．当研究室の研究によって，VEGF は *vegf* 遺伝子のプロモーター領域に由来するオリゴヌクレオチドに結合することが明らかになっている．VEGF には核移行シグナルが存在することが知られており，VEGF が *vegf* 自身のスプライシングに関わっている可能性が考えられる．そこで本研究では，VEGF が核内において DNA や RNA と積極的に相互作用していると仮説を立てた上で，エピジェネティック修飾である DNA のメチル化が，DNA と VEGF の結合に与える影響を評価することを目的とした．*vegf* 遺伝子のプロモーター領域の部分塩基配列由来のオリゴヌクレオチドについて，CD スペクトル測定による構造評価と表面プラズモン共鳴測定による結合評価を行った．今回用いたオリゴヌクレオチドは，DNA の二次構造である G-quadruplex 構造 (G4) を形成する．構造評価の結果，メチル化していないオリゴヌクレオチドは parallel 型 G4 を形成し，DNA のメチル化により hybrid 型 G4 への構造変化と熱安定性の上昇がみられた．さらに結合評価の結果，メチル化により結合シグナルの低下が観察され，解離定数 K_D が 13±0.43 nM から 25±5.7 nM に増加した．これより VEGF と *vegf* プロモーター由来のオリゴヌクレオチドの結合親和性がメチル化により低下することを見出した．塩基を置換し，G4 を形成しにくくしたオリゴヌクレオチドは VEGF に対する結合能が著しく低下したことから，メチル化による結合能の低下は G4 構造が変化したためであると考察した．これらのことから，DNA のメチル化が G4 の構造を変化させることにより DNA とタンパク質との結合に影響を与えることを示唆し，VEGF が DNA と相互作用し転写に関与している可能性を示した．

Effect analysis of DNA methylation on G-quadruplex structure and its protein binding

○Shiori Saito, Kaori Tsukakoshi, Maui Nishio, Jinhee Lee, Kazunori Ikebukuro
(Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words DNA-binding protein, structural analysis, epigenetic, G-quadruplex

4P-J212 G カルテット構造形成による CpG ODN の免疫活性能の向上

○山崎 智彦[1], 星 和明[2], 杉山 雄紀[2], 塚越 かおり[2], 津川 若子[2], 早出 広司[2], 池袋 一典[2]
（[1]物材研・機能性材料研究拠点, [2]農工大院・工）
YAMAZAKI.Tomohiko@nims.go.jp

シトシン－グアニンモチーフを含む合成オリゴデオキシリボヌクレオチド（CpG ODN）はトール様受容体 9（TLR9）のリガンド分子として機能し，B 細胞や形質細胞様樹状細胞からの炎症性サイトカインや I 型インターフェロンの発現と分泌を誘導し，免疫系を活性化する．そのため CpG ODN はワクチンアジュバンドとしての臨床応用が期待されている．天然の DNA と同じホスホジエステル（PD）骨格を有する ODN は核酸分解酵素により容易に分解されることから，核酸分解酵素耐性を有するホスホロチオエート（PT）骨格を持つ修飾 CpG ODN が臨床研究に広く用いられているが，PT-CpG ODN は蛋白質に非特異的に吸着し，これに起因する循環器や肝臓に対する副作用が指摘されおり，実用化には至っていない．
我々は免疫活性化能の高い天然型 PD-ODN の開発に取り組んでいる．本発表では生体内で形成される DNA の高次構造の 1 つである G カルテット構造の安定性に着目し，G カルテット構造と CpG モチーフを組み合わせた CpG ODN をデザインし，その機能を解析した．円二色性スペクトル測定により G カルテット構造を形成していることが示された CpG ODN は，核酸分解酵素に対する安定性，細胞の取り込み量が向上した．免疫細胞を含むヒト末梢血単核球を用いて免疫活性化能の評価を行ったところ，G カルテット構造を形成させた CpG ODN は直鎖 CpG ODN と比較して，免疫活性化の指標となる IFN-γ と IL-6 の分泌量が増加した．このことから，G カルテット構造と CpG モチーフを組み合わせることにより，TLR9 リガンド分子としての機能を保持しながら安定性を向上させることができることが示され，未修飾の天然型 PD-CpG ODN のアジュバンドとしての応用の可能性が示された．

Improved immunostimulatory activity of phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides by G-quadruplex formation

○Tomohiko Yamazaki[1], Kazuaki Hoshi[2], Yuuki Sugiyama[2], Kaori Tsukakoshi[2], Wakako Tsugawa[2], Koji Sode[2], Kazunori Ikebukuro[2]
([1]RCFM, Natl. Inst. Mater. Sci. (NIMS), [2]Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words CpG oligodeoxynucleotide, Toll like receptor 9, Adjuvant, G-quadruplex

4P-F213 ペプチドアレイを用いた配列改変による細胞内機能性ペプチドの高活性化

○小崎 一功[1], 清水 一憲[1], 本多 裕之[1,2]
（[1]名大院・工, [2]名大・予防早期医療創生セ）
honda@chembio.nagoya-u.ac.jp

【背景と目的】我々は医薬品等への応用が期待される細胞内機能性ペプチドの探索系を開発してきた[1]．本系はペプチドアレイの各スポットに光切断リンカー，膜透過性ペプチド（CPP）と候補ペプチドを順に合成したものであり，多種類の CPP-ペプチド複合体の細胞内活性を効率よく測定できる．本研究では，本系を用いて機能性ペプチドの配列改変を行い，活性の高いペプチド取得を目指した[2].
【方法】セルロースメンブレン上に光切断リンカー，CPP，候補ペプチドの順に合成したペプチドアレイを作製した．UV 照射でペプチド複合体を切り出し，各スポットの複合体を培地に溶出した．細胞を培養した 96 ウェルプレートの各ウェルに複合体入り培地を添加し，WST-8 アッセイで細胞生存率を算出した．
【結果と考察】既報[3]の細胞死誘導ペプチド（LNLISKLF-R8）を用いた．本ペプチドはミトコンドリアのイオンチャネルを開き，細胞質に Ca^{2+}を放出させ，細胞死を誘導する．まずペプチドの配列改変を行い，高活性ペプチドの取得を行った．N 末端から 5 残基目の S を F, V, W, Y に置換したペプチドは，元ペプチドより有意に高い細胞死活性を示したため，本系を用いて高活性ペプチドが取得できることが示された．次に，改変した高活性ペプチド（LNLIWKLF-R8）が元ペプチドと同様に細胞内 Ca^{2+}濃度を上昇させるか検証した．細胞内 Ca^{2+}測定試薬を用いて，ペプチド添加前後の蛍光値変化を共焦点顕微鏡で経時観察した．どちらのペプチドでも細胞内蛍光値が上昇したことから，高活性ペプチドは元ペプチドと同様の作用機序で細胞死誘導することが示唆された．
[1] Matsumoto, R., *et al.*, Scientific Reports, 5, 12884 (2015)
[2] Kozaki, I., *et al.*, J. Biosci. Bioeng., in press, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.03.013 (2017)
[3] Kim, J. *et al.*, J. Pept. Sci. Japan, 5, 485 (2013).

High activation of the intracellular functional peptides by sequence modification using peptide array system.

○Ikko Kozaki[1], Kazunori Shimizu[1], Hiroyuki Honda[1,2]
([1]Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ., [2]PME. Nagoya Univ.)

Key words peptide array, cell penetrating peptide, functional peptide, screening

4P-J214 金ナノ粒子合成制御に向けた金イオン還元性を示すペプチド触媒ライブラリーの作製

○田中 祐圭[1,2], 大河内 美奈[1,2]
（[1]東工大・物質理工, [2]JST・ImPACT）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

ペプチドは，生体分子や金属材料など，幅広い物質に親和性をもつ配列だけでなく，酸化還元能などの触媒機能をもつ配列が存在する．また，ナノ粒子はその形態，サイズなどの違いに応じて異なる物性を示すことから，緻密に粒子形態を制御できるナノ粒子合成技術の開発が進められている．これまで当研究グループは，セルロース膜上に異なるペプチド配列をスポット状に合成できるペプチドアレイ技術を利用することで，金ナノ粒子(AuNP)結合ペプチドを約１００００配列取得した．また，これらの配列のうち最も高い AuNP 結合能を示した３つのペプチド(AuP1, 2, 3)は，AuNP 結合能だけでなく，金イオンを還元し金ナノ粒子を合成できるペプチド触媒であることを示してきた[1].
そこで本研究では，これまでに同定した AuNP 結合性ペプチドライブラリーから，金イオン還元性を示す触媒機能をもつペプチドを多数同定することを試みた．具体的には，AuNP 結合性を示すペプチドライブラリーアレイを金イオン溶液に浸漬し，ペプチドスポット上での AuNP 合成能を評価した．その結果，100 配列以上の AuNP 合成能をもつペプチド触媒ライブラリーを取得した．また，個々のペプチド上で合成される AuNP は，プラズモン共鳴に基づく発色により異なる色調を示すことが観察された．そこで，特徴的な色調を示すペプチドを粉末合成し，溶液中で金イオン溶液と混合したところ，ペプチドアレイで見られた色調と同様の色調を示す AuNP を合成できることが示された．本手法は，任意の物性を示すナノ粒子合成を触媒するペプチドを，効率的に探索できる新たな技術として応用できる可能性がある．今後，同定されるペプチド触媒を利用することで，特定の物性を示すナノ粒子を温和な条件で合成できる技術が創出されることが期待される．

1）Tanaka M. et al., Acta Biomaterialia(2017)

Development of catalytic peptide library for green synthesis of property controlled gold nano-particles

○Masayoshi Tanaka[1,2], Mina Okochi[1,2]
([1]Sch. Mater. Chem. Tech., Tokyo Tech., [2]JST・ImPACT)

Key words gold nanoparticle, peptide array, catalytic peptide

4P-J215 膜結合ペプチドを用いたグラファイト電極への生体膜の固定

○立松 宗一郎, 田中 祐圭, 大西 知子, 早水 裕平, 大河内 美奈
（東工大）
okochi@chemeng.titech.ac.jp

生体膜に存在するイオンの送受を司るイオンチャネルは様々な疾病と関連しており，創薬における重要なターゲットとされている．近年では，活性評価の高感度化を目指し，グラフェンなどの高感度電極材料上に人工脂質膜を配し，精製したイオンチャネルを埋め込んだ電界効果トランジスタ(FET)の開発が行われている．本研究では，人工脂質膜を対象としている FET を用いて生体膜中のイオンチャネル活性の測定を目的に，生体膜をグラファイト基板上へ固定化する技術の開発を行った．ここでは，生体膜を基板上に固定するために，Cell penetrating peptide(CPP)と Virus fusion peptide(VFP)といった膜結合ペプチドに着目した．本研究では既報の CPP と VFP を対象に，その細胞膜結合能を評価し，細胞膜結合性を示す配列の取得を行った．具体的には，セルロース膜上に CPP のスポット合成を行い，そこへ細胞を播種し，固定化された細胞数を測定することで，その配列がもつ細胞膜結合能を評価した．その結果，CPP である pVEC（LLIIRRRIRKQAHAHAHSK）が高い膜結合性を示すことがわかった．取得した pVEC をグラファイト基板に修飾するために，その C 末端にグラファイト結合配列 WWW を連結した二機能性ペプチドを合成した．そのペプチド溶液をグラファイトに滴下し，表面修飾を行った．その基板上で HeLa を培養し，浸透圧法によって破砕した．その結果，pVEC を修飾することで底面細胞膜が基板上に固定されることが確認された．

Immobilizing cell membrane on Graphite electrode by Membrane-binding peptide

○Souichiro Tatematsu, masayoshi Tanaka, tomoko Onishi, Yuhei Hayamizu, mina Okochi
(Tokyo Tech)

Key words peptide, sensor, cell membrane

4P-F216 “超”高親和性型ペプチド輸送体の発見と輸送体工学への応用

○中山 綾花[1], Vu Thi Tuyet Lan[1], 河合 駿[2], 蟹江 慧[2], 加藤 竜司[2], 河原崎 泰昌[1], 伊藤 圭祐[1]
（[1]静県大・食栄, [2]名大院・創薬科学）
sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp

【背景と目的】 プロトン共役型オリゴペプチド輸送体 (POT) を介したペプチドの生体吸収システムは，微生物から高等動物まで幅広く保存されている．POT は 8,400 種類のジ・トリペプチドの輸送により窒素源の高効率な吸収に重要な役割を担っているため，POT の高機能化により，生物の生育促進や有用物質生産性の向上が期待できる．そこで本研究では，*Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして POT の高機能化の影響を検討した．
【方法と結果】 唯一の POT である scPtr2 を欠損した *S. cerevisiae* 株 (BY4742-*ptr2Δ*) を宿主として各種生物 POT の発現系を構築し，β-Ala-Lys (AMCA) の取り込み能を解析した．その結果，他の生物種由来の POT よりも顕著に高活性な *Candida albicans* PTR2 (caPTR2) を見出した．我々が開発した F-CUp assay により 338 種類のジペプチドを網羅解析した結果，caPTR2 に対するジペプチドの K_i 値は 0.00020 mM から 0.52 mM まで幅広く分布していた．平均的なジペプチドの K_i 値 （0.0030 mM） は scPtr2p のおよそ 1/100 であり，高親和性型 POT として知られるヒト POT （hPEPT2） と比較しても 1/10 以下であったことから，caPTR2 は“超”高親和性型 POT であることが示された．caPTR2 へ高親和性を示すジペプチドには芳香族アミノ酸や分岐鎖アミノ酸が高頻度に含まれており，低親和性ペプチドには酸性アミノ酸が高頻度に含まれていた．この基質多選択性は scPtr2p と類似していた (*Nature Commun.* 2013)．POT 欠損 *S. cerevisiae* 株を宿主として構築した caPTR2 発現株は，scPtr2p 発現株よりもペプチド性培地中で優れた増殖速度を示し，細胞内グルタチオン量の増加も確認された．以上より，本研究で見出した“超”高親和性型 POT である caPTR2 には，*S. cerevisiae* の生育および物質生産性の改善が期待できることが示唆された．

Application of hyper-affinity type peptide transporter to transporter engineering of *Saccharomyces cerevisiae*

○Ryoka Nakayama[1], Lan Vu Thi Tuyet[1], Shun Kawai[2], Kei Kanie[2], Ryuji Kato[2], Yasuaki Kawarasaki[1], Keisuke Ito[1]
([1]Sch. Food Nutr. Sci., Univ. Shizuoka., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ.)

Key words peptide, transporter, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*

4P-N217 納豆抽出物中のカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性の解明

○相田 涼介, 齊藤 健吾, 生江 俊樹, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
（新潟大・自然研）
f17b002k@mail.cc.niigata-u.ac.jp

【目的】 これまでに当研究室では，米や大豆などの食品タンパク質のアミノ酸配列からカチオン性ペプチドを探索し，それらのペプチドが抗菌活性，抗炎症活性，創傷治癒活性などを有していることを報告してきた．本研究では，発酵食品中に含まれるカチオン性ペプチドの生理活性を解明するために，納豆を研究対象とした．すなわち，納豆抽出物から等電点電気泳動によって，カチオン性ペプチド画分を調製し，抗菌活性を有することを確認した．また，抗菌活性を有する画分に含まれるペプチドを同定した．さらに，同定したペプチドの抗菌活性などの生理活性について検討した．
【実験方法】 本研究では, 納豆抽出物からエタノール沈殿によって高分子成分を遠心分離によって除去した．次に，得られたペプチドを含む上澄液から低分子成分を除去するために透析を行った．得られたサンプルを，等電点電気泳動によって 20 の画分に分画した．各画分の歯周病菌，アクネ菌，および日和見感染真菌に対する抗菌活性を測定した．活性を検出できた画分中のペプチドを逆相クロマトグラフィーにより精製し，各ピークに含まれるペプチドを MALDI-TOF/MS を用いて同定した．同定したペプチドの抗菌，LPS 中和，血管新生促進などの生理活性を測定した．
【結果】 等電点電気泳動後に得られた 20 画分のうち，No.19 と No.20 の画分の等電点は 12 以上であった．各分画の抗菌活性を測定した結果，主に等電点が高い画分に歯周病菌とアクネ菌に対する抗菌活性を検出できたが，日和見感染真菌に対する抗菌活性は検出できなかった．抗菌活性を検出できた No.19 と No.20 の画分からペプチドを精製し，同定した結果，現在までに 8 種類のカチオン性ペプチドを同定できた．今後，同定したペプチドの抗菌活性などの生理活性を測定する予定である．

Purification and identification of cationic peptides from natto extract and clarification of their bioactivities

○Ryousuke Aida, Kengo Saito, Toshiki Namae, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words natto extract, autofocusing, cationic peptide, antimicrobial peptide

4P-N218 培養細胞を用いたコメ糠タンパク質由来抗菌ペプチドの創傷治癒作用とその機構の解明

○斉藤 寿槻, 生江 俊樹, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
（新潟大・自然研）
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室では，コメ糠タンパク質酵素加水分解物から３種類のカチオン性ペプチド（SSF，LRR，および EKL）を同定し，それらがヒト病原微生物に対して抗菌活性を示すこと，および LPS 中和活性を示すことを既に報告している[1]．そこで本研究では，３種類のカチオン性ペプチドの創傷治癒活性を，血管新生促進作用と細胞遊走促進作用の観点から検討した．
【実験方法】本研究では，次のようにしてペプチドの血管新生促進活性を定量的に評価した．予め 96 ウェルプレートに Matrigel を添加し，人工基底膜を作製し，その上にヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）と各ペプチドを添加した．一定時間培養した後に，顕微鏡で管腔（血管）構造を形成した細胞を観察し，その細胞の長さの合計を測定し，その値から本活性を定量的に評価した．また，スクラッチ法を用いてペプチドの細胞遊走促進活性を測定した．最初に，24 ウェルプレートに HUVEC を播種し，コンフルエントな状態まで培養した後，スクラッチスティックによって一定の幅で細胞をはぎ取り，傷を作製した．その直後に各ペプチドを添加して，24 時間毎に傷の閉鎖状態を面積として測定し，細胞遊走促進活性を求めた．
【結果】血管新生促進試験において，SSF，LRR，および EKL を添加した場合に，コントロールとして用いた LL-37 と同じように，血管構造をした細胞がより密な状態となり，その細胞の長さの合計が無添加の場合に比べて増加した．また，細胞遊走促進試験においても，LL-37 と同じように，SSF，LRR，および EKL を添加した場合に，程度の差はあったが，創傷閉鎖が促進された．今後，各種阻害剤を用いて作用機構を検討する予定である．
1) *J. Functional Foods*, 34, 287-296 (2017).

Elucidation of wound healing activity and mechanism of action of antimicrobial peptides from rice bran protein using HUVECs.

○Kazuki Saito, Toshiki Namae, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words cationic peptide, wound healing, angiogenesis, migration promotion

4P-J219 抗菌ペプチド・アピデシンおよび高活性変異体の作用機構解析

○川上 駿[1], 山崎 蔵亨[1], 三吉 大地[1], 大井 俊彦[1], 橋本 茂樹[2], 堀 千明[1], 田口 精一[1,3], 松本 謙一郎[1]
([1]北大院・工, [2]東理大・基礎工, [3]東農大・生命科)
ooi@eng.hokudai.ac.jp

抗菌ペプチドは，天然の L 体アミノ酸から構成されているため，人体や環境への負荷が小さく，抗生物質に代わる次世代の抗菌剤としての応用が期待されている．本研究の対象としたミツバチ由来の抗菌ペプチドであるアピデシンは，細胞膜を損傷させることなく微生物菌体内へ導入され，細胞内に存在する標的分子との相互作用により抗菌活性を示すと考えられていた．当研究室では，既往の研究により，進化工学的手法を用いてアピデシンの高活性変異体が創出できることを報告している．これらの変異体は，細胞内への導入効率が向上していることが確認されていたが，細胞内標的との相互作用への影響は未解明であった．本研究では，アピデシンの高活性変異体の細胞内標的に対する活性評価，および細胞内作用分子の探索を目的とした．
組換え大腸菌とレポーター遺伝子を用いた予備実験により，アピデシンがレポータータンパク質の合成を阻害し，一方で mRNA の合成量には影響がみられなかったことから，アピデシンは翻訳段階を阻害することが示された．そこで，大腸菌由来無細胞転写翻訳系（PURE SYSTEM）を用いて，同様にアピデシンによりタンパク質合成系が阻害されることを確認した．さらに，同一条件においてアピデシンの高活性変異体を作用させたところ，ほぼ同濃度でタンパク質合成が阻害された．本結果から，高活性変異体は，大腸菌の細胞内に導入される効率の向上が主な高活性化機構であり，細胞内ターゲットとの相互作用には大きな変化はないことが示唆された．次に，アピデシンの抗菌作用の発揮に関係するタンパク質を同定するためのスクリーニングを行った．遺伝子型の異なる大腸菌のアピデシンに対する感受性を比較することにより，大腸菌内でのアピデシンの抗菌作用に関与すると推定される候補タンパク質を見出した．

Mechanism Study on Antibacterial Peptide "Apidaecin" and its Highly-Active Mutant

○Shun Kawakami[1], Kurato Yamazaki[1], Daichi Miyoshi[1], Toshihiko Ooi[1], Shigeki Hashimoto[2], Chiaki Hori[1], Seiichi Taguchi[1,3], Ken'ichiro Matumoto[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., [2]Basic Eng. Tokyo Univ. Sci., [3]Fac. Lifesci., Tokyo Univ. Agric.)

Key words antibacterial peptide, screening, translation, *Escherichia coli*

4P-N220 Thermal stability of raft-mimetic structure in liposome was decreased due to the interaction of local anesthetics.

○Ko Sugahara, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)
takagi@jaist.ac.jp

[INTRODUCTION]
Local anesthetics (LAs) can cause reversible absence of pain sensation. The blockage mechanism is considered to be dependent on membrane sodium channel localized in membrane raft region. However, changes in physicochemical property of cell membrane by LA may also influence the blockage mechanism. In this study, we used raft exhibiting model membrane (cell-sized liposome) to study its thermal behavior changes by addition of LAs.

[METHODS]
In order to examine effect of LAs on stability of raft structure, we measured (a) Miscibility temperature (T_{mix}) of LA added DOPC DOPC/DPPC (50/50 mol %) binary, and DOPC/DPPC/Cholesterol (Chol) (40/40/20 mol %) ternary membranes. (b) Line tension at the boundary of membrane phase-separation in DOPC/DPPC/Chol liposomes. (c) Differential Scanning Calorimetry (DSC) of LA added DPPC and DPPC/Chol (90/10 mol%) membranes.

[RESULTS and DISCUSSION]
We investigated thermal behavior changes of phase-separated structures by the addition of LAs. (a) Presence of LAs lowered miscibility temperature (T_{mix}) in DOPC/DPPC/Chol/LAs mixtures, whereas the miscibility temperature for DOPC/DPPC/LAs mixtures without Chol does not change significantly. (b) Moreover, line tension at phase boundary in DOPC/DPPC/Chol membrane is reduced by LAs. (c) DSC measurement revealed that LAs may be partitioned into L_o phase well. Therefore, LAs can be partitioned into L_o phase by the help of Chol. As a result, the miscibility temperature and the line tension are decreased significantly.

Thermal stability of raft-mimetic structure in liposome was decreased due to the interaction of local anesthetics.

○Ko Sugahara, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words liposome, local anesthetic, phase separation

4P-J221 オーランチオキトリウム属由来 β-カロテン合成酵素 CrtIBY の発現制御機構の解析

○野村 夏矢[1,4], 渡邉 研志[1,4], 岡村 好子[1,4], 田島 誉久[1,4], 松村 幸彦[2,4], 中島田 豊[1,4], 松山 恵介[3], 秋 庸裕[1,4]
([1]広島大院・先端物質, [2]広島大院・工, [3]長瀬産業, [4]JST・CREST)
aki@hiroshima-u.ac.jp

【研究背景】海洋性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，β-カロテンやアスタキサンチンのような健康食品や化粧品の原料として有用なカロテノイド類を生産することが知られている．トランスクリプトーム解析によると，カロテノイド生合成に関わる酵素群は培養後期において高発現しており，ストレスへの応答性が推測された．そこで本研究では，カロテノイド生合成において重要な β-カロテン合成酵素 CrtIBY の発現調節機構を解析し，カロテノイド生産における制御機構の解明を目的とした．
【方法・結果】レポーター遺伝子としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Rluc) をオーランチオキトリウム属株のゲノムから取得した CrtIBY 遺伝子の上流領域と elongation factor 1α（ef1）のターミネーター領域（Tef1）で挟み，相同組換え領域（CrtIBY から 3.6 kb 上流の領域）を持つベクターに挿入した．比較対象として Rluc を ef1 プロモーター（Pef1）の制御下に置いたプラスミドも構築した．各々のプラスミドを相同組換え法によりゲノム DNA に挿入した形質転換体を取得し，培養開始から 6 h ごとに回収した細胞と Renilla-Glo Luciferase Assay System および Fluoroskan Ascent 蛍光マイクロプレートリーダを用いてルシフェラーゼの発光強度を測定し，プロモーターの活性化パターンを解析した．その結果，ハウスキーピング遺伝子である ef1 のプロモーター活性は培養開始後 12 h で最大となり，その後徐々に減少していたのに対し，CrtIBY プロモーター領域の活性は培養開始後 6 h から徐々に増加して 24 h において最大となった．このことから CrtIBY プロモーターを培養後期に活性化する制御系の存在が示唆された．

Regulation of expression of carotenoid synthase CrtIBY in *Aurantiochytrium* sp.

○Nomura Natsuya[1,4], Watanabe Kenshi[1,4], Okamura Yoshiko[1,4], Tajima Takahisa[1,4], Matsumura Yukihiko[2,4], Nakashimada Yutaka[1,4], Matsuyama Keisuke[3], Aki Tsunehiro[1,4]
([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]NAGASE & CO. LTD., [4]CREST, JST)

Key words *Autanriochytrium*, carotenoid, transcriptional regulatory mechanism

4P-N222 Syntheses of tris-bipyrdine ferrous complexes having hexavalent glycolclusters and ion-induced changes in their carbohydrate packings

○Naoto Chigira[1], Fumiko Dai[1], Yuki Nonaka[1], Koki Sato[2], Masahito Hagio[2], Teruaki Hasegawa[2,3]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [2]Dept. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [3]Bio-nano Electron. Res. Center., Toyo Univ.)
t-hasegawa@toyo.jp

Interfacial interactions between two microdomains composed of various glycosphingolipids are now widely recognized as "carbohydrate-carbohydrate interactions (CCIs)". Such CCIs have attracted increasing research interest, since they initiate various cell-cell adhesions including cancer metastases. Little information concerning CCIs has been, however, obtained so far, suffering from fluidic and heterogeneic natures of cell surfaces. It is now, widely recognized that certain ions, Ca^{2+} in most cases, are essential to induce CCIs although the detailed mechanism is not clear.
Recently, we developed tris-bipyridine ferrous complexes presenting hexavalent glycoclusters and assessed their conformations in aqueous media containing various salts. Each of these metalloglycoclusters are composed of two diastereomers (Δ and Λ) having own carbohydrate packings. Since these two diastereomers are under dynamic equilibrium and Δ-Λ ratio can be readily assessed through circular dichroic (CD) spectral analyses, the metalloglycoclusters function as unique artificial models to probe ion-induced rearrangements of carbohydrate packings within the glycoclusters. We found that the $\Delta - \Lambda$ ratios of these metalloglycoclusters changed on additions of various ions. Although mechanisms of these ion-induced rearrangements of their carbohydrate packings are still unclear, these data imply that glycoclusters on the cell surface also bind various cations/anions to change their carbohydrate packings.

Syntheses of tris-bipyrdine ferrous complexes having hexavalent glycolclusters and ion-induced changes in their carbohydrate packings

○Naoto Chigira[1], Fumiko Dai[1], Yuki Nonaka[1], Koki Sato[2], Masahito Hagio[2], Teruaki Hasegawa[2,3]
([1]Grad. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [2]Dept. Sch. Life Sci., Toyo Univ., [3]Bio-nano Electron. Res. Center., Toyo Univ.)

Key words CCIs, ion responses

4P-J223 硫黄酸化細菌由来の β-1,4-*N*-アセチルグルコサミノグルカンのリゾチーム感受性

○三田 修平[1], 河﨑 雄太[1], 浜口 悠貴[1], 近藤 敬子[2], 片平 正人[2], 武田 穣[1]
（[1]横国大院・工, [2]京大・エネルギー理工研）
takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp

【背景と目的】糸状性硫黄酸化細菌である *Thiothrix nivea* の細胞列はマイクロチューブに覆われている．マイクロチューブは未同定デオキシ糖で修飾された β-1,4 グルコサミノグルコサミン（GG）の凝集体であり，部分分解によってデオキシ糖を除去すればGGが得られる．GG の *N*-アセチル化物（NGG）はキチン同様のリゾチーム感受性を持ちつつ甲殻類アレルギーの懸念がいため徐放性基材などへの応用が期待できる．現時点において完全な交互共重合体としての GG を供給できるのは *T. nivea* のみであり，本研究では *T. nivea* 由来の NGG のリゾチーム感受性を検証することとした．
【方法】*T. nivea* を培養後，アルカリと界面活性剤による溶菌処理の残渣としてマイクロチューブを得た．マイクロチューブを希塩酸で部分加水分解し，透析によって GG を回収した．GG 溶液に無水酢酸を作用させることによって NGG 懸濁液を調製した．また，GG 溶液を型枠内で乾燥させることによってシート化した後，無水酢酸を作用させて NGG シートを得た．NGG 懸濁液にリゾチームを作用させ，継時的に濁度を測定した．さらに，HPLC 分析によって分解に伴うオリゴ糖の遊離を確認した．NGG シートに対してもリゾチームを作用させ，シートの形状変化を観察した．
【結果と考察】GG 懸濁液にリゾチームを作用させると約 100 時間以内で濁度はほぼ半減した．HPLC 分析では，濁度の低下に呼応するように二つのピークが現れ徐々に大きくなった．質量分析でこれらの同定を試みたところ，3 糖および 5 糖由来と予想された．NGG シートに対するリゾチーム処理では 2 週間でシートの崩壊がもたらされた．したがって，*T. nivea* 由来の NGG のリゾチーム感受性を形状の変化と分子レベルの両面で確認することができた．

Lysozyme susceptibility of β-1,4-*N*-acetylglucosaminoglucan originated from a sulfate-oxidizing bacterium

○Shuhei Sanda[1], Yuta Kawasaki[1], Yuki Hamaguchi[1], Keiko Kondo[2], Masato Katahira[2], Minoru Takeda[1]
([1]Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ., [2]Inst. Advanced Energy, Kyoto Univ.)

Key words *Thiothric nivea*, microtube, lysozyme, glucosaminoglucan

4P-J224 組換え型ノダフジレクチンの酵母 *Ogataea minuta* での発現と特性解析

○千葉 靖典[1], 清水 明[1], 佐藤 隆[1], 舘野 浩章[1], 久保田 智巳[1], 宇津井 隆志[2], 松尾 一郎[2], 成松 久[1]
（[1]産総研・創薬基盤, [2]群大院・理工）
y-chiba@aist.go.jp

マメ科レクチンに属するノダフジレクチン (*Wisteria floribunda* agglutinin, WFA) はベータ結合の N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基を含む糖鎖を認識することが知られている．これまでに肝内胆管がん，肝繊維化，肝硬変，上皮性卵巣がんなどのバイオマーカー検出に WFA が有効であることを報告してきた．また我々はノダフジ種子より WFA をコードする遺伝子のクローニングにも成功し，さらに C272A 改変型 WFA が LacdiNAc（GalNAcbeta1-4GlcNAc: LDN）に特異的に結合することを明らかにしてきた．本研究では，WFA を広く活用するため，組換え型 WFA の酵母での発現と精製方法の確立，結晶構造解析ならびに糖鎖認識特異性について評価を行った．
ノダフジ種子よりクローニングされた WFA の二重変異体（N146Q/C272A）をコードする遺伝子を作製し，酵母 *O. minuta* 株に導入した．この培養上清 100 mL から His タグ付加 WFA（yWFA）を約 7 mg 精製した．また GalNAcbeta1-4GlcNAcbeta1-2Man からなる 3 糖を合成，カラムに固定し，得られた yWFA を供したところ効率よく yWFA が結合し，LDN カラムによる高度精製が可能となった．
得られた yWFA について，立体構造解析を行なった．市販の植物由来野生型 WFA は四量体であるのに対し，yWFA は二量体であることが予想された．四次構造の違いが糖鎖との弱い結合特異性に影響を及ぼす可能性が予想され，四量体構造をとりにくいことが LDN 特異的な結合特異性を示す要因の一つであると示唆された．
精製した組換え体の糖鎖認識能を糖鎖アレイで解析した結果，LacdiNAc を強く認識することが示された．また Lectin-ELISA 法を用いて LacdiNAc 型糖鎖を有するタンパク質の検出に成功した．以上より，yWFA は LDN 型糖鎖を有する糖鎖バイオマーカー検出のためのツールとして活用が期待できる．

Production and properties of the recombinant WFA from *Ogataea minuta*

○Yasunori Chiba[1], Akira Shimizu[1], Takashi Sato[1], Hiroaki Tateno[1], Tomomi Kubota[1], takashi Utsui[2], Ichiro Matsuo[2], Hisashi Narimatsu[1]
([1]BRD, AIST, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Gunma Univ.)

Key words WFA, *Ogataea minuta*, lectin, glyco-biomarker

4P-J225 ナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの酵母菌体内生産系の構築

○窪村 有紗, 大橋 貴生, 長谷川 友香, 三崎 亮, 藤山 和仁
（阪大・生工国際セ）
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

【背景】フラボノイドは糖鎖が結合した配糖体として植物に広く存在する．構造的に多様であり，付加した糖鎖構造が物性および生物学的特性に影響を与える．苦味配糖体であるナリンギンは特に柑橘類に豊富に存在し，糖鎖としてラムノース α1,2-グルコース構造を持ち，抗酸化活性や血流改善効果を示すことが知られている．本研究では，分裂酵母を生体触媒とした *in vivo* ナリンギン生産を目指し，1 糖目のグルコース転移に関わる糖転移酵素を分裂酵母で生産し，その酵素学的特性解析を行った．また，本酵素発現株を生体触媒として用いた，ナリンゲニン 7-*O*-グルコシド（N7G）の *in vivo* 生産に取り組んだ．
【方法】シロイヌナズナ由来ナリンゲニン-7-*O*-グルコース転移酵素（*AtGT2*）遺伝子を，cDNA を用いてクローニングし，分裂酵母用発現ベクターを構築した．培養した分裂酵母形質転換体から得られた粗酵素抽出液を用いて，ナリンゲニンおよび UDP-グルコースを基質として酵素反応を行った．また，菌体をナリンゲニンとともに培養し，菌体内での酵素活性を調べた．グルコースや有機溶媒を含有する培地での培養や，静止菌体法を試み，N7G の *in vivo* 生産における至適培養条件を検討した．
【結果と考察】逆相 HPLC 解析の結果，*in vitro* 反応，*in vivo* 反応ともに，組換え酵素 AtGT2 はナリンゲニンの 7 位にグルコース転移活性を持つことが確認できた．*in vivo* 反応において，至適条件を検討した結果，培養時にグルコースを添加する，培地中の pH を中性に保つと N7G の生産量が大きくなった．また，静止菌体法においては，有機溶媒を添加すると N7G の生産量が大きくなった．UDP 糖の供給や，酵母の生育，基質の取り込みに影響を与えたためだと考えられる．今後は，二糖目のラムノースを付加するラムノース糖転移酵素を反応系に組み込むことにより，*in vivo* 反応系の構築が可能になる．

Metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* for Naringenin7-*O*-glucoside production

○Arisa Kubomura, Takao Ohashi, Yuka Hasegawa, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words flavonoid, glycosyltransferase, AtGT2, yeast

4P-J226 高品質バイオ医薬品生産を目指したチャイニーズハムスター卵巣細胞の糖鎖合成経路改変

前田 晶子, ○三崎 亮, 大橋 貴生, 藤山 和仁
（阪大・生工国際セ）
fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

翻訳後修飾の中でもとりわけ N-結合型糖鎖修飾は，修飾を受けるタンパク質の生物学的活性，安定性，タンパク質間相互作用などに大きな影響を与える．しかしながら，バイオ医薬品をはじめとする組換えタンパク質生産のプラットフォームであるチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞では，タンパク質の品質面で好ましくない糖鎖修飾が起こる場合がある．そのため，生産物が生物学的活性を十分に発揮できるように，宿主 CHO 細胞の糖鎖修飾経路を改変することは有効な手段の一つである．
近年，抗体医薬品の市場拡大が著しい．抗体医薬品は主に CHO 細胞を宿主として遺伝子組換え生産される糖タンパク質であるが，N-結合型糖鎖へのα1,6-フコース結合を除去することで，抗体依存性細胞障害（ADCC）活性が劇的に増加することが知られている．また，CHO 細胞はヒトが合成できない糖残基 N-グリコリルノイラミン酸を含む糖鎖を合成する．そこで本研究では，ヒトに適合した，かつ高い ADCC 活性を持つ抗体生産を目指し α1,6-フコース転移酵素（Fut8）およびシチジン一リン酸-N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ（Cmah）遺伝子を破壊した CHO 細胞の構築を目的とした．
ゲノム DNA 上にある Fut8 および Cmah 遺伝子を CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を利用して破壊した CHO-K1 変異株を構築した．変異株より全可溶性糖タンパク質糖鎖を調製し，糖鎖を蛍光標識後，高速液体クロマトグラフィーおよび質量分析器を用いて糖鎖構造を解析した．この結果，野生株で検出された α1,6-フコース結合型糖鎖および N-グリコリルノイラミン酸結合型糖鎖は，変異株では確認できなかった．さらに，変異株では高マンノース型糖鎖量が顕著に増加するものの，複合型糖鎖であるガラクトース結合型糖鎖およびシアル酸結合型糖鎖の含有量に変化がないことが分かった．

Modification of glycosylation pathway in Chinese hamster ovary cells for high-quality therapeutic protein production

Akiko Maeda, ○Ryo Misaki, Takao Ohashi, Kazuhito Fujiyama
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words glycosylation, Chinese hamster ovary, Fut8, Cmah

4P-J227 カイコ由来 *N*-acetylgalactosaminyltransferase の基質特異性

○宮下 龍之介[1], 宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]
([1]静大院・総科技・農, [2]静大・グリーン科技研)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【目的】カイコで発現させた組換えタンパク質には，哺乳動物細胞で認められる複合型糖鎖ではなく，昆虫特有のパウチマンノース型糖鎖が付加される．カイコで発現させた糖タンパク質を医薬品として利用するためには複合型糖鎖を付加させる必要がある．カイコのゲノムには複合型糖鎖生合成に必要な β-1,4-galactosyltransferase (GalT)と相同性を有する酵素 (Glycosyltransferase family 7，アミノ酸配列相同性 38%)の遺伝子が存在し，その酵素が GalT ではなく *N*-acetylgalactosaminyltransferase (BmGalNAcT)であることを明らかにした 1)．本研究では，BmGalNAcT の基質特異性と構造との相関を明らかにするため変異体を構築し，活性測定を行った．
【方法】立体構造が明らかにされているウシ由来 GalT (PDB 1O0R)との比較により，BmGalNAcT において基質の *N*-アセチルガラクトサミン残基の認識に関わるアミノ酸残基を推定した．GalT と異なっていた 2 つのアミノ酸残基 (Ile298 と Ile310)を GalT 型に置換した変異体 (I298M，I310Y，I298M-I310Y)を構築した．作製した変異体の遺伝子をそれぞれ BmNPV バクミドに挿入し，カイコ幼虫で発現させ，FLAG タグで精製した．GlcNAc-β-*p*NP をアクセプター基質，UDP-ガラクトース (UDP-Gal)と UDP-*N*-アセチルガラクトサミン (UDP-GalNAc)をドナー基質として用いて酵素反応を行い，反応産物を定量した．
【結果】構築した三つの変異体において，ドナー基質として UDP-Gal を用いた反応では，ガラクトースを転移する活性は認められなかった．また，ドナー基質として UDP-GalNAc を用いた反応では，I298M のみ GalNAc を転移する活性が認められたが，野生型と比べ約 0.4 倍であった．現在 BmGalNAcT の新たな変異体の作製を行い，詳細な基質特異性の解析を行っている．

1）宮下ら，第 68 回日本生物工学会大会講演要旨集 293 頁，2016 年

Substrate specificity of *N*-acetylgalactosaminyltransferase expressed from silkworm

○Ryunosuke Miyashita[1], Takatsugu Miyazaki[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y Park[1,2]
([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words Silkworm, *N*-glycosylation, glycosyltransferase, *N*-acetylgalactosamine

4P-N228 カイコで発現させたヒトエリスロポエチンの糖転移酵素共発現による *N* 型糖鎖構造改変

○堀場 早紀[1], 加子 夏未[1], 宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2],
近藤 幸子[3,4], 矢木 宏和[3], 加藤 晃一[3,4,5], 朴 龍洙[1,2]
([1]静大院・総科技・農, [2]静大グリーン科技研, [3]名市大院・薬, [4]株式会社医学生物学研究所, [5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオ)
park.enoch@shizuoka.ac.jp

【背景・目的】近年，バイオ医薬品の需要は急増しており，タンパク質発現能力が高いカイコが宿主として注目されている．しかし，カイコで発現させた糖タンパク質の *N* 型糖鎖は，ほとんどが高マンノースもしくはパウチマンノース型糖鎖であり，哺乳動物細胞でみられる複合型糖鎖は殆ど認められない．そのため，カイコは医療用タンパク質生産宿主としては不向きとされている．本研究では，カイコ体内で複数のヒト由来糖転移酵素を共発現させることで，ヒトエリスロポエチン（hEPO）の糖鎖構造の改変を試みた．
【方法】hEPO またはヒト β-1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II (hβ2GnTII)，ヒト β-1,4-galactosyltransferase I (hβ4GalTI) 遺伝子をカイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入することでそれぞれ組換えバクミドを構築し，カイコ幼虫で発現させた．構築した 3 種類のバクミドをそれぞれカイコ 5 齢幼虫に注射し，7 日間飼育後，各組換えウイルスを含むカイコ体液を回収した．組換えウイルス BmNPV/hEPO と BmNPV/hβ2GnTII，BmNPV/hβ4GalTI を 1:3:3 の割合で混合し，カイコ幼虫に感染させ共発現させた．発現した組換え hEPO は，カイコ体液から回収し，硫安分画とアフィニティークロマトグラフィーの 2 段階精製を行った．*N* 型糖鎖の末端ガラクトース（Gal）を認識する RCA120 を使用したレクチンブロットにより，hEPO の *N* 型糖鎖構造を推定した．
【結果】カイコ体液と脂肪体内で hEPO と hβ2GnTII，hβ4GalTI の発現は，ウエスタンブロットによりそれぞれ確認された．レクチンブロットでは，単独発現の hEPO に比べて共発現させた hEPO で，強くバンドが認められた．したがって，hβ4GalTI を共発現することで hEPO の糖鎖末端への Gal 付加が示唆された．現在，詳しい糖鎖構造解析を行っている．

Modification of *N*-glycan structure in human erythropoietin by co-expression of glycosyltransferases in silkworm

○Saki Horiba[1], Natsumi Kako[1], Takatsugu Miyazaki[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Sachiko Kondo[3,4], Hirokazu Yagi[3], Koichi Kato[3,4,5], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Nagoya City Univ., [4]MBL CO.,LTD, [5]Okazaki Inst. for Integr. Biosci., Nat. Inst. of Nat. Sci.)

Key words *N*-glycan, human erythropoietin, silkworm, galactosyltransferase

4P-J229 カイコ - BmNPV バクミド発現系を用いた *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II の発現と性質の解析

○宮崎 剛亜[1,2], 加藤 竜也[1,2], 朴 龍洙[1,2]
([1]静大・グリーン科技研, [2]静大・農・応生化)
miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp

【背景と目的】*N* 結合型糖鎖は普遍的なタンパク質翻訳後修飾の一つであり，真核生物においてさまざまな生理機能に関与している．分子レベルではタンパク質のフォールディング，安定性，分子間認識などに関わっており，その機能によって糖鎖の構造も多様である．*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII)は，複合型糖鎖の生合成に重要な足場となる *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)残基を $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ 糖鎖に付加する反応を触媒する鍵酵素である．GnTII は大量発現系の報告がほとんどなく，構造機能相関に関する知見も少ない．本研究では GnTII の機能解析を行うため，カイコ - バクミド発現系を用いた組換え発現を検討した．
【方法】ヒト GnTII の N 末端側に存在する膜貫通領域を除き，N 末端側にカイコ由来 bombyxin 分泌シグナル，His タグおよび FLAG タグを付加したタンパク質をコードする DNA を *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入した．組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫に注射し，感染したカイコ幼虫から体液を回収した．カイコ体液よりアフィニティークロマトグラフィーにて精製後，ピリジルアミノ (PA) 化標識を施した糖鎖基質を用いて酵素反応を行い，HPLC により反応産物を解析した．
【結果】カイコ幼虫から回収した体液から 2 段階のクロマトグラフィーにより，組換えヒト GnTII を電気泳動的に単一バンドになるまで精製した．基質に UDP-GlcNAc と $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$-PA を用いた酵素反応を解析したところ，糖転移反応が確認された．現在，より大量のタンパク質を得るため，発現コンストラクトや精製条件の検討および酵素の詳細な性質の解析を行っている．

Heterologous expression and characterization of *N*-acetylglucosaminyltransferase II using silkworm-BmNPV bacmid expression system.

○Takatsugu Miyazaki[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2]
([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

Key words *N*-glycan, glycosyltransferase, silkworm, BmNPV bacmid

人名索引

A

ABD aziz amin 4P-H109
ABDEL-RAHMAN Mohamed Ali 2P-N157
Adegoke Oluwasesan 2P-J222
Ahmad Hannaneh 3P-H063
Ahmad Suparmin 4P-N185
Ajeeta Anand 2P-N188
Aki Tsunehiro 4P-I154
Amza Rezky Lastinov 3P-I174, 3P-I176
Ando Akinori 2P-H087, 3P-F131
Aoyagi Hideki 2P-N188
Arafiles Kim Hazel V 4P-I154
Arakawa Kenji 4P-J201
Araki Kiwako S. 3P-I119, 4P-H109, 4P-H124
Asai Hirotaka 2P-H087
Asano Yasuhisa 2S-Bp04, 2S-Bp05
Azmi Nurlina B. 3P-N072

B

Bach Thi Mai Hoa 2P-N054
Bai Fengwu 4P-G053, 4P-N077
Bamba Takahiro 4P-G054
Banwait Bhagat 4P-G036

C

Carnier Casaroli Viviane 3P-H083
Chaiyaso Thanongsak 2P-G046
Chang Min ju 4P-N158
Chang Minju 4P-N148
Chang Te-Sheng 2P-N184
Chao luomeng 2P-N182
Chavan Sachin 2P-N211, 2P-N212, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217
Chavan Sachin Ganpat 2P-N213, 2P-N218
Chigira Naoto 4P-N222
Chi-Hsien Liu 3P-J226
Choi Jeong-Woo 2S-Dp01
Choi Jonghoon 2P-N211, 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Choi Seri 4P-J195
Choi Yong-Keun 4P-N148, 4P-N158

D

Daba Ghoson Mosbah 2P-G025
Dai Fumiko 4P-N222
Dai Gang 2P-N182
Damnjanovic Jasmina 2P-G043
Dang Thuy Duong 2P-N054
Dang Tu 4P-N103
Darmayanti Rizki 2P-H083
Deo Vipin Kumar 2P-H063
Dinesh Adhikari 4P-H109, 4P-H124
Dissook Sivamoke 2P-H076
Do Tuan Anh 4P-N103
Dwivany Fenny Martha 3P-H112, 3P-H114

E

Elfaramawy Maie 3P-G050

F

Fathima Artnice Mega 3P-N090
Fauzi Amirudin Akhmad 4P-J201
Fujii Kosuke 3P-H078
Fujiyama Kazuhito 4P-G061
Fukuda Junji 4P-I168
Fukui Toshiaki 3P-H083
Fukusaki Eiichiro 2P-H076, 3P-N090, 3P-H112, 3P-H113, 3P-H114
Furuta Masakazu 4P-N103
Futagami Taiki 4P-H093

G

Gao Ming 2P-H083
Garcia-Contreras Rodolfo 3P-G031
Geng Xiong 2P-N182
Goto Eiji 3S-Ap04
Gou Min 4P-G057, 4P-N138
Guan Di 2P-N156
Guirimand Gregory 4P-G054

H

Hagio Masahito 4P-N222
Han Sung Ok 2S-Bp02
Hasegawa Teruaki 4P-N222
Hasunuma Tomohisa 3S-Ap05, 4P-G054
Hazel V. Arafiles Kim 4P-H072
Hida Akiko 4P-I128
Hiraoka Osamu 2P-N059
Hiroe Ayaka 2P-N085
Ho Cuong 4P-H114
Ho Tuyen 2P-N054
Hong Jong Wook 2S-Dp03, 4P-J195
Hori Chiaki 3P-J236
Hwang Jangsun 2P-N211, 2P-N212, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218

I

Ikeno Shinya 2P-J173
Ima Yudha Perwira 3P-I119
Inokuma Kentaro 4P-G054
Insomphun Chayatip 3P-H084
Irifune Tomoya 3P-H113
Ito Masakazu 3P-H078
Ito Sohei 2S-Bp04
Iwasa Tatsuo 2P-N182
Iwasaki Yugo 2P-G043
Iwata Hidehiro 4P-N103
Izzuddin Fahrurrozi 2P-J171

J

Jarvis Donald L. 3P-G023
Jeon Hojeong 2P-N218
Jeong Wu-Young 4P-N148, 4P-N158
Jianzhong He 4P-H107
Jo Yeonho 2P-N211, 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Juanssilfero Ario Betha 3P-I174, 3P-I176

K

Kahar Prihardi 2P-J171, 3P-N072, 3P-N075, 3P-I174, 3P-I176
Kameya Masafumi 2S-Bp03
Kato Junichi 4P-I128
Kato Yasuo 3P-F131
Kawasaki Takeru 4P-G007
Khan Muhammad Saad 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Khan Saad Muhammad 2P-N211
Khanh Dung Pham 3P-N160
Khoris Indra M. 2P-J226
Kihira Chie 3P-I174, 3P-I176
Kim Chang Joong 4P-N148, 4P-N158
Kim Daekyung 4P-N155
Kim Dong-Myung 2S-Bp01
Kim Hyung Joo 4P-N148, 4P-N158
Kim Kwang Jin 4P-N148, 4P-N158
Kinashi Haruyasu 4P-J201
Kishida Masao 4P-N103
Kishino Shigenobu 3P-H078
Kita Akihisa 4P-I154
Kiyoda Shunji 4P-N103
Kondo Akihiko 2P-J171, 3P-I174, 3P-I176, 4P-G054
Kristensen Peter 4P-G036
Kubo Motoki 3P-I119, 4P-H109, 4P-H124
Kuhara Satoru 3P-N160
Kuntiya Ampin 2P-G046
Kusumah Dewi 3P-H117
Kwon-Young Choi 4P-N196

L

Lan John Chi-Wei 2A-Bp01
Lavina Walter 3P-N090
Lee Dohyun 2P-N211, 2P-N213
Lee Donghyun 2S-Dp05
Lee Eunwon 4P-J195
Lee Jaemin 2P-J171
Lee Jaewook 2P-N223, 2P-J224, 2P-J226
Lee Kyung-Ho 2S-Bp01
Lee Kyungwoo 2P-N211, 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217
Lee Sang Hyun 4P-N148
Lee Sunyoung 4P-J195
Lee Wyungwoo 2P-N218
Lei Zhongfang 2P-N084, 2P-N141, 3P-H066, 4P-N142, 4P-N160, 4P-N162, 4P-N204
Liao James 3P-H089, 3P-N090, 4P-G068
Lim Hyuneui 2S-Dp05
Lim Kwanhun 4P-J195
Limtong Savitree 4P-G061
Ling Tau Chuan 2A-Dp01
Lisdiyanti Puspita 2P-J171
Liu Ming-cheh 3P-G025
Liu Na 4P-H116
Liu Ye 2P-N084, 4P-N142
Lutfi Nimatus Salamah 3P-I119

M

Ma Qiansu 4P-H116
Mabashi-Asazuma Hideaki 3P-G023
Maeda Isamu 3P-H117
Maezima Koki 2P-N085
Masaki Kazuo 3P-N160
Matsui Daisuke 2S-Bp05
Matsumoto Hana 3P-I174
Matsumoto Ken'ichiro 3P-J236
Matsumura Yukihiko 4P-I154
Matsuura Tomoaki 3P-G050
Matsuyama Keisuke 4P-I154
Mattana Tunchai 3P-I128
Meinhold Sarah 4P-H107
Mineta Katsuhiko 2S-Cp02
Misaki Ryo 4P-G061
Miyamoto Kenji 3P-F131
Miyata Atsushi 3P-N160
Mo Brian King Himm 2P-H087
Mohd Fadzil Fakhrul Ikhma Bin 2P-N085
Mohd. Ali Hassan 2P-N095
Mori Kazuki 3P-N160
Morita Masahiro 2P-J224
Mumbi Rose Caroline Kirigo 4P-H124
Muramatsu Masayoshi 3P-H078
Muranaka Toshiya 3S-Ap01
Myasnikova Dina 4P-I168

N

Nakamura Satoshi 3P-H083
Nakano Hideo 2P-G043
Nakano Shogo 2S-Bp04
Nakashimada Yutaka 4P-I128, 4P-I154
Nakatani Yuki 3P-H078
Nariya Hirofumi 4P-G007
Navarro Ronald 3P-I136, 4P-H115
Negishi Nobuaki 4P-H116
Nguyen Phuong Nhue 2P-N054
Nindita Yosi 4P-J201
Noguchi Takuya 2P-H083
Nonaka Yuki 4P-N222
Nurhayati Retno 3P-J193

O

Ogasawara Wataru 3P-N160
Ogawa Jun 2P-H087, 3P-H078, 3P-F131
Ogino Chiaki 2P-J171, 3P-I174, 3P-I176, 4P-G054
Ohashi Takao 4P-G061
Okada Wakako 3P-F131
Okamura Yoshiko 4P-I154
Okutsu Kayu 4P-H093
Orita Izumi 3P-H083
Otsuka Hiromi 3P-I174, 3P-I176

P

Paerwen Paerhati 3P-J211
Pamella Apriliana 2P-J171
Parijadi Anjaritha Aulia Rizky 3P-H112
Park Chanhwi 2P-N211, 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Park Enoch Y. 2P-J224, 2P-J226
Park Hae Joon 4P-J195
Pathak Nishit 2P-J173
Pham Thanh Huyen 2P-N054
Phi Quyet Tien 2P-N054
Pontreli Sammy 4P-G068
Prasetya Bambang 2P-J171, 3P-I174
Putri Sastia 2P-H076, 3P-H089, 3P-N090, 3P-H113, 4P-G068
Putri Sastia Prama 3P-H112, 3P-H114

Q

Qi Ruilin 4P-H116

R

Rahmani Nanik 2P-J171
Ramli Norhayati Bt. 2P-N095
Ravindra Pal Singh 4P-G064
Ridwani Sobir 3P-H112

S

Saad Alaaeldin M. 4P-G007
Sahoo Soubhagya Laxmi 3P-J226
Saijai Sakuntala 3P-F131
Sakai Kenji 2P-H083, 2P-N095, 2P-N157
Sakamoto Sayuri 2P-N059
Sakata Toshiya 2S-Dp02
Sasaki Kengo 4P-G054
Sato Koki 4P-N222
Seesuriyachan Phisit 2P-G046
Seo Youngmin 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Seung Chin Clament Fui 2P-N095
Seyoung Jang 4P-N196
Sharma Aditya 4P-I140
Shida Yosuke 3P-N160
Shim Sok-Young 4P-N158
Shim Sok-young 4P-N148
Shimamoto Tadashi 4P-G007
Shimizu Kazuya 2P-N084, 2P-N141, 3P-H066, 4P-N142, 4P-N160, 4P-N162, 4P-N204
Shimokawa Naofumi 4P-N220
Shin Soojeong 4P-J195
Shinohara Makoto 3P-F131
Shrihari Chandraghatgi 3P-N124
Soliman Ahmed M. 4P-G007
Son Jaewoo 2P-N211, 2P-N212, 2P-N213, 2P-N214, 2P-N215, 2P-N216, 2P-N217, 2P-N218
Song Hak Jin 4P-N148, 4P-N158
Sonomoto Kenji 2P-H083, 2P-N157
Stanislaus Mishma Silvia 4P-H119, 4P-I140, 4P-I149
Sugahara Ko 4P-N220
Sugiyama Shigeru 2P-N059
Suhaimi Hamizah 2P-H064
Sui Yu-An 3P-H078
Sun Hongyi 3P-H066
Sun Shuang 4P-N162, 4P-N204
Sun Siyu 4P-N160, 4P-N162
Sun Zhaoyong 4P-G057, 4P-N138
Suzaki Etsuko 2P-N059
Suzuki Tetsurou 2P-J226

T

Tagawa Ayato 2S-Dp06
Taguchi Seiichi 3P-J236
Tajima Takahisa 4P-I128, 4P-I154
Takagi Hiroshi 2P-N054
Takagi Masahiro 4P-N220
Takamine Kazunori 4P-H093
Takemura Kenshin 2P-J224, 2P-J226
Takeuchi Toshifumi 2S-Dp04
Tamaki Hisanori 4P-H093
Tan Jiaming 2P-N157
Tang Yueqin 4P-G057, 4P-N138
Tashiro Kosuke 3P-N160
Tashiro Yukihiro 2P-H083, 2P-N095,

2P-N157
Terai Takuya 2P-N059
Thontowi Ahmad 3P-I174
Tran Thi My Duyen 4P-J194
Tsai You-Shan 3P-F131
Tsai Yung Yu 4P-G061
Tsuge Takeharu 2P-N085
Tunchai Mattana 4P-H111, 4P-I128

U

Utsunomia Camila 3P-J236

V

Vangnai Alisa 3P-I121
Vangnai Alisa S. 2P-F167
Vu Thi Hanh Nguyen 2P-N054
Vu Thi Tuyet Lan 4P-F216

W

Wang Huizhong 4P-N138
Wang Wen-Fang 3S-Ap03
Wang Ying 2P-N084, 4P-N142
Wang Yong 3S-Ap02
Watanabe Hajime 3P-G050
Watanabe Kenji 3S-Da01
Watanabe Kenshi 4P-I154
Watanabe Suzuran 2P-N085
Wen Xinlei 4P-N142
Wu Chih Chan 4P-G061

X

Xiao Han 3S-Ap03
Xiao Long 4P-N162, 4P-N204

Y

Yamada Takashi 4P-G007
Yamamoto Kana 3P-H114
Yamazaki Harutake 3P-N160
Yang Baixue 4P-G057
Yang Xi 2P-N141, 4P-N160, 4P-N162, 4P-N204
Yang Yingnan 4P-H116, 4P-H119, 4P-I140, 4P-I149
Yang Yung-Hun 4P-N148
Yano Kohei 2P-J173
Yi Yue 4P-N138
Yin Chenzhu 2P-N084, 4P-N142
Yin Xuan 4P-H093
Yoon Tae Hang 4P-N148, 4P-N158
Yopi 2P-J171, 3P-I174
Yoshizaki Yumiko 4P-H093
Yu Xinshui 4P-G053
Yuan Tian 2P-N084
Yung-Hun Yang 4P-N196
Yun-Gon Kim 4P-N196
Yusianto 3P-H113

Z

Zainudi Mohd. Huzairi 2P-N095
Zendo Takeshi 2P-N157
Zhang Mingming 4P-N077
Zhang Nan 4P-H119, 4P-I140, 4P-I149
Zhang Yiwen 4P-J201
Zhang Zhenya 2P-N084, 2P-N141, 3P-H066, 4P-N142, 4P-N160, 4P-N162, 4P-N204
Zhao Chenyu 4P-H119, 4P-I140, 4P-I149
Zhao Xinqing 4P-G053, 4P-N077
Zhao Yuchen 3P-H066
Zhong Jian-Jiang 3S-Ap03
Zhou Xuehu 4P-H116
Zhu Junyi 2P-N141, 4P-N162
Zhu Qi 4P-H116, 4P-I140

あ

藍川 晋平 3P-G004, 3P-I175
愛甲 徹 3P-H073
相田 涼介 4P-N217
愛知 真木子 3P-H094
相原 惇也 2P-G013
相山 怜子 4P-H096
青井 議輝 3S-Hp02
青木 俊 2P-N048
青木 仁一 2P-I154
青木 壮太 3P-H060
青木 奈緒子 4P-J193
青木 菜摘 2P-I134
青木 里奈 2S-Da02
青木 航 2P-N142, 3P-J217, 3P-N218, 3S-Aa06, 4P-H080
青柳 智 4P-H114, 4P-H115
青柳 秀紀 2P-N187, 2P-J189, 2P-J190, 2P-J191, 3P-F170, 3P-I171, 3P-I172, 3P-I173, 3S-Hp03
青柳 有美 2P-I133
赤井 亮太 4P-N043
赤石 健児 4P-G024
赤尾 健 2P-F114, 2P-I118, 3S-Ba02, 4P-H089
赤上 雅子 2P-J195
赤城 幸 4P-G042
赤坂 直紀 2P-G030, 2P-H094, 2P-H107
赤澤 真一 3P-E022
明石 貴裕 4P-H088
赤田 倫治 2P-G013, 3P-G010
赤堀 文雄 3P-N135
秋 庸裕 2P-I151, 2P-J198, 4P-H072, 4P-I141, 4P-J221
秋田 紘長 2P-N192
秋元 浩 3S-Ca01
秋山 真一 2P-J176
秋山 佳丈 4P-I180
淺井 聖也 4P-I171
阿座上 弘行 2P-N001
浅川 賢史 2P-H066
朝倉 大河 3P-J221, 4P-N071
朝倉 侑弥 3P-I132, 4P-J192
淺田 元子 3P-I154
浅野 静 2P-I132
浅野 泰久 2P-G057, 2P-H060
浅間 孝志 2P-N072
浅水 俊平 2S-Hp03
浅村 健太 2P-J209, 3P-J213
朝山 宗彦 2P-G008, 2P-I154
芦内 誠 2P-G012, 4P-J209
小豆澤 友希 2P-J172
東 雅之 3P-H067, 3P-H068, 3P-I133, 4P-E143
東 勇太 3P-I156, 3P-I157
安達 桂香 4P-G064
新 裕太 4P-N043
跡見 晴幸 3P-N153
阿野 貴司 2P-N026, 4P-H121, 4P-N135, 4P-N136, 4P-I152, 4P-I153, 4P-J197
阿野 泰久 3P-H108
阿野 嘉孝 2P-I149
油井 信弘 3P-G030, 3P-I159, 3P-J186, 3P-J225, 3P-J230
油谷 幸代 3P-J215
油屋 駿介 4P-H080
阿部 勝正 4P-G016, 4P-G021
阿部 克也 3P-G030, 3P-I159, 3P-J186, 3P-J225, 3P-J230
阿部 敬悦 3P-G040
阿部 英喜 2P-I159, 2P-I160
阿部 文明 2P-N137, 2P-J230
天尾 豊 4S-Ba04
天辰 健一 4S-Aa05
天野 太郎 3P-G059
天野 善継 4P-N207, 4P-N208
雨宮 崇 2P-N142
綾部 時芳 3S-Bp04
鮎川 翔太郎 3S-Aa01
荒井 隆益 2P-N156
新井 俊陽 3P-I148
荒井 啓 3P-G015
新井 博之 3P-H077
新井 宗仁 3P-G054
新井 亮一 2P-H075
荒川 和晴 2S-Aa04
荒川 賢治 4P-J200
荒川 弦矢 4P-G005
荒木 希和子 3P-I118, 4P-H110, 4P-H113, 4P-I131
荒木 徹朗 3S-Gp01
荒木 朋洋 3P-N100
荒木 通啓 3P-J214
嵐田 遥 3P-J185
有川 尚志 2S-Da02
有永 幹基 4P-I169
有馬 一成 2P-G049
有馬 二朗 2P-G045, 3P-G027, 3P-G059
粟谷 晃也 3P-G036

安藤　翔太　4P-N099
安藤　正浩　2P-J193, 3P-J229

い

飯島　和丸　2P-I132
飯島　信司　4P-I172
飯島　翠　2P-I162
飯田　順子　4P-H079
飯田　泰広　3P-G024
飯野　隆夫　2S-Ba02
家藤　治幸　3S-Ba04
井門　久美子　3P-H108
五十嵐　一暁　3P-I146, 3P-I148
五十嵐　圭日子　3P-G039
井川　聡　2P-J172
生嶋　茂仁　3P-F109
生田　幸士　3P-J212
池　正和　2P-N156
池　道彦　3P-I138, 4P-H101, 4P-H122, 4P-H123
池内　暁紀　3P-I145
池内　真志　3P-J212
池上　健太郎　2P-H066, 2P-H073
池上　健仁　4P-H102
池側　智香子　2P-N127
池下　実咲　2P-N120
池田　和貴　3P-H094
池田　卓史　3P-N033
池田　丈　2P-G010, 2P-H096, 2P-H097, 3P-E057, 3P-J190
池田　宰　4P-I126
池田　優理子　4P-H086
池野　慎也　2P-J221
池袋　一典　2P-E007, 4P-J211, 4P-J212
伊佐　猛　3P-E022
伊佐木　芳　3P-J234
井沢　真吾　2P-F131, 4P-G051
石井　明子　4P-G035
石井　慧　2P-J200
石井　純　3P-G002, 3P-G004, 3P-I175, 4P-N059
石井　大輔　2P-I165
石井　正治　2S-Ba03, 3P-H077
石井　友理　2P-G030, 2P-H094, 2P-H107
石川　晃大　4P-I171
石川　恭子　2P-J195
石川　大将　3P-I178
石川　聖人　2P-J177, 2P-J200, 3P-H060, 3P-E092
石川　森夫　3P-H079
石川　陽一　4S-Aa01
石田　丈典　3P-E057
石田　尚之　3P-G058
石田　亘広　2P-J186
石田　秀樹　4P-H118
石田　義大　4P-H089
石塚　裕貴　2P-I147
石橋　直樹　2P-G024, 2P-G025
石原　杏里　2P-N021
石原　一彦　4P-I174
石原　玄基　3P-J220
石山　真乃介　3P-N103
伊豆　英恵　3S-Dp01
和泉　自泰　2P-H109, 4P-H082, 4P-E083, 4S-Da03
伊世井　湧太　3P-J230
磯谷　敦子　4P-H086
礒部　公安　2P-G057
伊田　小百合　2P-J196
板田　鉄平　2P-J180, 3P-H062
市川　響太郎　3P-G038
市川　航平　3P-J190
市川　夏子　4P-J187
市川　稚子　2P-H086
一木　葉月　3P-I122
市毛　栄太　4P-G065
一瀬　桜子　3P-G016
一瀬　涼　3P-H086
齊宮　史佳　2P-I149
一色　理乃　2P-G031
井手　圭吾　3P-J215
伊藤　彰敏　4P-H091
井藤　彰　2P-J178, 3P-J211, 4P-N170
伊藤　圭祐　2P-G019, 4P-F216
伊藤　惠介　3P-H111
伊東　謙吾　3P-N166, 3P-N167
伊藤　功起　4P-N085
伊藤　小百合　2P-G020
伊藤　順子　2P-J195
伊藤　順二　3P-I145
伊東　昇紀　2P-G044
伊藤　創平　2P-G019
伊藤　卓治　2P-J205
伊藤　俊彦　3P-H099
井藤　俊行　3P-H081, 4P-I137
伊藤　菜奈子　2P-G041
伊藤　伸哉　3P-G035, 3P-G036, 3P-H061
伊藤　遼　4P-H075
伊藤　英晃　3P-G039
伊藤　大和　2P-I132
伊東　雅人　2P-G055, 2P-G056
伊藤　みさご　4P-N106
伊藤　通浩　3P-J215, 3P-J222, 4P-H075, 4P-H076
伊東　祐二　2P-G049
伊藤　幸成　2P-H071
伊藤　弓弦　3S-Gp03
伊藤　洋一郎　3P-G004, 3P-I175, 4P-G051
糸岡　洸樹　2P-F131
糸見　明穂　3P-N072
稲垣　和三　2P-F228
稲垣　慶一　4P-I166
稲垣　賢二　2P-G041
稲垣　瑞穂　3P-N162, 3P-N163
稲垣　裕　2P-H063
乾　雅史　4S-Ca03
乾　将行　2P-H098, 2P-H099, 2P-H100
犬飼　忠彦　4P-N049
井家　益和　2S-Gp02
井上　順允　3P-I182
井上　大介　4P-H123
井上　千弘　3P-N124
井上　豊久　4P-H086
井上　尚　2P-G045
井上　諭宜　4P-H087
井上　優里　4P-I164
猪熊　健太郎　4P-H078
猪瀬　陽加　3P-F170
伊庭　斉志　3P-J213
今井　健太郎　3P-H079
今井　健人　2P-I138
今井　博之　4P-N081
今井　祐太　3P-J195
今石　浩正　2P-G036
今泉　鉄平　3P-N162, 3P-N163
今泉　裕　2P-J205
今岡　大士　4P-N020
今田　勝巳　2P-G041
今中　忠行　3P-N153
今中　洋行　3P-G058
今堀　夏奈美　4P-I165
今村　維克　3P-G058
今村　信和　2P-I154
井村　誠　3P-E045
伊豫谷　愛　4P-G010
入江　賢児　4P-G051
岩井　謙一　2P-H090, 2P-H091, 3P-N065, 4P-H094
岩井　良輔　3P-J207, 4P-F181
岩木　宏明　4P-G050
岩切　亮　3P-E045
岩倉　遼　3P-I164
岩越　亮汰　2P-G051
岩崎　還帰　2P-E101
岩崎　卓己　4P-G002
岩崎　裕樹　2P-H108
岩田　忠久　2P-I165
岩田　史也　2P-G053
岩本　悟志　3P-N162, 3P-N163
岩本　康成　2P-J179

う

上佐古　大貴　2P-I117
上田　賢一　3P-N142
上田　大次郎　4P-F198, 4P-J199
上田　宏　3P-G052, 3P-G053, 4P-G036, 4P-E041
植田　充美　2P-N142, 3P-J217, 3P-N218, 3S-Aa06, 4P-H080, 4P-J210
上田　佳希　4P-I133
植月　英智　4P-G034
上野　絹子　2P-E007
上野　大心　4P-J186

上野　嘉之　3P-N134
植林　希代加　3P-H089, 4P-N073
上原　健二　2P-I115
植松　元太郎　3P-H088
上村　毅　3P-G010
植村　壽公　2P-J175
魚住　昇平　2P-N021
魚住　信之　4P-E161
氏家　和紀　4P-J194
宇治家　武史　2P-J231
牛尾　一利　3P-I129
氏原　哲朗　4P-F202
鵜瀬　和秀　3P-H094
内田　博之　2P-G051
内田　由乃　4P-G040
内山　圭司　3P-J202
内山　佳祐　2P-I144
内山　俊宏　4P-I163
宇津井　隆志　4P-J224
鵜頭　理恵　3P-J194, 4P-I176
宇野　紘平　3P-G041
梅川　碧里　2P-N088
梅谷　かおり　3P-H064
梅津　光央　2P-H070, 4P-G038, 4P-N039
梅根　輝来人　3P-G021
梅野　太輔　3S-Da04
裏地　美杉　4P-N027, 4P-N028
浦瀬　太郎　4P-N108
黒澤　八重　2P-E065
上井　幸司　2P-H058, 2P-J180, 3P-H062
海野　源人　3P-H085

え

エーベル　レオ　2S-Hp01
江頭　由里子　4P-G035
浴野　圭輔　4P-N031
江口　晃弘　3P-G020
江口　優一　3P-J216, 4P-G005
江邉　正平　4P-H121, 4P-I152, 4P-I153
遠藤　淳　3P-G007
遠藤　佳純　3P-H102
遠藤　輪　3P-I173

お

及川　英秋　3S-Da03
笈木　宏和　3P-I122, 3P-I123
種田　あずさ　4P-H070
扇谷　悟　3P-I143, 3P-N144
黄地　祥子　4P-J187
大井　俊彦　2P-I162, 2P-N164, 2P-I165, 3S-Bp03, 4P-J219
大池　達矢　4P-H121, 4P-I152, 4P-I153, 4P-J197
大垣　裕亮　3P-N153
大柄　俊貴　3P-H062
大川　裕也　3P-H063
大河原　弘達　3P-N191
大久保　悠介　4P-H075, 4P-H076
大河内　美奈　4P-J214, 4P-J215, 4S-Ca04
大越　鷹哉　4P-N206
大澤　怜　4P-J203
大島　健志朗　2S-Cp01
大島　嵩裕　4P-H070
大島　立樹　3P-G051
大島　敏久　3P-G028, 3P-N029, 3P-G041, 3P-G042, 3P-G043, 4P-I145, 4P-I146
大城　隆　3P-G047, 3P-N046, 4P-G001
大杉　航平　4P-G016
大関　俊範　4P-G026
大薗　まみ　2P-I125
太田　邦史　4P-N048
太田　健人　3P-J227
太田　大策　4P-I159
太田　博道　2P-G049
太田　愛美　4P-G034
太田　美乃　3P-J235
大田　悠里　3P-I179
大瀧　賀也　3P-I171
大竹　遥　2P-J194
大谷　千晶　3P-G047
大谷　悠介　3S-Da04
大谷　優太　2P-N142
大津　厳生　4P-J203
大塚　裕美　3P-N075
大塚　未音　3P-I133
大塚　祐一郎　2P-H113, 3P-I137
大西　拓　3P-G043
大西　徹　3P-I145
大西　知子　4P-J215
大西　将也　3P-H068
大貫　喜嗣　4P-N175
大野　博司　3P-H081
大箸　信一　2P-H077
大橋　大志　4P-N031
大橋　貴生　4P-J225, 4P-J226
大橋　正孝　2P-I116
大畠　昌也　3P-G049
大原　礼仁　4P-H091
大堀　正裕　2P-H061
大政　健史　2P-H067, 3P-J202, 3P-J209, 3P-J210, 4P-I169
大室（松山）　有紀　4P-E041
大室　有紀　3P-G053
大本　貴士　2P-H102, 2P-H103, 4P-E143
大森　謙司　4P-G037
大山　彰　3P-J214
岡　有香里　4P-H079
岡崎　宜恭　4S-Aa03
岡崎　秀明　2P-G055, 2P-G056
岡澤　敦司　2P-H092, 4P-I159
小笠原　泰志　3P-J231, 4P-F202
岡島　奨　4P-N014
岡島　俊英　4P-G025, 4P-G026
岡住　脩平　4P-N020
岡田　克彦　2P-I154
岡田　真衣　3P-J195, 4P-J191
岡田　洋平　2P-J205
尾形　敦　3P-I136, 4P-H114
尾形　駿介　2P-G022
尾形　拓哉　2P-J203
尾形　智夫　4P-N085
岡南　政宏　2P-N026, 4P-H121, 4P-N135, 4P-N136, 4P-I152, 4P-I153, 4P-J197
岡西　崚輔　4P-G047
岡野　憲司　2P-G037, 3P-E045, 3P-H088, 4P-G069
岡野　啓志　2P-J231
岡野　凌一　4P-N104
岡林　雪乃　4P-N049
岡村　昂典　2P-N074
岡村　好子　2P-I151, 2P-J198, 4P-H072, 4P-H100, 4P-I141, 4P-J221
岡本　一起　2P-N220
岡本　浩二　4P-N059
岡本　士毅　3S-Dp04
岡本　姫佳　2P-H105
岡本　浩　2S-Gp01
岡本　正宏　2P-J168, 2P-J209, 3P-J213
岡本　諒太　2P-J209, 3P-H097
岡本　渉　4P-J199
小川　光輝　2P-I138
小川　俊　4P-G010
小川　順　2S-Ca01, 4P-E017
小川　拓水　4P-I159
小川　信明　3P-G039, 3P-G049
小川　真弘　4P-G005
沖　昌也　2P-G051
荻田　亮　2P-N126, 2P-N127, 2P-N128
荻野　千秋　2P-E101, 2P-J170, 2P-J206, 3P-N072, 3P-N075, 3P-I177
荻野　博康　3P-G009
荻山　大輝　3P-N105
荻原　寛和　2P-H062
奥河内　貴大　2P-J227
奥嵜　雄也　4P-I172
奥田　将生　4P-N033
奥田　真利　2P-G049
奥野　圭祐　2P-N026
奥野　琴音　4P-F198
奥野　恭史　2S-Cp04
奥村　友太　3P-N046, 3P-G047
小倉　一将　3P-H077
小椋　義俊　2P-G003
小栗　秀俊　2P-G040
小江　誠司　3P-G032
生越　大輔　2P-G055, 2P-G056
小山内　崇　2P-G044, 2P-I150, 2P-I155, 3P-N093, 3P-H095, 4P-N073
小山内　稚尋　3P-I125
小澤　賢人　2P-G002
尾島　由紘　3P-H067, 3P-H068,

3P-I133, 3P-J193, 4P-E143
尾関　健二　3P-N101, 3P-H102
小田　達也　4P-N155
尾高　雅文　3P-G037, 3P-G039, 3P-G049
小田垣　瑞穂　3P-J233
越智　浩　2P-N137, 2P-J230
落合　秋人　2P-H061, 2P-H062, 3S-Bp02, 4P-N217, 4P-N218
鬼塚　正義　3P-J202, 3P-J209, 3P-J210, 4P-I169
小野　章彦　4P-N170
小野　航央　3S-Da04
小野　智博　2P-G037
小野　奈津子　4P-N004
小野瀬　暁　4P-I137
小野寺　宜郷　3P-G007
小幡　公平　3P-G040
小畑　智弘　4P-H107
小原　聡　4S-Ba01
小俣　達男　3P-H094
面川　歩　3P-G037
親泊　安基　3S-Hp04
小山　智己　2P-I146
尾山　廣　4P-N031
折川　明日美　2P-G016
折田　和泉　2P-N161, 3P-H084, 3P-H085
折原　芳波　4S-Ca05
恩田　裕　4P-G009

か

甲斐　幹世　2P-N001
甲斐　達男　3P-N110
貝沼（岡本）　章子　2P-G011, 3P-H079
高　楽　3P-G044
加賀　経元　2P-G020
香川　元気　2P-N204
柿薗　ダララット　4P-N033
柿薗　俊英　4P-I147
角間　真人　3P-G041, 3P-G042
掛下　大視　3P-I148
加子　夏未　4P-N228
加古　博子　2P-I158
笠井　大輔　3P-I121
笠井　拓哉　2P-N029
笠井　尚哉　2P-I140, 3P-H116
笠井　宏朗　4P-H087
笠井　稜子　3P-F147
梶浦　裕之　4P-I163
樫尾　浩貴　2P-I145
梶田　真也　2P-H113
梶原　拓真　2P-I123
梶原　悠　3P-H081
梶山　慎一郎　3P-J233, 3P-J234, 4P-J197
柏　雅美　2P-J199
梶原　翔太　3P-G009
片岡　尚也　2P-F167, 4P-G029, 4P-G030
片桐　美紀　4P-N099
片倉　啓雄　2P-I124, 3P-H086, 3P-H087
片平　悟史　3P-I145, 4P-G051
片平　正人　4P-J223
片山　周平　3P-I177
片山　淳子　4P-N043
片山　翔太　2P-G009
片山　高嶺　2P-E082
片山　琢也　3S-Ba05, 4P-N063
片山　葉子　4P-H115
片山　義博　2P-H113
桂浦　善一朗　2P-H097
勝河　祐希　3P-H063
勝山　陽平　3S-Da02
加藤　明宏　3P-H094
加藤　克哉　4S-Aa04
加藤　晃　4P-J186
加藤　晃一　4P-N228
加藤　純一　2P-H108, 2P-H111, 2P-I151, 2P-J198, 3P-I128, 3P-I137, 4P-H111, 4P-N127, 4P-I141
加藤　太一郎　2P-G049, 2P-H106, 2P-J199
加藤　竜也　2P-H063, 2P-H064, 2P-E065, 4P-J227, 4P-N228, 4P-J229
加藤　晃代　4P-G040
加藤　寛人　3P-J196, 4P-I177
加藤　雅士　3P-N019, 4P-N063, 4P-H091
加藤　悠一　2P-I146, 4P-I156
加藤　祐輔　2S-Da04
加藤　竜司　2A-Gp01, 3P-J195, 3P-J196, 3P-J197, 4P-I167, 4P-I177, 4P-J191, 4P-F216
門倉　利守　2P-N120, 2P-N121
門屋　亨介　2P-N164
門脇　真史　2P-F114, 3S-Ba02
金井　保　3P-N153
金井　宗良　2P-I117
金尾　忠芳　3P-N135
金森　敏幸　3S-Gp07, 4P-I177, 4P-N182
金山　直樹　4P-G034
蟹江　慧　3P-J195, 3P-J196, 3P-J197, 4P-I167, 4P-I177, 4P-J191, 4P-F216
金岡　英徳　4P-I171, 4P-I172
金桶　光起　4P-H090
金子　恒太郎　2P-G050
金子　真大　2P-J177, 3P-E092
金子　由喜　4P-I137
兼崎　友　2P-G008, 2P-G011, 2P-N120, 2P-N121, 3P-H079, 4P-N055
金田　絵里　3P-N001
兼吉　航平　3P-J202
賀野　壮一朗　2P-G038
加納　健司　2S-Ba04
椛田　聖孝　3P-N100
釜井　彩花　2P-G057
釜井　優花　2P-G020
鎌形　洋一　3P-I143, 3P-N144
上岡　莉枝子　2P-E035
上條　知昭　4P-G002, 4P-N003
上出　倫敬　4P-J203
上塘　広也　4S-Aa05
神永　紗英子　2P-I153
上平　正道　2P-J178, 3P-J211, 4P-N170, 4P-I171
上村　一雄　3P-N135
上村　直史　3P-I156, 3P-I157, 4P-I129, 4P-I130
上村　光浩　2P-I138
神谷　典穂　2P-N204, 4P-G012
神吉　菜摘　4P-N046
亀田　真央　4P-I176
亀山　眞由美　2P-G027
唐鎌　智也　2P-J200
川井　淳　3P-N048
河合　一輝　4P-N055, 4P-G056
河合　和紀　2P-J177
河合　功治　2P-G050, 3P-J224
河合　繁子　3S-Da04
河合　駿　4P-J191, 4P-F216
河合　美桜　3P-H087
河合　祐人　2P-G031
河上　佳奈　3P-H061
川上　駿　3S-Bp03, 4P-J219
川上　隼人　3P-J224
川上　秀昭　2P-H093
河岸　洋和　2P-I158, 3P-F147, 3P-I149, 3P-I184, 4P-I151
川口　航平　3P-N013
川口　太一　4P-E143
川口　秀夫　2P-E101, 2P-J170
川﨑　了　2P-G040, 3P-I130
川崎　典起　2P-J196
川﨑　浩子　4P-G002, 4P-N003, 4P-J187, 4P-J189
河﨑　雄太　4P-J223
椛沢　遼　2P-G052
川下　理日人　4P-G024
川瀬　三雄　4P-N049
川名　修一　4P-H079
川西　琢也　2P-I144, 3P-I125, 3P-I126, 3P-I178
河野　邦晃　2P-H090, 2P-H091, 3P-N065
河野　慎一　4P-H079
河野　菜摘子　4S-Ca01
河野　祐介　4P-J203
河野　祥尚　4P-J192
川野　竜司　2A-Fa01
川端　潤　2P-G037
河原　あい　3P-H070
河原　正浩　3P-G020, 3P-G021
河邉　佳典　2P-J178, 3P-J211, 4P-N170
川又　透　2P-G008, 2P-I154
川向　孝知　4P-H082, 4P-E083
川村　駿介　2P-H105

川村　実央　3P-N153
河原崎　泰昌　2P-G019, 3P-G017, 4P-F216
河原林　裕　4P-G011
康　宇鎭　4S-Ca01
神田　昇佑　4P-J192
神田　義貴　4P-N052
神田　涼子　4P-H086
神並　美華　3P-J200
神原　亮大　2P-H096
神原　秀記　3P-G026
神戸　浩美　3P-I145

き

木賀　大介　3S-Aa01
菊田　弘和　3P-I145
菊地　晟弘　3P-I156
菊池　沙也香　4P-N039
菊地　淳　3P-J221, 4P-H070, 4P-N071
菊池　康紀　4S-Ba03
菊間　隆志　3P-N013
来住　秀憲　2P-H067
岸田　隆寛　2P-H102
岸田　真裕美　2P-H112
岸野　重信　2S-Ca01
岸野　真弓　2P-G023
岸本　高英　3P-N048, 4P-E017
喜多　晃久　2P-H108, 2P-I151, 4P-I141
北　一真　3P-J210
北　雄一　2P-H086
北岡　篤士　4P-H080, 4P-H098
北垣　浩志　2P-F114, 3P-H107, 3S-Ba02
北川　孝雄　4P-G051
北川　隆徳　2S-Hp04
北口　哲也　3P-G052
北澤　宏明　3P-N048, 4P-E017
北島　洋二　3P-N134
北野　勝久　2P-J172
北橋　優子　4P-J187
北村　進一　2P-N128
北本　勝ひこ　3P-N013
北本　宏子　3P-G003, 4P-G032
木野　邦器　2P-G038, 2P-G039, 2P-G052, 2P-H105
木野　裕太　4P-J184
木内　勇貴　3P-I121
紀ノ岡　正博　2P-J175, 2P-J176, 3P-J193, 3P-J204
木下　理恵　3P-H063, 2P-N068
木原　崇博　4P-N205
紀平　千枝　3P-H080
紀平　知枝　3P-N072, 3P-N075
金　達英　4P-J189
金　美海　2P-J176, 3P-J204
木村　明音　4P-J187
木村　和幸　2P-J199
木村　啓太郎　3S-Ba01
木村　哲哉　2P-H104
木村　尚弥　2P-H075
木村　信忠　3S-Hp01
姜　林涛　3P-F181
清　啓自　2P-G028, 2P-H080, 2P-H081, 2P-N120
木吉　真人　4P-G035
清瀬　紀彦　3P-G058
清田　泰次郎　3P-J196, 3P-J197
清野　珠美　4P-H098
桐浴　隆嘉　3P-F109
桐村　光太郎　4P-G008, 4P-G009, 4P-G062
金城　綾乃　3S-Dp04
金原　和秀　2P-N032, 3P-I137

く

クウォン　ヒースー　3P-N013
久木崎　雅人　2P-H090, 2P-H091
日下部　均　2P-G041
楠　正隆　4P-I179
葛山　智久　3S-Da05
國澤　研大　4P-H079
國武　絵美　2P-H104
久野　龍之介　4P-I153
久原　哲　2S-Cp03, 3P-N180
久保　研二　2P-H058
久保　幹　3P-I118, 4P-H110, 4P-H113, 4P-I131
久保　雄司　3S-Ba01
窪川　清一　2P-N142
久保田　恵理　2P-N120, 2P-N121
久保田　智巳　4P-J224
窪寺　隆文　4P-H088
窪村　有紗　4P-J225
熊谷　孝則　2P-G016
熊谷　浩樹　2P-I136
熊澤　史貴　2P-N127
熊田　陽一　3P-F181, 3P-I182, 3P-I183, 3P-J188, 3P-N187, 4P-N043, 4P-G044, 4P-N045, 4P-N046, 4P-G047, 4P-N049
倉富　優季　2P-I160
倉根　隆一郎　4P-H118
倉橋　健介　4P-N104, 4P-N106
倉林　篤史　2P-N137
倉光　香奈　2P-I124
栗木　隆　3S-Ca04
栗田　修　3P-H064
栗林　喬　4P-H090
栗原　誠　3P-G024
栗原　靖之　4P-G042
栗本　昌樹　2P-N137, 2P-J230
栗本　祐樹　2P-J203
厨　祐喜　3P-J214
黒木　克明　4P-N085
黒木　勝久　3P-G025
黒澤　恒平　4P-N048
黒沢　則夫　3P-G042
黒澤　尋　4P-N175
黒住　悟　4P-H118
黒田　章夫　2P-G010, 2P-H096, 2P-H097, 2P-H111, 2S-Da05, 3P-E057, 3P-J190
黒田　浩一　4P-J210
黒田　俊一　2P-J207, 2P-J208, 2P-N220
黒田　千尋　3P-G035
黒田　照夫　2P-G016
黒田　真史　3P-I138, 4P-H101, 4P-H122, 4P-H123
黒田　雄亮　4P-N136
黒羽　真以　2P-G017, 2P-G027
黒部　督惠　4P-N014
黒森　崇　4P-E161
桑原　浩誠　2P-H093
桒山　知子　4P-N134

け

下司　友仁香　4P-H097
解良　康太　4P-E161
解良　芳夫　4P-G016, 4P-G021

こ

小池　英明　3P-G003, 3P-I136
小泉　英樹　3P-H108
小泉　史明　3P-J228
黄　鵬涛　4P-N206
高　未麗　2P-I145
高阪　千尋　4P-H080, 4P-H098
合田　雅浩　2P-J197
合田　亮　4P-N106
高妻　篤史　2P-N029
甲元　一也　3P-N155
古賀　匠　3P-N192
古賀　雄一　2P-H067, 3A-Ap01, 3P-J202, 3P-J209, 3P-J210, 4P-I169
小川　雅人　3P-J222, 3P-J223, 4P-J190
苔庵　泰志　3P-H064
小坂　薫　4P-I179
小境　敏揮　2P-H090, 2P-H091
小酒井　一輝　4P-G025
小崎　一功　4P-F213
小塩　茂々子　4P-N023
越澤　大典　2P-I143
兒島　憲二　2P-J231
兒島　孝明　4P-G040, 4P-N063
五島　徹也　2P-I118
小杉　昭彦　2P-N156
小関　卓也　3P-G038
小園　祥子　4P-E017
小高　敦史　2P-I119
小高　章宏　4P-I157
小高　明日香　2P-I154
小谷　真也　2P-G017, 2P-G018, 2P-G027
児玉　浩明　1A-Wp03, 3P-H081, 4P-I137
小玉　誠　2P-H090, 2P-H091
児玉　悠　2P-N164

小塚　智沙代　3S-Dp04
後藤　早希　2P-I159, 2P-I160
後藤　雅宏　2P-N204
小西　正朗　2P-I130, 3P-G012, 3P-I141
小西　理絵　4P-G058
木場　康介　4P-I159
小林　和輝　2P-J191, 3S-Hp03
小林　慶一　4P-G062
小林　俊介　2P-E101
小林　彰子　3S-Dp05
小林　誠治　4P-N135
小林　新吾　2S-Da02
小林　伸太郎　2P-E065
小林　巧　3P-I121
小林　直也　2P-H075
小林　秀峰　2P-N202
小林　大起　3P-G059
小林　史尚　3P-N140
小林　正美　3P-J230
小林　洋介　3P-I143, 3P-N144
古原　俊哉　2P-H078, 3P-H081
駒　大輔　2P-H102, 2P-H103, 4P-E143
小松　丈紘　3P-N029
小松　雅史　4P-N134
小松崎　亜紀子　3P-G006
五味　勝也　3P-G015, 3P-G016, 3P-G017, 3P-G040
古村　崚　3P-N218, 3S-Aa06
小森　喜久夫　3S-Gp04
小森　誠也　3P-N019
小山　泰二　4P-G005
権平　文夫　4P-N045, 4P-N046, 4P-G047, 4P-N049
近藤　昭彦　2P-E101, 2P-H100, 2P-H112, 2P-I146, 2P-J169, 2P-J170, 2P-J206, 3P-G004, 3P-N005, 3P-N072, 3P-N075, 3P-H088, 3P-H096, 3P-I175, 3P-I177, 4P-G056, 4P-G058, 4P-N059, 4P-G065, 4P-H078, 4P-N120, 4P-I156
近藤　彬文　4P-N085
近藤　旺次郎　3P-I149
近藤　敬子　4P-J223
近藤　幸子　4P-N228
近藤　麻梨子　2P-G023
金野　智浩　4P-I174
紺屋　豊　2P-I135, 4P-E084

さ

崔　舸　3P-N124
佐伯　将　2P-G045
齋藤　充弘　3P-N191
斉藤　寿槻　4P-N218
斉藤　加奈子　3P-I179
齊藤　健吾　4P-N217
斎藤　幸一　3S-Gp02
齋藤　史織　4P-J211
齊藤　周　3P-H084
斉藤　丈　4P-I179
齋藤　大輝　3P-H068
齊藤　隆行　4P-H087
斎藤　博久　4S-Ca05
齋藤　雅典　4P-I139
齋藤　友紀　3P-N162
斉藤　諒　3S-Hp03
酒井　謙二　1A-Wp03, 2P-H078, 3P-H081, 3P-I132, 4P-F183, 4P-J192
境　慎司　2P-G034
酒井　千尋　3P-J205
酒井　遥行　3P-I150, 3P-I151
酒井　保藏　2P-N004, 2P-N005, 2P-G020
酒井　康行　3S-Gp04
酒井　雄大　2P-E007
坂上　莉奈　3P-J232
榊原　陽一　3P-G025
阪口　健太　4P-I156
坂口　武則　2P-H090, 2P-H091
阪口　利文　4P-H100
酒瀬川　信一　4P-G018
酒瀬川　世瑠　2P-N126
坂田　研二　3P-J221, 4P-N071
酒谷　真以　3P-H107
阪中　幹祥　2P-G003
坂梨　千佳子　3P-G026
坂本　一平　2P-E007
坂元　仁　3P-E069
坂本　拓郎　2P-I148
坂元　博昭　2P-N210, 2P-N225, 3P-G028, 3P-N029, 3P-G043, 4P-I145, 4P-I146
坂本　勝　4P-I132
阪本　真由子　3P-H107, 3S-Ba02
坂本　祐一朗　4P-G044
櫻井　紫乃　4P-H101
櫻木　直也　3S-Bp04
櫻庭　春彦　3P-G028, 3P-N029, 3P-G041, 3P-G042, 3P-G043, 4P-I145, 4P-I146
酒井　美由季　2P-G024
提箸　祥幸　2P-H061
座古　保　2P-J172, 2P-J181
佐合　徹　3P-H064
佐古田　久雄　2P-G030, 2P-H094, 2P-H107
迫野　昌文　2P-H071, 3P-G051
佐々木　章　2P-F228
佐々木　克仁　3P-G038
佐々木　慧　3P-I137
佐々木　健　3P-I137
佐々木　建吾　2P-J170, 4P-N120
佐々木　大樹　3P-H079
佐々木　大介　4P-N120
篠笥　光慶　2P-N129
笹野　佑　3S-Ba03
佐塚　隆志　2P-J170
粟冠　和郎　2P-H104
粟冠　真紀子　2P-H104
佐藤　銀河　3P-N101
佐藤　圭吾　4P-H090
佐藤　里咲　3P-I121
佐藤　俊輔　2S-Da02
佐藤　大介　4P-I179
佐藤　喬章　3P-N153
佐藤　隆　4P-J224
佐藤　琢　4P-I177, 4P-N182
佐藤　匠　3P-I157
佐藤　努　4P-F198, 4P-J199
佐藤　桃梨　3P-H073
佐藤　智詠　4P-N170
佐藤　直樹　2P-G008, 2P-I153
佐藤　英明　2P-I132
佐藤　文彦　2P-E082
佐藤　大　2P-N137
佐藤　守　2P-J194
佐藤　康治　4P-F202, 4P-J203
佐藤　由也　3P-I136
佐藤　有穂　3P-J221
里村　淳　4P-J210
里村　武範　3P-G028, 3P-N029, 3P-G041, 3P-G042, 3P-G043, 4P-I145, 4P-I146
佐野　千晴　4P-N020
佐野　涼子　4P-G010
佐原　健彦　3P-I143, 3P-N144
鮫島　正浩　3P-G039
澤　芳樹　3P-N191
澤井　歩　2P-I155
澤田　和子　4P-H123
澤田　和敬　2P-F114
澤田　祥子　4P-N136
澤田　武志　3P-J228
澤登　美空　4P-N175
澤辺　智雄　4P-I150
三田　修平　4P-J223
三本木　至宏　2P-I143

し

塩澤　伸哉　4P-N208
塩田　一磨　2P-I139, 4P-G010
塩田　晃久　4P-H082, 4P-E083
塩谷　侑子　3P-H102
塩野　義人　3P-G038
塩見　尚史　2P-F174
塩屋　健一　2P-G006
鹿内　利治　4P-E161
敷中　一洋　2P-H113
軸丸　裕介　3P-J220
繁　宥樹　2P-G030, 2P-H094
重田　育照　2P-G056
重藤　元　3P-J190
七田　沙耶香　2P-G057
篠田　英里　4P-I130
篠原　満利恵　3S-Gp04
篠原　もえ子　3S-Dp05
柴崎　良直　3P-I132

柴田　晃　2P-I140
柴田　重信　2P-I134
芝田　猛　3P-N100
柴田　望　3P-I146
柴田　裕介　2P-I118
柴山　祥枝　2P-F228
渋田　真結　3P-J196, 4P-I177
島崎　洋次　2P-J181
島谷　雅文　2P-N001
島袋　充生　3S-Dp04
清水　明　4P-J224
清水　一憲　2P-I138, 2P-J205, 2P-J230, 3P-J195, 3P-J196, 3P-J197, 3P-F203, 3S-Gp05, 4P-J191, 4P-F213
清水　克彦　2P-G045, 3P-G027, 3P-G059
清水　志保　4S-Aa03
清水　哲　2P-H099
清水　浩　2S-Aa02, 3P-N076, 3P-H089, 3P-H091, 4P-N052, 4P-N059, 4P-N066, 4P-G067, 4P-N073, 4P-H074
志水　誠　3P-N169
志水　元亨　3P-N019, 4P-N063, 4P-H091
清水　義宏　4P-J188
七五三掛　湧也　4P-G021
下飯　仁　3P-G003, 4P-H087, 4P-H089
下川　直史　3P-N168, 3P-N169, 3S-Aa05
下澤　勇弥　3P-G055
下畑　宣行　2P-J219
下平　武彦　3P-G025
下山　達　3P-J228
謝　肖男　4P-H125
祝　キ　2P-I166
徐　子暢　2P-N220
章　超　3P-N065
城　斗志夫　4P-H090
生野　千佳　2P-E007
庄野　暢晃　4P-I144
上村　真由子　4P-N134
白井　智量　4P-G056
白石　晋也　4P-N208
白岩　侑馬　4P-I178
白川　大暉　2P-G049
白須　未香　3P-H077
進　和美　4P-N182
新里　宙也　4P-H076
新谷　尚弘　3P-G015, 3P-G016, 3P-G017, 3P-G040
新谷　智子　3P-G040
新谷　政己　2P-N032
新藤　一敏　3P-H108
進藤　斉　4P-G005, 4P-H092
神藤　定生　2P-I148
新保　晃　4P-G016
新間　秀一　3P-H115, 3P-N219
新家　一男　3P-J232

す

蘇　九龍　4P-E041
水光　正仁　3P-G025
末　信一朗　2P-N210, 2P-N225, 3P-G028, 3P-N029, 3P-G041, 3P-G042, 3P-G043, 4P-I145, 4P-I146
末田　慎二　3P-N198
末次　真梨　3P-I146
末永　寿恵　4P-I180
末野　和男　2P-I118
菅原　卓也　2P-G008
杉浦　慎治　3S-Gp07, 4P-I177, 4P-N182
杉浦　悠毅　3P-N219
杉島　小雪　3P-G037
杉田　慎之介　2P-H067
杉田　晴佳　4P-I129
杉立　久仁代　3P-J220, 4P-H082, 4P-E083
杉野　雄規　3P-I158
杉原　惇嗣　4P-I180
杉原　圭彦　3P-F109
杉村　康司　2P-H058
杉本　勇　4S-Aa05
杉本　琢真　3S-Ca03
杉本　幸子　2P-I122
杉本　幸裕　4P-I159
杉森　大助　4P-G018
杉山　明生　4P-E017
杉山　友康　4P-H102
杉山　政則　2P-G016
杉山　峰崇　3S-Ba03
杉山　雄紀　4P-J212
杉若　隆一　3P-N198
助清　泰教　2P-N142
洲崎　悦生　4S-Da01
須志田　浩稔　2P-G024
筋野　拓馬　2P-H070
鈴木　市郎　3P-I139
鈴木　健　4P-G032
鈴木　健一　4P-H082, 4P-E083
鈴木　健一朗　2P-N120, 2P-N121
鈴木　健吾　4S-Ba02
鈴木　研志　2P-H110
鈴木　健太　3P-I129
鈴木　祥央　4P-I130
鈴木　伸　2P-G038, 2P-G039
鈴木　慎一郎　2P-E065
鈴木　大雅　4P-N170
鈴木　高広　4P-I132
鈴木　哲朗　2P-J222
鈴木　徹　2S-Ca03
鈴木　敏弘　3P-H079
鈴木　智大　2P-N032
鈴木　伸昭　4P-I163
鈴木　秀幸　2P-N137
鈴木　宏和　3P-N046, 3P-G047, 4P-G001
鈴木　亮平　2P-G038
須田　彰一郎　3P-J215, 3P-J222, 4P-H076
須田　雅子　2P-H098
須田　亙　2S-Cp01, 3P-H081
砂田　啓輔　2S-Hp05
角田　洋輔　3P-N048, 4P-E017
陶山　佳久　4P-I139

せ

清　和成　4P-H123
清木　誠　4P-G051
瀬尾　秀宗　4P-N048
関　兵馬　2P-H104
関　実　3P-J194, 4P-I176
関口　勇地　2P-F228
瀬古　玲　2P-H071
瀬島　祐大　3P-H080
背戸川　千春　4P-G042
瀬戸口　翔　4P-H094
芹野　武　4P-H082, 4P-E083
千田　大樹　3P-H082
善藤　威史　2P-G024, 2P-G025, 3P-H070, 3S-Bp01

そ

惣田　訓　3P-I138, 4P-H122
早出　広司　2P-E007, 4P-J212
相馬　悠希　2P-H109, 3S-Aa02, 4P-H082, 4P-E083
曽我　亜由美　4P-I151
園木　和典　2P-J203, 3P-I156, 3P-I157, 4P-I129, 4P-I130
園元　謙二　2P-G024, 2P-G025, 3S-Bp01, 4P-G064
曽宮　正晴　2P-J207, 2P-J208, 2P-N220
染谷　和彦　3P-G007
染谷　信孝　4P-H112

た

平良　英三　4P-H096
平良　東紀　4P-G012
大利　徹　3P-J231, 4P-F202, 4P-J203
多賀　直彦　3P-N100
高井　あまね　3P-J188
高垣　俊宏　4P-I147
高木　綾湖　3P-H096
高木　航太郎　3P-I161
高木　一好　4P-N019
高木　健一　2P-I122
高木　大地　4P-G037
髙木　妙子　3P-I179
高木　俊之　4P-I177
髙木　博史　1A-Wp02, 2P-I116, 2P-I122, 2P-I123, 2S-Hp05
高木　昌宏　3P-N168, 3P-N169, 3S-Aa05
高木　睦　3P-J207, 3P-J208
高崎　みつる　4P-H115

田頭　彩佳　4P-G002
髙瀬　良和　2P-H090, 2P-H091, 3P-N065, 4P-H094
高田　洋樹　3S-Ca04
高田　昌樹　2P-I165
高田　果歩　3P-J233
高田　潤　3P-N135
高田　真由香　4P-N063
高谷　信之　3P-H094
高津　章子　2P-F228
高野　力　2P-J189, 3S-Hp03
高野　真希　3P-H074, 3P-I152, 3P-I164, 3P-I165
高橋　海　2P-J229
高橋　清文　3P-G026
高橋　慶太郎　3P-N001
高橋　健司　3P-I156, 3P-I157, 4P-I129, 4P-I130
高橋　憲司　2P-H100, 2P-E101, 2P-H113, 3P-I158, 3P-J200, 4P-I164, 4P-I165, 4P-I166
高橋　浩一　4P-N045, 4P-N046, 4P-G047, 4P-N049
髙橋　沙綾　4P-I151
高橋　里美　4P-E017
高橋　祥司　4P-G016, 4P-G021
高橋　徹　4P-H094
高橋　俊成　2P-I118, 2S-Hp05
高橋　宏和　2P-I151
高橋　将人　2P-J190, 3S-Hp03
高橋　政友　4P-H082, 4P-E083
高橋　洋子　2P-J193, 3P-J229
高橋　里帆　3P-G053, 4P-E041
高橋　良輔　2P-N128
高橋　亮太　4P-G030
髙峯　和則　3S-Cp03
高村　映一郎　3P-G028
高山　征也　4P-G058
田川　滉　3P-N198
田川　陽一　3P-N192, 3S-Aa03
滝口　有沙　4P-G008
滝口　昇　2P-I144, 3P-I125, 3P-I126, 3P-I178
滝沢　憲治　2P-I165
滝田　禎亮　2P-J231
瀧村　靖　3P-I146, 3P-I148
田口　精一　2P-I159, 2P-I162, 2P-I163, 2P-I165, 2P-N164, 3S-Bp03, 4P-J219
田口　誠我　2P-F114, 3S-Ba02
田口　久貴　2P-H089
田熊　桃子　2P-G017
武　慶太郎　4P-N013
武井　孝行　2P-N185
竹内　一博　3P-J204
竹内　香純　4P-H112
竹内　俊輔　3P-G040
武尾　正弘　2P-G049, 2P-G055, 2P-G056, 2P-H106, 2P-J199
竹川　薫　3P-N013, 3P-E014
竹下　哲史　4P-N155
竹下　敏一　4S-Aa03
武下　文彦　3P-G007
竹下　正記　3P-I128
竹田　裕貴　3P-J222
武田　穣　4P-J223
竹中　慎治　2P-G046
竹中　慎　3P-G032
竹中　武蔵　2P-J206
竹原　一起　2P-G055, 2P-G056, 2P-H106
竹村　海生　2P-H108
竹村　謙信　2P-J222
竹本　淳一　4P-N015
竹屋　壮浩　2P-G044
竹山　春子　2P-I134, 2P-J193, 2P-J229, 3P-G026, 3P-J215, 3P-J222, 3P-J223, 3P-J229, 4P-H075, 4P-H076, 4P-J190
田島　誉久　2P-H108, 2P-H111, 2P-I151, 2P-J198, 3P-I128, 4P-H072, 4P-H111, 4P-N127, 4P-I141, 4P-J221
田島　直幸　2P-G008
田代　康介　3P-N180, 4P-H088
田代　朔也　2P-H089
田代　美希　3S-Da04
田代　幸寛　1A-Wp03, 2P-H078, 3P-H081, 3P-I132, 4P-F183, 4P-J192
田代　陽介　2P-H110, 3P-I161, 4P-N099
多田　清志　2P-J195
多田　千佳　4P-I139
多田　宣紀　3P-I145
多田　日菜子　3P-G017
多田羅　昌浩　3P-N134
立上　陽平　2P-N142, 4P-H080
龍見　宗樹　3P-N191
伊達　弘輝　3P-G058
伊達　康博　3P-J221, 4P-H070, 4P-N071
舘野　浩章　4P-J224
立松　健司　2P-J208, 2P-N220
立松　宗一郎　4P-J215
田中　賢二　2P-I159, 2P-I160, 2P-N161, 3P-N166, 3P-N167
田中　謙也　3P-E092
田中　志乃　4P-I146
田中　修三　3P-I150, 3P-I151
田中　翔大　2P-G019
田中　正太郎　4P-I173
田中　星奈　4P-H100
田中　孝明　2P-H061, 2P-H062, 4P-N217, 4P-N218
田中　貴大　4P-N019
田中　拓未　3P-G003, 4P-G032
田中　達也　2P-G010
田中　勉　2P-H112, 2P-J169, 4P-G058, 4P-G065
田中　剛　2P-I147, 3P-J227, 3P-J228
田中　俊雄　2P-N126, 2P-N127, 2P-N128
田仲　秀明　3S-Dp04
田中　祐圭　4P-J214, 4P-J215
田中　瑞己　2P-G019, 3P-G015, 3P-G016, 3P-G017
田中　悠佑　4P-G012
田中　貴絵　3P-N110
田中　良拓　4P-H107
田中　航　3P-J209
棚橋　博史　3S-Cp04
田邊　直人　2P-G051
谷　雅史　4P-H080
谷口　博範　3P-E045, 4P-G069
谷口　正之　2P-H061, 2P-H062, 3S-Bp02, 4P-N217, 4P-N218
谷口　麻菜美　3P-I183
谷口　茉莉亜　2P-I124
谷口　百優　2P-I135, 4P-E084
谷澤　克行　4P-G025, 4P-G026
谷端　怜奈　4P-N045
田端　菜央　2P-N026
タフオン　アミン　2S-Ca03
玉井　美保　3P-N192, 3S-Aa03
玉木　峻　2P-G036
玉置　尚徳　4P-H094
玉城　康智　4P-H095
玉木　良平　2P-H073
民谷　栄一　3S-Ca02
田村　隆　2P-G041
田村　廣人　2P-I148
田村　磨聖　4P-I177
田谷　正仁　1A-Wp01, 2P-G034

ち

知田　真之介　4P-I133
千々岩　樹佳　2P-I134
千葉　靖典　3P-G006, 3P-G007, 3P-G008, 4P-J224
張　嘉修　2P-I146
張　傛喆　2P-I152, 3P-N127
張　楠　4P-H117
長　雄一郎　3P-H081
鎭西　真理子　2P-G008

つ

塚越　かおり　2P-E007, 4P-J211, 4P-J212
塚越　崇之　3P-J186
塚原　恵子　4P-H096
塚原　知也　3P-G052
塚原　正俊　4P-H096
津川　裕司　2S-Aa03
津川　若子　4P-J212
月岡　祐一郎　2P-I115, 3P-H098
柘植　圭介　3P-H107
柘植　謙爾　3S-Aa04
柘植　丈治　2P-N033, 2P-I163, 3P-J235, 4P-N205, 4P-N206
柘植　陽太　2P-H100, 2P-E101, 2P-H113, 3P-I158, 4P-N120

辻　明彦　3P-I154, 4P-G037
辻　浩和　2S-Gp03
辻　雅晴　4P-G060
辻井　雅　4P-E161
辻上　誠也　3P-N019
辻塚　誠一郎　3P-N166, 3P-N167
都筑　幹夫　2P-I154
蔦　瑞樹　4P-H096
津田　直人　4P-J200
津田　将志　3P-G008
土田　喜野　3P-E022
土戸　哲明　3P-E069
土屋　麻美　3P-H087
筒井　裕文　4P-N108
津々木　亜美　2P-H111
都築　翔　4P-N063
都筑　幹夫　3P-I159
堤　浩子　3P-I177
常田　聡　2P-G031, 3P-I179
角田　達朗　3P-N034
角田　翼　4P-H123
坪井　裕理　4P-H070
円谷　健　2P-N202
津本　浩平　4P-G035
鶴田　開生　2P-G006

て

鄭　雄一　2P-J219
出来島　康方　2P-G037
出口　真里　2P-J168, 2P-J209
手島　愛子　4P-J200
手塚　保行　2P-H086
出村　拓　4P-J186
寺本　直純　3P-J201
寺本　陽彦　2P-H098, 2P-H099
照屋　盛実　2P-J197
傳寶　雄大　3P-H089

と

土居　克実　3P-N180
土井　剛志　2P-N127
戸井田　力　2P-G034
董　金華　3P-G052, 4P-G036
東海　彰太　3P-G027
堂田　丈明　3P-J193
道林　泰樹　2P-G051
東原　和成　3P-H077
道羅　英夫　2P-N032
渡嘉敷　直杏　3P-G018
土岐　麻菜　4P-I178
常盤　豊　2P-J196, 2P-J197
徳岡　昌文　4P-G005, 4P-H092
徳田　耕二　3P-H102
徳永　智哉　4P-I159
徳弘　健郎　3P-I145
徳丸　雄磨　4P-N073
徳光　浩　4P-G034
徳本　勇人　4P-N104, 4P-N106
徳安　健　2P-N156
徳山　健斗　2S-Aa02, 4P-G067
徳楽　清孝　2P-H058, 2P-J180, 3P-H062
利田　賢次　3P-G018
戸田　光　2P-G056
戸田　弘　3P-G035, 3P-G036
殿岡　愛菜　4P-I145
富田　淳美　4P-H074
冨田　晃佑　2P-J198
富田　因則　2P-E035
冨田　結芙子　3P-N093, 2P-I150
富永　依里子　4P-H100
戸谷　吉博　2S-Aa02, 3P-H089, 3P-H091, 4P-N052, 4P-G067, 4P-H074
外山　博英　3P-G018, 4P-H094
豊島　正和　2P-I153, 3P-H091
豊田　敦　2P-F114, 3S-Ba02
豊福　雅典　2S-Hp01
鳥居　誉　2P-N026

な

中井　昇太　2P-I151
中井　隆志　3P-J220
中井　拓也　2P-H092
中井　忠志　4P-G025, 4P-G026
中井　裕　4P-I139
永井　大地　2P-I166
永井　暉　4P-N066
永井　悠也　3P-J201
中江　貴司　4P-H086
中尾　仁美　2P-H071
仲尾　祐輝　4P-G034
中尾　洋一　3S-Hp04
中尾　領亜　2P-I148
中岡　知規　4P-N135, 4P-N136
中川　明　2P-E082
中川　克彦　3P-I129
中川　そらみ　2P-N068
中川　智行　3P-N162, 3P-N163
中川　美樹　2P-G010
中川路　伸吾　2P-G003
中口　雄貴　3P-G049
中里　美穂　4P-G009
中沢　伸重　3P-N001
中澤　光　2P-H070, 4P-G038, 4P-N039
中澤　慶久　4P-I163
長澤　麻央　4P-N063
中島　一紀　2P-G040, 3P-I130
中島　琢自　2P-J193, 3P-J229
中島　信孝　2P-N192, 4P-J184
中島　森　2P-G003
中嶋　千佳　4P-G042
中島　敏明　2P-H081
中嶋　優里　3P-H116
長島　拓則　3P-F203
長島　諒　4P-F181
中島（神戸）　敏明　2P-H080
中島田　豊　2P-H108, 2P-H111, 2P-I151, 2P-J198, 3P-I128, 3P-I137, 4P-H072, 4P-H111, 4P-I141, 4P-J221
中宿　優太　4P-I174
中瀬　舞　4P-H088
長瀬　多加子　3P-N034
中田　一弥　3P-J201
中田　創　2P-N137
中谷　耕治　4P-G034
中谷　航太　4S-Da03
中谷　元紀　4P-G034
中谷　侑紀　3P-G007, 3P-G008
長門石　暁　4P-G035
中西　文香　2P-J181
中西　周次　2P-J177, 3P-E092
中西　猛志　2P-G002
中西　裕美子　3P-H081
長沼　孝文　2P-H079
中野　祥吾　2P-G019
中野　太一　2P-N128
中野　智貴　2P-N072
中野　秀雄　4P-G040, 4P-N063
中野　洋介　2P-I135, 4P-E084
中野　義勝　3P-J215, 3P-J222, 4P-H075, 4P-H076
長濱　一弘　2P-G006, 2P-N021
仲原　丈晴　3S-Cp02
中東　良太　4P-N027
中平　洋一　2P-G008
中道　祐希　3P-N198
長棟　輝行　2P-G053, 3P-G020, 3P-G021, 4P-I174
中村　彰宏　3P-J189, 4S-Ca01
中村　薫　3P-I137
中村　公則　3S-Bp04
中村　建介　4P-N085
中村　謙太郎　4P-G029
中村　貞夫　3P-J220
中村　聡　3P-H085
中村　孝夫　4P-I179
中村　崇裕　2P-G014
中村　哲平　2P-I133
中村　真基　4P-N207
中村　雅哉　2P-H113, 3P-I137
中村　誠彌　4P-G018
中村　真由　2P-N187
中村　美紀子　2P-G013
中村　泰之　3P-G004, 3P-I175
仲村　佑介　4P-H095
中村　嘉利　3P-I154
中村　里沙　3P-I145
中村　龍貴　4P-H107
中村　隆太郎　3P-G049
中村　龍平　2S-Ba05, 3P-I120, 4P-I144
中本　侃　2P-N088
仲本　準　2P-J183
長森　英二　2P-H102
中谷　正樹　4S-Aa04
中山　敦好　2P-J196
中山　俊一　2P-N120, 2P-N121

中山　二郎　3S-Bp01, 4P-G064
中山　宗一郎　3P-H077
中山　泰宗　2P-G006, 2P-N021
中山　綾花　4P-F216
長山　尚輝　2P-J199
名倉　由起子　3P-J233
那須　雄大　2P-H092
那須野　亮　2P-I116
七尾　圭香　2P-H077
生江　俊樹　4P-N217, 4P-N218
成廣　隆　4P-H114
成松　久　4P-J224
成島　典子　3P-H111
成瀬　裕紀　3P-J213
鳴海　勇希　3P-J207
南部　友香　2P-N033

に

新倉　春香　3P-J231
二井手　哲平　4P-G038, 4P-N039
新土居　奈緒美　3P-H063
荷方　稔之　2P-N004, 2P-N005, 2P-G020
西　英二　4P-F183
仁志　和彦　4S-Aa02
西　輝之　3P-G004, 3P-I175
西　美智佳　3P-G059
西海　史子　3P-J233
西尾　真初　4P-J211
西岡　佐都子　3P-G010
西川　あずさ　4P-I137
西川　洋平　2P-J229, 3P-J222, 3P-J223, 4P-J190
西口　大貴　4P-N066
西崎　徹彦　3P-N162
西島　謙一　4P-I171, 4P-I172
西嶋　傑　2S-Cp01
西田　章弘　3P-I159
西田　敬二　4P-G065
西田　真一朗　2P-J206
西谷　洋輔　2P-H093
西野　駿佑　3P-N076
西八條　正克　2P-J201
西堀　奈穂子　3P-G018
西村　朋香　2P-H110
西村　勇哉　2P-J206
西村　友里　2P-N121
西本　遼　4P-H088
西矢　芳昭　3P-G055, 3P-G056, 4P-N014, 4P-N015
西山　紋加　4P-N135, 4P-N136
西山　陶三　3P-G004
西山　由美子　4P-G034
新田　克章　4P-G068
仁宮　一章　2P-H100, 2P-E101, 2P-H113, 3P-I158, 3P-J200, 4P-I164, 4P-I165, 4P-I166
丹羽　杏奈　2P-I155
丹羽　一樹　2P-G049

ぬ

沼本　穂　4P-H097

ね

根岸　諒　3P-J228
根来　誠司　2P-G049, 2P-G055, 2P-G056, 2P-H106, 2P-J199
根来　宏明　2P-I119
根本　理子　2P-G041
根路銘　伸介　3P-H067

の

野上　明日香　3P-N191
野口　恵一　2A-Fa01, 3P-G049
野口　英樹　2P-F114, 3S-Ba02
野口　洋文　3P-J212
野口　理紗　3P-G004
野島　大佑　2P-I147
野田　修平　2P-J169
野田　尚宏　2P-F228, 3P-I179
野田　秀夫　3P-H088
野中　源　2S-Da01
野中　健一　3P-J229
野中　浩一　3P-G007, 3P-G008
野中　大輔　2P-H080, 2P-H081
野村　泉　2S-Ca03
野村　伊知郎　4S-Ca05
野村　夏矢　4P-J221
野村　暢彦　2S-Hp01
野村　嘉紀　4P-I169
則武　ちあき　4P-G002

は

袴田　一晃　2A-Fa01
袴田　佳宏　2P-H077
萩尾　真人　4P-N208
萩原　遥太　4P-I172
萩本　惇史　2P-N069
朴　龍洙　2P-H063, 2P-H064, 2P-E065, 2P-J222, 2P-N223, 4P-J227, 4P-N228, 4P-J229
白米　優一　2P-G012, 4P-J209
端　瞭太　3P-N187
橋口　周平　2P-I125
橋田　礼博　2P-J175
橋爪　克己　3P-H099
橋本　講司　4P-N048
橋本　茂樹　3S-Bp03, 4P-J219
橋本　絢子　3P-J232
橋本　麻衣子　2P-N004
橋本　雅仁　2P-I125
橋本　昌征　4P-J199
蓮池　友香　4P-G024
蓮沼　誠久　2P-I146, 3P-G004, 3P-H096, 3P-I175, 4P-H078, 4P-I156
長谷川　輝明　4P-N207, 4P-N208
長谷川　智弘　3S-Hp03
長谷川　真梨菜　2P-N126
長谷川　桃子　2P-I143
長谷川　雄将　3P-I161
長谷川　友香　4P-J225
長谷川　喜衛　4P-G050
長谷部　涼　3P-J196
秦　康祐　4P-H082, 4P-E083, 4S-Da03
秦　洋二　2P-I119, 3P-I177, 3S-Cp01
羽田　彩夏　2P-N068
波多江　希　4P-J200
畠山　慶一　3P-J227
畑下　昌範　3P-H074, 3P-I152, 3P-I165
畠中　孝彰　2P-J186
畑中　唯史　4P-N027, 4P-N028
畑中　美咲　2P-I133
秦野　琢之　3P-N011, 3P-N142
八箇　裕子　3P-G036
服部　修平　4P-G038
服部　俊　3P-N106
服部　考成　4P-H079
服部　峰充　4P-N039
服部　正平　2S-Cp01, 3P-H081
花井　泰三　2P-H109, 2P-J168, 2P-J209, 3P-H097, 3P-N187, 3P-J188, 3P-J213, 3S-Aa02
花井　慎弦　4S-Ca01
花城　隆二　2P-J197
花谷　燿平　3P-E045
馬場　敦也　4P-I159
馬場　育美　2P-J179
馬場　悟史　3P-G007, 3P-G008
馬場　将弘　4P-G010
馬場　美聡　2P-J231
馬場　保徳　4P-I133, 4P-I139
馬場　梨沙子　2P-I125
馬場　里奈　2P-E065
馬場（森）　裕美　4P-I139
羽部　浩　3P-I136, 4P-H114, 4P-H115
濵　真司　3P-H088
浜垣　秀平　4P-G037
濱川　匡史　2P-G011
浜口　毅　3S-Dp05
濵口　宏夫　2P-J193, 3P-J229
浜口　悠貴　4P-J223
濵田　周吾　2P-N185
濱田　浩幸　2P-J168, 2P-J209, 3P-J213
濱田　祐成　2P-N204
濱田　涼子　2P-I117
濵野　雄大　2P-H113
濱野　吉十　3P-J231, 3P-J232
濱本　晋　4P-E161
早川　禎宏　4P-H079
林　悟　2P-I152
林　衆治　3P-J212
林　修平　2P-J179
林　順司　2P-N088, 3P-H104, 3P-N103, 3P-N105, 3P-N106, 4P-N013, 4P-N019, 4P-N020, 4P-N022, 4P-N023
林　祥平　4P-F202

林　千広 3P-N153
林　司 2P-J231
林　哲也 2P-G003
林　利哉 4P-N063
林　秀謙 4P-H105
林　文晶 2P-J186
林　優花 4P-G018
林　勇樹 3P-G054
林　梨咲 3P-G018
林　隆造 2P-J227
林田　真生 3P-I145
早瀬　伸樹 3P-I129
早水　裕平 4P-J215
原　清敬 3P-N005
原　健士 4S-Da03
原　正之 3P-J205, 3P-J206, 4P-I178
原　良太郎 2P-G038, 2P-G052
原口　典久 2P-G006
原島　俊 3S-Ba03
原田　和生 2P-H092, 4P-G024, 4P-J194
原田　春佳 2P-I117
原田　尚志 3P-H082
原田　雄斗 3P-N163
原田　里紗 3P-H087
バランワル　プリヤンカ 2P-J199
伴　さやか 4P-N003
馬場　健史 2P-H109, 4P-H082, 4P-E083, 4S-Da03
半谷　朗 4P-N004

ひ

東　達也 3P-N219
東　恒仁 3P-J199
東久保　遥 2P-G030, 2P-H094
東垂水　健太 2P-J179
引間　孝明 2P-I165
樋口　裕次郎 3P-N013, 3P-E014
久勝　順平 4P-H112
緋田　安希子 3P-I128, 4P-H111, 4P-N127
秀瀬　涼太 2P-G009, 2P-G011, 2P-G030, 2P-H094, 2P-H107, 2P-J231, 3P-G044
美藤　友博 2P-G045, 3P-G027, 3P-G059
日原　由香子 2P-E007
日并　隆雄 4P-N020
日比　慎 4P-E017
平井　浩文 2P-I158, 3P-F147, 3P-I149, 3P-I184, 4P-I151
平磯　一輝 4P-G008
平尾　理恵 3P-I145
平方　里美 4P-J189
平川　秀彦 2P-G053
平川　夕貴 2P-J179
平沢　敬 2P-G022, 2P-G023, 4P-N055, 4P-G056
平田　收正 2P-H092, 4P-G024, 4P-J194
平田　有希 2P-H112
平田　善彦 3P-N191
平沼　貴紀 4P-H117
平松　利輝人 2P-H064
平本　哲也 3P-G017
平山　吉朗 4P-N045, 4P-N046, 4P-G047, 4P-N049
比留田　美咲 3P-G056
廣江　綾香 2P-I163, 4P-N205, 4P-N206
廣岡　青央 4P-H080, 4P-H098
廣川　誠 3P-G037
広川　安孝 2P-G052, 3P-H097, 3P-N187, 3P-J188
広瀬　佑紀 4P-H102
廣田　隆一 2P-G010, 2P-H096, 2P-H097, 2P-H111, 2S-Da05, 3P-E057, 3P-J190
広幡　千紘 3P-H099

ふ

傅　博 3P-J208
吹谷　智 2P-G003, 3P-H080
福井　早紀 4P-E143
福居　俊昭 2P-N161, 3P-H084, 3P-H085
福崎　英一郎 2P-I135, 3P-H087, 3P-H089, 3P-H115, 3P-N219, 4P-G068, 4P-H079, 4P-E084
福田　真嗣 2S-Ca04
福田　展雄 3P-G002
福田　雅夫 3P-I121
福田　美南海 2P-H061
福田　康弘 4P-I139
福田　雄一 3P-H086
福田　裕介 3P-J230
福田　青郎 3P-N153
福谷　洋介 2P-H066, 2P-H073, 3P-G049
福永　愛 2P-G012
藤井　郁雄 2P-N202
藤井　健太 4P-G001
藤井　紳一郎 2P-F228
藤井　力 2P-I117, 2P-I118, 3S-Dp01, 4P-H086
藤井　翼 2P-H106
藤井　啓史 4P-N108
藤川　彩美 3P-H107
藤木　英寿 4P-N013
藤澤　彩乃 2P-J219
藤澤　宗一郎 3P-N127
藤田　憲一 2P-N126, 2P-N127, 2P-N128
冨士田　浩二 3P-N124
藤田　聡史 2P-G034, 3S-Gp06
藤田　直子 3P-H099
藤田　雅徳 3P-J206
藤田　賢大 3P-I130
藤谷　将也 4P-I167
藤野　志保子 2P-G041
藤原　可菜子 4P-N033
藤原　暢哉 3P-E057
藤原　悠右 2P-I146
藤丸　裕貴 2P-F114, 3S-Ba02
藤村　弘行 3P-J215, 4P-H076
藤本　章人 3P-H111
藤本　昇 2P-G015
藤森　一浩 3P-I143, 3P-N144
藤山　秋佐夫 2P-F114, 3S-Ba02
藤山　和仁 4P-J225, 4P-J226
藤山　陽一 3S-Aa03
藤原　郁也 2P-N225
藤原　祥子 3P-I159
藤原　伸介 2P-G009, 2P-G011, 2P-G030, 2P-H094, 2P-H107, 2P-J231, 3P-G044
藤原　大介 3P-H108, 3P-F109
藤原　久志 4P-H080, 4P-H098
藤原　央之 2P-G034
藤原　政司 3P-J208
藤原　由梨 2P-H109
藤原　良介 2P-J169
二神　泰基 4P-H094
二瀬　彩子 4S-Aa03
二又　裕之 2P-H110, 3P-I161, 4P-N099
二見　淳一郎 2P-N068, 2P-N069, 2P-N072, 3P-H063
二見　翠 2P-N072
舟木　裕哉 4P-N104
船越　吾郎 4P-H091
船戸　耕一 2P-I143
舟橋　久景 2P-H096, 2P-H097, 3P-E057, 3P-J190
古江-楠田　美保 3P-J197
古川　卓磨 2P-N005
古川　慎 4P-N022
古澤　力 2S-Aa01
古田　雅一 3P-E069
古田　吉史 3P-N110
古谷　陸 4P-N108
古橋　剛 3P-J220
古屋　俊樹 2P-H105
古屋敷　隆 3S-Ca04

へ

紅谷　貴之 2P-I145
逸見　光 2P-G027

ほ

外薗　英樹 3P-J189
外村　彩夏 2P-I159, 2P-I160
穂坂　賢 4P-G005, 4P-H092
星　和明 4P-J212
星　英之 4P-N106
星子　裕貴 3P-G031
星田　尚司 2P-G013, 3P-G010
星野　一樹 3P-G007
星野　一宏 3P-H074, 3P-I152,

3P-I164, 3P-I165
星野　保　2P-N192
星野　力　4P-F198
細貝　俊貴　3P-N127
細川　正人　2P-I134, 2P-J193, 2P-J229, 3P-G026, 3P-J222, 3P-J223, 4P-J190, 4S-Da02
細田　晃文　2P-I148
堀　綾香　4P-I176
堀　克敏　2P-J177, 2P-J200, 3P-H060
堀　千明　2P-I162, 3S-Bp03, 4P-J219
堀　知行　3P-I136, 4P-H114, 4P-H115
堀内　淳一　3P-F181
堀内　淳一　3P-I182, 3P-I183, 3P-N187, 3P-J188, 4P-N043, 4P-G044, 4P-N045, 4P-N046, 4P-G047, 4P-N049
堀江　正信　4P-I180
堀口　博文　4P-G010
堀之内　貴明　2S-Aa01
堀場　早紀　4P-N228
本荘　知子　3P-H063
本荘　雅宏　2P-H110
本田　亜由美　4P-G038
本田　憲昭　3P-N100
本田　孝祐　2P-G037, 2S-Da03, 3P-E045, 3P-H088, 4P-G069
本田　真也　3P-G002
本田　千尋　4P-H092
本多　裕之　2P-I138, 2P-J205, 2P-J230, 3P-F203, 3P-J195, 3P-J196, 3P-J197, 3S-Gp05, 4P-J191, 4P-F213
本田　裕樹　4P-G011
本間　陽名　3P-G039
本間　洋平　4P-I157

ま

眞井　洋輔　3P-J199
前川　貴宏　2P-J221
前島　由明　2P-N032
前田　晶子　4P-J226
前田　勇　3P-J185
前田　樹里　2P-G049
前田　翔大　3P-G024
前田　真一　3P-H094
前田　憲成　3P-G031
前田　智也　2S-Aa01
前田　誠　4P-H100
前田　みのり　4P-J197
前田　義昌　2P-I147, 3P-J227
馬形　さやか　3P-I138
蒔苗　浩司　3P-J216
曲　正樹　4P-G034
牧　慶子　4P-N019
槙坪　寛勝　2S-Gp01
牧野　幹　3P-G012
牧野　祥嗣　3P-H061
槇原　将紘　2P-N072
牧山　葉子　4P-J187
政井　英司　2P-H113, 3P-I156, 3P-I157, 4P-I129, 4P-I130
正木　和夫　2P-H079, 4P-N033
真崎　康博　2P-I153
真崎　雄一　3P-J199
益崎　裕章　3S-Dp04
舛田　晋　2P-I132
増村　威宏　4P-H097
増本　純也　2P-J181
町田　光史　3S-Hp04
町田　悠　3P-E022
松井　徹　4P-N108
松井　裕史　4P-I177
松浦　俊一　3P-N033, 3P-N034
松浦　友亮　2P-N074, 4P-J188
松浦　秀幸　4P-G024, 4P-J194
松浦　礼奈　2P-H112
松尾　一郎　4P-J224
松尾　健司　3P-I137
松尾　慎作　2P-G041
松岡　正佳　2P-G006, 2P-N021
松ヶ根　沙織　4P-J199
松上　明正　2P-J186
松川　哲也　3P-J233, 3P-J234, 4P-J197
松木　悠　4P-I139
松倉　智子　2P-F228, 3P-I179
松倉　秀典　3P-J217
松崎　弘美　2P-I159, 2P-I160, 3P-H070, 3P-H071
松崎　祥平　2P-N225
松崎　浩明　3P-N011, 3P-N142
松下　一信　2P-F167, 4P-G029, 4P-G030
松下　伸広　3P-I120
松田　浩希　4P-N127
松田　史生　2S-Aa02, 3P-N076, 3P-H089, 3P-H091, 4P-N052, 4P-N059, 4P-N066, 4P-N073, 4P-H074
松田　靖　3P-N100
松田　祐介　2P-G009
松谷　峰之介　4P-G029, 4P-G030
松永　是　3P-J228
松永　望　2P-E042
松波　宏明　2P-H066, 2P-H073
松葉　隆雄　2P-N202
松原　主典　3S-Dp01
松原　拓哉　3P-H079
松久　和歩　2P-G023
松村　憲吾　2P-I119
松村　洋寿　3P-G037, 3P-G039, 3P-G049
松村　真輝　3P-I184
松村　幸彦　2P-I151, 2P-J198, 4P-H072, 4P-I141, 4P-J221
松村　吉信　2P-I145
松本　厚子　2P-J193
松本　公彦　2P-H090, 2P-H091
松本　謙一郎　2P-I159, 2P-I162, 2P-N164, 2P-I165, 3S-Bp03, 4P-J219
松本　健治　4S-Ca05
松本　慎也　2P-G031
松元　太一　2P-I125
松本　崇弘　3P-G032
松本　雅記　4S-Da03
松本　瑞葵　2P-H080, 2P-H081
松本　光晴　3S-Dp02, 4P-H079
松本　美徳　4P-N015
松本　恵　3P-J195, 4P-J191
松本　裕子　2P-G002
松本　凌　3P-F203
松山　惠介　4P-H072, 4P-J221
松山　崇　4P-G051
的場　一孝　4P-N043
眞弓　大介　4P-H114, 4P-H115
真弓　智仁　3P-J230
丸井　萌子　4P-N063
丸海老　純也　4P-G008
丸尾　浩希　2P-N161
丸山　潤一　3S-Ba05, 4P-N063
丸山　千登勢　3P-J231, 3P-J232
丸山　徹　2P-I134, 4P-H076
丸山　悠　3P-H063
丸山　裕慎　3P-H064
丸山　温　4P-N134
万　クン　4P-N027, 4P-N028

み

三浦　隆匡　4P-J189
三浦　豊和　2P-I151, 4P-I141
三木　慎介　2P-G057
三木　健夫　2P-N129
三木　智寛　3P-G049
三崎　亮　4P-J225, 4P-J226
三嶋　隆　2P-N128
水谷　治　3P-G018, 3S-Ba04, 4P-H094
水沼　正樹　3S-Dp03
水野　康平　4P-N205
水野　光　2P-H100
美澄　幸恵　3P-G010
溝口　尊春　2P-H078
三田　一至　3P-J230
三井　俊　4P-H091
三ツ井　敏明　2P-H062
三井　雅貴　3P-H102
三井　亮司　2P-H093
満倉　浩一　2P-N047, 2P-N048
皆川　真之　2P-I154
水口　和信　2P-J201
南　篤志　3S-Da03
南　博道　2P-E082
南アルプス市　2P-H079
南川　泰輝　4P-H122
南畑　孝介　2P-N204, 4P-G012
美野　さやか　4P-I150
宮岡　理美　2P-J193, 3P-J229
宮川　繁　3P-N191
宮川　浩美　4P-H082, 4P-E083

宮木　達輝　2P-H070
三宅　克英　2P-G002, 4P-I133, 4P-I139
三宅　千絢　3P-G052
三宅　英雄　4P-J193
三宅　誠人　2P-I149
三宅　美加　3P-F109
三宅　湧登　2P-G018
宮越　俊一　2P-J194
宮坂　信城　4P-I150
宮坂　均　2P-J179
宮崎　剛亜　2P-H063, 4P-J227, 4P-N228, 4P-J229
宮崎　誠生　3P-G058
宮﨑　優　2P-J179
宮崎　由美子　4P-G006
宮澤　せいは　4P-J187
宮下　龍之介　4P-J227
宮戸　健二　4S-Ca01
宮成　悠介　4S-Da04
宮成　亮太　2P-H090, 2P-H091
宮野　博　2S-Gp04
宮原　佑宜　3P-J235
宮本　愛　2P-N069
宮本　久　1A-Wp03
宮本　浩邦　1A-Wp03, 2P-H078, 3P-H081, 4P-I137
宮本　悠里　2P-J183
宮本　葉子　2P-G028
宮本　義孝　3P-J201, 3P-J212
三好　航平　3P-H115
三吉　大地　3S-Bp03, 4P-J219
ミンカナー　ロバート　2P-E065

む

向井　伸彦　4P-N033
向田　潤　2P-H093
向山　正治　4P-G065
村井　利昭　3P-J224
村井　雄大　3P-N180
村上　明男　3P-N187, 3P-J188
村上　晴太郎　4P-I172
村上　葉月　2P-I117
村上　舞　2P-J178
村口　雄亮　2P-N032
連　綾香　4P-I131
村田　貴輝　3P-H115
村田　俊輔　3P-N019, 4P-N063
村田　大　2P-J201
村田　達郎　3P-N100
村田　瑠偉　4P-G024
村田　和加惠　2P-N126, 2P-N127
村本　伸彦　3P-I145
村山　晃歩　4P-N048
村山　晃一　2P-J189, 2P-J191

も

毛利　浩　4P-I163
モタカトラ　レッディー　2P-I152
望月　康佑　4P-N108
望月　玲於　2P-N187
元島　史尋　2P-H060
百川　拓実　3P-J204
森　一樹　4P-H075, 4P-J190
森　一将　2P-H111
森　健太朗　3P-I138
森　孔明　4P-I171
森　峻一　3P-I172
森　舜也　2P-N161
森　哲也　2P-H086
森　智夫　2P-I158, 3P-F147, 3P-I149, 3P-I184, 4P-I151
森　英樹　3P-J205, 3P-J206, 4P-I178
森　妹子　2S-Gp04
森　恵美　2P-I160
森　若葉　3P-N093
森岡　航　4P-I132
森坂　裕信　4P-H080
森田　啓介　4P-N059
森田　健太　2P-J206
森田　峻秀　2P-H080, 2P-H081
森田　敏彦　3P-N005
森田　友岳　3P-G003
森田　直樹　3P-N180
森田　英明　4S-Ca05
森田　寛人　2P-I133
森田　真広　2P-N223
森田　祐子　2P-N210, 2P-N225
森田　涼斗　4P-H110
森谷　亜希　2P-H090, 2P-H091
森中　和也　4P-H089
森永　花菜　2S-Hp01
森本　一輝　2P-I130
森本　陽子　4P-H097
守矢　恒司　3P-N192
守屋　繁春　4P-H070
守屋　央朗　3P-J216
森谷　政孝　4P-H113
森芳　邦彦　2P-H102, 2P-H103
茂呂　亮汰　4P-I126
諸星　知広　4P-H112, 4P-H125, 4P-I126

や

八木　周和　3P-N005
八木　透　3P-J201
八木　寿梓　3P-G047
矢木　宏和　4P-N228
八木　祐介　2P-G014
薬師　寿治　2P-F167, 4P-G029, 4P-G030
矢下　亜紀良　3P-J224
矢嶋　祐也　3P-J194, 4P-I176
矢島　由佳　2P-I152, 3P-N127
八代田　陽子　2S-Hp02
保川　清　2P-J231
安田　伸　3P-N100
保田　知香　3P-H095
安田　信幸　3P-G030
安田　優太郎　3P-N219
安田（吉野）　庄子　4P-N004
保谷　典子　3P-I145
八十原　良彦　3P-G004
矢田　幸博　3P-F109
八浪　早季　3P-H071
柳川　大樹　4P-N081
柳内　知哉　3P-J233
柳沢　真澄　4P-I177
柳沢　優　2P-N004
柳場　まな　2P-H079
柳原　格　2P-J231, 3P-J233
柳瀬　亜美　4P-H118
柳瀬　真紀　3P-H073
柳瀬　裕介　4P-I137
矢野　友啓　4P-N208
矢野　湧暉　2P-J181
山内　亮　3P-N162
山尾　明日美　4P-I178
山岡　千鶴　3P-H064
山岡　奈央　2P-J205
山川　隆　4P-I157
山岸　賢治　2P-N156
山岸　純也　3P-G040
山口　健一　4P-N155
山口　哲志　4P-I174, 4S-Da05
山口　雅紀　4P-N170
山口　宗義　4P-N134
山口　祐太朗　4P-H125
山口　良弘　2P-N128
山崎　思乃　2P-I124, 3P-H086, 3P-H087
山崎　将太郎　4P-J186
山崎　新平　3P-N142
山崎　照之　4S-Aa04
山﨑　朋美　2P-J231
山崎　康裕　4P-N155
山崎　敦史　4P-G006
山崎　蔵亨　3S-Bp03, 4P-J219
山﨑　晃司　3P-N029
山崎　太一　2P-F228
山崎　智彦　4P-J212
山下　聖樹　3P-H074, 3P-I152
山下　俊幸　4P-H082, 4P-E083
山下　奈菜　3P-H070, 3P-H071
山下　光雄　4P-H101
山下　結香　3P-G003, 4P-G032
山下　涼太　2P-J180
山田　修　3P-G018, 3S-Ba04, 4P-H094
山田　和広　4P-N063
山田　佳代子　4P-H082, 4P-E083
山田　泰地　3P-I150, 3P-I151
山田　拓司　2S-Ca02
山田　翼　2P-I118, 2S-Hp05
山田　哲也　3P-I120
山田　大貴　2P-H062
山田　正仁　3S-Dp05
山田　真澄　3P-J194, 4P-I176
山田　真理子　4P-H092
山田　美和　4P-H087, 4P-H089

山田　裕次郎　3P-I126
山田　亮祐　3P-G009
大和屋　健二　3P-J201
山中　勇人　2P-H102, 2P-H103
山西　守　4P-G051
山根　克己　3P-N162
山野　尚子　2P-J196
山野　範子　3P-J202, 3P-J209, 3P-J210, 4P-I169
山畑　直樹　3P-H104
山平　真也　4P-I174
山村　栄虎　2P-G015
山村　昌平　4S-Da03
山本　勝俊　3P-N033
山元　啓輔　3P-N005
山本　幸次郎　3P-N166, 3P-N167
山本　康次郎　3P-N135
山元　翔太　2P-N120, 2P-N121
山本　進二郎　2P-J179
山本　泰誠　4P-G050
山本　尚輝　2P-G031
山本　哲史　4P-H123
山本　真史　3P-N155
山本　眞知　4P-N015
山本　美佳　4P-J187
山本　美也子　2P-G016
山本　ゆかり　3P-H102, 3P-N101
山本　有紀　3P-H079
山本　耀悟　3P-N168
山本　佳宏　4P-H080, 4P-H098
山谷　竜大　3P-E022
家森　優佳　2P-G011
鎗水　透　3P-G003, 4P-G032

ゆ

湯浅　恵造　3P-I154, 4P-G037
由井　嵐士　4P-N099
雪本　寛　4P-H121
遊佐　一希　3P-N011
湯澤　太路　4P-G056
尹　基石　3P-G032

よ

楊　英男　2P-I166, 4P-H117
楊　卓朗　3P-H062
養王田　正文　2A-Fa01, 2P-H066, 2P-H073, 2P-J172, 3P-G049, 4P-H107
世嘉良　宏斗　2P-J196, 2P-J197
横尾　岳彦　3P-G006, 3P-G008
横田　篤　2P-G003, 3P-H073, 3P-H080
横田　大輝　3P-H102
横山　治樹　3P-J217
吉岡　育哲　4P-G062
吉岡　和政　2P-I150
吉岡　貫太郎　3P-J211
吉岡　潤一　4P-H105
吉岡　直哉　2P-I122
吉岡　真理子　2P-F228
吉岡　実咲　3P-H063
吉川　潤　2P-I139, 4P-G010
吉川　翔太　3P-H081
吉川　博文　2P-G008, 3P-H079, 4P-N055
吉沢　崚　2P-N047
吉田　充史　2P-I143
吉田　泉　2P-N128
吉田　久美　3P-G007
吉田　啓　3P-J195, 3P-J197
吉田　健一　2P-G046
吉田　嵩一郎　2P-H108
吉田　慎一　2P-J201
吉田　宗一郎　2P-J178
吉田　知左　4P-N014
吉田　知博　2P-G045
吉田　豊和　2P-N047, 2P-N048
吉田　ナオト　2P-G028, 2P-H080
吉田　寛郎　2S-Gp04
吉田　昌樹　2P-J195
吉田　雅駿　3P-J229
吉田　昌弘　2P-N185
吉田　稜　2P-H104
吉冨　耕太　3P-J209
吉冨　徹　2P-I153
吉浪　淳　2P-G046
吉野　知子　2P-I147, 3P-J227, 3P-J228
吉原　瑛梨奈　3P-G006
吉原　静恵　4P-N104, 4P-N106
吉水　芳織　4P-N136
吉村　剛　3P-I172
吉村　緑　3P-G015
吉本　敬太郎　2P-I153
吉本　将悟　2P-J200, 3P-H060
依田　卓也　3P-G026
依田　伸生　3P-H087
與那嶺　正人　3S-Dp04
米島　靖記　2S-Ca01

ら

楽　隆生　2P-J196

り

李　歓　4P-G044
李　昊　2P-J208
李　秋実　3P-E014
李　鎭熙　4P-J211
李　特　3P-N124
劉　秋実　2P-J207
劉　ナ　2P-I166
竜　瑞之　3P-N191

れ

練　子荷　4P-N108

ろ

六嶋　正知　2S-Aa05

わ

若井　暁　2S-Ba01, 3P-I177
若井　芳則　4P-H080, 4P-H098
若王子　智史　4P-H076
若林　興　4P-H086
若林　里衣　2P-N204
若山　守　2P-N088, 3P-N103, 3P-H104, 3P-N105, 3P-N106, 4P-N013, 4P-N019, 4P-N020, 4P-N022, 4P-N023
脇　孝典　3P-I118
脇田　和　2P-I160
脇中　琢良　3P-H098
涌井　秀樹　3P-G037
早田　亮太　3P-N142
和田　圭介　3P-H089
和田　潤　4P-H098
和田　大　3P-H073, 3P-H080
渡部　昭　3P-G040
渡辺　一樹　3P-I141
渡邉　一哉　2P-N029
渡辺　国晴　4S-Aa03
渡邊　桂子　2P-F174
渡邉　研志　2P-J198, 4P-H072, 4P-J221
渡辺　剛　4P-H105
渡邉　康太　4P-F183
渡邊　修平　2P-G028
渡部　潤　2P-I115, 3A-Cp01, 3P-H098
渡辺　淳　4S-Ca02
渡辺　祥　2P-N142
渡邉　泰祐　3P-G018
渡辺　大輔　2P-I116, 2P-I122, 2P-I123, 2S-Hp05
渡邊　哲也　2P-I132
渡邉　徹　3P-G004
渡辺　訓江　4P-I163
渡邉　肇　2P-N074
渡邉　輝　2P-H058
渡辺　寛和　2A-Fa01
渡辺　文雄　4P-H107
渡邉　信　2P-J195
渡辺　昌規　2P-G046, 3P-J185
渡邉　祐子　2P-N005
渡邉　里咲　3P-N135

キーワード索引

A

abandoned forest 4P-I131
ABC transporter 2P-G024, 3S-Bp01, 4P-G037
ABC transporter substrate-binding protein 4P-G008
Acclimation 3P-N144
accumulation 2P-G053
acetate overoxidation 3P-H079
acetic acid 2P-I125, 3P-N100, 4P-N077
acetic acid bacteria 2P-H094, 2P-H107, 3P-H079, 4P-G030
acetic acid fermentation 3P-H079
Acetobacter 3P-H079
acetyl-CoA production 3P-G032
acetylation 2P-G045
acetylcholine esterase 2P-G045
acetyltransferase 3P-G012
Achromobacter sp. 2P-N048
acid mine 3P-N135
acid tolerance 2P-J189, 4P-N013
acidophile 3P-N135
Acinetobacter 3P-H060, 3P-I121
aconitate isomerase 4P-G008
aconitic acid 4P-G008
acrylamide 4P-N022
actinomycetes 3S-Da02, 4P-H105, 4P-J197
activated sludge 3P-I136, 4P-H118
active site structure 4P-N015
activity 2P-N210
actual environment 4P-H116
acyl homoserine lactone 4P-H125, 4P-I126
acyl-CoA 3P-H078
acyl-CoA binding protein 3P-N013
adamantane 2P-N047
adenylation domain 2P-G038, 2P-G039
adhesion 2P-I124
Adjuvant 4P-J212
ADME 4P-F181
aeration 4S-Aa02
aerial microalgae 3P-I159, 3P-J186, 3P-J225, 3P-J230
aerobic culture 2P-J197
Aeromonas caviae 2P-I163
affinity chromatography 2P-J201
affinity peptide 3P-G058
affinity purification 2P-N202
affinity selection 3P-H061
Agar plate culture 3S-Hp03
Aggregate formation process 3P-J204
aggregation 2P-H058, 2P-I153
aggregation hot-spot 2S-Bp05
aging 2P-F174, 4P-H096
agriculture 2P-J179
agrochemical-contaminated soil 4P-H109
airlift bioreactor 3P-F181
alcohol 2P-N005
alcohol dehydrogenase 3P-G036
alcoholic fermentation 2P-I122
aldehyde 3P-H078
algal biofilm 3P-I159
algal extract 4S-Ba02
alginate 2P-I151, 2P-I153, 3P-I172
alkali-oxidation pretreatment 3P-I151
alkaline protease 3P-G031
alkaloid 2P-E082
alkane 2P-I154, 3P-H078
alkane biosynthesis 3P-G054
allergy 2P-J219, 4S-Ca04, 4S-Ca05
alpha-1,3-glucan 3P-G018
alpha-amylase 2P-H062, 3P-H088
alpha-defensin 3S-Bp04
alpha-EG 3P-N101, 3P-H102
alpha-glucosidase 4P-G009
alteration of fatty acid profile 4P-G061
alternative oxidase 4P-G062
Alzheimer's diease 3P-H062
Alzheimer's disease 2P-J180, 3S-Dp05
Amazake 3P-H107
Ambrein 4P-F198
amidase 4P-N033
amino acid 1A-Wp02, 2P-N033, 2P-I136, 2S-Bp03, 3P-F203, 4P-I146
amino acid analysis 2S-Gp04
amino acid sequence 2P-N202
amino acid substitution 2S-Bp05
6-aminohexanoate 2P-H106
aminopeptidase 2P-N001, 4P-N027
ammonia inhibition 4P-H117, 4P-H119
amplicon sequence 4P-J189
amylase 3P-G017
Amylin amyloid 2P-J181
Amyloid beta 2P-J180
amyloid beta aggregation 3P-H062
amyloid fibril 3P-G051
amyloid-beta 2P-H058
anaerobes 4P-J193
anaerobic acetate-oxidizing microorganisms 4P-H114
anaerobic ammonium oxidation 3P-N134
anaerobic condition 2P-I150
Anaerobic cultivation 2P-I152
anaerobic degradation 4P-H117
anaerobic digestion 4P-H119, 4P-I149
anaerobic fermentation 2P-N084
Anaerobic microbiota 4P-N104
anaerobic respiration 4P-H101
aneuploid 2P-F114
aneuploidy 3P-J210
angiogenesis 4P-N218
animal model 4S-Ca03
Animal use alternative 3S-Gp06
anion-exchange membrane 2P-I139
antagonist 3P-G002
Antarctic 3P-N140
Antarctic yeast 4P-G060
antibacterial 3P-N166
antibacterial activity 2P-N218, 3P-J230
antibacterial peptide 2P-G017, 4P-J219
antibiotics 2S-Cp01, 3S-Da01, 4P-H112, 4P-J194
antibody 2P-H070, 2P-J208, 3P-G020, 3P-H063, 3P-J202, 4P-G034, 4P-G036, 4P-G037, 4P-G038, 4P-N039, 4P-G040, 4P-E041, 4P-N048
antibody fragments 2P-J201, 2P-N202
antibody immobilization 4P-N049
Antibody production 2S-Gp01, 3P-J209
antidiabetic activity 2P-N141
antifungal activity 2P-H061
antigen 3P-N048
antimicrobial 2P-N217, 3S-Bp03
antimicrobial peptide 3S-Bp02, 4P-N217
antimony 3P-I138
antioxidant activity 2P-N141, 3P-I158
antitumor 4P-N208
APEXA 3P-I126
apidaecin 3S-Bp03
apoferritin expression 2P-N215
apoptosis 2P-H061, 3P-G020, 4P-N208
aptamer 2P-N212
aqueous two-phase system 2A-Dp01
Arabidopsis thaliana 4P-N136, 4P-E161
archaea 3P-G043, 3P-G044
archaerhodopsin 2P-N182
Ardisia pusilla 4P-N148
arginine 3P-J190, 3S-Dp02
arginine deiminase 3P-H098
aroma 3S-Cp03
aromatic amino acid 2P-H102, 2P-H103
Arthrobacter 2P-H106
artificial gene circuit 3P-J213
artificial photosynthesis 2S-Ba04, 4S-Ba04
artificial protein 2S-Bp04
ARTs 4S-Ca01
asbestos 3P-E057
ascospore 2P-I132
ASO IVD reagent 3P-N048
Aspergillus 3P-N019

Aspergillus flavus 4P-N003
Aspergillus kawachii 3P-F109
Aspergillus luchuensis 3P-G018, 4P-H094
Aspergillus niger 3P-H108, 4P-G062
Aspergillus oryzae 3P-N013, 3P-E014, 3P-G015, 3P-G016, 3P-G017, 3P-G038, 3P-G040, 3P-H099, 3P-N103, 3P-I177, 3S-Ba04, 3S-Ba05, 3S-Da03, 4P-N003, 4P-G005, 4P-N033, 4P-N063
astaxanthin 3P-H096, 3P-I182
asymmetric reduction 2P-G015
AtGT2 4P-J225
atmosphere 3P-N140
Atomic Force Microscopy 2P-J206
ATP 2P-H108
ATP regeneration 2P-G039
ATPase 3P-H097
Aurantiochytrium 2P-J195, 4P-H072
Aurantiochytrium sp. 4P-I154
Autanriochytrium 4P-J221
autofocusing 4P-N217
autologous cultured cartilage 2S-Gp02
autologous cultured epidermis 2S-Gp02
automated sample preparation 4P-H082
autonomous replicating plasmid 3P-G004
autophagy 3P-N013
autothermal thermophilic aerobic digestion 3P-I132
auxin 2S-Hp04
auxotrophic mutant 4P-G067
awamori 4P-H095
azo dye 3P-I129

B

B-factor 4P-G018
Bacillus 4P-I153
Bacillus cereus 2P-G010
Bacillus coagulans 2P-N156
Bacillus natto 2P-H077
Bacillus sp. 2P-G046, 2P-N128, 4P-N205
Bacillus subtilis 2P-I133, 3P-J185, 3S-Ba01, 4P-H074
bacitracin 3P-H070, 3P-H071
Bacmid 2P-H064
bacteria 2P-G020, 2S-Gp03, 2S-Hp01, 3P-I123, 3P-I125, 3S-Hp01, 4P-H075, 4P-H110, 4P-N134
bacterial collagenase 2P-N054
bacterial column 3P-I118
bacterial community structure 3P-I132, 4P-F183
bacterial consortium 3P-N124
Bacterial flora 3P-J221
bacterial growth enhancement 4P-I152
bacterial interaction 2S-Hp03
bacterial wilt disease 4P-I128
bactericidal 2S-Dp05
bacteriocin 2P-G024, 2P-G025
baculovirus 3P-G023, 4P-G035
Baeyer-Villiger monooxygenase 4P-G050
baker's yeast 2P-I123
banana ripening 3P-H114
basidiomycetes 3P-G003
basidiomycetous yeast 4P-G032
batch culture 2P-J170
baths 3P-N101
beauty materials 3P-H102
beer 4S-Aa04
benzoate 2P-G036
beta glucan 2P-N213
beta-galactosidase 2P-I139
beta-propeller domain 3P-G027
betaine 3P-N155
beverage 3P-H104
bianode 3P-N029
bifidobacterium 2P-G003, 2S-Ca03, 3P-I122
bifidogenic growth factor 2P-I133
big data analysis 3P-J197
Bigdata 2S-Cp03
bile acid 3P-F170
binding 2P-H066
binding protein scaffold 2P-H067
Bio-3D printer 3P-J200, 4P-I164, 4P-I165, 4P-I166
bio-based monomer 3P-I157, 4P-I129
bio-device 3P-N029
bio-hydrogen production 4P-I149
bio-industry 3S-Ca02
bio-mineralization 2P-J186
Bio-nanocapsule 2P-J207
bio-production 2P-H094, 3P-I156
bio-stimulants 4P-H124
bioactive compound 2P-J193
bioactive substances 4P-J197
bioaerosol 3P-N140
bioanalysis 3P-N140
bioassay 2S-Bp03, 3S-Gp02, 4P-G067
biobased plastic 2P-N164
Biobased polyester 3P-J236
biocatalysis 4P-I154
biocontainment 2P-H097
biocontrol agent 4P-H112
bioconversion 2P-G036, 2P-H103, 2P-J194
biodegradable plastic 2P-I159, 2P-I160, 2P-I165, 2S-Da02, 3P-H084, 3P-H085, 4P-G032
biodegradable polymer 2P-I159
biodegradation 2P-J196, 3P-I122, 3P-N127, 3P-I129, 4P-N108
biodevice 3P-G043
biodevices 2P-N225
biodiesel fuel 2P-I145, 2P-I146, 2P-I151, 2P-I153, 3P-H094, 4P-G006
Biodiversity 3P-J221
Bioeconomy 2S-Cp03
biofilm 2P-N218, 3P-N134, 4P-I126
bioflocculant 2P-J199
biofuel 2P-I147, 2P-I154, 3P-I159
biofuel cell 3P-N029, 3P-G043, 4P-I146
biofuel cells 3P-G028
Biofunctional 2P-N142
biogas 4P-I140
biohybrid 4P-I180
bioimaging 3P-E057
bioinformatics 2S-Aa04, 2S-Aa05, 2S-Ca02, 2S-Cp01, 3P-I136, 3P-J215, 4P-J188, 4P-J190
biological containment 2S-Da04, 2S-Da05
biological medicine 3P-E022
biological reduction 3P-I138
biologics production 3P-G008
bioluminescence 2P-G049, 3P-G053
biomarker 2S-Gp04, 4P-G002
biomass 1A-Wp03, 2P-E007, 2P-H089, 2P-I150, 2P-I165, 2P-J169, 3P-G039, 3P-N155, 3P-F181, 4S-Ba02
biomass conversion 4P-I154
Biomaterial 4P-N099
biomedicine 4P-G042
BioMEMS 3S-Gp05
biomineralization 2P-G040, 4P-H100
Biomolecular Imaging 2P-N214
biopanning 4P-G047
bioreactor 1A-Wp03, 3P-N034, 3P-I137, 3P-J193
bioreactor design 1A-Wp01
biorefinery 3P-I183
bioremediation 3P-N124, 4P-N104, 4P-H105, 4P-N106, 4P-H107
bioresources 2S-Bp02
biosensing 3P-G058
biosensor 2P-G041, 2P-H070, 2P-J227, 2S-Dp02, 3P-G056, 3P-H083, 3S-Ca02, 4P-G036, 4P-E041, 4P-J194
bioseparation 2A-Dp01
biosilica 2P-G040
biosurfactant 3P-H068
biosynthesis 2P-G012, 2P-G025, 3P-J232, 3S-Da01, 3S-Da02, 3S-Da03, 3S-Da05, 4P-H122, 4P-F198, 4P-J200
biosynthetic pathway 2P-G049
biotechnology 3S-Ca01
biotin ligase 3P-N198
biotransformation 2P-N184
bisphenol A 2P-G020
blue fluorescence 3P-J224
BmNPV 2P-H063

BmNPV bacmid 4P-J229
BNC 2P-N220
body on a chip 4P-F181
brackish lake 2P-N032
brain 3S-Dp04
branched-chain amino acids 2P-H107
branched-chain polyamine 2P-G011
bread 2P-I130
bread yeast 4P-N004
Breeding 4S-Ca01
Brevibacillus choshinensis 2P-J200
bulky ketone reduction 3P-G036
2,3-butanediol 2P-F167, 4P-N059
1,2,4-butanetriol 2P-F167
butanol 2P-H083, 3P-H089, 3P-N090, 4P-G065, 4P-G068
Butanol production 3P-F147

C

C-terminal alternation 2P-I163
cadaverine 2P-E101, 2P-H112
cadherin 3P-J211
Caenorhabditis elegans 3P-J217, 4P-N106
calcium 3P-J199
Calibration Curve Locking Database 4P-E083
calnexin 2P-H071
calorimetry 4P-J193
cAMP 3P-I164
cAMP phosphodiesterase 2P-N029
cancer 2P-J183, 2P-N211
cancer cells 3P-J227
cancer classification 3P-J196, 4P-I177
Cancer immunology 3P-H063
cancer immunotherapy 2P-N068
cancer screening 2S-Gp04
Candida albicans 3P-H067, 4P-F216
Candida boidinii 3P-N075
capsular polysaccharide 2P-G002
carbon binding peptide 4P-I145
carbon catabolite repression 2P-N157, 3P-G016
carbon dioxide 2P-J190, 2S-Ba04
Carbon-nitrogen ratio 2P-H076
carbonyl compounds 3P-J199
Carbonyl reductase 2P-G037, 2P-G057
carboxylation 2P-G052
Carboxysome 3P-G049
cardiomyocyte 4P-I179
Cardiomyocyte differentiation 4P-N175
carnosine 4P-N023
carotenoid 3P-N005, 3P-H096, 3P-J225, 4P-J221
carotenoid biosynthesis 3P-N160
Cas9 4P-J210
catalytic efficiency 4S-Ba04
catalytic peptide 4P-J214
cathode 4P-I145
cationic peptide 4P-N217, 4P-N218
CCAAT 3P-N019
CCIs 4P-N222
CcmN 3P-G049
CD media 2S-Gp01
CD9 4P-N043
CDF 4S-Aa02
CdS nanoparticles 3P-G030
cecium removal 3P-I137
cecretory proteins 3P-J227
cell 2P-N204, 3P-J201, 3P-J212, 3S-Gp02
cell and lipid production 3P-I176
Cell assay 2P-J205, 3S-Gp05
cell assebmly 4P-I180
Cell chip 2S-Dp01
cell culture 2P-N216
cell cycle 3P-N076
cell detachment 3P-J190
cell fate 3P-G021
cell fusion 3P-H104
Cell image analysis 4P-I177
cell immobilization 3P-I172, 4P-I174, 4S-Da05
cell membrane 3S-Aa05, 4P-J215
cell morphology 2A-Gp01
cell penetrating peptide 4P-F213
cell processing 2A-Gp01, 3P-J195
cell quality 2P-J176, 3P-J201
cell regulation 2P-N072
cell sorter 3P-J228, 4P-G040, 4P-I174
cell surface display 4P-G054
cell surface engineering 3P-J211, 3P-N198
cell suspension culture 4P-N162
cell wall 3P-H067
cell-arraying device 3P-J227
Cell-based assay 3S-Gp01, 3S-Gp06, 3S-Gp07, 4P-N182
cell-based sensor 4P-N170
cell-cell interactions 2S-Hp01, 3P-N198, 3S-Aa01
cell-free protein synthesis 2P-N074, 4P-G040
cell-fused strain 3P-I150
Cell-omics 4S-Da01
cell-sized liposome 2P-N074
cellobiohydrolase 3P-N155
cellulase 2P-I140, 3P-N142, 3P-I146, 3P-I148, 3P-I152, 3P-I154, 3P-N155, 4P-G053
cellulose 3P-I154
cellulose degrading enzyme 2P-J171
cellulose-binding domain 3P-I154
cellulosic baiomass 2P-H112
cellulosic biomass 3P-I154
Cellulosic ethanol 3P-N144
cellulosome 2P-I148
central metabolism 3P-N076, 4P-H074
centromere 3P-G004
ceramide 2P-H090, 2P-H091
certified reference material 2P-F228
cerulenin-resistant 4P-H090
cesium 4P-H105
chaperonin 3P-G044
chemical mutagenesis 2P-I147
Chemoinformatics 2S-Aa03
chemotaxis 2P-N004, 2P-N005, 3P-I128, 4P-H111, 4P-N127, 4P-I128
chimeric receptor 3P-G020
Chinese hamster ovary 3P-J210, 4P-J226
Chinese hamster ovary cells 4P-I169
chiral alcohol 2P-G037, 3P-G036
chiral fluoro alcohol 2P-G057
Chiromantes haematocheir 4P-I133
chitin 2P-H086, 4P-G012
chitinase 4P-N013
chitosan-like biopolymer 2P-J199
Chlamydomonas reinhardtii 4P-G024
Chlorella vulgaris 4P-I140
chloroaniline 3P-I121
chloroformate 3P-J220
chlorophyll 3P-J230, 4P-J209
Chloropicrin 4P-H110
chloroplast degradation 2P-I149
CHO cell 3P-J189, 3P-J202
CHO cells 2P-J178, 3P-J209
chromatin structure 4S-Da04
chromatography 2P-E065
chromosome 2P-H102, 3P-J210, 4P-I171, 4S-Da04
chromosome splitting 3S-Ba03
chromosome targeting 3P-J209
chrono-nutrition 2P-I134
chronological lifespan 2P-N126
circadian rhythm 2P-J177, 3P-N192
Circulating tumor cell 3P-J228
cis,cis-muconic acid 4P-I129, 4P-I130
cis-polyisoprene 4P-I163
Citrate 4P-H111
citric acid 2P-G028
Citrobacter 2P-H081, 2P-J199
Citrobacter sp. 2P-N095
Citrus 3P-J234, 4P-N081
cloning 2P-N129
Clostridium 4P-J193
Clostridium paraputrificum 2P-H104
Clostridium perfringens 4P-G064
Clostridium saccharoperbutylacetonicum 4P-G065
ClosTron 2P-H104
Cmah 4P-J226
CNT 2P-N225
co-compost 2P-N095
co-cultivation 3P-J186
co-culture 2P-J205
co-expression 2P-J173, 3P-I177
CO_2 fixation 2P-N161, 4P-I144,

4S-Ba04
CO_2/H_2 gas mixture 2P-N084
cobalt(II) 2P-G057
coculture 3P-F131, 3P-N180, 3P-I184
coffee 3P-H113
cold atmospheric pressure plasma 2P-F131
cold stress 4P-G060
cold-active enzyme 3P-G040
cold-adapted microorganism 4P-G060
ColG, colH 2P-N054
collagen 3P-J194, 4P-I178
collagen score 3P-H102
Colorimetric immunoassay 2P-J226
combinatorial library 3S-Aa04
combinatorial library strategy 3P-G009
combinatorial protein library 2P-G019
communication 2S-Hp02
companion diagnosis 3P-H063
complex microbial system 2P-H078
compost 1A-Wp03, 3P-H081, 4P-I137
confocal microscopy 4P-I173
conidiation 4P-G005
constructive genetics 3P-N218, 3S-Aa06
continuous culture 2P-H081, 4P-I150
continuous separation 2S-Dp03
coral 4P-H075
coral associated bacteria 3P-J222
coral holobiont 4P-H076
cordycepin 4P-N185
Cordyceps militaris 4P-N185
core model 3P-J214
corn cob 3P-I183
Corn steep liquor 2P-N192
Corynebacterium glutamicum 2P-G022, 2P-G023, 2P-H100, 2P-E101, 2P-H112, 3P-H073
Corynebacterium urealyticum 2P-G017
Coutinuous cropping 4P-H113
CpG oligodeoxynucleotide 4P-J212
Cre/LoxP system 3S-Ba04
CRISPR Cas9 system 4P-G058
CRISPR-Cas9 3P-G023, 4P-G057
CRISPR-PCS 3S-Ba03
CRISPR/Cas9 3P-J209, 3S-Ba05, 4P-I172
cross-linked peptide 4P-G026
cross-linking 2P-N212
crude oil 2S-Ba02
cryopreservation 3P-J201, 3P-J212, 3P-N191, 4P-J191
cryptic plasmid 2P-H094
crystal structure 2P-G041
CTT1 3P-N001
Cu^{2+} 2P-G022
cultivation 3P-I171, 3P-I179
cultivation history 4P-H098
culture condition 2P-H079
Culture model 3S-Aa03
culture optimization 4P-I167
Cupriavidus 2P-H105
Cupriavidus necator 2S-Da02
cutinase 3P-G040
cyanobacteria 2P-E007, 2P-G006, 2P-G044, 2P-H096, 2P-I148, 2P-I154, 3P-N090, 3P-H091, 3P-H094, 3P-H096, 3P-N187, 3P-J188, 4P-N073
cyclic peptide 4P-G025
cyclodipeptide 2P-I133
cyclohexanone monooxygenase 4P-G050
CydDC 2P-G023
cysteine 3P-E045
cysteine biosynthesis 2S-Da01
cysteine efflux system 2P-G023
cysteine fermentation 2S-Da01
cysteine production 2P-G023
cytochrome P450 2P-G036, 2P-G053
cytoplasmic pH 2P-G030
cytotoxicity 2P-N218

D

3D culture 3P-J194, 3P-J196, 3S-Gp01, 4P-F181
2D image analysis 4P-I164, 4P-I165, 4P-I166
3D observation 3P-H062
3D tissue 3P-J200
D-amino acid 2P-G038, 2P-N088, 2P-I135, 3P-I164, 4P-E084
D-amino acid oxidase 4P-G021
D-aspartate oxidase 4P-G016
D-fructose 2P-J198
D-Lactate 2P-N192, 3P-G042
D-Lactate dehydrogenase 2P-G044, 2P-N192
D-lactic acid 3P-I183, 3P-J188
Dark field microscopy 2P-J181
dark place 3P-N167
database 2S-Ca02, 4P-G038
date 2P-I143
DD agent 4P-H110
DDS 2P-N220
decarboxylase 2P-G052
decomposition respiration 4P-N134
defensin 2P-H061
defined substrates 4P-I141
degradation 3P-I123, 3P-I125, 3P-I133, 4P-G001
degradation sites 4P-J186
14-dehydroergosterol 3P-F109
dehydrogenase 4P-G030
dehydroquinate dehydratase 4P-G029
3-dehydroshikimate 4P-G029
demetallation 3P-J230
denitrification 3P-I118, 3P-I120
density gradient centrifugation 2P-N188
deracemization 2P-G049
Desulfovibrio 4P-N099
desulfurization 4P-N108
dextrin 3S-Ca04
DGGE 2P-J190
DHA 2P-J195
diagnosis 2P-N211
dietary fiber 2P-I124
digital PCR 2P-F228, 2S-Dp06
diglycerol monolaurate 2P-N127
dihydroferulic acid 2P-H093
3,4-dihydroxybenzoic acid 2P-N048
diketopiperazine 2P-I133
dimethyl trisulfide 4P-H086
dimorphism 3P-I164
1,4-dioxane 3P-N124, 4P-H123
dipeptide 2P-G038, 4P-N019
directed evolution 2P-G019, 3P-G028, 3P-G054, 3S-Da04, 4P-N039
disinfection 4P-H116
dissolved hydrogen concentration 4P-N142
distillation 4P-H096
divalent cation 3P-N168
DLC 4S-Aa04
DMSO free 3P-J201
DNA 2P-F228
DNA extraction 4P-J189
DNA hybridization 4P-N049
DNA methylation 3P-G024
DNA polymerase 2P-J231
DNA probe 2P-E035
DNA sensing 2P-N223
DNA-binding protein 4P-J211
DO-stat 4P-G044
dough fermentation 2P-I123
DPA 2P-J221
droplet digital PCR 3P-J222
Droplet interface bilayer 3P-G050
droplet microfluidics 2P-J229, 2S-Dp06
droplet PCR 2P-J229
drug carrier 2P-N213
Drug Delivery 2P-N214
drug delivery system 2P-J208, 2P-N213
drug discovery 2S-Aa05, 3S-Gp03
drug-induced liver injury 3S-Gp01
DT40 cells 4P-G034, 4P-N048
dye-linked dehydrogenase 3P-G041, 3P-G042

E

E coli Bacteria 2P-N215
E. coli 2P-G031
earthworm 3P-E022
ecofriendly synthesis 4P-N196
ecology 4P-G006
ecosystems 2S-Ba05
edible coating 3P-H114
effective factor 3P-I175

egg 2P-J195
Eikenella corrodens 2P-N001
Eisenia fetida 3P-E022
Electrical ground 4P-N158
electrical monitoring sensor 2P-N223
Electrical potential 4P-N148
electrochemical cultivation 3P-E092, 4P-I144
Electrochemical mediator 4P-N148
electrochemistry 2P-J177
electron 2S-Ba01
electron bifurcation 2S-Ba03
electron transfer pathway 4P-I144
electron transport chain 3P-G041
electrospinning 2P-N225
embryogenic callus 4P-I157
emulsification 3P-H068
emulsifier 3P-H067
enantiomer 2P-I136
enantioselectivity 4P-E084
enantioseparation 2P-I135
encapsulation of microorganism 3P-N162
Endospore 2P-J221
endothelial cell 4P-I178
endotoxin 3P-F170, 3P-I171
Endozoicomonas 3P-J222, 4P-H075
energy metabolism 4P-I144
energy self-sufficiency 4P-I132
eno1 promoter 3P-N072
Enterobacter 3P-I122
Enterococcus 2P-N157, 3P-H071
environmental bacteria 3P-I130
environmental engineering 4P-H118
enzymatic assay 2S-Bp03
enzymatic conversion 2S-Bp02, 4S-Ba04
enzymatic hydrolysis 3P-I126
enzymatic synthesis 2P-E042
enzyme 2P-N204, 2S-Bp01, 3A-Ap01, 3P-I177, 4P-G012, 4P-E041, 4P-H107
enzyme activity 3S-Da01, 4P-I139
enzyme characteristics 4P-G021
enzyme reaction 3S-Ca04
Enzyme reaction solvent 2P-G050
Enzyme stabilizing agent 2P-G050
enzyme-semiconductor hybrid 3P-G030
eosinophil 4S-Ca05
epigenetic 2P-J176, 4P-J211
epitope peptide 4S-Ca04
ER stress 2P-F131, 3S-Dp04
ergothioneine 4P-J203
Erlenmeyer flask 3S-Hp03
ERp29 2P-H071
ES/iPS cells 3S-Aa03
Escherichia coli 2P-G013, 2P-G028, 2P-G036, 2P-H066, 2P-E082, 2P-N085, 2P-H098, 2P-H102, 2P-H109, 2P-H113, 2P-N164, 2P-J169, 2P-J173, 2S-Aa01, 2S-Aa02, 2S-Da04, 3P-H080, 3P-H084, 3P-I133, 3P-J214, 3P-N218, 3S-Aa06, 4P-G037, 4P-G044, 4P-G067, 4P-G068, 4P-H110, 4P-H116, 4P-E143, 4P-J203, 4P-J219
esterase 2P-N026, 3P-G040, 3P-H082, 4P-G032
ethanol 2A-Bp01, 2P-I132, 3P-N100, 3P-I143, 4P-N066, 4S-Ba01
ethanol extract 2P-N141
ethanol fermentation 2P-H108, 2P-J170, 3P-I141, 3P-N142, 3P-I149
ethanol production 3P-I145, 3P-I152
ethyl acetate 2P-G045
Ethyl alpha-D-glucopyranoside 4P-G009
ethyl caproate 4P-H090
ethylene 2P-N021, 2P-I148
ethylene-forming enzyme 2P-N021
euglena 4S-Ba02
Euplectella 3P-G059
evolutionary engeneering 2S-Aa01, 2S-Aa02, 3S-Bp03, 4P-G018
excess sludge 4P-I147
Exophiala 4P-G050
exopolysaccharides 3P-J186
Exosome 2P-N211, 4P-N043, 4S-Ca01
Expansion culture 3P-J204
Export Promotion of Japanese sake 3S-Ca03
expression 2P-G018, 3P-G009, 3P-I128, 4P-G038
extensively hydrolysed formula 2P-N137
extracellular matrix 4P-I176
Extracellular electron transfer 4P-N099
extracellular expression 2P-J200
extracellular polysaccharide 3P-I173
extracellular vesicles 2S-Dp03
extractant per broth ratio 2P-H083
extractive fermentation 2P-H083
extremophiles 2P-G012, 4P-H121

F

FAD 3P-J231
FAD modification 2P-G051
fatty acid 2P-N085, 2P-I144, 2P-I145, 2S-Ca01, 2S-Hp02, 3P-H094
Fatty acid ester 3P-N065
fcs/ech 4P-N196
feces 3P-J220
fed-batch culture 2P-N085, 3P-H086, 4P-G044
feeder cell 3P-J211
fermentation 2P-H086, 2P-N088, 2P-J197, 3P-N072, 3P-N075, 3P-N103, 3P-N105, 3P-H117, 3P-I174, 3P-N187, 3S-Ap03, 3S-Dp01, 4P-G054, 4P-H087, 4S-Aa03
Fermentation ability 2P-I116
fermentation inhibitor 2P-H098
fermented food 3P-N106
ferulic acid 2P-H093
feruloyl esterase 4P-N028
fibroblast 3P-N101
fibroblasts 2P-F174
fibronectin 2P-G002
filamentous cyanobacteria 2P-G008
filamentous fungi 2P-H087
film 3P-J205
filterable bacteria 2P-N032
firefly luciferase 2P-G049
fixed-bed bioreactor 4P-I149
FK506 4S-Aa03
flavin prenyltransferase 2P-J203
flavonoid 4P-J225
flavoprotein 3P-J231
FlbC 3P-G015
flocculation 3P-I133
flow cytometry 2P-I146, 2P-J206, 4P-G042
fluorescence 3P-G052, 4S-Aa01
Fluorescence based functional assay 3P-G050
fluorescence imaging 3P-J225
fluorescence quenching 4P-G036
fluorescent labeling materials 3P-J224
fluorescent materials 3P-J224
fluorescent protein 2P-G030
flux balance analysis 3P-J214
Folate 2P-I118, 2P-N142
folates content 2P-I117
Folding activity 2P-J172
food analysis 2P-I135
food security 3S-Ca02
food self-sufficiency 4P-I132
Food waste 2P-I152
forest biomass 4P-I131
forest soil 4P-I131
formate dehydrogenase 2P-H111, 2S-Ba04
Formate oxidase 2P-G051
formic acid 2P-H080
8-formyl-FAD 2P-G051
FPIA-3000 3P-N163
freeze tolerante 2P-I130
fuel crop 4P-I132
fuel ethanol 4P-N077
Fulidic device 3S-Aa03
functional assay 2P-N074
functional food 3S-Dp01
functional peptide 4P-F213
functional property 1A-Wp02
fungal-bacterial interaction 3P-I184
fungi 3P-N127
fungus 3S-Ap03, 4P-N134
furanone 3A-Cp01

3-(2-furyl)acrolein 2P-J194
fusion tag 2P-N059
Fut8 4P-J226

G

G-protein-coupled receptor 3P-G002
G-quadruplex 4P-J211, 4P-J212
GABA 2P-H109, 2P-I143, 3P-N033, 3P-H080
galactosyltransferase 4P-N228
gamma-glutamylcysteine 4P-G024
gamma-glutamyltranspeptidase 4P-N020
gamma-oryzanol 3S-Dp04
Ganoderma lucidum 3P-H066
Garcinia mangostana 3P-H112
gas chromatography mass spectrometry 4P-E083
gas chromatography/mass spectrometry 3P-H114
GC-MS 3P-J220, 4P-N206
gene assembly 3S-Aa04
gene cloning 4P-N019
gene contol 4P-N170
gene delivery 2P-J178
gene disruption 2P-H077
gene expression 2P-G015, 3P-G015, 3P-G017, 3P-N153, 3P-J228, 3S-Aa01
gene knockout 2S-Ca03
gene transfection 2P-G034
genetic circuit 3S-Aa02
genetic engineering 3P-G008
genetic mapping 2P-E035
genome 2S-Aa01, 2S-Aa04, 2S-Cp04, 3S-Ba02, 4P-J187, 4S-Da02
genome deletion 4P-J201
genome design 3S-Aa04
genome editing 3S-Ap01, 3S-Ap04, 3S-Ba04, 3S-Ba05, 4P-G065, 4P-J210, 4S-Ca03
genome engineering 2P-G014, 2P-H103, 2S-Ca03, 3S-Ap03, 3S-Ba03, 4P-N048
Geobacillus kaustophilus 3P-N046, 3P-G047
Geobacillus stearothermophilus 3P-G055
Geobacillus thermodenitrificans 4P-G001
geographical origin 3P-H113
GFP 2P-H060, 3P-E069, 3P-H083, 3P-N162
global strategy 3S-Ca01
glucan 2S-Hp04
Gluconacetobacter 4P-G030
Gluconobacter oxydans 4P-G029
glucosaminoglucan 4P-J223
glucose repression 3P-I148
Glucosylation 4P-G009
glucosylceramides 4P-N081
glutamate decarboxylase 3P-N033
glutamate fermentation 2P-G022
glutelin 4P-H097
glycerol 2A-Bp01, 2P-H080, 3P-H086, 4P-N055, 4P-G056
Glycerol production 3P-H097
glyco-biomarker 4P-J224
Glycoengineering 3P-G023
glycogen 2P-E007, 3P-H097
glycolic acid 2P-J196
glycolysis 3P-J216
glycoprotein 3P-E014
glycosylation 4P-G035, 4P-N207, 4P-N208, 4P-J226
glycosylceramide 3P-H107
glycosyltransferase 4P-J225, 4P-J227, 4P-J229
gold nanoparticle 2P-J181, 2P-J222, 4P-J214
gold nanoparticles 2P-J226
Gordonia 4P-N108
gossypol 4P-N207, 4P-N208
GPCR 3P-G025
gram-negative bacteria 3P-I171
graphene oxide 2P-N217
grondwater 3P-I139
growth 2P-H110, 3P-J208
growth processes 4P-J193
growth rate 3P-I130
growth stimulation 2P-J179
GSK3beta inhibitor 4P-N175
guaiacol oxidation 4P-I133
Guayule 4P-I163
GUS 4P-I157
gut microbial metabolism 2S-Ca01
gut microbiota 2S-Ca04, 3P-H081

H

H_2O_2 3P-I151
halal business 3S-Ca02
Halomonas 2P-J197
halotolerant bacteria 4P-H121
halotolerant protease 2P-G046
HapX 3P-N019
headspace 2P-J190
health functionality 3S-Cp03
heat resistant 4P-G010
heat shock 4P-H089
heat shock protein 2P-J183
Heavy metal pollution 4P-N104
HEK293 cell 3P-J189
helicase 2P-J231
Helicteres angustifolia L 2P-N141
Helicteres angustifolia L. 4P-N160, 4P-N162, 4P-N204
heme containg membrane protein 3P-G039
hemolysin 2P-N001
heparan sulfate proteoglycan 2P-J207
Hepatic receptor 2P-J206
hepatitis B virus 2P-J207
hepatotoxicity 3P-N192
heterogeneity 1A-Wp01
heterologous expression 2P-G017
heterologous production 2P-G016
hexavalent chromium 4P-H102
hexose transporter 3P-I149
high cell density culture 3P-I176
high-resolution mass spectrometory 2P-N137
high-throughput screening 3P-I175
high-throughput sequencing 4P-H114, 4P-H115
histone 4P-I171
HLICTOF/MS 4P-H092
HMT1 2P-I118
hollow fiber membrane 2P-J199
homo-lactic acid 2P-N157
homocarnosine 4P-N023
homologous recombination 3P-N218, 3S-Aa06
host range 4P-G007
HTST system 2S-Gp01
human erythropoietin 4P-N228
human excreta 3P-I132
human hair 4P-F183
human induced pluripotent stem cell 2P-J175, 2P-J176
Human induced pluripotent stem cells 3P-J204
human iPS cell 3P-J197
human iPSCs 3P-F203
Hybrid 3S-Cp04
Hybrid materials 2P-N214
Hybrid nanomaterials for infectious virus detection 2P-J224
hydrocarbons 3P-N127
hydrogel 2P-G034, 2P-N204
hydrogen 2S-Ba01, 4P-I150
hydrogen production 2P-H099, 2P-H104, 4P-I151
hydrogen-oxidizing bacteria 2P-N161
hydrogenase 2P-H098, 2S-Ba03, 2S-Ba04
hydrogenase gene expression 4P-I151
Hydrogenobacter thermophilus 3P-H077
hydrolysates 3P-I141
hydrophobic substance 3P-I178
hydrophobicity 2S-Bp05
hydroponic culture 4P-N135
Hydroponics 2P-N142
10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid 2S-Ca01
3-hydroxyacyl-ACP dehydratase 4P-F202
hydroxyapatite 2P-N212
3-hydroxybutyric acid 2P-J196, 2P-J197

hydroxylation 2P-N047
3-hydroxypropionic acid 4P-G058
hydroxytyrosol 2P-H105
hydroxyurea 2P-G016
hyperthermophile 3A-Ap01, 3P-N153
hyperthermophilic archaeon 3P-N153
hypoxia 4P-N170

I

IAA 4P-N158
identification 4P-N003
IgG 3P-J189, 4P-G035
IL-12 2P-N128
illumination 4P-H119
image analysis 3P-J196
image-based analysis 4P-J191
image-based nalaysis 4P-I167
Imaging 4S-Da01
imidazole peptide 4P-N023
immobilization 2P-G053, 2P-H070, 2P-H081, 2P-H083, 3P-G032, 3P-G058, 3P-H060, 3P-F181, 4P-G047
immobilized enzyme 2P-J227, 3P-N033, 3P-N034
Immobization of protein 3P-G059
immuno assay 4P-N046
immunoassay 4P-N045
immunoglobulin new antigen receptor 4P-I169
immunomodulatory activity 4P-N204
in cell folding 2P-N072
in silico enzyme screening 2S-Bp04
in vitro metablic engineering 2S-Da03
in vitro metabolic engineering 3P-E045, 4P-G069
In vitro regeneration 4P-N160
indigenous marine actinomycetes 2P-J171
indigo 3P-G035
indirubin 3P-G035
industrial cooling water system 4P-H125
Industry4.0 4S-Aa05
inflammation 2P-J219, 3P-H108, 3P-N219, 4S-Ca05
inflienza 4P-G040
Influenza 2P-N223
Influenza virus 4P-G047
information analysis 3S-Ap05
inhibition of protein synthesis 3S-Bp02
inhibitor 4P-I159
inhibitor tolerant yeast 3P-N072
inhibitory chemical 3P-N072
innate immunity 3S-Bp04
innovative technologies 3S-Ca03
inoculation 3P-J208
insect cell 3P-G023
insect cell culture 4P-N046
insertion-sequencing 2P-G003
insulin secretion 4P-I168
Integrated analysis 3P-J221
intellectual property 3S-Ca01
interspecies hybridization 2P-I115
interspecies interaction 2P-H110
intestinal microbiota 3S-Bp04
intracellular redox state 2P-J177
Inulin 2P-I134
IO/Au-CNT 2P-N223
ion responses 4P-N222
ion-beam 3P-H074, 3P-I152
Ion-beam mutation 3P-I165
ion-complex 4P-J209
Ionic liquid 2P-G050
IoT 4S-Aa05
iPS cell 3P-J211
iPS cells 3S-Gp01, 4P-N175
iron oxidation 3P-N135
Iron oxide/gold nanoparticles modified graphene 2P-J224
iron respiration 3P-I120
iron-sulfur cluster 3P-N019
isoamylase 4P-G010
isolation 2P-N188, 3P-J226, 3S-Hp02
isomaltose 4P-H091
isoprenoid 3P-H082, 4P-N052
iturin A 4P-I153

J

Japanese sake yeast 2P-I116
Jatropha curcas 3P-J233

K

keratin 3P-J205
3-ketoacyl-ACP reductase 4P-F202
ketone body 4P-G036
killer gene 2P-N129
kimoto 2S-Hp05
Kinetic analysis 3P-J204
Kluyveromyces lactis 2P-I139
Koji 2P-H090, 2P-H091, 3P-F109
Koji making 3S-Cp01
Komagataeibacter europaeus 2P-G030, 2P-H094, 2P-H107
kouji 3P-N106

L

L-alanyl-L-glutamine 2P-J227
L-amino acid esterase 4P-N019, 4P-N023
$_{L}$-asparaginase 4P-N022
L-glutamate 3P-H080
L-glutamate oxidase 2P-G041, 4P-G018
L-lactic acid 2P-H078, 3P-G041, 3P-H088
L-proline 4P-N014
L-thioproline 4P-N014
L-tyrosine 4P-N196
LA oligomer 3P-J236
Lact-sho 3P-N106
lactate dehydrogenase 2P-I158
lactate oxidase 3P-G056
lactate production 2P-I158
lactic acid 2P-H080, 2P-H100, 2P-N156, 3P-H074
lactic acid bacteria 2P-G024, 2P-G025, 2P-H093, 2P-I124, 2P-I143, 2S-Ca01, 2S-Hp05, 3P-H070, 3P-H071, 3P-H081, 3P-H087, 3P-H098, 3P-H111, 3P-I173, 4P-N022
Lactobacillus plantarum 2P-H093, 3P-H070, 3P-H088
Lactobacillus reuteri 3P-H086
Lactococcus lactis 2P-G025, 3P-I122
land crab 4P-I133
lantibiotic 3S-Bp01
large grain 2P-E035
large-scale 3P-J193
lasso peptide 2P-G027
late embryogenesis abundant protein 2P-J173
latex agglutination 4P-N045
LC-MS 2S-Gp04
LC-MS/MS 4P-H079, 4P-N081, 4S-Ca02
LC/MS 2P-H076, 2P-J230
ldhA 2P-G031
leader peptide 2P-G024
lectin 4P-J224
leucine-responsive regulatory protein 2P-H107
life cycle thinking 4S-Ba03
lifespan 3S-Dp03
light response mechanism 3P-N160
light/dark cycle 2P-I146
lignin 2P-I140, 3P-I156, 3P-I157, 4P-I129, 4P-I130
Lignin nanoparticle 3P-I158
lignin-degradation enzyme 4P-I133
lignocellulose 4P-G054
Lignocellulosic biomass 3P-I158, 4P-I139
lignocellulosic materials 2P-N156, 3P-I141, 3P-I165
Limulus amebocyte lysate 3P-F170, 3P-I171
LINE-1 2P-J178
lipase 3P-G009
lipid 2P-H087
lipid accumulation ability 2P-H079
lipid II-binding motif 3S-Bp01
lipid production 2P-I149, 4P-G061, 4P-H072
lipid vesicle 2P-I125
lipidomics 4P-H082
Lipomyces 2P-H079, 4P-G006
Lipomyces starkeyi 3P-I174

Lipomyces starkeyi D35 3P-I176
Lipomycetaceae 4P-G006
lipopolysaccharide 2P-I125
liposome 3P-I161, 3P-N168, 3P-N169, 4P-N220
liquid biopsy 2S-Dp06
live cell imaging 4P-I173
liver 3S-Gp04
liver regeneration 3P-J194
livestock feed 2P-J195
local anesthetic 4P-N220
Localize surface plasmon resonance 2P-J222
long term storage 3P-J212
long-chain polyamine 2P-G010
longevity 3S-Dp02
Low temperature atmospheric pressure plasma 2P-J172
luciferase assay 3P-G025
Lysine production 3P-H073
Lysinibacillus sphaericus Bacillus sphaericus 2P-N054
lysozyme 4P-J223
lytic enzyme 3P-G031

M

machine learnig 4P-H070
machine learning 4P-N071
macroalga 4P-G001, 4P-I154
macrophage 2P-J208, 3P-H068, 3P-H107
macrophage migration inhibitory factor 3P-G037
magneto-Archimedes effect 4P-I180
malaria 2A-Fa01
Malate dehydrogenase 3P-G055
MALDI-IMS 3P-N219
MALDI-TOF MS 4P-G002, 4P-N003, 4P-N004
malic acid 2P-I119, 3P-I165, 4P-I128
mandelate 3P-G056
mangosteen 3P-H112
mannitol 2P-J198
mannosylerythritol lipid 3P-G012
manufacturing process 4P-H080
marine biomass 4P-I150
marine environment 2S-Cp02, 3P-J215
marine sediment 4P-H115
marine sponge 3S-Hp04
marker gene 4P-N033
Mass spectrometry 2S-Aa03, 4S-Da03
matabolomics 3P-N219
material circulation 4P-H124
material circulation 3P-I119
material curculation 4P-I131
mathematical analysis 3P-J213
mathematical model 2P-J168, 3S-Aa01
mating 4P-N085
mating type 2P-I115
MCFA 2P-I152
mcl-PHA 2P-N085
MCR-ALS 3P-J229
mechanosensitive channel 2P-G022
medium 3P-J189
Medium chain fatty acids 2P-I152
medium chain length polyhydroxyalkanoate 4P-N206
medium component 2P-H079
megakaryocyte 3P-J193
melanin 4P-N196
melanogenesis 3P-G024
Meloidogyne incognita 4P-I137
membrane disruption 3S-Bp02
membrane lipids 3S-Aa05
membrane protein 2A-Fa01, 2P-N074, 3P-G050
membrane vesicle 2S-Hp01, 3P-I161
menaquinone 4P-J199
mesenchymal stem cell 2S-Gp02, 3P-J195, 3P-J207, 4P-I167, 4P-J191
mesenchymal stem cells 3P-J208
mesh 3P-J206
mesoporous silica 3P-N034
meta-fermentation 2P-H078
metabolic analysis 2P-H109, 2P-F114, 3P-N090, 3P-H113, 3P-H115, 3S-Aa02, 4P-G060, 4P-N066, 4P-N073, 4P-H078, 4P-H079, 4P-H080, 4P-H082, 4P-E083, 4P-H098, 4P-I156, 4P-N120
metabolic engineering 2P-H098, 2P-H099, 2P-E101, 2P-H102, 2P-H112, 2P-H113, 2S-Bp02, 2S-Da01, 2S-Da02, 3P-N090, 3P-H096, 3S-Aa02, 3S-Ap01, 3S-Ap03, 3S-Ap05, 3S-Da04, 4P-G058, 4P-G062, 4P-G065, 4P-I156, 4P-N066, 4P-J203
metabolic flux 3P-H091
metabolic flux analysis 3P-H089, 4P-G056, 4P-H074
Metabolic pathway design 2S-Cp03
metabolic pathway modification 2P-H103, 2P-J169, 2S-Da05
metabolic simulation 2S-Aa02, 4P-G067
metabolism 1A-Wp02, 2P-H106, 2P-H110, 3P-H077, 3P-I120, 3S-Dp03, 4P-E143, 4P-J192
metabolite 2S-Ca04
metabollomics 4P-H072
metabologenomics 2S-Ca04
metabolome 3P-H087, 4P-N063, 4P-N071
Metabolome analysis 3P-H073
Metabolomics 2P-H076, 2S-Aa03, 3P-H112, 3P-H113, 3P-H114, 4P-G068, 4P-H082, 4P-E083
metabolomics analysis 3P-J234
metagenome 2S-Cp01, 3P-G036, 4P-N063
metagenomic libraries 2S-Cp02, 3S-Hp01, 4P-J192
metal absorption 4P-N103
metal adsorption 3P-I173
metal ions 3P-J225
metal nanoparticles 2P-N217
metalloproteinase 4P-N031
metals 4P-H123
methanation 4P-N142
methane 2P-N084, 4P-I141
methane fermentation 3P-N134, 4P-H119, 4P-N138
methanogen 2S-Ba01
methanogens 2P-N084
methanol 3P-H083, 3P-H085
methionine salvage pathway 4P-H086
methionine synthesis pathway 2P-I117
methotrexae 3P-G037
4-methoxysalicylic acid 2P-G052
4-methyl-1,3-pentanediol 2P-F167
Methyl-accepting chemotaxis protein 3P-I128, 4P-H111
Methylobacterium 4P-I126
methylotroph 3P-H083, 3P-H085
methylotrophic yeast 3P-G006, 3P-G007, 3P-G008
Mevalonate 4P-N052
mevalonate pathway 3P-H082
micafungin 3P-H067
Mice Feces 4P-H079
mice gut microbiota 2P-I134
micrbial risk infomation 4P-J187
micro particle 4P-I176
Micro vascular structure 4P-I164
microalgae 2P-I145, 2P-I146, 2P-I149, 2P-I150, 2P-I153, 4P-I156, 4S-Ba02
microarray 2P-G034
microbe 2S-Bp02, 3P-I179
microbial biomass 4P-H124
microbial catalysis 3P-H060
microbial community 3P-I138, 4P-I141, 4P-J189
microbial consortia 3P-I139
microbial consortium 2P-I151, 4P-J184
microbial cultivation 3S-Hp02
Microbial dark matter 2P-J189, 2P-J191, 3S-Hp03
microbial degradation 4P-H123
microbial diversity 2S-Cp02
microbial flora 3S-Dp02
microbial formulation 4P-N135
microbial fuel cell 4P-N120, 4P-E143
microbial fuel cells 4P-H121, 4P-I147
microbime 2S-Cp01
microbiologically influenced corrosion 2S-Ba01, 2S-Ba02
microbiology 3P-J215

microbiome 2S-Ca02, 4P-N071
microbiota 2S-Gp03, 3P-N110
microcapsule 2P-N185
microchannel array 3P-N162
microchip 4P-J195
Microdevice 2P-J205, 3S-Gp05
microdroplet 4P-J190
microflora 4P-N120
microfluidic device 2S-Dp06, 3P-N180, 3P-J223, 3S-Gp06, 3S-Gp07, 4P-N182, 4S-Da02
microfluidics droplet 3P-I179
microorganism immobilization 2P-N185
microorganisms 1A-Wp02, 3P-N093, 3P-N180, 3S-Ap05, 4P-H109, 4P-H118, 4P-H122
microtube 4P-J223
MiFuP Safety 4P-J187
migration promotion 4P-N218
Milking 3P-H094
MiSeq 4P-F183
miso 4P-N085
mitophagy 4P-N059
mixing 4S-Aa02
mock community 4P-J189
mode of action 3S-Bp01
molasses 4P-H102
mold 4P-H093
molecular breeding 2S-Da02
Molecular chaperon 2P-J172
molecular chaperone 2P-J183
molecular cloning 2P-G012
molecular design 4P-I169
molecular diagnosis 4P-J195
molecular evolution 3P-N046, 3P-G047, 4P-N048
molecular imprinting 2S-Dp04
molecular recognition 2S-Dp04
molybdenum yellow method 2P-G040
monoclonal antibody 3P-J226, 4P-G042
monomer supplier 4P-N205
monooxygenase 4P-G026
Morphological profiling 3P-J195
morphology 3P-N163
morphology information 3P-J197
mRNA stability 4P-J186
mucin 2P-I124
muconic acid 2P-J169, 2P-J203, 3P-I156, 3P-I157
Mucor circinelloides 3P-I164
multi-omics 4P-H076
multi-walled carbon nanotube 2P-N218
Multicellular spheroids 3P-J200, 4P-I165, 4P-I166
multicolor fluorescent *in situ* hybridization 3P-J210
multicopper oxidase 3P-G028
multicopperoxidase 4P-I145
multifunctional peptide 3S-Bp02
multiple displacement amplification 4P-J190
multivariate analysis 2P-N137
Muscat Bailey A 3S-Cp04
mutagenesis 3P-G055, 3P-N160, 4P-G038
mutants 4P-N020
mutation 2P-H097
mycelium 4P-N185

N

N-acetylgalactosamine 4P-J227
N-acetylglucosamine 2P-H086, 4P-H078
N-Acetyltransferase Mpr1 2P-I116
N-formimidoyl synthase 3P-J231
N-glycan 4P-N228, 4P-J229
N-glycosylation 4P-J227
N-succinyl-D-amino acid desuccinylase 4P-E017
N-succinyl-L-amino acid 3-hydroxylase 4P-E017
N-succinylamino acid racemase 4P-E017
NAD(P)H 2P-H089, 2S-Da03, 3P-J235
NAD^+ salvage synthesis 4P-G069
NADH oxidation 3P-G030
NADH regeneration 2P-H111
Nano biosensor 2P-J224
nano bubbles 4P-N142
nano-biospheres 4P-H100
Nano-LC 4S-Da03
Nanobioelectronic device 2S-Dp01
nanofiber protein 2P-J200
nanoparticle 3P-J226, 4P-H122
nanoparticles 2S-Dp03
nanopillar 2S-Dp05
nanosilver 3P-N166
NaOH 3P-I151
natto 3S-Ba01
natto extract 4P-N217
natural products 3S-Ap02
Naxibacter haematophilus 4P-G010
near infrared light 3P-N167
near infrared ray-responsible photosemiconductor 3P-N166
negatively charged lipid membrane 3P-N168
Neospora caninum 2P-H064
network analysis 3P-J215, 4P-N071
neural networks 3P-J217
neural stem cell 3P-J206, 4P-I178
neuromuscular junction 2P-J205
new born screeing 4S-Ca02
next generation sequencing 3P-I139, 4P-J186
Next-generation sequencer 4P-I139
next-generation sequencing 3P-H061
NF-kB 2P-N220
N^G-hydroxy-L-arginine 2P-G016
nickase 4P-J210
nitrate-reducing bacterium 2S-Ba02
nitrification 3P-F131
nitrifying bacteria 3P-F131
nitritation 3P-N134
nitrocellulose 4P-N049
nitrogen catabolite repression 2S-Hp02
nitrogen fixation 3P-J185
nitrogen-fixing bacteria 3P-J186
nojirimycin 2P-H092
non-adherent cells 2P-G034
non-GMO 3S-Ba02
non-invasive analysis 4P-J191
non-invasive evaluation 4P-I167
non-ribosomal peptide synthetase 3P-J232
non-urea-producing sake yeast 4P-H090
nonribosomal peptide synthetase 2P-G038
nonwoven fabrics 3P-J208
Norovirus detection 2P-J224
Norovirus-like particles 2P-J226
novel culture method 2P-N187
NRPS 2P-G039
nukadoko 3P-N110
nukazuke 3P-N110
nylon 3P-J206
nylon oligomer 2P-G055, 2P-G056

O

O-methyltransferase 2P-N184
odorant response 2P-H066
off-flavor 3A-Cp01
OGAB 3S-Aa04
Ogataea minuta 3P-G007, 3P-G008, 4P-J224
oil productivity 2P-I147
oleaginous yeast 3P-I174, 3P-I176
oleic acid 3P-I159
oligosaccharide 4P-H092
omics 2S-Ca04
OmpA 2P-G028
one-dimensional alignment 2P-N225
one-step RT-PCR 2P-J231
Optogenetics 3P-J217
organ cells 3S-Gp03
organic acid 2P-N120, 2P-N121, 3P-G016
Organic composition 3P-J221
organic dye 2P-N182
organic materials 4P-H109, 4P-H124
organic solvent 2P-N185
organogels 4P-J209
Organs-on-a-chip 3S-Gp06, 3S-Gp07, 4P-N182
Orobanche minor 4P-I159
orotic acid 2P-H077
orsellinic acid 2P-G052

Oryza sativa 2P-E035
oscillator 3P-J213
osmotorelant 3P-F203
oxalic acid 4P-G062
Oxaloacetate 3P-H073
oxidative stress 3P-N001, 3P-E069, 3P-H117, 4P-I168
oxidized cholesterol 3P-N169
oxidoreductase 4P-I146
2-oxoglutarate 2P-N021
oxygen sensing 4S-Aa01
oxygenase 3P-I121
oyster shell 4P-H117

P

P(3HB-*co*-3HHx) 2P-N161
P/Ag/Ag_2O/Ag_3PO_4/TiO_2 photocatalyst 4P-H116, 4P-I140
P450 3S-Ap01
pancreatic islet 4P-I168, 4P-I176
Paneth cell 3S-Bp04
paper-based analytical device 4P-J194
papillomavirus 2P-E065
paraoxon 3P-I133
parasitic plant 4P-I159
parasitic weed 2P-H092
Particle Induced X-ray Emission 2P-N187
partition 3P-I178
passage culture 4P-N055
pathogenic expression 2P-J209
pathway engineering 3P-H082
PC12 2P-J180
pear 2P-N126
PEG 4S-Da05
Penicillin 3P-J229
Penicillium 3P-N127
1,3-pentanediol 2P-F167
pentose phosphate pathway 3P-I143
pepA 4P-H094
peptide 2P-I138, 2P-J186, 2P-J207, 3P-J232, 3S-Bp03, 3S-Cp02, 4P-J215, 4P-F216
peptide array 2P-J230, 4P-F213, 4P-J214
peptide bond formation 3P-G027
peptide chip 4S-Ca04
peptidomics 2P-N137
peptidyl transferase 3P-G051
periodontopathogenic bacteria 2P-N001
peroxidase-like activity 2P-J226
peroxisome 2P-I119
persister 2P-G031
PET 4S-Aa04
PEX22 2P-I119
ph sensing 4S-Aa01
PHA 2A-Bp01, 2P-I159, 2P-I160, 2P-I162, 3P-J235, 4P-N205
PHA synthase 2P-I162, 2P-I163
PhaC box 2P-N033
phage 4P-G007
phage display 2P-H067, 2P-J186, 3P-H061
phagocytosis 2P-J208, 3P-E057
Phanerochaete sordida 3P-I149
Phanerochaete sordida YK-624 2P-I158
Phanerochaete sp. K-20 3P-F147
pharmaceuticals 3S-Ca01
phase separation 3P-N168, 3P-N169, 4P-N220
Phe510 2P-G051
phenolic compounds 4P-N162
phenotype 3P-G024, 3P-I150
phorbol ester 3P-J233
phosphate 2P-N004
phosphate accumulating microbes 2P-N188
phosphatidylthreonine 2P-E042
phosphite 2P-H096, 2P-H097
phosphite dehydrogenase 2P-H096, 2P-H111, 3P-J235
phospholipase D 2P-E042, 2P-G043
phosphorous 2S-Da05
phosphorylation 3P-H064
photo-cleavable linker 2P-J230
photobioreactor 3P-N187, 3P-J188
photocatalyst 2P-I166, 3P-G030
photocatalytic degradation 2P-N182
photocatalytic pretreatment 4P-I140
Photoresponsive polymer 4P-I177
photosynthetic bacteria 2P-J179, 3P-E092, 3P-J185, 3P-J188, 4P-N066
photosynthetic bacteria beads 3P-I137
photosystem II 2P-G006, 3P-H091
phytopathogens 4P-J197
Pichia farinosa 2P-G057
Pichia pastoris 3P-G004, 3P-I175
pigment 2P-I155, 4P-I156
Pimelobacter 4P-N031
plankton 4P-N155
plant 2P-J179
plant activator 2S-Hp04
plant and animal cells 1A-Wp01
plant cell 4P-J186
plant cell culture 3S-Ap01, 3S-Ap04, 4P-N162
plant cultivation 2P-N095
plant factory 3S-Ap04
Plant growth 4P-N158
plant growth promoting bacteria 2P-N095
Plant growth regulators 4P-N160
plant growth-promoting bacteria 4P-N135, 4P-N136
Plant microbial fuel cell 4P-N148
Plant pathogen 4P-H111
planteose 4P-I159
plasmid 2P-G013, 3P-G010
plasmid retention 3P-G004
Plasmodium falciparum 2P-H063
plastic antibody 2S-Dp04
PLSR 4P-G068
PMMA-tag 4P-N043
PNIPAM 3P-J207
pollen grains 2P-N187
poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) 3P-H084
poly(lactide) 2P-I162
poly-epsilon-lysine 4P-J209
poly-gamma-glutamate 2P-G012
poly-gamma-glutamic acid 2P-N128, 3P-H064
polyamine 2P-G009, 3S-Dp02
polyhydroxyalkanoate 2P-I159, 2P-I160, 2P-I163, 3P-H084, 3P-H085
polyketide 3S-Da05
Polylactide 3P-J236
polyphenol 3S-Dp05
Polypheonls 3P-H066
polyphosphate 4P-H105
Polyprenylacetone 4P-J199
polysaccharide 4P-N204
polyunsaturated fatty acid 4P-I179, 4P-F202
polyunsaturated fatty acid synthase 4P-F202
polyurethane 2P-J196
polyurethane nanofiber 2P-N210
porous compact 3P-N034
porous material 3P-N033
post-translational modification 4P-G026, 4S-Ca03
pot 4P-H095
power conversion 4P-I147
precious metal 4P-H122
prediction 2A-Gp01
Prefoldin 2P-J172
PreS1S2GFP 2P-J206
pretreatment 2P-J191, 3P-I126
principle component analysis 3P-I141
prion 2S-Hp05
probiotics 2S-Ca03, 3P-H081
process system simulation 4S-Ba03
production 2P-H077, 2P-E082, 2P-H087, 3P-N093, 4P-H080
proline 4P-G024
Prolixibacter denitrificans 2S-Ba02
prolyl oligopeptidase 3P-G027
promoter 3P-I177
propagation models 1A-Wp01
1,3-propanediol 2P-H080, 2P-H081, 3P-H086
propeptide 4P-N031
prostaglandin 3P-N219
protease 2P-I139, 2P-J230, 4P-H094
protein 2A-Dp01, 2P-H073, 3P-H116

protein adsorption 2P-N210
protein denaturation 2P-F131
protein display 4P-G034
Protein disulfide isomerase 2P-H071
protein engineering 2P-G043, 2P-H060, 2P-H067, 2P-N068, 2P-N069, 2P-H070, 2P-H075, 2P-N204, 2S-Bp01, 2S-Bp04, 3P-G054, 3P-H061, 3P-H063, 4P-N039
protein expression 2P-G006, 2S-Bp01, 3P-J216, 4P-G053, 4P-J188
protein folding 2P-G019, 2P-H060
Protein G 2P-J201
protein interaction 2P-G053, 2P-H073, 3P-N198
Protein L 2P-J201
Protein L chromatography 2P-N202
Protein M 3P-G052
protein nanobuilding block 2P-H075
protein overproduction 3P-G010, 3P-J216, 4P-G051
protein polymer 4P-G012
Protein secretion 3P-I175
protein structure design 2P-H075
protein transduction 2P-N072
protein translation 2S-Bp03
protein-protein interaction 2P-H071
proteome 3P-H089
proteomics 4P-N073, 4P-H074
proteorhodopsin 2P-N032
protocatechuate decarboxylase 2P-J203
proton motive force 2P-G031
protoplast 3P-G018
Pseudanabaena 2P-I154
Pseudomonas 2P-H110, 4P-H112
Pseudomonas aeruginosa 2P-G045
Pseudomonas putida 3P-I157, 4P-G002, 4P-I129
Pseudomounas 4P-G008
Pseudozyma 4P-G032
Pseudozyma hubeiensis 3P-G012
psychrophile 2P-H111, 2P-J198
purification 2A-Dp01, 4P-N204
purple non-sulfur bacteria 2P-H099
pYAN-1 2P-G018
pyrobaculum aerophilum 4P-I145
2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid 2P-H113
pyrroloquinoline quinone 4P-G030
Pyruvate 2P-N192
pyruvate decarboxylase 2P-I158, 2P-J194
pyruvate phosphate dikinase 2P-G039
pyruvate-ferredoxin oxidoreductase 3P-G032

Q

Q-body 3P-G052, 3P-G053
Qdot 2P-H058
qPCR 4P-N134
quality control 2A-Gp01, 3P-J197
quantification 2P-F228
quantum dot 2P-J222
quantum dot nanoprobe 2P-J180
quinone cofactor 4P-G026
quorum quenching 4P-G064
quorum sensing 2S-Hp01, 3P-G031, 4P-G064, 4P-H125, 4P-I126

R

(2*R*)-hydroxyamino acid 4P-E017
radical SAM enzyme 4P-G025
Radioactive substances 4P-N106
radioactivity removal 3P-I137
raft 3P-N169
Ralstonia eutropha 2P-N033, 2P-N161
Ralstonia solanacearum 3P-I128, 4P-I128
Raman microspectroscopy 2P-J193, 3P-J229
randomized controlled trial 2P-F114
rare earth 2P-J186
Rasamsonia emersonii 4P-G021
raw material 4S-Aa03
raw starch 3P-H088
raw sugar 4S-Ba01
reactive oxygen species 3P-E069, 4P-J199
reactor 4S-Aa01
Real-time evaluation 3P-J195
receptor 2P-H073, 3S-Aa05
recombinant production 3P-N187
recombinant protein 2P-N026, 2P-J173
recombinant protein expression 2P-N059
recombinant protein production 2P-G019
Reconstituted *in vitro* transcription-translation system 3P-G050
red tide 4P-N155
redox balance 2P-N121, 3P-H087
redox polymer 2P-J177
redox potential 3P-G028
regenerative medicine 2S-Gp02, 3P-F203
regional energy system 4S-Ba03
regulatory gene 4P-J200
rejuvenation 2P-F174
resistance 2P-G020
Resistant starch 3P-H099
respiratory chain 3P-H080
resveratrol 2P-N184
retrotransposons 2P-J178
reverse transcriptase 2P-J231
reverse transcriptattion-quantitative PCR 2S-Gp03
reward system 3S-Dp04
RGD motif 3P-J190
rheumatic drug 3P-G037
Rhizobacteria 4P-N158
Rhizopus microsporus 3P-I152
Rhizopus oryzae 3P-H074
Rhodobacter 2P-H099
Rhodococcus 2P-G015, 4P-N108
Rhodococcus opacus 2P-G037
Rhodosporidium toruloides 3P-N160, 4P-G061
ribosomal protein 4P-G002
rice 2P-H061, 2P-H062
rice blast fungus 3P-G039
rice husk biochar 4P-I152, 4P-I153
rice straw 2P-N157, 3P-I156
rifampicin resistance 3S-Ba01
Rim15p 2P-I122, 2P-I123
ripening stages 3P-H112
RNA polymerase 2P-G008, 2P-G011, 3S-Ba01
RNA sequencing 4P-N055
RNA-binding protein 4P-G051
RNA-seq 2P-N120, 2P-N121, 2P-I123
root-knot nematode 4P-I137
rotating wall vessel bioreactor 2P-J175
rRNA 2S-Gp03
rubber 3P-I123
Rubber biosynthesis 4P-I163
Rumen bacterial community 4P-I139

S

16S rDNA 4P-H075
16S rRNA gene 3P-J222, 4P-H115
saccharide binding site 2P-H062
saccharification 3P-I146
Saccharomyces cerevisiae 2P-N088, 2P-H089, 2P-I118, 2P-I119, 2P-N120, 2P-I122, 2P-N126, 2P-N127, 2P-N129, 2P-I132, 2P-J170, 2P-J194, 3P-G009, 3P-G010, 3P-H068, 3P-N076, 3P-N103, 3P-H117, 3P-N142, 3P-I143, 3P-N144, 3P-I145, 3P-N163, 3P-J216, 3S-Ba02, 3S-Ba03, 4P-N004, 4P-G051, 4P-N052, 4P-G053, 4P-N055, 4P-G056, 4P-G057, 4P-N059, 4P-N077, 4P-H087, 4P-H088, 4P-H091, 4P-N103, 4P-J210, 4P-F216
sake 3S-Cp01, 4P-H080, 4P-H088, 4P-H091, 4P-H092
Sake brewing rice 3S-Ca03, 4P-H097, 4P-H098
sake cake 2P-I117, 3S-Dp01
sake lees 2P-I118
sake yeast 2P-F114, 2P-I117, 2P-N121, 2S-Hp05, 3P-G010, 3S-Ba02, 3S-Dp01, 4P-H086, 4P-H089
salt selection media 2P-N188
salted fermentation food 2P-G046
Sampling system 3P-G026

sarcosine oxidase 4P-N014, 4P-N015
satreps 2P-J171
scale-up 2S-Gp01
scFv 4P-N043, 4P-G044, 4P-N045, 4P-G047
scFv-Fc 4P-N046
Scheffersomyces stipitis 4P-H078
schiff base 4P-N207
Schizophyllum commune 3P-I165
Schizosaccharomyces pombe 2S-Hp02
Scizosaccharomyces pombe 4P-G058
screening 2P-H060, 2P-H105, 2P-J193, 2S-Bp01, 3P-G021, 3P-N046, 3P-G047, 3P-I125, 4P-F213, 4P-J219
seawater salinity 4P-I141
seaweed 4P-G001
secondary metabolism 2S-Hp03
secondary metabolite 3S-Ap04, 3S-Da02, 4P-G005, 4P-J200
Secondary metabolites accumulation 4P-N160
secondary structure 2P-N210
secreted protein 3P-N013
Secretion 3P-E014, 3P-J236
secretion pathway 3P-J202
secretory production 3P-N011, 4P-G037
selection and screening 3S-Da04
selective fermentation 4S-Ba01
selenium 4P-H101
self-assembling supramolecular nanostructure 2P-H075
self-assembly 2P-G040
self-inducing reactor 3P-I132
SEM 4P-F183
Semen 4S-Ca01
semi-aerobic column 3P-I119
semi-anaerobic column 3P-I119
Sensitive detection 2P-J181
sensor 2P-N211, 2S-Dp04, 3P-E069, 3P-I120, 4P-J215
sequencing 4P-G007
serine protease 2P-G046
SERS 2P-J221
serum sample 3P-F170
shake flask culture 2P-J190
shark antibody 4P-I169
shear stress 2P-J175
Shewanella 2P-N029, 4P-H100
Shewanella oneidensis 4P-E143
shikimate pathway 4P-G029
Shirakami kodama yeast 3P-N001
Shiranuka 2P-H058
shochu 4P-H094
shochu distillery by-product 2P-H090
shochu distillery by-products 2P-H091
shochu distillery wastewater 3P-N100
shochu making 3S-Cp03
short chain fatty acids 3P-J220
shuttle vector 2P-G015, 2P-G018
sigma factor 2P-G008, 4P-N073
signal transduction 3P-G002, 3P-G021, 3P-J199, 3S-Aa05
silent secondary metabolites 4P-J201
silica 2P-G009, 2P-G010
Silica particle formation promoting protein 3P-G059
silicon dioxide 4P-I152
silkworm 2P-H063, 2P-H064, 2P-E065, 4P-J227, 4P-N228, 4P-J229
Silver nanoparticles 2P-J221
simple biocatalysis 2P-J198
Simultaneous saccharification and fermentation 3P-I183
simultaneous saccharification and fermentation (SSF) 2P-N156
single cell 4P-I174, 4S-Da05
Single cell analysis 4S-Da03
single cell level analysis 3P-J217
Single cell metabolomics 4S-Da03
single cell oil 3P-I174
single-cell analysis 2P-J229, 3P-J223, 3P-J227, 3P-J228, 4P-I174, 4P-J190, 4S-Da02
single-use bag 3P-J193
site-directed mutagenesis 4P-G011, 4P-G016
Site-specific gene expression analysis 3P-G026
skin moisture 3P-F109
sludge volume reduction 4P-H118
small molecules 2P-J183
Smart cell industry 2S-Cp03
sMPAID 2P-N220
socio-economic analysis 4S-Ba03
soil 3P-I130
solar light 2P-I166
solid state saccharification 4P-H093
Solid-state culture 3P-G015
solubilization 2S-Bp05
solubilized protein 4P-N031
solvent-intolerant bacteria 3P-I178
somatic hypermutation 4P-G034
sophorolipid 3P-N191
sotolon 4P-H095
Sourdough 3P-H111
soy sauce 3A-Cp01, 3P-H098, 3P-N106, 3S-Cp02, 4P-N085
soybean 2P-I140, 3P-H116, 3P-H117
Soybean curd residue 3P-H066
spatio-temporal analysis 4P-H070
specialized cellulose film 2P-J189, 2P-J191
Specific avtivity 3P-G055
Spectroelectrochemical method 2S-Dp01
spheroid 3P-J196, 4P-I168, 4P-I173
Sphingobium 4P-I130
sphingolipids 4P-N081
Sphingomonas 2P-G018
Sphingomonas subterranea 2P-G027
spider 2S-Aa04
Spinach 2P-N142
spirits 4P-H093
spontaneous mutant 4P-H090
sporamin promoter 4P-I157
spore 2P-G010
SSCF 3P-N144
SSCF(simultaneous saccharification co-fermentation) 3P-I150
ST0452 4P-G011
stability 2P-N069
stable enrichiment 3P-N124
stable isotope probing (SIP) 4P-H114, 4P-H115, 4P-N138
stable supply 3S-Gp03
standalization 3S-Gp03
Staphylococcus aureus 2P-J209
Stem cell culture 3S-Gp05
Stenotrophomonas maltophilia 2P-N004, 2P-N005, 2P-N026
Steptolysin O 3P-N048
sterols 3P-H108, 3P-I148
stochastic mathematical analysis 2P-J209
storage protein 4P-H097
Streptavidin monomer 2P-N059
Streptococcus anginosus 2P-G002
Streptococcus pyogenes 3P-N048
Streptomyces 2S-Hp03, 3S-Da05, 4P-N013, 4P-N027
Streptomyces ficellus 2P-H092
Streptomyces sp. 2P-N047, 4P-N028
stress related compounds 3P-J234
stress resistance 4P-G053, 4P-N077
strontium 2P-N187, 3P-I173
structural analysis 4P-J211
structure determination 2P-G027
styrene monooxygenase 3P-G035
Subcritical water extraction 3P-H066
substrate affinity 4P-N015
substrate binding 2P-G043
substrate specificity 2P-G041, 2P-G043, 3P-G027, 3P-G056, 4P-N014, 4P-N015, 4P-N020
subtilisin 3A-Ap01
subzero temperatures 3P-N162
succinate 2S-Aa02
succinic acid 2P-H100, 2P-E101
sucrose 2P-J170, 3P-H087
suface water 4P-H070
sugarcane 4S-Ba01
sulfated polyphenol 3P-G025
Sulfolobus tokodaii 4P-G011
sulfonamide 2P-N048
Sulfotransferase 3P-G025
sulfur content 3P-H077
sulfur metabolism 2S-Da01

superhydrophilic 2S-Dp05
surfactant 2P-N127
Survival strategy 3P-G031
sweet potato 3S-Cp03, 4P-I157
sweetpotato 4P-I132
Sweetpotato *shochu* 3P-N065
symbiosis 2S-Ba05, 3P-I172, 3S-Hp04, 4P-H076
symptom 2P-J209
Synechococcus 2P-I148, 3P-H089
Synechococcus elongatus PCC 7942 3P-H097
Synechocystis 3P-H095
syngas 4P-N142
synthetic biology 2P-E007, 2P-H109, 2S-Da04, 3P-J213, 3S-Aa01, 3S-Aa02, 3S-Ap02, 3S-Ap05
synthetic biology approach 4P-J194
synthetic genetic circuit 2P-J168
synthetic promotor system 4P-N170
syntrophic fatty acid oxidization 4P-N138
systems biology 4P-H076

T

TALEN 3S-Ba04
tandem mass spectrometer 4S-Ca02
tannase 3P-G038
TCA cycle 2P-N021
telomerase 2P-F174
temperature responsible 3P-J207
temperature sensitive 2P-N033
terminator 4P-G051
termite 3P-I172
terpenoid 3S-Da05, 4P-F198
Tetragenococcus 3P-H098
TGF-beta 2P-N068
Thalassiosira pseudonana 2P-G009
Thermococcus 3A-Ap01
Thermococcus kodakarensis 2P-G009, 2P-G011, 3P-G044
Thermomyces dupontii 4P-G016
thermophile 1A-Wp03, 2P-H108, 3P-G044, 4P-I146
thermophilic archaea 3P-G041, 3P-G042
thermophilic enzyme 4P-G069
thermophilic fungus 4P-G016, 4P-G021
thermostability 2P-G006, 2P-G050, 4P-G018
Thermostabilization 2P-I116
thermostable enzyme 2S-Da03, 3P-E045, 3P-N046, 3P-G047, 4P-N013
thermotolerance 2P-H100, 4P-G061
thioether bond 4P-G025
Thiothric nivea 4P-J223
three-dimentional culture 3P-J206
threonine 3P-F147
time dependent profiling 2P-I135
TiO_2 nanoparticles 2P-N182
Tissue clearing 4S-Da01
tissue engineering 3P-J194, 3S-Gp04, 4P-F181
TLR 2P-I125
toggle switch 2P-J168
TolB 3P-I161
Toll like receptor 9 4P-J212
toxicity 3P-J199, 3S-Gp02, 4P-N155
toxin 4P-N155
toxin regulation 4P-G064
transcription 2P-G008, 2P-G011
transcription factor 2P-N072
transcriptional factor 2P-N164
transcriptional regulator gene 4P-G005
transcriptional regulatory mechanism 4P-J221
transcriptome 2S-Aa01, 2S-Aa04, 3P-G026, 3P-I136, 4P-N185, 4S-Da02
transformation 2P-G028, 3P-G003, 3P-E022
transgenic chicken 4P-I172
translation 4P-J219
translocon 2A-Fa01
transmembrane domain 2P-H073
Transomics analysis 3P-N076
transparency 3P-J205
transparent 2S-Dp05
transporter 2P-H097, 2S-Da05, 4P-N059, 4P-E161, 4P-F216
transposable element 2P-G013
transposon mutagenesis 3P-I123
tree bark 2P-J191
Trichoderma reesei 3P-I146, 3P-I148
Trichoderma sp. 2P-H086
triglyceride 2P-I145, 3P-N011
trimeric autotransporter adhesin 2P-J200
Trp-His 4P-N019
trypsin 3P-J190
tumor 3P-J226
tumor microenvironment 2P-N216
tumor promoter 3P-J233
two component regulatory system 4P-H101
two-phase fermentation system 3P-I178
tyrosinase 2P-N184
tyrosine motif 3P-G021
tyrosol 2P-H105

U

ubiquitination 3P-G017
UDP-GlcNAc 4P-G011
ultra fine separation 2S-Dp03
ultraviolet 4P-I178
uncultured bacteria 2P-J189, 3S-Hp02, 3S-Hp03
unnatural amino acids 2S-Da04
unsaturated fatty acid 2P-G002
unsaturated monomers 4P-N206
UV-irradiation 3P-I126

V

vaccine production 3P-G007
vacuole 2P-N127
vanillin 4P-H096
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 3P-N065
vector autoregressive models 4P-H070
VEGF 2P-N212
vhh antibody 3P-G058
Vibrio 4P-I150
vinegar 3P-N105
4-vinylguaiacol 4P-H096
virus detection 4P-J195
Virus-like particle 2P-H063, 2P-H064, 2P-E065
viscosity 3P-H064
visible light 3P-N167
visualization 3P-G054
VLP 3P-G007
volatile fatty acids 2P-I151, 4P-N138
volatile organic compound 3P-H077
VTC complex 2P-I122

W

waste 2P-I143
waste bioconversion 2P-I144
waste glycerol 2P-I144
wastewater treatment 3P-I136, 3P-I138
water circulation 3P-I118
water purification 3P-I118
water splitting 2P-I166
water treatment 3P-I119
water-in-oil emulsion 3P-I179
water-surface floating microalgae 2P-I147
wetland soil 4P-H114
WFA 4P-J224
wheat bran 2P-I140
whey 3P-N103, 3P-H104, 3P-N105
white-rot fungi 3P-F147
white-rot fungus 3P-I184
white-rotting fungi 4P-I151
whole cell biocatalyst 2P-G037
whole genome amplification 3P-J223
wood biomass 3P-I151
wood decay 3P-I184
wool 3P-J205
wound healing 4P-N218

X

Xanthomonas campestris 4P-G009
Xanthophyllomyces dendrorhous 3P-I182
Xiaoqu-mijiu 4P-H093
xylanase 2P-J171, 3P-I146, 3P-N153
xylitol 2P-H089, 3P-F181, 3P-I182,

4P-G054
xylitol yield 4P-G057
xylose 3P-N075, 3P-I145, 3P-I150
xylose fermentation 3P-H074
xylose metabolism 4P-G057

Y

Yarrowia lipolytica 2P-H076
yeast 2P-I115, 2P-I130, 2P-F131, 3P-G002, 3P-G003, 3P-N005, 3P-N011, 3P-G012, 3P-N075, 3P-H104, 3P-H111, 3S-Cp01, 3S-Dp03, 4P-N052, 4P-H078, 4P-N085, 4P-H087, 4P-J225
yeast cell wall 2S-Hp04
yeast-like fungus 4P-G050

Z

Zenbei Kawakami 3S-Cp04
zeolite 4P-H117
Zika virus 2P-J222
zoonotic 4P-G007
zwitterionic 3P-J207
Zygosaccharomyces 2P-I115
Zygosaccharomyces rouxii 3A-Cp01
Zymomonas mobilis 3P-N105

ランチョンセミナー

本大会でのランチョンセミナーは事前予約制で行います．申し込み締め切りは，8月29日（火）です．あらかじめ大会ホームページより希望日のランチョンセミナーを予約してください（定員になり次第締切ります）．事前登録をされた方は，登録後に送られる通知メールを印刷してご持参ください．当日は，10:30までに大会受付で通知メールをご呈示の上，整理券をお受け取りください．混乱を避けるため11:35までには各ランチョンセミナー会場へお越しください．10:30までに整理券に引き換えなかった場合，事前予約されたランチョンセミナーに参加できなくなる可能性があります．あらかじめご了承ください．なお，当日空席がある場合に限り，予約なしでも入場できる可能性がありますので，10:30～11:30までは大会受付，11:30以降は講演会場にお越しください．

9月12日（火）（11：45～12：45）

2L-G01　東ソー株式会社　　**52号館2階　G会場**
バイオ医薬品生産における品質制御～細胞から抗体まで

2L-H02　アジレント・テクノロジー株式会社　　**52号館2階　H会場**
定量メタボローム解析のためのGC/MS Calibration-Curve-Locking Databaseの構築

2L-I03　タカラバイオ株式会社　　**52号 館3階　I会 場**
CRISPR/Cas9のA to Z

2L-J04　パラミロン研究会　　**52号 館3階　J会 場**
パラミロンの健康機能に関する可能性について

9月13日（水）（11：45～12：45）

3L-E01　エッペンドルフ株式会社　　**52号館1階　E会場**
ここまで進んだ培養装置：インキュベーターシェーカーとジャーファーメンター

3L-G02　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　　**52号館2階　G会場**
酵母の代謝解析から見えてきた，ビールのオフフレーバー生成機構

3L-H03　日本ウォーターズ株式会社　　**52号館2階　H会場**
麹甘酒に含まれる成分と機能解析について

3L-I04　株式会社島津製作所　　**52号 館3階　I会 場**
サルファーインデックス　食品中の硫黄化合物で微生物の働きや酸化度を評価する

3L-J05　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　　**52号 館3階　J会 場**
幅広い化合物情報を取得するための最新質量分析技術

9月14日（木）（11：45～12：45）

4L-H01　三洋貿易株式会社　　**52号館2階　H会場**
研究開発から生産まで　Cultivation Systems

4L-I02　公益財団法人かずさDNA研究所　　**52号 館3階　I会 場**
かずさDNA研究所の包括的な技術支援―NGS，バイオリソース，メタボロミクス，データ解析―

4L-J03　高機能遺伝子デザイン技術研究組合　　**52号 館3階　J会 場**
長鎖DNA合成技術による高機能遺伝子デザインの可能性

The Society for Biotechnology, Japan / Annual Meeting 2017

第 69 回 日本生物工学会大会

東ソー ランチョンセミナー

TOYOPEARL
TSKgel

9月12日(火) 11:45 – 12:45

G 会場 (52 号館 202 室)

演題 バイオ医薬品生産における品質制御～細胞から抗体まで

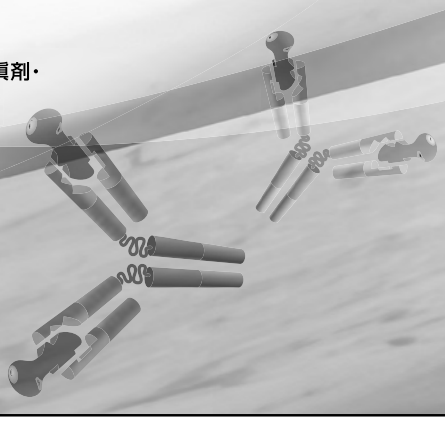
演者 **大政 健史** 先生

(大阪大学大学院工学研究科教授・徳島大学客員教授・神戸大学客員教授)

バイオ医薬品は、その高機能性と薬効の高さに注目されがちではあるが、その生産の難しさにも特徴がある。バイオ医薬品の製造プロセスの多くはまさに生体そのものである生物(微生物、動物細胞等)を利用する手段が用いられている。言い換えれば、これらを生産する手段は、「生きた生物を用いる」生物反応であるため、生物そのものを人工的に操作する必要がある。逆に言えば、生物そのものの不確定性や、生産物が持つ本質的な不均一性などを解決し、Rationalなデザインを実現していくことが真に求められている必要な技術である。特に高等真核生物は、複雑な分子も生産可能であるが、用いられる工業用生物が複雑であればあるほど、その生物自身を自在に操って生産させ、さらにこれを統括する技術も高度なものが求められる。

これらの背景を受けて、小生がプロジェクトリーダーとなってAMED「国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術」プロジェクトを開始しており、このプロジェクトの実行推進の目的で次世代バイオ医薬品製造技術研究組合が設立されている。本講演ではこのプロジェクトのうち、セルエンジニアリングとその品質分析に関する事柄を中心に開発された技術と今後の課題について紹介する。

その他、東ソー株式会社より、新規抗体精製用アフィニティー充填剤・抗体定量用カラムのご紹介をさせていただきます。



TOSOH 東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部

本 社／〒105-8623 東京都港区芝3-8-2 芝公園ファーストビル
TEL 03-5427-5180 FAX 03-5427-5220
大 阪 支 店 ☎ (06) 6209-1948 名古屋支店 ☎ (052) 211-5730
福 岡 支 店 ☎ (092) 781-0481 仙 台 支 店 ☎ (022) 266-2341
山口営業所 ☎ (0834) 63-9888
http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/

M1706GX.A

第 69 回 日本生物工学会
アジレント・テクノロジー ランチョンセミナー

9 月 12 日（火）11 : 45 – 12 : 45
H 会場 52 号館　204 室
セミナー番号 : 2L-H02

演 題

定量メタボローム解析のための GC/MS Calibration-Curve-Locking Database の構築

メタボローム解析においては、分析対象が多岐にわたることから、
その都度それぞれの代謝物の検量線を作成することはコスト、
労力の面から非常に困難であり、定量的なデータの取得はほとんどできていないのが実情である。
ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）においては、
質量分析計の検出感度比が一定となるように調整するターゲットチューニング
を用いることで、事前取得した検量線データベースに基づいて代謝物濃度を
導出する半定量法が可能とされている。
この手法は、Calibration Curve Locking Database（CCLD）と呼ばれ、
法医学・環境分析・農薬分析の分野で実際に利用されている。
本研究では、定量メタボローム解析のための新たな GC/MS 手法の開発に取り組み、
リテンション、MS スペクトル情報、検量線情報等を格納した
新規定量メタボローム解析用 CCLD を構築した。

演 者

九州大学 生体防御医学研究所
馬場　健史 先生

アジレント・テクノロジー株式会社
TEL : 0120-477-111　email_japan@agilent.com

Agilent Technologies

第69回日本生物工学会大会

2L-I03

CRISPR/Cas9のA to Z

–原理と実施例、そして成功率と効率Upに繋がる製品のご紹介–

2012年に登場したゲノム編集技術「CRISPR/Cas9」はその簡単さと高い汎用性から、基礎的なバイオサイエンス分野だけでなく、医薬や農林水産開発など産業分野にも大きなインパクトを与えました。
ほとんどすべての生物種で使えることから、CRISPR/Cas9は分野や研究目的を問わず、必須な技術の一つになったと言っても過言ではなく、そのニーズと重要性は日々高まっています。
本セミナーでは、これからCRISPR/Cas9による遺伝子改変を始めたいという方のために、「自分でもできる」というイメージを掴んでいただけるよう原理や分かりやすい実施例をご紹介します。
また、すでにCRISPR/Cas9を行っている方にも役立つ、失敗リスクを減らし目的遺伝子改変体の取得効率Upに繋がる様々な製品をご紹介します。特に先日新発売となったノックインドナー用長鎖一本鎖DNA（ssDNA）調製キットは、従来法に比べて圧倒的に操作が簡単でしかも収率も高いため、ノックイン効率を少しでも向上させたい方に最適です。
これからCRISPR/Cas9を始める方だけでなく、少しでも成功率と効率をUpさせたい方は、ぜひタカラバイオセミナーにご参加ください！

日　時：9月**12日**（火）11：45-12：45

会　場：早稲田大学　西早稲田キャンパス
　　I 会場（52号館　302室）

演　者：栗田　豊久（タカラバイオ株式会社　営業企画部）

タカラバイオ株式会社

東京支店　TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
TakaRaテクニカルサポートライン
　　TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

that's GOOD science!™

Clontech TaKaRa cellartis

パラミロン研究会

第 69 回　日本生物工学会大会

パラミロン研究会

ランチョンセミナー

日時　9月１２日（火）　11:45 ～ 12:45

場所　Ｊ会場（早稲田大学　５２号館　３０４室）

パラミロンの健康機能に関する可能性について

パラミロンとはユーグレナ属だけが産生する多糖で、ユーグレナ属の細胞内に顆粒として存在しています。非常に珍しい物質であり古くから研究されていますが、その機能性についてはまだ解明されているとは言えません。本講演では、パラミロンの新たな健康機能を探求する研究組織としてパラミロン研究会を発足させた経緯及び、新たな研究により示唆された機能性について紹介いたします。

パラミロン電子顕微鏡写真

演者　矢澤　一良

早稲田大学　ナノ・ライフ創新研究機構
規範科学総合研究所ヘルスフード科学部門　研究院教授

青江　誠一郎

大妻女子大学　家政学部　学部長
食物学科　教授

eppendorf

Luncheon Seminar

Let's Get Together!

9 月 13 日（水）11:45 ～ 12:45　E 会場（52 号館 101 室）　セミナー番号 3L-E01

ここまで進んだ培養装置：インキュベーターシェーカーとジャーファーメンター

お昼を食べながら菌体培養に思いを馳せてみませんか？
普段は気に留めない培養装置ですが、弊社製品には、より快適に安心してご使用いただくために、独自の技術と工夫が隠されています。
本セミナーではインキュベーターシェーカーと卓上ジャーファーメンターを題材にして、それらの特長と、使用にあたってのメリットをご紹介します。

Contact: info@eppendorf.jp / www.eppendorf.com
エッペンドルフ株式会社 101-0031 東京都千代田区東神田 2-4-5　Tel: 03-5825-2361　Fax: 03-5825-2365
eppendorf® and the Eppendorf logo are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany.
All rights reserved, including images and graphics. Copyright © 2017 by Eppendorf AG.

第 69 回日本生物工学会大会

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社ランチョンセミナー

2017年9月13日（水）11：45〜12：45　　3L-G02

G会場　52 号館 202 室

酵母の代謝解析から見えてきた、ビールのオフフレーバー生成機構

アサヒビール株式会社　酒類技術研究所　　野場 重都様

2-mercapto-3-methyl-1-butanol(2M3MB) はタマネギ様の香りのする含硫化合物で、ビールにおいては、ビール原料であるホップ由来のオフフレーバー（異臭）である。ホップ由来のため、ビールからしか検出事例のない特殊な香気成分であり、ビール業界においては、古くから低減策が模索されてきた。近年、我々は 2M3MB の前駆体をホップから精製し、同定することに成功した。2M3MB 生成挙動を追跡したところ、前駆体がビールの発酵中に酵母によって代謝され、2M3MB が生成することが明らかとなってきた。

本セミナーでは、企業における研究事例として、酵母の代謝解析から見えてきた 2M3MB 生成機構について、仮説も含めて紹介したい。発酵試験条件を変えて、HMT 社の CE-MS 解析を実施し、酵母中の代謝物を網羅的に測定した。その結果、酵母の硫黄代謝が 2M3MB 生成に大きく関与していることが明らかとなった。本研究については、ビールの国際学会である World Brewing Congress 2016、European Brewery Convention meeting 2017 にて報告した。

第69回日本生物工学会
日本ウォーターズ株式会社

ランチョンセミナー

日時：9月13日（水）11:45～12:45
会場：H会場（52号館 204室）

セミナー番号 3L-H03

八海醸造株式会社 研究開発室 室長　倉橋 敦 様

【演題】

麹甘酒に含まれる成分と機能解析について

甘酒は、日本の伝統的な甘味飲料です。発酵食品全般の美味しさや健康機能が見直される中、麹甘酒の魅力も再認識されています。しかしながら、意外なほど麹甘酒の研究報告が少ないのが現状です。八海醸造では麹甘酒メーカーの責任として、科学的根拠に基づいた情報提供を行っていきたいと考えています。本セミナーでは、麹甘酒に含まれる成分をLC/MSを用いて分析を行い、網羅的に解析した結果について紹介いたします。

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第5小池ビル　TEL 03-3471-7191（代表）FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル 11F　TEL 06-6304-8888（代表）FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
サービス拠点　東京　大阪　札幌　福島　静岡　富山　名古屋　徳島　福岡

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

SHIMADZU
Excellence in Science

第69回 日本生物工学会大会

株式会社島津製作所

ランチョンセミナー

日時 9月 13日(水) 11:45～12:45

場所 Ⅰ 会場 (52号館302室)

セミナー番号 3L-I04

サルファーインデックス 食品中の硫黄化合物で 微生物の働きや酸化度を評価する

土壌微生物叢は種々の化合物を媒体として植物と相互作用し、生育に重要な役割を果している。その一つとして「硫黄」が挙げられる。地球規模での循環を考えると、微生物・植物のみが土壌中の無機性硫黄化合物を取り込み、有機性硫黄化合物(システイン(Cys)、メチオニンなど)に固定するが、これらの有機性硫黄化合物の中でCys、グルタチオン(GSH)、エルゴチオネイン(ERG)などは優れた抗酸化機能を持つ。中でも、ERGは多くの生物に存在するが、動物や植物は生合成できず、キノコなどの菌類と一部の細菌のみが合成する。そのため、植物・動物のERG摂取は、完全に土壌微生物に依存している。従って、農産物を原材料とする食材・発酵食品のERGの含量を測定することで、関与した微生物叢の特性を把握することができる。本セミナーでは、甘酒、チーズ、ビール、納豆、ヨーグルトなどの発酵食品や野菜中のERGをはじめとする有機性硫黄化合物のプロファイル解析、関与する微生物種の特性についての推察について報告する。

演者 大津 巌生 先生
筑波大学・奈良先端科学技術大学院大学・株式会社サルファーインデックス

thermo scientific

第69回日本生物工学会大会 ランチョンセミナー 3L-J05

幅広い化合物情報を取得するための最新質量分析技術

～代謝を理解するターゲット分析と未知有用代謝物を見出すノンターゲット分析～

演 者　高原　健太郎
サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー&MS事業部　マーケティング部

日 時　2017年9月13日(水) 11:45～12:45

会 場　J会場(52号館 304室)

生物工学研究で生じる“主要代謝の理解”と“有用物質の検出・同定”に関して、当社が提供する質量分析計解析手法を実用例とともにご紹介いたします。

―主要代謝物を分析するためのメソッドパッケージ

物質生産を担う主要代謝物の分析は、多くの生物工学研究に有用な情報をもたらす一方、分析法を一から立ち上げるには非常に労力がかかります。新規に分析を導入された方でも迅速に結果を得ることができるよう、当社はGC Orbitrap™およびLC Orbitrap用にそれぞれ開発したメソッドーパッケージを提供しております。さらに分析初心者向けの前処理から解析までカバーする簡易分析キットについても測定例とともにご紹介します。

―ノンターゲット分析を成功させるクロマトグラフ

生体試料、食品試料、培地成分などの多様な化学特性をもつ混合物において、多岐にわたる化合物を広い濃度範囲で測定するノンターゲット分析では、優れたクロマト分離が欠かせません。妥協なく優れた分離が可能なThermo Scientific™ Vanquish™ UHPLCシステムと極性化合物の保持・異性体分離に優れたイオンクロマトグラフシステムをご紹介するとともに実際の分離プロファイルとともをお示しします。

―質量分析データから最大限に情報を引き出す解析ソフトウェア

最新の質量分析計のデータは大容量で多くの情報をもたらしますが、マニュアル解析でデータの全体像を把握するのは困難です。低分子解析ソフトウェアThermo Scientific Compound Discoverer™は、得られた成分情報を抽出し、質量から分子組成式や化合物と結び付けマニュアル解析を自動化します。さらにMS/MSスペクトルを集積した無料のWebサイト“mzCloudライブラリ(https://www.mzCloud.org/)”により、スペクトルマッチングから化合物同定だけでなく部分構造推定が可能になります。

本セミナーでは、これから質量分析装置の導入を検討する研究者に、測定系の立ち上げをどのように加速できるか、また解析データからどのような結果が期待できるかについてご提案いたします。

© 2017 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS108_A1706SO
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL：0120-753-670　FAX：0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com
facebook.com/ThermoFisherJapan　@ThermoFisherJP
www.thermofisher.com

ThermoFisher SCIENTIFIC

SANYO
TRADING CO.,LTD.

applikon®
BIOTECHNOLOGY

第69回 日本生物工学会大会

三洋貿易株式会社 / アプリコンバイオテクノロジー

ランチョンセミナー

9月14日（木）11:45～12:45
H会場（52号館204室）4L-H01

（新製品）ラベルフリー生細胞
イメージングモニターシステム iLine F

研究開発から生産まで
Cultivation Systems
From Discovery to Production

蘭国Applikon Biotechnology社は、
ラボスケールからプラントスケールでの細胞培養装置、
バイオプロセス機器におけるリーディングカンパニーの一つであります。

本講演では、次の特長ある新製品群を実例を挙げて紹介いたします。

- （新製品）24ウェルマイクロバイオリアクタ microMarix
- （新製品）ミニバイオリアクタ MiniBio
- （新製品）アコースティック（音響共鳴）バイオシェーカー RAMBio
- （新製品）ラベルフリー生細胞イメージングモニターシステム iLine F

三洋貿易株式会社
科学機器事業部
〒101-0054 東京都千代田区神田錦町２丁目 11 番地
TEL 03-3518-1196 FAX 03-3518-1237
e-mail: info-si@sanyo-trading.co.jp
URL: http://www.sanyo-si.com

Kazusa DNA Res. Inst.

第69回 日本生物工学会大会

公益財団法人

かずさDNA研究所

ランチョンセミナー

日時: ９月１４日（木）11：45～12：45

場所: Ⅰ会場（52号館 302室）

かずさDNA研究所の包括的な技術支援

－NGS,バイオリソース,メタボロミクス,データ解析－

かずさDNA研究所は、2007年10月に「バイオ産業技術支援センター」を設立しました。当センターでは、1994年10月開所以来蓄積された研究成果やクローンなどの成果物、さらに研究過程で得られた各種の技術的なノウハウ等を利用して大学・公的機関及び民間企業への技術支援を行い、加えて、バイオ産業の発展を支援する新しい技術開発を遂行してきました。

本セミナーでは、今年設立10周年を迎えたバイオ産業技術支援センターがこれまでに進めて来た、遺伝子解析から成分分析まで多岐にわたる包括的な技術支援活動内容をご紹介いたします。

長谷川 嘉則 /バイオ研究開発部　DNAシークエンシングチーム長
山川 央 /バイオ研究開発部　バイオリソースチーム長
鈴木 秀幸 /バイオ研究開発部 機器分析グループ長

公式マスコット
ダーナ

公益財団法人 かずさDNA研究所 バイオ産業技術支援センター
0438-52-3900（代表）
http://www.kazusa.or.jp
biosup@kazusa.or.jp

4L-J03

第69回日本生物工学会大会

高機能遺伝子デザイン技術研究組合ランチョンセミナー

2017. 9/14（木）
11:45 ～ 12:45

J 会場　早稲田大学 西早稲田キャンパス ５２号館 ３０４室

長鎖DNA合成技術による高機能遺伝子デザインの可能性

座長

慶應義塾大学先端生命科学研究所　板谷光泰

演者

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科　柘植謙爾
プレシジョン・システム・サイエンス株式会社　鈴木武尊
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科　石井　純

合成生物学の進展に伴い、複数の遺伝子からなる長鎖DNAを設計し、合成し、導入することで、有用物質生産性を向上させる、などの長鎖DNAを用いた生物の高機能化に近年関心が集まってきています。これを実現する長鎖DNAの合成技術、自動化技術、長鎖DNAの活用例などについて、3人の講師にご講演いただきます。

Technology Research Association of Highly Efficient Gene Design

TRAHED
高機能遺伝子デザイン技術研究組合(TRAHED)
Technology Research Association of Highly Efficient Gene Design
http://www.trahed.or.jp/

第69回　日本生物工学会大会講演要旨集

二〇一七（平成29年度）

日本生物工学会

第 69 回日本生物工学会大会講演要旨集

2017 年 8 月 8 日発行

発行所　公益社団法人 日本生物工学会
〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1
大阪大学工学部内
TEL. 06-6876-2731　FAX. 06-6879-2034
E-mail: info@sbj.or.jp
https://www.sbj.or.jp

● 表紙写真について ●

大隈重信像と早稲田大学大隈記念講堂